

## 鹅神经肽 Y 基因的克隆及生物信息学分析

张 军, 张宜辉, 张 蕊, 宋 政, 朱振鹏, 龚道清\*

(扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

**摘 要:** 克隆出鹅 *NPY* 基因并对序列进行分析。根据鸡 *NPY* 基因核苷酸序列设计引物, 利用 RT-PCR 方法获得了鹅 *NPY* 基因的编码序列, 并用相关软件及在线分析方法对其核苷酸及氨基酸序列进行分析。结果表明, 鹅 *NPY* 基因长度为 371 bp, 包含 294 bp 整个开放阅读框, 共编码 97 个氨基酸, 其分子量预测值为 11.083 kD, 等电点为 (pI) 为 5.76。鹅 *NPY* 基因核苷酸序列与禽类和哺乳动物的序列同源性分别为 96%~97%、86%~88%。氨基酸进化树分析发现 *NPY* 基因具有种间多样性, 鹅 *NPY* 与其他禽类处于同一分支。成功克隆鹅 *NPY* 基因 CDS 序列并对其进行了生物信息学分析, 为深入研究其功能奠定基础。

**关键词:** 鹅; 神经肽 Y; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S835.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0006-04

### Cloning and bioinformatics analysis of *NPY* gene of goose

ZHANG Jun, ZHANG Yihui, ZHANG Rui, SONG Zheng, ZHU Zhenpeng, GONG Daoqing

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract:** This study was to clone and analyze *NPY* gene of goose. Primers were designed according to the chicken *NPY* gene nucleic sequence. Goose *NPY* gene was cloned by RT-PCR. The nucleic sequence of goose *NPY* gene and the amino acid sequence deduced from the gene were analyzed by related softwares and on-line tools. The results showed that the amplified goose *NPY* was 371 bp in length, containing one open-reading frame of 294 bp and encoding 97 amino acid residues. The alignment of goose *NPY* gene cDNA sequence with other species showed the sequence similarities were respectively 96%-97% and 86%-88%. Phylogenetic tree showed *NPY* gene had varieties among species, and goose *NPY* was the same with other avian in the cladogram topological structure. Goose *NPY* was cloned and analyzed in this study, and it would lay a foundation for the further study on the function of *NPY* gene.

**Key words:** goose; *NPY* gene; gene clone; sequence analysis

神经肽 Y (Neuropeptide Y) 是一种含有 36 个氨基酸的单链多肽, 对动物摄食起到重要的调节作用<sup>[1]</sup>。它与动物的生长发育及生活行为等密切相关, 是生物体内重要的神经递质, 通过与其受体结合, 可以影响动物采食、激素分泌、心血管效应、调节体温、生物节律、性行为及动物情绪等多种功能<sup>[2]</sup>。目前在多种物种上 *NPY* 基因都得到了克隆, 包括人、大鼠、小鼠、牛、羊、鸡、火鸡、鸽子以及多种水生动物。研究发现 *NPY* 在进化上具有很强的保守性, 不同种属 *NPY* cDNA 在核苷酸序列及其编码

的氨基酸序列均存高度同源性。本试验以朗德鹅为素材, 以鸡 *NPY* 基因设计引物, 成功克隆出鹅 *NPY* 基因 CDS 序列, 与其他物种进行比较同源性比较并构建氨基酸系统进化树, 为进一步研究鹅 *NPY* 基因功能奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集** 本研究所用朗德鹅由国家级水禽种质资源基因库 (泰州) 提供, 110 日龄朗德鹅母

收稿日期: 2013-06-26

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程项目和江苏省农业科技自主创新基金[CX(12)2033]共同资助。

作者简介: 张 军, 副教授。E-mail: zhangjun@yzu.edu.cn

\* 通信作者: 龚道清, 教授, 博士生导师。E-mail: yzong@163.com

鹅 3 只, 颈部放血后迅速采集下丘脑组织样放于液氮中冷冻保存, 而后转存入  $-70^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱。

**1.1.2 主要试剂** Trizol 购自 Invitrogen 公司; pMD19-T 载体、DNA maker DL2000、反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; *Taq* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司;

DH 5 $\alpha$  感受态细胞、DNA 片段快速回收试剂盒及普通质粒提取试剂盒等均购自北京天根生化科技有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 引物设计** 根据 GenBank 中鸡 (NM\_205473)、鸽子 (EU427469) 等 5 种动物 *NPY* 基因的同源比对结果, 利用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计特异性引物。

上游引物为: 5'-CATGCAGGGCACCATGAG-3'

下游引物为: 5'-CGCTATGATTTGCTTCAGAGG-3' 引物由上海生工生物工程公司合成。

**1.2.2 RNA 提取及反转录** 采用 Trizol 法提取鹅下丘脑总 RNA, 利用核酸浓度测定仪检测 RNA 浓度和纯度, 并用琼脂糖快速电泳检测其完整度,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。cDNA 合成按照 Takara 逆转录试剂盒操作说明书进行。以适量 RNA 为模板, 以 Oligo (DT) 为引物在逆转录酶的作用下合成 cDNA 第一链,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.3 PCR 扩增鹅 *NPY* 基因** 以 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$ PCR Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  2.2  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture 0.8  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 11.8  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $61.4^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 33 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min;  $4^{\circ}\text{C}$  保存。

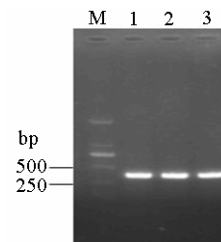
**1.2.4 PCR 产物的克隆和序列分析** PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取目的条带, 纯化回收 PCR 产物。回收的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接。重组子转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 涂布在含有含氨苄青霉素的 LB 培养基上,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 12 h。随机挑取菌落, 用菌液 PCR 法筛选阳性克隆, 并将 2 个阳性克隆送上海生工生物工程公司测序。

**1.2.5 生物信息学分析** 鹅 *NPY* 基因序列用 NCBI 上的 BLAST 进行序列比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 蛋白质结构域分析采用 SMT 程序 (<http://smart.embl.de/>), 氨基酸三级结构 SWISS-MODEL: (<http://swissmodel.expasy.org/>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 鹅 *NPY* 基因编码区片段的克隆与序列分析

RT-PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测得到与预期片段大小相符的特异性片段, 约 400 bp (图 1)。鹅 *NPY* 基因序列用 DNA Star 软件 EditSeq 程序分析表明, 采用 RT-PCR 扩增出的特异性条带长度为 371 bp, 包含 294 bp 的 CDS 区全序列, 为一个完整的开放阅读框 (ORF), 编码 97 个氨基酸。



M: DNA Maker; 1~3: *NPY* 基因 PCR 产物

M: DNA Maker; 1-3: RT-PCR products of goose *NPY* gene

图 1 朗德鹅 *NPY* 基因 RT-PCR 扩增电泳

Figure 1 RT-PCR products of goose *NPY* gene

### 2.2 鹅 *NPY* 编码蛋白质特性分析

**2.2.1 氨基酸组成分析** 由鹅 *NPY* 基因序列推导出该基因编码 97 个氨基酸, 分子量为 11.083 kD, 等电点为 (pI) 为 5.76。对氨基酸组成分析结果显示, 亮氨酸 (Leu) 的含量最高, 达到 13.4%; 其次为丝氨酸 (Ser), 占 11.3%; 带负电荷残基总数 (Asp+Glu) 为 12, 带正电荷残基总数 (Arg+Lys) 为 11。

**2.2.2 结构域分析** 采用网上在线工具 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 *NPY* 蛋白的结构域, 结果表明在 N 端具有一个信号肽序列: MQGTMRLWVSVLTFALSLLVCLGTLAE (图 2); 在中间段有一个 *NPY* 所具有的 PAH 结构功能域: YPSKPDS PGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY, 该结构功能域具有调控胰腺和胃肠道生理功能的作用 (图 2)。

**2.2.3 鹅 *NPY* 前体蛋白质二级结构** *NPY* 前体蛋白二级结构模型如图 3, 该蛋白的二级结构主要由随机卷曲、 $\alpha$ -螺旋延伸链组成, 其中随机卷曲的比例最高, 占 48.67%; 其次为  $\alpha$ -螺旋, 占 43.36%; 延伸链比例最低, 占 2.06%。

**2.2.4 鹅 *NPY* 蛋白质三级结构** 利用在线软件对鹅 *NPY* 进行三级结构预测, *NPY* 蛋白三级结构模型如图 4, 可以看出三级结构主要由  $\alpha$  螺旋组成。

```

1 c
2 ATGCAGGGCACCATGAGGCTGTGGGTGTCGGTCTGACTTTTCGCCCTGTCGCTGCTCGTC
1 M Q G T M R L W V S V L T F A L S L L V
62 TGCCTGGGCACGCTGGCAGAAGCGTACCCTCCAAACCGGACAGCCCCGGCAGGACGCC
21 C L G T L A E A Y P S K P D S P G E D A
122 CCCGCAGAGGACATGGCCAGATACTACTCGGCGCTGAGGCACTACATCAACCTCATACC
41 P A E D M A R Y Y S A L R H Y I N L I T
182 AGGCAGAGGTATGGAAAGAGATCAAGCCCAGAGACACTGATCTCAGACCTCTTGTGAGG
61 R Q R Y G K R S S P E T L I S D L L L R
242 GAAAGCACAGAAAATATCCCTAGATCCAGGTTTGAAGACCCTTCGATGTGGTGAtgggat
81 E S T E N I P R S R F E D P S M W *
302 tttcagcacaccgtcaaaacttttcctagttttcaattcacactccactcctctgaagca
362 aatcatagcg
    
```

小写字母代表非翻译区，大写字母代表编码区；上面为核苷酸序列，下面为氨基酸序列；起始密码子和终止密码子用粗体表示；信号肽用方框表示；PAH 结构功能域用下划线表示

Small letters represent untranslation region, and capital letters represent translation region; the up row is the sequence of nucleotide, and the down row is the sequence of amino acid; initial codon and stop codon were marked with bold type; signal peptide was marked with box; conserved domain of PAH was marked with underline

图 2 鹅 NPY 部分核苷酸序列及编码的氨基酸序列

Figure 2 Partial nucleotides and encoded amino acids of goose NPY gene

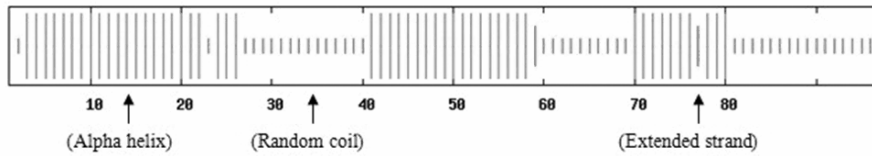


图 3 鹅 NPY 前体蛋白二级结构模型

Figure 3 Secondary structure model of NPY precursor protein



图 4 NPY 蛋白三级结构模型

Figure 4 Tertiary structure model of NPY precursor protein

### 2.3 同源性分析

鹅 NPY 基因 cDNA 序列经 BLASTN 分析，与其他家禽 NPY 基因具有较高的同源性。与其他物种核苷酸序列的同源性比较结果（表 1）表明，鹅 NPY 基因核苷酸序列与近缘物种家鸡、斑胸草雀、鸽、火鸡的序列相似性在 96%~97%之间；与哺乳动物序列的相似度在 86%~88%之间。构建的鹅 NPY 基因氨基酸序列系统进化树见图 5，朗德鹅与鸡、鸽、火鸡亲缘关系最近，聚为 1 类。

表 1 鹅 NPY 基因序列与其它物种序列同源性比较

Table 1 homology comparison of NPY nucleotide sequences among various species

物种 Species	登录号 Accession number	同源性/% Similarity	物种 Species	登录号 Accession number	同源性/% Similarity
家鸡	NM_205473	97	兔	NM_001160286	87
斑胸草雀	XM_002193012	96	亚马逊松鼠猴	XM_003982862	87
火鸡	XM_003207142	97	猫	XM_003896193	88
鸽	EU427469	96	猕猴	NM_001032814	88
人	NM_000905	88	东非狒狒	XM_003935132	88
大猩猩	XM_004045187	87	黑猩猩	XM_0011590094	88

### 3 讨论

NPY 最早是在 1982 年由瑞典科学家 Tatemoto 从猪脑中分离鉴定，由于其结构中富含酪氨酸，故

被称作神经肽酪氨酸<sup>[3-4]</sup>。神经肽 (NPY) 和胰多肽 (PP)、内分泌肠肽 YY (PYY) 及鱼胰肽 Y (PY) 都属于胰多肽家族<sup>[1,5]</sup>。NPY 序列极端保守，在不同物种间都具有相似的生物学功能。Mintz 等研究发

现人 *NPY* 基因编码区 294 bp 核苷酸, 编码 97 个氨基酸<sup>[6]</sup>。在人和大鼠上的研究发现 *NPY* 原 (*NPY* 前体) 由一个信号肽、成熟 *NPY* 肽、一个甘氨酸-赖氨酸-精氨酸加工位点以及一个 30 个氨基酸 C 末端肽组成。本试验克隆出鹅 *NPY* 基因编码区含有 294 bp 核苷酸, 编码 97 个氨基酸, 含有 28 个氨基酸的信号肽区域, 36 个氨基酸的 PAH 结构功能域, 该结构功能域是 *NPY* 所共有的结构, 具有调控胰腺和胃肠道生理功能的作用。本试验所获得鹅 *NPY* 基因核苷酸序列与近缘物种家鸡、斑胸草雀、鸽、火鸡的序列同源性较高, 在 96%~97% 之间, 氨基酸系统进化树也显示鹅与其它家禽聚为一类, 表明 *NPY* 是一种高度保守的神经内分泌肽。

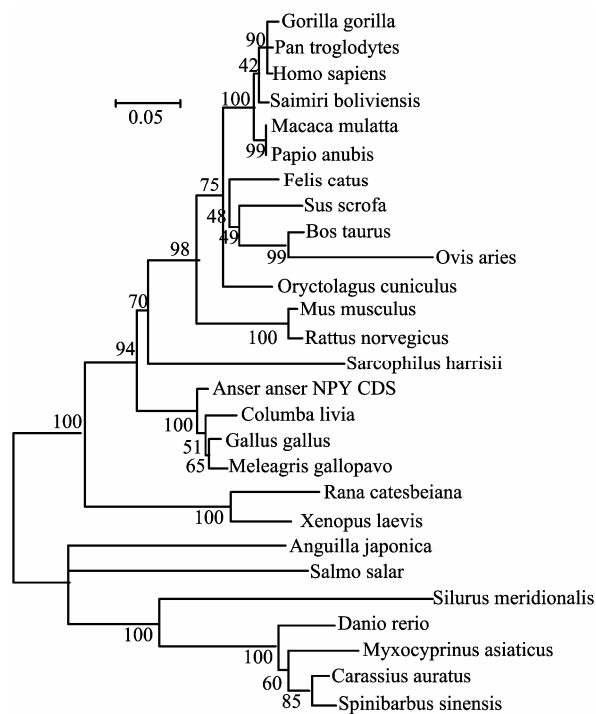


图 5 鹅与其他物种 *NPY* 氨基酸序列的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of *NPY* amino acids among various species

蛋白质的生物功能主要由其空间结构所决定。二级结构中随机卷曲和  $\alpha$ -螺旋的比例都会映射蛋白质的疏水值。Allen 研究发现大鼠 *NPY* 氨基酸序列与人类相同, 与鸟类胰多肽具有高度相似性, 并建立了哺乳动物神经肽 Y 三维模型。此模型提出 *NPY* 通过一个 N-末端聚脯氨酸-II-类螺旋和一个 C-末端- $\alpha$ -螺旋间的疏水作用维持三级结构<sup>[7]</sup>。本试验得到的三级结构, 模型中可以看出主要由  $\alpha$ -螺旋构成, 可能是  $\alpha$ -螺旋在维持鹅 *NPY* 蛋白三级结构起到重要作用。

*NPY* 通过与其受体结合调控摄食、生物节律性

及省直等活动, 目前已发现 8 种 *NPY* 受体: Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8, 均属于 G 蛋白偶联受体家族, 起到促食欲作用的主要是 Y1、Y2 和 Y5。Paker 等将 Y1 受体拮抗剂注入大鼠第 3 脑室后发现由 *NPY* 诱导的摄食行为收到明显抑制<sup>[8]</sup>。关于 *NPY* 基因与繁殖性能的研究也有报道, 张德祥等对黄羽肉公鸡的 *NPY* 基因 3 个酶切位点进行了多态性研究, 分析其与睾丸性状的关系, 研究发现 rs3 和 rs19 识别位点在隐性纯合子的情况下表现为较大的睾丸重 ( $P < 0.05$ ) 和睾丸指数, 可以作为公鸡睾丸性状的候选分子标记<sup>[9]</sup>。黄华云等在鸡上的研究发现 *NPY* 基因多态性与繁殖性状具有关联<sup>[10-11]</sup>。鉴于 *NPY* 基因在动物机体中发挥的各种重要作用, 深入研究 *NPY* 基因在朗德鹅产蛋、产肝等性能中的作用具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Larhammar D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Regul Pept, 1996, 629(1): 1-11.
- [2] 胡春燕, 李英文. 神经肽 Y(NPY)的生理功能研究进展[J]. 生物学杂志, 2011, 28(2): 66-68.
- [3] Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Nature, 1982, 296(5858): 659-660.
- [4] Tatemoto K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(18): 5485-5489.
- [5] Larhammar D, Blomqvist A G, Soderberg C. Evolution of neuropeptide Y and its related peptides[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1993, 106(3): 743-752.
- [6] Minth C D, Bloom S R, Polak J M, et al. Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(14): 4577-4581.
- [7] Allen J, Novotny J, Martin J, et al. Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(8): 2532-2536.
- [8] Parker E, Van Heek M, Stamford A. Neuropeptide Y receptors as targets for anti-obesity drug development: perspective and current status[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 440(2/3): 173-187.
- [9] 张德祥, 詹惠娜, 张细全. *NPY* 基因 SNP 与优质鸡睾丸性状的关联分析[J]. 中国家禽, 2012, 34(20): 23-25.
- [10] 朱文奇, 李慧芳, 吴旭, 等. *NPY*、*IGF-1* 基因对文昌鸡繁殖性状的遗传效应[J]. 扬州大学学报, 2007, 28(2): 20-23; 27.
- [11] 黄华云, 黎寿丰, 赵振华, 等. 神经肽(*NPY*)基因多态性与邵伯鸡母系繁殖性状的关联性分析[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(1): 47-50.