



胰核糖核酸酶基因(*RNASE1*)重复与功能分化

王小燕, 李能枝, 于黎*, 赵卉, 张亚平*

云南大学生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650091;

中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明 650223

* 联系人, E-mail: yuli1220@yahoo.com.cn; zhangyp1@263.net.cn

2009-02-19 收稿, 2009-07-16 接受

国家重点基础研究发展计划 (编号: 2007CB411600)和国家自然科学基金委-云南省政府联合基金(编号: U0836603)资助项目

摘要 适应是生物进化中最根本的问题之一。胰核糖核酸酶(*RNASE1*)由胰脏分泌, 是一种非常重要的消化酶。目前已证实 *RNASE1* 基因重复与前肠发酵食草动物中独特消化系统的功能适应紧密相关, 成为研究动物对食性适应性进化遗传机制的重要模式系统之一。同时有研究发现, 在不具有前肠发酵特征的某些哺乳动物中也存在 *RNASE1* 基因重复事件, 提示该基因在这些物种中可能产生了新的组织特异性或功能。文章综述了 *RNASE1* 基因在动物适应性进化, 包括食性方面的研究进展。

关键词

RNASE1 基因
消化酶
基因重复
适应性进化
前肠发酵
功能分化

生物究竟是如何通过自身变化实现对环境的稳定适应, 一直是生命科学的重要问题之一。尤其在生物多样性保护受到广泛关注的今天, 环境与生物进化及生物对环境变化而采取的适应机制的研究已经引起越来越多的生物学家们的重视。

基因的改变是适应遗传机制的核心。越来越多的研究表明, 基因数目的改变与其所执行的功能紧密相关^[1-4]。通过重复产生的冗余拷贝, 由于不受或很少受到选择压力, 不断积累各种突变, 与原基因产生分化, 最终可能产生具有新功能的基因^[5]。对哺乳动物^[6]、鸟类^[7]和两栖动物^[8]中编码黑皮质素-1受体(Mc1Y)的基因的研究表明, 该基因与动物的毛色变异相关; Gojobori和Innan^[9]及Okoyama^[10]对鱼视蛋白基因的研究表明, 4个视锥蛋白基因家族的重复事件对硬骨鱼视力的适应具有重要意义, 其中两个中波基因的重复事件对视觉适应性进化具有极为显著的贡献。对人和老鼠的味觉相关基因, 即甜味受体基因(*T1R*)^[11]和苦味受体基因(*T2R*)^[12]的研究表明, 这两个基因都发生了重复事件且都经历了适应性进化。

另外, 对脊椎动物中与嗅觉相关基因——犁鼻器受体1基因(*V1R*)和犁鼻器受体2基因(*V2R*)的研究结果表明, *V1R*数目与*V2R*数目的比例在水生和陆生物种中不同, 与动物适应水生和陆生不同生存环境相关^[13]; Wu和Su^[14]对灵长类中与雄性动物生殖相关的*SCML1*基因的研究表明, 该基因受到正选择作用并发生了适应性进化。由此可见, 基因重复是新基因产生的摇篮, 也是新功能产生的物质基础, 将有助于生物对生态环境的适应^[15,16]。

*RNASE1*基因重复及功能分化是一个很典型的例子, 证明了功能分化对适应性进化意义, 它是由脊椎动物的胰腺分泌的一种非常重要的消化酶。研究发现, 它在具有多分隔胃系统的反刍动物和类似反刍动物以及具有盲肠消化系统的动物胰脏中有显著高效的表达, 用来消化由食草动物胃或盲肠中共生细菌发酵食物而产生的大量细菌RNA, 从而获得营养^[17-20]。与那些只有一个*RNASE1*基因的哺乳动物相比, 牛、羊、骆驼、豚鼠、几内亚猪和大象等反刍和类反刍动物中的*RNASE1*基因都发生了独立的重复

引用格式: 王小燕, 李能枝, 于黎, 等. 胰核糖核酸酶(*RNASE1*)基因重复与功能分化. 科学通报, 2009, 54: 3658-3663

Wang X Y, Li N Z, Yu L, et al. Duplication and functional diversification of pancreatic ribonuclease (*RNASE1*) gene. Chinese Sci Bull, doi: 10.1007/s11434-009-0717-y

