

大豆中介体亚基基因鉴定及表达特性分析

魏 荷<sup>1</sup>,李海朝<sup>1</sup>,练 云<sup>1</sup>,雷晨芳<sup>1</sup>,武永康<sup>1</sup>,李金英<sup>1</sup>,王丰青<sup>2</sup>

(1. 河南省农业科学院 经济作物研究所,河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 农学院,河南 郑州 450002)

**摘 要:**中介体复合物在真核生物蛋白编码基因和非编码 RNA 的转录中非常重要。为了分析大豆中介体亚基的序列特征和基因表达模式,应用 BLASTp 获取与拟南芥中介体亚基同源的蛋白序列,用 Clustal Omega、MAFFT、MEGA 等方法进行多序列联配和进化分析,同时应用 MeV 构建了基因的表达量热图。结果表明:共获得 118 个基因位点(Locus),186 个转录本,在大豆 20 条染色体上均有分布。Med8 的 N 端具有 TBP 结构域,Med31 的 C 端具有脯氨酸富集区和假定的核定位信号,Med16 的 C 端有 C2-C2 型锌指结构域(Zinc-finger motif)。栽培大豆与野生大豆的同源蛋白亲缘关系最近,进化分析符合物种进化规律。大豆不同中介体亚基基因的表达量差异很大,但同一基因在不同组织中的表达差异较小,仅有 3 个基因在根瘤中特异表达,1 个基因在豆荚中特异表达。脱水处理后 5 个中介体亚基基因表达上调明显,NaCl 处理 1 和 6 h 后分别有 2 和 3 个中介体亚基基因表达显著上调。这为进一步分析中介体亚基在大豆发育和逆境胁迫中的分子功能奠定基础。

**关键词:**大豆;中介体亚基;鉴定;序列分析;表达特性

**中图分类号:**S565. 1      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 01. 0031

Identification and Expression Profiles of Mediator Subunit Genes in Soybean

WEI He<sup>1</sup>, LI Hai-chao<sup>1</sup>, LIAN Yun<sup>1</sup>, LEI Chen-fang<sup>1</sup>, WU Yong-kang<sup>1</sup>, LI Jin-ying<sup>1</sup>, WANG Feng-qing<sup>2</sup>

(1. Institute of Industrial Crops, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Mediator complex plays important roles in transcriptional regulation of both protein-coding genes and non-coding RNA in eukaryotes. In order to analyze sequence characteristics and expression pattern of soybean mediator subunit genes, homologous of *Arabidopsis thaliana* mediator subunits were obtained from phytozome V 9.1 database by BLASTp, multiple sequence alignments and phylogenetic trees were analyzed by Clustal Omega, MAFFT, MEGA 6.0 and other software, gene expression profiles were constructed with MeV V 4.9. The results showed that a total of 186 transcripts (belongs to 118 gene loci) were obtained and distributed on all of the 20 soybean chromosomes. The N-Terminus of Med8 has a TATA-box-binding protein (TBP) domain, the C-Terminus of plant Med31 has a proline rich region and a putative nuclear localization signal (NLS), and the C-Terminus of Med16 has a C2-C2 zinc finger domain. Subunits of cultivated soybean are closer to wild soybean, which conform to evolution theory. There were great differences in the transcriptional level between different soybean mediator subunit genes in the same tissue, but less difference for the same gene expression in different tissues, expect three genes specifically expressed in root and one in pod. Five subunit genes were up-regulated after dehydration treatment, two and three genes after 1 and 6 h of NaCl treatment respectively. This will lay the foundation for further analysis of molecular functions of mediator subunits in soybean development and stress response.

**Keywords:** Soybean; Mediator subunit; Identification; Sequence analysis; Expression pattern

中介体是一种多蛋白复合物,在真核生物中与 RNA 聚合酶 II(Pol II)一起调控基因的转录。已有的研究表明,它不但参与真核生物几乎所有蛋白编码基因的转录调控,而且能够参与非编码蛋白 RNA 基因的调控<sup>[1]</sup>。中介体包含头部、中部、尾部和激酶 4 个模块(module),与转录因子(TF)和转录预起始复合物(pre-initiation complex, PIC)结合,是调控

信号从 TF 到 Pol II 传递的桥梁<sup>[2-3]</sup>。虽然早在 1988 年就在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中发现了中介体<sup>[4]</sup>,然而,直到 2007 年才在拟南芥中初次分离出了中介体复合物的各亚基<sup>[5]</sup>。作为模式植物,拟南芥的绝大多数基因均发现了突变体,为中介体复合物的功能解析奠定了基础,近年来已经发现中介体亚基广泛参与细胞增殖和器官大小、花期、胚胎分

收稿日期:2015-04-24  
基金项目:国家自然科学基金(31371652);国家高技术研究发展计划“863 计划”(2012AA101106)。  
第一作者简介:魏荷(1980-)女,博士,助理研究员,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:weihezj123@126.com。  
通讯作者:王丰青(1977-),男,博士,副教授,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:heauzyxcw@126.com。

化以及逆境胁迫<sup>[6-10]</sup>。近几年,虽然在烟草、水稻等植物也有一些关于中介体亚基克隆和功能的研究,取得一些有意义的进展,但由于缺乏相应基因的突变体材料,中介体(亚基)的调控基因表达的分子机制研究受到了很大的限制。

