

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00890

猪 *Opn4* 基因 cDNA 克隆与表达分析

邹明峰, 白林, 康波, 李学伟

四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

摘要: 为揭示猪 *Opn4* 基因的结构并研究其在猪视网膜中昼夜表达差异与生长各阶段表达规律, 文章克隆了猪 *Opn4* 基因全长 CDS 区序列, 定量检测了 *Opn4* 基因在猪视网膜中昼夜的表达量以及其不同生长阶段的表达量。结果表明, *Opn4* 基因编码区序列为 1 437 bp, 编码 478 个氨基酸, 分子式为 $C_{2398}H_{3705}N_{623}O_{651}S_{23}$; *Opn4* 基因在白昼的表达量极显著高于夜晚 ($P<0.01$); *Opn4* 基因在出生前 34 d 胎儿视网膜中表达量最低 ($P<0.01$); 1 日龄时表达量最高 ($P<0.01$); 1 月龄、4 月龄、84 月龄猪视网膜中 *Opn4* 表达量差异不显著 ($P>0.05$)。以上结果提示, *Opn4* 基因可参与调控猪的生物节律, 并且 *Opn4* 主要参与出生后猪对外界光照的应答。

关键词: *Opn4*; 生物信息学; 表达; 视网膜; 实时定量 PCR

cDNA cloning and expression analysis of *Opn4* gene in retina of swines

ZOU Ming-Feng, BAI Lin, KANG Bo, LI Xue-Wei

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

Abstract: The purpose of this work was to elucidate the characteristics and the expression profiles of porcine *Opn4* during developmental stages and different times of the day. The coding sequence of *Opn4* gene was cloned. The mRNA expression levels of *Opn4* gene in the retina of the swines during developmental stages and different times of the day were examined. The results showed that the swine ORF of *Opn4* gene was 1 437 bp in length which encodes 478 amino acids residues with the molecular formula of $C_{2398}H_{3705}N_{623}O_{651}S_{23}$. The expression level of *Opn4* in the day was significantly higher than that in the night ($P<0.01$). During the growing periods, *Opn4* started expressing as early as 34 d in the embryonic phase with the lowest level ($P<0.01$), reached to a peak 1 day after birth ($P<0.01$), and then stayed at a moderate standard. The difference of *Opn4* expressions among the swines at 1th month, 4th month, and 84th month was not significantly different ($P>0.05$). In total, results showed that the *Opn4* gene can regulate the biological rhythm of the swines. Furthermore, it play an important role in mediate the responsibility to the light in the postnatal swines.

Keywords: *Opn4*; bioinformatics; expression; retina; real-time quantitative PCR

收稿日期: 2012-11-30; 修回日期: 2013-03-14

基金项目: 国家生猪产业体系四川创新团队养猪生产与环境控制项目资助

作者简介: 邹明峰, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: ZWL320036@163.com

通讯作者: 白林, 博士, 教授, 研究方向: 动物生产与环境控制。E-mail: blin16@126.com

网络出版时间: 2013-3-27 13:38:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130327.1338.001.html>

Melanopsin 是新近发现含 7 个跨膜结构域的视蛋白,属于 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR),由 *Opn4* 基因编码,主要在视网膜的自主感光视网膜神经节细胞(Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipGCs)中表达^[1,2]。Melanopsin 具有光敏感性、类维生素 A 作用以及信号转换的功能。*Opn4* 基因的发现改变了人们对视网膜感光的认识,也使得 ipGCs 成为继视锥细胞和视杆细胞之后的第 3 种的光感受细胞^[3,4]。通过 Melanopsin 的介导,ipGCs 具有感受光信号并将其投射到视交叉上核的功能。因此,ipGCs 具有瞳孔光反射、调节神经内分泌、传输光信号等非视觉成像系统的功能^[5]。

哺乳动物 *Opn4* 基因 CDS 区全长约 1 kb,包含 10 个外显子和 9 个内含子。哺乳动物 *Opn4* 基因前 8 个外显子的相似性较高,而后 2 个外显子相似性较低。人类 *Opn4* 基因位于染色体 10q22,包含 534 个氨基酸^[6]。哺乳动物 *Opn4* 基因长短有较大差异,小鼠约有 8 kb,大鼠约为 10 kb,而人类在 10 kb 以上。Gonzalez-Menendez 等研究小鼠 *Opn4* 基因生长表达规律,结果表明小鼠 *Opn4* 基因在胚胎期第 15 d 时就已表达,16 d 到 19 d 的表达量无显著变化,而从胚胎期第 19 d(出生前 1 d)到出生期间 Melanopsin 的表达量显著增长^[7]。Sekaran 等^[8]研究表明,出生后小鼠的 ipGCs 就能感受光刺激,并且在出生后 24 h 内小鼠 ipGCs 细胞的数量增加 2 倍。而小鼠从产后第 1 d 开始,ipGCs 数量保持不变,改变的只是 Melanopsin 的表达量^[9]。总之,ipRGC 的神经发生晚于其他的视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cells, RGCs),ipRGCs 主要在产后才开始调控下丘脑的视交叉上核(Suprachiasmatic nucleus, SCN)^[10],而 ipRGCs 的感光功能依赖于 *Opn4* 的表达。

猪是嗜睡的大型肉用家畜,没有色觉且视觉较差。猪对环境的感知主要依赖其发达的嗅觉,而生物节律的调节需要光照的参与。因此,作为一种调控生物体非视觉成像系统的基因,*Opn4* 在猪体内的感光功能及调节生物节律的功能对于猪维持日常行为具有不可替代的作用。因此,本研究克隆了猪 *Opn4* 基因并对其进行了生物信息学分析,检测了不同生长阶段猪视网膜 *Opn4* 基因 mRNA 表达量以及猪

视网膜中 *Opn4* 基因的昼夜表达差异,为阐明猪 *Opn4* 基因功能及其调控生物节律作用机制的研究奠定基础,同时将有助于理解动物视觉产生以及对光信号改变作出应答的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

试验用猪由四川农业大学实验养猪场提供的健康母猪(非同窝),产前 34 d 胎儿 3 头(A)、1 日龄仔猪 3 头(B)、1 月龄仔猪 3 头(C)、4 月龄猪 6 头(D)、84 月龄经产母猪 3 头(E),其中产前 34 d 胎儿 3 头(A)分别为 84 月龄经产母猪 3 头体内胎儿。以上样品用于猪 *Opn4* 不同生长阶段 mRNA 表达水平分析试验,猪只均在当日 8:00 统一屠宰,并采集猪视网膜。3 头 4 月龄育肥猪在 21:00 屠宰,采集猪视网膜,冷冻保存备用。连同 D 组 8:00 屠宰猪只 3 头用于猪 *Opn4* 昼夜 mRNA 表达水平分析试验。

1.2 总 RNA 提取与逆转录反应

应用 Trizol 试剂(宝生物工程(大连)有限公司)提取总 RNA,取 1 μ g 各阶段总 RNA,进行逆转录反应。逆转录(宝生物工程(大连)有限公司)体系为 20 μ L,其中总 RNA 1 μ g,5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ L,gDNA Eraser 1 μ L,总 RNA 1 μ g,RNase Free dH₂O 加至 10 μ L。42 $^{\circ}$ C 2 min,4 $^{\circ}$ C 保存。反应完成后再加入 5 \times PrimeScript[®]Buffer 2(for Real Time)4 μ L,PrimeScript[®]RT Enzyme Mix I 1 μ L,RT Primer Mix 4 μ L,RNase Free dH₂O 加至 20 μ L。37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 猪 *Opn4* 基因的克隆

根据 GenBank 已发表的人类(NM_033282.3)、小鼠(NM_013887.2)、大鼠(NM_138860.1)*Opn4* 基因序列,利用 Premier 5.0 软件设计 *Opn4* 基因编码区全长 PCR 引物 *Opn4*-A、*Opn4*-B、*Opn4*-C;荧光定量引物 *Opn4*-Y、内参基因 *ACTB*、内参基因 *Beta-actin*(表 1)。引物由北京华大基因公司合成。PCR 反应(天根生化科技(北京)有限公司)体系为 20 μ L,其中模板 cDNA 3 μ L,上下游引物各 0.8 μ L,10 μ L 的 10 \times Taq Mix,加灭菌去离子水 5.4 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,复性 30 s(复性温

度见表 1), 72 °C 延伸 1 min, 38 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。采用凝胶回收试剂盒回收目的片段, 具体步骤参见 OMEGA 说明书(OMEGA, USA)。PCR 产物纯化回收后, 分别克隆到 pMD19-T 载体(宝生物工程(大连)有限公司)中, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆委托华大基因公司测序。

1.4 生物信息学分析

使用 MEGA 5 对不同物种的 *Opn4* 基因序列进行同源性比对, 构建 *Opn4* 进化树, 分析不同物种之间的序列差异(表 2); 用 ProParam 工具分析 Melanopsin 的理化性质; 用 TMHMM Server V.2.0 对 Melanopsin 的跨膜区进行分析; 用 SMART 服务器分析 *Opn4* 蛋白的结构功能域; 用 PROSITE 数据库进行 motif 搜索; 用 SWISS-MODEL 同源建模(compatative modeling)Melanopsin 的三级结构。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测不同生长阶段以及昼夜 *Opn4* 表达水平

qRT-PCR 反应(宝生物工程(大连)有限公司)体系: SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 加 DEPC 处理水 8.5 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 反应结束后进行熔解曲线分析。qRT-PCR 结果用 CFX 软件的比较 Ct 法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)进行分析, 以内参基因为对照组, 计算 *Opn4* 基因在猪不同生长阶段以及昼夜 mRNA 的相对表达量, 采用 SPSS 软件单因素 ANOVA($P < 0.01$)进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 猪 *Opn4* 基因序列

1%琼脂糖凝胶电泳检测表明, *Opn4*-A、B、C 的 3 对引物 PCR 扩增产物, 在电泳检测中分别可见目的片段大小的特异条带(表 1)。克隆和测序结果表明, 本研究成功获得猪 *Opn4* 基因 1 456 bp 的核苷酸序列, 序列分析发现包括 1 437 bp 的 CDS 编码区, 编码 478 个氨基酸。

2.2 猪 Melanopsin 氨基酸序列的生物信息学分析

利用 Proaram tool 程序分析去除信号肽后的成熟蛋白, 结果显示 Melanopsin 的分子质量约 52 kDa, 理论等电点为 9.31, 总共包括 7 400 个原子, 分子式为 C₂₃₉₈H₃₇₀₅N₆₂₃O₆₅₁S₂₃; 在组成 Melanopsin 的 20 种氨基酸中, 亮氨酸(Leu)所占的比例最高, 高达 11.5%, 而天冬酰胺(Asn)所占的比例最低, 为 1.5%; Melanopsin 的不稳定指数为 50.83, 脂肪指数为 93.91。用 TMHMM server v.2.0 预测 Melanopsin 是有 7 个跨膜区的跨膜蛋白。用 SAMRT 服务器搜索 *Opn4* 基因蛋白结构功能域, 预测到 *Opn4* 基因蛋白有 3 种高度保守的结构功能域——Pfam: 7TM_GPCR_Srx、Pfam: 7TM_GPCR_Srsx、Pfam: 7tm_1。通过对 3 种结构域的序列分析, 发现 Pfam: 7TM_GPCR_Srsx 包含在 Pfam: 7tm_1 中, 而 Pfam: 7tm_1 包含在 Pfam: 7TM_GPCR_Srx 中。因此事实上的结构域可能只是其中一种。PROSITE 数据库进行 motif

表 1 克隆和实时荧光定量 PCR 引物

用途	引物名称	序列(5'→3')	片段长度(bp)	复性温度(°C)
PCR 扩增	<i>Opn4-AU</i>	AGCTTCTGGTCATCCTTCTCTTTG	646	56
	<i>Opn4-AL</i>	ATGTGAAGGGGCTGGATGTG	646	56
	<i>Opn4-BU</i>	CTCTATGCCCTCGCTTGGAGTCTAC	565	68
	<i>Opn4-BL</i>	GTGGGTGGAGCGGTAACCTGGT	565	68
	<i>Opn4-CU</i>	TTGTACACCAGTTACCGCTCCA	343	55
	<i>Opn4-CL</i>	GTGTCCCAGAAGACAGGCAGAG	343	55
	<i>Opn4-YU</i>	AGCTTCTGGTCATCCTTCTCTTTG	184	60
	<i>Opn4-YL</i>	ATTCTGTACTTGGGATGGGTGAT	184	60
实时荧光定量 PCR	<i>ACTB-U</i>	TCTGGCACCACACCTTCT	114	60
	<i>ACTB-L</i>	TGATCTGGGTCATCTTCTCAC	114	60
	<i>Beta-actin-U</i>	CCTCTATGCCAACACAGTGC	211	60
	<i>Beta-actin-L</i>	GTACTCCTGCTTGCTGATCC	211	60

