

陈新企,周光现,王慧芳,等. 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 SNP 位点筛查及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(11):43–52.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2022.11.006

狮头鹅 *MAP2K1* 基因 SNP 位点筛查及生物信息学分析

陈新企¹, 周光现¹, 王慧芳¹, 李立先², 贾汝敏¹, 赵志辉¹

(1. 广东海洋大学滨海农业学院, 广东湛江 524088; 2. 饶平浮滨狮头鹅原种繁育基地有限公司, 广东饶平 521000)

摘要: *MAP2K1* 基因属于 GnRH 信号通路且与哺乳动物的卵泡发育紧密相关。为研究 *MAP2K1* 基因在狮头鹅上的基因多态性,以 200 羽狮头鹅为试验对象,利用 DNA 池结合 PCR 产物直接测序法,筛选出 SNP 位点并进行生物信息学分析。检测结果表明,在狮头鹅群体中发现 1 个 SNP 位点,为 E3–63 A>G,存在 3 种基因型。生物信息学预测显示,*MAP2K1* 基因突变前后编码氨基酸并未发生改变,属于不稳定不跨膜酸性亲水性蛋白,存在卷曲螺旋结构,无信号肽存在。亚细胞定位于细胞核、细胞质、细胞支架的概率分别为 60.9%、30.4%、8.7%,主要在细胞核发挥生物学作用;有 34 个磷酸化位点,有 1 个 N-糖基化位点,1 个保守结构 S_{TKc},蛋白二级结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲组成。*MAP2K1* 基因突变前后 mRNA 的最小自由能,质心发生二级结构,含有假结的 mRNA 二级结构、折叠结构、MaxExpect 结果、点-括号结果、最小自由能、mRNA 结构的热力学集合、质心结构所形成的山地图发生改变,且自由能上升,结构稳定性变弱。从狮头鹅 *MAP2K1* 基因的 11 个外显子上检测出 1 个 SNP 位点,*MAP2K1* 基因突变前后改变 mRNA 二级结构,为进一步研究 *MAP2K1* 基因对狮头鹅产蛋数量提供参考。

关键词: 狮头鹅; *MAP2K1* 基因; SNP; 多态性; 生物信息学

中图分类号: S835.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2022)11–0043–10

狮头鹅被选为广东省第三届“十大名牌”农产品,生长速度快、耗料少,其营养价值高,亚麻酸含量超过其他肉类并接近人体所需氨基酸的比例^[1],具有很高的经济价值。但狮头鹅年产蛋不足 32 枚^[2–5],不足高产鹅的 1/4,远不能满足市场需求。丝裂原活化蛋白激酶 I (mitogen activated protein kinase 1,简称 MAP2K1,又称 MEK1 或 MAPKK1),属于 GnRH 信号通路,是细胞进入 DNA 合成期(即 S 期)的关键,激活 ERK1/2,ERK1/2 进入细胞核后,又激活转录因子形成转录复合物,导致细胞的增殖分化^[6]。*MAP2K1* 基因属于 MEK 家族成员,该家族包括 *MEK1*、*MEK2*、*MEK3*、*MEK4*、*MEK5*、*MEK6*、*MEK7* 基因,是 MAPK 信号通路中的重要成员^[7–9]。MAPK 信号通路包括:p38MAPK 通路(p38

mitogen activated protein,p38MAPK),c-Jun 氨基末端激酶通路/应激激活蛋白(c-Jun-N-terminal kinase,JNK/stress activated protein kinase,SAPK),细胞外信号调节蛋白激酶通路(extra cellular signal-regulated protein kinase,ERK)及细胞外信号调节激酶 5(ERK5)通路^[10–11]。*MAP2K1* 基因主要参与 ERK 途径,被认为是 ERK1/2 最主要调节因子之一^[12]。ERK1/2 参与分化细胞的减数分裂,有丝分裂后功能的调控^[13],活化原始卵泡和卵泡的生长,促进卵泡颗粒细胞增殖及类固醇激素合成^[14]。ERK1/2 差异性调节 FSH 诱导的卵泡颗粒细胞中孕激素和雌二醇合成^[15]。*MAP2K1* 是 ERK1/2 的上游激酶,为少有的双重特异性蛋白激酶,既为酪氨酸蛋白激酶,又为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[16–18]。*MAP2K1* 基因突变导致人各种疾病的发生,例如肝癌^[19–22]、结直肠癌^[23]等;导致鼠隐性表型致死,影响胎盘的发育^[24–25],滋养层细胞不能侵入胎盘迷路^[8,26];影响猪精子生成^[6],影响公牛精液品质^[27]。目前,*MAP2K1* 基因在狮头鹅的研究还未见相关报道。有关狮头鹅最新的研究为基于全基因组重测序技术的狮头鹅 Indel 标记分析^[28]和狮头鹅个体产蛋智能记录系统研制^[29]。而关于 *MAP2K1* 基因的多态性研究主要与人疾病相关,迄今为止,还没有

收稿日期:2021–07–25

基金项目:广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(编号:2019KJ137、2020KJ137);狮头鹅品种选育及健康养殖校企合作项目(编号:B15337)。

作者简介:陈新企(1996—),女,广西贺州人,硕士研究生,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:2476359974@qq.com。

通信作者:贾汝敏,教授,研究生导师,主要从事家禽遗传育种与繁殖研究,E-mail:jiarm@gdou.edu.cn;赵志辉,教授,研究生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:zhzhao@jlu.edu.cn。

关于狮头鹅 *MAP2K1* 基因的多态性及生物信息学分析,及是否可以作为影响产蛋性能候选基因的报道。因此,研究狮头鹅 *MAP2K1* 基因外显子多态性可快速、准确、不受环境条件干扰地揭示 *MAP2K1* 基因是否影响狮头鹅的产蛋量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

狮头鹅由国家级狮头鹅保种场(广东省饶平县)提供,从 1 400 羽 500 日龄繁殖期母鹅中随机挑选 200 羽健康成年母鹅。在翅下静脉肝素钠抗凝采集血样。Green Taq Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司,HiPure Blood DNA Mini Kit 试剂盒购自美基生物公司,DL-2000 Marker 购自广州东盛生物

科技有限公司。

1.2 基因组 DNA 提取和 DNA 池的构建

使用试剂盒进行血液样品 DNA 提取。经 1% 凝胶电泳检测 DNA 完整性,使用 Nanodrop 检测纯度。每个混池 100 个 DNA 样品,每个样品各取 1 μ L,然后混合均匀,构成狮头鹅基因组 DNA 池。

1.3 引物设计与合成

目前,GenBank 上未公布鹅 *MAP2K1* 基因序列,根据文献发现鹅的基因序列与鸭的基因序列一致性较高,因此采用鸭的基因序列设计相应引物。由表 1 可知,根据 GenBank 上已公布的绿头鸭 *MAP2K1* 基因序列(登录号 XM_027465642.2),采用 Primer Premier 5.0 对狮头鹅 *MAP2K1* 基因的 11 个外显子(Exon1~Exon11)设计引物。

表 1 *MAP2K1* 基因的引物序列信息

基因名称	引物(5'→3')	退火温度(℃)	片段长度(bp)
<i>MAP2K1</i> -1	F: TGCTTCTCTTGTTGCGGTG; R: CTTAGGAAGGCAGAACCTGGC	58.5	649
<i>MAP2K1</i> -2	F: CGGACAGAACCTCAGAGATGG; R: GTAGAATCAGCAAGCACAACTTCC	57.0	633
<i>MAP2K1</i> -3	F: TGCCCAACTTCTGAACAACCT; R: AAGCTAGGAGATTGAACGCAC	55.5	252
<i>MAP2K1</i> -4	F: TTAGCAGGAGTCAAACCATGGAA; R: TCTCCACATCTCCAATCCT	56.5	472
<i>MAP2K1</i> -5	F: GGTCTTTAGTGTGAGCTGGAGG; R: ATTGCAGACCAATGACAGCC	56.5	393
<i>MAP2K1</i> -6	F: CACGAATTTGGGTCTGGGTAGG; R: GTAGCAGAGGTAACAGCAACAG	57.0	419
<i>MAP2K1</i> -7	F: GGCACATGCCACGCTAGTAA; R: AAGTGCCTCAGTGGTACAGATG	57.5	453
<i>MAP2K1</i> -8	F: GCCTCTGGTGGAGAGTAACG; R: ACAGTTGTGTGATCCAGGC	58.0	365
<i>MAP2K1</i> -9	F: GCAGCACATGCTCTGTTTCATA; R: AGAGTTGCACACAGAACCAG	55.2	415
<i>MAP2K1</i> -10	F: AGACCCAGTTCTGTTTGAGTGG; R: TGTGTGAAAGCCTGAAGCCC	58.0	377
<i>MAP2K1</i> -11	F: AGGCACTCTGTAGGCAGTATT; R: ACGTACAGTGCAGTATTTGCTC	55.2	384

1.4 PCR 扩增及 SNP 位点鉴定

PCR 反应总体系为 25.0 μ L: Green Taq Mix 12.5 μ L,上下游引物各 1.0 μ L,DNA 样品 1.0 μ L,ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。利用 DNASTAR 中 seq man 应用查看,找出狮头鹅 *MAP2K1* 基因 SNP 位点;计算 SNP 位点等位基因频率、基因型频率、纯合度、杂合度、有效等位基因数。使用 PIC-CALC 和 PopGen32 分别计算多态信息量(PIC)和哈代-温伯格平衡(Hardy Weinberg's law)。

1.5 狮头鹅 MAP2K1 蛋白生物信息学分析

GenBank 上目前未有鹅 *MAP2K1* 蛋白序列,所使用序列为 DNA 测序结果预测的蛋白序列。利用 ExPASy 分析理化性质、疏水性、卷曲螺旋结构,利用

SignalP4.1 Server 对信号肽进行预测,利用 TMHMM 预测蛋白跨膜结构,利用 PSORT II 预测亚细胞定位,利用 SMART 预测蛋白结构域,利用 NetPhos2.0 预测磷酸化,利用 NetNGlyc1.0 Server 预测糖基化位点,利用 SOPMA 软件预测蛋白二级结构,利用 SWISS-MODEL 软件预测三级结构。

1.6 狮头鹅 MAP2K1 基因 mRNA 二级结构生物信息学分析

利用 RNAfold web server 和 RNAstructure 进行 mRNA 二级结构分析。

2 结果与分析

2.1 狮头鹅 MAP2K1 基因 PCR 扩增

由图 1 可知,对狮头鹅 *MAP2K1* 基因 Exon1~Exon11 进行扩增,PCR 扩增后分别获得 472、633、

649、252、365、377、384、393、415、419、453 bp 的产物,琼脂糖凝胶电泳结果显示条带干净清晰无污染。引物序列大小均与预期一致。

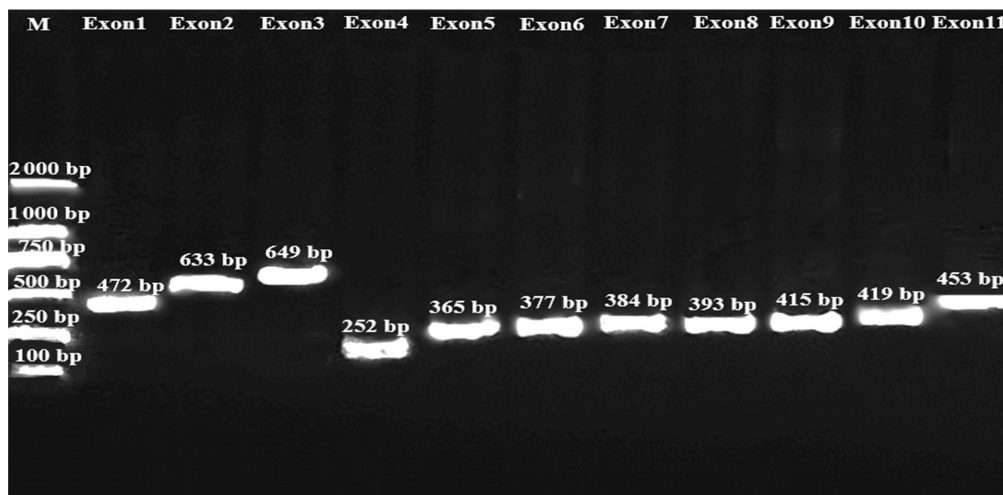


图1 *MAP2K1* 基因 PCR 产物结果

表2 *MAP2K1* 基因测序序列与绿头鸭序列对比

登录号	相似性	差异
XM_027465642.2	1 175/1 188 (99%)	0/1 188 (0%)

2.2 狮头鹅 *MAP2K1* 基因混池 SNP 位点鉴定结果

利用 DNASTAR 对狮头鹅 *MAP2K1* 基因测序结果与 GenBank 上已公布的绿头鸭 *MAP2K1* 基因序列进行对比分析。由图 2 可知, *MAP2K1* -3 引物上有明显套峰。

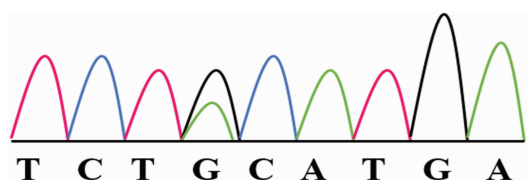


图2 狮头鹅 DNA 混池测序结果

2.3 狮头鹅 *MAP2K1* 基因个体验证

由图 3 可知,对引物 *MAP2K1* -3 进行 200 羽狮头鹅单个 DNA 样品 PCR 扩增后测序,发现 1 个 SNP 位点,有 3 种基因型。由图 4 可知,在 Exon3 的第 63 碱基处 A 突变成 G,命名为 E3-63 A > G。

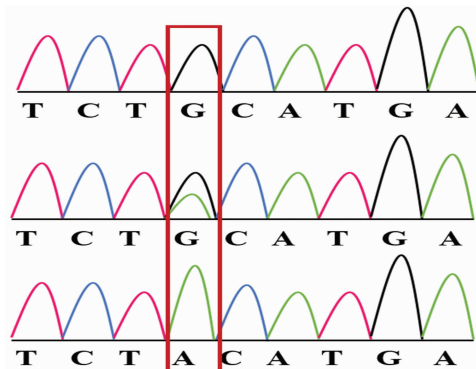


图3 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 SNP 突变位点

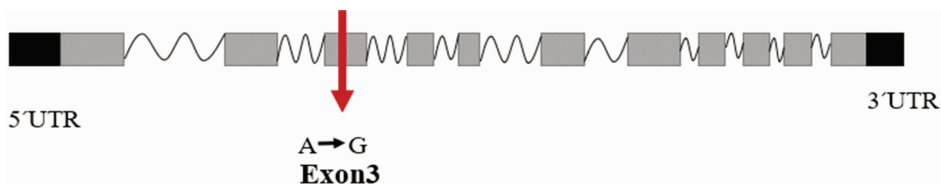


图4 狮头鹅 *MAP2K1* 基因突变位点

2.4 基因型频率、等位基因频率及哈代温伯格定律数据分析

对筛选出的 1 个 SNP 位点,进行等位基因频率、基因型频率、纯合子、杂合子、有效等位基因数、PIC 和 Hardy Weinberg's law 的计算。由表 3 可知, E3-63 A > G 等位基因 A 和 G 的频率分别为

19.93%、80.07%, G 为优势等位基因,中度多态 (PIC = 0.268 2),在群体遗传过程中符合 Hardy Weinberg's law ($P > 0.05$) 平衡状态。

2.5 *MAP2K1* 蛋白生物信息学分析

2.5.1 *MAP2K1* 蛋白的理化性质分析 利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对狮头鹅 *MAP2K1*

表 3 基因型频率、等位基因频率及哈代温伯格定律数据

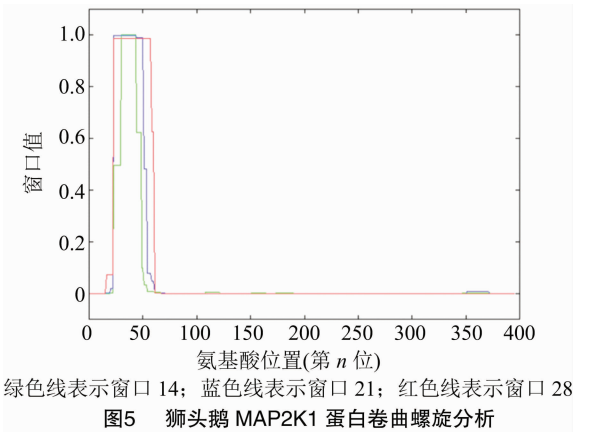
基因	位置	等位基因频率	基因型频率	纯合度	杂合度	有效等位基因数	多态信息量	哈代 - 温伯格平衡	
								χ^2	P 值
MAP2K1	E3 ~63	A(0.199 3)	AA(0.021 7)	0.649 9	0.355 1	1.538 7	0.268 2	1.653 0	0.198 5
		G(0.800 7)	GA(0.355 1)						
			GG(0.623 2)						

蛋白突变前后的氨基酸组成、等电点和不稳定系数等理化性质进行预测分析。结果显示,MAP2K1 蛋白突变前后编码氨基酸并未发生改变。MAP2K1 蛋白分子式为 C_{1 935} H_{3 090} N₅₂₈ O₅₇₈ S₁₈, 由 395 个氨基酸组成,其中,亮氨酸占比最高,为 9.1%,相对分子量为 43 576.09,理论等电点 *PI* 为 6.19,说明该蛋白为酸性,正电荷的残基总数为 46,负电荷的残基总数为 50,半衰期为 30 h,不稳定系数为 48.87,说明该蛋白不稳定,脂肪系数为 86.63,亲水性为 -0.323,说明该蛋白为亲水性蛋白。

2.5.2 MAP2K1 蛋白疏水性分析 利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对编码氨基酸疏水性进行预测。以 0 分为界,数值越大,疏水性越强,数值越小,亲水性越强。结果显示,在第 45 位和第 47 位氨基酸亲水性最强,为 -2.956;在第 170 位和第 173 位氨基酸疏水性最强,为 1.989,平均亲水性为 -0.323,说明该蛋白具有亲水性。

2.5.3 MAP2K1 蛋白 Coil 区分析 利用在线网站 (https://embnet.vital-it.ch/software/COILS_form.html),预测 Coil 区。当不同窗口值大于 0.5 时,则该位点存在 Coil 区。由图 5 可知,在 14 号窗口 30~48 位氨基酸有卷曲结构,第 30~43 位氨基酸的值为 1.000,第 44~48 位氨基酸的值为 0.622。在 21 号窗口第 23~50 位氨基酸有卷曲结构,第 23~43 位氨基酸的值为 0.999,第 43~50 位氨基酸的值为 0.989。28 号窗口第 23~60 位氨基酸有卷曲结构,第 23~57 位氨基酸的值为 0.987,第 58~60 位氨基酸的值为 0.626,说明该蛋白具有卷曲螺旋结构。

2.5.4 MAP2K1 蛋白信号肽分析 信号肽是决定新生肽链在细胞中的定位或决定某些氨基酸残基修饰的一些肽段。利用蛋白质序列信号肽分析工具 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 对 MAP2K1 突变前后蛋白进行分析。当 3 种 C、Y、S-score 计算结果 >0.5 时,则该位点存在信号肽。结果显示,在第 6 位氨基酸处 S 最大值为 0.108,在第 26 位氨基酸处 C、Y 最大值分



别为 0.119、0.10,均未超过 0.5,说明该蛋白无信号肽存在。

2.5.5 MAP2K1 蛋白跨膜结构分析 把得到的氨基酸序列输入 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线跨膜运输软件进行预测。结果显示,MAP2K1 蛋白无跨膜区域,说明 MAP2K1 不是跨膜蛋白。

2.5.6 MAP2K1 蛋白亚细胞定位分析 亚细胞定位是指某种蛋白或表达产物在细胞内的具体存在部位。通过工具 PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 预测 MAP2K1 突变前后编码蛋白的亚细胞定位。结果显示,该蛋白位于细胞核的概率为 60.9%、位于细胞质的概率为 30.4%、位于细胞支架的概率为 8.7%,主要在细胞核发挥生物学作用。

2.5.7 MAP2K1 蛋白磷酸化位点分析 利用 NetPhos 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测,当磷酸化电势大于阈值 0.5 时,则该位点有可能被磷酸化。结果显示,MAP2K1 蛋白有 34 个磷酸化位点,其中,丝氨酸磷酸化位点有 23 个,位于第 18、72、86、90、135、140、150、200、218、222、228、231、241、244、252、268、283、289、300、301、306、366、387 位氨基酸处;苏氨酸磷酸化位点有 8 个,位于第 28、55、178、226、238、294、380、388 位氨基酸处;酪氨酸磷酸化位点 3 个,位于第 125、229、318 位氨基酸处,说明 MAP2K1 蛋白主要是丝氨酸 (67.65%) 磷酸化。

2.5.8 MAP2K1 蛋白糖基化分析 利用 NetNGlyc1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)对 MAP2K1 突变前后蛋白糖基化位点预测,发现结果相同。当 *N*-糖基化电势大于阈值 0.5 时,则该位点有可能被 *N*-糖基化。结果显示,第 21 位对应天冬氨酰氨残基的酰胺氮原子存在 1 个 *N*-糖基化位点,其概率为 0.780 8。

2.5.9 MAP2K1 蛋白结构域分析 用 NCBI 和 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对突变前后蛋白结构域分析。由图 6 可知,MAP2K1 有 1 个特殊结构 S_TKc,位于 68~363 位氨基酸处,*E* 值为 2.04×10^{-79} ;一个卷曲螺旋结构位于 19~59 位氨基酸处。



图6 狮头鹅 MAP2K1 蛋白结构域分析

2.5.10 MAP2K1 蛋白二级结构预测 利用 Hopfield(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopm.html)预测突变前后编码蛋白二级结构,发现结果相同。由图 7 可知,MAP2K1 蛋白由 α 螺旋(44.56%)、无规则卷曲(40.76%)、延伸链(11.65%)、和 β -转角(3.04%)组成。说明该蛋白主要由 α 螺旋和无规则卷曲组成, β -转角和延伸链散布于整个蛋白中。

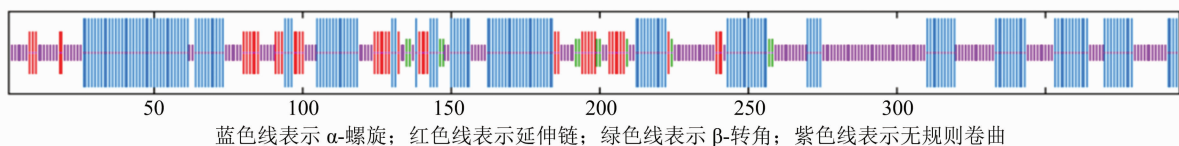


图7 狮头鹅 MAP2K1 蛋白二级结构分析

2.5.11 MAP2K1 蛋白三级结构预测 通过 SWISS-MODEL (<https://www.swiss-model.expasy.org/interactive>)预测突变前后编码蛋白三级结构,发现结果相同。由图 8 可知,MAP2K1 蛋白质三级结构与 SMTL ID:6u2g.1. 模板序列相似性 95.92%,说明预测的蛋白三级结构与二级结构预测结果基本一致。

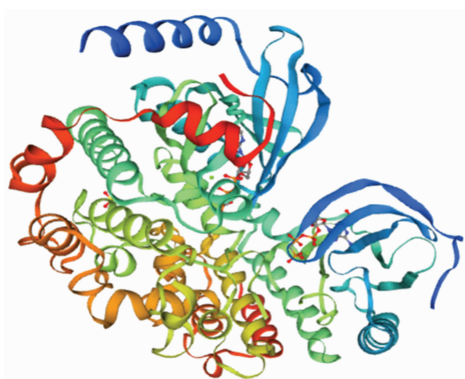


图8 狮头鹅 MAP2K1 蛋白三级结构分析

2.6 MAP2K1 基因 mRNA 二级结构分析

利用软件 RNAfold web server (<http://nibiru.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)和 RNAstructure (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>)分析突变前后 MAP2K1 基因 mRNA 二级结构。

由图 9 可知,MAP2K1 基因突变前后 mRNA 二级结构序列不同,序列由 A 变成 G,下面进一步分析突变前后 mRNA 二级结构的平面图、点-括号图及山地图是否存在差异。

2.6.1 mRNA 最小自由能(MFE)与质心二级结构平面图分析 利用 RNAfold 对 mRNA 二级结构进行分析,由图 10 可知,突变前后 MFE 结构存在明显差异,总自由能由 $-1\,419.11$ kJ/mol 上升到 $-1\,415.77$ kJ/mol;突变前后质心二级结构发生改变,自由能由 -712.19 kJ/mol 上升到 -707.60 kJ/mol;且突变后的内环结构多于突变前,说明环区的形成是破坏结构的稳定性,突变后自由能均呈上升趋势,结构的稳定性变弱。

2.6.2 含有假结的 mRNA 二级结构平面图分析 利用 RNAstructure 分析含有假结的 mRNA 二级结构。平面图将 mRNA 的碱基均匀地分布在圆形四周,弯成一个圆圈,在圈内用弧线或直线把配对碱基连接起来。假结结构是发卡结构环区的碱基与茎环结构外侧单链区的一些碱基形成氢键,结果形成类似于两茎连接结构,但两茎外侧形成 2 个环区^[30]。由图 11 可知,突变前后的结果不同,说明突变前后拥有的生物活性可能不同。

2.6.3 折叠结构平面图分析 利用 RNAstructure 分析折叠结构,预测序列的最低自由能结构和 1 组

AUGCCGAAAAAAGCCGGGGCCGAUCCAGCUGAACCCCGCGCCCGAUGGCUCGCCGCUAACGGGAC
CAGCGCCGCCGAGACAAAUUUGGAAGCACUUCAGAAGAAGCUGGAAGAACUAGAGUUGGAUGAAC
GCAACGAAAGCGCCUCGAAGCUUUCUUAACCCAGAAACAAAAGUUGGAGAGCUGAAGGAUGAUGAC
UUUGAGAAGAUCAUGAGCUGGGAGCAGGAAUUGCGGUGUGGUUUAUCAAAGUAUCACAAAGCC
UUCUGGUCUUAUAAUGGCAAGAAAGCUAAUUCUAGAGAUCAAGCCAGCUAUUCGAAACCAGAU
CAUUCGUGAGCUGCAAGUUCU[▲]CAUGAGUGCAACUCGCCAUACAUUGUGGGCUUUUACGGAGCUUU
UUACAGUGAUGGAGAAUUCAGAUUUUGCAUGGAACACAUGGAUGGCGGCCUCCUUGGAUCAAGUACU
GAAAAAGGCUGGAAGAAUUCAGAGCAGAUACUGGGCAAAGUUAAGCAUUGCGGUAAUCAAAGGACU
CACGUAUCUGAGANGAAAGCAUAAAAUAAUGCACAGAGAUGUUAACCAUCUAACAUUUUGGUAAA
CUCUAUAGGUGAAAUCAAGCUUUGUGAUUUUGGUGUCAGUGGACAACUGAUAGAUUCUAUGGCAA
ACUCGUUUUGUUGGCACGCGCUCCUACAUGUCUCCGGAAGACUACAGGGAACUAAUUAUUCUGUGC
AAUCAGAUUAUUGGAGUAUGGGGUUGUCACUGGUAGAAAUGGCCAUUGGCAGAUACCCGAUUCUC
CUCCUGACUCUAAGGAGCUCGAGUUAUGUUUGGCUGCCAGUGGAGGGAGAUUCUCCAGUUGCU
GAGACCUCACCCAGGCAAAGAACCUGGUCGACCAGUGAGCUCCUUGGACCAGACAGCCGCCGCC
AAUGGCAAUCUUUGAACUCCUUGAUUACAUCGUAUAGAGCCACCUCAAAAUUGCCCAAUGGUGU
UUUUGGUUCUGAAUUAAGAUUUUGUUAACAAAGUUAUUAUAAAAUCCUGCUGAGAGAGCUG
AUUUGAAGCAGCUGAUGAUUACUGCUUUAUUAAGAGAUUGAAGCAGAGGAGGUGGAUUUUGCA
GGAUGGCUUUGUUAACCAUAGGCCUUAACCAACCAAGUACACCCACGCAUGCUGCUGGAGUCUGA[△]

a. *MAP2K1* 突变前

AUGCCGAAAAAAGCCGGGGCCGAUCCAGCUGAACCCCGCGCCCGAUGGCUCGCCGCUAACGGGAC
CAGCGCCGCCGAGACAAAUUUGGAAGCACUUCAGAAGAAGCUGGAAGAACUAGAGUUGGAUGAAC
GCAACGAAAGCGCCUCGAAGCUUUCUUAACCCAGAAACAAAAGUUGGAGAGCUGAAGGAUGAUGAC
UUUGAGAAGAUCAUGAGCUGGGAGCAGGAAUUGCGGUGUGGUUUAUCAAAGUAUCACAAAGCC
UUCUGGUCUUAUAAUGGCAAGAAAGCUAAUUCUAGAGAUCAAGCCAGCUAUUCGAAACCAGAU
CAUUCGUGAGCUGCAAGUUCU[▲]CAUGAGUGCAACUCGCCAUACAUUGUGGGCUUUUACGGAGCUUU
UUACAGUGAUGGAGAAUUCAGAUUUUGCAUGGAACACAUGGAUGGCGGCCUCCUUGGAUCAAGUACU
GAAAAAGGCUGGAAGAAUUCAGAGCAGAUACUGGGCAAAGUUAAGCAUUGCGGUAAUCAAAGGACU
CACGUAUCUGAGANGAAAGCAUAAAAUAAUGCACAGAGAUGUUAACCAUCUAACAUUUUGGUAAA
CUCUAUAGGUGAAAUCAAGCUUUGUGAUUUUGGUGUCAGUGGACAACUGAUAGAUUCUAUGGCAA
ACUCGUUUUGUUGGCACGCGCUCCUACAUGUCUCCGGAAGACUACAGGGAACUAAUUAUUCUGUGC
AAUCAGAUUAUUGGAGUAUGGGGUUGUCACUGGUAGAAAUGGCCAUUGGCAGAUACCCGAUUCUC
CUCCUGACUCUAAGGAGCUCGAGUUAUGUUUGGCUGCCAGUGGAGGGAGAUUCUCCAGUUGCU
GAGACCUCACCCAGGCAAAGAACCUGGUCGACCAGUGAGCUCCUUGGACCAGACAGCCGCCGCC
AAUGGCAAUCUUUGAACUCCUUGAUUACAUCGUAUAGAGCCACCUCAAAAUUGCCCAAUGGUGU
UUUUGGUUCUGAAUUAAGAUUUUGUUAACAAAGUUAUUAUAAAAUCCUGCUGAGAGAGCUG
AUUUGAAGCAGCUGAUGAUUACUGCUUUAUUAAGAGAUUGAAGCAGAGGAGGUGGAUUUUGCA
GGAUGGCUUUGUUAACCAUAGGCCUUAACCAACCAAGUACACCCACGCAUGCUGCUGGAGUCUGA[△]

b. *MAP2K1* 突变后

图9 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 mRNA 二级序列分析

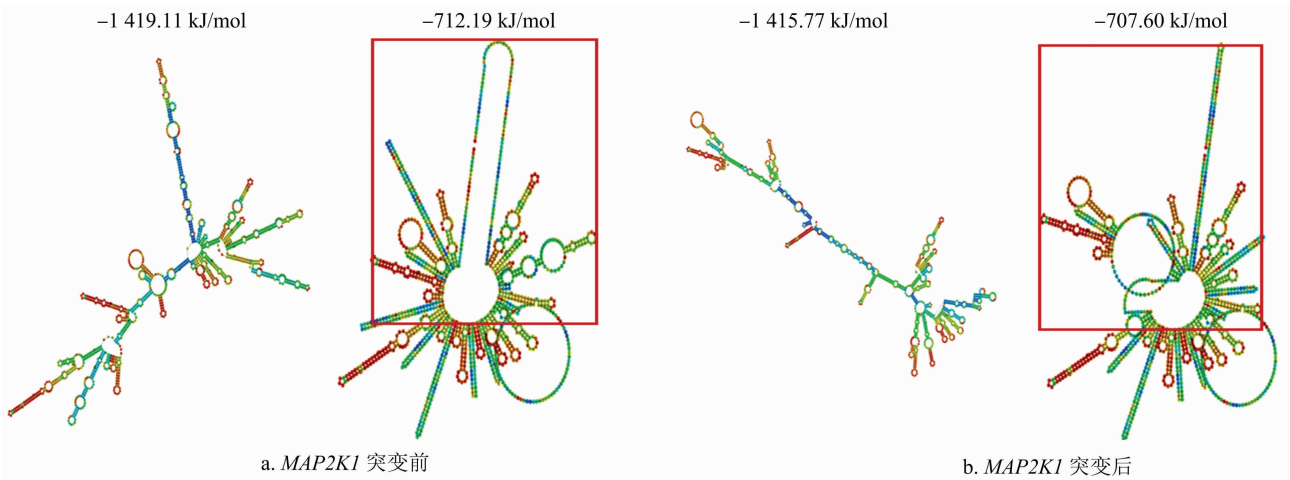
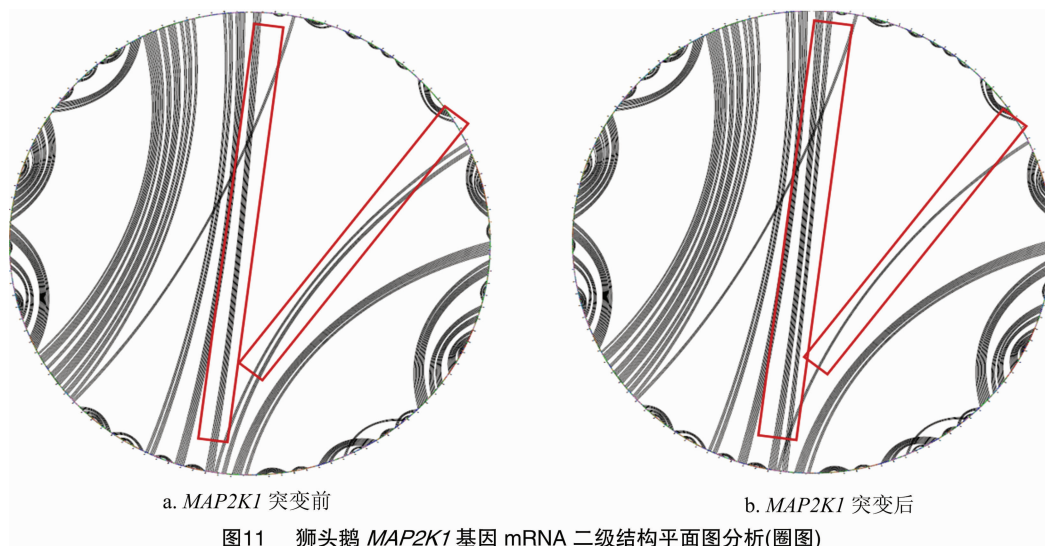
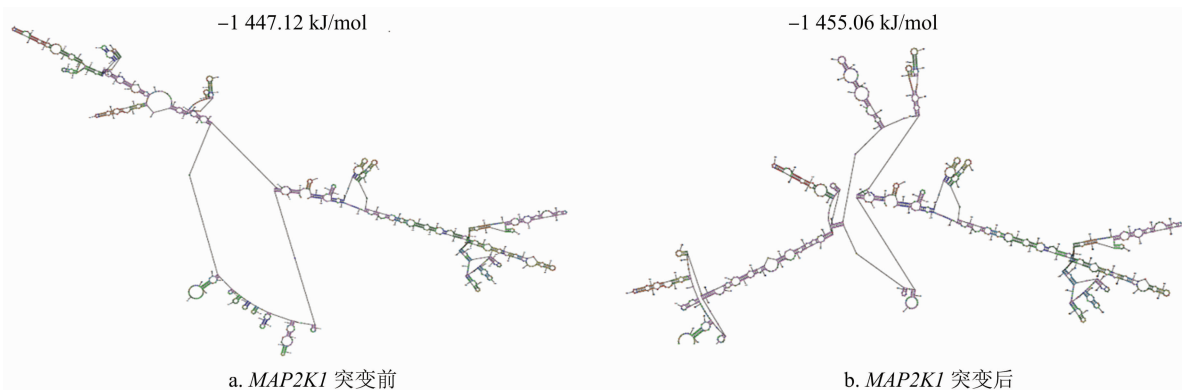


图10 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 mRNA 的 MFE 与质心二级结构平面图分析



低自由能结构。由图 12 可知,突变前后折叠结构不同,且自由能从 $-1\ 447.12\ \text{kJ/mol}$ 降低到 $-1\ 455.06\ \text{kJ/mol}$,说明突变前后所折叠成特有的

空间结构不同,可能会对生物活性和特定的生物学功能产生影响。



2.6.4 MaxExpect 结果平面图分析 利用 RNAstructure 分析特定结构的基团,这是一种结构预测的替代方法,在结构预测中可能具有更高的保真度。由图 13 可知,自由能从 $360.7\ \text{kJ/mol}$ 降低至 $352.4\ \text{kJ/mol}$,突变前后形成的特定结构不同,说明突变前后形成特定结构的基团不同会影响生物活性,可能使生物功能发生改变,且突变后的结构稳定性更稳定。

2.6.5 mRNA 二级结构点 - 括号分析 ((((((.....((.....))))))中,. (点)表示未配对碱基,() (括号)则代表表示匹配的碱基。利用 RNAfold 对 mRNA 二级结构分析,由图 14、图 15 可知,突变前后的 MFE 和质心二级结构点 - 括号结果不同,说明变前后碱基配对情况不同,对突变前后的自由能产生影响。

2.6.6 mRNA 二级结构山地图分析 利用 RNAfold 对突变前后 mRNA 最小自由能结构、热力学集合、质心结构的山地图分析,由图 16 可知,突变前后山地图明显不一样,说明突变前后碱基配对不同,对自由能产生影响。

3 讨论与结论

3.1 *MAP2K1* 相关基因的多态性分析

目前,还未发现在动物上与 *MAP2K1* 基因多态性的相关研究,而 *MAP2K1* 相关基因多态性的研究主要与猪的经济效益相关。张佳丽等研究发现,在法系大白猪 *MAP2K6* 基因有 4 个 SNPs 位点,分别为内含子 8、11 (Intron8、11, In8、11) 和 Exon12,均有 3 种基因型,rs325278117 和 rs325752048 位点 A 为优势等位基因,rs332107877 和 rs345304630 位点 G 为

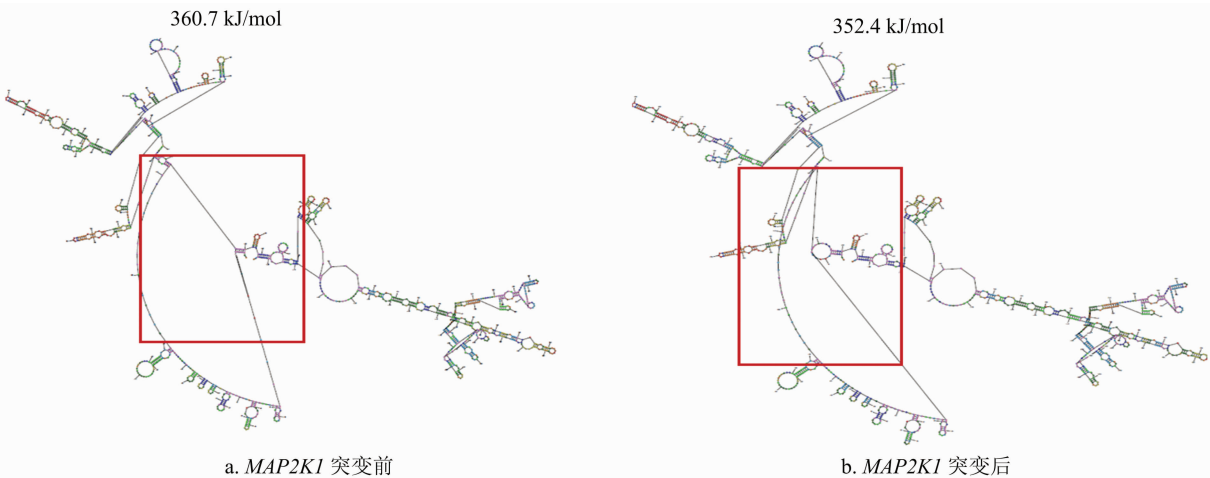


图13 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 mRNA 特定结构的基团平面图分析

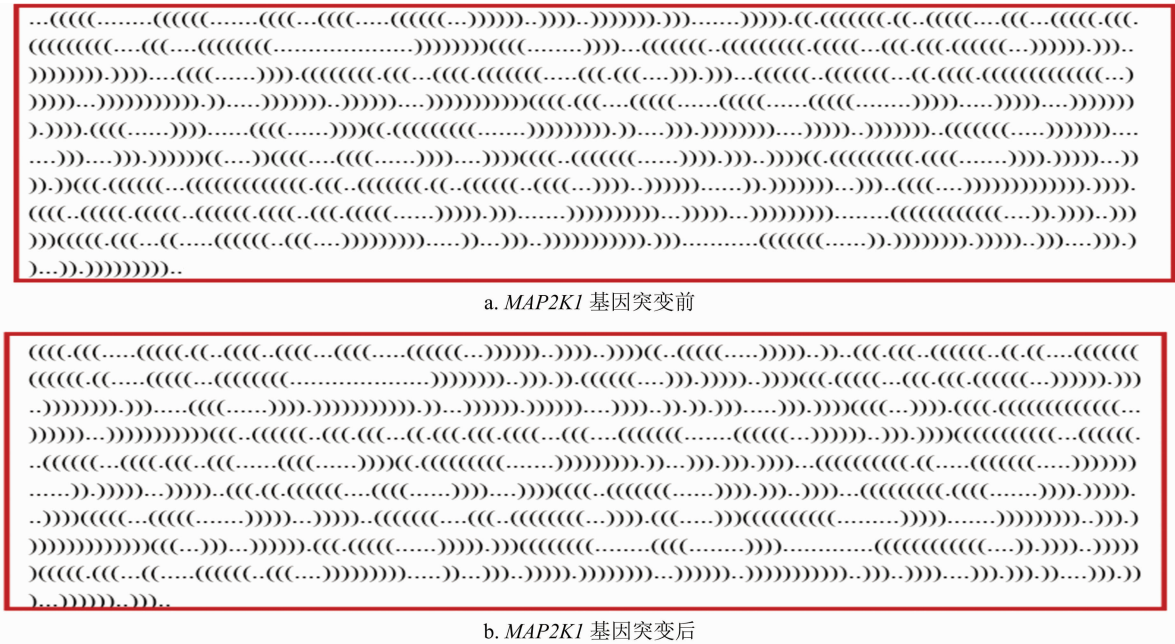


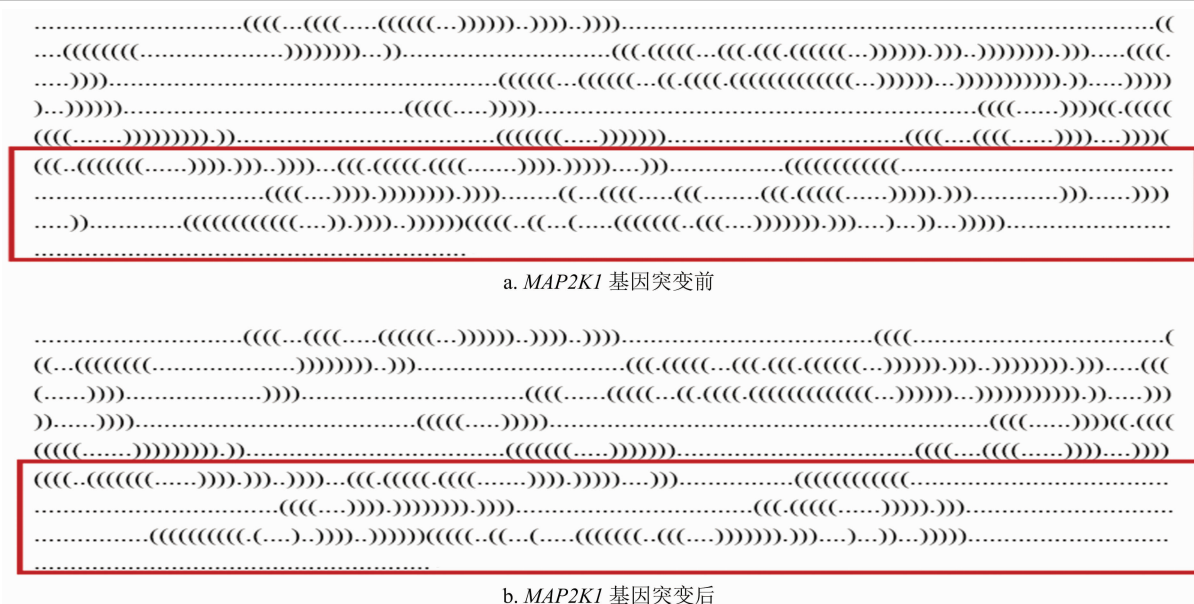
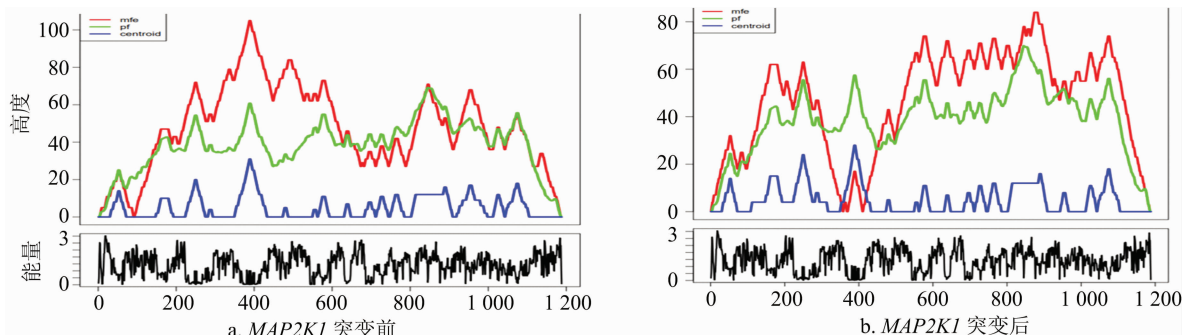
图14 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 mRNA 二级结构点-括号分析(MFE)

优势等位基因,且 4 个 SNPs 位点均与经济性状相关,影响法系大白猪的经济效益^[31]。蒲蕾等研究发现,在杜洛克猪 *MAP3K5* 基因有 4 个 SNPs 位点,30769583 A > C 位点 C 为优势等位基因;30781169 A > G 位点 G 为优势等位基因;30940839 A > G 位点 G 为优势等位基因;30962276 G > A 位点 A 为优势等位基因^[32]。30769583 A > C、30781169 A > G 和 30962276 G > A 在杜洛克猪群体中均处于 Hardy Weinberg's law 平衡状态 ($P > 0.05$);30940839 A > G 在杜洛克猪群体中偏离 Hardy Weinberg's law 平衡状态 ($P < 0.01$)。30769583 A > C、30781169 A > G 和 30940839 A > G 低度多态,30962276 G > A 为中度多态,且分别与剩余采食量、平均日采食量、饲

料转化率、平均日增质量相关,影响经济效益。本研究在狮头鹅 *MAP2K1* 基因中发现 1 个 SNP 位点,位于 Exon3,碱基 A 突变为 G,并未改变氨基酸编码,G 为优势等位基因,中度多态,处于 Hardy Weinberg's law 平衡状态 ($P > 0.05$)。*MAP2K6* 和 *MAP3K5* 基因多态性均影响猪的经济效益,虽本研究并未与产蛋量进行相关分析,但 E3-63 A > G 处于中度多态,具有较大的选择潜力,是否影响狮头鹅的产蛋量还需要进行下一步验证。

3.2 *MAP2K1* 蛋白生物信息学分析

蔡佳等研究发现,在红笛鲷 *MAPKK5* 基因 cDNA 序列全长 2 632 bp,分子量为 49.42 ku,理论等电点为 6.12,编码 438 个氨基酸,2 个保守结构域

图15 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 mRNA 二级结构点-括号分析(质心)

红色线表示最小自由能结构；绿色线表示 mRNA 结构的热力学集合；蓝色线表示质心结构

图16 狮头鹅 *MAP2K1* 基因 mRNA 山地图分析

PB1 和 S_TKc 区,22 个磷酸化位点,主要在细胞质发挥生物学功能, α 螺旋占 36%, β 折叠占 11%,无规则卷曲占 39%;而本研究 *MAP2K1* 基因 cDNA 序列全长 1 188 bp,相对分子量为 43 576.09,理论等电点 PI 为 6.19,编码 395 个氨基酸,1 个保守结构域 S_TKc 区,主要在细胞核发挥生物学作用,有 34 个磷酸化位点,蛋白二级结构由 α 螺旋(44.56%)、无规则卷曲(40.76%)、延伸链(11.65%)、和 β -转角(3.04%)组成^[33]。说明 MAPKK5 与 MAP2K1 蛋白均属于不稳定不跨膜酸性亲水性蛋白,无信号肽存在,蛋白二级结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲组成;但编码氨基酸数量、保守结构、发挥生物学作用的场所均不同。蒲蕾等研究发现,在大白猪 MAP3K5 蛋白同样具有保守结构域 S_TKc^[34]。由此看出,MAPKK5、MAP2K1 与 MAP3K5 蛋白均存在 S_TKc 结构域,S_TKc 结构域具有丝氨酸/苏氨酸激酶催化功能,被上游激酶激活后,能将胞外信号传

递至胞内,进而使机体对外界刺激做出应答^[15,35]。

3.3 *MAP2K1* 基因 mRNA 二级结构生物信息学分析

mRNA 二级结构主要通过调节核糖体在序列上的移动速率来调控各种生物过程,mRNA 二级结构能帮助 mRNA 正确定位。突变前后改变 mRNA 二级序列,序列由 A 突变成 G,突变前后 MFE 结构与质心二级结构发生改变,且自由能上升,结构稳定性变弱。突变后的内环结构多于突变前,说明各种环区的形成破坏结构的稳定性;突变前后的折叠不同,且 mRNA 二级结构中环结构含量与蛋白质折叠速率呈显著的正相关性,从而得知突变前后的 mRNA 二级结构的折叠速率不一样,折叠成不同的空间结构,不同的空间结构具有不同的生物活性,行使不同的生物学功能^[36-37],突变前后的 mRNA 二级可能发挥不同的生物学功能。假结结构在 mRNA 中有非常重要的地位,有研究表明在植物病毒中发

现了假结的存在,发现一旦假结结构消失,RNA 的生物活性也随之消失;核糖体在假结被降解,核糖体就会丧失其生物活性^[30],不会参与到蛋白质的合成过程中,突变前后含假结结构不同,可能拥有不同的生物活性。综上,从 mRNA 二级结构的多方面分析,可知突变前后的 mRNA 可能会拥有不同生物活性及其生物功能。

本研究首次筛选了狮头鹅 *MAP2K1* 基因的 SNP 位点,*MAP2K1* 基因 E3-63 A>G 位点属于中度多态,具有较大的选择潜力。*MAP2K1* 蛋白属于不稳定不跨膜酸性亲水性蛋白,主要在细胞核发挥生物学作用,有 34 个磷酸化位点,有 1 个 N-糖基化位点,1 个保守结构域 S_TKc 区,蛋白二级主要由 α 螺旋和无规则卷曲组成。*MAP2K1* 基因突变前后 mRNA 的最小自由能,质心发生二级结构,含有假结的 mRNA 二级结构,折叠结构,MaxExpect 结果,点-括号结果,最小自由能、mRNA 结构的热力学集合、质心结构所形成的山地图发生改变,且自由能上升,结构稳定性变弱。该研究可为后续提高狮头鹅产蛋量候选基因的鉴定提供理论依据。

参考文献:

- [1] 孙永立. 大鹅:国人餐桌一个不应被忽略的选择[J]. 中国食品工业,2019(12):12-15.
- [2] 阳希文,孙爱东,陈哲,等. 狮头鹅反季节繁殖生产技术[J]. 中国家禽,2015,37(10):61-62.
- [3] 林树欣,潘育璇,黄靓,等. 狮头鹅种鹅的饲养管理[J]. 广东畜牧兽医科技,2019,44(5):26-27,35.
- [4] 潘建秋,江丹莉,黄植霞,等. 反季节生产中马岗鹅与狮头鹅繁殖性能的观察[J]. 仲恺农业工程学院学报,2018,31(2):33-36.
- [5] 孙永泰. 狮头鹅的饲养技术[J]. 水禽世界,2016(2):59.
- [6] 岑永秀. 12 个 MicroRNAs 及其靶基因在香猪睾丸组织中的表达[D]. 贵阳:贵州大学,2017.
- [7] 丁苗,涂萍. miRNA 靶向 RAS-MAPK 通路的表现遗传性激活与肿瘤[J]. 临床与病理杂志,2016,36(11):1868-1872.
- [8] 高玉花. 东北虎胎盘 microRNA 表达谱、转录组及 microRNA-424 调节 MAPK 通路分子机制研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2016.
- [9] 黄璐. miRNA424 及其靶基因 *MEK1* 和 *FGFR1* 在胎儿生长受限中的作用机制研究[D]. 苏州:苏州大学,2013.
- [10] 李娜. 基于 GWAS 的猪肉品质性状候选基因研究[D]. 北京:中国农业大学,2016.
- [11] Hong F, Wu N, Ge Y, et al. Nanosized titanium dioxide resulted in the activation of TGF- β /Smads/p38MAPK pathway in renal inflammation and fibration of mice[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016, 104(6):1452-1461.
- [12] Raman M, Chen W, Cobb M H. Differential regulation and properties of MAPKs[J]. Oncogene, 2007, 26(22):3100-3112.
- [13] 李峥. 猪卵泡液外泌体对颗粒细胞增殖及孕酮合成的影响[D]. 长春:吉林大学,2020.
- [14] Fan H Y, Liu Z L, Shimada M, et al. ERK1/2 in ovarian granulosa cells are essential for female fertility[J]. Biology of Reproduction, 2009, 81(Suppl 1):153.
- [15] Moore R K, Otsuka F, Shimasaki S. Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 289(4):796-800.
- [16] 胡珊. *BMP15* 基因对绒山羊 mGSCs 增殖分化的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2017.
- [17] 王海禄. 雪兔毛色季节性变化皮肤转录组的分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2019.
- [18] 冯茵怡,严炯艺,夏星,等. 荔枝核总黄酮对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制和潜在 Q-marker 的预测[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23):5722-5731.
- [19] Cui X D, Zhang A J, Liu J W, et al. Down-regulation of *MAP2K1* by miR-539 inhibits hepatocarcinoma progression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 504(4):784-791.
- [20] Jin Z, Jia B X, Tan L D, et al. miR-330-3p suppresses liver cancer cell migration by targeting *MAP2K1*[J]. Oncology Letters, 2019, 18(1):314-320.
- [21] Zhou C, Wang P, Tu M T, et al. Long non-coding RNA *PART1* promotes proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via miR-149-5p/MAP2K1 axis[J]. Cancer Management and Research, 2020, 12:3771-3782.
- [22] 梁容瑞,周蕊,李宗芳,等. *MEK1* 表达载体的构建及其对肝癌细胞 ERK 通路活性的影响[J]. 西部医学, 2013, 25(10):1447-1450.
- [23] Chuang J, Wang C K, Guo Y M, et al. *MAP2K1* mutations in advanced colorectal cancer predict poor response to anti-EGFR therapy and to vertical targeting of MAPK pathway[J]. Clinical Colorectal Cancer, 2021, 20(1):72-78.
- [24] Ishii K, Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, et al. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through *MAP2K1* activation[J]. Development, 2012, 139(10):1734-1743.
- [25] Nadeau V, Charron J. Essential role of the ERK/MAPK pathway in blood-placental barrier formation[J]. Development, 2014, 141(14):2825-2837.
- [26] Bissonauth V, Roy S, Gravel M, et al. Requirement for *Map2kl* (*Mek1*) in extra-embryonic ectoderm during placentogenesis[J]. Development, 2006, 133(17):3429-3440.
- [27] 耿红红. 不同精液品质公牛全血 mRNA 差异表达分析[D]. 南京:南京农业大学,2016.
- [28] 王慧芳,周光现,孙永峰,等. 基于全基因组重测序技术的狮头鹅 Indel 标记分析[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(3):662-675.
- [29] 雷栩斌,贾汝敏,张锐毅,等. 狮头鹅个体产蛋智能记录系统的研制[J]. 中国草食动物科学, 2021, 41(1):13-17, 23.