

家蚕线粒体基因组 *EcoR* I 2.0kb 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 对家蚕线粒体基因组 *EcoR* I 2.0kb 片段进行了克隆和序列分析, 结果表明该片段包含完整的丝氨酸转移 RNA 基因、NADH 氧化还原酶亚基 I 基因、细胞色素氧化酶 b 亚基基因的部分序列。与果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 mtDNA 进行了同源性比较, 并根据无脊椎动物线粒体基因组密码子表, 推定氨基酸序列。

关键词 家蚕 线粒体 DNA 序列分析

前报^[1]已克隆了家蚕线粒体基因组 *EcoR* I 1.9kb 片段, 序列分析发现含完整的赖氨酸转移 RNA、天冬氨酸转移 RNA、ATP 合酶 FO 亚基 VIII 基因序列以及细胞色素 C 氧化酶 II 亚基和 ATP 合酶 FO 亚基 VI 基因的部分序列。本研究对家蚕线粒体基因组 *EcoR* I 2.0kb 片段进行了克隆和序列分析, 结果表明该片段包含细胞色素氧化酶 b 亚基、丝氨酸(UCA)转移 RNA、NADH 氧化还原酶亚基 I (*ND1*)等基因, 其中丝氨酸转移 RNA 为完整的基因。

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、*Hind* III、T4DNA 连接酶及其它主要试剂购自 GibcoBRL 公司, GeneClean Kit 购自 Promega 公司。

1.2 DNA 抽提方法

前报^[1]制备的 DNA 中混有的蛋白质量过多, 因此本实验对线粒体 DNA 的提取步骤作了改进, 用碱法抽提到加溶液 III 并离心去掉蛋白质, 后续步骤参照 GeneClean 试剂盒的方法进行^[2], 上清移到新管加入 3 倍体积的 6mol/L NaI 混匀, 加入适量 (> 10⁴μL) 玻璃奶 (glassmilk), 充分混匀, 冰上置 10~15min, 2~3min 摇匀 1 次; 10 000r/min 离心 20s, 去上清, 加 50 倍体积的 New Wash 溶液悬浮沉淀, 再离心, 重复洗涤 3 次; 用滤纸吸干残液滴, 40℃左右荫干 10min; 2 倍玻璃奶体积的 0.1×TE 溶解, 40℃置 5min, 10 000r/min 离心 2min; 小心吸取上清即 mtDNA 溶液, -20℃保存备用。

* 通讯作者。

收稿日期 2000-02-06

克隆和重组体 DNA 的筛选等参照文献 [3] 的方法。

2 结果与分析

对上述方法提取的家蚕 mtDNA 用 *Eco*RI 酶解后电泳, 结果与凌建华等^[4] 报道的相同, 并与前报^[1] 结果一致。将家蚕 mtDNA 的 *Eco*RI 2.0kb 片段克隆于 pSK 载体的 *Eco*RI 位点, 得到质粒 pSKmtDNA *Eco*RI 2.0kb 重组体^[5]。

由家蚕 mtDNA 的 *Eco*RI 酶解图谱可见, 在 *Eco*RI 2.0kb 片段中有 1 个 *Hind* III 切点, 而质粒载体 pSK 的多克隆位点上也有 1 个 *Hind* III 位点, 因此当用 *Hind* III 酶解家蚕 mtDNA/*Eco*RI 2.0kb 片段与 pSK/*Eco*RI 的重组体 DNA 时应产生 2 条带。家蚕 mtDNA 的 *Eco*RI 2.0kb 片段的 *Hind* III 酶解结果证明本次克隆到的是家蚕 mtDNA/*Eco*RI 2.0kb 片段(图 1)。

根据 pSKmtDNA *Eco*RI 2.0kb 质粒的部分测序结果, 查阅美国基因库 (GeneBank) 并与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 mtDNA 序列 (序列号: 11441~11634) 相比较, 推定该片段包含部分细胞色素 b 基因 (Cytb), 5' 端不全, 以 TAA 为终止密码; 该部分序列与果蝇线粒体 DNA 相应基因的同源性为 70.39%, 翻译产物氨基酸顺序与果蝇的相似性为 62.69% (图 2)。BmCytb 比 DmCytb 在 189~191 位多了 TTT 3 个碱基和在 3' 端多了 AAAAAAAAAA 9 个碱基及对应的氨基酸顺序 F 和 KKK^[6]。

