

李小芬, 朱睿, 宋易霖, 等. 高邮鸭 *Akt1* 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 1-7.

LI X F, ZHU R, SONG Y L, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *Akt1* gene from Gaoyou ducks [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 1-7.

## 高邮鸭 *Akt1* 基因克隆及生物信息学分析

李小芬<sup>1</sup>, 朱睿<sup>1,2</sup>, 宋易霖<sup>1</sup>, 田维婷<sup>1</sup>, 张蕾<sup>1\*</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300;

2. 江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室/江苏现代畜牧与新兽药工程技术中心, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** *Akt1* 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族基因, 通过响应生长因子刺激磷酸化一系列下游底物来调节许多过程, 包括代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成等。实验室前期对全转录组差异分析获得了与高邮鸭双黄蛋率显著相关的候选关键基因 *Akt1*, 并且 *Akt1* 显著富集于差异表达信号通路——PI3K-AKT 信号通路。为了对高邮鸭双黄蛋候选基因 *Akt1* 进行系统的功能研究, 本研究通过 PCR 技术克隆高邮鸭卵巢组织 *Akt1* 全长, 构建了 *Akt1*-EGFP 融合表达载体, 结合生物信息学技术对 AKT1 蛋白的理化性质进行系统分析。结果: AKT1 为种间保守型非分泌蛋白, 表达于质膜, 具有丰富的丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点, 可与 10 种蛋白 (TSC1、MAPK1、PIK3R1、PIK3CA、TSC2、CDKN1A、IKBKB、PIK3CD、PDPK1 和 ILK) 发生相互作用。研究结果为揭示 *Akt1* 基因编码的蛋白在调控高邮鸭双黄蛋形成过程中的功能和分子机制提供理论基础。

**关键词:** 高邮鸭; 双黄蛋; *Akt1* 基因; 克隆; 生物信息学分析

中图分类号: S834 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)10-0001-07

## Cloning and bioinformatics analysis of *Akt1* gene from Gaoyou ducks

LI Xiaofen<sup>1</sup>, ZHU Rui<sup>1,2</sup>, SONG Yilin<sup>1</sup>, TIAN Weiting<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>1\*</sup>

(1. Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. Engineering Technology Research Center for Modern Animal Science and Novel Veterinary Pharmaceutic Development/Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** *Akt1* is a serine/threonine protein kinase family gene that regulates many processes, including metabolism, proliferation, cell survival, growth, and angiogenesis, by phosphorylating a series of downstream substrates in response to growth factor stimulation. Our research group obtained a candidate key gene, *Akt1*, that is significantly correlated with the double yolk egg rate of Gaoyou ducks through full transcriptome differential analysis, and *Akt1* is significantly enriched in a differentially expressed signaling pathway, the PI3K-AKT signaling pathway. In order to conduct a systematic functional study on the candidate gene *Akt1* for the double yolk egg trait of Gaoyou ducks, the full length of the gene in the ovarian tissue of Gaoyou duck was cloned using PCR technology, and an *Akt1*-EGFP fusion expression vector was constructed. Then, the physicochemical properties of the AKT1 protein were systematically analyzed using bio-informatics technology. The results showed that AKT1 was a conserved non-secretory protein between species, expressed on the plasma membrane, with rich serine and threonine phosphorylation sites, and it interacted with 10 proteins (TSC1, MAPK1, PIK3R1, PIK3CA, TSC2, CDKN1A, IKBKB, PIK3CD, PDPK1, and ILK). These results provided a theoretical basis for further exploring the function and molecular mechanism of the protein encoded by the *Akt1* gene in regulating the formation of double yolk eggs in Gaoyou ducks.

**Keywords:** Gaoyou duck; double yolk eggs; *Akt1* gene; cloning; bio-informatics analysis

收稿日期: 2023-11-10; 修回日期: 2024-08-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32002157); 江苏省高校自然科学基金项目 (20KJD230001); 江苏农牧科技职业学院院级课题 (NSFZP202301); 2023 年度江苏省教育厅“江苏高校‘青蓝工程’”项目 (苏教师函 [2023] 27 号); 江苏省高职院校青年教师企业实践项目 (2023)

第一作者: 李小芬, 女, 硕士, 副教授

\* 通信作者: 张蕾, 副教授, 主要研究方向: 动物遗传育种与繁殖, E-mail: leizhang@jsahvc.edu.cn.

双黄蛋是由于家禽卵巢上的两颗卵泡同时发育成熟并排卵,经输卵管接纳后形成,在育种过程中因其一般不具备孵化能力而被认为是畸形蛋的一种,一般家禽品种双黄率极低<sup>[1]</sup>。然而,由于双黄蛋较高的营养价值以及吉祥、幸运的美好寓意备受广大消费者青睐,加上长期的供不应求,双黄蛋具有较大的市场潜力和较高的市场价值。高邮鸭是一种蛋肉兼用型的麻鸭品种,它是中国三大著名鸭种之一,原产于江苏高邮地区,在江淮地区饲养了数百年,因其著名的双黄蛋特色产品及双黄蛋“吉祥如意”的文化寓意而闻名于世,是经过长期选育的著名地方特色水禽品种。高邮鸭双黄蛋多见于青年母禽,与其旺盛的生殖机能密切相关,初产期双黄率可达2%~10%<sup>[2]</sup>。高邮鸭的双黄特性是其适应力的体现,也是研究双黄蛋产蛋机理的优良品种材料。Salamon等<sup>[3]</sup>已经证明,当双黄蛋的大小和位置合适时,可以孵化出健康的家禽后代,打破了传统的双黄蛋不能孵化的观点,进一步证明了双黄蛋性能稳定遗传的可能性。然而,目前对高邮鸭产蛋性能或双卵黄蛋生产特性的机理研究进展甚微,限制了该品种资源的开发利用。本团队围绕高邮鸭双黄蛋高、低产组卵巢组织结构、生殖激素和相关基因等进行了相关的基础研究<sup>[4-7]</sup>,通过对全转录组差异分析获得了与高邮鸭双黄蛋率显著相关的候选关键基因 *Akt1*。

*Akt1* 是3种密切相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine kinase) 家族基因 (*Akt1*、*Akt2* 和 *Akt3*) 之一,它们通过响应生长因子,即表皮生长因子 (EGF) 和类胰岛素生长因子 (IGF) 刺激磷酸化一系列下游底物来调节许多过程,包括代谢、增殖、细胞存活、生长和血管生成等<sup>[8]</sup>。除此之外, *Akt1* 的靶标种类繁多,使其能够通过无数下游底物刺激细胞生长,从而对细胞周期进程和调控产生多重影响,本课题组通过前期转录组数据富集对比分析,发现 *Akt1* 显著富集于差异表达信号通路——PI3K-AKT 信号通路<sup>[9]</sup>。*Akt1* 能够编码蛋白激酶 B 而被磷酸肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 磷酸化,从而激活 PI3K-AKT 信号通路。PI3K-AKT 信号通路是调节自噬的经典信号传导通路,在细胞增殖、生长、代谢等生物学过程中发挥重要的调控作用<sup>[10]</sup>,其上游信号分子 PDK1 和 PTEN 以及下游效应分子 Foxo3a、FoxL2 和 p27 等缺失均会导致早期卵泡池衰竭和卵巢早衰<sup>[11-14]</sup>。此外, *Akt1* 基因作为 PI3K-AKT 信号通路的重要节点基因,其编码的蛋白参与卵母细胞减数分裂过程中第1次减数分裂中期/第2次减数分裂中期的转变<sup>[15-16]</sup>,进而调控卵母细胞的成熟。高邮鸭在开产早期双黄蛋产蛋率最高,与

卵泡早期发育密切相关,这一特性与 PI3K-AKT 信号通路对卵泡早期发育以及颗粒细胞自噬及凋亡过程的调控特点吻合,表明该通路可能在高邮鸭双黄蛋的产蛋过程中起到重要调控作用。本研究通过生物信息分析软件对 PI3K-AKT 信号通路关键节点基因 *Akt1* 的基本理化性质进行预测,初步了解了 *Akt1* 基因基本结构,并验证了 AKT 蛋白亚细胞定位情况,为后期探索 PI3K-AKT 信号通路及其关键基因在高邮鸭卵巢颗粒细胞上相关生物学功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

330日龄高邮鸭和鸭胚由江苏省泰州市丰达水禽育种公司提供。pEGFP-N1质粒由扬州大学张亚妮教授惠赠;RNA提取试剂盒 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2、反转录试剂盒 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR、高保真酶 2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) 和非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒 ClonExpress II One Step Cloning Kit 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;胶回收试剂盒、无内毒素质粒小提试剂盒购自康为世纪生物科技股份有限公司;转染试剂 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 购自 Roche 公司;抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) 购自上海碧云天生物技术有限公司。引物合成和测序工作均由苏州金唯智生物科技股份有限公司完成。

### 1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

高邮鸭屠宰后立即采集卵巢组织放入无酶冻存管,经液氮速冻后,利用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒提取卵巢组织总 RNA,根据反转录试剂盒操作步骤制备 cDNA: 5×All-in-one qRT SuperMix 4 μL, Enzyme Mix 1 μL, RNA 15 μL 的反应体系在 50℃ 孵育 15 min, 85℃ 孵育 5 s 后获取 cDNA。

### 1.3 *Akt1* 基因克隆及 pEGFP-N1 重组表达载体构建

根据 NCBI 数据库公布的 *Akt1* 基因序列设计并合成特异性引物。上游引物: 5' - agcgcctaccggactcagatctcgagCGCCACCATGAATGAAGTAGCAATAGTGAAGGAAG-3'; 下游引物: 5' - ggatcccgggcccgcggtaccGTAGCGGTTCCACTGGCTGA-3'。小写字母序列为载体同源序列,大写字母序列为基因扩增序列。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件如下: 98℃ 预变性 3 min; 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 10 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段,将纯化的 PCR 产

物克隆至经 *Kpn* I 和 *Xho* I 限制性内切酶线性化的 pEGFP-N1 载体并转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 挑取单个菌落经菌液 PCR、双酶切鉴定正确后测序, 将测序正确的重组表达载体命名为 pAKT1-EGFP。

#### 1.4 鸭胚成纤维细胞 (DEF) 的制备和转染

将 9~10 日龄的胚蛋消毒后取出鸭胚, 去除头尾、骨骼和内脏, PBS 溶液中洗涤 2 次, 剪碎剩余组织, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min, 随后用含有 10% FBS 的 DMEM 终止消化并收集细胞悬液, 经 100

目过滤筛过滤后洗涤细胞, 最后计数、接种。转染前 20~24 h 将生长状态良好的第 3 代 DEF 细胞铺于 24 孔板, 待细胞丰度为 80% 时, 按照 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 转染方法进行转染, 分别设置重组质粒和空质粒转染组, 转染 48 h 经 DAPI 染色封片后显微镜下观察荧光。

#### 1.5 生物信息学分析

对测序后的高邮鸭 *Akt1* 基因序列进行生物信息学分析, 采用的在线软件及其网址信息见表 1。

表 1 AKT 蛋白生物信息学分析在线软件及其用途和网址

在线软件	用途	网址
NCBI Protein BLAST	蛋白同源性分析	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;LINK_LOC=blasthome</a>
ExPASy ProtParam Tool	蛋白特性分析	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>
SOPMA	蛋白二级结构预测	<a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a>
SWISS-MODEL	蛋白三级结构预测	<a href="https://swissmodel.expasy.org/interactive">https://swissmodel.expasy.org/interactive</a>
Pfam	蛋白结构域预测	<a href="http://pfam.xfam.org/search/sequence">http://pfam.xfam.org/search/sequence</a>
SignalP-5.0	信号肽预测	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0</a>
TMHMM	跨膜结构分析	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0</a>
PSORT II Prediction	亚细胞定位	<a href="https://psort.hgc.jp/form2.html">https://psort.hgc.jp/form2.html</a>
NetPhos-3.1	磷酸化	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1</a>
STRING	蛋白互作分析	<a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a>

## 2 结果与分析

### 2.1 *Akt1* 基因克隆及 pAKT1-EGFP 重组融合表达载体构建

以 cDNA 为模板, 利用特异性引物进行 PCR 扩增 *Akt1* 基因片段, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 目的条带大小约为 1 500 bp, 符合预期 (图 1A)。构建的 pAKT1-EGFP 重组表达载体经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 分别在 4 700 bp 和 1 500 bp 处存在线性化载体和目的片段, 与预期结果符合 (图 1B)。测序后显示目的片段长 1 440 bp, 与 NCBI 数据库公布的绿头鸭 (*Anas platyrhynchos*) *Akt1* 基因序列相似性为 99.86%, 说明高邮鸭 *Akt1* 基因克隆成功。

### 2.2 AKT1 蛋白相似性分析

为了比较 AKT1 蛋白序列在不同物种进化过程中的保守性, 利用 NCBI 数据库进行 BLAST 分析, 结果显示, 高邮鸭 AKT1 氨基酸序列与原鸡相似性最高, 与爬行动物相似性次之, 与哺乳动物相似性相对较低, 但不同种属间差异不大, 相似性均在 95% 以上 (表 2), 说明该蛋白在物种进化过程中具有较强的保守性。

### 2.3 AKT1 蛋白理化性质分析

利用在线软件 ExPASy ProtParam Tool 分析 AKT1 蛋白特性, 结果显示, AKT1 蛋白包含 480 个氨基酸, 理论分子式为 C<sub>2499</sub>H<sub>3870</sub>N<sub>664</sub>O<sub>737</sub>S<sub>25</sub>, 大小为 55.809 73 ku, 等电点为 5.78, 消光系数为 1.177, 亲水性平均系数为 -0.585。

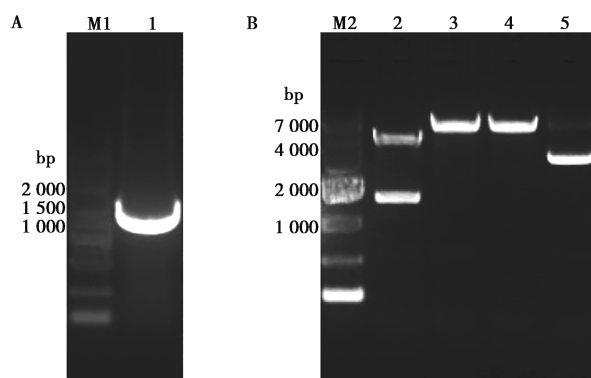


图 1 *Akt1* 基因 PCR 扩增 (A) 及 pAKT1-EGFP 重组表达载体双酶切鉴定 (B)

表 2 AKT1 蛋白相似性分析

物种	相似性/%	物种	相似性/%
鸿雁 ( <i>Anser cygnoides</i> )	100	束带蛇 ( <i>Thamnophis sirtalis</i> )	99.17
原鸡 ( <i>Gallus gallus</i> )	99.79	鸭嘴兽 ( <i>Ornithorhynchus anatinus</i> )	98.12
长吻鳄 ( <i>Gavialis gangeticus</i> )	99.58	人 ( <i>Homo sapiens</i> )	96.04
中华鳖 ( <i>Pelodiscus sinensis</i> )	99.38	小鼠 ( <i>Mus musculus</i> )	95.83
科莫多巨蜥 ( <i>Varanus komodoensis</i> )	99.17	大鼠 ( <i>Rattus norvegicus</i> )	95.62

## 2.4 AKT1 蛋白二级和三级结构预测

利用 SOPMA 在线软件预测分析 AKT1 蛋白二级结构后发现, 该蛋白具有  $\alpha$  螺旋 162 个, 占比 33.75%; 延伸链 85 个, 占比 17.71%;  $\beta$  转角 36

个, 占比 7.5%; 无规则卷曲 197 个, 占比 41.04% (图 2A)。运用 SWISS-MODEL 数据库预测分析 AKT 蛋白三级结构并建立单体分子三级结构模型 (图 2B)。



注: h 表示  $\alpha$  螺旋, e 表示延伸链, t 表示  $\beta$  转角, c 表示无规则卷曲。

图 2 AKT1 蛋白二级 (A) 和三级结构 (B) 预测分析

## 2.5 AKT1 蛋白结构域预测

蛋白功能结构域是蛋白发挥生理功能的基础, 为了预测 AKT1 蛋白的可能生理功能, 通过 Pfam 在线软件对 AKT1 蛋白的结构域进行预测, 结果显示, 该蛋白在第 6~108 位氨基酸处存在普列克底物蛋白同

源物样结构域, 暗示 AKT1 蛋白可能介导信号蛋白的互作, 参与信号转导; 同时, 在第 150~408 位氨基酸存在蛋白激酶结构域, 是 AKT1 蛋白的核心功能区 (图 3)。



图 3 AKT1 蛋白功能结构域预测

## 2.6 AKT1 蛋白信号肽预测和亚细胞定位分析

利用 SignalP-5.0 在线工具预测 AKT 蛋白信号肽后发现, Signal Peptide (Sec/SPI) 的值仅为 0.000 7, 因此认为该蛋白不具有信号肽 (图 4A); TMHMM 跨膜结构分析结果也显示, 该蛋白不存在跨膜螺旋区 (图 4B)。这些结果表明 AKT1 蛋白为非分泌蛋白。随后的亚细胞定位预测也显示, AKT1 蛋白主要定位

于细胞质中, 含量高达 69.6%, 细胞核中少量表达 (17.4%), 该结果与信号肽预测一致。为了进一步验证亚细胞定位的预测结果, 构建了 AKT1-EGFP 融合表达载体 pAKT1-EGFP 并在 DEF 细胞中进行表达并观察荧光情况。结果发现, AKT1-EGFP 融合蛋白表达定位于质膜中 (图 5)。

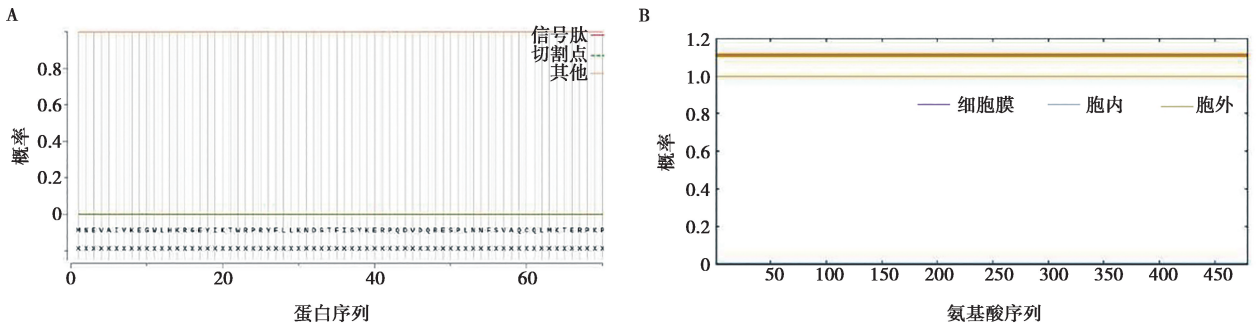
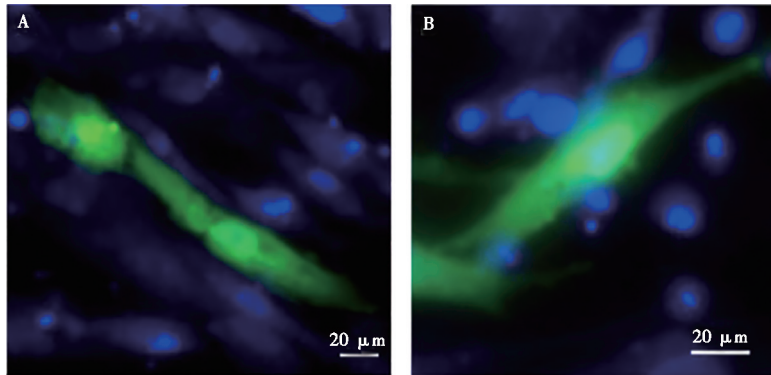


图4 AKT 蛋白信号肽预测 (A) 和跨膜结构分析 (B)



A. pAKT1-EGFP 重组质粒转染 DEF 细胞; B. pEGFP-N1 质粒转染 DEF 细胞。

图5 AKT 蛋白亚细胞定位

### 2.7 AKT1 蛋白磷酸化位点预测

磷酸化作为蛋白重要的表观遗传修饰方式，可以激活蛋白质的活性，影响蛋白发挥其生物功能。为了了解 AKT1 蛋白在表达过程中可能存在的磷酸化修

饰，通过在线工具 NetPhos-3.1 预测了 AKT1 蛋白磷酸化修饰情况，结果表明，AKT1 蛋白有 43 个磷酸化位点，其中丝氨酸的磷酸化位点 16 个，苏氨酸 18 个，酪氨酸 9 个（图 6）。

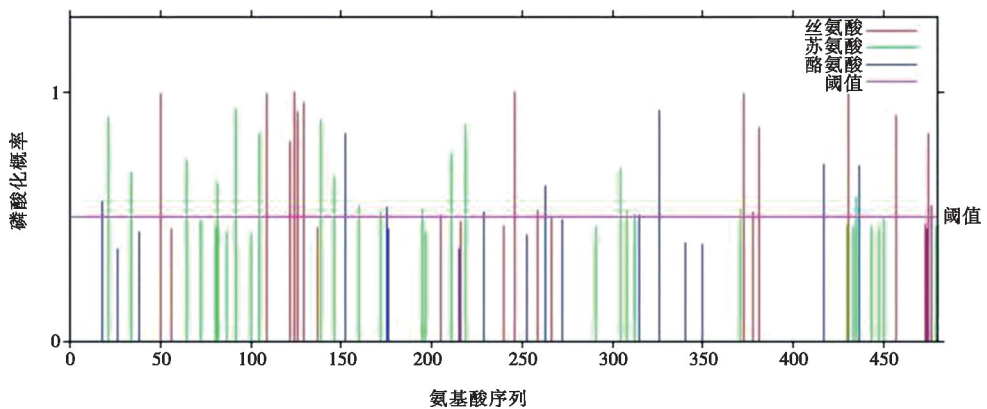


图6 AKT 蛋白磷酸化位点预测

### 2.8 AKT1 互作蛋白分析

通过 STRING 在线数据库预测并构建了鸭 AKT1 互作蛋白网络（图 7）。结果显示，AKT1 与多种蛋白质具有显著互作，互作相关评分均高于 0.8。这些蛋白主要涉及 p53（调控细胞周期的关键信号因子；

CDKN1A），mTOR（抑癌基因蛋白：TSC1 和 TSC2），PI3K-AKT（整合素连接激酶：ILK，3-磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1：PDPK1，PI3K 家族蛋白：PIK3R1、PIK3CA 和 PIK3CD），MAPK/ERK（丝裂原活化蛋白激酶：MAPK1）以及 NF-κB（IκB 激酶；

IKKB) 等关键细胞信号通路, 参与细胞增殖、凋亡、代谢、炎症反应及细胞周期调控等生理或病理过程。其中 TSC1-AKT1 与 MAPK1-AKT1 的互作相关度最高, PDPK1-AKT1 与 ILK-AKT1 的互作相关度最低, 表明 AKT1 在多条关键信号通路中起到核心作用, 调控多种细胞功能。

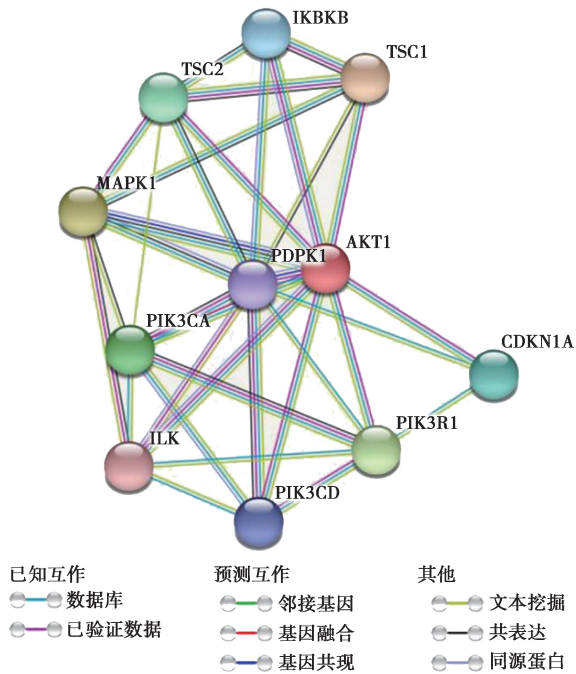


图 7 AKT1 蛋白互作预测

### 3 讨论

高邮鸭双黄蛋作为我国特色商品驰名海内外, 高邮鸭也因善产双黄蛋而闻名, 但目前对高邮鸭产蛋性能或双卵黄蛋生产特性的机理研究进展甚微, 限制了该品种资源的开发利用。本团队长期关注高邮鸭双黄蛋产蛋的分子调控机制研究, 并围绕高邮鸭双黄蛋高、低产组卵巢组织结构、生殖激素和相关基因等进行了一系列的研究<sup>[4-7]</sup>, 在对高邮鸭双黄蛋高、低产组卵巢组织的全转录组差异分析后获得了与高邮鸭双黄蛋率显著相关的信号通路: PI3K-AKT 信号通路<sup>[10]</sup>。在 NCBI 数据库公布的鸭基因组中, 已鉴定出 2 个 *Akt* 基因 *Akt1* 和 *Akt3*, *Akt1* 基因位于 Chr5: 9 596 520~9 668 829, *Akt3* 基因位于 Chr3: 28 648 609~28 801 623, 其中 AKT 主要亚型由 *Akt1* 编码。本研究通过生物信息学方法对 *Akt1* 基因编码的产物进行详细的预测分析及亚细胞定位验证, 为后续研究 PI3K-AKT 信号通路关键节点基因 *Akt1* 在调控高邮鸭双黄蛋形成过程中的具体生物学功能提供理论基础。

作为经典的细胞内通路, PI3K-AKT 信号通路调控卵巢卵泡发育的分子机制受到广泛关注, 在小鼠、牛和猪等物种中均有报道<sup>[17-18]</sup>。PI3K-AKT 信号通

路除了参与哺乳动物卵细胞发育之外, 在家禽中也有相关报道, 如: 高、低产蛋量白羽番鸭卵巢转录组对比分析<sup>[19]</sup>, 高、低产蛋量黑番鸭卵巢转录组对比分析<sup>[20]</sup>以及高、低产蛋量芦花鸡卵巢转录组对比分析<sup>[21]</sup>, 这些转录组数据富集分析结果均显示 PI3K-AKT 信号通路可能调控家禽卵泡发育或与产蛋性能相关。此外, Song 等<sup>[16]</sup>通过添加表皮生长因子体外培养猪卵母细胞, 显著提高 p-Akt Thr308 磷酸化水平, 从而提高卵母细胞成熟率; 而 Bezerra 等<sup>[22]</sup>通过体外加入胰岛素样生长因子 1, 促使 AKT 磷酸化, 从而有效激活绵羊卵泡并促进了卵泡颗粒细胞的增殖。这些研究者的生物信息学分析研究表明, PI3K-AKT 信号通路中的关键节点基因 *Akt1* 与卵泡发育密切相关。

本研究通过比对分析发现 AKT1 氨基酸序列与原鸡相似性最高, 与爬行动物相似性次之, 与哺乳动物相似性相对较低, 但不同种属间差异不大, 相似性均在 95% 以上, 表明该基因在物种进化过程中具有较强的保守性且可能具有相似的生物学功能, 也提示 AKT 蛋白功能的研究在不同物种间具有重要的借鉴和参考价值, 而种间特异性氨基酸序列也可能意味着该蛋白在生物学功能上存在物种特异性。

本研究在对 AKT1 蛋白功能域的预测中发现, AKT1 蛋白主要由三部分组成: N 端的 PH 结构域、中间的蛋白激酶催化结构域以及蛋白激酶 C 端疏水基序, 这与此前报道的人源 AKT1 蛋白结构一致<sup>[23]</sup>, 也符合本研究中对 AKT1 氨基酸相似性分析的结果。PH 结构域是一种功能性结构域, 可能通过参与蛋白活性调节进而介导信号传导过程中的蛋白质间的互作, 同时也可能对蛋白质具有细胞和亚细胞水平的膜定位作用<sup>[24]</sup>。PI3K-AKT 信号通路中, PI3K 激活后的产物 PIP2 和 PIP3 与 AKT 的 PH 结构域结合, 促使 AKT 从胞质转位到质膜, 使其构象发生改变, 在丝氨酸 473 和苏氨酸 308 处发生磷酸化, 最终激活 AKT<sup>[25]</sup>。本研究中对 AKT1 信号肽和跨膜结构的预测显示 AKT1 是不存在信号肽和跨膜结构的非分泌蛋白, 这似乎与 DEF 亚细胞定位试验获得的 AKT1 在质膜中表达的结果不符, 但前文所述 AKT 蛋白活化过程为这一结果提供了合理的解释, 即: AKT1 蛋白最初表达于胞质, 后转位到质膜被激活并发挥生物学功能<sup>[26]</sup>。

丝氨酸和苏氨酸的磷酸化是 AKT 蛋白活化并发挥生物学功能的重要标志, 本研究发现 AKT1 蛋白具有丰富的丝氨酸 (16 个) 和苏氨酸 (18 个) 的磷酸化位点, 这也暗示 AKT1 蛋白可能存在多种活化方式。此外, 构建的蛋白互作网络模式图表明 AKT1 蛋

白与 10 种蛋白互相作用, 这与 AKT1 蛋白丰富的丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点的结果相符。*PIK3RA*、*PIK3CA* 和 *PIK3CD* 均能编码 PI3K 的不同催化亚单位, 其可通过激活 AKT 信号磷酸化激活 PI3K-AKT 信号通路<sup>[27]</sup>。此外, AKT 通过作用于 TSC1/TSC2 复合体以及 mTORC 信号传导, 进而调节细胞生长<sup>[26]</sup>。辛晓萍等<sup>[10]</sup>对猪卵泡发育过程中的 PI3K-AKT 信号通路研究表明, *Akt1* 是 PI3K-AKT 信号通路的激活因子, *TSC1* 和 *TSC2* 是 PI3K-AKT 信号通路的抑制因子, 这些关键基因在不同时期的猪卵巢中差异表达, 参与调控猪卵泡的发育, 该研究结果部分验证了本文中 AKT1 蛋白的互作调控网络, 同时也提示 AKT1 蛋白为细胞传导的关键节点。

## 4 结论

本研究成功克隆了高邮鸭 PI3K-AKT 信号通路关键节点基因 *Akt1*, 生物信息学分析结合亚细胞定位发现 AKT1 蛋白为种间保守型非分泌蛋白, 表达于质膜, 具有丰富的丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点, 可与多种蛋白发生相互作用。研究结果为进一步探索 *Akt1* 基因在调控高邮鸭双黄蛋形成过程中的功能和分子机制提供理论基础。

## 参考文献:

- [1] 陈五湖, 王强, 蒲俊华, 等. 双黄蛋品质、产蛋机理与调控初探 [J]. 畜牧与兽医, 2006 (6): 22-23.
- [2] ZHANG T J, LI H F, CHEN K W, et al. Analysis of fitness predominance for Gaoyou duck's double-yolk egg [J]. J Anim Vet Adv, 2011, 10 (3): 367-371.
- [3] SALAMON A, KENT J P. Yolk size and ovulation order determine fertility within double-yolked duck (*Anas platyrhynchos domesticus*) eggs [J]. Reprod Fertil Dev, 2016, 28 (4): 440-445.
- [4] 张蕾, 张响英, 章敬旗, 等. 高、低产双黄蛋高邮鸭卵巢结构及生殖激素和相关基因差异 [J]. 江苏农业学报, 2018, 34 (2): 385-389.
- [5] 张蕾, 张响英, 章敬旗, 等. 高、低产双黄蛋高邮鸭卵巢组织差异分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (7): 1905-1911.
- [6] 张蕾, 张海波, 章敬旗, 等. 基于 RNA-Seq 测序的高、低产双黄蛋高邮鸭卵巢组织 SNP 筛选分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46 (12): 3495-3503.
- [7] ZHANG L, XIE J, SUN G B, et al. Identification of differentially expressed genes and signaling pathways in Gaoyou duck ovary at different physiological stages [J]. Front Vet Sci, 2023, 10: 1190998.
- [8] DUGGAL S, JAILKHANI N, MIDHA M K, et al. Defining the Akt1 interactome and its role in regulating the cell cycle [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 1303.
- [9] MUNDI P S, SACHDEV J, MCCOURT C, et al. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development [J]. Br J Clin Pharmacol, 2016, 82 (4): 943-956.
- [10] 辛晓萍, 袁晓龙, 陈炫, 等. PI3K 信号通路关键基因在猪卵泡发育中的表达规律 [J]. 华南农业大学学报, 2018, 39 (2): 23-28.
- [11] 洪雯丽, 黄瑶琪, 祝费隐, 等. PTEN 调控大鼠原始卵泡启动和生长 [J]. 基础医学与临床, 2019, 39 (8): 1077-1084.
- [12] HOSAKA T, BIGGS W H, TIEU D, et al. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (9): 2975-2980.
- [13] THANATSIS N, KAPONIS A, KOIKA V, et al. Reduced Foxo3a, FoxL2, and p27 mRNA expression in human ovarian tissue in premature ovarian insufficiency [J]. Hormones (Athens), 2019, 18 (4): 409-415.
- [14] REDDY P, LIU L, ADHIKARI D, et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool [J]. Science, 2008, 319 (5863): 611-613.
- [15] TOMEK W, SMILJAKOVIC T. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes [J]. Reproduction, 2005, 130 (4): 423-430.
- [16] SONG B S, JEONG P S, LEE J H, et al. The effects of kinase modulation on *in vitro* maturation according to different cumulus-oocyte complex morphologies [J]. PLoS One, 2018, 13 (10): e205495.
- [17] CHEN J, TORCIA S, XIE F, et al. Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15 (12): 1415-1423.
- [18] KALOUS J, KUBELKA M, SOLC P, et al. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes [J]. Reproduction, 2009, 138 (4): 645-654.
- [19] 黄利华. 白羽番鸭卵巢组织转录组及产蛋性状相关基因关联分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [20] 张杉杉. 黑番鸭卵巢组织 mRNA 差异表达与产蛋性状关联分析研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [21] MISHRA S K, CHEN B, ZHU Q, et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed genes associated with high rates of egg production in chicken hypothalamic-pituitary-ovarian axis [J]. Scientific Reports, 2020, 10 (1): 5976.
- [22] BEZERRA M, BARBERINO R S, MENEZES V G, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes primordial follicle growth and reduces DNA fragmentation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling pathway [J]. Reprod Fertil Dev, 2018, 30 (11): 1503-1513.
- [23] ABEYRATHNA P, SU Y C. The critical role of Akt in cardiovascular function [J]. Vascul Pharmacol, 2015, 74: 38-48.
- [24] 邓艳春, 药立波, 苏成芝. PH 结构域研究进展 [J]. 生命科学, 2000 (3): 117-121.
- [25] 李娇娇, 焦亚飞, 石德顺. PI3K/Akt 信号通路对卵泡发育和卵母细胞成熟作用的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57 (8): 33-37.
- [26] BHASKAR P T, HAY N. The two TORCs and Akt [J]. Dev Cell, 2007, 12 (4): 487-502.
- [27] MADSEN R R, VANHAESEBROECK B, SEMPLER R K. Cancer-associated PIK3CA mutations in overgrowth disorders [J]. Trends Mol Med, 2018, 24 (10): 856-870.