

文章编号: 0412-0914(2000)01-0071-05

柑桔黄龙病病原 DNA 片段的克隆及序列分析

孔维文, 邓晓玲, 梁志慧, 唐伟文

(华南农业大学植物病理教研室, 广州 510642)

摘要: 本研究利用聚合酶链式反应技术(PCR), 合成了中国柑桔黄龙病病原的一段 DNA 片段。将此片段插入到 pUC18 的 EcoRI 位点, 并转化进大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的 DH5 α 菌株中。通过 PCR 鉴定, 限制性内切酶(EcoRI)酶切分析及核苷酸序列分析, 均表明克隆成功。序列分析结果显示, 克隆片段与已知相应序列间同源性达 98.6%。该研究为制备柑桔黄龙病病原 DNA 分子探针奠定了基础。

关键词: 柑桔黄龙病; 聚合酶链式反应; 克隆; 序列分析

中图分类号: S436.661.12 **文献标识码:** A

CLONING AND SEQUENCING OF THE CITRUS HUANGLONGBING PATHOGEN DNA

KONG Wei-wen, DENG Xiao-ling, LIANG Zhi-hui, TANG Wei-wen

(South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A DNA fragment of citrus yellow shoot pathogen in China was obtained by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into the EcoRI site of plasmid pUC18, which was later transformed into DH5 α strain of *Escherichia coli*. The cloned DNA fragment was verified by PCR, restriction endonuclease (EcoRI) digestion and sequencing analyses. The results of sequencing analysis showed that the cloned DNA shared 98.6% homology with a published DNA nucleotide sequence.

Key words: Citrus Huanglongbing; polymerase chain reaction(PCR); cloning; sequential analysis

柑桔黄龙病(citrus yellow shoot)是柑桔栽培上的毁灭性病害,严重地限制了柑桔生产。该病害目前被认为是由原核生物薄壁菌门韧皮部杆菌属(*Liberobacter*)引起的^[1]。根据病原物对热的敏感性、不同虫媒和地理分布,可分为亚洲株系(*L. asiaticum*)及非洲株系(*L. africanum*)2类^[2,3]。我国的柑桔黄龙病病原属于亚洲株系^[4]。近年来,随着我国柑桔良种苗木繁育体系的初步形成,生产上迫切要求有一套准确、灵敏及快速的病原检测方法,以适应对苗木的无毒鉴定及病害防治的需要^[5]。由于柑桔黄龙病症状复杂,易与一些生理性病害混淆,且植株感病后潜育期长,

收稿日期: 1998-09-21; 修回日期: 1999-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(39700096); 广东省自然科学基金资助项目(960431)

作者简介: 孔维文(1972-), 男, 广东人, 现在南京农业大学植物病理专业攻读博士学位; 邓晓玲(1966-), 女(哈尼族), 云南人, 副教授, 硕士, 主要从事植物病理学研究, 为本文的联系作者。

这就给黄龙病的正确诊断带来很大的困难。聚合酶链式反应技术(polymerase chain reaction, PCR)被证明是一种可快速、灵敏地检测出柑桔黄龙病病原的方法^[4,6]。但要制备检测柑桔黄龙病的 PCR 检测试剂盒,在生产上推广应用,首先要克隆一个病原 DNA 的片段。另外,若能将病原 DNA 的片段进行克隆,并用地高辛标记制备成探针,也可通过分子杂交手段在生产上大量检测柑桔黄龙病病原。本文报道了柑桔黄龙病病原 DNA 部分片段的克隆和序列分析结果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

感病长春花(*Catharanthus roseas*):盆栽于防虫网室内,柑桔黄龙病病原是由草地菟丝子(*Cuscuta campestris* L.)从病柑桔传递到长春花上,表现出典型的柑桔黄龙病斑驳症状,再经顶芽嫁接而获得的。

PCR 相关试剂:购自华美生物工程公司。

PCR 产物纯化试剂盒(PCR Clean Up Kit):购自 Boehringer Mannheim 公司。

EcoRI、去磷酸化酶、T₄DNA 连接酶(Ligase):均为 Promega 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 参照文献 CTAB 方法^[6,7],操作如下:取 1g 病叶中脉进行植物总 DNA 的提取;65℃水浴 1h,每隔 10~12 min 晃动样品一次;苯酚/氯仿、氯仿/异戊醇提取至少 2 次;DNA 沉淀加入 100 μl TE 及 0.5 μl RNaseA (10 mg/ml);置 37℃水浴 30 min;取 2 μl 在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察 DNA 的纯度并估算其浓度,其余置-20℃保存备用。

1.2.2 病原 DNA 特异片段的 PCR 扩增 引物根据报道的柑桔黄龙病病原亚洲株系(*L. asiaticum*)16S rDNA 的 DNA 序列(基因序号:M₉₄₃₁₉)设计,分别与其第 39~61 区段的核苷酸序列同源及与第 551~573 区段的核苷酸序列互补。为便于克隆,在 5' 端引入了 *EcoRI* 酶切位点。引物序列如下:引物 I 5'-TGAATTCTTCGAGGTTGGTGAGC-3';引物 II 5'-AGAATTCGACTTATCCCCACCT-3'。扩增片段长度为 535 bp。

PCR 扩增参照文献方法^[6]进行,取 0.1 μg 植物总 DNA 作模板,两段引物各 40 ng,总体积 50 μl,在 PCR 仪上扩增 30 个循环。取 5 μl 扩增产物进行常规琼脂糖凝胶电泳检测反应效果并估计其浓度。PCR 产物按 PCR Clean Up Kit 说明书方法进行纯化。

1.2.3 PCR 产物及质粒的酶切 参照 *EcoRI* 酶产品使用说明书进行。操作如下:各取 1μg 环状质粒 pUC18 及 500~750 ng 上述纯化的 PCR 产物,分别加入 5U 及 10U 的内切酶,反应总体积为 20 μl。反应在 37℃水浴中进行,pUC18 酶切 3.5 h 后检测酶切效果,以未酶切质粒作对照,至 4.5 h 后终止反应;PCR 产物酶切过夜(12 h 以上);酶切产物用氯仿、异丙醇及乙醇纯化。线性质粒按 Sambrook 等^[8]方法进行去磷酸化。

1.2.4 连接反应 参照 T₄DNA 连接酶产品说明书进行。操作如下:在 20 μl 反应总体积中,按 1:3 取一定量的质粒 pUC18 及 PCR 产物,T₄DNA 连接酶为 3U,对照为未去磷酸化及去磷酸化线性 pUC18。在 Perkin-Elmer PCR 仪上于 15℃恒温 12 h,然后转入 70℃恒温 10 min 以终止反应。

1.2.5 重组子的转化 按文献方法^[8,9]进行。受体菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α,用氯化钙法制备新鲜的感受态细胞。取上述连接产物各 10 μl,同时取 25 ng 环状 pUC18 作对照,分别与 200 μl 感受态细胞混匀。转化液涂布于 LB 固体培养基中,于 37℃恒温培养 12 h 以上。

1.2.6 重组克隆的筛选鉴定 利用 α -互补进行筛选,按煮沸法^[8]稍作改动进行重组子的提取。对提取的重组子利用 PCR、EcoRI 酶切及序列分析鉴定。取重组子约 10 ng 作模板,在 25 μ l 反应体积中进行 PCR 扩增,每个反应含 Taq 聚合酶 1U,扩增方法同前。取重组子约 1 μ g 作底物,在 40 μ l 反应总体积中加入 10U EcoRI 酶,于 37°C 水浴中反应 14 h。

1.2.7 核苷酸序列测定 DNA 序列测定采用双脱氧终止法。使用美国 ABI 公司 370 型自动序列分析仪,测定反应试剂盒购于 ABI 公司,操作按说明书进行。测定了 3 个重组克隆的核苷酸序列,每个克隆进行正反双方向的测定。测序结果与已发表的相关序列进行比较。

2 结果与分析

2.1 感病长春花总 DNA 扩增结果

如图 1 所示,可见有一条长 535 bp 的特异带被扩增出,与期望相符。

2.2 PCR 产物及质粒酶切结果

PCR 产物及质粒酶切结果如图 2 所示。

2.3 PCR 鉴定

由电泳结果(图 3),借助分子量标准,可知扩增产物大小为 535 bp。表明模板中含预期的 DNA 片段。

2.4 酶切鉴定

如图 4 所示,重组子酶切后出现 2 条线性 DNA 带,长的约 2 700 bp,短约 535 bp,而未酶切的重组子、未酶切及酶切的 pUC18 则无此短的 DNA 带。酶切与扩增结果均获得了此长约 535 bp 的特异 DNA 带。

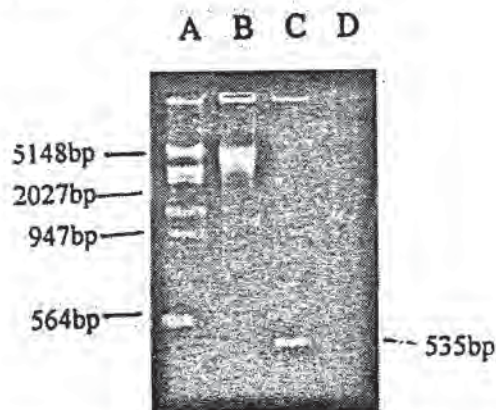


图 1 感病长春花 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplified result of the total DNA of infected periwinkle by PCR

A: 分子量标准 λ DNA/EcoRI+Hind III; B: 感病长春花总 DNA; C: 感病长春花总 DNA 扩增结果; D: 健康长春花总 DNA 扩增结果。

A: Molecular weight marker λ DNA/EcoRI+Hind III; B: The total DNA of infected periwinkle; C: Amplified results of the total DNA of infected periwinkle; D: Amplified results of the total DNA of healthy periwinkle.

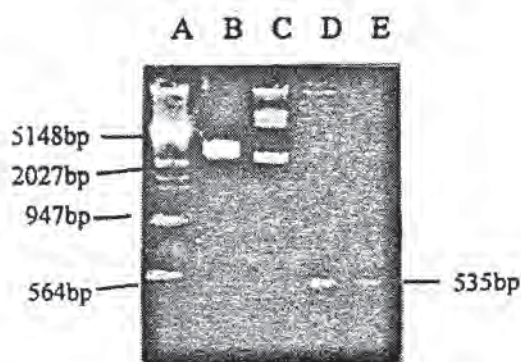


图 2 pUC18 与 PCR 产物酶切结果

Fig. 2 Digestion of pUC18 and PCR product with EcoRI

A: λ DNA/EcoRI+Hind III; B: pUC18 酶切; C: 未酶切之 pUC18; D: PCR 产物酶切; E: 未酶切之 PCR 产物。

A: Marker λ DNA/EcoRI+Hind III; B: Digestion of pUC18; C: Undigested pUC18; D: Digestion of PCR product; E: Undigested PCR product.

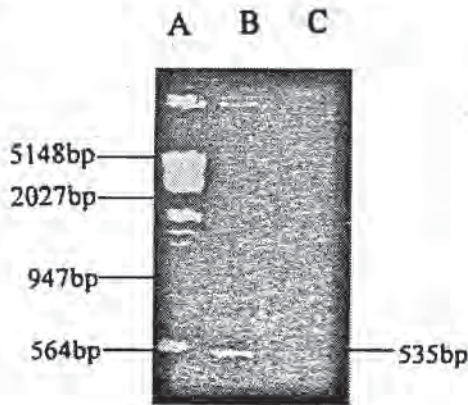


图3 重组子的PCR鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant by PCR
 A: λ DNA/EcoRI+Hind III; B: pUC18 重组子扩增结果; C: pUC18 扩增结果。
 A: λ DNA/EcoRI+Hind III; B: Result of PCR amplification to recombinant pUC18;
 C: Result of PCR amplification to pUC18

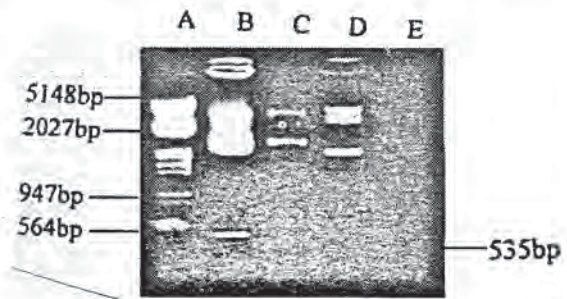


图4 重组子的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant by EcoRI digestion
 A: λ DNA/EcoRI+Hind III; B: 重组子的酶切结果;
 C: 未酶切重组子; D: 未酶切之 pUC18;
 E: 酶切之 pUC18
 A: λ DNA/EcoRI+Hind III; B: Digestion results of recombinant pUC18 by EcoRI; C: Undigested recombinant pUC18; D: Undigested pUC18; E: Digestion of pUC18 by EcoRI

2.5 克隆片段的核苷酸序列测定

测定了3个重组克隆,每个克隆按正反双向在ABI 370型自动序列分析仪上进行测序,结果表明:测得的3个重组克隆的核苷酸序列是完全一致的。我们将测得的结果与 Villechanoux 等^[10]发表的相应片段第66个至565个碱基(基因序号: M₉₄₃₁₉)进行比较。如图5所示,在比较的500个碱基中,仅有7个不同。计算结果表明,两者同源性达98.6%。

3 讨论与结论

本研究用我们自行设计的5'端含EcoRI位点的特异引物,及以典型斑驳症状的感病长春花总DNA为模板,利用PCR技术合成了一段长为535bp的DNA片段。以健康长春花总DNA作对照,PCR结果呈阴性反应。据此,我们初步认为,此DNA片段即为中国柑桔黄龙病病原(亚洲株系)DNA的特异扩增产物。将该片段纯化后插入到pUC18中,转化大肠杆菌。对抽提到的重组质粒,我们通过PCR鉴定以及EcoRI酶切分析,得到了一条长约535bp的特异DNA带,对该片段进行序列分析发现,它与国外发表的相应序列的500个碱基间的同源性达98.6%。据此,我们认为,中国柑桔黄龙病病原16S rDNA上的一个DNA片段被克隆成功。本研究关于中国柑桔黄龙病病原DNA上的一段长为535bp的DNA的成功克隆及序列分析,在国内属于首次。

柑桔黄龙病病原DNA片段的成功克隆在应用上有重要意义。我们不仅可以将该片段作为正对照,使PCR技术的应用规范化,从而提高PCR检测结果的可靠性;还可以对该片段进行标记制备成分子探针。若这2种技术进一步规范成试剂盒,将给柑桔黄龙病病原的检测及柑桔生产带来极大的方便。

Jagoueix等^[1]曾报道,利用原核生物的通用引物扩增出一条长1500bp的DNA片段,并对

克隆片段	TTGTGTCTCT	GATGGTCCGT	TTGCTTCTTT	TAATGGTATA	40
已知序列	-----	-----	-----A--	-----T--	
	AAGAATGTCG	ATGAAGAAAA	ATCTCGCGTT	CATGTAGAAG	80
	-----	-----CC	-----	-----G--	
	TTGTGATTTT	TGGTCGTGTC	ACACCAGTAG	AGTTAGCATA	120
	-----	-----	-----	-----A--	
	CAATCAAGTT	GAGAAGATCG	TATGATATTT	TGATTCGGT	160
	-----	-----	-----	-----	
	CATGAGTGGG	CGTATTATTA	TTATTGCTTT	TGTGTTTGTT	200
	-----	-----	-----C	-----	
	TTATATAGTA	GGTTGGTTGT	TTTTTAGAAA	GGCTAGGGAT	240
	-----	-----	-----	-----	
	GGCTAAAGTA	GTTTCTCGTA	TAGTTAAGTT	GCAGATAGAG	280
	-----	-----	-----	-----	
	TCGGGTCTG	CAAAGCCTTC	GCCGCCGTT	GGTCTGCAA	320
	-----	-----	-----	-----	
	TTGGACAGGC	TGGTATTCCC	ATTATGGCGT	TTTGTAAGGC	360
	-----	-----	-----	-----	
	GTTTAAATGCG	GCAACTGAGG	GTATGGAAAA	GGGTATTCCC	400
	-----	-----	-----	-----	
	ATCCCAACTA	CTGTGACTTG	TTATAAAGAT	AAGTCTTTTA	440
	-----	-----	-----	-----	
	CTTTTACGAT	GAGTCAGCCA	CCTGTAAGCT	TTTTTCTTAA	480
	-----	-----	-----	-----	
	AAAAGAGGTG	GGGATTAAGT			500
	-----	-----			

图 5 克隆片段的核苷酸序列及与已知片段的 500 个碱基的序列比较

Fig. 5 Sequencing result of the cloned DNA fragment and comparison with the published 500 nucleotides

其进行了克隆和测序。然后与多种细菌的相同 DNA 区段进行了比较,进而提出柑桔黄龙病病原新的分类地位的设想。这种设想现已被公认,即把柑桔黄龙病病原放到 *Liberobacter* 中。而我们所克隆的是柑桔黄龙病病原 DNA 上的另一段长 535 bp 的片段,这与其它原核生物相同区段同源性如何,对病原的分类地位的贡献如何,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] JAGOUEIX S,BOVE J M,GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria[J]. International Journal of Systematic Bacteriology,1994,44(2):379-386.
- [2] GRACA J V. Citrus greening disease[J]. Phytopathology,1991,29(1):109-136.
- [3] PLANET P,JAGOUEIX S,BOVE J M,et al. Detection and characterization of the African citrus greening liberobacter by amplification,cloning, and sequencing of the *rplKAJL-rpoBC* operon[J]. Current Microbiology. 1995,30(3):137-141.
- [4] 田亚南,柯穗,柯冲. 应用多聚酶链式反应技术和定量分析柑桔黄龙病病原[J]. 植物病理学报,1996,26(3):243-250.
- [5] 万仁秀,蒋元晖,戴胜根. 我国柑桔苗木生产现状剖析[J]. 中国南方果树,1997,26(3):13-14.
- [6] 邓晓玲,唐伟文. 应用 PCR 技术检测柑桔黄龙病病原的研究[J]. 华南农业大学学报,1996,17(3):119-120.
- [7] MURRAY M G,THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res. ,1980, 8(12):4321-4324.
- [8] SAMBROOK T,FRITSCH E F,MANIATIS T. Molecular cloning (2nd edition)[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989. 183-257.
- [9] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京:高等教育出版社,1993. 662.
- [10] VILLECHANOUX S,GARNIER M,LAIGRET F, et al. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rplKAJL-rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase[J]. Current Microbiology,1993,26(3):161-166.