

高原鼢鼠神经型一氧化氮合酶基因 编码区序列克隆与分析

张涓泽^{1, 4} 谢玲¹ 郭新异¹ 陈桂华² 林恭华¹ 都玉蓉³ 庞礴¹ 郭松长[✉]

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001)

(2 湖南省洞口县动物防疫监督站, 邵阳 422300)

(3 青海师范大学生命与地理科学学院, 西宁 810008) (4 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 高原鼢鼠是青藏高原特有的地下鼠, 受到高原低氧以及洞穴低氧的双重低氧环境压力。经 RNA 提取、RT-PCR、亚克隆与测序, 本研究获得高原鼢鼠神经型一氧化氮合酶 (nNOS) 的编码区序列, 并对其分子特征进行了分析。结果显示: 高原鼢鼠 nNOS 基因编码区 (CDS) 全长 4 290 bp, 编码 1 429 个氨基酸残基; CDS 与大鼠、小鼠、兔、狗、人的同源性分别为 90%、89%、87%、87%、89%; 结构域上, 高原鼢鼠 nNOS 具有 PDZ 蛋白结构域、氧化域、还原域及钙调素结合位点等 nNOSs 所具有的典型结构域; 基于 nNOS 的最大似然树和贝叶斯树均支持高原鼢鼠与小鼠、大鼠具有最近的亲缘关系, 与形态或其它分子标记构建的进化关系相符; 分子进化分析检测到高原鼢鼠 nNOS 中存在 3 个正选择位点——332 T、1200 G 和 1334 P, 但均未达到统计显著水平。本研究为揭示高原鼢鼠 nNOS 的表达特征及其在低氧适应中的作用与调控机制研究奠定了初步基础。

关键词: 高原鼢鼠; 神经型一氧化氮合酶; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q71; Q494

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2014) 01-0017-11

CDS cloning and sequence analysis of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) from plateau zokor (*Myospalax baileyi*)

ZHANG Xuze^{1, 4}, XIE Ling¹, GUO Xinyi¹, CHEN Guihua², LIN Gonghua¹, DU Yurong³, PANG Bo¹, GUO Songchang[✉]

(1 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

(2 Animal Epidemic Prevention Station of Dongkou County, Shaoyang 422300, China)

(3 School of Life and Geography Science, Qinghai Normal University, Xining 810008, China)

(4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Enduring hypoxia stress related to high altitude and subterranean burrows, the plateau zokor (*Myospalax baileyi*) has high efficiency in oxygen utilization which makes it adapt very well to the hypoxic plateau environment. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS), one of three isoforms of nitric oxide synthase, plays an important role in the adaptation to hypoxia. In this study, the coding sequence of nNOS was cloned by RT-PCR from the brain of plateau zokor. The size of this gene is 4 290 bp in length, and encodes a protein composed of 1 429 aa. The nNOS gene of the plateau zokor was 87% to 90% homologous to human, dog, rabbit, mouse and rat. We identified typical nNOS domains, such as PDZ, oxidase, reductase domain and CaM binding sites within nNOSs of Plateau zokor. The molecular phylogenetic trees based on ML and Bayesian method showed that the plateau zokor clustered with mouse and rat, which was consistent with traditional phylogenetic relationship inferred from morphological and molecular markers. Three positive selected sites of Plateau zokor (332 T, 1200 G and 1334 P) were identified by the PAML analysis, although statistically insignificant. Our results lay a foundation for further exploring the expression pattern, function and regulatory mechanism of nNOS in Plateau zokor acclimatization to hypoxia.

Key words: Gene cloning; Neuronal nitric oxide synthase; Plateau zokor (*Myospalax baileyi*); Sequence analysis

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-EW-J-26)

作者简介: 张涓泽 (1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事高原动物低氧适应研究。

收稿日期: 2013-03-06; 修回日期: 2013-07-17

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: guo@nwipb.cas.cn

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是动物机体中重要的细胞信使分子, 广泛参与机体的多种生理、病理过程, 如心血管系统、神经系统、免疫系统、生殖系统、消化系统等生理功能的维持及肿瘤发生过程 (Moncada *et al.*, 1991)。内源性 NO 的合成由神经型一氧化氮合酶 (neural nitric oxide synthase, nNOS)、诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和内皮型一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 3 种同工酶催化 L-精氨酸而产生 (Grilli *et al.*, 2003)。神经型一氧化氮合酶 (nNOS) 主要在动物中枢神经系统和周围神经系统中表达, 通过扩散对突触的生成、传递和联结产生一系列生理功能 (Bredt *et al.*, 1991); 此外, nNOS 也表达于肾、胰腺、骨骼肌以及雄性性腺中 (David *et al.*, 2012)。在人类, nNOS 基因的启动子和第一外显子较其它基因表现出更多的变异体 (Wang *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2003), 暗示 nNOS 功能重要且复杂。nNOS 基因是 HIF-1 α 信号通路的下游基因, 其表达受 HIF-1 α 的调控, 调节通路复杂 (David *et al.*, 2012)。慢性低氧条件下, 机体通过增加 nNOS 表达及其活性, 以减轻血管收缩程度 (Semenza, 2005)。Maiti 等 (2008) 研究发现低氧处理后大鼠大脑皮层、海马和纹状体中 NO 水平、nNOS 免疫反应以及 nNOS 表达量都显著增强, 并认为 nNOS 在脑组织中高表达是低氧胁迫动物不受低氧损伤的重要原因之一。此外, nNOS 基因和贫血之间存在相关, 其大量表达可使严重贫血的小鼠免于死亡 (Tsui *et al.*, 2011)。以上研究表明, nNOS 在机体的低氧适应中具有重要作用。

高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*) 隶属于啮齿目 (Rodentia), 鼯形鼠科 (Spalacidae), 鼯鼠亚科 (Myospalacinae), 鼯鼠属 (*Myospalax*) (Norris *et al.*, 2004), 主要分布在青藏高原东部, 海拔 2 800-4 200 m 的农田、山地、草甸草原等生境, 是青藏高原的特有种之一 (樊乃昌和施银柱, 1982; 张堰铭和刘季科, 2002)。与青藏高原其它哺乳动物不同, 高原鼯鼠受到高原低氧以及洞穴低氧的双重低氧环境压力。研究表明, 高原鼯鼠洞道中含氧量比同地区大气中低约 20% (王祖望等, 1979), 并随季节交替而发生变化。在旱季, 洞道内氧浓度为 18.02%; 而在雨季, 洞道中氧浓度仅

为 17.04% (曾缙祥等, 1984)。此外, 高原鼯鼠洞道环境还具有高二氧化碳、无光、低温、潮湿等特点 (王祖望等, 1979)。因此, 以高原鼯鼠为研究对象探讨青藏高原土著动物的低氧适应机制具有典型代表性和重要意义。

基于 nNOS 在低氧生理中的重要功能, 本研究以高原鼯鼠 nNOS 为研究对象, 首次克隆了其 cDNA CDS 全长, 并对其序列特征和生物信息学分析, 为进一步研究高原鼯鼠 nNOS 的组织定位、差异表达及其在高原鼯鼠低氧适应中的作用提供前期基础。

1 研究方法

1.1 材料

1.1.1 动物样品采集

高原鼯鼠采集于青海省大通县向华乡 (北纬 37°07.275'; 东经 101°47.907'), 海拔约 3 200 m, 属于典型高寒草甸。采用地箭活捕, 共捕捉高原鼯鼠 6 只, 雌雄各半。捕捉后称重, 以 10% 水合氯醛 (使用量: 0.5 mL/100 g 体重) 进行麻醉后就地解剖, 迅速将各组织放入液氮中保存, 带回实验室置于 -80°C 冰箱保存。

1.1.2 主要试剂

Trizol 试剂盒购自威格拉斯生物技术公司, pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司, 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司, PCR 所需 10 \times Buffer、dNTP、TaqDNA 聚合酶购自大连宝生物公司, 大肠杆菌 DH5 α 购自全式金公司, DNA 凝胶纯化试剂盒及其他试剂耗材购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 第一链合成

RNA 提取采用 Trizol 一步法进行。100 mg 高原鼯鼠脑组织置于预冷研钵, 加入液氮迅速研磨, 经裂解、离心获得 RNA 沉淀。干燥的 RNA 沉淀以 0.1% DEPC 水进行溶解, 紫外分光光度计测定其 OD_{260/280} 值以确定纯度, 1% 的琼脂糖凝胶电泳大致判断其完整性。cDNA 一链合成以 ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 进行。

1.2.2 引物设计

从 GenBank 中下载人 (*Homo sapiens*, NM_021257)、小鼠 (*Mus musculus*, NM_022414)、大鼠 (*Rattus norvegicus*, NM_033359) 的 nNOS

cDNA序列, 用 Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft, USA) 软件在其高度保守区内设计引物。实验共设

计 nNOS 编码区引物 4 对; 后基于测序结果, 设计了 2 条 3' RACE 引物。引物相关信息见表 1。

表 1 RT-PCR 和 3' RACE 中使用的引物

Table 1 Primer for RT-PCR and 3' RACE

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5' - 3')	预期片段长度 Expected size (bp)	退火温度 T _m (°C)
nz1	F: GCTCGGCTCCTCTGTAGAA R: GCAGTCTCGGGCATCAAA	1 327	54.5
nz4	F: TGGACTGGGCTTCTGCT R: CATTGTGCTCGCTGCTGT	463	55
nz7	F: GTCAAGAACTGGGAAACCG R: GGGAGTCAGAGTAGGACGAGA	1 657	53
nz9	F: GATTCAACAGCGTCTCGTCC R: GGCGGTTGGTCACTTCG	1 692	55
GSP1	GGTCTTTGGGTGTCGGCAATC	454	61.5
GSP2	AGCTGGCAGAGCCCGTGTAT	302	60

1.2.3 PCR 扩增

通过模板浓度梯度、dNTP 浓度梯度、温度梯度等试验的反复筛选, 得到了有效扩增 nNOS CDS 的反应体系。该体系总体积为 25 μ L, 含 cDNA 0.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5 mM) 1.2 μ L, Each Primer (10 μ M) 0.8 μ L, Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.3 μ L, ddH₂O 19.7 μ L。

PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 50 s, X°C 1 min (X 为不同引物的最适退火温度), 72°C 1 min 10 s, 38 个循环后, 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。

1.2.4 3' RACE

以 dT-AP 代替 oligo dT 进行 cDNA 第一链合成, 反应体系及条件与说明书相同。通过不同浓度梯度、温度梯度等的筛选, 得到了有效扩增 nNOS CDS 3' 末端的反应体系, 做巢式 PCR。该体系总体积为 20 μ L, 反转录产物/1st PCR 产物 1 μ L, 10 \times Ex PCR Buffer 2 μ L, dNTP (2.5 mM) 1.6 μ L, GSP1/GSP2 (10 μ M) 0.4 μ L, ddH₂O/AP (10 μ M) 0.4 μ L, Ex Taq (5 U/ μ L) 0.1 μ L, ddH₂O 14.5 μ L。

巢式 PCR 两轮反应条件一致: 94°C 预变性 3 min, 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环后, 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。

1.2.5 PCR 产物亚克隆

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶回收试剂盒回收后连接到 pGEM-Teasy 载体中, 连

接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 蓝白斑实验筛选阳性克隆。挑取阳性克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 摇床摇菌 10 h。用通用引物 M13 做菌液 PCR 鉴定, 预判含目的片段的阳性克隆送至上海生物工程有限公司进行测序 (或者直接送 PCR 原液测序)。

1.2.6 序列分析

测序结果经 Blast 比较, 以确定是否为目标序列; 采用 DNASTar 软件包 (DNASTar Inc., USA) 中 SeqMan 程序进行序列拼接, 并辅以人工校正; 用在线预测服务器 ExPASy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)、SignalP 3.0 Server (<http://www.Cbs.dtu.dk/services/SignalP>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、SSPro4.0 (<http://distill.ucd.ie/spritz/>)、SWISS-MODE (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质生物信息学特征分析。

1.2.7 构建系统进化树

在 GenBank 和 Ensembl 中下载哺乳动物 nNOS cDNA 序列, 用 MEGA5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 进行序列比对, 以 Jmodeltest3.7 (Posada and Crandall, 1998) 获得核苷酸进化的最佳模型。采用 PAUP 4.10b (Swofford, 2002) 和 MrBayes3.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) 分别构建最大似然树 (ML 树) 和贝叶斯树 (Bayes 树)。ML 分析采用启发式搜索算法和 1 000 次逐步随机叠加序列

(Stepwise-addition options) 进行, 以自展检验分析 (Bootstrap test) 估计进化树中节点的支持率, 重复次数为 1 000。贝叶斯分析设置如下: 随机树作为起始树, 马尔科夫链的蒙特卡洛方法 (Markov chain Monte Carlo process) 设置 4 条链同时运行, 3 条热链和 1 条冷链。共执行 5×10^6 代, 每 100 代保存一棵树。根据可能性值 (likelihood value) 及经验估计, 舍弃前 12 500 棵老化样本 (burnin sample), 而后的 47 500 棵树用于计算 50% 一致性树 (consensus tree)。

1.2.8 PAML 分析

采用 PAML 进化分析软件 (Yang, 2007) 的 CODEML 程序分析高原鼯鼠 nNOS 正向选择概率, 以确定其变异位点的性质, 核苷酸的最大似然树经修饰后用于所有 CODEML 分析。将地下鼠 (高原鼯鼠、裸鼯鼠) 支系作为 foreground branch, 而其他物种的支系作为 background branch, 分别用 branch model、branch site model 进行分析; 同时对以上所有序列进行 site model 分析。所有嵌套模型均采用似然比检验 (LRT) 的方法, 利用卡方检验两个模型似然函数对数值 (LnL) 的差异, 根据差异是否显著来做出是否接受无效模型的判断。

2 结果

2.1 测序结果和序列特性

实验获得高原鼯鼠 nNOS 编码区全长 4 290 bp, Blast 分析显示高原鼯鼠 nNOS 编码区与大鼠、小鼠、兔、狗、人的 nNOS 同源性较高, 分别达到 90%、89%、87%、87% 和 89%, 可认为该序列即为高原鼯鼠 nNOS 基因 cDNA 序列。将其提交至 GenBank, 登录号为 KC707555。在 4 290 个碱基中, 4 种碱基所占比例分别是: A 24.7%; C 29.8%; G 27.1%; T 18.4%, G + C 含量达 56.9%; A + T 含量为 43.1%; 其起始密码子和终止密码子分别是 ATG 和 TAA。高原鼯鼠 nNOS 基因共编码 1 429 个氨基酸残基, 成熟的高原鼯鼠 nNOS 氨基酸序列与大鼠、小鼠、兔、狗、人的同源性分别为 92%、94%、92%、92%、93%。高原鼯鼠 nNOS 编码区及其编码的氨基酸序列如图 1 所示。

2.2 蛋白性质预测

理化性质分析显示高原鼯鼠 nNOS 分子质量为 160 279.9 Da, 理论等电点是 6.61。该蛋白共包括 22 440 个原子, 分子式为 $C_{7119}H_{11154}N_{198602130}S_{51}$ 。在组成 nNOS 蛋白的 18 种氨基酸中, Leu (L) 所占比例最高为 9.0%, Trp (W) 所占比例最低为 1.5%, nNOS 蛋白不含 Pyl (O)、Sec (U) 两种氨基酸。nNOS 蛋白的不稳定性指数为 54.25, 脂肪指数为 79.13, 根据 Guruprasad 方法 (Guruprasad *et al.*, 1990) nNOS 蛋白不稳定。SignalP 3.0 Server 在 nNOS 中未检测到信号肽结构。以 SMART 服务器进行的蛋白结构功能域分析显示: nNOS 蛋白在第 26 - 100 位存在一 PDZ 蛋白结构域; 第 346 - 717 位是比较保守的一氧化氮合酶家族 (NOSs) 所共有的典型结构域, 具有结构分子活性; 第 757 - 930 位为黄素氧还蛋白 (Flavodoxin1) 结构域; 第 985 - 1 214 位和第 1 246 - 1 360 位则分别是 FAD 结合位点和 NAD 结合位点, 另外在氧化域与还原域中间包含一个低分子量的钙调素 (CaM) 结合位点。以 SPro4.0 服务器进行的二级结构预测 (Mooney *et al.*, 2011) 显示 nNOS 二级结构中 C (无规则卷曲) 占 50.1%, H (α -螺旋) 占 31.56%, E (β -折叠) 为 18.33%。

用 SWISS-MODEL 服务器对 nNOS 蛋白三级结构进行预测 (Arnold *et al.*, 2006): 从模型信息可知, nNOS 蛋白 12 到 126 氨基酸残基是基于 1qav 的 B 链进行建模, 两者序列的一致性达到 97.391%; 298 到 716 氨基酸残基是基于 1vag 的 A 链进行建模, 两者序列的一致性为 96.659%; 750 到 1413 氨基酸残基是基于 1tll 的 A 链进行建模, 两者序列的一致性为 92.771% (图 2)。

2.3 系统发育分析

基于 nNOS 基因的 ML 树和 Bayes 树得到了较为一致的各物种的系统发生关系 (图 3), 即啮齿目与兔形目形成姊妹群, 再与灵长目聚在一起形成灵长总目, 灵长总目与劳亚兽总目和非洲兽总目形成姊妹分类, 形成真兽亚纲, 然后与后兽亚纲形成姊妹分类。在构建的系统发育树中, 高原鼯鼠与大鼠、小鼠拥有更近的亲缘关系, 而与同为地下鼠的裸鼯鼠 (*Heterocephalus glaber*) 亲缘关系较远, 这与形态学分类一致。

1	ATG GAA GAC CAC ACG TTC GGG GTT AAG CAG ATC CAA CCC AAT GTA ATT TCT GTC
1	Met Glu Asp His Thr Phe Gly Val Lys Gln Ile Gln Pro Asn Val Ile Ser Val
55	CGT CTG TTC AAG CGC AAA GTC GGT GGA CTG GGC TTT CTG GTG AAG GAA CGG GTC
19	Arg Leu Phe Lys Arg Lys Val Gly Gly Leu Gly Phe Leu Val Lys Glu Arg Val
109	AAC AAG CCG CCT GTG ATC ATC TCT GAC CTG ATT CGC GGA GGT GCT GCA GAG CAG
37	Asn Lys Pro Pro Val Ile Ile Ser Asp Leu Ile Arg Gly Gly Ala Ala Glu Gln
163	TGC GGC CTC ATC CAG GCC GGG GAC ATC ATT CTC GCA GTC AAC GGC CGG CCC CTG
55	Cys Gly Leu Ile Gln Ala Gly Asp Ile Ile Leu Ala Val Asn Gly Arg Pro Leu
217	GTA GAC CTC AGC TAC GAC AGT GCC CTG GAG GTT CTC AGG GGC ATC GCC TCT GAG
73	Val Asp Leu Ser Tyr Asp Ser Ala Leu Glu Val Leu Arg Gly Ile Ala Ser Glu
271	ACT CAC GTG GTC CTC ATT CTG AGG GCC GAG CCC GAG GGA TTC ACC ACG CAT CTA GAG
91	Thr His Val Val Val Ile Leu Ile Leu Gly Pro Glu Gly Phe Thr Thr His Leu GAG
325	ACC ACT TTC ACT GGG GAC GGG ACT CCC AAG ACC ATC CGG GTG ACC CAG CCC CTG
109	Thr Thr Phe Thr Gly Asp Gly Thr Pro Lys Thr Ile Arg Val Thr Gln Pro Leu
379	GGT CCC CCT TCA AAA GCT GTT GAT CTG TCC CAG CAG CCA TCA TCC AGC AAA GAG
127	Gly Pro Pro Ser Lys Ala Val Asp Leu Ser Gln Gln Pro Ser Ser Ser Lys Glu
433	CAA CCT TTA GCA ATG GAC AAG ACT GCA GGT GCT GGC AAT GGG CCT CAG CAC ACC
145	Gln Pro Leu Ala Met Asp Lys Thr Ala Gly Ala Gly Asn Gly Pro Gln His Thr
487	CAA GGC CAC GGG CAG GAA GCC AGC TTG CTC TCC CAC GCC AAT GGC CTG GCT GTT
163	Gln Gly His Gly Gln Glu Ala Ser Leu Leu Ser His Ala Asn Gly Leu Ala Val
541	GAC CCT ACC GTG AAG AGT GCC AAG ACT GGC CTC CAG GAC AGC AGC GAG CAC AAT
181	Asp Pro Thr Val Lys Ser Ala Lys Thr Gly Leu Gln Asp Ser Ser Glu His Asn
595	GAA CTT CTC AGA GAG ATA GAA CCC GTA CTG AGC CTC CTC AAC AGT GGG GAC AAA
199	Glu Leu Leu Arg Glu Ile Glu Pro Val Leu Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asp Lys
649	GCA GTC AAC AGA GGG GTC CCC ACC AAG GCA GAG ACA AAA GAC ACG GGA GTC CAG
217	Ala Val Asn Arg Gly Val Pro Thr Lys Ala Glu Thr Lys Asp Thr Gly Val Gln
703	GTG GAC AGA GAC CCG GAT GGC AGG CCA CAC AAA GCC CTG CCC CTG GCC GGG GAG
235	Val Asp Arg Asp Pro Asp Gly Arg Pro His Lys Ala Leu Pro Leu Ala Gly Glu
757	AAT GAC AGA GTC TTC GAC GAC CTG TGG GGA AAG GGC AAC GTT CCT GTC GTC CTC
253	Asn Asp Arg Val Phe Asp Asp Leu Trp Gly Lys Gly Asn Val Pro Val Val Leu
811	AAC AAC CCG TAC TCA GAG AAG GAG CAG CCC CCA GCC TCG GGG AAA CAG TCC CCC
271	Asn Asn Pro Tyr Ser Glu Lys Glu Gln Pro Pro Ala Ser Gly Lys Gln Ser Pro
865	ACC AAG AAT GGC AGT CCA TCC AAG TGT CCC CGC TTC CTG AAG GTC AAG AAC TGG
289	Thr Lys Asn Gly Ser Pro Ser Lys Cys Pro Arg Phe Leu Lys Val Lys Asn Trp
919	GAA ACC GAC GTG GTC CTC ACT GAT ACC CTG CAC CTT AAG AGC ACG TTG GAA ACT
307	Glu Thr Asp Val Val Leu Thr Asp Thr Leu His Leu Lys Ser Thr Leu Glu Thr
973	GGA TGC ACA GAG CAC ATC TGC ACA GGC TCC ATC ATG CTG CCA TCC CAG CAC ACG
325	Gly Cys Thr Glu His Ile Cys Thr Gly Ser Ile Met Leu Pro Ser Gln His Thr
1027	CGG AGG CCG GAA GAT GTC CGC ACA AAG GAC CAG CTC TTC CCG CTC GCC AAA GAG
343	Arg Arg Pro Glu Asp Val Arg Thr Lys Asp Gln Leu Phe Pro Leu Ala Lys Glu
1081	TTT CTC GAC CAG TAC TAC TCA TCC ATT AAA AGA TTT GGC TCC AAG GCC CAC ATG
361	Phe Leu Asp Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Phe Gly Ser Lys Ala His Met
1135	GAC AGA CTG GAG GAG GTG AAC AAA GAG ATA GAG AGC ACC AGC ACC TAC CAG CTC
379	Asp Arg Leu Glu Glu Val Asn Lys Glu Ile Glu Ser Thr Ser Thr Tyr Gln Leu
1189	AAG GAC ACA GAG CTC ATC TAT GGC GCG AAA CAC GCC TGG CGG AAT GCC TCA CGC
397	Lys Asp Thr Glu Leu Ile Tyr Gly Ala Lys His Ala Trp Arg Asn Ala Ser Arg
1243	TGT GTG GGC AGG ATC CAG TGG TCC AAG CTG CAG GTG TTT GAT GCC CGA GAC TGC
415	Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Ser Lys Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys
1297	ACC ACG GCC CAC GGC ATG TTC AAC TAC ATC TGC AAC CAC GTG AAG TAT GCC ACC
433	Thr Thr Ala His Gly Met Phe Asn Tyr Ile Cys Asn His Val Lys Tyr Ala Thr
1351	AAC AAA GGG AAC CTC AGG TCG GCC ATC ACA ATA TTC CCT CAG AGG ACT GAT GGC
451	Asn Lys Gly Asn Leu Arg Ser Ala Ile Thr Ile Phe Pro Gln Arg Thr Asp Gly
1405	AAG CAT GAC TTC CGA GTG TGG AAT TCC CAG CTC ATC CGC TAT GCT GGC TAT AAG
469	Lys His Asp Phe Arg Val Trp Asn Ser Gln Leu Ile Arg Tyr Ala Gly Tyr Lys
1459	CAG CCA GAT GGC TCC ACC TTG GGG GAC CCA GCC AAC GTG CAG TTC ACA GAG ATC
487	Gln Pro Asp Gly Ser Thr Leu Gly Asp Pro Ala Asn Val Gln Phe Thr Glu Ile

1513 505	TGC ATC CAG CAG GGC TGG AAG CCC CCG AGA GGC CGC TTC GAC GTC CTG CCT CTG Cys Ile Gln Gln Gly Trp Lys Pro Pro Arg Gly Arg Phe Asp Val Leu Pro Leu
1567 523	CTG CTC CAG GCC AAC GGC AAT GAT CCT GAG CTC TTC CAG ATC CCC CCA GAG CTG Leu Leu Gln Ala Asn Gly Asn Asp Pro Glu Leu Phe Gln Ile Pro Pro Glu Leu
1621 541	GTG CTG GAA GTG CCC ATC AGA CAC CCC AAG TTT GAC TGG TTC AAA GAC CTG GGG Val Leu Glu Val Pro Ile Arg His Pro Lys Phe Asp Trp Phe Lys Asp Leu Gly
1675 559	CTC AAG TGG TAT GGG CTC CCC GCT GTG TCC AAC ATG TTA TTG GAG ATT GGT GGC Leu Lys Trp Tyr Gln Gly Leu Pro Ala Val Ser Asn Met Leu Leu Ile Gly Gly
1729 577	CTG GAG TTC AGC GCC TGC CCC TTC AGC GGC TGG TAC ATG GGC ACG GAG ATT GGT Leu Glu Phe Ser Ala Cys Pro Phe Ser Gly Trp Tyr Met Gly Thr Glu Ile Gly
1783 595	GTC CGT GAC TAC TGT GAC AGC TCA CGC TAC AAC ATC CTG GAG GAA GTA GCT AAA Val Arg Asp Tyr Cys Asp Ser Ser Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Glu Val Ala Lys
1837 613	AAA ATG AAC TTG GAC ATG AGG AAG ACA TCC TCA CTG TGG AAG GAC CAG GCG CTG Lys Met Asn Leu Asp Met Arg Lys Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Gln Ala Leu
1891 631	GTG GAG ATC AAC ATC GCT GTT CTC TAC AGT TTC CAG AGT GAC AAG GTG ACC ATT Val Glu Ile Asn Ile Ala Val Leu Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Lys Val Thr Ile
1945 649	GTC GAC CAT CAC TCA GCC ACT GAG TCC TTC ATC AAG CAC ATG GAG AAT GAA TAC Val Asp His His Ser Ala Thr Glu Ser Phe Ile Lys His Met Glu Asn Glu Tyr
1999 667	CGC TCC CGA GGG GGC TGC CCG GCC GAC TGG GTG TGG ATC GTG CCC CCC ATG TCA Arg Ser Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Val Trp Ile Val Pro Pro Met Ser
2053 685	GGC AGC ATC ACC CCT GTC TTC CAC CAG GAG ATG CTC AAC TAT CGA CTC ACC CCG Gly Ser Ile Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Leu Asn Tyr Arg Leu Thr Pro
2107 703	TCC TTC GAA TAC CAG CCT GAC CCA TGG AAC ACC CAC GTG TGG AAG GGC ACC AAC Ser Phe Glu Tyr Gln Pro Asp Pro Trp Asn Thr His Val Trp Lys Gly Thr Asn
2161 721	GGA ACC CCC ACG AAG CGG AGA GCC ATA GGC TTC AAG AAA CTG GCC GAA GCT GTC Gly Thr Pro Thr Lys Arg Arg Ala Ile Gly Phe Lys Lys Leu Ala Glu Ala Val
2215 739	AAG TTC TCA GCC AAG CTG ATG GGC CAG GCC ATG GCC AAG AGG GTC AAA GCA ACC Lys Phe Ser Ala Lys Leu Met Gly Gln Ala Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr
2269 757	ATT CTC TAT GCC ACA GAA ACT GGC AAA TCA CAA GCC TAT GCC AAG ACC TTG TGT Ile Leu Tyr Ala Thr Glu Thr Gly Lys Ser Gln Ala Tyr Ala Lys Thr Leu Cys
2323 775	GAG ATC TTC AAG CAC GCC TTT GAT GCC AAG GCC ATG TCC ATG GAA GAA TAC GAC Glu Ile Phe Lys His Ala Phe Asp Ala Lys Ala Met Ser Met Glu Glu Tyr Asp
2377 793	ATT GTC CAC TTG GAG CAC GAA GCC CTG GTC CTG GTG GTG ACC AGC ACC TTT GGC Ile Val His Leu Glu His Glu Ala Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly
2431 811	AAT GGA GAC CCC CCA GAG AAC GGG GAG AAA TTC GGC TGT GCT TTG ATG GAA ATG Asn Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Lys Phe Gly Cys Ala Leu Met Glu Met
2485 829	AGT CTT CCC AAC TCT GTA CAG GAG GAA CGG AAG AGT TAC AAG GTC CGA TTC AAC Ser Leu Pro Asn Ser Val Gln Glu Glu Arg Lys Ser Tyr Lys Val Arg Phe Asn
2539 847	AGC GTC TCG TCC TAC TCT GAC TCC CGC AAG TCA TCA GGC GAT GGA CCT GAC CTC Ser Val Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Arg Lys Ser Ser Ser Gly Asp Gly Pro Asp Leu
2593 865	AGA GAC AAC TTT GAA AGT ACC GGA CCC CTG GCC AAT GTG AGG TTC TCG GTA TTT Arg Asp Asn Phe Glu Ser Thr Gly Pro Leu Ala Asn Val Arg Phe Ser Val Phe
2647 883	GGC CTG GGC TCA CGG GCG TAC CCC CAC TTC TGC GCC TTC GGA CAT GCT GTA GAC Gly Leu Gly Ser Arg Ala Tyr Pro His Phe Cys Ala Phe Gly His Ala Val Asp
2701 901	ACC CTC CTG GAG GAG CTG GGA GGG GAG AGA ATC CTG AAG ATG AGA GAA GGA GAT Thr Leu Leu Glu Glu Leu Gly Gly Glu Arg Ile Leu Lys Met Arg Glu Gly Asp
2755 919	GAG CTC TGC GGA CAA GAG GAG GCT TTC AGG ACC TGG GCC AAG AAG GTC TTC AAG Glu Leu Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Thr Trp Ala Lys Lys Val Phe Lys
2809 937	GCA GCC TGT GAT GTG TTC TGC GTG GGG GAT GAC GTC AAC ATT GAG AAG GCA AAC Ala Ala Cys Asp Val Phe Cys Val Gly Asp Asp Val Asn Ile Glu Lys Ala Asn
2863 955	AAT TCC CTC ATC AGC AAT GAC CGC AGC TGG AAG AGG AAC AAG TTC CGT CTC ACT Asn Ser Leu Ile Ser Asn Asp Arg Ser Trp Lys Arg Asn Lys Phe Arg Leu Thr
2917 973	TAC GTG GCC GAA GCT CCA GAA CTT ACC CAA GGT CTC TCC AAT GTC CAC AAA AAG Tyr Val Ala Glu Ala Pro Glu Leu Thr Gln Gly Leu Ser Asn Val His Lys Lys
2971 991	CGT GTA TCA GCC GCC CGG CTC CTC AGC CGC CAG AAC CTG CAG AGC CCT AAA TCC Arg Val Ser Ala Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gln Asn Leu Gln Ser Pro Lys Ser

3025 1009	AGC Ser	CGA Arg	TCA Ser	ACC Thr	ATT Ile	TTC Phe	GTG Val	CGT Arg	CTC Leu	CAC His	ACC Thr	AAT Asn	GGG Gly	AAT Asn	CAG Gln	GAG Glu	CTG Leu	CAG Gln	
3079 1027	TAC Tyr	CAG Gln	CCA Pro	GGG Gly	GAC Asp	CAC His	CTG Leu	GGC Gly	GTC Val	TTC Phe	CCA Pro	GGC Gly	AAC Asn	CAC His	GAA Glu	GAC Asp	CTC Leu	GTG Val	
3133 1045	AAT Asn	GCT Ala	CTC Leu	ATT Ile	GAG Glu	CGG Arg	CTG Leu	GAG Glu	GAT Asp	GCA Ala	CCA Pro	CCT Pro	GTC Val	AAC Asn	CAG Gln	ATG Met	GTG Val	AAG Lys	
3187 1063	GTG Val	GAG Glu	CTG Leu	CTG Leu	GAG Glu	GAG Glu	CGG Arg	AAC Asn	ACA Thr	GCT Ala	CTG Leu	GGT Gly	GTC Val	ATC Ile	AGC Ser	AAC Asn	TGG Trp	AAG Lys	
3241 1081	GAC Asp	GAA Glu	CCT Pro	CGC Arg	CTC Leu	CCA Pro	CCC Pro	TGC Cys	ACC Thr	ATC Ile	TTT Phe	CAG Gln	GCC Ala	TTC Phe	AAG Lys	TAC Tyr	TAC Tyr	CTA Leu	
3295 1099	GAT Asp	ATC Ile	ACC Thr	ACA Thr	CCG Pro	CCC Pro	ACA Thr	CCC Pro	CTG Leu	CAG Gln	CTG Leu	CAA Gln	CAG Gln	TTC Phe	GCC Ala	TCC Ser	CTG Leu	GCT Ala	
3349 1117	ACC Thr	AGT Ser	GAG Glu	AAA Lys	GAG Glu	AAG Lys	CAA Gln	CGA Arg	CTG Leu	CTG Leu	GTC Val	CTC Leu	AGC Ser	AAG Lys	GGG Gly	CTG Leu	CAG Gln	GAG Glu	
3403 1135	TAC Tyr	GAG Glu	GAA Glu	TGG Trp	AAG Lys	TGG Trp	GGC Gly	CAG Gln	AAC Asn	CCC Pro	ACC Thr	ATG Met	GTG Val	GAG Glu	GTG Val	CTG Leu	GAG Glu	GAG Glu	
3457 1153	TTC Phe	CCT Pro	TCC Ser	ATC Ile	CAG Gln	ATG MET	CCG Pro	GCC Ala	ACG Thr	CTG Leu	CTT Leu	CTC Leu	ACG Thr	CAG Gln	CTG Leu	TCA Ser	CTG Leu	CTG Leu	
3511 1171	CAG Gln	CCT Pro	CGT Arg	TAC Tyr	TAC Tyr	TCC Ser	ATC Ile	AGC Ser	TCC Ser	TCC Ser	CCA Pro	GAC Asp	ATG MET	TAC Tyr	CCC Pro	GAC Asp	GAG Glu	GTG Val	
3565 1189	CAC His	CTC Leu	ACC Thr	GTG Val	GCC Ala	ATT Ile	GTC Val	TCC Ser	TAC Tyr	CAC His	ACC Thr	GGA Gly	GAT Asp	GGA Gly	GAA Glu	GGA Gly	CCA Pro	ATT Ile	
3619 1207	CAC His	CAT His	GGC Gly	GTG Val	TGC Cys	TCC Ser	TCC Ser	TGG Trp	CTC Leu	AAC Asn	AGG Arg	ATA Ile	CAG Gln	GCT Ala	GAT Asp	GAT Asp	GTG Val	GTC Val	
3673 1225	CCC Pro	TGC Cys	TTT Phe	GTG Val	AGA Arg	GGC Gly	GCC Ala	CCC Pro	AGC Ser	TTC Phe	CGC Arg	CTG Leu	CCG Pro	CGG Arg	AAC Asn	CCG Pro	CAG Gln	GTG Val	
3727 1243	CCC Pro	TGC Cys	ATC Ile	CTG Leu	GTC Val	GGC Gly	CCA Pro	GGC Gly	ACC Thr	GGT Gly	ATC Ile	GCC Ala	CCC Pro	TTC Phe	CGG Arg	AGC Ser	TTC Phe	TGG Trp	
3781 1261	CAG Gln	CAG Gln	AGA Arg	CAG Gln	TTT Phe	GAC Asp	ATC Ile	CAA Gln	CAC His	AAA Lys	GGA Gly	ATG Met	AGT Ser	CCC Pro	TGT Cys	CCC Pro	ATG Met	GTC Val	
3835 1279	CTG Leu	GTC Val	TTT Phe	GGG Gly	TGT Cys	CGG Arg	CAA Gln	TCC Ser	AAG Lys	ATA Ile	GAT Asp	CAC His	ATC Ile	TAC Tyr	AGA Arg	GAG Glu	GAG Glu	ACC Thr	
3889 1297	CTG Leu	CAG Gln	GCC Ala	AAG Lys	AAC Asn	AAG Lys	GGC Gly	GTC Val	TTC Phe	AGA Arg	GAA Glu	CTG Leu	TAC Tyr	ACG Thr	GCC Ala	TAC Tyr	TCC Ser	CGG Arg	
3943 1315	GAG Glu	CCA Pro	GAC Asp	AGA Arg	CCA Pro	AAG Lys	AAA Lys	TAT Tyr	GTA Val	CAG Gln	GAC Asp	GTC Val	CTG Leu	CAG Gln	GAG Glu	CAG Gln	CTG Leu	GCA Ala	
3997 1333	GAG Glu	CCC Pro	GTG Val	TAT Tyr	CGA Arg	GCC Ala	CTG Leu	AAG Lys	GAG Glu	CAA Gln	GGG Gly	GGC Gly	CAC His	ATT Ile	TAC Tyr	GTC Val	TGT Cys	GGG Gly	
4051 1351	GAT Asp	GTC Val	ACC Thr	ATG Met	GCT Ala	GCT Ala	GAC Asp	GTC Val	CTC Leu	AAA Lys	GCC Ala	ATC Ile	CAG Gln	CGC Arg	ATC Ile	ATG Met	ACC Thr	CAG Gln	
4105 1369	CAG Gln	GGG Gly	AAA Lys	CTC Leu	TCG Ser	GAG Glu	GAG Glu	GAT Asp	GCT Ala	GGC Gly	GTG Val	TTC Phe	GTC Val	AGC Ser	AGA Arg	CTG Leu	AGG Arg	GAT Asp	
4159 1387	GAC Asp	AAC Asn	CGG Arg	TAC Tyr	CAT His	GAG Glu	GAC Asp	ATC Ile	TTT Phe	GGA Gly	GTC Val	ACC Thr	TTG Leu	CGA Arg	ACA Thr	TAC Tyr	GAA Glu	GTG Val	
4213 1405	ACC Thr	AAC Asn	CGC Arg	CTT Leu	AGA Arg	TCA Ser	GAG Glu	TCC Ser	ATT Ile	GCC Ala	TTC Phe	ATC Ile	GAA Glu	GAG Glu	AGT Ser	AAA Lys	AAA Lys	GAC Asp	
4267 1423	ACA Thr	GAT Asp	GAA Glu	GTT Val	TTC Phe	AGC Ser	TCC Ser	TAA *											

图1 高原鼯鼠 nNOS 基因 cDNA 序列和由此推导出的氨基酸序列。_____ : PDZ 蛋白融合区; ~~~~~ : 一氧化氮合酶家族共有的典型结构域; : Flavodoxin1 的结构域; _ _ _ : FAD binding 1 结构域; ===== : NAD 结构域; * : 终止密码子

Fig.1 cDNA sequence and putative amino acid sequence of nNOS from plateau zokor. _____ : PDZ domain; ~~~~~ : NO synthase; : Flavodoxin1 motif; _ _ _ : FAD binding 1; ===== : NAD binding; * : the stop coden

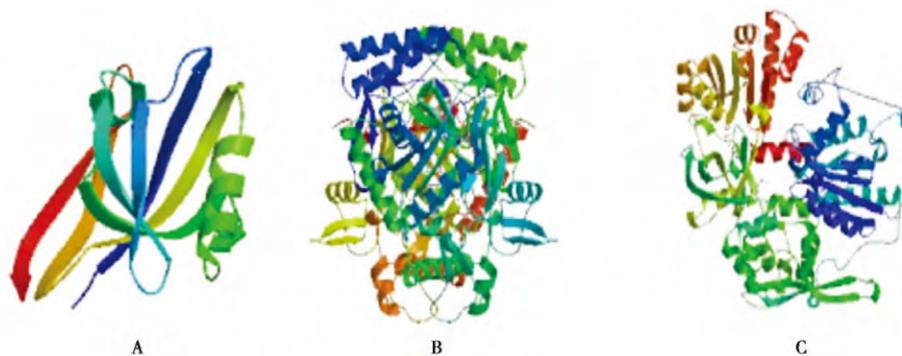


图2 高原鼯鼠 nNOS 蛋白三级结构模拟图。A: 12 - 126 位氨基酸; B: 298 - 716 位氨基酸; C: 750 - 1413 位氨基酸
 Fig. 2 The tertiary structure of protein model of plateau zokor nNOS. Model A is from 12 - 126 amino acid; Model B is from 298 - 716 amino acid; Model C is from 750 - 1413 amino acid

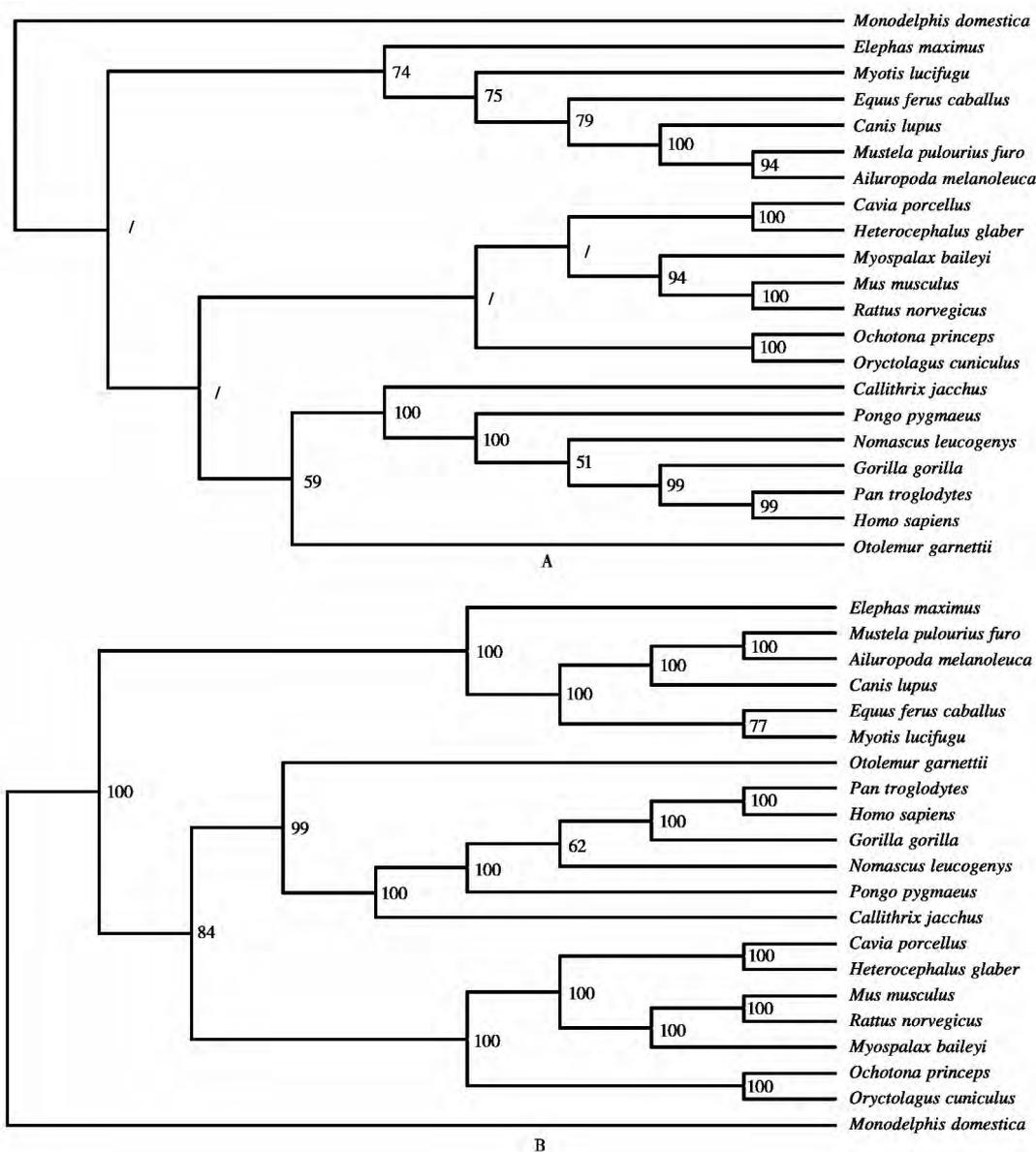


图3 基于 nNOS 基因的各物种系统发育关系。A: 最大似然树; B: 贝叶斯树 “/” 表示低支持率 (<50%)
 Fig. 3 Molecular Phylogenetic tree based on cDNA sequence of nNOS. A: MLtree; B: Bayes tree. Values lower than 50 are given as ‘/’

2.4 选择压力分析

Branch model 分析未能检测到正选择位点, 在 two-ratio 模型中 $\omega_0 = 0.03467$, $\omega_1 = 0.02072$, 与 one-ratio 模型中 $\omega = 0.03349$ 差异并不显著, 且零假设与备择假设之间 LRT 检验结果无显著差异 ($P > 0.05$)。Branch-site model 分析显示高原鼯鼠和裸鼯鼠 332T/I 可能处于正向选择下, 但缺乏统计支持 ($P = 0.559$), 且原假设与备择假设之间

LRT 检验结果也无显著差异 ($P > 0.05$)。对包括高原鼯鼠在内的 21 种哺乳动物的 nNOS 基因进行 Site model 分析, 结果表明: M3 与 M0 模型的 ω 值差异显著 ($P < 0.001$); M1a 和 M2a 模型产生的最大似然值几乎相同 ($P = 1$), 因而无统计学意义; M7 与 M8 模型提示 1200 G ($P = 0.889$)、1334 P ($P = 0.938$) 两个位点处于正向选择之下, 但亦未达到显著水平 (表 2, 表 3)。

表 2 nNOS 基因进化分析参数

Table 2 parameter estimates for evolutionary analysis of mammal nNOS gene

Nested model pairs	Parameter estimates	log likelihood	PSS
Branch model			
Two-ratio Site model	$\omega_0 = 0.03467$, $\omega_1 = 0.02072$	-17 865.56348	N. A.
M0: one-ratio (1 degree of freedom)	$\omega = 0.03349$	-17 868.14618	N. A.
M3: discrete (5)	$p_0 = 0.70814$, $p_1 = 0.26435$, ($p_2 = 0.02751$) $\omega_0 = 0.0000$, $\omega_1 = 0.09812$, $\omega_2 = 0.43111$	-17 660.6538	none
M1a: neutral (1)	$p_0 = 0.97618$, ($p_1 = 0.02382$) $\omega_0 = 0.02599$, ($\omega_1 = 1.00000$)	-17 781.98446	N. A.
M2a: selection (3)	$p_0 = 0.97618$, $p_1 = 0.02382$, $p_2 = 0.00000$ $\omega_0 = 0.02599$, ($\omega_1 = 1.00000$), $\omega_2 = 80.89420$	-17 781.98463	1200 G 1334 P
M7: beta (2)	$p = 0.14944$, $q = 3.35526$	-17 664.22413	N. A.
M8: beta & ω (4)	$p_0 = 0.99664$, ($p_1 = 0.00336$) $p = 0.15855$, $q = 3.88465$, $\omega = 1.04699$	-17 660.39124	1200 G 1334 P
Branch-site model			
Model A: alternative	$p_0 = 0.97599$, $p_1 = 0.02401$, $\omega_0 = 0.02603$, ($\omega_1 = 1.00000$), $\omega_2 = 1.00000$	-17 781.74389	332 T
Null	$p_0 = 0.97599$, $p_1 = 0.02401$, $\omega_0 = 0.02603$, ($\omega_1 = 1.00000$, $\omega_2 = 1.00000$)	-17 781.74388	

表 3 nNOS 进化分析似然比检验统计值

Table 3 Likelihood ratio test statistics ($2\Delta\ell$) for nNOS evolution analysis

	$2\Delta\ell$	df	P
LRT of branch model			
One-ratio vs. two-ratio	5.165394	1	0.023
LRTs of site model			
M1a vs. M2a	-0.000348	2	1
M0 (one-ratio) vs. M3	414.984758	4	<0.001
M7 vs. M8	7.665778	2	0.0216
LRT of branch-site model			
Model A vs. Null (Test 2)	-0.000012	1	1

3 讨论

高原鼯鼠分布于青藏高原海拔 2 800 - 4 200 m 的地区, 洞道中含氧量较同地区大气中更低, 并随季节不同而变化。高原鼯鼠在演化过程中产生了一系列的适应机制, 使之很好地适应了这种恶劣的环境。由于长期在高海拔低氧环境中营地下生活, 低氧会激活高原鼯鼠大脑一系列调节通路, 通过 nNOS 等下游基因的应答在新陈代谢过程中保护神经组织免受低氧损伤 (McLaren *et al.*, 2007)。因此, 克隆并预测高原鼯鼠 nNOS 的分子特征对揭示

高原鼯鼠的低氧适应机制具有一定意义。

本研究克隆的高原鼯鼠 nNOS CDS 及其氨基酸序列与大鼠、小鼠、家兔、狗和人的同源比较分析表明,高原鼯鼠与同为啮齿目的小鼠和大鼠之间同源性更高而与食肉目狗的同源性较低。基于 nNOS 基因构建的 ML 树和 Bayes 树得到了基本一致的拓扑结构,这一系统发育关系较好契合了哺乳动物系统生物学关于真兽亚纲中劳亚兽总目和灵长总目以及非洲兽总目在分类中的姊妹分类地位,以及后兽亚纲与真兽亚纲的姊妹分类地位 (Zhou *et al.*, 2012),且均支持高原鼯鼠是啮齿目鼯形鼠科的一支,与同为鼠超科的的大鼠和小鼠聚在一起 (Wang and Zhang, 2012); 裸鼯鼠系一种地下鼠,基于 nNOS 的系统发育关系显示其与同处于豪猪亚目 (Hystricomorpha) 的豚鼠 (*Cavia porcellus*) 聚在一起,与形态学分类结果 (Smith 和解焱, 2009) 相符。以上暗示高原鼯鼠与裸鼯鼠尽管具有相似的生境,均受到低氧的胁迫,但其 nNOS 基因并不存在趋同进化现象,这可能与 nNOS 基因进化速率较慢,具有较高的保守性有关。

结构域预测显示高原鼯鼠 nNOS 具有与其它动物 nNOS 基本一致的构成,即均含有氧化蛋白域、还原蛋白域以及钙调素 (CaM) 结合位点等结构域,其中氧化蛋白域即一氧化氮合酶典型结构功能域; 还原结构域包括 FMN 结构域、FAD 结合位点和 NAD 结合位点。研究显示 NOSs 是通过进化中一系列基因融合事件形成的大模块基因,在结构域及功能上均十分保守 (Ghosh *et al.*, 2003)。本研究预测到高原鼯鼠 nNOS 存在一个 nNOS 亚型中特有的 PDZ 结构域 (Alderton *et al.*, 2001)。PDZ 结构域是重要的蛋白结构域之一,参与多种生物学过程。如: nNOS 可通过 PDZ 域靶向作用于脑和骨骼肌的神经突触位点,进行突触可塑性调节 (Vaughn and Bjorkman, 1996); 神经元中 nNOS 与膜的结合也由 PDZ 域来调节 (Alderton *et al.*, 2001)。高原鼯鼠 nNOS 结构域类型上的高度保守可能与低氧条件下高原鼯鼠正常生理活动的维持有关。

基于地下鼠 nNOS 基因可能受到相同的选择压力这一假设, Branch 模型分析结果显示高原鼯鼠和裸鼯鼠支系的 ω 值低于其他背景支系,说明该基因所受选择压力以净化选择为主。Branch site 模型确定了一个正选择位点 322 T/I,但不具有统计学意

义,且该位点并未在 nNOS 功能域中。本研究中的地下鼠类仅包括裸鼯鼠和高原鼯鼠两种,且物种亲缘关系较远,不足以用来探讨高原鼯鼠 nNOS 基因的适应性进化。Site 模型在 nNOS 的 NAD 结合域中检测到两个正选择位点,即 1200 G 和 1344 P,但统计上均未达到显著水平。序列比对显示在大鼠、小鼠及灵长目动物中, nNOS 第 1334 位均为丝氨酸 (S),而在食肉目动物、北美鼠兔 (*Ochotona princeps*) 以及高原鼯鼠则为脯氨酸 (P)。随后进行的小鼠 nNOS 还原域蛋白结构 (Garcin *et al.*, 2004) 模拟突变分析显示该位点上的丝氨酸可与空间结构上邻近的位点形成氢键,而替换为脯氨酸后无法形成氢键 (未发表),但该位点上氨基酸残基的变化对 nNOS 功能是否产生显著影响尚有待进一步研究。

高原鼯鼠与其他啮齿类动物以及平原哺乳动物 nNOS 基因本质特征的相似暗示了其功能的重要性。作为神经信号传导通路重要的调节基因, nNOS 在高原鼯鼠低氧适应中的作用及机制尚需深入研究。本研究对高原鼯鼠 nNOS 基因进行了克隆和分子特征分析,为不同组织、不同氧浓度条件下的高原鼯鼠 nNOS 的表达特征及其在低氧适应中的作用与调控机制研究奠定了一定基础。

参考文献:

- Alderton W K, Cooper C E, Knowles R G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, **357**: 593 - 615.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, **22**: 195 - 201.
- Bredt D S, Hwang P M, Glatt C E, Lowenstein C, Reed R R, Snyder H. 1991. Cloned and expressed nitric-oxide synthase structurally resembles cytochrome-P450 reductase. *Nature*, **351** (6329): 714 - 718.
- David J J, Jeffrey H H S, Philip M, Marsden A. 2012. Nitric oxide signaling in hypoxia. *J Mol Med*, **90**: 217 - 231.
- Fan N C, Shi Y Z. 1982. A revision of the zokors of subgenus *Eospalax*. *Acta Theriologica Sinica*, **2** (2): 183 - 199. (in Chinese)
- Garcin E D, Bruns C M, Lloyd S J, Hosfield D J, Tiso M, Gachhui R, Stuehr D J, Tainer J A, Getzoff E D. 2004. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, **279**: 37918 - 37927.
- Ghosh D K, Salerno J. 2003. Nitric oxide synthases: domain structure and alignment in enzyme function and control. *Front Biosci*, **8**:

- d193 – 209.
- Grilli A , De Lutiis M A , Patruno A , Speranza L , Cataldi A , Centurione L , Taccardi A A , Di Napoli P , De Caterina R , Barbacane R , Conti P , Felaco M . 2003. Effect of chronic hypoxia on inducible nitric oxide synthase expression in rat myocardial tissue. *Experimental Biology and Medicine* , **228** (8) : 935 – 942.
- Guruprasad K , Reddy B V B , Pandit M W . 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng* , **4** (2) : 155 – 161.
- Huelsenbeck J P , Ronquist F . 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* , **17** : 754 – 755.
- Maiti P , Singh S B , Ilavazhagan G . 2008. Nitric oxide system is involved in hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat brain. *Acta Histochemica* , **112** (2010) : 222 – 232.
- McLaren A T , Marsden P A , Mazer C D , Baker A J , Stewart D J , Tsui A K Y , Li X M , Yucel Y , Robb M , Boyd S R , Liu E , Yu J , Hare G M T . 2007. Increased expression of HIF-1 α , nNOS , and VEGF in the cerebral cortex of anemic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* , **292** (1) : 403 – 414.
- Moncada S , Palmer R M , Higgs E A . 1991. Nitric oxide: physiology , pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* , **43** (2) : 109 – 142.
- Mooney C , Wang Y , Pollastri G . 2011. SCLpred: protein subcellular localization prediction by N – to – 1 neural networks. *Bioinformatics* , **27** (20) : 2812 – 2819.
- Norris R W , Zhou K Y , Zhou C Q . 2004. The phylogenetic position of the zokors (Myospalacinae) and comments on the families of muroids (Rodentia) . *Molecular Phylogenetics and Evolution* , **31** : 972 – 978.
- Newton D C , Bevan S C , Choi S , Robb G B , Millar A , Wang Y , Marsden P A . 2003. Translational regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5' -untranslated region leader exon. *J Biol Chem* , **278** : 636 – 644.
- Posada D , Crandall K A . 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* , **14** (9) : 817 – 818.
- Semenza G L . 2005. New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis. *J Clin Invest* , **115** : 2976 – 2978.
- Smith A T , Xie Y . 2009. A Guide to the Mammals of China. Changsha: Hunan Educational Publishing House , 31 – 184. (in Chinese)
- Swofford D L . 2002. PAUP* . Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods) . Version 4. Sinauer Associates , Sunderland , Massachusetts.
- Tamura K , Peterson D , Peterson N , Stecher G , Nei M , Kumar S . 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood , distance , and parsimony methods. *Mol Biol Evol* , **28** (10) : 2731 – 2739.
- Tsui A K Y , Marsden P A , Mazer C D , Adamson S L , Henkelman R M , Ho J J D , Wilson D F , Heximer S P , Connelly K A , Bolz S S , Lidington D , El-Beheiry M H , Dattani N D , Chen K M , Hare G M T . 2011. Priming of hypoxia-inducible factor by neuronal nitric oxide synthase is essential for adaptive responses to severe anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* , **108** (42) : 17544 – 17549.
- Wang Y , Newton D C , Miller T L , Teichert A M , Phillips M J , Davidoff M S , Marsden P A . 2002. An alternative promoter of the human neuronal nitric oxide synthase gene is expressed specifically in Leydig cells. *Am J Pathol* , **160** : 369 – 380.
- Wang Z , Zhang Y . 2012. Predicted structural change in erythropoietin of plateau zokors—Adaptation to high altitude. *Gene* , **501** (2012) : 206 – 212.
- Wang Z W , Zeng J X , Han Y C . 1979. Studies on the metabolism rates of the mouse hare (*Ochotona curzoniae*) and the mole rat (*Myospalax fontanierll*) . *Acta Zoologica Sinica* , **25** (1) : 75 – 85. (in Chinese)
- Vaughn D E , Bjorkman P J . 1996. The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* , **16** (2) : 261 – 273.
- Yang Z . 2007. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol* , **24** (8) : 1586 – 1591.
- Zhang Y M , Liu J K . 2002. Excavating effects of plateau zokor on the plant biomass and their response patterns in alpine meadow. *Acta Theriologica Sinica* , **22** (4) : 292 – 298. (in Chinese)
- Zhou X , Xu S , Xu J , Chen B , Zhou K , Yang G . 2012. Phylogenomic analysis resolves the interordinal relationships and rapid diversification of the Laurasiatherian mammals. *Syst Biol* , **61** (1) : 150 – 164.
- Smith A T , 解焱 . 2009. 中国兽类野外手册. 长沙: 湖南教育出版社 , 31 – 184.
- 王祖望 , 曾缙祥 , 韩永才 . 1979. 高原鼠兔和中华鼫鼠气体代谢的研究. *动物学报* , **25** (1) : 75 – 84.
- 张堰铭 , 刘季科 . 2002. 高原鼫鼠挖掘对植物生物量的效应及其反应格局. *兽类学报* , **22** (4) : 292 – 298.
- 曾缙祥 , 王祖望 , 师治贤 . 1984. 高山地区高原鼫鼠的代谢特点及若干生理指标的观察. *高原生物学集刊* , **3** : 163 – 171.
- 樊乃昌 , 施银柱 . 1982. 中国鼫鼠 (*Eospalax*) 亚属分类研究. *兽类学报* , **2** : 180 – 199.