

伯氏嗜木螨线粒体基因组全序列测定研究

孙恩涛 杨邦和 陶香林 叶长江 李朝品

(皖南医学院 检验学院,安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 测定并分析伯氏嗜木螨线粒体基因组全序列。方法: 采用长片段 PCR 扩增和引物步移法测序。结果: 伯氏嗜木螨线粒体基因组全序列为 14 273 bp, 为闭合环状分子, 包括 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 和 2 个 rRNA。tRNA 长度 47 ~63 bp, 平均(53.6±3.49) bp, 仅 *trnK* 能折叠形成三叶草结构, 其余均为缺乏 T-臂或 D-臂的非典型结构; 最大的非编码区 LNR 位于 *trnF* 和 *trnS1* 之间, 长 341 bp, 有 1 段类似微卫星的重复序列(AT)_n 和多个能稳定形成茎环的二级结构。结论: 获得了伯氏嗜木螨线粒体基因组全序列。

【关键词】伯氏嗜木螨; 无气门亚目; 线粒体基因组; tRNA 二级结构; 最大非编码区

【中图分类号】R 384.4 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.05.004

Determination of the complete mitochondrial genome of *Caloglyphus berlesei* (Acaridae: Astigmata)

SUN Entao, YANG Banghe, TAO Xianglin, YE Changjiang, LI Chaopin

School of Laboratory Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To determine the complete mitochondrial genome and analyze its sequence of *Caloglyphus berlesei* (*C. berlesei*). **Methods:** Four long fragments were amplified by long PCR and sequenced by conserved primer-walking technique. **Results:** The complete mitochondrial genome of *C. berlesei* was a circular molecule of 14 273bp, consisting of 13 protein-coding genes, two ribosomal RNA genes, and 22 transfer RNA genes. Most inferred tRNA genes were extremely truncated [47-63 bp, with an average of (53.6 ± 3.49) bp] Stem-loops were absent on either the T- or D-arm except for the *trnK*. The largest non-coding region (341 bp) was present between *trnF* and *trnS1*, and contained a microsatellite-like (AT)_n sequence and putative secondary structure features. **Conclusion:** Complete *C. berlesei* mitochondrial genome was successfully determined and sequenced.

【Key words】*Caloglyphus berlesei*; astigmata; mitochondrial genome; tRNA secondary structure; largest non-coding region

伯氏嗜木螨(*Caloglyphus berlesei*) 属无气门亚目(Astigmata)、粉螨科(Acaridae)。该螨性喜高温潮湿,常孳生于潮湿发霉的储藏物,也可侵害中华真地鳖、美洲大蠊等资源昆虫的卵和幼虫,造成相当大的经济损失。在适宜的温、湿度条件下,伯氏嗜木螨大量孳生,可对人们的生活环境造成污染,引起哮喘等变态反应性疾病,甚至可通过某种途径进入人体,导致人体内螨病^[1]。本研究测定并分析了伯氏嗜木螨的线粒体基因组全序列。

1 材料与方法

1.1 样品采集、饲养和鉴定 伯氏嗜木螨采自中华真地鳖培养床上的培养料,挑取单个雌螨在实验室(25±1)℃、85%RH、无光照的条件下进行“克隆”培

养。经过7~8周的培养后,在解剖镜下直接分离出成螨,一部分制作成玻片标本以作形态鉴定^[1],一部分饥饿24h后用70%酒精固定保存,存放于-80℃超低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 采用传统的酚氯仿提取基因组DNA。同时,利用DNeasy Tissue Kit(Qiagen, Hilden, Germany)试剂盒进行10个单个雌螨基因组DNA的提取。

1.2.2 引物设计、长片段PCR扩增及测序 用节肢动物线粒体基因的通用引物^[2-4],扩增出线粒体*cox1*、*cob*、*rns*和*nad4-nad5*基因序列,设计上述4个基因片段区间的长片段扩增引物(表1),反应总体积为50 μL,含LA-PCR Buffer II (Mg²⁺ plus)

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2016A725);安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016174)

