

蒋景龙, 李 丽, 王崇英. 外源  $H_2O_2$  影响山黧豆初生根蛋白表达研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 20–25.

# 外源 $H_2O_2$ 影响山黧豆初生根蛋白表达研究

蒋景龙<sup>1</sup>, 李 丽<sup>1</sup>, 王崇英<sup>2</sup>

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2. 兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000)

**摘要:**以山黧豆(*Lathyrus sativus* L.) 幼苗为试验材料, 施加  $H_2O_2$  处理山黧豆初生根, 然后检测初生根中  $H_2O_2$  含量变化, 并采用双向电泳与质谱鉴定技术, 对初生根中蛋白质表达的变化进行分析。结果显示: 施加  $H_2O_2$  处理引起了内源  $H_2O_2$  水平的产生与积累; 利用双向电泳技术, 共获得了 850~900 个蛋白质点, 并检测到 70 个蛋白质表现出显著的差异表达, 其中 43 个蛋白发生上调, 21 个蛋白发生下调, 新出现 6 个蛋白。对 15 个蛋白点 MALDI-TOF-MS/MS 质谱鉴定结果表明, 呼吸代谢、蛋白折叠、信号转导及细胞防御等方面的蛋白参与了山黧豆初生根对  $H_2O_2$  的应答反应。这些蛋白的发现将有助于进一步揭示根对氧化胁迫的应答及  $H_2O_2$  作用机制。

**关键词:**山黧豆; 过氧化氢; 初生根; 双向电泳; 质谱鉴定

**中图分类号:** Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0020-06

过氧化氢( $H_2O_2$ )是生物体内各种生理代谢的副产物, 可以通过有氧代谢过程(如线粒体的呼吸、叶绿体的光合作用和过氧化物酶体)不断产生, 也是活性氧(reactive oxygen species, ROS)中最稳定的一种, 一直被认为是细胞产生毒性的代谢物, 在过去的 10 年里引起了极大的关注<sup>[1]</sup>。当植物遭受各种各样的环境胁迫(如干旱、缺氧、高温、低温等)及生物胁迫(如细菌侵入)时,  $H_2O_2$  含量迅速升高, 胁迫较为严重时, 产生的过量  $H_2O_2$  会对细胞产生毒害作用, 如引起细胞膜脂的过氧化、蛋白质及核酸的降解、细胞凋亡甚至死亡<sup>[2]</sup>。然而, 随着研究的逐渐深入, 人们发现  $H_2O_2$  与其他的 ROS 分子如超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )、过羟基自由基( $HO_2^{\cdot}$ )、单线态的氧( $^1O_2$ )或羟自由基( $\cdot OH$ )不同,  $H_2O_2$  属于非激发态的 ROS, 半衰期很长, 并且不携带电荷<sup>[3]</sup>, 因此在生物体内  $H_2O_2$  可以作为一种稳定的信号分子, 在很多信号转导过程中扮演重要角色, 如诱导气孔关闭, 参与根的向地性生长、侧根的发育、细胞壁木质化、细胞程序性死亡以及花粉管和柱头相互作用等<sup>[4]</sup>, 成为了当今细胞与分子生物学研究的热点。

Joo 等的研究表明,  $H_2O_2$  参与了植物根的向地性生长过程, 且  $H_2O_2$  可能是生长素调节信号途径的下游元件<sup>[5]</sup>。Li 等研究发现,  $H_2O_2$  与生长素相互作用能够诱导黄瓜、绿豆的不定根生长<sup>[6-7]</sup>。Ishibashi 等用  $H_2O_2$  喷施大豆叶片后发现外源  $H_2O_2$  引起了叶片气孔的快速关闭, 防止水分过度蒸发, 并诱导了可溶性糖的合成, 增强了渗透调节能力, 从而提高了大豆的干旱抗性<sup>[8]</sup>。

近几年, 越来越多的研究者开始选择通过施加外源  $H_2O_2$  的方法来研究它对植物生长发育的影响。Wan 等用外源  $H_2O_2$  处理水培 12 d 苗龄的水稻 6 h, 然后分析水稻叶片生理生化反应, 并采用蛋白质组学方法研究水稻叶片对  $H_2O_2$  处理引起的蛋白质水平变化, 结果发现了 144 个差异表达的蛋白; 对其中 129 个差异表达蛋白进行质谱鉴定, 结果表明细胞防御、氧化还原、信号转导、蛋白合成与降解、光合、呼吸与糖类和能量代谢方面的蛋白参与了水稻叶片对  $H_2O_2$  的应答<sup>[9]</sup>。然而, 外源  $H_2O_2$  处理水培植物的过程中首先受到氧化胁迫和发生防御变化的应该是根部。因此, 本试验采用双向电泳和质谱分析相结合的蛋白质组学方法, 研究幼苗期山黧豆的初生根在外源  $H_2O_2$  处理过程中蛋白质表达的变化, 为揭示  $H_2O_2$  的作用机制及初生根对  $H_2O_2$  的应答反应奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

