

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190630001

http://www.yykxjz.cn/

张云滨, 任宪云, 高保全, 吕建建, 王磊, 刘萍. 三疣梭子蟹 C-JUN 氨基末端激酶基因克隆及在病原胁迫后的表达特征分析. 渔业科学进展, 2020, 41(5): 92-100

Zhang YB, Ren XY, Gao BQ, Lü JJ, Wang L, Liu P. Cloning and expression analysis of c-Jun N-terminal kinase gene in *Portunus trituberculatus* after pathogenic stress. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(5): 92-100

## 三疣梭子蟹 C-JUN 氨基末端激酶基因克隆 及在病原胁迫后的表达特征分析\*

张云滨<sup>1,3</sup> 任宪云<sup>2,3</sup> 高保全<sup>2,3</sup> 吕建建<sup>2,3</sup>  
王磊<sup>1,3</sup> 刘萍<sup>2,3</sup>①

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306;

2. 青岛海洋科学与技术试点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 266071;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛 266071)

**摘要** C-JUN 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)作为丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族的重要一员,在细胞增殖、凋亡和免疫应激等过程中发挥着重要作用。为深入研究 JNK 基因的免疫防御机制,本研究从三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)转录组数据库中筛选到 JNK 基因的 EST 序列,利用 RACE 扩增技术克隆得到该基因全长序列,命名为 *PtJNK*, cDNA 全长为 3240 bp,开放阅读框(ORF)为 1380 bp,编码 459 个氨基酸,具有 TPY 磷酸化位点的 S\_TKC 保守结构域,是 JNK 基因家族典型特征。组织表达分布结果显示,*PtJNK* 基因在所有组织中均有表达;Real-time PCR 检测不同病原刺激下 *PtJNK* 基因的表达水平,结果显示,注射副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)后,该基因显著下调表达( $P<0.05$ );而注射白斑综合征病毒(WSSV)后,该基因显著上调表达( $P<0.05$ )。综上所述,*PtJNK* 基因是一种广泛表达基因,且在不同的病原感染情况下,该基因的表达模式存在差异,在免疫防御过程中具有重要作用。

**关键词** 三疣梭子蟹; *PtJNK*; 基因克隆; 病原感染; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)05-0011-09

C-JUN 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)在 1990 年被发现,是形成丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族的重要亚基。JNK 基因家族具有 THR-Pro-Tyr(TPY)磷酸化位点的丝氨酸/苏氨酸蛋白

激酶(S\_TKC)典型结构域,是上游基因 MKK4 与 MKK7 的激活区域,磷酸化的 JNK 可激活下游各种转录因子(Davis, 2000; Minden *et al*, 2008)和非转录因子(Lin, 2003),参与细胞增殖(Zhang *et al*, 2002)、

\* 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)、国家自然科学基金面上项目(41576147; 41876186)、泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)、江苏省重点研发计划(面上项目)(BE2017325)和中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022018027)共同资助 [This work was supported by the National Shrimp and Crab Industry Technology System (CARS-48), the National Natural Science Foundation of China (41876186; 41576147), the Project of Taishan Scholars Leading Talent (LJNY2015002), the Key Research and Development Plan of Jiangsu Province (BE2017325), and Central Level Public Welfare Research Institutes Basic Research Business Expenses (20603022018027)]. 张云滨, E-mail: 930476134@qq.com

① 通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-6-30, 收修改稿日期: 2019-07-29

凋亡(Kyriakis *et al*, 1994)、分化和免疫应激(Huang *et al*, 2009)等生理过程。国内外研究者发现, JNK 可介导多种外界因素引起的细胞凋亡, 如 Dhanasekaran 等(2008)研究发现, JNK 可活化其下游转录因子 c-JUN/AP-1 的活性, 进而调节凋亡蛋白的表达; 活化 P53 基因的表达可调节细胞凋亡(Jones *et al*, 2008); JNK 还可以介导非转录因子 BCL-2 家族基因的表达来调节细胞凋亡(Aoki *et al*, 2002)。JNK 除在细胞凋亡中发挥重要作用外, 在机体免疫应激过程中也发挥重要作用, 如在果蝇(*Drosophila*)中, JNK 基因可以激活脂肪体中抗菌肽基因的表达, 参与对致病菌(Bond *et al*, 2009)、真菌(Sluss *et al*, 1996)和病毒(Delaney *et al*, 2006)的免疫防御; Shi 等(2012)在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中获得的 JNK 同源基因与 WSSV 的复制和基因转录有关; Zhu 等(2016)在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中发现, JNK 信号通路可调节抗菌肽(AMPs)的表达。可见 JNK 在机体的免疫防御过程中具有极其重要的作用。然而, 在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)中, 有关 JNK 是否参与细胞凋亡、免疫防御的作用机制尚未见报道。

三疣梭子蟹具有较高的经济价值, 是我国重要的海产养殖品种(任海波等, 2018)。但由于养殖环境的破坏与病害频发, 三疣梭子蟹养殖规模呈现下降的趋势, 其中, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和白斑综合征病毒(WSSV)是导致三疣梭子蟹病害频发的主要病原(周俊芳等, 2014; 李卢, 2005; 阎斌伦等, 2010)。因此, 本研究采用 RACE 技术克隆三疣梭子蟹的 JNK 基因, 通过生物学软件分析其基因结构与功能, 并利用实时荧光定量技术(qRT-PCR)对其在不同病原感染下的表达模式进行分析, 为进一步探索三疣梭子蟹 JNK 基因在免疫防御中的作用机制提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验样品的获取

三疣梭子蟹采集于山东省潍坊市昌邑海丰养殖基地, 选择健康的三疣梭子蟹 200 只[(25±3) g], 在 10 m<sup>2</sup> 的室内水池中暂养 7 d, 水温为(25±2)°C, 盐度为 33, 持续充氧, 为保证水质良好, 每天换水 1/3, 定时、定点、定量投喂新鲜杂鱼, 投喂量为其体重的 30% 左右。随机选取 3 只暂养后的健康三疣梭子蟹, 分别取其 10 个组织(脑、肝胰腺、血细胞、肌肉、胸腺、肠、眼柄、胃、鳃和心脏)存于液氮, 用于组织表达分布分析, 其中, 血细胞 800×g 4°C 离心 10 min, 去上清液, 保留血细胞, 并保存于液氮中。

将剩余的健康三疣梭子蟹平均分为 3 组, 即对照组(甲壳动物生理盐水)、副溶血弧菌感染组(1×10<sup>7</sup> CFU/ml)和 WSSV(3.7×10<sup>7</sup> copy/ml)感染组, 每组 50 只以确保有足够的取样个体数量, 浓度参照张杰等(2018), 注射量为 100 μl, 分别在感染 0、3、6、12、24、48 和 72 h 时取其鳃、肝胰腺和血细胞组织, 每组取 3 只混合放置在 1.5 ml 离心管中。其中, 血细胞 800×g 4°C 离心 10 min, 去上清液, 保留血细胞, 并保存于液氮中, 用于后续总 RNA 提取等。

### 1.2 总 RNA 提取与 RACE 模板合成

将保存于液氮未处理的组织进行充分研磨, 采用 TRIzol<sup>®</sup> Reagent(Roche 公司)方法进行总 RNA 提取, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo)检测其质量和浓度, 将高质量的 RNA 进行分装保存(-80°C)。将各组织中高质量的总 RNA 均匀混合, 并使用 SMARTer<sup>®</sup> RACE cDNA Amplification Kit (TaKaRa 公司)试剂盒合成 3'和 5' RACE cDNA 模板(-80°C 分装保存), 用于后续基因克隆实验。

### 1.3 *PtJNK* 基因 cDNA 全长扩增

根据三疣梭子蟹转录组数据库筛选得到 *PtJNK* 的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5' RACE 特异性引物及通用引物, 由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1), 使用 Trans Taq<sup>®</sup> DNA 高保真聚合酶(北京全式金生物公司)进行 3'和 5'末端巢式 PCR 扩增, 第 1 轮使用 UPM 通用引物, 10 μl 反应体系: 0.5 μl 模板、0.4 μl Forward/Reverse Primer (10 μmol/L)、5 μl Premix Taq (LA Taq Ver 2.0)、ddH<sub>2</sub>O 补足; 程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1.5 min, 35 个循环; 72°C 10 min。第 2 轮以第 1 轮反应为模板, 使用 NUP 通用引物, 20 μl 反应体系, 程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1.5 min, 35 个循环; 72°C 10 min。将获得的 PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将检测合理的目的条带进行切胶回收 (TaKaRa Mini BEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0), 与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接 3 h, 转化至 DH5α 大肠杆菌感受态细胞(TSINGKE)中, 涂布于含氨苄的固体培养基上, 37°C 恒温过夜培养, 挑取阳性单克隆, 加入含 100 μg/ml 氨苄的 LB 液体培养基中, 37°C 200 r/min 振荡培养 4 h, 用 M13-47/48 引物进行菌落 PCR 鉴定, 并将检测准确的目的菌液送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

表 1 本研究所用引物序列  
Tab.1 Nucleotide sequences of the PCR primers used in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'~3')	用途 Purpose
PtJNK-3' F1	GACCCAGAACGCAGGATAAGT	3'-RACE
PtJNK-3' F2	TGTTCTCCCCCTCTCCCACT	
PtJNK-5' R1	GTTGGCTGTAATCTGGACATAAAGT	5'-RACE
PtJNK-5' R2	GGGCTCCTCACTGCTTCCAA	
JNK-F	TATGTTGAAAACCGTCCTCGC	RT-PCR
JNK-R	CCACACTTATCTGCGTTCTG	
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primers
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	菌落 PCR Colony PCR
M13F (-47)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	
M13R (-48)	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	qRT-PCR 内参 qRT-PCR internal reference
$\beta$ -actin-F	CGAAACCTTCAACTCCCG	
$\beta$ -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	

#### 1.4 *PtJNK* 基因序列生物信息学分析

利用 Contig Express 软件将 3'和 5'克隆序列与 EST 序列进行拼接、验证,得到 *PtJNK* 基因的 cDNA 全长,利用 NCBI-BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线软件对 *PtJNK* 基因序列进行比对,并使用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 在线软件预测 *PtJNK* 基因序列的开放阅读框(ORF)。利用 ExPASy([http://cn.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://cn.expasy.org/tools/pi_tool.html))、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)、SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线生物学分析软件对基因编码的氨基酸进行物理性质、结构域、跨膜结构域和信号肽的预测。使用 DNA MAN 5.2.9 软件对不同物种的氨基酸序列进行多重序列比对,并通过 MEGA 6.0 软件(Tamura *et al*, 2011)采用邻接法(Neighbor-Joining method) (Saitou *et al*, 1987)进行系统进化树的构建。

#### 1.5 *PtJNK* 基因组织表达分析

将提取的总 RNA 用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) kit (南京诺维赞)进行反转录成 cDNA,用于组织表达定量检测。根据 *PtJNK* 基因的全长序列,通过 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 特异性引物,内参基因选用  $\beta$ -actin(表 1)。采用 10  $\mu$ l qRT-PCR 体系:SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$ ) 5.0  $\mu$ l, 正/反向引物(10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ l, ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.2  $\mu$ l, cDNA 模板 2.0  $\mu$ l, 灭菌水 3.0  $\mu$ l。反应程序: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。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法(Livak *et al*, 2001)对荧光定量结果进行分析,并通过 SPSS 19.0 软件进行显著性分析( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 *PtJNK* 基因全长与序列结构特征

利用 RACE 方法得到三疣梭子蟹 *JNK* 基因全长序列 3240 bp, 命名为 *PtJNK*(GenBank 登录号: MK28792)(图 1)。生物学软件分析显示,该基因包含 5'非编码区 668 bp, 3'非编码区 1192 bp, 其开放阅读框(ORF)1380 bp, 编码 459 个氨基酸, 预测分子量为 51.7 kDa, 理论等电点为 6.47。SMART、Signal 4.1 在线软件分析显示,该氨基酸序列具有 TPY 磷酸化位点的 S\_TKC 保守结构域(图 2), 属于 *JNK* 基因家族典型结构特征, 无信号肽及跨膜结构域。

### 2.2 *PtJNK* 氨基酸同源性与系统进化树分析

利用 Blast 在线软件对 *PtJNK* 氨基酸序列和其他物种的 *JNK* 氨基酸序列进行同源性比对, 结果显示, *PtJNK* 氨基酸序列与锯缘青蟹(*Scylla paramamosain*) *SpJNK* 氨基酸序列同源性最高(91.7%), 其次是中华绒螯蟹 *EsJNK*(89.98%)、凡纳滨对虾 *PvJNK*(88.52%)、日本对虾(*Penaeus japonicas*)*PjJNK*(87.90%)。利用 DNA MAN 对多个序列进行同源性比对发现(图 3), 每个氨基酸序列都具有 TPY 磷酸化位点的 S\_TKC 保守结构域结构。通过对多个氨基酸序列构建系统进化树发现(图 4), 三疣梭子蟹与锯缘青蟹和中华绒螯蟹聚为一支, 其次与凡纳滨对虾和日本对虾聚为一类。

### 2.3 *PtJNK* 基因组织表达分析

**2.3.1 *PtJNK* 全组织相对表达分析** 利用 qRT-PCR 技术对三疣梭子蟹不同组织的 *PtJNK* mRNA 进



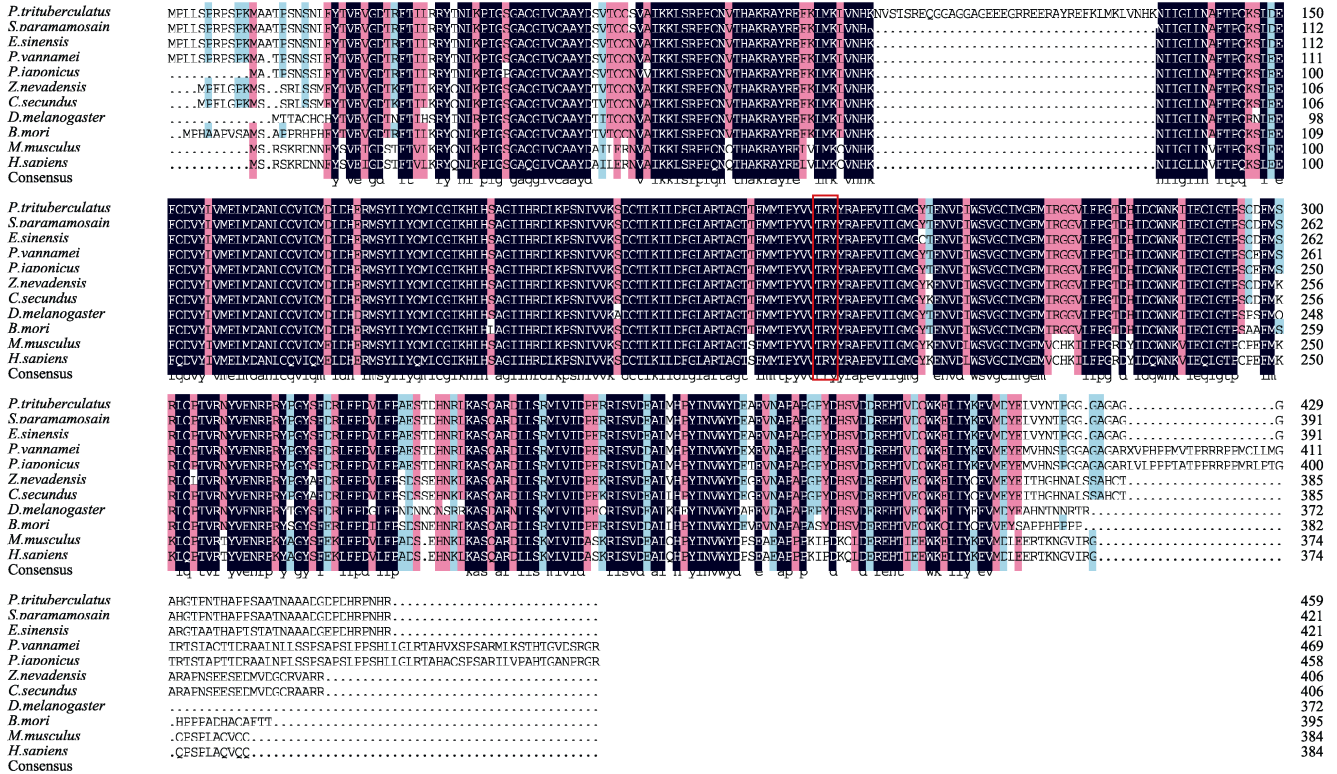


图 3 三疣梭子蟹 PtJNK 氨基酸序列的多序列比对

Fig.3 The multiple sequence alignment of that PtJNK amino acid sequences

各物种名称及 GenBank 登录号：三疣梭子蟹 MK28792；锯缘青蟹 AYK28495.1；中华绒螯蟹 AHG95993.1；凡纳滨对虾 XP\_027218684.1；日本对虾 BAI87826.1；家蚕 NP\_001103396.1；果蝇 AAB97094.1；乾木白蚁 PNF21055.1；内华达古白蚁 KDR18179.1；小鼠 BAA85875.1；人 NP\_001310231.1

Name of each species and GenBank accession numbers: *P. trituberculatus* MK28792; *S. paramamosain* AYK28495.1; *E. sinensis* AHG95993.1; *P. vannamei* XP\_027218684.1; *P. japonicus* BAI87826.1; *B. mori* NP\_001103396.1; *D. melanogaster* AAB97094.1; *C. secundus* PNF21055.1; *Z. nevadensis* KDR18179.1; *M. musculus* BAA85875.1; *H. sapiens* NP\_001310231.1

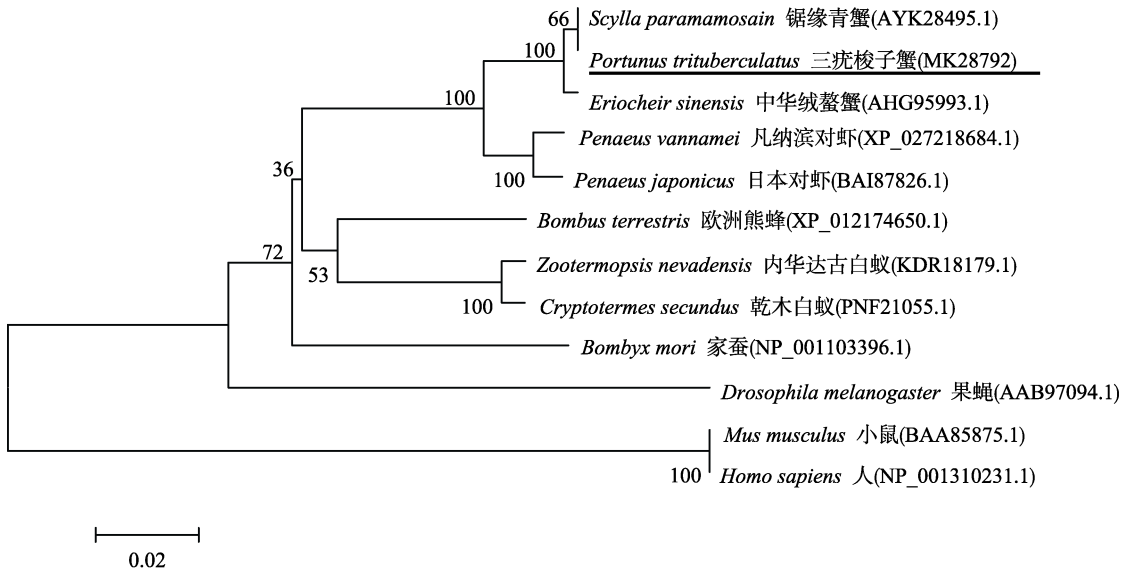


图 4 基于 JNK 氨基酸序列构建的不同物种的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of different species based on JNK amino acid sequences

行相对表达定量检测, 结果显示(图 5), *PtJNK* 在各组织中都有表达, 且表达存在显著差异( $P < 0.05$ )。实验以肝胰腺作为对照, 其中, 胃和肌肉中的表达量最高(与肝胰腺的表达水平相比分别为 3.98 和 3.78 倍); 其次在鳃的表达水平是肝胰腺的 1.79 倍; 在心脏略低于肝胰腺的表达水平, 在血细胞的相对表达量较低。因此, 推测 *PtJNK* 可能在三疣梭子蟹中发挥不同的作用, 其作用因组织类型的不同而不同。

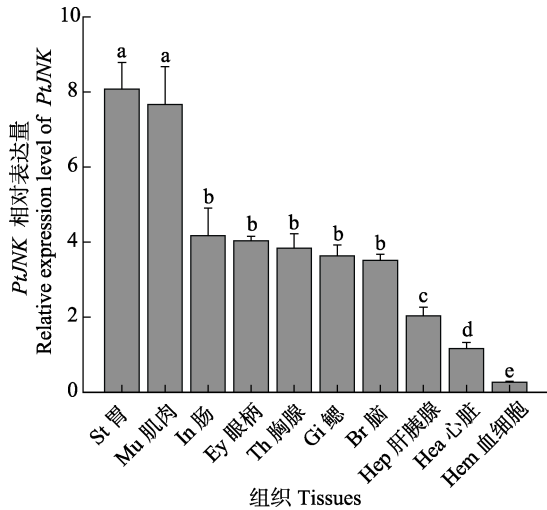


图 5 三疣梭子蟹 *PtJNK* 基因在不同组织中的表达  
Fig.5 Relative expression characterization of *PtJNK* gene in the various tissues of *P. trituberculatus*

相同字母代表差异不显著( $P > 0.05$ ),  
不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ ), 下同

Same letters indicated no significantly different ( $P > 0.05$ ),  
different letters indicated significantly different ( $P < 0.05$ ).  
The same as below

**2.3.2 不同病原刺激下 *PtJNK* 基因的表达分析** 本研究利用 qRT-PCR 技术, 研究在不同的病原刺激下, 三疣梭子蟹血细胞、肝胰腺和鳃中 *JNK* 基因的表达情况(图 6)。在副溶血弧菌感染后, *PtJNK* 基因在血细胞、鳃和肝胰腺 3 个组织中, 与对照组相比基本呈现不同程度的下调趋势, 且呈现先下降后上升再下降后趋于平衡的表达模式。在血细胞中, 分别在 12 h 和 24 h 高于对照组表达量, 达到最高表达水平, 为对照组的 1.79 倍和 1.54 倍; 在肝胰腺中, 在 12 h 达到最高值, 为对照组的 0.63 倍; 在鳃中, 在 6 h 达到最高表达量, 为对照组的 0.61 倍, 在 48 h 和 72 h 达到恒定水平, 为对照组的 0.56 倍和 0.59 倍。

在注射 WSSV 后, *PtJNK* 基因在血细胞、肝胰腺和鳃 3 个组织中, 相对对照组呈上调表达。在血细胞中呈先下降后上升再下降的表达模式, 在 24 h 达到最大值, 为对照组的 18.21 倍; 在肝胰腺中, *PtJNK*

基因的表达整体呈先上升后下降的表达趋势, 在 12 h 表达量达到最大值, 为对照组的 4.91 倍; 在鳃中, *PtJNK* 基因的表达整体呈先上升后下降再上升的表达趋势, 其中, 在 12 h 下调至最低水平, 为对照组的 0.38 倍。

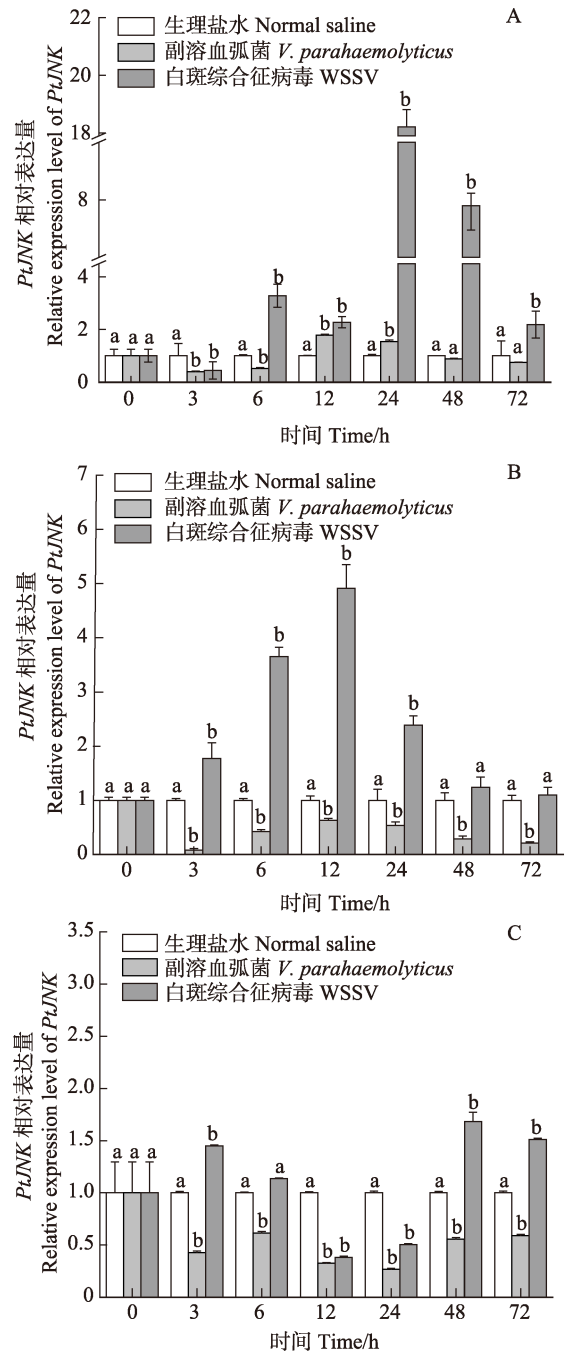


图 6 三疣梭子蟹在不同病原感染下 *PtJNK* 在血细胞(A)、肝胰腺(B)和鳃(C)中的表达模式

Fig.6 The expression of *PtJNK* in haemocytetes (A), hepatopancreas(B), and gill(C) of *P. trituberculatus* after different pathogen infection

感染组间没有进行差异显著分析

No analysis was performed between infected groups

### 3 讨论

为更加深入了解三疣梭子蟹 *JNK* 基因的分子特征, 本研究首次获得 *PtJNK* 基因的全长序列, cDNA 全长为 3240 bp。经生物学软件分析, *PtJNK* 基因含有 TPY 磷酸化位点的 S\_TKC 保守结构域, 是 C-JUN 氨基末端激酶(JNK)基因家族的典型结构域。氨基酸多重序列比对结果显示, *PtJNK* 氨基酸序列与其他物种具有高度的保守性。系统进化树结果表明, 无脊椎动物与脊椎动物有关 *JNK* 基因在进化上并没有十分密切的联系, 而三疣梭子蟹 *PtJNK* 基因与锯缘青蟹、中华绒螯蟹聚为一支。综上所述, 该序列确定为三疣梭子蟹 *JNK* 基因, 且在进化上高度保守。

*JNK* 基因可由各种环境应激激活, 如细菌或病毒感染、氧化应激等。为了深入研究 *JNK* 基因在三疣梭子蟹中的功能, 进行了病原感染实验, 并利用 qRT-PCR 对 *PtJNK* 基因的组织表达模式进行了分析。结果显示, 该基因在各检测组织(胃、肌肉、肠、眼柄、胸腺、鳃、脑、心脏、肝胰腺和血细胞)中均有表达, 其中, 在胃和肌肉中表达量最高。时恭芳(2017)在对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的研究中发现, *PmJNK* 在各组织中广泛表达, 其中, 在血淋巴、鳃和肠道中高表达; Sun 等(2016)对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)研究发现, *JNK* 基因在肌肉中表达量最高。因此, 推断 *PtJNK* 基因在三疣梭子蟹中可能参与多种生理表达, 且因物种的不同其表达模式具有明显的差异。

在无脊椎动物中, 血细胞(Wang *et al.*, 2005; Bachère *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2013)、肝胰腺(Diggles *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012)被认为是主要的免疫器官, 在宿主对外来病原体的免疫防御中发挥重要作用。为进一步研究 *PtJNK* 基因的功能, 本研究对血细胞、鳃和肝胰腺 3 个组织进行了表达定量分析。研究发现, 在注射副溶血弧菌后, *PtJNK* 基因在血细胞、鳃和肝胰腺中的表达呈现一定程度的下调表达( $P < 0.05$ ), 在 3 h 后, 该基因的表达量呈先上升后下降的模式, 而在对凡纳滨对虾(Li *et al.*, 2015)和近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*) (Qu *et al.*, 2016)中研究发现, *JNK* 基因呈上调表达, 且在病原感染的过程中发挥着免疫调节作用, 因此, 推测副溶血弧菌导致三疣梭子蟹机体紊乱, 引起 *PtJNK* 基因表达受到抑制, 表明 *PtJNK* 基因参与了三疣梭子蟹免疫防御过程。WSSV 感染后发现, 在所观察的血细胞、肝胰腺和鳃中均呈现显著的上调表达( $P < 0.05$ ), 分别在 24 h、12 h 和 48 h 达到最大值, 为对照组的 18.21 倍、4.9 倍和 11.68 倍, 这与凡纳滨对虾的研究结果相似: Shi 等

(2012)的研究证明了该基因具有抑制 WSSV 复制的功能, Li 等(2015)证明了 *JNK* 途径的激活(包括 MKK7/*JNK/AP-1*)可以增强抗菌肽(AMPs)的产生。另有研究发现, 在病毒感染过程中, *JNK* 信号通路参与病毒复制和调控特定病毒蛋白的表达(Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015), 而抗菌肽在机体免疫调节中具有重要的作用, 这进一步证实了 *PtJNK* 基因在三疣梭子蟹免疫防御过程中起调节作用。

综上所述, 本研究首次成功克隆得到三疣梭子蟹的 *PtJNK* 基因序列全长, 并对其氨基酸序列进行了生物学分析, 通过病原感染实验检测 *PtJNK* 基因在血细胞、肝胰腺和鳃中的相对表达量, 初步证实了 *PtJNK* 基因在三疣梭子蟹感染病原的过程中发挥着重要的作用, 为深入研究 *PtJNK* 基因的功能作用机制提供了理论参考。

### 参 考 文 献

- Aoki H, Kang PM, Hampe J, *et al.* Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(12): 10244–10250
- Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 149–168
- Bond D, Foley E. A quantitative RNAi screen for *JNK* modifiers identifies Pvr as a novel regulator of *Drosophila* immune signaling. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(11): 1000655
- Davis RJ. Signal transduction by the *JNK* group of MAP kinases. *Cell*, 2000, 103(2): 239
- Delaney JR, Stoven S, Uvell H, *et al.* Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the *JNK* and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *EMBO Journal*, 2006, 25(13): 3068–3077
- Dhanasekaran DN, Reddy EP. *JNK* signaling in apoptosis. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6245–6251
- Diggles BK, Moss GA, Carson J, *et al.* Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, 43(2): 127–137
- Huang G, Shi LZ, Chi H. Regulation of *JNK* and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination. *Cytokine*, 2009, 48(3): 161–169
- Jones E, Dickman M, Whitmarsh A. Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochemical Journal*, 2007, 405(3): 617–623
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, *et al.* The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 1994, 369(6476): 156–160
- Li C, Li H, Wang S, *et al.* The c-Fos and c-Jun from *Litopenaeus*

- vannamei* play opposite roles in *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 52(1): 26–36
- Li L. Common diseases and their control of swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2005, 32(6): 269–271 [李卢. 三疣梭子蟹的常见病及其防治. *水产科技情报*, 2005, 32(6): 269–271]
- Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: Breaking the brake on apoptosis. *Bioessays News and Reviews in Molecular Cellular and Developmental Biology*, 2003, 25(1): 17–24
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Letters in Spatial and Resource Sciences*, 2008, 1333(2): 85–104
- Qu F, Xiang Z, Xiao S, *et al.* c-Jun N-terminal kinase (JNK) is involved in immune defense against bacterial infection in *Crassostrea hongkongensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 67: 77–85
- Ren HB, Li YB, Zhang XR, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of *Scygonadin* from *Portunus trituberculatus*. *Journal of Biology*, 2018, 35(4): 21–24 [任海波, 李燕波, 张肖荣, 等. 三疣梭子蟹抗菌肽 *Scygonadin* 基因的克隆与序列分析. *生物学杂志*, 2018, 35(4): 21–24]
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425
- Shi GF. The cloning and function research of the genes JNK, C-JUN and ATF-2 in the JNK signaling pathway from shrimp, *Penaeus monodon*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2017 [时恭芳. 斑节对虾 JNK 信号通路中的 JNK、C-JUN 和 ATF-2 基因的克隆与功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- Shi H, Yan X, Ruan L, *et al.* A novel JNK from *Litopenaeus vannamei* involved in white spot syndrome virus infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 37(3–4): 421–428
- Sluss HK, Goberdhan DC, Davis RJ, *et al.* A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes and Development*, 1996, 10(21): 2745–2758
- Sun J, Li Y, Li M, *et al.* A novel JNK is involved in immune response by regulating IL expression in oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 79: 93–101
- Sun Y, Zhang L, Zhang M, *et al.* Characterization of three mitogen-activated protein kinases (MAPK) genes reveals involvement of ERK and JNK, not p38 in defense against bacterial infection in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 54: 507–515
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739
- Wang PH, Liang JP, Gu ZH, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(2): 359–371
- Wang Y, Puscheck EE, Lewis JJ, *et al.* Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38MAPK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media. *Fertility and Sterility*, 2005, 83(1): 1144–1154
- Wei S, Huang Y, Huang X, *et al.* Characterization of c-Jun from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* involved in SGIV infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 1(43): 230–240
- Xiao YM, Zhou YH, Xiong Z, *et al.* Involvement of JNK in the embryonic development and organogenesis in zebrafish. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(6): 716–725
- Yan BL, Liang LG, Zhang XJ. Prevention and cure of fish disease proceedings on main diseases of swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Fisheries Science and Technology Information*, 2010, 37(1): 29–33 [阎斌伦, 梁利国, 张晓君. 三疣梭子蟹主要病害研究进展. *水产科技情报*, 2010, 37(1): 29–33]
- Zhang J, Lü JJ, Liu P, *et al.* Cloning of Toll4 in *Portunus trituberculatus* and its expression in responding to pathogenic infection and low salinity stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 146–155 [张杰, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹 Toll4 基因克隆及其在病原和低盐胁迫中的表达特征分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 146–155]
- Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 2002, 12(1): 9–18
- Zhou JF, Li XC, Wang JY, *et al.* Analysis of major infectious diseases and their causative agents of Chinese sea crab. *Marine Sciences*, 2014, 38(6): 102–106 [周俊芳, 李新苍, 王江勇, 等. 中国海水蟹主要流行性疾病及其病原分析. *海洋科学*, 2014, 38(6): 102–106]
- Zhu YT, Zhang X, Wang SC, *et al.* Antimicrobial functions of EsLecH, a C-type lectin, via JNK pathway in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 61: 225–235



## Cloning and Expression Analysis of c-Jun N-Terminal Kinase Gene in *Portunus trituberculatus* after Pathogenic Stress

ZHANG Yunbin<sup>1,3</sup>, REN Xianyun<sup>2,3</sup>, GAO Baoquan<sup>2,3</sup>, LÜ Jianjian<sup>2,3</sup>  
WANG Lei<sup>1,3</sup>, LIU Ping<sup>2,3</sup><sup>①</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071)

**Abstract** The c-Jun N-terminal kinase (JNK) is a member of the mitogen-activated protein kinase superfamily, which plays an important role in cell proliferation, apoptosis, and immune stress. To further explore the immune defense mechanism of JNK in *Portunus trituberculatus*, the EST sequence of *PtJNK* was isolated from the transcriptome database of *P. trituberculatus*. In this study, the JNK gene of *P. trituberculatus* (*PtJNK*) was successfully cloned by RACE; measurements showed a cDNA length of 3240 bp and an open reading frame of 1380 bp. *PtJNK* consists of 459 amino acids, including a serine/threonine protein kinase (S-TKc) domain with a conserved Thr-Pro-Tyr (TPY) motif, which is a typical feature of the JNK gene family. The results of tissue expression and distribution show that the *PtJNK* gene is expressed in all tissues. Real-time PCR was used to detect the expression of *PtJNK* under different pathogenic stimuli. The results show that expression of the gene is significantly down-regulated after injection of *Vibrio parahaemolyticus* ( $P < 0.05$ ), while expression is significantly up-regulated when white spot syndrome virus is injected ( $P < 0.05$ ). To sum up, *PtJNK* gene is a widely expressed gene, and expression of the gene differs according to pathogen.

**Key words** *Portunus trituberculatus*; *PtJNK*; Gene cloning; Pathogenic infection; Quantitative Real-time PCR

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn