Hans Journal of Agricultural Sciences 农业科学, 2019, 9(2), 114-125
Published Online February 2019 in Hans. http://www.hanspub.org/journal/hjas
https://doi.org/10.12677/hjas.2019.92020

Hans汉斯

Mitochondrial Genome Sequence Analysis of *Cerapachys xizangensis*

Ye Zhong[1,2], Shanyi Zhou[1,2], Zhilin Chen[1,2*]

[1]Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Guangxi Normal University, Ministry of Education, Guilin Guangxi
[2]Guangxi Key Laboratory of Rare and Endangered Animal Ecology, Guangxi Normal University, Guilin Guangxi
Email: 616106618@qq.com, syzhou@mailbox.gxnu.edu.cn, *chenzhilin35@163.com

Received: Feb. 3rd, 2019; accepted: Feb. 15th, 2019; published: Feb. 22nd, 2019

Abstract

This paper reports mitochondrial genome of *Cerapachys xizangensis* based on high-throughput sequencing, and improves the method of primer design to circular DNA complete sequence creatively. Through the sequence analysis, we found that the mitochondrial genome of *Cerapachys xizangensisis* is a double-stranded DNA molecule, with total length of 16,769 bp, and two gene rearrangements occurred: one is gene shuffle; the other is gene inversion.

Keywords

Formicidae, Mitochondrial Genome, Gene Rearrangement, Primer Design

西藏粗角猛蚁线粒体基因组序列分析

钟　烨[1,2]，周善义[1,2]，陈志林[1,2*]

[1]广西师范大学，珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室，广西　桂林
[2]广西师范大学，广西珍稀濒危动物生态学重点实验室，广西　桂林
Email: 616106618@qq.com, syzhou@mailbox.gxnu.edu.cn, *chenzhilin35@163.com

收稿日期：2019年2月3日；录用日期：2019年2月15日；发布日期：2019年2月22日

摘　要

报道西藏粗角猛蚁*Cerapachys xizangensis*基于高通量测序的线粒体基因组全序列，创造性地改进了环状DNA缺口处的引物设计补全序列方法。通过序列分析发现，西藏粗角猛蚁线粒体基因组为闭合的双链

*通讯作者。

文章引用: 钟烨, 周善义, 陈志林. 西藏粗角猛蚁线粒体基因组序列分析[J]. 农业科学, 2019, 9(2): 114-125.
DOI: 10.12677/hjas.2019.92020

DNA分子，总长为16,769 bp，发生了两处基因重排现象：一处为基因洗牌，另一处为基因倒置。

关键词

蚁科，线粒体基因组，基因重排，引物设计

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

1. 引言

昆虫线粒体基因组较小，为闭合的双链 DNA 分子，总长度为 15~20 kb，含有 37 个基因，即 13 个蛋白编码基因(COI-III, cytb, ND1-6, ND4L, ATP6, ATP8)、2 个核糖体 RNA 基因(srRNA, lrRNA)、以及 22 转运 RNA 基因(其中丝氨酸和亮氨酸有两个对应的 tRNA，其它的 18 个 tRNA 分别对应一种氨基酸)，此外还有一段最大非编码区，此区域 AT 含量极高，并控制着线粒体基因组的复制与转录，因此称之为控制区 CR (Control Region)，又称为 AT 丰富区。不同的物种控制区相差较大，它是造成基因组大小差异的主要原因[1]。线粒体基因组具有母系遗传的特点，进化速率快，重组水平低，很适合作为分子标记做较低阶元的系统发育分析[2] [3]。在线粒体基因组中，基因结构紧凑，蛋白编码基因中没有发现内含子(珊瑚亚纲种类除外) [4] [5]，相邻基因间隔小，有较多的基因重叠现象，还存在着基因重排。由于线粒体 DNA 双链中均分布着一些基因，因此我们把有较多数目基因的链称为 J 链(majority strand)，与之对应的链则称之为 N 链(minority strand) [6]。此外，线粒体基因组高 A + T 含量是其显著特点[7]。蚂蚁线粒体基因组研究较晚，资料也较少。Gotzekr 等[8]首次测定了切叶蚁亚科火蚁属 *Solenopsis* 中 3 种的线粒体基因组全序列，分别长 15,549 bp、15,560 bp 和 15,552 bp，发现火蚁属线粒体基因组全序列中部分 tRNA 基因发生重排。Hasegawa 等[9]测定了双针棱胸蚁 *Pristomyrmex punctatus* 正常型和变型的线粒体全序列，分析了正常型和变型之间的差异。Berman 等[10]测定了臭蚁亚科的蜘蛛蚁 *Leptomyrmex pallens* 的线粒体基因组全序列，发现 tRNA 存在易位和倒置。Rodovalho 等[11]测定了切叶蚁亚科 *Atta laevigata* 的线粒体基因组全序列。Babbucci 等[12]测定了蚁亚科丝光褐林蚁 *Formica fusca* 和切叶蚁亚科粗角红蚁 *Myrmica scabrinodis* 的线粒体基因组全序列，首次证实其基因组与鳞翅目 Dytrisia 分支间共享同一基因排列顺序，同时分析了蚁科 3 类型的基因次序可能的进化机制。Kim 等[13]测定了韩国一种弓背蚁 *Camponotus atrox* 的线粒体基因组全序列，发现 tRNA 中 trnM 发生移位，推测该重排方式可能是由复制/随机丢失所致。Yang 等[14]测定了西利氏蚁 *Formica selysi* 的线粒体基因组全序列，证实其基因排序与丝光蚁 *F. fusca* 和蜘蛛蚁 *L. pallens* 的基因排序一致。西藏粗角猛蚁 *Cerapachys xizangensis* 是唐觉等[15]在《西藏昆虫》中描述的一个新种，也是国人首次命名的国内蚂蚁物种。测定该蚂蚁的线粒体基因组全序列，可以进一步丰富我国蚂蚁线粒体基因组数据库，为蚂蚁的系统发育研究提供基础资料。

2. 材料与方法

2.1. 研究材料

本实验所选取的蚂蚁标本采于西藏藏族自治区境内，根据《西藏昆虫》中所记述的西藏粗角猛蚁 *Cerapachys xizangensis* 的原始描述鉴定后确定。野外采集的标本放入盛有无水乙醇的收集管中，带回实

验室置于−60℃的条件下保存。实验时，取同巢中的一个标本制作成针插标本，另取一个标本放置于吸水纸上，待酒精挥发后，用剪刀剪去头部以下部分，将头部放入 2 mL 的离心管中剪碎、研磨，按照试剂盒上的操作步骤提取总 DNA，提取的总 DNA 经电泳检测合格后，一部分送生物公司做高通量测序，另保存一部分备用。

2.2. 引物设计补全序列

2.2.1. 高通量序列的获取

在生物公司官方网站下载目的 DNA 序列，用 txt 文件保存并命名该序列，然后用 ClustalX(1.83)软件打开，获得总长度为 16,741 bp 的 DNA 序列。

2.2.2. 引物设计

引物设计按以下步骤进行：

① 测序公司返回的序列是线性的，还不能确认是否成环，因此需先将原始序列保存，然后打开一个副本文件，从序列尾部截取 10 bp 的序列放在另一个新建文本中并命名，用 Clustal(1.83)软件的比对功能进行比对。若发现新截取的 10 bp 尾部序列与序列前端的某个区域不完全重合，则说明序列不能拼接成环，可能在前端与末端之间存在缺口。

② 根据高通量测序的特点及线粒体基因组的大小，可以估测缺口不长；又根据线粒体 DNA 呈环状的特点，可以用高通量测序末端的序列做正向引物和前端的序列做反向引物设计。本实验截取原序列副本的前端 1200 bp，粘贴到序列的末端构成一个新序列并命名。经过计算后，定位缺口在 15,541 的位置。

③ 将第二步处理的序列导入 Oligo 软件中，根据引物设计的基本要求寻找最佳引物。因为 PCR 双向测序的起始和结尾序列可靠性较低，因此在设计引物时最好选在离缺口 50 bp 碱基外寻找。本实验最终选中了两组引物(见表 1)用以扩增序列缺口。

④ 将设计的引物送生物公司合成。

Table 1. Primer sequence
表 1. 引物序列

引物名称	序列(5”-3”)	引物位置	扩增长度	退火温度
F1	**ACAATAACTATCATACCTGC**	**15,174**	**651 bp**	**45.9℃**
R1	**ATTAATTTGATATTCCACGAG**	**15,845**		
F2	**CTACAATAACTATCATACCTGC**	**15,172**	**650 bp**	**46.3℃**
R2	**ATTAATTTGATATTCCACGAGT**	**15,844**		

2.2.3. 扩增目的片段

首先将之前提取的 DNA 用表 1 中的引物做 PCR 扩增目的片段，然后对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，实验发现两组引物均能扩增出清晰的条带且与 maker 的 1000 bp 条带相近，因此可以估计此条带即为目的片段。因为 F2、R2 这一对引物的条带更为清晰，所以选择相应的 PCR 产物送生物公司做双向测序。

2.2.4. 序列比对补齐缺口

从生物公司网站上下载目的序列测序结果并用 txt 文件保存，然后直接用 ClustalX(1.83)软件导入目的序列和引物设计的第二步序列(即原始序列截取前端 1200 bp 碱基到尾部的序列)进行比对，在预先定位的 15,541 处发现序列有 28 bp 的缺口(见图 1)。将缺口处的序列输入原始序列的尾部即获得西藏粗角猛蚁的线粒体 DNA 全序列，总长 16,769 bp。

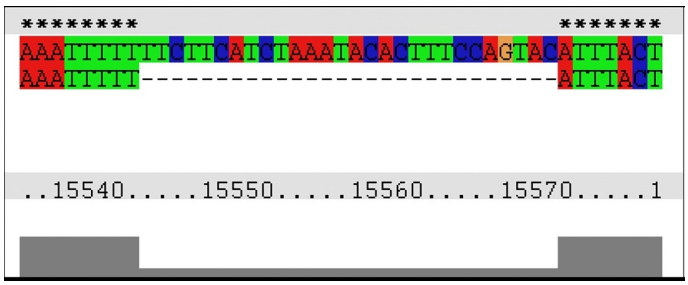


Figure 1. High-throughput sequencing gap
图 1. 高通量测序缺口

3. 序列分析

3.1. 基因注释

3.1.1. tRNA 基因定位及调零

将原始序列缺口补齐后放在 tRNAscan-SE 网站上搜索，得到 15 个 tRNA 基因(见表 2)。由 tRNA 基因排序可知，生物公司给出的原始序列为 J 链，为了便于注释，首先将序列调零。本实验选择 $tRNA^{met}$ 基因为起始基因，因此将补齐后的原始序列的前端 1826 bp 截取到序列尾部形成一个新序列，即序列调零。

Table 2. The tRNA genes were searched on tRNAscan-SE
表 2. 在 tRNAscan-SE 上搜索得到的 tRNA 基因

序号	tRNA	起始	终止	反密码子	得分
1	Ile	1666	1733	GAT	12.3
2	Met	1827	1895	CAT	15.3
3	Trp	3100	3174	TCA	27.0
4	Leu	5011	5077	TAA	18.4
5	Lys	5782	5850	TTT	35.6
6	Asp	5851	5922	GTC	6.9
7	Asn	8232	8297	GTT	11.7
8	Thr	12,140	12,211	TGT	24.9
9	Ser	14,077	14,145	TGA	13.8
10	Pro	12,281	12,214	TGG	12.5
11	His	10,401	10,337	GTG	14.9
12	Phe	8615	8548	GAA	17.1
13	Tyr	3398	3333	GTA	15.5
14	Cys	3271	3203	GCA	1.8
15	Gln	1977	1909	TTG	29.6

3.1.2. tRNA 二级结构

tRNA 的二级结构一般由氨基酸接受臂、TΨC 臂、TΨC 环、反密码子臂、反密码子环、二氢尿嘧啶臂、二氢尿嘧啶环，及一个多变的额外环组成(见图 2)，有时某些 tRNA 会缺少二氢尿嘧啶臂。通常，这些 tRNA 都能形成倒 L 型的三级结构，一般反密码子臂和氨基酸接受臂比较保守，而二氢尿嘧啶臂、TΨC 臂变异性较高，存在一些错配的情况。本文统计了搜索到的 15 个 tRNA 的二级结构(见图 3)。

