

条斑紫菜丝裂原活化蛋白激酶 *PyMAPK3* 基因的克隆及胁迫条件下的功能分析*

李 娜 孔凡娜^① 李 超 孙佩佩 董道英 茅云翔

(中国海洋大学海洋生命学院海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

摘要 本研究从条斑紫菜中克隆了一个丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase)基因,命名为 *PyMAPK3*。该基因全长 2155bp, 开放阅读框(ORF)1401bp, 编码 466 个氨基酸, 含有两个内含子。氨基酸序列分析表明, *PyMAPK3* 磷酸化位点的氨基酸基序为 TDY, 其等电点为 7.17, 蛋白分子量为 51.6KDa, 亚细胞定位于叶绿体。荧光定量 PCR 技术对该基因在不同非生物胁迫条件下的转录差异分析结果显示, 极端胁迫条件下基因表达量显著增加。蛋白免疫印迹技术对蛋白在不同胁迫条件下的表达量分析结果显示, 在不同的胁迫条件下其翻译水平的表达模式表现出与转录水平的不一致性。本研究为深入了解条斑紫菜在逆境适应机制中 MAPK 蛋白的作用奠定基础, 同时为条斑紫菜抗逆品系的选育提供理论指导。

关键词 条斑紫菜; 丝裂原活化蛋白激酶; 非生物胁迫; 荧光定量 PCR; 蛋白质免疫印迹

中图分类号 Q71 **doi:** 10.11693/hyhz20180400094

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)分布于潮间带, 随着潮汐的变化周期性的经历水分、渗透压及温度的胁迫, 是研究潮间带海藻生理生态及逆境胁迫适应机制的代表性模式物种。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应是真核生物中最具特征的信号放大级联反应, 在进化上具有保守性, 能将细胞外刺激转化为细胞内的反应(Xu *et al.*, 2015)。已有众多研究证实 MAPK 级联途径参与了植物的生长发育及众多生物及非生物胁迫的调节, 包括干旱、低温、高盐、缺氧及病原菌的侵染 (Colcombet *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2013; Benhamman *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017)。

MAPK 级联途径的基本组成部分包含三个相互关联的激酶模块: MAPKKK/MEKK, MAPKK/MKK 和 MAPK/MPK (Mészáros *et al.*, 2006)。MAPKKK 作为 MAPK 级联信号途径的最上游功能分子, 将细胞膜上受体分子感受的信号传入 MAPK 信号通路, 活

化的 MAPKKK 通过磷酸化 MAPKK 活化环上的丝氨酸和苏氨酸将二级功能分子 MAPKK 激活, 活化的 MAPKK 进而磷酸化 MAPK 蛋白的 T-X-Y motif 中的 T 和 Y 从而激活 MAPK。被激活的 MAPK 有的停留在细胞质中激活骨架蛋白或磷酸化蛋白酶类, 有的进入细胞核激活相应的转录因子从而调控基因的转录水平, 并最终引起细胞中的一系列生理响应 (Mishra *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006)。根据编码氨基酸保守域 TxY 基序的不同可将植物中的 MAPK 基因分为 TEY 类和 TDY 类(Asai *et al.*, 2002)。TEY 类可分为 A、B 和 C 三大亚族, TDY 类属于 D 亚族。MAPKs 的结构域特征相似度较高, 蛋白序列中含有 11 个 Ser/Thr 保守结构域, 且在 VII 和 VIII 的 Ser/Thr 结构域之间存在一个 T-loop (Activation-loop)的环状结构。T-loop 环中具有一个保守的 Ser-x-Tyr 三肽基序(TxY), TxY 基序中的 x 常为 E (谷氨酸)或 D(天冬氨酸), 即 ATP 磷酸化位点或活性片段。

* 国家自然科学基金项目, 31672641 号; 国家高技术研究发展计划项目, 2012AA10A401 号。李 娜, 硕士研究生, E-mail: lina370523@163.com

① 通讯作者: 孔凡娜, 副教授, E-mail: fnkong@ouc.edu.cn

收稿日期: 2018-04-16, 收修改稿日期: 2018-07-06

MAPK 的 A、B、C、D 亚族在植物的逆境胁迫响应中也发挥着不同的作用。A 亚族的 MAPKs 主要参与植物的逆境胁迫和激素应答。如拟南芥中 *AtMPK3* 和 *AtMPK6* 参与了病原侵染、氧化胁迫及植物激素等信号传递过程; 水稻的 *OsMPK5* 可被不同的病原菌及环境刺激所诱导 (Huang *et al*, 2000; Petersen *et al*, 2000; Droillard *et al*, 2002, 2004)。B 亚族的 MAPKs 研究较少, 已有研究证明其参与了环境胁迫应答和细胞周期的调节。C 亚族的 MAPKs 参与了机械损伤及激素的调节, 如拟南芥的 *AtMPK1*、*AtMPK2* 受机械损伤、JA、ABA 及 H_2O_2 的诱导 (Dahan *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2011; Shin *et al*, 2014; Liu *et al*, 2017)。D 亚族的 MAPKs 与 A、B 及 C 亚族存在较大的结构差异, 关于 D 类 MAPKs 的研究多集中在单子叶植物中, 如水稻的 *OsBWMK1* 与植物病原菌侵染的抗病反应有关, *OsMPK13*、*OsMPK15*、*OsMPK17* 均可被病原菌, SA 及 ET 诱导表达 (Agrawal *et al*, 2002; Soyano *et al*, 2003)。

条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)是广泛分布于潮间带的大型海藻, 由于其特殊的生长环境及自身具有的较强抗逆性使其成为研究潮间带逆境胁迫适应机制的代表性模式物种。然而, 目前对条斑紫菜 MAPK 基因的克隆及非生物胁迫下的表达研究尚未见报道。本研究以条斑紫菜叶状体为实验材料, 通过分子生

物学手段对 *PyMAPK3* 基因的生物学特性及逆境胁迫下的表达模式进行研究分析。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为实验室培养的条斑紫菜纯系 RZ 叶状体。

1.2 方法

1.2.1 条斑紫菜干旱、盐度及温度胁迫处理 选择叶片完整光滑、色深且有光泽的生长旺盛的健康藻体为材料, 通气瓶中培养驯化 1—2 周, 培养条件: 光照为 $35\text{—}45\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期为 12L:12D, 10°C 通气培养。不同的处理条件见表 1(每个处理设置 3 个平行), 处理后的样品置于液氮中保存。

1.2.2 条斑紫菜不同处理材料的 RNA 提取及 cDNA 的合成 利用植物组织 RNA 提取试剂盒(E.Z.N.A total RNA Kit)提取不同处理条件下叶状体的 RNA, 1%琼脂糖凝胶检测其完整性, NanoDrop 检测浓度及质量, 将质量合格($A_{260}/A_{230}=2.0\text{—}2.2$, $A_{260}/A_{280}=1.8\text{—}2.0$)的 RNA 合成 cDNA, 合成方法参照 PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser 试剂盒的说明。DNA 的提取使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN)。

表 1 条斑紫菜的不同胁迫处理
Tab.1 Different treatment conditions of *P. yezoensis*

样品名称	处理条件
对照组(正常培养)	盐度 33 的无菌海水, 4h, 10°C
失水率 10%	放在有干燥剂的密闭培养皿中直至失水率达到 10%, 10°C
失水率 30%	放在有干燥剂的密闭培养皿中直至失水率达到 30%, 10°C
失水率 50%	放在有干燥剂的密闭培养皿中直至失水率达到 50%, 10°C
失水率 70%	放在有干燥剂的密闭培养皿中直至失水率达到 70%, 10°C
失水率 80%后复水 15min	放在有干燥剂的密闭培养皿中直至失水率达到 80%, 然后放在盐度 33 的无菌海水中复水 15min, 10°C
失水率 80%后复水 30min	放在有干燥剂的密闭培养皿中直至失水率达到 80%, 然后放在盐度 33 的无菌海水中复水 30min, 10°C
海水盐度 8 (超低渗)	250mL 盐度 33 的无菌海水中加 750ml 去离子水, 4h, 10°C
海水盐度 16 (低渗)	500mL 盐度 33 的无菌海水中加 500ml 去离子水, 4h, 10°C
海水盐度 47 (高渗)	1L 盐度 33 的无菌海水中加 16g NaCl, 4h, 10°C
海水盐度 60 (超高渗)	1L 盐度 33 的无菌海水中加 33g NaCl, 4h, 10°C
-8°C	盐度 33 的无菌海水, 4h, -8°C
0°C	盐度 33 的无菌海水, 4h, 0°C
16°C	盐度 33 的无菌海水, 4h, 16°C
24°C	盐度 33 的无菌海水, 4h, 24°C

1.2.3 *PyMAPK3* 基因克隆与生物信息学分析 根据条斑紫菜转录组数据(ID PRJNA235353), 筛选得到一条丝裂原活化蛋白激酶基因。利用本地 blast 对筛选获得的基因进行拼接延伸。将拼接后的序列在 NCBI 的 ORF Finder 上进行预测。

根据拼接获得的序列, 利用 primer5.0 设计引物, 分别以 DNA 和 cDNA 为模板进行序列扩增。将纯化的 PCR 产物与 pMD18-T 连接后转化入大肠杆菌, 通过蓝白斑筛选, 挑取白色单菌落, 经 PCR 验证后, 将阳性克隆送至擎科公司测序。

利用 NCBI 的 ORF Finder 网站预测基因的开放阅读框。DNAMAN 软件进行氨基酸序列的比对, 运用在线软件 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测 *PyMAPK3* 基因编码的蛋白的等电点及分子量。利用 PFAM 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 预测蛋白激酶结构域, 利用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测顺式作用元件。

1.2.4 *PyMAPK3* 基因的荧光定量 PCR 分析 利用荧光定量 PCR 方法检测 *PyMAPK3* 在不同胁迫下的转录差异。PCR 反应体系(20 μ L)为: SYBR Green I Real-time PCR Master Mix 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 上、下游引物各 0.6 μ L, 灭菌 ddH₂O 6.8 μ L。扩增所用引物为 *PyMAPK3-F*, *PyMAPK3-R*, 内参基因选择 *PyEIF* 和 *PyUBC* (Kong *et al*, 2015)(引物序列见表 2)。每个处理样品设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复, 相对表达量的计算利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法 (Livak *et al*, 2001)。利用 SPSS 软件对试验数据进行差异性分析。

表 2 荧光定量 PCR 中所用的引物序列
Tab.2 The Primer sequences for genes used in RT-qPCR

基因名称	引物序列(5'—3')
<i>PyEIF</i>	F: GCTTTCTGTCTGGACGAGG R: TCTTACAAGGATGCGGAT
<i>PyUBC</i>	F: TCACAACGAGGATTTACCACC R: GAGGAGCACCTTGAAACG
<i>PyMAPK3</i>	F: GACCAGGTGCGGCGGATTGT R: CTTGCCATACCCGAGGCTGTC

1.2.5 *PyMAPK3* 蛋白的 Western-blot 分析 利用 Western-blot 的方法检测 *PyMAPK3* 蛋白在不同胁迫下的表达量差异。利用植物组织蛋白试剂盒提取不同处理条件下的总蛋白, 用 Qubit 定量仪测量蛋白浓度,

将等量蛋白与 loading 混匀后点样于 SDS-PAGE 胶上电泳, 以电泳后的 Rubisco 蛋白条带为参照(Kim *et al*, 2001), 电泳后利用蛋白免疫印迹技术检测不同处理条件下的蛋白表达量。一抗为 *PyMAPK3* 全蛋白的鼠源多克隆抗体, 二抗为兔源抗鼠多克隆抗体。利用 Image Proplus 计算不同处理条件下目的蛋白条带的灰度值。

