

## 小麦蓝矮病植原体胸苷酸激酶基因(*tmk*)的 分离、原核表达及酶活性分析

李蓓, 纪玲玲, 吴云锋\*, 郝兴安

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

**摘要:**【目的】克隆、表达小麦蓝矮病(WBD)植原体胸苷酸激酶基因(*tmk*), 并分析酶活性, 进一步研究胸苷酸激酶在植原体感染宿主及繁殖过程中的功能和作用机理, 更好地防治植原体病害。【方法】PCR 方法扩增 *tmk* 基因并进行序列分析, 连接 pET30a(+)表达载体后原核表达, 经 Ni-NTA 柱层析纯化后进行酶催化活性分析。【结果】首次从小麦蓝矮病(WBD)植原体基因组中分离出胸苷酸激酶基因(*tmk*), 该基因包含 *tmk-1* 和 *tmk-2* 两种, 大小分别为 630 bp 和 624 bp, 其编码的氨基酸序列均包含 3 个与结合 NTP/NMP 相关的保守功能区。表达的融合蛋白 TMK-1 活性极低, 酶活仅 16.4 U/mg, 而 TMK-2 酶活高达 112.41 U/mg, 且其最适催化条件为 32 °C、pH 7.3、1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 和 1 mmol/L ATP。【结论】分析了胸苷酸激酶活性中心的一级结构序列及其催化活性随条件变化而改变的性质, 为深入研究小麦蓝矮病植原体胸苷酸激酶在侵染寄主及其在宿主体内增殖的转录性质奠定基础。

**关键词:** 小麦蓝矮病 (WBD); 植原体; 胸苷酸激酶(TMK); 原核表达; 酶活性

中图分类号: S435.121 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 06-0739-06

小麦蓝矮病 (Wheat Blue Dwarf, WBD), 是我国首次报道的小麦植原体病害, 由介体条沙叶蝉 (*Psammotettix striatus* L.) 专化性传播。目前, 已完成了小麦蓝矮植原体寄主范围鉴定、组和亚组<sup>[1-3]</sup>水平的分类。胸苷酸激酶 (Thymidylate kinase, TMK, 国际系统命名: EC 2.7.4.9), 它广泛存在于细菌、病毒和哺乳动物中, 在 ATP 为供体和 Mg<sup>2+</sup> 参与条件下, 催化磷酸基从 ATP 转移到脱氧胸苷酸 deoxythymidylic monophosphate, dTMP) 形成 dTDP<sup>[4]</sup>, 是三磷酸胸苷 (dTTP) 从头合成和补救途径的关键酶之一。但是植原体细胞缺乏从头合成途径<sup>[5]</sup>, 因而补救途径成为唯一提供脱氧嘧啶核糖核苷酸的方式, 用于 DNA 的合成、修复或线粒体 DNA 的复制。目前, 对植原体胸苷酸激酶(TMK)的研究不多, 仅见 Onion yellows (OY)<sup>[6]</sup>、Aster yellows witches'-broom (AYWB)<sup>[7]</sup>、Phytoplasma sp. CPh<sup>[8]</sup>以及 Loofah witches'-

broom(LWB)<sup>[9]</sup>的胸苷酸激酶基因分离的报道。

本研究采用 PCR 方法分离、表达小麦蓝矮病植原体胸苷酸激酶(*tmk*)基因, 并对纯化的胸苷酸激酶蛋白进行酶活性分析, 为进一步研究 WBD-TMK 蛋白在植原体感染宿主及繁殖过程中的功能和作用机理奠定了基础, 也为将 TMK 作为药物靶标开发药物防治植原体病害提供一种新思路。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病原和质粒:** 小麦蓝矮病植原体病原、质粒 pET-30a(+)表达载体、*E. coli* JM109、*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞为本实验室保存, 感受态细胞用 Cohen 等<sup>[10]</sup>的氯化钙法制备。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 质粒 pMD18-T simple vec-

基金项目: 国家自然科学基金(30571214); 教育部长江学者和创新团队发展计划(200558)

\*通讯作者。Tel: +86-29-87092716; Fax: +86-029-87091389; E-mail: wyf@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 李蓓(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物病毒。E-mail: zero0707007@163.com

收稿日期: 2007-10-24; 修回日期: 2008-03-14

tor、限制性内切酶、DL2000 为大连 TaKaRa 公司产品, T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素 (Amp), 卡那霉素 (Kan), X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷), IPTG (异丙基- $\beta$ -半乳糖苷) 购自上海 Sangon 公司, Taq DNA 聚合酶、蛋白 Marker 为 MBI 产品, H.Q.&Q. 凝胶回收试剂盒, 质粒微提试剂盒购于 U-gene 生物工程有限公司, dTMP、PEP、NADH、PK、LDH、 $Mg^{2+}$  和 ATP 等均为 Sigma 公司产品。其它试剂均为国产或进口分析纯和生化试剂。Sigma 3-18 K 台式高速冷冻离心机、PCT-200 PCR 基因扩增仪、DYY-8B 型稳压稳流电泳仪、Dolphin-DOC 凝胶成像系统、AKTA prime 蛋白纯化系统、ASP-3700 紫外可见分光光度计等。

## 1.2 *tmk* 基因克隆与序列分析

参考已报道的 OY、AYWB、CPh 和 LWB 的 *tmk* 基因序列, 设计 2 个引物对 *tmk-1F*/*tmk-1R* 和 *tmk-2F*/*tmk-2R* 分离 *tmk-1* 和 *tmk-2* 基因。*tmk-1F*: 5'-ATGATGAAATTAATAGTTTTTGAAG-3', *tmk-1R*: 5'-TTAGTTATGATCGCCATTTGA-3'; *tmk-2F*: 5'-ATGTTTATTCTTTTGAAGGT-3', *tmk-2R*: 5'-TAAAGGT-ATTTGAAAG-3'。参照顾沛雯等<sup>[2]</sup>的方法, 提取感病小麦 DNA, 克隆 *tmk* 基因并进行序列分析。

## 1.3 *tmk* 基因的原核表达及蛋白纯化

引物序列中引入 *EcoR* 和 *Hind* 酶切位点构建 pET30a(+)-*tmk* 重组质粒, 经 PCR 和酶切鉴定, 将正确的重组子转化 *E. coli* BL21 (DE3), IPTG 分别诱导 0、2、4、6 h, 并取少量表达菌进行 SDS-PAGE 检测。表达培养结束后收集菌体, 加溶菌酶并超声裂解, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 室温下过 Ni-NTA 层析柱, 洗脱收集目的蛋白, 透析、浓缩于 4 $^{\circ}$ C 保存并将纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 检测。以空载 pET-30a(+)质粒为对照。

## 1.4 TMK 蛋白的酶催化活性分析

采用双酶分析方法<sup>[11]</sup>对纯化的 TMK 进行酶活性分析, 90  $\mu$ L 反应体系包含: 100  $\mu$ mol/L dTMP, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 100 mmol/L Tris-HCl(pH7.4), 5 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L PEP, 0.2 mmol/L NADH, pyruvate kinase 1.5 U, lactate dehydrogenase 1.5 U, 1.0 mmol/L ATP。将 10  $\mu$ L TMK 加入上述反应体系, 30 $^{\circ}$ C 下进行 100 min, 每隔 5 min 计数一次, 波长 340 nm 下测定 NADH 的浓度, 以单位时间(min)内 NADH 的消耗量( $\mu$ mol/L)作为 TMK 催化反应的反应速率[ $\mu$ mol/L/min], 最后于 98 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 终止反应。将蛋白纯化时所用洗脱缓冲液作相同处理作为阴

性对照。分别从以下几个催化条件设置梯度试验, 确定最佳酶反应条件: ① TMK/ $\mu$ g/mL: 52.75、105.5、211、422、844、1688; ② dTMP/ $\mu$ mol/L: 0.001、1、10、100、1000; ③  $Mg^{2+}$ /mmol/L: 0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3; ④ ATP/mmol/L: 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5、2; ⑤ pH: 4、5、6、7、8、9、10; ⑥ T/ $^{\circ}$ C: 20、25、30、35、40。

## 2 结果和分析

### 2.1 *tmk* 基因克隆与序列分析

从小麦蓝矮病病株总 DNA 中扩增分别得到 630 bp 和 624 bp 的特异片段, 与克隆载体连接后, 重组质粒 DNA 经 PCR 扩增也得到与病株总 DNA 扩增片段大小相同的产物 (图 1)。



图 1 小麦蓝矮病植原体 *tmk* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳 Fig. 1 PCR amplification of *tmk* gene of phytoplasma from wheat blue dwarf. M. Marker DL-2000; 1. *tmk-1*; 2. constructed plasmid of *tmk-1*; 3. *tmk-2*; 4. constructed plasmid of *tmk-2*; 5. Healthy wheat.

经序列测定, 小麦蓝矮植原体 *tmk-1*、*tmk-2* 基因分别为 630 bp (GenBank 登录号 EU183350) 和 624 bp (EU183351), 分别编码 209 和 207 个氨基酸, (G+C) 含量分别为 29.68% 和 28.37%。将小麦蓝矮植原体 *tmk-1*、*tmk-2* 基因的核苷酸序列及其翻译的氨基酸序列与已知的其它植原体比较 (表 1), 可知, 小麦蓝矮 (WBD) 植原体 *tmk-1* 基因与三叶草绿变 (Clover phyllody) CPh 株系、洋葱黄化 (Onion yellows, OY) 植原体的 *tmk-a* 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列同源率均达到 94% 以上, 而 *tmk-2* 与洋葱黄化 (Onion yellows, OY) 植原体的 *tmk-b*、翠菊黄化丛枝 (Aster yellows witches'-broom, AYWB) 植原体的 *tmk2* 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列同源率均达到 94% 以上。

结合前人研究报道<sup>[12]</sup>, 对小麦蓝矮植原体和已知的其它植原体、细菌的胸苷酸激酶 (TMK) 一级结构序列的分析表明 (图 2), TMK 与其他 dNMP 激酶一样都包含 3 个与结合 NTP/NMP 相关的保守区, 分别是 P-loop 区、TMP 结合区及 LID 区, 其中 P-loop 和

LID 是两个磷酸基供体结合区。小麦蓝矮植原体 TMK-1 的 3 个保守区是 P-loop 区(9-GLD GSG KT-16)、TMP 结合区(85-DRY LDS TIA YQ-95)和 LID 区(135-IGR TRK KK-143)。TMK-2 的 3 个保守区是 P-loop 区(7-GCE GAG

KT-14)、TMP 结合区(91-DRW LPS NFA YQ-101)和 LID 区(135-IGI QRV KQ-143),以上结果表明小麦蓝矮植原体 TMK1 和 TMK2 在一级结构上与已知 TMK 含有相同的功能区,由此推出它们可能行使同样的催化功能。

表 1 小麦蓝矮植原体与其它植原体 *tmk* 基因序列的同源性比较

Table 1 Homology comparison of thymidylate kinase gene sequences of WBD and other phytoplasmas

16Sr group and subgroup	phytoplasmas	GenBank Accession No.	Homology/%			
			<i>tmk-1</i>		<i>tmk-2</i>	
			Nucleotide	Amino acid	Nucleotide	Amino acid
16Sr -C	Clover Phylloidy (CPh)	DQ111953	95.71	96.42	-	-
16Sr -C	Onion	<i>tmk-a</i> AB010446	94.76	94.26	-	-
	yellow(OY)	<i>tmk-b</i> AB094668	-	-	95.19	95.65
16Sr -B	Aster yellows witches'-broom (AYWB)	CP000061	78.7	77.00	94.36	95.56
16Sr	Loofah witches'-broom(LWB)	AF251151	70.97	76.68	65.3	66.7

	P-loop	TMP binding motif	LID
WBD-1	GLIGSGKT 16	DRFLPSTNFAYQ 95	IGSTFKKK 143
OY-A	GLIGSGKT 16	DRFLPSTNFAYQ 95	IGSTFKKK 143
CPh	GLIGSGKT 16	DRFLPSTNFAYQ 95	IGSTFKKK 143
AY	GLIGSGKT 15	DRFLPSTNFAYQ 101	LGLEKIN 143
LWB	GLIGSGKT 15	DRFLPSTNFAYQ 101	..... 135
WBD-2	GLIGSGKT 15	DRFLPSTNFAYQ 101	IGICFVKQ 143
OY-B	GCEGAGKT 14	DRFLPSTNFAYQ 101	IGICFVKQ 143
<i>E.coli</i>	GCEGAGKT 17	DRFLPSTNFAYQ 109	VGIKR.A 150
<i>B.subtilis</i>	GCEGAGKT 17	DRFLPSTNFAYQ 105	EGIKRIYA 148
<i>B.hlodurans</i>	GCEGAGKT 18	DRFLPSTNFAYQ 106	VGISRIHR 149
<i>M.genitalium</i>	EVLCAGKT 18	DRFLPSTNFAYQ 105	EAICRMQK 148
<i>M.pneumoniae</i>	EVLCAGKT 18	DRFLPSTNFAYQ 105	TAINEMAK 148

图 2 植原体及细菌 *tmk* 基因编码的氨基酸序列中的 3 个保守功能区

Fig. 2 Three conserved functional domains of deduced amino acid sequences of *tmk* gene from WBD and other phytoplasma and bacteria.

## 2.2 *tmk* 基因的原核表达和蛋白纯化

将小麦蓝矮病植原体 *tmk* 基因插入原核表达载体 pET30a (+) 中, 筛选阳性克隆进行 PCR 和酶切鉴定, 将正确的重组子 pET-*tmk* 质粒转化 *E.coli* BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 与未诱导的电泳条带相比, 诱导后增加了一条强蛋白带, 大小约 35 kDa, 且表达量随表达时间的延长而增加(图 3)。TMK-1 和 TMK-2 的预计分子量

分别为 28.1 kDa 和 27.8 kDa, 加上 pET 表达的融合标签(约 7 kDa), 表达的融合蛋白大小基本吻合。大量表达后菌体裂解后取上清层析纯化经透析除盐、浓缩得到 TMK-1-poly His 和 TMK-2-poly His 融合蛋白浓度分别为 1.68 mg/ml 和 1.39 mg/ml。SDS-PAGE 检测结果表明, 纯化后的蛋白与诱导表达的蛋白在相同的位置有条带出现, 说明纯化的蛋白为目的蛋白。

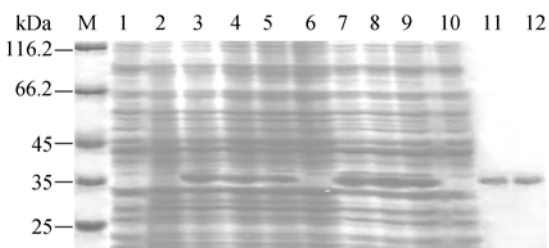


图 3 pET-*tmk* 重组菌诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression of pET-*tmk* induced by IPTG. M. protein size marker; 1 and 2. expression of *E.coli* containing pET-30a(+) only with different induction time for 6 and 0 h; 3-6. expression of *E.coli* containing recombinant pET-*tmk-1* with different induction time for 6, 4, 2, 0 h; 7-10. expression of *E.coli* containing recombinant pET-*tmk-2* with different induction time for 6, 4, 2, 0 h; 11. purification product of TMK-1-poly His fusion protein; 12. purification product of TMK-2-poly His fusion protein.

## 2.3 胸苷酸激酶催化活性分析

对纯化的 TMK-poly His 融合蛋白分别从 TMK、dTMP、Mg<sup>2+</sup>、ATP 的浓度、pH 值、温度等六个方面设置梯度试验, 得到不同条件下 TMK 的反应速率(图 4), 定义在 30 °C、pH 7.3 的条件下每分钟内催化生成 1 nmol/L ADP 所需的胸苷酸激酶的酶量为一个酶单位, 结果表明, TMK-1-poly His 融合蛋白催化活性极低, 酶活力仅 1.64 U/mg, (阴性对照为 0.15 U/mg), 且其催化活性在上述六种因素梯度改变的情况下均无太大变化。相对的, TMK-2-poly His 融合蛋白的催化活性较高, 酶浓度为 211 μg/mL 时达到最高(图 4-A), 酶活力为 112.41 U/mg, 该酶最适催化条件为 1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 1 mmol/L ATP, pH 7.3 左右, 温度 32 °C 左右。

图 4 表现了不同催化条件下 tmk 酶活性的变化情况, 并指出了低活性时的催化条件, 图 4-B 表明, 底物 dTMP 浓度在 0.001 至 1000  $\mu\text{mol/L}$  范围内变化对 TMK 的催化活性无太大影响。Mg<sup>2+</sup> 是影响 TMK 催化活性的一个重要因素, 图 4-C 表明 WBD-TMK-2 在低浓度 Mg<sup>2+</sup> 条件下活性很低, 其最适 Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.5 mmol/L, 在 2~3 mmol/L 范围内活性降低 20%。图 4-D 表明, 在 0.01 mmol/L 至 1 mmol/L 范围内 ATP 浓度增高能极大的提高 TMK 的催化活性, 随后其浓度的增高对 TMK 活性影响

不大, 说明 1 mmol/L ATP 在本实验的反应体系中已基本能提供足够的磷酸基转移给底物 dTMP。此外, TMK 催化反应对 Mg<sup>2+</sup>/ATP 比值也有较高要求<sup>[13,14]</sup>, WBD-TMK-2 活性在 Mg<sup>2+</sup>/ATP 比值为 1 和 1.5 时, 活性最高且变化不大。pH 值是影响 TMK 催化活性的另一个重要因素, 图 4-E 表明 WBD-TMK-2 在 pH7-8 范围内催化活性均较高, 这与前人研究<sup>[6,9,13,15,16]</sup>一致。图 4-F 表明 WBD-TMK-2 活性在 28 ~35 之间基本稳定, 这与 OY-TMK<sup>[6]</sup>、LWB-TMK<sup>[9]</sup>一致。

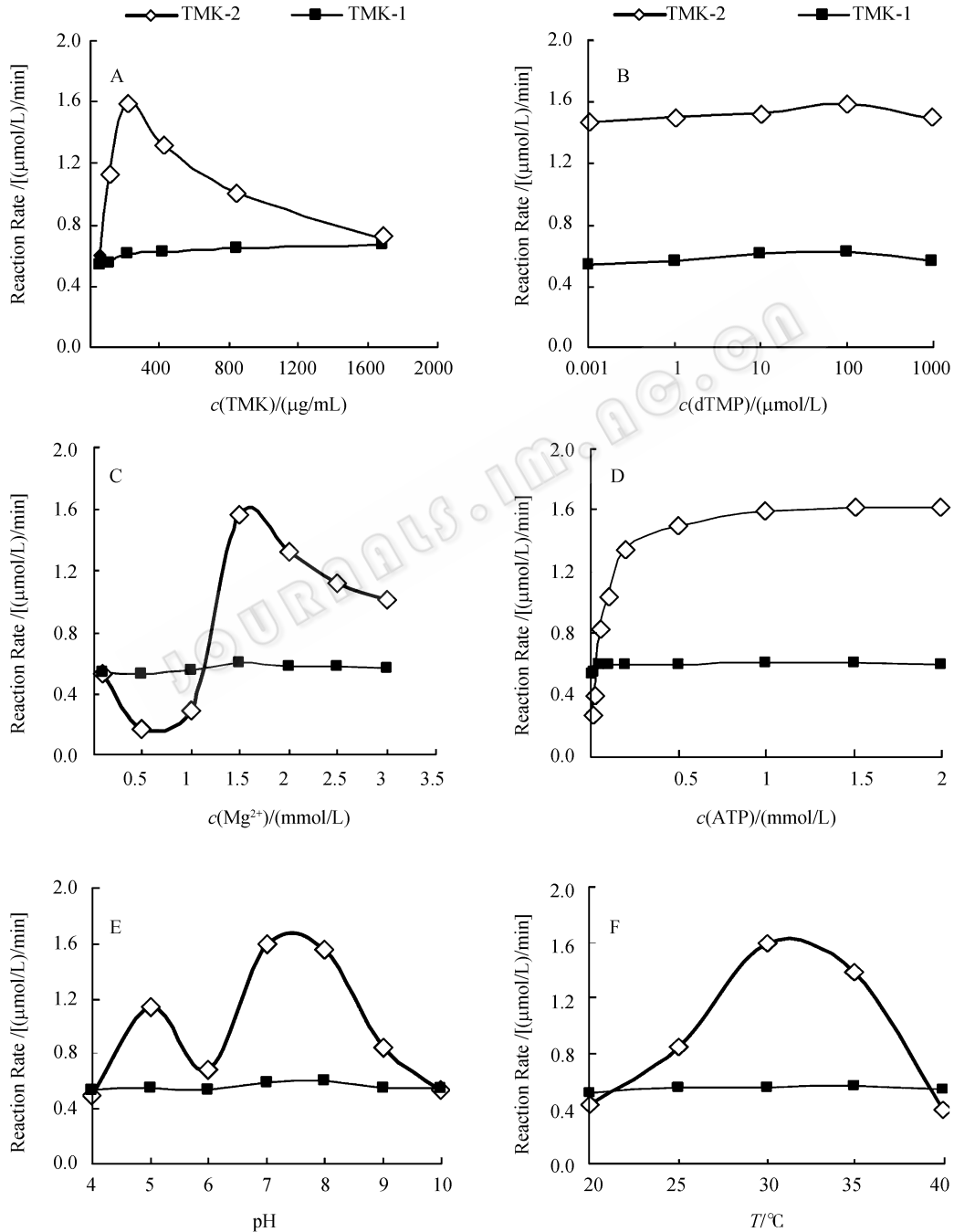


图 4 TMK-poly His 融合蛋白在不同 TMK、dTMP、Mg<sup>2+</sup>、ATP、pH 值和温度下的反应速率  
Fig. 4 Reaction rate under different concentration of TMK(A), dTMP(B), Mg<sup>2+</sup>(C), ATP(D) and different pH, temperature(F) conditions.

### 3 讨论

本实验首次分离出小麦蓝矮植原体 *tmk-1* 和 *tmk-2* 基因,进行原核表达,并分析了表达纯化的胸苷酸激酶的催化活性,得到了该酶的最适催化条件,及其活性随条件变化而变化的性质,并得到了该酶低活性时的部分催化条件,因而使得通过改变环境条件抑制胸苷酸激酶活性从而达到抑制植原体侵染寄主后的增殖这一目的成为可能,为进一步研究 WBD-TMK 蛋白在植原体感染宿主及增殖过程中的功能和作用机理奠定了基础。

*tmk-1* 和 *tmk-2* 编码的氨基酸序列有相同的保守功能区,说明 TMK-1 和 TMK-2 是有功能的,但是相对于 TMK-2, TMK-1 的活性极低,并且将 TMK 活性的影响因素设置梯度试验也未能改变极低的 TMK-1 的活性,分析原因可能是 TMK-1 作为另外一种激酶起作用,因为植原体侵染寄主后可能会改变其代谢途径以适应环境变化,使得 TMK-1 和 TMK-2 在不同的途径中起作用。比如,在支原体(*Mycoplasma* spp.)中 dAMP 激酶就可以催化 dAMP、dGMP、dCMP 磷酸化<sup>[17]</sup>。从 DNA 序列上分析,发现有 2 个高度保守区在缺失,一个是 P-loop 区下游的 TKEPGG,另外一个是在 TMP binding motif 上游的 PAL,这两个保守区域的缺失很可能削弱了 TMK-1 催化活性。

由于植原体不能在体外进行人工培养,对其遗传本质、致病机理等方面的研究受到极大的阻碍,对植原体病害的防治工作也进展缓慢。胸苷酸激酶作为细胞内一种重要的代谢酶,对酶活中心、催化活性随环境变化而改变的性质、在侵染寄主以及其在宿主体内增殖的转录性质等进行深入地研究将使得设计特异性植原体抑制剂成为可能。

### 参 考 文 献

- [1] 顾沛雯, 吴云锋, 安凤秋. 小麦蓝矮植原体寄主范围的鉴定及 RFLP 分析. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2007, 37(4): 390–397.
- [2] 顾沛雯, 安凤秋, 吴云锋等. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 基因片段的比较分析. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2005, 35(5): 403–411.
- [3] 安凤秋, 吴云锋, 孙秀芹, 等. 小麦蓝矮病植原体延伸因子(EF-Tu) *tuf* 基因序列的同源性分析. 中国农业科学(*Scientia Agricultura Sinica*), 2006, 39(1): 74–80.
- [4] Gesing A, Modrzejewska H, Kathownik M, *et al.* Thymidine kinase and adenosine kinase activities in homogenates of thyroid lobes in hemithyroidectomized rats effects of melatonin *in vitro*. *Neuro Endocrinol Lett.* 2000, 21(6): 453–459.
- [5] Pallack J, Williams M, Mcelhaney R, *et al.* The comparative metabolism of the mollicutes: the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and hylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol.* 1997, 23: 269–354.
- [6] Miyata S, Oshima K, Kakizawa S, *et al.* Two different thymidine kinase gene homologues, including one that has catalytic activity, are encoded in the onion yellows phytoplasma genome. *Microbiology.* 2003, 149: 2243–2250.
- [7] Bai X, Zhang J, Ewing A. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol.* 2006, 188 (10): 3682–3696.
- [8] Jomantiene R, Davis RE. Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in a phytoplasma genome. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 255 (1), 59–65.
- [9] 江施幸. 丝瓜簇叶病植物菌质体胸苷酸激酶基因(*tmk*)之表现及特性研究. 国立中央大学硕士论文, 2001.
- [10] Cohen S N, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. The Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 1972, 69: 2110–2114.
- [11] Blondin C, Serina L, Wiesmuller AM, *et al.* Improved spectrophotometric assay of nucleoside monophosphate kinase activity using the pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupling system. *Anal. Biochem.* 1994, 220: 219–221.
- [12] Ostermann N, Schlichting I, Brundiers R, *et al.* Insights into the phosphoryltransfer mechanism of human thymidine kinase gained from crystal structures of enzyme complexes along the reaction coordinate. *Structure*, 2000, 8: 629–642.
- [13] Lee LS, Cheng YC. Human thymidylate kinase, purification and kinetic behavior of the thymidylate kinase derived from chronic myelocytic leukemia. *J Biol Chem*, 1977, 252: 5685–5691.
- [14] Jong AYS, Campbell JL. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* thymidylate kinase, the CDC8 gene product. General properties, kinetic analysis, and subcellular localization. *J Biol Chem*, 1984, 259: 14394–14398.
- [15] Kielley RK. Purification and properties of thymidine monophosphate kinase from mouse hepatoma. *J Biol Chem*, 1970, 245: 4204–4212.
- [16] Nelson DJ, Carter CE. Purification and characterization of thymidine 5-monophosphate kinase from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem*, 1969, 244: 5254–5262.
- [17] Wang L, Westberg J, Bolske G, *et al.* Novel deoxynucleoside-phosphorylating enzymes in mycoplasmas: evidence for efficient utilization of deoxynucleosides. *Mol Microbiol*, 2001, 42, 1065–1073.

## Isolation, Prokaryotic Expression and Activity Analysis of Thymidylate Kinase (tmk) Gene from Phytoplasma of Wheat Blue Dwarf

Bei Li, Lingling Ji, Yunfeng Wu\*, Xing'an Hao

(Northwest Agriculture and Forestry University, Shaanxi Key Laboratory for Agriculture Molecular Biotechnology, Yangling 712100)

**Abstract:** [Objective] Wheat blue dwarf (WBD) is an important disease in winter wheat district, which causes serious losses in wheat production. Thymidylate kinase (TMK) catalyses the phosphorylation of dTMP to dTDP in the *de novo* and salvage pathways of dTTP synthesis in both prokaryotes and eukaryotes. In order effectively control this phytoplasma, we isolated the thymidylate kinase gene of WBD phytoplasma, and analyzed the catalytic activity of TMK protein. [Methods] *tmk* gene was amplified from the phytoplasma of WBD, the amplicons were digested with *EcoR* and *Hind* and then inserted into expression vector pET-30a(+). The polyHis-tagged TMK was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and fusion protein was obtained and purified by Ni-NTA column. The TMK activities were measured by the method of enzyme-coupled assay involving  $Mg^{2+}$ , dTMP and ATP. [Results] Two genes, *tmk-1* and *tmk-2* were obtained, with the molecular weight of 630 bp and 624 bp. Both of them encoded an amino acid sequence with three conserved functional motifs which related with binding NTP/NMP. The fusion protein, TMK-2 had a higher catalytic activity (112.41 U/mg) than TMK-1 (16.4 U/mg), and its optimum catalytic conditions were 32 °C, pH7.3, 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$  and 1 mmol/L ATP. [Conclusion] TMK-1 and TMK-2 had conserved functional motifs in their primary sequence, and suggested that they may function as TMK enzymes. But, the TMK-1-polyHis fusion protein had very low catalytic activity, the possible reason was that two highly conserved regions were absent in TMK-1, and it might function as another type of kinase in WBD phytoplasma. This experiment lay a foundation for further study of the TMK function in infection and reproduction of WBD phytoplasma.

**Keywords:** Wheat blue dwarf (WBD); Phytoplasma; Thymidylate kinase (TMK); Prokaryotic expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571214 and the Program for Changjiang Scholars and Innovative Team in University of Education Ministry of China(200558)

\*Corresponding author. Tel: +86-29-87092716; Fax: +86-29-87091389; E-mail: wyf@nwsuaf.edu.cn

Received: 24 October 2007/ Revised: 14 March 2008

### 《微生物学报》投稿方式

2007年12月修定

从2006年起,本刊采用“稿件远程处理系统”,全面试行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

(1) 远程投稿:请先登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn>,进入《微生物学报》,点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿,请先点击进行“注册”,注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿,则可直接投稿。如果忘了用户名和密码,请联系本刊编辑部找回登录口令。

(2) 邮寄纸样:所有来稿均需要邮寄1份纸稿、介绍信。

(3) 稿件受理费:投稿时请随寄100元受理费,务必通过邮局汇款,切忌随信邮寄!

注:务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。