

泡桐丛枝植原体 tRNA 异戊烯基焦磷酸转移酶基因克隆、原核表达及功能分析

胡佳续¹, 田国忠^{1*}, 林彩丽¹, 宋传生¹, 牟海青², 任争光¹, 郭颂², 周涛², 范在丰², 李怀方¹

¹中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091

²中国农业大学农学与生物技术学院植物病理系, 北京 100193

摘要:【目的】为了鉴定植原体 tRNA 异戊烯基焦磷酸转移酶基因(*tRNA-ipt*)的表达及蛋白功能,探索植原体致病机理。【方法】对泡桐丛枝、桑萎缩、长春花绿变及苦楝丛枝植原体 *tRNA-ipt* 基因完整序列进行 PCR 扩增和生物信息学分析。对泡桐丛枝植原体 *tRNA-ipt* 基因进行原核表达并制备抗体。利用 Western blot 和 FITC 间接免疫荧光显微镜检测其在植原体中的表达。使用分光光度计分析该基因对大肠杆菌生长的影响,用 ELISA 测定转化菌株细胞分裂素含量。【结果】首次发现泡桐丛枝、桑萎缩、长春花绿变及苦楝丛枝植原体中完整 *tRNA-ipt* 基因,大小为 876 bp,编码 291 个氨基酸,且 N 端均含有 ATP/GTP 结合位点保守序列(GPTASGKT)。4 种植原体 tRNA-IPT 之间的氨基酸序列相似率为 99.1% - 99.5%,与同组植原体同源性在 95.4% - 99.3%,与其他组植原体同源性低于 70%。SDS-PAGE 结果显示 tRNA-IPT 蛋白在大肠杆菌中得到表达。首次获得泡桐丛枝植原体 tRNA-IPT 抗体并检测到该蛋白在泡桐发病组织中的特异表达。经过对转化菌株生长曲线及玉米素含量的测定,发现该基因能促进大肠杆菌后期生长和玉米素核苷的积累。【结论】4 种植原体 *tRNA-ipt* 基因编码相同特性的功能蛋白,泡桐丛枝植原体 tRNA-IPT 蛋白能够在植原体中表达,根据该基因对异源菌株生长速率和激素合成的影响推断该蛋白可能参与植原体的细胞分裂素合成,在致病过程中起到重要作用。

关键词:tRNA 异戊烯基焦磷酸转移酶, 序列分析, 原核表达, 生长曲线

中图分类号:Q933 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2013)08-0832-10

植原体 (Phytoplasma), 原称类菌原体 (mycoplasma-like organism, 简称 MLO)^[1], 是一类无细胞壁的原核微生物^[2], 其细胞被单位膜包裹, 易受到外力影响而呈现出不同的形态。植原体主要分布于植物韧皮部以及刺吸式介体昆虫的肠道、淋巴、唾液腺等组织内, 能够通过筛板间的胞间连丝移动。

植原体侵染后, 发病植株的主要症状为丛枝、黄化、花变绿或变叶、衰退、干枯、矮化、白叶等。植原体主要依靠叶蝉和飞虱等从韧皮部取食的刺吸式昆虫及植物营养繁殖材料传播, 也可由菟丝子和人工嫁接传播^[3]。

基金项目:国家自然科学基金项目(30872025)

* 通信作者。Tel: +86-10-62889525; E-mail: tiangz@caf.ac.cn

作者简介:胡佳续(1984-), 男, 天津人, 博士研究生, 研究方向为分子植物病理。E-mail: huhu2544y@sina.com

收稿日期:2013-01-07; **修回日期:**2013-05-20

泡桐 (*Paulownia* sp.) 属落叶乔木, 用途极为广泛, 经济价值极高。泡桐丛枝病 (*Paulownia witches'-broom*, PaWB) 是一种由泡桐丛枝植原体引起的侵染性病害, 症状主要表现为丛枝、褪绿、花变叶、绿变等。除泡桐外, 由植原体引起的苦楝 (*Melia azedarach* L) 丛枝病 (CWB)^[4]、桑树萎缩病 (MD)^[5-6]、长春花 (*Catharanthus roseus*) 绿变 (PeV)^[7] 等均造成严重经济损失。

迄今, 关于植原体的致病机制尚未完全揭示。近年来对植原体效应子的研究为阐明植原体的致病机制奠定了良好的基础^[8], 但对其具体的作用方式以及与症状之间的关系尚不明确。根据之前的许多研究推测由植原体侵染引起的丛枝和花器变态 (花变叶和绿瓣症) 与激素代谢失调有着密切的关系^[9-16]。

tRNA-ipt 基因所编码的 tRNA 异戊烯基焦磷酸转移酶 (EC 2. 5. 1. 8), 催化二甲烯二磷酸 (DMAPP) 上的异戊烯基转移到前体 tRNA 分子反密码子邻位的腺嘌呤上, 异戊烯基化的 tRNA 被水解, 会产生有活性的细胞分裂素 (CTKs)。该基因在生物有机体中普遍存在, 在人类 (*Homo sapiens*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和大肠杆菌中均已被鉴定。tRNA 可以降解产生多种细胞分裂素 (CTKs), 其中顺式玉米素最丰富^[17]。目前, 全基因组已测序的洋葱黄化 (Onion yellows, OY)^[18]、翠菊黄化丛枝 (*Aster yellows witches'-broom*, AYWB)^[19]、澳大利亚葡萄黄化 (*Candidatus Phytoplasma australiense*) 和苹果簇叶 (apple proliferation, *Candidatus Phytoplasma mali*)^[20] 植原体中均含有 *tRNA-ipt* 基因完整可读框 (ORF)。

本研究测定了翠菊黄化组 (16SrI 组) 的泡桐丛枝、桑萎缩、苦楝丛枝和长春花绿变 4 个植原体的完整 *tRNA-ipt* 基因序列; 并用生物信息学软件对该基因编码的蛋白进行了结构与功能预测, 对该基因进行了原核表达分析, 异源表达菌株中的细胞分裂素含量测定等试验。研究进一步明确了植原体 tRNA-IPT 的结构和功能、及其与植原体病害症状的关系, 并推测泡桐丛枝植原体侵染泡桐后, *tRNA-ipt* 基因影响了植原体和寄主植物细胞分裂素 (玉米素) 合成, 进而影响植原体的致病过程, 为进一步研究植原体致病机制提供了参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

泡桐丛枝植原体株系为北京株系 (PaWBBj), 保存在泡桐组织培养苗上, 并表现典型丛枝症状^[21]; 长春花绿变植原体海南株系 (PeVHn) 材料采自海南琼海, 保存于长春花组织培养苗上, 表现小叶、黄化、丛簇等病症; 苦楝丛枝植原体福清株系 (CWBFq) 感病鲜材料采自福建福清, 桑萎缩植原体濮阳株系 (MDPy) 带病鲜材料采自河南濮阳市, 低温冷冻保存^[22]。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生物技术有限公司, *Taq* DNA 聚合酶, *Bam*HI、*Sal*I 限制性内切酶和 pMDTM 18-T Vector 购自 TaKaRa, 氨苄青霉素购自 Sigma、其它试剂均为国产分析纯。

1.3 序列 PCR 扩增与测定

利用引物对 iptf-BamHI/iptr-SalI (5'-CGGGATCCATGAAAAAGTAATCGCTAT-3' 和 5'-ACGCGTCGACATCAGTTTTAAAAAATCGT-3'), 分别以 PaWBBj 侵染的泡桐、CWBFq 侵染的苦楝、MDPy 侵染的桑树、PeVHn 侵染的长春花的总 DNA 为模板, 扩增并克隆 *tRNA-ipt* 完整基因, PCR 扩增为 35 个循环条件 (94℃, 4 min; 94℃, 30 s; 52℃, 30 s; 72℃, 1 min), 反应结束后 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物纯化后直接克隆到 pMD18-T 克隆载体上, 连接反应条件参照 TaKaRa pMDTM 18-T Vector 说明书 (D101A)。经 PCR 检查验证, 将阳性克隆送北京华大基因公司测序。

1.4 序列比对和蛋白质特征预测

利用 DNAMAN6.0 分析软件对测得序列进行整理; 序列同源性比较采用 BLAST 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>); 序列多重比对采用 DNAMAN; 序列相似性通过 GenBank 比对以后, 利用 MEGA4.1 软件构建进化树, 本研究中所应用序列保存于 GenBank 数据中; 由 PI Predictor (<http://mendel.imp.univie.ac.at>) 软件预测 GPI 锚定位点; 跨膜区预测采用 TMHMM server v. 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 亚细胞定位预测采用 TargetP 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/targetP/>)。

1.5 泡桐丛枝植原体 *tRNA-ipt* 基因原核表达及抗血清的制备

将泡桐植原体 *tRNA-ipt* 基因用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶切,并与同样酶切的质粒 pET28a(+) 连接,连接产物转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 。经 PCR 扩增和提取质粒酶切验证,对筛选阳性克隆的重组质粒测序并验证可读框的正确性。将读框正确的重组质粒 pET-*ipt* 及 pET28a(+) 空载体分别转化到 *E. coli* Rossetta (Novagen),挑取单菌落于 3 mL LB 液体培养基中(含氨苄青霉素 60 μ g/mL 和氯霉素 34 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 振动培养过夜后,按 1:100 稀释到新鲜的液体培养基中(含氨苄青霉素 60 μ g/mL 和氯霉素 34 μ g/mL),振荡培养至 OD_{600} 达到 0.4 - 0.6,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续于 37 $^{\circ}$ C 培养 6 h。离心收集菌体,加入 100 μ L 样品缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, pH 8.0),震荡悬浮,加入等体积即 100 μ L 的 2 \times 凝胶上样缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 0.2 mol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油),100 $^{\circ}$ C 沸水变性 5 min, 12% SDS-PAGE 鉴定表达结果。

将凝胶用染色液(0.025 mol/L KCl, 1 mmol/L DTT)染色,切下所需条带,加入等体积 0.85% 的生理盐水冰浴研磨,13200 \times g 离心 1 min,上清液即为纯化蛋白。向回收的纯化蛋白加入等体积的不完全佐剂。采用皮下注射和肌肉注射相结合的方法免疫德国大白兔,每次免疫剂量为 0.2 mg, 7 d 注射 1 次,注射 4 次后收集血清在 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 Western blot 分析

制备健康泡桐和植原体侵染泡桐的总蛋白用于 Western blot 分析。将健康和发病组织液氮研磨,分别称取 0.5 g 分装到 1.5 mL 离心管,加入 200 μ L 植物总蛋白提取液(40 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 5% SDS, 8 mol/L 尿素, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 巯基乙醇, 5 mmol/L PMSF),剧烈振荡充分混匀,在加入等体积的 2 \times SDS 样品缓冲液,沸水或 100 $^{\circ}$ C 恒温水浴处理 5 min。-20 $^{\circ}$ C 冷却 5 min。4 $^{\circ}$ C, 13200 \times g 离心 10 min,取上清备用。Western blot 分析方法按照林彩丽(2008)方法操作^[23]。

1.7 间接免疫荧光显微镜观察 tRNA-IPT 蛋白的表达

通过间接免疫荧光显微镜观察 tRNA-IPT 蛋白

在植物组织中的表达。按照田国忠等(1996)方法操作^[24],对待测组织(茎、叶柄或叶脉)进行徒手切片,迅速将组织薄片放入盛有 95% 的预冷(4 $^{\circ}$ C)乙醇的离心管中,固定 15 - 30 min,然后用 0.02 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。用生理盐水适当稀释抗血清(1:200),加至离心管淹没样品,搅拌均匀,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。PBST 漂洗 3 次,每次 10 - 20 min。加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG(1:100),于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 - 2 h。PBST 漂洗 3 次,每次 10 - 20 min。Leica DM6000B 显微镜上观察 FITC 特异性荧光(FITC 荧光素最大吸收光谱为 490 nm - 495 nm,发射光谱为 520 nm - 530 nm)。

1.8 转化菌株生长测定及细胞分裂素(玉米素)含量测定

分别将泡桐丛枝植原体 *tRNA-ipt* 基因与 Δ *tRNA-ipt*(基因突变型,该基因由于点突变无法正常表达)与质粒连接,将 pET-*ipt*、空载体 pET28、pET- Δ *ipt*(突变型)分别转化到 *E. coli* DH5 α ,培养 5 h 后,将菌液稀释至 $OD_{600} = 0.6$,然后按 1:1000 的比例接种于 50 mL LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养 2 h 后,用 IPTG 诱导 pET-*ipt* 菌株并与未处理的 pET-*ipt* 菌株、空载体 pET28 菌株和 pET- Δ *ipt* 菌株继续培养,每隔 1 h 利用紫外可见分光光度计测 1 次吸光度(OD_{600}),直到细菌的生长进入稳定期为止。

利用激素的酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定菌液中玉米素浓度^[25]。将 pET-*ipt*、空载体 pET28 分别转化到大肠杆菌 DH5 α ,培养 5 h 后,将菌液稀释至 $OD_{600} = 0.6$,然后按 1:1000 的比例接种于 50 mL LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养,每隔 1 h 收集 3 mL 菌液用液氮速冻,共收集 4 次。利用固相萃取柱层析的方法提取待测菌液激素,利用游离抗原和吸附抗原与游离抗体进行竞争,在酶联免疫分光光度计上依次测定标准物各浓度和各样品 490 nm 处的 OD 值,待测样品可根据其显色值在 logit 曲线中查出其所含激素浓度(ng/mL)的自然对数,再经过反对数即可知其激素的浓度(ng/mL)。每一菌株重复测定 3 次。

2 结果和分析

2.1 植原体 *tRNA-ipt* 基因的 PCR 扩增

以 PaWBBj 侵染的泡桐、CWBFq 侵染的苦楝、

MDPy 侵染的桑树及 PeVHn 侵染的长春花总 DNA 为模板,利用引物 iptf-BamHI/iptr-SalI 进行 PCR 扩增,电泳结果显示感病植物材料中分别在 876 bp 处有单一条带,与 GenBank 中报道洋葱黄化植原体相应的 *ipt* 基因序列大小一致,而健康对照未扩增出特异性条带(图 1)。

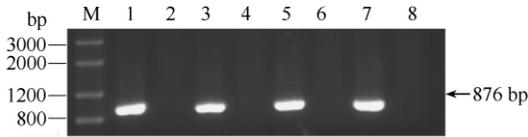


图 1. 4 种植原体 *tRNA-ipt* 基因的 PCR 扩增结果

Figure 1. PCR amplification of *tRNA-ipt* from four phytoplasmas. M: marker III; lane 1: PaWBBj; lane 2: Healthy control; lane 3: CWBWFq; lane 4: Healthy control; lane 5: MDPy; lane 6: Healthy control; lane 7: PEVHn; lane 8: Healthy control.

2.2 植原体 *tRNA-ipt* 和编码蛋白氨基酸序列分析

泡桐丛枝、桑萎缩、长春花绿变及苦楝丛枝植原体的 *tRNA-ipt* 基因, GenBank 登录号分别为: JQ955739、JQ955740、JQ955741、JQ955742, 皆由 879

个核苷酸组成,编码 291 个氨基酸。4 种植原体的 *tRNA-ipt* 基因编码氨基酸序列同源性较高,在 95.5% - 99.8% 之间,与 16SrI 组其它植原体的 *tRNA-IPT* 同源性也很高,均大于 95%,而与其它组的序列同源性为 60% 左右。比如 PaWB 植原体与 16SrXII 组的澳大利亚葡萄黄化 (*Candidatus Phytoplasma australiense*) 和 16SrX 组的苹果簇叶植原体 (*Candidatus Phytoplasma mali*) 的同源性分别为 57.4% 和 68.2%,与无胆甾原体 (*Acholeplasma*) 的同源性为 58.6%。*tRNA-ipt* 氨基酸序列的邻位连接 (NJ) 法系统进化树结果显示,所有已知氨基酸序列的 9 个植原体 *tRNA-IPT* 共聚为一大支。同时可以看出,依据此基因进化分析结果,在 7 种 16SrI 组植原体中,我国的 4 种植原体之间关系最近,与洋葱黄化植原体关系较近,与 AYWB 的关系较远。所有植原体与无胆甾原体共聚为一个大的进化支,它们作为菌原体中的亲缘关系最近的成员,这与其它基因的进化分析结果相吻合(图 2)。

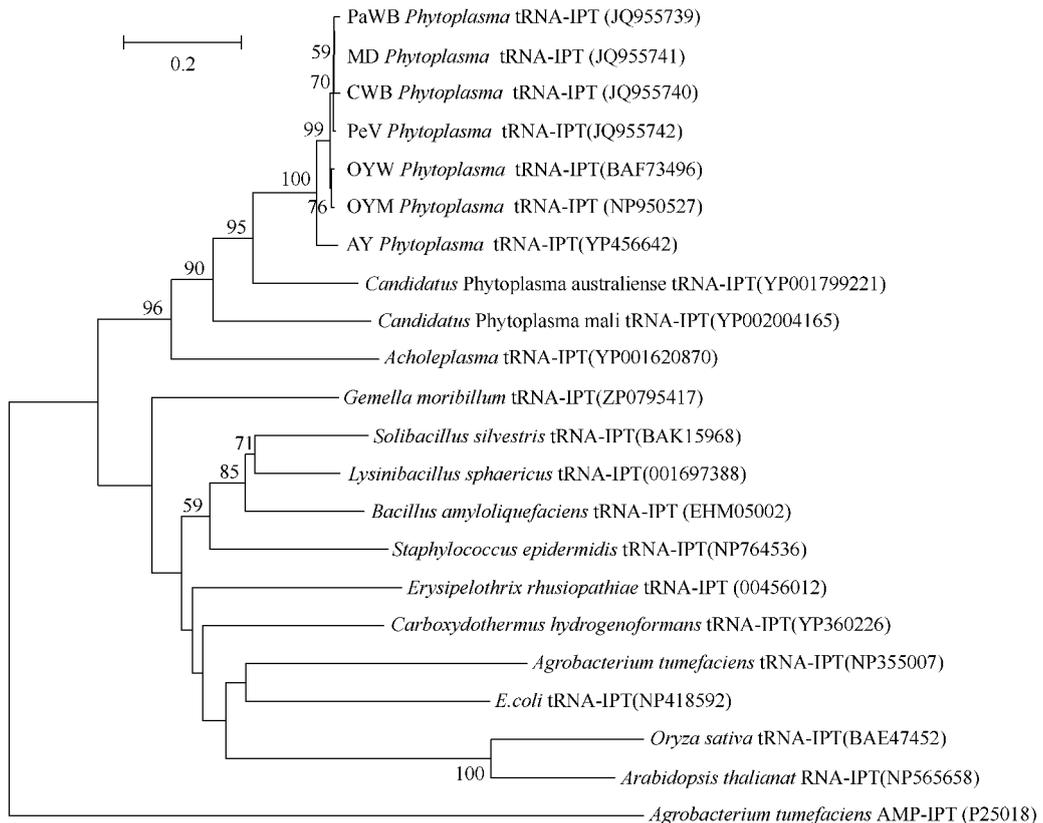


图 2. 基于不同物种 *ipt* 基因蛋白序列构建的系统进化树 (MEGA 4.1)

Figure 2. Phylogenetic tree for IPT protein sequences of different species constructed with MEGA4.1 using the neighbor joining method. Eukaryotic tRNA IPT from *Oryza sativa* (BAE47452) and *Arabidopsis thaliana* (BAB5904); prokaryotic tRNA IPT from paulownia witches'-broom (PaWB); mulberry dwarf, Chinaberry witches'-broom (CWB), periwinkle virescence (PeV), onion yellow wild type strain (BAF73496), *Candidatus Phytoplasma mali* (YP-002004165), *Candidatus Phytoplasma australiense* (YP-001799221); Bacterial tRNA-IPT and AMP-IPT from *Agrobacterium tumefaciens* (NP355007 and P25018); Other bacterial tRNA IPTs (BAK15968, 001697388, EHM05002, NP764536).

2.3 tRNA-IPT 蛋白结构分析

利用 TMHMM 软件对 4 种植原体 IPT 蛋白进行跨膜区分析,结果显示该蛋白不存在跨膜区。用 SignalIP 软件预测 4 种 IPT 蛋白是否带有信号肽,结果显示切割几率小于 0.1,推断不存在信号肽。利用 TargetP 程序,预测该蛋白应分布在细胞质内。

氨基酸序列比对结果显示,不同生物间 tRNA-IPT 蛋白氨基酸中发挥关键功能的 ATP 和 GTP 结合序列(ATP-and GTP-binding motif)相对保守(图

PaWB Phytoplasma	MKKVIAITGPTASGKTSLSIKIAKKINL.EIINCDSLQMY	39
CWB Phytoplasma	MKKVIAITGPTASGKTSLSIKIAKKINL.EIINCDSLQMY	39
MD Phytoplasma	MKKVIAITGPTASGKTSLSIKIAKKINL.EIINCDSLQMY	39
PeV Phytoplasma	MKKVIAITGPTASGKTSLSIKIAKKINL.EIINCDSLQMY	39
AY Phytoplasma	MKKVIAITGPTASGKTSLSIKIAKKFNL.EIINCDSLQMY	39
OYM Phytoplasma	MKKVIAITGPTASGKTSLSIKIAKKFNL.EIINCDSLQMY	39
OYW Phytoplasma	MKKVIAITGPTASGKTSLSIKIAKKFNL.EIINCDSLQMY	39
Candidatus Phytoplasma australiense	MKKIIAITGPTASGKTSLSIKIAKKFNL.EIINCDSLQMY	39
Candidatus Phytoplasma mali	MKKVIVITGPTSSGKTDLSIYLAKKFDG.EIINSDSVQIY	39
Acholeplasma	MKKVVCIVGPTGSGKTAALSVKLAKSLGA.EIINGDSVSIY	39
Solibacillus silvestris	KIDVVVAVGPTASGKTAALSIRLAKKEIDG.EIINGDSMQIY	42
Erysipelothrix rhusiopathiae	MKKVIVIVGPTASGKSSLAVSLAKKING.EIISADSVAVY	39
Gemella moribillium	KIPLIAIVGPTAVGKTAALSIELAKKFC.EIISIDSVQIY	41
Bacillus amyloliquefaciens	KQPVVILVGPPTAVGKTKLSIGLAKMLNA.EIISGDSMQVY	43
Carboxydotherrmus hydrogenoformans	SEKLIIVGPTAVGKSAALGKIVAKKING.EIISGDSMQVY	40
E.coli	LPKAIFLMGPTASGKTAALAEIRKILPV.EIISVDSALTY	47
Lysinibacillus sphaericus	QAEVVAIVGPTASGKTAALSIELAKKYNG.EIINGDSMQVY	46
Agrobacterium tumefaciens	NFDALITGPTASGKSALALRLARERNG.VVINADSMQVY	46
Arabidopsis thaliana	KAKVVVIMGPTGSGKSKLAVDLASHFP.VEINADAMQIY	57
Oryza sativa	LRKVVVVMGATGAGKSRSLAVDLASHFAGVEVVSADSMQVY	72
Consensus	g t gk l d y	

图 3. 不同生物 tRNA-IPT 蛋白的 ATP 和 GTP 结合位点 [G or A]-x4-G-K-[S or T]

Figure 3. ATP-and GTP-binding motif [G or A]-x4-G-K-[S or T] of different tRNA-IPT proteins from various organisms.

2.4 泡桐丛枝植原体 tRNA-ipt 基因原核表达产物的检测和分析

SDS-PAGE 分析结果表明含有 ipt 重组质粒的大肠杆菌菌株表达了与预期的 35 kDa 大小相符的目的蛋白(图 4)。

2.5 Western blot 检测

Western blot 检测结果表明,所制备的抗血清与染病泡桐总蛋白有免疫反应,反应条带大小与目标蛋白一致,而抗血清与健康泡桐对照没有反应(图 5)。因此证实植原体 tRNA-IPT 蛋白已经在发病植株中得到表达,tRNA-ipt 作为可编码蛋白的基因在植原体代谢及与寄主植物互动过程中会行使特定的功能。

2.6 间接免疫荧光显微镜检测结果

用所制备的抗血清采用间接免疫荧光显微镜技术检查 tRNA-IPT 在植物中的表达部位,结果显示,泡桐丛枝病苗的横切面韧皮部筛管位置可以观察到

3)。这一基序都为 tRNA-IPT 起始氨基酸后(N 端)的第 8 至 15 位的 8 个保守的多肽残基[G or A]-x4-G-K-[S or T],这一基序在所有已知的 16SrI 组植原体中均存在。葡萄黄化植原体、球形赖氨酸芽孢杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*)、土壤芽胞杆菌(*Solibacillus silvestris*)及大肠杆菌的此基序完全一致,即甘氨酸-脯氨酸-苏氨酸-丙氨酸-丝氨酸-甘氨酸-赖氨酸-苏氨酸(GPTASGKT)。

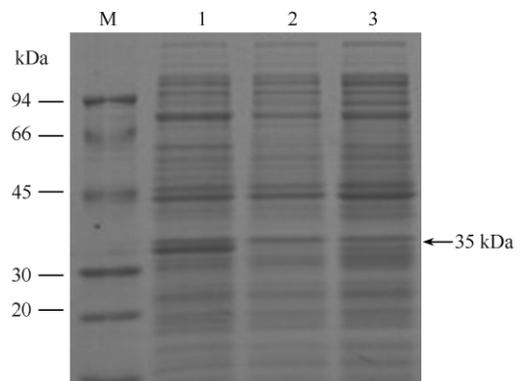


图 4. 表达产物 SDS-PAGE 分析

Figure 4. SDS-PAGE analysis results of expressed products in *E. coli*. Lane 1, Recombinant pET-ipt with the induction of 1mmol/L IPTG; lane 2, Crude *E. coli* cell extract transformed with vector plasmid pET28a (+) with induction of 1mmol/L IPTG; lane 3, Recombinant pET-ipt without the induction of 1mmol/L IPTG; M, protein molecular weight marker.

大量的翠绿色 FITC 特异性荧光,在健康泡桐苗中观

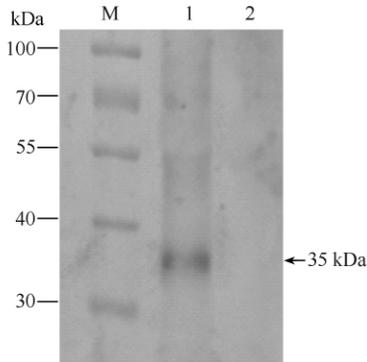


图 5. 感病泡桐的 Western blot 分析

Figure 5. Western blot analysis of the tRNA-IPT protein in phytoplasma-infected Paulownia; Lane 1, Paulownia infected with PaWB phytoplasma; lane 2, Healthy paulownia; M, Molecular weight marker.

察不到(图 6),表明 PaWB tRNA-IPT 蛋白抗体与感病泡桐体内植原体定殖部位的蛋白抗原具有明显、特异性的血清学反应。所以判断 PaWB *tRNA-ipt* 基因在植原体大量表达。此免疫荧光反应实验也与 Western blot 检测结果相吻合。

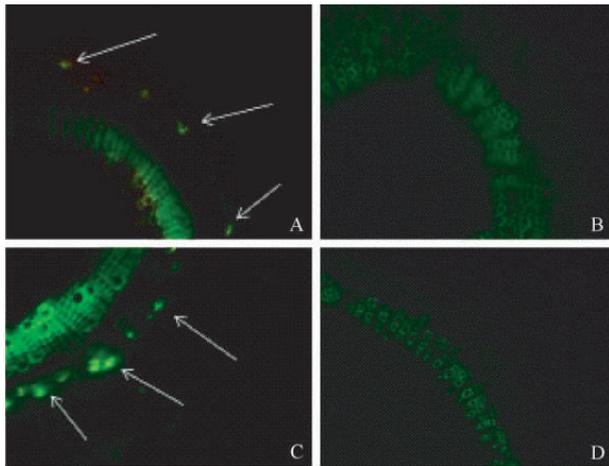


图 6. FITC 间接免疫荧光检测植物组织横切面显微镜观察结果

Figure 6. FITC immunofluorescence detection of the tRNA-IPT protein in cross sections of phytoplasma-infected plants; A and C: paulownia infected with PaWB phytoplasma; B and D: healthy paulownia; Arrowhead indicates the localization of the tRNA-IPT protein.

2.7 tRNA-IPT 对转化大肠杆菌生长速率及细胞分裂素(玉米素)产生的影响

在外界条件一致的情况下,测定不同转化 *E. coli* 的生长能力。生长曲线测定结果(图 7)显示含 pET-*ipt* 菌株、空载体 pET28 菌株、pET- Δ *ipt* (突变

型) *E. coli* 的生长速度在对数生长期差别不明显,进入稳定期后,含空载体 pET28 菌株和 pET- Δ *ipt* 菌株生长逐渐变缓,而 pET-*ipt* 菌株在培养 10 h 后生长得到加速,菌群数量明显超过另外两种菌株。而经过了 IPTG 诱导的 pET-*ipt* 菌株在前期生长相对缓慢,但在培养 10 h 后,生长速率逐渐加快,最终与 pET-*ipt* 菌株保持一致的生长能力和相差不大的菌群数量。推断经 IPTG 诱导的 pET-*ipt* 菌株在前期生长被抑制,但大量表达 tRNA-IPT 后,其生长能力得以迅速提高。

含异戊烯基腺嘌呤的 tRNA 可以降解产生多种细胞分裂素,其中玉米素类最丰富。玉米素浓度测定结果(图 8)显示 pET-*ipt* 菌株、空载体 pET28 菌株的玉米素核苷浓度在最初 1 h 差别不明显,进入约 2.5 h 后,含空载体 pET28 菌株的玉米素核苷浓度逐渐降低,而 pET-*ipt* 菌株在培养 3 h 后玉米素核苷浓度开始上升,最后明显超过 pET28 菌株。

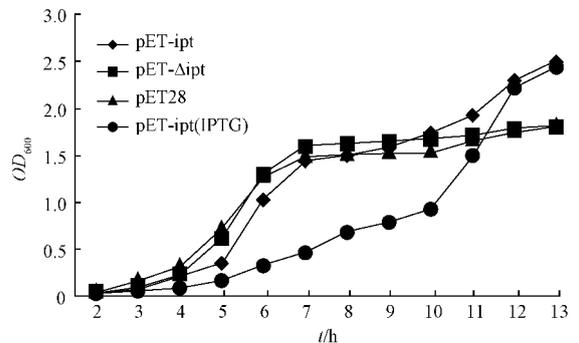


图 7. PaWB *tRNA-ipt* 基因转化大肠杆菌的不同生长曲线

Figure 7. The different growth curve of PaWB tRNA-*ipt* recombinant *E. coli* [pET-*ipt* without IPTG induction and pET-*ipt* (IPTG) with IPTG induction as well as pET- Δ *ipt* with the mutation of the *ipt* gene and control strain pET28].

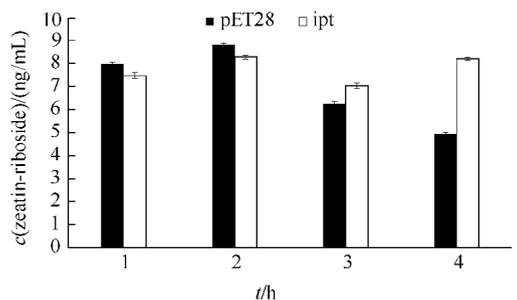


图 8. 大肠杆菌菌液玉米素核苷浓度动态变化

Figure 8. The dynamic changes of zeatin-riboside production of PaWB tRNA-*ipt* recombinant *E. coli* (ipt) and control strain(pET28).

3 讨论

本研究首次测定了我国发生的 16SrI 组的泡桐丛枝、桑萎缩、长春花绿变及苦楝丛枝植原体的 *tRNA-ipt* 基因的完整序列。据对已测序的 4 种植原体(洋葱黄化、翠菊黄化、苹果簇叶和澳大利亚葡萄黄化植原体)的全基因组分析结果显示,植原体仅含有第一类 *tRNA-ipt* 基因,而无第二类 *AMP-ipt* 基因。基于 NJ 法对植原体 tRNA-IPT 氨基酸序列构建的进化树显示,16SrI 组内植原体间的同源性最高,聚为一个大的分支,与其他组植原体及无胆甾原体的同源性次之,植原体与芽孢杆菌、大肠杆菌和土壤杆菌关系较远,而与单子叶植物水稻和双子叶植物拟南芥 *tRNA-ipt* 亲缘关系最远。由于在植原体群体中该基因的重要性和高度保守性,而且该基因的系统进化关系与细菌的 16SrDNA 等保守基因分析结果也比较吻合,所以通过设计更理想的通用引物,可以成为检测和鉴定植原体的重要分子标记之一,而且会有助于完善植原体的多指标、多基因分类系统。

各种生物 *tRNA-ipt* 基因表达产物 tRNA 异戊烯基焦磷酸转移酶除了参与修饰某些种类的 tRNA 进而影响蛋白合成、转录的保真度及其效率外,许多研究证明 tRNA-IPT 为细胞分裂素合成途径中的重要限速酶。tRNA-IPT 催化将二甲基烯丙基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)的异戊二烯基转移至前体 tRNA 分子的腺嘌呤残基上,形成含有异戊烯基腺嘌呤的一种成熟 tRNA 分子。这种 tRNA 的降解产物具有细胞分裂素的活性已被一些实验证实^[26]。

本实验用 PaWB *tRNA-ipt* 基因的原核表达产物作为抗原制备了特异性抗体并用于检测验证该基因在发病泡桐韧皮部组织的特异性表达。通过测定该基因在异源大肠杆菌体内的表达、对菌株生长和繁殖的促进作用及对菌体细胞分裂素的积累,间接证实该蛋白所具有的催化合成含有异戊烯基腺嘌呤的 tRNA 分子的生物活性。

根据已有的研究证据,推断植原体侵染泡桐后,来源于植原体的 *tRNA-ipt* 基因编码 tRNA 修饰酶—tRNA-IPT 催化二甲基烯丙基二磷酸(DMAPP)的异戊烯基转移到前体 tRNA 分子反密码子的邻位腺嘌呤残基上,此 tRNA 的降解可能会产生植物细胞分裂素(玉

米素),随着植原体细胞内细胞分裂素的大量合成,会渗透或分泌到寄主的微管束内,从而导致维管束形成层细胞内 CTK/IAA 的比值升高,而诱发感病植株顶端优势被打破,生芽较多,生根减少,而形成丛枝症状。这可能是植原体引致泡桐丛枝症状的原因之一。众多的遗传转化实验已经证明,当植物中导入 *ipt* 基因后具有抑制叶片衰老、引起丛生等作用。有实验将根癌农杆菌的 *ipt* 基因克隆并转化烟草,发现该转基因烟草能提高愈伤组织诱导率^[27]。实验结果显示,组成型过量表达 *ipt* 的转基因植物中细胞分裂素的含量明显增加,叶片的衰老被延迟,且转基因植物的生长发育及形态均受到了明显的影响,表现出花粉不育、叶片变小、侧枝增加、顶端优势丧失和根生长受抑制等表型^[28-29]。之前关于感染泡桐丛枝病植原体的泡桐组培苗激素代谢的研究结果已表明细胞分裂素和生长素,以及酚类物质和相关的氧化酶在植原体引致丛枝症状过程中的重要作用^[10-11,30]。对植原体侵染病组织的细胞分裂素含量的测定结果也显示了表现严重症状的发病组织内细胞分裂素的增加现象^[15],但此前对细胞分裂素增加的机理一无所知。本研究初步证实植原体 *tRNA-ipt* 的基因功能,为进一步深入揭示 tRNA-IPT 蛋白在植原体生长、繁殖和代谢中的作用并阐明植原体及其他病原菌的致病机制具有重要的意义和价值^[31]。

致谢 中国农业大学农学与生物技术学院王保民教授帮助开展用 ELISA 方法测定细胞分裂素;中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所赵文霞研究员和淮稳霞博士协助进行荧光显微镜观察,特此致谢。

参考文献

- [1] Liao X, Luo K, Zhu S. Classification and molecular biology of phytoplasma. *Plant Quarantine*, 2002, 16(3): 167-172. (in Chinese)
廖晓兰, 罗宽, 朱水芳. 植原体的分类及分子生物学研究进展. *植物检疫*, 2002, 16(3): 167-172.
- [2] Cai H, Kong B, Chen H. Detection and identification of phytoplasma strain associated with periwinkle yellows. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(1): 116-119. (in Chinese)
蔡红, 孔宝华, 陈海如. 长春花黄化植原体(PY)株系

- 的检测与鉴定. 微生物学报, 2003, 43(1): 116-119.
- [3] Seemüller E, Schneider B, Mairer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Lorenz KH, Firrao G, Lidon A, Sears BB, Stackebrandt E. Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44(7): 440-446.
- [4] 徐梅卿, 何平勋. 中国木本植物病原总汇. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2008: 816-817.
- [5] Zhang H, Wang T, Bao X. Advances in mulberry dwarf disease. *Zhongguo Canye*, 2010, 31(1): 9-12. (in Chinese)
张和禹, 汪泰初, 鲍先巡. 桑树萎缩病的研究进展. 中国蚕业, 2010, 31(1): 9-12.
- [6] Ji XL, Gai YP, Mu ZM. Comparative proteomic analysis provides new insights into mulberry dwarf responses in mulberry (*Morus alba* L.). *Proteomics*, 2009, 9(23): 5328-5339.
- [7] Che H, Luo D, Fu R, Ye S, Wu Y. Sequence analysis of 16S ribosomal DNA of phytoplasma associated with periwinkle yellows disease in Hainan. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(2): 212-216. (in Chinese)
车海彦, 罗大全, 符瑞益, 叶莎冰, 吴云锋. 海南长春花黄化病植原体的 16S rDNA 序列分析研究. 植物病理学报, 2009, 39(2): 212-216.
- [8] Ishii Y, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. In the non-insect transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology*, 2009, 155: 2058-2067.
- [9] Davey JE, Van Staden J, De Leeuw GTN. Endogenous cytokinin levels and development of flower virescence in *Catharanthus roseus* infected with mycoplasmas. *Physiological Plant Pathology*, 1981, 19: 193-200.
- [10] Tian G, Huang Q, Yuan Q, Zhang X. The relationship between pathogenesis and metabolic changes of the tissue-cultured plantlets of paulownia. *Science in China*, 1994, 24(5): 484-490. (in Chinese)
田国忠, 黄钦才, 袁巧平, 张锡津. 感染植原体泡桐组培苗代谢变化与致病机理的关系. 中国科学, 1994, 24(5): 484-490.
- [11] 田国忠, 袁巧平, 黄钦才, 张锡津. 类菌原体病原致病机理探讨. 中国植物病理学会第二届青年学术讨论会论文选编. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1995: 303-307.
- [12] Tian G, Li H, Qiu W. Interaction between plant hormones and diseases. *Plant Physiology Communications*, 1999, 35(3): 177-183. (in Chinese)
田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物激素与植物病害的相互作用. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 177-183.
- [13] Tian G, Zhu S, Luo F, Li H, Qiu W. Effects of *Agrobacterium tumefaciens* on the symptoms of paulownia sp. plantlet *in vitro* cultured. *Forest Research*, 2001, 14(3): 258-264. (in Chinese)
田国忠, 朱水芳, 罗飞, 李怀方, 裘维蕃. 根癌农杆菌对感染植原体的泡桐组培苗症状的影响. 林业科学研究, 2001, 14(3): 258-264.
- [14] Tian G, Li Y, Zhu S, Jia R, Wang H. Molecular detection and identification of pathogenic *Agrobacterium* spp. isolates associated with woody plant crown gall diseases in China. *Scientia Silvae Sinicae*, 2006, 42(2): 63-72. (in Chinese)
田国忠, 李永, 朱水芳, 贾瑞祥, 王慧敏. 我国木本植物致病性土壤杆菌的分子检测和比较鉴定. 林业科学, 2006, 42(2): 63-72.
- [15] Zhao J, Liu M, Zhou J. The variations of endogenous hormones in Chinese jujube infected with witches' broom disease. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(11): 2255-2260. (in Chinese)
赵锦, 刘孟军, 周俊义. 枣疯病病树中内源激素的变化研究. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2255-2260.
- [16] Musetti P, Tubaro F, Polizzotto R, Ermacora P, Osler P. Recovery da apple proliferation in meloè associato all'aumento della concentrazione dello ione calcio nel floema. *Petria*, 2008, 18(2): 380-383.
- [17] Peter J Davies. 植物激素: 合成、信号转导和作用. 段留生, 等译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008.
- [18] Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 2004, 36(1): 27-29.
- [19] Bai X, Zhang J, Ewing A, Sally AM, Radek AJ, Shevchenko D, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell John, Hogenhout SA. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(10): 3682-3696.
- [20] Kube M, Schneider B, Kuhl H. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma "*Candidatus Phytoplasma mali*". *BMC Genomics*, 2008, 9: 306.

- [21] Tian G, Wen X, Li Y, Sun Z, Zhao Y, Guo X, Huang Q, Li Z, Zhao J. Propagation and long-term preservation of several isolates of jujube witches' broom and paulownia witches' broom-phytoplasmas *in vitro* cultured plantlets and grafting transmission of the pathogens from the diseased to healthy plantlets. *Forest Research*, 2005, 18(1): 1-9. (in Chinese)
田国忠, 温秀军, 李永, 孙朝辉, 赵玉芬, 郭晓军, 黄钦才, 李志清, 赵俊芳. 枣疯病和泡桐丛枝病植原体不同分离物组织培养保藏和嫁接传病试验比较. 林业科学研究, 2005, 18(1): 1-9.
- [22] Song C, Lin C, Tian G, Zhao W, Zhu S, Mu H, Hu J, Wang X, Guo M. Complete sequence of a full-length DNA and molecular characterization of one plasmid from chinaberry (*Melia azedarach* Z) witches'-broom phytoplasma. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1158-1167. (in Chinese)
宋传生, 林彩丽, 田国忠, 赵文军, 朱水芳, 穆海清, 胡佳绩, 王曦苗, 郭民伟. 苦楝丛枝病植原体质粒的测定与分子特征. 微生物学报, 2011, 51(9): 1158-1167.
- [23] 林彩丽. 泡桐丛枝病植原体质粒分子特征及其编码蛋白功能研究. 中国农业大学博士学位论文, 2008.
- [24] Tian G, Zhang X, Zhu S, Zhang C, Luo F, Huang W. Detection of mycoplasma-like organism in the infected paulownia by indirect immunofluorescence microscopy. *Forest Research*, 1996, 9(1): 1-6. (in Chinese)
田国忠, 张锡津, 朱水芳, 张成良, 罗飞, 黄文胜. 间接免疫荧光显微术检测泡桐丛枝病原 MLO 的研究. 林业科学研究, 1996, 9(1): 1-6.
- [25] Tan W, He S, Zhao H, Li Z, Wang B, Qing X. Systemic optimization of antibody and coating antigen concentrations in ELISA checkerboard assay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(9): 1191-1195.
- [26] Persson BC, Esherg B, Olafasson O, Bjork GR. Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie*, 1994, 76: 1152-1160.
- [27] Qin S, Zhang X, Song B, Sun S, Wang H. Cloning of isopentenyl-transferases (ipt) gene and transformation of tobacco. *Journal of Southwest China Normal University*, 2009, 34(3): 206-209. (in Chinese)
秦淑丽, 张兴国, 宋波, 孙士群, 王洪伟. 异戊烯基转移酶基因的克隆与转化烟草的研究. 西南师范大学学报, 2009, 34(3): 206-209.
- [28] Xu S, Sun Y, Jia Z, Luo K. Effects of overexpression of IPT and KN1 on development and growth in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology Journal*, 2009(6): 537-543. (in Chinese)
胥珊, 孙一铭, 贾之春, 罗克明. 超量表达 IPT 和 KN1 基因对转基因烟草生长发育的影响. 植物生理学通讯, 2009(6): 537-543.
- [29] Wu J, Wang R, Ye Q, Li L. A review of the advances in cytokinin biosynthesis ipt gene. *Subtropical Plant Science*, 2005, 34(2): 66-69. (in Chinese)
吴吉林, 王再花, 叶庆生, 李玲. 细胞分裂素合成基因 ipt 研究进展. 亚热带植物科学, 2005, 34(2): 66-69.
- [30] Tian G, Yuan Q, Huang Q, Zhang X, Li J. Effects of plant growth regulators and phenolic compounds on paulownia culture *in vitro* infected with mycoplasma-like organisms. *International Journal of Tropical Plant Diseases*, 1994, 12(2): 43-52.
- [31] Wang J, Zhu XP, Gao R, Lin CL, Xu QC, Li Y, Piao CG, Li XD, Li HF, Tian GZ. Genetic and serological analyses of elongation factor EF-Tu of paulownia witches'-broom phytoplasma (16SrI-D). *Plant Pathology*, 2010, 59: 972-981.

Cloning, expression and characterization of tRNA-isopentenyltransferase genes (*tRNA-ipt*) from paulownia witches'-broom phytoplasma

Jiaxu Hu¹, Guozhong Tian^{1*}, Caili Lin¹, Chuansheng Song¹, Haiqing Mu², Zhengguang Ren¹, Song Guo², Tao Zhou², Zaifeng Fan², Huaifang Li²

¹Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, The Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China

²Department of Plant Pathology, College of Agronomy and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100193, China

Abstract: [**Objective**] To identify the *tRNA-ipt* gene of phytoplasmas and analyze the relationship between *tRNA-ipt* and synthesis of cytokinin as well as pathogenesis in phytoplasmas. [**Methods**] The paulownia witches'-broom phytoplasma (PaWB) *tRNA-ipt* gene was expressed in *E. coli* and specific antibody was prepared. Then the growth curve and cytokinin contents of *E. coli* with PaWB *tRNA-ipt* were measured by photodensitometry and ELISA respectively. [**Results**] The length of *tRNA-ipt* genes from PaWB as well as mulberry dwarf, periwinkle virescence and Chinaberry witches'-broom phytoplasmas were 876 bp. All these genes encoded the proteins consisting of 291 amino acids. They contained an identical motif (GPTASGKT) at N-terminal region related to the ATP or GTP binding sites. Four phytoplasma tRNA-IPTs shared the 99.1 – 99.5% , amino acid sequence identity with each other, shared 95.4 – 99.3% sequence identity with the same group phytoplasmas, whereas the less than 70% identity with 16SrX apple proliferation and 16SrXII Australia grapevine yellows phytoplasmas. The expression of the tRNA-IPT protein and localization in the phloem in phytoplasma-infected paulownia were confirmed by Western blotting and immunofluorescence detection. The determination of growth curve suggested that the growth rate increase of *E. coli* was affected by the transformation of exogenous *tRNA-ipt* gene, which might be associated with the cytokinin accumulation. [**Conclusion**] This protein was assumed to be involved in the cytokinin synthesis in phytoplasmas as well as other bacteria, which may play an important role in pathogenic processes of phytoplasmas and symptom development.

Keywords: tRNA-isopentenyltransferase, sequence and function analysis, expression in *E. coli*, growth curve

(本文责编: 张晓丽)