2 结果与分析

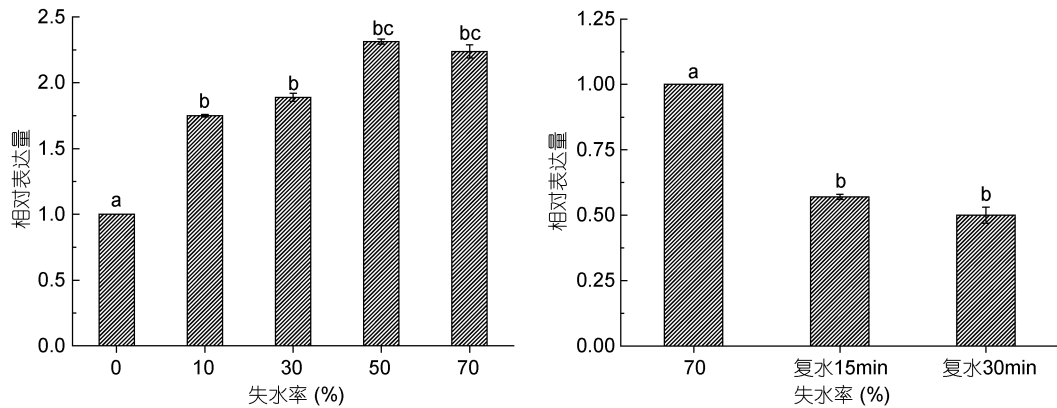
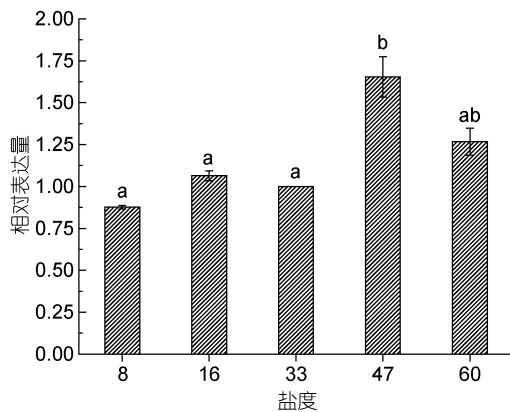
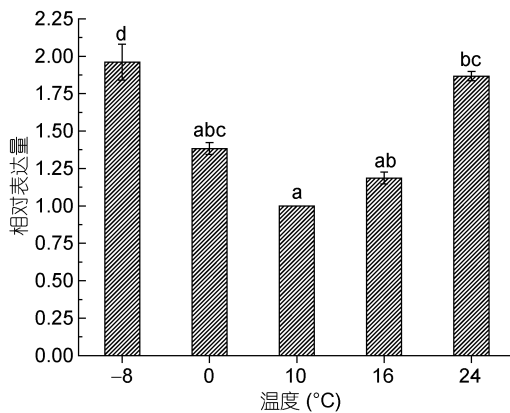
2.1 条斑紫菜 *PyMAPK3* 基因的克隆及生物信息学分析

将克隆所得序列进行测序验证, 同时在 NCBI 上对核酸序列进行比对分析及 ORF 的查找, 其 ORF 为 1401bp, 编码 466 个氨基酸。在开放阅读框两端设计引物, 利用 DNA 及 cDNA 为模板分别进行扩增, 序列比对发现 *PyMAPK3* 基因含有两个内含子。氨基酸序列分析显示, *PyMAPK3* 的等电点为 7.17, 蛋白分子量为 51.6KDa。亚细胞定位的预测结果显示, *PyMAPK3* 定位于叶绿体。通过对 *PyMAPK3* 的氨基酸序列分析发现, *PyMAPK3* 蛋白的磷酸化位点的氨基酸基序为 TDY。启动子顺势作用元件结果显示, *PyMAPK3* 启动子区含有 ABA 响应元件 ABRE 和调控元件 G-box。

2.2 *PyMAPK3* 基因在水分、盐度、温度胁迫响应中的表达分析

为了探究 *PyMAPK3* 基因在干旱、盐度及温度胁迫下的表达模式, 采用荧光定量 PCR 的方法检测了 *PyMAPK3* 在转录水平的变化规律。结果显示(图 1), *PyMAPK3* 基因的表达量随失水程度的增加呈上升趋势, 在失水初期(失水 10%和 30%), *PyMAPK3* 的表达量没有显著性增加; 在失水 50%及以上时, 基因表达与正常条件下基因表达量相比显著增加; 在复水条件下, *PyMAPK3* 基因的表达量显著降低。而在不同的盐度胁迫下, *PyMAPK3* 基因的表达量没有显著性差异(图 2)。

温度胁迫处理条件下(图 3), *PyMAPK3* 基因的表达量随温度的增加表现出先降低后增加的趋势。在低温(0 和 -8 $^{\circ}$ C)胁迫下, *PyMAPK3* 基因的表达量随温度的降低而增加, 且在冰冻温度(-8 $^{\circ}$ C)下基因表达量显著增加; 在高温(16 和 24 $^{\circ}$ C)胁迫下, 基因的表达量随温度的升高而增加, 且在极端高温(24 $^{\circ}$ C)下, 基因的表达量显著增加。

图1 失水处理条件下 *PyMAPK3* 基因的相对表达量Fig.1 The relative expression of *PyMAPK3* gene under water stress图2 盐度处理条件下 *PyMAPK3* 基因的相对表达量Fig.2 The relative expression of *PyMAPK3* gene under salinity stress图3 温度处理条件下 *PyMAPK3* 基因的相对表达量Fig.3 The relative expression of *PyMAPK3* gene under thermal stress

2.3 *PyMAPK3* 蛋白在水分、盐度、温度胁迫响应中的表达分析

为了探究 *PyMAPK3* 蛋白在干旱、盐度及温度胁迫下的表达模式, 采用蛋白免疫印迹(western-blot)的方法对 *PyMAPK3* 蛋白进行检测。结果显示,

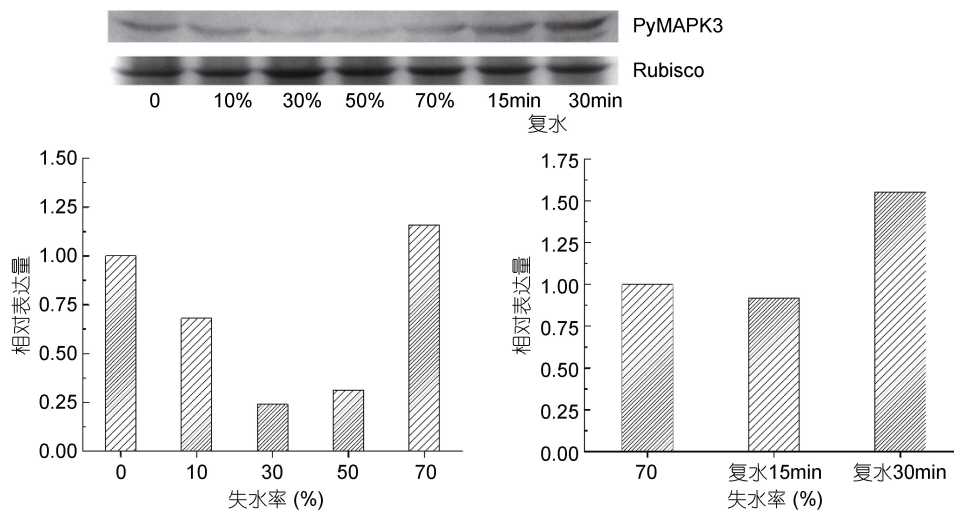
PyMAPK3 蛋白表达量随失水程度的增加表现出先降低后增加的趋势(图4), 在失水初期(失水10%—30%), *PyMAPK3* 蛋白表达量随失水程度的增加而降低; 随着失水程度的进一步增加(失水50%—70%), *PyMAPK3* 蛋白表达量随失水程度的增加而增加。在复水环境下, *PyMAPK3* 蛋白表达量随复水时间的增加而增加。

在盐度胁迫下, *PyMAPK3* 蛋白的表达量随渗透压的改变没有表现出显著性的变化(图5)。当渗透压低于正常生长盐度(33)时, *PyMAPK3* 的蛋白表达量出现轻微上升趋势。当渗透压高于正常生长盐度(33)时, *PyMAPK3* 的表达量升高。

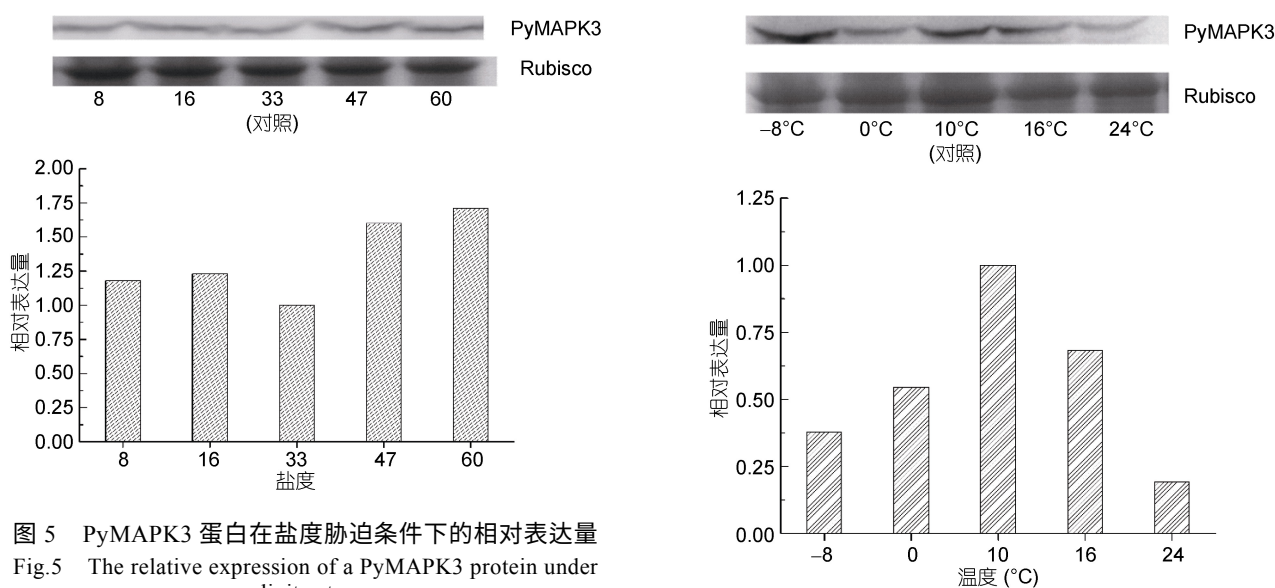
在温度胁迫下, *PyMAPK3* 蛋白的表达量随温度的升高表现出先降低后增加之后再降低的趋势(图6)。在低温(-8和0°C)胁迫下, *PyMAPK3* 蛋白表达量随温度的降低先降低后增加; 在高温(16和24°C)胁迫下, *PyMAPK3* 蛋白表达量随温度的升高而降低。

3 讨论

近年来, MAPK 家族基因的功能在高等植物中已被广泛的研究与报道, 其在植物的逆境胁迫响应中发挥了重要的作用。本研究从条斑紫菜中克隆了一个 MAPK 基因, 其开放阅读框为1401bp, 含有两个内含子, 编码的氨基酸序列中含有磷酸化的基序 TDY, 属于 D 亚族。目前, 对 D 亚族的 MAPK 基因的研究多集中于单子叶植物中, 如水稻的 *OsBWMK1* 基因与植物的抗病性相关, 在烟草中过表达 *OsBWMK1* 基因会使组成型的抗病基因 PR 基因表达从而增强植物对真菌(寄生性霉菌)和细菌(假单胞菌)感染的抗性 (Cheong *et al*, 2003)。拟南芥的一个 D 亚族 MAPK 基因 *MPK9* 优先在

图 4 *PyMAPK3* 蛋白在水分胁迫条件下的相对表达量Fig.4 The relative expression of a *PyMAPK3* protein under water stress

注: Rubisco 为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶, 作为内参蛋白

图 5 *PyMAPK3* 蛋白在盐度胁迫条件下的相对表达量Fig.5 The relative expression of a *PyMAPK3* protein under salinity stress

保卫细胞中表达并作为活性氧物质(ROS)下游的正调节物参与到保卫细胞中的脱落酸信号传导途径中。

本研究通过荧光定量 PCR 检测条斑紫菜 *PyMAPK3* 基因在不同胁迫下的表达情况, 发现 *PyMAPK3* 基因被多种胁迫所诱导, 且在不同的胁迫下呈现出不同的变化趋势, 如在干旱胁迫下, *PyMAPK3* 表达量随失水程度的增加而增加, 在复水条件下表达量降低; 而在盐度胁迫下, 其基因表达量没有显著性差异; 在低温和高温胁迫下, 基因随温度的变化而变化, 且在极端温度(-8 和 24℃)时基因表达量显著性增加。众多研究表明大多数对失水, 盐度

