

张娟, 虎红红, 邓占钊, 等. 静原鸡 *AK1* 基因序列分析及真核表达载体的构建 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(2): 17-25.
ZHANG Juan, HU Honghong, DENG Zhanzhao, et al. Sequence analysis of *AK1* gene from Jingyuan chicken and construction of its eukaryotic expression vector[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(2): 17-25.

静原鸡 *AK1* 基因序列分析及真核表达载体的构建

张 娟¹, 虎红红¹, 邓占钊², 母 童¹, 顾亚玲¹, 辛国省³

(1 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2 彭阳县畜牧技术推广服务中心, 宁夏 彭阳 756599;

3 宁夏大学 生命科学学院/宁夏饲料工程技术研究中心, 宁夏 银川 750021)

摘要:【目的】探究宁夏地方品种静原鸡前期转录组测序筛选出的 *AK1* 基因编码蛋白的结构与功能, 构建其真核表达载体。【方法】根据 GenBank 上已公布的原鸡 *AK1* 基因序列, 针对其 CDS 区设计特异性引物, 通过克隆测序对 *AK1* 基因 CDS 区 SNPs 进行快速筛查, 构建 *AK1* 基因的真核表达载体, 并进行编码区生物信息学功能分析。【结果】*AK1* 基因编码区全长 585 bp, 编码 194 个氨基酸; *AK1* 蛋白无跨膜结构域, 存在 2 个 CpG 岛, 18 个磷酸化位点, 10 个抗原表位, 为稳定的水溶性蛋白, 空间结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主。亚细胞定位结果显示, *AK1* 蛋白主要位于细胞质内; GO 富集分析发现, *AK1* 基因同样富集在细胞质中, 与亚细胞定位结果一致。基因共表达分析发现, 在与 *AK1* 互作的基因中, *AK1* 与 *AMPD1*、*PKM2* 基因存在共表达, 共表达系数分别为 0.116 和 0.063。成功构建出 *AK1*-pEGFP-N1 载体。【结论】该研究结果为后续 *AK1* 蛋白功能以及 *AK1* 作为肌苷酸相关基因的深入研究提供了科学依据。

关键词: *AK1* 基因; 生物信息学; 静原鸡; 基因共表达; 亚细胞定位

中图分类号: S831 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2021)02-0017-09

Sequence analysis of *AK1* gene from Jingyuan chicken and construction of its eukaryotic expression vector

ZHANG Juan¹, HU Honghong¹, DENG Zhanzhao², MU Tong¹, GU Yaling¹, XIN Guosheng³

(1 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2 Animal Husbandry and Technology Promotion Service Center of Pengyang County, Pengyang 756599, China; 3 School of Life Science, Ningxia University/ Ningxia Feed Engineering Technology Research Center, Yinchuan 750021, China)

Abstract: 【Objective】To explore the structure and function of protein encoded by *AK1* gene screened by transcriptome sequencing of Ningxia local breed Jingyuan chicken, and construct its eukaryotic expression vector. 【Method】According to the original chicken *AK1* gene sequence published on GenBank, specific primers were designed for its CDS region, and the CDS region SNPs of *AK1* gene were screened quickly by cloning and sequencing. The eukaryotic expression vector of *AK1* gene was constructed. The bioinformatics function of the coding region was analyzed. 【Result】The full length of *AK1* gene coding region was 585 bp, which encoded 194 amino acids. *AK1* protein had no transmembrane domain, and it had two CpG islands, 18 phosphorylation sites and 10 antigenic epitopes. *AK1* protein was a stable water-soluble protein, and the spatial structure was mainly α -helix and irregular crimp. The results of subcellular localization showed that *AK1* protein was mainly located in the cytoplasm, and GO enrichment analysis showed that *AK1* gene was also enriched in the cytoplasm, which was

consistent with the result of subcellular localization. Gene co-expression analysis of genes interacting with *AK1* showed that *AMPD1* and *PKM2* coexpressed with *AK1* gene, and the co-expression coefficients were 0.116 and 0.063, respectively. The AK1-pEGFP-N1 vector was successfully constructed. 【Conclusion】 The results of this study provide a scientific basis for further study of the function of AK1 protein and *AK1* as an inosinic acid-related gene.

Key words: *AK1* gene; bioinformatics; Jingyuan chicken; gene co-expression; subcellular localization

静原鸡主要分布于宁夏彭阳县和甘肃静宁县, 2006 年被农业部认定为地方优良品种, 已被列入国家级畜禽遗传资源保护名录^[1], 根据羽色的不同, 分为白羽、麻羽和黑羽 3 个群体。由于长期处于气候高寒湿润、地形起伏、牧草及昆虫众多的生活环境和优越的地理位置, 静原鸡具有耐粗饲、抗逆性强、氨基酸含量丰富、肉质细嫩、营养和滋补价值高等特点, 尤其多不饱和脂肪酸(二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸)含量较高^[2], 符合现今人们对高品质鸡肉的要求, 属鸡肉中优选的绿色食品^[3]。

腺苷酸激酶 (Adenylate kinase, AK) 是一种普遍存在于动植物体内的单体酶, 对生物的生长和维持至关重要^[4], 主要调节腺嘌呤核苷酸代谢, 催化反应: $ATP+AMP\leftrightarrow 2ADP$, 在维持细胞能量平衡中起着不可或缺的作用^[5]。在哺乳动物中, 有几种 AK 亚型具有组织特异性分布和独特的亚细胞定位^[6], 其中 AK1 蛋白被认为是骨骼肌细胞质中的主要 AK 亚型^[7]。猪心脏中胞质酶 AK1 蛋白的三维结构已经被 Schulz 等^[8]和 Sachsenheimer 等^[9]准确测定。有研究表明, *AK1* 基因缺失的小鼠尽管肌肉形成正常, 但由于 ADP 的异常积累会导致骨骼肌松弛延迟^[10]。此外, 还有研究发现 AK1 蛋白磷酸化可能是质膜线粒体和 KATP 通道之间传递信号所必需的^[11]。目前关于 *AK1* 基因的研究集中在与溶血性贫血相关的罕见遗传疾病中, 国内外将 *AK1* 作为肌苷酸影响基因及有关 *AK1* 基因结构及功能预测的研究鲜有报道。

本研究通过对宁夏优良地方品种静原鸡 *AK1* 基因 CDS 区序列进行扩增、克隆、构建其真核表达载体, 运用生物信息学分析方法预测其理化性质、

亲水性/疏水性、跨膜结构域、磷酸化位点、亚细胞定位、磷酸化位点、B 细胞抗原表位、基因共表达、CpG 岛、蛋白的空间结构等, 为后续深入研究 *AK1* 基因蛋白水平、代谢水平和细胞功能研究等的调控机理和表达模式提供科学依据, 并为我国地方品种鸡的分子育种技术平台奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

随机屠宰宁夏彭阳县朝那鸡繁育中心 180 日龄静原鸡公、母各 15 只 (饲养管理条件相同), 采集腿肌、胸肌于液氮罐中, 带回实验室于-80 ℃ 保存备用。试剂: Trizo, Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(gDNA digester plus) 试剂盒 (上海翊圣生物公司), DNA loading buffer(百泰克), 核酸染料 (索莱宝), pMD18-T、DH5α、质粒小提中量试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (天根), T4 连接酶 (NEB), *EcoR* I、*Bam*H I (宝生物有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及反转录 通过传统 Trizo(Invitrogen, USA) 法提取静原鸡腿肌、胸肌的总 RNA, 并对其 RNA 的纯度、完整性、浓度进行检测。采用 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(gDNA digester plus) 试剂盒合成 cDNA 后, 于-20 ℃ 保存备用。

1.2.2 *AK1* 基因的引物设计 根据 GenBank 上已公布的原鸡 *AK1* 基因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 (表 1), 并送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 静原鸡 *AK1* 基因 CDS 区引物序列
Table 1 Primer sequence for CDS region in *AK1* gene of Jingyuan chicken

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列(5'→3') ¹⁾ Primer sequence	产物长度/bp Product length	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>AK1</i>	M37901	F:TCCTCCACCCAGACAGCA R:ACGGGAAAGAGCCAAACA	741	57.6
<i>AK13</i>	M37901	F:ccgGAATTC TCCTCCACCCAGACAGCA R:cgCGATCCACGGGAAAGAGCCAAACA	759	62.7

1) 带有下划线的序列为酶切位点, *AK13* 上、下游引物分别插入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点。
1) Underlined sequences are restriction sites, and forward and reverse primers of *AK13* contained *EcoR* I and *Bam*H I restriction sites respectively

1.2.3 *AKI* 基因 CDS 区扩增、克隆及测序 PCR 扩增总体系为 20 μ L: cDNA 样品 1 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, *Taq* PCR Master Mix 11 μ L, ddH₂O 7 μ L。*AKI* 基因 CDS 区 PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 31 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物通过 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目的片段进行回收。

将回收纯化好的目的片段与 pMD18-T 载体 4 $^{\circ}$ C 下连接并过夜。将连接好的带有 pMD18-T 载体的目的片段转化到 DH5 α 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 冰浴 3 min, 加入无抗液体 LB 培养基, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 摇床 150 r/min 振荡培养 45 min, 涂布于含氨苄抗性的 LB 平板培养基上, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 12~16 h, 随机挑取 5 个单菌落放入含氨苄抗性的 LB 液体培养基 220 r/min 震荡培养 8 h, 菌液 PCR 扩增。收集菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.4 *AKI* 载体的构建 引物设计合成见“1.2.2”, 扩增回收同“1.2.3”, 选择 pEGFP-N1 真核表达载体进行质粒提取。利用 *Eco*R I、*Bam*H I 对 *AKI* 基因与 pEGFP-N1 质粒进行双酶切, 双酶切体系为 50 μ L, 具体加入量分别为: 11 μ L ddH₂O, 5 μ L 10 $\times$ Buffer, 2 μ L *Eco*R I, 2 μ L *Bam*H I, 30 μ L 重组质粒(目的片段)。37 $^{\circ}$ C 酶切 6 h 后使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 pEGFP-N1 载体片段和 *AKI* 目的片段, *AKI* 基因与 pEGFP-N1 载体的酶切回收片段经过 T4 连接酶连接后转化。AK1-pEGFP-N1 载体进行双酶切鉴定后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

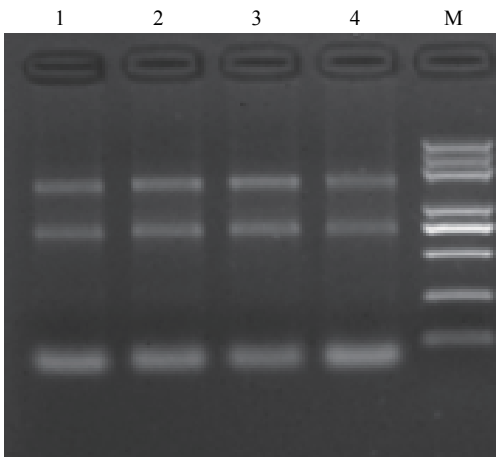
1.2.5 *AKI* 基因生物信息学分析 采用 BioEdit 软件对 *AKI* 基因的核苷酸序列进行比对, 分析碱基组成、氨基酸数目及组成; 相对分子质量和等电点运用在线网站 expasy 的 protparam 程序(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行分析; 蛋白质亲水性运用在线网站 expasy 的 protscale 程序(<https://web.expasy.org/protscale/>)进行分析; 蛋白质三级结构运用在线网站 swiss-model(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行预测; 蛋白质跨膜结构域运用在线网站 TMHMM-2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)进行预测; 磷酸化位点运用在线网站 NetPhos(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行预测; B 细胞抗原表位运用在线网站 immuneepitope 的

bcell 程序(<http://tools.immuneepitope.org/main/bcell/>)进行分析; 蛋白质二级结构运用在线网站 psipred(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)进行预测; 基因共表达和 GO 功能注释分析通过在线网站 string(<https://string-db.org/>)进行分析; CpG 岛运用在线网站 novopro(http://www.novopro.cn/tools/cpg_islands.html)进行预测; 基因的亚细胞定位通过在线网站 psort II(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)进行预测。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取

静原鸡胸肌、腿肌总 RNA 通过 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 所示, 可清晰看到 3 个条带, 无明显降解。核酸蛋白仪检测 RNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.2 之间, 完整性较好 ($RIN \geq 6.5$), 可用于后续试验。



1、2: 胸肌; 3、4: 腿肌; M: Trans2K Plus DNA Marker
1, 2: Chest muscle; 3, 4: Leg muscle; M: Trans2K Plus DNA Marker
图 1 静原鸡不同组织总 RNA 提取
Fig. 1 Total RNA extraction from different tissues of Jingyuan chicken

2.2 *AKI* 基因 CDS 区扩增及克隆

PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测, 经凝胶成像仪检测发现扩增片段条带整齐明亮且无引物二聚体等杂带, 表明引物特异性较好, 扩增条件合适。CDS 区扩增产物条带长度大小约为 741 bp, 与预期目的片段长度大小相符(图 2), 可以进行回收纯化; 回收后产物连接 pMD18-T 载体进行克隆, 菌液 PCR 鉴定片段大小与预期目的片段一致。

2.3 *AKI* 基因加酶切位点扩增

AKI 基因 CDS 区加酶切位点扩增产物条带长度大小约为 759 bp, 与预期目的片段长度大小相符(图 3), 可以进行回收纯化及菌液扩增。

Fig. 5 The full length coding sequence of *AKI* gene and corresponding amino acid sequence

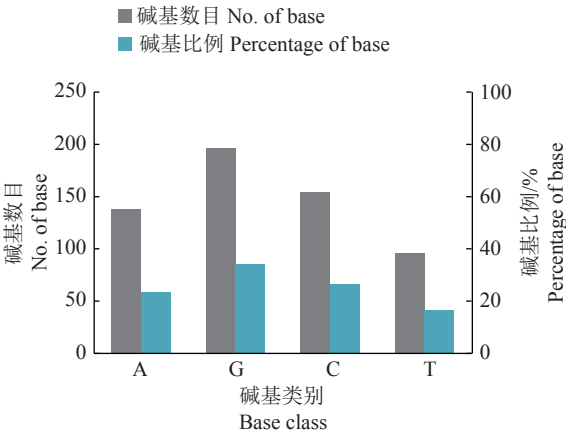


图 6 *AK1* 基因 CDS 区核苷酸组成

Fig. 6 Nucleotide composition in CDS region of *AK1* gene

含量(40.00%)。编码区 DNA 单链和双链相对分子质量分别为 177991 和356652 。

2.5.2 *AK1* 基因编码氨基酸序列及蛋白的理化分析 静原鸡 *AK1* 基因编码蛋白质的各种氨基酸中赖氨酸(Lys)数目占比最多(11.3%),天冬酰胺(Asn)和半胱氨酸(Cys)数目占比最少(1.0%)(表 2)。氨基

表 2 *AK1* 基因编码蛋白的氨基酸组成

Table 2 The composition of amino acid coded by *AK1* gene

氨基酸	数量	频率/%
Amino Acid	Number	Frequency
Ala	10	5.2
Arg	10	5.2
Asn	2	1.0
Asp	11	5.7
Cys	2	1.0
Gln	6	3.1
Glu	18	9.3
Pro	6	3.1
Thr	13	6.7
Val	15	7.7
Gly	19	9.8
His	4	2.1
Ile	9	4.6
Leu	20	10.3
Lys	22	11.3
Met	5	2.6
Phe	5	2.6
Ser	9	4.6
Tyr	8	4.1

酸残基中正电荷残基总数(Arg+Lys)为 32 个,负电荷残基总数(Asp+Glu)为 29 个。理化性质分析结果显示,静原鸡 *AK1* 蛋白的原子组成为 C₉₆₂H₁₅₆₆N₂₆₂O₂₉₁S₇,相对分子质量为 21 683,理论等电点为 8.68,不稳定指数为 21.56,脂肪指数为 85.88。

2.5.3 *AK1* 基因编码蛋白的亲水性/疏水性 使用在线分析网站对静原鸡 *AK1* 基因编码蛋白对水分子的亲和力进行研究的结果(图 7)表明,第 15 位缬氨酸(Val)疏水性最强(最高分数 1.933),第 105 位谷氨酸(Glu)亲水性最强(最低分数-2.589),总体亲水性均值小于 0(-0.469),说明该蛋白具有较强的亲水区域。

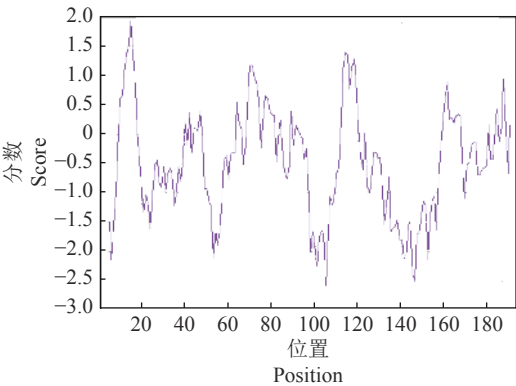


图 7 静原鸡 *AK1* 蛋白的疏水性/亲水性分析

Fig. 7 Hydrophobic/hydrophilic analysis for *AK1* protein in Jingyuan chicken

2.5.4 *AK1* 基因编码蛋白的跨膜结构域和 CpG 岛预测 采用在线软件 TMHMM-2.0 的预测结果表明静原鸡 *AK1* 基因的编码蛋白不存在跨膜结构域,不是跨膜蛋白。CpG 岛预测显示,*AK1* 基因编码蛋白存在 2 个 CpG 岛。

2.5.5 *AK1* 基因编码蛋白的磷酸化位点 静原鸡 *AK1* 蛋白可能存在 7 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点,分别位于氨基酸序列上第 20、39、50、52、88、137、189 位,8 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点,分别位于第 3、24、36、87、136、146、153、179 位,3 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点,分别位于第 35、118、155 位(图 8)。

2.5.6 *AK1* 基因编码蛋白的 B 细胞抗原表位预测 利用 immuneepitope 在线软件预测 *AK1* 基因编码蛋白的抗原表位(图 9),结果发现静原鸡 *AK1* 蛋白存在 10 个 B 细胞抗原表位,分别位于 1、17~25、38、48~56、85~88、97~111、122~124、134~147、155~158、176~181 位氨基酸残基。

2.5.7 *AK1* 基因编码蛋白的二级和三级结构预测 二级结构预测结果(图 10)显示,静原鸡 *AK1* 蛋

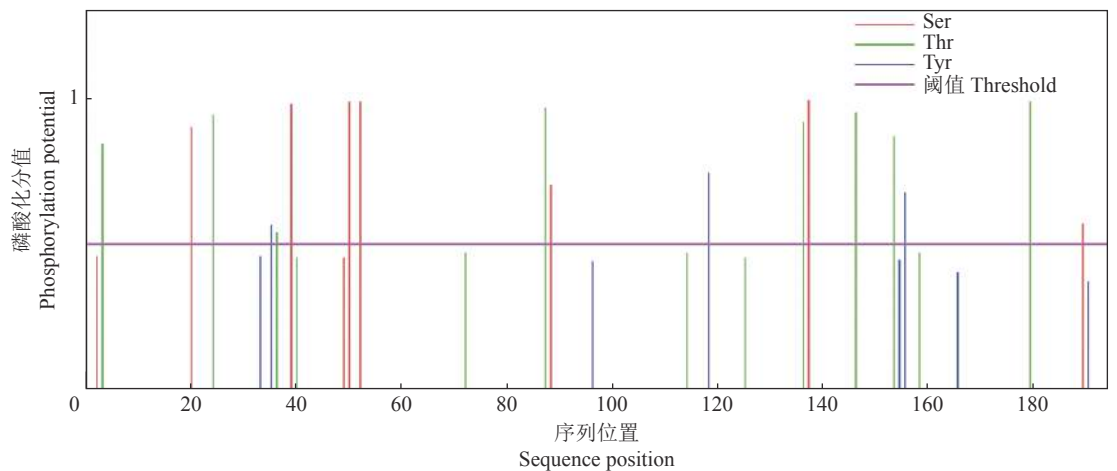


图 8 静原鸡 AK1 蛋白磷酸化位点

Fig. 8 The phosphorylation sites of AK1 protein in Jingyuan chicken

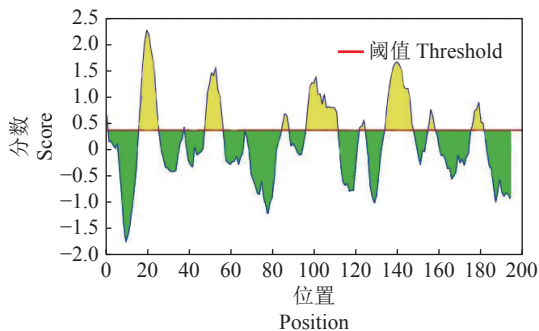


图 9 AK1 蛋白 B 抗原表位预测

Fig. 9 Prediction of B epitope of AK1 protein

白含有 8.76% 的伸展链, 46.91% 的 α -螺旋, 44.33% 的无规则卷曲。三级结构预测结果仍以 α -螺旋和无规则卷曲为主 (相似性为 86.39%)(图 11)。

2.5.8 AK1 基因共表达分析 通过 string 数据库对 AK1 基因进行共表达分析, 发现在原鸡中 AK1 和 AMPD1、PKM2 存在共表达, 共表达系数分别为 0.116 和 0.063。PKM2 与 AMPD1 共表达系数为 0.067, AMPD1 与 AMPD3 共表达系数为 0.082。在其他有机体中 AK1 与 AMPD3、AMPD1、NTPCR、PNPT1、CD39L1、PKM2、APRT、ADSL、ADK 和 TPK1 均存在共表达。

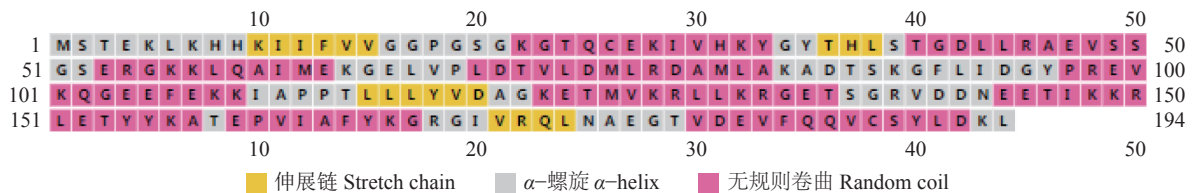


图 10 静原鸡 AK1 蛋白质二级结构

Fig. 10 The secondary structure of AK1 protein in Jingyuan chicken

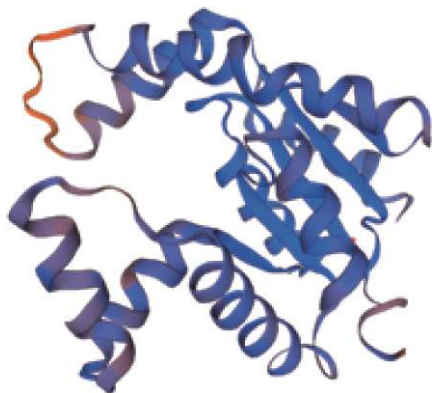


图 11 静原鸡 AK1 蛋白质预测三级结构

Fig. 11 The predicted tertiary structure of AK1 protein in Jingyuan chicken

2.5.9 AK1 基因编码蛋白亚细胞定位 通过在线工具 psort II 预测 AK1 基因编码产物的亚细胞定位, 其分布在细胞质的可能性为 52.2%, 分布在细胞骨架的可能性为 17.4%, 分布在细胞核中的可能性为 13.0%, 分布在线粒体、过氧化物酶体、内质网中的可能性分别为 8.7%、4.3%、4.3%。由此推断, AK1 基因编码产物主要在细胞质中发挥生物学作用。

2.5.10 AK1 基因的 GO 富集分析 通过 string 数据库对 AK1 基因进行 GO 富集分析, 发现 AK1 基因参与 4 个分子功能 GO 条目, 参与 11 个生物学过程 GO 条目, 参与 1 个细胞组分 GO 条目 (表 3)。

表 3 *AK1* 基因的 GO 注释分析

Table 3 GO annotation analysis of *AK1* gene

项目 Item	GO 条目 GO term	描述 Description	基因数 ¹⁾ Gene number	错误发现率 False discovery rate
生物学过程 Biological process	GO:0009167	嘌呤核糖核苷单磷酸代谢过程 Purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	4(41)	2.78×10 ⁻⁶
	GO:0009165	核苷酸生物合成的过程 Nucleotide biosynthetic process	4(40)	2.78×10 ⁻⁶
	GO:0009150	嘌呤核糖核苷酸的代谢过程 Purine ribonucleotide metabolic process	4(49)	2.78×10 ⁻⁶
	GO:0009168	嘌呤核糖核苷单磷酸生物合成过程 Purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	3(25)	7.56×10 ⁻⁶
	GO:0009152	嘌呤核糖核苷酸的生物合成过程 Purine ribonucleotide biosynthetic process	3(29)	8.98×10 ⁻⁶
	GO:0017144	药物代谢过程 Drug metabolic process	3(68)	7.47×10 ⁻⁵
	GO:0006188	肌苷酸生物合成过程 IMP biosynthetic process	2(7)	8.04×10 ⁻⁵
	GO:0046040	肌苷酸代谢过程 IMP metabolic process	2(9)	1.20×10 ⁻⁴
	GO:0006165	二磷酸核苷磷酸化 Nucleoside diphosphate phosphorylation	2(14)	2.40×10 ⁻⁴
	GO:0009142	核苷三磷酸生物合成过程 Nucleoside triphosphate biosynthetic process	2(21)	4.20×10 ⁻⁴
	GO:0046034	ATP 代谢过程 ATP metabolic process	2(31)	8.40×10 ⁻⁴
	GO:0003824	催化活性 Catalytic activity	5(642)	2.00×10 ⁻³
	GO:0016301	激酶活性 Kinase activity	2(98)	7.50×10 ⁻³
	GO:0005524	ATP 结合 ATP binding	3(202)	7.50×10 ⁻³
	GO:0016787	水解酶活性 Hydrolase activity	2(271)	3.13×10 ⁻²
细胞组分 Cellular component	GO:0005829	细胞溶质 Cytosol	3(264)	1.43×10 ⁻²

1) 括号内的数值表示富集到这个条目的所有基因数, 括号外的数值表示差异显著的基因数

1) The value in brackets represents the number of all genes enriched to this GO term, and the value outside brackets represents the number of significantly different genes

3 讨论与结论

随着生命科学的发展, 为揭示复杂的基因组信息结构及遗传语言的根本规律就出现了生物信息学, 生物信息学为大数据“插上翅膀”, 不仅给生命科学、农学、遗传学、细胞生物学和生物医学带来巨大的推动力且具有诱人的前景, 它已经渗透到人类基因组研究的各个层面, 如基因组、转录组学、蛋白质组学、代谢组学、疾病潜在靶点基因预测以及系统发育分析的研究^[12-13]。

腺苷酸激酶 (AK) 普遍存在于生物体, 催化腺嘌呤核苷酸的相互转化: $Mg^{2+} + ATP + AMP = Mg^{2+} + 2ADP$, 在不同哺乳动物组织中已经鉴定出 6 种 1 型 AK 同工酶 (AK1)^[14], 它们的主要功能是维持细胞的能量稳态, 处理与细胞能量利用相关的代谢信号, 并为核酸合成提供核苷酸^[15-16]。AK1 是一种小型胞质酶, 在骨骼肌、红细胞和脑等高周转率细胞中表达, 其活性依赖于 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 离子, 在没有 AK1 的情况下腺嘌呤核苷酸大量减少^[17]。鸡 *AK1* 基因约为 6000 碱基对, 由 7 个外显子组成, Suminami

等^[18]在鸡 AK1 和牛线粒体腺苷酸激酶 (AK2) 之间的点阵图发现, *AK1* 基因可能是通过缺失 1 个或多个外显子从 *AK2* 基因进化而来的。有研究表明鸡 AK1 的一级结构与猪 AK1 的一级结构有 85% 的相似性, 因此, 提出猪 AK1 的二级和三级结构^[19]也将适用于鸡 AK1, 而且发现 *AK1* 外显子 4 相对应的区域与 *AK2A* 构象的相似性最高, 已知该区域有助于 ATP 结合和催化功能^[20]。本研究发现静原鸡 *AK1* 基因 CDS 区共编码 194 个氨基酸, 理论等电点为 8.68(>7), 不稳定指数为 21.56(<40), 脂肪指数为 85.88, 推断该蛋白是碱性稳定蛋白^[21], 蛋白的稳定性会直接影响生物的生命活动和细胞周期, 因此, AK1 蛋白具有稳定的细胞周期和生命活动。AK1 蛋白总体亲水性均值为-0.469(<0), 说明该蛋白是可溶性蛋白。信号肽和跨膜结构域预测发现, AK1 蛋白不存在信号肽和跨膜结构, 说明该蛋白不是一个膜蛋白, 不能通过膜受体来发挥作用, 对其进行纯化可能较为简单。磷酸化位点分析发现 AK1 蛋白存在 8 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点、7 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点和 3 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点, 这些位点可以调节一些细胞的代谢和信号转导, 该蛋白可能需要通过翻译后的磷酸化和去磷酸化影响细胞生长、分化以及基因表达^[22], 这与 Carrasco 等^[11]发现 AK1 磷酸化可能是在质膜线粒体和 KATP 通道之间传递信号所必需的的研究结果一致。蛋白二三级结构预测发现 AK1 蛋白以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 且二级结构为混合模型^[23], 因此可能通过影响蛋白质肽链中配体和受体结合的活性^[24], 进而影响蛋白的功能。赵骁等^[25]等研究发现如果 β -转角和无规则卷曲在蛋白中占比居多, 则会出现抗原表位较多的现象, 因此, AK1 蛋白抗原表位预测发现其具有 10 个 B 细胞抗原表位。基因共表达分析发现, 在原鸡中 *AK1* 和 *AMPD1*、*PKM2* 存在共表达, 而 *AMPD1* 和 *PKM2* 都是肌苷酸 (Inosine acid, IMP) 从头合成途径的关键基因, 因此 *AK1* 可能存在与 *AMPD1* 与 *PKM2* 相似的功能, 可将 *AK1* 基因作为与 IMP 相关的功能基因进行研究。CpG 岛常位于基因转录调控区附近, 静原鸡 *AK1* 基因存在 2 个 CpG 岛, 这为后期 *AK1* 基因转录区 CpG 岛甲基化状态的研究十分重要。亚细胞定位发现 AK1 蛋白位于细胞质中, 与基因进行 GO 细胞组分分析和 Choo 等^[26]研究结果一致, 由此推断该蛋白主要在细胞质中发挥生物学作用。

综上, 本研究通过生物信息分析对前期转录组筛选的静原鸡不同部位与 IMP 相关的关键差异基

因 *AK1* 进行分析并通过分子生物学的方法构建其真核表达载体 AK1-pEGFP-N1。

静原鸡 *AK1* 基因 CDS 区全长 585 bp, AK1 蛋白含有 194 个氨基酸, 是具有较强的亲水区域的非跨膜蛋白, AK1 蛋白可能存在 7 个丝氨酸 (Ser) 磷酸化位点, 8 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点, 3 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点, 并且具有 10 个 B 细胞抗原表位, 2 个 CpG 岛, 预测其在细胞质中发挥作用, 与 *AMPD1*、*PKM2*、*ADSL* 存在共表达, AK1 蛋白二级结构和三级结构均以 α -螺旋和无规则卷曲为主 (相似性为 86.39%)。

参考文献:

[1] 王建保. 朝那鸡列入区级畜禽遗传保护品种[J]. 固原日报, 2009(1): 9-25.

[2] 张娟, 母童, 赵平, 等. 静原鸡 *ELOVL5* 基因遗传多样性研究[J]. 浙江农业学报, 2019, 31(2): 200-206.

[3] 母童, 张娟, 赵平, 等. 静原鸡 *ELOVL2* 和 *ELOVL5* 基因表达的组织特异性研究[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(8): 1290-1296.

[4] JONES M E, LIPMANN F. Aceto-CoA-kinase: ATP + CoA + Ac $\rightleftharpoons$ Ac-S CoA + 5-AMP + PP[J]. *Methods in Enzymology*, 1955, 1: 585-591.

[5] ZELEZNIKAR R J, HEYMAN R A, GRAEFF R M, et al. Evidence for compartmentalized adenylate kinase catalysis serving a high energy phosphoryl transfer function in rat skeletal muscle[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265: 300-311.

[6] VAN ROMPAY A R, JOHANSSON M, KARLSSON A. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 87(2/3): 189-198.

[7] TANABE T, YAMADA M, NOMA T, et al. Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1993, 113(2): 200-207.

[8] SCHULZ G E, ELZINGA M, MARX F, et al. Three-dimensional structure of adenylkinase[J]. *Nature*, 1974, 250(5462): 120-123.

[9] SACHSENHEIMER W, SCHULZ G E. Two conformations of crystalline adenylatekinase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1977, 114(1): 23-36.

[10] HANCOCK C R, JANSSEN E, TERJUNG R L. Skeletal muscle contractile performance and ADP accumulation in adenylate kinase-deficient mice[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2005, 288(6): C1287-C1297.

[11] CARRASCO A J, DZEJA P P, ALEKSEEV A E, et al. Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 2001, 98(13): 7623-7628.

[12] 易继财. 生物类专业生物信息学课程教学探索: 华南农业大学大学生物类专业生物信息学课程的教改实践与思考[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(26): 231-233.

[13] 吴风瑞, 陈德宇, 姜双林, 等. PBL 教学法在硕士研究生生物信息学教学中的应用[J]. *阜阳师范学院学报(自然科学版)*, 2017, 34(2): 109-111.

[14] PANAYIOTOU C, SOLAROLI N, KARLSSON A. The many isoforms of human adenylate kinases[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2014, 49: 75-83.

[15] JACOBASCH G. Biochemical and genetic basis of red cell enzyme deficiencies[J]. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2000, 13(1): 1-20.

[16] ABRUSCI P, CHIARELLI L R, GALIZZI A, et al. Erythrocyte adenylate kinase deficiency: Characterization of recombinant mutant forms and relationship with nonspherocytic hemolytic anemia[J]. *Experimental Hematology*, 2007, 35(8): 1182-1189.

[17] PUCAR D, BAST P, GUMINA R J, et al. Adenylate kinase *AKI* knockout heart: Energetics and functional performance under ischemia-reperfusion[J]. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2002, 283(2): H776-H782.

[18] SUMINAMI Y, KISHI F, TORIGOE T, et al. Structure and complete nucleotide sequence of the gene encoding chicken cytosolic adenylate kinase[J]. *Journal of Biochemistry*, 1988, 103(4): 611-617.

[19] PAI E F, SACHSENHEIMER W, SCHIRMER R H, et al. Substrate positions and induced-fit in crystalline adenylate kinase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1977, 114(1): 37-45.

[20] FRY D C, KUBY S A, MILDVAN A S. ATP-binding site of adenylate kinase: Mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(4): 907-911.

[21] GURUPRASAD K, REDDY B V, PANDIT M W. 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[J]. *Protein Engineering*, 1990, 4(2): 155-161.

[22] ZOR T, MAYR B M, DYSON H J, et al. Roles of phosphorylation and helix propensity in the binding of the KIX domain of CREB-binding protein by constitutive (c-myc) and inducible (CREB) activators[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(44): 42241-42248.

[23] KYTE J, DOOLITTLE R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105-132.

[24] 郑海军, 朱荣, 葛春蕾, 等. 人白细胞介素-29 的生物信息学分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(2): 209-212.

[25] 赵骁, 张峰波, 王红英, 等. 生物信息分析细粒棘球绦虫 EgA31 蛋白 T 细胞及 B 细胞的优势抗原表位[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(7): 1078-1083.

[26] CHOO H J, KIM B W, KWON O B, et al. Secretion of adenylate kinase 1 is required for extracellular ATP synthesis in C2C12 myotubes[J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2008, 40(2): 220-228.

【责任编辑 庄 延】