

# 用 PCR 及 RFLP 方法分析支原体与植原体的同源性\*

邓兆群<sup>1</sup> 胡勤学<sup>2</sup> 柳 晟<sup>2</sup> 王 瑶<sup>2</sup> 林木兰<sup>2</sup>\*\*

1(湖北医科大学微生物及免疫学教研室, 武汉 430071)

2(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

**摘 要** 将猪鼻支原体和泡桐丛枝病植原体的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 分别得到一条 1 kb 左右的扩增片段。PCR 扩增产物用限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 和 *Sma* I 进行 RFLP(限制性片段长度多态性)分析, 发现用 RFLP 分析猪鼻支原体和泡桐丛枝病植原体 16S rDNA 序列同源性的相关系数为 0.72。

**关键词** 支原体, 植原体, PCR, RFLP

**A homologous comparison between mycoplasma and phytoplasma using 16S rDNA PCR amplification and RFLP analysis/DENG Zhao\_Qun<sup>1)</sup>, HU Qin\_Xue<sup>2)</sup>, LIU Sheng<sup>2)</sup>, WANG Yao<sup>2)</sup>, LIN Mu\_Lan<sup>2)</sup>**

**Abstract** 16S rDNA from mycoplasma and phytoplasma was amplified by PCR, and a band was detected at about 1 kb. DNA products were digested with restriction enzymes *EcoR* I, *Hind* III, *Bam* H I, *Sal* I and *Sma* I, and then were analyzed using RFLP. Similarity coefficient derived from RFLP analysis of mycoplasma and phytoplasma is 0.72.

**Key words** mycoplasma, phytoplasma, PCR, RFLP

**Author's address** 1)Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071

2)Hubei Medical University, Wuhan 430071

支原体(mycoplasma)是引起人类及动物疾病的一类重要微生物,植原体(phytoplasma)则导致植物病害的病原体,由于它们缺乏细胞壁和基因组中低 G+C 含量等共性而同归于柔膜体纲(Mollicutes)(Lim et al., 1989),但因感染宿主不同及植物植原体不能人工培养而显示出明显差异(Kirkpatrick et al., 1987)。Pyung-OK Lim 等通过对支原体和植原体 16S rDNA 的克隆分析阐述了它们间的相关性(Lim et al., 1989)。我们选用人工培养的猪鼻支原体和患丛枝病泡桐中含植原体的粗提物为材料,提取总 DNA 后进行 16S rDNA 的 PCR 扩增及 RFLP 分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

猪鼻支原体由湖北医科大学微生物及免疫学教研室提供,PCR 扩增试剂盒及限制性内切酶等购自华美公司,PCR 扩增引物由上海生工生物工程公司合成,其它试剂为国产分析纯。

### 1.2 支原体的培养和 DNA 的抽提

用支原体常规培养方法培养猪鼻支原体。取培养物 200  $\mu$ l,离心 5 min(10 000 r/min),

\*1995 年中国科学院生物区系分类资助课题(960211)

\*\*通讯作者

收稿日期:1999-05-11;修改稿收到日期:1999-08-20

沉淀溶于 300  $\mu\text{l}$  无菌蒸馏水中。

### 1.3 植原体 DNA 的抽提(朱新产等,1998)

患丛枝病泡桐枝叶 1.0 g 液氮冷冻磨碎,用 10 ml 抽提缓冲液将其移入 70 ml 离心管,加入 1.5 ml 10% SDS 混匀后于 65 $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min。加入 3.5 ml 5 mol/L KAc 冰浴 30 min,离心 10 min (10 000 r/min),酚氯仿抽提,上清加 0.6~1 体积异丙醇,-20 $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min 以上,离心 15 min (10 000 r/min),沉淀经 70% 乙醇洗涤,溶于 100  $\mu\text{l}$  TE 中。

### 1.4 PCR 引物设计合成

根据 Shigetou Numba 等的报道(Numba et al.,1993),选取通用引物并在上海生工生物工程公司合成。P1:5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3';P2:5'-AACCCCGAGAACGTATTCACC-3'。

### 1.5 PCR 扩增

在 50  $\mu\text{l}$  反应体系中分别加入:1  $\mu\text{l}$  上述抽提的 DNA 为模板,0.5  $\mu\text{M}$  的引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>,250  $\mu\text{M}$  的 dNTP,5  $\mu\text{l}$  10xPCR 反应缓冲液,1.5 U *Taq* DNA 聚合酶,按下面程序进行反应:94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1.5 min,60 $^{\circ}\text{C}$  退火 2 min,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min,一个循环,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 2 min,60 $^{\circ}\text{C}$  退火 2 min,72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min,29 个循环,最后体系在 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。反应结束后,取 10  $\mu\text{l}$  进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳结果。