图 6 *PyMAPK3* 蛋白在温度胁迫条件下的相对表达量Fig.6 The relative expression of a *PyMAPK3* protein under thermal stress

及低温胁迫的响应基因是通过外源的 ABA 诱导的, 失水胁迫可以触发 ABA 的产生, 从而诱导基因的表达, ABA 在植物对干旱、高盐和寒冷的耐受性中具有重要的作用(Shinozaki *et al.*, 1996; Bray 1997)。而 ABA 对基因的诱导是通过基因启动子中的顺式作用元件来调节的, 包括 ABA 的识别元件 ABRE、干旱响应元件 DRE 等。在 *PyMAPK3* 顺式作用元件的分析中发现其含有 ABA 的响应元件 ABRE, 因此 *PyMAPK3* 对胁迫的响应过程可能是通过内源 ABA 的积累产生

所诱导激活的。许多证据已证实 MAPK 级联反应在植物的非生物胁迫(如干旱, 渗透压及温度)响应中起到积极的作用(Ichimura *et al*, 2002; Teige *et al*, 2004)。如拟南芥的 ATMPK3 在 mRNA 水平上能被干旱, 低温, 高盐及伤害所诱导(Mizoguchi *et al*, 1996)。苜蓿 MMK4 在翻译后水平上能被多种胁迫包括干旱, 低温及机械刺激所激活(Jonak *et al*, 1996)。

此外, 在本研究中, 我们发现 *PyMAPK3* 在不同的胁迫下转录水平和翻译水平上有不同的表达规律。如在失水胁迫下, *PyMAPK3* 在转录水平上呈上调表达, 其蛋白在翻译水平上呈现下调表达趋势。在渗透压胁迫下, *PyMAPK3* 在转录水平和翻译水平上均没有显著性差异; 在温度胁迫下, 在低温胁迫下, 转录水平上和蛋白水平上表达均上调, 而在高温胁迫下, 转录水平上表达上调, 而蛋白水平上表达下调。在水稻中也有类似的报道, 在各种胁迫因子刺激下, *BWMK1* 基因在转录水平发生了不同的变化, 其在蛋白水平上却没有明显的变化(Cheong *et al*, 2003)。这可能是在信号传递过程中 *PyMAPK3* 在翻译水平上通过调控蛋白的活性来实现信号的传导。

4 结论

本研究从条斑紫菜克隆了一个丝裂原活化蛋白激酶基因 *PyMAPK3*, 开放阅读框为 1401bp, 编码一个含 466 个氨基酸残基的多肽, 氨基酸序列分析结果显示其属于 TDY 型。在失水、渗透压和温度胁迫下, 在基因水平及蛋白水平上均表现出不同的表达规律。条斑紫菜作为一种研究潮间带藻类逆境胁迫响应机制的代表性模式物种, 本文对丝裂原活化蛋白激酶的研究能够为揭示条斑紫菜逆境适应机制奠定基础。