收稿日期:2018-02-28

作者简介:孙恩涛(1980-),男,副教授,博士,(电话)0553-3932034,(电子信箱)asdentao@126.com;

李朝品,男,教授,博士生导师,(电子信箱)cpli001@126.com,通信作者。

5 μL dNTPs 8 μL 引物各 1 μL 模板 DNA 浓度约为 100 ng LA Taq 酶 0.5 μL (5 U/μL) 加无菌水补足。反应条件为: 94℃ 预变性 60 s; 98℃ 变性 10 s , 退火与延伸在同一温度下进行 ,55~60℃ 5 min ,34 个循环 ,72℃ 终延伸 10 min。通过 Long-PCR 扩增出大片后 对纯化后的 PCR 产物进行步移法测序。

1.2.3 数据处理及分析 用 DNASTar 软件包的 Ed-itseq 和 Seqman 软件进行序列拼接和组装 ,得到线粒体基因组全序列。采用 Clustal X 2.0 软件 ,参考已测定的椭圆食粉螨线粒体基因组全序列(序列号 KC700022) [5] ,查找蛋白质编码基因、rRNA 和 tRNA 在线粒体基因组全序列中的位置; 用 tRNAscan-SE1.23和 ARWEN 构建 tRNA 的二级结构进行鉴定[6-7]。假定控制区的二级结构用 Mfold Server 在线软件构建[8]。

表 1 伯氏嗜木螨线粒体基因组扩增所用的 PCR 引物

Region	Name	Sequence(5' to 3')	Annealing temperature
<i>cob-cox1</i>	CBCyCoF	AGTAAAAGACACAACGCCCC	50℃
	CBCyCoR	CCCAACATAGTAGCCAACCA	
<i>cox1-rnmS</i>	CB-COSF	TGGTTGGCTACTATGTTGGG	55℃
	CB-COSR	AGCCCCACCTTATAGTCTAC	
<i>rrnS-nad4</i>	CB-12SNF	GTGTAGACTATAAGGTGGGG	56℃
	CB-Nd4R	CTGTCACCGTGGCATATTGT	
<i>nad5-cob</i>	CB-LC2F	TCTTGGCTTCCTGCTGCTAT	60℃
	CB-LC2R2	CCAGTAGAACCACCTTTGT	

2 结果

2.1 线粒体基因组结构和基因排布 伯氏嗜木螨 mtDNA 为闭合环状分子 ,其长度为 14 273bp(序列号 KF499016) ,由 13 个蛋白质编码基因 ,22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 基因构成 ,见表 2。

2.2 tRNA 基因 伯氏嗜木螨 tRNA 基因长度为 47~63 bp ,平均长度为(53.6±3.49) bp。在所预测的二级结构中 ,仅 *trnK* 能形成三叶草结构 ,*trnD* 等 15 个基因呈 TV-loop 结构 ,*trnR* 等 6 个基因缺少 D-臂 ,缺失可变臂和配对的茎。

2.3 非编码区 伯氏嗜木螨 mtDNA 最大的非编码区(LNR) 长 341 bp ,位于 *trnF* 和 *trnS1* 之间 ,AT 含量为 89.4% ,高于其他区域。二级结构分析显示 ,LNR 存在类似微卫星的 (AT) _n 序列 ,且存在个体异质性(44~50 bp) 。在 AT 重复序列的下游 ,是 1 个富含 AT 的区域 ,其 AT 含量可达 94.29% ,形成 1 个茎环结构。紧接 AT 富集区下游 ,形成 1 个含有短的回文序列(5'-ATGTA 和 TACAT-3') 的茎环结构。同时 ,在靠近 LNR 的 3'端 ,还发现了一个稳定的茎环结构 ,即由一个的连接环(GTTAAAA) 将 28

