

基于蛋白组学分析不同产地枸杞黄酮类化合物的差异

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

摘要 目的:从蛋白质组学的角度解析不同产地“宁杞 1 号”枸杞黄酮类化合物的差异。方法:以宁夏、青海和甘肃成熟期“宁杞 1 号”枸杞果实为研究对象,利用串联质谱标签(TMT)结合液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)技术,探究不同产地枸杞的蛋白差异。结果:3 个比较组共鉴定出 716 个差异表达蛋白(DEPs),KEGG 通路富集共发现 4 条与黄酮类化合物相关的代谢途径,其中苯丙烷生物合成途径在 3 个比较组中均被显著富集($P < 0.05$),表明苯丙烷生物合成途径在枸杞黄酮合成中可能做出较大贡献。筛选出 24 个与黄酮合成相关的关键差异表达蛋白,发现苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸 4-羟化酶(C4H)、查尔酮异构酶(CHI)、查尔酮合酶(CHS)等可能是宁夏、青海和甘肃枸杞黄酮类化合物生物合成的重要 DEPs。结论:从蛋白质层面鉴定出与枸杞黄酮类化合物生物合成相关的差异蛋白,初步推测枸杞黄酮类化合物合成代谢通路,为探究不同产地枸杞黄酮生物合成差异奠定基础。

关键词 枸杞; 蛋白质组学; 黄酮类化合物; 关键差异表达蛋白

文章编号 1009-7848(2024)11-0348-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.11.032

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科,是珍贵的传统药用植物^[1],也是我国公布的食药同源品种之一^[2],其果实和叶在食品行业具有较高的研究开发价值。枸杞子作为超级食物在全世界销售,主要归因于其富含多糖、酚酸、黄酮类化合物和一些微量营养素^[3-4]。枸杞起源于美洲,现已广泛种植于中国西北部、意大利和南欧等地区^[5-6]。在我国,其种植产地从单一的宁夏中宁,逐渐扩展至青海、甘肃、新疆、内蒙古等地^[7]。

黄酮类化合物在食源性植物中分布广泛且含量丰富,是一类重要的次生代谢产物。研究表明,黄酮类化合物不仅赋予植物多彩的颜色,还具有抗菌、抗炎、抗氧化,保护心血管和治疗肥胖等多种生理活性^[8-10]。枸杞中含有丰富的黄酮类化合物。据报道,芦丁、槲皮素和山奈酚是枸杞中主要的黄酮类化合物^[11]。迄今为止,针对枸杞中的黄酮类化合物的研究主要集中在其生理活性和含量差异方面^[12-13],关于不同产地枸杞黄酮类化合物生物合成差异调控机制研究较少。探究黄酮类化合物的代谢途径及环境对其生物合成的影响,对于推进枸杞中黄酮合成关键酶的研究,维护人类健康

具有重要意义。

基于蛋白质组学的高通量分析,是一种识别与质量性状相关的生物标志物和理解生物体生物过程的方法^[14]。近年来,串联质谱标签技术(Tandem mass tags, TMT)作为蛋白质组学常用的高通量筛选技术^[15],与高分辨率液相色谱-串联质谱技术相结合,可实现同时对 6~16 个不同样品低丰度蛋白质的定性分析。目前,蛋白组学技术虽已广泛应用于冬枣^[16]、沙棘^[17]、茶叶^[18]、山竹^[19]等植物的差异蛋白筛选和功能分析中,但在蛋白水平分析枸杞中黄酮类化合物合成及代谢相关的差异蛋白表达和调控机制的研究较少。本研究基于 TMT 体外标记技术对不同产地“宁杞 1 号”枸杞果实进行蛋白组学分析,通过生物信息学分析不同产地枸杞中蛋白质的功能,筛选出与黄酮类化合物合成及代谢相关的差异表达蛋白,为探究不同产地枸杞黄酮生物合成差异奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验样品分别于 6 月下旬、7 月中旬、8 月初采摘来自宁夏中宁(NX,N:37°41',E:105°57')、甘肃瓜州(GS,N:40°50',E:95°83')和青海诺木洪(QH,N:37°30',E:97°40')的“宁杞 1 号”成熟期枸杞果实。选择不同产地枸杞种植园中树龄为 5 岁、

收稿日期: 2023-11-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160534)

第一作者: 孙霞芝,女,硕士生

通信作者: 范艳丽 E-mail: fanyanli_fyl@163.com

连续生长的3株“宁杞1号”枸杞树,并于树的东、西、南、北4个不同方向随机采集无腐烂、无破损的新鲜枸杞果实,并将其充分混匀,形成一组,每组有3个生物学重复。各个产地均按照上述方法进行采样。将采摘后的样品立即用液氮冷冻24 h,并储存于-80℃冰箱待用。

1.2 主要试剂

十二烷基硫酸钠(SDS)、二硫苏糖醇,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、碘乙酰胺、碳酸氢铵,美国Sigma-Aldrich公司;胰蛋白酶,普洛麦格生物技术有限公司;甲酸,Fluka公司;乙腈,Merck公司;BCA试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器和设备

液相色谱、质谱仪,美国赛默飞世尔科技公司;超声破碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;Vortex振荡器,上海琪特分析仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 总黄酮含量测定 采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法测定枸杞果的总黄酮含量。称取新鲜枸杞2.00 g,充分研磨。加入30 mL 95%乙醇超声30 min(50℃),过滤后收集滤液。将上述操作重复2次,冷却定容。测定前离心10 min,取上清液。以芦丁为标准品,配制标准溶液。随后加入0.3 mL 4%的NaNO₂、0.3 mL 10%的Al(NO₃)₃和4.0 mL 5%的NaOH溶液,静置。在波长510 nm处测定各吸光值,绘制芦丁标准曲线。根据所绘制的标准曲线计算出枸杞提取物的黄酮含量。

1.4.2 总酚含量的测定 采用福林酚法测定枸杞果的总酚含量。称取枸杞1.0 g,研磨后加入25 mL乙醇,超声30 min后过滤离心(12 000 r/min)。将上述操作重复2次,合并上清液后定容50 mL。以没食子酸为标准品,配制不同浓度的标准溶液。随后,加入1 mL福林酚试剂和2 mL 12%的碳酸钠溶液,定容后避光静置2 h(室温)。于波长765 nm处测定吸光值,制作没食子酸标准曲线计算各产地枸杞总酚含量。

1.4.3 TMT蛋白质组学测定

1.4.3.1 蛋白质提取 将-80℃冷冻的鲜枸杞果实样品称取至被液氮提前预冷的研钵中,将其充

分研磨成粉末。所有样品分别按料液比1:4加入酚抽提缓冲液,随后通过超声进行裂解。取酚相后加入等体积的Tris平衡酚,5 500 r/min离心10 min(4℃)。后向上清液添加5倍体积的0.1 mol/L乙酸铵甲醇溶液,-20℃沉淀过夜。所得蛋白沉淀用甲醇和丙酮分别洗涤2次后,弃上清液。最后用尿素复溶蛋白沉淀物。采用BCA试剂盒和SDS-PAGE电泳进行蛋白浓度和完整性检验。

1.4.3.2 酶解烷基化及标记 准确取100 μg各组蛋白样品,添加裂解液直到体积达90 μL。随后,先加入10 mmol/L三(2-羧乙基)膦还原剂于37℃下反应1 h。再加入40 mmol/L碘乙酰胺在黑暗中反应40 min(常温)。分别向样品中加入预冷的丙酮,沉淀4 h后离心。取沉淀,使用50 mmol/L四乙基溴化铵溶液溶解沉淀样品,按照 $m_{\text{酶}}:m_{\text{蛋白}}=1:50$ 加入胰蛋白酶,于37℃下过夜酶解。取出-20℃保存的TMT试剂,待其恢复室温后加入乙腈溶液,充分涡旋和离心。按照1管TMT试剂加100 μg多肽样品进行肽段标记。与肽段混合的样品在常温下反应2 h,加入羟胺。最后,将同等量的标记产物混合在同一管中,真空冷冻干燥。

1.4.3.3 UPLC一维分离 采用C18柱进行UPLC液相分离。流动相A和B分别是2%和80%乙腈溶液。共洗脱66 min。设置紫外检测器的波长为214 nm,流速为200 μL/min。共收取20个组分,最终将其混合成10个组分,经真空浓缩后进行后续操作。

1.4.3.4 液相串联质谱 液质分析方法与Wang等^[20]的研究方法相同。采用纳升级液相色谱(Easy-nLC 1200)串联质谱(Q Exactive质谱仪)进行分析。液相色谱采用C18色谱柱(75 μm×25 cm)分离,设定流速为300 μL/min,流动相分别为A相2%乙腈(含0.1%甲酸),B相80%乙腈(含0.1%甲酸)。一级质谱和二级质谱的分辨率分别是70 000和35 000,选择信号最强的前20个母离子进行二级碎裂,动态排除时间为30 s。

1.4.4 生物信息学分析 对质谱下机的原始文件进行质谱的鉴定和定量分析,设定肽段鉴定的错误发现率(FDR)为FDR≤0.01。以差异倍数>1.2且P<0.05为条件确定差异表达蛋白(Differentially expressed protein, DEPs),采用t检验分析

蛋白质比值。根据已鉴定出的差异表达蛋白 KEGG 富集分析,对差异蛋白功能和相关代谢通路进行分析。

2 结果与分析

2.1 总黄酮和总酚含量分析

表 1 枸杞总黄酮和总酚含量的测定

Table 1 Determination of total flavonoids and total phenolic content of goji berry

样品名称	宁夏枸杞/($\mu\text{g/g}$)	甘肃枸杞/($\mu\text{g/g}$)	青海枸杞/($\mu\text{g/g}$)
总黄酮含量	57.87 ± 1.95^a	47.86 ± 1.42^{bc}	50.77 ± 1.01^b
总酚含量	183.41 ± 4.24^a	111.17 ± 6.37^c	156.81 ± 9.05^b

注:不同小写字母表示不同产地枸杞差异显著($P < 0.05$)。

2.2 总蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

采用 Tris-饱和酚法提取不同产地枸杞果实的总蛋白,通过 SDS-PAGE 以观察提取蛋白的质量。如图 1 所示,各组样品的蛋白完整性较好,无缺失部分,条带清晰,且结果的重复性好。蛋白质的分子质量主要集中在 15~25 ku 范围。结果表明,枸杞中提取的蛋白质符合 TMT 技术的要求,可进行下一步试验。

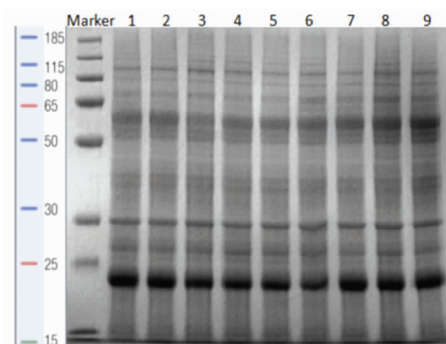
2.3 蛋白质鉴定和聚类分析

基于 TMT 技术分析了不同产地枸杞果实的蛋白质变化情况,共得到 311 202 个二级谱图,有效谱图数为 54 582,谱图利用率为 17.54%。经谱图解析后,共鉴定到 28 809 条肽段和 10 655 个蛋白,其中可定量蛋白数目为 5 654(图 2)。对不同产地枸杞果实蛋白组数据归一化后进行聚类分析,如图 3 所示,发现同一产地枸杞蛋白的 3 次测定数据在空间分布上较接近,相对聚集,表示出较好的重复性。不同产地枸杞蛋白之间则相互分离,有较为清晰的特异性聚集,表明不同产地枸杞果实的蛋白组学试验数据可信度高。

2.4 差异蛋白统计分析

根据差异倍数和 P 值对枸杞 3 个比较组的蛋白进行筛选,如图 4 所示。共鉴定出 716 个 DEPs,其中 410 个 DEPs 上调表达,占差异蛋白总数的 57.26%;316 个 DEPs 下调表达,占差异蛋白总数的 42.74%。在 3 个比较组中,QH v.s. NX 组 DEPs 数量最多,其 DEPs 数目为 380 个,其中上调蛋白

采用分光光度计测定不同产地枸杞果实中总黄酮和总酚含量,如表 1 所示。结果表明,宁夏枸杞中总黄酮的含量高于青海和甘肃。此外,枸杞中总酚含量的变化趋势与总黄酮含量一致。虽然这 3 个枸杞产区种植的是同一品种“宁杞 1 号”,但营养成分含量不同。



注:Marker 代表标准蛋白质,1~3 代表宁夏枸杞,4~6 和 7~9 分别代表青海和甘肃枸杞。

图 1 SDS-PAGE 图像

Fig.1 SDS-PAGE image

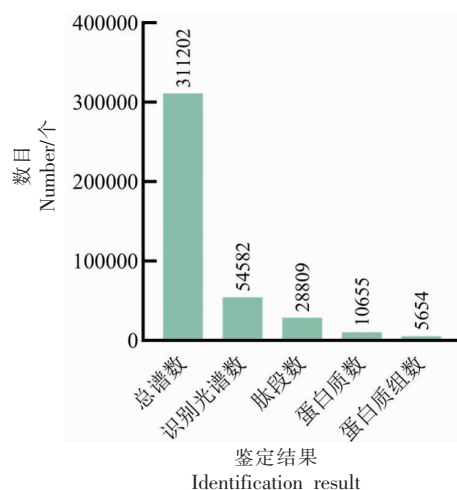


图 2 质谱鉴定结果

Fig.2 Mass spectrometry identification results

数目为 268 个,下调蛋白数目为 112 个;GS v.s. NX 组 DEPs 数目为 97 个,其中上调蛋白数目为

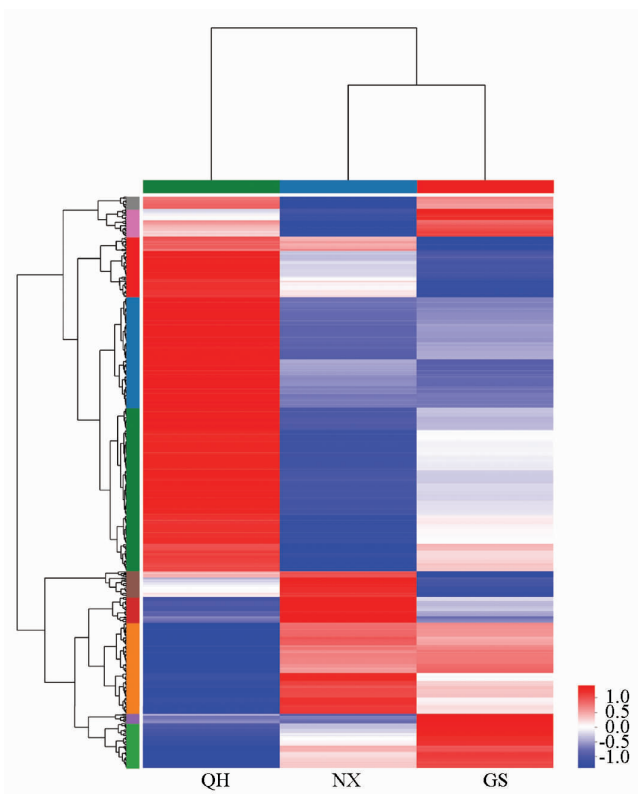


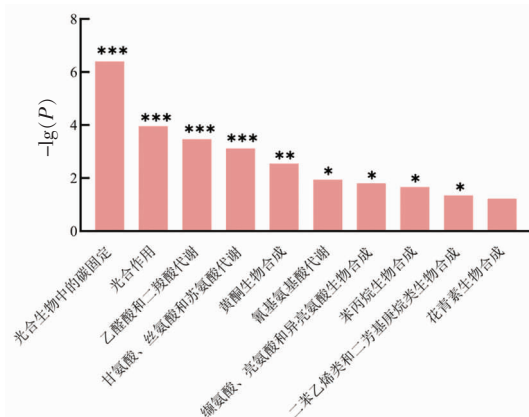
图 3 聚类分析结果

Fig.3 Cluster analysis results

57 个, 下调蛋白数目为 40 个;GS v.s. QH 组 DEPs 数目为 239 个,其中上调蛋白数目为 85 个, 下调蛋白数目为 154 个。

2.5 差异蛋白 KEGG 通路分析

对 QH v.s. NX 组、GS v.s. QH 组和 GS v.s. NX 组的 DEPs 进行 KEGG 通路富集分析,将富集



差异蛋白 KEGG 通路
Differential protein KEGG pathway
(a)QH v.s. NX

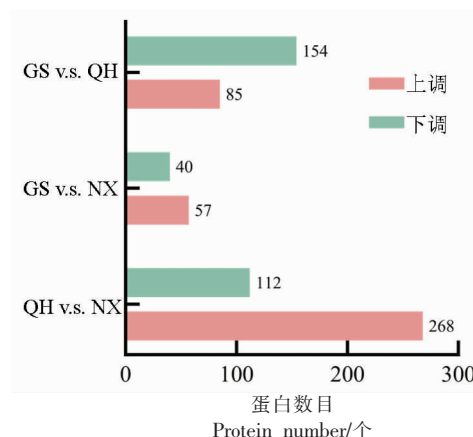
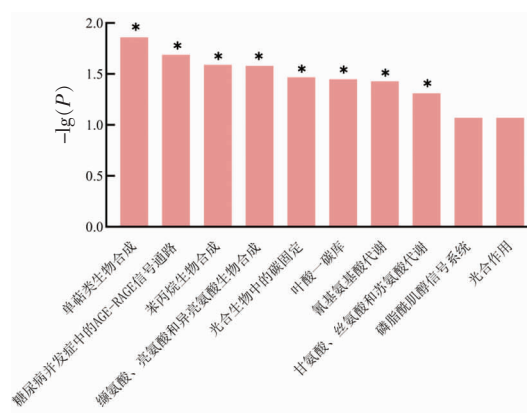


