

## 中国明对虾 *MKK4* 基因克隆及其在氨氮胁迫下的表达分析

姚万龙<sup>1,2</sup>, 何玉英<sup>1</sup>, 刘 萍<sup>1</sup>, 李 健<sup>1</sup>, 王清印<sup>1\*</sup>

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

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

**摘要:** 为初步研究中国明对虾 *MKK4* 的生物学功能,采用 RACE 技术克隆获得中国明对虾 *MKK4* 基因全长 cDNA 序列,并对该序列进行分析。结果显示,中国明对虾 *MKK4* 基因全长为 2 064 bp,开放阅读框长 1 221 bp,5'非编码区长 214 bp,3'非翻译区长 629 bp。将该基因命名为 *FcMCK4*。推测该基因编码 406 个氨基酸,预测分子量为 45.94 ku,理论等电点为 8.50。同源性和系统进化分析发现 *FcMCK4* 与肩突硬蜱和印度跳蚤的同源性分别为 80% 和 78%,与其他节肢动物 *MKK4* 聚为一支。荧光定量 RT-PCR 结果表明,*FcMCK4* 基因在肌肉中的相对表达量最高,其次为肝胰腺。氨氮胁迫后该基因在中国明对虾肌肉、肝胰腺、血细胞、鳃、心脏、肠和胃中的表达量均显著增加,并有不同的时空表达谱式,表明 *FcMCK4* 可能参与中国明对虾非生物胁迫的应答反应。

**关键词:** 中国明对虾; *MKK4* 基因; 氨氮胁迫; 基因克隆; 组织表达

**中图分类号:** Q 785; S 966.1

**文献标志码:** A

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*), 隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、游泳亚目 (Natantia)、对虾科 (Penaeidae)、明对虾属 (*Fenneropenaeus*), 是我国重要的经济养殖虾类之一<sup>[1]</sup>。近年来,随着沿海地区经济社会的发展和陆源污染物的增加,使得养殖环境急剧变化,对虾的适应能力降低<sup>[2]</sup>,其中残饵、虾体排泄物等有机物在海水中经微生物分解后产生大量的氨氮等物质,而氨氮在高浓度时对虾体有致死作用<sup>[3]</sup>。孙舰军等<sup>[4]</sup>研究表明,氨氮可降低中国明对虾与抗病力有关的酶活力,从而降低其免疫能力,增加发生疾病的可能性;吴中华等<sup>[5]</sup>研究表明,高浓度的亚硝酸盐和氨可使中国明对虾肝胰腺、胃等组织发生异常变化,出现从细胞肿胀到空泡化、坏死等一系列的组织病理学变化;王娟等<sup>[6]</sup>的研究表明亚硝酸盐和非离子氨对中国明对虾具有一定的毒性,且非离子氨对中国明对虾的毒性大于亚硝酸盐;蒋玫等<sup>[7]</sup>的研究表明,氨

氮胁迫抑制糠虾幼体本身的生长代谢过程。由此可见,氨氮对中国明对虾免疫及变态等有着重要的影响,深入研究氨氮对中国明对虾的影响在理论和实践上都具有重要意义。

丝裂原活化蛋白激酶 4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4, *MKK4*, 又称 *MAP2K4*, *MEK4*, *JNKK1* 和 *SEK1*), 是 *MAPK* 信号转导通路的组成部分,最早是在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 中被克隆出来,并命名为 *XMEK2*<sup>[8]</sup>;随后在小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 中克隆并最终命名为 *MKK4*<sup>[9-11]</sup>。*MKK4* 能同时激活 *p38* 和 *JNK* 两条 *MAPK* 信号转导通路<sup>[12-14]</sup>, 将细胞外的刺激信号转导至细胞及其细胞核内,并引起细胞凋亡、炎症反应及肿瘤发生<sup>[15-18]</sup>。*MKK4* 参与许多生理及病理过程。研究表明, *MKK4* 在胚胎发育过程中起着重要作用,在小鼠胚胎发育的前 10 d, *MKK4* 只在中枢神经系统中有表达<sup>[19]</sup>;到胚胎期第 12 天, *MKK4* 在多种组织中表达,且在肝脏中表达最高。缺失 *MKK4* 基因

收稿日期:2014-10-27 修回日期:2015-03-23

资助项目:国家虾产业技术体系 (CARS-47);山东省自主创新专项 (2013CX02038);国家自然科学基金 (31172401)

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

的小鼠在胚胎第 11.5 ~ 13.5 天时死于贫血或非正常的肝脏发育<sup>[20]</sup>。同样, *MKK4* 与免疫系统、心脏病及癌症的发生有关。在 *MKK4* 缺失的小鼠体内, B 和 T 淋巴细胞系均受到损坏<sup>[21-22]</sup>。一些研究表明, *MKK4* 包含于特殊的肿瘤抑制信号通路中, 为抑癌基因<sup>[23-24]</sup>; 与此相反, 也有研究表明 *MKK4* 为致癌基因<sup>[25-26]</sup>。由此可见, *MKK4* 在生物的生长及免疫过程中起着重要的作用, 目前已在许多生物中对其进行了研究, 如人<sup>[10]</sup>、小鼠<sup>[9]</sup>、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)<sup>[27]</sup>、斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[28]</sup> 等, 但在中国明对虾中尚未见报道。

本研究从本实验室构建的中国明对虾 cDNA 文库中筛选获得 *MKK4* 基因的 EST 序列, 采用 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 *MKK4* 的生物学功能及其对氨氮抗性机理的研究提供理论依据和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国明对虾取自黄海水产研究所在昌邑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, 体质量 (5.34 ± 1.67) g。暂养于 200 L 的 PVC 桶中, 每桶 30 尾, 暂养 1 周。养殖水温 25 °C, 盐度 24, pH 8.4, 持续充氧, 每天全部换水, 并投喂配合饲料。

Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 购自 Clontech

公司; LA Taq、DEPC 水、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup>、pMD18-T 载体和 Top 10 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒及实验所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 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放入液氮中研磨, 按 Trizol 法提取总 RNA, 总 RNA 质量及完整性用紫外分光光度计与 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。利用 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 反转录合成 cDNA 第 1 条链。

### 1.3 中国明对虾 *MKK4* 基因 cDNA 全长克隆及测序

根据本实验室构建的中国明对虾 cDNA 文库随机测序获得的 *MKK4* 基因的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物, 所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

3'RACE 以 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 反转录合成的 cDNA 第 1 链为模板, 使用引物 MKK4-F1 和通用引物 UPM 配对, 进行 3'端第 1 次扩增。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 59.1 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 70 °C 延伸 10 min。接着使用 MKK4-F1 和通用引物 NUP 配对, 以第 1 次扩增产物为模板进行 3'RACE 第 2 次扩增。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 58.8 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 70 °C 延伸 10 min。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 The sequence of primers used in this study

引物 primer	序列 sequence(5'-3')
MKK4-F1	ACCTCCGCTTGCGGTTTC
MKK4-F2	ACCGTCCACAGAACAACCTT
MKK4-R1	ATCTTGTCAGAAATGCCGCT
MKK4-R2	ACCACACATCAGAGCGAACG
MKK4-R3	AAACCTCCTCTTCCAATCTCC
UPM (short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
$\beta$ -actin-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGA
$\beta$ -actin-R	TTCTCCATGTCGTCCCACT
M13-F	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA

5'-RACE 以 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 反转录合成的 cDNA 第 1 链为模板,使用引物 MKK4-R1 和通用引物 UPM,进行 5'-RACE 第 1 次扩增;然后使用引物 MKK4-R2 和通用引物 NUP,以第 1 次扩增产物为模板进行 5'-RACE 第 2 次扩增。反应程序同 3'-RACE。

RACE 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,用胶回收试剂盒回收目的片段,然后与 PMD18-T 载体进行连接,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),送往上海生工生物工程公司进行测序。

#### 1.4 中国明对虾 *MKK4* 基因序列分析

利用 DNASTar 软件中的 SeqMan 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。*MKK4* 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](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 SWISS-MODEL 软件 (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行蛋白质三级结构预测,利用 TopPred1.10 软件 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#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](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 *MKK4* 基因与其他物种的 *MKK4* 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 MEGA 4.0 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 NH<sub>4</sub>Cl 海水溶液进行氨氮胁迫实验(经预实验,此浓度位于 96 h 半致死与全致死浓度之间,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,平均分为两组(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、3、6、12、24、48、72 和 96 h 取血液、鳃、肝胰腺、肌肉、胃、肠、心脏,每个时间点每个平行各取 3 尾共 9 尾虾,保存于液氮中,用于 RNA 的提取。此外,为检测中国明对虾 *MKK4* 基因在不同组织中的表达水平,另取 9 尾健康中国明对虾的血液、鳃、肝胰腺、肌肉、胃、肠、心脏和淋巴组织保存于液氮中,用于 RNA 的提取。

#### 1.6 *MKK4* 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<sup>[29]</sup>。

根据已获得的中国明对虾内参基因  $\beta$ -actin 和 *MKK4* 基因全长序列,分别设计 1 对正反引物 ( $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R、*MKK4*-F2 和 *MKK4*-R3),对健康中国明对虾各组织及不同时间点氨氮胁迫的 *MKK4* 基因表达量进行检测。荧光定量 PCR 的扩增体系为 20  $\mu$ L,其中包括 SYBR Premix Ex Taq II (2  $\times$ ) 10  $\mu$ L,正向引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L,反向引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L,ROX Reference Dye II (50  $\times$ ) 0.4  $\mu$ L,cDNA 模板 2.0  $\mu$ L,DEPC 水 6.0  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 30 s;95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 34 s,40 个循环;95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1.0 min,95  $^{\circ}$ C 15 s。荧光定量 PCR 检测结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  方法进行分析,用 SPSS 17.0 软件进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *FcMKK4* 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

利用 Trizol 试剂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 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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。以特异性引物 *MKK4*-F1 和 *MKK4*-R1 以及 *MKK4*-F1 和 *MKK4*-R2 分别与通用引物 UPM 和 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 *MKK4* 基因的全长 cDNA 序列,命名为 *FcMKK4*,GenBank 登录号为 KJ023198。该基因全长 2 064 bp,包括 214 bp 的 5'端非编码区 (5'UTR),629 bp 的 3'UTR 和 1 221 bp 的开放阅读框 (ORF)。3'端含有 PolyA 尾,但不含多聚腺苷酸的加尾信号 AATAA (图 1)。

### 2.2 *FcMKK4* 基因编码蛋白质的预测及生物信息学分析

氨基酸序列分析可知,*FcMKK4* 基因编码 1

个由 406 个氨基酸残基组成的蛋白质,包括 54 个碱性氨基酸(K,R),50 个酸性氨基酸(D,E),118 个疏水性氨基酸(A,I,L,F,W,V),110 个亲水性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y),104 个带电荷氨基酸

(D、E、R、K)。其分子量为 45.94 ku,理论等电点为 8.50,脂溶性指数为 76.08,为脂溶性蛋白质。总平均疏水性为 -0.507,为亲水性蛋白,但亲水性不强。

```

1 ACATGGGACCTCTGAGTGAGGATCGCTATTGACAACAAAGGAAAAATGTTTATTACTGTTTATCATGAAGTTTGGCGTCTCCACAAGTGTCTCAGTGGTCAATGGTCCAACACAGAG 120
121 TTGAAATGGGAACCTTAGAGCTGGTGAATGAGTAAGAGAAAGCTGAATAAGCCTTGTAGTGGGATAATATCGGCGTGTGGCAGCGGAGGGG ATG GCC GAG CAG CAG CAG 232
233 CAG GGA GGA GGG CAG CCC AGG CCA GGG ACT CTC AGC ATG TCA GGG GCT GTT CCA GGT CGA CGA AGC AAC CTC CGC TTG GCG TTT CCA GGT 322
Q G G G Q P R P G T L S M S G A V P G R R S N L R L A F P G
323 CAG GGA AGA CCC AAT AAT GAC CGT CCA CAG AAC AAC CTT GAC TTC CCT GCC TCC GGA TAC CCT GCG ACA CAG ATT GCT AGG ACC ATG ACG 412
Q G R P N N D R P Q N N L D F P A S G Y P A T Q I A R T M T
413 ACT GTG CCA CCC CAG CCA AGG GAC AGG ATT ACT CGG GGG ATT TAC CAG AGC ATC CAG TCA TCC GGC AAA CTC AAA ATC TCA CCT GAA TTG 502
T V P P Q P R D R I T R G I Y Q S I Q S S G K L K I S P E L
503 CAA GTT GAG TTC ACA GCG GAC GAC CTT CGT GAT TTA GGG GAG ATT GGA AGA GGA GGT TTT GGC ACT GTC AAC AAA ATG GTG CAT CGT AAG 592
Q V E F T A D D L R D L G E I G R G G F G T V N K M V H R K
593 AGT AAG ACA ATC ATG GCT GTT AAG CGT ATC CGT TCA ACA GTT GAT GAG AAG GAA CAG AAG CAA CTC TTG ATG GAT TTA GAG GTA GTC ATG 682
S N T I M A V K R I R S T V D E K E Q K Q L L M D L E V V M
683 CGA AGC AAC GAC TGC CCT TGT ATT GTT CAA TTT TAT GGT GCC ATA TTC AAG GAG GGT GAC TGT TGG ATA TGC ATG GAG CTT ATG GAC ACG 772
R S N D C P C I V Q F Y G A I F K E G D C W I C M E L M D T
773 TCA CTT GAC AAG TTC TAT AAA TTT ATA TAT GAA CGT TTA CAT GAA CGT CTT CCA GAA AAC ATG CTT GGA AAA ATA ACT GTT GCA ACA CTA 862
S L D K F Y K F I Y E R L H E R L P E N M L G K I T V A T L
863 ACA GCA CTA AAC TAT TTA AAG GAG AAG TTG AAA ATA ATC CAT CGT GAT GTG AAG CCA TCT AAC ATT TTA TTG GAT AAG CGC GGC AAT ATC 952
T A L N Y L K E K L K I I H R D V K P S N I L L D K R G N I
953 AAG CTC TGT GAT TTC GGC AIT TCT GGC CAG CTT GTG GAT TCC ATC GCC AAG ACA AGA GAT GCT GGA TGT AGA CCA TAT ATG GCA CCG GAA 1042
K L C D F G I S G Q L V D S I A K T R D A G C R P Y M A P E
1043 CGT ATA GAC CCA GCC AGA GCC CGG GGA TAT GAC GTT CGC TCT GAT GTG TGG TCC CTC GGT ATC ACC CTG ATG GAG CTG GCC ACA GGG AGT 1132
R I D P A R A R G V D V R S D V W S L G I T L M E L A T G S
1133 TTC CCG TAT CCC AAG TGG AAT TCT GTT TTC GAG CAG CTA ACG CAA GTA GTG CAA GGA GAG CCA CCA CGT CTT TCA CCC AAC GAG AAT GGC 1222
F P Y P K W N S V F E Q L T Q V V Q G E P P R L S P N E N G
1223 AAT ACT TTC TCC GAG GAG TTT GTT AGT TTT AAT ACA TGC TTA ATA AAA GAT GAA AGC TCA CGA CCC AAG TAT AAA CAG CTC CTC GAG 1312
N T F S E E F V S F V N T C L I K D E S S R P K Y K Q L L E
1313 CAC GAG TTT GTC GTG CGA TCG AGA GAG GAC CCC ATG GAC GTG ACA GAG TTT GTT AGC GGC ATT CTG GAC AAG ATG GCA AAC AAC GGA CGT 1402
H E F V V R S R E D P M D V T E F V S G I L D K M A N N G R
1403 GTC ATG TAT ACT TAC GAT TCT TAC AAC TGC TGA TGA ACTACTGTATAGCACTTGTCTCATCATTTTTAACTCTGGGACTACGAGTGAACAACCTTGTCTGGGGCA 1511
V M Y T Y D S Y N C *
1512 AGTTTAAGCCGTGCAGCATTATATTTATATGTAGGCTGAATAATGCCAGCTTTGCAAGAGAGAGAGTAAAAAAGAAATGTTGGAGTTTAAATGCCAGCTTTTATATGGCATTACGA 1631
1632 GTGGCACTGTGGCAGCAAAAATGGACTGGTTTACTGATTGACTGTGATGTGACACCCAGTATATGAAAACGAAGAATTTTTTTTTTTTTCAGTTATAAGAGTTATGTAGAAGTTTGT 1751
1752 CGAAAAAAGAAATGGGTGCAGATATGAGCCTTATACATAGGTAAGAAAAATGGGAATCAATCGGTTATAAAAGGAGACTCGTGCAGGTAGTTGTGTTGTCGTCGAGAGTGTGGCTGG 1871
1872 AATAGTTTTAGAAGCTGTTACAAATAGCATTCTGATGCAGAGTTCTCTACTGAATGAGGGGAATGGTCAACCAAAAGAGGAACCCAGCAGAAGTGACTTTTTAAATCAGAATTTGCCAITA 1991
1992 CCACCTGGTACATTATGTAGTGAACCTGATTGTTCCATTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2064

```

图 1 中国明对虾 *FcMKK4* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

横线方框内的 ATG 为起始密码子;终止密码子 TGA 由 \* 标出;画线部分为 S-TKc 结构域

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *F. chinensis FcMKK4* gene

Start codon(ATG)is marked with filament box; asterisk indicates stop codon(TGA); the S-TKc domain is underlined

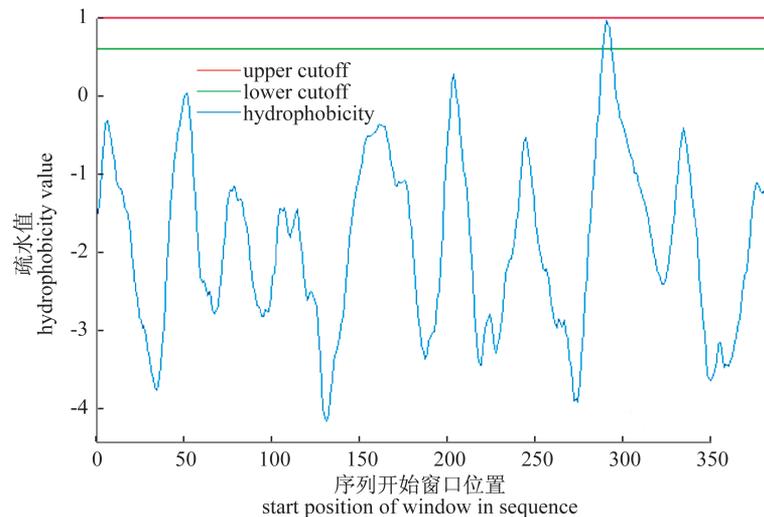


图 2 中国明对虾 *FcMKK4* 蛋白的疏水性分析

Fig. 2 Hydrophobicity analysis of *F. chinensis FcMKK4* protein

利用在线工具 SOPMA 对 *FcMKK4* 基因编码蛋白质的二级结构进行预测。结果显示,*FcMKK4* 预测蛋白包含 36.21% 的  $\alpha$  螺旋,10.59% 的延伸

链,4.19% 的  $\beta$  转角和 49.01% 的不规则卷曲。应用 SWISS-MODEL 在线软件对 *FcMKK4* 基因编码蛋白质三级结构进行预测。结果显示该蛋

白主要包含不规则卷曲和  $\alpha$  螺旋结构。应用 TopPred 对 *FcMKK4* 预测蛋白进行疏水性和拓扑结构分析。结果显示,该预测蛋白为亲水性蛋白,有一个不确定的跨膜结构域(位于 210 ~ 230 氨基酸序列,共 21 个氨基酸)。同时应用 TMpred 和 SignalP4.1 软件对 *FcMKK4* 预测蛋白进行拓扑

结构及信号肽分析,结果显示,该预测蛋白有一跨膜结构域(位于 292 ~ 310 氨基酸序列,共 19 个氨基酸),不含有信号肽序列。保守结构域分析表明,*FcMKK4* 基因预测蛋白存在 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-MKK4 亚族。

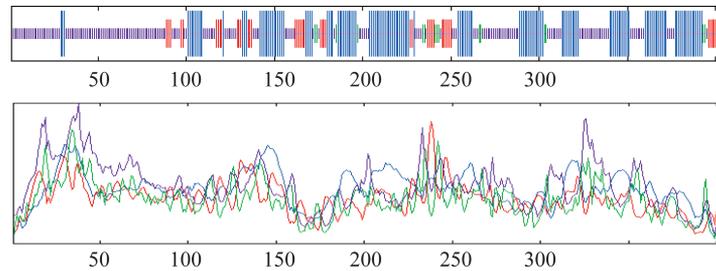


图 3 中国明对虾 *FcMKK4* 蛋白二级结构预测

蓝色代表  $\alpha$  螺旋,红色代表延伸链,绿色代表  $\beta$  转角,紫色代表不规则卷曲

Fig. 3 Prediction of the secondary structure of *F. chinensis FcMKK4* protein

Blue denotes alpha helix, red denotes extended strand, green denotes beta turn, purple denotes random coil

### 2.3 *FcMKK4* 基因同源性分析

利用 NCBI BLASTP 软件对中国明对虾 *FcMKK4* 基因编码的氨基酸序列进行同源比对。发现该序列与肩突硬蜱 (*Ixodes Scapularis*) 的同源性最高,为 80%。与其他无脊椎动物如印度跳蚤 (*Harpegnathos saltator*)、大红斑蝶 (*Danaus plexippus*)、佛罗里达弓背蚁 (*Camponotus floridanus*)、意蜂 (*Apis mellifera*)、切叶蚁 (*Acromyrmex echinator*) 和埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) 的 *MKK4* 的同源性分别为 78%、75%、74%、71%、68% 和 68%;与其他脊椎动物如非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、绿头鸭

(*Anas platyrhynchos*)、原鸽 (*Columba livia*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、裸鼯鼠 (*Heterocephalus glaber*) 和八齿鼠 (*Octodon degus*) 的 *MKK4* 的同源性分别为 70%、69%、69%、69%、64%、64% 和 64%。

利用 MEGA 4.1 软件进行系统进化分析表明,中国明对虾 *FcMKK4* 和其他节肢动物 *MKK4* 聚为一支(图 4)。将中国明对虾 *FcMKK4* 基因编码的氨基酸序列与肩突硬蜱、意蜂、埃及伊蚊、大红斑蝶、斑马鱼、非洲爪蟾和八齿鼠等动物的 *MKK4* 基因的氨基酸序列进行比对发现, *GYDVRSDVWSLGTTL* 基因序列高度保守(图 5)。

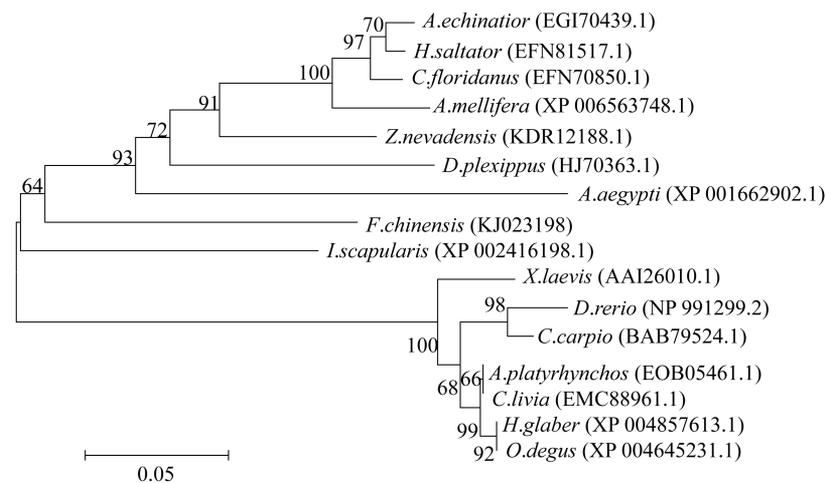


图 4 利用 MEGA4.1 软件构建的基于 *MKK4* 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on *MKK4* amino acid sequences by MEGA 4.1

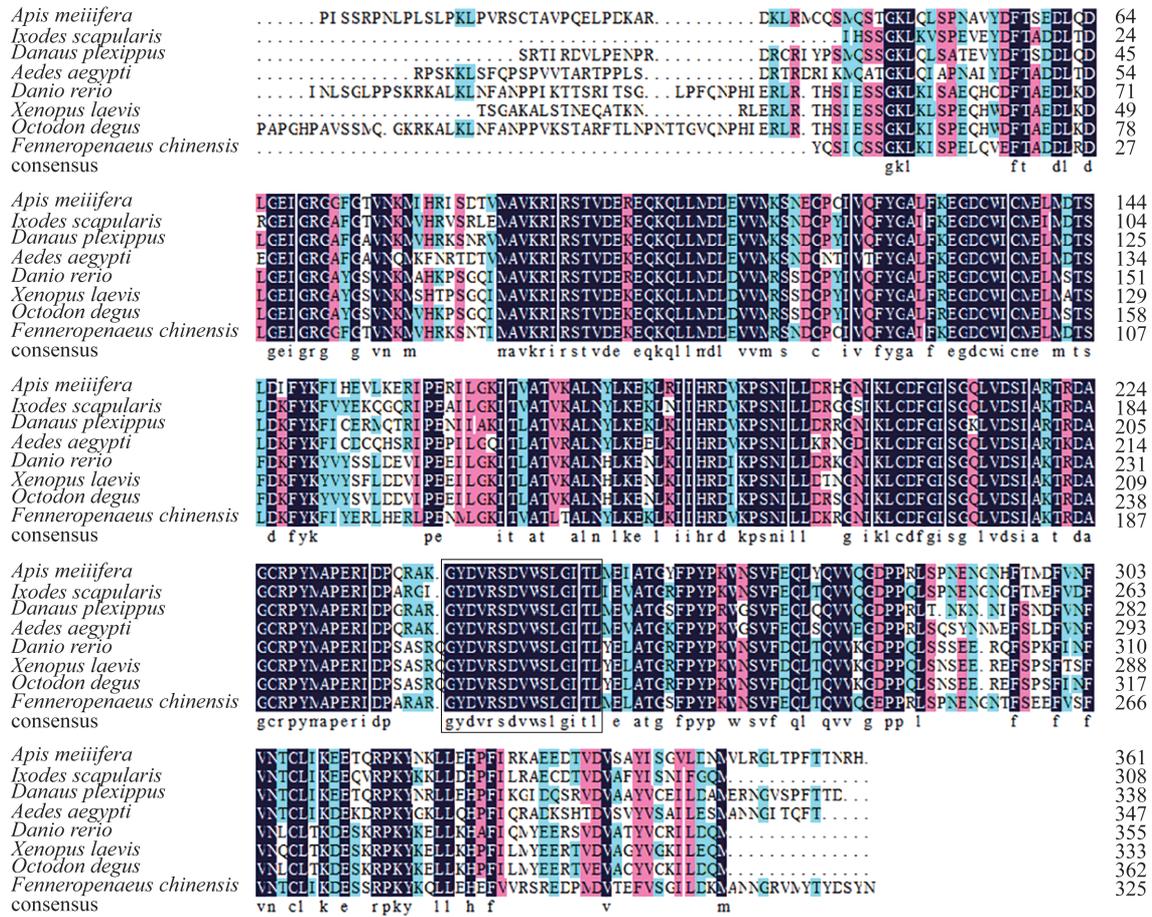


图5 中国明对虾 FcMKK4 氨基酸序列与其他物种 MKK4 氨基酸序列比对

保守基序 GYDVRSDVWSLGTTL 以方框表示,图中藏青色代表相同水平为 100%,粉红色代表相同水平≥75%,浅蓝色代表相同水平≥50%

Fig.5 Amino acid sequences alignment of FcMKK4 with other species MKK4

The conserve sequence GYDVRSDVWSLGTTL is marked with filament box,navy denotes the homology level is 100%,pink denotes the homology level is greater than or equal to 75% but less than 100%,light blue denotes the homology level is greater than or equal to 50% but less than 75%

2.4 中国明对虾 MKK4 基因的组织表达分析

利用 RT-PCR 分析中国明对虾 FcMKK4 基因在不同组织中的表达水平,结果表明,FcMKK4 基因在肌肉、肝胰腺、淋巴、心脏、胃、鳃、肠、血细胞中均有表达。在肌肉中的表达量最高(为血细胞中表达量的 13.47 倍),其次为肝胰腺 > 心脏 > 鳃 > 胃 > 淋巴 > 肠(分别为血细胞中表达量的 7.19、6.60、6.46、6.44、5.34 和 4.23 倍),在血细胞中的表达量最少(图 6)。

氨氮胁迫后,与对照组相比,FcMKK4 基因相对表达量在鳃、胃、心脏、肝胰腺、肌肉和血细胞中首先表现为下调趋势,其中在鳃、胃、肝胰腺、肌肉和血细胞中的相对表达量在 3 h 时最低,分别为对照组的 0.58 (P < 0.01)、0.79 (P < 0.05)、0.18 (P < 0.01)、0.60 (P < 0.01) 和 0.53 倍 (P < 0.01);在

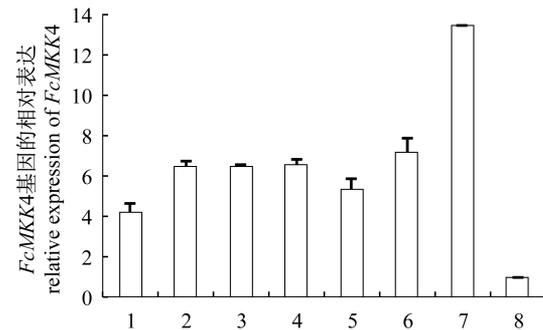


图6 中国明对虾 FcMKK4 基因在不同组织中的表达分布

1. 肠; 2. 鳃; 3. 胃; 4. 心脏; 5. 淋巴; 6. 肝胰腺; 7. 肌肉; 8. 血细胞

Fig.6 Distribution of FcMKK4 gene expression in different tissues of F. chinensis

1. intestine; 2. gill; 3. stomach; 4. heart; 5. lymph; 6. hepatopancreas; 7. muscle; 8. hemocytes

心脏中的相对表达量在 6 h 最低,为对照组的 0.87 倍 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。随后, *FcMKK4* 基因的相对表达量出现上调,并分别在 72、72、6、48、72 和 48 h 达到最大值,相对表达量分别为对照组的 3.94 ( $P < 0.01$ )、3.44 ( $P < 0.01$ )、1.72 ( $P < 0.01$ )、1.84 ( $P < 0.01$ )、1.36 ( $P < 0.01$ ) 和 2.35 倍 ( $P < 0.01$ ),且 *FcMKK4* 的相对表达量总体呈现先下降后上升再下降的变化趋势。

与上述情况相反,氨氮胁迫后,中国明对虾 *FcMKK4* 基因在肠中的相对表达量呈现先上调后下调再上调的变化趋势,且分别在 24 和 96 h 达到最大值,相对表达量分别为对照组的 2.17 倍 ( $P < 0.01$ ) 和 2.97 倍 ( $P < 0.01$ )。在各时间点,氨氮胁迫组 *FcMKK4* 基因的相对表达量均高于对照组 (图 7-a)。

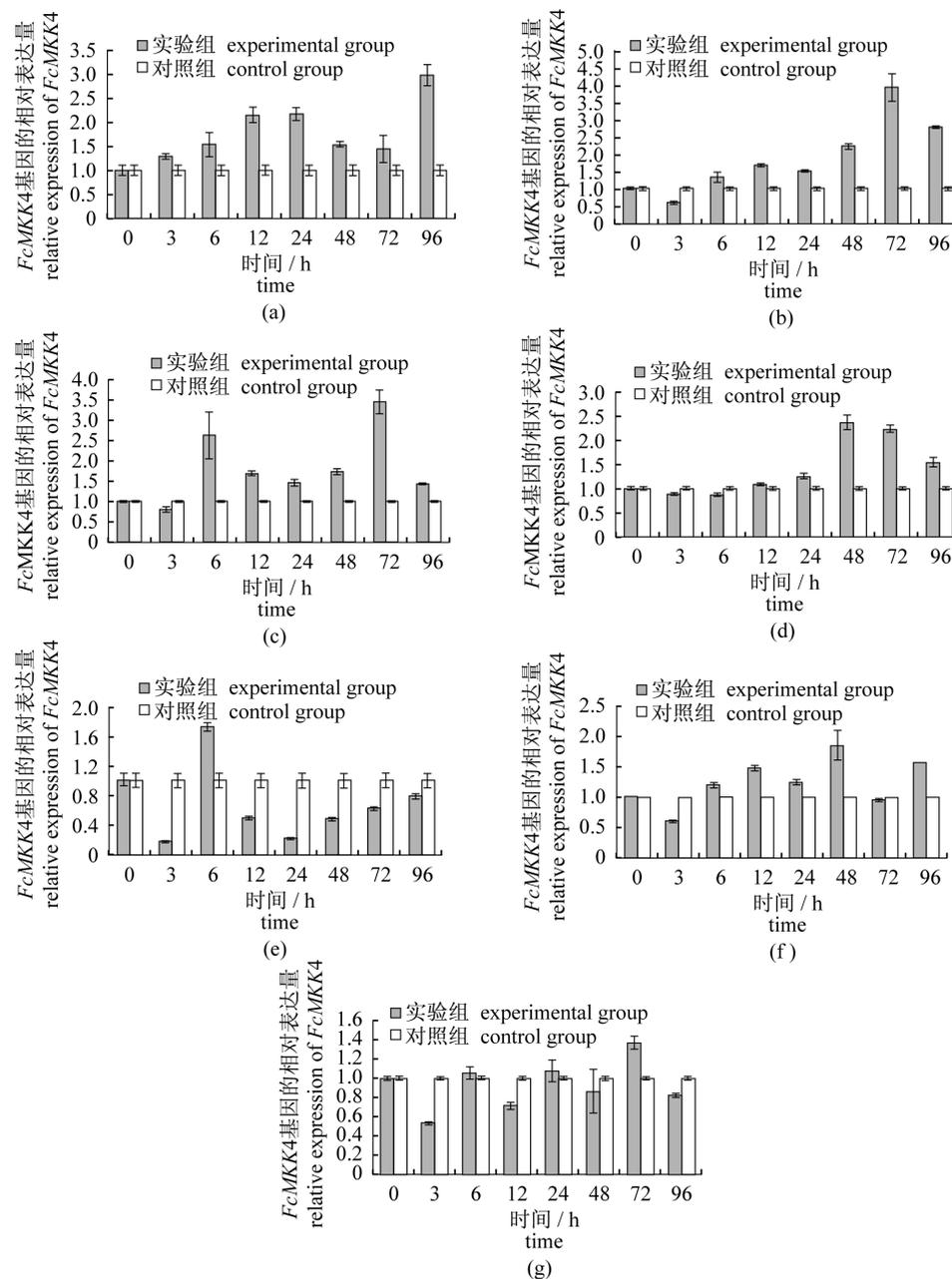


图 7 氨氮胁迫后中国明对虾 *FcMKK4* 基因在不同时间的表达变化

(a) 肠; (b) 鳃; (c) 胃; (d) 心脏; (e) 肝胰腺; (f) 肌肉; (g) 血细胞

Fig. 7 Expression of *FcMKK4* gene in *F. chinensis* after ammonia-N stress

(a) intestine; (b) gill; (c) stomach; (d) heart; (e) hepatopancreas; (f) muscle; (g) hemocytes

### 3 讨论

*MKK4* 基因自从非洲爪蟾中首次被克隆以来,其分子功能及机制等得到较为深入的研究,但主要结果大多来自人<sup>[10]</sup>和小鼠<sup>[9]</sup>等生物,且与生长及免疫过程密切相关。在甲壳动物中仅见淡水枝角水蚤(*Daphnia pulex*)<sup>[30]</sup>和斑节对虾<sup>[28]</sup>有报道。本研究从中国明对虾 EST 文库中查找比对获得中国明对虾 *MKK4* 基因一段序列,克隆获得其全长,并命名为 *FcMKK4*。该基因全长 2 064 bp,其开放阅读框 1 221 bp,编码一个由 406 个氨基酸组成的多肽。三级结构预测显示,软件只能预测同源性部分(氨基酸残基范围 98 ~ 391)的模型,因此估计,前段几十个氨基酸残基很可能是 loop 区,对整体构型影响不大,和油菜(*Brassica campestris* L.)*BnMKK4* 预测结果相似<sup>[31]</sup>。信号肽预测结果显示,*FcMKK4* 不含信号肽,与油菜 *BnMKK4* 结果不同<sup>[31]</sup>,表明 *MKK4* 基因在植物和动物中表达存在显著差异。保守结构域分析表明,*FcMKK4* 基因预测蛋白存在 S-TKc 保守结构域,且该蛋白属于 PKc 超家族,PKc-MKK4 亚族。经 BLASTP 比对,*FcMKK4* 基因编码的蛋白质属于 *MKK4* 家族,且与其他无脊椎动物的 *MKK4* 具有高度同源性(68% ~ 80%)。系统进化分析表明,中国明对虾 *FcMKK4* 与无脊椎动物聚为一支。*MKK4* 是一个高度保守的基因,已在多种动植物中分离出 *MKK4* 基因的同源序列。同源序列分析表明,*FcMKK4* 基因编码的氨基酸序列与其他物种一样高度保守,且 GYDVRSDVWSLGTTL 基序在无脊椎和脊椎动物中均高度保守(图 5)。综上所述,可以确定该序列为中国明对虾 *MKK4* 基因序列。

对 *MKK4* 在不同物种各组织中的表达情况的研究表明,在成年小鼠和人类的各组织中 *MKK4* mRNA 均广泛表达<sup>[10,12]</sup>,且在骨骼肌和大脑中的表达量较高。在斑节对虾各组织中也均有表达<sup>[28]</sup>,且存在明显的组织差异性。与斑节对虾相比,*MKK4* 在中国明对虾各组织中均有表达,但表达趋势有所不同。中国明对虾 *FcMKK4* 基因在肌肉中的表达量最高,其次为肝胰腺、心脏、鳃、胃、淋巴和肠,在血细胞中的表达量最少。而斑节对虾 *MKK4* 基因组织相对表达量由高到低依次为肠、鳃、淋巴、肝胰腺、心脏和血细胞,这可能与选取的实验对虾处于不同的生长发育阶段有关,

因为 *MKK4* 在生物生理过程中起着重要作用<sup>[19-20]</sup>,不同的生长发育阶段可能有着不同的组织分布。

由于 *MKK4* 基因在生物生理及病理过程中起着重要作用,近年来已在多个物种中进行了研究。对小鼠及人的研究主要集中于 *MKK4* 基因在细胞凋亡、炎症反应和肿瘤发生<sup>[15-18]</sup>中的重要作用,在植物中则有 *MKK4* 基因参与非生物胁迫及病害相关的信号传导的报道。Kong 等<sup>[32]</sup>的研究表明,玉米(*Zea mays*)中 *ZmMKK4* 的转录水平受到冷胁迫、盐胁迫和外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫的影响而出现上调,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,*ZmMKK4* 基因的过表达则可增加对冷胁迫和盐胁迫的抗性。Jonak 等<sup>[33]</sup>研究发现,冷刺激能够激活紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)中的 *p44MKK4* 基因的表达和活性。张国腾等<sup>[31]</sup>的研究则表明,油菜中 *BnMKK4* 基因的表达受低温胁迫和盐胁迫的诱导。为探索中国明对虾 *FcMKK4* 基因在非生物胁迫应答中的作用,本研究采用 64 mg/L 的 NH<sub>4</sub>Cl 海水溶液对中国明对虾进行氨氮胁迫实验,结果表明,中国明对虾鳃、胃、心脏、肝胰腺、肌肉、血细胞和肠中 *FcMKK4* 的表达量均随胁迫时间的不同表现出明显差异。氨氮胁迫后,*FcMKK4* 在鳃、胃、心脏、肝胰腺、肌肉和血细胞中的表达量先下调后上调,在肠中表达量则先上调后下调,且在各组织中各时间点的表达量变化不同,其原因可能是组织器官功能差异性所致<sup>[34]</sup>。中国明对虾 *FcMKK4* 基因在组织中的表达量无论是先下调后上调(如鳃、胃等),还是先上调后下调(如肠),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 *FcMKK4* 基因在抵抗持续性氨氮胁迫中起着重要作用。关于 *MKK4* 在虾类中的作用机制方面的研究尚未见报道,而虾类 *MKK4* 是否具有与其他动物 *MKK4* 相似的功能,还有待进一步的研究。

本研究成功克隆获得了中国明对虾 *FcMKK4* 基因的全长 cDNA 序列,并通过分析氨氮胁迫后 *FcMKK4* 基因在鳃、胃、心脏、肝胰腺、肌肉、血细胞和肠中基因的表达特征,推断其可能在中国明对虾对非生物胁迫中具有应答反应。该结果为深入研究中国明对虾 *FcMKK4* 蛋白特性及其在非生物胁迫应答反应中的作用途径和机理提供了理

论基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Deng J H, Ye C C, Liu Y C. Bo hai and yellow sea prawns and resource management [ M ]. Beijing: The Ocean Publishing Company, 1990; 36 - 164. [ 邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤海的对虾及其资源管理. 北京: 海洋出版社, 1990; 36 - 164. ]
- [ 2 ] Capy P, Gasperi G, Biemont C, *et al.* Stress and transposable elements: Co-evolution or useful parasites? [ J ]. Heredity ( Edinb ), 2000, 85 ( 2 ): 101 - 106
- [ 3 ] Wickens J F. The tolerance of warm-water prawn to recirculated water [ J ]. Aquaculture, 1976, 9 ( 11 ): 19 - 37.
- [ 4 ] Sun J J, Ding M L. Effect of ammonia-N on anti-disease ability of *Penaeus Chinensis* [ J ]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3): 267 - 272. [ 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国明对虾抗病力的影响. 海洋与湖泊, 1999, 30(3): 267 - 272. ]
- [ 5 ] Wu Z H, Liu C B, Liu C R, *et al.* Histopathological research on chronic poisoning of *Penaeus chinensis* by nitrite and ammonia [ J ]. Journal of Central China Normal University: Natural Sciences, 1999, 33 ( 1 ): 119 - 122. [ 吴中华, 刘昌彬, 刘存仁, 等. 中国对虾慢性亚硝酸盐和氨中毒的组织病理学研究. 华中师范大学学报: 自然科学版, 1999, 33 ( 1 ): 119 - 122. ]
- [ 6 ] Wang J, Qu K M, Liu H J, *et al.* Acute toxic effects of nitrite and non-ion ammonia on *Fenneropenaeus chinensis* at different dissolved oxygen levels [ J ]. Marine Fisheries Research, 2007, 28 ( 6 ): 1 - 6. [ 王娟, 曲克明, 刘海英, 等. 不同溶氧条件下亚硝酸盐和氨氮对中国对虾的急性毒性效应. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 1 - 6. ]
- [ 7 ] Jiang M, Shen X Q, Li L, *et al.* Acute Toxicity of Ammonia on the Growth and RNA/DNA Ratio in *Exopalaemon carinicauda* Larvae [ J ]. Chinese Journal of Zoology, 2011, 46(4): 102 - 108. [ 蒋玫, 沈新强, 李磊, 等. 氨氮对脊尾白虾幼体存活生长及体内 RNA/DNA 比值的影响. 动物学杂志, 2011, 46(4): 102 - 108. ]
- [ 8 ] Yashar B M, Kelley C, Yee K, *et al.* Novel members of the mitogen-activated protein kinase activator family in *Xenopus laevis* [ J ]. Molecular and Cellular Biology, 1993, 13(9): 5738 - 5748.
- [ 9 ] Sanchez I, Hughes R T, Mayer B J, *et al.* Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating the transcription factor c-jun [ J ]. Nature, 1994, 372(6508): 794 - 798.
- [ 10 ] 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.
- [ 11 ] Lin A, Minden A, Martinetto H, *et al.* Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2 [ J ]. Science, 1995, 268 ( 5208 ): 286 - 290.
- [ 12 ] Cuenda A. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 ( MKK4 ) [ J ]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000, 32 ( 6 ): 581 - 587.
- [ 13 ] Robinson V L, Hickson J A, Vander G D J, *et al.* MKK4 and metastasis suppression: A marriage of signal transduction and metastasis research [ J ]. Clinical and Experimental Metastasis, 2003, 20 ( 1 ): 25 - 30.
- [ 14 ] Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [ J ]. Cell, 2000, 103(2): 239 - 252.
- [ 15 ] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [ J ]. Nature, 2001, 410 ( 6824 ): 37 - 40.
- [ 16 ] Liu B, Chen D, Yang L, *et al.* A functional variant ( 1304T > G ) in the MKK4 promoter contributes to a decreased risk of lung cancer by increasing the promoter activity [ J ]. Carcinogenesis, 2010, 31 ( 8 ): 1405 - 1411.
- [ 17 ] Maruyama J, Naguro I, Takeda K, *et al.* Stress-activated MAP kinase cascades in cellular senescence [ J ]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16 ( 10 ): 1229 - 1235.
- [ 18 ] Yujiri T, Sather S, Fanger G R, *et al.* Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption [ J ]. Science, 1998, 282(5395): 1911 - 1914.
- [ 19 ] Lee J K, Hwang W S, Lee Y D, *et al.* Dynamic expression of SEK1 suggests multiple roles of the gene during embryogenesis and in adult brain of mice [ J ]. Molecular Brain Research, 1999, 66 ( 1 ): 133 - 140.
- [ 20 ] Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, *et al.* SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis [ J ]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(12): 6881 - 6886.

- [21] Nishina H, Fischer K D, Radvanyi L, *et al.* Stress-signaling kinase SEK1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3 [J]. *Nature*, 1997, 385(6614):350 – 353.
- [22] Nishina H, Bachmann M, Oliveira-dos-Santos A J, *et al.* Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1997, 186(6):941 – 953.
- [23] Teng D H F, Hogan J K, Baumfard M, *et al.* Human mitogen-activated protein kinase kinase 4 as a candidate tumor suppressor [J]. *Cancer Research*, 1997, 57(19):4177 – 4182.
- [24] Su G H, Hilgers W, Shekher M C, *et al.* Alterations in pancreatic, biliary, and breast carcinomas support MKK4 as a genetically targeted tumor suppressor gene [J]. *Cancer Research*, 1998, 58(11):2339 – 2342.
- [25] Wang L, Pan Y, Dai J L. Evidence of MKK4 pro-oncogenic activity in breast and pancreatic tumors [J]. *Oncogene*, 2004, 23(35):5978 – 5985.
- [26] Cunningham S C, Gallmeier E, Hucl T, *et al.* Targeted deletion of MKK4 in cancer cells: A detrimental phenotype manifests as decreased experimental metastasis and suggests a counterweight to the evolution of tumor-suppressor loss [J]. *Cancer Research*, 2006, 66(11):5560 – 5564.
- [27] Han Z S, Enslin H, Hu X, *et al.* A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulated *Drosophila* immunity gene expression [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(6):3527 – 3539.
- [28] Sun W W, Yang L S, Su T F, *et al.* Expression analysis of MKK4 gene in *Penaeus monodon* [J]. *Guangdong agricultural sciences*, 2012, 39(13):155 – 157. [孙文文, 杨丽诗, 苏天凤, 等. 斑节对虾 MKK4 基因的表达分析. *广东农业科学*, 2012, 39(13):155 – 157.]
- [29] 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. *水产学报*, 2011, 35(8):1130 – 1138.]
- [30] Colbourne J K, Pfrender M E, Gilbert D, *et al.* The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex* [J]. *Science*, 2011, 331(6017):555 – 561.
- [31] Zhang G T, Wang N, Wang J, *et al.* Cloning and expression analysis of a BnMKK4 gene from *Brassica napus* L [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(5):491 – 498. [张国腾, 王宁, 王娟, 等. 油菜 BnMKK4 全长基因的克隆及表达分析. *植物生理学报*, 2012, 48(5):491 – 498.]
- [32] Kong X P, Pan J W, Zhang M Y, *et al.* ZmMKK4, a novel group C mitogen-activated protein kinase kinase in maize (*Zea mays*), confers salt and cold tolerance in transgenic Arabidopsis [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2011, 34(8):1291 – 1303.
- [33] Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, *et al.* Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought [J]. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 1996, 93(20):11274 – 11276.
- [34] 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. *海洋与湖沼*, 2012, 43(2):306 – 312.]

## cDNA cloning and expression analysis of *MKK4* gene under ammonia-N stress in *Fenneropenaeus chinensis*

YAO Wanlong<sup>1,2</sup>, HE Yuying<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, WANG Qingyin<sup>1\*</sup>

(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)

**Abstract:** For preliminary research on the biology function of *MKK4* in *Fenneropenaeus chinensis* in this study, full-length cDNA sequence of *MKK4* gene in *F. chinensis* was cloned using RACE method and was named *FcMKK4*. The full-length of cDNA sequence of *MKK4* is 2 064 bp, which contains a 214 bp 5'-UTR, 629 bp 3'-UTR and 1 221 bp open reading frame (ORF) that encodes 406 amino acid residues. Its isoelectric point (PI) was 8.50 and molecular mass was 45.94 ku. Homology analysis revealed that the amino acid sequences of *FcMKK4* were highly homogenous with *MKK4* of other species, 80% with *Ixodes Scapularis*, and 78% with *Harpegnathos saltator*. The phylogenetic analysis showed that *F. chinensis FcMKK4* was in the same class with other arthropods' *MKK4*. The expression level of *FcMKK4* gene in different tissues was analyzed by quantitative real-time PCR. The results indicated that the highest expression level of *FcMKK4* gene was in muscle, and that in hepatopancreas was the second. Real-time PCR analysis showed that the expression level of *FcMKK4* was up-regulated significantly in muscle, hepatopancreas, hemocytes, gill, heart, intestine and stomach after stimulation with ammonia-N stress, and *FcMKK4* showed different expression profiles in different tissues. The results implied that *FcMKK4* might play an important role in abiotic stress response in *F. chinensis*.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; *MKK4* gene; ammonia-N stress; gene cloning; expression

**Corresponding author:** WANG Qingyin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn