

Amplification and Analysis of the Partial cDNA Sequence of UCP1 Gene in *Tupaia belangeri*

Wenrong Gao^{1,2*}, Wanlong Zhu^{2#}

¹School of Energy and Environmental Science, Yunnan Normal University, Kunming

²Key Laboratory of Ecological Adaptive Evolution and Conservation on Animals-Plants in Southwest Mountain Ecosystem of Yunnan Provinc Higher Institutes College, School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming

Email: gaowenrong2012@163.com, zwl_8307@163.com

Received: Aug. 25th, 2014; revised: Sep. 16th, 2014; accepted: Oct. 8th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Uncoupling protein-1 (UCP1) is a kind of heat producing protein, which distributes on the inner membrane of mitochondria. Its main function is to maintain the body's energy metabolic balance by participating thermogenic regulation and energy metabolism in BAT. In this study, we designed primers and used reversing transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). This experiment successfully obtained 444 bp BAT UCP1 cDNA core fragment of tree shrews, and we speculated that the amino acid sequence were 148 amino acids. After structure-function analysis, we found that fragment composed of these amino acid possessed 32 bp homologous sequence of UCPs and 13 bp specific sequence of UCP1 in *Tupaia belangeri*. After the comparison of amino acid sequence homology, the results showed that the UCP1 homology between tree shrews and other animals like *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetulus griseus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Equus caballus*, *Felis catus*, *Bos taurus*, *Odobenus rosmarus*, *Pongo abelii* and *Ailuropoda melanoleuca* was respectively 80%, 81%, 82%, 86%, 85%, 86%, 89%, 87%, 83% and 88%. UCP1 coding region showed higher conservation in mammals, suggesting that UCP1 plays an important physiological role in vertebrates.

Keywords

Tupaia belangeri, UCP1, cDNA, RT-PCR

*第一作者。

#通讯作者。

中缅树鼩解偶联蛋白-1基因部分序列的扩增与分析

高文荣^{1,2*}, 朱万龙^{2#}

¹云南师范大学能源与环境科学学院, 昆明

²云南省高校西南山地生态系统动植物生态适应进化及保护重点实验室, 云南师范大学生命科学学院, 昆明

Email: gaowenrong2012@163.com, zwl_8307@163.com

收稿日期: 2014年8月25日; 修回日期: 2014年9月16日; 录用日期: 2014年10月8日

摘要

解偶联蛋白-1 (UCP1)是分布于线粒体内膜上的一种产热蛋白,其主要功能是参与褐色脂肪组织(BAT)的产热调节和能量代谢来维持机体的能量代谢平衡。本研究通过设计简并引物进行反转录聚合酶链式反应(RT-PCR),从中缅树鼩(*Tupaia belangeri*)BAT中成功获得444 bp UCP1 cDNA核心片段。推测其氨基酸序列为148个氨基酸;经结构功能分析发现,此段氨基酸序列具有32 bp UCPs 共同具有的同源序列,具有13 bp中缅树鼩BAT UCP1的特异性序列;进行氨基酸源性序列比较分析表明,中缅树鼩与小家鼠、褐家鼠、灰仓鼠、家兔、马、猫、牛、海象、黑猩猩和大熊猫UCP1的同源性分别为80%、81%、82%、86%、85%、86%、89%、87%、83%和88%。结果表明:UCP1编码区在哺乳动物中具有较高保守性,提示UCP1在脊椎动物中扮演着重要的生理角色。

关键词

中缅树鼩, UCP1, cDNA, RT-PCR

1. 引言

解偶联蛋白(UCPs)是分布于线粒体内膜上的一类产热蛋白[1]。其活性与热量散失紧密相关,受嘌呤核苷(ADP, ATP)、鸟苷(GDP, GTP)及游离脂肪酸(Free Fatty Acids, FFA)的调节,在哺乳动物产热和能量代谢调节中具有重要的作用[1]。目前已发现主要有五种类型的UCP:UCP1、UCP2、UCP3、UCP4和UCP5。UCP1活性存在于哺乳动物褐色脂肪组织(Brown adipose tissue, BAT)中;UCP2则广泛分布于全身组织,如白色脂肪组织(White adipose tissue, WAT)、心、肝、肾、脾、甲状腺、胃肠等[2];UCP3主要分布于骨骼肌中[3];UCP4主要分布于神经组织中[4];UCP5主要存在于脑及神经组织中。这些蛋白质都属于线粒体载体族蛋白。后来又在啮齿类和人的大脑里发现存在一种与UCP3功能相似的线粒体载体蛋白,称为脑线粒体载体蛋白-1(BMCP1)[5]。在马铃薯和拟南芥中也发现与哺乳动物UCPs类似的解偶联蛋白,即StUCP和AtUCP,可能与植物抵抗低温胁迫功能有关。近年来的研究大都支持UCPs作用于线粒体状态IV呼吸,引起呼吸解偶联或质子泄漏的观点[5]。目前,不仅在哺乳动物和植物组织中发现有多种解偶联蛋白质(UCP1、UCP2、UCP3、UCP4、BMCP1、StUCP、AtUCP)存在,而且在原生动物、鱼类中均发现存在与哺乳动物和植物UCPs相类似的解偶联蛋白。因此UCPs可能存在于整个真核生物中[6]。其中UCP1、UCP2、UCP3是决定哺乳动物线粒体解偶联过程的主要蛋白质,在哺乳动物产热和能

量代谢调节中具有重要的作用。UCP1, 可能还有 UCP3 主要决定了 BAT 和骨骼肌的非颤抖性产热能力; UCP2 可能在调节体重和维持能量代谢平衡中起着重要的作用[7]。

中缅树鼩属攀鼩目(Scandentia)树鼩科(Tupaiaidae), 该科动物主要分布于印度、尼泊尔、缅甸、苏门答腊、爪哇、婆罗洲, 以及贝宁、菲律宾及其附近的岛屿[8]。在国内主要分布于云南、广西、贵州、四川及海南岛等地, 其中, 云南是其主要的分布区[9]。随着世界灵长动物资源的逐渐枯竭和生物学实验动物小型化发展, 自 80 年代以来, 中缅树鼩已被广泛应用于各种生物医学研究, 例如, 现已广泛用于研究肝炎[10], 尤其是研究丙肝病毒的感染机制[11]。目前, 对 UCP 的研究主要集中在人和鼠上, 本研究从中缅树鼩 BAT 中成功获得了 UCP1 基因 cDNA 核心序列, 这将为脊椎动物 UCP1 基因结构与功能研究提供新信息。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

实验动物中缅树鼩捕自昆明禄劝县灌丛, 该地区位于东经 102°13'~102°57', 北纬 25°26'~26°22', 海拔 1679 m。该地区位于滇中高原北部, 气候属于北亚热带高原气候, 年平均温度为 15.6°C; 最热月(7 月)平均气温 19.8°C; 最冷月(1 月)为 7.8°C[12], 气温垂直变化明显, 年温差较小, 但是日温差较大。该地区地表起伏较大, 地质地貌复杂。

2.2. 方法

2.2.1. BAT 中总 RNA 的提取

将中缅树鼩断颈处死以后, 分离出 BAT, 总 RNA 的提取与纯化按照 RNApure 高纯总 RNA 快速抽提试剂盒(BioTeke Co.)进行。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度和完整性。RNA 于-80°C 保存。

2.2.2. cDNA 第一链的合成

cDNA 第一链的合成使用试剂盒, 以 BAT 总 RNA 为模板, oligo (dT)18 为反转录引物, 按照 M-MLV First Strand Kit 试剂盒(Invitrogen Co.)推荐方法进行。按表 1 冰浴配制反应体系, 反应完毕后, 于-20°C 保存。

2.2.3. UCP1 基因 cDNA 核心序列的扩增

根据人、大鼠和小鼠等已知脊椎动物 UCP1 基因氨基酸序列的保守区域设计简并引物。以上述 cDNA 第一链为模板进行 RT-PCR, 扩增条件为: 94°C 变性 5 min, 94°C 30 s, 53~58°C 1 min, 72°C 1 min, 共 37 个循环, 72°C 延伸 10 min。扩增体系为 25 μ L: 其中包括 1 μ L Template (10 ng/ μ L), 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 1 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μ L dNTP Mixture (10 mmol/L, pH 8.0), 1 μ L Primer 1 (10 pmol/ μ L), 1 μ L Primer 2 (10 pmol/ μ L), 0.5 μ L Taq enzyme (4 U/ μ L), 16 μ L ddH₂O。