挑选籽粒饱满、无损坏的山黧豆种子, 用自来水冲洗 3

收稿日期: 2013-12-02

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划(编号: 2014JQ3113); 陕西理工学院科研基金(博士启动基金)(编号: SLGQD13-11)。

作者简介: 蒋景龙(1980—), 男, 山东枣庄人, 博士, 讲师, 主要从事信号分子  $H_2O_2$  对植物生长发育及抗逆性影响研究。E-mail: jiangjinglong511@163.com。

[11] Hu H H, Dai M Q, Yao J L, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(35): 12987–12992.

[12] Saad A S, Li X, Li H P, et al. A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses[J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2013, 203–204(204): 33–40.

[13] Moon Y H, Kang H G, Jung J Y, et al. Determination of the motif re-

sponsible for interaction between the rice APETALA1/AGAMOUS-LIKE9 family proteins using a yeast two-hybrid system[J]. Plant Physiology, 1999, 120(4): 1193–1203.

[14] Singh R, Lee M O, Lee J E, et al. Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system[J]. Plant Physiology, 2012, 160(1): 477–487.

[15] Petroni K, Kumimoto R W, Gnesutta N, et al. The promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y transcription factors[J]. The Plant Cell, 2012, 24(12): 4777–4792.

次,播种至潮湿的蛭石中萌发 48 h 后,选取长势良好、初生根长度为 2.0 ~ 2.5 cm 的幼苗作为试验材料。将清洗干净的幼苗水平放置在盛有 50 mL 20 mmol/L  $H_2O_2$  溶液的培养皿(直径 90 mm)中处理 12 h,只加蒸馏水而没有  $H_2O_2$  的设为对照组。每个培养皿放置 10 株山黧豆幼苗,每个处理设置 3 ~ 4 个平行组。处理 12 h 后分别收集  $H_2O_2$  处理组和对照组幼苗的初生根各 4 份(每份 0.5 g),用锡箔纸包好, - 80 °C 冰箱保存。

## 1.2 试验仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 IPGPhor 等电聚焦单元, Hoefer SE600 垂直电泳单元, MultiTemp III cooling 冷凝单元, Image Scanner 高精度扫描仪, LabScan 扫描控制和分析前处理软件, Image Master 2D Platinum Version 5.0 双向凝胶分析软件(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司), 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer 质谱检测仪器[ABI(Foster City)公司], Eppendorf 5417C/R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2.2 试剂 IPG 胶条(pH 值 4 ~ 7, 18 cm)、碘乙酰胺、硫脲、考马斯亮蓝 R-250、矿物油均购自 GE 医疗集团。二巯苏糖醇(DTT)、过硫酸铵(AP)、3-[ (3-胆固醇氨丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸(CHAPS)购自 Sigma 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、甘氨酸、十二烷基磺酸钠(SDS)、Tris-碱、二氨基苯胺(DAB)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。丙酮、甲醇、乙酸、甘油、乙酸铵均为国产分析纯。

## 1.3 试验方法

1.3.1 内源  $H_2O_2$  的组织化学定位及含量检测 山黧豆初生根中的  $H_2O_2$  组织定位与含量的测定分别参照 Jiang 等的 DAB(3,3-diaminobenzidine, 二氨基苯胺)组织化学染色法与  $H_2O_2$  测定的双酶法<sup>[10]</sup>。

1.3.2 蛋白质的提取与定量 参照 Wu 等的 TCA-丙酮法<sup>[11]</sup>提取山黧豆初生根的总蛋白质,然后参照 Bradford 法<sup>[12]</sup>进行蛋白质定量,蛋白质的上样量为 500  $\mu$ g/凝胶。等点聚焦与第二向 SDS-PAGE 凝胶电泳操作均参照双向电泳指导手册完成。

1.3.3 质谱分析与数据检索 用扫描仪 Image Scanner 扫描图像,分辨率为 500 dpi,扫描的图像比例为 1:1。使用 Image Master 2D Platinum Version 5.0 双向凝胶分析软件进行凝胶图像分析。根据蛋白点的体积和光密度进行蛋白质的丰度测定,蛋白点体积与对照点体积相差大于 1.5 倍,被视为显著性差异。经过比对后,取差异蛋白质点进行 MALDI-TOF/TOF-MS/MS 蛋白质检测。质谱检测详细步骤为:(1)胶内酶解及 Ziptip 脱盐。每个胶粒切碎后放入 EP 管中,每管加入 200 ~ 400  $\mu$ L 100 mmol/L  $NH_4HCO_3$ /30% ACN 脱色,冻干后,加入 5  $\mu$ L 2.5 ~ 10 ng/ $\mu$ L 测序级 Trypsin (Promega)溶液,37 °C 反应过夜;20 h 左右后,吸出酶解液,转移至新 EP 管中,向管中加入 100  $\mu$ L 60% ACN/0.1% TFA,超声 15 min,合并前次溶液,冻干;若有盐,则用 Ziptip (millipore)进行脱盐。(2)质谱分析。样品与 5 mg/mL HCCA 基质 1:1 混合后,用 4800 串联飞行时间质谱仪(4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer)进行质谱分析,激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器,加

速电压为 2 kV,采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据,PMF 质量扫描范围为 800 ~ 4 000 u,选择信噪比大于 50 的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析,每个样品点上选择 8 个母离子,二级 MS/MS 激光激发 2 500 次,碰撞能量 2 kV, CID 关闭。(3)数据库检索。使用以下数据库综合分析搜索:数据库:NCBI;搜索类型:肽指纹图谱(MS/MS 离子搜索);鉴定成功标准:蛋白分值 C.I.% 大于 90 分。

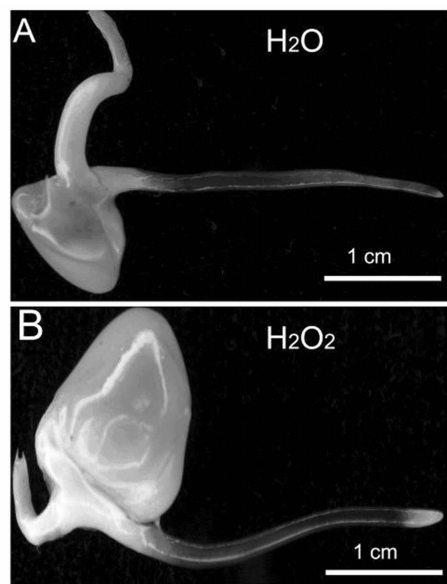
## 1.4 数据统计

测定的所有指标都设置 3 个以上的平行组,以  $P \leq 0.05$  水平作为显著性差异的标准对测定的参数平均值进行  $t$  检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源 $H_2O_2$ 的处理导致山黧豆初生根中内源 $H_2O_2$ 的积累

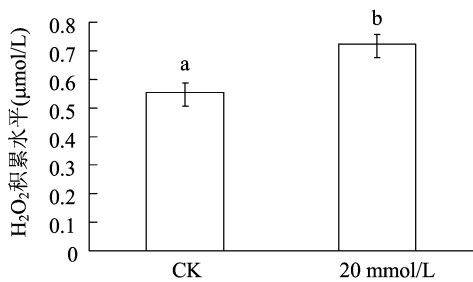
由于 DAB 能够和  $H_2O_2$  反应生成红褐色的物质,因此通过 DAB 特异染料染色法分析山黧豆初生根组织内的  $H_2O_2$  积累。结果发现,经 20 mmol/L  $H_2O_2$  处理后山黧豆初生根中染色程度比对照组(蒸馏水中正常生长)中山黧豆初生根的染色程度深(图 1),表明外源  $H_2O_2$  处理可能导致了山黧豆初生根内源  $H_2O_2$  的积累。为了验证这一结果,进一步采用双酶法直接检测内源  $H_2O_2$  的含量。结果显示,未经过  $H_2O_2$  处理的山黧豆初生根中内源  $H_2O_2$  的水平为 0.55  $\mu$ mol/L,而经过  $H_2O_2$  处理的初生根中内源  $H_2O_2$  的水平增加至 0.72  $\mu$ mol/L,表明外源  $H_2O_2$  处理后,内源  $H_2O_2$  含量显著增高(图 2),这一结果与染色的结果相符合。



A—对照中山黧豆初生根的DAB染色结果;  
B— $H_2O_2$ 溶液处理山黧豆初生根的DAB染色结果  
图1 山黧豆初生根中 $H_2O_2$ 的组织化学染色分析

### 2.2 $H_2O_2$ 处理后山黧豆初生根的蛋白图谱分析

通过双向电泳技术对  $H_2O_2$  处理的山黧豆初生根与对照组的初生根进行全蛋白的提取与分离,获得了较好重复性与分辨率较高的电泳图谱(图 3)。经 Image Master 2D Platinum Version 5.0 软件分析发现,每张 2-DE 图谱分离到的蛋白质



误差棒上不同小写字母代表差异显著( $P \leq 0.05$ )

图2 山黧豆初生根中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累水平分析

数目为( $840 \pm 67$ )个,对照组与处理组的蛋白点匹配率为86.2%,相互匹配蛋白数为818,在蛋白质的总数上没有明显变化(图3-A、图3-B)。与对照组相比,70个蛋白质点的表达发生了显著或极显著变化,其中上调蛋白43个,占总差异表达蛋白的61.43%,下调蛋白21个,占30%,新出现蛋白点6个,占8.57%(表1)。这些结果表明,处理后上调的蛋白点比例要高于下调的蛋白点比例。

进一步分析发现,新出现的蛋白质分子量超过116 ku,等电点靠近7且主要集中在电泳图谱的a区,而大部分上调的蛋白点主要集中在b、d、e区,下调的蛋白点主要集中在c区(图3-A)。选取差异极显著( $P < 0.01$ )(变化倍率在2倍以上的)15个蛋白点(其丰度变化如图3-C)进行MALDI-TOF/MALDI-TOF/TOF质谱分析鉴定。

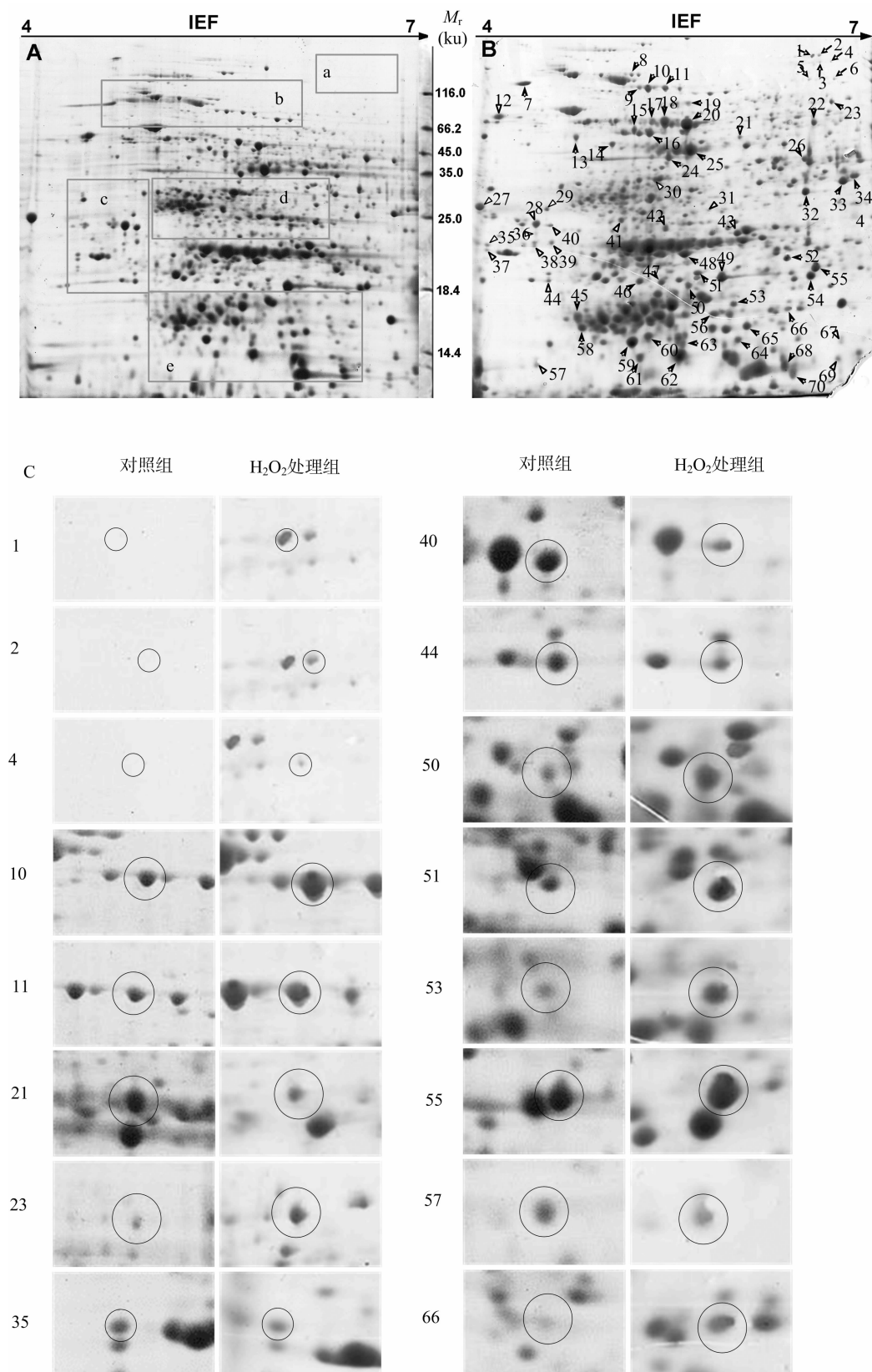
### 2.3 蛋白质的质谱鉴定及分析

MALDI-TOF-MS/MS质谱鉴定结果见表2。表2结果显示,除了53、55、57这3个蛋白点未鉴定成功外,其余的蛋白都被成功鉴定。将蛋白分值C.I.%高于90分的蛋白选择出来,列于表2中。对上述鉴定的蛋白点进行功能归类发现,外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后有5类重要蛋白的表达发生了显著变化。(1)呼吸代谢相关蛋白。1号蛋白鉴定结果为NADH泛醌氧化还原酶亚基(NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit),这种蛋白主要定位于线粒体中,为三羧酸循环的电子传递链传递电子。2号蛋白为NADH脱氢酶辅酶Q-Fe-S蛋白1-线粒体类似蛋白(NADH dehydrogenase[ubiquinone] iron-sulfur protein 1, mitochondrial-like),它是NADH泛醌氧化还原酶亚基中的一种特殊形式,也在三羧酸循环过程中发挥重要的作用。4号蛋白为磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase),存在于细胞质和线粒体中,在糖异生过程中起催化作用,它能将草酰乙酸转化成磷酸烯醇式丙酮酸和二氧化碳。