

蓖麻蚕线粒体基因组中 *nd1* 及其侧翼 tRNA 基因的克隆与结构分析^{*}

沈兴家 赵巧玲 张志芳^{*} 李奕仁 何家禄

韦波

(中国农业科学院蚕业研究所, 农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 镇江 212018) (广西壮族自治区蚕业技术推广总站)

摘 要 按 Koichiro Tamura 等(1988)的方法制备出蓖麻蚕线粒体 DNA, 用 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶解后, 以 pSK(+)(Amp^r)为载体进行克隆, 获得 1 个 3.3 kb 的克隆片段。测序结果表明, 所测序列包括部分 16S rRNA、完整的 tRNA-Leu, *nd1* 和 tRNA-Ser 基因。其中 16S rRNA(3'端部分)、*nd1* 基因与家蚕具有很高的同源性。同时以 *nd1* 基因为依据构建了 17 种动物的分子进化树, 显示出蓖麻蚕与家蚕、野蚕有最近的演化关系。根据 tRNA-Leu 和 tRNA-Ser 基因的一级结构, 推定了可能的二级结构, 并与家蚕进行了比较。

关键词 蓖麻蚕 线粒体 DNA 测序 基因

动物线粒体基因组约为 15~20 kb, 拷贝数多(每个细胞 1 000~10 000 拷贝), 适合于限制性核酸内切酶操作, 而且其碱基替代率比核 DNA 快 5~10 倍, 即进化速率快, 是研究真核生物分子遗传学和发育生物学的一种重要的模式体系, 被广泛地应用于生物进化的研究^[1]。近年来, 动物线粒体基因组研究进展迅速, 至今已对约 70 多种动物的线粒体 DNA 的全序列进行了测定, 其中包括果蝇、蚊子、蜜蜂、蝗虫和家蚕等昆虫^[2]。蓖麻蚕作为一种重要的绢丝昆虫之一, 又与家蚕同属于鳞翅目, 研究其线粒体基因组对研究家蚕分子遗传学和进化及其与家蚕的关系都具有一定的意义。凌建华等^[3]已研究构建了蓖麻蚕 mtDNA 的限制酶图谱, 魏兆军等^[4]已有蓖麻蚕线粒体基因序列发表。

动物线粒体基因组有 13 个蛋白质或亚基基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 1 个 D 环。蛋白质基因包括细胞色素 b 基因(*cytb*)、细胞色素 c 氧化酶的 3 个亚基基因(*cox1*、*cox2*、*cox3*)、NADH 氧化还原酶的 7 个亚基基因(*nd1*、*nd2*、*nd4*、*nd4L*、*nd5*、*nd6*)、ATP 合酶的 2 个亚基基因(*atp6*、*atp8*), 它们都是线粒体内膜上呼吸链的组分, 参与能量代谢。本文采用 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶解蓖麻蚕线粒体 DNA (ScmtDNA), 克隆到 1 个约 3.3 kb 片段, 其中包括

nd1 及其侧翼 tRNA-Leu 和 tRNA-Ser 等基因, 并进行了基因结构和分子进化分析。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

实验所用的蓖麻蚕品种为“花蓝”, 克隆载体 pSK(+)(Amp^r)和宿主菌 *E. coli* Jm109, 均由农业部家蚕生物技术重点开放实验室保存; 其它试剂购自 Gibco BRL 公司。

1.2 蓖麻蚕 mtDNA 的提取

参照 Koichiro Tamura 等^[5]和沈兴家等^[6]的方法, 抽提蓖麻蚕线粒体 DNA, -20℃保存备用。

1.3 蓖麻蚕 mtDNA 3.3 kb 片段的克隆

用 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶解蓖麻蚕 mtDNA 和质粒 pSK(+)(Amp^r), 经 T4 DNA 连接酶连接后, 转化大肠杆菌 Jm 109, 转化混合物于含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上 37℃培养过夜。

