

# 花生簇葉病菌質體 *polC* 基因之選殖與分析

紀凱齡<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 93 年 11 月 29 日

## 摘要

紀凱齡、林長平. 2005. 花生簇葉病菌質體 *polC* 基因之選殖與分析. 植病會刊 14: 51-58.

本研究在於從事花生簇葉病菌質體 *polC* 基因之選殖，採用之選殖策略為先行收集其他革蘭氏陽性細菌 *polC* 基因之核酸及胺基酸序列，進行比對分析，根據其高保守性區域設計引子對 F3-2/R6-2，再以感染花生簇葉病之日日春全 DNA 為模板進行 PCR 反應，藉此獲得一 729 bp 大小之 PCR 產物，再將其選殖至 pCR<sup>II</sup>-TOPO 質體中，得到一重組質體 pF3-2-15，針對 pF3-2-15 之嵌入片段進行核酸定序，並根據此序列設計專一性引子對 F4/R6，經利用 PCR DIG 標識法針對 pF3-2-15 之嵌入片段增幅出 493 bp 之 DIG 標識片段，以作為 *polC* 基因篩選用核酸探針，從事花生簇葉病菌質體重組質體之篩選，如此遂獲得一選殖株重組質體 pH15-40。重組質體 pH15-40 之嵌入片段長度為 5221 bp，其中包含一個完整 ORF 及一個不完整的 ORF，分別稱之為 ORF1 (4479bp) 與 ORF2 (502 bp)。將由 ORF1 核酸序列推衍所得之胺基酸序列進行比對分析後，發現該序列與其他細菌的 DNA 聚合酶 III 基因 *polC* 相似。此外，由 ORF1 所推衍之胺基酸序列在一些重要的胺基酸位點上的保守性也很高，而且在 ORF1 所推衍之胺基酸序列中，在第 400 個至第 562 個胺基酸之間可發現 *exo domain*，而在第 1233 個胺基酸至第 1335 個胺基酸之間可發現 *pol domain*，因此推測 ORF1 應為花生簇葉病菌質體的 *polC* 基因。由 ORF2 之核酸序列推衍所得之胺基酸序列進行比對分析後，發現該序列與其他細菌的 NADH oxidase 基因 *nox* 相似。以罹病日日春全 RNA 進行反轉錄聚合酶連鎖反應的結果顯示 *polC* 基因有轉錄情形發生，且選殖株 pH15-40 的嵌入片段包含 *polC* 基因全長。

關鍵詞：DNA 聚合酶、花生簇葉病、*polC*

## 緒言

植物菌質體 (phytoplasma)，原名為似菌質體 (mycoplasma-like organism, MLO)，是一種重要的植物病原細菌。目前已知全球有超過兩百種的植物病害是由植物菌質體所引起<sup>(4)</sup>，其中包括了梨、花生、甘藷及泡桐等重要經濟作物的病害，在農業上造成十分嚴重的損失。花生簇葉病 (peanut witches' broom, PNWB) 在台灣首先於澎湖及苗栗兩地被發現，其病原經由 4', 6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride (DAPI) 螢光染色、電子顯微鏡之檢定，及利用菟絲子 (dodder) 與南斑浮塵子 (*Orosius orientalis* Matsumura) 傳播等方式鑑定後，確定是由植物菌質體所引起之病害<sup>(32)</sup>。

原核生物具有三種 DNA 聚合酶，分別為 DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I)、DNA 聚合酶 II (DNA polymerase II)、及 DNA 聚合酶 III (DNA polymerase III)。DNA 聚合酶 I 為具有 5' to 3' DNA 聚合功能、3' to 5' 核酸外切酶功能以及 5' to 3' 核酸外切酶功能<sup>(31)</sup>。DNA 聚合酶 II 與 DNA 聚合酶 III 皆具有 5' to 3' DNA 聚合功能及 3' to 5' 核酸外切酶功能，但 DNA 聚合酶 II 之活性較 DNA 聚合酶 III 低，且其突變株仍可存活。一般認為 DNA 聚合酶 III 為原核生物

最重要之 DNA 複製酶 (replicase)，與生物體維持及繁衍生命息息相關<sup>(13)</sup>。DNA 聚合酶 III 之完全酶 (holoenzyme) 共由十個次單位 (subunit) 所組成，其中單位與 DNA 之合成具直接相關性，其係由 *polC* 基因轉而成<sup>(20)</sup>。本實驗室曾於 1996 年嘗試選殖花生簇葉病菌質體之 *polC* 基因，期間獲得一選殖株 PDPB5，其嵌入片 3' 端之核酸序列與 *M. genitalium* 及 *M. pulmonis* 之 *polC* 基因的 3' 端相似，其 5' 端之互補股序列與 *M. genitalium dnaN* 基因相似<sup>(1)</sup>，然而其完整之 ORF (open reading frame) 及 *polC* 基因之功能區塊均未在該選殖片段中找到，故時無法有完整之結論，因此，本實驗即在於利用不同之選殖策略再次從事花生簇葉病菌質體之 *polC* 基因之選殖企圖能選殖出該基因全長，並與前述之實驗結果加以對照，以期能對其核酸序列及特性有更完整之探討。

## 材料與方法

### 試驗植物之繁殖與植物全 DNA (total DNA) 之純化

本實驗以日日春 (*Catharanthus roseus*, periwrinkle) 為試驗植物來繁殖植物菌質體。利用菟絲子 (*Cuscuta*)

*australis*, dodder) 作為媒介，將花生病株上之植物菌質體由花生傳入日日春健株上<sup>(32)</sup>。溫室中乃利用旁嫁接法 (side graft) 繁殖。而植物全 DNA 抽取之方法主要乃參考 Ko 與 Lin 等人的方法<sup>(19)</sup>，稍作修改後進行。

### 花生簇葉病菌質體 *polC* 基因篩選用核酸探針 (probe) 之製備

本研究之資料係由國家衛生研究院巨分子序列分析軟體 (GCG, <http://gcg.nhri.org.tw/>) 基因資料庫及 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中收集細菌之 *polC* 基因之核酸序列 (nucleic acid sequence) 與胺基酸序列 (amino acid sequence)，以親緣關係較近之 Mollicutes 綱及其他革蘭氏陽性細菌為主；另輔以革蘭氏陰性細菌如 *Escherichia coli* 的資料。於基因庫中所蒐集之資料包括 *Bacillus subtilis* (X52116)<sup>(15)</sup>，*Mycoplasma genitalium* (L43967)<sup>(12)</sup>，*M. pneumoniae* (U00089)<sup>(17)</sup>，*M. pulmonis* (U06833)<sup>(7)</sup>，*Ureaplasma urealyticum* (AE002135)<sup>(14)</sup>，*Staphylococcus aureus* (AB053353)<sup>(18)</sup>，*Streptococcus pyogenes* (AF280761)<sup>(8)</sup> 及 *Escherichia coli* (D83536)<sup>(30)</sup> 等細菌之 *polC* 基因之核酸及胺基酸序列共八筆。將收集到之核酸及胺基酸序列先行輸入 CLUSTAL<sup>(16)</sup> 軟體進行比對，找出此蛋白質所特有保守性較高且相距有數百鹼基 (base) 的六個區域，依該等區域對應之核酸序列，分別設計出長約 20 bp 大小之簡併式寡核酸 (degenerate oligonucleotides) 引子 F3-2: 5'-GGKCARCAYCCWGGKG G DAT-3' 及 R6-2: 5'-RGCR TGK GCTTTMGGRAA-3'。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction) 中，兩引子濃度各為 0.5  $\mu$ M、並以 50 ng 前述製備之罹病或健康植物全 DNA 進行 35 個循環，反應條件如下：94 30 秒，47 30 秒，72 1 分鐘。反應產物經 1% 瓊脂凝膠水平電泳 (agarose gel horizontal electrophoresis) 分析後再利用 QIAquick<sup>™</sup> gel extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 與 TOPO TA cloning<sup>™</sup> kit (Invitrogen Corporation, San Diego, CA) 進行 PCR 產物之純化與選殖。所獲得之選殖株重組質體嵌入片段之核酸序列定序分析工作委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech, Taipei, Taiwan) 進行。

核酸探針之標識反應採用 Roche Molecular Biochemicals 公司 (Mannheim, Germany) 所開發之 PCR DIG probe synthesis kit 進行，在 PCR 非放射標識反應中，引子則依上述選殖株重組質體核酸定序所得之部分 *polC* 基因片段序列，重新於其上適當位置設計專一性引子 F4: 5'-ACTTTGATTAAGTTTTTGATG-3'，R6: 5'-CCAATC ATTTACATTATGCTC -3' (引子 F4 與 R6 相距 493 bp)。以此引子對 F4/R6 對罹病日日春全 DNA 以 PCR 進行標識反應，以獲得篩選 *polC* 基因之核酸探針。

### 南方氏轉漬 (Southern blotting) 及雜配反應 (hybridization)

取 5  $\mu$ g 感染花生簇葉病之植物全 DNA，分別以 10 單位之 *Bam*HI, *Bg*III, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I 核酸內限制酶 (Roche Molecular Biochemicals) 進行酵解；另外，取 5  $\mu$ g 健康日日春全 DNA 及 500 ng 用於製備

核酸探針之重組質體 DNA 分別以 10 單位之 *Hind*III 與 *Eco*RI 核酸內限制酶進行酵解以作為對照組，進行 6 小時之酵解後，再以 0.8% 瓊脂凝膠進行水平式電泳，並將 DNA 轉漬至尼龍濾膜 (Hybond<sup>™</sup>-N+, 0.45  $\mu$ m nylon transfer membrane; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)，隨後進行雜配及呈色反應<sup>(9, 19)</sup>。

### 花生簇葉病菌質體基因體 DNA 重組質體之構築與篩選

由於上述以 *Hind*III 內限制酶酵解罹病日日春全 DNA 之南方氏雜配反應結果顯示其略大於 5.0 kb 之酵解產物與核酸探針有雜配訊號產生 (見結果)，而該 5.0 kb 之酵解產物為可能含有完整 *polC* 基因之最小 DNA 片段，因此初步選擇以 *Hind*III 內限制酶酵解罹病日日春全 DNA 以進行選殖工作。首先取 10  $\mu$ g 之罹病日日春全 DNA 以 15 單位之 *Hind*III 內限制酶於 37 下作用 6 小時，以 65 處理 10 分鐘以終止反應，再以 0.8% 瓊脂凝膠進行水平式電泳，切下 5 至 5.5 kb 大小之酵解產物，以 QIAGEN 公司所開發生產之 QIAquick<sup>™</sup> gel extraction kit 進行純化，此即為擬選殖嵌入之 DNA，並選用 pBluescriptII SK (-) phagemid (Stratagene, La Jolla, CA) 為載體，將其同樣以內限制酶 *Hind*III 酵解後，再以 alkaline phosphatase (CIAP) (Stratagene) 處理進行 5' 端去磷酸化反應 (dephosphorylation)，隨後將兩者以莫耳數比 1:1 (167 ng 擬嵌入之片段: 100 ng 載體) 之比例混合放入微量離心管中，加入 1 單位之 T4 DNA ligase (Promega Corporation, Madison, WI)，於 16 水浴中作用 16 小時以進行黏結反應。取 DNA 黏結反應混合液加入 200  $\mu$ l 以氯化鈣 (CaCl<sub>2</sub>) 法<sup>(11)</sup> 處理的 *E. coli* TOP10F' 勝任細胞，進行轉形作用以獲得轉形株 (transformant)。

以菌落雜配反應 (colony hybridization) 之方法大量地篩選轉形株，其步驟為將尼龍濾膜 (Hybond<sup>™</sup>-N+; Amersham Pharmacia Biotech) 貼於已於 37 培養 16 小時之轉形株菌盤上，並以 18 G 針頭在濾膜上打洞做記號後，在 37 培養箱中靜置 5 分鐘使濾膜吸附菌體。隨後將此吸附有菌體之濾膜取出置於以 denaturation solution (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) 浸濕之 3MM 濾紙上 5 分鐘，將接觸菌體的一面朝上，而後取出尼龍濾膜置於以 neutralization solution (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5; 3 M NaCl) 浸濕之 3MM 濾紙上 5 分鐘，再取出濾膜置於以 2x SSC 浸濕之 3MM 濾紙上 15 分鐘，之後置於 3MM 濾紙上風乾，利用紫外線聯結器施以 1.2x10<sup>5</sup>  $\mu$ Ci/cm 強度的 UV 照射濾膜 20 秒，使 DNA 與尼龍濾膜聯結，其後進行之雜配與呈色反應步驟同南方氏雜配反應。篩選所得之選殖株重組質體嵌入片段之核酸序列定序分析工作係委由明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech) 進行。定序結果並以 Lasergene 軟體 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 及連結 NCBI 基因資料庫對嵌入 DNA 之核酸序列進行分析，設定 ATG 為起始密碼，TGA、TAG 及 TAA 為終止密碼<sup>(21)</sup>，找出可能之 ORF。

