

# 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) p38 MAPK 基因克隆及表达分析\*

姚万龙<sup>1,2</sup> 何玉英<sup>1,3</sup> 刘萍<sup>1,3</sup> 李健<sup>1,3</sup> 王清印<sup>1①</sup>

(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 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 青岛 266200)

**摘要** 应用 RACE 克隆技术获得中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) p38 MAPK 基因全长 cDNA 序列, 并对该序列进行分析。结果显示, 中国对虾 p38 MAPK 基因全长为 1563 bp, 开放阅读框长 1098 bp, 5'非编码区长 122 bp, 3'非编码区长 343 bp, 将该基因命名为 *Fcp38*。氨基酸序列分析推测, 该基因编码 365 个氨基酸, 分子量为 41.77 kDa, 理论等电点为 5.68。同源性分析表明, *Fcp38* 基因与凡纳滨对虾和日本囊对虾的 p38 相似性最高, 为 98%。通过比对发现, 该基因除含 p38 家族特有的标志性 Thr-Gly-Tyr 双磷酸化位点和底物结合位点 Ala-Thr-Arg-Trp, 还具有 p38 家族关键功能位点 ED。系统进化分析显示, *Fcp38* 与凡纳滨对虾和日本囊对虾的 p38 聚为一支。荧光定量 PCR 结果显示, *Fcp38* 基因在肠、鳃、胃、心脏、淋巴、肝胰腺、肌肉、血细胞中均有表达, 以在肌肉中表达量最高。氨氮胁迫后, 该基因在中国对虾肌肉、血细胞、鳃、心脏、肠和胃中的相对表达量均显著增加, 且有不同的时空表达趋势, 表明 *Fcp38* 基因可能在中国对虾应对环境胁迫过程中起着重要作用。

**关键词** 中国对虾; p38 MAPK 基因; 氨氮胁迫; 基因克隆; 组织表达

**中图分类号** Q342 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)02-0091-08

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路在细胞应对细胞外刺激过程中起着重要作用(Rouse *et al*, 1994), 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 通过磷酸化级联反应将细胞外信号传递到细胞内。MAPK 超家族包含细胞外调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)、大丝裂素活化蛋白激酶 1(Big MAP kinase 1, BMK1)、C-Jun 氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)/应激活化蛋白激酶(Stress-activated protein kinase, SPAK)和 p38 MAPK 通路 4 个亚族, 其中, p38 MAPK 信号通路可被多种细胞外刺激所激活, 包括炎症性细胞因子、环

境胁迫、紫外线和病原体感染等(Raingaud *et al*, 1995; Regan *et al*, 2009; Huang *et al*, 2011)。

p38 MAPK 基因自从第一次克隆(Brewster *et al*, 1993)以来, 其分子功能及机制等得到较为深入的研究。p38 同系物在脊椎动物(Fujii *et al*, 2000; Hashimoto *et al*, 2000)以及无脊椎动物(Han *et al*, 1998)、酵母菌(Brewster *et al*, 1993)中均被发现, 分为 p38 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  共 4 个亚型, 且都含有典型保守的 Thr-Gly-Tyr(TGY)双磷酸化位点和紧密相连的底物结合位点 Ala-Thr-Arg-Trp(ATRW)(Hanks *et al*, 1995)。p38 在多种调节过程中起着重要作用, 如蛋白质降解及定位、mRNA

\* 国家虾产业技术体系(CARS-47)、鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)和国家自然科学基金面上项目(31172401)共同资助。姚万龙, E-mail: wanlongyao@yeah.net

① 通讯作者: 王清印, 研究员, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

收稿日期: 2015-03-04, 收修改稿日期: 2015-04-24

稳定性、内吞作用、细胞凋亡等(Cuadrado *et al*, 2010); p38 在斑马鱼早期胚胎发育过程中起着重要作用(Krens *et al*, 2006); p38 是小鼠胚胎正常发育所必需的, 并被认为是哺乳动物肌肉发育的关键调节因子(Natale *et al*, 2004; Keren *et al*, 2006); p38 能被胁迫激活, 与 II 型糖尿病、正常免疫和炎症反应等多种病理学现象相关(Ozcan *et al*, 2004; Roux *et al*, 2004; Lee *et al*, 2011); 近年的研究表明, p38 可通过 toll 样受体(TLRs)参与免疫调节反应(Li *et al*, 2013; Yee *et al*, 2013); 点带石斑鱼感染虹彩病毒时, p38 MAPKs 在调节细胞凋亡和病毒复制过程中起着至关重要的作用(Cai *et al*, 2011)。由此可见, p38 在生物生长发育及胁迫刺激、免疫等过程中发挥着极其重要的作用。

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在我国经济养殖虾类中占据重要地位(邓景耀等, 1990)。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, 中国对虾养殖环境急剧变化, 降低了对虾的适应性(Capy *et al*, 2000), 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(Wickens, 1976), 并且随着氨氮浓度的不断升高, 虾体免疫力越低, 越容易感染病原体(哈承旭等, 2009)。由此可见, 氨氮对中国对虾的生长和免疫有着极其重要的影响。对虾中关于 p38 报告仅见于凡纳滨对虾(He *et al*, 2013; Yan *et al*, 2013), 中国对虾中尚未见报道。本研究克隆获得中国对虾 p38 基因, 对其组织表达分布及氨氮胁迫后在各组织中表达变化情况进行初步分析, 以期为中国对虾 p38 基因的生物学功能及其应对胁迫刺激机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康中国对虾取自山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司培养的“黄海 3 号”, 体长为(74.97±7.54) mm, 体重为(5.34±1.67) g, 于 150 L 的整理箱中暂养, 每箱 30 尾, 养殖水温约为 25℃, 盐度为 31, pH=8.4, 持续充氧, 每天换水 1/3, 暂养 10 d, 正常投喂配合饲料。

TRIzol Reagent 提取液为 Invitrogen 生产; SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification 试剂盒为 Clontech 生产; LA Taq、DEPC 水、SYBR® Premix Ex Taq<sup>TM</sup>11、pMD18-T 载体和 Top 10 感受态细胞购自 TaKaRa 公司; 实验所用引物及胶回收试剂盒均由生工生物工程

(上海)股份有限公司(下文简称上海生工)提供; 其余实验试剂均为国产分析纯。

### 1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

取健康中国对虾肝胰腺于液氮中进行研磨, 按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA, 总 RNA 完整性及质量用 2.0%琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计进行检测。利用普通反转录试剂盒反转录合成 cDNA(韩俊英等, 2011), 利用 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 分别反转录合成 3' RACE 和 5' RACE cDNA 第一条链。

### 1.3 中国对虾 p38 基因全长 cDNA 克隆及测序

在 NCBI 中搜寻日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*, BAK78916.1)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*, AGG82488/AFL70597.1)和果蝇(*Drosophila melanogaster*, NP 477361.1)的 p38 基因, 经 ClustalX 同源比对确定保守区域, 根据保守序列设计简并引物 p38-F1 和 p38-R1, 引物由上海生工合成。以中国对虾肝胰腺 cDNA 为模板, 以 p38-F1 和 p38-R1 为引物, 进行中国对虾 p38 基因中间片段扩增(表 1)。PCR 反应体积为 50 μl, 反应程序: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55.0℃退火 30 s, 72℃延伸 1.0 min, 35 个循环; 70℃延伸 10 min。扩增的 PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 直接送往上海生工进行测序。测序结果经 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)比对, 获得中国对虾 p38 基因中间片段序列。根据测序获得的中国对虾 p38 基因序列, 应用引物设计软件 Primer Premier

表 1 实验所用引物  
Tab.1 The primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
p38-F1	GAYTGTGAGCTGAAGATCCT
p38-F2	GATTGTGAGCTGAAGATCCT
p38-F3	TGAGGAGGCTCGCAACTACATACGC
p38-F4	AGGCTCGCAACTACATACGC
p38-R1	TCMWTDTTCCTCGAARCTCTG
p38-R2	GCTGTCACACGCCTCTCGCTATC
p38-R3	GTGAGCGTATGTAGTTGCGAGCC
p38-R4	CTGGTCATAGGGCTCACTGTC
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG TGATATCAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
β-actin-F	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGA
β-actin-R	TTCTCCATGTCTGCCAGT
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-R	AGCGGATAACAATTTCCACACAGGA

5.0 进行 3' RACE 和 5' RACE 特异性引物设计, 然后交予上海生工进行合成。

3' RACE: 以 RACE 反转录试剂盒合成的 3' RACE 第一链为模板, 用引物 p38-F2 和通用引物 UPM 配对, 进行 3' RACE 第 1 次扩增; 接着使用 p38-F3 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。反应程序同中间片段扩增程序, 但将第 2 次扩增条件改为 62.0°C 30 s。

5' RACE: 以 RACE 反转录试剂盒合成的 5' RACE 第一链为模板, 用引物 p38-R2 和通用引物 UPM, 进行 5' RACE 第 1 次扩增; 然后使用引物 p38-R3 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。反应程序同中间片段扩增程序, 但将第 1 次退火条件改为 58.0°C 30 s, 第 2 次退火条件改为 54.0°C 30 s。

RACE 所得产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用胶回收试剂盒进行纯化, 然后连接到 pMD18-T 载体, 重组好的载体转入 Top 10 感受态细胞, 产生的阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后(所用引物为 M13-F 和 M13-R, 程序同普通 PCR)送测序。

#### 1.4 中国对虾 p38 基因序列分析

使用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序去除测序所得结果中的载体序列并进行拼接, 然后用 EditSeq 程序进行开放阅读框(ORF)的预测及氨基酸翻译。使用 NCBI BLAST 对 p38 MAPK 基因的核苷酸序列及推导的氨基酸序列进行相似性比对。蛋白质理化性质预测使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在软件, 信号肽预测使用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 在线软件, 使用 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 ClustalX 软件, 将中国对虾 p38 基因预测编码氨基酸与其他物种的 p38 基因所翻译的氨基酸序列进行多重序列比对及同源性分析, 在此基础上, 采用 MEGA 4.1 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(此浓度为中国对虾“黄海 3 号”新品种选育时所用氨氮浓度, 其最终存活率为 10%)。实验前随机挑选暂养 7 d 的健康中国对虾 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, 实验期间正常投喂饵料, 且每天(24 h)换取新配制的 NH<sub>4</sub>Cl 海水溶液。各组分别在实验开始后的 0、3、6、12、24、

48、72 和 96 h, 取血细胞、鳃、心脏、肝胰腺、胃、肠、肌肉, 每个时间点各取 6 尾, 保存于液氮, 用于 RNA 的提取。此外, 为检测中国对虾 p38 基因在不同组织中的分布情况, 另选 6 尾健康的中国对虾, 取其血细胞、心脏、淋巴、鳃、肝胰腺、肠、胃和肌肉组织, 保存于液氮, 用于各组织总 RNA 的提取。

#### 1.6 p38 基因 RT-PCR 定量检测

按 TRIzol 试剂说明书对不同实验组中国对虾所取组织进行总 RNA 提取, 检测后进行 cDNA 合成, 方法参照韩俊英等(2011)。

根据测序获得的中国对虾 p38 基因和已获得的内参基因  $\beta$ -actin 全长序列, 分别设计 1 对正反引物(p38-F4 和 p38-R4;  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R), 对健康中国对虾各组织及不同时间点氨氮胁迫的中国对虾各组织中的 p38 基因的表达量进行检测。RT-PCR 扩增体系为 20  $\mu$ l, 试剂添加按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 11 说明书进行。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。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法对荧光定量 PCR 检测结果进行分析, 显著性用 SPSS 17.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Fcp38* 基因全长 cDNA 克隆及序列分析

利用 TRIzol 试剂提取获得的中国对虾肝胰腺总 RNA, 紫外分光光度计检测结果  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  为 1.98, 表明 RNA 质量较好; RNA 完整性经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 其中, 18S 和 28S rRNA 条带清晰且完整, 符合实验所需。用特异性引物 p38-F2 和 p38-R2 通用引物 UPM 以及 p38-F3 和 p38-R3 与通用引物 NUP 分别配对, 进行 3' RACE 和 5' RACE 扩增, 所得产物经测序拼接后, 获得中国对虾 p38 MAPK 基因全长 cDNA 序列, 命名为 *Fcp38 MAPK*, GenBank 登录号为 KF991368。该基因总长为 1563 bp, 其中, 5' 端非编码区(5' UTR) 长 122 bp, 3' 端非编码区(3' UTR) 长 343 bp, 开放阅读框(ORF) 长 1098 bp。3' 端含有 PolyA 尾, 但不含多聚腺苷酸 AATAA 加尾信号(图 1)。

氨基酸序列分析可知, *Fcp38* 基因编码的蛋白质由 365 个氨基酸残基组成, 包括 42 个碱性氨基酸(K 和 R)、52 个酸性氨基酸(D 和 E)、121 个疏水性氨基酸(A、I、L、F、W 和 V)、89 个亲水性氨基酸(N、C、Q、S、T 和 Y)、94 个带电荷氨基酸(D、E、R 和 K), 其推导分子量为 41.77 kDa, 理论等电点为 5.68, 脂

1	ACATGGGAGTCGAGATCTACGGAGTGTGGGAGGAGGACCGGCTCCTTTGGATTAAAGTTTCGCCCTTCGACCCGCTCTGGGATTTTTTAAACGGGATTCTAGGGAGACTCCG	120
121	CT <u>ATG</u> CCT AAG CCA GGG TAC CAC ACG ATA GAG TTA AAC AAG ACG GAA TGG GAG GTG CCG CAG AAG TAC ACC ATG CTC TCC CCT GTG GGC	209
	M P K P G Y H T I E L N K T E W E V P Q K Y T M L S P V G	
210	TCG GGG GCG TAT GCA GTG TGC GCC CTG CAG TCG AAG ACG GGG CCG AAG GTG GCC ATC AAG AAG CTG GCG CGG CCC TTC CAG ACG	299
	S G G A Y G Q V C S A L D S K T G R K V A I K K L A R P F Q T	
300	CAC ATC CAC GCC AAG CGC ACC TAC AGG GAG CTC CGC ATG CTC AAG CAC ATG GAC CAC GAG AAC ATC ATC GGG CTG CTT GAC GTG TTT ACT	389
	H I H A K R T Y R E L R M L K H M D H E N I I G L L D V F T	
390	CCC TCC ACT TCT TAC GGC GAC TTC CAG GAC GTA TAT CTG GTG ACT CCT CTG ATG GGT GCC GAC CTA AAC AAT ATC GTC AAA ACA CAA AAG	479
	P S T S Y G D F Q D V Y L V T P L M G A D L N N I V K T Q K	
480	TTA ACA GAT GAT CAT GTT CAG TTC CTC ATA TAC CAA GTA CTT CGA GGC CTT AAA TAC ATT CAC TCA GCG GGT ATT ATC CAT AGG GAT CTA	569
	L T D D H V Q F L I Y Q V L R G L K Y I H S A G I I H R D L	
570	AAG CCA AGT AAT ATA GCT GTC AAT GAA GAT TGT GAG CTG AAG ATC CTT GAC TTT GGT TTG GCC CGA CCC ACC GAG TCA GAG ATG ACT GGT	659
	K P S N I A V N E D C E L K I L D F G L A R P T E S E M T G	
660	TAC GTG GCC ACC AGG TGG TAT CGT GCT CCA GAG ATT ATG CTC AAC TGG ATG CAC TAT AAT CAG ACA GTG GAT ATC TGG TCA GTG GGC TGC	749
	Y V A T R W Y R A P E I M L N W M H Y N Q T V D I W S V G C	
750	ATA ATG GCT GAG CTT CTG ACT AGC AGA ACC TTA TTC CCA GGT GCT GAT CAC ATT GAC CAA ACG CGC ATC ATA GTG GTC GCC GGA ACG	839
	I M A E L L T S R T T L F P G A D H I D Q L T R I I V V A G T	
840	CCG GAT GAA GAA ACT TTA TAT AAA ATC ACC AGT GAG GAG GCT CGC AAC TAC ATA CGC TCA CCC CAC ATG AGG AAG AAG GAC TTT AAG	929
	P D E E T L Y K I T S E E A R N Y I R S L P H M R K K D F K	
930	CAA GTT TTC CGT GGA GCA AAT CCC TTA GCG GTG GAT CTG CTG GAG AAG ATG CTG GAG CTG GAT AGC GAG AGG CGT GTG ACA GCA GCC CAG	1019
	Q V F R G A N P L A V D L L E K M L E L D S E R R V T A A Q	
1020	GCG TTG GCC CAC CCT TAT CTG GCT CAG TAC GCC GAT CCC ACT GAT GAG CCG GAC AGT GAG CCC TAT GAC CAG AGC TTC GAG GAC ATG GAT	1109
	A L A H P Y L A Q Y A D P T D E P D S E P Y D Q S F E D M D	
1110	CTC CCA ACT GAG AAG TGG AAA GAA CTT GTA TGG AAA GAA GTG ATA GAC TTC ACA CCC AAG CCA GCA GTA TTG GCA GAA GAA GCA GAG AAA	1199
	L P T E K W K E L V W K E V I D F T P K P A V L A E E A E K	
1200	ACG CAG TCA TCA TCG CAG TGA GAGTCGCGCTTCAAACCTGAGTACTTTGTTTCGGAATTTGCTTGAAACCCGCTCTTTTCATGGTGAAAGTGTGCATATGTTAGCATAGGG	1312
	T Q S S S Q *	
1313	CACCTGAAGAGGAATATGTTGTAATATTACATGCCAAACAGTACACCCTGTGGATATTCCTCGTCACTCTGTTCTTGAAGATAACCTCAGGTGGAAGATGTCGGGAACCTGATTTTGT	1432
1433	ATGAAATTTGTGTTTATTAAGATGTTGTAAGATGACAGTGTCTGTTTCTGATTTTTTTTCAGTCATGTGGGACTTTTGTAGGCTGTAAAATATATTTCTGCCTTATCCAAAAA	1552
1553	AAAAAAAAAA	1563

图 1 中国对虾 p38 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of *F. chinensis* p38 gene and its deduced amino acid sequence

起始密码子 ATG 由细线方框标出；终止密码子 TGA 由\*标出；画线部分为 S-TKs 保守结构域

Start codon(ATG) is marked with filament box. Asterisk indicates stop codon(TGA). The conserved domain S-TKs is underlined

溶指数为 85.51, 为脂溶性蛋白质, 总平均疏水性为 -0.420, 为亲水性蛋白, 但亲水性不强。信号肽预测分析显示, *Fcp38* 预测蛋白不含信号肽; 保守结构域分析显示, *Fcp38* 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。

## 2.2 *Fcp38* 基因同源性分析

利用 NCBI BLASTP 软件对中国对虾 *Fcp38* 基因编码的氨基酸序列进行同源比对, 发现该序列与凡纳滨对虾(*L. vannamei*)和日本囊对虾(*M. japonicus*)的相似性最高, 为 98%; 与其他无脊椎动物如拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)、大红斑蝶(*Danaus plexippus*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、丽蝇蛹集金小蜂(*Nasonia vitripennis*)、家蚕(*Bombyx mori*)和烟粉虱(*Bemisia tabaci*)的 p38 基因的同源性分别为 88%、82%、80%、80%、80%、78%和 78%; 与其他脊椎动物如非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、智人(*Homo sapiens*)、鸡(*Gallus gallus*)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、小家鼠(*Mus musculus*)和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的 p38 基因的相似性分别为 76%、76%、75%、74%、73%、73%和 73%。

利用 MEGA 4.1 软件进行系统进化分析显示, 中国对虾 p38 和凡纳滨对虾和日本囊对虾 p38 聚为一

支, 与其他无脊椎动物 p38 聚为一类(图 2)。将中国对虾 p38 基因编码的氨基酸序列与凡纳滨对虾、日本囊对虾、埃及伊蚊、拟穴青蟹、斑马鱼、智人和小家鼠等动物的 p38 基因所编码的氨基酸序列进行同源分析, 结果表明, *Fcp38* 包含 p38 家族特有的标志性 Thr-Gly-Tyr(TGY)双磷酸化位点和底物结合位点 Ala-Thr-Arg-Trp(ATRW), 还具有 p38 家族关键功能位点 ED(ERK docking)(图 3)。

## 2.3 p38 基因在中国对虾各组织中的表达分析

用 RT-PCR 对中国对虾不同组织中 p38 基因的相对表达水平进行分析, 结果显示, *Fcp38* 基因在肠、鳃、胃、心脏、淋巴、肝胰腺、肌肉、血细胞中均有表达, 在肌肉中的相对表达量最高(为血细胞中相对表达量的 31.64 倍), 其次为淋巴、肠、胃(分别为血细胞中相对表达量的 8.73、4.35、4.01 倍), 在血细胞中的相对表达量最少(图 4)。

中国对虾氨氮胁迫后, p38 基因在肠、鳃、胃、心脏、肝胰腺、肌肉和血细胞中的相对表达量变化情况显示(图 5), 与对照组相比, *Fcp38* 基因相对表达量在肠、鳃、胃、心脏、肝胰腺和血细胞中首先表现为下调趋势, 其中, 在肠、鳃、胃、心脏和肝胰腺中的相对表达量在 3 h 最低, 分别为对照组的 0.69 倍( $P < 0.01$ )、0.78 倍( $P < 0.01$ )、0.92 倍( $P > 0.05$ )、0.56 倍( $P < 0.01$ )和 0.19 倍( $P < 0.01$ ); 在血细胞中的相对表达

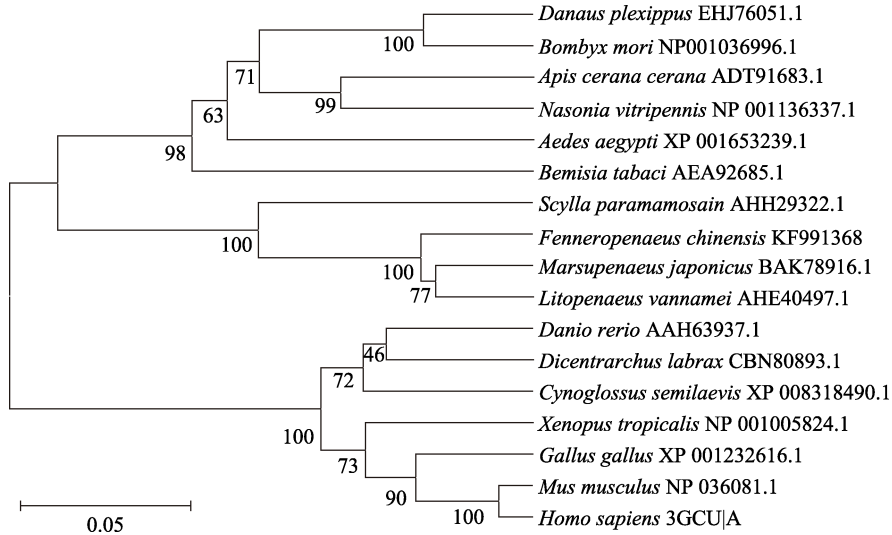


图 2 利用 MEGA 4.1 软件构建的基于 p38 基因所编码氨基酸序列的 NJ 系统进化树  
Fig.2 NJ phylogenetic tree based on p38 amino acid sequences by MEGA 4.1

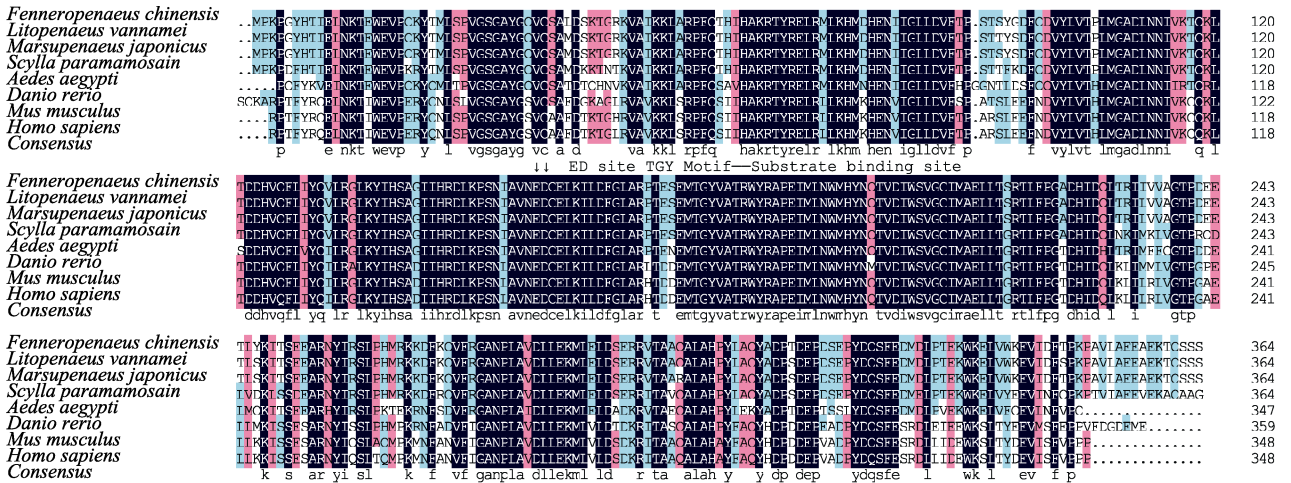


图 3 中国对虾 p38 氨基酸序列与其他物种 p38 氨基酸序列比对  
Fig.3 Amino acid sequences alignment of *F.chinensis* p38 with other species' p38

双磷酸化位点 TGY 和底物结合位点 ATRW 用方框标出; ED 位点用箭头标出

The predicted phosphorylation motif TGY and substrate-binding site ATRW are indicated by boxes. The conserved ED motif, which is important for docking, is indicated by arrows.

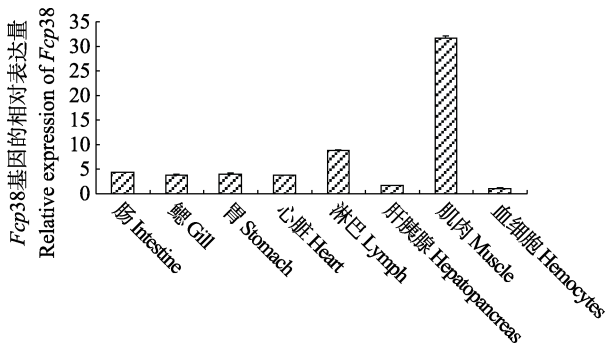


图 4 p38 基因在中国对虾不同组织中的表达分布  
Fig.4 Distribution of p38 gene relative expression in different tissues of *F. chinensis*

量在 12 h 最低, 为对照组的 0.51 倍( $P<0.01$ ); 随后, *Fcp38* 基因的相对表达量出现上调, 各组织表达量分别在 72 h、72 h、72 h、48 h、6 h 和 48 h 达到最大值, 相对表达量分别为对照组的 1.48 倍( $P<0.01$ )、2.37 倍( $P<0.01$ )、2.20 倍( $P<0.01$ )、2.16 倍( $P<0.01$ )、1.11 倍( $P<0.01$ )和 2.04 倍( $P<0.01$ ), 且 *Fcp38* 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, 中国对虾 *Fcp38* 基因在肌肉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 12 h 和 96 h 达到最大值,

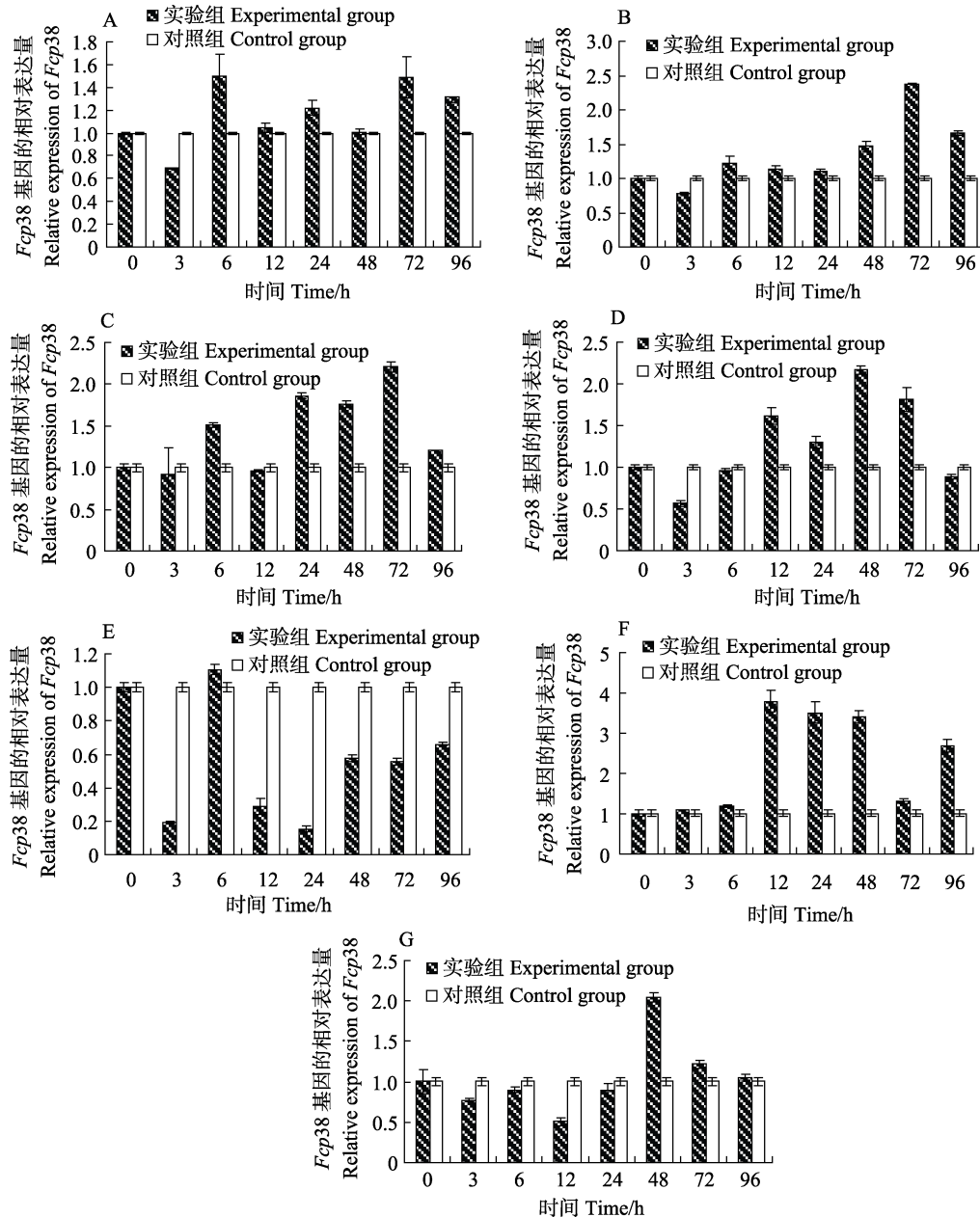


图 5 氨氮胁迫后中国对虾 p38 基因在不同时间的表达变化  
Fig.5 Expression of p38 gene in *F.chinensis* after ammonia-N stress

A: 肠; B: 鳃; C: 胃; D: 心脏; E: 肝胰腺; F: 肌肉; G: 血细胞

A: Intestine; B: Gill; C: Stomach; D: Heart; E: Hepatopancreas; F: Muscle; G: Hemocytes

相对表达量分别为对照组的 3.78 倍( $P<0.01$ )和 2.69 倍( $P<0.01$ ), 且在各时间点, 氨氮胁迫组 *Fcp38* 基因的相对表达量均高于对照组。

### 3 讨论

p38 MAPK 信号转导通路从酵母菌到哺乳动物高度保守(Roux *et al.*, 2004; Cargnello *et al.*, 2011), 能被环境胁迫和细胞因子激活。p38 基因自从第一次克隆(Brewster *et al.*, 1993)以来, 其分子功能及机制等得

到较为深入的研究。p38 在蛋白质降解及定位、mRNA 稳定性、内吞作用、细胞凋亡(Cuadrado *et al.*, 2010) 等过程中起重要的调节作用。对斑马鱼的研究表明, p38 在早期胚胎发育过程中起着重要作用(Krens *et al.*, 2006)。点带石斑鱼的研究结果表明(Cai *et al.*, 2011), 在虹彩病毒感染过程中, p38 MAPKs 在调节细胞凋亡和病毒复制过程中起着至关重要的作用。由于 p38 MAPKs 在生物中的重要作用, 已在许多物种中得到广泛研究, 但在甲壳动物中的研究比较滞后。本研究

克隆获得中国对虾 p38 基因全长, 并命名为 *Fcp38*, 该基因全长 1563 bp, 其开放阅读框 1098 bp, 编码 1 个由 365 个氨基酸组成的多肽。*Fcp38* 基因编码的蛋白质经 BLASTP 在线比对, 结果显示, 该蛋白属于 p38 MAPK 家族, 且与其他无脊椎动物和脊椎动物的相似性都较高(98%–73%)。系统进化分析显示, 中国对虾 p38 与凡纳滨对虾、日本囊对虾 p38 聚为一支, 与无脊椎动物 p38 聚为一类。p38 是一个高度保守的基因, 同源性分析表明, *Fcp38* 基因编码的氨基酸与其他物种的 p38 基因编码的氨基酸一样高度保守, 具有 p38 家族保守的 TGY 双磷酸化位点和底物结合位点 ATRW(Hanks *et al*, 1995), 还具有 p38 家族关键功能位点 ED(ERK docking)(图 3)。综上所述, 可以确定该序列为中国对虾 p38 基因序列。

p38 MAPK 在生物体各组织中广泛表达, 且存在明显的组织差异性。凡纳滨对虾研究表明(He *et al*, 2013), 凡纳滨对虾 p38 基因在眼柄、肠、鳃、肌肉、胰腺和心脏中都有所表达, 且在肌肉和胰腺中的相对表达量较高, 且存在显著的组织差异性。RT-PCR 结果显示, 中国对虾 p38 基因在肠、鳃、胃、心脏、淋巴、胰腺、肌肉和血细胞中均有表达(图 4), 其中, 在肌肉中的相对表达量最高, 其次为淋巴、肠、胃, 在血细胞中的表达量最少, 且存在明显的组织差异性, 其可能与组织生理功能有关。

近年来, 由于 p38 MAPK 基因在生物生理及病理过程中的重要作用, 在许多物种中进行了研究。在小鼠中的研究表明(Natale *et al*, 2004; Keren *et al*, 2006), p38 是小鼠胚胎正常发育所必需的, 并在肌肉发育过程中起着关键性调节因子的作用; 胁迫能激活 p38, 并参与 II 型糖尿病、正常免疫和炎症反应等多种病理学过程(Ozcan *et al*, 2004; Roux *et al*, 2004; Lee *et al*, 2011); 研究表明, p38 可通过 toll 样受体(TLRs) 参与免疫调节反应(Li *et al*, 2013; Yee *et al*, 2013)。为研究中国对虾 p38 基因在应对环境胁迫中的作用, 本研究采用 64 mg/L 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  海水溶液对中国对虾进行氨氮胁迫实验, 结果显示, 中国对虾肠、鳃、胃、心脏、胰腺、血细胞和肌肉中 p38 基因的相对表达量均有明显的时间差异。氨氮胁迫后 *Fcp38* 基因的相对表达量在肠、鳃、胃、心脏、胰腺和血细胞中先下调后上调, 在肌肉中的相对表达量则先上调后下调, 且各组织中各时间点 *Fcp38* 基因相对表达量变化不尽相同, 其原因可能是组织器官功能差异性所致(李美玉等, 2012)。中国对虾 p38 基因在各组织中的相对表达量无论是先下调后上调(如肠、鳃等), 还是先上调后下调(肌肉), 其总体变化趋势呈现出上调和下调波动性往复变化的趋势, 由此可推测, 中国对虾 p38

基因在应对持续性氨氮胁迫过程中通过反复调节基因表达, 以维持机体正常的生理功能。关于 p38 MAPKs 在对虾中的作用机制方面的研究仅见于凡纳滨对虾(He *et al*, 2013; Yan *et al*, 2013), 在凡纳滨对虾蜕皮及先天性免疫过程中起着重要作用, 但研究比较滞后, 虾类 p38 MAPKs 是否与其他物种 p38 MAPKs 具有相似性功能, 还需进一步的研究。

## 4 结论

本研究成功克隆获得了中国对虾 p38 基因的全长 cDNA 序列, 并通过分析氨氮胁迫后中国对虾 p38 基因在肠、鳃、胃、心脏、胰腺、肌肉、血细胞中的相对表达量特征, 推断其可能在中国对虾应对环境胁迫过程中起着重要的作用, 为深入研究中国对虾 p38 蛋白特性及应对环境胁迫的途径和机理奠定了理论基础。

## 参 考 文 献

- 邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤海黄海的对中国对虾及其资源管理. 北京: 海洋出版社, 1990, 36–164
- 李美玉, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因克隆及表达分析. 海洋与湖泊, 2012, 43(2): 306–312
- 哈承旭, 刘萍, 何玉英, 等. 氯化铵对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶类的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 34–40
- 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
- Brewster JL, Dwyer ND, Winter E, *et al*. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 1993, 259(5102): 1760–1763
- Cai J, Huang YH, Wei SN, *et al*. Characterization of p38 MAPKs from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(6): 1129–1136
- Capy P, Gasperi G, Biemont C, *et al*. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, 2000, 85(2): 101–106
- Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50–83
- Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. *Biochemical J*, 2010, 429(3): 403–417
- Fujii R, Yamashita S, Hibi M, *et al*. Asymmetric p38 activation in zebrafish. *J Cell Biol*, 2000, 150(6): 1335–1348
- Han ZS, Enslin H, Hu X, *et al*. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(6): 3527–3539
- Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 1995, 9(8): 576–596
- Hashimoto H, Fukuda M, Matsuo Y, *et al*. Identification of a nuclear export signal in MKK6, an activator of the carp p38 mitogen-activated protein kinases. *FEBS J*, 2000, 267(14): 4362–4371
- He S, Qian Z, Yang J, *et al*. Molecular characterization of a p38 MAPK from *Litopenaeus vannamei* and its expression during the molt cycle and following pathogen infection. *Dev*

- Comp Immunol, 2013, 41(2): 217–221
- Huang X, Huang Y, Cai J, *et al.* Roles of stress-activated protein kinases in the replication of Singapore grouper iridovirus and regulation of the inflammatory responses in grouper cells. *J Gen Virol*, 2011, 92: 1292–1301
- Keren A, Tamir Y, Bengal E. The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 252(1–2): 224–230
- Krens SFG, He S, Spalink HP, *et al.* Characterization and expression patterns of the MAPK family in zebrafish. *Gene Expression Patterns*, 2006, 6(8): 1019–1026
- Lee J, Sun C, Zhou YJ, *et al.* p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1251–1283
- Li DQ, Lei H, Li ZH, *et al.* A novel lipopeptide from skin commensal activates TLR2/CD36-p38 MAPK signaling to increase antibacterial defense against bacterial infection. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): 1–9
- Natale DR, Paliga AJM, Beier F, *et al.* p38 MAPK signaling during murine preimplantation development. *Dev Biol*, 2004, 268(1): 76–88
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 2004, 306(5695): 457–461
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, *et al.* Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, 1995, 270(13): 7420–7426
- Regan AD, Cohen RD, Whittaker GR. Activation of p38 MAPK by feline infectious peritonitis virus regulates pro-inflammatory cytokine production in primary blood-derived feline mononuclear cells. *Virology*, 2009, 384(1): 135–143
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, *et al.* A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock protein. *Cell*, 1994, 78(6): 1027–1037
- Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(2): 320–344
- Wickens JF. The tolerance of warm water prawn to recirculated water. *Aquaculture*, 1976, 9(11): 19–37
- Yan H, Zhang S, Li CZ, *et al.* Molecular characterization and function of a p38 MAPK gene from *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 34(6): 1421–1431
- Yee NK, Hamerman JA.  $\beta$ 2 integrins inhibit TLR responses by regulating NF- $\kappa$ B pathway and p38 MAPK activation. *Eur J Immunol*, 2013, 43(3): 779–792

(编辑 冯小花)

## The cDNA Cloning and Expression Analysis of p38 MAPK Gene of *Fenneropenaeus chinensis*

YAO Wanlong<sup>1,2</sup>, HE Yuying<sup>1,3</sup>, LIU Ping<sup>1,3</sup>, LI Jian<sup>1,3</sup>, WANG Qingyin<sup>1</sup>①

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Functional Laboratory of Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266200)

**Abstract** In this study we employed the RACE method to sequence the full-length cDNA of p38 MAPK gene of *Fenneropenaeus chinensis* for the first time and named it as *Fcp38*. The full-length cDNA sequence contained 1563 bp, including a 122-bp 5'-UTR, a 343-bp 3'-UTR, and a 1098-bp open reading frame (ORF) that encoded 365 amino acid residues. The isoelectric point (pI) of this peptide was 5.68, and the molecular mass was 41.77 kDa. Homology analysis revealed that the amino acid sequence of *Fcp38* was highly similar to the p38 MAPK sequences in other species. The sequence similarity reached 98% between *F. chinensis* and *Litopenaeus vannamei* and *Marsupenaeus japonicus*. *Fcp38* had a conserved Thr-Gly-Tyr (TGY) motif, a substrate-binding site Ala-Thr-Arg-Trp (ATRW), and an ED (ERK docking) motif. This structure played a critical role in the interaction between p38 MAPK and other molecules. The phylogenetic analysis showed that p38 of *F. chinensis* was in the same branch with *L. vannamei* and *M. japonicus*. The expression of *Fcp38* gene in different tissues was also analyzed with quantitative real-time PCR. The results showed that *Fcp38* existed in all the tested tissues including the intestine, gill, stomach, heart, hepatopancreas, muscles and hemocytes, and the expression was the highest in muscles. Real-time PCR analysis showed that ammonia-N stress significantly up-regulated the expression of *Fcp38* in the muscles, hemocytes, gill, heart, intestine and stomach, and that there was a spatiotemporal pattern for the expression of *Fcp38*. These results implied that *Fcp38* might play an important role in the response to the environmental stresses.

**Key words** *Fenneropenaeus chinensis*; p38 MAPK gene; Ammonia-N stress; Gene cloning; Tissue expression

① Corresponding author: WANG Qingyin, E-mail: qywang@public.qd.sd.cn