参 考 文 献

- Agrawal G K, Rakwal R, Iwahashi H, 2002. Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, *OsMSRMK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(5): 1009—1016
- Asai T, Tena G, Plotnikova J *et al*, 2002. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875): 977—983
- Benhamman R, Bai F W, Drory S B *et al*, 2017. The *Arabidopsis* Mitogen-activated protein Kinase Kinase Kinase 20 (MKKK20) acts upstream of MKK3 and MPK18 in two separate signaling pathways involved in root microtubule functions. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1352
- Bray E A, 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2(2): 48—54
- Cheong Y H, Moon B C, Kim J K *et al*, 2003. BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology*, 132(4): 1961—1972
- Colcombet J, Hirt H, 2008. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413(2): 217—226
- Dahan J, Pichereaux C, Rossignol M *et al*, 2009. Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogin, an elicitor of plant defence reactions. *Biochemical Journal*, 418(1): 191—200
- Droillard M J, Boudsocq M, Barbier-Brygoo H *et al*, 2002. Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *FEBS Letters*, 527(1—3): 43—50
- Droillard M J, Boudsocq M, Barbier-Brygoo H *et al*, 2004. Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters*, 574(1—3): 42—48
- Huang Y F, Li H, Gupta R *et al*, 2000. ATMPK4, an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase, is activated in vitro by AtMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiology*, 122(4): 1301—1310
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G *et al*, 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7(7): 301—308
- Jonak C, Kiegl S, Ligterink W *et al*, 1996. Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20): 11274—11279
- Kim S T, Cho K S, Jang Y S *et al*, 2001. Two dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, 22(10): 2103—2109
- Kong F N, Cao M, Sun P P *et al*, 2015. Selection of reference genes for gene expression normalization in *Pyropia yezoensis* using quantitative real-time PCR. *Journal of Applied Phycology*, 27(2): 1003—1010
- Liu C, Wei C, Zhang M *et al*, 2017. Mulberry *MnMAPK1*, a group C mitogen-activated protein kinase gene, endowed transgenic *Arabidopsis* with novel responses to various abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(1): 151—162
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Mészáros T, Helfer A, Hatzimasoura E *et al*, 2006. The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *The Plant Journal*, 48(4): 485—498

- Meng X Z, Zhang S Q, 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 245—266
- Mishra N S, Tuteja R, Tuteja N, 2006. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452(1): 55—68
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T *et al*, 1996. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2): 765—769
- Petersen M, Brodersen P, Naested H *et al*, 2000. *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103(7): 1111—1120
- Shin H Y, You M K, Jeung J U *et al*, 2014. OsMPK3 is a TEY-type rice MAPK in Group C and phosphorylates OsbHLH65, a transcription factor binding to the E-box element. *Plant Cell Reports*, 33(8): 1343—1353
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(2): 161—167
- Soyano T, Nishihama R, Morikiyo K *et al*, 2003. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes & Development*, 17(8): 1055—1067
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T *et al*, 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 15(1): 141—152
- Xu J, Zhang S Q, 2015. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science*, 20(1): 56—64
- Zhang A Y, Jiang M Y, Zhang J H *et al*, 2006. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology*, 141(2): 475—487
- Zhang L, Xi D M, Li S W *et al*, 2011. A cotton group C MAP kinase gene, *GhMPK2*, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 77(1—2): 17—31
- Zhao C Z, Wang P C, Si T *et al*, 2017. MAP kinase cascades regulate the cold response by modulating ICE1 protein stability. *Developmental Cell*, 43(5): 618—629.e5

CLONING AND EXPRESSION OF *PYMAPK3* IN *PYROPIA YEZOENSIS* UNDER DIFFERENT STRESSES

LI Na, KONG Fan-Na, LI Chao, SUN Pei-Pei, DONG Dao-Ying, MAO Yun-Xiang

(The Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades are ubiquitous signaling models in eukaryotes. Many studies have indicated that MAPK cascading could play a crucial role in plant growth and development, and participate in biotic and abiotic stress responses. The red macroalgae *Pyropia yezoensis*, classified as Bangiophyceae, is a suitable species for the elucidation of molecular mechanisms against the environmental stress in marine red algae. A *PyMAPK3* gene was isolated through a silico clone based on the transcriptomic data in this research. The full length of *PyMAPK3* contains two introns and an open reading frame of 1401bp encoding 466 amino acids. The isoelectric points (PI) and molecular weights (MW) of the *PyMAPK3* amino acid sequence are 7.17 and 51.6KDa, respectively. To better understand the expression patterns of *PyMAPK3* in responses to an abiotic stress, qRT-PCR, and the Western-blot were used to investigate the expression patterns of *PyMAPK3* in different treatment conditions (salinity, dehydration, and temperature). At mRNA levels, the gene expression increased under extremely stress conditions, while the expression pattern at the translation level was inconsistent with the transcription levels. The isolation and expression characterization of the *PyMAPK3* gene in *P. yezoensis* may provide insights for understanding the mechanisms of *PyMAPK3* responding against abiotic stresses.

Key words *Pyropia yezoensis*; MAPK; abiotic stress; real time-PCR; Western-blot