

DOI: 10.12264/JFSC2022-0321

泥蚶 *JNK* 基因在哈维氏弧菌感染下的表达特征及其对激活蛋白-1 的调控分析

王秋金^{1,2}, 肖国强^{1,2}, 滕爽爽¹

1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 温州市海洋生物遗传育种重点实验室, 浙江 温州 325005;
2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 泥蚶(*Tegillarca granosa*)作为我国常见的滩涂养殖贝类, 具有较高的经济价值。以弧菌为代表的条件致病菌一直以来是困扰双壳贝类健康养殖的一大难题。为了探讨泥蚶感染弧菌过程中, c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)介导的激活蛋白-1(activating protein-1, AP-1)先天免疫防御通路的作用及机制, 本研究采用 PCR 技术克隆了泥蚶 *JNK* 基因(*TgJNK*)的 cDNA 序列, 并对 *TgJNK* 和 *TgAP-1* 在弧菌感染下的表达和调控关系进行了分析。结果显示, *TgJNK* 基因 cDNA 全长 2696 bp, 开放阅读框 1332 bp, 编码了 443 个氨基酸; 蛋白多重比较和邻近系统发育树分析表明, *TgJNK* 相对保守, 存在一个 STKc-JNK 结构域, 与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和紫贻贝(*Mytilus edulis*)的同源相似度较高。qRT-PCR 和 WB 结果表明 *TgJNK* 在泥蚶的鳃中表达最高。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的浸泡感染可显著上调 *TgJNK* 的转录水平($P<0.05$)和磷酸化水平, 并增加 *TgAP-1* 的蛋白丰度; JNK 抑制后 *TgJNK* 和 *TgAP-1* 的转录水平显著降低($P<0.05$), *TgJNK* 磷酸化水平和 *TgAP-1* 蛋白丰度也降低。CoIP 分析显示, 磷酸化的 JNK 蛋白能与 *TgAP-1* 蛋白相互结合。研究表明, *TgJNK* 和 *TgAP-1* 共同参与了泥蚶感染弧菌后的先天免疫反应, *TgJNK* 蛋白磷酸化是激活 *TgAP-1* 蛋白的重要因素, *TgJNK* 能够正向调控 *TgAP-1* 的表达。本研究阐明了泥蚶先天免疫通路 *JNK* 介导的 *AP-1* 途径在弧菌感染过程中的信号传递机制, 丰富了泥蚶等双壳贝类先天免疫理论知识。

关键词: 泥蚶; *JNK*; *AP-1*; 弧菌感染; 磷酸化调控

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)01-0060-15

c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)超家族成员之一, 对细胞表面受体到核内靶点的信号转导有重要意义^[1]。在哺乳动物中, *JNK* 由 *JNK1*、*JNK2*、*JNK3* 三种不同基因编码的亚型组成, 在进化上属于保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[1]。*JNK* 首先在大鼠的肝脏中发现, 通过 MAPK 信号诱导苏氨酸和酪氨酸残基磷酸化激活^[2]。磷酸化的 *JNK* 能够进一步激

活下游的转录因子 *AP-1*、*p53*、*ATF-2* 等^[3], 继而调控凋亡基因 *Bcl* 家族成员^[4], 炎症细胞因子 *TNF- α* 以及白细胞介素家族成员的表达^[5-8], 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫反应、炎症反应, 介导病原微生物感染后的免疫信号传递。*JNK1* 和 *JNK2* 表达广泛, 在各个组织均有表达, *JNK3* 仅在脑、神经、心脏及睾丸等组织特异性表达^[9]。已有研究表明, 在水产动物先天免疫防御系统中, *JNK* 发挥重要作用, 如凡纳滨对虾(*Litope-*

收稿日期: 2022-10-12; 修订日期: 2022-10-19.

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY23C190006); 台州市重大农业科技“揭榜挂帅”研发攻关计划项目(NYJBGS202203); 温州市农业新品种选育协作组项目(2019ZX001-1); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49).

作者简介: 王秋金(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向为贝类分子免疫学. E-mail: 979770397@qq.com

通信作者: 滕爽爽, 副研究员, 研究方向为滩涂贝类遗传育种. E-mail: 188175998@qq.com

naeus vannamei)的 *JNK* 基因能够调控抗菌肽的合成,被认为参与了对虾白斑综合征病毒(WSSV)的免疫抵抗^[10]。从中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中分离的 *JNK* 同源基因通过上调细胞防御素在清除体内细菌方面有重要意义^[11]。在双壳贝类长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[12]和厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)^[13]的研究中发现, *JNK* 通过 MAPK 信号通路磷酸化激活参与了宿主的免疫防御。

JNK 参与的先天免疫防御途径,主要通过调控下游转录因子实现。激活蛋白-1(AP-1)在哺乳动物细胞核内首次发现,属于碱性亮氨酸拉链(BZIP)转录因子家族,主要由 Jun (c-Jun, JunB, JunD)和 Fos(c-Fos, FosB, Fra1, Fra2)蛋白构成,具有多效性,在多种免疫应答中起重要作用^[14]。AP-1 的 Jun 结构域通常由 *JNK* 磷酸化激活^[15],激活的 AP-1 在形成二聚体后,从细胞质迁移到细胞核,结合特异性靶序列,调控免疫与炎症因子的转录,参与细胞的增殖、分化和凋亡进程^[14-16]。在哺乳动物中, *JNK* 介导的 AP-1 途径,能够调控血管内皮细胞中肿瘤坏死因子 TNF- α 的转录^[17]。从大鼠肝脏中提纯的 *JNK* 蛋白激酶,能够磷酸化 c-Jun,激活 AP-1 的表达^[18]。在甲壳动物中,南美白对虾的 *JNK* 通过激活 c-Jun 介导了 AP-1 与下游靶基因抗菌肽(*LvCrustin*)的结合^[19]。然而,泥蚶中是否存在 *JNK* 介导的 AP-1 途径尚不清楚。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国沿海主要养殖的经济贝类之一,作为生活在潮间带的滤食性贝类,对水体和淤泥内的各种病原体具有一定的抵抗能力,是贝类免疫学研究的一个重要物种。近年来,泥蚶全基因组的测序成功^[20],为滩涂贝类的分子免疫与遗传育种的研究提供了便利。本研究在泥蚶基因组内发现了一个 *JNK* 同源序列(*TgJNK*),通过弧菌浸泡感染、磷酸化抑制与检测等方法以及荧光定量、免疫印迹、蛋白质互作等技术,探索了泥蚶 *JNK* 介导的 AP-1 途径的激活机制与功能,以及该途径在弧菌感染后的免疫防御机制,为全面了解泥蚶先天免疫防御功能提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 泥蚶 *TgJNK* 基因的鉴定与生物信息学分析

TgJNK 序列来源于泥蚶基因组(JABXWC-000000000),根据其 cDNA 序列信息,设计引物(*JNK-F*, *JNK-R*;表 1),以泥蚶 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,送上海生工生物科技有限公司测序后,分别与泥蚶基因组和 NCBI 数据库中其它物种进行序列和蛋白比对,以确定 *TgJNK* 基因 cDNA 序列信息。*TgJNK* 的开放阅读框由 ORF Finder 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测; *TgJNK* 蛋白的保守区和功能域由 NCBI 蛋白质结构域分析网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)确定; *TgJNK* 蛋白磷酸化位点由 NetPhos 3.1 网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)定位。*TgJNK* 蛋白分子量由 ExPASy 分子生物学服务器(<https://www.expasy.org/>)计算。另外,参考 DNASTar 软件中的 Protean 子程序,对 *TgJNK* 蛋白的亲水性、疏水性、柔韧性以及抗原表位进行综合性分析。最后,采用 Clustalx 和 DNAMAN 进行蛋白多序列比对,并通过 Mega 6.0 软件构建邻近系统发育树。

1.2 动物与引物

泥蚶,壳长(33.98 $\pm$ 2.19) mm,取自浙江省温岭市城南镇,养殖在 1000 L 玻璃钢水槽中。从自然温度条件下升温,每天上升 2 $^{\circ}\text{C}$,直到温度维持在 28 $^{\circ}\text{C}$ 。每天换水一次,早晚各投喂一次足量的小褐藻(*Phaeophyta*),经过为期一周的暂养,随机取出 10 颗泥蚶,分别解剖取其鳃、足、闭壳肌、外套膜、肝胰腺以及血淋巴,存于-80 $^{\circ}\text{C}$,用于 *TgJNK* mRNA($n=5$)和蛋白($n=5$)的组织表达检测。本实验所用的引物均由 Primer 5.0 设计,并由上海生工生物科技有限公司合成(表 1)。

1.3 RNA 的提取与 cDNA 的合成

本实验中总 RNA 均按照 EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱,中国)方法提取。提取的 RNA 用超微量核酸计数分析仪 Nano-200 定量,并用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。根据 PrimeScriptTM RT reagent kit (TaKaRa, 日本)的方法逆转录合成 cDNA。

表 1 本实验所用的引物名称与序列信息
Tab. 1 Primer name and sequence information
used in the experiment

名称 name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 application	引物来源 source of primer
JNK-F	ATCATCACAGATACAGGAAC	克隆	自主设计
JNK-R	GAAACCAACAAACACACCAA	cloning	self-designing
18S-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	内参	[21]
18S-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCAC	internal reference	
β -actin-F	GCCGCTTCTTCATCCTCAT	内参	[22]
β -actin-R	GTCGGCAATACCTGGGAAC	internal reference	
TgJNK-F	ATGAGTAAACCAGCCCCCAAGT	荧光定量	自主设计
TgJNK-R	TCCAGTCCCTGAATCATAAGCG	qPCR	self-designing
TgAP-1-F	CAAGAAAGTGTCGAACGAG	荧光定量	[23]
TgAP-1-R	GGTCCCGTAAACTATTAGCTG	qPCR	

1.4 哈维氏弧菌浸泡攻毒

哈维氏弧菌菌株由 2014 年浙江滩涂大规模染病濒死泥蚶体内分离鉴定,并于-80℃保存。取出菌株划线于 2216E 培养斜面上,首先接种到 50 mL2216E 液体培养基内并于 28℃摇床培育 12 h,然后转移到 1 L2216E 液体培养基中扩大培养,最后使用弧菌计数标准曲线计算弧菌浓度^[24]。本实验设置的攻毒浓度为 1×10⁷ CFU/mL,攻毒温度为(28.0±0.5)℃。在攻毒期间每天定时更换一次砂滤海水并在投喂小硅藻 2 h 后重新加入弧菌。在感染后不同时间点(0 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h)分别取出 5 颗泥蚶的鳃组织,存于-80℃,用于分析 TgJNK 在感染后的表达模式。另外,在哈维氏弧菌攻毒后 0 h、12 h、24 h、48 h、72 h 从各个攻毒组,随机取出 5 颗泥蚶解剖,取出鳃组织,存于-80℃,用于检测 TgJNK 蛋白的磷酸化以及对 TgAP-1 蛋白表达的影响。实验设置对照组,对照组不添加弧菌,其他处理与攻毒组一致。

1.5 泥蚶 TgJNK 的注射抑制

称取 2.08 mg 的 JNK 抑制剂(SP600125, MedChemExpress, 美国)溶于 1 mL 的助溶剂(10% DMSO, 40% PEG300, 5% Tween, 45% 生理盐水)内,配置成 2.08 mg/mL 的 JNK 抑制剂母液。选取规格相近的泥蚶,根据泥蚶湿重,分别按照 5 mg/g、10 mg/g 的抑制浓度,肌肉注射 JNK 抑制剂溶液。对照组泥蚶注射等体积的助溶剂,空白

组泥蚶则不做任何处理。在完成注射后,将泥蚶干露 2 h 后放回砂滤海水中,保持水温为 25℃,并投喂足量的小褐藻。每天更换一次沙滤海水,并定时投喂饵料。分别于抑制后 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 从各个组随机挑选 5 颗泥蚶解剖,取出鳃组织,存于-80℃,采用 qRT-PCR 检测比较 JNK 的抑制效果。根据 JNK 的抑制效果,选取最佳的抑制浓度和抑制时间,分别从各个组随机挑选 5 颗泥蚶解剖,取出鳃组织,用于检测 TgJNK 蛋白的磷酸化以及对 TgAP-1 蛋白表达的影响。

1.6 荧光定量 PCR(Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

使用 TB Green Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)Kit (TaKaRa, 日本)提供的试剂和方法在 StepOnePlus Real-Time PCR 检测系统 (Applied Biosystems, 美国)中进行实时荧光定量聚合酶链式反应分析。TgJNK 的扩增引物 (TgJNK-F, TgJNK-R)如表 1 所示。使用两步法进行扩增:95℃预变性 30 s,PCR 反应共 40 个循环包括 95℃变性 5 s 以及 60℃退火与延伸 30 s,选用 18S rRNA 和 β -actin 作为内部参照,2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算 mRNA 相对表达水平。

1.7 蛋白免疫印迹(Western Blot, WB)

使用 RIPA 裂解液(碧云天,中国)裂解组织细胞,释放组织细胞内的蛋白,在得到蛋白样品后利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,中国)进行定量分析。根据 WB Kit (上海生工,中国)提供

的试剂和方法进行蛋白免疫印迹分析。将蛋白提取物稀释到相同浓度, 在 12% 的 SDS-PAGE 蛋白分离胶中分离出等量蛋白质并转移到 PVDF 膜上进行抗体孵育和染色。选用的一抗分别为 JNK 兔单克隆抗体(EPR5693, Abcam, 英国)、JNK 磷酸化抗体(sc-6254, Santa Cruz Biotechnology, 美国)以及 AP-1 鼠单克隆抗体(sc-376488, Santa Cruz Biotechnology, 美国)。选用的二抗分别为 HRP 标记的 IgG 兔和鼠, 以 α -tubulin 和 Tubulin (碧云天, 中国)作为内部参照。使用 ECL 发光液对膜上蛋白避光染色, 在化学发光成像仪(BIO-RAD, 美国)上进行曝光观察。

1.8 免疫共沉淀(Co-Immunoprecipitation, CoIP)

从 3 颗泥蚶鳃组织中收集适量的细胞($2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ cell/IP), 洗涤后, 加入预冷的免疫沉淀裂解液, 提取细胞蛋白, 并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, 中国)测定浓度, 取出总体积 1/10 的蛋白提取液, 作为 Input 对照。根据 PierceTM 交联磁珠式免疫沉淀试剂盒(Thermo Scientific, 美国)的方法, 将用于 IP 的抗体结合于蛋白 A/G 磁珠上。用于结合的抗体分别为 JNK 磷酸化抗体(sc-6254, Santa Cruz Biotechnology, 美国)、AP-1 单克隆抗体(sc-376488, Santa Cruz Biotechnology, 美国)以及 IgG 鼠源血清。将结合抗体的磁珠, 加入各 IP 组, 为检测 TgJNK 蛋白与 TgAP-1 蛋白的作用机制, 实验的 Input 参照组不加入任何抗体, 阴性对照使用与抗体来源相同的小鼠血清, CoIP 组分别选用 JNK 磷酸化抗体和 AP-1 抗体捕获目的蛋白。利用磁力架收集与抗体-抗原结合的磁珠, 经洗脱后, 进行 WB 检测。分别使用 AP-1 抗体和 JNK 磷酸化抗体检测 JNK 磷酸化抗体结合的抗原蛋白以及 AP-1 抗体结合的抗原蛋白。

