

青蛤 *MAPK/p38* 基因的克隆及 Poly:Ic 胁迫下的表达分析

姚玥彤¹, 王玉梅¹, 侯梓园¹, 王斌², 石雅峰¹, 潘宝平¹, 闫春财^{1*}

(1. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387; 2. 天津市北大港湿地自然保护区管理中心, 天津 300270)

摘要 [目的]克隆青蛤 *MAPK/p38* 基因, 并分析其在 Poly:Ic 胁迫下的表达情况。[方法]利用转录组测序获得青蛤 *MAPK/p38* 基因的序列信息, 采用生物信息学软件分析该基因在近缘生物间的进化关系; 利用巢式及荧光定量 PCR 技术克隆青蛤 *MAPK/p38* 基因的结构域序列, 并在 Poly:Ic 胁迫后立即分析该基因在青蛤各组织中的表达情况以及血淋巴中的时序性表达情况。[结果]克隆得到青蛤 *MAPK/p38* 基因的结构域序列, 分析发现该基因在物种进化中很保守, 其在青蛤的血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌和鳃中均有表达, 其中在血淋巴中表达量最高, 鳃中表达量最低。Poly:Ic 胁迫 3 h 后该基因的表达量达到最大值, 与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。[结论] *MAPK/p38* 基因所表达的产物是青蛤重要的免疫信号通路蛋白。

关键词 青蛤; *MAPK/p38*; Poly:Ic; 荧光定量 PCR

中图分类号 S968.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)04-0100-03

Cloning of *MAPK/p38* in *Cyclina sinensis* and Its Expression under Poly:Ic Strees

YAO Yue-tong, WANG Yu-mei, HOU Zi-yuan et al (College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Key Laboratory of Plant and Animal Resistance in Tianjin, Tianjin 300387)

Abstract [Objective] To clone the *MAPK/p38* gene, and analyze its expression under Poly:Ic stress. [Method] Using the transcriptome sequencing won the *Cyclina sinensis* silk crack the original amp-activated protein kinase (*MAPK/p38*) gene sequence information, using bioinformatics software analyze the evolution of the relationship between the gene in the related biological. Using the nested and fluorescence quantitative PCR cloning technology and analyzing the *MAPK/p38* gene expression in organizations, as well as Poly:Ic testing under the stress of the *MAPK/p38* gene sequence in *C. sinensis* haemolymph expression. [Result] The *MAPK/p38* gene structural domain sequences was cloned, the analysis found that gene in evolution was very conservative, *MAPK/p38* genes in *C. sinensis* haemolymph muscle, liver, coat film, closed shell and gills were expressed, which express in the haemolymph amount was highest, gills expressed in the lowest amount. The gene expression quantity under Poly:Ic stress in 3 h was the maximum, which had extremely significant difference with the control group ($P < 0.01$). [Conclusion] The product expressed by the gene was important immune signaling pathways protein for *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*; *MAPK/p38*; Poly:Ic; Fluorescence quantitative PCR

青蛤 (*Cyclina sinensis*) 是我国传统的经济养殖贝类^[1], 它不仅肉质鲜美, 还具有极高的药用和营养价值。但近年来, 随着不断扩大的增养殖规模、日益加深的集约化程度以及不断恶化的养殖环境, 青蛤的大规模病害和死亡现象日渐增多^[2]。为了保证青蛤养殖业的可持续发展, 更好地推动我国沿海经济的发展, 青蛤免疫抗病害方面的研究迫在眉睫。

贝类属于非特异性免疫系统, 其中 Toll 样受体是非特异性免疫反应中一类重要的识别受体, 在对抗病原物的侵染过程中起着关键作用^[3-8]。MAPK 家族是 TLRs 信号通路中的重要成员之一, 它作为介导细胞反应的一种重要信号系统, 参与了细胞间多种生化反应信号的识别、传递以及放大等处理过程^[9]。目前研究认为 MAPKs 主要由细胞外信号调节激酶 1/2、氨基末端激酶、p38MAPK 和 Erk5 这 4 条信号转导途径组成^[10-12]。p38 是 MAPKs 通路的主要蛋白之一, 它的激活途径很保守, 属于典型的 3 级激酶级联反应磷酸化激活途径^[9]。目前对此通路的研究在脊椎类如人类^[13]、小鼠^[14]等中的报道较多, 但在无脊椎动物中的报道较少, 因此对贝类免疫学的研究具有重要的理论意义。探究 MAPK/p38 在

MAPKs 信号通路中的作用, 为探索丝裂原活化蛋白激酶所参与的青蛤免疫机制提供重要的试验数据, 并为选育贝类新品种、开发疫苗提供理论依据, 减少其养殖过程中的大规模死亡现象, 从而推动沿海地区的经济发展。

1 材料与方法

1.1 材料 在天津大港的滩涂区域采集青蛤后选取各形态指标无显著差异的有活性个体为试验对象, 在海水密度为 1.02~1.04 g/cm³, 水温为 21~24 ℃, pH 7.0 的通气人工海水中暂养 14 d 左右^[15]。暂养期间需要每天更换一次水且持续曝气, 并喂养一次 0.005 g/mL 的小球藻^[16]。该试验所用的 Poly:Ic 低温冷冻保存于天津师范大学生命科学学院分子免疫学实验室内^[17]。

1.2 方法

1.2.1 材料处理。 饲养 14 d 后选取无明显形态差异且表面无破损的青蛤进行分组。试验之前将保存的 Poly:Ic 接种到 2216E 液体培养基中 (比例 1:100)。将接好的菌种转移进摇床中培养 1 d, 控制温度为 37 ℃、转速为 200 r/min, 用无菌海水洗脱至 OD₆₀₀ = 0.4^[17]。试验组每只青蛤注射 50 μL Poly:Ic 菌液, 对照组中每只青蛤注射等量的灭菌生理盐水。每个组别采用随机分组的方法设置 10 个平行组。在注射 0、3、6、12、24、48、96 h 后分别提取青蛤的血淋巴冷冻备用。

1.2.2 青蛤转录组文库构建。 TRIzol 法提取青蛤各个组织的总 RNA, 用 RNA 提取试剂盒分离 mRNA。采用第二代 MiSeq 测序仪, pair end 双端模式完成青蛤转录组测序, 利用 De novo RNA-seq analysis 技术综合分析, 分析相关基因功能

基金项目 天津市科委应用基础与前沿技术项目 (14JCZDJC34200, 14JCQNJC14600); 天津市高等学校科技发展基金项目 (20090608); 天津师范大学基金项目 (5RL104, 043135205-GC54, 043135202-KK1706); 大学生创新创业训练计划项目 (201710065034)。

作者简介 姚玥彤 (1996—), 女, 天津人, 本科生, 专业: 生物科学。* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事动物分子系统学与免疫学研究。

收稿日期 2017-11-17

注释和代谢途径,后通过筛选得到 *MAPK/p38* 基因的类似序列。

1.2.3 *MAPK/p38* 基因结构域的克隆及生物信息学分析 利用获得的 *MAPK/p38* 基因类似序列设计克隆引物 *MAPK/p38* - S:5' - CCAATGTCTTAGCCCGGTAGG - 3', *MAPK/p38* - A:5' - GTAAGGGTGTGCAAGAGCC - 3',进行克隆,与 GenBank 中的核酸数据库进行 Blastx 比对,并完成系统树的建立。

1.2.4 Poly:Ic 刺激下青蛤 *MAPK/p38* 基因在血淋巴内的时序性表达 按照上述材料中的方法处理青蛤,并分别在 0、3、6、12、24、48、96 h 时提取 Poly:Ic 试验组和对照组青蛤血淋巴的总 RNA 后,将其反转成 cDNA (TRIZOL 法),保存在 -20 ℃ 条件下^[18]。

以 β -actin 基因为内参基因进行实时定量, β -actin - S:5' - CACCACAACGCGGAGAG - 3', β -actin - A:5' - C - CGATAGTGATGACCTGACC - 3'; *MAPK/p38* - S:5' - CCAATGTCTTAGCCCGGTAGG - 3', *MAPK/p38* - A:5' - GTA-

AGGGTGTGCAAGAGCC - 3',上述为所用引物^[15]。

Rotor-Gene 7500 实时定量 PCR 仪为反应仪器。扩增体系共 20 μ L,其反应程序为 95 ℃ 预变性 30 s,94 ℃ 变性 5 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据处理,用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析^[16]。

1.2.5 Poly:Ic 刺激后青蛤不同组织中的表达特征 在 Poly:Ic 刺激后用 TRIZOL 法提取青蛤血淋巴、闭壳肌、外套膜、肝脏和鳃的总 RNA,之后反转成 cDNA,-20 ℃ 保存。内参基因、实时定量时所用的引物序列、体系和程序、数据处理方法同“1.2.4”。

2 结果与分析

2.1 青蛤 *MAPK/p38* 基因的生物信息学分析 分析显示 *MAPK/p38* 基因无跨膜区,为完整的胞内蛋白;其信息传递序列位于第 30~40 个氨基酸;有一个完整的激酶结构域:S-TKc,位于第 27~311 个氨基酸;建立系统发育树(图 1),青蛤的 *MAPK/p38* 基因与光滑双脐螺的亲缘关系最近。

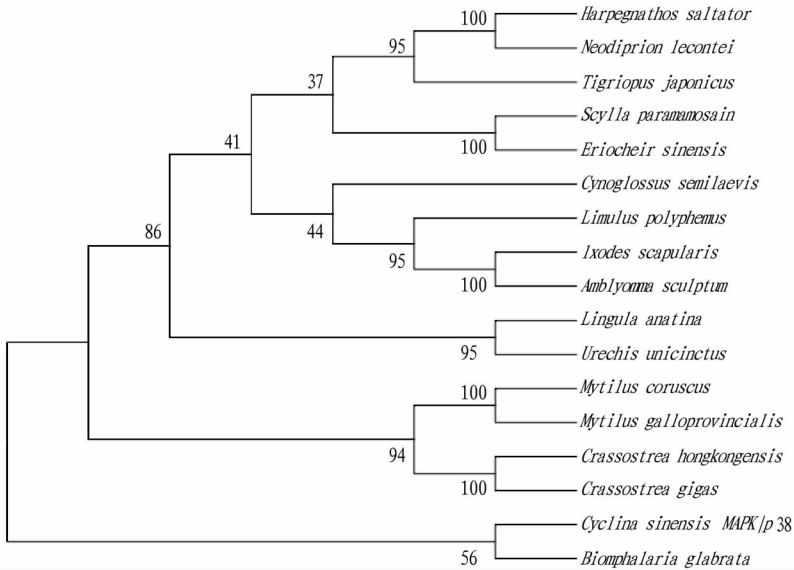


图 1 青蛤 *MAPK/p38* 基因和其他物种的 *MAPK/p38* 基因氨基酸序列构建的系统树

Fig.1 The phylogenetic tree constructed by the amino acid sequence of *MAPK/p38* from *C. sinensis* and *MAPK/p38* from other species

2.2 青蛤 *MAPK/p38* 基因结构域的克隆 用“1.2.3”中的引物,采用 PCR 技术扩增得到青蛤 *MAPK/p38* 基因的结构域序列(图 2),结构域序列长 855 bp。扩增体系为 25 μ L,其反应程序为 95 ℃ 预变性 30 s,94 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。

2.3 青蛤 *MAPK/p38* 基因在不同组织间的表达 以 β -actin 基因在各组织中的表达量为内参对照,利用实时荧光定量 PCR 分析 *MAPK/p38* 基因在青蛤刚刚注射 Poly:Ic 后其血淋巴、肝脏、外套膜、闭壳肌和鳃 5 个组织中的表达情况,结果表明该基因在以上组织中普遍表达(图 3),但表达量有明显不同,在血淋巴中表达量最高,与其他组织相比差异极显著($P < 0.01$),鳃中表达量最少。

2.4 Poly:Ic 刺激下青蛤 *MAPK/p38* 基因在血淋巴中的时序性表达 以 β -actin 基因为内参基因,用实时定量荧光 PCR 技术分析被 Poly:Ic 侵染后的青蛤 *MAPK/p38* 基因在血

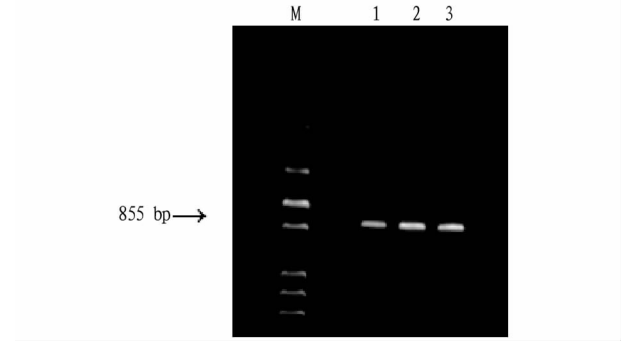


图 2 青蛤 *MAPK/p38* 基因结构域的克隆结果

Fig.2 Cloning result of genetic structure domain of *MAPK/p38* from *C. sinensis*

淋巴中表达的时序性变化。结果表明:表达量达到最大值时为刺激 3 h 后,与对照组相比存在极显著差异($P < 0.01$),之后的数值逐渐下降,最后趋于正常水平(图 4)。

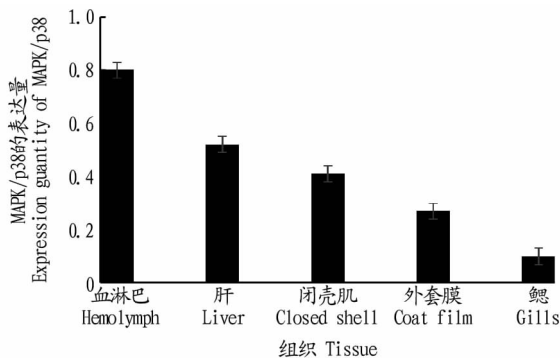


图3 *MAPK/p38* 基因在青蛤不同组织中的表达分布

Fig.3 The distribution of *MAPK/p38* expression in different tissues of *C. sinensis*

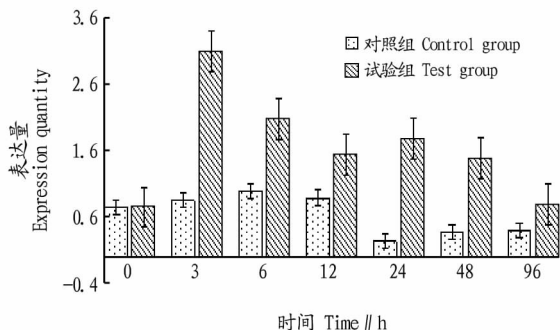


图4 Poly:Ic 刺激下青蛤 *MAPK/p38* 基因在血淋巴中的时序性表达结果

Fig.4 The temporal expression of *MAPK/p38* gene in hemolymph was stimulated by the Poly:Ic

3 讨论

该试验发现,经 Poly:Ic 刺激过后的试验组中,目的基因在各个组织中均有表达,其中在血淋巴中表达量最高,在鳃中的表达量最低。这与未刺激时目的基因在各个组织中表达的相对含量一致;在随后的时序性表达中发现,经 Poly:Ic 刺激后的 96 h 中血淋巴内的表达量呈先升高后又逐渐减少直至趋于正常水平的趋势,在刺激 3 h 后达到表达的最高值且与对照组的差异具有高度统计学意义。这与刺激其他动物的结果相吻合:长牡蛎和蚕的 *defenfe* 经刺激后血淋巴的表达量明显上升并在刺激 6 h 后达到最高值^[19-20], 虾夷扇贝的 *Tollip* 和 *NF-κB* 基因在刺激 3 h 后表达量显著上升,而且 *MKK* 和 *TNFR* 基因的表达水平也有变化^[21-24]。青蛤血淋巴中 *MAPK/p38* 基因在刺激后大量表达这一现象,能揭示该基因的表达产物可能承担着青蛤对于防御细菌感染等免疫应答方面的特殊作用。同时,由于表达结果所得数据与其他微生物刺激后的表达量具有差异性,得知青蛤 *MAPK/p38* 基因在不同刺激下的免疫应答反应进程是不同的,并且发现在 Poly:Ic 菌液刺激下的免疫应答程度更显著。后续可以从以上方面入手进一步研究。

青蛤受到外界因素胁迫后,其血淋巴中 *MAPK/p38* 基因表达在较短时间内至最大值,说明病原物能够识别并诱导 TLRs 免疫受体及下游 *MAPK/p38* 信号通路蛋白,而后使其血液中合成相应的免疫信号蛋白,防止机体自身受到外来物

迫物的侵害。同时, *MAPK/p38* 基因的表达量大体上呈现先升高后降低的趋势,证明 *MAPK/p38* 基因参与了非特异免疫的全部过程。该试验结果为探索丝裂原活化蛋白激酶所参与的青蛤免疫机制提供了重要的试验数据,并为选育贝类新品种、开发疫苗提供相应的理论依据。

参考文献

- [1] 丁理法,徐礼明. 贝类人工育苗技术之一青蛤全人工育苗技术要点[J]. 中国水产,2005(12):43-44.
- [2] 孙成渤,施文革,张鹏,等. 青蛤亲贝的培育技术[J]. 天津农林科技,2005(1):4-6.
- [3] GE H,WANG G D,ZHANG L L,et al. Molecular cloning and expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4, an important mediator of Toll-like receptor signal pathway, from small abalone *Haliotis diversicolor* [J]. Fish & shellfish immunology,2011,30(4/5):1138-1146.
- [4] MEDZHITOV R,PRESTON-HURLBURN P,JANEWAY JR C A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature,1997,388(6640):394-397.
- [5] ZHANG D,ZHANG G,HAYDEN M S,et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria [J]. Science,2004,303(5663):1522-1526.
- [6] TAKEUCHI O,KAWAI T,SANJO H,et al. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family [J]. Gene,1999,231(1/2):59-65.
- [7] CHUANG T H,ULEVITCH R J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9 [J]. Eur Cytokine Netw,2000,11(3):372-378.
- [8] HEMMI H,TAKEUCHI O,KAWAI T,et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. Nature,2000,408(6813):740-745.
- [9] 王晓琳,周元丽,孙伟,等. p38MAPK 信号通路调控人主动脉平滑肌细胞Ⅱ型和Ⅲ型胶原的表达 [J]. 山东大学学报(医学版),2016,54(8):12-16.
- [10] 刘婷婷,张淑萍,覃筱燕,等. MAPK 信号转导通路神经损伤研究进展 [J]. 中国公共卫生,2016,32(2):248-254.
- [11] HUANG Y N,LAI C C,CHIU C T,et al. L-asorbate attenuates the endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation and NF-κB translocation in cortical neurons /glia cocultures [J]. Plos one,2014,9(7):1-12.
- [12] CORRÊA S A L,EALLES K L. The role of p38 MAPK and its substrates in neuronal plasticity and neurodegenerative disease [J]. Journal of signal transduction,2012,6:1-12.
- [13] NASHIDA T,TAKUMA K,FUKUDA S,et al. The specific Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor SEA0400 prevents nitric oxide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells [J]. Neurochemistry international,2011,59(1):51-58.
- [14] 李熙. p38MAPK 信号通路在逆反防治阿尔茨海默病模型大鼠中的作用研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学,2012.
- [15] 高晶,任毅鹏,潘宝平,等. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 侵染对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 髓样分化因子 88 基因表达的影响 [J]. 海洋与湖沼,2015,46(2):440-445.
- [16] 杨莹,高珊,潘宝平,等. 青蛤 (*Cyclina sinensis*) IRAK-4 基因的克隆及其组织间的表达分析 [J]. 安徽农业科学,2015,43(27):33-36.
- [17] 任毅鹏,高晶,潘宝平,等. 青蛤 (*Cyclina sinensis*) TLR2 基因的克隆与表达分析 [J]. 海洋与湖沼,2014,45(5):1037-1043.
- [18] 罗凯娅,刘欣欣,葛端阳,等. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 侵染对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 谷胱甘肽转氨酶及其基因表达的影响 [J]. 海洋与湖沼,2012,43(4):735-740.
- [19] 刘敏敏,占鹏,黄绍华,等. 蚕茧组织蛋白酶 L 及其特异性抑制剂基因参与微生物诱导蚕体的免疫响应研究 [J]. 蚕业科学,2015,41(4):650-657.
- [20] 张冉冉,韦秀梅,杨建敏,等. 短蛸 (*Octopus ocellatus*) 酪氨酸蛋白激酶基因的克隆及其 mRNA 在细菌刺激后的表达规律 [J]. 海洋与湖沼,2015,46(1):173-180.
- [21] 邢强. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 的全基因组鉴定、进化分析和其在免疫应答中的表达谱构建 [C]// 遗传多样性:前沿与挑战—中国的遗传学研究(2013-2015)—2015 中国遗传学会大会论文摘要汇编. 上海:中国遗传学会,2015.
- [22] 李若佼. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) NF-κB 家族的基因鉴定及表达分析 [C]// 遗传多样性:前沿与挑战—中国的遗传学研究(2013-2015)—2015 中国遗传学会大会论文摘要汇编 [C]. 上海:中国遗传学会,2015.

历史的见证者。

2.3 人文资源 作为鲁南山区正在消失的古老的石头房子,更是作为一种独特的民间艺术和罕见的地方历史和文化遗产,不仅吸引了地方政府的注意,还包括非物质文化遗产和保护单位。石板房古村落因历史的洗礼,形成独有的文化底蕴,从而为旅游开发奠定基础。当地为宣扬传统文化、地域特色、民俗文化,着手于对古村落的多样化开发,从而使得石板房不仅成为当地旅游村,而且形成了特色的电影电视剧拍摄基地,进一步拓展古村落内涵^[5]。

3 研究对象的旅游开发对策

3.1 充分利用历史遗迹,形成特色主题 石板房的建筑材料是枣庄石板房发展旅游的独有资源。石板房作为建筑遗迹,各方面保存保护得比较好,建筑格局及村落模式都比较完善。首先,在旅游开发时注重保护历史遗迹,除石板房特色建筑,还有村内原有的石磨、植物、周围环境都在原基础进行利用;其次,在对原有现状进行修葺时,石板房采用和原村落相似的石材,并为加强特色建筑设计而突出建筑主体。

3.2 提升文化内涵,彰显民俗特色 石板房的民俗文化体现在村落空间布局、古建筑、装饰、古树名木、民间风俗、传统技艺、外部自然空间等诸多方面,从而体现某种观赏价值。提升文化内涵是石板房旅游开发再利用的重心,可以通过民俗手工艺品、民俗活动、乡土产品来突出文化内涵及民俗特色。加强对名人宅院的保护力度,并在宅院内陈列和历史有关的物品,设立指引标志引导参观,深化文化和民俗概念。石板房除了设立赏灯节以外,还进行戏曲和民间表演活动,深化民俗特色,打造朴素自然的形象。

3.3 保护自然环境,打造生态聚落 石板房古村落所具有

的生态价值是自古村落诞生以来确立的价值体系,在人与自然的系统中已经确立。为发展旅游业,在石板房建设中就对周围及基址环境进行保护。石板房的基址在枣庄山亭这样一个绿水青山的地方,这对石板房来说是发展旅游业的基础。在石板房旅游开发时已经做到避免破坏原有山体,同时尽最大可能保留原基址特色^[6]。石板房因其特殊地形而形成天然的生态聚落,整体上做到石板房聚落和自然环境及其历史文化相统一。

4 小结

我国是一个传统农业大国,历经几千年的发展,不同地区形成了各具特色的古村落,并塑造了相应的村落传统文化。伴随着国民经济的发展,以及社会主义新农村建设的全面推行,乡村旅游产业迅猛发展。古村落是旅游开发的重要部分,古村的旅游开发不仅提升了当地农民的经济收益,更能有效宣传和保护当地的风貌特色,改善相应的生态环境,最终实现城乡统筹发展。古村落的旅游开发使得原住民更热爱本地文化,旅游者收获回归自然的体验。

参考文献

- [1] 费孝通. 乡土中国[M]. 南京:江苏文艺出版社,2007.
- [2] 张光直. 考古学专题六讲[M]. 北京:文物出版社,1986.
- [3] 董正. 鲁南地区兴隆庄石板房建筑研究[J]. 枣庄学院学报,2016,33(2):135-141.
- [4] 扈妙章. 城镇化中的坚守:鲁南翼云山周边村落石头民居研究[C]//山东省民俗学会 2013 年年会暨中国石榴文化学术研讨会论文集. 济南:山东省民俗学会,2013.
- [5] 张凯雷. 豫北山区传统石板房民居资源的保护与利用[J]. 湖南科技学院学报,2013,34(1):90-91.
- [6] 沈宏娜. 旅游开发背景下古村落地方文化的再表达——以漳州南靖县田螺坑村为例[D]. 厦门:厦门大学,2014.

(上接第 102 页)

- [23] 李若佼. 虾夷扇贝 NF- κ B 家族基因和 Tollip 基因鉴定及表达分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2015.

- [24] 邹佳君. 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) MAPKK 基因家族结构及表达分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2015.

名词解释

扩展总被引频次:指该期刊自创刊以来所登载的全部论文在统计当年被引用的总次数。这是一个非常客观实际的评价指标,可以显示该期刊被使用和受重视的程度,以及在科学交流中的作用和地位。

扩展影响因子:这是一个国际上通行的期刊评价指标,是 E·加菲尔德于 1972 年提出的。由于它是一个相对统计量,所以可公平地评价和处理各类期刊。通常,期刊影响因子越大,它的学术影响力和作用也越大。具体算法为:

$$\text{扩展影响因子} = \frac{\text{该刊前两年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该刊前两年发表论文总数}}$$

扩展即年指标:这是一个表征期刊即时反应速率的指标,主要描述期刊当年发表的论文在当年被引用的情况。具体算法为:

$$\text{扩展即年指标} = \frac{\text{该期刊当年发表论文在统计当年被引用的总次数}}{\text{该期刊当年发表论文总数}}$$

扩展他引率:指该期刊全部被引次数中,被其他刊引用次数所占的比例。具体算法为:

$$\text{扩展他引率} = \frac{\text{被其他刊引用的次数}}{\text{期刊被引用的总次数}}$$

扩展引用刊数:引用被评价期刊的期刊数,反映被评价期刊被使用的范围。

扩展学科扩散指标:指在统计源期刊范围内,引用该刊的期刊数量与其所在学科全部期刊数量之比。