

## 不同产地“宁杞 1 号”枸杞果实的多糖合成代谢差异

马瑞雪, 寇婷婷, 孙霞芝, 范艳丽\*  
(宁夏大学食品科学与工程学院 银川 750021)

**摘要** 基于同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantity, iTRAQ)技术,以采自宁夏中宁的“宁杞 1 号”枸杞果实为样品,以采自新疆精河、内蒙古乌拉特前旗、甘肃瓜州和青海德令哈的“宁杞 1 号”枸杞果实为对照,进行差异蛋白组学的生物信息学分析。结果表明,新疆/宁夏组、内蒙古/宁夏组、甘肃/宁夏组和青海/宁夏组分别有 446, 166, 966 个和 1 015 个差异表达蛋白(DEPs),与枸杞多糖合成代谢相关的 DEPs 共 160 个。进一步筛选得到 23 个与枸杞多糖相关 DEPs,包括蔗糖磷酸合成酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和  $\alpha$ -半乳糖苷酶等。推测采自不同产地的枸杞果实的多糖合成代谢差异通路主要包括蔗糖、纤维素、半乳糖、半纤维素和果胶合成代谢过程,且这些过程均可通过 UDP-葡萄糖链接在一起。通过蛋白组学分析枸杞多糖合成途径上的相关蛋白,为深入研究不同产地同种枸杞多糖调控机制提供理论参考。

**关键词** 枸杞; 枸杞多糖(LBP); 差异表达蛋白(DEPs); 多糖合成代谢途径

**文章编号** 1009-7848(2023)09-0295-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.031

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科,多年生落叶灌木,是我国珍贵的传统药用植物<sup>[1]</sup>,也是药食同源品种之一<sup>[2]</sup>,具有抗炎、抗老和神经保护等多种生物学功能<sup>[3-5]</sup>。其种植区域从传统的宁夏中宁产区,逐渐扩展为“宁夏道地产区为核心,青海、甘肃、新疆、内蒙为两翼”的大枸杞种植区<sup>[6]</sup>。枸杞多糖(*Lycium Barbarum polysaccharides*, LBP)是枸杞的主要活性成分,是一种有效的抗氧化剂<sup>[7]</sup>。由于环境因素不同,导致不同产地枸杞的品质存在很大差异<sup>[8]</sup>,而枸杞多糖结构和活性是否存在典型的地区差异,对其质量评价和产品研发有至关重要的作用<sup>[9]</sup>。

基于同位素标记相对和绝对定量(Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation, iTRAQ)技术的蛋白组学分析,广泛应用于植物蛋白的识别和定性、定量分析中,该技术可同时比较 8 个样品的表达量<sup>[10]</sup>。目前关于不同产区枸杞多糖的研究已有报道。Wang 等<sup>[9]</sup>的研究发现,青海产地的枸杞果实明显大于宁夏和新疆,而其产量低于其它产地,研究还发现不同产地枸杞多糖的单糖组成、分子质量和构象相似,抗氧化和免疫活性结果也一致。徐金楠等<sup>[11]</sup>通过对不同产地枸杞多糖

结构特征对比,发现不同产地的枸杞多糖结构相似,且环境因素对多糖糖环形式和单糖组成的影响比品种因素大。在蛋白水平探究不同产地枸杞多糖差异的相关报道较少,课题组前期比较了不同产地枸杞多糖的含量、分子质量、单糖组成以及结构特征,通过 iTRAQ 技术比较枸杞蛋白表达差异<sup>[12]</sup>,而未分析枸杞多糖的相关蛋白。本文基于前期 iTRAQ 定量蛋白组学技术,对不同产地“宁杞 1 号”枸杞果实的蛋白质进行分析,筛选出与枸杞多糖合成代谢相关的蛋白质,并初步推测枸杞多糖合成代谢相关通路,为不同产地枸杞多糖的差异提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

SDS(色谱纯)、Urea(色谱纯)、二硫苏糖醇(色谱纯)、碘乙酰胺(色谱纯),美国 Bio-Rad 公司;碳酸氢铵(色谱纯)、Tris(色谱纯)、三氟乙酸(色谱纯),美国 Sigma-Aldrich 公司;甲酸(色谱纯),德国 Fluka 公司;乙腈(色谱纯),德国 Merck 公司;其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 设备与仪器

液相色谱系统(Easy nLC)、质谱仪(Q Exactive)、微量紫外光度计(2000c)、酶标仪(Multi-skan FC),美国 Thermo Scientific;低温高速离心

收稿日期: 2022-09-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160534)

第一作者: 马瑞雪,女,硕士生

通信作者: 范艳丽 E-mail: fanyanli\_fyl@163.com

机(5430R)、真空离心浓缩仪(Concentrator Plus),德国 Eppendorf 公司;超声破碎仪(JY92-II),宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 采样 枸杞样品为分别采摘自宁夏中宁、新疆精河、内蒙古乌拉特前旗、甘肃瓜州和青海德令哈的“宁杞1号”枸杞。于7月枸杞夏果期,选择6年生树势健壮、栽培管理一致的“宁杞1号”代表性植株5株,从开花坐果起第32天进行取样。共设3个重复,兼顾东、西、南、北4个方向及上、下、内、外各个方位的果实,并将其充分混匀。取样后立即用液氮冷冻24h,并用-80℃冰箱贮藏,待所有产地全部采样完成后,用干冰冷冻快递至上海美吉生物科技有限公司进行测样。

1.3.2 蛋白质提取与定量 将5%TCA/丙酮(1:9)加入枸杞细粉中,并用涡旋混匀。混合物在-20℃下沉淀4h后离心(6 000×g,40 min),并将沉淀风干。将30%的SDT缓冲液加入20 μg粉末中,混合煮沸5 min,并在80 W的条件下匀浆超声10次,每次10 s,间歇15 s。煮沸15 min并离心(14 000×g,40 min),用0.22 μm过滤器过滤上清液。用BCA蛋白检测试剂盒测定蛋白质含量,并于-80℃保存。采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对枸杞蛋白进行验证。

1.3.3 蛋白质消化 利用过滤辅助样品制备程序进行蛋白质消化<sup>[13]</sup>,并用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白质含量。

1.3.4 iTRAQ 标记 按说明使用iTRAQ试剂标记每个枸杞样品的100 μg肽混合物。蛋白质样品分别标记为113(宁夏中宁)、114(新疆精河)、115(内蒙古乌拉特前旗)、116(甘肃瓜州)及117(青海德令哈)。

1.3.5 分离标记肽 利用纯化系统通过强阳离子交换SCX色谱分离iTRAQ标记的肽。用缓冲液A(25% ACN、10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 3.0)酸化重组干燥的肽混合物,并将其装入聚硫乙基(4.6×100) mm柱(5 μm,200Å)。用缓冲液B(500 mmol/L KCl,10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,25% ACN,pH 3.0)以1 mL/min的流速梯度洗脱肽。缓冲液B吸光度值的线性梯度和后续步骤与前人研究方法相同<sup>[14]</sup>。

1.3.6 液相色谱-串联质谱分析 液相色谱-串联

质谱(LC-MS/MS)分析的方法与Wang等<sup>[15]</sup>的研究相同。每个样品都采用液相色谱系统Easy nLC分离。0.1%甲酸为缓冲液A,0.1%甲酸(84%乙腈)为缓冲液B,色谱柱与95%缓冲液A平衡。将样品从自动进样器装入装载柱,并通过ntelliFlow技术用分析柱分离,流速为300 nL/min。在Q Exactive上进行LC-MS/MS分析,并将其与Easy nLC耦合。

1.3.7 数据库搜索和蛋白质鉴定与定量 质谱的鉴定和定量通过Proteome Discoverer 1.4和MaxQuant 2.2进行。用蛋白表达倍数≥1.2或≤0.83且P<0.05来确定上调或下调差异表达蛋白(DEPs),用t检验进一步分析蛋白质比值。

1.3.8 生物信息学分析 以宁夏中宁“宁杞1号”枸杞作为相对定量参考,采用层次聚类算法对5个产地的总蛋白质进行聚类分析,对所有DEPs进行KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。后将各个比较组DEPs通过蛋白质ID在uniprot网站进行查找,标注所有DEPs的主要功能,并筛选出与多糖合成相关的DEPs。将筛选的DEPs通过STRING软件构建蛋白质互作网络(protein-protein interaction, PPI),利用KEGG通路结合筛选后的DEPs推测出多糖合成代谢途径。

## 2 结果与分析

### 2.1 枸杞蛋白质质谱鉴定和聚类分析

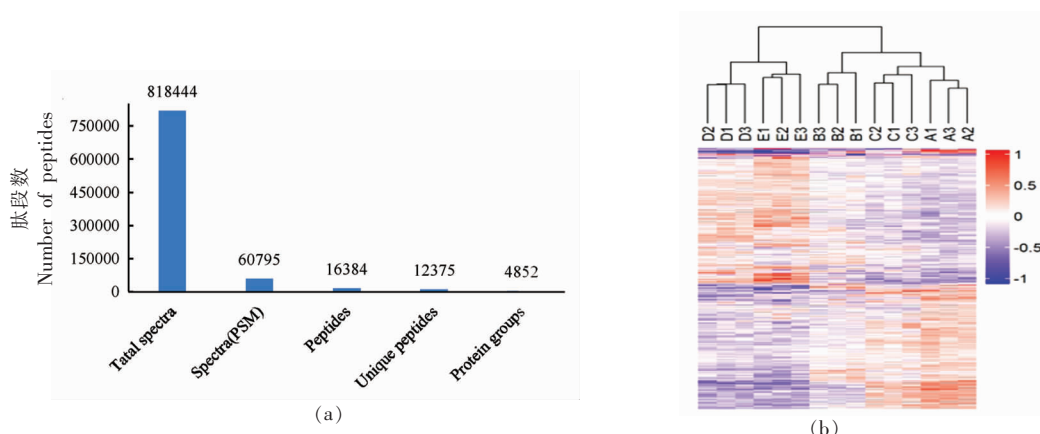
质谱数据(图1a)表明共有818 444个LC-MS/MS谱与已知谱进行了匹配;匹配谱数为60 795个,利用率为7.43%;得到16 384个肽段;其中鉴定到的唯一肽段总数有12 375个。这些肽共鉴定得到4 852个蛋白质,表明采自宁夏、新疆、内蒙古、甘肃和青海的“宁杞1号”枸杞共鉴定出4 852个蛋白质。将鉴定到的蛋白进行聚类分析(图1b),结果表明采自各产地的枸杞样品的3次重复结果较好,蛋白组学测定结果可靠。

### 2.2 差异蛋白筛选与分析结果

4个比较组共鉴定出1 437个DEPs,如图2a,青海/宁夏组的DEPs数量最多,共1 015个。其次是甘肃/宁夏组和新疆/宁夏组,分别是966个和446个。而内蒙古/宁夏组的DEPs最少,共166个。此外,各比较组上调的DEPs数量均小于下调

的。将 4 个比较组的 DEPs 做 Venn 图,结果如图 2b 所示,发现在 4 个比较组中都存在的 DEPs 有

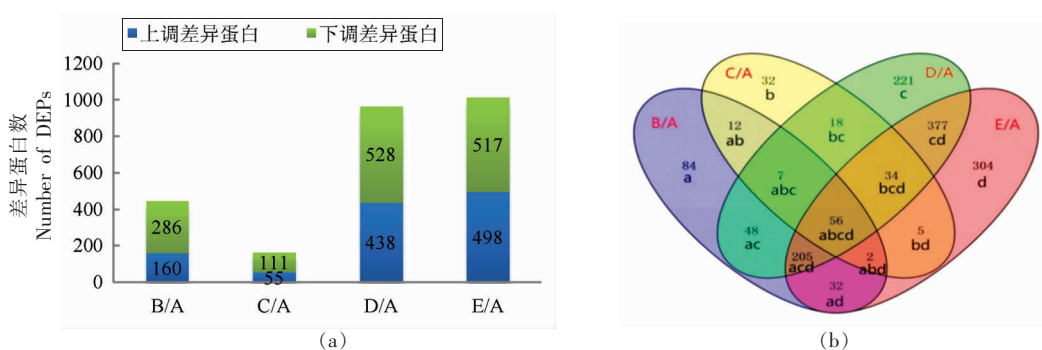
56 个,且新疆/宁夏组、青海/宁夏组和内蒙古/宁夏组共有的 DEPs 最少,共 2 个。



注:A,B,C,D,E 分别代表宁夏、新疆、内蒙古、甘肃和青海;1,2,3 代表 3 次重复试验。

图 1 蛋白质鉴定(a)和聚类分析(b)

Fig.1 Mass spectrometry identification results(a) and Cluster analysis(b)



注:A,B,C,D,E 分别代表宁夏、新疆、内蒙古、甘肃和青海。

图 2 DEPs 分布及重叠情况

Fig.2 Distribution and overlap of DEPs

### 2.3 差异蛋白 KEGG 通路分析

对新疆/宁夏组、内蒙古/宁夏组、甘肃/宁夏组及青海/宁夏组的 DEPs 进行 KEGG 通路分析,并将各组注释到 DEPs 数最多的前 20 个通路列出。结果如图 3 所示,新疆和宁夏比较组 KEGG 途径中 DEPs 数目最多的条目是“碳代谢”,其次为“氨基酸的生物合成”和“核糖体”。内蒙古和宁夏比较组 KEGG 途径中 DEPs 数目最多的条目是“内质网蛋白质加工”,其次为“氨基酸的生物合成”和“嘌呤代谢”。甘肃和宁夏比较组 KEGG 途径中 DEPs 数目最多的条目是“碳代谢”,其次为“氨基酸的生物合成”和“核糖体”。青海和宁夏比较组

KEGG 途径中 DEPs 数目最多的条目是“碳代谢”,其次为“氨基酸的生物合成”和“内质网蛋白质加工”。在 4 个比较组中 DEPs 占比最大的是光合有机体的“碳代谢”,中心碳代谢是所有生物体最基本的细胞代谢途径之一<sup>[16]</sup>,而且光合作用本身是糖合成和运输的决定性因素,并连接着调节果实发育的环境和生物因素<sup>[17]</sup>。

### 2.4 枸杞中多糖相关 DEPs 筛选

筛选与枸杞多糖合成代谢相关的 DEPs,共 160 个。结果如图 4 所示,青海/宁夏组得到的相关差异蛋白最多,共 102 个;内蒙古/宁夏组得到的相关差异蛋白最少,共 11 个。

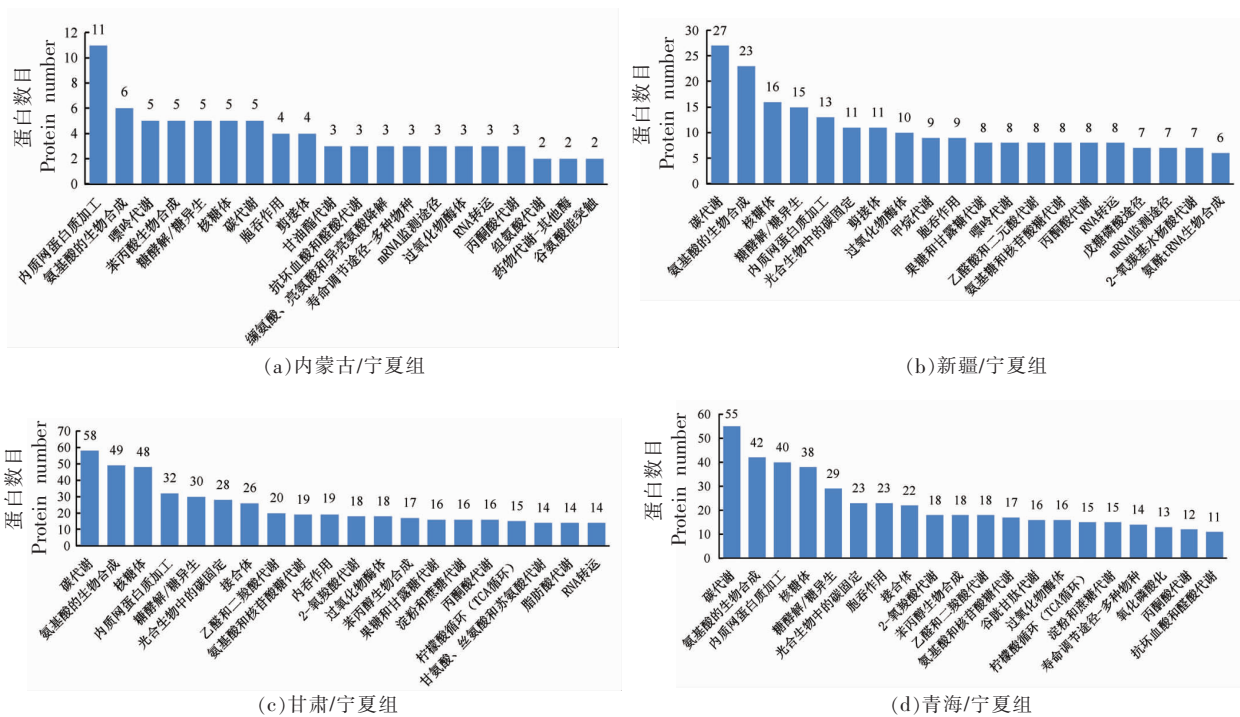
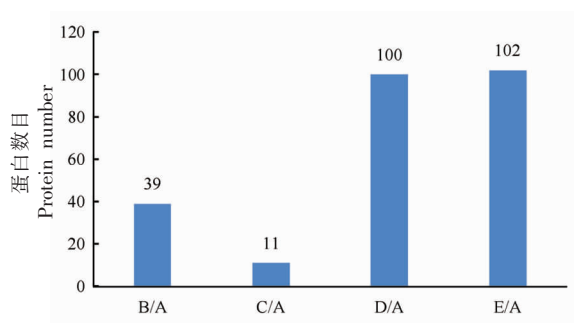


图 3 差异蛋白 KEGG 通路注释

Fig.3 KEGG pathway annotation of protein expression



注:A,B,C,D,E 分别代表宁夏、新疆、内蒙古、甘肃和青海。

图 4 各个比较组蛋白筛选结果

Fig.4 Screening results of proteins in each comparison group

进一步筛选后,除去未表征蛋白和在 KEGG 通路中无法注释的外,与枸杞多糖相关的 DEPs 共 23 个,得到的多数表达蛋白与植物多糖合成代谢有直接关系。而这 23 个 DEPs 大多表征在甘肃/宁夏组和青海/宁夏组中,且在新疆/宁夏组和内蒙古/宁夏组中多不显著表达( $P>0.05$ ),因此剔除这两个比较组,只比较甘肃/宁夏组和青海/宁夏组,得到的结果如表 1 所示。

表 1 不同产地枸杞果实多糖相关差异蛋白筛选

Table 1 Screening of wolfberry polysaccharide related proteins from different habitats

蛋白 ID	注释	甘肃/宁夏组		青海/宁夏组	
		差异倍数	P 值	差异倍数	P 值
K4ATD8	UDP-芹菜糖/木糖合酶[AXS]	0.739	0.03	0.6361	0.0097
M1CAG8	UDP-阿拉伯吡喃糖突变酶[5.4.99.30]	1.3412	0.0069	1.3227	0.0118
K4B740	UDP 葡萄糖 6-脱氢酶[EC:1.1.1.22]	1.4086	0.0026	1.3427	0.0066
M1C5Y4	UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶[EC:4.1.1.35]	-	-	0.6962	0.0226
A0A0V0IJ15	$\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸转移酶[EC:2.4.1.43]	1.3828	0.0002	-	-
Q76LU4	$\alpha$ -N-阿拉伯吡喃糖苷酶[EC:3.2.1.55]	0.7225	0.0062	0.729	0.0087
A0A0V0I9A6	$\alpha$ -半乳糖苷酶[EC:3.2.1.22]	0.6348	0.0139	0.6248	0.0092

(续表 1)

蛋白 ID	注释	甘肃/宁夏组		青海/宁夏组	
		差异倍数	P 值	差异倍数	P 值
A0A0V0IEK3	$\beta$ -1,3-葡聚糖酶 [EC:3.2.1.39]	-	-	2.4281	0.0375
A0A0V0IBS4	$\beta$ -1,3-葡聚糖酶[EC:3.2.1.39]	-	-	1.5388	0.0245
M1CWU2	$\beta$ -D-木糖苷酶 4 [EC:3.2.1.37]	1.3795	0.0021	-	-
M1ARH9	$\beta$ -果糖呔喃糖苷酶[EC:3.2.1.26]	0.5884	0.001	0.8301	0.0425
K4C994	$\beta$ -葡萄糖苷酶[EC:3.2.1.21]	1.2276	0.0076	1.2909	0.0173
K4DEV8	$\beta$ -葡萄糖苷酶[EC:3.2.1.21]	1.3095	0.0007	1.2517	0.0026
M1A467	$\beta$ -葡萄糖苷酶[EC:3.2.1.21]	1.7415	0.0088	1.6979	0.031
Q8S345	果胶酸裂解酶[EC:4.2.2.2]	1.5385	0.0035	2.6294	0.0021
M1BIS5	果胶酯酶[EC:3.1.1.11]	1.2553	0.0131	-	-
P37829	果糖激酶[EC:2.7.1.4]	1.2875	0.0366	-	-
K4C7S0	己糖激酶[EC:2.7.1.1]	1.2343	0.0152	1.2684	0.0132
M1B8D0	可逆糖基化多肽/ UDP-阿拉伯吡喃糖突变酶 [EC5.4.99.30]	-	-	1.4231	0.0387
A0A0V0IP07	磷酸葡萄糖变位酶[EC:5.4.2.2]	-	-	1.2546	0.001
K4C285	葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶[EC:2.7.7.9]	1.2151	0.0134	-	-
Q84T18	蔗糖合成酶[EC:2.4.1.13]	-	-	0.7965	0.0293
A0A059T2S5	蔗糖磷酸合成酶[EC:2.4.1.14]	0.7988	0.0077	0.6999	0.0041

### 2.5 蛋白质互作网络(PPI)的构建

由于缺乏枸杞及其近边缘物种的蛋白质互作，故而通过茄科的同源性蛋白构建蛋白质互作网络(图 5)。利用 160 个与多糖相关的 DEPs 制作蛋白质互作互作用最明显的一组由 21 个 DEPs 组成,包括:糖基转移酶家族(K4CPX6、K4CMS0)、

己糖激酶家族(K4C7S0)、ATP 依赖的 6-磷酸果糖激酶 (K4CES3)、 $\alpha$ -1,4-葡聚糖磷酸化酶 (K4CSQ2) 及一些尚未被验证的蛋白(annotation not available)。另一组由 6 个 DEPs 组成,包括 $\beta$ -半乳糖苷酶 (E3UVW7), $\alpha$ -半乳糖苷酶 (K4BP29)、 $\alpha$ -甘露糖苷酶(E0XN34)及一些尚未

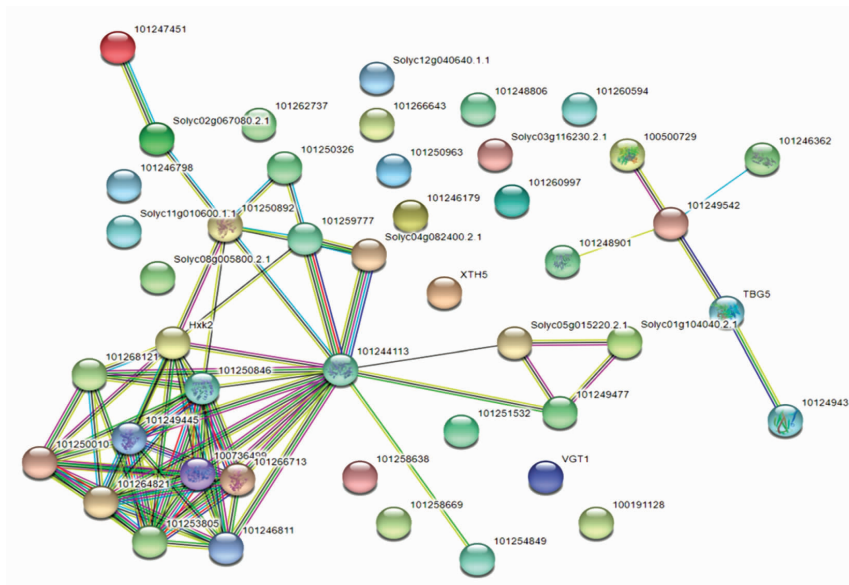


图 5 筛选后差异表达蛋白的相互作用网络

Fig.5 Interaction network of differentially expressed proteins after screening

被验证的蛋白(annotation not available)。

## 2.6 枸杞多糖相关蛋白通路分析

植物中的多糖主要分为纤维素、半纤维素和果胶三大类<sup>[18]</sup>,并利用这 23 个多糖相关蛋白与 KEGG 通路分析结合,初步预测枸杞多糖合成代谢相关通路,主要有 5 个过程。这些过程并非单独存在,而是由 UDP-葡萄糖连接在一起的,UDP-葡萄糖通过一系列反应参与果胶物质、半纤维素、糖脂和其它糖基化分子的合成<sup>[19]</sup>,因此多糖的合成是通过 UDP-葡萄糖池的通量进行碳分配和循环<sup>[20]</sup>。在多糖合成代谢的过程中,当不同产地的同一个蛋白的表达倍数存在差异时,可能导致其多糖合成代谢也存在差异。

### 2.6.1 蔗糖合成分解代谢过程

蔗糖合成和分解代谢的过程如图 6 所示,蔗糖磷酸合成酶(EC:2.4.1.14,SPS)先催化果糖-6-磷酸和 UDP-葡萄糖转化为蔗糖-6-磷酸。通过对不同淀粉叶物种茄科植物番茄、马铃薯和烟草等植物的 SPS 过表达的分析得到证实,SPS 活性与这些物种叶片的蔗糖合成率呈正比关系<sup>[21]</sup>。青海和甘肃枸杞中 SPS 的表达量低于宁夏枸杞(表 1),推测宁夏蔗糖合成率可能高于青海和甘肃。郑国琦<sup>[22]</sup>研究发现不同发育期枸杞果实中枸杞多糖含量的积累与蔗糖含量呈负显著相关,表明宁夏中宁产地枸杞的多糖含量可能会低于青海和甘肃,但这与课题组前期试验结果并不一致<sup>[12]</sup>。前期枸杞多糖含量测定结果表明,青海和宁夏产地微高于甘肃产地,导致这一结果的原因可能是 SPS 的活性与蔗糖积累量并不总是密切相关,葡萄柚汁囊中蔗糖含量增加时,SPS 活性趋于稳定<sup>[23]</sup>。

蔗糖分解代谢具有复杂的生理生化过程,主要调控因子是蔗糖代谢酶,包括蔗糖合成酶(EC:2.4.1.13,SS)和细胞壁转化酶(EC:3.2.1.26,INV),二者活性的变化明显影响了总碳水化合物的积累状态,其中 SS 的作用是双向的,促进蔗糖和 UDP-葡萄糖的平衡<sup>[24]</sup>。UDP-葡萄糖作为纤维素合成的底物,通过 SS 被引导到纤维素合成酶复合物,催化蔗糖裂解生成 UDP-葡萄糖和果糖<sup>[25]</sup>。SPS(果糖-6-磷酸+UDP-葡萄糖)通过循环使果糖生成蔗糖,为 SS 提供连续的底物,以 UDP-葡萄糖的形式进行纤维素的生物合成,同时限制了细胞内果

糖的数量<sup>[26]</sup>。如表 1 所示,青海枸杞蛋白中的 SS 表达量低于宁夏,可能会导致青海枸杞中纤维素的前体底物 UDP-葡萄糖较少,使纤维素含量较少,影响枸杞多糖合成。

### 2.6.2 纤维素合成代谢过程

纤维素合成代谢的过程如图 6 所示,一部分 UDP-葡萄糖通过一系列反应生成纤维素后,纤维素需要一个酶联合体来逐渐将纤维素分解,最终代谢为葡萄糖;另一部分 UDP-葡萄糖生成 1,3- $\beta$ -葡聚糖和  $\beta$ -葡萄糖苷,并分别由  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(EC:3.2.1.39,GN5-6)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC:3.2.1.21,BGL)最终代谢为葡萄糖<sup>[27]</sup>。研究表明纯化后的野生杏  $\beta$ -葡萄糖苷酶(EC:3.2.1.21,BGL)对纤维素材料的糖化具有高亲和力和催化能力<sup>[28]</sup>。纤维素的底物 UDP-葡萄糖通过一系列酶的作用转化为纤维素是利用一个高效的酶联合体来水解纤维素,转化为葡萄糖通常需要 3 种酶:内切葡聚糖酶(EC:3.2.1.4,EG)、外切葡聚糖酶(EC:3.2.1.91,CBH)和 BGL。如表 1 所示,在酶联合体中,除青海和甘肃枸杞中 BGL 的表达量高于宁夏枸杞外,未发现其它两种酶有差异表达,推测 BGL 可能是导致青海和甘肃与宁夏枸杞的纤维素水解效果速率产生差异的主要原因。在纤维素水解过程中,产物葡萄糖在很多情况下会抑制 BGL 的活性<sup>[29]</sup>,因而青海和甘肃产地枸杞多糖中的葡萄糖含量可能会低于宁夏产地,这一结果与前期研究一致<sup>[12]</sup>。