2 结果与分析

2.1 TgJNK 的鉴定与特征分析

TgJNK 基因 cDNA 序列全长 2696 bp, 开放阅读框 1332 bp, 5'UTR 12 bp, 3'UTR 1352 bp, 编码 443 个氨基酸, 蛋白质等电点 6.38, 相对分子质量 50.62 kD (图 1)。该序列已上传到 NCBI 数据库 (GenBank: ON568697)。TgJNK 蛋白存在较多的

磷酸化位点, 其中丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)以及酪氨酸(Tyr)残基磷酸化程度较高(图 2)。TgJNK 的亲水残基多于疏水残基, 折叠区域分布均匀, 抗原表位较多(图 3)。TgJNK 蛋白与其他物种之间有着较高的相似性, 不同物种之间差异性较小, 且存在一个保守的 STKc-JNK 结构域(图 4)。系统发育树分析表明, TgJNK 被划分到无脊椎动物分支, 与厚壳贻贝、长牡蛎的同源性较高(图 5)。

2.2 TgJNK 的组织表达

TgJNK 的 mRNA 在泥蚶的 6 种组织(鳃、肝胰腺、血淋巴、足、外套膜、闭壳肌)中均存在表达。鳃、肝胰腺和血淋巴的表达水平较高, 显著高于足、外套膜和闭壳肌($P < 0.05$)。闭壳肌的表达水平最低, 显著低于其他 5 个组织($P < 0.05$) (图 6 A)。TgJNK 蛋白在泥蚶的鳃、肝胰腺和血淋巴中丰度较高, 在足、外套膜和闭壳肌中丰度较低(图 6 B)。TgJNK 的转录与翻译水平均在泥蚶的鳃组织内最高。

2.3 哈维氏弧菌攻毒后 TgJNK 和 TgAP-1 的响应变化

哈维氏弧菌感染后, 泥蚶鳃组织中 TgJNK 的 mRNA 表达水平随时间推移, 整体呈现先升高后下降的趋势(图 7 A)。在感染后的 24 h 内, TgJNK 的表达增加较快, 并在 24 h 达到峰值, 且显著高于对照组($P < 0.05$)。随后 TgJNK 的表达出现下降趋势, 但仍显著高于对照组($P < 0.05$)。泥蚶鳃组织中 TgAP-1 的 mRNA 表达水平同样在 24 h 达到峰值, 且显著高于对照组($P < 0.05$), 在 48 h 到 96 h 之间开始逐渐下降(图 7 B)。在弧菌感染后的不同时间内, 泥蚶 TgAP-1 的转录表达变化与 TgJNK 的变化趋势基本一致。另外, 在弧菌感染后选取 0 h、24 h、48 h、72 h, 对 TgJNK 的蛋白磷酸化水平进行测定, 与对照组(0 h)相比, TgJNK 蛋白磷酸化水平上升。TgAP-1 蛋白丰度随着 TgJNK 磷酸化水平的上升而增加(图 8)。

2.4 TgJNK 的抑制对 TgAP-1 的影响

为确保 JNK 抑制效率, 本实验设置了 2 个抑制浓度, 并在抑制后 96 h 内对 TgJNK 的表达进行检测(图 9)。结果表明, 5 mg/g 和 10 mg/g JNK 抑制浓度均能有效抑制 TgJNK 的表达, 且 10 mg/g

The green shaded part is marked as the predicted amino acid residue phosphorylation site.

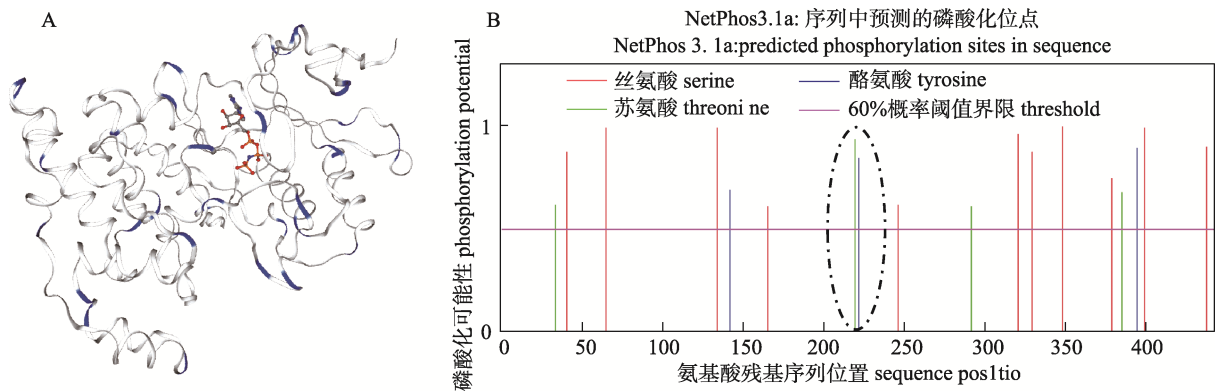


图 2 泥蚶 TgJNK 蛋白结构预测(A)以及磷酸化位点预测(B)分析
图 A 蓝色部分表示 Ser/Thr 磷酸化位点.图 B 统计预测值在 60%以上的氨基酸残基磷酸化位点, 黑色虚线圈出的部分为磷酸化抗体检测的两个磷酸化位点(220 Thr, 222 Tyr).

Fig. 2 The predicted structure (A) and phosphorylation site (B) of *Tegillarca granosa* TgJNK
The blue part of Figure A shows the Ser/Thr phosphorylation site. The amino acid residue phosphorylation sites with more than 60% reliability prediction are counted and the part circled by the black dotted line is the two phosphorylation sites (220 Thr, 222 Tyr) detected of Figure B.

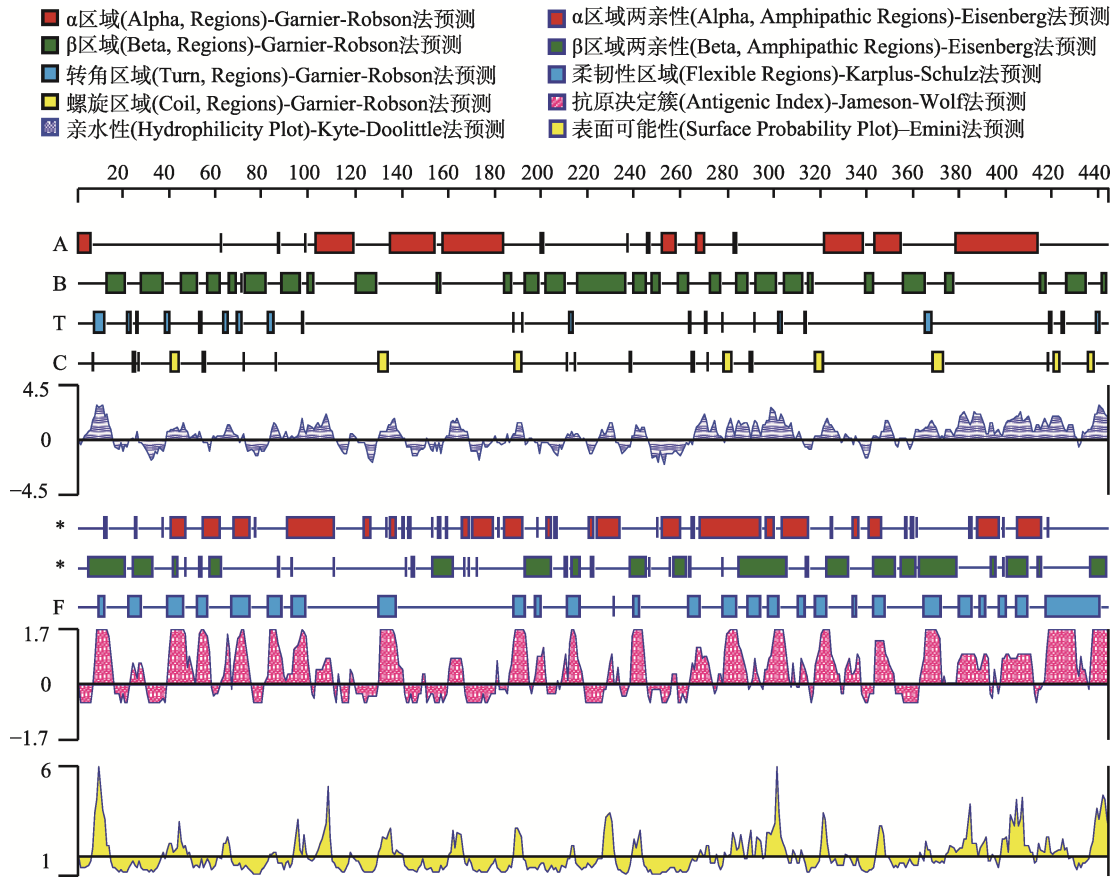


图 3 泥蚶 TgJNK 蛋白二级结构分析
紫色波峰为 TgJNK 蛋白亲水性分析, 峰型向上为亲水残基, 峰型向下疏水残基; 蓝色矩形部分为蛋白骨架柔韧性预测; 粉红色和黄色波峰部分为抗原决定簇和蛋白表位预测.

Fig. 3 The secondary structure analysis of *Tegillarca granosa* TgJNK
The purple peak is the hydrophilic analysis of TgJNK protein. The upward peak is hydrophilic amino acid residues and the downward peak is hydrophobic amino acid residues. The blue rectangular part is the protein folding region prediction, and the pink and yellow wave peak are the antigen epitope prediction.



(续图 continued)



图 4 JNK 蛋白多序列比对

黑色阴影为相似性 100% 的氨基酸残基；红色矩形框为 STKc-JNK 结构域；黄色多角星为本实验磷酸化抗体检测的两个磷酸化位点(220 Thr, 222 Tyr)；黑色箭头为 ATP 结合位点；绿色箭头为活性位点；蓝色箭头为多肽底物结合位点；红色箭头为 KIM 锚定位点；橙色箭头为活化环(A-loop)。

Fig. 4 The JNK protein multiple sequence alignment

The black shadow is the amino acid residue with 100% similarity; the red rectangle is the STKc-JNK domain; the yellow polyhedral star is the two phosphorylation sites (220 Thr, 222 Tyr) detected by the phosphorylated antibody in this experiment; the black arrow is the ATP binding site; the green arrow is the active site; the blue arrow is the polypeptide substrate binding site; the red arrow is the KIM docking site; and the orange arrow is the activation loop (A-loop).

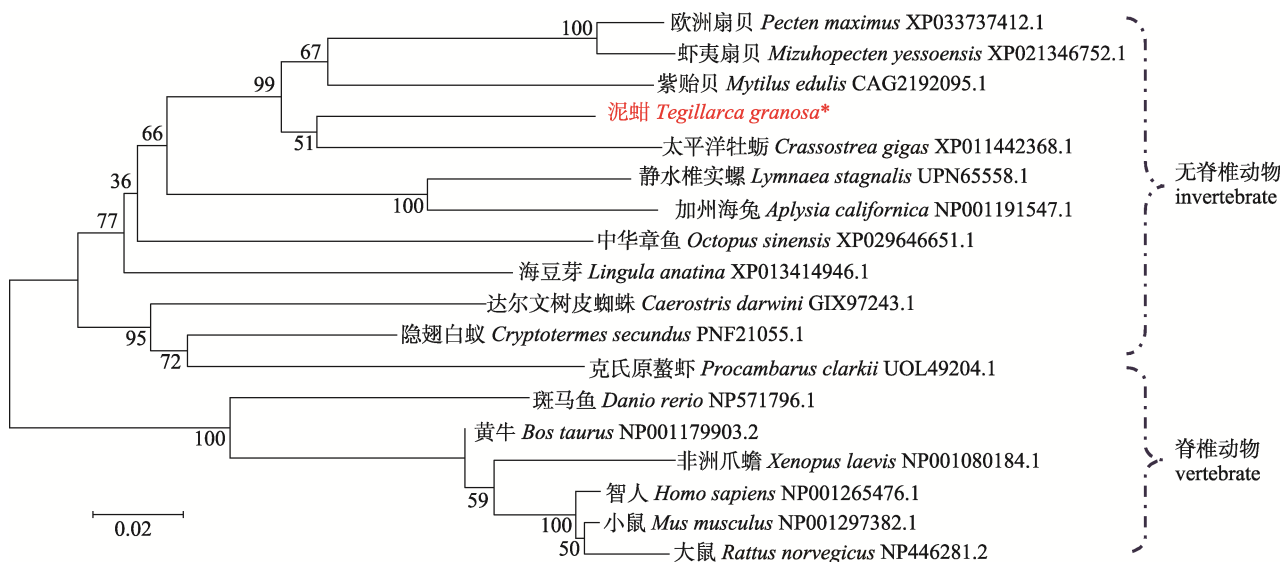


图 5 JNK 氨基酸序列邻近系统发育树分析

Fig. 5 Phylogenetic Tree Analysis of adjacent JNK Amino Acid sequences

的抑制效应时间更快, 持续时间更长。在注射抑制的 24~72 h 内, 抑制剂注射组 TgJNK 的表达显著低于空白组和对照组($P < 0.05$), 在 96 h TgJNK 的表达呈现回调趋势, 抑制效果减弱(图 9 A)。

同时, 为了探究抑制 JNK 基因表达对 TgAP-1 转录的影响, 检测了 TgAP-1 在 TgJNK 抑制后 96 h 内的表达情况。结果表明, 随着 TgJNK 的表达减少, TgAP-1 的表达亦降低; 特别是在注射了

10 mg/g 的 JNK 抑制剂组, TgAP-1 与空白、对照组相比下降了 1/2~2/3, 在抑制的 12~96 h 之间均出现显著降低($P < 0.05$)(图 9 B)。

在注射 JNK 抑制剂 48 h 后检测 TgJNK 蛋白的磷酸化水平以及 TgAP-1 的蛋白表达水平, 结果显示, 抑制组的 TgJNK 蛋白磷酸化水平和 TgAP-1 蛋白丰度与空白组、对照组相比均明显降低(图 10)。

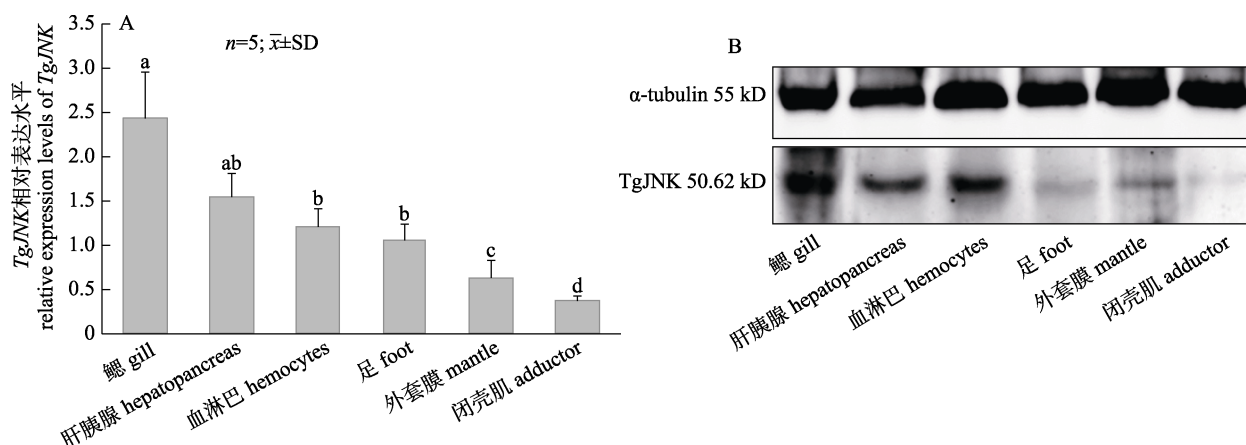


图 6 泥蚶 *TgJNK* mRNA(A)和蛋白(B)的组织表达

不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 6 Tissue expression of *Tegillarca granosa* *TgJNK* mRNA (A) and protein (B)
The different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

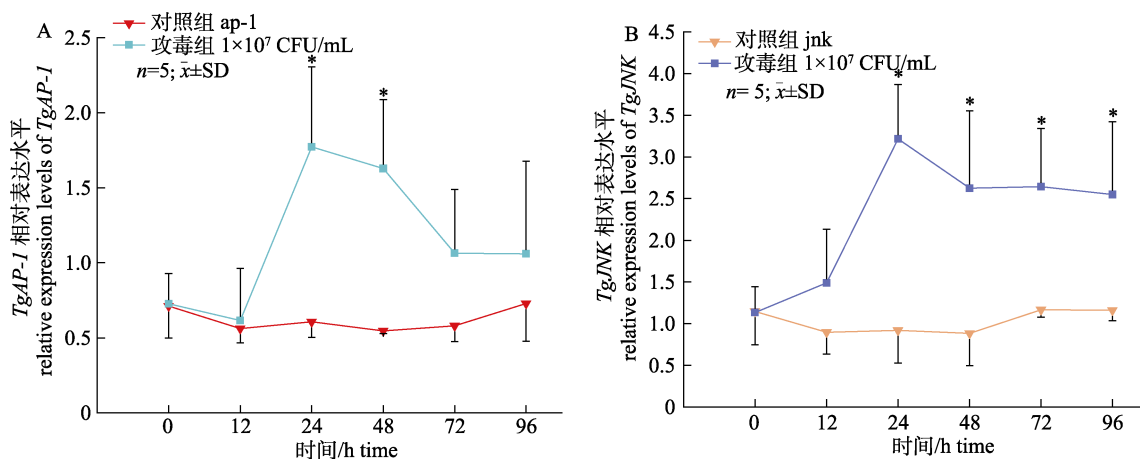


图 7 泥蚶感染弧菌后 *TgAP-1* (A)及 *TgJNK* (B)的表达变化

*表示同一时间点下对照组和攻毒组之间显著差异($P < 0.05$).

Fig. 7 The expression of *TgAP-1* (A) and *TgJNK* (B) in *Tegillarca granosa* after *Vibrio* infection
* indicated that there is a significant difference between the control group and the challenge group at the same time after infection ($P < 0.05$).

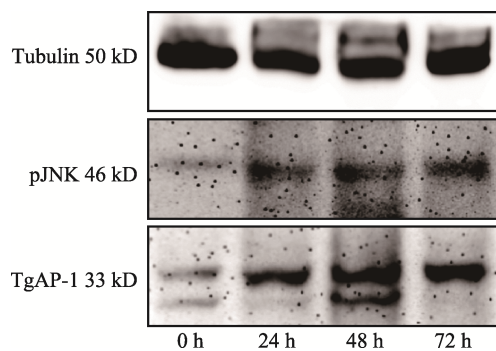


图 8 *TgJNK* 蛋白磷酸化水平及 *TgAP-1* 蛋白表达在弧菌感染后的变化

Fig. 8 Changes of *Tegillarca granosa* *TgJNK* protein phosphorylation level and *TgAP-1* protein expression after *Vibrio* infection

2.5 *TgJNK* 与 *TgAP-1* 的结合鉴定

经 AP-1 抗体富集到的抗原蛋白中, 存在磷酸化的 *TgJNK* 蛋白特异性条带。通过 JNK 磷酸化抗体富集到的抗原蛋白中, 存在 *TgAP-1* 的特异性蛋白条带。以鼠源血清为阴性对照的 IgG 组, 均未出现蛋白条带, Input 组内存在 *TgJNK* 磷酸化蛋白以及 *TgAP-1* 蛋白条带(图 11)。

3 讨论

3.1 *TgJNK* 序列及蛋白结构鉴定分析

本研究从泥蚶基因组内鉴定并克隆到 *JNK* 基因 cDNA 序列, 其开放阅读框 1332 bp, 编码一个

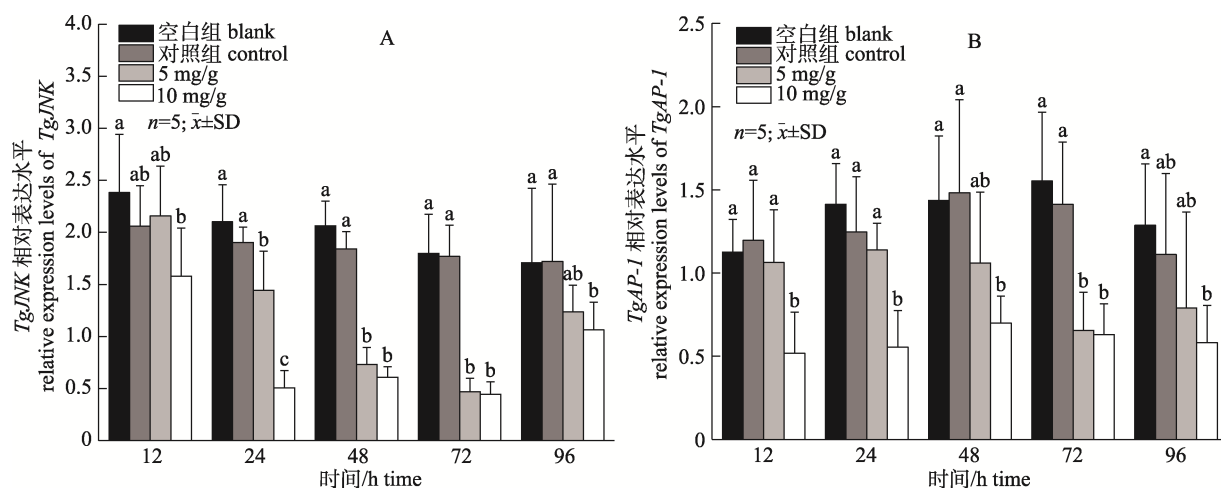


图 9 注射 JNK 抑制剂后泥蚶 TgJNK(A)和 TgAP-1(B)的表达变化

不同字母标记同一时间点不同实验组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 9 The expression changes of TgJNK (A) and TgAP-1 (B) in *Tegillarca granosa* after injection of JNK inhibitor. Significant differences are indicated with different letters among treatment groups at the same time ($P < 0.05$).

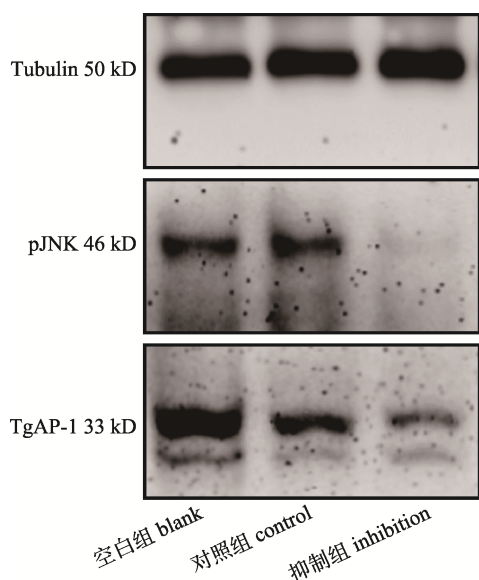


图 10 JNK 抑制下 TgJNK 的磷酸化水平以及 TgAP-1 蛋白的表达变化

Fig. 10 The phosphorylation level of TgJNK and the expression of TgAP-1 protein under the inhibition of JNK

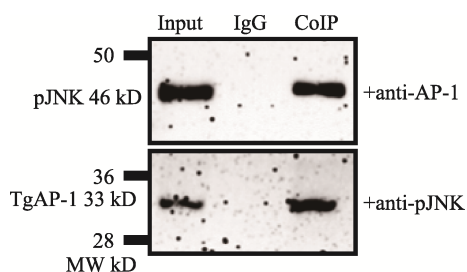


图 11 泥蚶 JNK 蛋白与 AP-1 蛋白的结合关系

Fig. 11 Binding relationship between JNK protein and AP-1 protein in *Tegillarca granosa*

由 443 个氨基酸残基组成的蛋白质。TgJNK 为亲水性蛋白, 柔韧区分布均匀, 不易断裂, 抗原区与表位区多有重叠, 有助于抗原抗体的自由结合。TgJNK 蛋白包含 11 个丝氨酸(Ser)、4 个苏氨酸(Thr)以及 3 个酪氨酸(Tyr)残基磷酸化位点。其中 Thr(220)和 Tyr(222)残基磷酸化位点, 与小鼠的 Thr(183)和 Tyr(185)残基磷酸化位点对应, 该氨基酸残基在哺乳动物中已被证明可由丝裂原活化激酶(MAPK)途径磷酸化激活^[25-26]。蛋白多序列比对以及邻近系统发育树分析表明, TgJNK 蛋白归属于无脊椎软体动物分支, 与厚壳贻贝的同源性较高, 约 87.72%, 与哺乳动物小鼠的同源性较低, 约 79.35%。TgJNK 蛋白具有一个典型的 STKc-JNK 结构域, 该结构域占 JNK 蛋白结构的 75.9%, 同源相似率大于 97%。在进化上, 泥蚶的 JNK 蛋白与其它真核生物相似, 同样属于保守的 MAPK 信号激酶家族。TgJNK 蛋白结构域包含一个由 20 个氨基酸残基组成的 ATP 结合位点, 一个由 36 个氨基酸残基组成的活化位点, 一个由 12 个氨基酸残基组成的多肽底物结合位点, 一个由 13 个氨基酸残基组成的 KIM 锚定位点以及一个由 20 个氨基酸残基组成的活化环(A-loop), 与中华绒螯蟹的 JNK 蛋白结构相同^[27]。其中 ATP 结合位点与活化位点多有重叠, 表明 TgJNK 蛋白活化是由 ATP 提供磷酸基团并释放能量的过程。活化环(A-loop)在 MAPK 家

族内均有存在,对激活作用的调节有重要意义^[28]。另外, JNK 蛋白可通过多肽底物结合位点和 KIM 锚定位点与不同的蛋白底物结合,如去磷酸化酶、磷酸化酶、支架蛋白以及激活蛋白激酶等^[29]。值得注意的是,泥蚶的 Thr (220)和 Tyr(222)残基磷酸化位点均位于蛋白多肽结合区与活化环的重叠部分,此部分磷酸化位点以及结构域可能是 TgJNK 蛋白磷酸化的核心功能区。该核心区的作用与功能,有待进一步通过定点敲除和去磷酸化等方法加以验证。

3.2 TgJNK 组织表达分析

JNK 在小鼠(*Mus musculus*)^[30]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[31]、果蝇(*Drosophila*)^[32]等不同模式生物中均有表达。实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹 WB 显示, TgJNK 在泥蚶的 6 种组织中同样存在表达,其中鳃、肝胰腺和血淋巴的表达水平较高,与斑节对虾(*Penaeus monodon*)的表达模式一致^[33]。双壳贝类的鳃、肝胰腺以及血淋巴是病原微生物最易富集的部位^[34]。在病原菌的攻击下,文蛤的鳃丝粘连断裂、细胞脱落、内腔间隙增大,充血严重,炎症反应加剧^[35]。鳃细胞的凋亡与坏死以及鳃组织的损害将直接抑制生物的呼吸作用,破坏机体内离子平衡,最终导致生物体患病死亡。鳃作为无脊椎贝类先天免疫防御的第一道屏障,在气体交换,维持渗透压平衡以及抵抗病原入侵的免疫进程中发挥重要作用^[36]。推测, JNK 在泥蚶鳃内的高表达,同样是一种炎性应激的表现。肝胰腺是无脊椎动物非特异性免疫器官之一,对病原菌的入侵较为敏感,容易在感染后出现脂滴累积和细胞质溶解现象,造成机体消化代谢紊乱^[35]。无脊椎动物的肝胰腺可通过调控免疫、抗氧化相关酶活,参与机体的免疫反应,在维持机体内环境与生理代谢稳定方面具有重要作用^[37-38]。另外,泥蚶的血淋巴与肝胰腺相似,是双壳贝类体液免疫的重要组成部分,同样可通过凝集素、抗菌肽、溶酶体蛋白酶与免疫效应因子协同,共同参与对病原微生物的清除作用^[39]。同时,泥蚶的血细胞通过包埋、吞噬、结节、凝块等方式参与病原入侵的细胞免疫反应,血红蛋白在杀灭细菌方面亦有重要意义^[40]。中华绒螯蟹的 JNK 的重组蛋白,

上调了抗菌肽的表达,加速了血淋巴和肝胰腺内细菌的清除^[11]。因此, JNK 在泥蚶肝胰腺和血淋巴内的高表达,表明 TgJNK 可能参与了对病原微生物清除的免疫进程。

3.3 TgJNK 与 TgAP-1 在弧菌感染后的响应变化分析

TgJNK 和 TgAP-1 在弧菌感染 24 h 内转录水平显著升高,且均在 24 h 达到峰值,在随后的 48 h 至 96 h 之间逐渐下降。泥蚶 TgJNK 与 TgAP-1 在弧菌感染后的表达模式分别与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[41]在感染白斑病毒(WSSV)后 JNK 的表达以及近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)^[42]在感染溶血葡萄球菌(*Salmo haemolyticus*)后 AP-1 的表达变化一致。参考杨千元等^[24]对泥蚶感染哈维氏弧菌后不同组织的载菌量变化趋势,推测在感染初期,由于环境内弧菌突然增多,泥蚶的应激免疫反应强烈, TgJNK 和 TgAP-1 转录增多,加快了免疫相关因子的表达,随着感染时间的增加,泥蚶体内的弧菌不断被免疫系统清除,组织内的载菌量下降,泥蚶对环境内的弧菌逐渐适应,应激免疫反应降低, TgJNK 和 TgAP-1 转录开始下降。据报道,肺炎克雷伯菌(*Klebsiella Pneumoniae*)诱导人支气管上皮细胞 JNK 和 AP-1 的表达上调,并促使 JNK 和 AP-1 磷酸化,加强了 AP-1 对 β -防御素-3 的调控信号,共同参与了对细菌性肺炎的免疫防御^[43]。在哺乳动物中,细胞外病原信号可促使 JNK 磷酸化,并激活下游转录因子 AP-1 向核内迁移,参与对免疫与炎症相关基因的调控^[3,15]。因此,在泥蚶感染弧菌后, TgJNK 和 TgAP-1 的表达上调, TgJNK 蛋白磷酸化增加, TgAP-1 的蛋白丰度增加,表明 JNK 介导的 AP-1 途径同样参与了泥蚶的先天免疫反应。

3.4 TgJNK 对 TgAP-1 的免疫调控分析

磷酸化修饰是生物体内常见的蛋白共价修饰方式之一,该方式能够迅速且持续的对外界刺激做出反应,对于酶和其它蛋白分子活性的发挥以及细胞信号转导存在重要意义。MAPK 信号通路的激活由细胞内磷酸化级联反应实现, JNK 作为 MAPK 家族成员之一,可同时被 MEK4/7 通过苏氨酸和酪氨酸的双重磷酸化激活。活化的 JNK 在

信号转导中, 使 c-Jun 磷酸化来激活 AP-1, 进而调节 AP-1 蛋白的活性, 参与对免疫、炎症相关基因的转录调控。通过敲降斑节对虾(*P. monodon*) MAPK 家族激酶 MEK7 的表达, 可降低 JNK 的活性^[44]。Bao 等^[45]研究发现, 腺苷激动剂可以使 JNK 蛋白的磷酸化增强, 其下游的 c-Fos 和 c-Jun 的蛋白质水平升高, c-Fos 和 c-Jun 结合在 Foxp3 的启动子区, 促进 Foxp3 在细胞中的表达。本研究中弧菌感染能够上调 TgJNK 表达, 促使 TgJNK 磷酸化, 诱导 TgAP-1 的表达增加; 采用 SP600125 抑制 JNK 活化后, TgJNK 的表达和磷酸化水平均降低, TgAP-1 的转录和翻译水平也相应减少; CoIP 分析证实, 磷酸化的 TgJNK 蛋白能与 TgAP-1 蛋白相互结合; 上述结果表明 JNK/AP-1 途径在弧菌刺激的免疫反应调控中发挥关键作用。Brandt 等^[46]发现 JNK/c-Jun/AP-1 信号通路在半乳凝素-1 刺激的 T 细胞死亡调控中发挥重要作用, 与本研究结果相似。综上所述, 泥蚶的 JNK 蛋白同样可能由 MAPK 传递的免疫信号磷酸化激活, 而磷酸化的 JNK 蛋白通过与 AP-1 蛋白的结合作用, 继续将免疫信号级联放大, 一方面上调了 AP-1 的表达, 另一方面被激活的 AP-1 将免疫信号传递到细胞核内, 并通过其转录激活作用, 调控免疫相关基因的表达。

4 结论

本研究结果表明, 泥蚶 *TgJNK* 基因相对保守与长牡蛎和厚壳贻贝亲缘关系较近, 存在一个典型的 STKc-JNK 结构域。泥蚶感染弧菌后, TgJNK 和 TgAP-1 表达上调, TgJNK 蛋白磷酸化增加。TgJNK 对 TgAP-1 的表达存在正向调控作用。磷酸化 TgJNK 蛋白与 TgAP-1 蛋白存在互作关系。TgJNK 通过磷酸化将免疫信号传递给 TgAP-1, 进而共同参与了泥蚶感染弧菌后的免疫防御进程。

参考文献:

- [1] Yao Y Q, Li X M. Progress in JNK signaling[J]. Chinese Journal of Coll Biology, 2005, 27(3): 242-246. [姚毓奇, 李晓玫. JNK 信号通路研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(3): 242-246.]
- [2] Kyriakis J M, Brautigan D L, Ingebritsen T S, et al. pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(16): 10043-10046.
- [3] Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1333(2): F85-F104.
- [4] Lin A N. Activation of the JNK signaling pathway: Breaking the brake on apoptosis[J]. BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, 2003, 25(1): 17-24.
- [5] Galcheva-Gargova Z, Dérjard B, Wu I H, et al. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells[J]. Science, 1994, 265(5173): 806-808.
- [6] Westwick J K, Weitzel C, Minden A, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(42): 26396-26401.
- [7] Nikulina M A, Sandhu N, Shamim Z, et al. The JNK binding domain of islet-brain 1 inhibits IL-1 induced JNK activity and apoptosis but not the transcription of key proapoptotic or protective genes in insulin-secreting cell lines[J]. Cytokine, 2003, 24(1-2): 13-24.
- [8] Perey A C, Weishaar I M, McGee D W. The effect of ROCK on TNF- α -induced CXCL8 secretion by intestinal epithelial cell lines is mediated through MKK4 and JNK signaling[J]. Cellular Immunology, 2015, 293(2): 80-86.
- [9] Bogoyevitch M A, Boehm I, Oakley A, et al. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: Basic science and therapeutic potential[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2004, 1697(1-2): 89-101.
- [10] Wang S, Li H Y, Weng S P, et al. White spot syndrome virus establishes a novel IE1/JNK/c-Jun positive feedback loop to drive replication[J]. iScience, 2020, 23(1): 100752.
- [11] Huang Y, Nie X M, Zhu Z J, et al. A novel JNK induces innate immune response by activating the expression of antimicrobial peptides in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Molecular Immunology, 2021, 138: 76-86.
- [12] Zhu B J, Wu X Z. Identification of outer membrane protein ompR from rickettsia-like organism and induction of immune response in *Crassostrea ariakensis*[J]. Molecular Immunology, 2008, 45(11): 3198-3204.
- [13] Betti M, Ciacci C, Lorusso L C, et al. Effects of tumour necrosis factor α (TNF α) on *Mytilus haemocytetes*: Role of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs)[J]. Biology of the Cell, 2006, 98(4): 233-244.
- [14] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1

- complex in cell-proliferation and transformation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1991, 1072(2-3): 129-157.
- [15] Karin M, Liu Z G, Zandi E. AP-1 function and regulation[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, 9(2): 240-246.
- [16] Li B S, Meng J, Li L, et al. Identification and functional characterization of the glycogen synthesis related gene glycogenin in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(35): 7764-7773.
- [17] Yin Y M, Wang S, Sun Y J, et al. JNK/AP-1 pathway is involved in tumor necrosis factor- α induced expression of vascular endothelial growth factor in MCF7 cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2009, 63(6): 429-435.
- [18] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update[J]. *Physiological Reviews*, 2012, 92(2): 689-737.
- [19] Li M, Ma C X, Li H Y, et al. Molecular cloning, expression, promoter analysis and functional characterization of a new Crustin from *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 42-49.
- [20] Bao Y B, Zeng Q F, Wang J, et al. Genomic insights into the origin and evolution of molluscan red-bloodedness in the blood clam *Tegillarca granosa*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(6): 2351-2365.
- [21] Bao Y B, Wang Q, Liu H M, et al. A small HSP gene of bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against *Vibrio parahaemolyticus* and lipopolysaccharide[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 729-733.
- [22] Li C H, He J J, Su X R, et al. A Manganese superoxide dismutase in blood clam *Tegillarca granosa*: Molecular cloning, tissue distribution and expression analysis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 159(1): 64-70.
- [23] Wang Q J, Li M, Hu G Y, et al. Characterization of a novel activating protein-1 (AP-1) gene and the association of its single nucleotide polymorphisms with vibrio resistance in *Tegillarca granosa*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 124: 552-562.
- [24] Yang Q Y, Teng S S, Cai Y L, et al. Load variation of *Vibrio harveyi* in the blood clam *Tegillarca granosa*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(6): 1506-1513. [杨千元, 滕爽爽, 蔡逸龙, 等. 哈维氏弧菌浸泡感染下泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 不同组织弧菌载量的变化规律分析[J]. *海洋与湖沼*, 2021, 52(6): 1506-1513.]
- [25] Challa T D, Wueest S, Lucchini F C, et al. Liver ASK1 protects from non-alcoholic fatty liver disease and fibrosis[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2019, 11: e10124.
- [26] Fung T S, Liu D X. Activation of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway by coronavirus infectious bronchitis virus promotes apoptosis independently of c-Jun[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8: 3215.
- [27] Yang H D, Yu A Q, Lin H, et al. Molecular characterization and sub-cellular distribution of JNK and JIP4 protein kinases in spermatogenesis and acrosome reaction of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853 (Crustacea: Brachyura: Varunidae)[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2016, 36(5): 684-694.
- [28] Sun X, He Y, Hou L, et al. Myosin Va participates in acrosomal formation and nuclear morphogenesis during spermatogenesis of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(9): e12738.
- [29] Yang H D. Cloning and expression pattern of JNK and JIP4 in spermatogenesis and acrosome reaction in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2016. [杨洪丹. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) JNK 和 JIP4 的克隆及在精子发生和顶体反应过程中的表达模式分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2016.]
- [30] Kyriakis J M, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(28): 17355-17363.
- [31] Chen L L, Zou L J, Xiong Z, et al. The tissue-specific and temporal expression patterns of jnk3 gene in *Carassius auratus auratus* and *Danio rerio*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(2): 161-169. [陈丽莉, 邹立军, 熊振, 等. jnk3 基因在金鱼和斑马鱼不同发育时期胚胎与成体不同组织中的分化表达[J]. *水产学报*, 2011, 35(2): 161-169.]
- [32] Tang C C, Jia J. The research progress in *Drosophila* JNK signaling pathway[J]. *Journal of Biology*, 2019, 36(3): 78-82. [唐成晨, 贾佳. 果蝇 JNK 信号通路的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2019, 36(3): 78-82.]
- [33] 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.
- [34] Wang D P, Shi X M. Distribution and detection of pathogens in shellfish-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(10): 1304-1309. [王大鹏, 史贤明. 贝类中致病微生物的检测技术及其组织分布[J]. *微生物学报*, 2011, 51(10): 1304-1309.]
- [35] Yue X. *Vibrio* disease, anti-vibrio immunity and *Vibrio*-resistance selective breeding of clam *Meretrix meretrix*[D].

- Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011. [岳欣. 文蛤弧菌病的病原分析、免疫应答及抗性选育研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2011.]
- [36] Lichtenfels A J F C, Lorenzi-Filho G, Guimarães E T, et al. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 1996, 115(1): 47-60.
- [37] Cheng C, Xiao M, Li J, et al. Effects of *Aeromonas hydrophila* stimulation on immunity of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(4): 465-475. [程超, 肖敏, 李菁, 等. 嗜水气单胞菌刺激对中华绒螯蟹免疫的影响[J]. *水产科学*, 2020, 39(4): 465-475.]
- [38] Zhang M M, Ning J J, Xu S L, et al. Effect of *Vibrio alginolyticus* infection on immune function of *Charybdis japonica* hepatopancreas[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(12): 1863-1871. [张萌萌, 宁俊佳, 徐善良, 等. 感染溶藻弧菌对日本蟳肝胰腺免疫功能的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(12): 1863-1871.]
- [39] Zhu Z W, Xu L P, Wu X Z, et al. Morphological, structural characteristics and phagocytic and enzymatic activities of haemocytes in blood clam *Tegillarca granosa*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1494-1504. [朱泽闻, 徐立蒲, 吴信忠, 等. 泥蚶血细胞的形态结构特征及部分免疫功能[J]. *水产学报*, 2011, 35(10): 1494-1504.]
- [40] Wang Q. Molecular cloning, expression and immune-related research on the hemoglobin from blood clam *Tegillarca granosa*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [汪青. 泥蚶血红蛋白克隆、表达与免疫相关性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [41] Zhang Y B. Identification and functional characterization of *JNK/bcl-2* genes in swimming crab (*Portunus trituberculatus*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [张云滨. 三疣梭子蟹 *JNK/Bcl-2* 通路中相关凋亡基因的功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [42] Xiang Z M, Qu F F, Li J, et al. Activator protein-1 (AP-1) and response to pathogen infection in the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 83-89.
- [43] Xiao F, Hu Z, Yang J, et al. *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide activates AP-1 to induce expression of β -defensin-3 in human bronchial epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(4): 395-398. [肖非, 胡智, 阳君, 等. 肺炎克雷伯菌荚膜多糖激活 AP-1 诱导人支气管上皮细胞表达 β -防御素-3[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(4): 395-398.]
- [44] Fan H D, Li Y D, Yang Q B, et al. Characterization and expression analysis of *MKK7* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different stressors[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(7): 748-758. [范红弟, 李运东, 杨其彬, 等. 斑节对虾 *MKK7* 基因的克隆及在不同胁迫条件下的表达分析[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(7): 748-758.]
- [45] Bao R, Hou J, Li Y, et al. Adenosine promotes Foxp3 expression in Treg cells in sepsis model by activating *JNK/AP-1* pathway[J]. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(5): 2284-2292.
- [46] Brandt B, Abou-Eladab E F, Tiedge M, et al. Role of the *JNK/c-Jun/AP-1* signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death[J]. *Cell Death & Disease*, 2010, 1(2): e23.

Expression characteristics of the *JNK* gene in *Tegillarca granosa* infected by *Vibrio harveyi* and its regulation on activating protein-1

WANG Qiuji^{1,2}, XIAO Guoqiang^{1,2}, TENG Shuangshuang¹

1. Zhejiang Mariculture Research Institute; Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-Resource; Wenzhou Key Laboratory of Marine Biological Genetics and Breeding, Wenzhou 325005, China;
2. State-level Fisheries Science Experimental Teaching Demonstration Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Blood clam (*Tegillarca granosa*), as a common farmed bivalve in tidal flat shellfish, has high economic value. Conditional pathogenic bacteria, such as *Vibrio*, is a serious problem encountered in the healthy culture of bivalve shellfish. To explore the role and mechanism of JNK-mediated AP-1 innate immune defense pathway in the process of vibrio infection, the cDNA sequence of *TgJNK* was cloned by PCR, and the expression and regulatory relationship of TgJNK and TgAP-1 after vibrio infection were analyzed. The results showed that the full-length of the *TgJNK* cDNA sequence was 2696 bp with an open reading frame of 1,332 bp, encoding a 443 amino acid polypeptide. Multiple protein comparison and adjacent phylogenetic tree analysis showed that TgJNK was relatively conservative with a STKc-JNK domain and had high homologous similarity with *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*. The qRT-PCR and WB analysis showed that TgJNK was highly expressed in the gill. The level of TgJNK transcription was up-regulated significantly ($P < 0.05$) with immersion infection of *Vibrio harveyi*. At the same time, the phosphorylation level of TgJNK and the abundance of TgAP-1 protein increased under the stimulation of vibrio. The effect of the JNK inhibitor could significantly decrease the transcription level of TgJNK and TgAP-1 ($P < 0.05$). Correspondingly, the phosphorylation of TgJNK and the abundance of TgAP-1 protein decreased after JNK inhibition. In addition, CoIP analysis showed that the phosphorylated JNK protein could bind to TgAP-1 protein. These results indicated that TgJNK and TgAP-1 participated in the innate immune response of *Vibrio* infection in blood clams. The phosphorylation of TgJNK protein was an important factor in activating TgAP-1 protein, and TgJNK could positively regulate the expression of TgAP-1. The study elucidated the signal transduction mechanism of JNK-mediated AP-1 pathway after vibrio infection and enriched the theoretical knowledge on the innate immunity of bivalve shellfish.

Key words: *Tegillarca granosa*; *JNK*; *AP-1*; vibrio infection; phosphorylation regulation

Corresponding author: TENG Shuangshuang. E-mail: 188175998@qq.com