2.2.4. 数据处理

对于获取的 UCP1 基因 cDNA 序列, 用美国国家生物技术信息中心(NCBI, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)网站的 BLAST 软件进行同源性比对, 采用 MEGA5 软件[13]中的 ML 法与 GenBank 数据库中已公布的不同来源的 UCP1 基因 cDNA 序列构建系统进化树, 系统树各分支的数值由 500 次重复检验所得; 用 ORF 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>)推导编码蛋白的氨基酸序列。

3. 结果与分析

3.1. BAT 中总 RNA 的提取

根据 Biotek 公司的 Total RNA Isolation Kit 试剂盒说明书提取中缅树鼩 BAT 总 RNA, 并以 0.8% 琼

Table 1. The reaction system of cDNA synthesis for first chain**表 1.** cDNA 第一链合成反应体系

配制体积	100 (μL)
5 × 第一链合成缓冲液	4 μl
10mMdNTP (each)	1 μl
Oligo (dT)	1 μl
0.1MDTT	2 μl
RNA 模板	8 μl
M-MLV	1 μl
RNase ddH ₂ O	补充至 20 μl
总体积	20 μl

脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。

3.2. UCP1 基因 cDNA 核心序列

以中缅树鼩 BAT 总 RNA 为模板, 根据 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书合成 cDNA 第一链, 根据已经报道的人、鼠、犬等哺乳动物 UCP1 序列的保守区域, 设计引物, 再分别以上述 cDNA 第一链为模板, 进行 RT-PCR 合成 cDNA, 进行琼脂糖电泳检测, 获得产物片段, 结果见图 2。

3.3. UCP1 RT-PCR 产物的测序及分析

送 UCP1 RT-PCR 所得产物, 进行正反两个方向的序列测定, 结果得到一个 444 bp 的中缅树鼩 BAT UCP1 cDNA 核心片段, 推测其氨基酸序列为 148 个氨基酸。经结构功能分析发现, 此段氨基酸序列具有 32 bp UCPs 共同具有的同源序列, 具有 13 bp 中缅树鼩 BAT UCP1 的特异性序列(图 3)。

3.4. UCP1 氨基酸序列的同源性分析

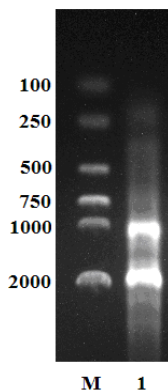
哺乳类动物完整的 UCP1 一级结构由 306 个氨基酸残基构成, 含有 6 个外显子和 5 个内含子。中缅树鼩与小家鼠、褐家鼠、灰仓鼠、家兔、马、猫、牛、海象、黑猩猩和大熊猫 UCP1 的同源性分别为 80%、81%、82%、86%、85%、89%、87%、83% 和 88%(图 4), 表明 UCP1 编码区在哺乳动物中具有较高保守性, 提示 UCP1 在脊椎动物中扮演着重要的生理角色。

3.5. UCP1 系统进化分析

我们利用 NJ 法运算 500 次建立系统进化树, 将扩增得到的 UCP1 序列与小家鼠(*Mus musculus* NM_009463.3)、褐家鼠(*Rattus norvegicus* NM_012682.2)、金仓鼠(*Mesocricetus auratus* NM_001281332.1)、绵羊 (*Ovis aries* JN604985.1)、野猪 (*Sus scrofa* NG_005757.1)、小耳大婴猴 (*Otolemur garnettii* XM_003790181.1)、普通狨(*Callithrix jacchus* XM_002745333.1)、猕猴(*Macaca mulatta* XM_001090457.2)、智人(*Homo sapiens* NG_012139.1)、鲫鱼(*Cyprinus carpio* AY461434.2)UCP1 序列构建系统进化树, 由图 5 可以看出褐家鼠、小家鼠和金仓鼠聚在一起, 形成啮齿目分支; 绵羊和野猪聚在一起形成偶蹄目分支; 鲫鱼单独聚为一支; 中缅树鼩与小耳大婴猴、普通狨、猕猴和智人聚为灵长目分支。说明中缅树鼩的亲缘关系更接近灵长目。

4. 讨论

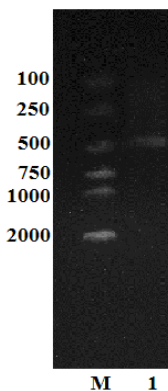
研究指出 UCP1 的一级结构由 306 个氨基酸残基构成, 具有 6 个由 α -螺旋构成的疏水环的过渡区域



