

# 花生簇葉病病原菌質體 *rpoC* 基因之選殖與分析

林啓揚<sup>1</sup> 陳武揚<sup>1</sup> 林長平<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 臺北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

<sup>2</sup> 聯絡作者，電子郵件 cplin@ntu.edu.tw；傳真：+886-2-23661980

接受日期：中華民國 95 年 6 月 5 日

## 摘要

林啓揚、陳武揚、林長平. 2006. 花生簇葉病病原菌質體 *rpoC* 基因之選殖與分析. 植病會刊 15 : 129-138.

本研究在於進行花生簇葉病菌質體 *rpoC* 基因之選殖與基因序列之分析。基因篩選的策略為先行比對革蘭氏陽性細菌之 *rpoC* 基因的核酸及胺基酸序列，找出其保守性區段後設計出簡併式 (degenerate) PCR 引子對 Frpoc1/ RrpoC1，再以感染花生簇葉病之日日春植株全 DNA 為模版增幅出一 1.8 kb 大小含有 *rpoC* 基因部分序列之 PCR 產物以作為探針，並利用在一般原核生物中位於 *rpoC* 上游之 *rpoB* 與位於下游之 *rpsL* 基因之序列，以 chromosomal walking 的方式選殖出 *rpoC* 兩端之基因片段，如此共完成包含 *rpoB* 3'端、*rpoC* 及 *rpsL* 5' 端之 4,817 bp 序列之選殖與定序。在核酸序列中從 nt 201- 4,340 具有一完整之 ORF1，並可推行轉譯出 1,379 個胺基酸序列，其胺基酸序列經比對後發現與其他細菌之 *rpoC* 基因之胺基酸序列具有相似性。將此一 *rpoC* 可能基因之胺基酸序列與 *E. coli* K12 之 RpoC, *Saccharomyces cerevisiae* 之 RPO21, 及 *Drosophila melanogaster* 之 RNA polymerase II 215 KD subunit RPII215 之胺基酸序列做比對，在八個具保守性的區域中，發現在 C, D, G 等區域具有較高之相似度。另外由胺基酸序列行預測功能上之推估比較，發現所選殖出的花生簇葉病菌質體 *rpoC* 基因在功能上並沒有退化演化的跡象，此可能乃因每一個功能區在基因轉錄的運作上均有其必要性。經南方雜配反應 (Southern hybridization) 顯示 *rpoC* 基因在花生簇葉病菌質體應是 single copy 或 low copy number。此外，由北方雜配反應與 RT-PCR 之結果亦證實所選殖之花生簇葉病菌質體 *rpoC* 有轉錄成 mRNA。

關鍵詞：花生簇葉病、植物菌質體、*rpoC* 基因

## 緒言

植物菌質體 (phytoplasma) 為革蘭氏陽性菌 (Gram-positive bacteria)，缺乏細胞壁，侷限於植物韌皮部造成眾多植物病害，可經由葉蟬 (leafhopper)、飛蝨 (planthopper) 或木蝨 (psylla) 及嫁接 (graft) 等方式傳播。花生簇葉病 (peanut witches' broom, PnWB) 在臺灣澎湖及苗栗首次被發現，Yang 於 1988 年根據 DAPI (4',6 - diamidino -2- phenylindole) 螢光染色加上電子顯微鏡觀察，並利用菟絲子 (dodder, *Cuscuta australis*) 與南斑浮塵子 (*Orosius orientalis*, Matsumura) 傳播等方式鑑定，證明其係由植物病原菌質體所引起的病害<sup>(1)</sup>。

遺傳物質 DNA 上的遺傳密碼是否能順利轉錄

(transcribe) 成 RNA，RNA 聚合酵素 (RNA polymerase) 扮演著極重要的角色，在原核生物中其係由五個亞單位所建構之巨大聚合物 ( $\alpha_2 \beta \beta' \sigma$ )，且每個亞單位 ( $\alpha \beta \beta'$  及  $\sigma$ ) 都具有特殊的功能以維持整體酵素之正常運作。其中以  $\beta'$  (RpoC) 亞單位之分子量為最大，且  $\beta'$  關係到 RNA 聚合酵素與 DNA 鍵結的穩定性。學者將 yeast 與 *Drosophila* 之 RNA 聚合酵素 II (RNA polymerase II) 與其他生物之 RNA 聚合酵素作比對，發現 yeast 與 *Drosophila* 之 RNA 聚合酵素 II 除了和其它真核生物之 RNA 聚合酵素 I 具有高度保守性外，另外還與原核生物之 *E. coli rpoC* 具有高度相似性，並從胺基酸序列中歸納出 A-H 八個具保守性的區域<sup>(2, 3, 13)</sup>，故

依據此一特性分析植物菌質體 *rpoC* 基因之該對等區域，便可進一步瞭解在執行基因轉錄時所需要的序列與功能。另外 *rpoC* 基因之核酸與胺基酸序列長度較長，且具一定之保守性，故在原核生物間也具有探討親緣關係的價值<sup>(6, 14)</sup>，並能提供相當豐富的資訊以供瞭解植物菌質體基因密碼的利用情形。

本研究即在於進行花生簇葉病菌質體 *rpoC* 基因之選殖與其基因序列之分析，篩選基因的策略乃先收集其他原核細菌 *rpoC* 基因之核酸及胺基酸序列，找出保守性區段並設計多種 PCR 引子對，利用 PCR 增幅出健康與罹病植物之差異性片段，並利用一般在原核生物中相對於 *rpoC* 之上下游基因之序列，以 chromosomal walking 的方式選殖出 *rpoC* 兩端之基因片段，以完成 *rpoC* 全長核酸序列之選殖與定序，並進一步分析其序列特性，以期能對植物菌質體在轉錄方面有更進一步的認識。

## 材料與方法

### 試驗植物之繁殖與全 DNA (total DNA) 及全 RNA (total RNA) 之純化

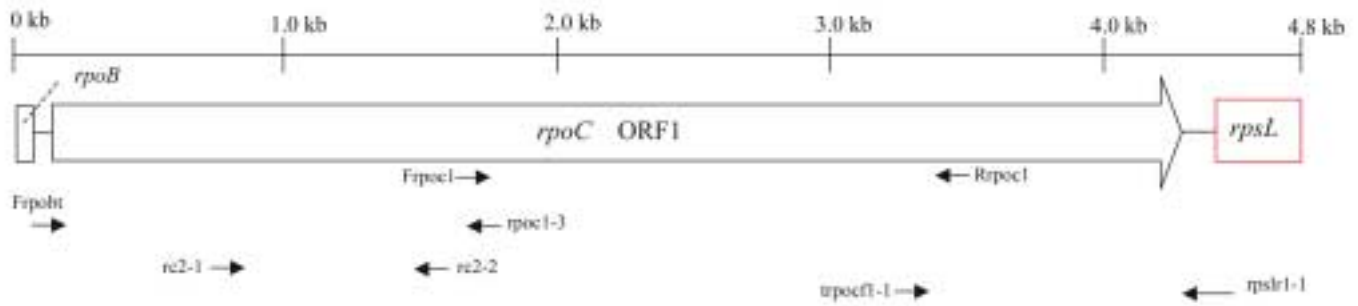
本實驗以日日春 (*periwinkle, Catharanthus roseus*) 作為試驗植物來繁殖植物菌質體，病原菌的繁殖乃利用旁嫁接法 (side graft) 將植物菌質體由罹病日日春傳入健康日日春中。植物全 DNA 之抽取方法主要乃參考 Ko 等人的方法進行<sup>(15)</sup>；全 RNA 之抽取則利用 Verwoerd 等人之方法進行<sup>(18)</sup>。

### 花生簇葉病菌質體 *rpoC* 基因篩選用核酸探針 (probe) 之製備及 *rpoC* 全長序列之選殖

由 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中收集各細菌 (eubacteria) *rpoC* 基因的核酸序列與胺基酸序列，其 GenBank 登錄號碼標示於括號中，其中包括：*Bacillus subtilis* (NC000964), *Mycoplasma penetrans* (NC00443), *Mycoplasma genitalium* (NC000908), *Bacillus anthracis* str. Ames (NC003997), *Streptococcus pneumoniae* R6 (AE008542), *Bacillus anthracis* (X89230), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* N315 (AP003130), *Bacillus halodurans* (AP001507), *E. coli* K12 (NC000913)，將該等核酸及胺基酸序列以 ClustalX 1.81 軟體進行比對，找出此基因保守性較高且相距有數百鹼基 (base) 的數個區域，據此設計出簡併式 (degenerate) PCR 引子對 Frpoc1 (5'-

AATTTTRTTRGGHAAAMGVG-3') 和 RrpoC1 (5'-WGGTTCACCRATWGATTG-3')。進行 PCR 時，於聚合酶連鎖反應器 (GeneAmp PCR System 2400/ 2700, Applied Biosystems, Foster City, CA) 中進行，在本研究中各 PCR 反應之模版 DNA 濃度為 50 ng，兩引子反應濃度各為 0.5  $\mu$ M，以 94°C 30 秒 (denaturation)，45°C 1 分鐘 (annealing)，72°C 1 分 30 秒 (extension) 共進行 35 個循環。PCR 反應後，若由以罹病日日春植株全 DNA 為模版 (template) 之 PCR 中增幅出不同於以健康日日春全 DNA 為模版的 PCR 產物，則將此片段進行選殖並解序。本研究中之各 PCR 片段之選殖工作均以 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 依廠商建議之方法進行，而定序工作則委由明欣生物科技股份有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行。序列經 NCBI 基因庫資料比對後，若此片段為 *rpoC* 基因之一部分，則將該片段進行標識成探針 (詳如後述)。並進一步以南方氏雜配反應 (詳如後述) 證實此一探針序列為 PnWB phytoplasma 之 *rpoC* 基因片段，如此則可進行該 PCR 增幅出之基因片段 5' 端上游及 3' 端下游序列之選殖與定序工作。

在選殖 *rpoC* 5' 端序列時，依據 *rpoBC* operon 的基因排列方式，則從上述以 PCR 增幅出之基因片段序列 5' 端下游數個核酸處設計往上游方向之引子 (即後述之引子 rpoC1-3)，及利用本實驗室曾經選殖出之 *rpoB* 基因之序列 (預測其位於 *rpoC* 上游)<sup>(1)</sup>，從其 3' 端上游 130 bp 處往下游設計出引子 Frpobt (5'-AGGGCGTAATCAATTATA-3')，以此引子對藉由 PCR 反應，預估可增幅出包含 *rpoB* 3' 端及 *rpoC* 5' 端間之片段。PCR 之反應條件為：94°C 30 秒，45°C 30 秒，72°C 2 分鐘，共進行 35 個循環；以同樣的策略，在選殖 *rpoC* 3' 端序列時，依據革蘭氏陽性菌 *B. subtilis* 與革蘭氏陰性菌 *E. coli* 在 *rpoBC* 下游均有 *rpsL* (ribosomal protein S12) 基因存在之報告<sup>(20)</sup>，因此從資料庫中擷取細菌 *rpsL* 基因之核酸與胺基酸序列，作為選殖 *rpoC* 3' 端序列時的參考，參考資料如下 (GenBank 登錄號碼標示於括號中)：*B. anthracis* str. Ames (NC003997), *B. halodurans* (NC002570), *B. subtilis* (NC000964), *E. coli* K12 (NC000913), *Mycoplasma pulmonis* (NC002771), *Staph. aureus* subsp. *aureus* N315 (NC002745), *M. penetrans* (NC004432), *Strep. pneumoniae* R6 (NC003098)，將該等核酸序列進行比對後，於 *rpsL* 基因之 5' 端往上游設計簡併式引子 rpsLr1-1 (5'-WACAACRCTRGTGCTTTG-3')，並在 *rpoC* 基因片段 3' 端往下游設計引子 (即後述之引子 rtpocf1-1)，以此對引子藉由 PCR 反應，預估可增幅出包含



圖一、本研究中所選殖包含 *rpoC* 基因之 4,817 bp 全長序列、各基因之相對位置及實驗中 PCR 反應各引子之相對位置圖。

Fig. 1. Diagram showing the relative positions of *rpoB*, *rpoC*, and *rpsL* (open boxes) in the sequenced 4,817 bp DNA of PnWB phytoplasma. Large arrows refer to the direction of transcription, and small arrows refer to the annealing sites and the direction of oligonucleotide PCR primers used in this study.

*rpoC* 3' 端及 *rpsL* 5' 端間之片段。PCR 之反應條件為：94°C 30 秒，45°C 30 秒，72°C 1分30 秒，共進行 35 個循環。上述之 PCR 產物若經選殖、解序比對無誤，則將此三段 PCR 產物在序列彼此間重疊部位做聯結，預估將聯結成包含 *rpoB* 3' 端、*rpoC* 全長、*rpsL* 5' 端之全序列。實驗中各引子之相對位置如圖一所示。

### 南方氏雜配反應 (Southern hybridization)

進行南方氏雜配反應時，先進行探針之標識，探針標識時，則將上述以引子對 *Frpoc1*/*RrpoC1* 所增幅出之 *rpoC* 基因片段利用 TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen Corporation) 進行選殖 (clone) 以作為核酸探針製備之模版。核酸探針之製備反應及所使用之藥品係採用 Roche Molecular Biochemicals 公司 (Mannheim, Germany) 所開發之 PCR DIG Probe Synthesis Kit 及其藥品，並依其建議之方法進行。

進行電泳時，取 7  $\mu$ g 健康及感染花生簇葉病之植物全 DNA，分別以 10 單位之 *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III 核酸內限制酵素 (Roche Molecular Biochemicals) 進行酵解 6 小時，再以 0.8% 瓊脂凝膠進行水平式電泳，隨後將 DNA 轉漬至 Nylon 濾膜 (Hybond<sup>™</sup>-N+, 0.45  $\mu$ m; Nylon transfer membrane, Amersham Biosciences Ltd., Buckinghamshire, UK)，並利用紫外線聯結器 (UV crosslinker, XL-100, Spectronics Corporation, NY) 進行 DNA 與 nylon 濾膜之聯結，即可進行雜配及呈色反應<sup>(15)</sup>。

使用上述已標識 DIG-dUTP 之探針，在 68°C 下進行雜配反應 2.5 小時，再加入稀釋 5,000 倍之 anti-

digoxigenin alkaline phosphate-conjugated (750 units/ml) 抗體 (Roche Molecular Biochemicals) 作 DIG-dUTP 探針的聯結，隨後即進行呈色觀察 DNA 條帶的位置<sup>(15)</sup>。

### 北方氏雜配反應 (Northern hybridization)

為瞭解所選殖出的 *rpoC* 可能基因，在 PnWB phytoplasma 中是否轉錄成 mRNA，故利用北方氏雜配反應加以證明。

標識 DIG-dUTP 之核酸探針係採用位於 *rpoC* 基因 5' 端區域之 *rpoC* 引子對 rc2-1 (5'-TCCTATTATTTTGGCCCTGTTC-3') 與 rc2-2 (5'-CATTAGCCATTTGTCGCGGGATACC-3') 所增幅出之 PCR 產物 (圖一)。探針標識之方法如前述。而 PCR 之反應條件為：94°C 15 秒，50°C 30 秒，72°C 1 分 30 秒，共進行 35 個循環。

進行電泳時，取 30  $\mu$ g 之全 RNA，以 1% formaldehyde gel (1% agarose, 1 x formaldehyde gel-running buffer, 0.22 M formaldehyde) 進行電泳約 3.5 小時。雜配反應仍採用上述非放射性之 DIG-dUTP 標示之 DNA 探針，探針之反應濃度為 50 ng/ml，唯 RNA 在進行轉漬時改用 20 x SSC，且更改 hybridization solution 的成分 [formamide, 50% (v/v); 5 x SSC; blocking reagent, 2% (w/v); N-lauroylsarcosine, 0.1% (w/v); SDS, 0.02% (w/v)]，而呈色受質亦改為 CDP-Star<sup>™</sup> chemiluminescent detection reagent (TROPIX Inc., Bedford, MA)，此一受質在被 alkaline phosphatase 進行去磷酸化反應 (dephosphorylation) 後會發出螢光，可使 X 光底片感光，其敏感度可達 30 fg 之 RNA，故以 X

光片壓片 2 至 20 分鐘後，沖洗 X 光底片以觀察結果。

### 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR)

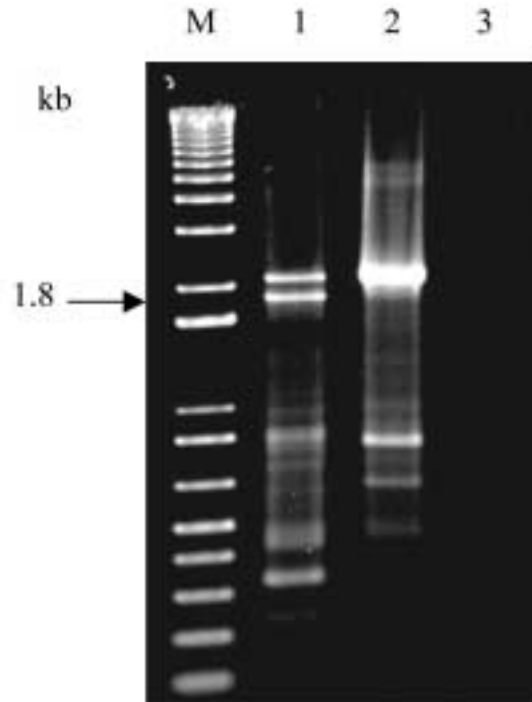
除前述之北方雜配反應外，本研究亦進行 RT-PCR 以了解所選殖的可能 *rpoC* 基因是否有轉錄出 mRNA。所利用之引子對為前述之 rc2-1/ rc2-2，其位於基因 *rpoC* 5' 端區域，且預估之 RT-PCR 產物大小為 952 bp。

反轉錄實驗乃採用 SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum<sup>®</sup> Taq Kit (Invitrogen Corporation) 進行。反應方式如下：在 0.2 ml 之微量 PCR 反應管中依序加入無菌水（反應總體積為 25  $\mu$ l）、12.5  $\mu$ l 的 2 x Reaction Mix (0.4 mM of each dNTP, 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>)、兩引子（均為 20  $\mu$ M）各 0.5  $\mu$ l（反應濃度各為 0.2  $\mu$ M）；模版 RNA (template RNA) 100 ng；再加入 0.5  $\mu$ l 之 RT/ Platinum<sup>®</sup> Taq Mix，以 tip 輕輕混勻後，進行聚合酵素連鎖反應，RT-PCR 之反應條件為：50°C 30 分鐘，94°C 2 分鐘 pre-run，接著以 94°C 15 秒，50°C 30 秒，72°C 1 分 30 秒進行 35 個循環，最後以 72°C 7 分鐘結束反應，反應完成後，於 1% 瓊脂凝膠中進行電泳分析，經 ethidium bromide 染色後，觀察聚合酵素連鎖反應的結果。實驗中之 PCR 對照組則以 Taq DNA 聚合酵素取代反轉錄酵素。

## 結 果

### 基因庫資料的搜尋與聚合酵素連鎖反應 (PCR) 引子之設計及 PCR 產物之分析

由 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中收集各細菌 (eubacteria) *rpoC* 之核酸序列與胺基酸序列，經比對後，設計出引子對：Frpoc1, Rrpoc1 (圖一)，在以病株 DNA 為模版之 PCR 反應中獲得相較於健株多出一 1.8 kb 之專一性產物 (圖二)，將該專一性 1.8 kb 產物選殖後並完成定序，經 NCBI BLAST 確定其序列為 *rpoC* 基因的部份序列，基於 *rpoBC* 相對位置的概念，遂參考部分的 RNA polymerase  $\beta$  亞單位 (即 *rpoB* 基因)<sup>(1)</sup> 的 3' 端序列當作設計 PCR 引子 Frpobt 的參考 (序列如前述)；此外並在已完成定序之 1.8 kb 序列中 5' 端下游 35 bp 處設計了 rpoc1-3 (5'-CGTCCTGAATAATCTACC-3')，在以病株 DNA 為模版之反應中得到大小約 1.6 kb 之專一性產物 (圖三)，將該片段選殖後完成解序得到包含部分 *rpoB* 3' 端及 *rpoC* 5' 端的序列。另外因發現在革蘭氏陽性菌 *B.*

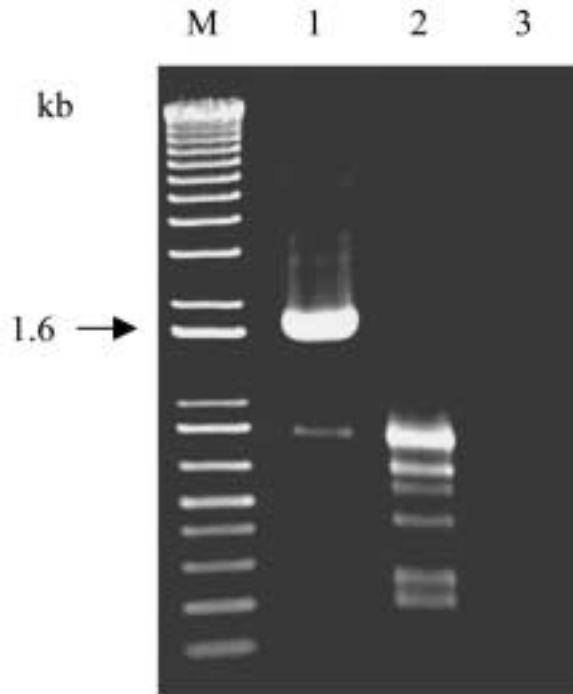


圖二、利用引子對 Frpoc1 / Rrpoc1 之組合對受花生簇葉病菌質體感染之日日春全 DNA 及健康日日春全 DNA 進行聚合酵素連鎖反應之產物分析。

Fig. 2. Polymerase chain reaction (PCR)-product amplified by primer pair Frpoc1/ Rrpoc1 using DNA templates extracted from: lane 1, periwinkle plants infected with PnWB phytoplasma; lane 2, healthy periwinkle plants; lane 3, water as negative control. M, 1 kb DNA ladder as molecular weight standards. Size (in kb) of PCR product selected for further study is shown on the left.

*subtilis* 與革蘭性陰性菌 *E. coli* 在 *rpoBC* 下游均有基因 *rpsL* (ribosomal protein S12) 存在<sup>(20)</sup>，因此也從資料庫中擷取 *rpsL* 基因之核酸與胺基酸序列，並依據其 5' 端序列設計出簡併式引子 rpslr1-1 (序列如前述)，並在已完成定序之 1.8 kb 序列中 3' 端上游 144 bp 處設計了 trpocf1-1 (5'-TCTGTAAAATTAGAAGT-3') (圖一)，在以病株 DNA 為模版之反應中得到大小約 1.4 kb 之專一性產物 (圖四)，將該產物選殖後完成定序即得到包含部分 *rpoC* 3' 端及 *rpsL* 5' 端的序列。再將此三個 DNA 片段序列依重疊部分組合起來完成 4,817 bp 的 DNA 序列，其中從 nt 1-4,685 bp 之序列登錄於 GenBank，其 GenBank 登錄號碼為 DQ358049。

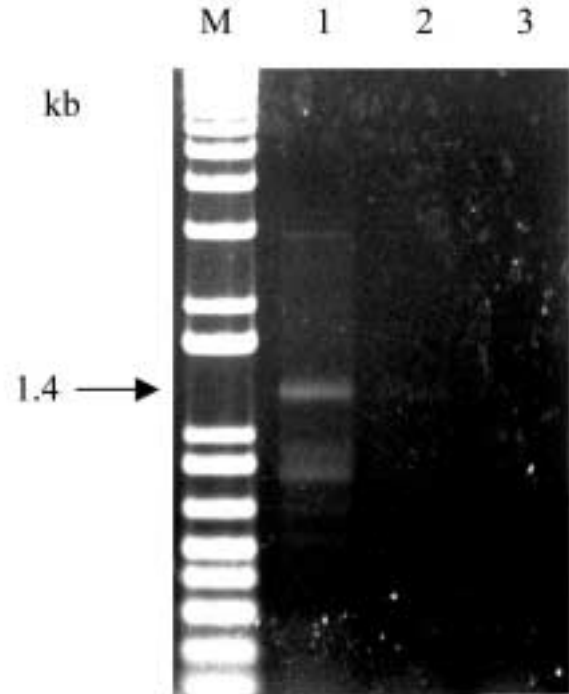
利用 Lasergene 軟體 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 及 NCBI 基因庫進行全長 4,817 bp 的序列分析及 ORF (open reading frame) 的搜尋。而在 ORF 尋找過程中，由 NCBI ORF finder 的預測，以 ATG 為起始密碼，以 TGA, TAG 及 TAA 為終止密碼找出可能之 ORF，結果



圖三、利用引子對 Frpobt / rpoC1-3 之組合對受花生簇葉病菌質體感染之日日春全 DNA 及健康日日春全 DNA 進行聚合酵素連鎖反應之產物分析。

Fig. 3. Polymerase chain reaction (PCR)-product amplified by primer pair Frpobt/ rpoC1-3 using DNA templates extracted from: lane 1, periwinkle plants infected with PnWB phytoplasma; lane 2, healthy periwinkle plants; lane 3, water as negative control. M, 1 kb DNA ladder as molecular weight standards. Size (in kb) of PCR product selected for further cloning and sequencing is shown on the left.

在核酸序列 nt 201- 4,340 可推衍轉譯出 1,379 個胺基酸序列，將其稱為 ORF1，其胺基酸序列經比對後發現與其他細菌之 *rpoC* 基因之胺基酸序列具有之相似度 (similarity) 分別為：*Bacillus* sp. (53%)，*Staphylococcus* sp. (51-52%)，*Streptococcus* sp. (50%)，*Mycoplasma gallisepticum* R (42%)，*Mycoplasma penetrans* (41%)，*Mycoplasma genitalium* (40%)，*Mycoplasma pneumoniae* (39%)，*Pseudomonas* sp. (42-46%)，且在第 170-1,363 胺基酸發現有如預期中之完整的保守性區域 (putative conserved domains)。ORF1 中 A+T 值為 71.50%，G+C 值為 28.50%，符合植物菌質體低 G+C 值的特性。由 ORF1 所推衍之產物其推估之分子量大小為 156.6 KD，與其他細菌之  $\beta'$  亞單位 (~155 KD) 的大小相仿，且該 ORF1 在胺基酸密碼的利用上亦並無發現有以 UGA 為 tryptophan 密碼的情形。而在以 ORF1 為主的密碼利用率中最高者為 UUA (Leu, L) (8.4%)，其次為 AAA (Lys, K) (7.1%) 及 AUU (Ile, I) (7.0%)。

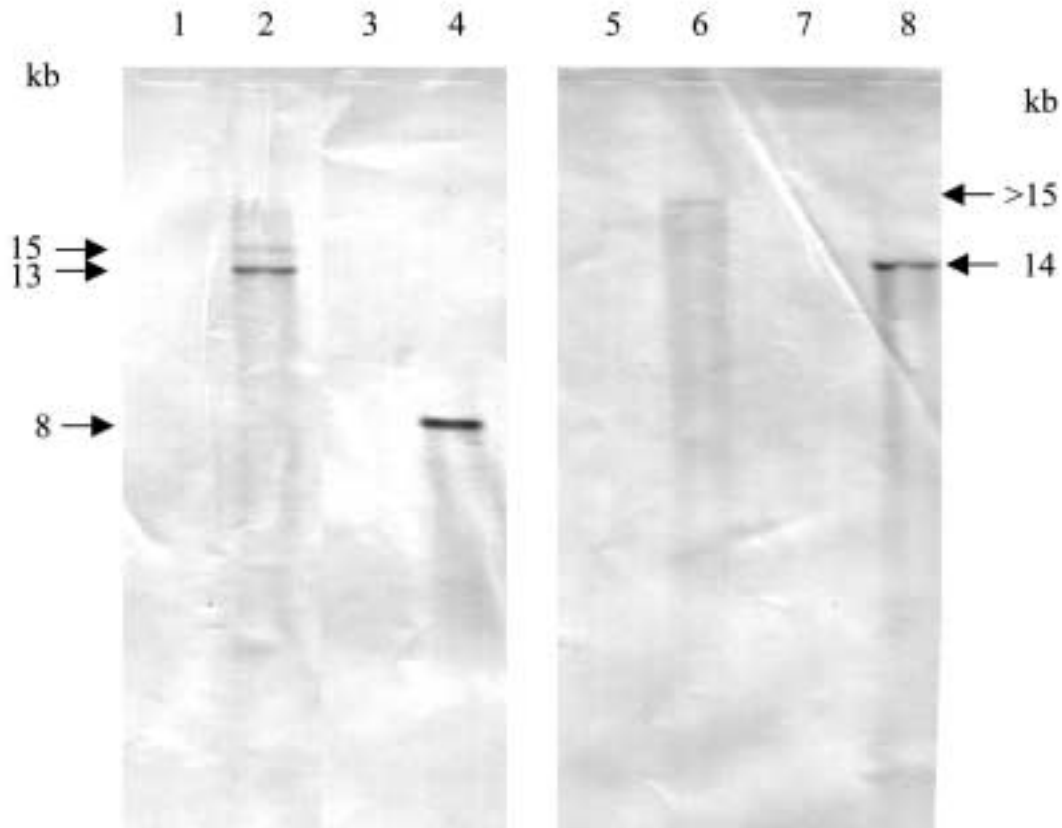


圖四、利用引子對 trpocf1-1/ rpslr1-1 之組合對受花生簇葉病菌質體感染之日日春全 DNA 及健康日日春全 DNA 進行聚合酵素連鎖反應之產物分析。

Fig. 4. Polymerase chain reaction (PCR)-product amplified by primer pair trpocf1-1/ rpslr1-1 using DNA templates extracted from: lane 1, periwinkle plants infected with PnWB phytoplasma; lane 2, healthy periwinkle plants; lane 3, water as negative control. M, 1 kb DNA ladder as molecular weight standards. Size (in kb) of PCR product selected for further cloning and sequencing is shown on the left.

在全序列 5' 端 nt 2- 103 處可轉譯出 RpoB 之 C 端部分胺基酸序列，在與其他細菌之 RpoB C 端相對應之胺基酸序列比對後，發現其相似度分別為：*Mycoplasma gallisepticum* R (58%)，*Mycoplasma pneumoniae* (62%)，*Mycoplasma genitalium* (62%)，*Mycoplasma pulmonis* (59%)，*Mycoplasma penetrans* (48%)，*Staphylococcus* sp. (55-58%)，*Bacillus* sp. (55%)，*Streptococcus* sp. (58%)。此段序列中 A+T 值為 67.65%，G+C 值為 32.35%，符合植物菌質體低 G+C 值的特性，且在 RpoB 之 C 端的部分胺基酸序列中亦無發現有以 UGA 為 tryptophan 密碼的情形。

在全序列 3' 端 nt 4,539- 4,817 bp 處可轉譯出 RpsL N 端部分的胺基酸序列，在與其他細菌之 RpsL 之胺基酸序列比對後，發現其相似度分別為：*Staphylococcus* sp. (70%)，*Bacillus* sp. (69-70%)，*Mycoplasma pulmonis* (67%)，*Streptococcus* sp. (65-70%)，*Ureaplasma urealyticum* (68%)，*Mycoplasma genitalium* (66%)，



圖五、對健康及受花生簇葉病菌質體感染之日日春全 DNA 以不同內限制酵素醇解後以 *rpoC* 基因核酸探針進行南方氏雜配反應。

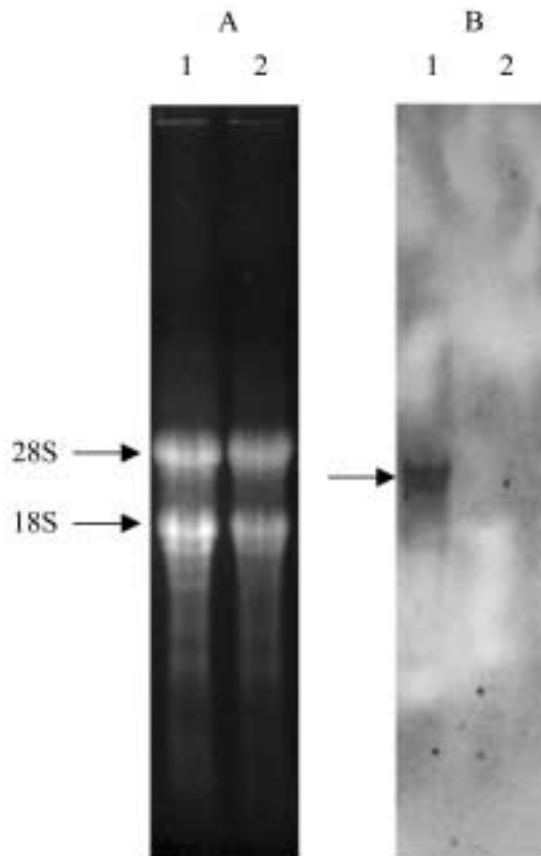
Fig. 5. Southern blot analysis of total DNA (5  $\mu$ g per lane) prepared from healthy periwinkle plants (lanes 1, 3, 5, 7) and periwinkle plants infected with PnWB phytoplasma (lanes 2, 4, 6, 8) digested with restriction enzyme *EcoRI* (lanes 1, 2), *HindIII* (lanes 3, 4), *BamHI* (lanes 5, 6), *XhoI* (lanes 7, 8). Sizes (in kb) of the hybridization signals are shown on the margins.

*Mycoplasma pneumoniae* (66%), *Mycoplasma gallisepticum* R (65%), *Mycoplasma penetrans* (64%), *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* (62%)。此段序列中 A+T 值為 69.57%，G+C 值為 30.43%，符合植物菌質體低 G+C 值的特性，而在 RpsL 之 N 端部分胺基酸序列中，亦無發現有以 UGA 為 tryptophan 密碼的情形。

因發現 *E. coli* RpoC 與 yeast 和 *Drosophila* 之 RNA polymerase II 之胺基酸序列具有高相似性，從胺基酸序列中可歸納出八個具保守性的區域，依次為 A, B, C, D, E, F, G, H<sup>(2, 3, 13)</sup>。因此將 ORF1 所推衍之 RpoC 之胺基酸序列 (1- 1,379 a.a.) 與 *E. coli* K12 之 RpoC, *Saccharomyces cerevisiae* 之 RPO21, *Drosophila melanogaster* 之 RNA polymerase II 215 KD subunit RPII215 之序列做比對，依據歸納的八個具保守性的區域中，相似度較高的區域為 C, D, G。

### 以南方氏雜配反應確定 PnWB phytoplasma 中 *rpoC* 基因之套數 (copy number)

花生簇葉病菌質體感染之罹病日日春及健康日日春之全 DNA，以核酸內限制酵素 *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* 及 *XhoI* 進行醇解，並以引子對 Frpoc1/ RrpoC1 所增幅出之 1.8 kb 片段作為探針進行南方氏雜配反應。結果顯示此探針可對受花生簇葉病菌質體感染之日日春全 DNA 產生雜配訊號；以 *EcoRI* 醇解者，可在約 13 kb 及 15 kb 之 DNA 片段處產生訊號；以 *HindIII* 醇解者，可在約 8 kb 之 DNA 片段處產生訊號；以 *BamHI* 醇解者，可在大於 15 kb 之 DNA 片段處產生訊號；以 *XhoI* 醇解者，可在約 14 kb 之 DNA 片段處產生訊號。基因探針對健康日日春之全 DNA 則沒有任何雜配訊號 (圖五)。由上述結果，我們可以推測 *rpoC* 基因在花生簇葉病菌質體之基因體應是 single copy 或 low copy number。



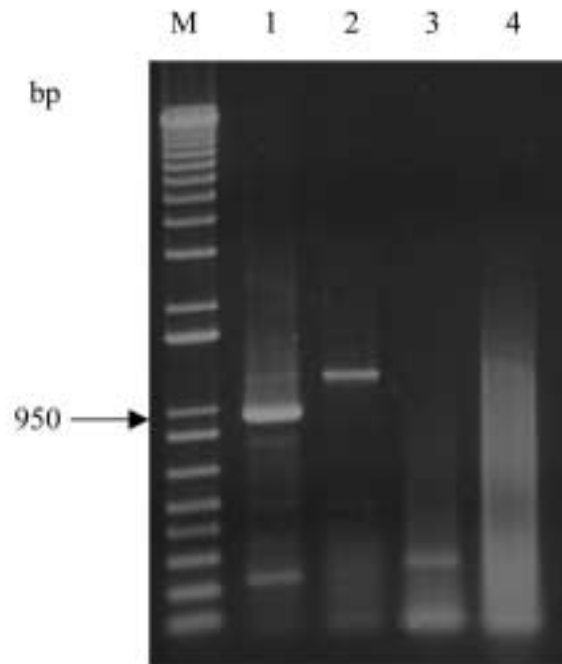
圖六、對健康及受花生簇葉病菌質體感染之日日春全 RNA 以 *rpoC* 基因核酸探針進行北方氏雜配反應。  
Fig. 6. Electrophoresis (A) and Northern blot analysis (B) of total RNA (30  $\mu$ g per lane) prepared from diseased periwinkle plants infected with PnWB phytoplasma (lane 1) and from healthy periwinkle plants (lane 2). 28S, 28S ribosomal RNA; 18S, 18S ribosomal RNA; arrow, hybridization signal.

### 以北方氏雜配反應確定 *rpoC* 之表現

抽取花生簇葉病菌質體感染之罹病日日春及健康日日春之全 RNA 經電泳分析後，轉漬至 nylon 濾膜上，以引子對 rc2-1/ rc2-2 (圖一) 所增幅出之 *rpoC* 基因片段作為探針，進行雜配反應。結果顯示探針可對花生簇葉病菌質體感染之日日春全 RNA 產生雜配訊號，顯示花生簇葉病菌質體之 *rpoC* 基因有轉錄成 mRNA。而對健康日日春之全 RNA 則無任何雜配訊號產生 (圖六)。

### 反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR)

以花生簇葉病菌質體感染之日日春全 RNA 利用引子對 rc2-1/ rc2-2 (圖一) 進行 RT-PCR 反應並可順利增幅出預期中之 952 bp 的片段 (圖七)，再次證實此



圖七、以反轉錄聚合酵素連鎖反應分析 *rpoC* 基因之轉錄產物。

Fig. 7. Transcription of the *rpoC* gene was verified by RT-PCR. For each amplification, a primer pair rc2-1/ rc2-2 was used. RT-PCR products were amplified using RNA templates prepared from healthy periwinkle (lane 1) and from periwinkle infected with PnWB phytoplasma (lane 2). PCR products were amplified with *Taq* DNA polymerase instead of reverse transcriptase using RNA templates prepared from healthy periwinkle plants (lane 3) and periwinkle plants infected with PnWB phytoplasma (lane 4). M, 1 kb DNA ladder as molecular weight standards. Size (in bp) of RT-PCR product is shown on the left.

