

## 小麦 *TaMAPK2* 基因的克隆及表达分析

胡 伟<sup>1</sup>, 颜 彦<sup>1</sup>, 马占兵<sup>2</sup>

(1 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101; 2 宁夏医科大学 医学遗传与细胞生物学系, 银川 750004)

**摘 要:** 该研究从小麦中克隆了 1 个 *MAPK* 基因 *TaMAPK2*。序列分析表明, *TaMAPK2* 基因的 ORF 为 1 110 bp, 编码 369 个氨基酸。序列比对分析表明, 该基因所编码的蛋白与粗山羊草、水稻、谷子等 *MAPK* 蛋白具有较高的一致性, 分别为 99%、94%、94%。进化树分析表明, *TaMAPK2* 与水稻 *OsMAPK2* 的亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析表明, 该基因的表达显著受渗透胁迫、低温胁迫、高盐胁迫、乙烯和双氧水诱导, 受 ABA 抑制。研究表明, *TaMAPK2* 可能参与非生物逆境胁迫及相关信号分子应答。

**关键词:** 小麦; *MAPK*; 克隆; 表达

**中图分类号:** Q785; Q786

**文献标志码:** A

## Cloning and Expression Analysis of *TaMAPK2* Gene in Wheat

HU Wei<sup>1</sup>, YAN Yan<sup>1</sup>, MA Zhanbing<sup>2</sup>

(1 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China; 2

Department of Medical Genetic and Cell Biology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**Abstract:** *MAPK* protein kinase plays an important role in the response of abiotic stresses. In the present study, we isolated a *MAPK* gene designated *TaMAPK2* from wheat. *TaMAPK2* ORF is 1 110 bp, which encodes 369 amino acids. Comparison of amino acid sequences indicated that *TaMAPK2* shared high similarity with *MAPKs* from other species, such as *Aegilops tauschii* (99%), *Oryza sativa* (94%) and *Setaria italica* (94%). Phylogenetic analysis showed that *TaMAPK2* is closely related with *OsMAPK2*. Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) assay revealed that *TaMAPK2* expression is induced after osmotic stress, low temperature, salt stress, ethylene and  $H_2O_2$  treatments and inhibited after ABA treatment. These results suggested that *TaMAPK2* participates in the response of abiotic stresses and related signaling molecules.

**Key words:** wheat; *MAPK*; cloning expression

蛋白质的磷酸化在植物对逆境胁迫的信号转导过程中发挥着重要作用。底物蛋白质被磷酸化的氨基酸残基主要是丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸等少数几个氨基酸。因此, 根据磷酸化靶蛋白的氨基酸残基种类的不同, 蛋白激酶被分为丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶、组氨酸激酶、色氨酸激酶和天冬氨酰基/谷氨酰基蛋白激酶等 5 类。促分裂素原活化蛋白激

酶(mitogen-activated protein kinase, *MAPK*) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其功能主要是参与调控细胞生长、分化、对环境的适应、炎症反应等多种重要的细胞生理和病理过程<sup>[1]</sup>。

在植物中, 根据 *MAPK* 编码蛋白序列的 TxY 基序的不同, 将 *MAPK* 蛋白分为 TEY 类和 TDY 类, 根据系统发生关系将 TEY 类进而划分为 A、B、C 组,

收稿日期: 2014-05-16; 修改稿收到日期: 2014-08-25

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(ITBB140204); 海南省重大科技专项(ZDZX2013023-1)

作者简介: 胡 伟(1982—), 博士, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: huwei2010916@126.com

TDY 类单独列为 D 组<sup>[2]</sup>。每一组中的 MAPK 成员都被报道能够参与逆境胁迫应答和激素信号转导。AtMPK6 (A 组)、AtMPK4 (B 组)、ZmMPK7 (C 组)、BWMK1 (D 组) 能被逆境胁迫和相关信号分子激活<sup>[3-5]</sup>。MAPK 是一个高度保守的基因家族,在拟南芥以及其它物种中多个 MAPK 家族成员都被报道能够赋予植物对生物及非生物逆境胁迫的耐受性。所以,MAPK 家族基因在植物对逆境胁迫的应答及相关信号转导过程中发挥着重要作用。然而,小麦的 MAPK 家族基因的研究较少。Komis 等<sup>[6]</sup>报道,小麦 p38-like MAPK 蛋白的表达可能与高渗胁迫诱导的相关生理过程有关。Rudd 等<sup>[7]</sup>研究表明,真菌侵染能够在转录水平和翻译水平诱导 TaMPK3 上调表达,但抑制 TaMPK6 表达。所以,小麦 MAPK 家族基因对非生物逆境胁迫及相关信号分子研究非常有限,小麦 MAPK 家族基因在非生物逆境胁迫中的功能值得进一步研究。