### 反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription PCR, RT-PCR)

取 5  $\mu$ g 罹病或健康植株之全 RNA，加入 1  $\mu$ l (10

units) RNase-free DNase I (Roche Molecular Biochemicals), 以 nuclease-free 無菌水調整體積至 20  $\mu$ l。以 37  $^{\circ}$ C 處理 30 分鐘, 再經 68  $^{\circ}$ C 處理 10 分鐘以去除 DNase I 活性及 RNA 之二級結構, 並立即置於冰上待用。本實驗之反轉錄聚合酶連鎖反應是採用 SuperScript<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR with Platinum<sup>™</sup> Taq 套組 (Invitrogen Corporation)。實驗時取 1  $\mu$ l 上述反應液 (0.5  $\mu$ g RNA), 再依序加入 12.5  $\mu$ l 的 2x reaction mix、引子 (FH15-3/ RH15 or FH15-4/ RH15) (FH15-3: 5'- AAATATTAGAAATTTTC- 3', FH15-4: 5'- CCATTAATAGAAGTTGTGG -3', RH15: 5'- TTTTAATCTGAAATGTCAAA -3')(FH15-3、FH15-4 皆位於 *polC* 上游、RH15 位於 *polC* 之近 5' 端處, 其相對位置見圖一) 各 1  $\mu$ l (使反應濃度為 0.8  $\mu$ M), 加入 0.5  $\mu$ l RT/ Platinum<sup>™</sup> Taq, 再加入 nuclease-free 無菌水使反應總體積為 25  $\mu$ l。反應流程為 50  $^{\circ}$ C 30 分鐘, 94  $^{\circ}$ C 2 分鐘; 再以 94  $^{\circ}$ C 30 秒鐘, 56  $^{\circ}$ C 30 秒鐘, 72  $^{\circ}$ C 30 秒鐘進行 35 個循環。另外, 分別取健康或感染花生簇葉病之日日春全 DNA 各 50 ng、健康或感染花生簇葉病之日日春全 RNA 各 0.5  $\mu$ g, 加入無菌水 (使反應總體積為 25  $\mu$ l)、上述引子 (20  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l (使反應濃度各為 0.8  $\mu$ M), 再加入 1.25 單位之 Taq DNA polymerase (Promega Corporation), 進行 PCR 反應, 反應程式為 94  $^{\circ}$ C 30 秒, 56  $^{\circ}$ C 30 秒, 72  $^{\circ}$ C 30 秒進行 35 個循環, 以做為聚合酶連鎖反應之對照組。反應完成後之產物於 1% 瓊脂凝膠進行水平電泳分析。

## 結果

### 花生簇葉病菌質體 *polC* 基因篩選用核酸探針之製備

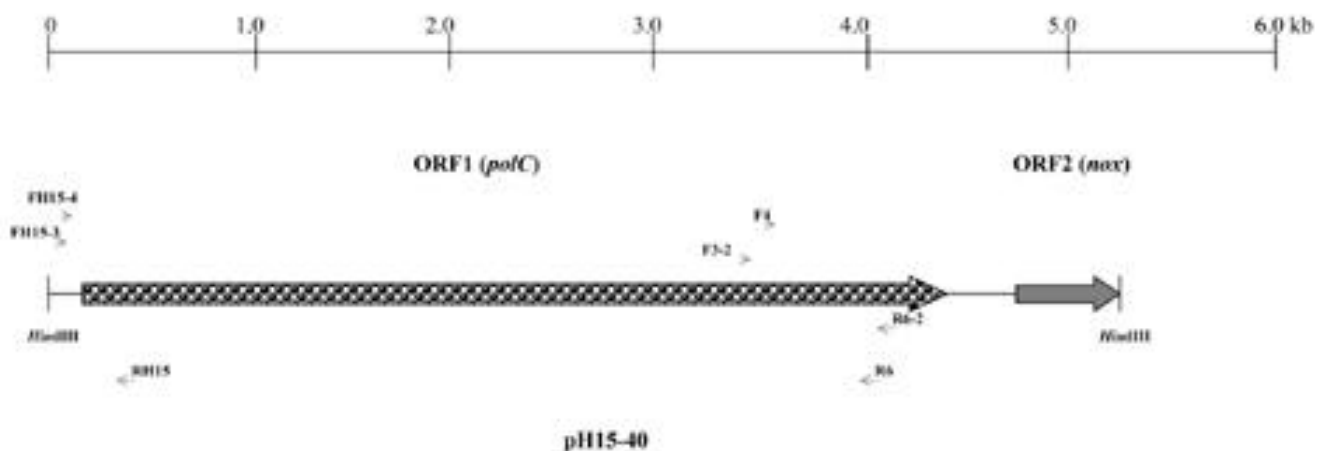
以簡併式寡核酸引子對 F3-2/R6-2 進行聚合酶連鎖反應之產物經純化與選殖後獲得一轉殖株重組質體 pF3-2-15, 其嵌入片段大小為 729 bp。依重組質體 pF3-2-15 嵌入片段核酸定序所得之部分 *polC* 基因序列, 重新於其上適當位置設計專一性引子對 F4/R6 對罹病日日春全 DNA 以 PCR 進行 DIG 標識反應, 即獲得 493 bp 之 *polC* 基因篩選用核酸探針。

### 南方氏轉漬及雜配反應

以核酸內限制酶 *Bam*HI, *Bgl*III, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*PstI, *Sma*I, *Xba*I 及 *Xho*I 酵解感染花生簇葉病之日日春 DNA 進行南方氏轉漬及雜配反應, 並以 *Eco*RI 酵解之組質體 pF3-2-15 作為正反應對照組 (positive control)。果顯示此探針對受花生簇葉病菌質體感染之日日春 DNA 可產生雜配訊號, 其中以 *Hind*III 酵解者, 可在於 5.0 kb 之 DNA 片段處產生雜配訊號; 以 *Cla*I 酵解者可在約 8.0 kb 之 DNA 片段處產生訊號; 以 *Xba*I 酵解者可在約 4.0 kb 之 DNA 片段處產生訊號; 以 *Bgl*III 酵解者可在約 9.0 kb 之 DNA 片段處產生訊號; 而以其餘數種核酸內限制酶酵解者皆在 10 Kb 以上之 DNA 片段處產生配訊號, 而正反應對照組也有專一性訊號產生; 相對的在健康日日春之全 DNA 則沒有任何雜配訊號 (圖二)。

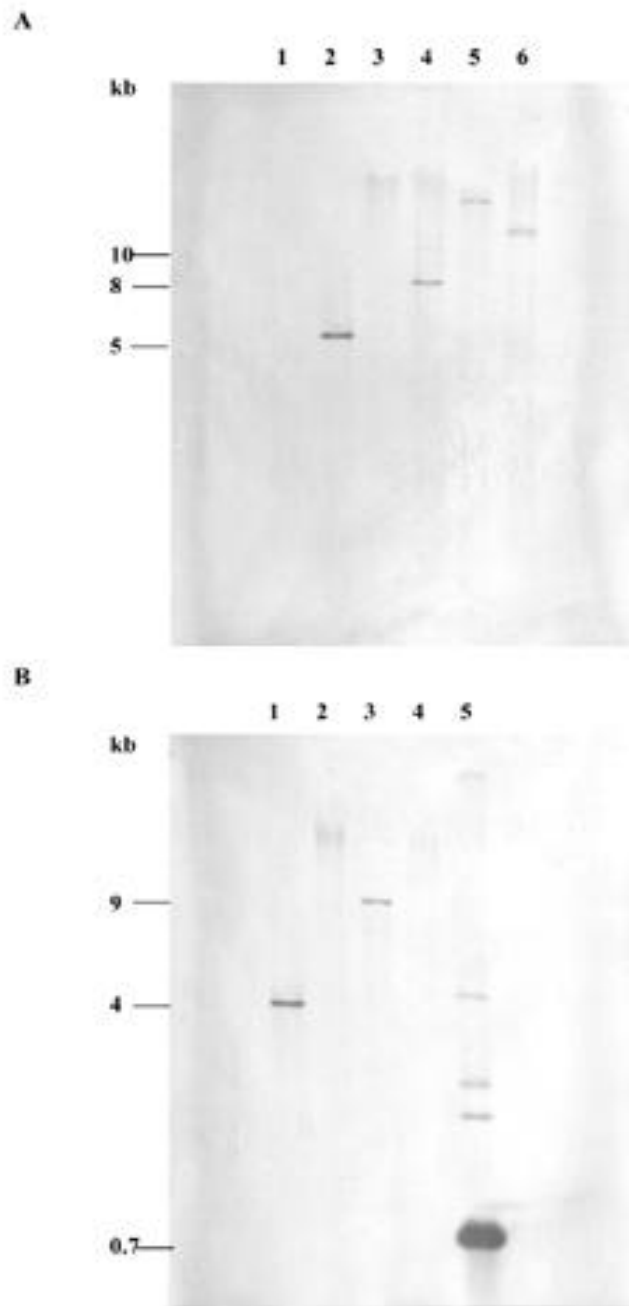
### 花生簇葉病菌質體基因體 DNA 重組質體之篩選及形株之特性分析

以菌落雜配反應進行篩選, 得到一個有雜配訊息的組質體轉形株 H15-40。並以其製備大量的重組質體 pH15-40 之 DNA, 並進行其嵌入片段全長之核酸定序分析。酸序列之定序共進行兩次, 確定無誤後再進行其核酸序之後續分析。結果顯示重組質體 pH15-40 包含 5221 bp 嵌入片段, 其核酸組成為 14.2% 的 G, 37.3% 的 A, 38.1% 的 T, 10.3% 的 C, A+T 值為 75.5%, G+C 值為 24.5% 符合植物菌質體基因體低 G+C 值的特性。接著 Lasergene 軟體 (DNASTAR Inc.) 及連結至 NCBI 基因資料庫的 ORF Finder 針對此 5221 bp 之嵌入 DNA 核酸序列行分析, 找出可能之 ORF, 結果在 pH15-40 之嵌入片段發現一個完整的 ORF1 (nt 88-4566) 及一不完整之 ORF2 (4720-5221) (圖一)。本文中後續所述之序列已登錄 NCBI, 登錄號碼為 GenBank AY259517, 請參照。ORF1 之核酸序列長度共有 4479 bp, 可推演出 1492 個胺基酸基因產物大小估計約為 174.9 kD 的蛋白質, 轉譯起始密碼為 ATG, 終止密碼為 TGA。ORF1 中 A+T 值為 75.42% G+C 值為 24.58%, 其核酸組成為 13.98% 的 G, 37.31%



圖一、重組質體 pH15-40 所含之 ORF1 及 ORF2 示意圖及實驗中所用之引子相對位置。

Fig. 1. Diagram showing the relative positions of ORF1 and ORF2 in the insert DNA of recombinant plasmid pH15-40 and annealing sites of primers applied in this study. Large arrows refer to the direction of transcription, and small arrows refer to 5' to 3' direction of oligonucleotide primers.



圖二、健康及受花生簇葉病菌質體感染之日日春全 DNA 以不同內限制酶酵解後以 *polC* 基因核酸探針進行南方氏雜配分析。

Fig. 2. A, Southern blot analysis of total DNA (5  $\mu$ g per lane) prepared from healthy periwinkle digested with restriction enzyme *Hind*III (lane 1) and from diseased periwinkle infected with PNWB-phytoplasma digested with restriction enzymes *Hind*III (lane 2), *Bam*HI (lane 3), *Cla*I (lane 4), *Eco*RI (lane 5), and *Pst*I (lane 6). B, Southern blot analysis of total DNA from diseased periwinkles infected with PNWB-phytoplasma digested with restriction enzymes *Xba*I (lane 1), *Xho*I (lane 2), *Bgl*II (lane 3), *Sma*I (lane 4) and DNA from recombinant plasmid pF3-2-15 digested with restriction enzyme *Eco*RI (lane 5). Hybridizations were conducted at 68 using the PCR DIG-labeled *polC* gene probes. Sizes (in kb) of the hybridization signals are indicated.

A, 38.11% 的 T, 10.60% 的 C; 其密碼利用性 (codon usage) 如表一所示, 密碼利用率最高為 AAA (9.57%), 其次為 AUU (7.9%), 密碼第三位核酸為 A 或 U 者佔所有密碼之 88.07%, 密碼第一位核酸為 A 或 U 者佔所有密碼之 62.75%。ORF2 為一不完整的 ORF, 其核酸序列長度為 502 bp, 轉譯成胺基酸序列後共有 167 個胺基酸, 轉譯起始密碼為 ATG, 未發現終止密碼。ORF2 中 A+T 值為 71.66%, G+C 值為 28.34%, 其核酸組成為 18.36% 的 G, 33.93% 的 A, 37.73% 的 T, 9.98% 的 C。以 ORF1 之核酸及胺基酸序列連結至 NCBI 資料庫, 利用其中 BLAST 軟體進行比對, 發現 ORF1 與其他革蘭氏陽性細菌之 *polC* 基因相似, 在胺基酸序列上有 50% 以上之相似度 (similarity)(表二), 例如與 *B. subtilis* 之 DNA 聚合酶 III 之相似度達 57%, 因此推測 ORF1 可能為花生簇葉病原菌質體之 *polC* 基因。根據前人之研究, 革蘭氏陽性細菌之 DNA 聚合酶 III 包含兩個重要之功能區塊, 如 *B. subtilis* 之 DNA 聚合酶 III, 分別為位於第 415 至第 570 個胺基酸具有 3' to 5' 核酸外切酶功能的 *exo* domain; 與位於第 1175 至第 1273 個胺基酸具有 5' to 3' 之 DNA 聚合功能的 *pol* domain<sup>(6, 23)</sup>, 此革蘭氏陽性細菌的 DNA 聚合酶 III 所特有的兩個功能區塊在本研究中之花生簇葉病菌質體之 *PolC* 蛋白上都有發現, 其中 *exo* domain 位於花生簇葉病菌質體 *PolC* 蛋白的第 400 至第 562 個胺基酸之間; *pol* domain 位於花生簇葉病菌質體 *PolC* 蛋白的第 1233 至第 1335 個胺基酸之間。此外, 花生簇葉病菌質體的 *PolC* 蛋白的胺基酸序列在 DNA 聚合酶 III 重要的胺基酸位點上之保守性很高, 如 *exo* domain 中的 Asp<sup>409</sup>、Glu<sup>411</sup>、Gly<sup>414</sup> 及 Asp<sup>499</sup> (相對於 *B. subtilis* DNA 聚合酶 III 的 Asp<sup>425</sup>、Glu<sup>427</sup>、Gly<sup>430</sup> 及 Asp<sup>510</sup>)<sup>(6, 27)</sup>; *pol* domain 中的 Ser<sup>1233</sup>、Leu<sup>1235</sup>、Phe<sup>1326</sup> 及 Val<sup>1335</sup> (相對於 *B. subtilis* DNA 聚合酶 III 的 Ser<sup>1175</sup>、Leu<sup>1177</sup>、Phe<sup>1264</sup> 及 Val<sup>1273</sup>)<sup>(5, 6, 15, 26)</sup>, 及分別位於 *pol* domain 上游及下游的 Cys<sup>988</sup> 與 Ser<sup>1420</sup> (相對於 *B. subtilis* DNA 聚合酶 III 的 Cys<sup>940</sup> 與 Ser<sup>1360</sup>)<sup>(15)</sup>。在其起始密碼 ATG 之上游約 9 至 27 個鹼基間, 有兩個與植物菌質體<sup>(22)</sup> 及一般原核生物的 16S rRNA 3' 端的預列互補, 類似 Shine-Dalgarno 序列 (Shine-Dalgarno sequence), 亦即核糖體鍵結位置 (ribosomal binding site, RBS) 以及啟動子 (promoter)<sup>(29)</sup>。而以 ORF2 之核酸及胺基酸序列連結至 NCBI 資料庫, 利用其中 BLAST 軟體進行比對, 發現與其他革蘭氏陽性細菌之 NADH oxidase 基因 *nox* 之 5' 端相似, 在胺基酸序列上有 61% 以上之相似度 (表三), 在其起始密碼 ATG 之上游約 7 至 19 個鹼基間, 亦發現兩個可能的核糖體鍵結位置。

### 反轉錄聚合酶連鎖反應

以花生簇葉病菌質體感染之日日春全 RNA 進行 PCR 反應, 結果並沒有任何產物產生, 顯示 DNaseI 作用完全, RNA 樣本內無 DNA 殘留。而以花生簇葉病菌質體感染之日日春全 RNA 進行 RT-PCR 的結果, 以 FH15-3/RH15 引子進行 RT-PCR 反應, 無增幅出任何產物 (圖三 A); 而以 FH15-4/RH15 引子對進行 RT-PCR 反應, 則可對罹病日日春全 RNA 分別增幅出如預期大小 (408 bp) 之產物, 而以健康日日春全 RNA 為模版則沒有任何產物出現 (圖三 B), 顯示所選殖到之花生簇葉病菌質體 *polC* 基因在

花生簇葉病菌質體有轉錄產物的產生。因此推測花生簇葉病菌質體 *polC* 基因的轉錄起始位置應位於 FH15-3 引子黏合位置與 FH15-4 引子黏合位置之間，故無法利用 FH15-3/RH15 引子對以 RT-PCR 增幅出任何產物。

## 討 論

由於 DNA 聚合酶 III 為原核生物 DNA 複製過程中最重要的酵素之一，因此一般認為解譯出此蛋白的 *polC* 基因在演化的變異過程中累積相當的保守性，尤其是其中的 *exo domain* 以及 *pol domain*。但鑑於革蘭氏陽性細菌與革蘭氏陰性細菌之 DNA 聚合酶 III 之基因序列、功能等特性上仍有較大的差異存在 (7, 8, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 23, 30)，因此本實驗採用之基因選殖策略為利用相同基因在胺基酸序列上應

具有較高保守性之特性，收集多種革蘭氏陽性細菌 *polC* 基因之核酸及胺基酸序列，搜尋其保守性區段與高保守胺基酸序列所相對應之核酸密碼，進行簡併 (degenerate) PCR 引子設計。引子對 F3-2/R6-2，可增幅具專一性大小為 729 bp 的單一 PCR 產物。將該 PCR 產物進行選殖後，獲得一選殖株重組質體 pF3-2-15，其嵌入段包含了花生簇葉病菌質體 *polC* 基因之一部分片段，進而利用其序列設計專一性 PCR 引子，以獲得 *polC* 基因篩選用探針，此乃植物菌質體基因選殖之最關鍵步驟。

本實驗乃將花生簇葉病菌質體 DNA 構築 pBluescriptII SK (-) phagemid 中，以期得到具有花生簇葉病菌質體 *polC* 基因之選殖株。Ott 等人在研究中提到 *subtilis* 的 DNA 聚合酶 III 會抑制 *E. coli* 的生長<sup>(24)</sup>，因此人於篩選重組質體轉形株時即未添加基因表現誘導

表一、花生簇葉病菌質體 *polC* 基因之密碼應用性  
Table 1. Codon usage in the PNWB-phytoplasma *polC* gene

1 <sup>st</sup> base	Codon with 2 <sup>nd</sup> base								3 <sup>rd</sup> base
	U		C		A		G		
	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	
U	Phe (F)	104	Ser (S)	42	Tyr (Y)	68	Cys (C)	13	U
	Phe (F)	4	Ser (S)	5	Tyr (Y)	4	Cys (C)	1	C
	Leu (L)	104	Ser (S)	14	TER <sup>1</sup>	0	TER	1	A
	Leu (L)	27	Ser (S)	5	TER	0	Trp (W)	12	G
C	Leu (L)	12	Pro (P)	36	His (H)	32	Arg (R)	13	U
	Leu (L)	0	Pro (P)	1	His (H)	1	Arg (R)	5	C
	Leu (L)	7	Pro (P)	11	Gln (Q)	56	Arg (R)	3	A
	Leu (L)	1	Pro (P)	4	Gln (Q)	7	Arg (R)	2	G
A	Ile (I)	118	Thr (T)	34	Asn (N)	96	Ser (S)	16	U
	Ile (I)	11	Thr (T)	4	Asn (N)	5	Ser (S)	2	C
	Ile (I)	34	Thr (T)	15	Lys (K)	143	Arg (R)	13	A
	Met (M)	22	Thr (T)	3	Lys (K)	12	Arg (R)	5	G
G	Val (V)	47	Ala (A)	36	Asp (D)	97	Gly (G)	31	U
	Val (V)	0	Ala (A)	5	Asp (D)	5	Gly (G)	7	C
	Val (V)	13	Ala (A)	5	Glu (E)	85	Gly (G)	16	A
	Val (V)	4	Ala (A)	4	Glu (E)	7	Gly (G)	3	G

<sup>1</sup> TER, termination codon

表二、花生簇葉病菌質體 *polC* 基因之胺基酸序列與多種細菌之 *polC* 基因之胺基酸序列相似度及相同度之分析

Table 2. The percentage of similarities and identities of the amino acid sequence of PNWB-phytoplasma putative PolC protein compared with those of the PolC proteins of various organisms

Organisms	Similarities	Identities
<i>Bacillus subtilis</i>	57%	40%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	55%	38%
<i>Staphylococcus aureus</i>	54%	37%
<i>Mycoplasma penetrans</i>	54%	35%
<i>Mycoplasma genitalium</i>	52%	34%
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	52%	33%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	51%	34%
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	50%	34%

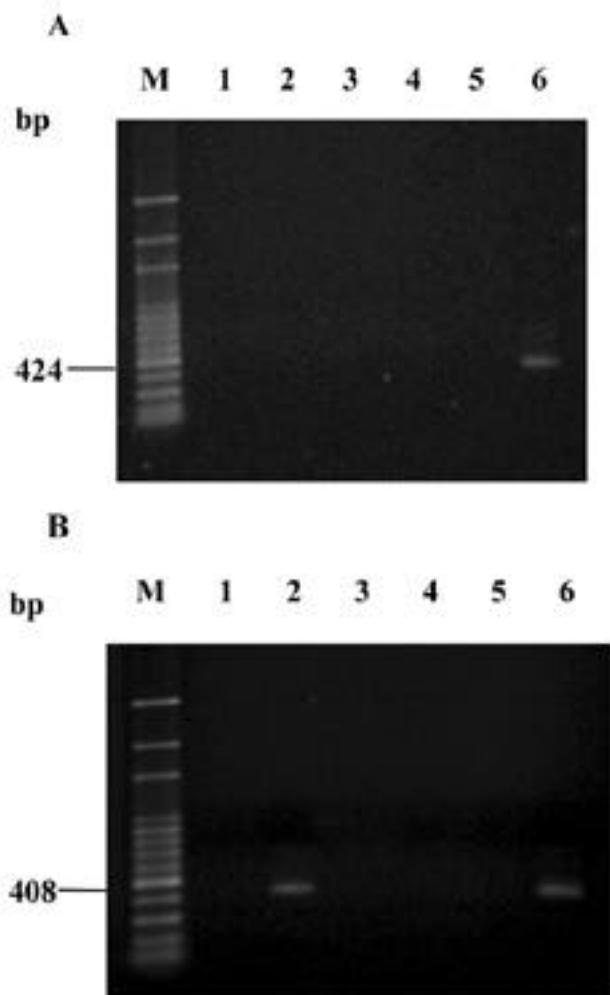
表三、花生簇葉病菌質體 *nox* 基因之胺基酸序列與多種細菌之 *nox* 基因之胺基酸序列相似度及相同度之分析

Table 3. The percentage of similarities and identities of amino acid sequence of PNWB-phytoplasma putative NAO oxidase compared with those of the NADH oxidases various organisms

Organisms	Similarities	Identities
<i>Enterococcus faecalis</i>	75%	54%
<i>Lactobacillus brevis</i>	75%	53%
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	70%	48%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	63%	37%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	61%	39%
<i>Mycoplasma genitalium</i>	61%	38%

(inducer) IPTG, 故乃直接利用菌落雜合反應篩選選殖株, 以避免重組質體之嵌入片段中 *polC* 基因表現而抑制轉形株生長, 徒增轉形株篩選之困難。

實驗中所篩選獲得之選殖株 H15-40, 其內之重組質體 pH15-40 包含兩個 ORFs, 其 A+T 值分別高達 75.42% 與



圖三、以反轉錄聚合酶連鎖反應分析 *polC* 基因之轉錄產物。

Fig. 3. Transcript of the *polC* gene was verified by using RT-PCR. A, Primer FH15-3, located in the upstream region of the *polC* gene and primer RH15, in the 5' region of the *polC* gene were used. B, Primer FH15-4, located in the upstream region of the *polC* gene and primer RH15, in the 5' region of the *polC* gene were used. RT-PCR products were amplified by using RNA templates extracted from healthy periwinkle (lanes 1, A and B), and from periwinkle infected with PNWB-phytoplasma (lanes 2, A and B). PCR products were amplified by using RNA templates extracted from healthy periwinkle (lanes 3, A and B), and from periwinkle infected with PNWB-phytoplasma (lanes 4, A and B) and by using DNA templates extracted from healthy periwinkle (lanes 5, A and B), and from periwinkle infected with PNWB-phytoplasma (lanes 6, A and B). RT-PCR and PCR products were separated in a 1% agarose gel. M, 100 bp DNA ladder as molecular weight standards. Sizes of RT-PCR and PCR products are indicated on the left.

71.66%, 符合植物菌質體基因體之低 G+C 值特性, 將其核酸及胺基酸序列利用 NCBI 資料庫中 BLAST 軟體進行比對, 發現 ORF1 所推行之胺基酸序列與其他革蘭氏陽性細菌之 DNA 聚合酶 III 相似, 其大小 (1492 個胺基酸) 亦與其他革蘭氏陽性細菌之 DNA 聚合酶 III 符合, 而與 DNA 聚合酶 I、II 除了大小不同 (*M. genitalium* 之 DNA 聚合酶 I 大小為 291 個胺基酸; *Thermoplasma acidophilum* 之 DNA 聚合酶 II 大小為 791 個胺基酸)<sup>(12, 25)</sup> 之外, 其序列之比對結果亦不相似 (未展示結果); 而不完整之 ORF2 則與 *nox* 基因之 5' 端相似。