### 1.6 PCR 产物 RFLP 分析

PCR 扩增的支原体和植原体 16S rDNA 进行 RFLP 分析,将支原体和植原体的 PCR 扩增产物 DNA 6  $\mu\text{l}$  用 *Eco*R I、*Hind* III、*Bam*H I、*Sal* I 和 *Sma* I 进行酶切,酶切产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察电泳结果,支原体和植原体间的相关系数( $F$ )用公式  $F = 2N_0 / (N_1 + N_2)$  求出(Lee et al.,1993)。 $N_0$  为 5 种限制性内切酶酶切后支原体和植原体共有的酶切片段总和; $N_1$ 、 $N_2$  分别为 5 种限制性内切酶酶切后支原体和植原体各自的酶切片段。

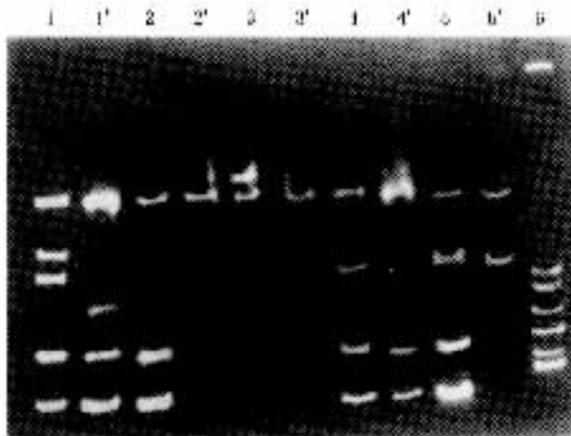


图 1 5 种限制性内切酶对支原体和植原体 PCR 产物 16S rDNA 的 RFLP 分析

Fig. 1 RFLP analysis of PCR products of mycoplasma and phytoplasma using five restriction enzymes

注:1 2 3 4 5,为植原体样品。1' 2' 3' 4' 5'为支原体样品。1 和 1'为 *Sma* I 酶切 2 和 2'为 *Sal* I 酶切 3 和 3'为 *Bam*H I 酶切 4 和 4'为 *Hind* III 酶切 5 和 5'为 *Eco*R I 酶切 6 为  $\lambda$ DNA Marker。

Note:1 2 3 4 5 phytoplasma;1' 2' 3' 4' 5' mycoplasma. 1, 1'digested with *Sma* I; 2, 2'digested with *Sal* I; 3, 3'digested with *Bam*H I; 4, 4'digested *Hind* III; 5, 5' digested with *Eco*R I; 6  $\lambda$ DNA Marker.

## 2 结果

2.1 以支原体和植原体 DNA 为模板 ,通过引物 P1、P2 进行 PCR 扩增 ,分别得到一条 1 kb 左右的扩增片段 ,即按预期设计扩增出的支原体和植原体的部分 16S rDNA 序列。

2.2 用 5 种限制性内切酶对支原体和植原体的 PCR 扩增产物进行酶切 ,16S rDNA 的 RFLP 分析见图 1。5 种限制性内切酶酶切后支原体和植原体共有的酶切片段总和  $N_0$  为 10 ,支原体酶切总片段  $N_1$  为 11 ,植原体酶切总片段  $N_2$  为 18。 $F = 2N_0 / (N_1 + N_2) = 2 \times 10 / (11 + 18) = 0.72$ 。

## 3 讨论

我们利用 RFLP 分析比较支原体和植原体的相关性 ,得到二者相关系数为 0.72(即相关性为 72%) ,结合 Pyung\_OK Lim 等(Lim et al. ,1989)对覃状支原体和植原体 16S rDNA 序列分析得出的同源性 72% ,说明支原体和植原体 16S rDNA 的 RFLP 分析与序列分析结果一致 ,使得应用 RFLP 进行支原体与植原体间的同源性分析成为可能 ,同时说明支原体与植原体在进化上存在较高的亲缘关系 ,可能由于某种原因 ,在进化过程中使得支原体和植原体在寄主特异性和培养特性显出多样性。在目前植原体尚不能人工培养的情况下 ,将有助于借鉴支原体的人工培养方法 ,进行植原体代谢研究及人工培养基组成的选择。从微生物系统发育和起源的角度考虑 ,既然二者同源性较高 ,但又在寄主范围和可培养性等重要特性上存在本质差别 ,如果能做进一步的工作 ,将为动物支原体及植原体致病机理和进化关系提供证据。

## 参 考 文 献

- 朱新产 ,张涌 ,廖祥儒 ,1998. PCR 技术战略. 生物技术通报 3 :29 ~ 33
- Kirkpatrick B C ,Stenger D C ,Morris T J ,1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic ,mycoplasma\_like organism. *Science* ,**238** :197 ~ 200
- Lee I M ,Hammond R W ,Davis R E ,Gundersen D E ,1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* ,**83**( 8 ) :834 ~ 842
- Lim P ,Sears B B ,1989. 16S rDNA sequence indicates that plant\_pathogenic mycoplasma\_like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology* ,**171**( 11 ) :5901 ~ 5906
- Numba S ,Kato S ,Iwanami S ,Oyaizu H ,Shiozawa H ,Tsuzhizaki T ,1993. Detection and differentiation of plant\_pathogenic mycoplasma\_like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* **83**( 7 ) :786 ~ 791

( 本文责任编辑 :王美林 )