紧接着细胞色素 b 基因后 207~209bp 有 1 个“TTA”, 其功能不详。210~275bp 为丝氨酸 (UCA) 转移 RNA 基因 (tRNA-Ser), 根据其一级结构, 推出其可能的三叶草型的二级结构(图 3)。按照它与果蝇线粒体 DNA 对应的 tRNA-Ser (UCA) 基因 (序列号: 11637~11702) 的三叶草型的二级结构分析, 两者的同源性为 78.39%, 这不同于一般脊椎动物的 tRNA-Ser 基因变异较大的特点。

在丝氨酸 (UCA) 转移 RNA 基因后面有一段序列 (TTTATTAATACTAAAAATATTACAA) 功能不详, 可能为一调控序列; 果蝇 mtDNA 也有一段与之相对应的序列 (TTACTTAAAAAAATTCA)。

接下来的序列为由互补链编码的 NADH 氧化还原酶亚基 I 基因 (ND1), 5' 端不全, 由 TAA 密码子终止。这部分序列与果蝇 (序列号: 11720~12076) 的同源性为 71.42%, 翻译产物的氨基酸顺序与果蝇 mtDNA 基因的相似性为 66.95% (互补链见图 4)。但在 3' 端比果蝇少了 9 个碱基。

上述基因在家蚕线粒体基因组中的排列顺序与果蝇一致。

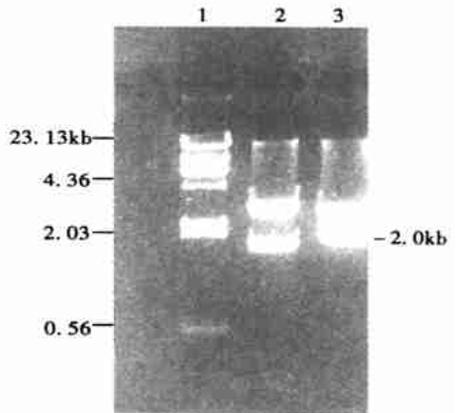


图 1 克隆片段的鉴定

1. λ DNA/*Hind* III (Marker)
2. 重组体 DNA/*Hind* III
3. 重组体 DNA/*Eco*RI

BmCytb GAATTCAATTTTATCCAATTAATCAAATTATTTTTTTGAATATTCTTAGTAATTATAATTTTATTA
 DmCytb GGATTCAATTTTATCCTATTAATCAAGTAATATTCTGATCTATATTAGTAACAGTAATTTTATTA
 ACATGAATCGGAGCCCGACCTGTAGAAAATCCATATATATTACAGGACAATTATTAACAATTATATATTTTTT
 ACTTGAATTGGAGCTCGACCAGTTGAAGAACCCTTATGTATTAATTGGACAAATTTAACTGTGTATATTTCTT
 ATATTTTTTTTTTAAATCCAATTATCGGAATATACTGAGATAAAATTTATTTAATAAAAAAATAA
 ATATTATTTAGTAAACCCATTAATTACAAAATGATGAGATAATTTATTA---AAT-----TAA

推定的氨基酸顺序:

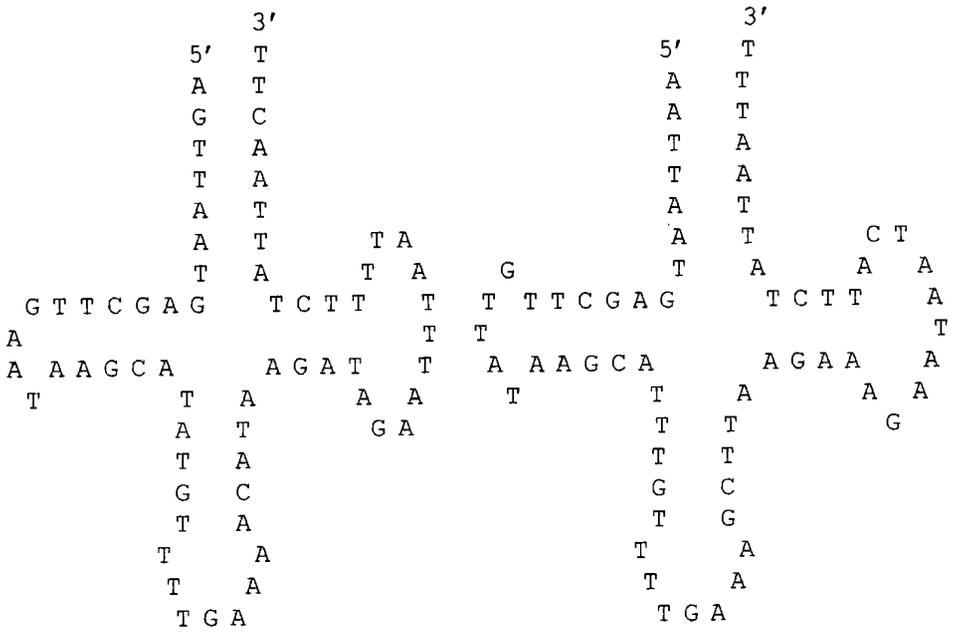
BmCytb IQFYPINQIIFWMFLVIMILLTWIGARPVENPYIITGQLLTIMYFLYFFLNPIIGMYWDKILENKKK
 DmCytb IQFYPINQVMFWSMLVTVILLTWIGARPVEEPYVLIGQILTVVYFLYLVNPLITKWDNLL N

图 2 家蚕 mtDNA Cytb 基因部分序列及其翻译产物的氨基酸顺序与果蝇的比较

Bm tRNA-Ser

AAFTAATGAGCTTGTATAAGCATTGTTTTGAAAGCTTAAGAAAGAAT-AATCATCTATTAATTT

DmtRNA-ser



a. DmtRNA-Ser

b. BmtRNA-Ser

图 3 家蚕 mtDNA tRNA-Ser(UCA)基因一级结构及其转录产物可能的二级结构与果蝇 mtDNA 的比较

```

BmND1  GCTGAAACAAATCGAACTCCTTTTGATTTTGCTGAAGGTGAAAGAGAGTTAGTTTCTGGATTTAAT
DmND1  GCTGAAAGTAATCGGAATCCTTTTGATTTTGCTGAAGGAGAATCAGAATTAGTTTCAGGATTTAAT
ATTGAATATAGAAGAGGGGGATTGCTTTAATTTTTTTGGCTGAATATTCAAGTATTTATTTATAAGAATGA
GTAGAATATAGAAGAGGGGGTTTGGCTTTAATTTTTATAGCTGAATATGCGAGAATTTTATTTATAAGAATAT
TTTTAGTTATTATAAATATGGGCGGTTATAATTTAAGATTTTTTTTTTATTTAAAATTAAGATTAATTTCTTT
TATTTTGC GTTATTTTTTACCTTGTGATGTGTTAATTTATTAATTTATATAAAATTAACCTTTTATTTGTTT
TTTATTTATTTGAGTTCGTGGTACTTTACCTCGTTATCGTTATGATAAGTTAATATATTTAGCTTGAAAAAGA
TGTTTTTATTTGAGTTCGAGGAACCTTACCTCGATTTTCGTTATGATAAAATTAATATATTTAGCTTGAAAAATG
TATTTACCTATTTTCATTAATTTATTTATTATTTTATTATTTTAGGCTTAAAATTTTATTTATTT      TAA
TTTTTATCTTTTTCTTTAAATTTATTTATTATTTTATTGGGTTTAAAATTTTATTTATTTCTTTATTATAG

```

推定的氨基酸顺序:

```

BmND1  AETNRTPFDFAEGESELVSGFNIEYSSGGFALIFLAEYSSICFMSMILVIMNMGYNSLFF
DmND1  AETNRNPFDFAEGESELVSGFNVEYSSGGLALIFMAEYASILFMSMLFCVIFLPCDVFNLLI
      YLKLISLISFLFIWVRGTLPRYRYDKLMLYLAWSYLPISLNYLLFLGLKFYLF
      YMKLTFISFVFIWVRGTLPRFRYDKLMLYLAWKCFSLMYLFFIDFKILLFSL