在 ORF1 核酸序列中共發現兩個起始密碼 ATG, 分別位於 ORF1 的第 1 個至第 3 個鹼基 (nt 88-90, pH15-40) 與第 220 個至第 222 個鹼基 (nt 307-309, pH15-40), 若由前者開始轉譯, 則可轉譯成 1492 個胺基酸, 略大於其他革蘭氏陽性細菌之 DNA 聚合酶 III (含有 1443 個至 1451 個胺基酸); 但若由後者開始轉譯, 則轉譯成 1419 個胺基酸, 略小於其他革蘭氏陽性細菌之 DNA 聚合酶 III。以正股引子之黏合位置位於起始密碼 (第 1 個至第 3 個鹼基) 上游 32 個鹼基之引子對 FH15-3/RH15 無法經 RT-PCR 對感染花生簇葉病原植物菌質體之日日春全 RNA 增幅出任何產物, 而以正股引子之黏合位置位於起始密碼上游 15 個鹼基的引子對 FH15-4/RH15 進行 RT-PCR 反應, 則可對罹病日日春全 RNA 增幅出預期之產物, 因此 ORF1 的轉錄之起始位置應位於 FH15-3 引子與 FH15-4 引子黏合位置之間, 也就是位於重組質體 pH15-40 的第 39 個至第 75 個鹼基之間, 故推測 ORF1 轉譯起始位置應位於 ORF1 的第一個鹼基; 至於確切之轉錄作用起始鹼基位置則仍需進一步研究證實。在轉譯起始密碼的上游亦發現一個可能的啟動子以及兩個可能的核糖體鍵結位置, 而核糖體鍵結位置一般位於轉譯之起始密碼上游約 5 個至 9 個鹼基的位置, 故推測離轉譯起始密碼最近的核糖體鍵結位置為最有可能的核糖體鍵結位置。此外, 由於前人研究發現植物菌質體密碼應用上沒有以 UGA 為 tryptophan 密碼的情形<sup>(2, 3, 33)</sup>, 故推測 ORF1 之終止密碼應為位於 ORF1 第 4477 個鹼基 (nt 4564, pH15-40) 之 TGA, 而非位於其下游 52 個鹼基 (nt 4618, pH15-40) 之 TAA。

革蘭氏陽性細菌的 DNA 聚合酶 III 所特有的 *exo* domain 與 *pol* domain 兩個功能區塊在吾人研究之花生簇葉病菌質體之 PolC 蛋白上都有發現, 花生簇葉病菌質體的 PolC 蛋白的胺基酸序列在 DNA 聚合酶 III 重要的胺基酸位點上之保守性很高, 前人研究證實 *exo* domain 中的 Asp<sup>409</sup>、Glu<sup>411</sup>、Gly<sup>414</sup> 及 Asp<sup>499</sup>, 單一個胺基酸發生改變就會影響 3' to 5' 核酸酵解的功能, 造成 DNA 複製時錯誤率提高<sup>(6, 27)</sup>; *pol* domain 中的 Ser<sup>1233</sup>、Leu<sup>1235</sup>、Phe<sup>1326</sup> 及 Val<sup>1335</sup>, 其中一個發生改變就會影響 5' to 3' DNA 聚合的功能, 可能會導致 DNA 聚合酶 III 對 arylhydrazino pyrimidine 藥劑產生抗性或 DNA 複製受到抑制<sup>(5, 6, 15, 26, 27)</sup>, 以及分別位於 *pol* domain 上游及下游的 Cys<sup>988</sup> 與 Ser<sup>1420</sup>, 若其發生改變會造成 DNA 聚合酶 III 對高溫敏感<sup>(15)</sup>。由於吾人所選殖到的花生簇葉病菌質體 *polC* 基因, 其所轉譯之 PolC 蛋白的一級結構 (primary structure) 與其他革蘭氏陽性細菌的 DNA 聚合酶 III 的特性相同, 因此進一步支持此基因即為花生簇葉病菌質體之 *polC* 基因, 且其產物與革蘭氏陽性細菌的 DNA 聚合酶 III 應具有相同的功能。

在一般生長期的原核生物細胞內，其 DNA 聚合酶 III 之含量並不高，直到進入對數生長期，細胞中的 DNA 聚合酶 III 含量才迅速累積，此時的 DNA 聚合酶 III 含量與之前相比提高了五至八倍，每個細胞中約含有 50 個 DNA 聚合酶 III 分子，直到將進入穩定生長期 (stationary phase) 時，DNA 聚合酶 III 含量又迅速降低<sup>(10)</sup>，因此推測菌體內 *polC* 基因之表現受到良好而嚴謹的調控。吾人所選殖的花生簇葉病菌質體 *polC* 基因在其上游發現可能的核糖體鍵結位置以及啟動子 TATA box，然而並未發現如 *B. subtilis* 之 *polC* 基因上游的終止子 (terminator)、反向重複序列 (inverted repeats) 及 DnaA box 等與基因表現調控可能相關的序列<sup>(28)</sup>，但是以上與基因表現調控之可能相關序列於其他革蘭氏陽性細菌之 *polC* 基因上亦無發現，因此推測花生簇葉病菌質體 *polC* 基因的調控可能是採取與 *B. subtilis* 不同之方式，然而有關 *polC* 基因之調控機制之相關研究目前仍然不多。

在本研究中，吾人亦從日日春罹病植株中抽取其全 RNA，做為研究花生簇葉病菌質體 *polC* 基因表現與否之材料。利用反轉錄聚合酶連鎖反應，由黏合位置位於 pH15-40 嵌入片段 5' 端之引子對 FH15-3/RH15 無法從日日春罹病植株全 RNA 中增幅出產物，而利用 FH15-4/RH15 引子對進行增幅，則均可增幅出預期大小之產物，顯示本研究選殖到之 *polC* 基因有轉錄產物的產生，且轉錄作用起始位置應位於 FH15-3 引子與 FH15-4 引子黏合位置之間，而選殖株 pH15-40 之嵌入片段中的 ORF1 即為 *polC* 基因全長。

## 引用文獻

- 唐天仁 1996. 花生簇葉病病原菌質體核酸聚合酶 III 基因的選殖. 國立台灣大學植物病蟲害學研究所碩士論文.
- 莊景光 2000. 花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 和 *gyrA* 基因之選殖. 國立台灣大學植物病理學研究所碩士論文.
- 黃俊霖 1996. 絲瓜簇葉病植物菌質體可能的 ABC 轉運系統基因之分離及特性分析. 國立台灣大學植物學研究所碩士論文.
- Agrios, G. N. 1997. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 457-470 in: Plant pathology, 4<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Barnes, M. H., Hammond, R. A., Foster, K. A., Mitchener, J. A., and Brown, N. C. 1989. The cloned *polC* gene of *Bacillus subtilis*: characterization of the *azp12* mutation and controlled *in vitro* synthesis of active DNA polymerase III. *Gene* 85: 177-186.
- Barnes, M. H., Hammond, R. A., Kennedy, C. C., Mack, S. L., and Brown, N. C. 1992. Localization of the exonuclease and polymerase domains of *Bacillus subtilis* DNA polymerase III. *Gene* 111: 43-49.
- Barnes, M. H., Tarantino, P. M., Jr., Spacciapoli, P., Brown, N. C., Yu, H., and Dybvig, K. 1994. DNA polymerase III of *Mycoplasma pulmonis*: isolation and characterization of the enzyme and its structural gene, *polC*. *Mol. Microbiol.* 13: 843-854.
- Bruck, I. and O'Donnell, M. 2000. The DNA replicat machine of a Gram- positive organism. *J. Biol. Chem.* 275: 28971-28983.
- Chen, M. F. and Lin, C. P. 1997. DNA probes and P primers for the detection of a phytoplasma associa with peanut witches' broom. *Eur. J. Plant Pathol.* 1: 137-145.
- Ciarrocchi, G., Attolini, C., Cobianchi, F., Riva, S., Falaschi, A. 1977. Modulation of deoxyribonucleic a polymerase III level during the life cycle of *Bacil subtilis*. *J. Bacteriol.* 131: 776-783.
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. 1979. Prolonged incubat in calcium chloride improves the competence *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-28.
- Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adama, M. Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. Kerlavage, A. R., Sutton, G. G., Kelley, J. M., Fritchm J. L., Weidman, J. F., Small, K. V., Sandusky, J Fuhrmann, J. L., Nguyen, D. T., Utterback, T., Saudek, M., Phillips, C. A., Merrick, J. M., Tomb, J., Doughe B. A., Bott, K. F., Hu, P. C., Lucier, T. S., Peterson, S. Smith, H. O., and Venter, J. C. 1995. The minimal g complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 2 397-403.
- Gefter, M. L., Hirota, Y., Kornberg, T., Wechsler, J. and Barnoux, C. 1971. Analysis of DNA polymerase: and III in mutants of *Escherichia coli* Thermosensitive DNA Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 31: 3153.
- Glass, J. I., Lefkowitz, E. J., Glas, J. S., Heiner, C. Chen, E. Y., and Cassell, G. H. 2000. The compl sequence of the mucosal pathogen *Ureaplas urealyticum*. *Nature* 407: 757-762.
- Hammond, R. A., Barnes, M. H., Mack, S. L., Mitchel J. A., and Brown, N. C. 1991. *Bacillus subtilis* D1 polymerase III: complete sequence, overexpression, a characterization of the *polC* gene. *Gene* 98: 29-36.
- Higgins, D. G. and Sharp, P. M. 1989. CLUSTAL package for performing multiple sequence alignment o microcomputer. *Gene* 73: 237-244.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, C., and Herrmann, R. 1996. Complete sequence analy of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoni* *Nucleic Acids Res.* 24: 4420-4449.
- Inoue, R., Kaito, C., Tanabe, M., Kamura, K., Akimit N., and Sekimizu, K. 2001. Genetic identification of t distinct DNA polymerases, DnaE and PolC, that essential for chromosomal DNA replication *Staphylococcus aureus*. *Mol. Genet. Genomics* 66: 5: 571.
- Ko, H. C. and Lin, C. P. 1994. Development a application of cloned DNA probe for a mycoplasmal organism associated with sweet potato witches'-broc

- Phytopathology 84: 468-473.
20. Kornberg, A. and Baker, T. A. 1992. Prokaryotic DNA polymerases other than *E. coli* Pol I. Pages 165-196 in: DNA replication, 2<sup>nd</sup> ed. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA
  21. Kozak, M. Y. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47: 1-45.
  22. Lim, P. O. and Sears, B. B. 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant- pathogenic mycoplasmalike organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171: 5901-5906.
  23. Low, R. L., Rashbaum, S. A., and Cozzarelli, N. R. 1976. Purification and characterization of DNA polymerase III from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 251: 1311-1325.
  24. Ott, R. W., Goodman, L. E., and Ganesan, A. T. 1987. Expression of the *Bacillus subtilis polC* gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 207: 335-341.
  25. Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N., and Baumeister, W. 2000. The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407: 508-513.
  26. Sanjanwala, B. and Ganesan, A. T. 1989. DNA polymerase gene of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4421-4424.
  27. Sanjanwala, B. and Ganesan, A. T. 1991. Genetic structure and domains of DNA polymerase III of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 467-472.
  28. Sanjanwala, B. and Ganesan, A. T. 1993. Leader region of the gene encoding DNA polymerase III of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 236: 374- 378.
  29. Shine, J. and Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1342-1346.
  30. Tomasiewicz, H. H. and McHenry, C. S. 1987. Sequence analysis of the *Escherichia coli dnaE* gene. *J. Bacteriol.* 169: 5735-5744.
  31. Weaver, R. F. 1999. DNA replication I: basic mechanism and enzymology. Pages. 633-611 in: *Molecular Biology*, 1<sup>st</sup> ed. WCB/ McGraw-Hill, Boston, USA
  32. Yang, I. L. 1988. Witches' broom diseases of sweet potato and peanut in Taiwan. Ph. D. Thesis. Hokkaido Univ., Japan.
  33. Yu, Y. L., Yeh, K. W., and Lin, C. P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology* 144: 1257-1262.

## ABSTRACT

Chi, K. L.<sup>1</sup>, and Lin, C. P.<sup>1,2</sup> 2005. Cloning and analysis of *polC* gene of phytoplasma associated with peanut witches' broom. *Plant Pathol. Bull.* 14:51-58. (<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 and analyze the *polC* gene of peanut witches' broom- phytoplasma (PNWB-phytoplasma), a pair of degenerate oligonucleotide PCR primer F3-2/ R6-2 were designed according to the conserved sequences of the *polC* gene of various Gram-positive bacteria. The total DNA from a periwinkle infected with PNWB-phytoplasma was prepared for PCR reaction to amplify a 729-bp PCR product. The PCR product was then cloned into the vector pCR<sup>™</sup>II-TOPO to obtain a recombinant plasmid pF3-2-15. A 493-bp DIG-labeled PCR product was amplified by using the primers F4/ R6 designed according to the sequence of the insert DNA of pF3-2-15 and was used as a nucleic acid probe for the screening of recombinant plasmids of PNWB-phytoplasma DNA. The recombinant plasmid pH15-40 thus obtained comprises an insert DNA of 5221 nucleotides and encompasses a complete ORF of 4479 nucleotides and an incomplete ORF of 502 nucleotides, referred to as ORF1 and ORF2, respectively. The alignment of the primary structures of ORF1 and the DNA polymerase IIIs of other Gram-positive bacteria reveals strong conservation of long segments of sequences and perfect conservation of amino acid residues in the exo domain (400<sup>th</sup>-562<sup>nd</sup> amino acid) and the pol domain (1233<sup>rd</sup> -1335<sup>th</sup> amino acid). The analyses of nucleic acid sequence and amino acid sequence suggest that ORF1 is the putative *polC* gene of PNWB-phytoplasma. Moreover, the sequence of ORF2 is homologous to the NADH oxidase gene, *nox*, of other organisms. The results of RT-PCR reveal that the *polC* gene was transcribed when the total RNA from PNWB-phytoplasma infected periwinkle was applied as the template and the recombinant plasmid pH15-40 encompasses the entire *polC* gene of PNWB-phytoplasma.

Key words : DNA polymerase, peanut witches' broom, *polC* gene