

小麦蓝矮植原体染色体 DNA 的分离

陈旺 李艳 吴云锋*

(旱区作物逆境生物学国家重点实验室 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理
重点实验室 西北农林科技大学 植保学院 陕西 杨凌 712100)

摘要: 【目的】分离小麦蓝矮(WBD)植原体染色体 DNA, 并建立 WBD 植原体染色体分离纯化体系。【方法】采用差速离心和脉冲电泳(PFGE)方法富集纯化 WBD 植原体染色体 DNA, 并通过 PCR 和 Southern blot 进行检测验证, 实时荧光定量 PCR 方法对分离纯化效果进行定量检测。【结果】脉冲电泳凝胶中出现一条大小约为 650 kb 的条带, 经 PCR 检测和 Southern blot 分析表明该条带为 WBD 植原体的染色体 DNA。实时荧光定量 PCR 检测结果表明采用差速离心与脉冲电泳结合的方法可以将 WBD 植原体基因组的相对拷贝数提高 436.5 倍。【结论】采用差速离心与脉冲电泳法结合可以有效地从感染 WBD 长春花中分离到纯的 WBD 植原体染色体 DNA, WBD 植原体染色体 DNA 大小约为 650 kb。

关键词: 小麦蓝矮(WBD)植原体, 染色体 DNA, 分离纯化, 差速离心, 脉冲电泳

Isolation of chromosome DNA of wheat blue dwarf phytoplasma

CHEN Wang LI Yan WU Yun-Feng*

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas/Key Laboratory of Crop Pest Integrated Pest Management on Crop in Northwestern Loess Plateau, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] Isolating chromosome DNA of wheat blue dwarf (WBD) phytoplasma and establishing an effective protocol of purification for chromosome DNA. [Methods] Dif-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970133); 高等学校学科创新引智计划项目(No. B07049)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-29-87092716; 邮箱: wuyf@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2012-06-17; 接受日期: 2012-10-12

ferential centrifugation and plus-filed gel electrophoresis (PFGE) were used to purify the chromosome DNA of WBD phytoplasma. The band observed in PFGE was confirmed by PCR and Southern blot. The effect of each step was detected by real-time quantitative PCR analysis. [Results] Using differential centrifugation and PFGE, a band about 650 kb was observed, which was confirmed as the chromosome DNA of WBD phytoplasma by Southern blot hybridization and PCR. Meanwhile, real-time PCR analysis showed that the relative copies of WBD phytoplasma chromosome DNA derived from differential centrifugation and PFGE was 436.5 times than that in the total DNA of infected periwinkle. [Conclusion] The size of WBD phytoplasma chromosome DNA is about 650 kb, purified WBD phytoplasma chromosome DNA can be obtained effectively using differential centrifugation and PFGE.

Keywords: Wheat blue dwarf (WBD) phytoplasma, Chromosome DNA, Isolation and purification, Differential centrifugation, Plus-filed gel electrophoresis

植原体(Phytoplasma, *Candidatus phytoplasma*)病害是一类重要的维管束病害。据最新统计,世界上报道的植原体病害达到 300 多种,其中多种植原体使经济作物受到了严重的危害^[1]。在我国,也已报道了 40 余种植原体病害^[2]。

小麦蓝矮病(Wheat blue dwarf, WBD)是我国首次报道的小麦植原体病害,国外尚未见报道^[3]。在田间由介体条沙叶蝉(*Psammotettix striatus* L.)持久性传播,危害小麦,引起严重损失。本实验室已经开展了病原学、介体传播、寄主范围及发病规律等研究,克隆了 WBD 植原体 16S rRNA 及核糖体蛋白(Ribosomal protein, *rp*)基因,并基于 16S rRNA、*rp* 基因的系统发育分析和 16S rRNA 基因序列多态性(RFLP)的分析结果将小麦蓝矮植原体划归于 16SrI-C 亚组^[4]。目前对 WBD 植原体的基因组结构尚不明确,严重制约了对小麦蓝矮植原体致病性、介体传播机理与病害防治等研究。本实验以长春花感病组织为材料,分离并纯化了完整的 WBD 植原体染色体 DNA,并建立了一套系统的植原体染色体纯化与验证方法,为小麦蓝矮植原体基因组序列测定奠定了良好基础。

1 材料与方 法

1.1 病原与寄主材料

WBD 植原体病原活体保存在防虫温室的小麦(*Triticum aestivum* Linn.)幼苗上。通过条沙叶蝉(*Psammotettix striatus* L.)传播到繁殖寄主长春花 [*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don]上,通过芽接法进行感病植株的繁殖。采集花器变绿与叶片黄化的新鲜发病组织,提取植原体染色体 DNA。

1.2 WBD 染色体 DNA 的提取

WBD 植原体提取方法如下。取 2 g 发病组织,在液氮中快速研磨,悬浮于 20 mL 缓冲液(0.1 mol/L Na₂HPO₄, 10%蔗糖 W/V, 50 mmol/L 抗坏血酸, 2% PVP-10, 0.15% BSA, pH 7.6)中,混匀后经 3 层纱布过滤,滤液在 4 °C、1 500×g 离心 10 min,取上清,18 000×g 离心 25 min,沉淀在重悬液(20 mmol/L Tris-HCl, 10% 蔗糖, pH 8.0)中重悬后,再重复上述两次离心,将沉淀用 20 μL 重悬液悬浮,用等体积的 2% 低熔点琼脂糖(Sigma, 美国)包埋,包埋后的胶块在裂解缓冲液(0.5 mol/L EDTA, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 1.0 g/L 蛋白酶 K, pH 8.0)中,50 °C 裂解 3 d,每天更换一

次裂解液。取出胶块,用 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA)漂洗 3 次,每次 20 min。健康对照与泡桐丛枝植原体(*Paulownia witches'-broom*, PaWB)阳性对照的处理方法同上。

1.3 WBD 染色体 DNA 的纯化与回收

采用脉冲电泳(PFGE)纯化 WBD 染色体 DNA,割胶回收目标条带。将经蛋白酶 K 处理的胶块在 0.5×TBE 中平衡 2 h,进行脉冲电泳(PFGE)分析,电泳条件为:24 h、40–90 s、6 V/cm、14 °C。脉冲电泳凝胶在 EB 溶液中染色 0.5 h,蒸馏水脱色 2 h,紫外灯下成像。凝胶中植原体染色体 DNA 的回收参考《分子克隆》透析袋电洗脱的方法^[5]。将目标条带胶条装在加有 0.5×TBE 的透析袋中,在 0.5×TBE、12.5 °C、30–30 s、6 V/cm 的条件下电泳 4 h,反转透析袋电泳 1 min,吸出洗脱液。

1.4 WBD 染色体 DNA 的 PCR 和 Southern blot 检验

采用 PCR 和 Southern blot 杂交验证植原体染色体 DNA 条带。PCR 检测的 WBD 植原体基因分别是 16S rDNA、核糖体蛋白(*rp*)、延伸因子(*Tuf*),PCR 检测引物对依次为 P1: AAGAGTTTG ATCCTGGCTCAGGATT/P7: CGTCCTTCATCG GCTCTT; *rp*F1: GGACATAAGTTAGGTGAATTT/*rp*R1: ACGATATTTAGTTCTTTTTGG; *fTufu*: CC TGAAGAAAGAGAACGTGG/*rTufu*: CGGAAAT AGAATTGAGGACG。Southern blot 验证参照罗氏地高辛核酸标记和检测试剂盒(Roche, 美国)使用说明进行操作。杂交探针为小麦蓝矮植原体的 16S rDNA 片段。脉冲电泳凝胶在 20×SSC (3.0 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.0)中采用毛细管法将核酸转移到尼龙膜上。80 °C 烘 2 h,将核酸固定在膜上。在预杂液中 65 °C 预杂交 1 h。加入 WBD 植原体 16S rDNA 探针,65 °C 杂交过夜。洗膜后于 37 °C 黑暗处显色,直至出现明显的条带,趁膜湿润时拍照。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析植原体纯化效果

分别以植物材料的总 DNA、差速离心后重悬液、电洗脱回收液为模板,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对植原体的 16S rDNA 和植物的泛素基因进行定量分析,确定植原体纯化的效果。以小麦蓝矮植原体的 16S rDNA 序列为模板,设计实时荧光定量 PCR 引物,16S 引物对为 RT16s1162: 5'-GCTTGCCT ACATTAGTTAG-3'; RT16s999: 5'-GCTCGGTCA GAGTTTCCT-3'。植物泛素基因定量引物对^[6] UBQ-1252F: 5'-GCTGCTCTGGTGATTGATGG T-3'; UBQ-1392R: 5'-CCAAAAGGAACCCGAAA ACA-3'。实时荧光 PCR 反应条件为:95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环;反应结束后进行熔解曲线分析,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 病原 WBD 植原体的接种繁殖

用条沙叶蝉(*Psammotettix striatus* L.)将 WBD 植原体传播到繁殖寄主长春花,40 d 后长春花表现出黄化、花绿变、花变叶等症状,同时茎基部腋芽萌发。解剖花器发现,感病长春花花托变长,花萼叶化,花冠绿变、叶化,花筒缩短,雄蕊不育,雌蕊叶化(图 1)。

2.2 植原体提取及染色体 DNA 的分离

用 2 g 新鲜感病组织材料,经差速离心得到 20 μ L 重悬液,包埋于等体积的 2%低熔点琼脂糖中,裂解 3 d 后胶块变白,呈透明状。经脉冲电泳后,感病长春花泳道中出现了一条明显的条带,而健康对照无此条带,确定其条带为小麦蓝矮植原体基因组 DNA,通过与酵母染色体 PFG marker 进行比较发现 WBD 基因组大小约为 650 kb (图 2)。

2.3 WBD 植原体染色体 DNA 的 PCR 检验

以 650 kb 条带 DNA 电洗液为模板,用 PCR 检验 16S rRNA 基因、核糖体蛋白(*rp*)基因、延伸

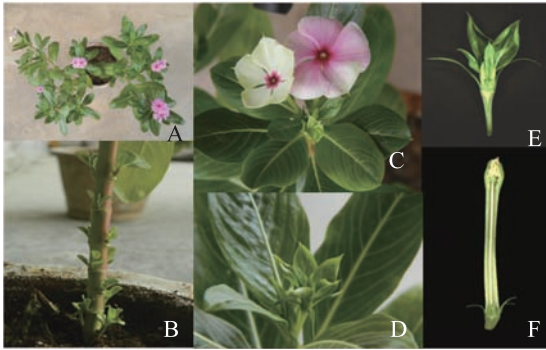


图1 长春花被WBD感染后的症状和组织病理学变化
Fig. 1 Symptom and pathological change of WBD-infected periwinkle

注: A: 感染WBD长春花植株; B: 茎基部腋芽; C: 花绿变; D: 花变叶; E: 感病花纵切; F: 健康花纵切。

Note: A: Infected plant; B: Axillary buds of the stem; C: Virescence of petal; D: Phyllody of floral organ; E: Longitudinal section of flower; F: Longitudinal section of healthy flower.

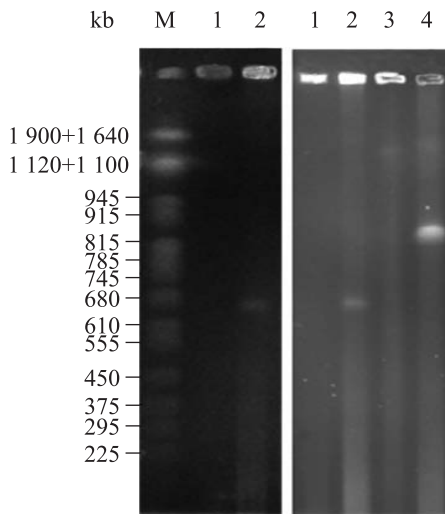


图2 WBD染色体DNA脉冲电泳

Fig. 2 PFGE of WBD chromosome DNA

注: 1: 健康长春花; 2: 感染WBD长春花; 3: 健康泡桐; 4: 感染PaWB泡桐; M: PFG marker.

Note: 1: Healthy periwinkle; 2: WBD-infected periwinkle; 3: Healthy paulownia; 4: PaWB-infected paulownia; M: PFG marker.

因子(*Tuf*)基因, 均检测到上述基因(图3)。说明纯化的650 kb条带是WBD植原体染色体DNA。

2.4 WBD植原体染色体DNA的Southern blot检验

用WBD植原体16S rDNA作为杂交探针,

对脉冲电泳凝胶进行Southern blot检测, 在650 kb条带处出现明显的杂交条带, 而健康材料中没有条带出现, 对照试验组中泡桐丛枝泳道中也出现明显的条带, 而健康的没有杂交条带(图4)。杂交试验表明650 kb条带是WBD植原体染色体DNA。

2.5 植原体染色体DNA纯化效果

采用荧光定量PCR方法分析植原体基因组

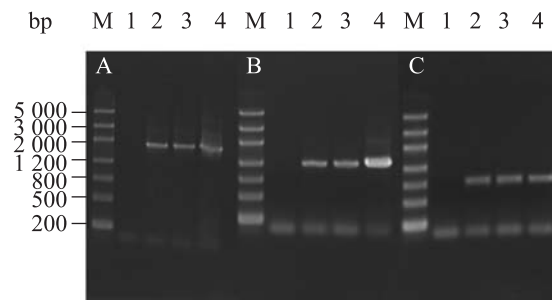


图3 电洗脱液PCR检测

Fig. 3 PCR detection of electroelution solution

注: A: 16S rRNA基因; B: *rp*基因; C: *Tuf*基因. M: Marker; 1: 电洗脱缓冲液; 2: WBD电洗脱液; 3: PaWB电洗脱液; 4: 感染PaWB泡桐DNA.