2010 年大豆的全基因组测序顺利完成<sup>[11]</sup>,带动大豆功能基因组学的研究迅猛发展。然而,大豆中介体亚基分离及其在大豆发育和逆境胁迫中的作用还未见报道。本研究利用生物信息学手段,对大豆基因组中全部中介体亚基基因成员进行鉴定,通过氨基酸序列分析和进化分析对其进行验证,并应用高通量的数据分析了中介体亚基基因的时空表达模式以及相应脱水和盐胁迫下的表达特性,旨在为今后中介体亚基在大豆发育和响应逆境胁迫中的分子功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 大豆中介体亚基基因序列获得

从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载已知的拟南芥中介体亚基的蛋白质序列,并以它们为 Query 序列,利用 BLASTp 在大豆全基因组数据库(<http://www.phytozome.net/soybean.php?url>)中获取同源蛋白序列。设定 Score ≥ 100, E ≤ 10<sup>-10</sup>,且比对上的序列比例大于 Query 序列的 60%。应用 NCBI 数据的在线 BLASTp 软件和 SMART 在线软件(<http://smart.embl.de/>)对获取的蛋白质序列进行验证和保守结构域预测。

1.2 大豆中介体亚基多序列联配及进化分析

氨基酸多序列联配用在线软件 Clustal Omega(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)和离线软件 Genedoc。Med8 的氨基酸序列特征分析参考 Larivière 等<sup>[12]</sup>的文献,Med31 的氨基酸序列特征分析结合 Mathur 等<sup>[13]</sup>的方法,Med16 氨基酸序列特征分析参考 Bourbon 等<sup>[14]</sup>的报道。进化分析应用在线软件 MAFFT(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>)和离线软件 MEGA 6.0<sup>[15]</sup>进行,以 Neighbor-Joining 算法进行 bootstrapping 分析,随机抽样重复次数为 1 000 次,构建系统发生树。

1.3 大豆中介体亚基基因的表达分析

通过检索大豆中介体亚基基因 ID 号,根据已经报道的大豆转录组测序数据信息<sup>[16-18]</sup>,分别获得其在大豆不同组织(器官)、豆荚和种子不同发育阶段以及脱水和盐胁迫处理后根中表达信息。应用

MeV(<http://www.tn4.org/mev.html>)<sup>[19]</sup>软件进行表达谱分析,根据表达量数据大小适当调整最小和最大的颜色值范围。构建大豆不同组织及盐和脱水胁迫处理的中介体亚基基因的表达谱时需把 RP-KM 值进行 Log<sub>2</sub>对数转换。

2 结果与分析

2.1 大豆中介体亚基基因的鉴定

以拟南芥中介体亚基氨基酸序列在 Phytozome(<http://www.phytozome.net>)上进行同源比对,结果检索到拟南芥中介体所有 31 个亚基的同源蛋白,共获得 186 个转录本,分属于 118 个基因位点(Locus),在大豆 20 条染色体上均有分布(表 1)。除了 Med6 和 Med23 只检索到 1 个基因位点外,其余 29 个亚基检索到至少 2 个基因位点,其中 Med37 更是多达 34 个同源的基因位点。功能注释结果表明, Glyma08g39660 等 34 个基因位点(分属于 14 个亚基)注释为中介体亚基, Glyma06g15430 等 4 个基因位点(Med26)注释为具有转录调控功能基因。 Glyma09g34860 等 4 个位点注释为 ATP 依赖的 DNA 螺旋酶, Glyma14g10071 等 4 个位点注释为具有 WW domain 的 mRNA 前体剪接因子, Glyma11g36090 等 4 个位点注释为具有 tRNA 加工、rRNA 甲基转移酶活性的核仁纤维蛋白, Glyma19g35560 等 34 个位点注释为具有 ATP 绑定活性的 Hsp70 蛋白。

2.2 大豆中介体亚基的序列分析

为了分析中介体亚基氨基酸序列特征,分别选取中介体头部模块的亚基 Med8、中部模块的亚基 Med31 和尾部模块的亚基 Med16 为研究对象,在 NCBI 上检索酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、人(*Homo sapiens*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的同源蛋白。应用 Clustal Omega 在线软件分别对 3 个中介体亚基的同源蛋白进行多序列联配,结果表明,大豆 3 个中介体亚基在不同物种中保守程度较高,特别是与拟南芥同源蛋白的序列一致性很高(图 1)。Med8 的联配结果表明,大豆 Glyma13g45020 和 Glyma12g31400 均具有与酵母 ScMed8(注册号: P38304.3)和人 HsMed8(Q96G25.2)类似的 TBP 结构域(图 1A)。不同物种 Med31 在 N 端高度保守,大豆 Glyma20g28990、Glyma10g38750 和拟南芥 AtMed31(NP\_197491.2)在 C 端具有酵母 ScMed31(P38633.1)和人 HsMed31(NP\_057144.1)没有的脯氨酸富集区和假定的核定位信号(NLS)(图 1B)。