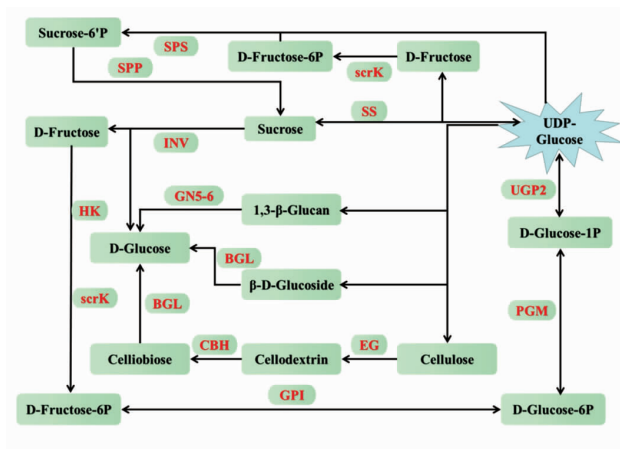


图 6 蔗糖与纤维素合成代谢过程

Fig.6 The synthesis and metabolism of sucrose and cellulose

2.6.3 半乳聚糖合成代谢过程 如图 7 所示, UDP-葡萄糖-4-表异构酶 (EC: 5.1.3.2, galE) 催化 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖相互转化。UDP-半乳糖在半乳糖醇合成酶 (EC:2.4.1.123, GOLS) 的作用下生成半乳糖醇, 半乳糖醇作为半乳糖基供体, 分别由棉子糖合成酶 (EC:2.4.1.82, E2.4.1.82) 和水苏糖合成酶 (EC:2.4.1.67, E2.4.1.67) 这两种专门的合成酶合成棉子糖和水苏糖; 随后由  $\beta$ -呋喃果糖苷酶 (EC:3.2.1.26, INV) 将两种糖分别水解成蜜二糖和甘露三糖; 最后由  $\alpha$ -半乳糖苷酶 (EC:3.2.1.22, GLA) 水解棉子糖、水苏糖、甘露三糖和蜜二糖最终生成半乳糖和葡萄糖<sup>[30]</sup>。在拟南芥中, 棉子糖和半乳糖醇在冷适应条件下会增加, 而棉子糖的合成降解会受到半乳糖醇合成酶和棉子糖合成酶的作用<sup>[31]</sup>。在矮牵牛花中 GLA 下调会导致整个植株的耐寒性增加, 因此认为 GLA 基因的过度表达会导致内源性棉子糖含量降低, 从而减低植物抗冻性<sup>[32]</sup>。由表 1 可知甘肃和青海地区枸杞 GLA 和 INV 与宁夏地区相比表达下调, 推测甘肃和青海地区枸杞耐寒性高于宁夏, 宁夏地区枸杞棉子糖家族寡糖含量可能低于甘肃和青海地区。

2.6.4 半纤维素合成代谢过程 半纤维素主要为阿拉伯木聚糖, 如图 8 所示, UDP-葡萄糖通过 UDP-葡萄糖脱氢酶 (EC:1.1.1.22, UGDH) 不可逆地反应生成 UDP-葡萄糖醛酸, 并在 UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶 (EC 4.1.1.35, UXS)、UDP-木糖/木糖合酶 (AXS) 和其它一系列酶的作用下一部分转化为 UDP-D-芹菜糖和 UDP -D-木糖<sup>[33]</sup>, UDP-木糖通过一些与阿拉伯聚糖合成代谢相关的酶作用下进行分解代谢。UDP-葡萄糖作为转换 UDP-糖的重要分支节点在 UGDH、UXS 及 AXS 和 UDP-阿拉伯糖-4-表异构酶 (EC 5.1.3.5, UXE) 的催化下分别转换为 UDP-葡萄糖醛酸、UDP-木糖和 UDP-L-阿拉伯糖。

有研究表明, 高表达的 AXS 和低表达的 UXE 会导致 UDP-木糖的积累<sup>[34]</sup>。前期研究发现<sup>[12]</sup>, 宁夏产地枸杞多糖中木糖含量高于青海, 而阿拉伯糖含量低于青海。可能因为青海枸杞中 UXS 和 AXS 的表达量均低于宁夏, 青海枸杞中 UGDH 的表达量高于宁夏而导致木糖和阿拉伯糖积累发生

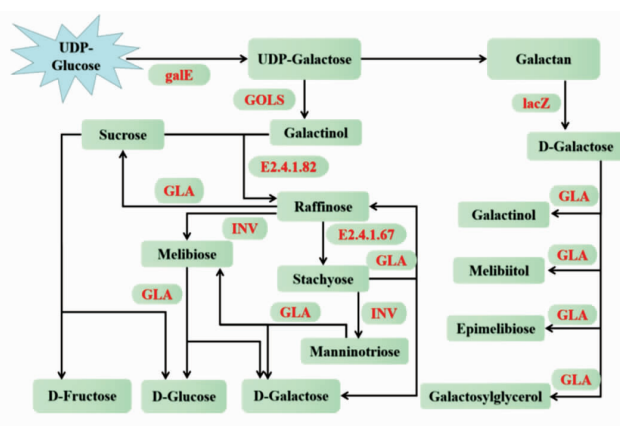


图 7 半乳聚糖合成代谢过程

Fig.7 The synthesis and metabolism of galactan

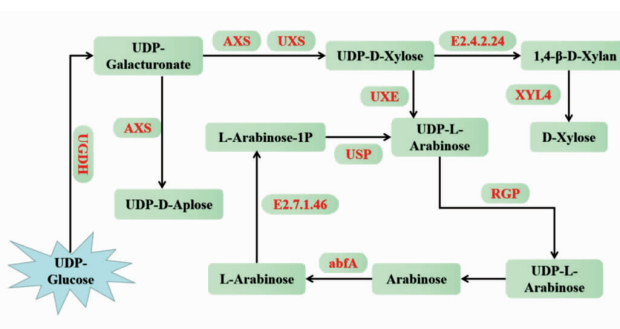


图 8 半纤维素合成代谢过程

Fig.8 The synthesis and metabolism of hemicellulose

变化。

2.6.5 果胶合成代谢过程 果胶是存在所有植物初级细胞壁中的多糖家族, 属于酸性植物细胞壁多糖, (1,4)-链接的  $\beta$ -D-吡喃半乳糖醛酸作为骨架结构的一部分。如图 9 所示, UDP-葡萄糖-4-表异构酶 (EC: 5.1.3.2, galE) 催化 UDP-葡萄糖和 UDP-半乳糖相互转化, UDP-半乳糖醛酸在  $\alpha$ -1,4-半乳糖醛酸转移酶 (EC:2.4.1.43, GAUT) 的作用下生成果胶, 而 PG (EC 3.2.1.15) 和果胶酯酶 (EC: 3.1.1.11, E3.1.1.11) 是最佳的果胶修饰酶, 可降解果胶<sup>[35-36]</sup>。

果胶裂解酶 (EC:4.2.2.2, PLY) 主要通过降解原代细胞壁中的果胶在植物生长发育过程中发挥重要作用, 能够促进细胞的扩张和分化<sup>[38-39]</sup>。在植物中, 已经证实, 在香蕉等水果的成熟和软化过程中 PLY 参与果胶多糖主链的降解<sup>[37]</sup>。果胶酯酶 (EC:3.1.1.11, E3.1.1.11) 是一种羧酸酯酶, 属于水

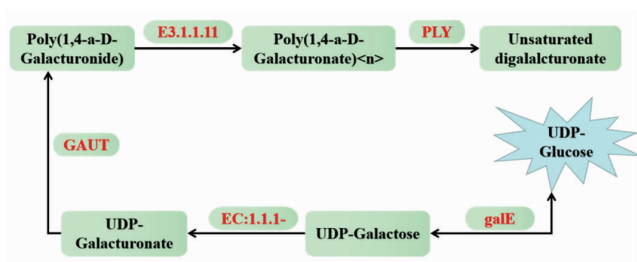


图9 果胶合成代谢过程

Fig.9 The synthesis and metabolism of pectin

解酶类,该酶通过使细胞壁中存在的多半乳糖醛酸果胶主链中的甲基化羧基脱酯化,促进果胶的降解,从而提高了多半乳糖醛酸酶的效率<sup>[40]</sup>。甘肃和青海地区枸杞中 PLY 和 E3.1.1.11 的表达量与宁夏产地有差异,PLY 和果胶酯酶可能对枸杞果实中的果胶多糖具有一定的降解作用,从而影响不同产地枸杞多糖差异。

### 3 结论

本文基于 iTRAQ 结合 2D LC-MS/MS 的技术研究不同产地“宁杞 1 号”枸杞的蛋白质差异,共筛选到 1 437 个 DEPs,进行 KEGG 通路注释,进一步筛选发现与枸杞多糖相关的差异表达蛋白共 23 个,推测枸杞多糖合成代谢通路,主要分为蔗糖合成代谢、纤维素合成代谢、半乳聚糖合成代谢、阿拉伯木聚糖合成代谢及果胶合成代谢 5 个过程,主要参与其中的酶为蔗糖磷酸合成酶、蔗糖合成酶、UDP-葡萄糖醛酸脱羧酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶、果胶酯酶和果胶裂解酶等,这些酶可能是影响不同产地枸杞多糖差异的重要蛋白。本文为深入了解不同产地枸杞多糖差异变化机理提供了一定的参考,下一步可针对不同成熟期的枸杞进一步分析,以探究不同产地枸杞多糖变化规律。

### 参 考 文 献

- [1] JIA G L, XIN G L, REN X L, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of *Lycium barbarum* (Solanales: Solanaceae), a unique economic plant to China[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2018, 3(2): 1062-1063.
- [2] 徐常青,刘赛,徐荣,等.我国枸杞主产区生产现状调研及建议[J].中国中药杂志,2014,39(11): 1979-1984.  
XU C Q, LIU S, XU R, et al. Investigation and suggestions on the production status of main *Lycium barbarum* producing areas in China[J]. Journal of traditional Chinese Medicine, 2014, 39(11): 1979-1984.
- [3] THIHARA R F, AMANDA C R K, PAMELA G D S, et al. Effects of electron beam irradiation on the bioactive components of goji-berry [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2021, 179: 109144.
- [4] ZHANG J J, LIU X, PAN J H, et al. Anti-aging effect of brown black wolfberry on *Drosophila melanogaster* and D-galactose-induced aging mice [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 65 (C): 103724-103724.
- [5] KUMARI N, SONALI D, RALENE S, et al. Fructus lycii: a natural dietary supplement for amelioration of retinal diseases[J]. Nutrients, 2021, 13(1): 246-246.
- [6] 金莹,韩东钊.中国枸杞五大主产区产业竞争力综合评价研究[J].林业经济问题,2018,38(3): 86-91, 111.  
JIN Y, HAN D Z. Study on comprehensive evaluation of industrial competitiveness of five main *Lycium barbarum* producing areas in China[J]. Forestry Economic Issues, 2018, 38(3): 86-91, 111.
- [7] NI J G, AU M T, KONG H K, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides in ageing and its potential use for prevention and treatment of osteoarthritis: a systematic review[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2021, 21(1): 212.
- [8] MENG J, LIU Z, GOU C L, et al. Geographical origin of Chinese wolfberry (goji) determined by carbon isotope analysis of specific volatile compounds[J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1105: 104-112.
- [9] WANG Y, JIN H Y, DONG X X, et al. Quality evaluation of *Lycium barbarum* (wolfberry) from different regions in China based on polysaccharide structure, yield and bioactivities[J]. Chinese Medicine, 2019, 14(49): 2-10.
- [10] 马聪聪,张九凯,韩建勋,等.基于 iTRAQ 定量蛋白质组学的三文鱼新鲜度分析[J].食品科学,2020,41(21): 44-51.



- MA C C, ZHANG J K, HAN J X, et al. Freshness analysis of salmon based on iTRAQ quantitative proteomics[J]. *Food Science*, 2020, 41(21): 44–51.
- [11] 徐金楠, 刘玮, 刘春晶, 等. 不同枸杞中多糖含量与结构特征的对比研究[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(4): 233–239.
- XU J N, LIU W, LIU C J, et al. Comparative study on the content and structural characteristics of polysaccharides in different *Lycium barbarum* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(4): 233–239.
- [12] 韩丽娜. 不同产地“宁杞1号”枸杞的多糖组成及蛋白表达差异研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2018: 1–32.
- HAN L N. Study on the difference of polysaccharide composition and protein expression of ‘Ningqi No. 1’ *Lycium barbarum* from different producing areas[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2018: 1–20.
- [13] WIŚNIEWSKI J R, ALEXANDRE Z, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods: Techniques for Life Scientists and Chemists*, 2009, 6(5): 359–362.
- [14] LIN M M, FANG J B, QI X J, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals alterations in the metabolism of *Actinidia arguta*. [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5670.
- [15] WANG L X, LIANG W Y, XING J H, et al. Dynamics of chloroplast proteome in salt-stressed mangrove *Kandelia candel* (L.) druce[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(11): 5124–5136.
- [16] ARREN B E, AVI F, ELAD N, et al. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(6): 509–517.
- [17] 胡举伟, 代欣, 宋涛, 等. 不同光质对桑树幼苗生长和光合特性的影响[J]. *植物研究*, 2019, 39(4): 481–489.
- HU J W, DAI X, SONG T, et al. Effects of different light quality on growth and photosynthetic characteristics of mulberry seedlings [J]. *Plant Research*, 2019, 39(4): 481–489.
- [18] CAFFALL K H, MOHNEN D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides[J]. *Carbohydrate Research*, 2009, 344(14): 1879–1900.
- [19] VESTAL R E, THUMMEL K E, MUSSER B, et al. Cimetidine inhibits theophylline clearance in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a study using stable isotope methodology during multiple oral dose administration [J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1983, 15(4): 411–418.
- [20] ANDRADE F H. Photoassimilate distribution in plants and crops: Source-sink relationships[J]. *Field Crops Research*, 1997, 52(3): 285–286.
- [21] HASHIDA Y, HIROSE T, OKAMURA M, et al. A reduction of sucrose phosphate synthase (SPS) activity affects sucrose/starch ratio in leaves but does not inhibit normal plant growth in rice[J]. *Plant Science*, 2016, 253: 40–49.
- [22] 郑国琦. 宁夏枸杞果实结构、发育与糖分积累关系研究[D]. 西安: 西北大学, 2011: 1–10.
- ZHENG G Q. Study on the relationship between fruit structure, development and sugar accumulation of *Lycium barbarum* in Ningxia [D]. Xi’an: Northwestern University, 2011: 1–10.
- [23] 蒲小秋. 枣果实糖积累和代谢酶活性变化及其基因表达的研究[D]. 塔里木: 塔里木大学, 2017: 4–20.
- PU X Q. Study on sugar accumulation, metabolic enzyme activity and gene expression in jujube fruit [D]. Tarim: Tarim University, 2017: 4–20.
- [24] WANG L, CUI N, ZHAO X C, et al. Accumulation of carbohydrate and regulation of 14–3–3 protein on sucrose phosphate synthase (SPS) activity in two tomato species[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2014, 13(2): 358–364.
- [25] HAIGLER C H, IVANOVA -DATCHEVA M, HOGAN P S, et al. Carbon partitioning to cellulose synthesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 47(1/2): 29–51.
- [26] DELMER D. Cellulose biosynthesis: Exciting times for a difficult field of study[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50(50): 245–276.
- [27] CHOUDHURY S R, ROY S, SENGUPTA D N. Characterization of cultivar differences in  $\beta$ -1,3 glucanase gene expression, glucanase activity and fruit pulp softening rates during fruit ripening in three naturally occurring banana cultivars [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(11): 1641–1653.
- [28] BEŠIĆ L, AŠIĆ A, MUHOVIĆ I. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from brassica oler-

- acea[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2016, 41(2): 1–7.
- [29] PANG P J, CAO L C, LIU Y H, et al. Structures of a glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase provide insights into its mechanism[J]. Journal of Structural Biology, 2017, 198(3): 154–162.
- [30] DU F, ZHU M J, WANG H X, et al. Purification and characterization of an  $\alpha$ -galactosidase from *Phaseolus coccineus* seeds showing degrading capability on raffinose family oligosaccharides[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 69: 49–53.
- [31] TAJI T, OHSUMI C, IUCHI S, et al. Important roles of drought - and cold - inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2002, 29(4): 417–426.
- [32] PENNYCOOKE J C, JONES M L, STUSHNOFF C. Down-regulating  $\alpha$ -galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia[J]. Plant Physiology, 2003, 133(2): 901–909.
- [33] GUYETT P, GLUSHKA J, GU X G, et al. Real-time NMR monitoring of intermediates and labile products of the bifunctional enzyme UDP-apiose/UDP-xylose synthase [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(9): 1072–1078.
- [34] HAN X X, ZHANG L J, MIAO X M, et al. Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of mucilage biosynthesis during *Artemisia sphaerocephala* seed development [J]. Industrial Crops & Products, 2020, 145: 111991.
- [35] LAKE M R, WILLIAMSON C L, SLOCUM R D. Molecular cloning and characterization of a UDP-glucose-4-epimerase gene (*galE*) and its expression in pea tissues[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1998, 36(8): 555–562.
- [36] IWAI H, MASAOKA N, ISHII T, et al. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 99(25): 16319–16324.
- [37] KAMIJO J, SAKAI K, SUZUKI H, et al. Identification and characterization of a thermostable pectate lyase from *Aspergillus luchuensis* var *saitoi*[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 503–510.
- [38] CARPITA N C, GIBEAUT D M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth[J]. The Plant Journal, 1993, 3(1): 1–30.
- [39] WANG T, ZABOTINA O, HONG M. Pectin-cellulose interactions in the *Arabidopsis* primary cell wall from two-dimensional magic-angle-spinning solid-state nuclear magnetic resonance [J]. Biochemistry, 2012, 51(49): 9846–9856.
- [40] WU M C, TSENG K C, HUANG T H. Pectinesterase inhibitor in rubbery banana (*Musa sapientum* L.) [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(4): 1337–1340.

## The Difference of Polysaccharide Synthesis and Metabolism of ‘Ningqi No. 1’ *Lycium Barbarum* Fruits from Different Producing Areas

Ma Ruixue, Kou Tingting, Sun Xiazhi, Fan Yanli\*

(College of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021)

**Abstract** Based on iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantity, iTRAQ) technology, the bioinformatics analysis of differential proteomics were carried out with the fruits of ‘Ningqi No. 1’ wolfberry collected from Zhongning, Ningxia as samples and the fruits of ‘Ningqi No. 1’ wolfberry collected from Jinghe, Xinjiang, wulateqian banner, Inner Mongolia, Guazhou, Gansu and Delingha, Qinghai as controls. The results showed that there were 446, 166, 966 and 1 015 differentially expressed proteins (DEPs) in Xinjiang/Ningxia group, Inner Mongolia/Ningxia group, Gansu/Ningxia group and Qinghai/Ningxia group respectively, and 160 DEPs related to *Lycium barbarum* polysaccharide synthesis and metabolism. Through further screening, 23 DEPs related to *Lycium barbarum* polysaccharides were obtained, including sucrose phosphate synthase,  $\beta$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Galactosidase, etc. It was speculated that the different pathways of polysaccharide anabolism in *Lycium barbarum* fruits from different producing areas mainly included sucrose, cellulose,

galactan, hemicellulose and pectin anabolism, and these processes can be linked together with UDP-glucose. This study analyzed the related proteins in the synthesis pathways of *Lycium barbarum* polysaccharides by proteomics, which provides a theoretical basis for further study on the regulation mechanism of the same *Lycium barbarum* polysaccharide from different producing areas.

**Keywords** Wolfberry (*Lycium barbarum* L.); *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP); differentially expressed proteins (DEPs); pathway of polysaccharide synthesis and metabolism