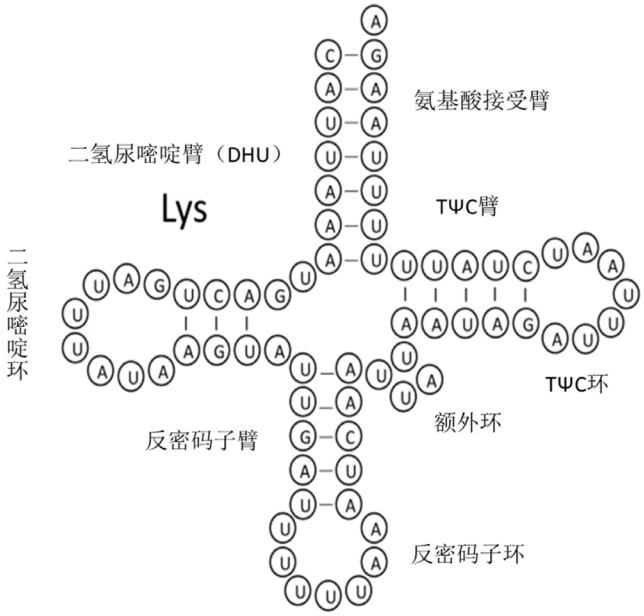
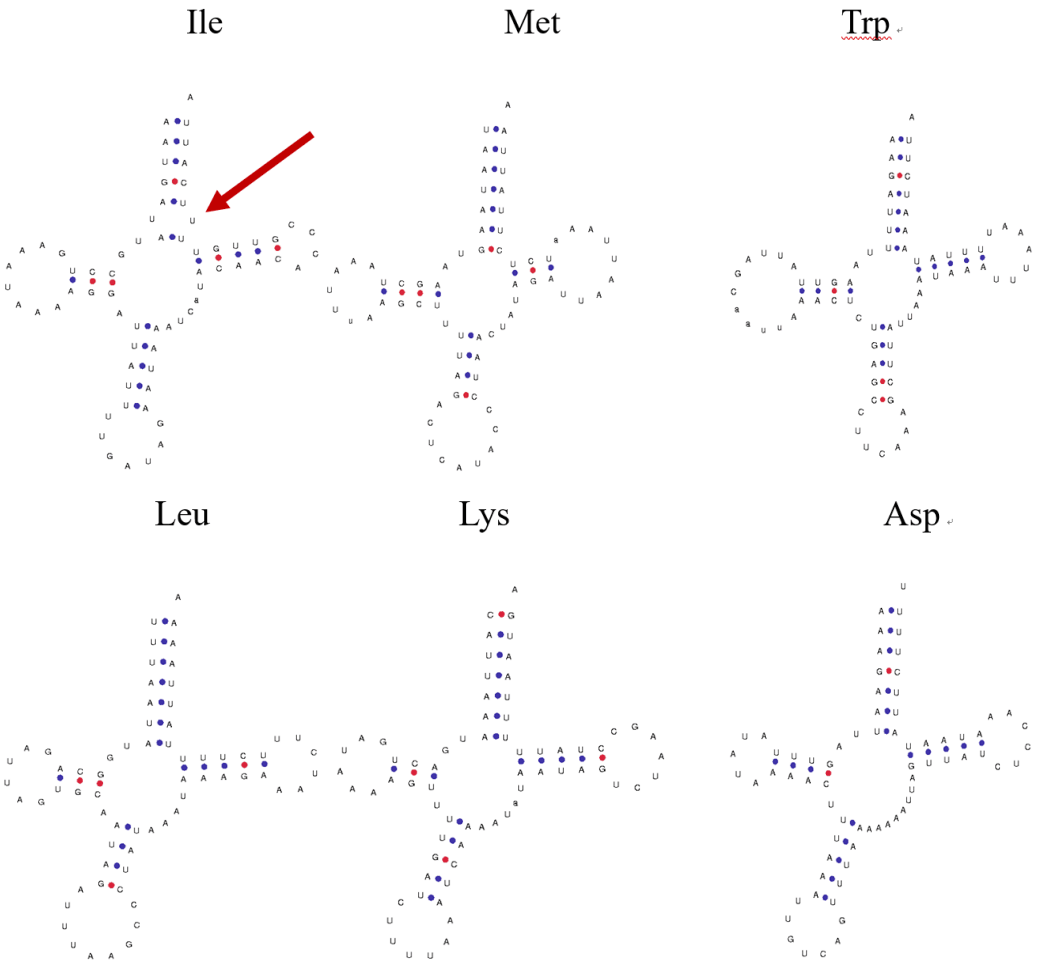


Figure 2. Schematic diagram of secondary structure of tRNA
图 2. tRNA 二级结构模式图



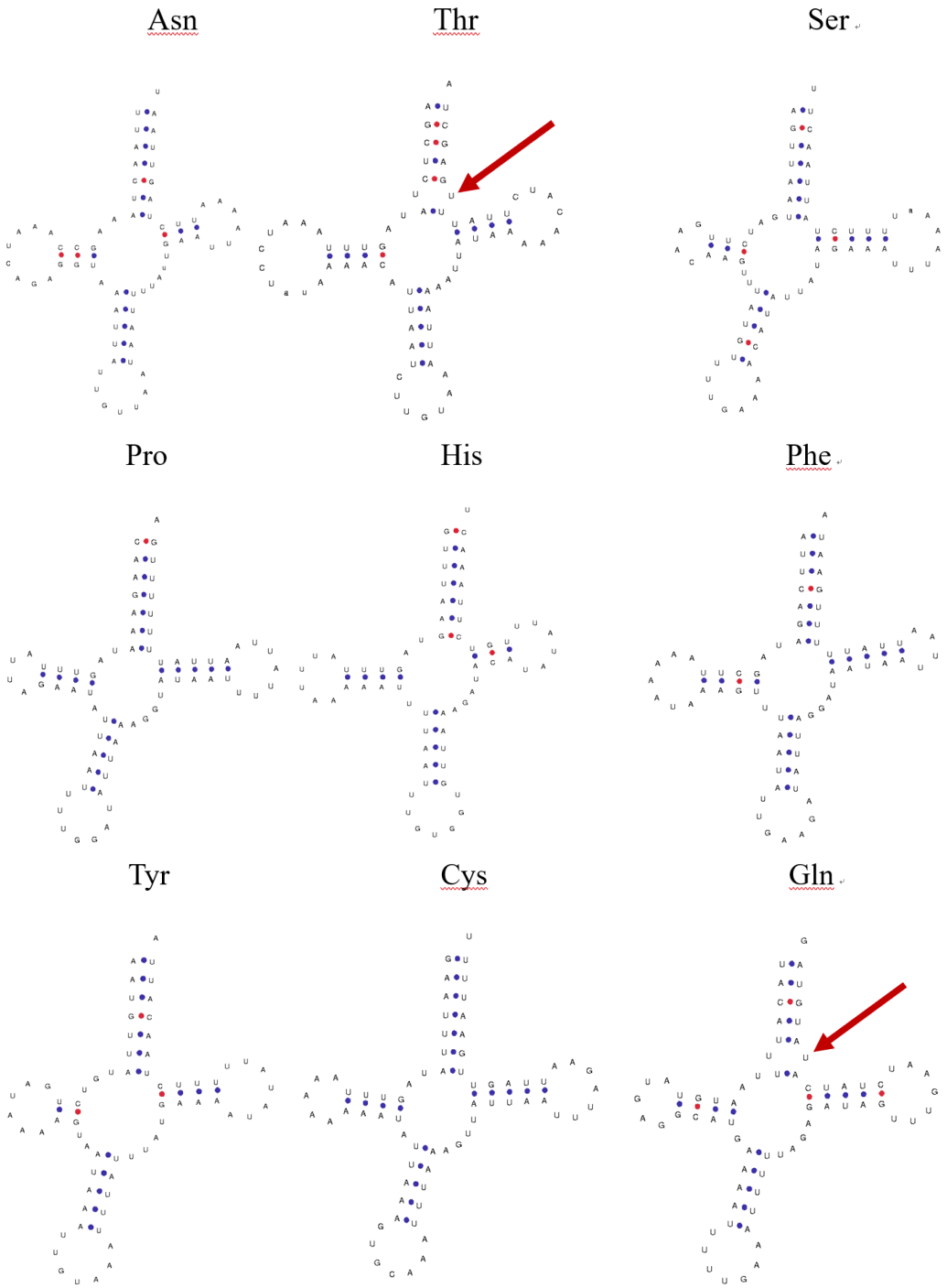


Figure 3. The secondary structure of the tRNA genes were searched on tRNAscan-SE
图 3. 在 tRNAscan-SE 上搜索得到的 tRNA 基因二级结构

由图 3 可知，$tRNA^{Ile}$、$tRNA^{Thr}$、$tRNA^{Gln}$ 基因的氨基酸接受臂均发生了 U-U 错配(红色箭头标出)。

3.1.3. 相近种的线粒体基因组全序列获取及比对

为定位其它的 tRNA 基因、蛋白质基因和 rRNA 基因，从 NCBI 网站上用 BLAST 功能进行相似性搜索并选择相似性最高的序列。本研究从 NCBI 中选择了编号 KT266831 的双齿多刺蚁 *Polyrhachis dives* 的

线粒体基因组全序列作为参考，用 ClustalX(1.83)软件将其蛋白质基因、rRNA 基因和 7 个 tRNA 基因($tRNA^{Gly}$、$tRNA^{Ala}$、$tRNA^{Arg}$、$tRNA^{Ser(TCT)}$、$tRNA^{Glu}$、$tRNA^{Leu}$、$tRNA^{val}$)截取保存。然后将西藏粗角猛蚁调零后的线粒体 NDA 序列导入 ClustalX(1.83)软件中，再分别添加之前保存的双齿多刺蚁各基因序列进行比对，从而逐个确定西藏粗角猛蚁线粒体基因组其它的基因位置和序列，并最终得到其线粒体基因组注释结果(见表 3)。

Table 3. The mitochondrial genome annotation of *Cerapachys xizangensis*
表 3. 西藏粗角猛蚁线粒体基因组注释

基因	N/J 链	基因位置	基因长度(Bp)	反/起始密码子	终止密码子	基因间隔区(bp)
tRNA-Met	J	1~69	69	CAT		13
tRNA-Gln	N	83~151	69	TTG		137
ND2	J	289~1192	904	ATA	T	81
tRNA-Trp	J	1274~1348	75	TCA		27
tRNA-Cys	N	1377~1445	69	GCA		61
tRNA-Tyr	N	1507~1572	66	GTA		57
COI	J	1630~3165	1536	ATG	TAA	19
tRNA-Leu	J	3185~3251	67	TAA		0
COII	J	3252~3935	684	ATA	TAA	20
tRNA-Lys	J	3956~4024	69	TTT		0
tRNA-Asp	J	4025~4096	72	GTC		0
ATP8	J	4097~4258	162	ATA	TAA	6
ATP6	J	4265~4927	663	ATA	TAA	8
COIII	J	4936~5718	783	ATG	TAA	76
tRNA-Gly	J	5795~5863	69	TCC		9
ND3	J	5873~6214	342	ATT	TAA	22
tRNA-Ala	N	6237~6298	62	TGC		47
tRNA-Arg	J	6346~6403	58	TCG		2
tRNA-Asn	J	6406~6471	66	GTT		22
tRNA-Ser	J	6494~6558	65	TCT		19
tRNA-Glu	J	6578~6632	55	TTC		89
tRNA-Phe	N	6722~6789	68	GAA		47
ND5	N	6837~8510	1674	ATT	TAA	0
tRNA-His	N	8511~8575	65	GTG		74
ND4	N	8650~9996	1347	ATG	TAA	25
ND4L	N	10,022~10,309	288	ATT	TAA	4
tRNA-Thr	J	10,314~10,385	72	TGT		2
tRNA-Pro	N	10,388~10,455	68	TGG		20
ND6	J	10,476~11,012	537	ATG	TAG	78
Cytb	J	11,091~12,190	1100	ATG	TA	60
tRNA-Ser	J	12,251~12,319	69	TGA		68
ND1	N	12,388~13,341	954	ATA	TAA	-1
tRNA-Leu	N	13,341~13,412	72	TAG		5
lrRNA	N	13,418~14,824	1407			25
tRNA-Val	N	14,850~14,914	65	TAC		3
srRNA	N	14,918~15,764	847			0
CR(A+T)		15,765~16,608	843			0
tRNA-Ile	J	16,609~16,676	68	GAT		93

3.1.4. 蛋白质基因翻译结果

西藏粗角猛蚁的 13 个蛋白质基因均是典型的 ATN 起始密码子，大多数蛋白基因以完全终止密码子 ATT 结尾，只有 ND2 基因以 T，Cytp 基因以 TA 作为不完全终止密码子，而 ND6 以 TAG 作为终止密码子。本文用 MEGA4.1 软件选择 invertebrate mitichondrial 密码子对 13 种蛋白质进行翻译(见表 4)。

Table 4. Translation results of protein gene
表 4. 蛋白质基因翻译结果

基因	蛋白质一级结构
ND2	MFYFYMIMLMLMLTSVFSLFLNNMLTIWFLMEINNFIFLFYLSLFMKNKKMIFLYFFIQIMSSLVLILFLL INFYTFLNNNYLTSIFLFFSLLLKLGVPPLHFWMPLISMYMNWNMITVFFTLQKIIPLIFISLTNTPSIIYFTI ISLCMIIPPIFMINNNNFKKLLAYSSINQMGWMILLIMISPIMWFLYMVIYSLSLYIITSFMKLKNIKANL WIKMNSSMKLIIMLMMLNMSGLPPFTFFIMKWYTIFLFISQMNFNIILIIMLLSSLILMYIYMNMIIKISL FYSTNLKLMNLTYQ
CO1	MIKWMYSTNHKDIGILYFIFALWAGMIGSSMSMIIRMELGTCGMMITSDQIFNILVTSHAFIMIFFMV MPFMIGGFGNFLVPLMLGAPDMAYPRMNNMSFWLLPPSLTLLIMSNFISSGAGTGWTIYPPLASSTF HSGPSVDFTIFSLHIAGMSSILGAINFISTIMNMYHKNMSMDKIPLLVWSIMITAILLLLSLPVLAGAITM LLTDRNLNTSFFDPSGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGLISHIITNESGKKETFGSLGMIYAIMAI GFLGFIVWAHHMFTIGMDVDTRAYFTSATMIIAIPTGIKVFSWITTLHGVKINHSPSPALLWSMGFVFL FTMGGLTGIMLSNSSIDIILHDTYYVVAHFHYVLSMGAVFSIIASFIHWYPLITGYTLNNYYLFSQFFTMF IGVNLTFFPQHFLGLSGMPRRYSDYPDAFLFWNIISSIGSMISIISLIYLIFILWESLASKRKIISMFYLSSSLE WTSSCPPANHSYNEVPAV
CO2	MNTWMFTMQNSNSPIFDLMIWFHDTTMAILIFITLMISYMMIIISCNLFTNRFLLQGHSIELIWTIAPIFI LIFIAIPSLKILYLSDDTCSSKLTIKTIGHQWYWSYEYSDFLNIQFDSFMINTSTLTPYEFRLLDVDNRCVLP FQLNIRILTTSVDVIHSWTVPSLGIKMDSTPGRLNQCHLHMYRPGLFFGQCSEICGINHSFMPIVIESTS FSYFKIWLNLQQS
ATP8	MPQMKPMIWLLFLILTIILLLALVILLYYFFIPHPPKSLTTLIKKIKYYKYRW
ATP6	MTNIFSIFDPSTSLNCSLNWLSLLIIFILAPYTYWLEPSRYIMFWWLSISYIMKEFKILLKYSYSNLIIFISLFL MIIVNNFLGLFPYIFTASSHMSICLSLSLTMWLGTMIYSIVNHSNNFCSHMTPQGTPYILMPFMVMIETI SLFIRPLTLAIRLTANMIAGHLLLSLLGSSGEMINMHFVPLLISLEILLFTLELAVSIIQAYVFSILSTLYSSEI
CO3	MTKYHHPFHLVTPSPWPLLTSLSIFNNLITTIAWMHKMNYSFVFTIPATLLCSLLWWQDIVREATFSGS HTKQVYSIMRLGMILFILSEIFFFISFFWAYFHSSLSPTIEIGQLWPPLGINPFNPYSIPLLNTIILISSGLTITW SHHSMLMSNFYESKKSLMISISLGVYFSYIQLTEYIESPFTMADSVYGSTFFIATGFHGLHVIIGTSFLLVC LWRLSFLHFSPTHHFGFEAAAWYWHFVDVVWLFLYMSIYWWGY
ND3	ILLFSMVIVLLPILMMLMNLSLSKKKNYNYEKMSPFECGFDPLSKSRLPFSIQFFMISLIFLIFDIEIALLIPLIL LMKKFSLTLIFTSLFFLLILLLGLLYEYTEKSLEWKI
ND5	IYKLIFYSYVLFLLFIMNMFFSMYLYMMSKDFLIEWVIYSVNSVMMEMYVLLDWISLLFISFVLMISSMV VLYSVIYMKSDKFLERFMYLLLLFILSMLMMILSPNLISILLGWDLLGLVSYCLVIFYQNYSSFNSGMVTV LSNRIGDVGILLSIGVSLMYGSWNIYLLENKVLLFSMILLGAITKSAQMPFSTWLPMAMAAPTPISSLVH SSTLVTAGVYLIIRFNNFIMSTKLNFVLLYLSVLTMLMSGIMALCEFDLKKIIALSTLSQLGLMMMILSMG LKLLGLYHLLTHAIFKSLLFLCAGILIHLSKGNQDIRCFGNFSDMLPFVNMSFFISILSLMGMPFFSGFYSK DLIMEMLFIKEVNLVMMSLILVSLSFTVFYSLRLYYFLYFNELKLESSVMVSENWLMNISMMFLMIFSVII GSLLNWLFFFDFSIIYLSVFVKMMSLFFLFLGALSWGLSVMLIKVLYMKSTIVVCSSMWFLNYFHYCMN IFFITFSEYFKLVDLEWVENISGKFSVKVKINTMKFYYSSYKLYNIIYSQMFMILFMYFILMN
ND4	MMKIFMMIIFMLVMIYYNMMIMFYMNLCFIVVFFMFFYFSISAGDYLGALSLYFGGDSYTFFMMMLS FWVVGLMFMTLLFENVSKMKLFMFNMMLLILVMFFSVYNLMLLYFFFEVSLIPTFFIVLFWGGNLERLE AGLYLMLYMLFISFPLLIYIMKIYWCSSSLDMSILSILVFNSMDKTVGSWEFLVMFGAFFIKLPIYLFHIWL PKAHVEAPVFGSMLLAAVLLKLGGYGLLRMMLMFIYSCQIYKNMVLSLGIMGALFVSVLCLTQVDMK SLVAYSSVVHMNFMLCAMLVLSKFSFMGSYIVMVSHGLCSSGLFFFVNVFYKRSFSRLISLNKGLISLM PSIGFWWFLLCVSNFSFPLSLNFLGEVMLIMMILNWGGEIFVFFIGLISFFSGAYSLYLFSVVYHGDIYYE QKIDMGFLSEHLVGFLHYFPLILLFLNLYMYTY
ND4L	IFFDLYFYLYLSLIAVGFLLIGVKYFLLLLIMMEMIIMNIAMFMYCVFLSSGLESVFIYYLVFSVCESVMGLV ILVLVIRYYGDDYYKSVSLVKF
ND6	MTNNLMILSLIWGMSLLMILIILTNLIHPSLMIMMMLMFNSLLCLNMNFWKSSLILPIIFFLIMVSGVLIIF LYFSSLISNEKIFPQVNLLSLMIFFINLLLMNLVNLYYFYSPPMDYIDHESLHTLKNYNNFMNSMMMLY KYPWSNLTLMSMIYLLIVLISTIKICSPKNKTMRKLQ
Cytb	MNKMLKTANSTLLNLPTPINISYWWNYGSLLGLFLMIQLISGTLLSMHYCPSTTHAFMSIIHIIQNVNQ GWLLHNIHINGASMFFICIYIHMGRGMYYHSFNLKKTWMVGTTIFALSMATAFLGYVLPWGQMSFW GATVITNLVTTTPYVGTMIVEWLWGGFAISNSTLNRFFSFHFLLPFIIIMMIILHLYFLHETGSKNPLGVN SNLYKIPFHIYFTIKDILGFLLFLMFFMMINLQYPYFFSDPDNFTQANPMITPTHIQPEWYFLFAYAILRAI PNKLGGVLALILSIMILYTQSWNKYFMGSNQFYPINQLLFWMFINTFVLLTFSGAQIIEFPYTNISQMLS FTYFIYFLLIHYTSMLWD
ND1	MMINLLIYFMMNLCSVLMVVIFVLVGVAFLTLLERKILSYLQLRKGPNKLGMVGIFQPFSDAIKLFTKEG LVILKSNYYIFYLCPMVFMFSMLFSWFLIPWFTNVYFMNYSLLFMFILMSLSGFMLLMMGWSSNSMFS LMGAVRFVAQSISYEVSFLLIIYCFMLLSESYSLSMLGVWQKYVWNIVFLFPIFVIFFISVLAEMNRSPMD LIEGESELVSGFNIEYFGGSFALIFMAEYGMIIFFSFIMGLIFFKVNTCGGFIFILMLFMILIIFMRGIMPRMR YDELMQLCWKVILPLVLIYLIILISFKFILLVIF

3.2. 蛋白质编码基因相对同义密码子使用

蛋白质编码基因相对同义密码子使用(Relative Synonymous Codon Usage, RSCU)，是指对于某一特定

的密码子在编码对应氨基酸的同义密码子间的概率，它除去了氨基酸组成对密码子使用的影响。理论上，如果没有选择压力，所有同义密码子的使用频率应该是相同的，即 RSCU 应该等于 1，当某一密码子的 RSCU 大于 1 时，说明该密码子为使用较多的密码子，反之亦然。本研究用 MEGA4.1 软件统计了 13 种蛋白质基因的序列(终止密码子除外)，总共 10,938 bp，然后计算了它们的 RSCU (见表 5)。

Table 5. Frequency statistics of relative synonymous cod on usage
表 5. 相对同义密码子使用频率统计

密码子(aa)	数量	RSCU	密码子(aa)	数量	RSCU	密码子(aa)	数量	RSCU
UUU(F)	296	1.63	UCU(S)	72	1.61	UAU(Y)	142	1.42
UUC(F)	67	0.37	UCC(S)	39	0.87	UAC(Y)	58	0.58
UUA(L)	296	3.18	UCA(S)	82	1.84	UAA(*)	0	0
UUG(L)	56	0.6	UCG(S)	14	0.31	UAG(*)	0	0
CUU(L)	66	0.71	CCU(P)	54	1.79	CAU(H)	44	1.19
CUC(L)	39	0.42	CCC(P)	38	1.26	CAC(H)	30	0.81
CUA(L)	91	0.98	CCA(P)	25	0.83	CAA(Q)	42	1.58
CUG(L)	11	0.12	CCG(P)	4	0.13	CAG(Q)	11	0.42
AUU(I)	328	1.51	ACU(T)	71	1.81	AAU(N)	134	1.58
AUC(I)	90	0.43	ACC(T)	17	0.43	AAC(N)	36	0.42
AUA(M)	259	1.74	ACA(T)	64	1.63	AAA(K)	97	1.6
AUG(M)	38	0.26	ACG(T)	5	0.13	AAG(K)	24	0.4
GUU(V)	82	1.9	GCU(A)	28	1.18	GAU(D)	40	1.36
GUC(V)	23	0.53	GCC(A)	30	1.26	GAC(D)	19	0.64
GUA(V)	55	1.27	GCA(A)	31	1.31	GAA(E)	51	1.34
GUG(V)	13	0.3	GCG(A)	6	0.25	GAG(E)	25	0.66
UGU(C)	30	1.58	CGU(R)	12	1.14	AGU(S)	24	0.54
UGC(C)	8	0.42	CGC(R)	2	0.19	AGC(S)	7	0.16
UGA(W)	78	1.81	CGA(R)	20	1.9	AGA(S)	86	1.93
UGG(W)	8	0.19	CGG(R)	8	0.76	AGG(S)	33	0.74
GGU(G)	35	0.84	GGA(G)	64	1.53			
GGC(G)	22	0.53	GGG(G)	46	1.1			

3.3. 基因重排

果蝇 *Drosophila yakuba* 为第一个被测序的昆虫线粒体基因组[16]，一般将果蝇的线粒体基因排列作为昆虫线粒体基因的模式排列(见图 4)。随着分子生物学研究的逐步深入与成熟，越来越多的昆虫线粒体基因组被测序，基因重排事件也不断被发现，其中以 tRNA 基因重排为主，同时还存在着基因的重复[17]-[22]。基因重排事件主要有四种形式包括基因移位、基因洗牌、倒置和异位倒置，其中 CR-ND2、ND2-COI、COII-ATP8、ND3-ND5 是基因重排的热点区域[23] [24]。本研究中的西藏粗角猛蚁发生两处基因重排，即发生在 CR-ND2 区的基因洗牌和 ND3-ND5 区的基因倒置(见图 5)。

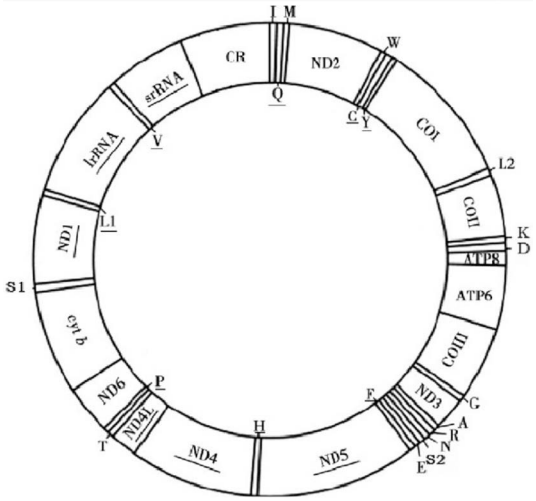


Figure 4. Original arrangement of insect mitochondrial genome (speculation)
图 4. 昆虫线粒体基因组原始排列(推测)

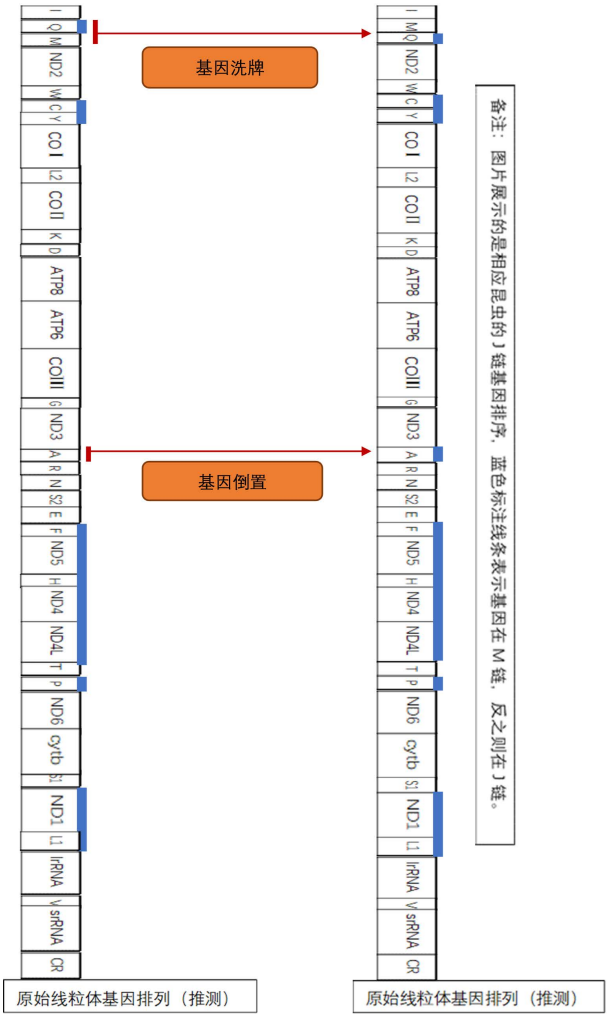


Figure 5. Gene rearrangement schematic diagram
图 5. 基因重排示意图

4. 总结与讨论

本文测定了西藏粗角猛蚁的线粒体基因组全序列，丰富了我国蚁科昆虫的基因数据，还创造性地改进了环状 DNA 缺口处的引物设计方法，克服了昆虫线粒体基因组高 A + T 含量造成的扩增困难。通过注释和基因位置的分析，发现了两处基因重排现象。本研究发现的 tRNA 基因 U-U 错配问题，可能是因为测序误差而引起，也可能是因为基因突变，或者本身就是如此。这个问题还有待进一步的研究。

致　谢

湖南师范大学博士研究生黄超洋为本实验引物设计提出了很好的建议，广西师范大学研究生唐祺玲介绍实验方法和数据分析软件，在此谨表谢意！

基金项目

国家自然科学基金项目(31672343)和科技基础性工作专项重点项目(2015FY210300)资助。

参考文献

[1] Boore, J.L. (1999) Animal Mitochondrial Genomes. *Nucleic Acids Research*, **27**, 1767-1780. https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767

[2] Wang, Y., Chen, J., Jiang, L.Y., *et al*. (2015) Hemipteran Mitochondrial Genomes: Features Structures and Implications for Phylogeny. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 12382-12404. https://doi.org/10.3390/ijms160612382

[3] Amaral, D.T., Mitani, Y., Ohmiya, Y., *et al*. (2016) Organization and Comparative Analysis of the Mitochondrial Genomes of Bioluminescent Elateroidea (Coleoptera: Polyphaga). *Gene*, **586**, 254-262. https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.009

[4] Beagley, C.T., Okada, N.A. and Wolstenholme, D.R. (1996) Two Mitochondrial Group I Introns in a Metazoan, the Sea Anemone *Metridium senile*: One Intron Contains Genes for Subunits 1 and 3 of NADH Dehydrogenase. *Processdings of the National Academy of Sciences*, **93**, 5619-5623. https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5619

[5] Fukami, H., Chen, C.A., Chiou, C.Y., *et al*. (2007) Novel Group I Introns Encoding a Putative Homing Endonuclease in the Mitochondrial Cox1 Gene of *Scleractinian Corals*. *Journal of Molecular Evolution*, **64**, 591-600. https://doi.org/10.1007/s00239-006-0279-4

[6] Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., *et al*. (1994) Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 651-701. https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651

[7] Cameron, S.L., Dowton, M., Castro, L.R., *et al*. (2008) Mitochondrial Genome Organization and Phylogeny of Two Vespid Wasps. *Genome*, **51**, 800-808. https://doi.org/10.1139/G08-066

[8] Gotzek, D., Clarke, J. and Shoemaker, D. (2010) Mitochondrial Genome Evolution in Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae). *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 1-13. https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-300

[9] Hasegawa, E., Kobayashi, K. and Yagi, N. (2011) Complete Mitochondrial Genomes of Normal and Cheater Morphs in the Parthenogenetic Ant *Pristomyrmex punctatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, **15**, 85-90.

[10] Berman, M., Austin, C.M. and Miller, A.D. (2014) Characterisation of the Complete Mitochondrial Genome and 13 Microsatellite Loci through Next-Generation Sequencing for the New Caledonian Spider-Ant. *Leptomyrmexpallens*. *Molecular Biology Reports*, **41**, 1179-1187. https://doi.org/10.1007/s11033-013-2657-5

[11] de Melo Rodovalho, C., Lyra, M.L. and Ferro, M. (2014) The Mitochondrial Genome of the Leaf-Cutter Ant *Atta laevigata*: A Mitogenome with a Large Number of Intergenic Spacers. *PLoS ONE*, **9**, 1-9.

[12] Babbucci, M., Basso, A., Scupola, A., *et al*. (2014) Is It an Ant or a Butterfly? Convergent Evolution in the Mitochondrial Gene Order of Hymenoptera and Lepidoptera. *Genome Biology and Evolution*, **6**, 3326-3343. https://doi.org/10.1093/gbe/evu265

[13] Kim, M.J., Hong, E.J. and Kim, I. (2015) Complete Mitochondrial Genome of *Camponotus atrox* (Hymenoptera: Formicidae): A New tRNA Arrangement in Hymenoptera. *Genome*, **59**, 59-74. https://doi.org/10.1139/gen-2015-0080

[14] Yang, S., Li, X., Cai, L.G. and Qian, Z.Q. (2016) Characterization of the Complete Mitochondrial Genome of *Formica selysi* (Insecta: Hymenoptera: Formicidae: Formicinae). *Mitochondial DNA*, **27**, 3378-3380.

https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1018229

[15] 唐觉, 李参. 西藏昆虫[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 371-374.

[16] Clary, D.O. and Wolstenholme, D.R. (1985) The Mitochondrial DNA Molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide Sequence, Gene Organization and Genetic Code. *Journal of Molecular Evolution*, **22**, 252-271. https://doi.org/10.1007/BF02099755

[17] Crozier, R.H. and Crozier, Y.C. (1993) The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetics*, **133**, 97-117.

[18] Szymura, J., Lunt, D. and Hewitt, G. (1996) The Sequence of the Meadow Grasshopper (*Chorthippus parallelus*) Mitochondrial srRNA, ND2, CO1, CO2, ATPase8 and 9 tRNA Genes. *Insect Molecular Biology*, **5**, 127-139. https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1996.tb00047.x

[19] Dowton, M., Belshaw, R., Austin, A.D., *et al*. (2002) Simultaneous Molecular and Morphological Analysis of Braconid Relationships (Insecta: Hymenoptera: Braconidae) Indicates Independent mt-tRNA Gene Inversions within a Single Wasp Family. *Journal of Molecular Evolution*, **54**, 210-226. https://doi.org/10.1007/s00239-001-0003-3

[20] Dowton, M., Stephen, L., Cameron, J., *et al*. (2009) Characterization of 67 Mitochondrial tRNA Gene Rearrangements in the Hymenoptera Suggests That Mitochondrial tRNA Gene Position Is Selectively Neutral. *Molecular Biology and Evolution*, **26**, 1607-1617. https://doi.org/10.1093/molbev/msp072

[21] Tay, W.T., Elfekih, S., Court, L., *et al*. (2014) Complete Mitochondrial DNA Genome of Bemisiatabaci Cryptic Pest Species Complex Asia II-5 (Hemiptera: Aleyrodidae). *Mitochondial DNA*, **27**, 1-2.

[22] Nishimoto, M., Okuyama, H., Kiyoshi, T., *et al*. (2017) Complete Mitochondrial Genome of the Japanese Bumblebee, Bombus Hypocrita Hypocrita (Insecta: Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part B*, **2**, 19-20. https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1275849

[23] Dowton, M. and Austin, A.D. (1999) Evolutionary Dynamics of a Mitochondrial Rearrangement "Hot Spot" in the Hymenoptera. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 298-309. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026111

[24] Dowton, M., Castro, L.R., Campbell, S.L., *et al*. (2003) Frequent Mitochondrial Gene Rearrangement at the Hymenopteran nad3-nad5 Junction. *Journal of Molecular Evolution*, **56**, 517-526. https://doi.org/10.1007/s00239-002-2420-3

Hans 汉斯

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD
   下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-5507，即可查询
2. 打开知网首页 http://cnki.net/
   左侧"国际文献总库"进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：http://www.hanspub.org/Submission.aspx
期刊邮箱：hjas@hanspub.org