1.4 重组体 DNA 的筛选、鉴定

在转化的 LB 平板上随机挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃摇床培养 8~10 h。采用 Erik Beuken 等^[7]的方法, 按 DNA 分子量的大小一步筛选重组体 DNA, 并对重组子进行酶解鉴定。

1.5 测序

含目标克隆的重组质粒经大量培养后, 抽提 DNA 用于第 1 次测序; 根据前一次测序结果, 设计

^{*}通讯作者。

收稿日期 2002-05-27

新的引物,采用 Primer-walking 法测序。测序由上海基康生物技术有限公司进行。序列分析采用 Dnas-tar 软件分析。

2 结果与分析

2.1 蓖麻蚕 mtDNA 3.3 kb 片段的克隆

对重组子 DNA 用 *Eco*RI 和 *Xba*I 分别进行单酶解和双酶解,结果单酶解时都只有 1 条带,双酶解时有 2 条带,说明克隆的片段为蓖麻蚕 mtDNA 经 *Eco*RI 和 *Xba*I 双酶切产生,而且其两个末端分别为 *Eco*RI 和 *Xba*I 酶切末端。

2.2 蓖麻蚕 mtDNA 3.3 kb 片段的序列分析

2.2.1 蓖麻蚕 mtDNA 3.3 kb 片段序列及其因组成
通过测序获得 1 857 bp 的碱基序列。经 Blast 在线检索比较,发现所测序列与家蚕、果蝇等的 *nd1*、

16S rRNA 基因序列具有较高的同源性。采用 Dnas-tar 软件分析比较,推定所得序列包括:16S rRNA (~723 bp)、tRNA-Leu(UUA) (726 ~ 797 bp)、*nd1* (789 ~ 1 718 bp)、tRNA-Ser(AGU) (互补链,1 719 ~ 1 784 bp) 基因(图 1)。

2.2.2 16S rRNA 基因 测得 723 bp 的蓖麻蚕 mtDNA 16S rRNA 部分序列(5' 端不全),其 A+T 的含量为 77.46%,与家蚕线粒体 16S rRNA 相应序列的同源性达 78.5%,表明该基因有较高保守性。