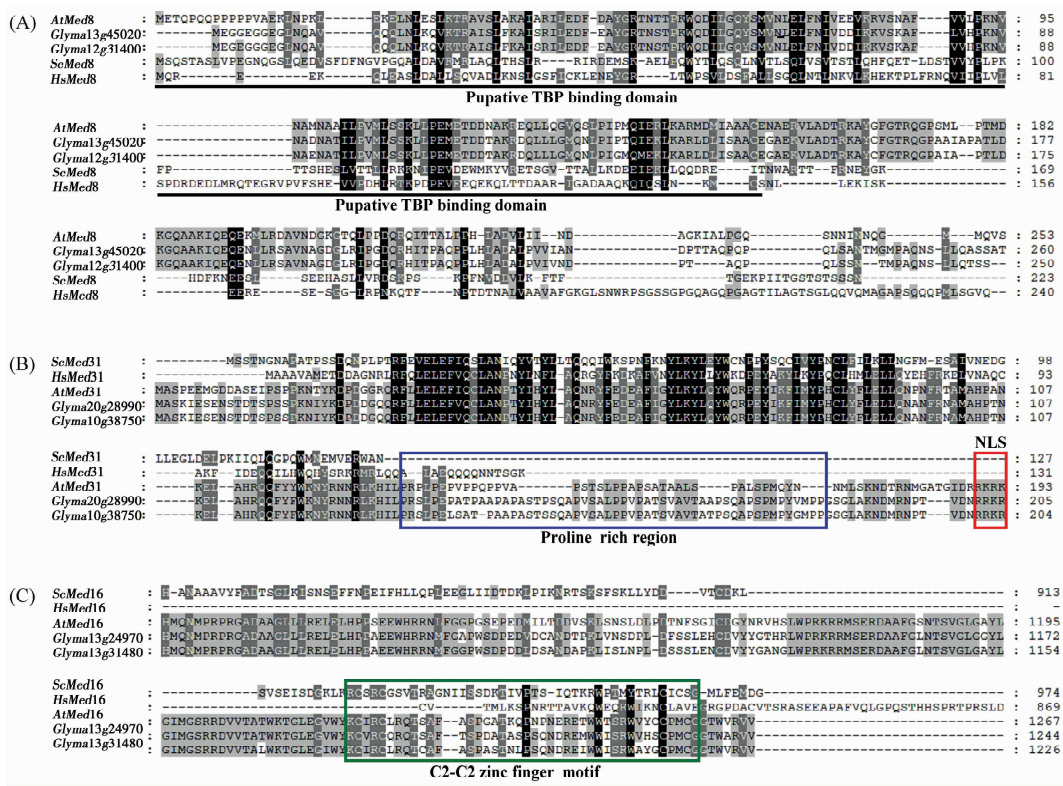
不同物种 Med16 的 C 端均有 1 个锌指结构域(Zinc-finger motif),其中 *ScMed31* (CAA96140.1)、*AtMed31* (NP\_001190676.1) 和大豆 *Glyma13g24970*、*Glyma13g31480* 均具有典型的 C2-C2 型锌指结构域

(图 1C)。大豆 *Med8* 和 *Med16* 的基因虽然没有功能注释,但其氨基酸序列却具有典型的中介体亚基保守结构域,说明鉴定的基因为大豆中介体亚基基因。

表 1 根据基因组 *Glycine max* v 1.1 鉴定出的大豆中介体亚基基因

Table 1 The subunit genes of mediator identified from soybean genome database *Glycine max* v 1.1

基因 Gene name	中介体模块 Mediator Module	转录本数 No. of transcript	基因位点数 No. of locus	染色体 Chromosome	功能注释 Functional annotations
<i>Med4</i>	Middle	3	3	6,8,13	Vitamin-D-receptor interacting Mediator subunit 4
<i>Med6</i>	Head	1	1	8	MED6 mediator sub complex component
<i>Med7</i>	Middle	3	2	7,8	MED7 protein /Transcriptional coactivator
<i>Med8</i>	Head	4	2	12,13	
<i>Med9</i>	Middle	4	2	7,8	
<i>Med10</i>	Middle	4	2	8,18	Subunit 10 of Mediator complex
<i>Med11</i>	Head	5	2	3,19	Mediator complex protein
<i>Med12</i>	Kinase	9	4	3,7,9,18	Transcription mediator complex subunit Med12
<i>Med13</i>	Kinase	2	2	11,18	
<i>Med14</i>	Tail	2	2	3,19	Mediator complex subunit MED14
<i>Med15</i>	Tail	6	4	7,8,13,15	
<i>Med16</i>	Tail	2	2	13	
<i>Med17</i>	Head	5	3	5,14,17	Subunit 17 of Mediator complex
<i>Med18</i>	Head	9	3	9,15,18	Uncharacterized conserved protein
<i>Med19</i>	Head	18	6	4,5,6,7,8,16	
<i>Med20</i>	Head	3	2	13,17	Subunit 20 of Mediator complex
<i>Med21</i>	Middle	2	2	10,20	Subunit 21 of Mediator complex
<i>Med22</i>	Head	2	2	8,15	Subunit 22 of Mediator complex
<i>Med23</i>	Tail	2	1	9	
<i>Med25</i>	Unknown	11	5	1,2,20	Mediator complex subunit 25
<i>Med26</i>	Unknown	9	4	4,5,6,8	Transcription regulator activity/TEF-related
<i>Med3/27</i>	Tail	4	2	3,9	Mediator complex subunit 27
<i>Med28</i>	Head	2	2	5,8	
<i>Med30</i>	Head	2	2	4,6	
<i>Med31</i>	Middle	3	2	10,20	Transcriptional regulator SOH1/Med31
<i>Med2/29/32</i>	Tail	3	2	4,9	Uncharacterized
<i>Med5/24/33</i>	Tail	6	6	3,5,13,15,18,19	
<i>Med34</i>	Unknown	5	4	8,9,10,12	ATP-dependent DNA helicase
<i>Med35</i>	Unknown	8	4	10,14,17,20	Pre-mRNA-processing factor 40
<i>Med36</i>	Unknown	4	4	4,6,11,18	Fibrillarin and related nucleolar RNA-binding proteins
<i>Med37</i>	Unknown	43	34	1,2,3,5,7,8,11,12,13,15,16,17,18	HSP70 superfamily protein



