

• 药材与资源 •

地黄中介体亚基基因 RgMed6 的分离与表达特性

王丰青¹, 谢彩侠², 李明杰³, 李焯桢¹, 张红瑞¹, 杜家方¹, 张重义^{1,3*}

1. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

2. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450046

3. 福建农林大学 中药材 GAP 研究所, 福建 福州 350002

摘要: 目的 克隆地黄中介体亚基基因 RgMed6, 分析其编码的蛋白序列特征和基因表达特性。方法 利用地黄转录组数据库进行同源比对, 获得拟南芥 Med6 的同源基因片段, 通过序列拼接获得 RgMed6 的全长开放阅读框 (ORF), 在 NCBI 上进行 BLASTp 获得 RgMed6 的同源蛋白, 用 MAFFT 进行多序列联配, 应用 MEGA 6.0 构建系统进化树, 以实时荧光定量 PCR 技术检测 RgMed6 在地黄不同组织以及逆境胁迫下的相对表达量。结果 获得 1 条 924 bp 的 cDNA 序列, 包含 1 个 771 bp 的完整 ORF, 编码 256 个氨基酸, 具有 Med6 蛋白的典型结构域和 1 个潜在的核定位信号序列。RgMed6 在检测的 5 个地黄组织 (器官) 中均有表达, 其中在地黄叶片里表达强度最大, 其次为花蕾, 在茎中表达量最低。在连作地黄块根中 RgMed6 的表达量降低, NaCl 胁迫处理下 RgMed6 的表达量升高。结论 首次克隆了地黄中介体亚基基因 RgMed6, 为阐明其在地黄生长发育和逆境胁迫中的分子功能奠定基础。

关键词: 地黄; 中介体亚基; RgMed6; 克隆; 表达分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)19-2919-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.017

Isolation and expression analysis of RgMed6 from *Rehmannia glutinosa*

WANG Feng-qing¹, XIE Cai-xia², LI Ming-jie³, LI Xuan-zhen¹, ZHANG Hong-rui¹, DU Jia-fang¹, ZHANG Zhong-yi^{1,3}

1. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2. School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. Institute of Chinese Crude Drugs GAP, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective To clone RgMed6 gene, which coded a subunit of mediator complex, from *Rehmannia glutinosa*, and to analyze the characteristics of protein sequence and gene expression. **Methods** The transcriptional EST database of *R. glutinosa* was used to search analogs of AtMed6 gene by BLAST, the full-length open reading frame (ORF) of RgMed6 was obtained by assembling the ESTs. BLASTp, the online analysis tool of NCBI was used to get the homologous sequences of RgMed6, and MAFFT has been performed to analyze the multiple sequence alignment. Phylogenetic tree has been constructed using MEGA 6.0 software. Quantitative RT-PCR has been applied to detecting the transcription level of RgMed6 in five tissues as well as in tuberous roots or leaves under three stresses. **Results** The cDNA sequence of RgMed6 containing 924 bp was obtained. The ORF of RgMed6 was 771 bp encoding 256 amino acids, which had typical structural domains and a potential nuclear localization signal (NLS). RgMed6 showed the highest expression level in leaves, followed by buds, but very weak in stems. The transcription level of RgMed6 mRNA was reduced under continuous cropping conditions in tuberous roots while it increased under salinity stress in leaves. **Conclusion** RgMed6, a mediator subunit gene from *R. glutinosa* has been obtained for the first time, which can lay the foundation for further studies about its molecular function in development and responses to stress.