```

图 4 家蚕 mtDNA *ND1* 基因部分序列及其翻译产物的氨基酸顺序与果蝇 mtDNA 的比较

3 讨论

克隆的家蚕 mtDNA *EcoRI* 2.0kb 片段包含了细胞色素氧化酶 b 亚基 (*Cyb*)、丝氨酸 (UCA)tRNA (tRNA-Ser)、NADH 氧化还原酶亚基 I (*ND1*) 等基因。

Cyb 基因只有 3' 端部分序列, 3' 末端尾家蚕比果蝇多了 TTT 和 AAAAAAAA 序列, 终止密码都为 TAA; 两者的同源性较大, 达 70.39%, 因序列不完整, 实际两者的同源性会有所出入。在脊椎动物中 *Cyb* 基因也是最保守基因之一。*Cyb* 基因是蛋白质基因, 该蛋白质是线粒体内膜呼吸链的组分。

tRNA-Ser 基因序列较短, 只有 69 个核苷酸, 与果蝇的同源性较大, 达 78.39%, 但推断的二级结构三叶草图型中反密码子臂的错配率较高。而在其他动物线粒体的 tRNA 基因中, tRNA-Ser 基因变异最大。例如人和牛的 tRNA-Ser 基因只有 62 和 63 个核苷酸, 形成的二叶草结构缺少 D 环和 D 臂。脊椎动物线粒体间的 tRNA-Ser 基因 (AGY) 同源性只有 54%~64%。在果蝇线粒体 DNA 中编码丝氨酸的密码较多, 有 8 个, 而 tRNA-Ser 只有 2 个, 因此在 tRNA-Ser 与反密码子之间必须采用“三读二”的办法。这样有可能导致了 tRNA-Ser 基因的高度变异性。家蚕线粒体 DNA 中 tRNA-Ser 与果蝇的同源性较高, 达 78.39%, 这不同于其它动物线粒体的 tRNA 基因组中 tRNA-Ser 变异最大, 是昆虫界特有的现象还是家蚕与果蝇例外, 值得探讨。

ND1 基因是互补链编码, 由于 TAA 密码终止, 3' 端比果蝇少了 9 个核苷酸, 而果蝇以 ATG 密码终止, 两者的同源性较高, 为 71.42%。

保守的生物能量产生体系的关键酶 *ND1* 和 *Cyb* 基因在果蝇和家蚕间有相当的差异,说明线粒体 DNA 是研究昆虫进化的好素材。近几年研究发现,线粒体基因产物并不完全局限于线粒体中,例如线粒体编码的 *ND1* 蛋白作为一种组织相容性抗原,出现在小鼠细胞表面^[7],引起了人们的兴趣。完整的家蚕线粒体 DNA 序列正在测定中。

参 考 文 献

- 1 沈兴家,赵巧玲,张志芳,等. 家蚕线粒体基因组 *EcoR* I 1.9kb 片段的克隆及序列分析. 蚕业科学, 2000, 26(2): 87 ~ 90
- 2 promega 公司编. Protocols and applications guide. 第 3 版. 1996.
- 3 Erik Beuken, et al. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. Biotechniques, 1998, 24(5): 746 ~ 750
- 4 凌建华,王斌,陈元霖. 家蚕线粒体 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
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,等译. 北京: 科学出版社, 1996
- 6 Gene Bank. Acession: NC-001709, *Drosophila melanogaster* mitochondrio complete genome.
- 7 张方,米志勇. 动物线粒体 DNA 的分子生物学研究进展. 生物工程进展, 1998, 18(3), 25 ~ 31

Cloning and Sequenceing Analyses of *EcoR* I 2.0kb Fragment of Silkworm Mitochondrial Genome

Shen Xingjia Zhao Qiaoling Zhang Zhifang * Li Yiren He Jialu

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

Abstract In this study, *EcoR* I 2.0kb fragment of mitochondrial genome DNA (mtDNA) of silkworm was cloned and sequenced. The results showed that this cloned fragment contains the complete gene of tRNA-Ser, partial sequences of oxidoreductas NADH subunit I gene and cytochrome oxidase subunit b gene. The homologies of these genes were compared with that of fruitfly, *Drosophila melanogaster* mtDNA. The amino acid sequences were deduced according to the mitochondrial codon of invertebrate as well.

Key words *Bombyx mori* Mitochondrial DNA Sequencing