



# 大菱鲂 MKK 基因家族全基因组鉴定及其在生物和非生物应激下的表达分析

郑卫卫<sup>1,2</sup>, 徐锡文<sup>2,3</sup>, 陈松林<sup>1,2,3</sup>, 俄泽琛<sup>1,2</sup>, 刘英杰<sup>1,4\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 山东 青岛 266071;

4. 中国水产科学研究院, 北京 100141)

**摘要:** 为了阐明大菱鲂丝裂原活化蛋白激酶激酶 (mitogen-activated protein kinase kinases, MAPKKs 或 MKKs) 基因家族在生物和非生物应激响应中的作用, 本实验首先通过生物信息学方法对大菱鲂 MKK 基因家族进行了全基因组水平的鉴定, 利用多个应激相关转录组数据集分析了大菱鲂 MKK 家族成员在不同组织及不同生物和非生物应激下的表达模式。结果显示, 本研究在大菱鲂全基因组水平上共鉴定出 9 个 MKK 基因家族成员, 它们不均匀地分布在 7 条染色体上, 并分别对其编码蛋白的理化性质、蛋白二级结构和亚细胞定位进行了预测。基于系统发育分析, 将 *SmMKKs* 划分为 5 个亚家族。内含-外显子结构、保守基序和多重序列比对分析结果不仅为大菱鲂 MKK 亚家族分类提供了证据, 而且表明 *SmMKKs* 在进化上高度保守。*SmMKKs* 在不同组织及不同生物和非生物应激下的基因表达模式分析表明, *SmMKKs* 具有明显的组织特异性表达。另外, 结果显示, 粘孢子虫和肿大细胞病毒感染后, *SmMKK6a* 呈极显著差异表达; 热应激处理后, *SmMKK6a* 呈极显著差异表达; 高盐或低盐胁迫后, *SmMKK4a*、*SmMKK4b*、*SmMKK6a* 和 *SmMKK7* 呈极显著差异表达。*SmMKK6a* 在各种应激条件下均表现出极显著响应, 表明其可能在综合抗应激中具有潜在的作用。这可能是第一个对大菱鲂 MKK 基因家族进行系统识别和功能分析的研究。以上研究结果不仅表明 MKK 基因家族在大菱鲂响应多种生物和非生物应激中发挥重要作用, 而且也为大菱鲂综合抗逆分子选择育种研究提供了重要的理论支撑。

**关键词:** 大菱鲂; 丝裂原活化蛋白激酶激酶 (MKK); 基因家族; 生物应激; 非生物应激

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 级联是在所有真核生物中普遍存在且在进化上高度保守的信号转导途径<sup>[1-2]</sup>。作为重要的信号转导途径, MAPK 级联能对各种细胞外刺激作出响应, 诱导和调节多种细胞过程, 如增殖、分化、凋亡、发育、应

激反应等<sup>[3-4]</sup>。典型的 MAPK 级联由 3 种进化保守的蛋白激酶组成: MAPK 激酶激酶 (MEKK 或 MKKK)、MAPK 激酶 (MKK、MEK 或 MAPKK) 和 MAPK<sup>[5]</sup>, 在信号传导过程中它们依次被激活。激活的 MAPK 级联可以作为信号换能器, 通过磷

收稿日期: 2022-10-10 修回日期: 2022-11-02

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2020TD20); 山东省泰山学者攀登计划

第一作者: 郑卫卫 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: zhengww@ysfri.ac.cn

通信作者: 刘英杰, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: lyj@cafs.ac.cn



酸化和去磷酸化作用逐级放大并传递细胞膜表面受体接收到的外界刺激信号, 从而激活效应蛋白, 触发应激反应和免疫调节等细胞反应<sup>[2, 5-6]</sup>。

作为级联反应的核心枢纽, MKK 蛋白序列具有保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域 (S<sub>2</sub>TKc)、DVD 结构域及多个亚结构域, 如双磷酸化位点 (S/T<sub>xxx</sub>S/T)、GxGxxGxV motif (参与 MKK 和 MAPK 之间的磷酸转移反应)、AxK motif (对 ATP 的锚定和定向有重要作用)、HRDxKSPN motif (位于 MKKs 的催化环中, 是接受底物羟基质子的催化基序)、DFG/APE motif (调节 ATP 和 MKK 的相互作用)、DxWxxG (稳定催化环) 等。作为双特异性激酶, MKKs 可以整合来自上游 MKKKs 的信号并激活下游 MAPKs<sup>[7]</sup>, 即上游磷酸化的 MKKKs 通过 MKKs 中的双磷酸化位点将 MKKs 磷酸化并激活, 同时, 激活的 MKKs 又通过磷酸化 MAPK 激活环中的 T-X-Y motif 从而激活 MAPKs<sup>[8]</sup>。

近年来, MKK 基因家族全基因组水平的鉴定及其在响应生物和非生物应激中的作用已在多种植物中被报道<sup>[9-13]</sup>。在小麦 (*Triticum aestivum*) 中共鉴定出 18 个 MKK 基因家族成员, 转录组数据分析表明, MKKs 在响应热、冷、干旱、盐度等多种非生物胁迫中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。Song 等<sup>[10]</sup>在西瓜 (*Citrullus lanatus*) 中鉴定出 6 个 MKKs, 分析表明, 大部分 MKK 家族成员对生物应激如西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum f. sp. niveum*) 感染和非生物应激如干旱、盐度、冷和热处理等均有较强的响应。Liang 等<sup>[11]</sup>在欧洲油菜 (*Brassica napus*) 中共鉴定出 7 个 MKK 基因, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 分析表明, 其中 4 个家族成员对冷、乙二酸、水杨酸、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 等应激中的至少一种应激具有响应。另外, 大量研究表明 MKK 基因家族在水生动物响应环境胁迫中也发挥着重要作用<sup>[8, 14-16]</sup>。如 Zou 等<sup>[8]</sup>对虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) MKK 基因家族进行了全基因组水平鉴定并分析了其在细菌感染后的表达模式, 研究表明, 所有 5 个家族成员在藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 和鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后均表现出显著差异表达。另外, Fan 等<sup>[15]</sup>克隆了一个斑节对虾 (*Penaeus monodon*) MKK 基因, 该基因在哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 和鳗弧菌感染及低盐胁迫下均表现出显著上调或下调。然而有关硬骨鱼 MKK 基因家族的系统鉴定和功能研究只在大黑口鲈 (*Micropterus sal-*

*moides*) 和虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中被报道<sup>[17]</sup>。Yu 等<sup>[17]</sup>在大黑口鲈基因组中鉴定出 8 个 MKK 基因家族成员, 其中 MKK2、5、6、7 在冷胁迫后呈现差异表达。Yang 等<sup>[18]</sup>在虹鳟中共鉴定出 17 个 MKKs, 其中 MKK2、MKK4b3、MKK6s 对鳗弧菌感染具有较强的响应。

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*, FishBase ID: 1348) 是具有重要经济价值的冷水性海洋比目鱼类, 味道鲜美, 营养价值高, 目前已成为世界年养殖产量最高的鲆鲽鱼类之一<sup>[19]</sup>。近年来, 由于高密度集约化养殖规模的不断扩大以及气候变暖等极端天气事件频发等, 大菱鲆正面临着多种生物和非生物应激的胁迫, 如病原菌感染<sup>[20-22]</sup>、热应激<sup>[23]</sup>、低氧应激<sup>[24]</sup>、盐度胁迫<sup>[25]</sup>等, 极大地阻碍了大菱鲆养殖产业的健康和可持续发展。鉴于 MKKs 在响应各种应激胁迫中的作用, 对大菱鲆 MKK 基因家族进行系统地鉴定并对其进行功能分析具有重要的现实意义。因此, 本研究对大菱鲆 MKK 基因家族进行了全基因组水平的鉴定, 并对其理化性质、系统发育关系、基因结构和保守基序等进行了分析。另外, 基于多个已公开的应激相关的大菱鲆转录组数据集, 研究了 MKKs 在不同组织以及不同生物和非生物胁迫下的表达模式。这可能是首次对大菱鲆 MKK 基因家族进行系统的鉴定和功能研究。本研究结果将为研究大菱鲆 MAPK 基因家族在响应各种生物和非生物应激中的作用提供新的见解, 为大菱鲆综合抗逆分子选择育种研究提供重要的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 大菱鲆 MKK 基因家族鉴定及理化性质分析

在 NCBI 数据库下载大菱鲆基因组序列 (GCA\_022379125.1)<sup>[26]</sup>、基因组注释 (GTF) 文件、蛋白序列文件, 在 UniProt 数据库下载斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳞 (*Oryzias latipes*) 和斑点雀鲷 (*Lepisosteus oculatus*) MKK 氨基酸序列。以斑马鱼 MKK 氨基酸序列作为查询数据库, 使用 BLASTP (*E*-value < 1e-10) 对大菱鲆基因组进行搜索, 得到候选的大菱鲆 MKK 氨基酸序列, 然后分别利用 SMART、NCBI CDD 和 HMM search 进行结构域分析, 将具有 MKK 基因家族特有保守结构域 (S<sub>2</sub>TKc) 的序列作为最终的大菱鲆 MKK (SmMKKs) 蛋白序列。然后, 利用 ExPASy Prot-

Param 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *SmMKK* 蛋白的理化性质, 包括氨基酸数目、分子重量、理论等电点、不稳定指数等。

## 1.2 MKK 基因家族系统发育分析

使用 MEGA 11.0<sup>[27]</sup> 中的 MUSCLE 方法对大菱鲂、斑马鱼、青鳉和斑点雀鳉的 MKK 氨基酸序列进行多重序列比对, 然后利用邻接法 (NJ) 构建进化树, 进化树检验采用 Bootstrap 方法, 检验次数设置为 1 000, 建树模型选择 Jones-Taylor-Thornton (JTT) 氨基酸替代模型, 其他参数设置为默认。采用 EvolView 2.0<sup>[28]</sup> (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 对进化树进行可视化。

## 1.3 染色体分布及重复基因分子进化分析

通过 GTF 文件获得染色体长度和基因位置信息, 然后用 TBtool (v1.098769)<sup>[29]</sup> 绘制 *SmMKKs* 的染色体分布图。为了评估进化过程中大菱鲂 MKK 重复基因的选择压力, 利用 TBtools 中的“simple *Ka/Ks* calculator functions”工具计算大菱鲂 MKK 重复基因对的非同义替换率 (*Ka*)、同义替换率 (*Ks*) 和 *Ka/Ks* 值。

## 1.4 亚细胞定位及蛋白结构预测

用在线软件 WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 对 *SmMKK* 蛋白进行亚细胞定位预测。用 SOPMA 在线软件 ([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)) 预测 *SmMKK* 蛋白的二级结构。用 SignalP 6.0 在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>) 对 *SmMKK* 蛋白进行信号肽预测。

## 1.5 基因结构和保守基序 (motif) 分析

从 GTF 文件中提取 *SmMKKs* 的基因结构注释信息, 通过在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 进行内含子-外显子分布模式分析。使用在线软件 MEME 5.4.1<sup>[30]</sup> 对 *SmMKK* 蛋白序列进行 motif 分析, motif 数量设置为 12, 其他参数为默认值。另外, 使用 DNAMAN 软件对 *SmMKK* 蛋白序列进行多重序列比对。

## 1.6 用于 *SmMKKs* 组织表达模式分析的转录组数据

从 NCBI SRA 数据库中下载大菱鲂 12 个不同组织 (精巢、卵巢、鳃、肝脏、肠道、血液、肾

脏、肌肉、脾脏、胸腺、大脑和幽门盲囊) 的转录组数据 (对照组健康个体), 用于分析 *SmMKKs* 在大菱鲂不同组织中的表达情况。

## 1.7 生物应激转录组数据

为了分析 *SmMKKs* 在生物应激 (免疫应答) 条件下的表达模式, 从 NCBI SRA 数据库中分别下载了大菱鲂粘孢子虫 (*Enteromyxum scophthalmi*) 感染的转录组数据集 SRP308109<sup>[31]</sup> 和肿大细胞病毒 (Megalocytivirus) 感染的转录组数据集 SRP347383<sup>[20]</sup>。SRP308109 数据集是对不同程度 (初期、轻度、中度和重度) 粘孢子虫感染和健康大菱鲂的血液进行转录组测序, 健康、初期、轻度、中度和重度感染组分别有 8、14、15、13 和 10 个生物学重复。SRP347383 数据集是对健康和感染肿大细胞病毒后第 3 天、第 6 天和第 9 天的头肾组织进行转录组测序, 每个组 3 个生物学重复。

## 1.8 非生物应激转录组数据

为了分析 *SmMKKs* 在非生物应激条件下的表达模式, 从 NCBI SRA 数据库中收集了 2 个热应激相关和 3 个盐度应激相关的转录组数据集。在 SRA 实验 SRP152627<sup>[23]</sup> 中, 对 23 °C、25 °C 和 28 °C 热应激处理 24 h 后及 14 °C 对照组的大菱鲂肾脏组织进行转录组测序。在 SRA 实验 SRP273870<sup>[32]</sup> 中, 对 20 °C、24 °C 和 28 °C 热应激处理 24 h 后及 14 °C 对照组的大菱鲂肝脏组织进行转录组测序。在 SRA 实验 SRP238143<sup>[33]</sup> 和 SRP153594<sup>[25]</sup> 中, 分别对低盐 (5)、天然海水 (30) 和高盐 (50) 处理 24 h 后的大菱鲂鳃和肾脏组织进行转录组测序。在 SRA 实验 SRP277001<sup>[34]</sup> 中, 对天然海水 (30) 和淡水 (0) 处理 24 h 后的大菱鲂肝脏组织进行转录组测序。上述所有转录组数据的对照组和处理组均有 3 个生物学重复。

## 1.9 基因表达模式分析

首先用 STAR<sup>[35]</sup> 软件将上述转录组数据的 reads 比对到大菱鲂基因组, 然后利用 Subread<sup>[36]</sup> 中的 featureCounts<sup>[37]</sup> 软件统计比对到基因组上的 reads 数并构建 reads 矩阵, 接下来用 edgeR<sup>[38]</sup> 进行差异表达基因分析 ( $P < 0.05$  为显著差异表达基因,  $FDR < 0.05$  且  $|\log_2 FC| > 1$  为极显著差异表达基因)。利用 reads 矩阵计算 *SmMKKs* 在不同组织、生物应激和非生物应激条件下的表达量 (TPM),



然后用 TBtools 将标准化的表达量数据 ( $\log_2^{TPM+1}$ ) 绘制为基因表达热图并进行相关分析。

实验过程中操作人员严格遵守中国水产科学研究院黄海水产研究所动物实验伦理审查委员会实验动物伦理规范, 并按照中国水产科学研究院黄海水产研究所动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

## 2 结果

### 2.1 大菱鲂 MKK 基因家族成员鉴定及理化性质分析

通过 BLASTP 比对和 SMART、NCBI CDD、HMM search 结构域筛选, 在大菱鲂中共鉴定出 9 个 MKK 基因, 它们都具有保守的 S\_TKc 结构域 (图 1)。对 *Sm*MKK 蛋白的理化性质进行了分析 (表 1), 结果表明 *Sm*MKK 蛋白序列长度介于 336~450 个氨基酸之间, 相对分子量范围为 37 540.66~

50 860.69 u, 理论等电点介于 5.75~9.09 之间。*Sm*-MKK 蛋白的总平均亲水性均为负值, 表明它们均为疏水蛋白。蛋白质不稳定性指数预测结果显示, MKK5 和 MKK6b 为稳定性蛋白质 (cutoff < 40), 其他为非稳定性蛋白质。

### 2.2 系统发育分析

为了对 MKK 基因家族进行分类、阐明 MKK 家族成员的进化关系, 用大菱鲂、斑马鱼、青鳞和斑点雀鲷的共 31 个 MKK 氨基酸序列构建了 NJ 进化树 (图 2)。根据进化树将 MKK 基因家族成员分为 5 个亚家族, 分别是 MKK1/2、MKK4、MKK5、MKK6 和 MKK7。比较分析发现, 属于同一亚家族的不同硬骨鱼的直系同源基因首先聚为一支。另外, 分析发现亚家族 MKK1/2、MKK4 和 MKK6 中存在重复基因, 其中, 大菱鲂中的重复基因分别为 *Sm*MKK2a 和 *Sm*MKK2b、*Sm*MKK4a 和 *Sm*MKK4b、*Sm*MKK6a 和 *Sm*MKK6b。

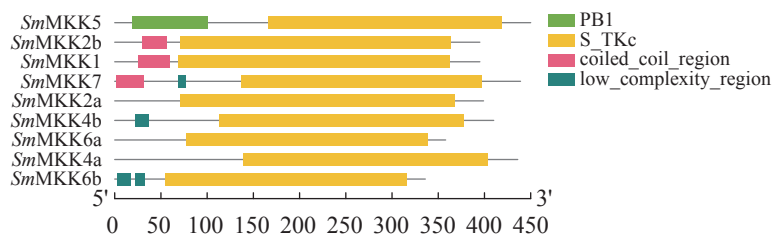


图 1 SMART 预测的大菱鲂 MKK 蛋白的保守结构域

Fig. 1 Conserved domain of *Sm*MKK proteins predicted by SMART

表 1 大菱鲂 MKK 基因家族蛋白的理化性质

Tab. 1 Summary of sequence characteristics of MKK genes in *S. maximus*

| 亚家族<br>subfamily | 基因名<br>genes name | 染色体<br>chromosome | 基因长度/bp<br>genes length | 氨基酸数目<br>no. of amino acids | 分子量/u<br>molecular weight | 等电点<br>isoelectric point | 不稳定指数<br>instability index | 平均亲水性<br>gravy | 亚细胞定位<br>subcellular location  |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------|--------------------------------|
| MKK1/2           | <i>Sm</i> MKK1    | Chr7              | 7 947                   | 395                         | 43 888.38                 | 6.18                     | 50.25                      | -0.387         | 细胞核<br>nuclear                 |
|                  | <i>Sm</i> MKK2a   | Chr13             | 9 724                   | 399                         | 44 305.89                 | 5.99                     | 53.01                      | -0.328         | 细胞核<br>nuclear                 |
|                  | <i>Sm</i> MKK2b   | Chr5              | 6 540                   | 395                         | 43 766.25                 | 6.44                     | 52.07                      | -0.333         | 细胞质和细胞核<br>cytosol and nuclear |
| MKK4             | <i>Sm</i> MKK4a   | Chr17             | 9 499                   | 436                         | 49 026.94                 | 8.41                     | 53.23                      | -0.493         | 细胞核<br>nuclear                 |
|                  | <i>Sm</i> MKK4b   | Chr16             | 13 837                  | 410                         | 46 070.90                 | 8.45                     | 50.57                      | -0.330         | 细胞核<br>nuclear                 |
| MKK5             | <i>Sm</i> MKK5    | Chr4              | 57 946                  | 450                         | 50 860.69                 | 5.75                     | 36.54                      | -0.150         | 细胞质<br>cytosol                 |
| MKK6             | <i>Sm</i> MKK6a   | Chr16             | 16 272                  | 358                         | 39 963.95                 | 5.96                     | 43.80                      | -0.322         | 细胞质<br>cytosol                 |
|                  | <i>Sm</i> MKK6b   | Chr17             | 10 150                  | 336                         | 37 540.66                 | 8.09                     | 35.16                      | -0.173         | 细胞质<br>cytosol                 |
| MKK7             | <i>Sm</i> MKK7    | Chr8              | 18 091                  | 439                         | 49 691.30                 | 9.09                     | 55.17                      | -0.490         | 细胞质和细胞核<br>cytosol and nuclear |

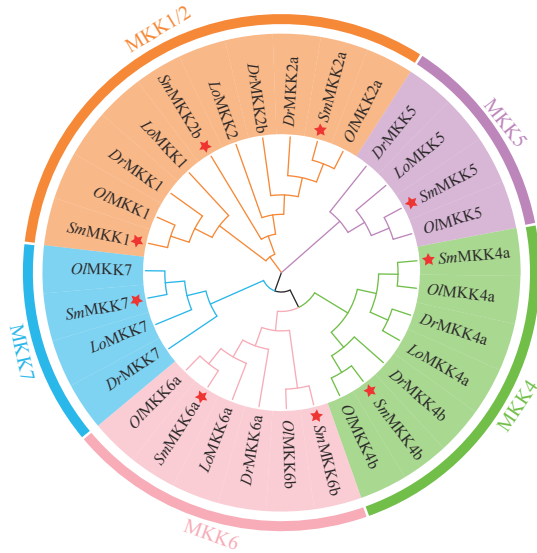


图2 大菱鲂和其他三种代表性硬骨鱼 MKK 基因家族的系统进化树

Dr, Ol, Lo 分别代表斑马鱼、青鳞和斑点雀鲷

Fig. 2 Phylogenetic tree of MKK genes in *S. maximus* and other three representative teleost species

Dr. *D. rerio*, Ol. *O. latipes*, Lo. *L. oculatus*

### 2.3 SmMKKs 染色体分布和重复基因分子进化分析

通过染色体定位发现, 9 个大菱鲂 MKK 家族成员不均匀的分布在 7 条染色体上(图 3), 其中, 16 和 17 号染色体上分别有 2 个 *SmMKKs*, 4、5、7、8 和 13 号染色体上各有 1 个 *SmMKK*。另外, 所有的大菱鲂重复 MKK 基因对都位于不同染色体上, 推测这些重复基因可能是由于全基因组复制形成的。大菱鲂重复基因对的 *Ka/Ks* 值分别为 0.042(*MKK2a-MKK2b*)、0.10 (*MKK4a-MKK4b*) 和

0.063 (*MKK6a-MKK6b*)(表 2), 均小于 1, 表明所有的重复 *SmMKKs* 在进化过程中都经历了纯化选择。

### 2.4 SmMKKs 亚细胞定位和蛋白二级结构预测

亚细胞定位预测表明 *SmMKKs* 主要定位于细胞质和细胞核中(表 1)。蛋白二级结构预测结果显示, 全部 *SmMKK* 氨基酸序列的二级结构都以无规则卷曲为主(42.63%), 其次是  $\alpha$ -螺旋(41.10%), 延伸链和  $\beta$ -转角分别占 12.30% 和 3.98%(表 3)。另外, 信号肽预测结果发现 *SmMKKs* 均不含有信号肽, 表明大菱鲂 MKK 基因家族编码的蛋白均为非分泌蛋白。

### 2.5 SmMKKs 基因结构和 motif 分析

为了阐明 *SmMKKs* 的基因结构和进化关系, 我们对其内含子、外显子结构和 motif 组成进行了分析。基因结构分析表明, *SmMKK5* 含有最多的外显子和内含子数量, 均为 22 个; 其他 *SmMKK* 基因家族成员外显子的数目在 11~13 之间, 内含子数目在 10~12 之间(图 4)。另外, 同一亚家族中的成员(旁系同源基因)具有相似的外显子-内含子组成结构, 如 MKK1/2 亚家族的 *MKK1*、2a、2b 都具有 11 个外显子(图 4)。

本研究共鉴定出 12 个保守的 motif, 分别命名为 motif 1~12(图 4)。结果表明 *SmMKKs* 中 motif 的数量和类型是相对保守的, motif 1、2、3、4、5、6、7、8 在所有 *SmMKKs* 中均存在, 且都按照 motif 3、2、6、1、8、4、7、5 的顺序排列。另外, 比较发现相同亚家族成员具有十分相似的 motif 组成, 这说明来自同一亚家族的成员可能具

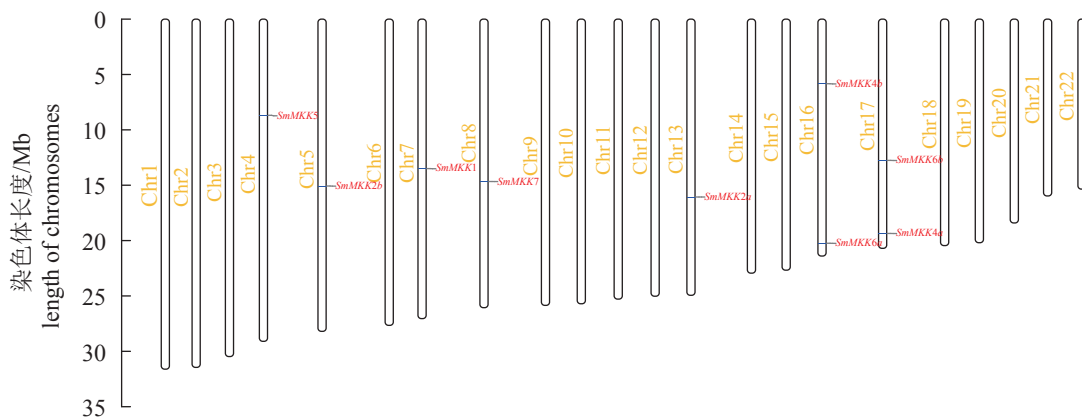


图3 大菱鲂 MKK 基因的染色体分布

Fig. 3 Chromosomal distribution of *S. maximus* MKK genes

表 2 大菱鲆 MKK 重复基因对的 *Ka/Ks* 值

Tab. 2 The *Ka/Ks* ratios of duplicated MKK genes in

*S. maximus*

| 重复基因对<br>duplicated gene pairs | 非同义替换率<br><i>Ka</i> | 同义替换率<br><i>Ks</i> | <i>Ka/Ks</i> |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|--------------|
| <i>SmMKK2a-SmMKK2b</i>         | 0.082 682           | 1.946 531          | 0.042 476    |
| <i>SmMKK4a-SmMKK4b</i>         | 0.089 982           | 0.861 878          | 0.104 402    |
| <i>SmMKK6a-SmMKK6b</i>         | 0.098 695           | 1.571 141          | 0.062 817    |

有相似的功能。另外, 每个亚家族都有其特有的保守 motif, 例如 motif 9 只存在于 MKK1/2 亚家族中, motif 11 只存在于 MKK4 亚家族中, 说明不同亚家族之间在功能上可能存在差异。

氨基酸多重序列比对结果显示, *SmMKKs* 含有多个 MKK 基因家族保守的 motif (图 5), 如 GxGxxGxV motif、AxK motif、HRDxKPSN motif、DFG/APE motif、DxWxxG motif, 表明 MKK 基因

家族成员在进化上是高度保守的。

### 2.6 *SmMKKs* 组织表达模式分析

利用 NCBI 公开的转录组数据, 分析了 *SmMKKs* 在 12 个不同组织中的表达模式。*SmMKKs* 在所有组织中均广泛表达, 其中在脑、精巢、肾脏和胸腺中的表达量较高, 在肌肉、肝脏、脾脏和血液中的表达量较低 (图 6)。另外, *SmMKKs* 存在明显的组织特异性表达, 如 *SmMKK1* 在脑中的表达量及 *SmMKK4b* 在精巢中的表达量明显高于其他组织。

### 2.7 *SmMKKs* 在生物应激下的表达模式分析

为了探究 *SmMKKs* 对生物应激的响应, 实验利用粘孢子虫感染的血液转录组数据和肿大细胞病毒感染的肾脏转录组数据分析了 *SmMKKs* 在粘孢子虫和肿大细胞病毒感染应激下的表达模式

表 3 大菱鲆 MKK 蛋白的二级结构

Tab. 3 Secondary structure information of MKK proteins in *S. maximus*

| 基因名字<br>gene name | α-螺旋/%<br>alpha helix | 延伸链/%<br>extended strand | β-转角/%<br>beta turn | 无规则卷曲/%<br>random coil |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|
| <i>SmMKK1</i>     | 44.56                 | 11.14                    | 3.54                | 40.76                  |
| <i>SmMKK2a</i>    | 43.36                 | 10.53                    | 3.51                | 42.61                  |
| <i>SmMKK2b</i>    | 42.53                 | 10.38                    | 2.78                | 44.30                  |
| <i>SmMKK4a</i>    | 36.24                 | 12.16                    | 2.98                | 48.62                  |
| <i>SmMKK4b</i>    | 39.27                 | 10.98                    | 4.39                | 45.37                  |
| <i>SmMKK5</i>     | 37.11                 | 17.11                    | 5.11                | 40.67                  |
| <i>SmMKK6a</i>    | 37.99                 | 13.13                    | 4.75                | 44.13                  |
| <i>SmMKK6b</i>    | 45.54                 | 13.39                    | 5.36                | 35.71                  |
| <i>SmMKK7</i>     | 43.28                 | 11.85                    | 3.42                | 41.46                  |
| 平均 average        | 41.10                 | 12.30                    | 3.98                | 42.63                  |

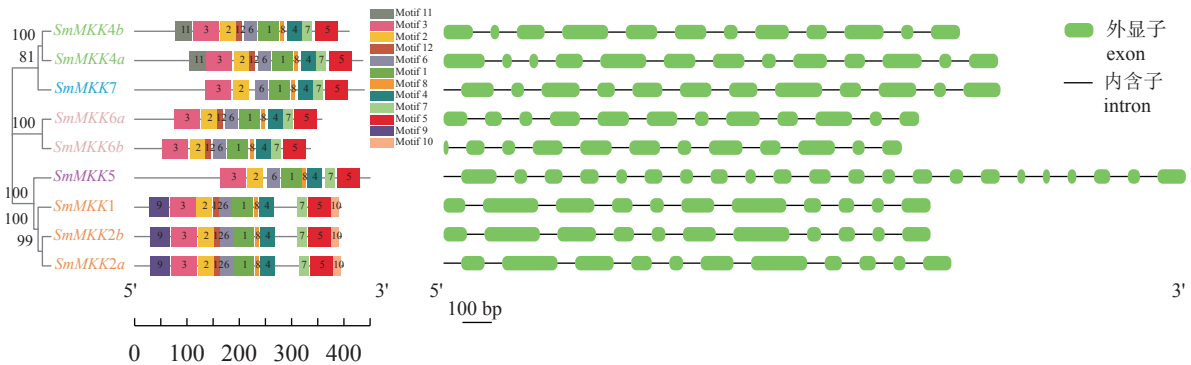


图 4 大菱鲆 MKK 基因家族成员的系统进化树、motif 分析和外显子-内含子结构示意图

每个 *SmMKKs* 内含子的长度显示为相同的长度

Fig. 4 The combination of phylogenetic relationship, conserved motif and exon-intron structure

The lengths of introns in *SmMKKs* were displayed in the same length

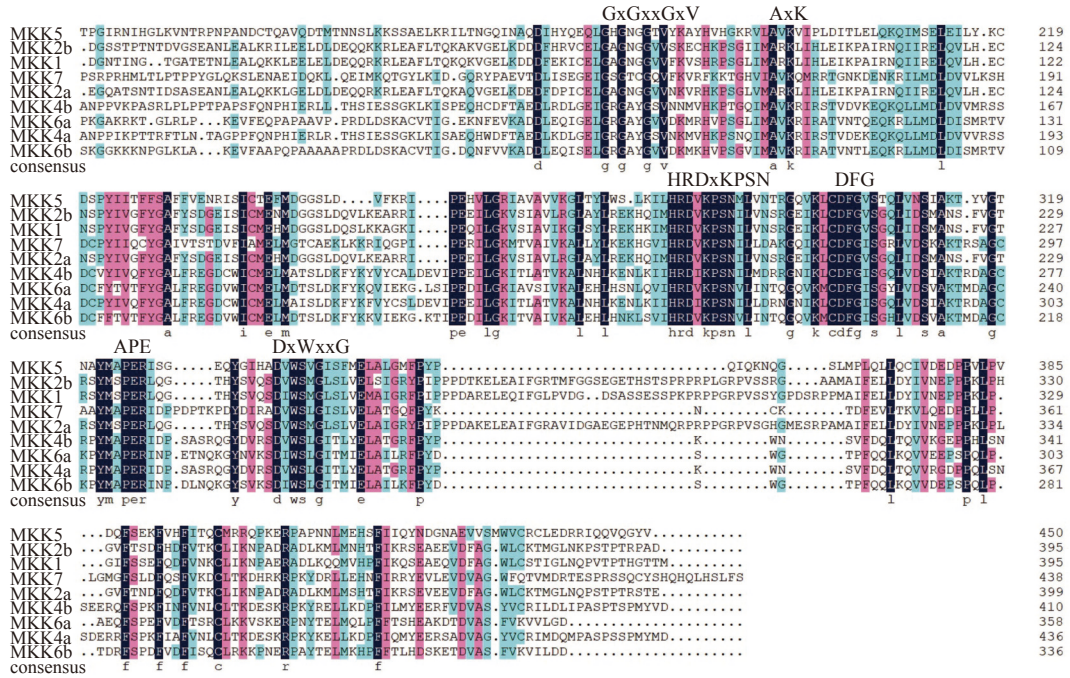


图 5 大菱鲂 MKK 氨基酸多重序列对比

Fig. 5 Multiple sequence alignment of the MKK proteins in *S. maxims*

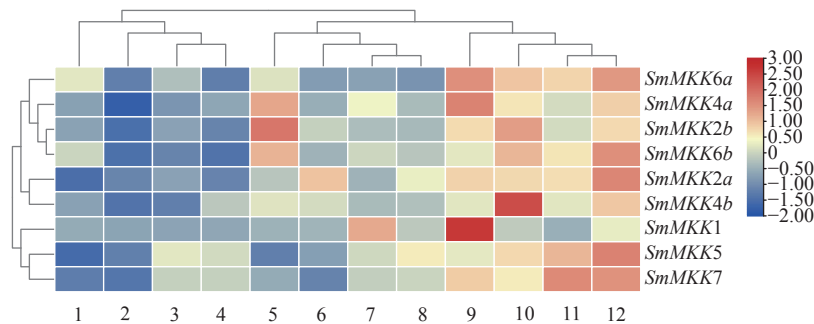


图 6 大菱鲂 MKKs 在 12 种不同组织中的表达模式

1. 肌肉, 2. 肝脏, 3. 脾脏, 4. 血液, 5. 卵巢, 6. 幽门盲囊, 7. 鳃, 8. 肠, 9. 脑, 10. 精巢, 11. 肾脏, 12. 胸腺

Fig. 6 Heat map of MKKs expression in twelve different tissues in *S. maxims*

1. muscle, 2. liver, 3. spleen, 4. blood, 5. ovary, 6. pyloric caeca, 7. gill, 8. intestine, 9. brain, 10. testis, 11. kidney, 12. thymus

(图 7)。在粘孢子虫初期和轻度感染的血液中, 无显著差异表达基因; 在轻度和中度感染组中, *SmMKK6a* 显著下调; 在重度感染组中, *SmMKK4b* 和 *SmMKK7* 显著下调, *SmMKK4a* 显著上调, *SmMKK6a* 极显著下调 (FDR < 0.05 且 |log<sub>2</sub> FC| > 1)。以上结果表明, 随着大菱鲂粘孢子虫感染程度的加重, 差异表达的 *SmMKK* 数目明显增加, 说明随着感染程度的加重, 较多的 *SmMKKs* 对粘孢子虫感染应激产生了响应。其中, *SmMKK6a* 对粘孢子虫感染的响应较其他家族成员迅速且强烈。

对于肿大细胞病毒感染应激, 在感染后第 3 天没有检测到差异表达的 *SmMKK* 基因; 感染后

第 6 天 *SmMKK6a* 和 *SmMKK4b* 显著下调; 感染后第 9 天, *SmMKK4b*、*SmMKK5* 和 *SmMKK7* 显著下调, *SmMKK2b* 和 *SmMKK6b* 显著上调, *SmMKK6a* 极显著下调 (FDR < 0.05 且 |log<sub>2</sub> FC| > 1)。以上分析表明 *SmMKKs* 在肿大细胞病毒感染条件下呈时间依赖性表达, 随着感染程度的加重, 更多的 *MKK* 家族成员产生响应, 其中 *SmMKK6a* 对肿大细胞病毒感染具有比较迅速且强烈的响应。

综上所述, *SmMKK6a* 在寄生虫和病毒感染条件下均有比较迅速且强烈的响应, 表明其在大菱鲂响应生物应激的过程中可能发挥重要作用。



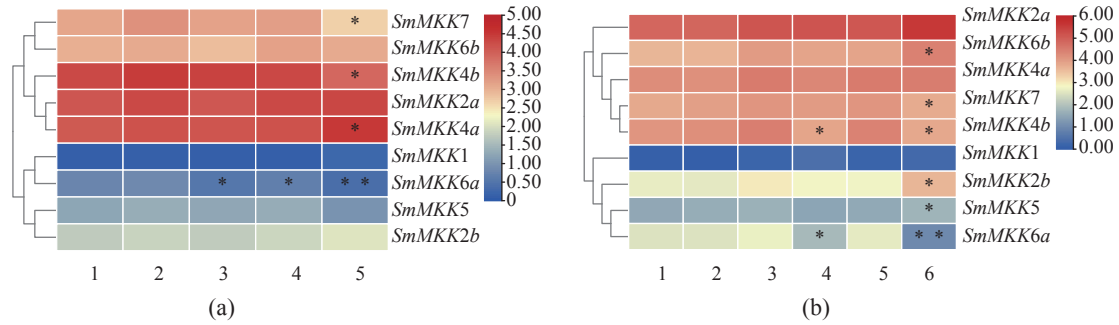


图 7 大菱鲂 MKKs 在病原菌 (粘孢子虫和肿大细胞病毒) 感染应激下的表达模式

(a) 粘孢子虫不同感染程度下 MKKs 在血液中的表达模式, 1-5 分别表示对照、初期、轻度、中度和重度感染组; (b) 肿大细胞病毒感染下 MKKs 在肾脏中的表达模式, 1、3 和 5 分别表示第 3、6 和 9 天的对照组, 2、4 和 6 分别表示第 3、6 和 9 天的感染组; \*代表差异表达基因 ( $P < 0.05$ ), \*\*代表极显著差异表达基因 (false discovery rate (FDR)  $< 0.05$  且  $|\log_2 \text{fold change (FC)}| > 1$ ); 下同

Fig. 7 Heat map of MKKs expression in *S. maximus* under pathogens (*E. scophthalmi*, Megalocytivirus) infection

(a) Expression of MKKs in blood under infection with *E. scophthalmi*, 1-5 represented control, incipient, slight, moderate and severe infection groups, respectively; (b) Expression of MKKs in kidney under infection with Megalocytivirus, 1, 3 and 5 represent the control group at 3, 6 and 9 day, respectively, and 2, 4 and 6 represented the infected group at 3, 6 and 9 day, respectively; \* indicates significant difference,  $P < 0.05$ , \*\* indicates the extremely significant difference, false discovery rate (FDR)  $< 0.05$  and  $|\log_2 \text{fold change (FC)}| > 1$ ; the same below

2.8 SmMKKs 在非生物应激下的表达模式分析

为了探究 SmMKKs 在非生物应激的响应, 我们分别利用热、低盐和高盐应激相关的转录组数据集分析了 SmMKKs 在热和盐度应激条件下的表达模式。首先分析了热处理条件下 SmMKK 基因在肾脏和肝脏中的表达模式 (图 8-a)。肾脏中, 与对照组相比 (14 °C), 高温处理 (28 °C) 下 SmMKK6b 显著下调, SmMKK6a 极显著下调 (FDR  $< 0.05$  且  $|\log_2 \text{FC}| > 1$ )。肝脏中, 与对照组相比, SmMKK6a 在 20 °C 条件下显著上调, 在 28 °C 条件下极显著下调 (FDR  $< 0.05$  且  $|\log_2 \text{FC}| > 1$ )。以上分析表明,

SmMKK6a 对热应激具有较强的响应。

另外, 我们还分析了低盐和高盐胁迫下 SmMKKs 在肾脏、鳃和肝脏中的表达模式 (图 8-b)。肾脏中, 与正常海水组 (30) 相比, 在 50 高盐胁迫下, SmMKK4b、SmMKK6a 和 SmMKK7 显著下调; 低盐 (5) 胁迫下未检测到差异表达的 SmMKKs。鳃中, 与正常海水组相比, 在 50 高盐胁迫下, SmMKK2a 和 SmMKK5 显著上调, SmMKK4a、SmMKK4b 和 SmMKK7 极显著下调 (FDR  $< 0.05$  且  $|\log_2 \text{FC}| > 1$ ); 在 5 低盐胁迫下, SmMKK2b 显著上调, SmMKK5 显著下调。肝脏中, 与正常海水

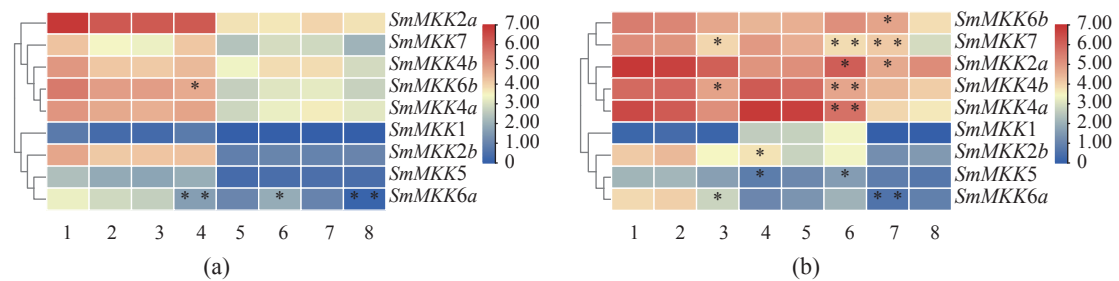


图 8 大菱鲂 MKKs 在非生物应激下的表达模式

(a) 热应激下 MKKs 在肾脏和肝脏中的表达模式, 1~4 分别表示 14 °C、23 °C、25 °C 和 28 °C 处理下的肾脏组织, 5~8 代表 14 °C、20 °C、24 °C 和 28 °C 处理下的肝脏组织; (b) 盐度应激下 MKKs 在肾脏、鳃和肝脏中的表达模式, 1-3 分别代表 5、30 和 50 盐度处理下的肾脏组织, 4-6 代表 5、30 和 50 盐度处理下的鳃组织, 7 和 8 分别代表 0 和 30 盐度处理下的肝脏组织

Fig. 8 Heat map of MKKs expression in *S. maximus* under abiotic stresses

(a) Expression of MKKs in kidney and liver tissues under heat stress, 1-4 represented kidney tissue treated with 14, 23, 25, and 28 °C, and 5-8 represented liver tissue treated with 14, 20, 24, and 28 °C, respectively; (b) Expression of MKKs in kidney, gill and liver tissues under salinity stress, 1-3 represented kidney tissue at 5, 30 and 50 salinity, 4-6 represented gill tissue at 5, 30 and 50 salinity, and 7 and 8 represent liver tissue at 0 and 30 salinity, respectively



组相比, *SmMKK2a*在淡水(0)处理条件下显著下调, *SmMKK6b*显著上调, *SmMKK6a*极显著下调(FDR < 0.05 且|log<sub>2</sub> FC| > 1), *SmMKK7*极显著上调(FDR < 0.05 且|log<sub>2</sub> FC| > 1)。以上分析表明, *SmMKK4a*、*SmMKK4b*、*SmMKK6a*和*SmMKK7*对盐度应激具有较强的响应。

综上所述, *SmMKK6a*对热、高盐、低盐胁迫均有较强的响应, 表明其在大菱鲆响应非生物应激的过程中可能具有重要作用。

### 3 讨论

MKK是MAPK信号通路的核心组成部分, 在先天免疫应答和细胞应对外部刺激的响应中发挥重要作用<sup>[8, 15]</sup>。近年来, 随着基因组测序技术的发展, MKK基因家族已在多种植物<sup>[11, 39-40]</sup>和水产动物[如虹鳟<sup>[18]</sup>、大黑口鲈<sup>[17]</sup>、虾夷扇贝<sup>[8]</sup>、硬壳蛤(*Mercuria mercenaria*)<sup>[41]</sup>等]中进行了全基因组水平的鉴定和功能研究。目前, MKK基因家族的系统鉴定和功能研究在大菱鲆中尚未见报道。本研究在全基因组水平对大菱鲆MKK基因家族进行了系统的鉴定和理化特征分析, 并进行了系统发育、基因结构和保守基序等分析。另外, 基于多个公开发表的转录组数据集, 研究了*SmMKKs*在不同组织和不同生物和非生物胁迫响应中的表达模式。

MKKs广泛存在于各种真核生物中, 但其家族成员数目在不同物种间存在较大差别。本研究通过BLASTP比对和结构域筛选相结合的方法, 在大菱鲆基因组共鉴定出9个MKK基因家族成员, 与大黑口鲈(8个)<sup>[17]</sup>、斑马鱼(8个)等硬骨鱼相似, 明显少于虹鳟(17个)<sup>[18]</sup>, 多于哺乳动物(7个)和双壳动物[虾夷扇贝(5个)<sup>[8]</sup>、硬壳蛤(5个)<sup>[41]</sup>]。研究表明大部分脊椎动物在进化过程中都经历了2次全基因组加倍, 而鱼类经历了3次或4次全基因组加倍<sup>[42]</sup>, 如虹鳟经历了4次基因组加倍, 因此, 全基因组加倍可能是不同物种中MKK基因拷贝数变化主要原因之一。本研究中大菱鲆的重复基因对全部位于不同染色体上, 也说明全基因组重复可能是导致大菱鲆MKK基因重复的主要原因。另外, 相关研究还认为基因重复和基因丢失是基因家族和物种形成的必要条件<sup>[43]</sup>。与哺乳动物和鸟类相比, 本实验未在大菱鲆MKK基因家族中发现MKK3家族成员, 这与在虹鳟、大黑口鲈中的研究结果一致<sup>[17-18]</sup>, 说明

MKKs可能在硬骨鱼进化过程中发生了选择性丢失。另外, 分子进化分析表明, 所有大菱鲆重复基因对的Ka/Ks值均小于1, 表明纯化选择在大菱鲆MKK基因家族进化过程中发挥了重要作用。

系统发育关系分析可以为基因家族的分类和进化提供重要证据。本研究用大菱鲆及其他3种代表性硬骨鱼(斑马鱼、青鳞和斑点雀鲷)的MKKs蛋白序列构建了系统进化树, 根据进化树将所有蛋白序列分为5个亚家族。其中, 家族成员MKK1和MKK2的亲缘关系比其他MKKs都要近, 因此将MKK1和MKK2划分为MKK1/2亚家族。另外, 不同硬骨鱼相同亚家族内的直系同源基因首先聚为一支, 表明MKK亚家族成员在物种之间的保守性远高于亚家族之间的保守性。

基因结构分析也可以为评估基因家族成员的进化关系及揭示MKK家族成员功能的进化提供证据<sup>[44]</sup>。本研究中, 基因结构和保守基序分析表明, 相同亚家族成员具有相似的内含子-外显子结构和motif组成, 不仅说明大菱鲆MKK基因家族在进化上是高度保守的, 也进一步为MKK基因家族分类提供了重要证据。另外, 多重序列比对分析显示, *SmMKKs*含有多个MKK基因家族的保守motif序列, 例如, 参与MKK和MAPK之间的磷酸转移反应的GxGxxGxV motif、在调节ATP和MKK相互作用中起重要作用的DFG/APE motif等, 说明MKK基因家族的进化具有高度保守性。另外, 基因结构分析也表明, 不同亚家族之间的内含子-外显子结构及motif组成有差别, 说明MKK家族成员在功能上可能具有多样性。例如, motif 9只存在于MKK1/2亚家族中, motif 11只存在于MKK4亚家族中, 基因表达模式分析表明, MKK1/2和MKK4亚家族成员的功能在应激响应中具有较大差异。另外, 基因结构分析表明, *MKK6a*和*MKK6b*具有相同的内含子和外显子数目, 但是*MKK6a*第一外显子长度明显长于*MKK6b*, 推测可能是二者功能存在较大分化的主要原因。

本研究通过综合分析*SmMKKs*在多种生物和非生物应激条件下的表达模式发现, *SmMKK6a*在寄生虫、病毒感染等生物应激条件和热、盐度等非生物应激条件下均表现出迅速且强烈的响应, 表明*SmMKK6a*可能在大菱鲆响应生物和非生物应激中均发挥重要作用; 另外, *SmMKK6b*在病毒感染、高温等应激反应中也表现出一定的响应, 表明*SmMKK6b*在应激响应中也具有一定的作用。

近年来, 已有大量研究表明 *MKK6* 在水生动物响应低温、氧、化学物质等非生物应激中发挥重要作用。例如, Yu 等<sup>[17]</sup> 研究表明, 与对照组 (27 °C) 相比, 大黑口鲈 *MKK6* 基因在低温应激条件下 (9 °C、18 °C) 表现出显著下调。大西洋鲑 (*Salmo salar*) 中鉴定了 3 个 *MKK6* 旁系同源基因 (*MKK6a*、*MKK6b* 和 *MKK6c*), 在亚砷酸钠、山梨醇、紫外辐射等不同非生物应激处理后, 3 个 *MKK6* 旁系同源基因都呈现出不同程度的表达和激活模式<sup>[45]</sup>。Diao 等<sup>[46]</sup> 通过生化和细胞学实验发现, *MKK6* 对氧化应激十分敏感, 是一种独特的细胞氧化还原传感器。另外, *MKK6* 在水生动物响应病原菌感染等生物应激中的重要作用也已被大量报道。例如, Wang 等<sup>[16]</sup> 在仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 基因组中克隆了 *MKK6* 基因 (*AjMKK6*), qRT-PCR 分析表明, 在感染灿烂弧菌 (*V. splendidus*) 12 和 24 h 后, *AjMKK6* 表达水平均发生显著改变。在凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 中鉴定出一个 *MKK6* 基因 (*LvMKK6*), 进一步研究表明, 在副溶血性弧菌感染下, *LvMKK6* 基因的表达下调导致了 AMPs 的表达减弱, 导致凡纳滨对虾的死亡率升高; 另外, 在对虾白斑综合征病毒 (WSSV) 感染过程中, *LvMKK6* 的沉默导致了较低的病毒载量和抑制病毒基因 (*VP28*) 的表达, 表明 *LvMKK6* 可能在抵抗细菌和病毒感染中均发挥重要作用<sup>[47]</sup>。结合本研究及以上研究结果, 我们推测 *MKK6* 基因可能具有综合抗应激的潜力。然而, 目前缺乏对 *MKKs* 尤其是 *MKK6* 同时在多种应激条件下的功能研究。另外, *MKK6* 的综合抗应激作用需要进一步实验验证和分析。

综上所述, 本研究在大菱鲆全基因组水平上鉴定了 9 个 *MKK* 基因家族成员, 并对其编码蛋白的理化特性、序列特征、基因结构及在生物和非生物应激响应中的潜在作用进行了研究, 研究结果表明, *MKK6* 亚家族成员 *SmMKK6a* 可能具有综合抗应激的作用, 值得进一步深入研究。这是首次对鲆鲽鱼类 *MKK* 基因家族进行系统地鉴定和功能研究, 为鲆鲽及其他硬骨鱼类 *MKK* 基因家族的鉴定和功能研究提供了重要参考和依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

[1] Colcombet J, Hirt H. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes[J]. *Biochemical Journal*, 2008, 413(2): 217-226.

<https://www.china-fishery.cn>

[2] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update[J]. *Physiological Reviews*, 2012, 92(2): 689-737.

[3] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions[M]//Seger R. MAP Kinase Signaling Protocols. Totowa: Humana, 2010: 3-38.

[4] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, et al. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2011, 1813(9): 1619-1633.

[5] Widmann C, Gibson S, Jarpe M B, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human[J]. *Physiological Reviews*, 1999, 79(1): 143-180.

[6] Zheng W W, Xu X W, E Z C, et al. Genome-wide identification of the MAPK gene family in turbot and its involvement in abiotic and biotic stress responses[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1005401.

[7] de Vantéry Arrighi C, Campana A, Schorderet-Slatkine S. A role for the MEK-MAPK pathway in okadaic acid-induced meiotic resumption of incompetent growing mouse oocytes[J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 63(2): 658-665.

[8] Zou J J, Wang R J, Li R J, et al. The genome-wide identification of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) genes in Yesso scallop *Patinopecten yessoensis* and their expression responses to bacteria challenges[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 901-911.

[9] Zhan H S, Yue H, Zhao X, et al. Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene families in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Genes*, 2017, 8(10): 284.

[10] Song Q M, Li D Y, Dai Y, et al. Characterization, expression patterns and functional analysis of the MAPK and MAPKK genes in watermelon (*Citrullus lanatus*)[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 298.

[11] Liang W W, Yang B, Yu B J, et al. Identification and analysis of MKK and MPK gene families in canola (*Brassica napus* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 392.

- [12] Liu Z Q, Shi L P, Liu Y Y, *et al.* Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of mitogen-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase genes in *Capsicum annuum*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 780.
- [13] Zhang S Z, Xu R R, Luo X C, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of MAPK and MAPKK gene family in *Malus domestica*[J]. *Gene*, 2013, 531(2): 377-387.
- [14] Su Y L, Chen J P, Mo Z Q, *et al.* A novel MKK gene (EcMKK6) in *Epinephelus coioides*: identification, characterization and its response to *Vibrio alginolyticus* and SGIV infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 500-507.
- [15] Fan H D, Li Y D, Yang Q B, *et al.* Isolation and characterization of a MAPKK gene from *Penaeus monodon* in response to bacterial infection and low-salinity challenge[J]. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100671.
- [16] Wang Y, Chen G, Li K Q, *et al.* A novel MKK gene (*AjMKK3/6*) in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*: identification, characterization and its response to pathogenic challenge[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 61: 24-33.
- [17] Yu J J, Li Y, Zhang Z H, *et al.* Genome-wide identification of MKK and MAPK gene families and their expression analysis under abiotic stress in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 561: 738688.
- [18] Yang X D, Hou Z S, Liu M Q, *et al.* Identification and characterization of mkk genes and their expression profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) symptomatically or asymptotically infected with *Vibrio anguillarum*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 121: 1-11.
- [19] 雷霖霖, 刘新富, 关长涛. 中国大菱鲆养殖20年成就和展望——庆祝大菱鲆引进中国20周年[J]. *渔业科学进展*, 2012, 33(4): 123-130.
- Lei J L, Liu X F, Guan C T. Turbot culture in China for two decades: achievements and prospect[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(4): 123-130 (in Chinese).
- [20] Xu X D, Liu L, Feng J X, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals potential anti-viral immune pathways of turbot (*Scophthalmus maximus*) subverted by megalocytivirus RBIV-C1 for immune evasion[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022, 122: 153-161.
- [21] Robledo D, Ronza P, Harrison P W, *et al.* RNA-seq analysis reveals significant transcriptome changes in turbot (*Scophthalmus maximus*) suffering severe enteromyxosis[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1149.
- [22] Ronza P, Robledo D, Losada A P, *et al.* The teleost thymus in health and disease: new insights from transcriptomic and histopathological analyses of turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. *Biology*, 2020, 9(8): 221.
- [23] Huang Z H, Ma A J, Yang S S, *et al.* Transcriptome analysis and weighted gene co-expression network reveals potential genes responses to heat stress in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2020, 33: 100632.
- [24] Nie X B, Zhang C F, Jiang C X, *et al.* Characterizing transcriptome changes in gill tissue of turbot (*Scophthalmus maximus*) for waterless preservation[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734830.
- [25] Cui W X, Ma A J, Wang X N. Response of the PI3K-AKT signalling pathway to low salinity and the effect of its inhibition mediated by wortmannin on ion channels in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. *Aquaculture Research*, 2020, 51(7): 2676-2686.
- [26] Xu X W, Zheng W W, Meng Z, *et al.* Identification of stress-related genes by co-expression network analysis based on the improved turbot genome[J]. *Scientific Data*, 2022, 9(1): 374.
- [27] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [28] He Z L, Zhang H K, Gao S H, *et al.* Evolveview v2: an online visualization and management tool for customized and annotated phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W236-W241.
- [29] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [30] Bailey T L, Johnson J, Grant C E, *et al.* The MEME suite[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W39-W49.
- [31] Ronza P, Álvarez-Dios J A, Robledo D, *et al.* Blood transcriptomics of turbot *Scophthalmus maximus*: a tool for health monitoring and disease studies[J]. *Animals*,



- 2021, 11(5): 1296.
- [32] Zhao T T, Ma A J, Huang Z H, *et al.* Transcriptome analysis reveals that high temperatures alter modes of lipid metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) liver[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 40: 100887.
- [33] Cui W X, Ma A J, Huang Z H, *et al.* Transcriptomic analysis reveals putative osmoregulation mechanisms in the kidney of euryhaline turbot *Scophthalmus maximus* responded to hypo-saline seawater[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2020, 38(2): 467-479.
- [34] Liu Z F, Ma A J, Yuan C H, *et al.* Transcriptome analysis of liver lipid metabolism disorders of the turbot *Scophthalmus maximus* in response to low salinity stress[J]. *Aquaculture*, 2021, 534: 736273.
- [35] Dobin A, Davis C A, Schlesinger F, *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(1): 15-21.
- [36] Liao Y, Smyth G K, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(10): e108.
- [37] Liao Y, Smyth G K, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923-930.
- [38] Robinson M D, Mccarthy D J, Smyth G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [39] Kong X P, Pan J W, Zhang D, *et al.* Identification of mitogen-activated protein kinase kinase gene family and MKK-MAPK interaction network in maize[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 441(4): 964-969.
- [40] Liang Z, Wei S, Guo Y J, *et al.* Genome-wide identification of *MPK* and *MKK* gene families and their responses to phytohormone treatment and abiotic stress in foxtail millet[J]. *Plant Growth Regulation*, 2022, doi: 10.1007/s10725-022-00877-y.
- [41] Hu Z, Song H, Feng J, *et al.* Genome-wide analysis of the hard clam mitogen-activated protein kinase kinase gene family and their transcriptional profiles under abiotic stress[J]. *Marine Environmental Research*, 2022, 176: 105606.
- [42] Sato Y, Nishida M. Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2010, 88(2): 169-188.
- [43] Zhang J Z. Evolution by gene duplication: an update[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2003, 18(6): 292-298.
- [44] Wang J, Pan C T, Wang Y, *et al.* Genome-wide identification of *MAPK*, *MAPKK*, and *MAPKKK* gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 386.
- [45] Hansen T E, Puntervoll P, Seternes O M, *et al.* Atlantic salmon possess three mitogen activated protein kinase kinase 6 paralogs responding differently to stress[J]. *Febs Journal*, 2008, 275(19): 4887-4902.
- [46] Diao Y R, Liu W, Wong C C L, *et al.* Oxidation-induced intramolecular disulfide bond inactivates mitogen-activated protein kinase kinase 6 by inhibiting ATP binding[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(49): 20974-20979.
- [47] Li H Y, Wang S, Qian Z, *et al.* MKK6 from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is responsive to bacterial and WSSV infection[J]. *Molecular Immunology*, 2016, 70: 72-83.

## Genome-wide identification of the MKK gene family in *Scophthalmus maximus* and its involvement in abiotic and biotic stress responses

ZHENG Weiwei<sup>1,2</sup>, XU Xiwen<sup>2,3</sup>, CHEN Songlin<sup>1,2,3</sup>, E Zechen<sup>1,2</sup>, LIU Yingjie<sup>1,4\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao 266071, China;

4. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China)

**Abstract:** Mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs or MKKs) are essential components of the highly evolutionarily conserved mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, which play crucial roles in response to a variety of biotic and abiotic stresses and immune responses. However, very little information is available about the MKKs in *S. maximus*. In order to detect the roles of the MKKs in response to biotic and abiotic stresses in *Scophthalmus maximus*, we first identified the MKKs of *S. maximus* at the whole genome level through bioinformatics methods, and then analyzed the expression patterns of MKKs in different tissues and under different biotic and abiotic stresses using multiple stress-related RNA-seq datasets. As a result, a total of 9 MKKs of *S. maximus* (*SmMKKs*) were identified, and they were unevenly distributed on 7 chromosomes. Physicochemical characteristics, secondary structure and subcellular localization of the proteins they encode were predicted, respectively. Phylogenetic analysis revealed that *SmMKKs* were classified into 5 subfamilies. Conserved motifs, intron-exon structure and multiple sequence alignment not only provided evidences for the classification of MKK subfamilies, but also revealed high levels of conservation in evolution within and between subfamilies. Expression patterns of *SmMKKs* in distinct tissues and under diverse abiotic and biotic stresses were examined using multiple published RNA-seq datasets. As a result, *SmMKKs* showed obviously tissue-specific expression. In addition, *SmMKK6a* was extremely significant differentially expressed after infection with both *Enteromyxum scophthalmi* and Megalocytivirus. After heat stress, *SmMKK6a* also showed extremely significant differential expression. Furthermore, *SmMKK4a*, *SmMKK4b*, *SmMKK6a* and *SmMKK7* were extremely significant differentially expressed after high- or low- salinity stresses. Among these candidate stress-responsive MKK genes, *SmMKK6a* showed extremely significant response to both abiotic and biotic stresses, demonstrating its potential functions in comprehensive anti-stress. This study may be the first to systematically identify and analyze the MKK gene family in turbot. The results not only demonstrate that *SmMKKs* play crucial roles in response to various biotic and abiotic stresses, but also provide important theoretical support for the development of molecular selective breeding for comprehensive stress-resistance in *S. maximus*.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; mitogen-activated protein kinase kinases (MKK); gene family; biotic stress; abiotic stress

**Corresponding author:** LIU Yingjie. E-mail: lyj@cafs.ac.cn

**Funding projects:** Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD20); Taishan Scholar Climbing Project of Shandong Province