*rpoC* 基因有被轉錄成 mRNA。

## 討 論

本研究篩選基因的策略乃先收集其他原核細菌 *rpoC* 基因之核酸及胺基酸序列，並利用相同基因在胺基酸序列上應具有較高保守性之特性，先找出保守性區段，再找出其中高保守性胺基酸所相對應之之核酸密碼以進行比對分析。由於密碼子在胺基酸之應用上，相同的胺基酸並不一定對應相同的核酸密碼，且 wobble 現象常發生在核酸密碼的第三位上，故本實驗中利用已知 Mollicutes 綱細菌以及本實驗室已選殖成功之其他基因的數據，考量植物菌質體在胺基酸密碼選擇上的偏好性，及其在基因體 DNA 鹼基偏好 A、T 的情形，設計簡併式 (degenerate) 引子用於基因選殖工作

的進行。由引子對 Frpoc1/ Rrpoc1 (圖一) 所增幅出的差異性片段 1.8 kb (圖二) 經 NCBI 基因庫比對及經南方氏雜配反應證實該片段確為花生簇葉病原菌質體所具有之 *rpoC* 可能基因之部分序列。而在該 PCR 反應中，在 1.8 kb 上方有一大於 2 kb 的片段經與健株比較確定其乃屬於植物 DNA 所有 (圖二)。此乃因所設計之引子座落於原核生物 *rpoC* 與真核生物 RNA polymerase II 相似區域之 C 區與 G 區，可能因此而導致植物 DNA 片段被 PCR 引子對增幅出來<sup>(2, 3, 13)</sup>。

利用 *rpoBC* operon 的排列，加上革蘭氏陽性菌 *B. subtilis* 與革蘭氏陰性菌 *E. coli* 在 *rpoBC* 下游均有 *rpsL* 基因 (ribosomal protein S12) 存在，因而有實驗室利用 chromosomal walking 方式選殖鄰近之基因片段<sup>(20)</sup>，故在本研究中，分別利用引子對 Frpobt/ rpoC1-3 與 trpocf1-1/ rpsl1-1 (圖一)，利用 PCR 分別取得 *rpoB* 3' 端加上 *rpoC* 5' 端的序列及 *rpoC* 3' 端與 *rpsL* 5' 端的序列片段 (圖三、四)。

在選殖並完成解序之整個 4,817 bp 序列中，經 NCBI 比對推測出二個不完整之 ORFs (*rpoB* 之 3' 端：nt 2-103；*rpsL* 之 5' 端：nt 4,539-4,817) 及一個完整的 ORF1 (nt 201-4,340)，這些 ORF 或部份 ORF 之胺基酸序列與典型的革蘭氏陽性菌如 *B. subtilis* 或 *Mycoplasma* sp. 之胺基酸序列相似度約 40-70% 不等，與以往其他植物菌質體基因之研究數據相仿。

因 *E. coli* 之 *rpoC* 與 yeast 和 *Drosophila* 之 RNA polymerase II 具有高度相似性，從胺基酸序列中可歸納出八個具保守性的區域 A-H<sup>(2, 3, 13)</sup>。將本研究中之花生簇葉病原菌質體之 *rpoC* 可能基因之胺基酸序列與 *E. coli* K12 之 RpoC, *Saccharomyces cerevisiae* 之 RPO21, *Drosophila melanogaster* 之 RNA polymerase II 215 KD subunit RPII215 做比對，依據歸納的八個具保守性的區域中，其中在 C, D, G 等區域具有較高之相似度。在 A 區域中其主要的功能在真核生物被推測為 Zinc-binding region，可能扮演著 RNA 聚合酶的穩定性及與各亞單位間的結合，通常辨識的胺基酸序列主要為 CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub><sub>12</sub>CXGHXGX<sub>24-37</sub>CX<sub>2</sub>C，不過在 *E. coli* 中卻無法輕易的辨認出該區域<sup>(9)</sup>，同樣的在花生簇葉病原菌質體之 RpoC 也無法辨認此一區序列，然而有學者利用突變的方法在 *E. coli* 中發現介於 F 與 G 區域間之胺基酸 Cystein<sup>814, 888, 895, 898</sup> (C) 會影響 Zinc 的結合能力，且該等序列在真核生物對應位置上亦是無法辨識出的<sup>(21)</sup>。但相對於花生簇葉病原菌質體及其他在本實驗中所比對之細菌，在 F 與 G 區域之間與 *E. coli* 對應的位置上則存在著 Cystein，因此原核與真核生物中之 Zinc-binding site 可能是有著不同的位置分佈，並非存在於某個同源性區

域中。

然而在這八個保守性區域中，C 區域是一 two-helix motif，與 DNA 的結合有關<sup>(13)</sup>，而在 D 區域中則有一高保守性的胺基酸序列 NADFDGD，關係到與鎂離子之整合，鍵結的位置主要為序列中的三個 Asparagine (D)<sup>(21)</sup>，對應到花生簇葉病原菌質體及其他原核菌種之序列均發現對應的位置完全契合，因此推論在花生簇葉病原菌質體上也保有上述功能，並無退化演化的跡象。

在革蘭氏陽性菌 *B. subtilis*, *Mycobacterium leprae* 與革蘭氏陰性菌 *E. coli* 之 *rpoC* 胺基酸序列中，位於保守性區域 G 區域與 H 區域之間，革蘭氏陽性菌通常比革蘭氏陰性菌少了約 189 個胺基酸<sup>(20)</sup>，推測缺失的區域可能對於  $\beta'$  亞單位的功能與結構並非絕對需要。在花生簇葉病原菌質體和其他革蘭氏陽性菌與 *E. coli* 比對後，所得到的結果與以上之陳述相同，由於植物菌質體在分類地位上屬於革蘭氏陽性細菌，因此可以推測所選殖出的花生簇葉病原菌質體之 *rpoC* 符合革蘭氏陽性菌 *rpoC* 的特性。

在抗生素的研究上，包括 rifampicin, sorangicin A 和 streptolydigin 會抑制細菌的轉錄反應<sup>(12, 16)</sup>，而 rifampicin 與 streptolydigin 經利用突變株研究發現，在 *E. coli* 中 rifampicin 與 streptolydigin 主要乃與 RNA 聚合酶中  $\beta$  亞單位結合；而在 *B. subtilis* 中 rifampicin 與 streptolydigin 則分別作用於  $\beta$  和  $\beta'$  亞單位。另外，經人為突變發現，在 *E. coli* 中當  $\beta'$  發生 S793F 之變異 (region F)，則會產生抗 streptolydigin (Stl<sup>R</sup>) 的現象<sup>(10, 17)</sup>。在胺基酸相似度的分析中，花生簇葉病原菌質體 *rpoC* 基因在 F 區域中與 *E. coli* Serine<sup>793</sup> (S) 的相對位置上出現 Serine，是否意味著將之突變也可能產生抗 streptolydigin 的能力，則有待後續之證明。另外在 *B. subtilis* 之  $\beta'$  亞單位胺基酸序列中若於 F 區域發生 D796G 變異，則會產生抗 streptolydigin 的能力，但在花生簇葉病原菌質體中該對應的位置則是 E，故無法推測是否與 streptolydigin 鍵結有關。

Sigma factor ( $\sigma$ ) 具有啓動子辨識 (promotor recognition) 的功能，其必須辨識出基因之啓動子區域，並且結合在 -10 至 -35 區域後再與 core enzyme 結合，如此轉錄反應才能開始進行<sup>(7, 8, 9, 11)</sup>。在  $\sigma$  的研究中， $\sigma^{70}$  在 *E. coli* 會與 RpoC 之蛋白結合在 260-309 胺基酸序列，經突變分析，R275Q, E295K, 和 A302D 之變異，均會使  $\sigma^{70}$  失去與之鍵結的能力<sup>(4, 5)</sup>，對應至花生簇葉病原菌質體 RpoC 之 412-461 胺基酸序列，此區域具有高度的相似性，在 *E. coli* 的突變點上與花生簇葉病原菌質體有著完全一樣的胺基酸分佈，故此區域



亦有可能為  $\sigma$  鍵結的位置。

由於植物菌質體無法人工培養，因此在蛋白質功能研究方面仍有很大的障礙，必須與親源關係較近的細菌做互補試驗才有機會瞭解基因的可能運作。另一方面，藉助基因庫資料的比對與搜尋，加上預測功能之保守性序列比對，推測所選殖出的 PnWB phytoplasma *rpoC* 基因在功能上並沒有退化演化的跡象，可見每一個功能區在轉錄的正常運作上均有其必要性。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

- 鄧靜雯. 1999. 花生簇葉病病原菌質體 RNA 聚合酶素  $\beta$  亞單位基因之選殖. 國立台灣大學植物病蟲害學研究所碩士論文。
- Allison, L. A., Moyle, M., Shale, M., and Ingles, C. J. 1985. Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic RNA polymerase. *Cell* 42: 599-610.
- Archambault, J., and Friesen, J. D. 1993. Genetics of eukaryotic RNA polymerase I, II, and III. *Microbiol. Rev.* 57: 703-724.
- Arthur, T., and Burgess R. 1998. Localization of a  $\sigma^{70}$  binding site on the N terminus of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\beta'$  subunit. *J. Biol. Chem.* 273: 31381-31387.
- Arthur, T., Anthony, L., and Burgess, R. 2000. Mutational analysis of  $\beta'_{260-309}$ , a  $\sigma^{70}$  binding site located on *Escherichia coli* core RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 275: 23113-23119.
- Bocchetta, M., Gribaldo, S., Sanangelantoni, A., and Cammarano, P. 2000. Phylogenetic depth of the bacterial genera *Aquifex* and *Thermotoga* inferred from analysis of ribosomal protein, elongation factor, and RNA polymerase subunit sequences. *J. Mol. Evol.* 50: 366-380.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., and Bautz, E. K. F. 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221: 43-46.
- Chamberlin, M. J. 1974. The selectivity of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 43: 721-775.
- Doi, R. H., and Wang, L. F. 1986. Multiple prokaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factor. *Microbiol. Rev.* 50: 227-243.
- Halling, S. M., Burtis, K. C., and Doi, R. H. 1978.  $\beta'$  subunit of bacterial RNA polymerase is responsible for streptolydigin resistance in *Bacillus subtilis*. *Nature* 272: 837-839.
- Helmann, J. D., and Chamberlin, M. J. 1987. DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6422-6424.
- Johnson, D., and McClure, W. 1976. Pages 101-126 in: RNA Polymerase. R. Losick, and M. J. Chamberlin eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Jokerst, R. S., Weeks, J. R., Zehring, W. A., and Greenleaf, A. L. 1989. Analysis of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase II in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 215: 266-275.
- Klenk, H. P., Meier, T. D., Durovic, P., Schwass, V., Lottspeich, F., Dennis, P., and Zillig, W. 1999. RNA polymerase of *Aquifex pyrophilus*: Implications for the evolution of the bacterial *rpoBC* operon and extremely thermophilic bacteria. *J. Mol. Evol.* 48: 528-541.
- Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and application of cloned DNA probe for a mycoplasma-like organism associated with sweet potato withes' broom. *Phytopathology* 84: 468-473.
- McClure, W. 1980. On the mechanism of streptolydigin inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 255: 1610-1616.
- Severinov, K., Markov, D., Severinova, E., Nikiforov, V., Landick, R., Darst, S., and Goldfarb, A. 1995. Streptolydigin-resistant mutants in an evolutionarily conserved region of the  $\beta'$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 268: 23926-23929.
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., and Hockema, A. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17: 2362.
- Yang, I. L. 1988. Witches' broom diseases of sweet potato and peanut in Taiwan. Ph. D. Thesis. Hokkaido Univ., Japan.
- Yang, X., and Price, C. 1995. Streptolydigin resistance can be conferred by alterations to either the  $\beta$  or  $\beta'$  subunits of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 41: 23930-23933.
- Zhang, G., Campbell, E., Minakhin, L., Richter, C., Severino, K., and Darst, S. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3Å resolution. *Cell* 98: 811-824.

## ABSTRACT

Lin, C. Y.<sup>1</sup>, Chen, W. Y.<sup>1</sup>, and Lin, C. P.<sup>1,2</sup> 2006. Cloning and analysis of *rpoC* gene of phytoplasma associated with peanut witches' broom. *Plant Pathol. Bull.* 15:129-138. (<sup>1</sup> Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R.O.C.; <sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: cplin@ntu.edu.tw; Fax: +886-2-23661980).

To clone the *rpoC* gene that encodes the  $\beta'$  subunit of the RNA polymerase in phytoplasma associated with peanut witches' broom (PnWB), a pair of degenerate PCR primers Frpoc1/ Rrpoc1 was designed based on the conserved regions of the *rpoC* genes of various prokaryotes. A 1.8-kb PCR fragment was amplified specifically from the PnWB phytoplasma-infected periwinkle plants using primer pair Frpoc1/ Rrpoc1. Sequence analysis revealed that the PCR product has high sequence homology to other reported *rpoC* genes. To obtain the full length of the *rpoC* gene, a chromosomal walking strategy was conducted. Based on the conserved sequences flanking the *rpoC* gene, four PCR primers were designed. A total of 4,817-bp DNA fragment containing the full length of *rpoC* gene, partial *rpoB* gene (3' end), and partial *rpsL* (5' end) gene was amplified and sequenced. An open reading frame between nt 201 and nt 4,340 was identified as ORF1. Alignment of amino acid sequence of ORF1 with those of *E. coli* K12 RpoC, *Saccharomyces cerevisiae* RPO21, and *Drosophila melanogaster* RNA polymerase II 215 KD subunit RPII215 revealed that regions C, D, and G shared great similarities. Southern hybridization analysis indicated that *rpoC* is a one-copy or low-copy number gene in the PnWB phytoplasma genome. Northern hybridization and RT-PCR analyses both showed that mRNA of *rpoC* was transcribed in PnWB phytoplasma.

Key words: peanut witches' broom, phytoplasma, *rpoC* gene.