划线部分为保守 TBP 绑定结构域,蓝色框内为脯氨酸富集区,红色框为潜在的核定位信号 (NLS),绿色框为 C2-C2 锌指结构域。Sc:酵母;Hs:人;At:拟南芥。

The putative TBP binding domain underlined; The proline rich region is marked in blue box; A potential nuclear localizing signal (NLS) marked in red box; The C2-C2 zinc-finger motif marked in green box. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Hs: *Homo sapiens*; At: *Arabidopsis thaliana*.

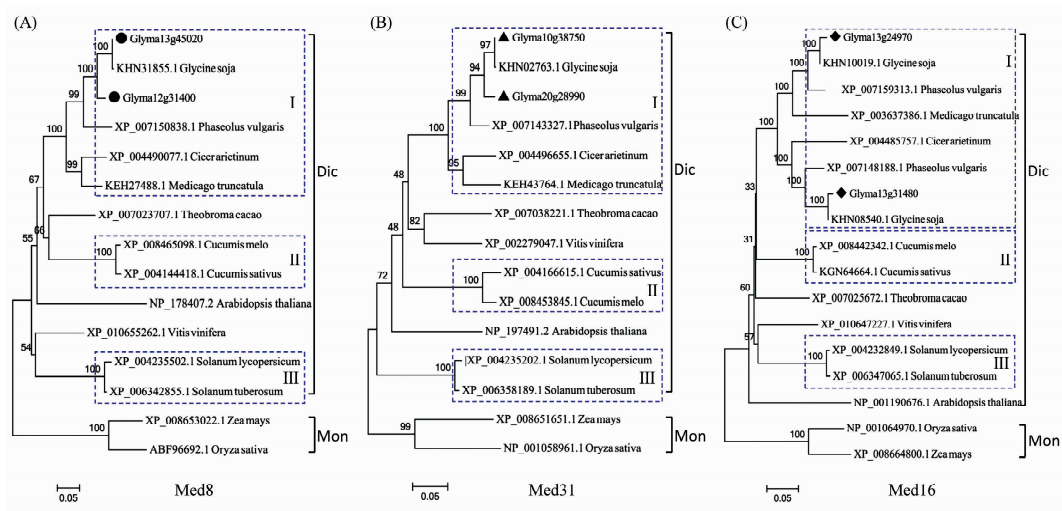
图1 大豆中介体亚基 Med8 (A)、Med31 (B) 和 Med16 (C) 与酵母、人和拟南芥同源蛋白的多序列联配  
Fig. 1 Amino acid alignments of Med8 (A), Med31 (B) and Med16 (C) sequences among soybean, yeast, human and *Arabidopsis* Mediator

2.3 大豆中介体亚基的进化分析

同样选取中介体亚基 Med8、Med31 和 Med16 为研究对象,以大豆基因编码的氨基酸序列为查询序列(query sequence),在 NCBI 上进行同源搜索,分别获得 13、13 和 15 个同源蛋白,分属 13 个植物物种。分别对 14 个物种中介体亚基 Med8、Med31 和 Med16 的同源蛋白进行多序列联配,然后用 MEGA 6.0 软件<sup>[15]</sup>构建系统发生树,结果表明:3 个中介体亚基同源蛋白能够明显分为双子叶植物(Dic, Dicots)和单子叶植物(Mon, Monocots) 2 个类群,单子叶植物玉米(*Zea mays*)和水稻(*Oryza sativa*)在 3 个中介体亚基的进化树中始终处在同一个分支。3 个进化树中,同一个中介体亚基的 2 个同源蛋白中,至

少有 1 个与野生大豆(*G. soja*)的同源蛋白亲缘关系最近,同源性也最高。而且,大豆中介体亚基与其它豆科(*Leguminosae*)植物菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的同源蛋白均属于同一个小的类群 I。另外,黄瓜(*Cucumis sativus*)与香瓜(*C. melo*)均属于葫芦科(*Cucurbitaceae*)植物,番茄(*Solanum lycopersicum*)和马铃薯(*S. tuberosum*)均属于茄科(*Solanaceae*)植物,在 3 个进化树中其同源蛋白也分别同属于小类群 II 和 III(图 2)。可以看出,以中介体亚基同源蛋白氨基酸序列构建的系统进化树其进化关系符合物种的进化规律,亲缘关系较近的物种其中介体亚基氨基酸序列一致性较高。





在每个节点的数字为以 bootstrap 方法对进化树进行验证重复 1 000 次该节点存在的百分数。Dic: 双子叶植物; Mon: 单子叶植物。

Bootstrap values (shown at the corresponding nodes) were obtained from 1 000 replicates and reported as percentages. Dic; Dicots; Mon; Monocots.

图 2 以 MEGA 6.0 软件构建的大豆中介体亚基 Med8 (A)、Med31 (B) 和 Med16 (C) 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Mediator subunits Med8 (A), Med31 (B) and Med16 (C) in soybean using MEGA 6.0 software

2.4 中介体亚基基因的时空表达特性

拟南芥、水稻和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中介体亚基基因均存在差异表达现象<sup>[20-22]</sup>。为了分析大豆中介体亚基基因的时空表达模式,根据 Libault 等<sup>[16]</sup>报道的大豆转录组测序数据信息,获得 95 个大豆中介体亚基基因(位点)在根瘤、茎顶端分生组织、花、绿色豆荚、叶片、根和根尖中的表达量数据。MeV 4.0 的表达谱分析结果表明,在相同的大豆组织(器官)中 95 个中介体亚基的表达量差异很大,其标准化的 reads 数相差达几千倍(图 3A)。Med2/29/32、Med4、Med7、Med9、Med11、Med17、Med18、Med19、Med21、Med22、Med27、Med31、Med34 这 13 个基因在各个组织中表达量均较弱,Med6、Med14、Med15、Med16、Med23、Med25、Med35、Med36 这 8 个基因在各组织中表达均较强,其它 9 个基因不同转录本的表达量差异较大。同一基因在不同组织中的表达量虽然也有差异,但多数基因均在一个相对较小的范围内波动。仅有少数基因表现组织特异性表达,Med26 的 3 个同源基因 (*Glyma13g21350*、*Glyma10g07460* 和 *Glyma19g37410*) 和 Med37 的 2 个同源基因 (*Glyma02g36700* 和 *Glyma01g44910*) 在根瘤中特异表达, *Glyma08g39660* (Med4) 在豆荚中特异表达, *Glyma13g16910* (Med20) 和 *Glyma18g45100* (Med5/24/33) 在 SAM 和根尖中表达较强。

根据 Severin 等<sup>[17]</sup>的报道获得 95 个中介体亚

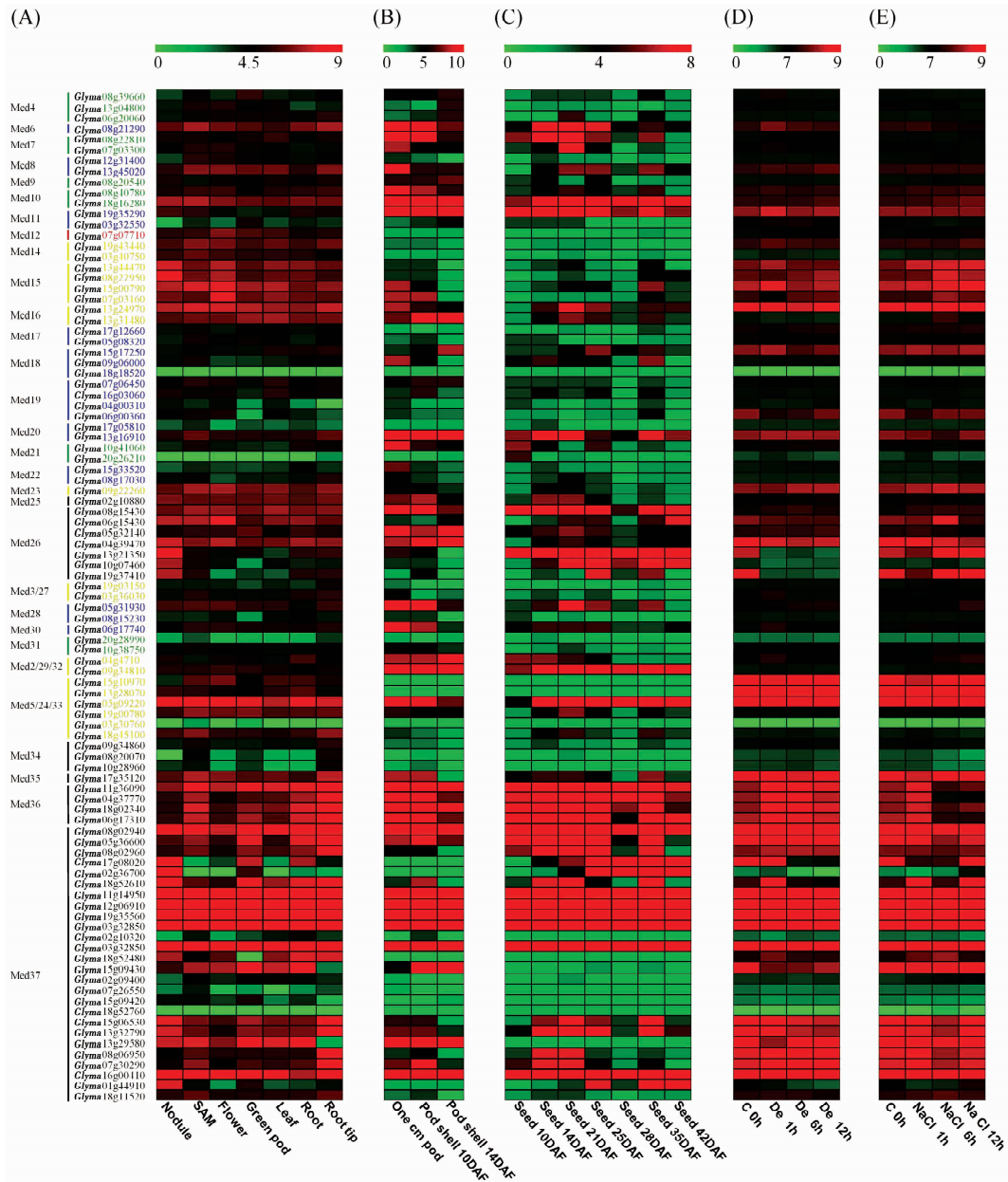
基基因在豆荚和籽粒不同发育时期的表达量数据。MeV 4.0 的表达谱分析结果表明,随着豆荚的发育绝大多数基因表达量呈降低的趋势,只有 Med4 的 3 个同源基因 *Glyma08g39660*、*Glyma13g04800*、*Glyma06g20060*, *Glyma13g31480* (Med16)、*Glyma15g17250* (Med18) 和 *Glyma15g09430* (Med37) 等少数几个基因在花后 14 d 的豆荚中表达较强(图 3B)。随着种子的发育 *Glyma04g14710* (Med2/29/32) 的表达量逐渐降低, *Glyma17g08020* 和 *Glyma02g36700* (Med37) 的表达量逐渐增强;部分基因如 *Glyma08g21290* (Med6) 等在种子发育的中期表达量较强,其它基因的表达量在种子发育的各个阶段变化不显著(图 3C)。

2.5 中介体亚基基因在脱水和盐胁迫下的表达特性

根据 Belamkar 等<sup>[18]</sup>的大豆转录组信息获得 95 个中介体亚基基因在豆荚和籽粒不同发育时期的表达量数据, MeV 4.0 的表达谱分析结果表明, Med26 的 2 个同源基因 *Glyma13g21350* 和 *Glyma19g37410* 在脱水处理后各检测时段均非常严重的下调, Med36 的 4 个同源基因 *Glyma11g36090*、*Glyma04g37770*、*Glyma18g02340*、*Glyma06g17310* 和 Med37 的 1 个同源基因 *Glyma18g52610* 在脱水处理后 1 h 上调明显,其它基因在脱水处理后的表达量差异均较小(图 3D)。 *Glyma20g26210* (Med21) 和 *Glyma18g52610* (Med37) 在 NaCl 处理 1 h 后显著上

调, *Glyma13g31480* (*Med16*) 和 *Glyma13g21350* (*Med26*)、*Glyma19g37410*(*Med26*) 在 NaCl 处理 6 h 后显著上调, *Glyma01g44910*(*Med37*) 在 NaCl 处理

1,6 h 后均显著下调,其它基因在 NaCl 处理后的表达量差异较小(图 3E)。



图中红色代表表达量高,绿色代表表达量低;基因表达量热图由 MeV 4.9 软件构建;SAM:茎顶端分生组织;C 0h:对照;De:脱水。

Red indicates higher, while green represents lower expression. The heat maps were generated by MeV 4.9 software. SAM: Shoot apical meristem; C 0h: Control; De: Dehydration.

图3 大豆中介体亚基基因在不同组织(A)、不同发育时期的豆荚(B)、不同发育时期籽粒(C)、脱水(D)和NaCl(E)处理后的根的表达谱热图

Fig. 3 Heat map view of Mediator subunit genes in different tissues (A), pots (B) and seeds (C) at different stages, tuberous roots after dehydration (D) and NaCl (E) treatment.

3 讨论

中介体复合物广泛存在于真核生物中,从进化初级的真菌酵母到进化高级的哺乳动物和高等植物,均含有数目不等的中介体亚基,如酵母、人和拟南芥中分别分离出 25,33 和 32 个中介体亚基<sup>[13]</sup>。

更多的中介体亚基是通过生物信息分析鉴定出来的,而且鉴定的中介体亚基较实验分离出的要多,如在拟南芥中共鉴定出 52 个中介体亚基。而且不同的真核生物含有的中介体亚基种类也略有差异,如在植物中没有真菌和哺乳动物中 Med1<sup>[13]</sup>。本研究通过同源比对的方式,在大豆基因组中共获得

186 个转录本, 分属 118 个基因 (locus), 数量是拟南芥的 2 倍多, 估计与大豆是由古四倍体演变而来的有关。除了 *Med6* 和 *Med23* 只检索到 1 个基因, 其余 29 个亚基检索到至少 2 个基因, 其中 *Med37* 更是多达 34 个同源的基因位点, 这与其它所有植物物种中鉴定出的 *Med37* 均为多拷贝基因的结果是一致的<sup>[6]</sup>。本研究发现, 即使在同一个基因位点也存在应剪接方式不同而导致不同的转录本, 进一步表明大豆基因的转录调控可能比较复杂。

中介体复合物包括头部模块、中部模块和尾部模块 3 个核心模块, 还有 1 个可分离的激酶模块<sup>[23-24]</sup>。头部和中间模块主要与 Pol II 的 C 端相连, 而尾部模块的功能主要是与转录因子互作绑定到启动子的调控序列<sup>[3]</sup>。中介体复合物在真核生物中的保守性不但体现在亚基组成上, 而且体现在亚基的结构上, 进而体现在调控真核基因表达调控的分子机制上<sup>[25]</sup>。本研究分别选取 *Med8*、*Med31* 和 *Med16* 进行多序列联配, 结果表明这 3 个中介体亚基在酵母、人和拟南芥的同源蛋白序列保守程度较高, 特别是拟南芥中介体亚基。在功能结构域上, 3 个中介体亚基均高度保守, *Med8* 具有 TBP 结构域, *Med16* 的 C 端具有 C2-C2 型锌指结构域, 植物 *Med31* 的 C 端具有脯氨酸富集区和假定的核定位信号序列。中介体亚基蛋白序列在植物不同物种的进化分析进一步表明中介体亚基序列保守程度与物种进化关系一致, 说明中介体亚基在不同的植物中调控基因转录的分子功能可能一致或类似。

虽然中介体和 Pol II 结合广泛参与真核基因的转录调控, 但亚基基因的表达水平却呈现时空差异<sup>[13,20,22]</sup>。芯片分析结果表明, 96.2% 的水稻中介体亚基基因和 97.7% 拟南芥中介体亚基基因至少在 1 个组织 (发育阶段) 中表现差异表达, *OsMed37-1*、*OsMed37-6* 在各阶段的发育种子中表达较高 (>2 倍), 而 *AtMed36-1* 则在种子中表达较低<sup>[13]</sup>。*OsMed12* 仅在发育中期的种子中有强的表达, *OsMed11* 在花序发育的各阶段均有较强表达, 其它多数基因呈组成型表达<sup>[21]</sup>。荧光定量 PCR 结果显示, 超过一半的拟南芥中介体亚基基因在 7 个检测的组织中表达水平差异较小, 仅有 *AtMed36*、*AtMed9*、*AtMed15* 和 *AtMed23* 等少数基因呈组织特异表达<sup>[22]</sup>。本研究发现大豆不同中介体亚基基因的表达量差异很大, 但同一基因在不同组织中的表达差异较小, 仅有 *Med26* 的 3 个同源基因和 *Med37* 的 2 个同源基因在根瘤中特异表达, *Glyma08g39660* (*Med4*) 在豆荚中特异表达。不难看出, 编码相同中介体亚基的同源基因在不同物种的组织表达模式并不一致, 这可能与物种的发育模式和生长环境差异较大有关。

中介体亚基在植物响应逆境胁迫中也发挥着

非常重要的作用。在干旱、低温和盐 3 种胁迫下, 拟南芥和水稻中分别有 4 和 29 个基因至少在 1 种胁迫下差异表达, 其中 *OsMed37-1*、*OsMed37-3* 和 *OsMed37-6* 在盐和干旱处理下显著上调<sup>[13]</sup>。经过水杨酸 (SA)、茉莉酸 (JA) 处理和接种白叶枯菌的水稻植株 *OsMed7* 均显著下调<sup>[26]</sup>。本研究发现在脱水处理后 1 h *Med36* 的所有 4 个同源基因和 *Med37* 的 1 个同源基因 *Glyma18g52610* 均上调明显, 盐胁迫 1 和 6 h 后分别有 2 和 3 个中介体亚基基因显著上调, 这为研究大豆响应逆境胁迫的分子调控机制奠定了基础。

参考文献

[1] Poss Z C, Ebmeier C C, Taatjes D J. The mediator complex and transcription regulation[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 48(6): 575-608.

[2] Kim Y J, Björklund S, Li Y, et al. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II[J]. Cell, 1994, 77(4): 599-608.

[3] Malik S, Roeder R G. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2005, 30(5): 256-263.

[4] Gill G, Ptashne M. Negative effect of the transcriptional activator GAL 4[J]. Nature, 1988, 334(6184): 721-724.

[5] Bäckström S, Elfving N, Nilsson R, et al. Purification of a plant mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit[J]. Molecular Cell, 2007, 26(5): 717-729.

[6] 王丰青, 吴为人, 张重义, 等. 水稻中介体亚基的表达谱分析及亚细胞定位[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(5): 463-472. (Wang F Q, Wu W R, Zhang Z Y, et al. Expression profiling and subcellular location of mediator subunits in rice[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(5): 463-472.)

[7] Zheng Z, Guan H, Leal F, et al. Mediator subunit18 controls flowering time and floral organ identity in *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(1): e53924.

[8] Hemsley P A, Hurst C H, Kaliyadasa E, et al. The *Arabidopsis* Mediator complex subunits MED16, MED14, and MED2 regulate Mediator and RNA polymerase II recruitment to CBF-responsive cold-regulated genes[J]. Plant Cell, 2014, 26(1): 465-484.