bp 的茎和发夹结构连接起来。此外 ,还预测有 3 个能稳定形成茎环的二级结构。

表 2 伯氏嗜木螨线粒体基因组的结构

Gene	Position	Size	int ^a	AA	start	stop	anti
<i>cox1</i>	1-1551	1551	6	517	ATT	TAA	
<i>cox2</i>	1558-2319	762	2	254	ATG	TAG	
<i>trnD</i>	2322-2376	55	-1				GTC
<i>atp8</i>	2376-2531	156	4	52	ATT	TAG	
<i>atp6</i>	2536-3207	672	13	224	ATG	TAG	
<i>cox3</i>	3221-4003	783	10	261	ATG	TAA	
<i>trnG</i>	4014-4068	55	-1				TCC
<i>nad3</i>	4068-4412	345	29	115	ATT	TAA	
<i>trnR</i>	4442-4490	49	15				TCG
<i>trnM</i>	4506-4557	52	1				CAT
<i>trnS2</i>	4559-4610	52	2				TGA
<i>trnC</i>	4613-4665	53	11				GCA
<i>trnP</i>	4677-4731	55	-1				TGG
<i>trnY</i>	4731-4793	63	-12				GTA
<i>trnK</i>	4782-4844	63	-1				TTT
<i>trnN</i>	4844-4898	55	0				GTT
<i>rrnS</i>	4899-5561	663	-1				
<i>trnV</i>	5561-5607	47	0				TAC
<i>rrnL</i>	5608-6635	1028	0				
<i>trnW</i>	6636-6691	56	53				TCA
<i>nad1</i>	6745-7674	930	51	310	ATG	TAA	
<i>nad6</i>	7726-8160	435	3	145	ATA	TAA	
<i>trnT</i>	8164-8215	52	2				TGT
<i>nad4L</i>	8218-8469	252	11	84	ATG	TAA	
<i>nad4</i>	8481-9759	1279	0	426	ATG	T	
<i>trnH</i>	9760-9814	55	-1				GTG
<i>nad5</i>	9814-11445	1632	-1	544	ATA	TAA	
<i>trnF</i>	11445-11500	56	0				GAA
<i>LNR</i>	11501-11841	341	0				
<i>trnS1</i>	11842-11892	51	-2				TCT
<i>trnQ</i>	11891-11943	53	2				TTG
<i>trnI</i>	11946-11999	54	0				GAT
<i>nad2</i>	12000-12945	946	-1	315	ATA	T	
<i>trnE</i>	12945-12999	55	6				TTC
<i>cob</i>	13006-14106	1101	2	367	ATG	TAG	
<i>trnL1</i>	14109-14163	55	9				TAG
<i>trnA</i>	14173-14219	47	-2				TGC
<i>trnL2</i>	14218-14273	56	0				TAA

int^a: 间隔区 ,负值为相邻基因重叠; LNR: 最大的非编码区; 在次要链上编码的基因用下划线表示。

3 讨论

随着分子生物学技术的发展 ,越来越多的蜚螨线粒体基因组提交到数据库中 ,并广泛地应用于蜚螨各个阶元的系统学研究中。本研究获得了伯氏嗜木螨线粒体基因组全序列 ,长度为 14 273 bp ,所编码的 37 个基因 ,其相对位置与已释放的无气门亚目中椭圆食粉螨、屋尘螨和粉尘螨相一致[9]。

伯氏嗜木螨线粒体 tRNA 基因具有缺乏 T-臂或 D-臂的非典型结构 ,这与真螨总目螨类线粒体 tRNA 基因的长度显著缩短一致 ,其是否具有正常的功能 ,尚需进一步的线粒体转录组学研究。

(下转第 429 页)

【参考文献】

[1] ROUTSIAS JG ,TZIOUFAS AG. Sjögren’s syndrome study of autoantigens and autoantibodies [J]. Clinical reviews in allergy & immunology 2007 ,32(3) : 238–251.

[2] 李永哲. 新的中国汉族人群原发性干燥综合征的易感基因 [J]. 中华内科杂志 2014 ,53(11) : 901.

[3] BARRETT SP ,SALZMAN J. Circular RNAs: analysis ,expression and potential functions [J]. Development 2016 ,143(11) : 1838–1847.

[4] SALZMAN J. Circular RNA expression: its potential regulation and function [J]. Trends Genet 2016 ,32(5) : 309–316.