注: M: Marker; 1: BAT 中总 RNA;
Note: M: Marker; 1: the total RNA of BAT

Figure 1. Total RNA electrophoregram of *Tupaia belangeri*

图 1. 中缅树鼩总 RNA 电泳图



注: M: marker; 1: BAT 中 UCP1;
Note: M: Marker; 1: the UCP1 of BAT

Figure 2. The electrophoregram of RT-PCR products

图 2. RT-PCR 产物电泳图

[5] [7] [14]。解偶联蛋白基因与人类多种疾病相关，如糖尿病、肝病、神经系统疾病等[15]。UCP1 主要分布于 BAT，对于线粒体载体家族成员的晶体结构、腺嘌呤核苷酸转位酶的研究主要集中在 UCP1，UCP1 基因分析结果表明 UCP1 基因具有很高的保守性。UCP1 基因具有 6 个外显子，其中包括了编码序列，每个外显子都可以编码蛋白质的穿膜域[16]。我们的研究通过 RT-PCR 得到 444 bp 的中缅树鼩 BAT UCP1 cDNA 核心片段，推测其氨基酸序列为 148 个氨基酸。经结构功能分析发现，此段氨基酸序列具有 32 bp UCPs 共同具有的同源序列，具有 13 bp 中缅树鼩 BAT UCP1 的特异性序列，与多种哺乳动物 UCP1 基因同源性比较发现，其氨基酸序列的同源性高达 80% 以上。

本研究通过对中缅树鼩 UCP1 基因结构、功能、系统进化地位的系统分析，探索了中缅树鼩 UCP1 在其产热、脂肪代谢等生理机能中的重要作用。此外，UCP1 基因组织表达模式的调控也值得进一步研究。现在已知 UCP1 序列的哺乳动物中，BAT UCP1 的同源性非常高，达到 99% 以上。中缅树鼩 BAT UCP1 分子量与人，大鼠，小鼠非常近似。至于一级结构全序列同源性还有待于对中缅树鼩的 BAT UCP1 氨基酸序列及相关基因序列进一步研究。对氨基酸序列同源性进行研究，能为树鼩科动物在系统演化或进化树上的定位提供意义重大的数据。因此，进一步对中缅树鼩 UCP1 蛋白质的一级结构，空间晶体结构，核

```

ATG TTG TTC AAG ATC CTC TCG GCT GGA GTG GCG GCC TGC TTG GCG 45
M L F K I L S A G V A A C L A 15
GAC GTG ATC ACC TTC CCG CTG GAC ACC GCC AAA GTC CG CTA CAG 90
D V I T F P L D T A K V R L Q 30

ATT CAA GGC GAA TGC CAG ACC TCC AGT GCT ATT CGG TAT AAA GGT 135
I Q G E C Q T S S A I R Y K G 45
GTC CTG GGA ACC ATC TCC ACT CTA GCC AGA TCA GAA GGA CCC GTG 180
V L G T I S T L A R S E G P V 60

AAG CTT TAC AGC GGG CTG CCC GCC GGC CTT CAG AGA CAG ATA AGC 225
K L Y S G L P A G L Q R Q I S 75
TTT GCT TCT CTC AGG ATC GGC CTC TAT GAT ACA GTC CAG GAG TTC 270
F A S L R I G L Y D T V Q E F 90

TTC GCC ACA GGG AAA GAA AGT AGT TTA AGC AAG ATC TCA GCT GCC 315
F A T G K E S S L S K I S A G 105
TTA ACG ACC GGA GGA GTG GCA GTA TTC ATC GGG CAG CCC ACA GAG 360
L T T G G V A V F I G Q P T E 120

GTC GTG AAA GTC AGG CTT CAA GCG CAG AGC CAT ATG CAT GGG CTC 405
V V K V R L Q A Q S H M H G L 135
AAG CCT CGC TAC ACT GGG ACT TAC CCG TAT GCC AGC ACC 444
K P R Y T G T Y P Y A S T 148
    
```

Figure 3. The partial nucleotide sequence of *Tupaia belangeri* uncoupling protein 1 cDNA and putative amino acid sequence. The consensus sequence of UCPs is boxed, The special sequence of UCP1 in *Tupaia belangeri* is underlined
图 3. 中缅树鼩 UCP1 基因 cDNA 部分序列及其推导的氨基酸序列。方框内为 UCPs 共有序列，下划线为中缅树鼩 BAT UCP1 的特异性序列

```

Tupaia belangeri      MLFKILSAGVAACLADVITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSRAIRYKGVLG 48
Ailuropoda melanoleuca  MTVKIFSAGVAACVADVITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSRAIRYKGVLG
Odobenus rosmarus     MPVKIFSAGVAACVADVITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSRAIRYKGVLG
Felis catus           MAVKIFSAGVAACVADVITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSSTIKYRGLV
Bos taurus            MAVKIFSAGVAACVADIIITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSSTIRYKGV
Equus caballus       MAVKIFSAGVAACVADVIITFPPLDTAKVRLQIQGERQTSALRYKGL
Cavia porcellus      MGVKIFSAGVAACLADVITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSSTIRYKGV
Oryctolagus cuniculus MGVKIFSAGVAACLADVITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSSTIRYKGV
Pongo abelii         LGVQLFSAGIAACLADVITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSRAIRYKGV
Cricetulus griseus   MGVKIFSAGVAACLADIIITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSSTIRYKGV
Rattus norvegicus    MGVKIFSAGVAACLADIIITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSSTIRYKGV
Mus musculus         MGVKIFSAGVAACLADIIITFPPLDTAKVRLQIQGECQTSSTIRYKGV
. . . ***. **. *. *. ***** * . *** . . . *. *. **

Tupaia belangeri      TITTLARSEGPVKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFATGKES--SLS-KISAG 11
Ailuropoda melanoleuca TITTLAKTEGPMKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFSTGKETTASLGSKIAG
Odobenus rosmarus     TVTTLAKTEGPMKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFSTGKETTASLGSKIAG
Felis catus           TITTLAKTEGPMKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFSAGKETTASLGSKIAG
Bos taurus            TITTLAKTEGPMKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFTTGKEA--SLGSKIAG
Equus caballus       TITTLAKTEGPMKLYSGPPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFTRKET--SLGSKVSAG
Cavia porcellus      TITTLAKTEGPMKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFYTSKDATPSLGSKIAG
Oryctolagus cuniculus TITTLAKTEGPMKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFTSG--EETPSLGSKIAG
Pongo abelii         TITTLAKTEGPMKLYSGLPAGLQRQISSASLRIGLYDTVQEFFLTAGKETTASLGSKIAG
Cricetulus griseus   TITTLAKTEGLPKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFSSGKETPPTLGNRIAG
Rattus norvegicus    TITTLAKTEGLPKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDTVQEFFSSGRETPASLGSKIAG
Mus musculus         TITTLAKTEGLPKLYSGLPAGLQRQISFASLRIGLYDSVQEFFSSGRETPASLGNRIAG
* . ***. **. * ***** ***. ** ** ***** * . ***. . . * .. **

Tupaia belangeri      LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY 146
Ailuropoda melanoleuca LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Odobenus rosmarus     LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Felis catus           LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Bos taurus            LMTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Equus caballus       LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Cavia porcellus      LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Oryctolagus cuniculus LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Pongo abelii         LTTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Cricetulus griseus   LMTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Rattus norvegicus    LMTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
Mus musculus         LMTGGVAVFIGQFTEVVKVRLQAQSHMHGPKPRYTGTY
* ***** ***** ***. ** *****
    
```

Figure 4. The comparison of amino acid sequence homology of UCP1 gene between tree shrews and other mammals. * indicated the same amino acid; a period indicates semiconservative substitutions
图 4. 中缅树鼩与其他哺乳动物 UCP1 基因氨基酸序列同源性比较。*表示相同氨基酸，. 表示半保守序列替代物

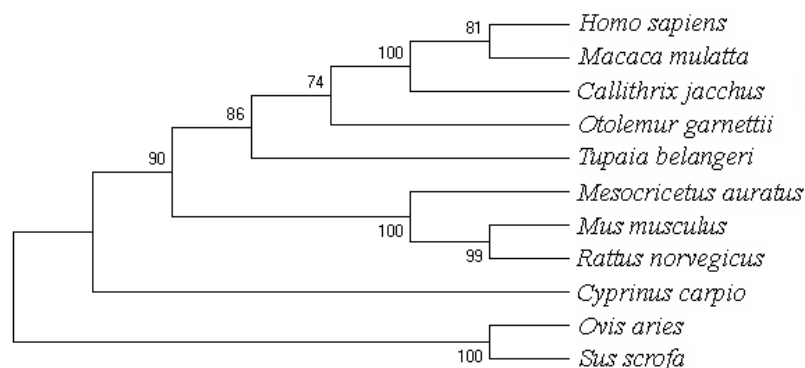


Figure 5. Phylogenetic tree of UCP1 gene. Phylogenetic tree obtained using MEGA5 software by ML method. The value at the nodes presents the bootstrap value using 500 bootstrap replications

图 5. UCP1 系统进化树。MEGA5 软件中的 ML 方法建树，枝上数值表示 500 次重复抽样所得的支持率

酸序列，基因结构，甚至在核苷酸突变、UCP1 基因人工去除等方面进行深入研究，将为树鼩科动物及相关类目动物的系统学分类提供更为有力的分子生物学证据。

综上所述，本研究中，中缅树鼩 UCP1 氨基酸同源性分析结果表明，UCP1 基因编码区在哺乳动物中均具有较高保守性，揭示了 UCP1 在脊椎动物中扮演着重要的生理角色，其可能在产热和能量代谢调节中具有重要的作用。

致谢

感谢国家国际科技合作专项项目(2014DFR31040)；十二五科技支撑项目(2014BAI01B00)；国家自然科学基金项目(No.31360096; No.31260097)；云南省应用基础研究计划重点项目(No. 2013FA014)的支持。

参考文献 (References)

- [1] Himms-Hagen, J. (1990) Brown adipose tissue thermogenesis: Interdisciplinary studies. *The FASEB Journal*, **4**, 2890-2898.
- [2] Hidaka, S., Kakuma, T., Yoshimatsu, H., et al. (1998) Molecular cloning of rat uncoupling protein 2 cDNA and its expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1389**, 178-186.
- [3] Solanes, G., Vidal-Puig, A., Grujic, D., et al. (1997) The human uncoupling protein-3 gene. Genomic structure, chromosomal localization, and genetic basis to short and long form transcripts. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 2433-2436.
- [4] Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., et al. (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Letters*, **443**, 326-330.
- [5] Ricquier, D. and Bouillaud, F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal*, **345**, 161-179.
- [6] Jarmuszkiewicz, W., Almeida, A.M., vercesi, A.E., et al. (2000) Proton re-uptake partitioning between uncoupling protein and ATP synthase during benzohydroxamic acid-resistant state 3 respiration in tomato fruit mitochondria. *Biological Chemistry*, **275**, 13315-13320.
- [7] Ricquier, D., Casteilla, L. and Bouillaud, F. (1991) Molecular studies of the uncoupling protein. *The FASEB Journal*, **5**, 2237-2242.
- [8] Sloan, W.D., Clark, A.B., Coleman, K., et al. (1994) Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology & Evolution*, **9**, 442-446.
- [9] 王应祥, 李崇云, 马世来 (1991) 树鼩的分类与生态. 树鼩生物学. 云南科技出版社, 昆明, 21-70.
- [10] Mer, C.M., Sominskaya, I., Skrastina, D., et al. (2011) N-terminal myristoylation-dependent masking of neutralizing epitopes in the preS1 attachment site of hepatitis B virus. *Journal of Hepatology*, **55**, 29-37.

- [11] Tong, Y.M., Zhu, Y.Z., Xia, X.S., Liu, Y., Feng, Y., Hua, X., *et al.* (2011) Tupaia CD81, SR-BI, claudin-1, and occludin support hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, **85**, 2793-2802.
- [12] 王政昆, 孙儒泳, 李庆芬, 房继明 (1994) 中缅树鼩静止代谢率的研究. *北京师范大学学报(自然科学版)*, **3**, 408-414.
- [13] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- [14] Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C., Jimenez, M.A., Sanz, J.M., Romero, A., Bouillaud, F. and Rial, E. (1999) Structural and functional study of a conserved region in the uncoupling protein UCPI: The three matrix loops are involved in the control of transport. *Journal of Molecular Biology*, **292**, 137-149.
- [15] 贾晓丽 (2011) UCP2 的研究进展. *赤峰学院学报(自然科学版)*, **7**, 39-41.
- [16] Ricquire, D. (1999) Uncoupling protein-1(ucp1): Molecular and genetic studies. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, **23**, S38-S42.