

猪獾苦味受体 *T2R2* 基因的分子克隆与进化分析

徐怀亮*, 姚永芳, 朱庆

四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

摘要: 苦味的感知是机体有效的自我保护机制之一。文章采用PCR和克隆测序方法首次从猪獾基因组中获得一全长为1 169 bp的苦味受体*T2R2*基因DNA序列 (GenBank登录号: FJ812727)。该序列含有完整的1个外显子 (无内含子), 大小为915 bp, 编码304个氨基酸残基。其蛋白质等电点为9.76, 分子量为34.74 kDa。拓扑结构预测显示猪獾*T2R2*蛋白上含有N-糖基化位点、N-肉豆蔻酰化位点各1个, 蛋白激酶C磷酸化位点2个。整个蛋白质多肽链含有7个跨膜螺旋区, 4个细胞外区和4个细胞内区。亲水性/疏水性分析表明, 猪獾*T2R2*蛋白质为一疏水性蛋白, 其亲水性区段所占比例较小。种间相似性比较显示, 猪獾*T2R2*基因与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠的*T2R2*基因cDNA序列相似性分别为91.4%、90.6%、84.4%、85.4%、83.8%、72.1%, 氨基酸序列相似性分别为85.5%、85.8%、74.0%、77.6%、75.3%、61.5%。核苷酸替换计算和选择性检验结果表明, 猪獾*T2R2*基因与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠间存在着强烈的纯净化选择(Purifying selection), 即强烈的功能束缚 (Functional constraint), 进一步分析发现该选择作用实际上主要存在于跨膜区。猪獾、犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠的*T2R2*基因外显子核苷酸序列构建的基因树与其物种树的拓扑结构是相一致的, 表明*T2R2*基因适合于构建不同物种间的系统进化树。

关键词: 猪獾; 苦味受体; *T2R2*基因; 克隆; 分子进化分析

Molecular cloning and evolutionary analysis of Hog-Badger bitter taste receptor *T2R2* gene

XU Huai-Liang*, YAO Yong-Fang, ZHU Qing*

College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: Recognition of natural bitter toxins through taste is one of the most effective mechanisms of self-safety. An approximate 1 169 bp sequence of the bitter taste receptor *T2R2* gene was obtained by PCR and cloning technique from hog-badger genomic DNA (GenBank accession number : FJ812727) . This sequence contains a complete single exon (without intron) 915 bp in size, which encodes 304 amino acid residues. The isoelectric point (pI) of the protein is 9.76 and its molecular weight is 34.74 kDa. Topology prediction showed that the *T2R2* protein contained one N-glycosylation site, one N-myristoylation site, and two potential protein kinase C phosphorylation sites. Additionally, the whole peptide chains were comprised of seven transmembrane helix regions, four extracellular regions, and four intracellular regions. The *T2R2* is a hydrophobic protein with a few hydrophilic components. Homology analysis of the *T2R2* gene sequences by Clustal W indicated that the cDNA sequence homology of *T2R2* gene in hog

收稿日期: 2009-03-24; 修回日期: 2009-06-03

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (编号: 2005037803) 和四川省教育厅重点科研项目 (编号: 08ZA076) 资助

作者简介: 徐怀亮 (1968-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 野生动物遗传资源保护与利用。E-mail: huailxu@yahoo.com
姚永芳 (1973-), 女, 实验师, 硕士, 研究方向: 野生动物遗传资源保护与利用。E-mail: yao073@126.com
徐怀亮和姚永芳同为第一作者。

通讯作者: 朱庆 (1959-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 动物遗传育种。Tel: 0835-2882006; E-mail: zhuging5959@163.com

badger with dog, cat, cattle, horse, chimpanzee, and mouse is 91.4%, 90.6%, 84.4%, 85.4%, 83.8% and 72.1%, respectively, and the homology of amino acid sequence is 85.5%, 85.8%, 74.0%, 77.6%, 75.3% and 61.5%, respectively. The results of nucleotide acid substitution computation and selective test showed that strong purifying selection (functional constraint) occurred between hog badger and the six species, respectively, which mainly existed in the transmembrane regions of *T2R2*. In addition, the Neighbour-Joining tree of *T2R2* gene exons from these seven species is consistent with their species tree, indicating that the *T2R2* gene is suitable for constructing molecular phylogenetic tree among different species likewise.

Keywords: Hog Badger; bitter taste receptor; *T2R2* gene; cloning; molecular phylogenetic analysis

猪獾(*Arctonyx collaris*), 俗名猪鼻狸、地猪、沙獾, 属哺乳纲(Mammalia), 食肉目(Carnivora), 鼬科(Mustelidae), 猪獾属(*Arctonyx*), 在我国广泛分布于华南、西南、华东、华北、东北及陕西、甘肃等地, 尤以南方较为多见。穴居, 多挖洞于荒原或栖居于岩石裂隙和树洞中。生活力强, 喜群居, 昼伏夜出。食性杂, 喜食各种动植物性饲料, 动物性饲料中尤喜食蚯蚓、青虾、泥鳅、天牛、鼠类等, 植物性饲料中尤喜食玉米、小麦、红苕、花生等农作物^[1]。猪獾具有很高的经济价值。据《本草纲目》记载: 獾油不仅是治疗烫伤的特效良药, 而且对痔疮和胃溃疡也有较好的疗效; 獾毛刚硬挺拔, 多用作刷; 獾皮具有皮板致密的特点, 制成的皮服、皮帽畅销国内外。该物种已被列入国家林业局2000年8月1日发布的《国家保护的有益的或者有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》。《中国物种红色名录》评估等级为: 易危物种(Vulnerable, VU)。近年来, 对猪獾的保护与人工养殖利用研究引起了人们的普遍关注, 但有关其分子遗传学方面的报道较少。

味觉为动物判断所摄取食物的特性和质量提供宝贵的信息。许多自然的有机物包括咖啡因、尼古丁、番木鳖碱以及众多的化学合成药物都是苦味物质。比较淡的苦味产生不愉快感, 而强烈的苦味会引起恶心、呕吐以及心理上的厌恶感。因此苦味的感知是机体有效的自我保护机制之一, 可以防止潜在性有害物质的摄入^[2]。苦味物质的感知主要是由苦味受体(Taste receptor type 2, T2R)介导的, 该受体属于G蛋白偶联受体超家族, 是由一条多肽链形成的7个跨膜螺旋结构, 有相应的3个细胞内环和3个细胞外环^[3,4]。T2Rs的细胞外N端很短, 可能是配体结合区, 具有明显的多态性, 可以结合不同结构的苦味物质。细胞内的3个环状结构则高度保守, 是细胞内G蛋白偶联区域。T2Rs由一个含有多个成员的基因家族所编码。已有研究表明, 在人中含有25个推导性功能基因和8个假基因, 在小鼠中含有33个推导性功能基因和3个假基因^[5,6]。近年来, 学者们通过灵长类和一些模式生物中T2Rs基因家族的进化分析^[7~12], 发现T2R基因家族在不同的物种谱系中存在着不同的进化模式, 或许是构成动物适应不同食物环境的分子基础。T2R2基因为T2Rs基因家族的成员之一, 在人类中为假基因, 在其他哺乳动物中为推导性功能基因, 基因内部无内含子。猪獾为食肉目中的杂食性动物, 食性较特殊。本研究通过克隆猪獾苦味受体T2R2基因组DNA序列, 分析该基因的核苷酸及其cDNA所编码蛋白的序列特征, 并与其他哺乳动物物种进行比较分析, 为进一步对T2R2基因的表达调控、基因多态性及猪獾属动物味觉受体的分子进化适应等方面研究奠定基础, 旨在为猪獾遗传资源的保护与开发利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

猪獾来自于四川雅安碧峰动物园 1 死亡个体, 取其腿部肌肉, 用无水乙醇保存带回贮存于-80℃超低温冰箱。PCR 所需 10×LaBuffer、dNTP、LaTaq DNA 聚合酶、pMD 18-T Vector、大肠杆菌 DH5α 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 凝胶纯化试剂盒, 小量质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标本的预处理

取乙醇保存的猪獾腿部肌肉组织少许(约 30~50 mg), 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 0.9%生理盐水 100 μL, 剪碎材料; 加入 700~800 μL 生理盐水, 浸泡 12~24 h, 其间更换生理盐水 3 次; 然后用 1×TE 溶液置换 2 次; 最后将 TE 溶液吸干净, 将标本烘干备用。

1.2.2 基因组 DNA 提取

经预处理后的猪獾肌肉组织DNA的提取按常规酚-氯仿法进行^[13]。所提DNA经 0.8%琼脂糖凝胶电泳, GreenView核酸染料染色, 于紫外透射仪上观察估计浓度和纯度。

1.2.3 引物设计与合成

从 GenBank 数据库中查找出犬 *T2R2* 基因完全编码序列 (GenBank 登录号: AB249685), 再以此为基础从犬全基因组序列中找出比该序列上下游各长出约 300 bp 的一段序列, 以同样的方法得到猫的相同长度的相应同源序列。利用生物软件 Primer 5.0, 基于犬、猫 *T2R2* 编码序列两端相对保守区域设计 1 对特异性引物, 上游引物 (T2R2f): 5'-AGATCAGATTCTCAGGGCTGTATG -3'; 下游引物 (T2R2'): 5'-AATTAGTGCTTCACCTGTCCTGGG-3', 并由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 PCR 扩增

用设计的引物扩增猪獾*T2R2* 基因, 当模板DNA浓度为 50 ng/μL 时, 通过设置Mg²⁺浓度梯度、温度梯度等, 经多次反复试验, 配置了一套有效扩增猪獾*T2R2* 基因的PCR反应体系: 基因组 DNA (50 ng/μL) 5 μL, 10×LaBuffer II 2 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 2 μL, Primer(10 μmol/L)各 1 μL, LaTaq DNA Polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 7.2 μL, 总体积 20 μL。

PCR反应条件为: 94℃预变性5 min; (94℃ 35 s; 54℃ 30 s; 72℃ 45 s) 30个循环后, 72℃延伸 5 min, 4℃保存。

1.2.5 克隆测序

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 用试剂盒对凝胶产物进行回收, 采用 pMD18-T Vector 连接, 连接产物转化感受态 DH5α, 挑取阳性克隆, 提取重组质粒, 经酶切、PCR 鉴定后送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.6 序列分析

所测序列用Chromosoma 1.62、DNASTar软件包中SeqMan, EditSeq, Megalign软件(DNASTAR Inc, 1996)进行人工校对、编辑, 确保序列无误。序列确定后, DNA序列的ORF查找和编码预测分别采用ORF finder 软

件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorffgorf.html>)和GenScan软件(<http://genes.Mit.edu/GENSCAN.html>)。序列的相似性比较采用Blast 2.1 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。多序列的比较分析采用Clustal W 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)。蛋白质的结构与特征预测采用PredictProtein 软件(<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>)。氨基酸序列疏水性分析采用DNAMAN软件, Kyte and Doolittle运算法则^[14]被应用; 采用MEGA 4.1软件^[15]计算序列间碱基对的差异、转换/颠换数及其比值, 并运用Kimura双参数模型构建分子进化树, 采用的搜索方法为:用NJ(Neighbor-Joining)法建立起始树, 搜索时采用近邻交换算法(Close-Neighbor-Interchange,CND)。进行数据分析时还从GenBank中引用了6种哺乳动物的T2R2基因序列: 犬 (*Canis familiaris*, AB249685)、猫 (*Felis catus*, ACBE01074008)、牛 (*Bos taurus*, NW_001494849.2)、马 (*Equus caballus*, NW_001867413.1)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*, NW_001237933.1)和小鼠 (*Mus musculus*, AC121573)。

2 结果与分析

2.1 测序结果和序列特性

将阳性重组质粒进行测序, 测序结果经人工校对、序列拼接, 除去质粒载体序列和引物序列, 所需序列为1 169 bp。与GenBank中犬T2R2基因序列比较后, 确认本实验所克隆序列是猪獾T2R2基因DNA序列, 含有完整的1个外显子, 大小为915 bp, 无内含子。1-103为5'端侧翼区, 1019-1169为3'端侧翼区; 5'端侧翼区和3'端侧翼区分别为103 bp、151 bp。将该序列提交到GenBank, 登录号为FJ812727。猪獾T2R2基因的编码区序列和预测的氨基酸序列(如图1所示), ORF序列为915 bp, 编码304个氨基酸残基, 起始密码子和终止密码子分别为ATG和TGA。A、T、G、C的平均含量分别为26.89%、33.99%、18.69%、20.44%, A+T含量较高, 为61.87%, G+C含量为39.13%。对猪獾T2R2蛋白质进一步预测分析发现, 猪獾T2R2蛋白的分子量为34.74 kDa, pI为9.76, 在pH7.0时的带电荷量为19.79。该蛋白含有143个非极性氨基酸残基(丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸)和77个极性氨基酸残基(天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸), 以及10个带负电荷的氨基酸残基(天冬氨酸和谷氨酸)和29个带正电荷的氨基酸残基(精氨酸和赖氨酸)。氨基酸序列比较显示(图2), 猪獾T2R2蛋白上有1个N-糖基化位点(253NMTF), 2个蛋白激酶C磷酸化位点(168TLK,211THR)和1个N-肉豆蔻酰化位点(137GSFLAS)。整个蛋白质多肽链含有7个跨膜螺旋区(位于7-31, 48-72, 85-109, 130-150, 181-205, 236-258, 271-288, 合计为162个氨基酸), 4个细胞外区(位于1-6, 73-84, 151-180, 259-270, 合计为60个氨基酸)和4个细胞内区(位于32-47, 110-129, 206-235, 289-304, 合计为82个氨基酸)。

采用DNAMAN软件按默认值参数对猪獾T2R2蛋白质氨基酸序列进行疏水性分析(图3)。由分析图谱可知, 猪獾T2R2蛋白质氨基酸序列的大部分区段都为疏水区, 亲水区段只有13个, 其中大的区段只有4个(位于32-43, 152-164, 168-179, 207-231), 包含的氨基酸残基数为12~25个, 其余8个均为小区段(位于55, 79-80, 115-117, 126, 130, 258-263, 276-278, 286-294, 300-304), 包含的氨基酸残基数仅为1~9个, 所有亲水性氨基酸残基数(94个)占总氨基酸残基数(304个)的比例约30.92%。结合胞内外所处位置, 在13个亲水区段中, 有4个区段位于胞外区域(79-80, 152-164, 168-179, 258-263), 3个区段位于跨膜区域(55, 130, 276-278), 6个区段均位于胞内区域(32-43, 115-117, 126, 207-231, 286-294, 300-304)。

进一步的疏水性预测可知，GRAVY（Grand average of hydropathicity）值为0.71。这些结果表明，猪獾T2R2蛋白质为疏水性蛋白，其亲水性区段所占比例较小。

ATG	GCC	TCC	TOC	TTG	TCA	GCG	ATT	CCT	CAT	GTT	ATT	GTT	ATG	TCA	GCA	GAA	TTT	ATC	ATA	60
M	A	S	S	L	S	A	I	P	H	V	I	V	M	S	A	E	F	I	I	20
GGG	ATT	ATA	GTA	AAT	GGA	TTT	CTT	ATC	CTC	ATC	AAC	TGT	AAA	GAA	CTG	ATC	AAA	GGC	AGA	120
G	I	I	V	N	G	F	L	I	L	I	N	C	K	E	L	I	K	G	R	40
AAG	CTA	AAA	CCA	ATG	CAA	CTC	CTT	TTC	CTA	TGT	ATA	GGG	ATG	TOG	AGA	TTT	GGT	CTG	CTG	180
K	L	K	P	M	Q	L	L	F	L	C	I	G	M	S	R	F	G	L	L	60
ATG	GTG	TTA	ATG	GTG	CAA	AGT	TTT	TTC	TCT	GTG	TTC	TTT	CCA	CTC	TTT	TAT	AGG	GTA	AAA	240
M	V	L	M	V	Q	S	F	F	S	V	F	F	P	L	F	Y	R	V	K	80
GTT	TAT	GGT	GCA	GCA	ATG	TTG	TTC	TTC	TGG	ATG	TTT	TTC	AGT	TCT	CTC	AGT	CTC	TGG	TTT	300
V	Y	G	A	A	M	L	F	F	W	M	F	F	S	S	V	S	L	W	F	100
GCC	ACC	TGC	CTT	TCT	GTA	TTT	TAC	TGC	CTC	AAG	ATA	TCA	GGC	TTC	ACG	CAG	TCC	TAT	TTT	360
A	T	C	L	S	V	F	Y	C	L	K	I	S	G	F	T	Q	S	Y	F	120
CTT	TGG	CTG	AAA	TTT	AGG	ATC	TCA	AAG	GTA	ATG	AGT	TGG	CTG	CTT	CTG	GGA	AGC	TTT	CTG	420
L	W	L	K	F	R	I	S	K	V	M	S	W	L	L	L	G	S	F	L	140
GCA	TOC	ATG	AGC	ACA	GCA	GCT	CTG	TGT	ATT	GAG	GCT	GAT	TAC	CCT	AAA	GAA	GCA	AAC	AAT	480
A	S	M	S	T	A	A	L	C	I	E	A	D	Y	P	K	E	A	N	N	160
GAT	GAT	GTC	CTC	AAG	AAT	GOC	ACG	CTG	AAG	AGG	ACT	GAA	CCC	AAG	ATA	AGG	CAA	ATT	AAT	540
D	D	V	L	K	N	A	T	L	K	R	T	E	P	K	I	R	Q	I	N	180
GGA	GTA	CTT	CTT	GTC	AAC	TTG	GCA	TTA	CTA	TTT	CCT	CTA	GCC	CTA	TTT	GTG	ATG	TGC	ACT	600
G	V	L	L	V	N	L	A	L	L	F	P	L	A	L	F	V	M	C	T	200
TTT	ATG	TTA	CTC	ATT	TCT	CTC	TAC	AAG	CAC	ACT	CAT	CGG	ATG	CAA	AAT	GGA	TCT	CAT	GGT	660
F	M	L	L	I	S	L	Y	K	H	T	H	R	M	Q	N	G	S	H	G	220
GTT	AGA	AAT	GOC	AGC	ACA	GAA	GCC	CAT	ATA	AAT	GCA	TTA	AAA	ACA	GTG	ATG	ACG	TTC	TTT	720
V	R	N	A	S	T	E	A	H	I	N	A	L	K	T	V	M	T	F	F	240
TGC	TTC	TTT	ATT	TCT	TAT	TTT	GCT	GOC	TTC	ATG	GCA	AAT	ATG	ACA	TTC	AGT	ATT	CCT	TAT	780
C	F	F	I	S	Y	F	A	A	F	M	A	N	M	T	F	S	I	P	Y	260
AGA	AGT	CAT	TGC	TTC	TTT	GTA	CTA	AAG	GAT	ATA	ATG	GCA	GCA	TTT	CCC	TOC	GGC	CAT	TCA	840
R	S	H	C	F	F	V	L	K	D	I	M	A	A	F	P	S	G	H	S	280
ATT	ATA	ATC	ATC	TTG	AGT	AAT	TCA	AAA	TTC	CAA	CAA	CCT	TTC	AAG	AGA	CTT	CTC	TGC	CTC	900
I	I	I	I	L	S	N	S	K	F	Q	Q	P	F	K	R	L	L	C	L	300
AAA	AAG	AAT	CAA	TGA																915
K	K	N	Q	*																305

图 1 猪獾 T2R2 基因编码区序列和由此推导的氨基酸序列

*表示终止密码子。

	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
<i>A. collaris</i>	MASSLSAIPH	VIVMSAEFII	GIIVNGFLIL	INCKELIKR	KLKPMQLLFL	CIGMSRFGLI	MVLWQGSFFS	70
<i>C. familiaris</i>	I.F...L...	...T...T...	I.M...S...	PT.V...I...	...I...I...	...I...I...	...I...I...	70
<i>F. catus</i>	...L.I...	...T...VI...	...G...S...	...T...CI...	...I...I...	...I...I...	...I...I...	70
<i>B. taurus</i>	I...G...I...	...T...VT...	...I...SN...	...V.S...	...T...V...	...I...Q...	...G...I...	70
<i>F. caballus</i>	V.P...L...LI	...T...T...	...I...H...	...S...T...	...V...V...	...T...Q...	...I...I...	70
<i>P. troglodytes</i>	L.F.VL...	I.I...FT...	...T...I...	V.N...H...	M.V.I.LM	...T...Q...	...I...I...	70
<i>M. musculus</i>	T.PFP...Y	MVI.T...L	TT...I...	V.YD.F.S	TFLIL.T.LM	T.L.L.Q	IM.T...	70
<i>A. collaris</i>	tt00000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	140
<i>C. familiaris</i>	VFFPLFIRVK	VVGAAMLFFW	MFFSSVSLWF	ATCLSWFYCL	KISGPTQSYF	LWLKFRISKV	MSWLLGSEL	140
<i>F. catus</i>	...L...K.N	IF.T...F...	...A...C...	...A...C...	...A...C...	...L...P...	...L...L...	140
<i>B. taurus</i>	...SA...I	TP...I...	...L...VT...	...C...V...	...L...P...	...M...L...	...L...L...	140
<i>F. caballus</i>	I...L.A...	I.PV.I.L	...A...C...	...A...C...	...L...P...	...L...P...	...L...L...	140
<i>P. troglodytes</i>	...L.VKI	I...M.L...	...I...C...	...C...P...	...L...IP...	...V...L...	...L...L...	140
<i>M. musculus</i>	...YS.EEN	I.SSDIM.V	...IG...	...PPW...	...L...IF...	...L...L...	...L...L...	140
<i>A. collaris</i>	tttttttttt	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	210
<i>C. familiaris</i>	ASMTAALCI	EADYPKEANN	DDVLKNAIK	RTEPKIRQIN	GULLVNLALL	FPLALFVMT	FMLLISLYKH	210
<i>F. catus</i>	...I...I...	KV-D...A...	...S...EM...	...S...EM...	...I...I...	...I...I...	...F...F...	210
<i>B. taurus</i>	...I.VSL	DVG...NM...	N.F...K...	L.GP...	...I...I...	...I...I...	...F...R...	210
<i>F. caballus</i>	T.V.I...V	KV...IV-D	I.I.G...A...	KLNTK...	E...I...I...	TI...II...	VI...VI...	210
<i>P. troglodytes</i>	...V.I...T	V...LHV--	S.I.R.T...	...L.K.S...	E...I...I...	...I...I...	V.F...V...	210
<i>M. musculus</i>	...V.I.SV...	V.FA.NV-E	E.A.R.T...	KRKA...K.K.S	E...I...I...	...I...I...	S...S...	210
	...LG...TV...	VGF.LIE-D	GY...R.G.N	DSNA.LVRN	DL...I...I...	L...SV...	S...FV...	210
<i>A. collaris</i>	tttttttttt	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	280
<i>C. familiaris</i>	THHQNGSHG	VKNASTKAI	NALKTVMTF	CFPISYFAAF	MANMTFSIPY	RSCHCFVLKD	IMAAFPSCGS	280
<i>F. catus</i>	...R...R...	...K...I...	...I...I...	...I...I...	...I...I...	...I...I...	...I...I...	280
<i>B. taurus</i>	...PL...F	TR...R...I...	...G...N...	...N...N...	...I...I...	...I...I...	...I...I...	280
<i>F. caballus</i>	R...K.P.	FSD...A...	R...I...	...T...I...	...V...V...	...Q...Q...	...F...F...	280
<i>P. troglodytes</i>	...H...F	N...I...	...I...I...	...T...T...	...L...L...	...Q...Q...	...Y...Y...	280
<i>M. musculus</i>	M.W.SE...K	LSS.R...	...T...V...	...R...R...	...Q...Q...	...V...V...	...Y...Y...	280
<i>A. collaris</i>	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	304
<i>C. familiaris</i>	IIIIILNSKF	QQPFRILLCL	KKNQ	304				
<i>F. catus</i>	...L...Y	...R...F...	...F...	304				
<i>B. taurus</i>	V...N...	...R...	...R...	304				
<i>F. caballus</i>	V...H...	...R...	...R...	304				
<i>P. troglodytes</i>	V...S.R.I.	...KL	304					
<i>M. musculus</i>	V...V...	KDL.R.ML	Q.EE	304				

小圆点表示与野猪的核苷酸位点一致，短横线表示缺失，*号表示终止密码子，灰色突出显示为变异位点；序列上边的 o 表示胞外区，t 表示跨膜区，i 表示胞内区；下划线_____为 N-糖基化位点（253NMTF），_____为蛋白激酶 C 磷酸化位点（168TLK，211THR），_____为 N-肉豆蔻酰化位点（137GSFLAS）。

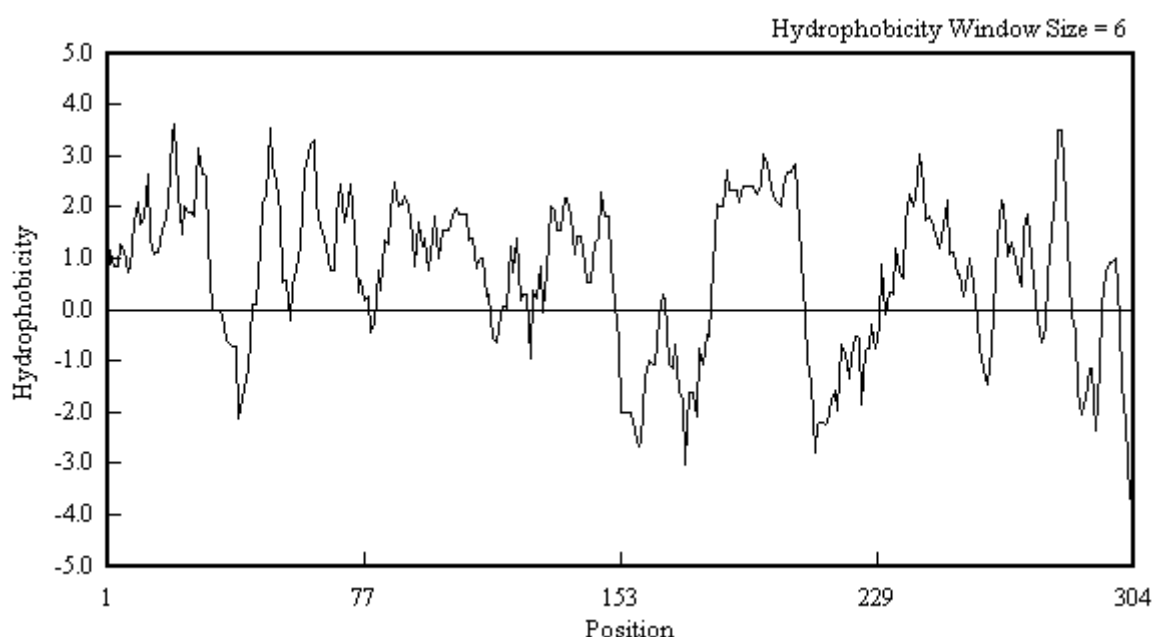


图 3 猪獾T2R2蛋白的疏水性分析图

2.2 序列比较与进化分析

将猪獾T2R2基因的外显子核苷酸序列与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠的相应相似序列进行比较，相似性分别为91.4%、90.6%、84.4%、85.4%、83.8%、72.1%。进一步进行氨基酸序列比较（图2），可知猪獾与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠T2R2基因编码的氨基酸序列相似性分别为85.5%、85.8%、74.0%、77.6%、75.3%、61.5%。在完全编码区核苷酸序列（915）的比对中，检出393个核苷酸变异位点，占分析位点总数的42.95%。其中简约信息位点124个，占变异位点总数的31.55%，单个变异位点269个，占变异位点总数的68.45%；在氨基酸序列（304 AA）的比较中，检出170个氨基酸变异位点，占分析位点总数的55.92%。其中简约信息位点57个，占变异位点总数的33.53%，单个变异位点113个，占变异位点总数的66.47%。另外，当分别按胞外区、跨膜区、胞内区进行分析时（表1），其核苷酸变异位点数占各区域总核苷酸数的百分比分别为69.5%、33.33%、33.33%，氨基酸变异位点数占各区域总残基数的百分比分别为78.33%、46.91%、56.10%，可看出胞外区的变异位率远大于跨膜区和胞内区。

表 1 猪獾 T2R2 基因不同区域核苷酸（DNA）及其氨基酸(AA)序列的总长度及变异位点数

	完整编码区 Complete Region			胞外编码区 Outside Region			跨膜编码区 Transmembrane Region			胞内编码区 Inside Region		
	TS	VS	VS%	TS	VS	VS%	TS	VS	VS%	TS	VS	VS%
DNA	915	393	42.95	141	98	69.5	558	186	33.33	330	110	33.33
AA	304	170	55.92	60	47	78.33	162	76	46.91	82	46	56.10

注：TS为各区域总位点数，VS为各区域变异位点数，VS%为各区域变异位点数占该区域总长度的百分比。

为进一步研究猪獾T2R2基因与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠间的变异情况，采用MEGA 4.1软件计算猪獾与其余6个物种T2R2基因蛋白质编码序列间碱基对的差异、非同义替换速率（ dN ）和同义替换速率（ dS ），单尾Z-检验被用于检测偏离中性的期望值，结果见表2。从表2可看出，将猪獾T2R2基因的完整编

码序列与其他6个物种间的同源序列进行核苷酸替换计算结果都表现为 $dN < dS$ ，即 ω (dN/dS) < 1 ，选择性检验为显著 ($P < 0.05$)。这表明，猪獾 $T2R2$ 基因与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠间存在着强烈的纯化选择(Purifying selection)，即强烈的功能束缚 (Functional constraint)。将猪獾 $T2R2$ 基因按其编码的蛋白质所处细胞的位置分成三个区域 (胞外编码区、跨膜编码区和胞内编码区) 来分别考察时，发现在跨膜编码区所表现的结果与完整编码区的结果完全一致，其余两个区域的结果与完整编码区的则有所不同。对于胞外编码区，猪獾与猫、牛间的 $dN > dS(\omega > 1)$ ，而与犬、马、黑猩猩和小鼠间的 $dN < dS(\omega < 1)$ ，但选择性检验均不显著 ($P > 0.05$)；对于胞内编码区，猪獾与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠间的 $dN < dS(\omega < 1)$ ，选择性检验表现为：与黑猩猩、小鼠间显著 ($P < 0.05$ ，显示出强烈的纯化选择)，其余均不显著 ($P > 0.05$)。该结果表明，猪獾 $T2R2$ 基因与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠间存在的强烈纯化选择实际上主要作用于跨膜编码区。

表 2 猪獾和其他物种间 $T2R2$ 基因不同区域每个位点的平均非同义(dN)替换数目和平均同义(dS)替换数目 ($\pm SE$)

	完整编码区 Complete Region	胞外编码区 Outside Region	跨膜编码区 Transmembrane Region	胞内编码区 Inside Region
<i>C.familiaris</i> (犬)	0.0734 \pm 0.0111 0.1449 \pm 0.03 0.5066	0.1382 \pm 0.0399 0.1798 \pm 0.0777 0.7686	0.0583 \pm 0.0134 0.1622 \pm 0.0442 0.3594	0.0624 \pm 0.0195 0.0835 \pm 0.0454 0.7473
<i>F.catus</i> (猫)	0.0738 \pm 0.0119 0.1981 \pm 0.0352 0.3725	0.1506 \pm 0.0442 0.1466 \pm 0.0688 <u>1.0273</u>	0.0672 \pm 0.0144 0.2604 \pm 0.0575 0.2581	0.0353 \pm 0.0153 0.1214 \pm 0.0615 0.2908
<i>B.taurus</i> (牛)	0.143 \pm 0.0159 0.283 \pm 0.0433 0.5053	0.2717 \pm 0.0659 0.193 \pm 0.1020 <u>1.4078</u>	0.0672 \pm 0.0175 0.3375 \pm 0.0657 0.1991	0.0353 \pm 0.0275 0.2688 \pm 0.1000 0.1313
<i>E.caballus</i> (马)	0.1247 \pm 0.0156 0.2518 \pm 0.0401 0.4952	0.2526 \pm 0.0648 0.3925 \pm 0.1433 0.6436	0.0672 \pm 0.0176 0.2707 \pm 0.0536 0.2482	0.0353 \pm 0.0222 0.1362 \pm 0.0621 0.2592
<i>P.troglodytes</i> (黑猩猩)	0.139 \pm 0.0167 0.3046 \pm 0.0447 0.4563	0.3333 \pm 0.1009 0.5123 \pm 0.2032 0.6506	0.0672 \pm 0.0172 0.2884 \pm 0.0578 0.2330	0.0353 \pm 0.0250 0.2291 \pm 0.0807 0.1541
<i>M.musculus</i> (小鼠)	0.2589 \pm 0.0248 0.7057 \pm 0.0865 0.3669	0.5001 \pm 0.1505 0.5157 \pm 0.2204 0.9697	0.0672 \pm 0.0259 0.7661 \pm 0.1500 0.0877	0.0353 \pm 0.0581 0.7992 \pm 0.2634 0.0442

注：对于每一物种，第一行的数值为 $dN \pm SE$ ，第二行为 $dS \pm SE$ ，第三行为 ω 值 ($\omega = dN/dS$)；突出显示为 dN/dS 值显著小于 1 (纯化性选择检验, $P < 0.05$)；下划线为 $dN/dS > 1$ 的值(但不显著, $P > 0.05$)。

2.3 基于 $T2R2$ 基因外显子构建的进化树

以猪獾、犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠7个物种的 $T2R2$ 基因外显子核苷酸序列为数据，借助MEGA 4.1软件，基于Kimura双参数模型，用NJ (Neighbor-Joining) 法和ME(Minimum evolution)法两种方法构建了 $T2R2$ 基因树(图4)，并采用自展(Bootstrap)检验法来评价树中分支的置信度，自展检验重复1 000次。两棵基因树的拓扑结构完全一致。从这两棵基因树可看出，猪獾首先与犬聚在一起，然后依次与猫、牛、马、黑猩猩聚在一起，最后再与小鼠聚在一起。这表明，在这7个物种中，猪獾与犬的亲缘关系最近，与猫、牛、马、黑猩猩的亲缘关系依次较近，而与小鼠的亲缘关系最远。显示出与同源性比较类似的结果。整个基因树的拓扑结构也与这7个物种树的拓扑结构是一致的。

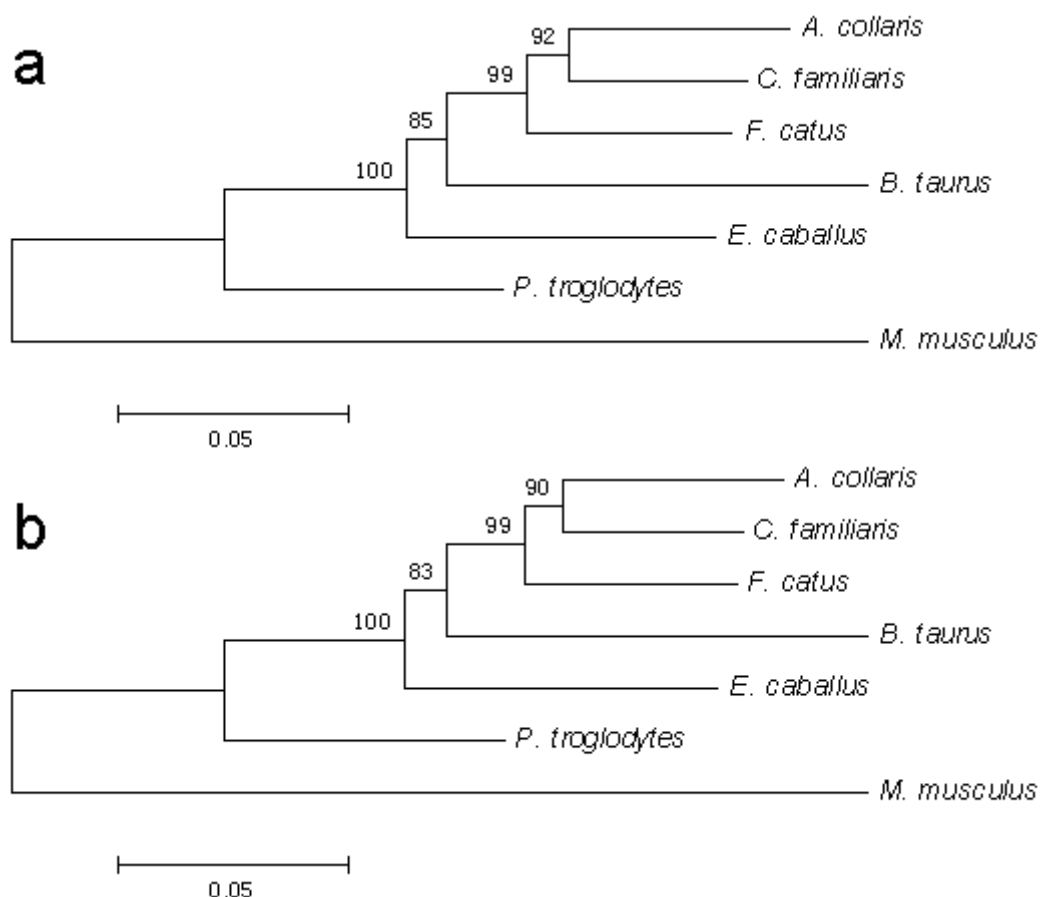


图4 7个物种 *T2R2* 基因外显子构建的NJ树(a)和ME树(b)

分枝节点上的数字为大于50%的自展值。

3 讨论

猪獾在动物分类学上属于食肉目 (Carnivora) 动物, 但与典型的食肉动物犬、猫、虎、豹等相比, 它却喜食各类动植物饲料, 即在食性上属于杂食性动物。可以推测, 猪獾在与其他典型食肉动物分道扬镳后走上杂食性道路的长期进化历程中, 在分子水平上必定要表现出对这种食性泛化的进化性适应。

本研究对猪獾 *T2R2* 基因的研究结果表明, 猪獾该基因的结构与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠等其它哺乳动物种类的一样, 基因内部无内含子, 即整个阅读框架只由1个外显子组成, 其起始密码子ATG上游的第3个核苷酸是腺嘌呤, 紧跟在ATG后面的核苷酸是鸟嘌呤, 这与“Kozak序列”特征一致^[16], 符合大多数真核生物起始密码子所具有的结构特征, 说明本研究得到的 *T2R2* 基因结构是正确的。猪獾与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠等6个物种 *T2R2* 基因编码区核苷酸序列间相似性平均达84.6%; 氨基酸序列间相似性平均达76.6%。在完全编码区核苷酸序列 (915 bp) 的比对中, 检出393个核苷酸变异位点, 占分析位点总数的42.95%。蛋白质高级结构预测表明, 猪獾 *T2R2* 蛋白质和其它物种的类似, 为跨膜螺旋蛋白, 也含有7个跨膜螺旋区、4个细胞外区和4个细胞内区。这表明猪獾与6个物种间特别是与同为食肉目的犬、猫在该基因编码区核苷酸序列及其编码的氨基酸序列上均具有较高的保守性。说明在猪獾功能基因组学的研究中, 可以利用犬、猫等其它哺乳动物中已经克隆和定位的基因来开展比较基因组学研究, 快速地克隆、定位和分析猪獾经济性状的功能基因。

本研究分别按胞外区、跨膜区、胞内区进行比较分析时,发现T2R2基因种间的变异位点主要发生在胞外区,其核苷酸变异位点数占该区域总核苷酸数的百分比高达69.5%,相应的氨基酸变异位点百分比高达78.33%。相比之下,跨膜区和胞内区的变异率则较低,核苷酸变异位点百分比均为33.33%,相应的氨基酸变异位点百分比分别为46.91%和56.10%。进一步采用MEGA 4.1软件计算猪獾与其余6个物种T2R2基因蛋白质编码序列间碱基对的差异、平均非同义替换速率(dN)和同义替换速率(dS),单尾Z-检验被用于检测偏离中性的期望值。结果显示,猪獾T2R2基因与犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠间存在着强烈的纯净化选择(Purifying selection),即强烈的功能束缚(Functional constraint),但按3个区域分别考察时,发现这种选择作用实际上主要作用于跨膜区(dN 显著小于 dS),这也说明T2R2基因种间的进化保守性主要体现在跨膜编码区,胞外区的变异则较大,胞内区次之。Shi等^[6]对于人鼠间苦味受体基因家族其他成员的分子进化研究中也得出类似的结论。

关于味觉传导的分子生理学研究结果表明苦味受体(T2R)分子的胞外区主要涉及到苦味物质分子的结合Gilbertson等^[17],而Kim等^[18]对与苯硫脲(Phenylthiocarbamide, PTC)苦味感知相关的苦味受体T2R38的研究结果则表明,PTC味感知者和PTC味非感知者间的差异仅仅是由于T2R38氨基酸序列上3个氨基酸的替换所致,即Pro-49变成Ala、Ala-262变成Val以及Val-269变成Ile。由此可推测,T2R2分子胞外区物种间的高度变异可能意味着该受体是对于介导不同苦味物质或苦味感知敏感性的一种进化性适应。当然,这仅属于初步探索,有待于进一步研究。

在真核生物系统进化研究中,多数学者采用mtDNA作为研究对象,并且获得了丰富的研究成果,但它们并不是分子进化研究中的金钥匙,也存在着一些缺陷和特例^[19],例如在物种亲缘关系较远的情况下,mtDNA不能真实反映物种间亲缘关系变化的问题。因此必须采用基于多个独立进化(不连锁)的基因组信息,即挖掘具有不同遗传特征的分子标记,如核基因序列,来验证线粒体研究结果或填补空白。本研究中以猪獾、犬、猫、牛、马、黑猩猩和小鼠7个物种的T2R2基因外显子核苷酸序列为数据,基于Kimura双参数模型,用NJ(Neighbor-joining)法和ME(Minimum evolution)法两种方法构建了T2R2基因树(图4)。两棵树的拓扑结构完全一致,各分支也均获得了较高的置信度。从该基因树可看出,在7个物种中,猪獾与犬的亲缘关系最近,与猫、牛、马、黑猩猩的亲缘关系依次较近,而与小鼠的亲缘关系最远。整个基因树的拓扑结构也与这7个物种树的拓扑结构是一致的,例如猪獾、犬、猫虽同为食肉目,但已有多种证据^[20]表明前二者同属于犬形超科(Feliformia),而后者另属于猫形超科(Caniformia)。这个结果表明T2R2基因可考虑作为哺乳动物分子系统进化树构建的一个核内候选基因。

参考文献(References):

- [1] 夏武平. 中国动物图谱—兽类(第二卷). 北京: 科学技术出版社, 1988, 25-26.
- [2] Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF. Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, 1996, 381(6585): 796-800.
- [3] Striem BJ, Pace U, Zehavi U, Naim M, Lancet D. Sweet tastants stimulate adenylate cyclase coupled to GTP-binding protein in rat tongue membranes. *Biochem J*, 1989, 260(1): 121-126.
- [4] Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ruvka NJ, Zuker CS. A novel family of mammalian taste receptors, *Cell*, 2000, 100(6): 693-702.

- [5] Conte C, Ebeling M, Marcuz A, Nef P, Andres-Barquin P J. Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 98(1): 45-53.
- [6] Shi P, Zhang J, Yang H, Zhang YP. Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(5): 805-814.
- [7] Parry CM, Erkner A, le Coutre J. Divergence of T2R chemosensory receptor families in humans, bonobos, and chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(41): 14830-14834.
- [8] Wang X, Thomas SD, Zhang J. Relaxation of selective constraint and loss of function in the evolution of human bitter taste receptor genes. *Hum Mol Genet*, 2005, 13(21): 2671-2678.
- [9] Fischer A, Gilad Y, Man O, Pääbo S. Evolution of bitter taste receptors in humans and apes, *Mol Bio Evol*, 2004, 22(3): 432-436.
- [10] Go Y, Satta Y, Takenaka O, Takahata N. Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics*, 2005, 170(1): 313-326.
- [11] Go Y. Proceedings of the SMCBE Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Lineage-specific expansions and contractions of the bitter taste receptor gene repertoire in vertebrates. *Mol Biol Evol*, 2006, 23(5): 964-972.
- [12] Dong D, Jones G, Zhang S. Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 2008, 9: 1-12.
- [13] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2002. pp. 931-958.
- [14] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157(1): 105-132.
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [16] Kozak M. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acid Res*, 1984, 12(2): 857-872.
- [17] Gilbertson TA, Damak S, Margolskee RF. The molecular physiology of taste transduction. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, 10(4): 519-527.
- [18] Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, 2003, 299(5610): 1221-1225.
- [19] Sengupta S, Yang X, Higgs PG. The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes. *J Mol Evol*, 2007, 64(6): 662-688.
- [20] 于黎, 张亚平. 食肉目哺乳动物的系统发育学研究概述. *动物学研究*, 2006, 27(6): 657-665.