[5] CHEN LL ,YANG L. Regulation of circRNA biogenesis [J]. RNA biology 2015 ,12(4) : 381–388.

[6] EBBESEN KK ,HANSEN TB ,KJEMS J. Insights into circular RNA biology [J]. RNA biology 2017 ,14(8) : 1035–1045.

[7] GUO JU ,AGARWAL V ,GUO H ,et al. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs [J]. Genome Biol 2014 ,15(7) : 409.

[8] NAIR AA ,NIU N ,TANG X ,et al. Circular RNAs and their associ-

ations with breast cancer subtypes [J]. Oncotarget 2016 ,7(49) : 80967–80979.

[9] KULCHESKI FR ,CHRISTOFF AP ,MARGIS R. Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker [J]. Journal of biotechnology 2016 238: 42–51.

[10] CORTES-LOPEZ M ,MIURA P. Emerging Functions of Circular RNAs [J]. The Yale journal of biology and medicine ,2016 ,89(4) : 527–537.

[11] BARTEL DP. MicroRNAs: genomics ,biogenesis ,mechanism ,and function [J]. Cell 2004 ,116(2) : 281–297.

[12] BRENNER JL ,JASIEWICZ KL ,FAHLEY AF ,et al. Loss of individual microRNAs causes mutant phenotypes in sensitized genetic backgrounds in *C. elegans* [J]. Current Biology 2010 ,20(14) : 1321–1325.

[13] 彭琳一. 原发性干燥综合征 microRNA 的表达谱研究 [D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院 2013.

[14] ZHOU X ,JEKER LT ,FIFE BT ,et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity [J]. Journal of Experimental Medicine 2008 205(9) : 1983–1991.

(上接第 421 页)

节肢动物线粒体控制区一般具有较高的 AT 含量 作为复制起点的识别信号 poly-T/A 和形成潜在的茎环结构等^[10]。伯氏嗜木螨 LNR 的 AT 含量高, 且形成多个潜在的茎环结构。因此 我们推测伯氏嗜木螨线粒体 LNR 为其线粒体基因组的控制区。本研究测序获得伯氏嗜木螨线粒体基因组全序列, 为推动蜱螨分子系统学的研究提供了基础信息。

【参考文献】

[1] 李朝品, 沈兆鹏. 中国粉螨概论 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 248–255.

[2] DERMAUW W ,LEEUWEN TV ,VANHOLME B ,et al. The complete mitochondrial genome of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) : a novel gene arrangement among arthropods [J]. BMC Genomics ,2009 ,10(1) : 107.

[3] WEBSTER LMI ,THOMAS RH ,MCCORMACK GP. Molecular systematics of *Acarus siro* s. lat. , a complex of stored food pests [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution ,2004 ,32(3) : 817.

[4] SIMON C ,BUCKLEY T R ,FRATI F ,et al. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis , and a new compilation of

conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA [J]. Annual Review of Ecology Evolution & Systematics ,2006 ,37(37) : 545–579.

[5] SUN ET ,LI CP ,NIE LW ,et al. The complete mitochondrial genome of the brown leg mite *Aleuroglyphus ovatus* (Acari: Sarcopitiformes) : evaluation of largest non-coding region and unique tRNAs [J]. Exp Appl Acarol 2014 64(2) : 141–157.

[6] LOWE TM ,EDDY SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. Nucleic Acids Res ,1997 ,25: 955–964.

[7] LASLETT D ,CANBACK B. ARWEN , a program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences [J]. Bioinformatics 2008 ,24: 172–175

[8] ZUKER M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction [J]. Nucleic Acids Res 2003 31: 3406–3415.

[9] SUN E ,LI C ,LI S ,et al. Complete mitochondrial genome of *Caloglyphus berlesii* (Acaridae: Astigmata) : The first representative of the genus *Caloglyphus* [J]. Journal of Stored Products Research ,2014 ,59: 282–284.

[10] ZHANG DX ,HEWITT GM. Insect mitochondrial control region: A review of its structure , evolution and usefulness in evolutionary studies [J]. Biochem Syst Ecol ,1997 ,25: 99–120.