

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

魏兆军, 赵巧玲, 张志芳*, 肖庆利, 王章娥, 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: 测定了蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini* 线粒体基因组 (mtDNA) 含完整的细胞色素氧化酶亚基 III (COX3)、tRNA-Gly 和部分的 NADH 亚基 III (ND3) 基因的 DNA 片段序列。COX3 基因编码框包含 789 个核苷酸, 编码 262 个氨基酸的蛋白质。通过同源性比较, 发现 COX3 基因的 3' 端比 5' 端要保守, 其编码的蛋白在 C 端有两个保守序列存在。COX3 的下游为 66 bp 的 tRNA-Gly 基因。蓖麻蚕的 COX3 与家蚕 COX3 同源性最高, 核苷酸和氨基酸序列同源性分别是 80.2% 和 85.6%。根据 COX3 氨基酸序列进行了 12 种无脊椎动物的分子进化树分析, 认为在采用线粒体基因序列进行分子进化分析时, 应该综合考虑物种的繁殖模式及生态特点。

关键词: 线粒体 DNA; 蓖麻蚕; COX3 基因; 分子进化

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 02-0193-05

Characterization of the cytochrome oxidase subunit III gene of mitochondrial DNA from the eri silkworm, *Samia cynthia ricini*

WEI Zhao-Jun, ZHAO Qiao-Ling, ZHANG Zhi-Fang*, XIAO Qing-Li, WANG Zhang-E, HE Jia-Lu (Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: The cytochrome oxidase subunit III gene (COX3), tRNA-Gly gene and partial ND3 gene of the eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, were sequenced. The open reading frame of COX3 gene contains 789 nucleotides, encoding a putative protein of 262 amino acids. Comparison of the amino acid homology with COX3 genes of other eleven arthropods was made. The results showed that the conservation of C' termination was higher than N' termination in COX3, and there were two conservative regions in C' termination of COX3. The COX3 gene of mtDNA in the eri silkworm was most closely related to that of the silkworm *Bombyx mori*, with the homology of 80.2% nucleotide and 85.6% amino acid respectively. Based on the alignment of amino acid sequences deduced from the COX3 genes, a phylogenetic tree of the twelve invertebrates was constructed. It was proposed that when the molecular evolution is analysed based on mitochondrial genetic sequences, the reproduction pattern and ecological characteristics should be considered.

Key words: mitochondrial DNA; *Samia cynthia ricini*; COX3 gene; molecular evolution

动物线粒体基因组 (mtDNA) 中含细胞色素氧化酶三个亚基基因 (cytochrome oxidase subunit I, II, III, 缩写 COX1, COX2, COX3)、Cytb、ATP6、ATP8 等 13 个蛋白基因, 它们都是线粒体内膜呼吸链的重要组分。其中 COX1、COX2 和 COX3 最保守, 同源性达 80% 左右, 对其序列进行克隆和分析是研究远缘物种分子系统演化和分类的有效基因之一。Garcia-Machado 等 (1999) 通过比较龙虾

Panulirus argus 和 4 种昆虫的线粒体完整的 COX1 基因序列和部分的 COX2、COX3 序列, 认为甲壳纲与昆虫纲在分类上很接近。此外, 动物线粒体基因组按照严格的母性遗传方式传代, 分子量小, 拷贝数多, 其基因的碱基替代率比单拷贝的核 DNA 基因组快 5~10 倍, 其进化速率很快。因此, 线粒体基因组是研究真核生物分子遗传学、发育生物学和分子进化的一种重要的模式体系 (Brown, 1983)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970571)

第一作者简介: 魏兆军, 男, 1970 年 11 月生, 安徽肥东人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为蚕分子生物学, E-mail: weizhaojun@hotmail.com

* 联系作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 2001-04-21; 接受日期 Accepted: 2001-12-24

本实验根据蓖麻蚕 *Samia cynthia ricini* 线粒体基因组 DNA 的限制性内切酶图谱 (凌建华等, 1993), 进行了 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切的蓖麻蚕线粒体 DNA 基因组文库的构建, 并对含细胞色素氧化酶亚基 III (COX3) 及 tRNA-Gly 和 ND6 基因 N 端部分的 *EcoR* I 及 *Xba* I 片段进行了序列分析。通过检索 GenBank 的其他 COX3 序列, 进行了同源性和分子进化方面的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

蓖麻蚕品种为花篮; 克隆用的质粒载体为 pBluescript SK (+) (*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; 主要工具酶 *EcoR* I、*Xba* I、T4DNA 连接酶及其它主要试剂购自 Gibco BRL 公司。

1.2 方法

1.2.1 蓖麻蚕线粒体 DNA 的制备: 按沈兴家等 (2000) 报道的方法进行。

1.2.2 蓖麻蚕线粒体细胞色素氧化酶亚基 III 基因的克隆: 制备所得的 mtDNA 分别经 *EcoR* I 和 *Xba* I 完全酶切后, 低熔点凝胶回收其中的片段, 分别与经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶解的 pBluescript SK (+) 载体 DNA 进行连接、转化 (Sambrook *et al.*, 1995)。用酚:氯仿 (1:1) 一步法筛选重组子 (Beuken, 1998)。经酶切鉴定后, 双脱氧法进行序列测定。

1.2.3 线粒体细胞色素氧化酶亚基 III 基因的分子进化分析: 利用 Dnastar 软件对所克隆的基因的 DNA 序列按无脊椎动物线粒体基因组遗传密码进行阅读框分析、氨基酸序列的推定, 并利用 Clustal 软件与其它 11 种无脊椎动物 mtDNA 的 COX3 基因氨基酸进行同源性和分子进化的探讨。

2 结果与分析

2.1 蓖麻蚕线粒体细胞色素氧化酶亚基 III (COX3) 基因的核苷酸序列分析

对所克隆蓖麻蚕 mtDNA 的 *Xba* I - *EcoR* I 约 1.0 kb 片段进行测序分析, 测得序列长为 1 028 bp (GenBank Accession NO. AF288145) (图 1)。经 GenBank 的 Blast 检索, 18 ~ 806 bp 为细胞色素氧化酶

亚基 III (COX3) 基因, 809 ~ 874 bp 为 tRNA-Gly 基因, 878 ~ 1 028 bp 为 NADH dehydrogenase subunit III (ND3) 基因 5' 端的部分序列。

蓖麻蚕线粒体 COX3 基因前面的 1 ~ 18 bp 为线粒体 ATP 合成酶 Fo 亚基 6 的 3' 端部分, 其终止子 TAA 与 COX3 的 ATG 的 A 相重叠; 蓖麻蚕 mtDNA 的 COX3 基因编码框包含 789 个核苷酸, 编码 262 个氨基酸的蛋白质 (图 1); COX3 基因中 (A + T) 所占的比例为 71.99% 远远高于 (C + G) 的含量 (28.01%); 终止密码子为 TAA。COX3 的 3' 端下游只间隔 2 个碱基为 tRNA-Gly 基因, 长度为 66 bp, 按 Sprinzal 等划分线粒体基因 tRNA 二级结构的方法 (Sprinzal *et al.*, 1989), 推定了蓖麻蚕线粒体 tRNA-Gly 基因的二级结构, 与家蚕相比仅 A 变为 T, 变异发生在 D 环 (图 2); 与核 tRNA 的结构相比, 蓖麻蚕线粒体 tRNA-Gly 碱基数较少, 缺少可变频环。tRNA-Gly 基因后为 ND3 基因, 二者只间隔 ATT, 部分序列显示它与家蚕线粒体 ND3 基因的核苷酸序列同源性和分子进化的探讨。

2.2 线粒体细胞色素氧化酶亚基 III (COX3) 基因的同源性比较

检索 GenBank 数据库已发表的 11 种其他无脊椎动物线粒体 COX3 基因, 利用 Dnastar 软件进行同源性和分子进化的探讨。这 11 种无脊椎动物及其 COX3 基因代码分别为: 鳞翅目的家蚕 (*Bombyx mori*, BmCOX3); 直翅目的东亚飞蝗 (*Locusta migratoria*, LmCOX3); 膜翅目的蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*, AmCOX3); 双翅目的四斑按蚊 (*Anopheles quadrimaculatus*, AqCOX3); 冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*, AgCOX3); 果蝇 (*Drosophila yakuba*, DyCOX3); 黄猩猩果蝇 (*Drosophila melanogaster*, DmCOX3); 地中海实蝇 (*Ceratitis capitata*, CcCOX3) 和螺旋锥蝇 (*Cochliomyia hominivorax*, ChCOX3); 甲壳纲十足目的斑节对虾 (*Penaeus monodon*, PmCOX3) 和寄居蟹 (*Pagurus longicarpus*, PICOX3)。对照蓖麻蚕 COX3 基因 (ScCOX3) 推断的氨基酸序列与其它昆虫线粒体 COX3 基因的氨基酸序列 (表 1), 发现氨基酸同源性和分子进化的探讨。值得注意的是蜜蜂线粒体 COX3 基因的氨基酸序列与其他无脊椎动物 mtDNA COX3 基因的氨基酸序列同源性和分子进化的探讨。

表 1 无脊椎动物线粒体 DNA COX3 基因同源性比较

Table 1 Comparison of homology (%) among COX3 from invertebrate mtDNA

%	AgCOX3	AmCOX3	AqCOX3	BmCOX3	CcCOX3	ChCOX3	DmCOX3	DyCOX3	LmCOX3	PiCOX3	PmCOX3
ScCOX3	77.9	51.9	79.0	85.6	76.4	75.3	76.8	75.7	72.6	72.6	71.9
AgCOX3		53.1	96.6	74.8	84.4	83.2	85.9	86.6	75.2	73.7	73.3
AmCOX3			53.5	53.1	52.3	52.7	52.7	51.5	46.9	50.8	50.4
AqCOX3				75.6	84.0	82.8	85.5	86.6	74.8	72.5	73.7
BmCOX3					76.4	76.8	77.6	76.0	71.5	68.1	68.8
CcCOX3						90.5	91.6	91.6	74.1	73.8	74.1
ChCOX3							91.3	90.9	74.1	72.6	73.4
DmCOX3								97.7	74.9	73.4	74.9
DyCOX3									74.9	73.4	75.3
LmCOX3										72.3	72.6
PiCOX3											83.7

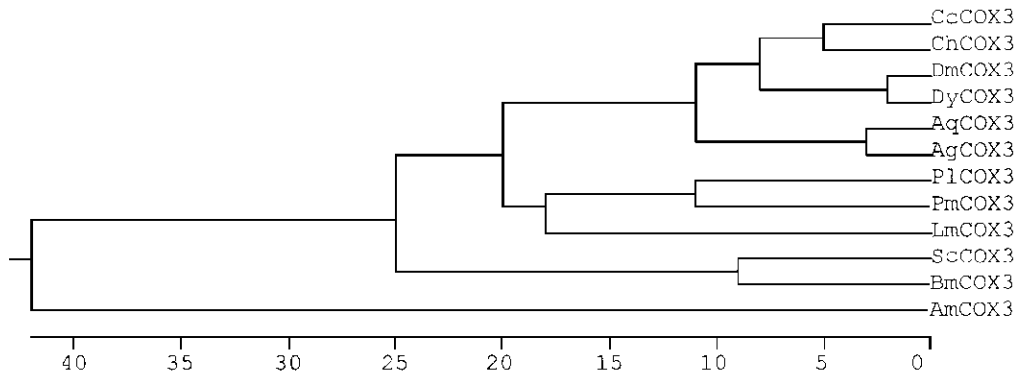


图 3 12 种无脊椎动物基于线粒体 DNA COX3 基因序列的分子系统树

Fig. 3 A phylogenetic tree based on mtDNA COX3

3 讨论

本研究以蓖麻蚕蛹为材料,提取了 mtDNA,并克隆了 mtDNA 的 *Xba* I - *Eco* R I 1.0 kb 片段,测序结果表明该片段包括 COX3 基因、tRNA-Gly 基因和 ND3 基因 5' 端的部分序列。与家蚕 mtDNA (GenBank Accession NO. NC002355) 的相应部分序列比较,蓖麻蚕 mtDNA COX3 基因与 ATP 合成酶 Fo 亚基 6 基因之间缺少 14 bp 的 AAAGAATTAAATTA 间隔部分序列,引起缺失的原因与功能有待探讨。蓖麻蚕 mtDNA COX3 基因终止密码子为 TAA,而四斑按蚊 (Mitchell *et al.*, 1993)、冈比亚按蚊 (Beard *et al.*, 1993) 和斑节对虾 (Wilson *et al.*, 2000) 等的终止密码子只有一个 T,需经添加 polyA 后才形成终止子。

根据线粒体 COX3 基因的结构构建的分子进化树,与从形态学角度进行的系统分类比较来看,结果略有差异。从本研究看,斑节对虾和寄居蟹与直翅目和双翅目昆虫关系密切,这与形态分类差别较大,按照后者斑节对虾和寄居蟹都属于节肢动物中的甲壳纲十足目,与昆虫分居不同的纲。Garcia-Machado (1999) 等根据线粒体基因所进行的分子进化亦认为甲壳纲十足目的龙虾与昆虫纲的昆虫在分类上很接近,我们的分类结果更进一步证实了上述结论。本研究得出分子进化树中,蜜蜂与其它物种的关系都较远,说明蜜蜂的线粒体 COX3 变异较大,进化速率快。David 等 (1994) 研究也发现蜜蜂线粒体基因组碱基置换率远远高于果蝇等昆虫,这可能与线粒体 DNA 严格的母性遗传方式和蜜蜂的群体繁育模式有关。蜜蜂的一个群体一般只有一个雌蜂王承担繁衍后代的任务,相对于其他物种的

母性个体数, 群体较小, 发生的遗传漂变容易被固定, 在进化过程中线粒体基因的分子进化的速率较快, 显得蜜蜂的进化就比较快。另外, 东亚飞蝗与其他昆虫距离较远, 其机理还需进一步探讨。

目前, 依据基因序列构建分子系统树进行分子系统演化研究较多, 构建分子系统树所依据的基因不同, 结果往往受到影响。Miya (2000) 等研究认为 mtDNA COX3 的基因序列作为分子系统分类的依据效果最好, 而 Zardoya (1996) 则认为中等。两位学者对 mtDNA COX3 基因作为分子分类的依据的优劣评价不同, 可能与所研究的物种不同有关系。从本研究的结果看, 除蜜蜂和东亚飞蝗外, 根据 mtDNA COX3 基因的数据结果构建的分子系统进化树基本上可反映这一组物种的亲缘关系规律。然而昆虫纲由于物种数目多, 所处的生态环境、迁移活动范围及繁殖方式各异, 所以遗传变异亦较为丰富, 进行分子进化分析时, 往往与形态分类有所矛盾, 因此, 在采用线粒体基因序列进行分子进化分析时, 应该综合考虑其繁殖模式及生态特点, 将分子与形态结合起来比单一方法可对生物的多样性作出更好的描述和解释。

参 考 文 献 (References)

- Beard C B, Hamm D M, Collins F H, 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.*, 2 (2): 103 - 124.
- Beuken E, 1998. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques*, 24 (5): 746 - 750.
- Brown W M, 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Nei M, Koehml R K eds. *Evolution of Genes and Proteins*. New York: Sinauer Assotition Inc Press. 62 - 88.
- David O F, Sklbinsk L, Zouros S E *et al.*, 1994. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, 368 (6474): 817 - 818.
- Garcia-Machado E, Pempera M, Dennebouy N *et al.*, 1999. Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta. *J. Mol. Evol.*, 49 (1): 142 - 149.
- Ling J H, Chen Y L, 1993. Restriction endonuclease cleavage maps of mtDNA from the pupas of eri silkworms. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 32 (5): 641 - 646. [凌建华, 陈元霖, 1993. 蓖麻蚕蛹线粒体 DNA (mtDNA) 限制性内切酶图谱. 厦门大学学报 (自然科学版), 32 (5): 641 - 646]
- Mitchell S E, Cockburn A F, Seawright J A, 1993. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species: a complete nucleotide sequence and gene organization. *Genome*, 36 (6): 1 058 - 1 073.
- Miya M, Nishida M, 2000. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 17 (3): 437 - 455.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1995. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd. Beijing: Science Press. 34 - 60. [萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯 (金冬雁等译). 1995. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社. 34 - 60]
- Shen X J, Zhao Q L, Zhang Z F *et al.*, 2000. Cloning and sequence alignment of *EcoR* I 1.9kb fragment of silkworm mitochondrial DNA. *Acta Sericologica Sinica*, 26 (2): 87 - 90. [沈兴家, 赵巧玲, 张志芳等, 2000. 家蚕 mtDNA *EcoR* I 1.9 kb 片段的克隆及序列分析. 蚕业科学, 26 (2): 87 - 90]
- Sprinzel M, Thomas H, Joachim W *et al.*, 1989. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA gene. *Nucleic Acids Res.*, 17 (1): 1 - 172.
- Wilson K, Cahill V, Ballment E, Benzie J, 2000. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods?. *Mol. Biol. Evol.*, 17 (6): 863 - 874.
- Zardoya R, Meyer A, 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol. Biol. Evol.*, 13 (7): 933 - 942.