

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19289

## 斑节对虾 *MKK7* 基因的克隆及在不同胁迫条件下的表达分析

范红弟<sup>1,2</sup>, 李运东<sup>2</sup>, 杨其彬<sup>2</sup>, 姜松<sup>2</sup>, 杨丽诗<sup>2</sup>, 黄建华<sup>2</sup>, 江世贵<sup>2</sup>, 张汤生<sup>3</sup>,  
周发林<sup>2</sup>

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

3. 饶平晟源水产育苗场, 广东 饶平 515724

**摘要:** 丝裂原活化蛋白激酶激酶 7 (MKK7) 是 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 信号通路的关键调控因子, 参与调节细胞对各种胞外刺激的反应。本研究利用 RACE 技术克隆获得了斑节对虾 (*Penaeus monodon*) *MKK7* 基因 (*PmMKK7*), 其全长为 2710 bp, 包括 14 bp 的 5' 非编码区 (UTR)、1295 bp 的 3' UTR 和 1401 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 466 个氨基酸。多重序列比对和系统进化树分析结果表明, *PmMKK7* 与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) *MKK7* 基因聚为一支并且具有最高的同源性 (99.14%)。定量表达结果表明, *PmMKK7* 基因在斑节对虾的各个组织中都有表达, 其中在肌肉中表达最高, 在胃中表达最低。菌注射实验后, 感染金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 组和鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 组在肝胰腺和鳃组织中均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 感染哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 组, 这两种组织中的表达量均显著低于对照组。两组低盐 (1‰、3‰) 胁迫后, 肝胰腺和鳃组织中的 *PmMKK7* 表达量均出现显著上调情况。*PmMKK7* 基因敲降后, 低盐胁迫下斑节对虾的死亡率明显增加, 同时其 MAPK 信号通路的下游基因 *PmJNK* 在各组的表达均受到抑制, 表明 MAPK 信号转导通路可能在斑节对虾免疫防御和盐度应激过程中发挥重要作用。

**关键词:** 斑节对虾; *MKK7* 基因; 基因克隆; 低盐胁迫; RNA 干扰

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)07-0748-11

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路由一种保守的三级激酶模式组成, 包括 MAPK 激酶激酶 (MAP kinase kinase kinase, MKKK)、MAPK 激酶 (MAP kinase kinase, MKK) 和 MAPK, 共同调节着细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种重要的细胞生理过程<sup>[1]</sup>。MAPK 级联的激活一般由细胞外刺激引发, 通常通过 G 蛋白偶联受体激活几组细胞质激酶, 导致细胞增殖、分化、发育或凋亡<sup>[2]</sup>。MAPK 信号通路有 3 个亚家族, 分别为 MAPK (细胞外信号调节激酶, ERK), p38 亚家族

和 JNK (c-Jun 氨基末端激酶)<sup>[3-5]</sup>。JNK 通路可以被激素、毒素、渗透压胁迫、温度胁迫等外界刺激激活, 从而增强细胞整体的抗应激以及损伤修复功能<sup>[6-7]</sup>。JNK 的激活是由上游的 MKK4 或 MKK7 所介导, 通过对保守的 Thr-Pro-Tyr (T-Y-P) 基序的 Thr 和 Tyr 残基的双重磷酸化实现<sup>[8-9]</sup>。激活的 JNK 可以从细胞质转移到细胞核, 在细胞核中磷酸化 c-Jun、Elk1、p53、ATF2 等转录因子, 诱导 JNK 通路靶基因表达<sup>[8, 10]</sup>。其中 *MKK7* 是激活 JNK 上游通路的关键基因, 尤其在环境应激下, 机体会调节 *MKK7* 的表达来维持正常生命活动<sup>[11]</sup>, 在环

收稿日期: 2019-10-06; 修订日期: 2020-02-10.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0900303); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-48); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2019KJ149).

作者简介: 范红弟 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传与育种. E-mail: fanhongdi1108@aliyun.com

通信作者: 周发林, 博士, 研究员, 研究方向为水产动物遗传与育种. E-mail: zhoulalin@aliyun.com

境适应过程起到重要作用。

JNK 信号级联作为 MAPK 通路的一个分支, 在先天免疫的背景下发挥着重要的作用<sup>[12]</sup>, 在水产动物中的免疫和刺激应答功能得到了广泛的研究。花鲈(*Lateolabrax japonicus*)在不同的盐度胁迫下, 通过过表达 *JNK1* 和 *JNK2* 基因来适应低盐环境, 表明花鲈中的 JNK 信号通路在环境应激中起着重要的作用<sup>[13]</sup>。凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *MKK4* 和 *MKK7* 基因在多种菌刺激下出现显著变化, 并且验证了 *LvMKK7* 基因有一个特征性的 S-K-A-K-T 基序, 被上游基因磷酸化激活后再激活 JNK, 在抗菌反应中发挥重要作用<sup>[11, 14]</sup>。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的 *MKK4* 和 *MKK7* 基因参与了草鱼的肠组织对胞壁酰二肽的免疫应激反应<sup>[15]</sup>。此外, JNK 信号通路在重金属解毒和发育过程的调控作用, 在鲫(*Carassius auratus*)和金鱼(*Carassius auratus*)中均得到了很好的证实<sup>[16-17]</sup>, 但是有关 JNK 信号通路在斑节对虾(*Penaeus monodon*)中的研究十分缺乏, 关于 *MKK7* 在斑节对虾胁迫后的应答目前还未见报道。

斑节对虾是世界上重要的经济养殖对虾品种之一, 病害的发生和盐度胁迫应激, 影响斑节对虾的生长、发育及存活, 制约着斑节对虾养殖业健康发展<sup>[18-21]</sup>。鉴于 JNK 通路在机体维持正常生命活动中的重要作用, 本研究对斑节对虾 *MKK7* 基因的生物学功能进行了初步研究。本研究克隆获得了斑节对虾 *MKK7* 基因全长, 分析了 *MKK7* 在斑节对虾各个组织中的表达情况, 探究了不同病原体刺激和盐度胁迫下的表达模式, 通过构建低盐度胁迫下的 RNAi 体系, 追踪了在 72 h 内斑节对虾的死亡情况, 并进一步研究了沉默 *MKK7* 后 JNK 分子通路中其他基因的表达情况, 期望探究 *MKK7* 在斑节对虾低盐胁迫的分子功能和作用, 以期对斑节对虾对盐度胁迫的应答分子机制提供更多的基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用斑节对虾取自中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地。选取体长 7~

10 cm、体重 8~12 g 的斑节对虾, 在天然养殖海水环境中暂养 1 周, 同时充分曝气, 养殖温度为 25~28 °C。1 周后, 随机选取健康完整的雌雄对虾各 3 尾, 分别取其肝胰腺、鳃、肠、胃、淋巴、心脏、肌肉、表皮、眼柄神经、脑神经、胸神经、腹神经、卵巢、精巢组织, 来自 3 尾虾的同种组织样品混合于一管, 管中加足量的 RNAlater Solution (Ambion, 上海), 4 °C 保存过夜后置于 -80 °C 保存。

### 1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

按照 HiPure Fibrous RNA Plus Kit (Megan, 中国)试剂盒说明书提取上述样品的总 RNA。RNA 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳确定完整性, 经 NanoDrop 2000 分光光度计测定纯度及浓度。以总 RNA (1 µg) 为模板, 由肝胰腺、肌肉的混合样品分别按照 HiPure Tissue DNA Mini Kit 试剂盒说明书和 Prime Script II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书制备克隆的模板 cDNA 及用于 RACE 的模板 cDNA。

### 1.3 斑节对虾 *MKK7* 的 cDNA 克隆

根据本实验室构建的斑节对虾转录组文库, 获得 *PmMKK7* 的部分序列片段, 利用 Primer Premier 5.0 设计特异性扩增引物 *MKK7*-F1、*MKK7*-R1、*MKK7*-F2、*MKK7*-R2 (表 1), 所用引物均由北京睿博兴科生物技术有限公司广州分公司合成, 使用 Ex Taq 酶 (TaKaRa, 中国), 以前面制备的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的条带进行回收后与 pMD19-T 载体 (TaKaRa, 中国) 连接, 再转入大肠杆菌感受态细胞中, 挑取 8 个阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后送至北京睿博兴科生物技术有限公司广州分公司进行测序。

利用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术、降落 PCR 技术、半巢式 (semi-nest) PCR 技术扩增 *PmMKK7* 的 3' 和 5' 端。实验中所用引物 *MKK7*-3G1、*MKK7*-3G2、*MKK7*-5G1、*MKK7*-5G2 及接头通用引物 UPM、NUP 均见表 1。一扩反应分别以制备的 3'、5'-cDNA 为模板, 二扩反应以对应的一扩反应产物稀释 10 倍为模板。最后的 PCR 产物与验证目的片段产物同样处理, 最后将

表 1 实验中所用引物序列  
Tab. 1 Sequences of primers used in this study

| 引物名称 primer name  | 序列 (5'-3') sequence                           | 用途 application |
|-------------------|-----------------------------------------------|----------------|
| MKK7-F1:          | GAATTAGGTAATGGCACATCAGG                       | cDNA 序列验证      |
| MKK7-R1:          | AGTAGTTTCTTGTACTTTGGGCG                       | cDNA 序列验证      |
| MKK7-F2:          | ATACATGGCGCCAGAACG                            | cDNA 序列验证      |
| MKK7-R2:          | GGAGGTCGGATATTGGGTC                           | cDNA 序列验证      |
| MKK7-5G1          | GCTTGTCAGACAGGTGGCCATGAG                      | 5'-RACE        |
| MKK7-5G2          | CGATGGATGACACCGTGGGATTC                       | 5'-RACE        |
| MKK7-3G1          | CGGTCTTTGGTGCGAATGACTGAC                      | 3'-RACE        |
| MKK7-3G2          | TGCTTTCATGTTGCACTAAAACAGAGGAG                 | 3'-RACE        |
| UPM Long          | CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT | RACE           |
| UPM Short         | CTAATACGACTCACTATAGGGC                        | RACE           |
| NUP               | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT                       | RACE           |
| qMKK7-F           | TAACCTAGAAGAGACCAAGC                          | 实时荧光定量 PCR     |
| qMKK7-R           | CTGTGACGAAGCATCCTA                            | 实时荧光定量 PCR     |
| qEF-1 $\alpha$ -F | AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT                      | 实时荧光定量 PCR     |
| qEF-1 $\alpha$ -R | CGTGGTGCATCTCCACAGACT                         | 实时荧光定量 PCR     |
| dsMKK7-f:         | GGTAATGGCACATCAGGCAAC                         | 双链 RNA 合成      |
| dsMkk7-r          | GCGCAACCAGCACTACGAG                           | 双链 RNA 合成      |
| dsGFP-F           | TGGAGTGGTCCCAGTTCTTGTGTTGA                    | 双链 RNA 合成      |
| dsGFP-R           | GCCATTCTTTGGTTTGTCTCCCAT                      | 双链 RNA 合成      |
| qMKK4-F           | GCCACACTAACAGCACTA                            | 干扰后实时荧光定量 PCR  |
| qMKK4-R           | GTCTACATCCAGCATCTCT                           | 干扰后实时荧光定量 PCR  |
| qJNK-F            | CCGTCCCCGCTACCCTGGCTATTC                      | 干扰后实时荧光定量 PCR  |
| qJNK-R            | AGGTCTCGTGCTTGACTCGCTTTG                      | 干扰后实时荧光定量 PCR  |

测序结果与目的基因比对, 获得 *PmMKK7* 基因的 cDNA 全长。

#### 1.4 生物信息学分析

利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测开放阅读框, 利用 EMBOSS (<http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>) 翻译其氨基酸序列。利用 NCBI 中 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具对预测的氨基酸序列与蛋白质数据库进行相似性比对分析。利用 Clustal X 软件进行多重序列比对。利用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测等电点和理论分子质量。利用 SMART 4.0 ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?GENOMIC=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?GENOMIC=1)) 进行蛋白结构域分析。利用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点。利用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点。利

用 Clustal X 和 MEGA 6.0 软件基于 NJ 法构建系统进化树。

#### 1.5 *PmMKK7* 的表达分析

通过 Beacon Designer 7.0 软件设计 *PmMKK7* 的定量引物 qMKK7-F、qMKK7-R, 以 qEF-1 $\alpha$ -F、qEF-1 $\alpha$ -R 为内参基因<sup>[22]</sup>(表 1)。以上述所制备的 cDNA 为样品, 浓度稀释到(55 $\pm$ 2) ng/ $\mu$ L, 用 Roche Light Cycler® 480II (Roche, Germany) 进行实时荧光定量 RT-PCR 扩增, 每个样品及内参均设 3 个重复。扩增体系为 12.5  $\mu$ L, 包括: 1  $\mu$ L 模板 cDNA, 0.5  $\mu$ L 上游引物, 0.5  $\mu$ L 下游引物, 6.25  $\mu$ L TB Green TM Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (T li RNaseH Plus) (TaKaRa, 中国), 4.25  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 20 s, 60  $^{\circ}$ C 5 s, 45 个循环; 65  $^{\circ}$ C 15 s; 55  $^{\circ}$ C 升至 97  $^{\circ}$ C; 37  $^{\circ}$ C 5 min。计算方法采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法, 数据处理使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和

Duncan 检验。

### 1.6 病原体感染实验

选取 200 尾平均体重 15~18 g 的健康斑节对虾, 用于攻毒实验。将实验虾随机分为 4 组, 每组 50 尾, 分别于第二腹节注射 PBS、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)。基于 Qin 等<sup>[23]</sup>和 Zhu 等<sup>[24]</sup>的研究, 确定各菌株注射的浓度。对照组注射 100  $\mu$ L 无菌磷酸盐(PBS, pH 7.4), 其他 3 组的虾分别注射 100  $\mu$ L ( $1.0 \times 10^8$  cfu/mL)的菌株。注射后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 时随机选取健康完整的 3 尾虾, 取其肝胰腺和鳃组织, 置于 RNAlater solution 4  $^{\circ}$ C 保存过夜后置于  $-80^{\circ}$ C 保存。

### 1.7 盐度胁迫实验

盐度胁迫实验于中国水产科学研究院南海水产研究所深圳试验基地开展, 基于同步进行的预实验<sup>[19]</sup>, 设定盐度 3 为低盐实验组, 盐度 17 为中盐实验组, 普通养殖海水(约为 25)为对照组。盐度用淡水和海水调节, 盐度计校准。实验后的 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 随机选取健康完整的 3 尾虾, 取其肝胰腺和鳃组织, 置于 RNAlater solution 4  $^{\circ}$ C 保存过夜后置于  $-80^{\circ}$ C 保存。

### 1.8 RNA 干扰实验

利用 Primer Premier 5.0 设计用于合成 dsMKK7 所需的引物 dsMKK7-f、dsMkk7-r、dsGFP-F、dsGFP-R (表 1), 发送至北京睿博兴科广州分公司合成。以普通 cDNA 为模板通过 Ex Taq 酶扩增得到含有 T7 启动子的 DNA 片段。获得清晰明亮的条带, 按照胶回收试剂盒说明书步骤进行琼脂糖凝胶回收, 将浓度大于 125 ng/ $\mu$ L 且满足实验要求的 cDNA 储存于  $-20^{\circ}$ C 备用。双链 dsRNA 的合成按照 T7 RiboMAXTExpress RNAi System 试剂盒说明书进行。利用 dsGFP-F/R 引物及本实验室保存的 pD7-GFP 重组载体进行 dsGFP 合成, 方法同上注射前将合成好的 dsPmMkk7 及 dsGFP 稀释, 浓度均为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L。本实验用斑节对虾体重为 ( $5.0 \pm 1.0$ ) g, 按照 3~5  $\mu$ g/g 的比例注射 dsRNA。注射实验分为 4 组, 分别为注射 PBS 组、注射 dsGFP 组、注

射 dsPmMKK7 组和不注射组, 每组 3 个平行, 每组 70 尾对虾。第 1 天随机捞取 3 尾健康、处于蜕皮间期的虾, 取其肌肉组织置于 RNAlater 中。注射 24 h 后将各组虾全部移入盐度为 3 的养殖用水中, 每隔 3 h 捞取每组中的死虾, 并做好记录。在盐度胁迫后第 3 小时、6 小时、9 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时, 分别从各处理组中捞取 3 尾健康、处于蜕皮间期的虾, 取其肌肉组织置于 RNAlater 中。同时, 在另外 2 个普通养殖海水的塑料桶中各放入 10 只注射过 dsGFP 及 dsPmMkks 的对虾, 分别在 24 h 和 48 h 从中随机捞取并取其肌肉组织置于 RNAlater 中, 作为检测 dsRNA 干扰效率的样品。所有 RNA 样品混匀后放  $-4^{\circ}$ C 过夜后置于  $-80^{\circ}$ C 保存。RNA 的提取、cDNA 的制备以及定量实验同上述 1.4 和 1.7 所述。

## 2 结果与分析

### 2.1 PmMKK7 的序列分析

通过克隆获得斑节对虾丝裂原活化蛋白激酶激酶 7 (*PmMKK7*) cDNA, 全长 2710 bp, GenBank 登录号: MN519730, 其 5' 和 3' 端非编码区(UTR)分别为 14 bp 和 1295 bp, 开放阅读框(ORF)长 1401 bp, 编码 466 个氨基酸(图 1)。ExPASy ProtParam 预测其分子量为 55.33 kD, 理论等电点为 8.97。经预测 *PmMKK7* 无信号肽, 无跨膜结构。共有 13 个磷酸化位点, 其中丝氨酸位点 10 个, 苏氨酸位点 1 个, 酪氨酸位点 2 个。另外含有 3 个糖基化位点, 属于 N 连接的糖基化。*PmMKK7* 含有 261 个氨基酸的保守激酶结构域, 其中有一个保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(S<sub>TKc</sub>)区域, 是 MKKK 磷酸化的潜在位点。

利用 NCBI BLASTP 对斑节对虾 *MKK7* 基因进行同源性比较, 结果显示, *PmMKK7* 基因与凡纳滨对虾的同源性最高(图 2), 为 99.14%, 与家蚕(*Bombyx mori*)、温室希蛛(*Parasteatoda tepidarium*)、美洲蜚( *Limulus Polyphemus*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)的同源性分别 69.69%、61.23%、59.91%、64.58%、55.48%、52.33%。利用 MEGA 6.06 软件, 基于 NJ (neighbor-joining)法



采用 bootstrap method 重复计算 1000 次构建了 *PmMCK7* 和其他物种的系统进化树(图 3)。斑节对虾 *MKK7* 基因首先与甲壳动物凡纳滨对虾聚为一支, 后与虾夷扇贝和美洲鲎这两种无脊椎动物聚类, 其他物种聚为一支。

多重序列比对采用 GenBank 上的 *MKK7* 序列

登录号: 凡纳滨对虾(*L. vannamei*): ALU86069.1; 家蚕(*B.mori*): NP\_001243912.1; 温室希蛛(*P. tepidariorum*): XP\_015921360.1; 美洲鲎(*L. Polyphemus*): XP\_013786818.2; 虾夷扇贝(*M. yessoensis*): XP\_021376194.1; 斑马鱼(*D. rerio*): NP\_001177235.1; 玻璃海鞘(*C. intestinalis*): NP\_001071759.1。

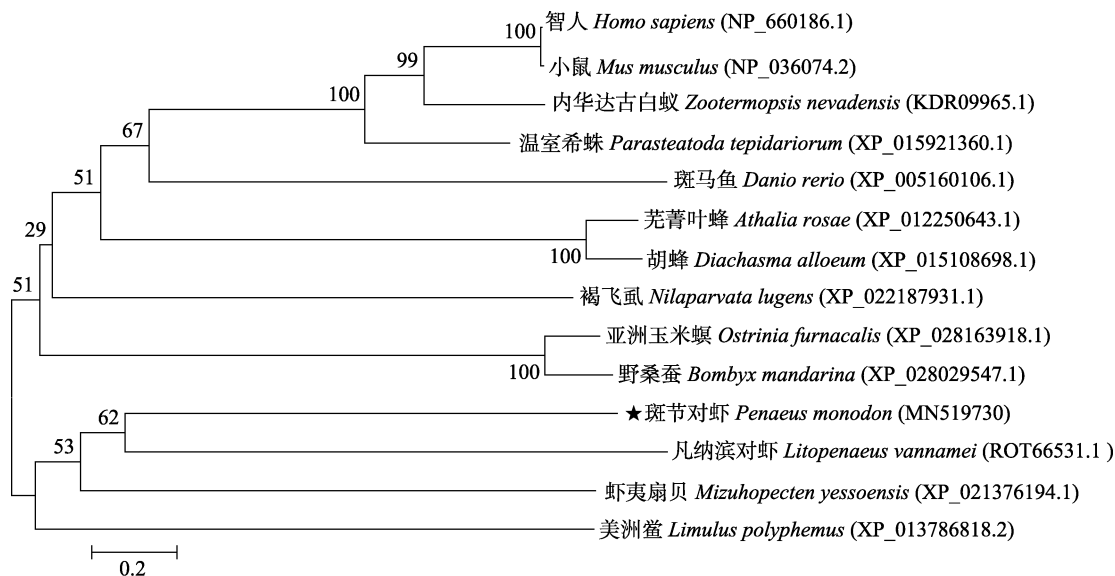


图 3 斑节对虾与其他物种的 *PmMCK7* 进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *PmMCK7* with other reported *PmMCK7*

## 2.2 *PmMCK7* 在不同组织中的表达

利用实时定量 PCR 技术, 探索 *PmMCK7* 基因在斑节对虾中各组织间的表达差异。结果表明, *PmMCK7* 基因在所有组织中均有表达。其中, 在肌肉中的表达量最高, 胃中表达量最低。肌肉中表达量为胃中表达量的 19.69 倍。其次在胸神经中表达也较高, 为胃表达量的 18.13 倍, 其他组织中呈逐渐递减的态势(图 4)。

## 2.3 *PmMCK7* 在菌刺激下的表达变化

在鳃组织中, 注射 PBS、金黄色葡萄球菌、哈维氏弧菌和鳃弧菌后, *PmMCK7* 的表达量均上调(图 5A)。以 PBS 组为对照, 感染金黄色葡萄球菌组在前 24 h 呈不断上调趋势, 在 24 h 时达最高值, 为此时 PBS 组表达量的 2.63 倍, 存在显著性差异( $P<0.05$ ), 之后开始下调至平稳。感染哈维氏弧菌组从 6 h 开始出现下调, 直到 72 h 时恢复正常水平。感染鳃弧菌组, 除 9 h 外, 表达量始终保

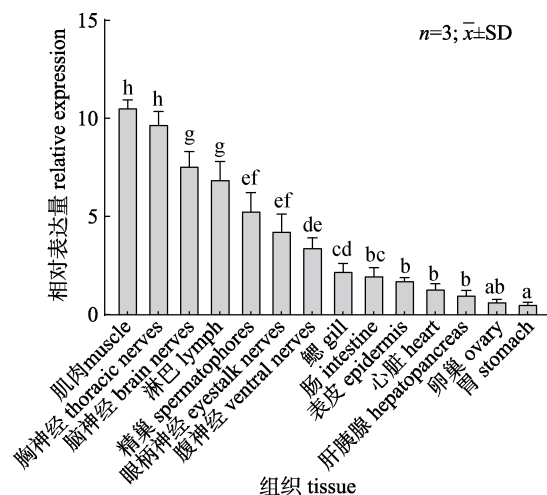


图 4 *PmMCK7* 在各组织的相对表达量

柱上字母不同表示组织间差异显著( $P<0.05$ ).

Fig. 4 Relative expression of *PmMCK7* in different tissues. Different letters mean significant difference between different tissues ( $P<0.05$ ).

持上调, 与对照组有显著性差异( $P<0.05$ ).

在肝胰腺组织中, 各注射组出现不同的上



调、下调趋势(图 5B)。以 PBS 组为对照, 感染金黄色葡萄球菌组首先出现下调趋势, 在 24 h 时出现显著性上调( $P<0.05$ ), 表达量为对照组的 1.55 倍, 之后又出现下调, 在 72 h 时降至对照组的 0.33 倍。感染哈维氏弧菌组与对照组相比始终呈下调趋势, 在 3 h、6 h、12 h、72 h 时存在显著性差异( $P<0.05$ )。感染鳗弧菌组整体呈上调趋势, 感染 3 h、6 h、9 h 时表达量分别为对照组的 1.73 倍、1.49 倍、2.48 倍, 在 72 h 时降回初始水平。

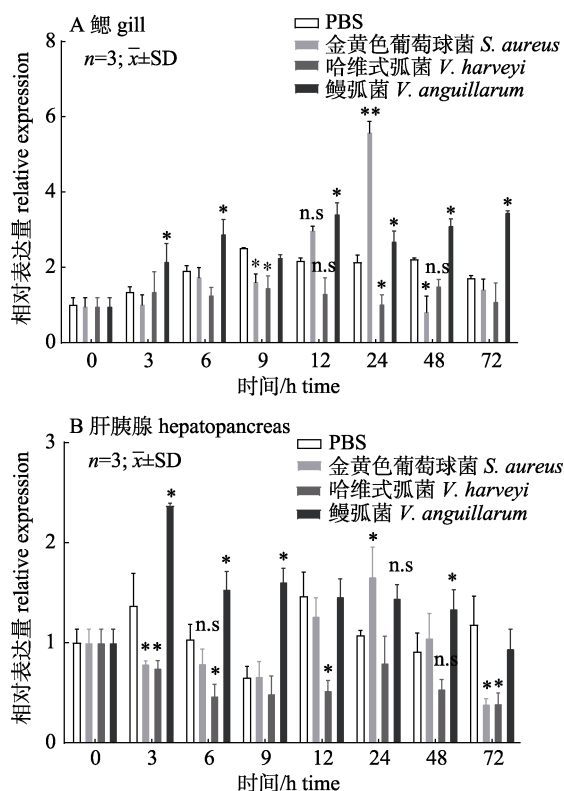


图 5 注射 PBS、金黄色葡萄球菌、哈维氏弧菌、鳗弧菌后 *PmMKK7* 在鳃(A)和肝胰腺(B)中的相对表达水平

\*表示各实验组与同一时间下的 PBS 组差异显著( $P<0.05$ ),

\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 5 Relative expression levels of *PmMKK7* in gill (A) and hepatopancreas (B) of *Penaeus monodon* after injection with PBS, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio anguillarum* \* denotes significant difference from the PBS group ( $P<0.05$ ), and \*\* denotes extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

## 2.4 *PmMKK7* 在盐度胁迫下的表达变化

盐度胁迫后的表达水平显示, 在鳃组织中(图 6A), 中低盐(17)和低盐(3)组与对照组相比, 除了胁迫 12 h 时, 其他时间点都有不同程度的上调。盐度 17 组的整体变化趋势为先上调再下调, 最后

趋于平稳, 96 h 时表达量约为对照组 96 h 的 1.43 倍。盐度为 3 组的变化趋势比较不平稳, 在 24 h 和 72 h 时出现了较高上调, 分别为对照组的 1.66 和 1.73 倍, 在 96 h 时降回对照组 1.35 倍。在肝胰腺组织中(图 6B), 中低盐组出现极显著上调, 其中 1 h、3 h、6 h、72 h 是上调的高峰点, 表达量分别约为对照组的 4.04 倍、3.61 倍、2.83 倍、2.05 倍。肝胰腺组织的低盐组表达出现先下降后波动式上升趋势。3 h 和 6 h 时, *PmMKK7* 的表达量分别下降至对照组的 0.53 倍、0.39 倍, 之后开始波动式上调, 在 96 h 时约达到对照组的 5 倍。

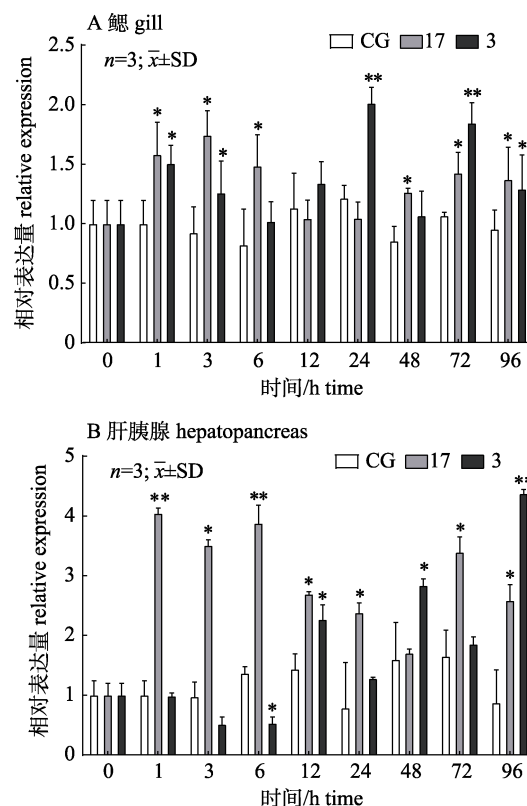


图 6 急性低盐胁迫下斑节对虾 *PmMKK7* 在鳃(A)和肝胰腺(B)组织中的相对表达水平

\*表示各实验组与同一时间下的未注射组差异显著( $P<0.05$ ),

\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 6 Relative expression levels of *PmMKK7* in gill (A) and hepatopancreas (B) of *Penaeus monodon* after low salinity stress

\* denotes significant difference from the uninjected group ( $P<0.05$ ), and \*\* denotes extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

## 2.5 *PmMKK7* 基因敲降后的相关表达分析

根据全组织表达定量结果, *PmMKK7* 在肌肉

中表达最高, 因此基因敲降后选择肌肉组织继续后续的定量研究。在 RNA 干扰后的 24 h 和 48 h 时进行 *PmMKK7* 基因的定量检测, 验证干扰效率<sup>[25-26]</sup>。以未注射组为对照, 由图 7 所示, 注射后 24 h, *dsMKK7* 组斑节对虾体内 *PmMKK7* 的表达量仅为未注射组的 33.7%。至 48 h 时, 注射 *dsMKK7* 组的表达量继续下降至未注射组的 28.1%。说明 *dsPmMKK7* 的干扰效率明显。RNAi 实验各组在低盐(3)胁迫后各时间点的死亡率如图 8 所示, 注射 *dsPmMKK7* 组的死亡率始终高于其他 3 组, 在 9 h 时死亡率开始超过 40%, 最终死亡率达 45%。死亡率最低的为注射 *dsGFP* 组, 最终死亡率低于 25%。

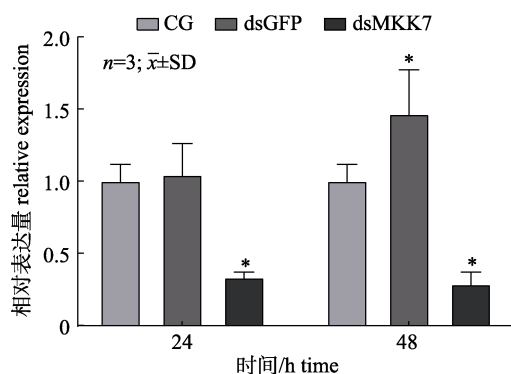


图 7 斑节对虾 *PmMKK7* 在 dsRNA-MKK7 干扰后的表达  
\*表示各实验组与同一时间下的未注射组差异显著( $P<0.05$ ),  
\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 7 *PmMKK7* mRNA expression profiles after silencing by dsRNA

\* denotes significant difference from the uninjected group ( $P<0.05$ ), and \*\* denotes extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

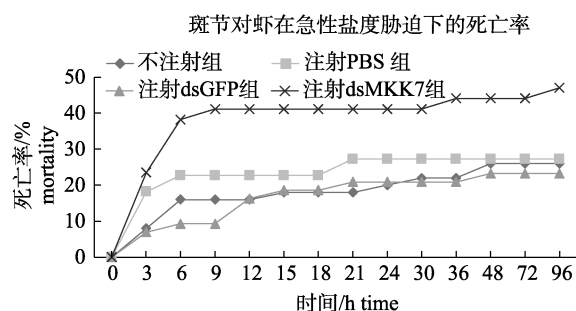


图 8 在急性低盐胁迫下各基因沉默组斑节对虾的死亡率变化

Fig. 8 Mortality changes of *Penaeus monodon* in different gene silencing groups under acute low salinity stress

注射 *dsPmMKK7* 后, 在急性低盐胁迫下, 斑节对虾肌肉中 *PmMKK4* 和 *PmJNK* 的表达量如图 9 所示。其中斑节对虾 *MKK4* 基因表达量注射 *dsMKK7* 组与未注射组相比出现显著性差异, 在低盐胁迫 6 h、9 h、48 h 时出现显著下调, 在 72 h 时显著上调。*PmJNK* 各组间的表达量差异不显著, 在急性低盐胁迫后, 未注射组和注射 *dsMKK7* 组首先下调, 其他两组紧接着下调, 最终在 72 h 时注射 *dsMKK7* 组的 *JNK* 表达量出现回升。

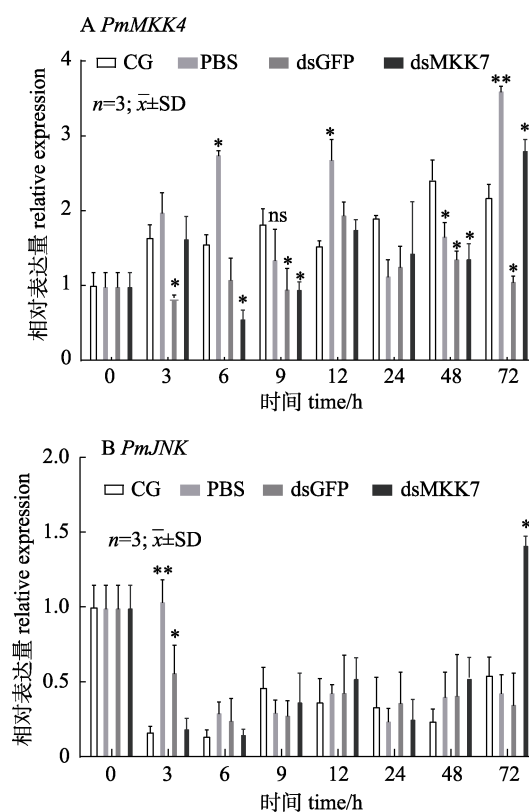


图 9 *PmMKK7* 基因沉默 *PmMKK4* (A) 和 *PmJNK* (B) 在急性低盐胁迫下的表达

\*表示各实验组与同一时间下的未注射组差异显著( $P<0.05$ ),  
\*\*表示差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 9 Relative expression levels of *PmMKK4* (A) and *PmJNK* (B) after dsRNA-MKK7 under acute low salinity stress  
\* denotes significant difference from the uninjected group ( $P<0.05$ ), and \*\* denotes extremely significant difference ( $P<0.01$ ).

### 3 讨论

本研究克隆获得斑节对虾 *MKK7* 基因, 氨基酸序列分析结果表明 *PmMKK7* 有 13 个磷酸化位



点,磷酸基团的添加或去除对许多反应起着生物“开/关”作用。含有 3 个糖基化位点,糖基化修饰在信号转导、分子识别、免疫等过程中发挥重要作用。结构预测表明,*PmMKK7* 含有 261 个氨基酸的保守激酶结构域,其中有一个保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(S-TKc)区域,是潜在的双磷酸化位点,属于 PKc 超家族,PKc-MKK7 亚族。系统进化树分析表明斑节对虾 *MKK7* 基因与凡纳滨对虾关系最近,聚为一支。多重比对结果显示,*PmMKK7* 与其他物种的 *MKK7* 基因具有较高的相似性,其中与凡纳滨对虾的同源性最高(99.14%),说明 *MKK7* 基因在近缘物种间较为保守,推测其保守的蛋白激酶结构域可能会在先天免疫等方面发挥重要作用。

*MKK7* 基因在斑节对虾中的组织分布研究,发现 *PmMKK7* 在所有组织中均有表达,其中在肌肉、神经、淋巴中表达较高。*MKK7* 基因在肌肉组织中表达量较高的现象在凡纳滨对虾中也有报道<sup>[11]</sup>,这表明肌肉可能是 *MKK7* 基因发挥作用的重要组织。同时,该研究揭示了凡纳滨对虾中 *MKK7* 基因在免疫相关的组织如肠、肝胰腺和血细胞中表达较高,表明其与凡纳滨对虾的免疫防御活动有关。在本研究中,斑节对虾中 *MKK7* 在肝胰腺中表达不高,而在淋巴组织中表达较高,猜测斑节对虾中的 *JNK* 通路发挥的先天免疫作用更多的是依托淋巴组织的细胞吞噬作用。为了探究 *MKK7* 基因在斑节对虾先天免疫过程中的作用,本研究对其进行了病原体感染实验,试验结果表明,肝胰腺组织与鳃组织中 *PmMKK7* 表达量变化趋势类似,在感染金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)时先上调后趋平稳,感染鳃弧菌(革兰氏阴性菌)后显著上调。这与已有研究结果一致,感染副溶血弧菌(革兰氏阴性菌)后凡纳滨对虾 *MKK7* 基因先上调后趋平稳<sup>[11]</sup>,香港牡蛎 *JNK* 基因明显上调<sup>[27]</sup>。感染金黄色葡萄球菌后凡纳滨对虾肝胰腺组织 *MKK7* 显著上调,这说明在病原体感染时,机体可能通过 *MKK7* 基因激活的 *JNK* 通路起到防御细菌感染作用。而感染哈维氏弧菌时 *PmMKK7* 表达出现显著下调,这与 Shi 等<sup>[28]</sup>的研究结果相一致,斑节对虾感染哈维氏弧菌后, *JNK* 通路上

的 3 个 MAPK 层级基因表达水平均显著降低,表明 *JNK* 信号通路部分效应分子可能参与到免疫调控的过程中。

盐度改变会引起对虾体内渗透压、各类非特异性免疫酶的活性发生变化,影响对虾的免疫防御能力。随着环境盐度的降低,亚硝酸盐对南方滨对虾(*Litopenaeus schmitti*)的毒害作用更强<sup>[29]</sup>,南方滨对虾对亚硝酸盐的耐受性不断减弱。本研究的急性盐度胁迫实验结果表明,在两种低盐度胁迫下,肝胰腺和鳃组织 *PmMKK7* 的表达量均上调,其中鳃组织中 3ppt 组较 17ppt 组上调更明显。而肝胰腺组织前期中低盐组上调明显,后期低盐组上调更为显著。这可能是因为在急性盐度胁迫情况下,斑节对虾通过激活 *JNK* 通路继而响应机体渗透压的调节和免疫应答。MAPK 信号通路在生物体内应对盐度胁迫时发挥了重要作用,已有研究证实植物 MAPKs 在响应各盐度胁迫方面具有重要意义,同时在植物激素的信号传递和细胞分裂方面发挥着重要作用<sup>[30]</sup>。其中 *JNK* 分支通路在水产动物盐度适应过程中也已有研究,花鲈在盐度胁迫下, *mapk8 (jnk1)*、*mapk9 (jnk2)* 的表达明显上调<sup>[13]</sup>,推测 *JNK* 通路在花鲈受到盐度胁迫时起到重要作用。为了进一步探究 *PmMKK7* 基因在低盐胁迫中起到的作用,本研究进行了双链 RNA 注射实验。干扰后定量结果表明, *MKK7* 的下游基因 *JNK* 表达一直下调,在胁迫 96 h 时表达水平回升正常以上水平。这表明 *JNK* 基因在低盐胁迫时是下调应答,但因 *MKK4* 也可以激活 *JNK*,因此敲降 *MKK7* 基因对 *JNK* 的表达量没有显著影响。而同级基因 *MKK4* 的表达先下调后上调。因为 *MKK4* 基因可以选择性地激活 *JNK* 通路和 p38 通路<sup>[16]</sup>,所以 *JNK* 表达水平和 *MKK4* 变化趋势不一致。如图 8 所示,在低盐环境下,敲降 *PmMKK7* 基因后的死亡率在短时间内迅速上升,而其他三组的死亡率均较低。由此推测, *PmMKK7* 基因可能在对低盐环境的适应中起到了重要作用。

综上所述,本研究克隆获得了斑节对虾 *PmMKK7* 基因序列,其在斑节对虾所有组织中普遍表达,在病原体感染后的先天免疫和在低盐环境中的适应过程中都发挥了重要的作用,为深入

研究丝裂原活化蛋白激酶信号通路在斑节对虾耐低盐胁迫和免疫应答过程的分子机制提供了依据。

### 参考文献:

- [1] Arthur J S C, Ley S C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity[J]. *Nature Reviews, Immunology*, 2013, 13(9): 679-692.
- [2] Krens S F G, He S N, Spaink H P, et al. Characterization and expression patterns of the MAPK family in zebrafish[J]. *Gene Expression Patterns*, 2006, 6(8): 1019-1026.
- [3] Plotnikov A, Chuderland D, Karamansha Y, et al. Nuclear ERK translocation is mediated by protein kinase CK2 and accelerated by autophosphorylation[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2019, 53(2): 366-387.
- [4] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912.
- [5] Johnson G L, Dohlman H G, Graves L M. MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, 9(3): 325-331.
- [6] Ryazantseva N V, Novitsky V V, Chasovskih N Y, et al. Role of recombinant mitogen-activated protein kinases JNK and p38 in the regulation of apoptosis in blood mononuclear cells under conditions of oxidative stress *in vitro*[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, 145(5): 569-572.
- [7] Nathan C, Ding A H. Nonresolving Inflammation[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 871-882.
- [8] Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-252.
- [9] Krzyzowska M, Swiatek W, Fijalkowska B, et al. The role of map kinases in immune response[J]. *Advances in Cell Biology*, 2010, 2(3): 125-138.
- [10] Dong C, Davis R J, Flavell R A. MAP kinases in the immune response[J]. *Annual Review of Immunology*, 2002, 20(1): 55-72.
- [11] Wang S, Qian Z, Li H Y, et al. Identification and characterization of MKK7 as an upstream activator of JNK in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 285-294.
- [12] Valanne S, Kleino A, Myllymäki H, et al. Iap2 is required for a sustained response in the Drosophila Imd pathway[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2007, 31(10): 991-1001.
- [13] Tian Y, Wen H S, Qi X, et al. Identification of *mapk* gene family in *Lateolabrax maculatus* and their expression profiles in response to hypoxia and salinity challenges[J]. *Gene*, 2019, 684: 20-29.
- [14] Wang S, Yin B, Li H Y, et al. MKK4 from *Litopenaeus vannamei* is a regulator of p38 MAPK kinase and involved in anti-bacterial response[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 78: 61-70.
- [15] Qu F F, Tang J Z, Peng X Y, et al. Two novel MKKs (MKK4 and MKK7) from *Ctenopharyngodon idella* are involved in the intestinal immune response to bacterial muramyl dipeptide challenge[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 93: 103-114.
- [16] Zheng G H, Liu C M, Sun J M, et al. Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 147: 105-111.
- [17] Zou L J, Huang W, Zhuang Y H, et al. Expression analysis of *JNK1* in different developmental phases of gonad in goldfish *Carassius auratus*[J]. *Journal of Biology*, 2017, 34(4): 6-10. [邹立军, 黄文, 庄远红, 等. *JNK1* 基因在金鱼性腺不同发育时期的表达分析[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(4): 6-10.]
- [18] Yang Q B, Ye L, Wen W G, et al. Effect of salinity on molting survival, growth and feed conversion rate of juvenile *Penaeus monodon*[J]. *South China Fisheries Science*, 2008, 4(1): 16-21. [杨其彬, 叶乐, 温为庚, 等. 盐度对斑节对虾蜕壳、存活、生长和饲料转化率的影响[J]. *南方水产*, 2008, 4(1): 16-21.]
- [19] He P, Jiang S G, Li Y D, et al. Molecular cloning and expression pattern analysis of GLUT1 in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2019, 15(2): 72-82. [何鹏, 江世贵, 李运东, 等. 斑节对虾 GLUT1 基因 cDNA 的克隆与表达分析[J]. *南方水产科学*, 2019, 15(2): 72-82.]
- [20] Ye L, Jiang S G, Zhu X M, et al. Effects of salinity on growth and energy budget of juvenile *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2009, 290(1-2): 140-144.
- [21] de la Peña L D, Cabillon N A, Catedral D D, et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 116(3): 251-254.
- [22] Yang L S, Li X L, Jiang S, et al. Characterization of Argonaute2 gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and its responses to immune challenges[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 261-269.
- [23] Qin Y K, Jiang S G, Huang J H, et al. C-type lectin response to bacterial infection and ammonia nitrogen stress in tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 90: 188-198.
- [24] Zhu D D, Yang L S, Huang J H, et al. The comprehensive expression analysis of the G protein-coupled receptor from *Penaeus monodon* indicating it participates in innate immunity and anti-ammonia nitrogen stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 75: 17-26.
- [25] Chen Y H, Lian Y Y, He H H, et al. Functional characterization of an ER-stress responding Crustin gene in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 541-550.
- [26] Wang P H, Wan D H, Gu Z H, et al. Analysis of expression, cellular localization, and function of three inhibitors of apoptosis (IAPs) from *Litopenaeus vannamei* during WSSV infection and in regulation of antimicrobial peptide genes (AMPs)[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e72592.
- [27] Qu F F, Xiang Z M, Xiao S, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in immune defense against bacterial infection in *Crassostrea hongkongensis*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 93: 103-114.

- parative Immunology, 2017, 67: 77-85.
- [28] Shi G F, Zhao C, Fu M J, et al. The immune response of the C-Jun in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) after bacterial infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 61: 181-186.
- [29] Barbieri E, Bondioli A C V, de Melo C B, et al. Nitrite toxicity to *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels[J]. Aquaculture Research, 2016, 47(4): 1260-1268.
- [30] Zhang T, Liu Y, Yang T, et al. Diverse signals converge at MAPK cascades in plant[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(5-6): 274-283.

## Characterization and expression analysis of *MKK7* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different stressors

FAN Hongdi<sup>1,2</sup>, LI Yundong<sup>2</sup>, YANG Qibin<sup>2</sup>, JIANG Song<sup>2</sup>, YANG Lishi<sup>2</sup>, HUANG Jianhua<sup>2</sup>, JIANG Shigui<sup>2</sup>, ZHANG Tangsheng<sup>3</sup>, ZHOU Falin<sup>2</sup>

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
3. Raoping Shengyuan Aquatic Breeding Farm, Raoping 515724, China

**Abstract:** *Penaeus monodon* is one of the most economically important cultured shrimp species in the world. However, the frequent occurrence of various shrimp diseases has brought severe economic losses to the aquaculture industry. Moreover, the growth and development of *P. monodon* are also affected by unstable aquaculture water. All of these restrict the healthy development of *P. monodon* aquaculture. Like other invertebrates, *P. monodon* only relies on innate immunity to protect itself from external invasion. Therefore, it is very important to analyze its immune response and salinity adaptation mechanisms. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a key regulator of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathway. It is involved in regulating cell response to a variety of extracellular stimuli. In this experiment, the full-length cDNA sequence of MKK7 (*PmMKK7*) of *P. monodon* was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology and the sequence was biologically analyzed. The full-length *PmMKK7* cDNA consisted of 2710 bp with a 1410 bp open reading frame, encoding 466 amino acids. In its conserved kinase domain, a serine/threonine protein kinase (S-TKc) region is a potential site for activation by upstream genes. The results of multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *PmMKK7* and *Litopenaeus vannamei* MKK7 genes were clustered together and had the highest homology: 99.14%. The quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis shows that *PmMKK7* was ubiquitously expressed in all tested tissues. The highest expression level was in muscle tissue and the lowest expression was in stomach tissue. Following a bacterial injection experiment, the groups infected with *Staphylococcus aureus* and *Vibrio anguillarum* had significantly higher expression in the hepatopancreas and gills than the control group ( $P < 0.05$ ). In the group Infected with the *V. harvey*, expression in both tissues was significantly lower than the control group. After low salinity (17, 3) stress, the expression levels of *PmMKK7* in hepatopancreas and gill tissues was significantly up-regulated. After the *PmMKK7* gene was silenced by interference, the mortality of *P. monodon* increased significantly under low salinity stress, and the expression of *PmJNK* in the downstream gene of the MAPK signaling pathway was inhibited. The results show that the JNK signal transduction pathway may play an important role in the immune defense and salinity stress tolerance of *P. monodon*. It is hoped that more studies on the JNK signaling pathway will be conducted in order to better understand the innate molecular immune mechanisms of *P. monodon*.

**Key words:** *Penaeus monodon*; MKK7 gene; gene cloning; low salinity stress; RNA interference

**Corresponding author:** ZHOU Falin. E-mail: zhoulalin@aliyun.com