表 2 构建进化树物种序列

物种名称	基因	GenBank 登录号
<i>Bos taurus</i>	<i>Opn4</i>	NM_001192399.1
<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Opn4</i>	XM_848642.2
<i>Felis catus</i>	<i>Opn4</i>	NM_001009325.2
<i>Macaca mulatta</i>	<i>Opn4</i>	XM_001088248.2
<i>Nomascus leucogenys</i>	<i>Opn4</i>	XM_003278589.1
<i>Pan troglodytes</i>	<i>Opn4</i>	XM_001135445.1
<i>Homo sapiens</i>	<i>Opn4</i>	NM_033282.3
<i>Mus musculus</i>	<i>Opn4</i>	NM_013887.2
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Opn4</i>	NM_138860.1
<i>Sminthopsis crassicaudata</i>	<i>Opn4</i>	DQ383281.1
<i>Danio rerio</i>	<i>Opn4</i>	NM_001128761.1
<i>Gallus gallus</i>	<i>Opn4</i>	EU124632.1
<i>Rutilus rutilus</i>	<i>Opn4</i>	AY226847.1
<i>Astatotilapia burtoni</i>	<i>Opn4</i>	EU523855.1
<i>Coryphaenoides armatus</i>	<i>Opn4</i>	EU479707.1
<i>Meleagris gallopavo</i>	<i>Opn4</i>	XM_003205485.1
<i>Podarcis sicula</i>	<i>Opn4</i>	DQ013043.2

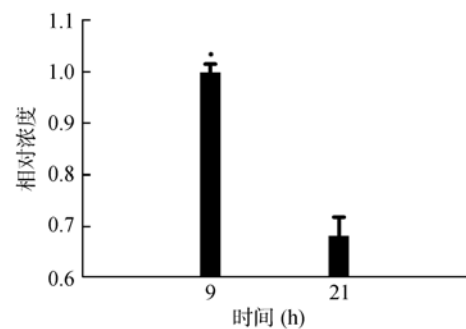
搜索, Melanopsin 中 2 处位置与 G 蛋白偶联受体、视蛋白模式相匹配, 具体为 156-172、334-350 位的氨基酸序列。通过二级结构预测, 表明猪 Melanopsin α 螺旋结构占 45.40%, β 折叠结构占 8.79%, 无规则卷曲结构占 45.82%。在 SWISS-MODEL 上使用同源建模的方法预测 Melanopsin 的三级结构, Melanopsin 蛋白是基于 2ziy A 链建模的, 两者序列一致性达到 38.37%。预测猪 Melanopsin 与模板蛋白三维结构均方根偏差(Root-mean-square deviation, RMSD)为 3.70 Å。2ziy A 为视紫红质晶体, 进一步证明 Melanopsin 是一种感光因子。其的作用机理可能与视紫红质相似。

猪 *Opn4* 基因的 CDS 区序列与其他物种的 *Opn4* 基因 CDS 区序列进行比对, 结果表明, 该序列猪与牛的相似性最高, 为 89.63%; 其后依次是白颊长臂猿 85.30%、人类 85.03%、猫 83.11%、黑猩猩 83.01% 等。说明所获取序列是正确的序列, 并且该序列是比较保守的。

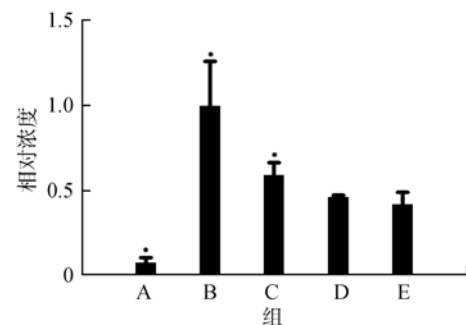
2.3 猪 *Opn4* 基因的不同生长阶段以及昼夜 mRNA 表达水平分析

猪视网膜中 *Opn4* 基因昼夜表达规律的 qRT-PCR 结果表明, 4 月龄育肥猪白昼时 *Opn4* 基因表达

量极显著高于夜晚($P<0.01$)(图 1)。*Opn4* 基因在不同生长阶段猪视网膜中的表达分析表明, 将出生后 1 日龄仔猪(B)*Opn4* 基因相对于 Beta-actin、ACTB 的表达量定义为 1。从图 2 可以看出, *Opn4* 基因在 1 日龄时表达量最高($P<0.01$); 出生前 34 d 时 *Opn4* 基因表达量最低($P<0.01$); 1 月龄、4 月龄、84 月龄 *Opn4* 基因表达量相对稳定, 两两间差异不显著($P>0.05$)。说明 *Opn4* 基因在胚胎期就已经有少量表达, 但在出生后表达量很快达到顶峰, 随后相对稳定在一个适中的水平。

