中国明对虾 MKK3 基因 cDNA 克隆及其在氨氮胁迫下的表达

姚万龙^{1,2},何玉英^{1,3},刘萍^{1,3},李健^{1,3},王清印¹

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室,中国水产科学研究院 黄海水产研究所,山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室,海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室,山东 青岛 266235

摘要:采用 RACE 技术克隆获得中国明对虾(Fenneropenaeus chinensis)丝裂原活化蛋白激酶激酶 3(MKK3)基因全长 cDNA 序列,并对该序列进行分析。结果表明,该基因全长为 1434 bp,开放阅读框长 1011 bp,5'非编码区长 33 bp, 3'非编码区长 390 bp,将该基因命名为 FcMKK3。推测该基因编码 336 个氨基酸,分子量为 37.89 kD,理论等电点为 6.08。同源性和系统进化分析表明,FcMKK3 基因与丽蝇蛹集金小蜂(Nasonia vitripennis)和地中海实蝇(Ceratitis capitata)的相似性分别为 69%和 68%,与其他节肢动物 MKK3 聚为一类。荧光定量 RT-PCR 结果表明,FcMKK3 基 因在肌肉中的相对表达量最高,其次为鳃。氨氮胁迫后该基因在中国明对虾肠、鳃、胃、心脏、肝胰腺、肌肉和 血细胞中的表达量均显著增加,并有不同的时空表达趋势,表明 FcMKK3 基因可能在中国明对虾应对非生物胁迫反应的过程中起着重要的作用。

关键词:中国明对虾; *MKK3* 基因; 氨氮胁迫; 基因克隆; 组织表达 中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2016)01-0034-10

中国明对虾(Fenneropenaeus chinensis)隶属 于节肢动物门(Arthropoda),是我国重要的经济养 殖虾类之一^[1]。近年来,随着沿海地区经济的发展 和陆源污染物的增加,养殖环境发生急剧变化,使 对虾的适应性降低^[2],其中残饵、虾体排泄物等有 机物质在海水中经微生物分解产生大量的氨态氮, 而高浓度氨态氮对虾体有致死作用^[3],并且当水体 中氨态氮的浓度达到一定值后,对虾将会处于一种 病理状态,超出机体的免疫调节限度,容易遭受病 原体感染而引起疾病^[4]。由此可见,氨态氮对中国明 对虾健康生长发育有着不可忽视的作用,深入研究 氨态氮对中国明对虾的影响具有极其重要的意义。

丝裂原活化蛋白激酶激酶 3 (Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 3, MKK3, 又被称为 MAP2K3) 是 p38 MAPK 信号转导通路的重要组成部分, 可

特异性地激活 p38 MAPK,从而调节应激反应^[5-7], 在炎症反应过程中起着重要作用^[8]。MKK3 在多种 组织中均有表达^[9]并且能被应激刺激激活^[10-11];大 量的体内外研究表明,MKK3 在非变应性炎症发生 发展过程中起着重要的作用^[12-14]。由此可见,MKK3 在生物体应对外界刺激以及炎症发生发展过程中起 着重要的作用。目前,关于MKK3 的研究主要在人^[15] 和小鼠^[16]中,在中国明对虾中未见报道。

本研究从本实验室构建的中国明对虾 cDNA 文库中筛选获得 *MKK3* 基因的 EST 序列,应用 RACE 技术,克隆得到该基因的全长 cDNA 序列, 并对其在氨氮胁迫(ammonia-N stress)后的中国明 对虾组织中的表达特征进行初步研究,以期为中 国明对虾 *MKK3* 基因的生物学功能研究提供理论 依据和技术支持,为 *MKK3* 基因在无脊椎动物中

收稿日期: 2015-02-03; 修订日期: 2015-04-14.

基金项目:国家虾产业技术体系项目(CARS-47);国家自然科学基金面上项目(31172401);青岛海洋科学与技术国家实验室螯 山科技创新计划项目(2015ASKJ02).

作者简介:姚万龙(1988-),硕士研究生,主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究. E-mail: wanlongyao@yeah.net

通信作者:王清印,研究员. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

的作用研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

健康的中国明对虾取自昌邑市海丰水产养殖 有限责任公司培养的'黄海 3 号',体长(74.97± 7.54) mm,体重(5.34±1.67)g,于200 L 的 PVC 桶 中进行暂养,每桶 30 尾,暂养 1 周。养殖水温 25℃,盐度 24, pH8.4,持续充氧,每天换水 1/3, 并正常投喂配合饲料。

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; SMART[™] RACE Amplification Kit 购自 Clontech 公司; DEPC 水、LA Taq、PMD18-T 载体、Top 10 感受态细胞 和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™]均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒及实验所用引物均由生工生物工程 (上海)股份有限公司(下文简称上海生工)合成; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

取健康中国明对虾肝胰腺, 在液氮中进行研磨, 然后按 Trizol 试剂法提取总 RNA, 提取的 RNA 质量及完整性通过紫外分光光度计与 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测。挑选质量及完整性较 好的 RNA 用 SMARTTM RACE Amplification Kit 试剂盒分别反转录合成 3'RACE 和 5'RACE cDNA 第一条链。

1.3 中国明对虾 MKK3 基因全长 cDNA 克隆及测序

根据本实验室已构建的中国明对虾 cDNA 文 库随机测序获得的一段 *MKK3* 基因的 EST 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物,引物由上海生工合成。

	表Ⅰ 本研究所用 引物序列
Tab.1	The sequences of primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')
MKK3-F1	CTATGAATGGGCAGGATGTCG
MKK3-F2	ACTGGGTCGTGGAGCCTACGGTGT
MKK3-F3	ACCGTGATGTGAAACCATCC
MKK3-R1	CAAAGTCGCACATCTTCACC
MKK3-R2	TACTCGTGGATAAAACTTGTC
MKK3-R3	CGATATGCCAAGTGACCACA
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
β -actin-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGA
β-actin-R	TTCTCCATGTCGTCCCAGT
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
M13-R	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA

3'RACE: 以 SMARTTM RACE Amplification Kit 反转录合成的 3'RACE cDNA 第一链为模板, 用引物 MKK3-F1 和通用引物 UPM 配对,进行 3' 端第一次扩增。反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 59.0℃退火 30 s, 72℃延伸 1.5 min, 35 个循环; 70℃延伸 10 min。接着用引物 MKK3-F2 和通用引物 NUP 配对,以 3'RACE 第一次扩增产 物为模板进行 3'RACE 第二次扩增。反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 65.5℃退火 30 s,

72℃延伸 1.5 min, 35 个循环; 70℃延伸 10 min。

5'RACE: 以 SMARTTM RACE Amplification Kit 反转录合成的 5'RACE cDNA 第一链为模板, 用引物MKK3-R1和通用引物UPM,进行5'RACE 第一次扩增;然后使用引物 MKK3-R2 和通用引 物 NUP, 以 5'RACE 第一次扩增产物为模板进行 5'RACE 第二次扩增。反应程序除退火温度外,其 余同 3'RACE (5'RACE 第一次扩增 56.0℃退火 30 s; 5'RACE 第二次扩增 52.0℃退火 30 s)。 RACE 扩增产物经 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测 后,用胶回收试剂盒回收目的片段,然后将目的 片段与 PMD18-T 载体进行连接,接着转化入 Top 10 感受态细胞,阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后(所 用引物为 M13-F 和 M13-R),送往上海生工进行 测序。

1.4 中国明对虾 MKK3 基因序列分析

利用 DNAStar 软件中的 SegMan 程序对测序 所得结果进行载体序列去除, 然后用 EditSeq 程 序进行开放阅读框的预测并翻译氨基酸。MKK3 基因的核苷酸序列及推导氨基酸序列使用 NCBI BLAST 进行相似性比对。利用 ProtParam 软件 (http://web.expasy.org/protparam/)进行蛋白质理化 性质预测、利用 SOPMA 软件(http://npsa-pbil. ibcp.fr/cgi-bin/npsa automat.pl?page=npsa sopma. html) 对蛋白质的二级结构进行预测、利用 TopPred1.10 软件(http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/ portal.pv?#forms:::toppred)进行蛋白疏水性和拓 扑结构预测分析,利用 TMpred 软件(http://www. ch.embnet.org/software/TMPRED form.html)进行 蛋白拓扑结构分析,利用 SignalP4.1 软件(http: // www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)进行信号肽预测, 利用 NCBI 网站保守结构域(CDD)数据库(http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) 进 行氨基酸序列的保守结构域预测。使用 Clustal X 软件对中国明对虾 MKK3 基因与其他物种的 MKK3 基因所翻译的氨基酸序列进行多重序列比 对,在此基础上采用 MEGA4.0 软件,以邻接法 (NJ)进行系统进化树构建。

1.5 氨氮胁迫实验

实验用 64 mg/L 的 NH₄Cl 海水溶液进行氨氮 胁迫实验(该浓度比 96 h半致死浓度高, 其存活率 在 10%左右)。实验前随机挑选暂养 7 d 的健康中 国明对虾 180 尾, 平均分为 2 组(氨氮胁迫组和空 白对照组), 每组 3 个平行。各组分别在实验开始 后的 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 取血液、鳃、肝胰脏、肌肉、胃、肠、心脏, 每 个时间点各取 6 尾, 保存于液氮, 用于 RNA 的提 取。此外, 另取 6 尾健康的中国明对虾的血液、 鳃、肝胰腺、肌肉、胃、肠、心脏和淋巴组织保存于液氮,用于 RNA 的提取,用以检测中国明对虾 *MKK3* 基因在不同组织中的表达水平。

1.6 MKK3 基因的表达分析

Trizol 试剂提取不同实验组中国明对虾各组织的总 RNA,反转录合成 cDNA,方法同韩俊英等^[17]。

根据已获得的中国明对虾内参基因 β-actin 和 *MKK3*基因全长序列,分别设计 1 对正反引物 (β-actin-F 和 β-actin-R、MKK3-F3 和 MKK3-R3), 对健康中国明对虾各组织及不同时间点氨氮胁迫 后的中国明对虾各组织中的 *MKK3*基因的相对表 达量进行检测。荧光定量 PCR 的扩增体系为 20 µL, 其中包括 SYBR Premix Ex Taq II (2×)10 µL, 正向 引物(10 µmol/L) 0.8 µL,反向引物(10 µmol/L) 0.8 µL, ROX Reference Dye II (50×) 0.4 µL, cDNA 模板 2.0 µL, 灭菌水 6.0 µL。反应程序为: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 1.0 min, 95°C 15 s。荧光定量 PCR 检测结果采用 2^{-ΔΔCI}方法进行分析,用 SPSS17.0 软件进行显著 性分析。

2 结果与分析

2.1 FcMKK3 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

利用 Trizol 试剂法提取获得的中国明对虾肝 胰腺总 RNA, 经紫外分光光度计检测, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀为 1.98, 表明 RNA 纯度较高; 经 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 18S 和 28S rRNA 条带 清晰, 完整性较好, 符合实验的要求(图 1)。以特 异性引物 MKK3-F1 和 MKK3-R1 与通用引物 UPM 以及 MKK3-F2 和 MKK3-R2 与通用引物 NUP 配对, 进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增, 扩增产 物分别测序后拼接, 获得中国明对虾 *MKK3* 基因 的全长 cDNA 序列, 命名为 *FcMKK3*, GenBank 登 录号为 KF994775。该基因全长 1434 bp, 包括 33 bp 的 5'端非编码区(5'UTR), 390 bp 的 3'端非编码区 (3'UTR)和 1011 bp 的开放阅读框(ORF)。3'端含多 聚腺苷酸的加尾信号 AATAA 和 PolyA 尾(图 2)。

氨基酸序列分析可知, *FcMKK3*基因编码一个由 336 个氨基酸残基组成的蛋白质,包括 38 个



图 1 中国明对虾总 RNA 2%琼脂糖凝胶电泳分析 Fig. 1 Analysis of total RNA from *Fenneropenaeus chinensis* by 2.0% agarose gel electrophoresis 碱性氨基酸(K, R), 42 个酸性氨基酸(D, E), 108 个 疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V), 80 个亲水性氨基 酸(N, C, Q, S, T, Y), 80 个带电荷氨基酸(D、E、R、 K), 其分子量为37.89 kD, 理论等电点为6.08, 脂 溶指数为 80.30, 为脂溶性蛋白质, 总平均疏水性 为-0.305, 为亲水性蛋白, 但亲水性不强。

利用在线工具 SOPMA 对 *FcMKK3* 基因编码 蛋白质的二级结构进行预测,结果显示,*FcMKK3* 预测蛋白包含 37.50%的 α 螺旋(alpha helix)、13.69% 的延伸链(extended strand)、3.87%的 β 转角(beta turn)和 44.94%的不规则卷曲(random coil)。

应用 TopPred 对 FcMKK3 预测蛋白进行疏水

1	ACA	TGGGG	GAAA	GAGG	GAAGI	ΓΑΤΑΟ	CATA	GCAA	AT A	IG CI	AT GO	GC CC	GA AG	CA A	AG A	GG A	AA G	GT C	CT G.	AC C	IC A	AA T	IC A	AG T	TC TC	CC G	AC A	AT CI	AG O	CT	96
									1	4 H	H (; I	R 1	I I	x i	R I	x	G I	P I	DI	_ 1	K I	FI	K I	F S	5 1	DI	N (Q I	Р	
97	GCA	CAG	ccc	GTT	GGT	ССТ	ССТ	AGA	GAC	CTA	GAC	AGT	AGA	ACC	ACC	ATA	ACT	ATG	AAT	GGG	CAG	GAT	GTC	GAA	GTT	TCA	GCA	GAC	GAC	TTG	186
	А	Q	Р	v	G	P	P	R	D	L	D	s	R	т	Т	I	Т	N	N	G	Q	D	٧	Е	v	s	A	D	D	L	
187	GAA	CTT	CTA	ACA	GAA	CTG	GGT	CGT	GGA	GCC	TAC	GGT	GTG	GTG	GAG	AAA	ATG	AGA	CAT	CGA	CCG	TCC	GAT	ACA	ATT	ATG	GCA	GTT	AAG	CGT	276
	E	L	L	т	E	L	G	R	G	A	Y	G	v	v	E	К	M	R	н	R	Р	s	D	т	I	M	A	v	К	R	
277	ATA	ACA	AGT	ACA	GTT	GAT	AGC	CGT	GAA	CAG	CAG	TAC	CTT	TTA	ATG	GAC	СТТ	GAT	GTT	тст	ATG	AGA	тст	GGA	GCA	TGT	сст	TAT	ACA	GTC	366
	T	т	s	т	v	D	s	R	E	۵	۵	Y	L	L	. <u> </u>	D	L	D	v	s	M	R	s	G	A	с	Р	Y	т	v	
367	CAT	ттс	TAT	GGG	GCA	TTG	TTC	CGG	GAC	GGA	GAC	GTC	TGG	ATT	TGT	ATG	GAG	GTC	ATG	GAG	ACT	тсс	TTG	IGAC	AAG		K3-R2 TAT	CCA	CGA	GTAL	456
207	н	۹۲. F	v	c	A	1	т П	R	n	G	n	v	w	т	c	M	R	v	w	F	т	s	T	n	ĸ	म	v	р	R	V	
457	TTC	404	CAA	000	СТС	ACT	ATC	тст	GAA	GAA	TTC	CTT		444	ATT	GCT	ТАС	тст	ста	GTC	AGT	000	TTA	CAC	тат		CAC	ACA	CAC	TTG	546
-57	F	T	0	000	1	T	T		F	F	F	1	6000		ліі т		v				01		116	u	- TAI	1	u	T	E SUD		540
547	r	1	NTC	ChC	L	I CAT	1		E	E	r AAT	L	OTT	ATT	1	- A	I	3	v	V CTC	3	MKK	L 3-R1	п	I	L CPC	<u>п</u>	TCC	E		626
547	AAA	GIC	AIC	CAC	CGI	GAI	616	AAA	CCA		AAI	AII		ATT	AAI	AGA	CGI	666	GAG	GIG	AAG	AIG	IGC	GAL		666	AII	100	GGA	IAI	030
(27	K	V	1	н	ĸ	U	V	K	P	5	N	1	L	1	N	ĸ	R	G	E	V	K	<u>M</u>	C	U	r	G	1	S	G	Y	70 (
637	CTG	GTA	GAC	TCA	GTG	GCC	AAA	ACA	GTA	CAA	GCT	GGA	TGT	AAA	ccc	TAT	ATG	GCT	CCA	GAG	CGA	ATA	GAT	CCA	CAA	GGA	GTT	CCC	TCG	GGG	726
	L	V	D	S	V	A	K	<u> </u>	V	Q	A	G	С	K	Р	Y	M	A	Р	E	R	I	D	Р	Q	G	V	Р	S	G	
727	TAT	GAC	ATC	CGA	TCT	GAT	GTG	TGG	TCA	CTT	GGC	ATA	TCG	ATG	GTG	GAG	ATA	GCT	ACG	GGT	AAA	TTT	CCC	TAC	AAG	TCC	TGG	GGA	ACT	CCA	816
	Y	D	I	R	S	D	V	Ŵ	S	L	G	I	S	M	V	E	I	A	<u>T</u>	G	K	F	Р	Y	K	S	Ŵ	G	Т	Р	
817	TTT	GAC	CAG	CTG	AAG	CAA	GTT	GTG	ATG	GAT	GCT	ССТ	CCA	CGG	CTG	CCA	GCT	GGA	ACC	TTC	TCC	CCA	GAC	TTT	GAT	AAT	TTC	ATA	GAA	CAA	906
	F	D	Q	L	K	Q	V	V	N	D	A	Р	Р	R	L	Р	A	G	Т	F	S	Р	D	F	D	N	F	I	E	ଢ	
907	GTC	CTT	GTG	AAG	GAC	TAC	AAA	CTT	CGG	CCA	AAC	TAC	ATG	CGT	CTC	CTT	GAA	CAC	CCT	TTT	ATT	GTG	GCA	CAT	GCC	AAC	AGT	CCA	AAT	GAT	996
	v	L	v	К	D	Y	K	L	R	Р	N	Y	M	R	L	L	E	Н	Р	F	I	V	A	Н	A	N	S	Ρ	N	D	
997	ACT	TTT	GCA	GAC	TTT	ATC	AAC	TCC	AAT	TTA	CCT	CCA	CTA	CCA	CAG	TGA	CGT	CAAG	CTCT	TTTA	GCAT	AGTT	GCCC	CCTT	TTTT	ATTT	гсстл	ATGAT	TTT	TTTGA	1100
	Т	F	A	D	F	I	Ν	S	N	L	Р	Р	L	Р	Q	*															
1101	TTT	TTTT	GATT	TTTT	TTTT	TTTT	TAA	TTAC	ATGTI	FACT	AATGI	TATT	ATTA	GATAT	TTAT	AATG	AGAA'	TTTT	TAT	TAAA	ΓΑΑΑ	GATT	TTAAT	rgaa'	TAGAC	CATG	TTTG	AAAGI	AGAA	тсстс	1220
1221	TTA	TGTT	TTGT	GTACI	IGTTI	TCAGT	IGTA	CAAA	TATCO	стсс	CAGGI	TACI	FAGAG	GTTT <i>I</i>	ATTG	ГААС	ATGT	ITTA	GGTA	TTAG	ACCC	TGT	GGTA	CAGA	ATCCI	[AGA]	IGAT(GCCA	CCAT	TTTGG	1340
1341	GTG.	AGTT	GTTG	AAGTI	IGTG	CTGTC	CCTT	GTGT.	AAAT	AGTTI	TTA	GAGT	ATA	TAA	AGCA	GCTT	ITTA	AAAA	AAAA		AAAA	AAAA	AAAA	AAA							1434
													_	_																	

图 2 中国明对虾 FcMKK3 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

细线方框内的 ATG 为起始密码, AATAA 为加尾信号, RACE 引物也用方框标出;终止密码子 TGA 由*标出;实线部分为 S-TKs 结构域,虚线部分为 EST 序列.

Fig. 2 The nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *Fenneropenaeus chinensis FcMKK3* gene Start codon (ATG), plus tail signal and the primers used for RACE are marked with filament boxes. Asterisk indicates stop codon (TGA). The S-TKs domain is underlined by solid line and the EST sequence is underlined by dotted line. 性和拓扑结构分析。结果显示,该预测蛋白为亲 水蛋白,没有跨膜结构域。同时应用 TMpred 和 SignaIP4.1 软件对 *FcMKK3* 预测蛋白进行拓扑结 构及信号肽分析,结果显示,该预测蛋白有 2 个 跨膜结构域(位于 146~167 和 234~153 氨基酸序 列),不含有信号肽序列。对 FcMKK3 预测蛋白保 守结构域预测结果显示,该蛋白存在 S-TKc(丝氨 酸/苏氨酸蛋白激酶催化区)保守结构域,且该蛋 白属于 PKc(蛋白激酶 c)超家族, PKc-MKK3 亚族。 2.2 *FcMKK3* 基因同源性分析

利用 NCBI BLASTP 软件对中国明对虾 FcMKK3 基因编码的氨基酸序列进行同源比对, 发现该序列与丽蝇蛹集金小蜂(Nasonia vitripennis)的相似性最高,为 69%。与其他无脊椎动物如 地中海实蝇(Ceratitis capitata)、小蜜蜂(Apis florea)、 家蝇(Musca domestica)、红带袖蝶(Heliconius melpomene)和致倦库蚊(Culex quinquefasciatus)的 MKK3 基因的相似性分别为 68%、67%、67%、66% 和 63%;与其他脊椎动物如八齿鼠(Octodon degus)、中华鳖(Pelodiscus sinensis)、小家鼠(Mus musculus)、牛(Bos taurus)、虎鲸(Orcinus orca)、 藏羚羊(Pantholops hodgsonii)、美国鼠兔(Ochotona princeps)、家绵羊(Ovis aries)和智人(Homo sapiens) 的 *MKK3* 基因的相似性分别为 62%、62%、61%、61%、61%、61%、61%、61%、61%和 61%。

利用 MEGA4.1 软件进行中国明对虾 FcMKK3氨基酸序列NJ系统进化分析,结果表明, 中国明对虾FcMKK3和其他节肢动物MKK3聚为 一类(图 3)。将中国明对虾*FcMKK3*基因编码的氨 基酸序列与丽蝇蛹集金小蜂、小蜜蜂、红带袖蝶、 致倦库蚊、小家鼠、藏羚羊和智人等动物的*MKK3* 基因的氨基酸序列进行比对发现,CDFGISGY LVDSVAKT基序高度保守(图 4)。

2.3 中国明对虾 MKK3 基因的组织表达分析

利用 RT-PCR 分析中国明对虾 *FcMKK3* 基因 在不同组织中的表达水平,结果表明,*FcMKK3* 基 因在肠、鳃、胃、心脏、淋巴、肝胰腺、肌肉和 血细胞中均有表达,其中在肌肉中的表达量最高, 是血细胞的 9.81 倍;其次为鳃、心脏和胃,分别 为血细胞的 3.75 倍、3.62 倍和 2.83 倍;在血细胞 中的表达量最少(图 5)。

中国明对虾氨氮胁迫后 *FcMKK3* 基因在各组 织中的相对表达量变化见图 6。结果显示,与对照 组相比,*FcMKK3* 基因相对表达量在肠、鳃、胃和 肌肉中呈现先上调后下调再上调的变化趋势,其 中肠中相对表达量在 6 h 和 96 h 达到最大值,分



图 3 利用 MEGA4.1 软件构建的基于 MKK3 氨基酸序列的 NJ 系统进化树 Fig. 3 NJ phylogenetic tree based on MKK3 amino acid sequences by MEGA 4.1



图 4 中国明对虾 FcMKK3 氨基酸序列与其他物种 MKK3 氨基酸序列比对 保守基序 CDFGISGYLVDSVAKT 以方框表示.

Fig. 4 Amino acid sequences alignment of *Fenneropenaeus chinensis* FcMKK3 with other species' MKK3 The conserve sequence CDFGISGYLVDSVAKT is marked with filament box.



图 5 中国明对虾 *FcMKK3* 基因在不同组织中的表达分布 Fig. 5 Distribution of *FcMKK3* gene expression in different tissues of *Fenneropenaeus chinensis*

别为对照组的 2.33 倍(*P*<0.01)和 2.49 倍(*P*<0.01); 鳃中的相对表达量在 6 h和 72 h达到最大值,分 别为对照组的 1.56 倍(*P*<0.01)和 2.34 倍(*P*<0.01); 胃中的相对表达量在 6 h和 72 h达到最大值,分 别为对照组的 2.99 倍(*P*<0.01)和 2.36 倍(*P*<0.01); 肌肉中相对表达量在 3 h和 48 h达到最大值,分 别为对照组的 1.56 倍(*P*<0.01)和 5.58 倍(*P*<0.01); 且在各时间点,氨氮胁迫组 *FcMKK3* 基因的相对 表达量均高于对照组。

与上述情况相反、与对照组相比、氨氮胁迫

后中国明对虾 *FcMKK3* 基因在心脏、肝胰腺和血 细胞中的相对表达量首先表现为下调趋势,且分 别在 3 h、3 h和 6 h达到最低,分别为对照组的 0.56倍(*P*<0.01)、0.26倍(*P*<0.01)和0.72倍(*P*<0.01); 随后,*FcMKK3* 基因的相对表达量出现上调,分别 在 48 h、6 h和 24 h达到最大值,分别为对照组的 2.16倍(*P*<0.01)、2.53倍(*P*<0.01)和1.19倍(*P*<0.05); 且 *FcMKK3* 基因的相对表达量总体呈现先下降后 上升再下降的变化趋势。

3 讨论

MKK3 基因的分子功能及机制等已得到较为 深入的研究,但主要来自人^[15]和小鼠^[16]等生物, 在应对外界刺激及炎症发生发展过程中起着重要 的作用,在甲壳动物中鲜有报道。本研究从本实 验室构建的中国明对虾 cDNA 文库中查找比对获 得中国明对虾 *MKK3* 基因一段 EST 序列,克隆获 得该基因全长,并命名为 *FcMKK3*。*FcMKK3* 基因 全长 1434 bp,其开放阅读框 1011 bp,编码一个由 336 个氨基酸组成的多肽。保守结构域分析表明, 该蛋白存在 S-TKc 保守结构域,属于 PKc 超家族, PKc-MKK3 亚族。经 BLASTP 比对,*FcMKK3* 基 因编码的蛋白质属于 MKK3 家族,且与其他无脊



图 6 氨氮胁迫后中国明对虾 *FcMKK3* 基因在各组织中不同时间的表达变化 A. 肠; B. 鳃; C. 胃; D. 心脏; E. 肝胰腺; F. 肌肉; G. 血细胞.

Fig. 6 Expression of *FcMKK3* gene in *Fenneropenaeus chinensis* after ammonia-N stress A. Intestine; B. Gill; C. Stomach; D. Heart; E. Hepatopancreas; F. Muscle; G. Hemocytes.

椎动物的 MKK3 具有高度的相似性(63%~69%)。 系统进化分析表明,中国明对虾 FcMKK3 与无脊 椎动物 MKK3 聚为一类。*MKK3* 是一个高度保守 的基因,已在多种动植物中分离出 *MKK3* 基因的 同源序列。同源序列分析表明,*FcMKK3* 基因编码 的氨基酸序列与其他物种一样高度保守,且 CDFGISG YLVDSVAKT 基序在无脊椎和脊椎动 物中均高度保守(图 6)。综上所述,可以确定该序 列为 *MKK3* 基因序列。

MKK3 基因的组织表达分布研究表明,在智 人的各组织中,*MKK3* mRNA 广泛表达^[15, 18],且 在骨骼肌中表达量较高,存在明显的组织差异 性。在中国明对虾中,*MKK3* 基因同样在各组织中 均有表达, Real-time PCR 结果显示,中国明对虾 *FcMKK3* 基因在肠、鳃、胃、心脏、淋巴、肝胰 腺、肌肉和血细胞中均有所表达(图 7),其中在肌 肉中的表达量最高,其次为鳃、心脏和胃,在血细 胞中的表达量最少,存在明显的组织差异性,这 可能与组织功能差异相关。

近年来,随着对 MKK3 基因研究的不断深入, 许多研究表明 MKK3 基因在生物体炎症发生发展 的过程中起着重要的作用。Inoue 等^[13]研究表明、 MKK3 在炎症性关节炎发生过程中对于调节 p38 活化作用起着关键作用; Fukuda 等^[19]的研究表明, 在多次低浓度链霉毒素给药的情况下, MKK3 在 白细胞调解胰腺损伤过程中起着至关重要的作用; Holand 等^[20]应用蛋白质组学研究 MKK3 在肺部 炎症中的作用、发现支气管哮喘与 MKK3 的超表 达有关。为研究中国明对虾 FcMKK3 基因在应对 外界刺激及所引发的炎症反应中的作用、本研究 采用 64 mg/L 的 NH₄Cl 海水溶液对中国明对虾进 行氨氮胁迫实验,结果表明,与对照组相比,实 验组中国明对虾肠、鳃、胃、心脏、肝胰腺、肌 肉和血细胞中 FcMKK3 的表达量均有明显的时间 差异。氨氮胁迫后 FcMKK3 的相对表达量在肠、 鳃、胃和肌肉中先上调后下调、在心脏、肝胰腺 和血细胞中相对表达量则先下调后上调、且各组 织中各时间点 FcMKK3 变化不尽相同, 其原因可能

是组织器官功能差异性所致^[21]。中国明对虾

FcMKK3 基因在各组织中的相对表达量无论是先 上调后下调(如肠、鳃等),还是先下调后上调(如 心脏、肝胰腺等),其总体趋势呈现出上调和下调 波动性反复变化的趋势,由此可推测,中国明对 虾 *FcMKK3* 基因在应对氨氮胁迫的反应过程中 起着重要作用。关于 *MKK3* 基因在虾类中的作用 机制方面的研究未见报道,而虾类 MKK3 是否 具有与其他动物 MKK3 相似的功能,有待进一 步的研究。

本研究成功克隆获得了中国明对虾 *FcMKK3* 基因的全长 cDNA 序列,并通过分析氨氮胁迫后 中国明对虾 *FcMKK3* 基因在肠、鳃、胃、心脏、 肝胰腺、肌肉和血细胞中基因的表达特征,推断 其可能在中国明对虾应对非生物胁迫过程中起着 重要的作用,为深入研究中国明对虾 *FcMKK3* 蛋 白特性及其在非生物胁迫应答反应中的作用的途 径和机理奠定了理论基础。

参考文献:

- Deng J H, Ye C C, Liu Y C. Bohai and Yellow Sea Prawns and Resource Management[M]. Beijing: China Ocean Press, 1990: 36-164. [邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤黄海的对虾及 其资源管理[M]. 北京: 海洋出版社, 1990: 36-164.]
- [2] Capy P, Gasperi G, Biémont C, et al. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites?[J]. Heredity, 2000, 85(2): 101–106.
- [3] Wickins J F. The tolerance of warm-water prawn to recirculated water[J]. Aquaculture, 1976, 9: 19–37.
- [4] Ha C X, Liu P, He Y Y, et al. Effect of ammonium chloride on immunity-related enzymes of "Huanghai No. 1" population of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(1): 34–40. [哈承旭, 刘萍, 何玉 英,等.氯化铵对"黄海一号"中国对虾免疫相关酶类的影 响[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 34–40.]
- [5] Raingeaud J, Gupta S, Rogers J S, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 7420–7426.
- [6] Tan Y, Rouse J, Zhang A H, et al. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2[J]. Embo J, 1996, 15(17): 4629–4642.
- [7] Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, et al. The p38/RK

mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor[J]. Embo J, 1996, 15(8): 1914–1923.

- [8] Pettus L H, Wurz R P. Small molecule p38 MAP kinase inhibitors for the treatment of inflammatory disease: novel structures and developments during 2006–2008[J]. Curr Top Med Chem, 2008, 8(16): 1452–1467.
- [9] Raingeaud J, Whitmarsh A J, Barrett T, et al. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(3): 1247–1255.
- [10] Cuenda A, Alonso G, Morrice N, et al. Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells[J]. EMBO J, 1996, 15(16): 4156–4164.
- [11] Cuenda A, Cohen P, Buée-Scherrer V, et al. Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38)[J]. EMBO J, 1997, 16(2): 295–305.
- [12] Inoue T, Hammaker D, Boyle D L, et al. Regulation of p38 MAPK by MAPK kinases 3 and 6 in fibroblast-like synoviocytes[J]. J Immunol, 2005, 174(7): 4301–4306.
- [13] Inoue T, Boyle D L, Corr M, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase 3 is a pivotal pathway regulating p38 activation in inflammatory arthritis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(14): 5484–5489.
- [14] Wang L, Ma R, Flavell R A, et al. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for Activation of p38 α and p38 δ MAPK Isoforms by TGF- β 1 in murine mesan-

gial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(49): 47257-47262.

- [15] Han J H, Wang X H, Jiang Y, et al. Identification and characterization of a predominant isoform of human MKK3[J]. FEBS Lett, 1997, 403(1): 19–22.
- [16] Sorkin L S, Boyle D L, Hammaker D, et al. MKK3, an upstream activator of p38, contributes to formalin phase 2 and late allodynia in mice[J]. Neuroscience, 2009, 162(2): 462–471.
- [17] Han J Y, Li J, Li J T, et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(8): 1130–1138. [韩 俊英,李健,李吉涛,等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基 因的克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1130–1138.]
- [18] Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, et al. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms[J]. Science, 1995, 267(5198): 682–685.
- [19] Fukuda K, Tesch G H, Yap F Y, et al. MKK3 signalling plays an essential role in leukocyte-mediated pancreatic injury in the multiple low-dose streptozotocin model[J]. Lab Invest, 2008, 88(4): 398–407.
- [20] Holand T, Riffo-Vasquez Y, Spina D, et al. A role for mitogen kinase kinase 3 in pulmonary inflammation validated from a proteomic approach[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2014, 27(2): 156–163.
- [21] Li M Y, Li J, Liu P, et al. Cloning and expression analysis of ferritin gene in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 306–312. [李美玉, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)ferritin 基 因克隆及表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 306–312.]

Cloning and expression analysis of the *MKK3* gene in *Fenneropenaeus* chinensis under ammonia-N stress

YAO Wanlong^{1, 2}, HE Yuying^{1, 3}, LIU Ping^{1, 3}, LI Jian^{1, 3}, WANG Qingyin¹

- 1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
- 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
- 3. Laboratory for Marine Fisheries and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266235, China

Abstract: We cloned the full-length mitogen activated protein kinase kinase 3 (MKK3) cDNA sequence using the rapid amplification of cDNA ends method to understand the physicochemical and functional characteristics of MKK3 in Fenneropenaeus chinensis. F. chinensis MKK3 was analyzed using a bioinformatics method to explore the sequence homology of MKK3 genes from different species. MKK3 gene expression levels were determined in different tissues by quantitative real-time polymerase chain reaction analysis before and after exposure to ammonia-N stress. The full-length cDNA sequence of the F. chinensis MKK3 gene (FcMKK3) was 1434 bp long and contained a 33 bp 5'-untranslated region (UTR), a 390-bp 3'-UTR, and a 1011-bp open reading frame that encoded 336 amino acid residues, with an isoelectric point (PI) of 6.08 and molecular mass of 37.89 kD. The homology analysis revealed that the FcMKK3 amino acid sequence had highly similarity with MKK3 of other species, such as 69% identity with Nasonia vitripennis MKK3 and 68% identity with Ceratitis capitata MKK3. The phylogenetic analysis showed that FcMKK3 was in the same class with other arthropod MKK3 genes. The FcMKK3 gene was expressed in intestine, gill, stomach, heart, lymph, hepatopancreas, muscle, and hemocytes, with significant differences in tissue expression levels. Relative expression of FcMKK3 in muscle was the highest, followed by the gill. FcMKK3 expression in hemocytes was the lowest. FcMKK3 expression after exposure to ammonia-N stress was initially upregulated in intestine, gill, stomach, and muscle and then downregulated, followed by upregulation. FcMKK3 expression reached the first peak at 6 h, 6 h, 6 h, and 3 h in intestine, gill, stomach, and muscle, respectively, which was 2.33-fold (P < 0.01), 1.56-fold (P < 0.01), 2.99-fold (P < 0.01), and 1.56-fold (P < 0.01) of the four tissues in control animals, respectively. The second peak was reached at 96 h, 72 h, 72 h, and 48 h, which was 2.49-fold (P < 0.01), 2.34-fold (P < 0.01), 2.36-fold (P < 0.01), and 5.58-fold (P < 0.01) more than those in the control group, respectively. Relative FcMKK3 expression levels in the experimental group were higher than those in the control group at all testing points. In contrast, relative FcMKK3 expression in heart, hepatopancreas, and hemocytes was downregulated initially and then upregulated. FcMKK3 expression was the lowest at 3 h, 3 h, and 6 h, which was 0.56-fold (P<0.01), 0.26-fold (P<0.01), and 0.72-fold (P<0.01) of the values in the three tissues from animals in the control group, respectively. Then, FcMKK3 expression was upregulated and reached peaks at 48 h, 6 h, and 24 h, which were 2.16-fold (P < 0.01), 2.53-fold (P < 0.01), and 1.19-fold (P < 0.05) of the control group values, respectively. In conclusion, relative FcMKK3 expression was upregulated significantly in intestine, gill, stomach, heart, hepatopancreas, muscle, and hemocytes compared with those in the control group after exposure to ammonia-N stress and showed different expression profiles. These results suggest that FcMKK3 might play important roles in the F. chinensis stress response.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; *MKK3* gene; ammonia-N stress; gene cloning; expression Corresponding author: WANG Qingyin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn