

文章编号:1000-5641(2009)06-0038-09

三种蝙蝠线粒体解偶联蛋白 2(UCP2) 基因的克隆和进化分析

左学国¹ 何灵江¹ 张俊鹏² 原丽红³

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062;

2. 中国科学院 动物研究所, 北京 100101;

3. 广东省昆虫研究所, 广州 510260)

摘要: 根据几种哺乳动物 UCP2 基因的保守区设计一对简并引物, 扩增马铁菊头蝠(*Rhinolophus ferrumequinum*)、长翼蝠(*Miniopterus fuliginosus*)和犬蝠(*Cynopterus sphinx*)的 UCP2 基因的全部编码区序列。测序结果表明, 三种蝙蝠 UCP2 编码区全长 930 bp, 编码 309 个氨基酸, 推测的氨基酸序列包含线粒体内膜载体蛋白的 3 个特征结构及解偶联蛋白(UCPs)的特征序列。序列分析表明, 蝙蝠与其它哺乳动物 UCP2 的氨基酸推导序列有很高的同源性, 为 90.6%~97.0%。进化分析表明, UCP2 基因在哺乳动物中进化过程中非常保守, 受到强烈的纯化选择压力作用($\omega = 0.063$)。Branch-specific 模型分析表明, UCP2 基因在蝙蝠支系与其它不能飞行的哺乳动物、冬眠蝙蝠与非冬眠蝙蝠的进化过程所受到的选择压力无明显差异($P > 0.05$)。这说明在整个哺乳动物进化过程中 UCP2 对其能量代谢的调控均起到了重要作用。然而, UCP2 如何参与哺乳动物能量调控仍有待于进一步研究。

关键词: 蝙蝠; 能量代谢; 进化; UCP2

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A

Cloning and evolutionary analysis of UCP2 in bats

ZUO Xue-guo¹, HE Ling-jiang¹, ZHANG Jun-peng², YUAN Li-hong³

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. Institute of Zoology, China Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

3. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract: A pair of degenerated primers was designed based on the conserved region of UCP2 among human, mouse, horse and dog. Then, cDNA fragments encoding the complete coding domain sequence (CDS) of UCP2 were amplified from three bat species (orders), *Rhinolophus ferrumequinum* (Rhinolophidae), *Miniopterus fuliginosus* (Miniopteridae) and *Cynopterus sphinx* (Pteropodidae). The CDS of UCP2 from three different bat species contain 930 bp enco-

收稿日期:2008-12

基金项目:教育部 985 项目

第一作者:左学国,男,硕士研究生,主要从事蝙蝠冬眠分子机制研究。E-mail: zxgxl2006@163.com.

通讯作者:原丽红,女,博士,主要从事冬眠及其可利用机制研究。E-mail: ylhong825@126.com.

ding 309 amino acids. The deduced amino acid sequence of bat *UCP2* consist three signature motifs of mitochondrial transporter protein and UCP-specific sequences. Our results showed that *UCP2* gene of bats and other mammals shared high homology (90.6% to 97.0%). Evolutionary analysis indicated that *UCP2* gene is highly conserved and has undergone strong purifying selected pressure during the evolution of mammals ($\omega = 0.063$). In addition, by comparing the difference of selected pressure on *UCP2* between bats and other mammals, non-hibernating bats and hibernating bats, no significant difference was identified ($P > 0.05$). Taken together, all these data proved that *UCP2* has an effect on the regulation of energy metabolism of mammal evolution. The mechanism of metabolic regulation of *UCP2*, however, remains unclear and further investigation is needed to clarify this process.

Key words: bats; energy metabolism; evolution; *UCP2*

0 引言

哺乳动物机体摄入的能量除有一部分以脂肪的形式储存外,大部分能量以热能的形式散发,用以维持体温恒定或转变为化学能维持生命代谢所需.线粒体作为机体的能量加工厂,主要通过位于线粒体内膜上的解偶联蛋白(Uncoupling proteins,UCPs)来控制所产生的能量最终是以热能的形式散发还是转化为ATP维持代谢^[1,2].UCP蛋白家族包括UCP1,UCP2,UCP3,UCP4和UCP5五个成员,五种蛋白在结构和功能上相似,都可以作为质子通道驱散呼吸时形成的 H^+ 梯度,从而增加呼吸,阻止ATP形成,通过将呼吸链与ATP产生过程解偶联来调节体内能量平衡^[3].

五种解偶联蛋白中,UCP2在组织中的分布最广,如白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)、棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)、肌肉、心、肺、肾和淋巴细胞等均有表达^[4].UCP2与UCP1氨基酸的同源性达到56%,分子量为33.218 kD.大鼠和人的*UCP2*基因分别位于7号染色体和11号染色体11q13,长6.4 kb,编码区由6个外显子组成,共930 bp,309个氨基酸^[5].作为解偶联蛋白家族的重要成员,*UCP2*在能量平衡和体温调节中起着重要的作用,冷暴露和高脂饮食均可使*UCP2*在BAT,WAT中表达增加^[6-8].Boyer等人通过比较北极地松鼠冬眠前和冬眠期*UCP2*在BAT,WAT和骨骼肌中mRNA的表达量,发现*UCP2*在冬眠期WAT中的表达量是冬眠前的1.6倍;此外*UCP2*在冬眠期地松鼠各组织中的表达量也随着环境温度的变化而变化,当环境温度在0℃以下时,*UCP2*在地松鼠WAT,BAT和骨骼肌中表达量是环境温度0℃以上时的两倍^[9],这些结果表明*UCP2*在调节动物冬眠过程时的体温稳定和能量消耗过程中可能起重要作用.

蝙蝠属于哺乳动物翼手目(Chiroptera),其中包括2个亚目(大蝙蝠亚目和小蝙蝠亚目),现生种类有1117种,分为19个科^[10].作为现存世界上唯一一类真正具有飞行能力的哺乳动物,蝙蝠在飞行过程中消耗大量的能量.研究表明,蝙蝠在飞行时其代谢速率与小型鸟类相近,略高于有记录的剧烈运动状态的陆地哺乳动物,并且在由静止到飞行的瞬间,蝙蝠的代谢速率提高了3~4倍,而捕食状态下其代谢速率是休憩状态下的40倍^[10,11].此外,蝙蝠在地球上分布十分广泛,由于不同的地理区域具有不同的气候条件与自然环境,使得各种蝙蝠由于地理分布位置不同而形成了冬眠、迁徙和非冬眠等多种适应性行为^[12].本文通过克隆两种冬眠蝙蝠和一种非冬眠蝙蝠的*UCP2*基因,利用分子进化分析方法,比较*UCP2*

基因在蝙蝠与其它哺乳动物之间的进化差异,以及比较蝙蝠内部冬眠与非冬眠蝙蝠间的进化差异,从而分析 *UCP2* 基因如何参与蝙蝠的飞行及冬眠状态能量代谢调控,为揭示蝙蝠的飞行及冬眠的分子生物学机制提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

实验用马铁菊头蝠(*Rhinolophus ferrumequinum*)于2004年11月取自北京房山区(39°48'N,115°42'E);实验用长翼蝠(*Miniopterus fuliginosus*)于2006年10月取自安徽省六安市(31°32'N,116°08'E);犬蝠(*Cynopterus sphinx*)于2007年3月取自广东省广州市(23°09'N,113°20'E).其中马铁菊头蝠和长翼蝠具有冬眠习性,犬蝠不具有冬眠习性.所有实验动物均采用断颈处死并迅速取其肌肉组织放入液氮中保存.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

用大连宝生物工程有限公司的 TaKaRa RNAliso Reagent 试剂盒提取三种蝙蝠肌肉组织样品的总 RNA. 所有操作步骤按试剂盒说明书和 RNA 提取标准操作进行. 提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定质量,并用紫外分光光度法测定 OD_{260} 值进行定量.

1.2.2 逆转录

用 SuperScript III™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒(Invitrogen, USA),根据说明书逆转录合成样品的 cDNA.

1.2.3 引物设计

根据已知哺乳动物的 *UCP2* 基因序列设计简并引物 F1 (5' ATG GKG RRC CYS ACR RCY TCS GAM GTR CM 3') / R1 (5' CAG GAG SAC TGR GRC WAY RRG KAG MTG A 3'),扩增蝙蝠 *UCP2* 基因的全部编码区序列. 所有引物均由 Invitrogen 公司 PAGE 纯化方式合成.

1.2.4 PCR 扩增

以马铁菊头蝠、长翼蝠和犬蝠的肌肉组织一链 cDNA 为模板,F1/R1 扩增 *UCP2* 基因. 在 50 μ L 反应体系中加入 2 μ L 的 cDNA 样品作为模板,10 μ mol/L 浓度的正、反义引物各 1 μ L, 2 \times Premix Taq(TaKaRa)25 μ L. PCR 扩增反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行. 具体反应条件是:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,54 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 min.

1.2.5 克隆和测序

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳(见图 1),回收、纯化后克隆到 PMD-19T 载体(TaKaRa)上,常规转化,蓝白斑筛选,以通用引物 M13 进行 PCR 鉴定阳性克隆. 多克隆测序由英杰生命技术有限公司完成.

1.2.6 不同位点核苷酸变化情况分析

SWAAP 软件^[13]是一种针对每个核苷酸位点进行分析的软件,该软件将所比对序列的不同位点进行分别处理,分别计算出各个不同位点的核酸变化情况,然后按照位点的顺序输出结果,从而根据各个位点的进化速率更直观地确定哪个区域受到何种选择压力作用.

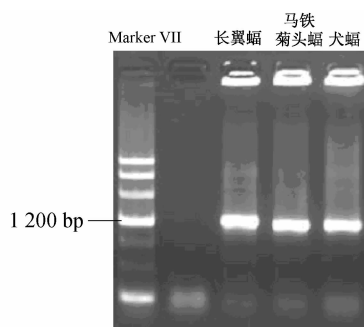


图 1 PCR 扩增结果电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR product

1.3 进化分析

1.3.1 UCP2 基因序列比对和建树

从 NCBI 公共数据库中检索并下载了包括食肉动物、奇蹄动物、偶蹄动物、灵长类和啮齿动物在内的 14 个物种的 UCP2 基因编码序列, GenBank 登录号分别为: *Equus caballus*, XM_001498480; *Sus scrofa*, NM_214289; *Bos taurus*, XM_001254288; *Mus musculus*, BC012967; *Rattus norvegicus*, BC062230. 1; *Homo sapiens*, NM_003355; *Pan troglodytes*, XM_508635. 2; *Pongo abelii*, CR860955; *Macaca mulatta*, XM_001115559. 1; *Canis lupus*, NM_001003048. 1; *Dicrostonyx groenlandicus*, AY484518. 1; *Antechinus flavipes*, AY233003. 1; *Monodelphis domestica*, XM_001362929. 1; *Phodopus sungorus*, AF271264. 1.

利用 MEGA 3.1 程序对不同动物 UCP2 的蛋白质序列进行 BLAST 分析, 计算物种间的遗传距离. 在此基础上, 采用 T_Coffee 程序以保证在 BLAST 过程中 cDNA 的各密码子碱基均为 3 的整数倍. 根据 cDNA 的 BLAST 结果, 并构建种间系统 ML 发生树.

1.3.2 选择压力分析

将 17 个物种的 UCP2 基因全部编码序列用 ClustalX1.81 软件^[14]进行比对, 比对结果经 MEGA3^[15]格式转换后, 应用 PAML4.0 软件包中的 CODEML^[16]程序、分别根据 UCP2 基因树和物种树进行选择压力分析. 本文选用了该程序中的碱基位点模型(site models)和特定枝系模型(branch-specific models), 两种模型都是基于最大似然法.

碱基位点模型可以检测各个氨基酸位点在进化过程中所受到的自然选择压力, 非同义替换率和同义替换率的比值($\omega = d_N/d_S$)可以用来估算各个氨基酸位点所受到的选择压力. 其中, M0(one-ratio model)假定所有枝系的非同义替换与同义替换比率相同. M1a, M2a 和 M3 是在 M0 基础上派生出的模型, M1a (Nearlyneutral model) 按照基因中各个氨基酸位点受到的自然选择压力不同将其分为两大类($\omega_1 = 0$ 和 $\omega_2 = 1$); M2a (positive selection model) 和 M3 (discrete model) 在 M1a 的基础上引入额外的参数即 $\omega_3 > 1$, 可以检测受到正选择的位点^[17,18]. M7 假设所分析的数据符合 β 分布, M8 是在 M7 基础上引入额外的参数派生出的模型, 也可检测受到正选择的位点^[17].

特定枝系模型是将所选定的枝系作为研究对象, 其余枝系作为背景, 对该枝系所受选择压力进行分析, 包含 two ratio model 和 three ratio model 两种模型^[19]. 应用特定枝系模型中的 two ratio model 分析 UCP2 基因在蝙蝠与其它哺乳动物进化过程中所受选择压力的差异, 把蝙蝠枝设为检测枝, 其余枝系设为背景枝; 应用特定枝系模型中的 three ratio model

分析 *UCP2* 基因在冬眠蝙蝠和非冬眠蝙蝠进化中所受选择压力差异,将冬眠蝙蝠和非冬眠蝙蝠分别设为检测枝(a 和 b),其余枝系设为背景枝。

上述模型均需要进行似然率检验(likelihood ratio test, $LRT = 2\Delta l$),从而判定 *UCP2* 基因在进化中受到何种选择压力,以及 *UCP2* 基因在翼手目和和其它哺乳动物、冬眠蝙蝠和非冬眠蝙蝠中进化压力是否相同。

2 结 果

2.1 序列分析

2.1.1 三种蝙蝠 *UCP2* 编码区序列结构分析

通过分子克隆,结果得到三种蝙蝠 *UCP2* cDNA 片段共 930 bp,编码 309 个氨基酸,GenBank 收录号为 FJ201997(*R. ferrumequinum*),FJ201998(*C. sphinx*)和 FJ201999(*M. fuliginosus*)。

作为一种线粒体内膜跨膜蛋白,*UCP2* 的 6 个 TM 区域,主要作用是改变膜内外的 H^+ 和 Cl^- 等离子在膜内外的梯度,从而实现 *UCP2* 对能量代谢过程的调节,因此其膜蛋白的结构与其功能密切相关^[20]。本次克隆得到的三种蝙蝠物种 *UCP2* 基因的 CDS 区由 309 个氨基酸组成,根据 17 种哺乳动物 *UCP2* 基因的推导氨基酸序列比对分析表明,蝙蝠的 *UCP2* 基因也具有 3 个线粒体内膜载体蛋白特征结构域,6 个跨膜 α -螺旋结构域(transmembrane domain, TM),嘌呤结合区域(purine nucleotide binding domain, PNBD)以及解偶联蛋白的特征序列。其中 TM1-TM6 示 6 个跨膜功能区,其位置分别为 11~32,79~101,121~137,182~197,217~234,269~291(见图 2)。

经过比对 17 种哺乳动物 *UCP2* 的 TM 区,发现 TM1 和 TM3 在 17 个物种中完全相同,并没有任何差异;TM2, TM4, TM5 和 TM6 4 个区域中分别只有 1 个氨基酸位点差异。TM2 中为狗和牛的第 80 位点由 N(天冬酰胺)变为 S(丝氨酸),TM4 中为三种蝙蝠的第 183 号位点由缬氨酸(V)变为异亮氨酸(I),TM5 中为犬蝠、马铁菊头蝠和马等 3 个物种第 230 号位点由缬氨酸(V)变为异亮氨酸(I),TM6 中为牛的第 274 号位点由蛋氨酸(M)变为苏氨酸(T)。此外,3 个线粒体内膜载体蛋白特征结构域,在所比较的 17 个物种完全相同;解偶联蛋白特征序列位于它们的第一、二、四 α -螺旋区及第 3 与第 4 跨膜 α -螺旋结构域之间的编码序列上^[21],并且位于第一、二 α -螺旋区上的解偶联蛋白特征序列在所有 17 个物种中完全相同,而位于第四 α -螺旋区上的特征序列在不同物种变化较大,位于第二基质区上的特征序列只有 1 个氨基酸位点有差异,为大鼠的第 192 位点由丙氨酸(A)变为苏氨酸(T);PNBD 的核苷酸序列在本实验研究的所有物种中一致,UCPs 即通过此区域与嘌呤核苷酸结合,从而抑制 H^+ 转运活性,防止解偶联的发生^[22](见图 2)。

2.1.2 蝙蝠 *UCP2* 编码区序列的同源性分析

通过 GenBank 检索,三种蝙蝠 *UCP2* 与人 *UCP2* 同源性分别是长翼蝠 98.7%、马铁菊头蝠 98.7%和犬蝠 97.7%,平均为 98.4%;而人的其它 UCPs 与三种蝙蝠 *UCP2* 基因的同源性平均值分别是 80.6%(*hUCP1*),86.9%(*hUCP3*),57.0%(*hUCP4*)和 56.5%(*hUCP5*)(见表 1)。三种蝙蝠 *UCP2* 与环颈旅鼠的 *UCP2* 的同源性最低,分别是 93.5%(长翼蝠-环颈旅鼠),93.5%(马铁菊头蝠-环颈旅鼠)和 90.6%(犬蝠-环颈旅鼠);与马的同源性最高,分别是 97.0%(长翼蝠-马),97.0%(马铁菊头蝠-马)和 94.1%(犬蝠-马),表明翼手目 *UCP2* 基因与奇蹄动物 *UCP2* 基因的进化速率相近,而与啮齿类、灵长类的 *UCP2* 基因进化速率差

异较大,这与哺乳动物内物种进化关系是一致的。

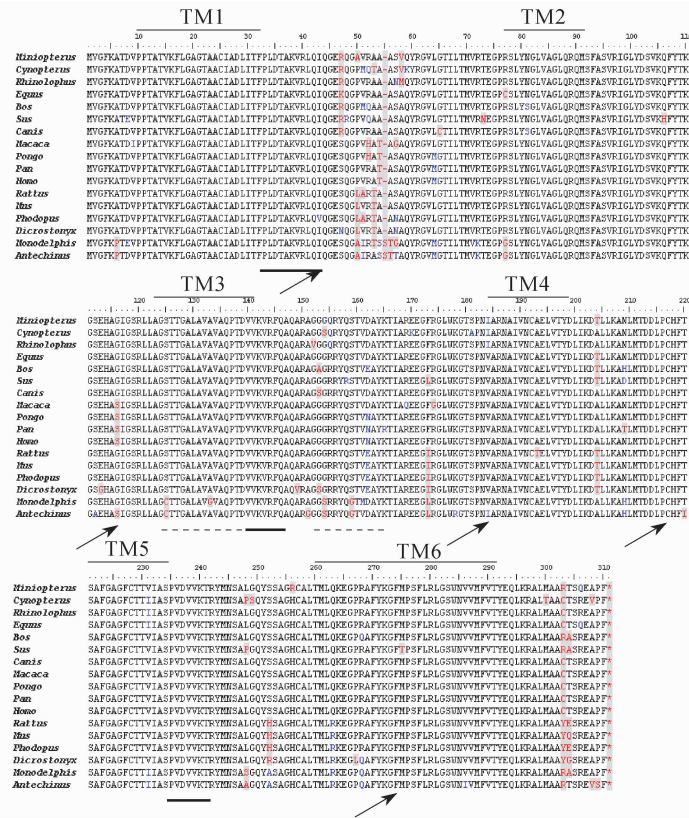


图 2 17 种哺乳动物的 UCP2 氨基酸序列的排列比对

Fig. 2 Alignment of UCP2 amino acids sequences of seventeen mammals

注: TM1-TM6 6 个 α -跨膜结构域;黑粗线 线粒体内膜载体蛋白特征结构域;虚线 解偶联蛋白特征序列;
箭头 可能的剪切位点;红色阴影 相同的位点;蓝色 相似的位点

表 1 蝙蝠 UCP2 与人 UCPs 同源性比较

Tab. 1 Comparison of homology of bats UCP2 with human UCPs

	<i>hUCP2</i>	<i>hUCP1</i>	<i>hUCP3</i>	<i>hUCP4</i>	<i>hUCP5</i>	%
<i>mUCP2</i>	98.7	80.4	87.3	56.8	56.4	
<i>rUCP2</i>	98.7	80.4	86.9	57.1	57.2	
<i>cUCP2</i>	97.7	81.1	86.3	57.1	55.8	
平均	98.4	80.6	86.9	57.0	56.5	

注: *m* 长翼蝠, *r* 马铁菊头蝠, *c* 犬蝠, *h* 人

2.1.3 不同位点核苷酸变化情况分析

通过将 17 个物种的 UCP2 基因序列进行比对,然后用 SWAAP 1.0.2 软件进行数据分析处理,并将最后的比较结果用 Excel 软件绘制点线图,研究在不同核苷酸位点中的 d_N/d_S 值的变化趋势.从图 3 中可以看出,在大约 190 左右的核苷酸位点处,具有较大差异,即约在蛋白质 64 号位点处具有最大的变化速率.然而在 UCP2 基因的 6 个 TM 功能区域,并没有出现很大的 d_N/d_S 值的波动,说明在进化过程中,UCP2 基因的 6 个 TM 功能区域非常保守,受到强烈的纯化选择压力作用。

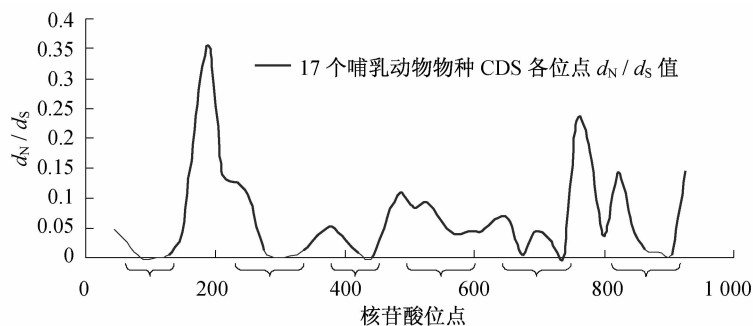


图3 SWAAP 1.0.2 软件分析 17 个哺乳动物物种 CDS 各位点 d_N/d_S 值的变化趋势

Fig. 3 The d_N/d_S of UCP2 among 17 mammals detected by SWAAP 1.0.2

注:花括号所标示区域分别为跨膜结构域 TM1 - TM6

2.2 进化分析

将已知的 17 个物种的哺乳动物 UCP2 编码区核苷酸序列用 PAUP 4.0 软件构建 ML 树,其结果如图 4 A 所示.随后参照 Murphy 等人归纳的哺乳物种进化关系^[23],对基因树(bootstrap<60 的支系)进行修改(见图 4 B).应用 PAML 软件包中的 CODEML 程序,根据修改后的基因树(见图 4 B),对哺乳动物 UCP2 基因各个氨基酸位点在进化过程中受到的选择压力进行检测.检测结果表明所有模型的 ω 值平均为 0.063,这意味着只有 6.3% 的非同义替换在基因进化过程中被固定下来,说明该基因在哺乳动物进化过程中是极度保守的;模型 M2a, M3 和 M8 可以检测潜在的受到正向自然选择压力的位点.对所有模型进行了 LRT 检验,仅 M3/M0 具有统计学意义,说明 UCP2 基因在进化过程中部分位点受到选择压力的作用.用 Branch-specific models 对 UCP2 基因进行分析,发现冬眠蝙蝠和非冬眠蝙蝠之间、蝙蝠和其它哺乳动物之间并无显著差异($P>0.05$).进化分析结果表明,哺乳动物 UCP2 基因在进化过程中受到强烈的纯化选择压力的作用和功能限制.

此外,用 PAML 软件根据哺乳动物 UCP2 基因树(见图 4 A)进行了相同的检验,得到与上述一致的结果.

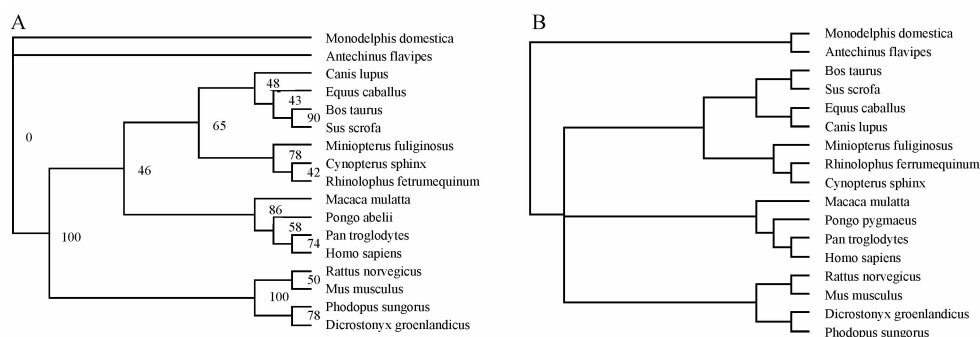


图4 17 个物种 UCP2 基因编码区核苷酸序列构建的 ML 树和分类进化树

Fig. 4 Molecular phylogenetic tree of coding nucleotide sequences of UCP2 gene from 17 species by ML method and Molecular phylogenetic tree

注:A 17 个物种 UCP2 基因编码区核苷酸序列构建的 ML 树, B 参照文献^[23]所绘制的 17 个哺乳动物传统物种分类进化树

3 讨 论

解偶联蛋白(UCPs)作为线粒体内膜的质子载体可以将内膜外侧的 H^+ 运回内侧,降低物质氧化过程与 H^+ 形成的膜两侧电化学梯度,使氧化过程与磷酸化过程脱偶联,即 UCPs 能使氧化磷酸化产生的质子流改道离开线粒体的三磷酸腺苷合成,质子可通过 UCPs 进入基质,而不参与 ATP 的合成,即发生了质子渗透,导致储存在质子电化学势能中的自由能被消耗,从而使氧化磷酸化解偶联,把能量变作热量消耗掉,而不是利用它们或将它们贮存起来^[20]. UCP2 是解偶联蛋白家族的重要成员,广泛分布在哺乳动物的多种组织,在能量平衡和体温调节中起着重要的作用,冷暴露和高脂饮食均可使 UCP2 在 BAT 和 WAT 中表达增加^[6-8].

序列同源性比较结果表明,UCP2 基因在物种间的同源性平均为 94.7%,表明 UCP2 基因在哺乳动物内部有较高的保守性. UCP2 基因在蝙蝠物种和非蝙蝠物种中并无显著差异($P>0.05$),表明 UCP2 基因并不是通过序列差异导致功能变化来参与飞行哺乳动物的能量调控. 序列比对表明,UCP2 基因在翼手目、偶蹄目、奇蹄目和食肉目物种中略有变化,而在灵长目、啮齿目中则没有变化(见图 2). 在整体的进化过程中,翼手目动物表现出与其它类哺乳动物更大的氨基酸序列差异,暗示该差异可能对于 UCP2 蛋白结构和功能有一定程度的改变,以适应翼手目动物特定的生理习性、生存环境和能量需求等方面的需要. 而这些小的变化是否会引起其功能的重大变化,从而导致蝙蝠物种具有某些与飞行有关的特殊适应,还有待进一步研究探索.

核酸和氨基酸序列比对结果表明,该基因在哺乳动物中有着高度的保守性,预示着其在能量代谢调控过程中起到重要的调控作用,因此在物种进化过程中受到强烈的纯化选择压力. 为进一步验证这个假说,本文构建了哺乳动物 UCP2 基因树(见图 4 A),其中偶蹄目、食肉目以及奇蹄目三者的拓扑结构与物种进化关系不一致,可能是由于基因进化速度与物种进化速度不一致造成的. 随后根据 Murphy^[23]等人的研究结果对基因树进行修改,得到哺乳动物 UCP2 的物种树,分别以物种树(见图 4 B)和基因树(见图 4 A)为基础,应用最大似然法中的碱基位点模型对 17 种哺乳动物的 UCP2 基因在进化过程中受到的选择压力进行检测,二者结果一致,表明 UCP2 基因在进化过程中经历了强烈的纯化选择和功能限制. 蝙蝠是唯一会飞行的哺乳动物,这必然要求蝙蝠有与飞行相适应的生理功能和分子调控. UCP2 可以调节 ATP 的产生速度,如当 ATP 需求增加时,质子泄漏和 ATP 合成之间可以快速转换,而无需依赖于底物代谢和线粒体呼吸的增加,使 ATP 可以快速大量产生^[24]. UCP2 基因可能并非通过序列差异来改变蛋白质的结构和功能进而参与蝙蝠冬眠状态的调控. 结合前人研究表明,UCP2 可能通过时空差异表达来调控动物冬眠期的能量代谢^[9,25,26]. 然而,UCP2 是如何参与蝙蝠冬眠的能量消耗和体温调节还有待进一步研究.

致谢:感谢中国科学院动物研究所张劲硕博士和华攀玉博士对本研究蝙蝠样品的采集给予的帮助;感谢审稿人对文章的改进.

[参 考 文 献]

- [1] PALOU A, PICO C, BONET M L, et al. The uncoupling protein, thermogenin[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1998, 30:7-11.
- [2] MOUALIJ B, DUYCKAERTS C, LAMOTTE B J, et al. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier

- family of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast* (Chichester, England), 1997, 13: 573-581.
- [3] BRAND M D. The proton leak across the mitochondrial inner membrane[J]. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1990, 1018:128-133.
- [4] SIMONEAU J A, KELLEY D E, WARDEN C. Obesity and increased contractile activity influence the protein content of UCP2 in human skeletal muscle[J]. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 1999, 23(Suppl)(6): S68-71.
- [5] ARGYROPOULOS G, BROWN A M, PETERSON R, et al. Structure and organization of the human uncoupling protein 2 gene and identification of a common biallelic variant in Caucasian and African-American subjects[J]. *Diabetes*, 1998, 47:685-687.
- [6] JACOBSSON A, MUHLEISEN M, CANNON B, et al. The uncoupling protein thermogenin during acclimation: indications for pretranslational control[J]. *The American Journal of Physiology*, 1992, 267: R999-1007.
- [7] REHNMARK S, BIANCO A C, KIEFFER J D, et al. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms in uncoupling protein mRNA response to cold[J]. *The American Journal of Physiology*, 1992, 262: E58-67.
- [8] FLEURY C, NEVEROVA M, COLLINS S, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia[J]. *Nature Genetics*, 1997, 15: 269-272.
- [9] BOYER B B, BARNES B M, LOWELL B B, et al. Differential regulation of uncoupling protein gene homologues in multiple tissues of hibernating ground squirrels[J]. *The American Journal of Physiology*, 1998, 275: R1232-1238.
- [10] FINDLEY J S. *Bats: A Community Perspective* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.
- [11] RACEY P A. Viability of bat spermatozoa after prolonged storage in the epididymis[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1972, 28:309-311.
- [12] CAREY H V, ANDREWS M T, MARTIN S L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature[J]. *Physiological Reviews*, 2003, 83: 1153-1181.
- [13] PRIDE D T, MEINERSMANN R J, WASSENAAR T M, et al. Evolutionary implications of microbial genome tetranucleotide frequency biases[J]. *Genome Research*, 2003, 13: 145-158.
- [14] 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[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [15] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004(5): 150-163.
- [16] YANG Z. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 2007, 13: 555-556.
- [17] YANG Z, NIELSEN R, GOLDMAN N, et al. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites[J]. *Genetics*, 2000, 155: 431-449.
- [18] NIELSEN R, YANG Z. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene[J]. *Genetics*, 1998, 148:929-936.
- [19] YANG Z. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, 15: 568-573.
- [20] YAMAGUCHI H, JELOKHANI-NIARAKI M, KODAMA H. Second transmembrane domain of human uncoupling protein 2 is essential for its anion channel formation[J]. *FEBS Letters*, 2004, 577: 299-304.
- [21] JEZEK P, URBANKOVA E. Specific sequence of motifs of mitochondrial uncoupling proteins[J]. *IUBMB Life*, 2000, 49: 63-70.
- [22] BOSS O, HAGEN T, LOWELL B B. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism[J]. *Diabetes*, 2000, 49: 143-156.
- [23] MURPHY W J, PEVZNER P A, O'BRIEN S J. Mammalian phylogenomics comes of age[J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20:631-639.

- 1999,33(4):575-578.
- [13] 邓泓,叶志鸿,黄铭洪. 湿地植物根系泌氧的特征[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),2007,(6):69-76.
DENG H, YE Z H, HUANG M H. Characteristics of Radial Oxygen Loss from Root of Wetland Plants [J]. Journal of East China Normal University(Natural Science),2007,(6):69-76.
- [14] VISSER E J W, COLMER T D, BLOM C W P M. Changes in growth, porosity, and radial oxygen loss from adventitious roots of selected mon- and dicotyledonous wetland species with contrasting types of aerenchyma[J]. Plant, Cell and Environment, 2000, 23: 1237-1245.
- [15] 王茹华,张启发,周宝利,等. 浅析植物根分泌物与根际微生物的相互作用关系[J]. 土壤通报,2007,38(1):167-172.
WANG R H, ZHANG Q F, ZHOU B L, et al. Analysis on the interaction between root exudates and rhizosphere microbes [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2007, 38(1): 167-172.
- [16] 陆雅海,张福锁. 根际微生物研究进展[J]. 土壤, 2006, 38 (2): 113-121
LU Y H, ZHANG F S. The advances in rhizosphere microbiology [J]. Soils, 2006, 38 (2): 113-121.
- [17] 冯骞,王超,汪岁羽,等. EM 生物接触氧化反应器启动过程试验研究[J]. 河海大学学报(自然科学版),2005,33(1):55-58.
FENG Q, WANG C, WANG H, et al. Experimental study on starting process of effective microorganism biological contact oxidation reactor [J]. Journal of Hehai University (Natural Sciences), 2005, 33(1): 55-58.

(上接第 46 页)

- [24] BOSS O, HAGEN T, LOWELL B B. Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism[J]. Diabetes, 2000, 49:143-156.
- [25] LIU X, LIN Q, LI Q, et al. Uncoupling protein mRNA, mitochondrial GTP-binding, and T4 5'-deiodinase activity of brown adipose tissue in Daurian ground squirrel during hibernation and arousal[J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, Molecular & Integrative Physiology, 1998, 120:745-752.
- [26] LIU X, LIN Q, LI Q, et al. Uncoupling protein1 mRNA, mitochondrial GTP-binding, and T4 5'-deiodinase of brown adipose tissue in euthermic Daurian ground squirrel during cold exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2001, 128:827-835.