图 1 猪 *OPN4* 基因昼夜表达差异

*表示 $P<0.01$ 。

图 2 *Opn4* 基因不同生长阶段表达差异分析

A: 产前 34 d 胎儿; B: 1 日龄仔猪; C: 1 月龄仔猪; D: 4 月龄育肥猪; E: 84 月龄经产母猪。*表示 $P<0.01$ 。

3 讨论

Melanopsin 为一包含 7 次跨膜结构域的 G 蛋白偶联受体, 是一种双稳态的感光色素。Melanopsin 作为感光色素, 凭借 G 蛋白信号级联放大产生综合性的细胞应答, 从而推动机体对光信号反应^[11, 12]。本研究成功克隆了猪 *Opn4* 基因序列, 人类与猪 *Opn4* 基因的序列相似性为 85.73%, 氨基酸的相似性为 81.38%; 人类与猪的 Melanopsin 都具有 7 个跨膜区和 3 个高度保守的 G 蛋白偶联受体功能结构域,

说明猪与人 Melanopsin 与配体的结合能力是相似的。人类的 motif 位点与猪一致,但氨基酸序列有所改变:人类 157 号氨基酸为丝氨酸(Ser S)、猪 157 号氨基酸为苏氨酸(Thr T);人类 345 号氨基酸为酪氨酸(Tyr Y)、猪 345 号氨基酸为组氨酸(His H),这些差异所致的 Melanopsin 的功能差异仍有待进一步研究阐明。进化树分析表明猪与牛的 *Opn4* 基因的相似性最高,说明猪与牛在感光与生物节律调控方面有一定的相似性。

本研究结果表明猪视网膜 *Opn4* 基因的表达量呈现昼夜波动的规律性变化,提示 *Opn4* 参与调控猪对外界环境(光照)变化的应答。Melanopsin 的感光依赖于视黄醛反式亚型的存在,有选择地对短波光敏感^[12],Melanopsin 感受光刺激并将其传到视觉交叉上核来维持动物的昼夜节律。因此,作为调节生物节律的视蛋白,视网膜中 Melanopsin 的表达处于动态平衡。这种平衡的维持有助于生物体准确的感知光环境的变化,也使得该基因的表达量与光照的周期变化同步,实现对生物钟基因的校准。白昼由于有充足的光信号不断进入视网膜,使得视网膜中 Melanopsin 被不断消耗,为维持 Melanopsin 在视网膜中的相对稳定,机体不断增加 *Opn4* 基因的表达量,维持机体的动态平衡;夜晚光信号减弱,Melanopsin 的消耗也相对减少,使得 *Opn4* 基因的表达量也相对减少。另外,Melanopsin 在这一过程中产生的中间代谢物,可能不断积累形成“睡眠压”,从而导致猪嗜睡行为的产生^[13]。这些都与该基因作为一种调控生物节律的视蛋白的功能是相适宜的。但猪嗜睡的生物学特性是否是该基因的表达异于其他物种而引起的,还需要进一步的研究。由于猪视觉成像系统不完善,因此光信号通过视觉成像系统调节其生物节律的作用可能不如人和鸡等动物重要,但 Melanopsin 作为通过非视觉成像系统调节生物节律的视蛋白,在猪体内的调节作用因而比在其他动物中的调节作用更重要。

Opn4 基因在猪的胚胎期就已经有少量表达,但在出生后表达量很快达到顶峰,随后相对稳定在一个适中的水平,这与 Gonzalez-Menendez 等^[7]的研究结果相似。Melanopsin 在出生前就已经表达可能是胎儿需要与母体的生物节律同步,所以作为调节生物节律的 Melanopsin 在胎儿期表达是必要的。但该

基因在仔猪胎儿期所起到的作用还需要进一步研究。非视觉成像系统是先于视觉成像系统发育成熟的,仔猪在初生期视觉成像系统还未完全发育成熟,非视觉成像系统在这个期间担任了感知光线的功能。因此仔猪在初生期表现出较强的避光性^[14],其心率也受到光信号调控^[15,16]。在这个过程中起到感光分子作用的极可能就是 Melanopsin。仔猪在出生前后其所处的光环境发生巨大变化,为应对光环境的改变,生物体需要进行适应性调节。所以在出生前 *Opn4* 基因表达量有一个爆发式增长。这充分说明 *Opn4* 基因在仔猪早期非视觉成像系统感知光信号和调节生物节律中具有至关重要的作用。仔猪 *Opn4* 基因表达量在 1 月龄以后处于相对稳定的表达水平,说明该基因并不随年龄的增加以及体重的增加而变化。这与生物体需要保持其生物节律相对稳定的特性是相适宜的。

光对于生物体维持正常的生物学特性具有重要意义,生物体可以通过光信号的改变调整它们的行为以应对其所处的特定的光环境。由于猪视觉成像系统并不完善,非视觉成像系统对猪调节自身行为的作用显得尤为重要。而 *Opn4* 基因作为一种非视觉成像系统中调节生物节律的感光视蛋白,其通过接受光信号调节猪行为的作用是至关重要的。在以往的研究中,人们认为猪视觉系统对猪行为的影响十分有限,对通过光环境调节控制猪行为的研究较少,而 *Opn4* 基因的发现及其作用让人们不得不重新审视光环境对猪的生理调节作用。

参考文献(References):

- [1] Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*, 2002, 415(6871): 493. DOI
- [2] Hatori M, Panda S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med*, 2010, 16(10): 435–446. DOI
- [3] Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 2002, 295(5557): 1065–1070. DOI
- [4] Foster RG, Hankins MW. Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21(6): 507–527. DOI

- [5] Nayak SK, Jegla T, Panda S. Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(2): 144–154. [DOI](#)
- [6] Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*, 2000, 20(2): 600–605. [DOI](#)
- [7] González-Menéndez I, Contreras F, García-Fernández JM, Cernuda-Cernuda R. Perinatal development of melanopsin expression in the mouse retina. *Brain Res*, 2011, 1419: 12–18. [DOI](#)
- [8] Sekaran S, Lupi D, Jones SL, Sheely CJ, Hattar S, Yau KW, Lucas RJ, Foster RG, Hankins MW. Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol*, 2005, 15(12): 1099–1107. [DOI](#)
- [9] González-Menéndez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, García-Fernández JM. No loss of melanopsin-expressing ganglion cells detected during postnatal development of the mouse retina. *Histol Histopathol*, 2010, 25(1): 73–82. [DOI](#)
- [10] McNeill DS, Sheely CJ, Ecker JL, Badea TC, Morhardt D, Guido W, Hattar S. Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry. *Neural Dev*, 2011, 6: 8. [DOI](#)
- [11] Melyan Z, Tarttelin EE, Bellingham J, Lucas RJ, Hankins MW. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature*, 2005, 433(7027): 741–745. [DOI](#)
- [12] Kang SW, Leclerc B, Kosonsiriluk S, Mauro LJ, Iwasawa A, El Halawani ME. Melanopsin expression in dopamine-melatonin neurons of the premammillary nucleus of the hypothalamus and seasonal reproduction in birds. *Neuroscience*, 2010, 170(1): 200–213. [DOI](#)
- [13] Nana NN, Takasu M, Nakamura W. Importance of regular lifestyle with daytime bright light exposure on circadian rhythm sleep-wake disorders in pervasive developmental disorders. *Jpn Dent Sci Rev*, 2011, 47(2): 141–149. [DOI](#)
- [14] Johnson J, Wu V, Donovan M, Majumdar S, Rentería RC, Porco T, Van Gelder RN, Copenhagen DR. Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(40): 17374–17378. [DOI](#)
- [15] Hao HP, Rivkees SA. The biological clock of very premature primate infants is responsive to light. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2426–2429. [DOI](#)
- [16] Dailey W, Wigal SB, Amsel A. Effects of photic stimulation on heart rate of infant rats. *Int J Psychophysiol*, 1986, 3(3): 183–204. [DOI](#)