[9] Gillmor C S, Silva-Ortega C O, Willmann M R, et al. The *Arabidopsis* Mediator CDK8 module genes *CCT* (*MED12*) and *GCT* (*MED13*) are global regulators of developmental phase transitions [J]. Development, 2014, 141(23): 4580-4589.

[10] Zhu Y, Schluttenhoffer C M, Wang P, et al. CYCLIN-DEPENDENT KINASE8 differentially regulates plant immunity to fungal pathogens through kinase-dependent and-independent functions in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2014, 26(10): 4149-4170.

[11] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463(7278): 178-183.

[12] Larivière L, Geiger S, Hoepfner S, et al. Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8-Med18-Med20 [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2006, 13(10): 895-901.

[13] Mathur S, Vyas S, Kapoor S, et al. The mediator complex in plants: Structure, phylogeny, and expression profiling of repre-

- sentative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (rice) during reproduction and abiotic stress[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 1609-1627.
- [14] Bourbon H M. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(12): 3993-4008.
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] Libault M, Farmer A, Joshi T, et al. An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants [J]. *Plant Journal*, 2010, 63(1): 86-99.
- [17] Severin A J, Woody J L, Bolon Y T, et al. RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: A guide to the soybean transcriptome [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 160.
- [18] Belamkar V, Weeks N T, Bharti A K, et al. Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 950.
- [19] Saeed A I, Sharov V, White J, et al. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis [J]. *Biotechniques*, 2003, 34(2): 374-378.
- [20] Wang F, Wei H, Tong Z, et al. Knockdown of *NtMed8*, a *Med8*-like gene, causes abnormal development of vegetative and floral organs in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(11): 2117-2129.
- [21] 王丰青, 田云鹤, 魏荷, 等. 植物中介体的组成及功能和表达特性研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2012, 32(10): 2124-2132. (Wang F Q, Tian Y H, Wei H, et al. Mediator complex in plant: Component, function and expression profile [J]. *Acta Botanica Boreali-Occident Sinica*, 2012, 32(10): 2124-2132.)
- [22] Pasrija R, Thakur J K. Tissue specific expression profile of Mediator genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(5): e23983.
- [23] Guglielmi B, Van berkum N L, Klapholz B, et al. A high resolution protein interaction map of the yeast mediator complex [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(18): 5379-5391.
- [24] Takagi Y, Calero G, Komori H, et al. Head module control of mediator interactions [J]. *Molecular Cell*, 2006, 23(3): 355-364.
- [25] Cai G, Imasaki T, Takagi Y, et al. Mediator structural conservation and implications for the regulation mechanism [J]. *Structure*, 2009, 17(4): 559-567.
- [26] 向鹏, 龙承波, 罗红丽. 水稻 *OsMED7* 基因的克隆及表达分析 [J]. *作物杂志*, 2013(3): 21-24. (Xiang P, Long C B, Luo H L. Cloning and expression of *OsMED7* from rice [J]. *Crops*, 2013(3): 21-24.)

## (上接第 30 页)

- [5] Ghonlam C, Foursy A, Fares K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2002, 47(1): 39-50.
- [6] Santa A, Acosta M, Rus A. Short term salt tolerance mechanisms in differentially salt tolerant tomato species [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37(1): 65-71.
- [7] Aida H S, Radhia G B, Amira B. Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants [J]. *Plant Science*, 2005, 169(4): 746-752.
- [8] Bartels D, Phillips J. Drought stress tolerance [J]. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 2010, 64(2): 139-157.
- [9] Daniels M J. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homology of the tonoplast water channel protein TIP [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106: 1325-1333.
- [10] Peng Z, Lu Q, Verma D P S. Reciprocal regulation of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls levels during and after osmotic stress in plants [J]. *Molecular and General Genetics*, 1996, 253: 334-341.
- [11] Hayashi F, Ichino T, Osanai M & Waa K. Oscillation and regulation of proline content by *P5CS* and *ProDH* gene expressions in the light/dark cycles in the *Arabidopsis thaliana* L [J]. *Plant Cell Physiology*, 2000, 41: 1096-1111.
- [12] Yoshihara Y, Kiyosue T, Katagiri T, et al. Correlation between the induction of a gene for pyrroline-5-carboxylate synthetase and accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress [J]. *Plant Journal*, 1995(7): 751-760.
- [13] Ahmad I, Hellebust J A. The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae [J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(2): 328.
- [14] Forlani G, Scainelli D, Nielsen E.  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultured cells of potato [J]. *Plant Physiology*, 1997, 113: 1413-1418.
- [15] Hu C A, Delauney A J, Verma D P S. A bifunctional enzyme ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 1992, 89: 9354-9358.
- [16] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3: 217-223.
- [17] 陈吉宝, 赵丽英, 毛新国, 等. 转 *PvP5CS1* 基因拟南芥植株对干旱和盐胁迫的反应 [J]. *作物学报*, 2010, 36(1): 147-153. (Chen J B, Zhao L Y, Mao X G, et al. Response of *PvP5CS1* transgenic *Arabidopsis* plants to drought and salt stress [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(1): 147-153.)
- [18] Strizhov N, Abraham Z, Okrészl, et al. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 1997, 12(3): 557-569.
- [19] Szekely G, Abraham E, Cseplo A, et al. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis [J]. *Plant Journal*, 2008, 53(1): 11-28.