本研究从小麦中克隆了一个 *TaMAPK2* 基因,并对其在逆境胁迫以及多种信号分子处理下的表达模式进行了考察,为进一步探讨 *TaMAPK2* 基因的功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验所用小麦品种为‘中国春’(*Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring),种子由中国热带农业科学院热带生物技术研究所有保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 目的基因的获得** 小麦种子在无菌水中发芽生长 10 d 后,提取叶片 RNA,反转录成 cDNA 后进行基因克隆。根据 DFCI 小麦数据库中的信息 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) 设计 3'-RACE 扩增引物 (5'-AGCGCACCTCTTGCCAT-TGAC-3')。利用 RACE 扩增试剂盒 (Clontech 公司) 从小麦幼苗叶片中克隆得到该基因的 3' 端。扩增反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 次。获得 3'-RACE 扩增片段后对序列进行拼接得到 *TaMAPK2* cDNA 全长序列。然后根据 cDNA 全长序列设计 1 对引物 (5'-GCCGACGCTGTCTGCTGC-3'; 5'-ATC-CATACGCCGTTTATTGTGC-3') 扩增 *TaMAPK2* cDNA 全长序列。扩增反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 次。PCR 扩增产物回收、连接、转化后,

挑取单克隆在 LB 液体培养基中培养并进行 PCR 鉴定。对已鉴定的阳性克隆进行测序分析。

**1.2.2 生物信息学分析** 序列比对和保守结构域预测利用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 开放阅读框预测利用 ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 和 GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>); 多序列比对利用 DNAMAN 软件; 进化树构建利用 MEGA 软件。

**1.2.3 基因的表达分析** 生长 10 d 的小麦幼苗分别用 20% PEG-6000、200 mmol/L NaCl 和 4 °C 低温进行胁迫处理,以及 100 μmol/L ABA、100 μmol/L 乙烯和 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进行信号分子处理 (PEG-6000、NaCl、ABA、乙烯和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 均购自上海生工生物工程有限公司), 在处理 2、6、12、24 h, 分别取样, 利用 RNA simple Total RNA Kit (Tiangen 公司) 提取叶片总 RNA, 再用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 利用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司) 将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。反转录反应程序为 65 °C 5 min; 42 °C 60 min; 70 °C 5 min。以反转录的 cDNA 第一链为模板。为避免基因组 DNA 的污染, 在 RNA 提取过程中进行了基因组 DNA 消化。

实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 试剂盒 (TaRaKa 公司), 按照操作说明在 Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪 (吉泰生物科技有限公司) 上进行。所用引物为 TaMAPK2F (5'-CGCCACTGCCAC-CTCTCA-3') 和 TaMAPK2R (5'-GCACCACCTC-ACCACCCA-3'); TaACTINF (5'-CTTGTCTTTG-ACCCTTCC-3') 和 TaACTINR (5'-ATGTTTCAT-TCCTGCTTGT-3')。参考 TaKaRa 实时荧光定量标准说明书进行引物设计。为了保证引物的特异性, 引物设计在非翻译区, PCR 产物的长度维持在 300 bp 以内, 并进行了测序分析。实时荧光定量 PCR 引物均由上海生工生物工程有限公司合成。以小麦 *Actin* 基因为内参。荧光定量 PCR 反应程序为 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 7 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 循环 40 次。定量方法为 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法:  $\Delta\Delta C_t = (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ x} - (C_{T,Target} - C_{T,Actin})_{Time\ 0}$ <sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *TaMAPK2* 基因的克隆及生物信息学分析

根据 DFCI 小麦数据库中的序列信息, 发现 1

个 EST 序列与小麦 MAPK 家族基因具有较高的一致性,但是其 3'-端缺失。随后,利用 RACE 技术从小麦中克隆了其 3'-cDNA 序列 394 bp。将扩增的 3'-端序列与原序列拼接得到该基因的 cDNA 全长序列(图 1),并利用 PCR 扩增,扩增片段为 1 289 bp,分析表明其包含 1 个 1 110 bp 的 ORF,编码 369 个氨基酸。保守结构域分析表明该基因编码的蛋白具有激酶活性位点、ATP 结合位点和底物结合位点,属于 PKC 超家族(图 2)。Blastx 分析表明该基因编码的氨基酸序列与粗山羊草(EMT18927)、水稻(NP\_001058471)、谷子(XP\_004966120)的 MAPK 家族蛋白具有较高的一致性,分别为 99%、94%、94%。多序列比对分析表明 *TaMAPK2* 编码的氨基酸序列与其它物种的 MAPK 氨基酸序列具有较高的一致性(图 3),将其命名为 *TaMAPK2*。进化树分析表明,*TaMAPK2* 与水稻 MAPK 家族基因具有较近的亲缘关系,其中与 *OsMAPK2* 的进化关系最近(图 4)。

## 2.2 *TaMAPK2* 基因在非生物逆境胁迫下的表达分析

为了研究 *TaMAPK2* 基因对非生物逆境胁迫的响应,利用实时定量 PCR 的方法检测了 *TaMAPK2* 基因在 PEG、低温、NaCl 处理下的表达模式(图 5)。结果表明,在 PEG 处理下,*TaMAPK2* 基因的表达在处理 2~24h 被显著诱导;在低温处

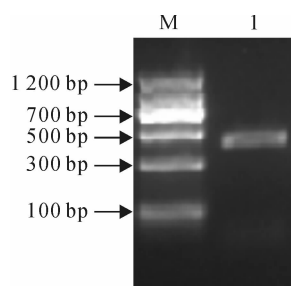


图 1 *TaMAPK2* 3'-RACE PCR 扩增电泳图

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of *TaMAPK2* 3'-RACE PCR  
M. DNA marker; 1. *TaMAPK2*

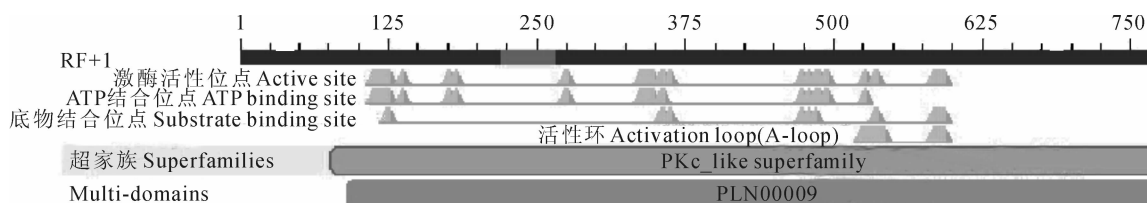


图 2 *TaMAPK2* 蛋白的保守特征预测

Fig. 2 Conserved characters of *TaMAPK2* protein

理下,*TaMAPK2* 基因的表达在处理 6~24 h 被显著诱导;在高盐处理下,*TaMAPK2* 基因的表达在处理 2~6 h 显著被诱导。这些结果表明,*TaMAPK2* 基因受渗透、低温和高盐胁迫诱导上调表达。

## 2.3 *TaMAPK2* 基因在信号分子处理下的表达分析

为了研究信号分子对 *TaMAPK2* 基因表达的调控,用 ABA、乙烯、双氧水分别处理小麦幼苗,利用实时荧光定量 PCR 检测 *TaMAPK2* 的表达(图 5)。结果表明,在 ABA 处理 2~12 h 该基因的表达被抑制;在乙烯和双氧水处理 2~24h,该基因的表达显著被

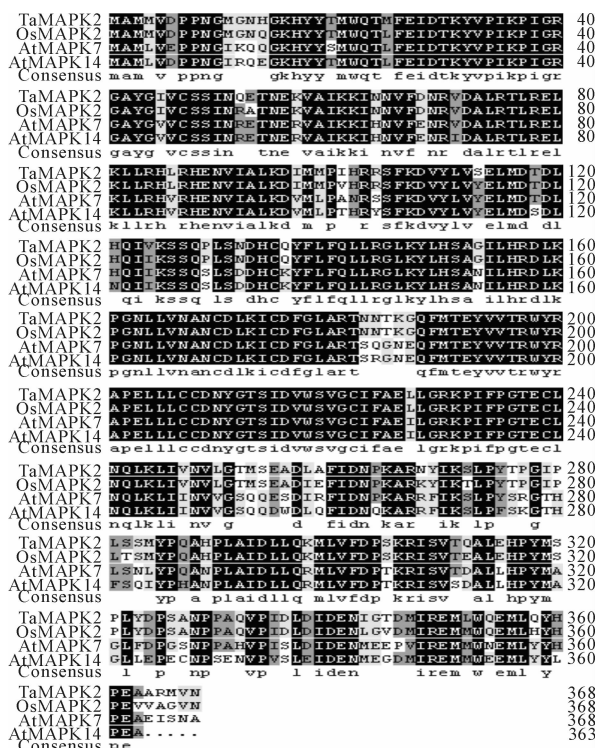


图 3 *TaMAPK2* 与其它物种中 MAPK 家族基因的氨基酸序列比对

*OsMAPK2*(BAD53997). 水稻; *AtMAPK7*(NP\_179409)、  
*AtMAPK14*(XP\_002867014). 拟南芥

Fig. 3 Comparison of the amino acid sequences of *TaMAPK2* and other MAPK proteins

*OsMAPK2*(BAD53997). *O. sativa*; *AtMAPK7* (NP\_179409), *AtMAPK14*(XP\_002867014). *A. thaliana*

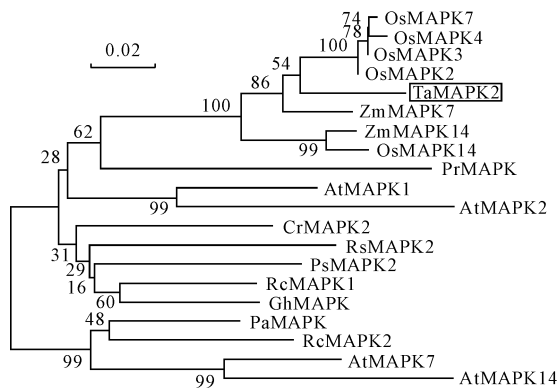


图 4 *TaMAPK2* 与其它物种中 MAPK 家族成员的系统发育进化树

标尺代表碱基替换率;分支上的数字表示 Bootstrap 验证中 1 000 次重复计算的值。OsMAPK2(BAD53997)、OsMAPK3(CAD54741)、OsMAPK7(ABH01191)、OsMAPK4(CAB61889)、OsMAPK14(ACD76440)。水稻;ZmMAPK7(ACG35608)、ZmMAPK14(NP\_001167676)。玉米;PrMAPK(CAH05024),虞美人;AtMAPK1(NP\_172492)、AtMAPK2(NP\_564746)、AtMAPK7(NP\_179409)、AtMAPK14(XP\_002867014)。拟南芥;CrMAPK2(ABO84840)。长春花;RsMAPK2(ACF49705)。琵琶柴;PsMAPK2(AAF73257)。豌豆;RcMAPK1(XP\_002510434)、RcMAPK2(EEF40793)。蓖麻;GhMAPK(ABA00652)。棉花;PaMAPK(AAD32204)。杏

Fig. 4 Phylogenetic tree of *TaMAPK2* and MAPK proteins from other species

The number in the ruler means the substitution rate of base;  
The numbers on the branches indicate the value of Bootstraps according to 1 000 replication;OsMAPK2(BAD53997), OsMAPK3(CAD54741), OsMAPK7(ABH01191), OsMAPK4(CAB61889), OsMAPK14(ACD76440). *Oryza sativa*; ZmMAPK7(ACG35608), ZmMAPK14(NP\_001167676). *Zea mays*; PrMAPK(CAH05024). *Papaver rhoeas*; AtMAPK1(NP\_172492), AtMAPK2(NP\_564746), AtMAPK7(NP\_179409), AtMAPK14(XP\_002867014). *A. thaliana*; CrMAPK2(ABO84840). *Catharanthus roseus*; RsMAPK2(ACF49705), RcMAPK2(EEF40793). *Reaumuria soongarica*; PsMAPK2(AAF73257). *Pisum sativum*; RcMAPK1(XP\_002510434). *Ricinus communis*; GhMAPK(ABA00652). *Gossypium hirsutum*; PaMAPK(AAD32204). *Prunus armeniaca*

诱导。这些结果表明,ABA 能够抑制 *TaMAPK2* 表达,而乙烯和双氧水能够诱导 *TaMAPK2* 表达。

### 3 讨论

MAPK 是一个相对保守的家族,在植物适应逆境胁迫过程中起着重要作用。一些模式植物(拟南芥和水稻)MAPK 家族基因的功能及其介导的信号转导途径已经被鉴定。小麦遗传背景复杂(异源六倍体)、基因组大(17 000 Gb,是水稻基因组的 40 倍)、基因组上重复序列多(85%),严重限制了小麦功能基因的分离和鉴定<sup>[9]</sup>。所以,小麦中 MAPK 家族基因的研究相对滞后,目前小麦中 MAPK 家族基因的报道也非常有限。本研究克隆了 1 个小麦 *TaMAPK2* 基因,该基因编码的氨基酸序列具有 MAPK 家族蛋白的基本特征,与其它物种中 MAPK 家族成员具有较高的一致性,与水稻 MAPK 家族成员具有较近的进化关系。

MAPK 家族基因的表达受环境胁迫影响<sup>[10]</sup>。一些 MAPK 基因是非生物逆境胁迫的正调控因子。如在拟南芥中过表达 *ZmMPK7* 和 *SpMPK3* 能够增强植物对渗透胁迫的耐受性<sup>[4,11]</sup>;在烟草中过表达 *ZmSIMK1* 能够增强植物对于干旱胁迫的耐受性<sup>[12]</sup>;在烟草中过表达 *GhMPK2* 能够增强植物对于干旱和高盐胁迫的耐受性<sup>[13]</sup>。然而,也有证据表明,MAPK 家族基因是非生物逆境胁迫的负调控因子。如在烟草中过表达 *GhMPK6a* 能够降低植物对渗透胁迫的耐受性<sup>[14]</sup>;在拟南芥中过表达 *GhMPK16* 能够降低植物对于干旱胁迫的耐受性<sup>[15]</sup>。所以,不同 MAPK 家族成员在植物对非生物逆境胁迫的应答过程中发挥着不同的作用,这也暗示着

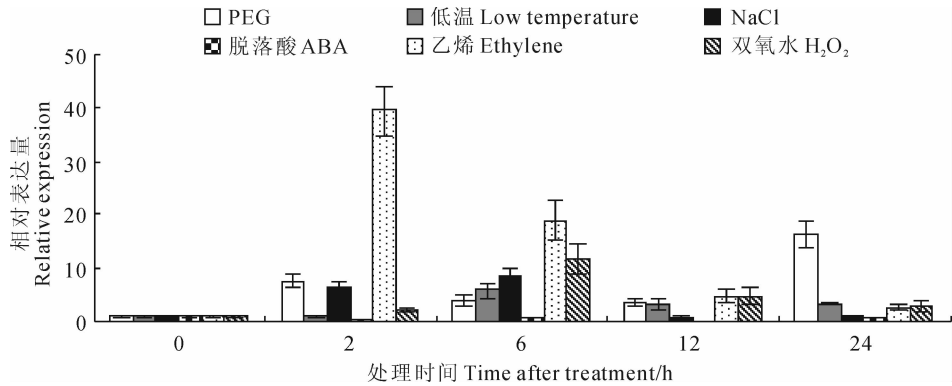


图 5 *TaMAPK2* 基因在不同处理下的表达分析

Fig. 5 Quantitative real-time PCR analysis of *TaMAPK2* gene responding to various treatments

MAPK 家族基因功能的复杂性。本研究利用实时荧光定量 PCR 分析小麦 *TaMAPK2* 基因对非生物逆境胁迫的应答的结果表明, *TaMAPK2* 的表达能够被渗透、低温和高盐胁迫诱导。这些结果暗示着 *TaMAPK2* 可能是小麦对非生物逆境胁迫应答的正调控因子。这一研究结果将为后续利用转基因的方法鉴定该基因在非生物逆境胁迫中的功能奠定了基础。

植物遭受非生物逆境胁迫后会导致相关信号分子介导的信号转导途径被激活。MAPK 家族基因能够被逆境胁迫相关的信号分子激活, 如 ABA、乙烯、双氧水、MeJA 和 SA。玉米 *ZmMPK7* 的表达

能够被 ABA 和双氧水诱导<sup>[4]</sup>。拟南芥 *MPK6* 和 *MPK13*, 苜蓿 *MMK3* 和 *SIMK* 能够被乙烯激活<sup>[16]</sup>。桑树基因组中存在 10 个 MAPK 基因, 其中 9 个都能被 ABA、SA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MeJA 诱导<sup>[10]</sup>。这些研究结果表明 MAPK 家族基因的表达广泛受逆境胁迫相关的信号分子调控。本研究利用实时荧光定量 PCR 分析小麦 *TaMAPK2* 基因对 ABA、乙烯和双氧水信号的应答的结果显示, *TaMAPK2* 的表达能够被 ABA 抑制, 被乙烯和双氧水诱导。这些结果为进一步研究 *TaMAPK2* 介导的信号转导途径奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] CHEN L, HU W, TAN S, *et al.* Genome-wide identification and analysis of MAPK and MAPKK gene families in *Brachypodium distachyon* [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e46744.
- [2] 宗晓娟. 玉米 C 组促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)基因 *ZmMPK7* 的分离及功能分析[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2009.
- [3] ICHIMURA K, MIZOGUCHI T, YOSHIDA R, *et al.* Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6 [J]. *The Plant Journal*, 2000, **24**(5): 655—665.
- [4] ZONG X J, LI D P, GU L K, *et al.* Abscisic acid and hydrogen peroxide induce a novel maize group C MAP kinase gene, *ZmMPK7*, which is responsible for the removal of reactive oxygen species [J]. *Planta*, 2009, **229**(3): 485—495.
- [5] HE C, FONG S H, YANG D, *et al.* BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, **12**(12): 1 064—1 073.
- [6] KOMIS G, APOSTOLAKOS P, GAITANAKI C, *et al.* Hyperosmotically induced accumulation of a phosphorylated p38-like MAPK involved in protoplast volume regulation of plasmolyzed wheat root cells [J]. *FEBS Letters*, 2004, **573**(1/3): 168—174.
- [7] RUDD J J, KEON J, HAMMOND-KOSACK K E. The wheat mitogen-activated protein kinases TaMPK3 and TaMPK6 are differentially regulated at multiple levels during compatible disease interactions with *Mycosphaerella graminicola* [J]. *Plant Physiology*, 2008, **147**(2): 802—815.
- [8] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method [J]. *Method*, 2001, **25**(4): 402—408.
- [9] BRENCHLEY R, SPANNAGL M, PFEIFER M, *et al.* Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing [J]. *Nature*, 2012, **491**(7426): 705—710.
- [10] WEI C, LIU X, LONG D, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of mulberry MAPK gene family [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, **77**: 108—116.
- [11] LI C, CHANG P P, GHEBREMARIAM K M, *et al.* Overexpression of tomato *SpMPK3* gene in *Arabidopsis* enhances the osmotic tolerance [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, **443**(2): 357—362.
- [12] WANG L, LIU Y, CAI G, *et al.* Ectopic expression of *ZmSIMK1* leads to improved drought tolerance and activation of systematic acquired resistance in transgenic tobacco [J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, **172**: 18—29.
- [13] ZHANG L, XI D, LI S, *et al.* A cotton group C MAP kinase gene, *GhMPK2*, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, **77**(1—2): 17—31.
- [14] LI Y, ZHANG L, WANG X, *et al.* Cotton *GhMPK6a* negatively regulates osmotic tolerance and bacterial infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*, and plays a pivotal role in development [J]. *FEBS Journal*, 2013, **280**(20): 5 128—5 144.
- [15] SHI J, ZHANG L, AN H, *et al.* *GhMPK16*, a novel stress-responsive group D MAPK gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity [J]. *BMC Molecular Biology*, 2011, **12**(1): 22.
- [16] CHANG C. Ethylene signaling, the MAPK module has finally landed [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, **8**(8): 365—368.