Note: A: 16S rRNA gene; B: *rp* gene; C: *Tuf* gene. M: Marker; 1: Electroelution buffer; 2: WBD electroelution solution; 3: PaWB electroelution solution; 4: PaWB-infected paulownia DNA.

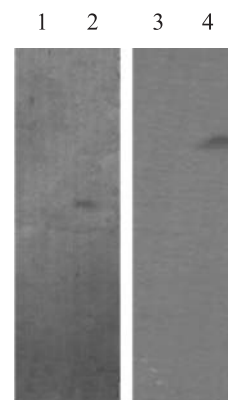


图4 WBD DNA的Southern blot检测

Fig. 4 Southern blot of WBD DNA

注: 1: 健康长春花; 2: 感染WBD长春花; 3: 健康泡桐; 4: 感染PaWB泡桐.

Note: 1: Healthy periwinkle; 2: WBD-infected periwinkle; 3: Healthy paulownia; 4: PaWB-infected paulownia.

和植物基因组相对量的变化,结果表明 WBD 植原体基因组拷贝数相对于植物基因组拷贝数,经过差速离心提纯后, WBD 植原体 DNA 提高了 18.4 倍; 经过 PFGE 分离 WBD 植原体 DNA 提高了 436.5 倍,说明差速离心和脉冲电泳能够提高植原体基因组 DNA 的纯度。

3 结论与讨论

本实验采用差速离心和脉冲电泳相结合的方法首次从感病长春花中获得了大小为约 650 kb 的 DNA, 通过 PCR 和 Southern blot 检测证实其为 WBD 植原体染色体 DNA。利用实时荧光定量 PCR 检测纯化效果,发现差速离心和脉冲电泳相结合能将植原体 DNA 的浓度提高 436.5 倍。

由于植原体尚不能在培养基上生长,使分离纯化植原体基因组 DNA 变得十分困难,人们对植原体基因组研究进展缓慢。因此,获得完整的植原体基因组成为植原体基因组研究的关键。早在 1993 年 Neimark 等^[7]开展了植原体染色体 DNA 的分离纯化工作。在我国,2011 年杨毅等^[8]也开展了泡桐丛枝植原体染色体 DNA 的分离纯化工作,目前尚未见其他植原体染色体 DNA 分离纯化方面的报道。WBD 是我国首次报道的小麦植原体病害,主要危害小麦等一些禾本科植物,而这些禾本科植物多为一年生草本,且体内植原体浓度较低,增加了 WBD 植原体富集和纯化工作的难度。本实验首先将 WBD 植原体传播到植原体繁殖寄主长春花上,而长春花为多年生草本植物,体内植原体含量高,有效地解决了植原体含量低和染色体 DNA 收集困难等问题,为 WBD 植原体基因组序列的测定工作提供了宝贵

的实验材料,也为 WBD 植原体致病机理和虫传机制的研究奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] Bertaccin A, Duduk B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research[J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2009, 48(3): 355–378.
- [2] Li ZN, Zhang L, Liu P, et al. Detection and molecular characterization of cactus witches'-broom disease associated with a group 16SrII phytoplasma in northern areas of China[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2012, 37(3): 210–214.
- [3] 顾沛雯, 吴云锋, 安凤秋. 小麦蓝矮病的研究进展[C]. 中国植物病理学会2006年学术年会论文集, 2006: 144–145.
- [4] Wu YF, Hao XG, Li ZN, et al. Identification of the phytoplasma associated with wheat blue dwarf disease in China[J]. *Plant Disease*, 2010, 94(8): 977–985.
- [5] Smbrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*[M]. 2nd ed. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 321–322.
- [6] Chen WY, Lin CP. Characterization of *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by peanut Witches' broom Phytoplasma infection[J]. *Journal of Phytopathology*, 2011, 159(7/8): 505–510.
- [7] Neimark H, Kirkpatrick BC. Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic *Mycioplasmalike* organisms[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 7(1): 21–28.
- [8] 杨毅, 杨旭光, 林彩丽, 等. 泡桐丛枝植原体染色体全长及两个 rRNA 操纵子定位研究[J]. *植物检疫*, 2011, 25(4): 5–9.