

黑豆萌芽中抗氧化活性相关基因表达研究

来吉祥¹,何聪芬²,方云¹,赵亚³,魏少敏^{1,3}

(1. 江南大学 化学与材料工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 北京工商大学 理学院,北京 100048; 3. 上海家化联合股份有限公司,上海 200082)

摘要:采用基因芯片技术和 GO Term 分析研究了黑豆萌芽中抗氧化活性相关基因的表达,并通过 RT-PCR 进行验证。结果表明:对比 0.5 和 5.0 cm 黑豆萌芽的差异表达基因,在芽长 0.5 cm 的萌芽中发现了 10 个与抗氧化活性相关的基因显著高表达,他们属于 GO:0006979(response to oxidative stress,氧化压力响应);BE823689.1_567,GMFL01-02-F14-R_381,GMFL01-03-G22-R_364,GMFL01-14-M12-R_553,GMFL01-51-M23-R_265,AW757007.1_297,AW761420.1_260,BI788389.1_501,BQ273202.1_332,GMFL01-10-I14-F_701,这些基因主要控制合成热休克蛋白和抗氧化酶类,与细胞内的氧化代谢平衡密切相关;RT-PCR 结果与基因芯片试验结果一致,证明了基因芯片结果的准确性和可重复性。

关键词:黑豆萌芽;抗氧化;基因表达;基因芯片;实时荧光定量 PCR

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0473

Analysis of Gene Expression Related to Antioxidant Activity in Black Soybean (*Glycine max* var) Sprouts

LAI Ji-xiang¹, HE Cong-fen², FANG Yun¹, ZHAO Ya³, WEI Shao-min^{1,3}

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Science, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. Shanghai Jahwa United Co. Ltd, Shanghai 200082, China)

Abstract: The purpose of this study was to analyze the gene expression of black soybean(*Glycine max* var) sprouts with high antioxidant activity. Microarray and GO(Gene Ontology) term enrichment analysis were used to research the expressed genes, and the results were confirmed by qRT-PCR. Microarray analysis of expressed genes between sprouts(0.5 and 5.0 cm) showed that the most up-regulated genes in 0.5 cm sprouts belonged to GO:0006979(response to oxidative stress), in which ten genes were significantly highly expressed: BE823689.1_567, GMFL01-02-F14-R_381, GMFL01-03-G22-R_364, GMFL01-14-M12-R_553, GMFL01-51-M23-R_265, AW757007.1_297, AW761420.1_260, BI788389.1_501, BQ273202.1_332 and GMFL01-10-I14-F_701. Those genes mainly control the synthesis of heat shock protein and antioxidant enzymes which related to intracellular oxidation metabolic balance. The results of qRT-PCR analysis regarding up-regulated genes were consistent with those of the microarray analysis, which indicated that the results were biologically reproducible and believable.

Key words: Black soybean sprouts; Antioxidant activity; Gene expression; Microarray; Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

黑豆是豆科植物[*Glycine max* (L.) Merr.]的黑色种子,俗称黑大豆或乌豆,是我国历史悠久的药食同源作物。黑豆富含蛋白质、多糖、花青素、维生素和异黄酮等活性成分^[1-3],具有抗氧化^[4]、抗癌^[5]、预防动脉粥样硬化^[6]、养颜美容^[7]和延缓衰老^[8]等功效,其中多数功效与其抗氧化活性密切相关。前期研究发现:黑豆经过萌发后,其抗氧化活性发生显著变化,萌动期的黑豆(芽长 0.5 cm)具有最优的抗氧化活性,而萌芽中后期(芽长 5.0 cm 之后)抗氧化活性显著减弱^[9]。目前,针对黑豆抗氧化活性的研究主要集中在功效评价、成分分析和作用途径等几个方面,对抗氧化活性相关基因的研究还未见报道。

基因芯片技术是随着人类基因组计划的进展而发展起来的一项新技术^[10-11],可同时对大量基因的差异表达进行分析,对全基因组进行表达基因检测,具有高通量、快速、高敏感性、重复性好等优点,其应用已经涉及到植物学、医学和动物学等诸多研究领域^[12-13]。目前,在植物活性相关基因筛选方面的研究和应用主要集中在大米^[14]、小麦^[15]和棉花^[16]等作物,并取得了良好的效果。本研究采用基因芯片技术对不同萌芽期的黑豆萌芽(芽长 0.5 和 5.0 cm)的基因表达情况进行对比分析,研究其中与抗氧化活性相关基因的表达,并通过 RT-PCR 验证了基因芯片结果的准确性,为深入研究黑豆萌芽抗氧化的分子生物学机制提供依据。

收稿日期:2013-12-30

基金项目:国家自然科学基金(21276113);北京市教育委员会项目(KM200910011001)。

第一作者简介:来吉祥(1983-),男,博士,主要从事植物源化妆品功效添加剂研究。E-mail: laijixiang1983@163.com。

通讯作者:魏少敏(1952-),男,教授,博士生导师,主要从事精细化学品科学研究。E-mail: weishaomin@jahwa.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物材料:按照文献方法^[9]对黑豆进行萌发。取芽长为0.5和5.0 cm的豆芽黑豆,每种材料取4份,每份4粒,无菌条件下分装于离心管中,液氮速冻保存于-80℃。

供试试剂主要有 Trizol 试剂(Invitrogen 公司),低样本快速标记试剂盒(Agilent 公司),Cy3-dCTP(GE Healthcare Cat 公司)。

供试芯片类型:Agilent 公司的 *G. max* (Soybean) Oligo Microarray 4 × 44K 大豆 cDNA 芯片,探针长度为60 mer 寡聚核苷酸序列。主要仪器为 Agilent G3 共聚焦扫描仪和 RT-PCR 仪,均为 Agilent 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 黑豆萌芽总 RNA 提取 根据说明书所示方法,使用 Trizol 试剂,分别提取0.5和5.0 cm 黑豆萌芽中的总 RNA。通过甲醛琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的质量,并使用分光光度法对 RNA 进行定量,4次重复。

1.2.2 RNA 标记 采用单色标记芯片系统比较0.5和5.0 cm 黑豆萌芽中 mRNA 的表达。使用 Agilent 公司的低样本快速标记试剂盒对 RNA 进行扩增和标记,每个样品使用100 ng 总 RNA 用来合成双链 cDNA。采用体外转录,由3'端向5'端逆向转录对 RNA 进行扩增。然后将 RNA 反向转录成 cDNA,使用 KLENOW 酶与 Cy3-dCTP 标记。

1.2.3 芯片杂交与清洗 将荧光染料标记的 cDNA 杂交在 Agilent 公司的 *G. max* (Soybean) Oligo Microarray 4 × 44K 大豆 cDNA 芯片上,立即封片,放置

于 Agilent 杂交炉中,密闭,65℃ 杂交 17 h。杂交后的芯片在 Agilent 芯片平台上进行冲洗,洗去未结合的探针,然后进行荧光信号的扫描与分析。

1.2.4 芯片扫描 杂交后的芯片用特定波长的激光进行激发,芯片上的探针会发出不同波长的荧光。使用 Agilent G3 共聚焦微阵列扫描仪检测探针的荧光强度,获得试验的原始数据——杂交图像。

1.2.5 芯片数据采集 使用 Agilent Feature Extraction 软件将芯片数据从杂交图像中提取出来,即将原始杂交图像转化为基因表达谱数据。采用 Gene-spring 进行总体平均标准化处理。如果一个基因探针在4个样本中的强度都低于800,这个基因将被排除,不再作进一步分析。采用 Cluster 软件对检测到的基因进行聚类分析。

1.2.6 差异表达基因分析与注释 采用 SAM(significance analysis of microarrays) 软件筛选差异表达基因。差异倍数(fold change, FC)的阈值设置在4倍以上,q 值低于0.05。基因芯片的原始数据存入“基因表达精选集”。使用 R 语言软件包中的超几何分布对差异表达基因中的 GO (Gene Ontology) terms 作进一步分析。对差异表达4倍以上的基因进行分子功能、生物学过程和细胞组成的分析。

1.2.7 RT-PCR 验证部分基因芯片检测结果 1 μg 经 DNase 处理过的总 RNA 加入 20 μL 的总反应体系中,用 M-MLV reverse transcriptase 与 Oligo(dT)12 进行反转录。然后,取 1 μL 该混合液加入另外 20 μL 的反应体系中,体系中含有 1 × PCR 缓冲液(Mg²⁺ Plus),200 μmol·L⁻¹ 各自的 dNTP,0.5 μmol·L⁻¹ 前引物,0.5 μmol·L⁻¹ 反转录引物和 LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System 的 Eva Green Master Mix。RT-PCR 验证差异基因的引物如表1所示。

表1 RT-PCR 验证的差异基因及其引物序列

Table 1 Primer pairs for the validation of differentially expressed genes by RT-PCR

探针 Probe	基因库注册号 GenBank No.		引物(5'→3') Primer(5'→3')
BE823689.1_567	BE823689.1	F	ACTTCCCACTGCTTCTTTCAA
		R	GCCATAGCCAACACTCGC
GMFL01-02-F14-R_381	BW651605.1	F	CTGTTGGGGTTGGCATC
		R	GAAAGAGGATCTGAAGGTGCA
GMFL01-03-G22-R_364	BW652365.1	F	TTCACAGAGTAGCATCAGAATT
		R	AAGTTGGAGGTGTTGAAGCC
GMFL01-14-M12-R_553	BW658506.1	F	TTCAGCCCTGGAATATCAGC
		R	GCCGAAGGAGCACTGTTT
GMFL01-51-M23-R_265	BW684102.1	R	ATAGAAGCCAGACATGTTGAAG

续表

探针 Probe	基因库注册号 GenBank No.		引物(5'→3') Primer(5'→3')
		F	TCCAGCAAAGAGGTTTTACAA
AW757007.1_297	AW757007.1	F	TGCCACATCAATGTCGGA
		R	CGCAATCTAACCAACGCTC
AW761420.1_260	AW761420.1	F	CCTTCAAAGTATAATCCTATTGCTC
		R	CATGGGTGACTCGTGGGT
BI788389.1_501	BI788389.1	F	GCAACCGTATCTGGAAACAA
		R	ACGATCATAGCAATCTCCTCTG
BQ273202.1_332	BQ273202.1	F	AGCACTTACTAGGGAGGATTCTAC
		R	ATCGGGAACCATCTTATCACT
GMFL01-10-114-F_701	BW656400.1	F	GGCATATGGATGGTTTTGG
		R	ATGGAGGTCTTGACTGGCA

PCR 反应条件为:95℃ 延伸 4 min,1 个循环,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 45 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。 β -actin 作为参照基因,所有检测基因的表达水平显示为相对于该基因的变化倍数。数据采用 2- $\Delta\Delta C_t$ 法进行分析^[17]。

2 结果与讨论

2.1 总 RNA 提取与纯化

寡聚核苷酸微阵列芯片(oligonucleotide microarray)是基因芯片的一种,又称 Oligo 微阵列,是根据基因序列设计 Oligo 探针,通过点样机器人、或者原位合成技术把这些 Oligo 探针固定在面积微小

的固体表面,然后与来自不同细胞、组织或同一细胞不同状态下的荧光标记 cDNA 进行杂交,通过激光共聚焦荧光检测系统对芯片进行扫描,对每一探针上的荧光信号做出比较和处理。根据杂交信号的有无或强弱,来确定探针所代表的基因在不同细胞、组织或器官中的表达情况。

取芽长分别为 0.5 和 5.0 cm 的黑豆全芽,经过提取、纯化,分别获得总 RNA。对抽提的总 RNA 进行分光光度计检测(表 2),结果表明, RNA 纯度 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$,纯度较高,且没有蛋白质和 DNA 污染,可以满足基因芯片杂交的要求。

表 2 黑豆萌芽总 RNA 检测结果
Table 2 Results of total RNA detections

样品 编号 Sample No.	电泳编号 No.	浓度 Concentration/ ng· μ L ⁻¹	A ₂₆₀	A _{260/280}	溶液 Liquor	RNA/ μ g	结果 Result
1-1	1	544.6	13.62	1.98	0.1% DEPC-H ₂ O	54.46	RNA 可用
1-2	2	489.2	12.23	1.94	0.1% DEPC-H ₂ O	48.92	RNA 可用
1-3	3	708.1	17.70	2.08	0.1% DEPC-H ₂ O	70.81	RNA 可用
1-4	4	667.5	16.69	1.97	0.1% DEPC-H ₂ O	66.75	RNA 可用
2-1	5	420.5	10.51	1.91	0.1% DEPC-H ₂ O	42.05	RNA 可用
2-2	6	489.2	12.23	1.91	0.1% DEPC-H ₂ O	48.92	RNA 可用
2-3	7	396.3	9.91	1.89	0.1% DEPC-H ₂ O	39.63	RNA 可用
2-4	8	427.9	10.70	2.04	0.1% DEPC-H ₂ O	42.79	RNA 可用

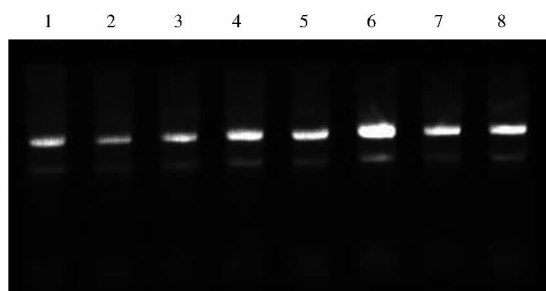
1-1,1-2,1-3 和 1-4 为 0.5 cm 黑豆萌芽样本;2-1,2-2,2-3 和 2-4 为 5.0 cm 黑豆萌芽样本。下同。

1-1,1-2,1-3 and 1-4 were 0.5 cm sprouts;2-1,2-2,2-3 and 2-4 were 5.0 cm sprouts. The same below.

总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳检测如图 1 所示,结果表明, RNA 的 26S 和 16S RNA 条带清晰,没有降解,总 RNA 质量也满足芯片试验的要求。

2.2 芯片杂交及检测质量判断

使用 Agilent G3 共聚焦微阵列扫描仪检测,获得杂交图像(图 2)。



1~4 为 0.5 cm 黑豆萌芽总 RNA;5~8 为 5.0 cm 黑豆萌芽总 RNA。

1-4 present total RNA of 0.5 cm black soybean sprouts;5-8 present total RNA of 5.0 cm black soybean sprouts.

图 1 黑豆萌芽 RNA 电泳图

Fig. 1 RNA electrophoresis map of black soybean sprouts

由图 2 可以看到:芯片扫描图像清晰,芯片杂交过程未发生污染,杂交质控标记清晰,杂交反应成功。芯片检测结果表明,芯片外标、内标等阳性对照信号正常,阴性对照检测为阴性;无影响数据的污染。检测到的看家基因重复性较好,FC 值多数在 $(-2) \sim 2$,芯片杂交结果可靠。

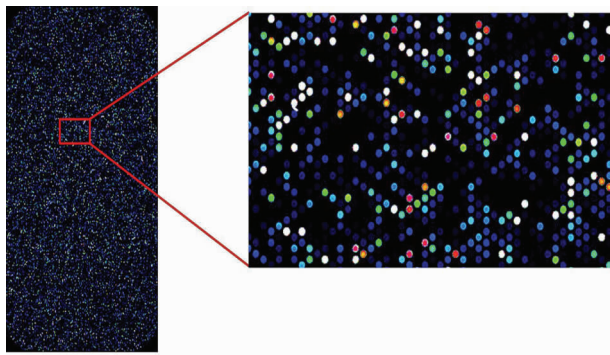


图 2 基因芯片荧光信号图

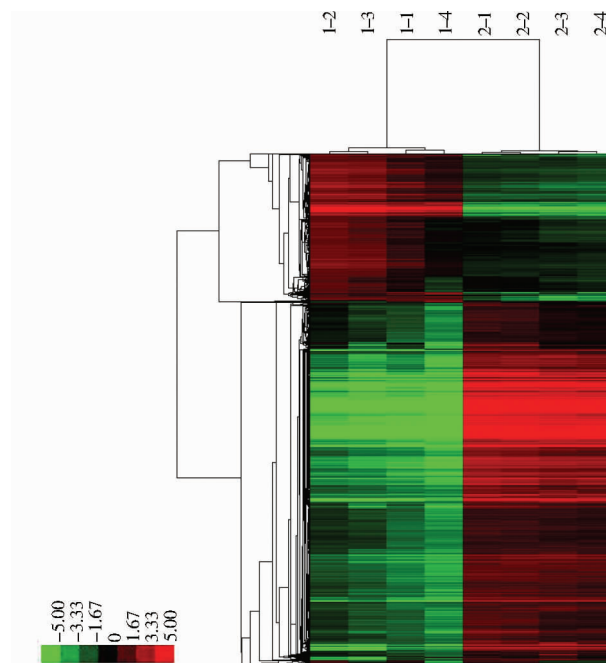
Fig. 2 The fluorescent signal of cDNA microarray

2.3 非监督聚类分析

考虑到生物细胞中,并不是所有的基因都会在一个时间点进行表达。在高等生物中,在某一个具体时间点,表达的基因最多占全部基因的 60%。为了避免那些不表达的基因影响结果,先用信号值进行了筛选,按照至少在 4 个样本中信号值大于 800 为表达有意义,共筛选出 9 993 个基因,进行非监督聚类(图 3)。结果表明:每组样本生物学重复良好,两组样本基因表达差异非常明显,黑豆萌芽从 0.5 cm 发育到 5.0 cm 时,大部分基因表达上调。

2.4 监督聚类分析

从监督聚类图中可以发现(图 4),黑豆芽从 0.5 cm 生长到 5.0 cm,表达上调的基因占全部变化基因的 85%,说明随着发育的进行,很多休眠的基因被激活。



红色——上调;绿色——下调。下同。

Red; Up-regulated; Green; Down-regulated. The same below.

图 3 黑豆萌芽基因表达的非监督聚类分析

Fig. 3 Unsupervised cluster analysis on black soybean sprouts

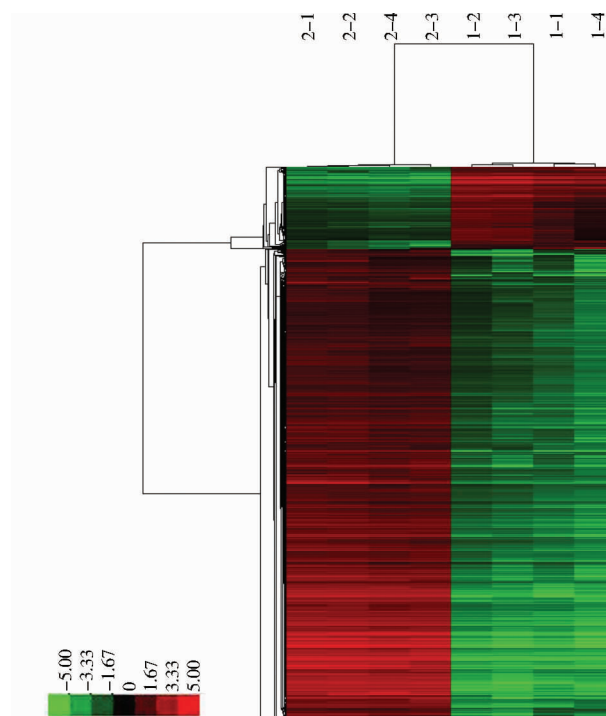


图 4 0.5 与 5.0 cm 黑豆萌芽基因表达的监督聚类分析

Fig. 4 Supervised cluster analysis on black soybean with 0.5 and 5.0 cm sprouts

2.5 差异表达基因数量统计

将 0.5 与 5.0 cm 芽长的黑豆萌芽进行比较,发现两种芽长的黑豆萌芽均有基因发生差异表达,即

表达上调或下调。应用国际上通用的差异基因分析软件 SAM 软件 (two class unpaired) 分析,如果按照常规差异倍数(2 倍)筛选,差异基因数目会接近 10 000 个,本研究将该筛选差异表达的倍数阈值提高至 4 倍,选取变化倍数 (fold change, FC) >4 或 <-4 的基因作为差异表达基因,进行后续分析。共筛选出 6 203 个表达差异显著的基因,其中,上调表达

基因 918 个,下调表达基因 5 285 个。

2.6 抗氧化活性相关基因分析

对 0.5 cm 黑豆萌芽中的 918 个上调表达基因进行 GO term 分析,发现其中有 10 个显著上调表达的基因与抗氧化活性密切相关。这 10 个基因属于 GO:0006979 (response to oxidative stress,氧化压力响应) (表 3)。

表 3 0.5 cm 黑豆萌芽中显著上调的与抗氧化活性相关的基因
Table 3 Significantly up-regulated genes in GO:0006979 (response to oxidative stress) in black soybean with 0.5 cm sprouts

探针 Probe	基因库注册 GenBank accession	变化倍数 Fold change	功能注释 Description
BE823689.1_567	BE823689.1	11.6	Cytosolic class I small heat shock protein type
GMFL01-02-F14-R_381	BW651605.1	6.7	Low molecular weight heat shock protein
GMFL01-03-G22-R_364	BW652365.1	4.7	Fructose-bisphosphate aldolase
GMFL01-14-M12-R_553	BW658506.1	13.7	Low molecular weight heat shock protein
GMFL01-51-M23-R_265	BW684102.1	13.2	Peptide methionine sulfoxide reductase
AW757007.1_297	AW757007.1	2.23	Adenylate kinase isoenzyme
AW761420.1_260	AW761420.1	3.1	Peroxisomal catalase
BI788389.1_501	BI788389.1	2.5	NADH dehydrogenase subunit
BQ273202.1_332	BQ273202.1	2.9	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
GMFL01-10-I14-F_701	BW656400.1	3.7	Peroxisomal catalase

由表 3 可知,这些基因主要控制合成热休克蛋白和抗氧化酶类,包括过氧化氢酶、NADH 脱氢酶亚基及肽蛋氨酸亚砷还原酶,与细胞内的氧化代谢平衡密切相关。这一发现表明,0.5 cm 比 5.0 cm 黑豆萌芽中显著上调的抗氧化活性相关基因,主要与氧化压力响应有关。

活性氧簇 (ROS) 是细胞内的多功能因子,可以调节细胞功能,参与细胞信号介导等。但在氧化应激条件下,会产生过量的 ROS,对细胞产生毒害作用,导致细胞死亡,引起各种病理反应^[18]。细胞保护自己免受 ROS 伤害的机制有两个:一是在损伤可能发生之前破坏 ROS;二是对损伤后的大分子进行修复^[19]。已知 NADH 脱氢酶可以通过从 FMN₂ 转移一个电子到过氧化氢酶和过氧化物酶从而清除 ROS。因此推测,这两种酶与维持 ROS 生产与清除之间的平衡有密切关系。肽蛋氨酸亚砷还原酶和热休克蛋白也参与修复 ROS 损伤的大分子。在蛋白质中,蛋氨酸是最容易被 ROS 氧化的一种氨基

酸,氧化后转化为蛋氨酸亚砷。肽蛋氨酸亚砷还原酶可以催化蛋白质中的蛋氨酸亚砷还原为蛋氨酸^[20-22]。热休克蛋白是细胞内其他蛋白质的分子伴侣,可以将老的蛋白质运回蛋白酶小体,即细胞的“回收站”,并帮助新合成的蛋白质正确折叠^[23-24]。作为分子伴侣,热休克蛋白能够协助在环境变化中发生变性的蛋白进行重折叠,由此为细胞提供了一个必备的通用的修复功能,以应对各种不利的生存条件,包括自由基损伤^[25]。

2.7 RT-PCR 验证差异基因

为验证基因芯片研究所发现的 10 个基因确实在 0.5 cm 黑豆萌芽中的表达高于 5.0 cm 黑豆萌芽,进行了 RT-PCR 验证 (表 4)。

结合表 3 和表 4,汇总基因芯片数据和 RT-PCR 实验结果,证实基因芯片数据和实时定量 RT-PCR 验证结果一致,表明采用基因芯片技术筛选到的 10 个与抗氧化活性相关的基因在 0.5 cm 的黑豆萌芽中确实显著表达。

表 4 RT-PCR 验证结果汇总

Table 4 Results of qRT-PCR

探针 Probe	组 Group	平均 RQ Mean RQ	变化倍数 Fold change	P 值 P value
BE823689. 1_567	1	1.08	24.12	0.0017
	2	0.04		
GMFL01-02-F14-R_381	1	0.88	9.78	0.0046
	2	0.09		
GMFL01-03-G22-R_364	1	1.36	7.99	0.0094
	2	0.17		
GMFL01-14-M12-R_553	1	1.29	5.33	0.0340
	2	0.24		
GMFL01-51-M23-R_265	1	1.05	26.32	0.0008
	2	0.04		
AW757007. 1_297	1	1.27	2.60	0.0329
	2	0.49		
AW761420. 1_260	1	1.72	7.57	0.0450
	2	0.23		
BT788389. 1_501	1	1.26	4.06	0.0098
	2	0.31		
BQ273202. 1_332	1	1.51	6.58	0.0136
	2	0.23		
GMFL01-10-I14-F_701	1	2.33	5.97	0.0610
	2	0.39		

3 结论与讨论

基因芯片技术研究结果表明 0.5 与 5.0 cm 芽长的黑豆萌芽均有基因发生差异表达,GO term 分析差异基因的功能,发现在 0.5 cm 芽长的黑豆萌芽中属于 GO:0006979(氧化压力响应)的 10 个基因显著高表达,这些基因主要控制热休克蛋白和抗氧化酶类的合成,这些酶类与保持细胞氧化还原代谢平衡有密切关系。这一研究结果与作者之前对黑豆萌芽提取物体外抗氧化活性的研究结果一致,0.5 cm 黑豆萌芽的抗氧化活性显著优于干种子和其他长度的黑豆萌芽,可能是由于种子在萌发初期(0.5 cm 芽长),其中与抗氧化酶类合成相关的基因高表达,产生了更多的抗氧化活性成分,增强了萌芽的抗氧化活性。基因芯片数据和 RT-PCR 验证结果一致,表明基因芯片检测结果准确可信。该研究发现了黑豆萌芽中与抗氧化活性密切相关的基因,为进一步从分子水平研究黑豆萌芽抗氧化活性的生物学机制奠定良好的基础。

致谢:衷心感谢博尔诚(北京)科技有限公司和张亮博士在基因芯片检测方面对本研究的大力支持与帮助。

参考文献

- [1] 钟耀广. 黑豆的营养特性与生物活性物质[J]. 北方园艺,2000(3):59. (Zhong Y G. Study on nutritional characteristics and biological active ingredients in black soybean[J]. Northern Horticulture,2000(3):59.)
- [2] Hong G, Mandal P K, Lim K, et al. Fermentation increases isoflavone aglycone contents in black soybean pulp[J]. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances,2012,7(6):502-511.
- [3] Guajardo-Flores D, Garcia-Patino M, Serna-Guerrero D, et al. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans[J]. Food Chemistry,2012,134(3):1312-1319.
- [4] 王萌,阮美娟. 黑豆提取物抗氧化性的研究[J]. 食品科技,2007(3):123-125. (Wang M, Ruan M J. Antioxidant activity of black bean extracts[J]. Food Science and Technology,2007(3):123-125.)
- [5] Xu B J, Chang K C. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines[J]. Food Chemistry,2012,134(3):1287-1296.
- [6] Kim K, Lim K, Shin H, et al. Inhibitory effects of black soybean on platelet activation mediated through its active component of adenosine[J]. Thrombosis Research,2013,131(3):254-261.

(下转第 487 页)

- vator proteins with the acetyltransferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2006, 1759 (1): 69-79.
- [6] Pavangadkar K, Thomashow M F, Triezenberg S J. Histone dynamics and roles of histone acetyltransferases during cold-induced gene regulation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74 (1-2): 183-200.
- [7] Yamamoto Y Y, Ichida H, Abe T, et al. Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35 (18): 6219-6226.
- [8] 周雯, 蔡望伟, 周代锋, 等. 紧密连接蛋白 claudin-15 基因 5'调控区序列的生物信息学分析 [J]. *海南医学院学报*, 2012, 18 (12): 1685-1688. (Zhou W, Cai W W, Zhou D F, et al. Bioinformatics analysis on 5' regulatory region sequence properties of gene encoding tight junction protein Claudin-15 [J]. *Journal of Hainan Medical College*, 2012, 18 (12): 1685-1688.)
- [9] Zhao Y, Li X, Chen W, et al. Whole-genome survey and characterization of MADS-box gene family in maize and sorghum [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2011, 105 (2): 159-173.
- [10] Verhoeven K J F, Jansen J J, van Dijk P J, et al. Stress induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions [J]. *New Phytologist*, 2010, 185 (4): 1108-1118.
- [11] Downen R H, Pelizzola M, Schmitz R J, et al. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2012, 109 (32): 2183-2191.
- [12] Kovar A, Koukalova B, Bezde M, et al. Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95 (1): 301-306.
- [13] Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, et al. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (40): 37741.
- [14] Pavlopoulou A, Kossida S. Plant cytosine-5 DNA methyltransferases; structure, function, and molecular evolution [J]. *Genomics*, 2007, 90 (4): 530-541.
- [15] 方淑梅, 梁喜龙, 纪伟波, 等. 大豆 DNA 甲基化酶生物信息学分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35 (2): 225-230. (Fang S M, Liang X L, Ji W B, et al. Bioinformatics analysis of DNA methylase from soybean [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2013, 35 (2): 225-230.)
- [16] 徐龙勇, 陈德桂. 组蛋白去甲基化酶研究进展 [J]. *生命科学*, 2010, 22 (2): 109-114. (Xu L Y, Chen D G. Research progress and prospect of histone demethylases [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, 22 (2): 109-114.)
- [17] Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair [J]. *Trends in Genetics*, 2009, 25 (2): 82-90.
- [18] Zhu J K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases [J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 143.

(上接第 478 页)

- [7] 王常青, 任海伟, 王海凤, 等. 黑豆多肽对 D-半乳糖衰老小鼠抗氧化能力的影响 [J]. *食品科学*, 2010, 31 (3): 262-266. (Wang C Q, Ren H W, Wang H F, et al. Antioxidant function of black soybean peptide in D-galactose-induced senescent mice [J]. *Food Science*, 2010, 31 (3): 262-266.)
- [8] 张瑞芬, 黄昉, 徐志宏, 等. 黑豆皮提取物抗氧化和延缓衰老作用研究 [J]. *营养学报*, 2007, 29 (2): 160-162. (Zhang R F, Huang F, Xu Z H, et al. Study on the anti-oxidative activity and potential anti-aging effect of black soybean coat extracts [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2007, 29 (2): 160-162.)
- [9] Lai J X, Xin C, Zhao Y, et al. Study of active ingredients in black soybean sprouts and their safety in cosmetic use [J]. *Molecules*, 2012, 17 (10): 11669-11679.
- [10] Schena M, Shalon D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, 270, 467-470.
- [11] Sreenivasulu N, Sunkar R, Wobus U, et al. Array platforms and bioinformatics tools for the analysis of plant transcriptome in response to abiotic stress [J]. *Methods Molecular Biology*, 2010, 639: 71-81.
- [12] Aharoni A, Vorst O. DNA microarrays for functional plant genomics [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48: 99-118.
- [13] Tusher V G, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2001, 98: 5116-5121.
- [14] Huang X Z, Qian Q, Liu Z B, et al. Natural variation at the DEPT locus enhances grain yield in rice [J]. *Nature Genetics*, 2009, 41 (4): 494-497.
- [15] Ullah S, Khan A S, Raza A, et al. Gene action analysis of yield and yield related traits in spring wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2010, 12: 125-128.
- [16] 李龙云, 于霁雯, 翟红红, 等. 利用基因芯片技术筛选棉纤维伸长相关基因 [J]. *作物学报*, 2011, 37 (1): 95-104. (Li L Y, Yu J W, Zhai H H, et al. Identification of fiber length-related genes using cotton oligonucleotide microarrays [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37 (1): 95-104.)
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [18] Bonekamp N A, Volkl A, Fahimi H D, et al. Reactive oxygen species and peroxisomes; struggling for balance [J]. *Biofactors*, 2009, 35: 346-355.
- [19] Brunell D, Weissbach H, Hodder P, et al. A high-throughput screening compatible assay for activators and inhibitors of methionine sulfoxide reductase A [J]. *Assay and Drug Development Technologies*, 2010, 8: 615-620.
- [20] Weissbach H, Etienne F, Hoshi T, et al. Peptide methionine sulfoxide reductase; Structure, mechanism of action, and biological function [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 397: 172-178.
- [21] Weissbach H, Resnick L, Brot N. Methionine sulfoxide reductases; History and cellular role in protecting against oxidative damage [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1703: 203-212.
- [22] Ruan H, Tang X D, Chen M L, et al. High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 2002, 99: 2748-2753.
- [23] Walter S, Buchner J. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding [J]. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, 2002, 41: 1098-1113.
- [24] Borges J C, Ramos C H. Protein folding assisted by chaperones [J]. *Protein Peptide Lett*, 2005, 12: 257-261.
- [25] Santoro M G. Heat shock factors and the control of the stress response [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000, 59: 55-63.