

家蚕蛹线粒体 DNA EcoR I 1.9kb 片段的克隆及序列分析

沈兴家 赵巧玲 张志芳* 李奕仁 何家禄

(农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018)

摘 要 克隆了二化性家蚕蛹体的线粒体 DNA EcoR I 酶解 1.9kb 片段, 并进行了序列测定。结果表明: 克隆片段中包含完整的线粒体赖氨酸转移 RNA (tRNA-Lys) 基因、天冬氨酸转移 RNA (tRNA-Asp) 基因、ATP 合酶亚基 VIII 基因和细胞色素 C 氧化酶亚基 II、ATP 合酶亚基 VI 基因的部分序列。并与果蝇线粒体 DNA 的同源性和参照果蝇线粒体 DNA 密码子翻译的氨基酸顺序进行了比较, 由 tRNA 的一级结构推断出可能的二级结构模型。

关键词 家蚕 线粒体 DNA 序列分析

自 1963 年 Nass 等证明动物线粒体 DNA 与核 DNA 有所不同后, 有关 mtDNA 的结构、组成、复制、转录、基因表达、调控的研究以及 mtDNA 的进化及其在进化生物学和分类学中的应用研究受到了广泛的重视^[1]。家蚕是起源于我国的一种重要的经济昆虫, 进行家蚕线粒体 DNA 的克隆及序列测定, 对研究家蚕的起源和演化、性状的遗传以及分子育种等都具有重要的意义。目前, 已研究构建了二化和多化性家蚕品种 mtDNA 的限制酶图谱^[2], 但家蚕 mtDNA 的克隆和序列分析至今未见报道。本研究通过对家蚕 mtDNA 的酶解, 克隆到 1 个 EcoR I 1.9kb 片段, 并进行了序列测定。

1 材料与方法

1.1 蚕品种与试剂

家蚕品种秋丰由中国农业科学院蚕业研究所保存; 克隆用的质粒载体为 pSK(+)(Amp^R), 宿主菌为 *E. coli* JM109, 均由农业部家蚕生物技术重点开放实验室保存; 主要试剂 EcoR I、Xba I、BamH I、T4DNA 连接酶及其他主要试剂购自 Gibco BRL 公司。

1.2 家蚕 mtDNA 的提取

参照文献[3]方法, 并作改进。1g 鲜蚕蛹加 10mL 冷抽提液 (0.25mol/L 蔗糖、10mmol/L EDTA、30mmol/L Tris pH7.5), 冰上充分研磨; 用双层脱脂纱布过滤于 50mL 离心管, 700g, 4℃离心 2min; 上清转移到 1.5mL 离心管, 12 000g, 4℃离心 10min; 去上清, 沉淀用 150 μ L 10mmol/L Tris-EDTA 缓冲液 (10mmol/L Tris pH8.0, 10mmol/L EDTA, 0.15mol/L NaCl) 重新悬浮, 室温 15min; 加溶液 II (0.2mol/L NaOH, 1% SDS) 300 μ L、氯仿 150 μ L, 轻轻振荡混

* 通讯作者。

收稿日期 2000-01-14

匀,冰上 10min;加溶液 III(4V 5mol/L KAc 加 IV 10mol/L HAc)450 μ L 混匀,冰上 10min,12 000g,4 $^{\circ}$ C 离心 5min;上清转移到新管,加 450 μ L 异丙醇,混匀,室温 10min,12 000g,4 $^{\circ}$ C 离心 5min;去上清,沉淀溶于 250 μ L TER 溶液(1 $\times$ TE pH8.0,含 20 μ g/mL RNase),室温 20min;用酚、氯仿各抽提 1 次;加 300 μ L 沉淀缓冲液(异丙醇加 KAc),室温 20min,12 000g,4 $^{\circ}$ C 离心 5min;去上清,75%乙醇洗沉淀 1 次,减压抽干,溶于适量 1 $\times$ TE pH8.0,-20 $^{\circ}$ C 保存备用,并进行酶切鉴定。

1.3 家蚕 mtDNA 片段的克隆

EcoRI 分别酶解家蚕 mtDNA 和质粒 pSK(+)(Amp^R),经 T4 DNA 连接酶连接后,转化大肠杆菌 JM109。

1.4 重组体 DNA 的筛选与测序

在转化的 LB(含 Amp.)的平板上随机挑取单菌落接种于 LB 液体培养基。采用 Erik Beuken 等的方法,按 DNA 分子量的一步筛选重组体 DNA,并对重组体 DNA 进行酶解鉴定,选择目标克隆。EcoRI 1.9kb 片段克隆到 pSK 的重组质粒的菌株大量培养后,抽提 DNA 用于测序。由上海基康生物技术有限公司测序,序列分析在 PC 机上完成。

2 结果与分析

家蚕 mtDNA 分子量为 15.0kb,基因组共有 5 个 EcoRI 酶解位点,完全酶解时产生 5 个片段,分别为 5.6、5.2、2.0、1.9、0.3kb。对提取的 DNA 用 EcoRI 酶解,以 λ DNA/Hind III 为分子量对照,获得与上述相同的结果,表明提取的是家蚕 mtDNA,且达到酶解要求的纯度。

根据家蚕 mtDNA 限制酶图谱,EcoRI 1.9kb 片段中有一 XbaI 切点;质粒 pSK 也有一 XbaI 切点,用 XbaI 酶解重组质粒 DNA 时产生 2 条带,证明克隆的片段确系家蚕 mtDNA EcoRI 1.9kb 片段(图 1、2)。

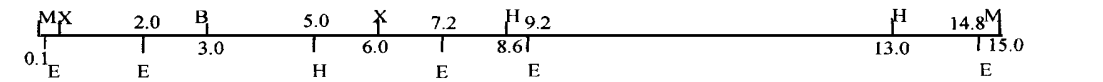


图 1 家蚕 mtDNA EcoRI 酶解示意图(线形)

E. EcoRI X. XbaI H. Hind III B. BamHI M. 原点



图 3 家蚕 mtDNA COX2 基因部分序列及其与果蝇 mtDNA COX2 基因的比较

BmATP8 ATACCTCAAATAATACCTATTAATTGAATTTTTCTTATTTTTTTTTATTGCAATTTT
DmATP8 ATTCCACAAATAGCACCTATTAGATGATTATTATTATTTATTTTTCTATTACATTT

TTAATTTTTAATATCATAAAATTACTTCATTTATGAAAAAAAATACATCTTATTAATAAA
ATTTTATTTTGTTCTATTAACATTATCTTATATACCAAATTCACCTAAATCTAATGAA

TTTAACCAAAAAAAAAAATTAACTTTTAATTGAAATGATAA
TTAAAAATATCAACTTAAATTCAATAAATTGAAATGATAA

BmATP6 ATGATAACAAACTTATTTTCTATTTTGACCATCAACAAATTTAATAAATTACCAATAAA
DmATP6 ATGATAACAAATTTATTTTCTGTATTTCGACCCCTTAGCTATTTTAATTTTCACTTAAT

TTGAATTAGAACAATTTAGGATTATTATTATTCGGATAGATTTGGATTAATCCCAAATCG
TGATTAAGAACATTTTATAGGACTTTTAATAATTCGTCATTTATTGATTAATACCTTCT

ACATTATTATATGAAATTCATTCAAAAAATT ...
CGTTACAATATTATATGAAATTCATTTTATT ---

图 7 家蚕 mtDNA ATP8、ATP6(部分)基因序列及其与果蝇 mtDNA ATP8、ATP6 基因的比较

3 讨论

本研究以二化性家蚕蛹为材料,对 mtDNA 的提取方法进行了改进,并克隆了 EcoR I 1.9kb 片段,从测序结果推定了 tRNA-Lys、tRNA-Asp、ATP 合酶亚基 VIII 基因和细胞色素 C 氧化酶亚 II、ATP 合酶亚基 V 基因等,可为家蚕线粒体 DNA 的研究提供参考。

参 考 文 献

1 张方,米志勇. 动物线粒体 DNA 分子生物学研究进展. 生物工程进展, 1998, 18(3): 25~31
2 凌建华,王斌,陈元霖. 家蚕蛹线粒体 DNA 限制酶图谱初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32(增刊 1): 33~39
3 Koichiro Tamura et al. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by the ackalinolysis procedure. Biochemical genetics, 1988, 26(11/12): 815~819

Cloning and Sequence Alignment of EcoR I 1.9kb Fragment of Silkworm Mitochondrial DNA

Shen Xingjia Zhao Qiaoling Zhang Zhifang Li Yiren He Jialu

(Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018)

Abstract Mitochondria DNA (mtDNA) extracted from bivoltine silkworm pupae was digested by EcoR I into five restriction fragments, of which the 1.9kb fragment was cloned and sequenced. The results showed that this cloned fragment contains complete genes of tRNA-Lys, tRNA-Asp, ATP synthase F0 subunit 8, and partial genes of cytochrome C oxidase subunit 2 and ATP synthase F0 subunit 6. And the homology of these genes were compared with that of fruitfly, *Drosophila melan-gaster* mtDNA, and the amino acid sequence as well. Moreover, the possible secondary structures of tRNA-Lys and tRNA-Asp were deduced.

Key words *Bombyx mori* Mitochondrial DNA Sequence analysis