

# 大足鼠耳蝠短波视蛋白基因的 RACE 扩增及其进化分析

茹炳华<sup>①</sup> 周莹莹<sup>①</sup> 李婵娟<sup>①</sup> 王力<sup>①</sup> 赵华斌<sup>①②\*</sup>

(<sup>①</sup>华东师范大学生命科学学院 上海 200062; <sup>②</sup>中国科学院动物研究所 北京 100101)

**摘要:** 根据几种哺乳动物的短波视蛋白基因的比对结果, 在保守区设计两条基因特异引物扩增足鼠耳蝠 (*Myotis ricketti*) 的短波视蛋白基因, 用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 扩增出其 5' 和 3' 末端序列, 并结合 GenBank 中相关哺乳动物短波视蛋白基因编码区进行了进化分析。结果显示, 该基因编码区全长为 1 050 bp, 共编码 350 个氨基酸, 没有发现提前终止密码子, 且功能区严格保守, 提示是一个有功能的基因; 5 个关键氨基酸位点分别为 52 T、86 F、93 T、114 A 和 118 S, 表明该蝙蝠的短波视蛋白对紫外光最敏感。进化分析表明, 兽类的短波视蛋白基因受到正选择压力的影响; 相对速率检验结果显示, 大足鼠耳蝠与其他兽类的短波视蛋白基因进化速率有明显的差异。提示大足鼠耳蝠的该基因可能发生了功能特化, 可能对其夜晚视觉有重要的作用。

**关键词:** 大足鼠耳蝠; 短波视蛋白基因; RACE; 紫外光

中图分类号: Q751 文献标识码: A 文章编号: 0250 3263(2008)06-43-08

## Short Wavelength sensitive (SWS) *Opsin* Gene in *Myotis ricketti*: RACE Amplification and Evolutionary Analysis

RU Bing-Hua<sup>①</sup> ZHOU Ying-Ying<sup>①</sup> LI Chan Juan<sup>①</sup> WANG Li<sup>①</sup> ZHAO Hua Bin<sup>①②\*</sup>

(<sup>①</sup> School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062;

<sup>②</sup> Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** The gene special primers (GSP) were designed based on the short wavelength sensitive (SWS) *Opsin* genes of primates, mice, cow and dog. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) were used for amplifying 5' end and 3' end sequences of SWS *Opsin* gene of *Myotis ricketti*. The results show that the gene contains 1 050 bp in the coding region, encodes 350 amino acids, and lacks premature stop codons. In comparison with other mammals, the functionally important seven transmembrane regions of the SWS *Opsin* gene are highly conserved, suggesting that it is a functional gene; and the key functional sites are 52 T, 86 F, 93 T, 114 A and 118 S, respectively, implying that the SWS *Opsin* of *M. ricketti* is sensitive to the ultraviolet (UV) light. Evolutionary analysis shows that positive selection has imposed on SWS *Opsin* in mammals, and the evolutionary rates of this gene have significant differences between *M. ricketti* and other mammals inferred by relative ratio test. Our study suggests that the SWS *Opsin* of *M. ricketti* have functional specialization, and thus may play an important role in bat vision in the night.

**Key words:** *Myotis ricketti*; Short wavelength sensitive (SWS) *Opsin* gene; RACE; Ultraviolet light

动物的视觉形成主要依赖于视网膜上的光感受细胞, 根据其形态和功能的不同可分为视杆细胞 (rods) 和视锥细胞 (cones) 两类。其中, 哺乳动物的视锥细胞根据其所感受光波范围的不同分为三种: 长波 (long wavelength sensitive, LWS)、中波 (middle wavelength sensitive, MWS)

和短波 (short wavelength sensitive, SWS) 敏感视

基金项目 华东师范大学 985 工程重点资助项目;

\* 通讯作者, E-mail: huabin.zhao@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 茹炳华, 女, 硕士研究生; 研究方向: 兽类分子进化; E-mail: waoc0.1@163.com.

收稿日期: 2008-05-07, 修回日期: 2008-07-29

锥细胞: 它们分别含有相对应的视色素, 这些视色素是由视蛋白和生色团结合而成。哺乳动物的生色团绝大多数都是 11-顺式视黄醛, 只是视蛋白的分子结构略有不同。但正是由于视蛋白分子结构中这种微小的差异, 才决定了与之结合的视黄醛分子对某种波长的光线最为敏感<sup>[1,2]</sup>。因此, 视蛋白基因是研究视觉功能的重要手段之一。

翼手目 (Chiroptera) 俗称蝙蝠, 物种多样性丰富, 现存约 1 116 种, 是哺乳动物的第二大目<sup>[3]</sup>, 然而关于翼手目动物视蛋白的研究尚少。蝙蝠几乎皆为夜行性动物, 其短波视蛋白可能与其夜行性相适应并具有相应的特点。本研究以蝙蝠科鼠耳蝠属的大足鼠耳蝠 (*Myotis ricketti*) 为研究对象, 应用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 得到短波视蛋白基因的编码区全长, 分析该视蛋白的功能及其在夜行生活中的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂 大足鼠耳蝠采自中国

蝙蝠研究与保护基地——北京市房山区霞云岭乡四合村蝙蝠洞 (39°42.1'N, 115°43.2'E, 海拔 712 m)。将其中一个个体解剖, 取脑组织, 用液氮运回实验室, -80℃ 保存备用。

总 RNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、pMD19-T 载体和 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA Marker、IPTG、X-gal、大肠杆菌 DH5-a 购自上海 Tiangen 生物科技有限公司; 琼脂粉、琼脂糖、氨卞青霉素购自上海鼎国生物科技有限公司; RACE 采用 Clontech 公司的 SMART RACE 试剂盒; 其他试剂均为国产分析纯。

**1.2 引物设计** 根据 NCBI 中的哺乳动物短波视蛋白基因序列的保守区, 使用 Primer 5 软件 (Plymouth Marine Laboratories, UK) 设计了 5' 和 3' 端的 RACE 基因特异性引物 (gene special primers, GSP): MR5、MR3。引物序列及 PCR 得到的目的片段长度见表 1, 为了减少非特异带的扩增, 设计的 GSP 引物长度分别为 27 和 29 个核苷酸, GC 含量均高于 50%, T<sub>m</sub> 大于 70℃。

**1.3 总 RNA 的提取** 取大足鼠耳蝠的脑组织于研钵中, 迅速加液氮研磨, 采用 TaKaRa 总 RNA

表 1 大足鼠耳蝠短波长视蛋白基因的特异引物及 PCR 扩增目的片段

Table 1 PCR primers and target fragments for SWS Opsin gene of *Myotis ricketti*

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	目的片段 Target fragments (bp)
MR5	5' GCTGCCGAAGGGCTTACAGACGACAAT 3'	≥470
MR3	5' TATTGGCGTCTCCATCCACCCTTCTTTG 3'	≥565

提取试剂: 加入 1 ml RNAiso Regent 匀浆, 消化组织; 待组织融化后加 1/5 RNAiso Reagent 体积的氯仿, 用于除去蛋白等物质, 12 000 r/min 离心后, 取上清液于一干净离心管, 加等体积异丙醇, 室温沉淀 10 min, 12 000 r/min 离心, 于沉淀中加 1 ml 75% 乙醇以除去残留杂质, 12 000 r/min 离心去乙醇; 最后, 将沉淀在室温干燥 5 min, 加适量 DEPC 水溶解 RNA。

**1.4 RACE 扩增 RNA 的反转录** 第一链 cDNA 合成反应体系如下: 3 μl 总 RNA, 1 μl 5'/3'-CDS primer A, 加水至 5 μl 转移到 0.2 ml 离心管, 混匀, 稍离心, 70℃ 加热 2 min, 立即放入冰

水浴中冷却 2 min, 稍离心, 将溶液收集到管底。在反应管中加入 2 μl 5× 反转录酶缓冲液, 1 μl DTT (20 mmol/L)、1 μl dNTPs (10 mmol/L)、1 μl PowerScript 反转录酶, 混匀, 稍离心, 42℃ 温浴保温 90 min, 加 100 μl Tris-EDTA 缓冲液以稀释反转录产物, 72℃ 加热 7 min 终止反应。获得的 cDNA 保存于 -80℃, 做为 RT-PCR 反应的模板。

**1.5 目的片段扩增** 用 RACE 试剂盒附带的通用引物 (UPM) 及 GSP 引物 MR5 和 MR3 分别进行 PCR 扩增。配制 Master Mix: 6.9 μl PCR 梯度水, 1 μl 10× Advantage 2 PCR 缓冲液, 0.2 μl

dNTP 混合物 (10 nmol/L), 0.2  $\mu$ l 50  $\times$  Advantage 2 聚合酶混合物。PCR 反应体系为: 0.5  $\mu$ l 5'/3' RACE 备用 cDNA, 1  $\mu$ l 10  $\times$  UMP, 0.2  $\mu$ l GPS 引物, 8.3  $\mu$ l Master Mix。按上述体系加好后, 置于 PCR 仪中。反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 循环 5 次; 再 94  $^{\circ}$ C 30 s, 70  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 循环 5 次; 再 94  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 循环 25 次; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

**1.6 目的片段的纯化、克隆及鉴定** 扩增结束后, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 切取  $\geq 470$  bp (5' RACE) 和  $\geq 565$  bp (3' RACE) 目的条带, 用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification kit 2.0 做胶回收。取回收产物中的 4.5  $\mu$ l 做连接, 载体为 pMD19-T simple vector 0.5  $\mu$ l, 加 5  $\mu$ l Solution I, 16  $^{\circ}$ C 连接 2 h。

取 5  $\mu$ l 连接产物加 100  $\mu$ l Top10 感受态细胞做转化, 应用  $\alpha$  互补蓝白斑检测及特异引物 PCR 扩增, 挑选出含有目的片段的阳性单克隆, 送上海 Invitrogen 公司测序。

**1.7 序列分析** 测定的序列在 Blast 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 进行在线搜索, 确定是目的基因; 用 Clustalx 1.81<sup>[4]</sup> 和 Mega 3.1<sup>[5]</sup> 软件对所测序列进行对位排列分析。

**1.8 进化分析** 从 GenBank 中收集了其他 19 种哺乳动物的短波视蛋白编码区全长序列, GenBank 登录号分别为: 塔马尔沙袋鼠 (*Macropus eugenii*), AY286017; 短尾灰沙袋鼠 (*Setonix brachyurus*), AY726545; 短鼻袋狸 (*Isoodon obesulus*), AY726544; 非洲象 (*Loxodonta africana*), AY686753; 牛 (*Bos taurus*), NM-174567; 野猪 (*Sus scrofa*), AY091587; 黑猩猩 (*Pan troglodytes*), NM-001009127; 人 (*Homo sapiens*), DQ822478; 猕猴 (*Macaca mulatta*), XM-001091869; 食蟹猴 (*Macaca fascicularis*), AF158977; 黑带卷尾猴 (*Cebus olivaceus*), AF039424; 亚马逊松鼠猴 (*Saimiri boliviensis*), U53875; 马 (*Equus caballus*), XM-001502735; 邦加眼镜猴 (*Tarsius bancanus*), DQ191949-53; 狗 (*Canis familiaris*), XM-539386; 豚鼠 (*Cavia*

*porcellus*), AY552608; 灰松鼠 (*Sciurus carolinensis*), DQ302163; 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*), NM-031015; 小鼠 (*Mus musculus*), NM-007538。

相对速率检验用 RRTree 1.1<sup>[6]</sup> 计算。首先用编码区全长序列作为输入文件, 计算出大足鼠耳蝠与其他 19 种兽类的同义替换速率 ( $K_s$ ) 差异及非同义替换速率 ( $K_a$ ) 差异; 再用氨基酸序列作为输入文件, 计算出大足鼠耳蝠与其他兽类的氨基酸差异。所有的差异都用  $P$  值表示。如果  $P$  值小于 0.05, 表明两条序列间有显著性差异。

非同义替换率与同义替换率的比值 ( $\omega = d_n/d_s$ ) 可以用来估算编码蛋白质基因的选择压力。假定同义突变符合严格的中性进化模式, 那么,  $\omega < 1$ ,  $\omega = 1$ ,  $\omega > 1$  就分别表示纯化选择、中性进化以及达尔文正选择<sup>[7,8]</sup>。用 PAML 软件包中的 Codeml 程序分析基因所受的选择压力<sup>[8,9]</sup>。Site specific 模型被应用于可能的正选择检测<sup>[8-10]</sup>。本文应用 3 对 Site specific 模型: M0 模型把所有氨基酸位点作为一类, 只能估算一个进化速率值; M3 模型把所有氨基酸位点分成三类, 模拟了一个非限制的离散分布; M1a 模型把所有位点分为两类, 一类的进化速率限制在  $0 < \omega_0 < 1$ , 另外一类限制为等于 1; M2a 是 M1a 的扩展模型, 增加了第三类位点, 这一类位点的进化速率可以大于 1; M7 模型用 beta 分布来模拟进化速率, 但是限制所有位点的进化速率都小于 1; M8 模型在 M7 的基础上, 增加了一类位点, 这类位点允许  $\omega > 1$ 。所有模型的输入树都是参考 Murphy 等的哺乳动物物种树<sup>[11]</sup>。似然率检验被用于检测正选择。本研究采用 3 对似然率检验: M0 vs M3, M1a vs M2a 和 M7 vs M8。两个模型似然值差的两倍被模拟成卡平方分布, 自由度 ( $df$ ) 为两个模型的参数差。如果两个模型间有显著性差异, 而且其中一类位点的进化速率  $\omega > 1$ , 就表明这个基因可能受到正选择压力。

## 2 结果

### 2.1 RACE 扩增结果 5'/3' RACE 由特异引

物 MR5/3 以第一链 cDNA 为模板进行扩增, 电泳检测扩增片段 (图 1)。其中, 5' RACE 的目的条带为 500 bp 左右的单一片段; 3' RACE 扩

增结果为一条约 1 500 bp 的条带。两种条带分别经过克隆和测序并在 Blast 网站进行在线搜索, 结果表明均为目标片段。

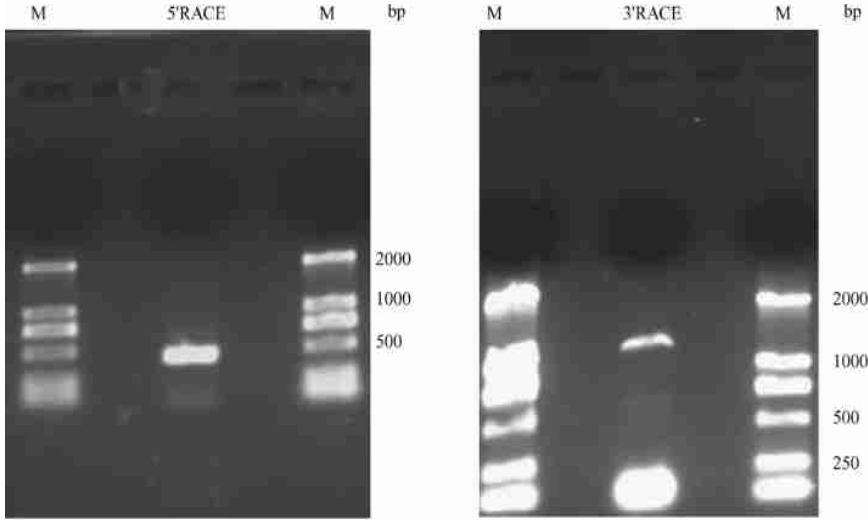


图 1 RACE 扩增结果电泳图

Fig 1 Electrophoretograms of RACE product

M. DL2000 DNA 分子量标准。M. DL2000 DNA marker.

## 2.2 序列分析

2.2.1 大足鼠耳蝠短波视蛋白基因 mRNA 序列 将以上测序结果进行拼接, 得到的序列全长为 1 554 bp, 其中 5' 非翻译区 (UTR) 为 67 bp, 3' UTR 为 437 bp, 编码区全长为 1 050 bp, 共编码 350 个氨基酸。全部编码区包括 5 个外显子, 分别为 355 bp、169 bp、166 bp、240 bp 和 120 bp (图 2)。用 BLAST 与核酸数据库进行比对, 结果显示来源于大足鼠耳蝠与来源于相关哺乳动物的短波视蛋白基因序列的同源性为 95% 以上。该序列已经提交到 GenBank (登录号为 EU662250)。

2.2.2 对位排列、同源性分析 将所得序列的编码区与狗、牛、人、小鼠的相应基因序列进行了对位排列。结果显示, 大足鼠耳蝠与以上 4 个哺乳动物代表物种的同源性分别为 91%、90%、89% 和 86%, 表明翼手类短波视蛋白基因与食肉类、偶蹄类的亲缘关系较近, 而与灵长类、啮齿类的亲缘关系较远。5 种哺乳动物短波视蛋白基因的氨基酸对位排列结果显示, 大

足鼠耳蝠的短波视蛋白的 7 个跨膜功能区<sup>[12]</sup>, 其位置分别为 35~ 64、71~ 100、106~ 140、150~ 174、201~ 226、242~ 279、286~ 309 (图 3)。而且, 大足鼠耳蝠与其他哺乳动物短波视蛋白的 7 个跨膜功能区非常保守。

短波视蛋白对光吸收特性的 5 个关键位点的位置与牛的视紫红质 (rhodopsin) 相对应, 分别为 52、86、93、114 和 118 (氨基酸位置, 图 3)<sup>[13, 14]</sup>。大足鼠耳蝠在这 5 个位点的氨基酸分别为苏氨酸 (T)、苯丙氨酸 (F)、苏氨酸 (T)、丙氨酸 (A) 和丝氨酸 (S) (图 3), 与具有紫外视觉的啮齿类<sup>[13]</sup>、爬行类<sup>[14]</sup> 相同, 提示大足鼠耳蝠的短波视蛋白很可能对紫外光最敏感。

## 2.3 进化分析

2.3.1 相对速率检测 相对速率检测结果 (表 2) 显示, 大足鼠耳蝠的短波视蛋白基因与其他兽类的非同义替换率 (Ka) 和氨基酸差异的 P 值大都小于 0.05, 同义替换率 (Ks) 差异的 P 值多数大于 0.05。但是, 影响蛋白质性质及功能变化的主要是非同义替换和氨基酸差异。因此

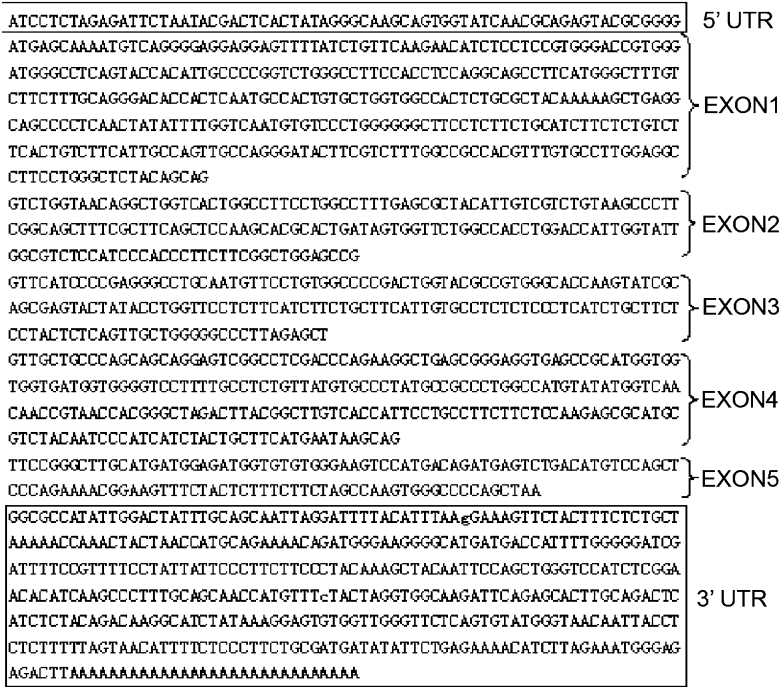


图 2 大足鼠耳蝠短波视蛋白基因 mRNA

Fig 2 mRNA nucleotide sequence of SWS Opsin gene from Myotis ricketti

UTR 为非翻译区, EXON 1~ 5 为 5 个外显子。UTR means untranslated region; EXON 1- 5 indicate the five exons of this gene.

表 2 大足鼠耳蝠与其他 19 种兽类的非同义替换率 (Ka)、同义替换率 (Ks)、氨基酸 (aa) 的差异 (P 值)

Table 2 Pairwise nonsynonymous (Ka) and synonymous (Ks) substitutions and amino acid (aa) variation between Myotis ricketti and other 19 species of mammals (P value)

两两比较物种 Species compared pairwise	非同义替换率差异 Ka differences	同义替换率差异 Ks differences	氨基酸差异 aa differences
黑猩猩 <i>Pan troglodytes</i>	0.056	0.243	0.075
人 <i>Homo sapiens</i>	0.056	0.301	0.075
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	0.013	0.448	0.035
食蟹猴 <i>M. fascicularis</i>	0.010	0.315	0.024
黑带卷尾猴 <i>Cebus olivaceus</i>	0.016	0.758	0.004
亚马逊松鼠猴 <i>Saimiri boliviensis</i>	0.040	0.945	0.028
马 <i>Equus caballus</i>	0.019	0.570	0.011
邦加眼镜猴 <i>Tarsius bancanus</i>	0.061	0.134	0.017
大足鼠耳蝠 <i>Myotis ricketti</i>			
野猪 <i>Sus scrofa</i>	0.005	0.385	0.009
牛 <i>Bos taurus</i>	0.091	0.838	0.249
狗 <i>Canis familiaris</i>	0.573	0.740	0.620
非洲象 <i>Loxalonta Africana</i>	0.252	0.475	0.083
豚鼠 <i>Cavia porcellus</i>	0.003	0.487	0.002
灰松鼠 <i>Sciurus carolinensis</i>	0.135	0.768	0.173
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	0.067	0.597	0.058
小鼠 <i>Mus musculus</i>	0.274	0.332	0.193
塔马尔沙袋鼠 <i>Macopus eugenii</i>	0.001	0.000	0.004
短尾灰沙袋鼠 <i>Setonix trachyurus</i>	0.001	0.000	0.004
短鼻袋狸 <i>Isalodon obesulus</i>	0.000	0.000	0.000

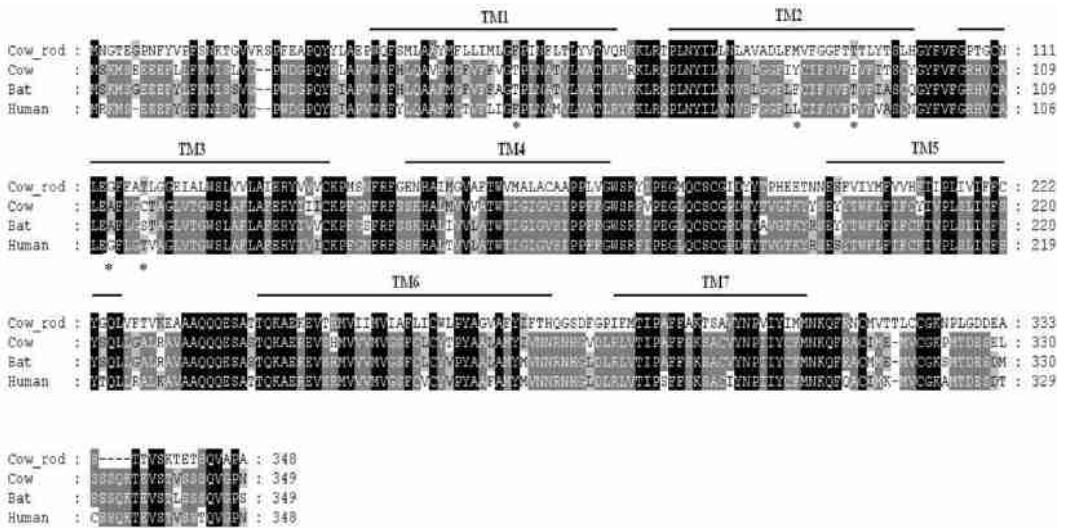


图3 3种哺乳动物(人、牛和大足鼠耳蝠)短波视蛋白氨基酸序列的排列比对  
**Fig 3 Multiple alignment of SWS opsin amino acids sequences of three species of mammals (Human, Cow and *Myotis ricketti*)**

Cow\_ rod 为牛的视紫红质序列, 用其对应短波视蛋白的氨基酸位置, GenBank 登陆号为 NM\_001014890; Bat 为本文测定的大足鼠耳蝠的氨基酸序列; Cow 和 Human 分别为牛和人的短波视蛋白序列; TM1~ TM7 分别表示 7 个跨膜功能区; 黑色阴影部分为相同的位点, 灰色阴影为相似的位点; \* 为 5 个关键功能位点。

Cow\_ rod denotes the rhodopsin amino acids sequence of cow, showing the amino acids positions of SWS opsins, GenBank accession no. is NM\_001014890; Bat refers to the sequence of *Myotis ricketti* examined in this study; Cow and Human indicate the amino acid sequences of cow and human, respectively. Seven transmembrane functional regions are shown by black bars; Identical sites are shaded in dark, while similar sites are shaded in gray; Five functionally important sites are indicated by asterisks

可以推断, 大足鼠耳蝠与其他兽类的短波视蛋白的进化速率有显著性差异。

**2.3.2 选择压力分析** Site-specific 模型的计算结果及似然率检验(LRT)见表 3 和表 4。M2a 模型没有检测到正选择位点的存在, 而且与 M1a 模型的似然值比较接近。因此, 这一对模型的似然率检验得到的  $P$  值为 0.056, 没有统计学意义。离散模型(M3)计算结果显示, 9% 的氨基酸位点受到正选择压力的影响, 这些位点的  $\omega$  值为 1.16, 检测到 11 个正选择位点: 43I、49M、78L、84P、88A、91N、105G、110V、214T、316T、321T, 贝叶斯后验概率值 (Bayesian posterior probability) 都在 95% 以上; 似然率检验表明, M3 和 M0 模型之间有显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 提示 M3 模型更适合本研究的数据。M8 模型估算到 2% 的氨基酸位点受到了正选择压力的影响, 这类位点的  $\omega$  值为 2.21, 同时

也检测到了 2 个后验概率值都大于 95% 的正选择位点: 43I、91N; M7 和 M8 模型的似然率比较显示, 这一对模型之间有显著性差异 ( $P = 0.002$ ), 因此, M8 模型更适合所分析的数据。

### 3 讨论

**3.1 RACE 技术** RACE 技术于 1988 年首次提出, 是一种以 PCR 反应为基础, 应用通用引物和特异引物从低丰度转录本中快速扩增已知 cDNA 片段旁侧 5' 和 3' 末端的简单而有效的方法, 又被称为单边 PCR (one-sided PCR) 或锚定 PCR (anchored PCR)<sup>[15]</sup>。与经典的通过 cDNA 文库筛选进而克隆全长 cDNA 的方法相比, 该方法实验周期短、技术步骤简单, 同时可免去接触同位素对人体的危害。因此, RACE 技术已成为克隆未知基因全长 cDNA 序列的常用手段。Clontech 公司于 1999 年推出的 SMART RACE 技

表 3 短波视蛋白基因选择压力分析的似然值和参数估计

Table 3 Likelihood values and parameter estimates for the SWS *Opsin* genes

模型 Model	似然值 Likelihood value	参数个数 Number of parameter	参数估算 Estimate of parameters	正选择位点 Positive selection sites
M0	- 6 222.7640	$\omega = 0.15$	无	
M1a	- 6 054.09	41	$\rho_0 = 0.83$ ( $\rho_1 = 0.17$ ), $\omega_0 = 0.06$ , $\omega_1 = 1.00$	不估算
M2a	- 6 051.20	43	$\rho_0 = 0.83$ , $\rho_1 = 0.16$ ( $\rho_2 = 0.01$ ); $\omega_0 = 0.06$ , $\omega_1 = 1.00$ ( $\omega_2 = 3.69$ )	无
M3	- 6 032.49	44	$\rho_0 = 0.61$ , $\rho_1 = 0.30$ ( $\rho_2 = 0.09$ ); $\omega_0 = 0.01$ , $\omega_1 = 0.27$ ( $\omega_2 = 1.16$ )	43I <sup>**</sup> , 49M <sup>*</sup> , 78L <sup>*</sup> , 84P <sup>**</sup> , 88A <sup>**</sup> , 91N <sup>**</sup> , 105G <sup>*</sup> , 110V <sup>*</sup> , 214I <sup>*</sup> , 316I <sup>*</sup> , 321I <sup>**</sup>
M7	- 6 037.74	41	$p = 0.19$ , $q = 0.84$	不估算
M8	- 6 031.40	43	$\rho_0 = 0.98$ , $p = 0.22$ , $q = 1.16$ , $\rho_1 = 0.02$ , $\omega = 2.21$	43I <sup>*</sup> , 91N <sup>*</sup>

\* 表示后验概率值大于 95%, \*\* 表示后验概率值大于 99%。

\* Means the PS site with posterior probability greater than 95%, \*\* Means the PS site with posterior probability greater than 99%.

表 4 短波视蛋白基因的似然率检验(LRT)

Table 4 Likelihood ratio test statistics for the SWS *Opsin* gene

似然率检验 LRT	似然值差的倍数 $2\Delta^1$	自由度 $df$	$P$ 值 $P$ value
M3 vs. M0	380.54	4	< 0.001
M2 vs. M1	5.77	2	0.056
M7 vs. M8	12.69	2	0.002

术,与其他 RACE 技术相比,最大特点是 5' RACE 过程中的“模板跳转”现象,由于上述过程无需接头连接,而且直接以第一链 cDNA 作为模板进行 RACE-PCR,因此更加简便、快捷<sup>[16]</sup>。本文运用 RACE 技术快速扩增了大足鼠耳蝠短波视蛋白基因 cDNA 编码区全长序列,实验效果良好,值得在以后的研究中广泛应用和推广。

**3.2 大足鼠耳蝠的短波视蛋白基因** Wang 等测定了两种大蝙蝠(简果蝠 *Haplonycteris fischeri*、琉球果蝠 *Pteropus dasymallus*)和一种小蝙蝠(洞鼠耳蝠 *M. velifer*)的短波视蛋白基因,结果显示,这 3 种蝙蝠的该基因都是有功能的,并且都对紫外光最敏感<sup>[17]</sup>。但是, Wang 等<sup>[17]</sup>只是测定了该基因的部分序列,即第 1 外显子的部分、第 2 和第 3 外显子的全长、第 4 外显子的部分,共 795 bp。本文测定了大足鼠耳蝠短波视蛋白基因的全长,结果也表明该种蝙蝠可能对紫外光最敏感。

蝙蝠几乎都是夜行性动物,而短波视蛋白存在于视锥细胞中,具有在亮光下视物的明视觉功能,并且对夜晚的弱光较不敏感。近年来,人们发现了许多夜行性灵长类<sup>[18]</sup>、啮齿类<sup>[19]</sup>以及食肉类<sup>[20]</sup>的短波视蛋白基因丧失了功能,提示该基因的功能丧失可能与长期的夜行生活有关。然而, Winter 等<sup>[21]</sup>认为夜晚也有少量的光,相对于白天,波长较短,也就是说夜晚的短波光相对较多,并且发现了一种食花的叶口蝠(形长舌蝠 *Glossophaga soricina*)能看见花冠反射的紫外光而觅食。因此,对紫外光敏感的短波视蛋白可能利用夜晚相对较多的短波光,帮助食花、食果蝙蝠寻找食物。

然而,大足鼠耳蝠主要捕食昆虫和鱼类<sup>[22,23]</sup>,为什么有一个有完整的且很可能有功能的短波视蛋白呢? Wang 等认为,可能蝙蝠进入夜行生活的时间较短,该基因还没有来得及发生较多突变,导致该基因功能尚未丧失<sup>[17]</sup>。需要指出的是,蝙蝠有 1 000 多个物种, Wang 等只是研究了 3 个物种,并推测出上述结论,缺乏充分的科学依据。其实,蝙蝠是一类古老的动物类群,在距今约 6 400 万年前就分化形成<sup>[24]</sup>,认为蝙蝠只是经历了短暂的夜间生活有待商榷。本文第一次对大足鼠耳蝠的短波视蛋白基因进行了序列测定,发现该视蛋白基因与其他哺乳动物的直系同源基因序列的进化速率有显著性差异,表明该基因在兽类中并不是很保守

的。另外,进化分析表明,该基因的部分位点受到了正选择压力的影响,提示该基因可能为了适应大足鼠耳蝠的夜晚生活,已经在部分位点上发生了适应性的功能特化,进一步说明该视蛋白对大足鼠耳蝠的视觉可能有重要作用。值得一提的是,蝙蝠的物种多样性丰富,其视觉的进化可能非常复杂,仅仅对一种或几种蝙蝠的视蛋白基因进行分析,很难得到令人信服结论。因此,对于蝙蝠视觉进化的认识,有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Yokoyama S, Yokoyama R. Adaptive evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates. *Annu Rev Ecol Syst.*, 1996, **27**: 543~ 567.
- [ 2 ] Yokoyama S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2000, **19**: 385~ 419.
- [ 3 ] Simmons N B. Order Chiroptera. In: Wilson D E, Reeder D M eds. *Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005, 312~ 529.
- [ 4 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 4 876~ 4 882.
- [ 5 ] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150~ 163.
- [ 6 ] Robinson R M, Hudon D. RRTree: Relative rate tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. *Bioinformatics*, 2000, **16**: 296~ 297.
- [ 7 ] Yang Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**(8): 1 586~ 1 591.
- [ 8 ] Yang Z H, Nielsen R, Goldman N, *et al.* Codon substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, 2000, **155**(1): 431~ 449.
- [ 9 ] Yang Z H, Wong W S W, Nielsen R. Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol Biol Evol*, 2005, **22**: 1 107~ 1 118.
- [ 10 ] Wong W S W, Yang Z H, Goldman N, *et al.* Accuracy and power of statistical methods for detecting adaptive evolution in protein coding sequences and for identifying positively selected sites. *Genetics*, 2004, **168**: 1 041~ 1 051.
- [ 11 ] Murphy W, Eizirik E, Johnson W, *et al.* Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature*, 2001, **409**: 614~ 618.
- [ 12 ] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein coupled receptor. *Science*, 2000, **289**: 739~ 745.
- [ 13 ] Yokoyama S, Radlwimmer F B, Kawamura S. Regeneration of ultraviolet pigments of vertebrates. *FEBS Lett*, 1998, **423**: 155~ 158.
- [ 14 ] Yokoyama S, Shi Y. Genetics and evolution of ultraviolet vision in vertebrates. *FEBS Lett*, 2000, **486**: 167~ 172.
- [ 15 ] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: amplification using single gene specific oligonucleotide primer. *PNAS*, 1988, **85**(23): 8 998~ 9 002.
- [ 16 ] Lee A J, Isaac R E, Coates D. The construction of a cDNA expression library for the sheep scab mite *Psoroptes ovis*. *Vet Parasitol*, 1999, **3**: 241~ 252.
- [ 17 ] Wang D, Oakley T, Mower J, *et al.* Molecular evolution of bat color vision genes. *Mol Biol Evol*, 2004, **21**: 295~ 302.
- [ 18 ] Jacobs G H. Ultraviolet vision in vertebrates. *Am Zool*, 1992, **32**: 544~ 554.
- [ 19 ] Calderone J B, Jacobs J H. Cone receptor variations and their functional consequences in two species of hamster. *Vis Neurosci*, 1999, **16**: 53~ 63.
- [ 20 ] Peichl L, Pöhl B. Cone types and cone:rod ratios in the crab eating raccoon and coati (Procyonidae). *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, **41**: S494.
- [ 21 ] Winter Y, López J, von Helversen O. Ultraviolet vision in a bat. *Nature*, 2003, **425**(6 958): 612~ 614.
- [ 22 ] Ma J, Jones G, Zhang S Y, *et al.* Dietary analysis confirms that Rickett's big footed bat (*Myotis ricketti*) is a piscivore. *Journal of Zoology*, London, 2003, **261**: 245~ 248.
- [ 23 ] 马杰, Jones G, 梁冰等. 食鱼蝙蝠——大足鼠耳蝠初报. *动物学杂志*, 2003, **38**(3): 93~ 95.
- [ 24 ] Teeling E C, Springer M S, Madsen O, *et al.* A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science*, 2005, **307**(5 709): 580~ 584.