2.2.3 *nd1* 基因 蓖麻蚕 mtDNA *nd1* 为完整的基因,序列长度为 930 bp,比家蚕线粒体 *nd1* 基因短 15 bp,编码 309 个氨基酸,起始密码子为 ATA,终止密码子为 TAA,与家蚕相同。A+T 的含量为 76.56%,与家蚕、果蝇和蝗虫等无脊椎动物相近,但明显高于脊椎动物(表 1)。

```
1 GAATTCGGCAAAAATTTATATTCACCTGTTTATCAAAAACATGCTTTTTGTTAATAATTTAAAGTCTAATCTGCCCACT
81 GATGTAATATTGAAGGGCTGCAGTATTTGACTGTACAAAGGTAGCATAATCATTAGTCTCTTAATTGGTGACTGTATG
161 AAGGATTGGATGAGATATAAGCTGTCTTGATAATATTTAATTGAATTTAATTTTTATTTAAAAAGTTAAATAATTTAA
241 AAAGACGAGAAGACCCATAGAGTTTTATATTAAATTAAATTAAAATTATTTATATAATTATTAATATAGATTTAATTTT
321 AGTATTTTGTGGGGTGACAAAAAATAAATAAACTTTTTTTATTATTTACATAAATAAATGAATTTTTGATCCAATTT
401 TATTGATTAAAAGAAAAAATTACCTTAGGGATAACAGCGTAATTTTTTTTTTAGTTCTTATAAGAAAAAAGTTGCGA
481 CCTCGATGTTGGATTAAGATAAAATTTAAATGCAAAAGTTTAAATTTTTGATCTGGTCGATCATTAAATCTTACATGA
561 TCTGAGTTCAAACCGGTGAAGCCAGGTGGTTTCTATCTTTAAAAATTTAATATTTTAGTACGAAAGGATTGAATAT
641 TATAATTAAATTAATATTAGGAATTTATTAATTTTTTTTATTCAAGTAAAAAATTAAATGGAAGGCTATTTGGC
721 AGAAAAATGTGATGATTTTAGAAGTCATGAATGTATAATTTATTATATAGATAGTATAATGTATATAATAGATTTATAT
801 TTGATTTTTATTGGATTATTAATTTAATTGTTGGGGTAATAGTAGGAATTGCTTTTTTGACTTTATTAGAGCGTAAAGT
881 ATTAGGTATATTCAAATTCGTAAAGGGCCTAATAAGTTAGGTATAGTTGGGTATTACAACCTTTTCTGATGGTATTA
961 AATTATTTACGAAAGAACAACCTTATCCTAATTATTCAAATTATTTTGTATTATTTTCTCCGGAGTTAGTTTTTTTA
1041 ATATCTTTATTAATTTGGATATTAATTCCTATTATTTTAATATAGGTAGGTTAATTTAGGAGTTTATTTTTTTTTTG
1121 TAGGATTAGGTTAGGTGTTTATACAGTTATAATTGCTGGTGATCTCTCAAATCTAATTATGCTTTATTAGGGGGATTAC
1201 GAGCGGTAGCTCAAACAATTTCTTATGAAGTAAGATTAGCTTTAATTTTTATATCTAGTTTATTAATAATTATAGATTTT
1281 AATTTTTGGATATTTTTTAAATATCAAAAATAATTTGATTTATTTTTTTCATATTTCTTTATCTTTGTGTTGGGTTTC
1361 TTCAATAATGGCTGAAACTAATCGTACTCCTTTTGACTTTGCTGAAGGGGAGAGAGAGTTAGTATCAGGGTTAATGTAG
1441 AATATAGAAGAGGAGGTTTTGCTTTAATTTTTTTAGCAGAATATTCTAGTATTTTATTATAAGATTTTTATTGTTTTTA
1521 GTTATTTAGGGGTTATGTTTTAAATTTAATATTTTATTTAAATTAACTTAATTTCTTTTTATTATTATTTGGATTTCG
1601 AGGAACATTACCTCGTTATCGTTATGATAAGTTAATATATTTAGCTTGAATAGGGTATTACCTGTTGCTTTAAATTTT
1681 TATTATTATTTATAGGAATTAATTTTTTTAATATAAATGAATTATTTTAGTATAATTTAAATTAATAGAATAAGTT
1761 ATTCTTTCTTAAGTTTTCAAACAATGCTTTTAAAGCTTATTAATTAATAATTTATTTATGGATAAAAGTTGGTCTC
1841 AATAAATCTAATTAATTA
```

图 1 蓖麻蚕 mtDNA 3.3 kb 片段部分序列

表 1 蓖麻蚕及其它物种线粒体 *nd1* 基因大小和碱基组成

Table 1 The size and base composition of *nd1* genes from ScmtDNA and other 16 animal species

物种 Species	GenBank 登录号 Accession no.	代号 Code name	序列长度 Length	起始密码子 Initiator	终止密码子 Terminator	A+T 含量(%) (A+T)%
蓖麻蚕 <i>Samia cynthia ricini</i>	/	ScND1	930	ata	taa	76.56
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	NC002355	BmND1	945	ata	taa	79.15
野桑蚕 <i>Bombyx mandarina</i>	NC003395	BmaND1	945	ata	taa	78.94
雅库巴果蝇 <i>Drosophila yakuba</i>	NC001322	DyND1	975	ata	taa	78.97
黄星星果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	NC001709	DmND1	939	ata	atg	77.74
螺旋锥蝇 <i>Cochliomyia hominivorax</i>	NC002660	ChND1	939	ata	taa	76.14
蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	NC001566	AmND1	918	att	taa	83.01
东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	NC001712	ImND1	924	ata	taa	75.80
四斑按蚊 <i>Anopheles quadrimaculatus</i>	NC000875	AqND1	945	att	taa	75.98
冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	NC002084	AgND1	945	ata	taa	76.61
斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	NC002184	PmND1	939	ata	taa	70.29
寄居蟹 <i>Pagurus longicarpus</i>	NC003058	PIND1	945	atg	taa	71.43
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NC001323	GgND1	975	atg	taa	52.51
鲸 <i>Balaenoptera musculus</i>	NC001601	BamND1	957	atg	taa	58.20
绵羊 <i>Ovis aries</i>	NC001941	OaND1	957	atg	taa	59.46
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NC001665	RnND1	957	gtg	tag	57.48
矮小猩猩 <i>Pongo dygmaeus</i>	NC001646	PdND1	902	atg	taa	52.46

对蓖麻蚕线粒体 *nd1* 基因与上述 16 种动物线粒体 *nd1* 基因序列采用 Clustal 软件分析, 结果显示各物种 *nd1* 基因的差异主要在 3' 末端和 5' 末端, 而中间部分约 870 bp 的保守性很高, 推测与基因翻译产物 ND1 的活性部位有关。蓖麻蚕 *nd1* 基因与家蚕 *nd1* 基因核苷酸序列的同源性达 77.2%, 氨基酸序列的同源性为 73.9%。

2.2.4 tRNA 基因 和其它动物一样, 蓖麻蚕 mtDNA *nd1* 基因的两侧各有 1 个 tRNA 基因, 其中 tRNA-Leu(UUA) 基因由 72 个碱基组成, 与家蚕线粒体 tRNA-Leu(CUA) 的同源性仅为 32.09%; 蓖麻蚕 tRNA-Ser(AGU) 基因由 66 个碱基组成, 与家蚕线粒体 tRNA-Ser(UCA) 的同源性为 50.0%。根据它们的核苷酸序列并与家蚕线粒体对应的 tRNA 基因比较, 推定其二级结构如图 2 所示, 它们都为典型的三叶草形。从结构上看, 不论是家蚕还是蓖麻蚕 tRNA-Leu, 各臂的碱基对比率都很高, 稳定性好; 而蓖麻蚕 tRNA-Ser(AGU) 的二级结构中, 碱基错配比率高, 稳定性不及家蚕线粒体 tRNA-Ser(UCA)^[8]。

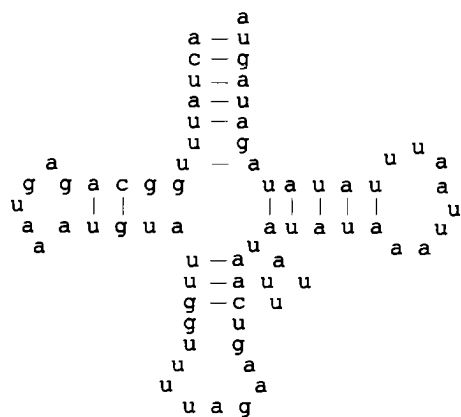
2.3 基于线粒体 *nd1* 基因的分子进化分析

依据线粒体 *nd1* 基因的核苷酸序列, 对表 1 所

列 17 种动物进行分子系统演化分析, 从系统演化树(图 3)可以看出: 无脊椎动物和脊椎动物门是最早分歧的两个系统; 昆虫纲的鳞翅目、直翅目和双翅目与甲壳纲(斑节对虾、寄居蟹)合为一支, 与昆虫纲膜翅目的蜜蜂并列; 蜜蜂在分子系统树中的地位有些特殊, 其线粒体 *nd1* 基因与包括昆虫纲在内的其它动物的 *nd1* 基因的同源性都比较低, 在 34.6%~58.2% 范围内; 蓖麻蚕与同属于鳞翅目的家蚕和野蚕演化关系最近, 是最近分歧演化的两个分支。

3 讨论

本研究克隆了蓖麻蚕线粒体 3.3 kb 片段, 并进行了部分测序和基因结构的初步分析。已测序列包括 16S rRNA 基因的 3' 端和完整的 tRNA-Leu(UUA)、*nd1*、tRNA-Ser(AGU) 基因。16S rRNA 基因和 *nd1* 基因与家蚕对应基因的同源性达 77.2%, 说明 16S rRNA、*nd1* 基因具有较高的保守性, 蓖麻蚕与家蚕具有较近的亲缘关系。以 *nd1* 基因序列为基础构建的包括无脊椎动物门的昆虫纲、甲壳纲和脊椎动物门的哺乳纲等 17 种物种分子进化树, 显示了这些物种的演化关系, 其中蓖麻蚕与家蚕遗传距离最短, 是



最近分歧演化的两个分支;但是膜翅目的蜜蜂比较特殊,它与昆虫纲其它目的亲缘关系比与甲壳纲的关系远,与魏兆军等^[4]以蓖麻蚕线粒体 *cox3* 为基础的分析结果相同。动物线粒体基因组蛋白质基因中, *cytb* 和 *cox1*、*cox2*、*cox3* 等基因最保守,同源性达 80% 左右;而 *nd1*、*atp6* 和 *atp8* 等基因的变异相对较大。因此,对蓖麻蚕的进化分析宜在 *cox*、*cytb* 基因测序完成后进行。

另外,蓖麻蚕线粒体 tRNA-Leu 和家蚕的同源性,与其它动物 tRNA-Leu 基因高度保守的情况相反,而且反密码子也与家蚕不同;与具有相同反密码子的家蚕 tRNA-Leu 比较,同源性也很低。原因有待于进一步研究。

参 考 文 献

1 张亚军,施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况(J). 动物

学研究, 1992, 13(3): 289~298

2 张方,米志勇. 动物线粒体 DNA 分子生物学研究进展(J). 生物工程进展, 1998, 18(3): 25~31

3 凌建华,陈元霖. 蓖麻蚕线粒体 DNA(mtDNA)限制酶图谱(J). 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32(5): 641~646

4 魏兆军,赵巧玲,张志芳,等. 蓖麻蚕线粒体基因组细胞色素氧化酶亚基 III 的序列及其分子进化分析(J). 昆虫学报, 2002, 45(2): 193~197

5 Koichiro Tamura, T Aotsuka. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure(J). Biochemical genetics, 1988, 26(11/12): 815~819

6 沈兴家,赵巧玲,张志芳,等. 家蚕线粒体 DNA *EcoRI* 1.9 kb 片段的克隆及序列分析(J). 蚕业科学, 2000, 26(2): 87~90

7 Erik Beuken, Cornilis Vink, Cathrien A. Bruggenman. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size(J). Biotechniques, 1998, 24(5): 746~750

8 廖顺尧,刘运强,鲁成,等. 家蚕线粒体基因组 1.8 kb 片段的克隆及序列分析(J). 蚕业科学, 2002, 28(1): 26~30

Cloning and Analysis of Structure of *nd1* and its Connected tRNA Genes of Mitochondrial Genome From Eri Silkworm *Samia cynthia ricini*

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)

Wei Bo

(General Extending Station of Sericultural Technology, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530007)

Abstract Mitochondrial DNA of eri silkworm *Samia cynthia ricini* (ScmtDNA) was prepared with the method of Koichiro Tamura et al (1988) and was doubly digested by *EcoRI* and *Xba I*. And a 3.3 kb restriction fragment was cloned into pSK(+) (Amp^r) vector and sequenced. The results showed that the sequenced part of this clone contains partial 16S rRNA, complete genes of tRNA-Leu, *nd1* and tRNA-Ser. Of which 16S rRNA and *nd1* gene has high homology with those of *Bombyx mori*. A phylogentic tree of 17 animal species was constructed based on *nd1* gene sequences. The tree indicated that *Samia cynthia ricini* has closest relationship with *Bombyx mori*. Meanwhile the possible secondary structures of tRNA-Leu and tRNA-Ser genes of *Samia cynthia ricini* were deduced according to these sequences and compared to *Bombyx mori*.

Key words *Samia cynthia ricini* Mitochondrial DNA Sequencing Gene