Key words: *Rehmannia glutinosa* L.; mediator subunit; RgMed6; cloning; expression analysis

中介体是一种大分子蛋白复合物, 由至少 25 个亚基组成, 是真核生物转录因子和转录起始复合物间信息传递的平台^[1]。尽管早在 1988 年, 就在酵母中发现了中介体的存在^[2]。然而, 直到 2007 年,

收稿日期: 2015-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473299, 81274022); 中国博士后科学基金项目 (2013M541977)

作者简介: 王丰青, 博士, 讲师, 研究方向为中药资源学。E-mail: heauzycxw@126.com

*通信作者 张重义, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源学和作物栽培学与耕作学。Tel: (0591)83742793 E-mail: zy Zhang@fafu.edu.cn

才首次报道从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 中分离出中介体复合物^[3]。近年来, 多个中介体亚基基因的功能缺失突变体揭示了中介体在植物发育和逆境胁迫中发挥关键的功能, 目前已经发现至少 10 个中介体亚基广泛参与控制植物器官发育、花期、胚胎发育和抗逆性^[4-5]。

地黄 *Rehmannia glutinosa* L. 为玄参科多年生草本植物, 以块根入药, 是我国常用大宗药材, 其道地产区为河南古“怀庆府”(今温县、武陟、修武、孟州等沿沁河一带), 是著名“四大怀药”之一。地黄耐盐碱、怕渍水, 而且生产上存在严重的连作障碍^[6]。研究表明, 地黄体内存在多个响应连作的基因^[7], 然而, 由于差异表达的基因实在太多, 无法有效锁定调控地黄连作的候选基因。根据真核基因的转录机制, 这些响应地黄连作的差异表达的基因转录必然有中介体亚基的参与, 那么, 从中介体亚基入手将是解析地黄连作障碍形成的分子机制的一条捷径。

近年来, 药用植物发育和活性成分生物合成的分子生物学报道越来越多。迄今为止, 从地黄中克隆的功能基因仍然偏少^[8-9]。然而, 地黄稳定遗传转化体系的建立为基因功能研究奠定了基础^[10]。因此, 鉴定和克隆地黄中介体亚基, 应用分子生物学手段研究其分子功能, 在解析地黄的生长发育和响应逆境胁迫的分子机制中具有重要意义。本研究克隆了 1 个地黄中介体亚基基因 RgMed6, 并分析了其在不同组织中以及在连作、NaCl 和渍水胁迫下的表达量, 为进一步研究其在地黄发育和逆境胁迫中的分子功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆基因和胁迫处理均选用怀地黄优良品种“温 85-5”, 经河南农业大学高致明教授鉴定为地黄 *Rehmannia glutinosa* L.。所有实验材料均种植在直径 14.5 cm、高 15.5 cm 的聚乙烯塑料盆里, 在光照培养箱 (GXZ-280C, 宁波江南仪器厂) 里生长, 温度为 (25±1) °C, 光照强度为 2 000~4 000 lx, 光照时间 14 h。

1.2 RNA 提取与反转录

每个样品取材约 50 mg, 以 Trizol 法 (TaKaRa, 大连) 提取地黄总 RNA, 提取方法参考说明书进行。反转录采用反转录试剂盒 (Invitrogen, 上海), 用于 cDNA 第一链合成需要小于 1 μg 的总 RNA, 0.5

μg 的 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 引物, 1 μL RNase 抑制剂, M-MLV 反转录酶, 终体积为 20 μL。反应条件为 37 °C 下 50 min, 之后 70 °C 下 15 min。

1.3 基因克隆

以拟南芥 AtMed6 (NM_001161161.1) cDNA 为查询序列, 在本课题组前期测定的转录组 EST 数据库中进行搜索, 应用序列分析工具 DNAMAN 和 DNASTAR 对获得的 EST 序列进行冗余序列剔除和拼接。根据 cDNA 序列设计特异引物 5'-ATGGCAACAACGCCGATGAT-3' 和 5'-TCAA-AATTCATTCTCTTGGATGG-3', 以“温 85-5”的 cDNA 为模板, 用 PrimeSTAR[®] 高保真酶 (TaKaRa, 大连) 进行 PCR 扩增, 克隆 RgMed6 的编码序列 (CDS)。

PCR 扩增体系: 5×Prime STAR[®] 缓冲液 (Mg²⁺ plus) 10 μL, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL, 正向引物 (10 μmol/L) 和反向引物 (10 μmol/L) 均为 1 μL, 模板 cDNA 0.5 μL, Prime STAR[®] HS DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.5 μL, 灭菌蒸馏水 33 μL, 共计 50 μL。反应条件: 98 °C、10 s, 58 °C、5 s, 72 °C、1 min, 30 个循环; 72 °C、10 min。

1.4 序列特征分析

以 NCBI 在线分析工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找基因开放阅读框 (ORF)。应用 NCBI 结构域在线工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析氨基酸序列保守结构域, 相似性搜索应用 NCBI 在线软件 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行。采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质二级结构分析和三维建模。核定位信号预测用在线软件 seqNLS (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>)。氨基酸多序列联配用 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), 进化树构建利用在线分析软件 MAFFT 和离线软件 MEGA 6.0^[11] 进行。

1.5 地黄的胁迫处理

1.5.1 连作 以至少 10 年未种植过地黄的土壤为头茬栽培处理, 以上年种植过地黄的土壤为连作栽培处理。在头茬和连作处理的土壤中种植地黄 (块根), 出苗后 70 d 取叶片和块根用于基因表达检测。

1.5.2 盐胁迫 以 2% NaCl 水溶液浇灌头茬土盆栽种 45 d 的无菌组培苗, 12 h 后取叶片用于基因表达分析。

1.5.3 渍水胁迫 自来水浇灌头茬土盆栽 45 d 的无菌组培苗, 水层高于土表 2 cm 左右, 连续处理 3 d 后取叶片用于基因表达分析。盐胁迫和渍水胁迫均以未处理的无菌组培苗为对照。

1.6 基因表达检测

1.6.1 时空表达模式分析 提取地黄“温 85-5”膨大基因的块根、叶片和开花结实期的花蕾、颖果和茎的总 RNA, 反转录成 cDNA 模板, 以 Rg18S 为内参基因, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测基因的表达量。

1.6.2 胁迫下表达水平检测 每个胁迫处理随机选取 3 株初展开的地黄叶片, 提取总 RNA 用于 qRT-PCR 检测。所用 PCR 仪为 BIO-RAD iQ5 (伯乐, 上海)。根据候选 RgMed6 基因 CDS 序列信息设计特异引物 5'-TTCGCTCTCTCCCCATTCTAT-3' 和 5'-TCCAGCACTTCACTCAGCATA-3' (扩增片段长度 131 bp), 以 Rg18 S 作为内参基因, 引物序列为 5'-GTTCTTAGTTGGTGGAGCGATT-3' 和 5'-CAGACCTGTTATTGCCTCAAAC-3' (扩增片段长度 155 bp)。qRT-PCR 分析试剂盒为 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 大连)。PCR 扩增体系: SYBR[®] Premix Ex Taq 12.5 μL, Forward Primer (10 μmol/L) 1 μL, Reverse Primer (10 μmol/L) 1 μL, cDNA 模板 2.0 μL, ddH₂O 8.5 μL, 共计 25 μL。反应条件: 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 RNA 完整性检测和 RgMed6 基因克隆

从 2 份组培地黄幼苗的叶片中提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明, 3 条电泳条带清晰, 28 S 较 18 S 亮度高, 5 S 较暗, 显示 RNA 完整性好 (图 1)。

在地黄转录组数据库中, 通过同源搜索、拼接和延伸, 获得 1 条包含 924 个碱基的 cDNA 序列, 检索发现其包含 1 个 771 bp 的开放编码框 (ORF), 编码 256 个氨基酸, 5' 非编码序列 (UTR) 有 92 bp, 3' UTR 有 61 bp。根据其编码区序列设计特异引物, 以地黄叶片 cDNA 为模板扩增出 1 条 771 bp 的条带 (图 1), 与预期大小一致, 测序证实序列完全正确, 命名为 RgMed6。

2.2 RgMed6 的序列特征

应用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算发现 RgMed6 蛋白的相对分子质量为 28 300,

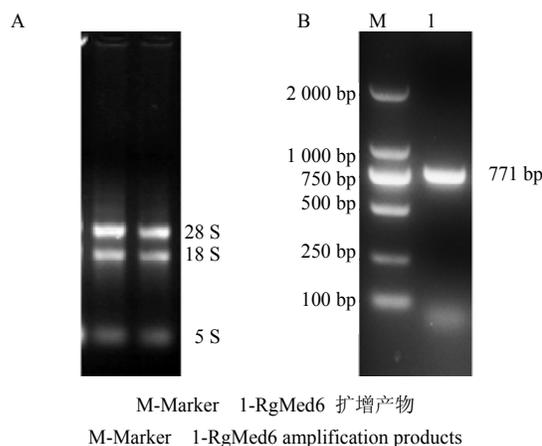
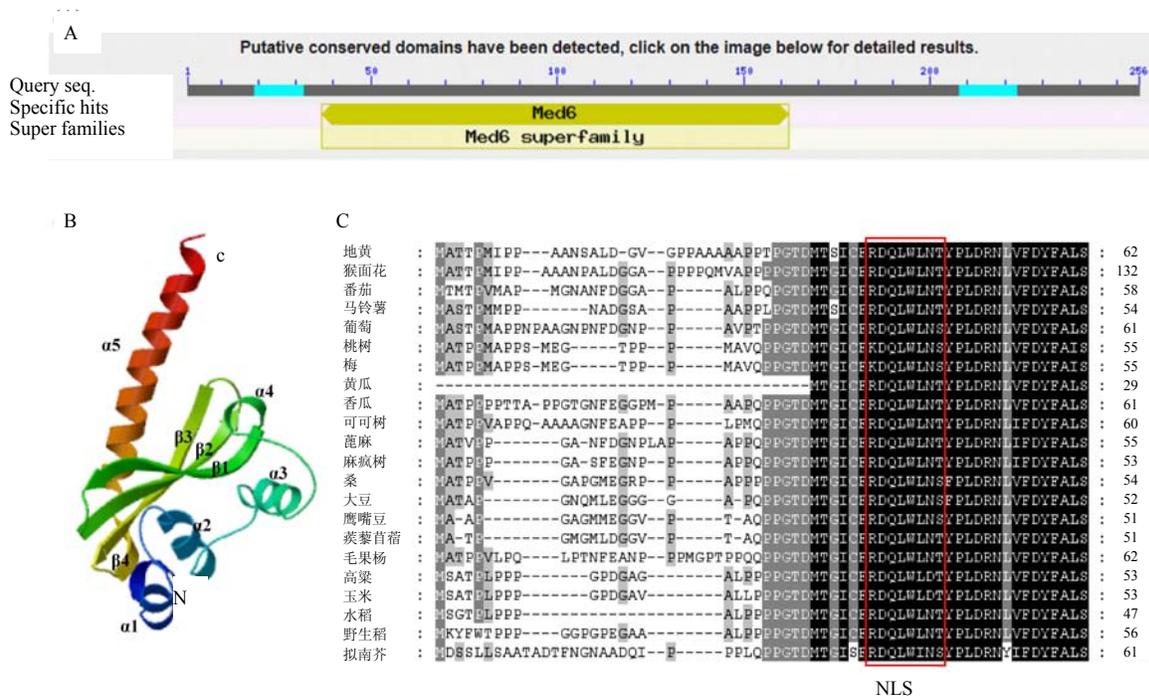


图 1 地黄总 RNA (A) 与 RgMed6 的 PCR 扩增产物 (B) 检测
Fig. 1 Detection of total RNA (A) and amplification product of RgMed6 by PCR (B)

等电点 (pI) 为 5.88。应用 NCBI 在线工具分析其保守的结构域, 发现从第 37 个氨基酸到第 162 个氨基酸含有 1 个 Med6 亚家族蛋白结构域 (图 2-A)。用 SWISS-MODEL 在线软件以裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* Med6 蛋白为模板对 RgMed6 蛋白同源建模, 结果 (图 2-B) 显示, RgMed6 蛋白空间上包含 5 个 α 螺旋和 4 个 β 折叠。利用 RgMed6 蛋白的氨基酸序列在 NCBI 上进行 BLASTP 同源搜索, 获得 21 个扩展蛋白, 分属 21 个植物物种。应用 Clustal Omega 在线软件对 22 个蛋白进行多序列联配, 结果表明, Med6 在 22 个植物物种中保守程度很高, 其氨基酸序列一致性在 72%~90%。以 seqNLS 预测发现在植物 Med6 蛋白 N 端存在 1 个假定的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) (图 2-C)。

2.3 系统进化分析

以 MAFFT 对 22 个物种的同源蛋白进行多序列联配, 然后用 MEGA 6.0 软件 (2007) 打开并以 Neighbor-Joining 算法进行 bootstrapping 分析, 构建系统发生树, 结果 (图 3) 把 22 个蛋白分为 7 个类群。地黄 RgMed6 与同为玄参科的猴面花 *Erythranthe guttata* (DC.) Nesom EgMed6 (EYU21430.1) 亲缘关系最近, 同源性也最高, 序列一致性达到 90%。番茄 *Solanum lycopersicum* L. 和马铃薯 *S. tuberosum* L. 均属于茄科 (Solanaceae) 植物, 其同源蛋白 SImed6 (XP_004252362.1) 和 StMed6 (XP_006343025.1) 同属于同一个分支, 与 RgMed6 和 EgMed6 同属于类群 I。



A-RgMed6 保守结构域预测 B-RgMed6 三级结构模型 C-RgMed6 N 端多序列联配结果和推测的核定位信号序列 N-RgMed6 蛋白 N 端 c-RgMed6 蛋白 C 端 α - α 螺旋 β - β 折叠 NLS-预测的核定位信号
 A-motif and conserved domain prediction B-ribbon Model of the RgMed6 crystal structure C-multiple alignment of RgMed6 with other plant Med6.
 N-N terminal of RgMed6 c-C terminal of RgMed6 α - α helix β - β sheet NLS-putative nuclear localization signal

图 2 RgMed6 序列分析
 Fig. 2 Sequence analysis of RgMed6

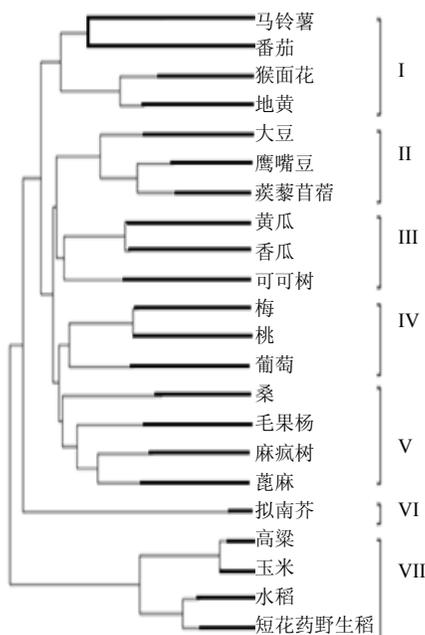


图 3 用 MEGA6.0 软件构建的 RgMed6 和不同物种同源蛋白的进化树
 Fig. 3 Phylogenetic tree of RgMed6 and its homologous proteins from other species using MEGA6.0 software

大豆 *Glycine max* (L.) Merr.、鹰嘴豆 *Cicer arietinum* L. 和蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.均为豆科 (Leguminosae) 植物, 其同源蛋白亲缘关系最近, 属于同一个类群 II。葫芦科 (Cucurbitaceae) 的黄瓜 *Cucumis sativus* L.、香瓜 *C. melo* L. 和梧桐科 (Sterculiaceae) 植物可可树 *Theobroma cacao* L. 的同源蛋白同属一个类群 III。葡萄科 (Vitaceae) 的葡萄 *Vitis vinifera* L.、蔷薇科 (Rosaceae) 的桃树 *Prunus persica* (L.) Batsch 和梅 *P. mume* Siebold & Zucc., 它们同属于蔷薇目 (Rosales), 其同源蛋白属于一个小的类群 IV。类群 V 包括大戟科 (Euphorbiaceae) 植物蓖麻 *Ricinus communis* L. 和麻疯树 *Jatropha curcas* L., 桑科 (Moraceae) 的桑 *Morus notabilis* Schneid. 和杨柳科 (Salicaceae) 的毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray 4 个物种的同源蛋白。类群 VI 只有十字花科 (Cruciferae) 的拟南芥一个物种的蛋白 AtMed6。高粱 *Sorghum bicolor* (L.) Moench、玉米 *Zea mays* L.、水稻 *Oryza sativa* L. 和野生稻 (短花药野生稻) 等 4 个物种均为禾本科植物, 其同源蛋白属

于一个类群(VII)。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。

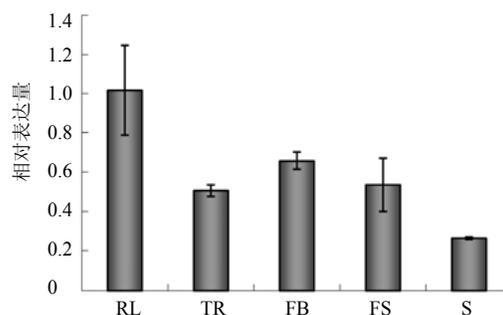
2.4 RgMed6 的时空表达模式

qRT-PCR 扩增熔解曲线显示, Rg18S 和 RgMed6 有良好的特异性, 表现为单峰, 无非特异性峰。qRT-PCR 分析结果(图 4)表明, RgMed6 在检测的 5 个地黄组织(器官)中均有表达。其中在地黄块根膨大期的叶片里表达强度最大, 其次为花蕾; 膨大期的块根和颖果中的表达量比较接近; 在茎中的表达量最低, 仅约为叶片中表达量的 1/4。

2.5 逆境胁迫下 RgMed6 的表达

为了探讨 RgMed6 在逆境胁迫下与地黄发育的关系, 以 qRT-PCR 检测了其在连作、2.0% NaCl 和渍水处理等 3 种逆境下的表达量。结果表明, 在连作条件下, 地黄叶片内 RgMed6 的表达量虽有降低, 但差异不显著, 地黄块根内表达量的降低达到了显著水平(图 5-A)。在 2.0% NaCl 水溶液中生长 12 h,

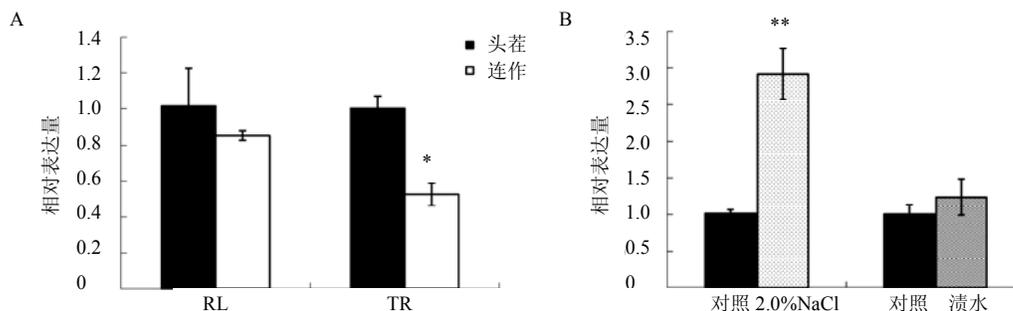
地黄叶片内 RgMed6 的表达量显著升高, 约为对照的 2.9 倍(图 5-B)。而渍水处理 3 d 后, 地黄叶片内 RgMed6 的表达量虽也略有增加, 但没有达到显著水平(图 5-B)。



RL-块根膨大期的叶片 TR-膨大期的块根 FB-花蕾 FS-颖果 S-茎, 下同
RL-rosette leaf TR-tuberous root B-flower with bract FS-fruit with sepal S-stem, same as below

图 4 RgMed6 在地黄不同组织中的表达量

Fig. 4 Expression of RgMed6 gene in different tissues of *R. glutinosa*



A-在头茬和连作下的表达量 B-在盐和渍水胁迫下叶片中的表达量 *-与头茬相比差异显著 ($P < 0.05$) **-与对照相比差异显著 ($P < 0.01$)
A-expression of RgMed6 gene in the first year crop and the second year crop plants B-expression of RgMed6 gene in leaves of *R. glutinosa* under 2.0% NaCl and waterlogging treatments, *-denotes a significant difference compared with the first year crop plants at $P < 0.05$ **-denotes a significant difference compared with the control at $P < 0.01$

图 5 逆境胁迫条件下 RgMed6 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of RgMed6 gene under different stresses

3 讨论

真核生物中介体保守程度很高^[12], 特别在植物不同物种之间中介体亚基高度保守^[4], 主要表现在亚基组成、亚基序列上。Med6 是中介体复合物中保守程度较高的一个亚基, 如水稻 OsMed6 与玉米和高粱同源蛋白的一致性均达到 83%, 与同源性最低的卷柏 *Selaginella moellendorffii* Hieron. 一致性也有 62%, 但与人 mMed6 的一致性仅 35%^[13]。本研究发现, Med6 在获得的 22 个植物物种中保守程度很高, 其氨基酸序列一致性在 72%~90%, 地黄 RgMed6 与猴面花 EgMed6 的序列一致性更是高达

90%。课题组前期的研究发现 OsMed6 与 GFP 融合蛋白的荧光只在细胞核中可以观察到, 说明 OsMed6 为核蛋白^[13]。本研究在 RgMed6 蛋白的第 40 aa 和第 47 aa 之间发现一段核定位信号序列 RDQLWLNT, 推测 RgMed6 应该也为核蛋白。这与中介体复合物作为真核生物转录起始装置的重要组成部分参与基因的转录调控的功能是一致的。

进化分析发现, 以 Med6 同源蛋白构建的系统进化树基本符合物种进化规律, 亲缘关系较近的物种, 其同源蛋白则处于同一个类群中。首先, 22 个蛋白分属于双子叶植物(类群 I~VI)和单子叶植

物 (VII) 2 个大的群组。其次, 不同单双子叶植物的同源蛋白又分为不同的小类群。如地黄 RgMed6 与同为玄参科的猴面花 EgMed6 处于同一个分支, 番茄 SlMed6 与同为茄科的马铃薯 StMed6 也处于同一分支, 玄参科与茄科均属于唇形亚纲, 同属一个类群 I。而葫芦科与梧桐科植物同属于五桠果亚纲, 黄瓜、香瓜和可可的同源蛋白属于同一个类群 III。同为稻属的水稻 OsMed6 和野生稻 ObMed6 处于同一个分支, 黍亚科 (Panicoideae) 的高粱 SbMed6 与玉米 ZmMed6 处于同一个分支, 且这 4 个物种同为禾本科植物, 同属于一个类群 VII。然而, 本研究将分属不同亚纲的植物蓖麻、麻疯树、桑和毛果杨归于一个类群, 在传统分类学上无法很好解释。但查阅文献发现, 潘宝华等^[14]对天冬酰胺合成酶蛋白进化分析也把桑、毛果杨和蓖麻聚为一类, 说明这 3 个物种具有较近的亲缘关系。

作为中介体复合物中连接头部模块与中部模块的枢纽, Med6 在酵母、线虫和果蝇中都在发育调控中发挥重要的作用^[15-17]。基因的表达模式与其编码蛋白的分子功能有一定的相关性。基因芯片数据的分析结果表明, 水稻 OsMed6 在各个组织均有表达, 但表达水平有明显差异, 在茎顶端分生组织 (SAM) 和子房里表达最强, 幼嫩叶片较成熟叶片表达强^[18]。qRT-PCR 分析发现拟南芥 AtMed6 的表达模式与水稻 OsMed6 类似, 各组织均有表达, 在 3 叶期的叶片中表达最强, 成株期叶片中表达量约为前者的 1/3, 根中的表达量与成株期叶片中相近^[19]。本研究发现, RgMed6 与 OsMed6、AtMed6 的组织表达特性比较类似, 在功能期叶片中表达较强, 块根中表达相对较弱, 推测 RgMed6 在植物发育的各个组织均发挥重要的作用, 特别是在叶片中。Pasrija 等^[20]检测了不同逆境胁迫下 AtMed6 的表达量, 结果表明, 在油菜素内酯 (BR) 和 NaCl 胁迫下表达上调, 在暗胁迫下表达下调, 在 IAA、JA、ABA、高光和冷胁迫处理下表达量无显著变化。本研究中连作的地黄块根中 RgMed6 的表达量显著下调, 在 NaCl 胁迫下叶片中的表达量显著上调, 在连作和渍水胁迫的叶片中表达量没有显著变化。可以看出, Med6 在不同植物中的时空表达模式和响应逆境胁迫的表达特性具有相似性, 显示其功能可能也具有相似性。

参考文献

- [1] Flanagan P M, Kelleher R J, Sayre M H, *et al.* A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription *in vitro* [J]. *Nature*, 1991, 350(6317): 436-438.
- [2] Gill G, Ptashne M. Negative effect of the transcriptional

- activator GAL4 [J]. *Nature*, 1988, 334(6184): 721-724.
- [3] Bäckström S, Elfving N, Nilsson R, *et al.* Purification of a plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit [J]. *Mol Cell*, 2007, 26: 717-729.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 张重义, 李明杰, 陈新建, 等. 地黄连作障碍机制的研究进展与消减策略 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(1): 38-44.
- [7] Yang Y H, Li M J, Chen X J, *et al.* *De novo* characterization of the *Rehmannia glutinosa* leaf transcriptome and analysis of gene expression associated with replanting disease [J]. *Mol Breed*, 2014, 34(3): 905-915.
- [8] 臧亚超, 孙 鹏, 杨太新, 等. 地黄扩展蛋白基因 RgExpA1 的克隆与表达分析 [J]. 生物技术通报, 2012(4): 69-73.
- [9] 周延清, 张永华, 张 喻, 等. 怀地黄 3-酮酯酰 CoA-硫解酶基因的克隆, 序列特征和时空表达分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 76-82.
- [10] 王丰青, 田云鹤, 谢彩侠, 等. 根癌农杆菌介导的怀地黄遗传转化研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2541-2546.
- [11] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [12] Cai G, Imasaki T, Takagi Y, *et al.* Mediator structural conservation and implications for the regulation mechanism [J]. *Structure*, 2009, 17(4): 559-567.
- [13] 王丰青, 魏 荷, 童治军, 等. 水稻中介体亚基 OsMed6 的表达及进化分析 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(5): 488-493.
- [14] 潘宝华, 潘 刚, 方荣俊, 等. 桑树天冬酰胺合成酶基因的克隆与表达分析 [J]. 蚕业科学, 2011, 37(1): 1-8.
- [15] Lee Y C, Kim Y J. Requirement for a functional interaction between mediator components Med6 and Srb4 in RNA polymerase II transcription [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(9): 5364-5370.
- [16] Gim B S, Park J M, Yoon J H, *et al.* *Drosophila* Med6 is required for elevated expression of a large but distinct set of developmentally regulated genes [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(15): 5242-5255.
- [17] Kwon J Y, Lee J. Biological significance of a universally conserved transcription mediator in metazoan developmental signaling pathways [J]. *Development*, 2001, 128(16): 3095-3104.
- [18] 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.
- [19] Pasrija R, Thakur J K. Tissue specific expression profile of Mediator genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2013, 8(5): e23983.
- [20] Pasrija R, Thakur J K. Analysis of differential expression of Mediator subunit genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signal Behav*, 2012, 7(12): 1676-1686.