23号蛋白为一种线粒体加工肽酶β亚基类似蛋白(probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta-like protein),这种蛋白主要参与了线粒体的呼吸代谢。结果表明,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理在山黧豆的初生根中诱导了一系列呼吸代谢和糖异生相关的蛋白。(2)蛋白折叠相关蛋白。10、11、66号蛋白点均为热激蛋白(heat shock protein),这类蛋白参与了蛋白质修饰过程中的蛋白折叠和去折叠,这类蛋白具有多种功能,如参与各种胁迫应答、协助蛋白质的折叠与组装、参与细胞防御等。(3)信号转导相关蛋白。经过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后,40号蛋白显著下调,经鉴定这个蛋白为RanBP1(ran-binding protein 1 homolog b-like),这类蛋白是一类胞质Ran

结合蛋白,它能够抑制RCC1从而刺激GTP从Ran蛋白上释放出来。Ran是一个GTP结合蛋白,它是RNA和蛋白质从核孔复合体中穿过和转运过程中所必需的,同时,它也控制着DNA的合成与细胞周期的调控,主要作为一种调节蛋白与膜上的受体蛋白结合,调控细胞的信号转导。(4)细胞防御相关蛋白。51号蛋白为蛋白酶体的α形式(proteasome subunit alpha type),它的功能是主要清除细胞内的一些多余的肽段,参与细胞内蛋白质的降解与回收。44号蛋白为铁蛋白(feritin),这是一种在细胞内普遍存在的蛋白,它主要是一种铁离子的蛋白仓库,调控着细胞内的铁离子含量,并参与了一些离子的转运,去除细胞内多余的铁离子。(5)贮存蛋白。21号蛋白为豌豆球蛋白(vicilin),它是豌豆种子中的一种贮存蛋白,这一蛋白在处理的过程中明显地下调,表明有可能外源施加过高浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能够下调这些贮存蛋白,加速他们的分解,以提供更多的营养或者能量。50号蛋白为区别豆球蛋白和豌豆球蛋白的第3种贮存蛋白,即convicilin蛋白,这种蛋白已经在豌豆中被分离,但是其功能现在还未研究清楚。此外,值得注意的是质谱分析结果表明,这种蛋白主要存在于野豌豆族(如豌豆、山黧豆、兵豆和蚕豆)中。这一蛋白在处理后的初生根中显著上调,表明可能起重要作用,而具体作用还需进一步研究。

### 3 讨论

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>扮演双重角色,一方面作为植物正常代谢中的有毒副产物,另一方面作为在胁迫生理和信号转导中的调节性分子;但是目前这2种角色在植物中的转换机制还不清楚,在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫条件下,植物是如何通过调节胞内代谢网络和抗氧化系统来使植物生存的机制也还不清楚<sup>[9]</sup>。本研究采用蛋白质组学的方法在蛋白水平比较了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理及未处理的初生根内蛋白质的表达变化。结果表明,一些与呼吸作用相关的蛋白,如NADH泛醌氧化还原酶亚基(NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit)、NADH脱氢酶辅酶Q-Fe-S蛋白1-线粒体类似蛋白(NADH dehydrogenase[ubiquinone] iron-sulfur protein 1, mitochondrial-like)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase)只在处理组中表达,说明外源的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理导致了一些特异的呼吸代谢作用的出现。NADH泛醌氧化还原酶也称复合体I,是线粒体呼吸电子传递链上的第一个酶体<sup>[13]</sup>。这表明H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>胁迫后为了弥补呼吸代谢消耗掉的能量和碳源,这些与呼吸代谢作用和催化糖异生相关的酶被诱导表达。存在于细胞溶质中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(简称PEPC),是C<sub>4</sub>植物光合作用的关键酶,同时也在植物的各种代谢中发挥许多重要的功能,如在细胞伸长生长、气孔开放、氮同化、根系离子吸收、细胞质pH调节、光合碳同化等方面发挥重要作用<sup>[14]</sup>。在外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理后,初生根中诱导表达的这一蛋白可能与根的离子吸收和根细胞内的pH调节有关。外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理也是一种胁迫因子,在正常生长发育时期,影响了植物的正常生长。试验结果发现,处理后一些增强氧化胁迫抗性的重要蛋白表现出了上调,如热激蛋白(heat shock protein),它是生物体在高温、盐渍、寒冷、干旱、饥饿及重金属离子等环境胁迫下能够诱导合成的一类应激蛋白,是一种非特异性高度保守的蛋白<sup>[15]</sup>。逆境胁迫



A—培养在水中的山黧豆初生根双向电泳图谱 (CK) ; B—在 20 mmol/L  $H_2O_2$  中处理 60 h 的初生根的双向电泳图谱 (T) ; C—16 个差异表达倍率较高的蛋白点丰度放大图 (比例 1 : 3) ; 图 B 中 ▽ 表示新出现的蛋白, ▲ 表示上调的蛋白, △ 表示下调的蛋白。

图3  $H_2O_2$  处理和未处理山黧豆初生根的双向电泳胶扫描图谱

表 1 70 个差异表达蛋白点的丰度值及倍率变化

蛋白编号	相对表达水平		变化倍数	蛋白编号	相对表达水平		变化倍数
	对照组	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 处理组			对照组	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 处理组	
1	0	0.068 ± 0.012 **		36	0.036 ± 0.002	0.021 ± 0.002 *	1.71
2	0	0.049 ± 0.006 **		37	0.039 ± 0.004	0.023 ± 0.005 *	1.70
3	0	0.024 ± 0.001 *		38	0.045 ± 0.005	0.028 ± 0.002 *	1.61
4	0	0.021 ± 0.002 **		39	0.044 ± 0.003	0.029 ± 0.001 *	1.52
5	0	0.029 ± 0.003 *		40	0.452 ± 0.034	0.054 ± 0.006 **	8.37
6	0	0.032 ± 0.004 *		41	0.128 ± 0.003	0.082 ± 0.004 *	1.56
7	0.082 ± 0.055	0.158 ± 0.023 *	1.93	42	0.145 ± 0.005	0.089 ± 0.008 *	1.63
8	0.031 ± 0.034	0.061 ± 0.061 *	1.97	43	0.379 ± 0.042	0.236 ± 0.031 *	1.61
9	0.042 ± 0.052	0.076 ± 0.079 *	1.81	44	0.142 ± 0.007	0.057 ± 0.007 **	2.49
10	0.094 ± 0.012	0.248 ± 0.024 **	2.64	45	0.074 ± 0.008	0.144 ± 0.027 *	1.95
11	0.085 ± 0.002	0.171 ± 0.008 **	2.01	46	0.067 ± 0.007	0.125 ± 0.031 *	1.87
12	0.273 ± 0.041	0.152 ± 0.014 *	1.80	47	0.068 ± 0.007	0.109 ± 0.009 *	1.60
13	0.071 ± 0.075	0.108 ± 0.027 *	1.52	48	0.204 ± 0.021	0.306 ± 0.047 *	1.50
14	0.069 ± 0.063	0.122 ± 0.009 *	1.77	49	0.649 ± 0.074	0.423 ± 0.063 *	1.53
15	0.084 ± 0.091	0.128 ± 0.007 *	1.52	50	0.036 ± 0.006	0.168 ± 0.022 **	4.67
16	0.139 ± 0.025	0.226 ± 0.049 *	1.91	51	0.073 ± 0.004	0.273 ± 0.032 **	3.74
17	0.063 ± 0.007	0.122 ± 0.028 *	1.94	52	0.085 ± 0.008	0.155 ± 0.026 *	1.82
18	0.273 ± 0.036	0.523 ± 0.098 *	1.92	53	0.026 ± 0.001	0.162 ± 0.013 **	6.23
19	0.026 ± 0.030	0.044 ± 0.047 *	1.69	54	0.288 ± 0.047	0.536 ± 0.052 *	1.86
20	0.343 ± 0.030	0.664 ± 0.091 *	1.94	55	0.263 ± 0.026	0.549 ± 0.089 **	2.09
21	0.163 ± 0.014	0.053 ± 0.006 **	3.08	56	0.207 ± 0.039	0.362 ± 0.037 *	1.75
22	0.068 ± 0.006	0.135 ± 0.055 *	1.99	57	0.463 ± 0.006	0.206 ± 0.004 **	2.25
23	0.031 ± 0.004	0.079 ± 0.009 **	2.55	58	0.271 ± 0.037	0.432 ± 0.026 *	1.59
24	0.213 ± 0.025	0.324 ± 0.032 *	1.52	59	0.342 ± 0.058	0.529 ± 0.067 *	1.55
25	0.592 ± 0.073	0.954 ± 0.102 *	1.61	60	0.193 ± 0.044	0.296 ± 0.074 *	1.53
26	0.107 ± 0.014	0.175 ± 0.049 *	1.64	61	0.185 ± 0.032	0.287 ± 0.053 *	1.55
27	0.774 ± 0.092	0.408 ± 0.032 *	1.90	62	0.302 ± 0.033	0.475 ± 0.038 *	1.57
28	0.725 ± 0.074	0.376 ± 0.035 *	1.93	63	0.208 ± 0.031	0.346 ± 0.035 *	1.66
29	0.077 ± 0.006	0.046 ± 0.007 *	1.67	64	0.125 ± 0.056	0.195 ± 0.005 *	1.56
30	0.756 ± 0.064	0.425 ± 0.042 *	1.78	65	0.207 ± 0.042	0.328 ± 0.033 *	1.58
31	0.049 ± 0.003	0.028 ± 0.002 *	1.75	66	0.016 ± 0.002	0.064 ± 0.008 **	4.00
32	0.153 ± 0.009	0.295 ± 0.036 *	1.93	67	0.078 ± 0.005	0.024 ± 0.004 *	1.71
33	0.186 ± 0.024	0.308 ± 0.034 *	1.66	68	0.169 ± 0.003	0.293 ± 0.045 *	1.73
34	0.085 ± 0.008	0.158 ± 0.009 *	1.86	69	0.060 ± 0.008	0.036 ± 0.004 *	1.67
35	0.065 ± 0.008	0.033 ± 0.003 *	1.97	70	0.228 ± 0.008	0.374 ± 0.047 *	1.64

注：\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )；\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。与对照相比,表中上调点变化倍率计算公式为变化倍率 = 处理组/对照组;下调点变化倍率计算公式为变化倍率 = 对照组/处理组。

对细胞造成的直接伤害包括使蛋白质变性而失去正常功能,热激蛋白作为分子伴侣,在逆境胁迫条件下可以维护蛋白的功能结构、防止非天然蛋白的集聚、重新折叠变性蛋白以恢复其功能结构以及清除有潜在危害的变性蛋白等<sup>[16]</sup>。Wan 等研究表明,用外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理水培水稻,然后对叶片的蛋白质组学进行分析,结果发现大量的热激蛋白上调表达<sup>[9]</sup>,这一结果和本试验结果相吻合。但是目前还没有在植物初生根的蛋白质组学中发现热激蛋白上调的报道。热激蛋白的表达增强可能提高了山黧豆初生根对外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的胁迫抵抗,这也许与热激蛋白表达的增强相关。外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 胁迫有可能引起部分蛋白质降解,因此一些参与细胞内蛋白质的降解与回收的蛋白,如蛋白酶体的 α 形式 (proteasome subunit alpha type) 表现出了明显的上调。还有一些起到氧化还原和信号

转导方面的蛋白也发生了明显的上调或下调,如铁蛋白 (ferritin) 和 RanBP1 蛋白。铁蛋白是一种广泛存在于生命体中的铁贮藏蛋白,具有调节机体铁代谢平衡、去除二价铁毒性和防止机体氧化损伤的双重功能<sup>[17]</sup>。植物铁蛋白也能通过降解途径加速铁的释放,与此功能相呼应的是铁蛋白在细胞内的表达被铁离子浓度和氧化应激状态调控。铁蛋白的表达在植物中主要受到转录水平上的调控,诱导物是铁离子和氧化物,在动物体内主要受到的则是翻译水平上的调控,而植物的萌芽和生长均离不开铁蛋白铁的释放<sup>[18]</sup>。另外,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后还有一些种子中贮存的蛋白,如豌豆球蛋白 (vicilin) 与 convicilin 蛋白,也发生了重要变化,但是这些蛋白的功能还需要进一步研究。由于质谱分析的蛋白点数目有限,因此更多的信息还需要在以后的研究中进一步挖掘。

表 2 12 个差异表达蛋白的 MALDI-TOF-MS/MS 质谱鉴定结果

编号	登录号	蛋白名称	理论等电点/ 实验等电点	理论分子量/ 实验分子量	得分	蛋白质可 信度(%)	肽段覆盖 率(%)
1	gi 357460817	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit [ <i>Medicago truncatula</i> ]	7.11/6.42	81 583.8/174 532.1	204	100	24
2	gi 357460817	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit [ <i>Medicago truncatula</i> ]	7.11/6.55	81 583.8/164 289.5	214	100	18
4	gi 297794171	Hypothetical-protein ARALYDRAFT_496802	6.02/6.83	73 465.6/156 231.9	124	100	15
10	gi 357476131	heat shock protein [ <i>Medicago truncatula</i> ]	5.87/5.68	72 477.6/136 739.6	633	100	26
11	gi 357476131	heat shock protein [ <i>Medicago truncatula</i> ]	5.87/5.94	72 477.6/134 871.6	973	100	40
21	gi 42414629	vicilin [ <i>Pisum sativum</i> ]	5.43/6.22	47 326.4/682 578.2	358	100	37
23	gi 356527314	probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta-like [ <i>Glycine max</i> ]	6.49/6.97	58 973.2/891 352.7	472	100	29
40	gi 356576095	ran-binding protein 1 homolog b-like [ <i>Glycine max</i> ]	4.78/4.47	24 970.2/24 324.5	105	99.997	13
44	gi 417006	ferritin-1, chloroplastic; flags; precursor	6.14/4.96	28 772.5/204 798.3	98	99.982	23
50	gi 164512544	convicilin [ <i>Lathyrus sativus</i> ]	5.46/5.91	61 562.5/192 325.7	654	100	34
51	gi 357451023	proteasome subunit alpha type [ <i>Medicago truncatula</i> ]	5.68/6.02	27 348.8/23 895.6	743	100	45
66	gi 145354305	predicted protein [ <i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901]	7.70/6.21	14 419.7/15 632.5	76	97.412	19

参考文献:

[1] Quan L J, Zhang B, Shi W W, et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network[J]. J Integr Plant Biol, 2008, 50(1): 2-18.

[2] Pomar F, Caballero N, Pedreño M, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis[J]. Febs Letters, 2002, 529(2/3): 198-202.

[3] Halliwell B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 312-322.

[4] Barba-Espin G, Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno M J, et al. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings[J]. Plant Cell and Environment, 2010, 33(6): 981-994.

[5] Joo J H, Bae Y S, Lee J S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism[J]. Plant Physiology, 2001, 126(3): 1055-1060.

[6] Li S W, Xue L G, Xu S J, et al. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber[J]. Plant Growth Regulation, 2007, 52(2): 173-180.

[7] Li S W, Xue L G, Xu S J, et al. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings[J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 65(1): 63-71.

[8] Ishibashi Y, Yamaguchi H, Yuasa T, et al. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(13): 1562-1567.

[9] Wan X Y, Liu J Y. Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2008, 7(8):

1469-1488.

[10] Jiang J L, Su M, Wang L Y, et al. Exogenous hydrogen peroxide reversibly inhibits root gravitropism and induces horizontal curvature of primary root during grass pea germination[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 53: 84-93.

[11] Wu Q F, Li C, Ke L M, et al. A high-efficiency, two-dimensional gel electrophoresis platform for mature leaves of grass pea (*Lathyrus sativus* L.)[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33(6): 2387-2397.

[12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.

[13] Klodmann J, Braun H P. Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants[J]. Phytochemistry, 2011, 72(10): 1071-1080.

[14] Ding Z S, Zhou B Y, Sun X F, et al. High light tolerance is enhanced by over expressed PEPC in rice under drought stress[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(2): 285-292.

[15] Janicka-Russak M, Kabała K. Absciscic acid and hydrogen peroxide induce modification of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Cucumis sativus* L. roots under heat shock[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(16): 1607-1614.

[16] 裴丽丽, 徐兆师, 尹丽娟, 等. 植物热激蛋白 90 的分子作用机理及其利用研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 109-114.

[17] Djennane S, Cesbron C, Sourice S, et al. Iron homeostasis and fire blight susceptibility in transgenic pear plants over expressing a pea ferritin gene[J]. Plant Science, 2011, 180(5): 694-701.

[18] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373-399.