事件^[21-27]。这些研究仅局限于理论分析,而 Zhang 等人^[28,29]首次采用进化分析和功能实验相结合的方法揭示了 *RNASE1* 基因重复对于灵长目疣猴亚科中亚洲白臀叶猴和非洲黑白疣猴对以树叶为食的适应的重要意义,这为今后的研究提供了很好的方法和思路。由基因重复产生的新基因受到适应性(正)选择作用的驱动,经历快速进化,形成了适应疣猴亚科动物独特消化系统的基因,帮助其对食物进行消化^[28-30]。*RNASE1* 基因对动物食物适应的意义显而易见,是研究动物对食性适应性进化遗传机制的重要模式系统。有趣的是,近期有研究报道在没有前肠发酵特征的啮齿目鼠科大鼠属和食肉目鼬科等哺乳动物类群中也发现了 *RNASE1* 基因重复,提示该基因在这些物种中产生了新的组织特异性或功能^[26,31]。那么, *RNASE1* 基因到底具有怎样的新功能? 基因重复和正选择作用在 *RNASE1* 新基因产生和适应性进化中到底扮演怎样的角色呢? 本文将对 *RNASE1* 基因以及它在动物适应性进化方面的研究进展做详尽综述,为进一步深入探讨 *RNASE1* 基因具有怎样的新功能以及它在适应进化中扮演的角色奠定基础。

1 胰核糖核酸酶基因(*RNASE1*)及其表达

1.1 *RNASE1* 基因结构特征

哺乳动物核糖核酸酶由一个基因超家族编码,这个基因超家族通过基因重复和序列趋异形成,具有多种功能,包括消化细菌 RNA, 血管形成, 细胞毒性, 宿主防御系统和刺激内皮细胞活性等, 是研究基因进化以及新功能产生的重要模式系统之一^[32-36]。*RNASE1* 基因是核糖核酸酶基因超家族中的一个成员,由两个外显子和一个内含子组成。内含子将非编码外显子 1 与包含编码序列的外显子 2 分开^[28], 其中外显子 2 编码信号肽和成熟肽。

1.2 *RNASE1* 基因的表达

最著名的核糖核酸酶是牛胰核糖核酸酶。牛胰核糖核酸酶不仅在胰腺中有较高水平的分泌^[37], 而且在体内其他部位也有分泌, 但是量很少^[38]。目前, 除了从胰腺中分离出来的胰核糖核酸酶, 其他两个牛胰核糖核酸酶也已分离出来, 其中精液核糖核酸酶在精液中分泌, 并且在精液囊泡中高水平表达, 而脑核糖核酸酶在大脑中表达, 并且与哺乳期乳腺增生疾病相关^[39-42]。目前, 牛胰核糖核酸酶已经从牛奶、尿

液、血清、精液浆、肾、精囊、乳腺、唾液腺中被分离出来^[38]。以上研究结果提示, *RNASE1* 除了消化功能外, 可能还具有其他未知生理学功能。

随着越来越多动物的 *RNASE1* 被分离出来, 研究发现具有前肠发酵消化系统的反刍偶蹄目动物分泌的 *RNASE1* 是其他非前肠发酵动物的 15~1200 倍^[17,43]。类似地, 具有前肠发酵消化系统, 主要以树叶为食的灵长目疣猴亚科物种白臀叶猴胰腺中的核糖核酸大约是人胰腺中核糖核酸的 60 倍^[20]。这种高浓度 *RNASE1* 的存在是用来消化大量发酵植物性食物的细菌释放出来的 RNA, 从而有利于 RNA 氮的有效循环利用^[17]。同时, 研究表明, 许多哺乳动物的 *RNASE1* 在胰腺以外的部位也有表达^[44], 并且具有降解双链 RNA (dsRNA) 的活性^[45], 这种活性被认为是宿主抵御双链 RNA 病毒的一种机制^[46,47]。*RNASE1* 在其他组织和体液中的存在也提示 *RNASE1* 除了消化功能外还有其他潜在的更为复杂的生理功能^[48,49]。

2 *RNASE1* 基因与动物适应性进化

2.1 *RNASE1* 基因与食性适应进化

基因重复为基因和基因组的进化提供了素材^[50-53]。已有研究表明, *RNASE1* 基因重复与前肠发酵食草动物中消化系统的功能适应紧密相关, 最令人信服的证据来自于 Zhang 等人^[28,29]对具有类似反刍动物消化系统的食叶灵长类疣猴亚科动物亚洲白臀叶猴和西非黑白疣猴的研究。过去对适应性进化的研究主要依赖于理论计算, 很难进行功能实验上的验证。Zhang 等人^[28,29]首次采用进化分析与功能实验相结合的方法揭示了动物对食性的适应性进化的机制。他们的研究揭示了一个重复拷贝的 *RNASE1* 基因如何进化形成一个新的基因, 而这个基因编码的酶有助于叶猴对食物的消化, 从而促进其对生态环境的适应。

与其他猴子喜食水果和昆虫不同, 灵长目疣猴亚科物种以树叶为主要食物, 食物在其前肠通过共生的细菌发酵消化, 它们通过各种酶, 包括胰核糖核酸酶, 消化细菌而获得营养。对灵长类动物及人的胰核糖核酸酶基因进行研究发现, 叶猴中有 2 个基因拷贝, 而其他灵长类动物及人中都是单拷贝。由基因重复产生的新基因受到适应性(正)选择作用的驱动, 经历快速进化, 形成了适应疣猴亚科动物独特消化系统的基因, 帮助其对食物进行消化^[28-30]。普通灵长

类动物的 RNASE1 酶有两个功能: 一是分解双链 RNA, 这被认为是动物抵御双链 RNA 病毒的一种机制; 二是消化食物中的 RNA^[54,55]. 鉴于分解双链 RNA 活动似乎是依赖于暴露蛋白表面的无催化作用的负电荷^[54], 叶猴中的两个基因中都保留这项功能是不可能的, 因为基因重复在功能上是冗余的, 通常一个拷贝会丢失或者功能上发生分化^[28,29,56]. 因此, 叶猴中原始 RNASE1 基因保留了降解 RNA 的功能, 而新基因所编码的酶在叶猴小肠内环境下降解 dsRNA 的活性达到最高, 专门执行消化功能. 原基因和新基因各承担其中一项功能, 功能更加精细化, 大大提高了工作效率, 从而促进物种对环境的适应^[28,29]. 研究表明, 原有的 RNASE1 基因合成的胰核糖核酸酶只用于分解双链 RNA, 最适反应 pH 是 7.4, 而新的基因合成的酶专用于消化共生细菌, 最适反应 pH 为 6.3~6.7. 这种重复基因的产生是对白臀叶猴小肠内酸性环境的一种适应, 因为普通灵长类小肠内的 pH 通常在 7.4~8, 而疣猴亚科物种小肠内的 pH 为 6~7. Schienman 等人^[30]通过增加疣猴亚科物种, 对 RNASE1 基因进行适应性进化研究证实了以上结果. 有趣的是, 他们对 RNASE1 基因编码区序列和非编码区序列分别进行系统发育重建, 结果发现编码区和非编码区的基因分析得到不同的 RNASE1 基因进化历史, 他们认为 RNASE1 基因重复发生在 15 百万年 (MYA) 以前, 即在亚洲和非洲疣猴物种分歧 (10~11 MYA) 之前^[57], 而不是原来认为的发生在亚洲和非洲疣猴物种分歧之后. 以上研究表明, RNASE1 进化历史比原有想象中的要更复杂和扑朔迷离, 增加疣猴亚科其他物种进行深入分析是非常必要的.

一直以来, 对于新基因功能的产生的进化动力是正选择作用还是纯净化选择压力放松争论不休, Zhang 等人^[28,29]对叶猴 RNASE1 基因的研究表明, 两方面的作用都必不可少, 基因的重复释放了其中一个拷贝中维持原有功能的选择压力, 提供了进化的原始材料, 而食物环境的变化提供了适应性选择的动力, 推动形成效率更高的新酶, 新酶的形成又进一步促进了动物对环境的适应能力.

为什么新酶的最适 pH 会降低至小肠内环境的 pH? 这是因为受到了小肠内环境的正选择作用, RNASE1 新基因积累了很多氨基酸替代, 损失了很多带正电荷的精氨酸残基, 而带正电荷的精氨酸残基

的损失可能与前肠发酵动物的小肠内环境的偏好有关^[58], 使酶的等电点降低^[28,29]. 这与 Beintema^[20]通过直接从白臀叶猴胰腺中分离胰核糖核酸酶和蛋白质测序发现该酶具有较少的正电荷, 并且比人胰核糖核酸酶序列的糖基化少得多的结果一致. Zhang 等人^[28,29]在亚洲白臀叶猴和非洲黑白疣猴 RNASE1 新基因的研究中发现了 3 个平行氨基酸替代. 功能实验表明, 这 3 个平行氨基酸替代不仅显著影响了新酶降解 dsRNA 的活性, 而且是使新酶降解 dsRNA 的最适 pH 降低的重要原因, 表明这 3 个平行氨基酸的替代对于新酶功能至关重要^[29]. 以上研究结果表明, 在受到相同的小肠内环境选择压力下, 该酶在不同的物种中将会重复相似的适应性进化路径^[29]. 因此, 非洲和亚洲叶猴中具有一套类似的独立进化过程, 表现出对一个共同选择压力的适应^[28-30].

2.2 RNASE1 基因与其他生理学功能

啮齿目鼠科动物具有一个比较简单的消化系统, 在瘤胃或盲肠缺乏上述食草动物最典型的前肠发酵消化系统^[59]. 对大鼠和小鼠 RNASE1 基因的适应性进化研究发现, 在 RNASE 超家族的 8 个基因中, 大鼠属一支受到了正选择, 提示在这支附近有可能发生了基因重复与基因多样化^[60]. 随后, Dubois 等人^[26]对大鼠属中 6 个物种的 RNASE1 基因进行研究, 意外发现褐家鼠 RNASE1 基因经历了生(基因重复)与灭(假基因化)的进化过程^[1], 且新基因表现出快速进化, 但其他的啮齿类物种都只有一个 RNASE1 基因^[26,61]. 蛋白分离纯化研究进一步表明, 这些 RNASE1 基因中只有一个基因在胰腺中高效表达, 其他基因都在其他组织中表达^[26]. 上述结果提示, RNASE1 基因在啮齿目褐家鼠物种中功能可能已经发生分化, 产生了新的组织特异性或功能^[26].

哺乳动物中的食肉目物种与啮齿目鼠科动物类似, 也具有一个比较简单的消化系统且 RNASE1 表达水平极低^[38,62]. 有趣的是, 与预期在食肉目物种中只有一个 RNASE1 基因不同, Yu 和 Zhang^[31]在对食肉目 7 个科 15 个物种的 RNASE1 研究中发现, 在鼬科的 3 个代表物种中都观察到了 RNASE1 基因生(基因重复)和死(假基因)的进化过程^[1]. 研究表明, 重复事件发生在鼬科物种分歧之前, 它们与小熊猫分歧之后^[31]. 与 Dubois 等人^[26]对大鼠属 RNASE1 基因的研究不同, 他们通过进化分析证实了正选择作用是 RNASE1 基

因发生重复的重要驱动力, 鼬科中新基因的非同义替代速率显著加快, 积累了很多氨基酸替代^[31]. 他们推测, 鼬科物种中“异常”的进化过程一方面可能与食物在鼬科物种消化道中滞留时间最短, 从而使消化酶发生相应改变有关, 另一方面, *RNASE1* 基因在鼬科物种中可能产生了新的组织特异性或功能^[31].

以上研究结果均表明, *RNASE1* 除了消化功能外, 在一些物种(如大鼠和鼬科动物)中可能还具有其他一些生理功能.

3 结语与展望

RNASE1 是由脊椎动物胰腺分泌的一种消化酶, 也是分子进化研究中最具吸引力的模型系统之一. 采用理论分析和功能实验相结合的方法对灵长目中以树叶为主要食物的疣猴亚科物种 *RNASE1* 基因的研究, 为今后进化生物学研究新基因的起源及新功能的演变, 进而揭示适应进化的遗传机制提供了一个新的研究方法和思路, 而在具有简单消化系统的

啮齿目和食肉目部分物种中也检测到 *RNASE1* 基因的适应性扩张的新发现提示, 该酶可能产生了新的组织特异性或功能, 为下一步研究这个基因的结构、功能和进化提供了重要的信息. 以上研究结果表明 *RNASE1* 基因进化和功能分化比我们所了解的更为复杂, 需要进一步地研究. 因此, 在今后的研究中, 选择具有重要进化理论意义的更多动物代表类群进行 *RNASE1* 基因及其他消化酶基因的研究, 系统阐述这些基因在不同动物类群中的进化模式以及功能分化, 将为深入了解新基因的起源和新功能的演变, 揭示动物适应进化中的关键问题, 即动物对食物的适应的遗传机制, 做出重要贡献. 近年来, 基因组测序技术的飞速发展和大量模式生物基因组数据的获得, 为我们在比较基因组学和进化基因组学水平上探讨新基因产生或功能基因假基因化对动物适应的意义以及环境压力与基因家族进化之间的关系, 从而为进一步阐述动物适应性进化的遗传机制提供了前所未有的机会.

参考文献

- 1 Nei M, Gu X, Sitnikova T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7799—7806[[doi](#)]
- 2 Nei M, Rogozin L B, Piontkivska H. Purifying selection and birth-and-death evolution in the ubiquitin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 10866—10871[[doi](#)]
- 3 Zhang J, Rosenberg H F, Nei M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3708—3713[[doi](#)]
- 4 Shi P, Zhang J, Yang H, et al. Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 805—814[[doi](#)]
- 5 李昕, 杨爽, 彭立新, 等. 新基因的起源与进化. *科学通报*, 2004, 49: 1219—1225
- 6 Robbins L S, Nadeau J H, Johnson K R, et al. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, 1993, 72: 827—834[[doi](#)]
- 7 Takeuchi S H, Suzuki S, Hirose Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1306: 122—126
- 8 Rosenblum E B, Hoekstra H E, Nachman M W. Adaptive reptile color variation and the evolution of the *Mc1r* gene. *Evolution*, 2004, 58: 1794—1808
- 9 Gojobori J, Innan H. Potential of fish opsin gene duplications to evolve new adaptive functions. *Trends Genet*, 2009, 25: 198—202[[doi](#)]
- 10 Okoyama S, Yokoyama R. Adaptive evolution of photoreceptors and visual pigments in vertebrates. *Annu Rev Ecol Syst*, 1996, 27: 543—567[[doi](#)]
- 11 Shi P, Zhang J Z, Yang H, et al. Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in mammalian evolution. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 805—814[[doi](#)]
- 12 Shi P, Zhang J. Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol Biol Evol*, 2006, 23: 292—300[[doi](#)]
- 13 Shi P, Zhang J. Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. *Genome Res*, 2007, 17: 166—174[[doi](#)]

- 14 Wu H H, Su B. Adaptive evolution of SCML1 in primates, a gene involved in male reproduction. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 192[[doi](#)]
- 15 Ota T, Nei M. Divergent evolution and evolution by the birth-and-death process in the immunoglobulin *VH* gene family. *Mol Biol Evol*, 1994, 11: 469—482
- 16 Makova K D, Li W H. Divergence in the spatial pattern of gene expression between human duplicate genes. *Genome Res*, 2003, 13: 1638—1645[[doi](#)]
- 17 Barnard E A. Biological function of pancreatic ribonuclease. *Nature*, 1969, 221: 340—344[[doi](#)]
- 18 Beintema J J, Gaastra W, Lenstra J A, et al. The molecular evolution of pancreatic ribonuclease. *J Mol Evol*, 1977, 10: 49—71[[doi](#)]
- 19 Beintema J J, Fitch W M, Carsana A. Molecular evolution of pancreatic-type ribonucleases. *Mol Biol Evol*, 1986, 3: 262—275
- 20 Beintema J J. The primary structure of langur (*Presbytis entellus*) pancreatic ribonuclease: Adaptive features in digestive enzymes in mammals. *Mol Biol Evol*, 1990, 7: 470—477
- 21 D'Alessio G, Floridi A, De Prisco R, et al. Bull semen ribonucleases 1 purification and physico-chemical properties of the major component. *Eur J Biochem*, 1972, 26: 153—161[[doi](#)]
- 22 Suzuki H, Parente A, Farina B, et al. Complete amino-acid sequence of bovine seminal ribonuclease, a dimeric protein from seminal plasma. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1987, 368: 1305—1312
- 23 Beintema J J, Neuteboom B. Origin of the duplicated ribonuclease gene in guinea-pig: Comparison of the amino acid sequences with those of two close relatives: capybara and cuis ribonuclease. *J Mol Evol*, 1983, 19: 145—152[[doi](#)]
- 24 Kleineidam R G, Pesole G, Breukelman H J, et al. Inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla based on phylogenetic analysis of pancreatic ribonuclease genes. *J Mol Evol*, 1999, 48: 360—368[[doi](#)]
- 25 Breukelman H J, Jekel P A, Dubois J Y, et al. Secretory ribonucleases in the primitive ruminant chevrotain (*Tragulus javanicus*). *Eur J Biochem*, 2001, 268: 3890—3897
- 26 Dubois J Y, Jekel P A, Mulder P P, et al. Pancreatic-type ribonuclease 1 gene duplications in rat species. *J Mol Evol*, 2002, 55: 522—533[[doi](#)]
- 27 Dubois J Y, Ursing B M, Kolkman J A, et al. Molecular evolution of mammalian ribonucleases 1. *Mol Phyl Evol*, 2003, 27: 453—463[[doi](#)]
- 28 Zhang J, Zhang Y P, Rosenberg H F. Adaptive evolution of a duplicated pancreatic ribonuclease gene in a leaf-eating monkey. *Nat Genet*, 2002, 30: 411—415
- 29 Zhang J. Parallel adaptive origins of digestive RNases in Asian and African leaf monkeys. *Nat Genet*, 2006, 38: 819—823[[doi](#)]
- 30 Schienman J E, Holt R A, Auerbach M R, et al. Duplication and divergence of 2 distinct pancreatic ribonuclease genes in leaf-eating African and Asian colobine monkeys. *Mol Biol Evol*, 2006, 23: 1465—1479[[doi](#)]
- 31 Yu L, Zhang Y P. The unusual adaptive expansion of pancreatic ribonuclease gene in carnivora. *Mol Biol Evol*, 2006, 23: 2326—2335[[doi](#)]
- 32 D'Alessio G, Riordan J F. *RNASEs Structures and Functions*. New York: Academic Press, 1996
- 33 Beintema J J, Breukelman H J, Carsana A, et al. Evolution of vertebrate ribonucleases: Ribonuclease A superfamily. In: D'Alessio G, Riordan J F, eds. *Ribonucleases Structures and Functions*. San Diego: Academic Press, 1997. 245—269
- 34 Beintema J J, Kleineidam R G. The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54: 825—832[[doi](#)]
- 35 Cho S, Beintema J J, Zhang J. The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: Identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics*, 2005, 85: 208—220[[doi](#)]
- 36 Golding G B, Dean A M. The structural basis of molecular adaptation. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 355—396
- 37 Blackburn P, Moore S. Pancreatic ribonuclease. In: Boyer P D, ed. *The Enzymes*. Vol 15. New York: Academic Press, 1982
- 38 Beintema J J, Schuller C, Irie M, et al. Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. *Prog Biophys Mol Biol*, 1988, 51: 165—192[[doi](#)]
- 39 Sasso M P, Carsana A, Confalone E, et al. Molecular cloning of the gene encoding the bovine brain ribonuclease and its expression in different regions of the brain. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 6469—6474 [[doi](#)]
- 40 Watanabe H, Katoh H, Ishii M, et al. Primary structure of a ribonuclease from bovine brain. *J Biochem*, 1988, 104: 939—945
- 41 Sasso M P, Lombardi M, Confalone E, et al. The differential pattern of tissue-specific expression of ruminant pancreatic type ribonucleases may help to understand the evolutionary history of their genes. *Gene*, 1999, 227: 205—212[[doi](#)]
- 42 Zhao W, Confalone E, Breukelman H J, et al. Ruminant brain ribonucleases. Expression and Evolution. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1547: 95—103
- 43 Beintema J J, Scheffer A J, Van Dijk H, et al. Pancreatic ribonuclease distribution and comparisons in mammals. *Nat New Biol*, 1973, 241: 76—78
- 44 Futami J, Tsushima Y, Murato Y, et al. Tissue-specific expression of pancreatic type RNases and RNase inhibitor. *DNA Cell Biol*, 1997, 16: 413—419[[doi](#)]

- 45 Libonati M, Floridi A. Breakdown of double-stranded RNA by bull semen ribonuclease. *Eur J Biochem*, 1969, 8: 81—87[[doi](#)]
- 46 Sorrentino S, Libonati M. Structure-function relationships in human ribonucleases: Main distinctive features of the major RNASE types. *FEBS Lett*, 1997, 404: 1—5[[doi](#)]
- 47 Libonati M, Sorrentino S. Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases. *Methods Enzymol*, 2001, 341: 234—248[[doi](#)]
- 48 Weickmann J L, Glitz D G. Human ribonucleases: Quantitation of pancreaticlike enzymes in serum, urine and organ preparations. *J Biol Chem*, 1982, 257: 8705—8710
- 49 Beintema J J, Blank A, Schieven G L, et al. Differences in glycosylation pattern of human secretory ribonucleases. *Biochem J*, 1988, 255: 501—505
- 50 Ohno S. *Evolution by Gene Duplication*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 1970
- 51 Clegg M T, Cummings M P, Durbin M L. The evolution of plant nuclear genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 7791—7798[[doi](#)]
- 52 Force A, Lynch M, Pickett F, et al. Preservation of duplicate genes by complementary degenerative mutations. *Genetics*, 1999, 151: 1531—1545
- 53 Zhang J. Evolution by gene duplication: An update. *Trends Ecol Evol*, 2003, 18: 292—298[[doi](#)]
- 54 Sorrentino S, Naddeo M, Russo A, et al. Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: crucial role of non-catalytic basic amino acid residues. *Biochemistry*, 2003, 42: 10182—10190[[doi](#)]
- 55 Zhang J. Parallel functional changes in the digestive RNases of ruminants and colobines by divergent amino acid substitutions. *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 1310—1317[[doi](#)]
- 56 Kay R N B, Davies A G. Digestive physiology. In: Davies A G, Oates J F, eds. *Colobine Monkeys: Their Ecology, Behaviour and Evolution*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994
- 57 Delson E. Evolutionary history of the colobine monkeys in paleoenvironmental perspective. In: Davies A G, Oates J F, eds. *Colobine Monkeys: Their Ecology, Behaviour, and Evolution*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1994
- 58 Stewart C B, Wilson A C. Sequence convergence and functional adaptation of stomach lysozymes from foregut fermenters. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1987, 52: 891—899
- 59 Schaller G B, Teng Q T, Johnson K G, et al. The feeding ecology of giant pandas and Asiatic black bears in the Tanjiahe Reserve, China. In: Gittleman J L, ed. *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*. New York: Cornell University Press, 1989. 212—241
- 60 Neil A S, Kimberly D, Zhang J Z, et al. Rapid evolution of the ribonuclease a superfamily: Adaptive expansion of independent gene clusters in rats and mice. *J Mol Evol*, 1999, 49: 721—728[[doi](#)]
- 61 Dubois J Y, Catzeflis F M, Beintema J J. The phylogenetic position of “Acomyinae” (Rodentia, Mammalia) as sistergroup of a murinae1 gerbillinae clade: Evidence from the nuclear ribonuclease gene. *Mol Phyl Evol*, 1999, 13: 181—192[[doi](#)]
- 62 Beintema J J, Lenstra J A. Evolution of mammalian pancreatic ribonucleases. In: Goodman M, ed. *Macromolecular Sequences in Systematic and Evolutionary Biology*. New York: Plenum, 1982. 43—73