图 4 差异蛋白上、下调图

Fig.4 Up and down regulation of DEPs

的通路按照显著性差异值由大到小排序, 排名前 10 的代谢通路如图 5 所示。QH v.s. NX 组中的差异蛋白主要参与到光合作用, 乙醛酸和二羧酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 黄酮生物合成, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、苯丙烷生物合成和花青素生物合成等途径。其中, 光合作用, 乙醛酸和二羧酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及黄酮生物合成通路极显著富集 ($P < 0.01$), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成, 苯丙烷生物合成, 二苯乙烯类和二芳基庚烷类生物合成途径显著富集 ($P < 0.05$)。黄酮生物合成 ($P < 0.01$)、苯丙烷生物合成 ($P < 0.05$)、花青素生物合成及黄酮和黄酮醇生物合成途径均有差异蛋白注释, 其可能与宁夏和青海枸杞黄酮类化合物生物合成有



差异蛋白 KEGG 通路
Differential protein KEGG pathway
(b)QH v.s. GS

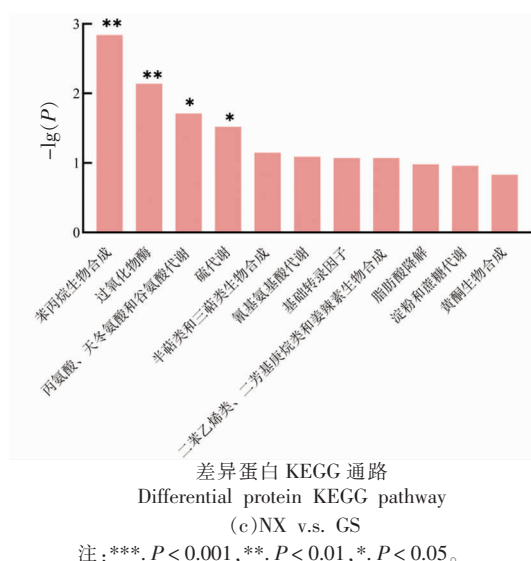


图5 差异蛋白 KEGG 通路富集

Fig.5 KEGG enrichment pathway of DEPs

关。QH v.s. GS 组中的差异蛋白主要参与到单萜类生物合成,糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路,苯丙烷生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,光合生物中的碳固定,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及磷脂酰肌醇信号系统等代谢途径,其中,前 6 个代谢通路均显著富集($P < 0.05$)。在 GS v.s. QH 组,差异蛋白只注释到与一条黄酮类化合物生物合成相关的代谢通路,即苯丙烷生物合成途径,且其显著富集($P < 0.05$)。NX v.s. GS 组中的差异蛋白主要参与到苯丙烷生物合成,过氧化物酶,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,硫代谢,半萜类和三萜类生物合成,氨基酸代谢,基础转录因子,二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜辣素生物合成以及脂肪酸降解。其中,前 4 种代谢途径均显著富集($P < 0.05$)。在 GS v.s. NX 组,差异蛋白注释到两条黄酮类化合物生物合成相关的代谢通路,即苯丙烷生物合成途径($P < 0.05$)和黄酮生物途径。

2.6 与黄酮生物合成相关差异蛋白筛选

基于 KEGG 通路富集结果,发现与黄酮类化合物相关的代谢途径主要有:苯丙烷生物合成途径、类黄酮生物途径、花青素生物合成途径及黄酮和黄酮醇生物合成途径。因此,筛选注释于这 4 条途径中的 DEPs,结果如表 2 所示。共筛选到 24 个与黄酮类化合物合成代谢相关的关键蛋白,主要

注释到 13 种酶,包括查尔酮异构酶(CHI)、查尔酮合酶(CHS)、肉桂酸 4-羟化酶(C4H)、3 个细胞色素 P450 酶(Cytochrome P450, CYP450)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、4 个 β -葡萄糖苷酶(beta-Glucosidase, bglX)、4 个过氧化物酶(Peroxidase, POD)、咖啡酰莽草酸酯酶(Caffeoylshikimate esterase, CSE)、类黄酮 3-葡萄糖基转移酶(Flavonoid 3-glucosyl transferase, UFGT)、花青素 3-O-葡萄糖基转移酶(Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase, UAGT)、UDP 葡萄糖:葡萄糖基转移酶(UDP-glucose:glucosyltransferase, UGT)和 3 个谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)。其中 PAL(TRINITY_DN3671_c0_g1_i4_orf1)和 bglX(TRINITY_DN20382_c0_g1_i1_orf1)在 QH v.s. NX、GS v.s. QH 和 GS v.s. NX 3 个比较组均显著表达($P < 0.05$),说明它们可能是宁夏、青海和甘肃枸杞黄酮类化合物生物合成的重要 DEPs。

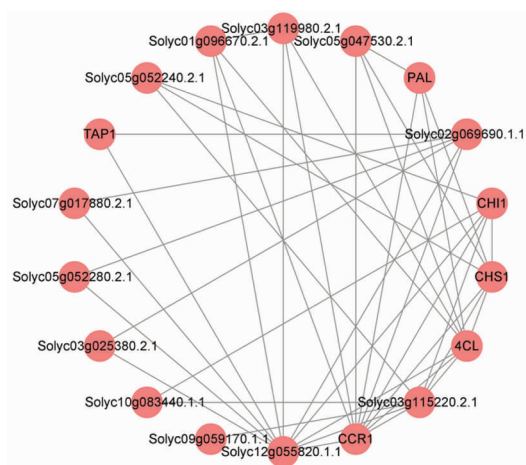
2.7 蛋白质互作网络(PPI)的构建

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 6)。利用 24 个与黄酮类化合物相关的 DEPs 制作蛋白质互作互交作用最明显的一组由 18 个 DEPs 组成,包括:过氧化物酶家族、查尔酮合酶、查耳酮异构酶家族、细胞色素 P450 超家族蛋白、咖啡酰莽草酸酯酶、苯丙氨酸解氨酶、肉桂

表 2 不同产地黄酮类化合物相关蛋白筛选

Table 2 Screening of goji flavonoid related proteins from different habitats

蛋白 ID	注释	QH v.s. NX		GS v.s. QH		GS v.s. NX	
		log ₂ FC	P 值	log ₂ FC	P 值	log ₂ FC	P 值
TRINITY_DN24343_c0_g1_i1_orf1	查尔酮异构酶	0.44	0.04	-0.27	0.16	0.17	0.190
TRINITY_DN26890_c0_g2_i1_orf1	查尔酮合酶	1.37	0.01	-0.70	0.06	0.39	0.030
TRINITY_DN4016_c1_g2_i2_orf1	肉桂酸 4-羟化酶	0.36	0.01	0.03	0.82	0.39	0.030
TRINITY_DN9770_c0_g1_i1_orf1	细胞色素 P450 98A2	-0.28	0.02	0.17	0.16	-0.11	0.230
TRINITY_DN3671_c0_g1_i4_orf1	苯丙氨酸解氨酶	0.55	0.01	-0.36	0.01	0.20	0.040
TRINITY_DN1185_c0_g1_i10_orf1	β-葡萄糖苷酶	0.38	0.04	-0.18	0.20	0.21	0.030
TRINITY_DN13647_c0_g1_i1_orf1	β-葡萄糖苷酶	-0.68	0.049	0.12	0.61	-0.56	0.030
TRINITY_DN21395_c0_g2_i1_orf1	β-葡萄糖苷酶	-0.31	0.00	0.16	0.04	-0.15	0.030
TRINITY_DN20382_c0_g1_i1_orf1	β-葡萄糖苷酶	0.08	0.61	-0.39	0.08	-0.32	0.046
TRINITY_DN22148_c0_g2_i1_orf1	过氧化物酶	0.16	0.25	-0.32	0.03	-0.16	0.390
TRINITY_DN4322_c0_g2_i1_orf1	过氧化物酶	-0.40	0.02	0.47	0.02	0.06	0.560
TRINITY_DN19868_c0_g3_i1_orf1	过氧化物酶	-0.55	0.03	0.18	0.27	-0.38	0.053
TRINITY_DN7788_c0_g4_i1_orf1	过氧化物酶	-0.59	0.12	1.69	0.00	1.10	0.020
TRINITY_DN15241_c0_g1_i3_orf1	四氢甘草酸合成酶	0.17	0.39	0.19	0.36	0.36	0.047
TRINITY_DN50967_c0_g1_i1_orf1	咖啡酰莽草酸酯酶	-0.18	0.14	0.31	0.049	0.14	0.330
TRINITY_DN7400_c0_g1_i1_orf1	类黄酮 3-葡萄糖基转移酶	0.70	0.02	-0.42	0.07	0.28	0.130
TRINITY_DN50860_c0_g1_i1_orf1	花青素 3-O-葡糖基转移酶	0.45	0.04	-0.27	0.14	0.18	0.300
TRINITY_DN10324_c0_g1_i3_orf1	UDP-葡萄糖:葡萄糖基转移酶	0.30	0.01	-0.09	0.09	0.21	0.020
TRINITY_DN9989_c0_g1_i1_orf1	UDP 糖基转移酶	-0.08	0.51	0.28	0.01	0.21	0.060
TRINITY_DN697_c1_g1_i4_orf1	谷胱甘肽 S-转移酶	-0.10	0.17	0.37	0.01	0.27	0.030
TRINITY_DN6177_c0_g3_i1_orf1	谷胱甘肽 S-转移酶	0.26	0.01	-0.29	0.04	-0.03	0.730
TRINITY_DN697_c1_g1_i3_orf1	谷胱甘肽 S-转移酶	-0.18	0.09	0.43	0.01	0.25	0.030
TRINITY_DN554_c0_g1_i3_orf1	细胞色素 P450	0.26	0.19	0.26	0.27	0.52	0.040
TRINITY_DN25253_c0_g1_i2_orf1	细胞色素 P450	-0.22	0.26	-0.25	0.13	-0.47	0.045



注: Solyc09g059170.1.1. UDP-糖基转移酶, CCR1. 肉桂酰辅酶 A 还原酶, PAL. 苯丙氨酸解氨酶, CHS1. 查尔酮合酶, CHH1, Solyc05g052240.2.1. 查尔酮异构酶, TAP1, Solyc07g017880.2.1, Solyc03g025380.2.1, Solyc05g052280.2.1, Solyc02g069690.1.1. 过氧化物酶, Solyc10g083440.1.1. 花青素 3-O-葡糖基转移酶, Solyc05g047530.2.1, Solyc03g115220.2.1, Solyc01g096670.2.1. 细胞色素 P450 超家族蛋白, Solyc12g055820.1.1. 肉桂酸 4-羟化酶, Solyc03g119980.2.1. 咖啡酰莽草酸酯酶, 4CL. 未被验证的蛋白。

图 6 筛选后差异表达蛋白的相互作用网络

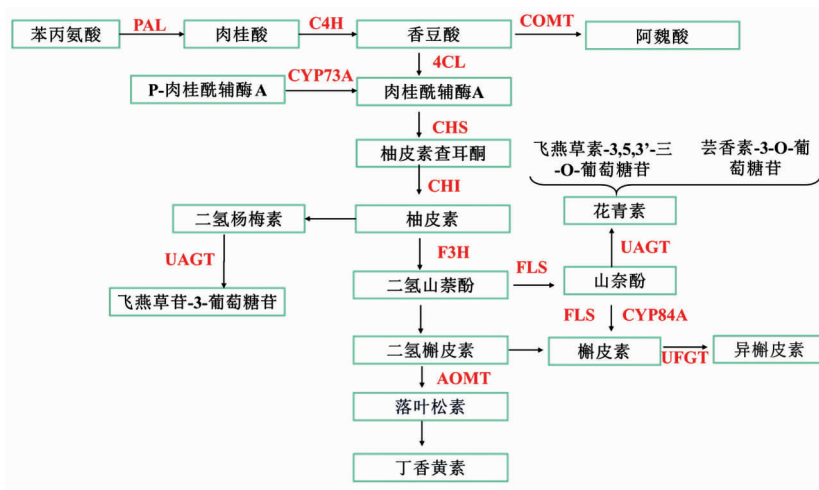
Fig.6 Interaction network of differentially expressed proteins after screening

酰辅酶 A 还原酶、黄酮 3-羟化酶、UDP-糖基转移酶家族及一些尚未被验证的蛋白。

2.8 枸杞黄酮类化合物相关蛋白通路分析

黄酮类化合物的合成受内部结构基因和外部环境的影响,生物过程复杂。基于 KEGG 富集途径结果建构枸杞黄酮类化合物生物合成途径。如图 7 所示,该途径主要包括苯丙烷代谢途径、类黄酮生物合成途径和部分花青素合成途径。首先 PAL 作为催化酶催化苯丙氨酸(Phenylalanine)转化为肉桂酸(Cinnamic acid),其次在 C4H 的催化下转化为对香豆酸(Coumaric acid),随后由丙二酰辅酶 A 和 4-香豆酰辅酶 A 作为底物,经 TT4 催化开启类黄酮生物合成第一步。上游底物经过 TT4 催化后会产生柚皮素-查尔酮(Naringenin chalcone),这 2 种产物将开始 2 个异黄酮生物合成途径。异黄酮生物合成途径中的中间产物柚皮素将

开启 3 步黄酮和黄酮醇生物合成途径,柚皮素经过 F3H 催化转化为二氢山奈酚(Dihydrokaempferol),再在 FLS 催化下转化为山奈酚,随后在 UAGT、DFR、ANR 催化下转化为花青素(Anthocyanins);另一条是在 FLS 催化下转化为槲皮素(Quercetin),再在 UFGT 催化下转化为异槲皮素(Quercitrin)。其中,PAL、CHS、CHI 和 UAGT 酶差异蛋白均有注释,且在宁夏、青海和甘肃枸杞中的表达量均不同,说明它们可能在枸杞黄酮合成通路中发挥重要作用。CHI 酶作为合成柚皮素的关键酶,注释于该酶的 DEP 在青海枸杞中高表达,可能共同导致了青海产地柚皮素含量的积累。值得注意的是,甘肃枸杞槲皮素含量虽不是最高,但甘肃枸杞中的槲皮素糖苷类物质(金丝桃苷、异槲皮苷和槲皮苷)却较高,可能是糖基化酶 UFGT 差异导致的。



注:PAL. 苯丙氨酸解氨酶,C4H. 肉桂酸 4-羟化酶,4CL. 4-香豆酸-CoA 连接酶,COMT. 咖啡酸 3-O-甲基转移酶,CHS. 查尔酮合酶,CHI. 查尔酮异构酶,FLS. 黄酮醇合成酶,F3H. 黄酮 3-羟化酶,UAGT. 花青素 3-O-葡萄糖基转移酶,UFGT. 类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶,AOMT. 类黄酮 O-甲基转移酶,DFR. 二氢黄酮醇 4-还原酶,ANR. 花青素还原酶。

图 7 枸杞黄酮类化合物生物合成途径

Fig.7 The flavonoid biosynthetic pathway of *Lycium barbarum*

3 讨论

随着分子生物学技术的发展,蛋白质组学定量分析技术在植物研究中已广泛应用。目前,蛋白质组学在枸杞中的应用主要集中在寡糖代谢^[21]、细胞壁多糖与果实软化^[22-23]以及甜菜碱^[24]差异研究等方面。Kou 等^[25]利用 iTRAQ 技术对中国 5 个省份“宁杞 1 号”枸杞的蛋白质组进行了差异比

较,发现宁夏枸杞与内蒙古和新疆的枸杞蛋白差异较小,而甘肃和青海的差异很大,它们的差异主要体现在“代谢进程”上,而对于不同产地枸杞次级代谢产物-黄酮的差异蛋白研究较少。本文采用 TMT 蛋白质组学技术探究不同产地枸杞黄酮类化合物相关差异蛋白,共筛选出 716 个差异表达蛋白,通过 KEGG 通路富集分析发现黄酮生物合成、苯

丙烷生物合成、花青素生物合成及黄酮和黄酮醇生物合成途径与枸杞黄酮类化合物生物合成密切相关,进一步筛选出 24 个与黄酮合成相关的差异蛋白。

苯丙烷生物合成途径是碳和能量流的重要途径,是植物次级代谢的重要途径^[26]。本研究通过 KEGG 通路富集发现,苯丙烷生物合成途径在 QH v.s. NX、GS v.s. QH 和 GS v.s. NX 3 个比较组中均被 DEPs 显著富集($P < 0.05$),说明苯丙烷生物合成途径在枸杞蛋白黄酮类化合物生物合成中起重要作用。PAL 酶是苯丙烷代谢途径上的第 1 个关键限速酶,可催化生成反式肉桂酸,为多种次生代谢产物-酚类和黄酮提供前体物质^[27-28]。PAL 酶的活性与植物中花青素、黄酮类化合物的积累呈显著正相关关系,其可以调节次级代谢产物的生成^[29-30]。注释于 PAL 酶的蛋白(TRINITY_DN3671_c0_g1_i4_orf1)在 3 个比较组均显著表达($P < 0.05$),且在青海和宁夏枸杞中上调表达,说明 PAL 有可能是促进枸杞黄酮表达的关键蛋白。CYP450 酶是植物界重要的生物催化剂,许多天然代谢产物如苯丙烷类前体物质的生物合成均有 CYP450 参与^[31-32]。部分 CYP450 家族已被鉴定为参与了植物中黄酮类化合物的合成,可促进黄酮类化合物产生^[33-34]。本文共筛选出 4 个细胞色素 P450 酶,包括 C4H 酶。与其它 CYP450 酶相比,C4H 酶在植物的各个组织中均具有很高活性,可以催化生成植物合成黄酮类物质。C4H 酶在 QH v.s. NX 和 GS v.s. NX 组中显著表达,表明它可能与青海、甘肃和宁夏枸杞黄酮之间的差异密切相关。CHS 酶和 CHI 酶是参与类黄酮生物合成途径的关键酶,可催化生成查尔酮及其它黄酮类化合物,进而影响类黄酮色素的积累^[35]。CHI 酶和 CHS 酶在青海和宁夏中均上调表达,可能影响查尔酮在两产地的积累。

糖基化可以增加类黄酮化合物的稳定性,是黄酮积累的重要步骤,植物黄酮类物质经糖基化后可被转运至液泡储存。UGT 酶是常见的糖基转移酶,本文共发现了 2 个 UGT 蛋白在枸杞中差异表达。UAGT 也是一种黄酮糖基化的转移酶,它参与花青素合成最后一步的酶,可促进形成结构稳定的花青素苷^[36-37]。UAGT 只在 QH vs NX 组显著

表达,可能会对青海和宁夏枸杞中花青素物质产生影响。

4 结论

本文首先对宁夏、青海和甘肃产地枸杞果实中的总黄酮和总酚含量分别进行测定,总酚含量和总黄酮含量在宁夏均较高,基于 TMT 结合 LC-MS/MS 的技术研究 3 个不同产地“宁杞 1 号”枸杞的蛋白质差异。结果表明,共获得 716 个 DEPs,进一步筛选出 24 个与黄酮合成相关的关键差异表达蛋白,共注释到了 13 种酶。初步推测枸杞黄酮类化合物合成代谢通路,PAL、C4H、CHI、CHS 及 UAGT 等可能是宁夏、青海和甘肃枸杞黄酮类化合物生物合成差异的重要 DEPs。这些酶可能是影响不同产地枸杞黄酮类化合物差异的重要蛋白。本文为深入探索枸杞黄酮代谢提供强力的研究基础。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黄酮类化合物的变化规律。

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 Q, XU R, et al. Investigation and suggestions on production status of goji berries in major producing areas in China[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Materia Medica, 2014, 39(11): 1979-1984.
- [3] KAFKAS N E, OĞUZ H İ, OĞUZ İ. Evaluation of fruit characteristics of various organically -grown wolfberry (*Lycium barbarum* L., *Lycium chinense* Miller) species during ripening stages[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 101: 103846.
- [4] WANG Y J, LIANG X J, GUO S J, et al. Evaluation of nutrients and related environmental factors for wolfberry (*Lycium barbarum*) fruits grown in the

- different areas of China[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2019, 86: 103916.
- [5] SPANO M, MACCELLI A, DI M G, et al. Metabolomic profiling of fresh goji (*Lycium barbarum* L.) berries from two cultivars grown in central Italy: A multi-methodological approach [J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5412.
- [6] YOSSA N I, GUO B, ZHANG T, et al. Comparative metabolic profiling of *Lycium* fruits (*Lycium barbarum* and *Lycium chinense*) from different areas in China and from Nepal[J]. *Journal of Food Quality*, 2019, 2019(1): 4396027.
- [7] LI H Y, HUANG M, LUO Q Y, et al. *Lycium barbarum* (wolfberry) increases retinal ganglion cell survival and affects both microglia/macrophage polarization and autophagy after rat partial optic nerve transection[J]. *Cell Transplantation*, 2019, 28(5): 607–618.
- [8] PIRES T C, DIAS M I, BARROS L, et al. Phenolic compounds profile, nutritional compounds and bioactive properties of *Lycium barbarum* L.: A comparative study with stems and fruits [J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 122: 574–581.
- [9] ROCCHETTI G, CHIODELLI G, GIUBERTI G, et al. UHPLC–ESI–QTOF–MS profile of polyphenols in goji berries (*Lycium barbarum* L.) and its dynamics during *in vitro* gastrointestinal digestion and fermentation [J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 40: 564–572.
- [10] CHEN Z J, ZHENG S R, LI L P, et al. Metabolism of flavonoids in human: A comprehensive review [J]. *Current Drug Metabolism*, 2014, 15(1): 48–61.
- [11] MOCAN A, CAIRONE F, LOCATELLI M, et al. Polyphenols from *Lycium barbarum* (Goji) fruit European cultivars at different maturation steps: Extraction, HPLC–DAD analyses, and biological evaluation [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(11): 562.
- [12] SKENDERIDIS P, KERASIOTI E, KARKANTA E, et al. Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation [J]. *Toxicology Reports*, 2018, 5: 251–257.
- [13] RYU M, KIM M, JI M, et al. Discrimination of *Lycium chinense* and *L. Barbarum* based on metabolite analysis and hepatoprotective activity [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5835.
- [14] JIA C, LU X, GAO J H, et al. TMT-labeled quantitative proteomic analysis to identify proteins associated with the stability of peanut milk [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(15): 6424–6433.
- [15] WANG Y Y, YAN J K, DING Y H, et al. Effects of ultrasound on the thawing of quick-frozen small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) based on TMT-labeled quantitative proteomic [J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130600.
- [16] 田晏, 侯召华. 冬枣果实发育过程中非标记定量蛋白质组学分析 [J]. *食品科学*, 2022, 43(6): 221–228.
- TIAN Y, HOU Z H. Non-labeled quantitative proteomic analysis during jujube fruit development [J]. *Food Science*, 2022, 43(6): 221–228.
- [17] DU W, DING J, LU S G, et al. Identification of the key flavonoid and lipid synthesis proteins in the pulp of two sea buckthorn cultivars at different developmental stages [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 299.
- [18] LU M Q, LI Y F, JIA H Y, et al. Integrated proteomics and transcriptome analysis reveal a decreased catechins metabolism in variegated tea leaves [J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 295: 110824.
- [19] JAMIL I N, SANUSI S, MACKEEN M M, et al. SWATH-MS proteomics and postharvest analyses of mangosteen ripening revealed intricate regulation of carbohydrate metabolism and secondary metabolite biosynthesis [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 176: 111493.
- [20] 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.
- [21] 高鹏燕, 李佩佩, 刘军, 等. 枸杞果实生长发育过程中寡糖代谢的蛋白组学分析 [J]. *食品科学*, 2023, 44(12): 115–123.
- GAO P Y, LI P P, LIU J, et al. Proteomic analysis of oligosaccharide metabolism during the growth and development of goji berry fruit [J]. *Food Science*, 2023, 44(12): 115–123.
- [22] 刘军. 枸杞发育过程中果实软化的生理差异及其作用机制研究 [D]. 银川: 宁夏大学, 2020.
- LIU J. Physiological differences and mechanism of

- fruit softening during the development of goji berries [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2020.
- [23] 徐昊. 枸杞不同生长期壁多糖变化的相关蛋白作用机制研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2019.
- XU H. Study on the mechanism of protein action related to the changes of wall polysaccharides in different growth stages of goji berries[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2019.
- [24] ZHAO X L, ZHANG X K, LIU J, et al. Identification of key enzymes involved in the accumulation of carotenoids during fruit ripening of *Lycium barbarum* L. by a proteomic approach[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 56(10): 5050–5061.
- [25] KOU T T, NIU Y H, FAN Y L, et al. iTRAQ-based quantitative differentially expressed proteins of wolfberry (*Lycium barbarum*) from different habitats in China[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2020, 23(4): 820–828.
- [26] JIA X M, ZHU Y F, HU Y, et al. Integrated physiologic, proteomic, and metabolomic analyses of *Malus halliana* adaptation to saline-alkali stress[J]. Horticulture Research, 2019, 6: 91.
- [27] 黄小贞, 赵德刚. 植物苯丙氨酸解氨酶表达调控机理的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(4): 16–20.
- HUANG X Z, ZHAO D G. Research progress on the expression and regulation mechanism of plant phenylalanine ammonia-lyase[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2017, 45(4): 16–20.
- [28] 饶莉萍, 苏文瑾, 刘意, 等. 甘薯苯丙氨酸解氨酶基因 *IbPAL* 的克隆与表达分析[J]. 植物科学学报, 2020, 38(3): 360–368.
- RAO L P, SU W J, LIU Y, et al. Cloning and expression analysis of *IbPAL* gene in sweet potato phenylalanine ammonia-lyase gene [J]. Journal of Plant Science, 2020, 38(3): 360–368.
- [29] 杨会晓, 孙媛媛, 贾彩红, 等. 香蕉苯丙氨酸解氨酶基因家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. 热带作物学报, 2019, 40(10): 1949–1957.
- YANG H X, SUN Y Y, JIA C H, et al. Genome-wide identification and expression analysis of banana phenylalanine ammonia-lyase gene family[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(10): 1949–1957.
- [30] 郝向阳, 孙雪丽, 王天池, 等. 植物 *PAL* 基因及其编码蛋白的特征与功能研究进展[J]. 热带作物学报, 2018, 39(7): 1452–1461.
- HAO X Y, SUN X L, WANG T C, et al. Research progress on the characteristics and functions of plant pal genes and their coding proteins[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(7): 1452–1461.
- [31] 钟巍然, 柴友荣, 张凯, 等. 苯丙烷代谢途径中细胞色素 P450 的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(13): 5285–5289.
- ZHONG W R, CHAI Y R, ZHANG K, et al. Study on cytochrome P450 in phenylpropane metabolic pathway[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(13): 5285–5289.
- [32] 郁慧丽, 李爱涛. 细胞色素 P450 酶在香精香料绿色生物合成中的应用[J]. 生物技术通报, 2023, 39(4): 24–37.
- YU H L, LI A T. Application of cytochrome P450 enzyme in green biosynthesis of flavors and fragrances[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(4): 24–37.
- [33] YANG J, LI H Q, MA R J, et al. Genome-wide transcriptome analysis and characterization of the cytochrome P450 flavonoid biosynthesis genes in pigeon pea (*Cajanus cajan*)[J]. Planta, 2022, 255(6): 126.
- [34] NAVEED A, LIU J Y, TIAN X, et al. Overexpression of a novel cytochrome P450 promotes flavonoid biosynthesis and osmotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Genes (Basel), 2019, 10(10): 756.
- [35] WU X Q, JIANG L, YU M L, et al. Proteomic analysis of changes in mitochondrial protein expression during peach fruit ripening and senescence[J]. Journal of Proteomics, 2016, 147: 197–211.
- [36] 杜灵娟, 陈凯利, 刘雅莉. 葡萄风信子花青素 3-O-葡萄糖基转移酶基因的克隆及其表达分析[J]. 草业科学, 2017, 34(11): 2235–2244.
- DU L J, CHEN K L, LIU Y L. Cloning and expression analysis of grape hyacinth anthocyanin 3-O-glucosyltransferase gene[J]. Pratacultural Science, 2017, 34(11): 2235–2244.
- [37] SUI X, GAO X, AO M, et al. cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: Antho-cyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Freesia hybrida*[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(7): 1209–1218.

The Difference of Biosynthesis of Flavonoids in Goji Berry from Different Regions Based on Proteomic Analysis

Sun Xiazhi, Ma Ruixue, Yang Chao, Fan Yanli*

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

Abstract Objective: To analyze the differences of goji flavonoids from different origins from the perspective of proteomics. Methods: The protein differences of goji berries from different origins were explored by tandem mass tag (TMT) combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) technology in Ningxia, Qinghai and Gansu. Results: A total of 716 differential expressed proteins (DEPs), and a total of four metabolic pathways associated with flavonoids were found in the KEGG pathway, and the phenylpropane biosynthesis pathway was significantly enriched in all three comparison groups ($P < 0.05$), indicating that the phenylpropane biosynthesis pathway might make a greater contribution to the synthesis of goji flavonoids. Further screening of 24 key differentially expressed proteins related to flavonoid synthesis, it was found that phenylalanine ammonia-lyase (PAL), cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H), chalcone isomerase (CHI), chalcone synthase (CHS), etc. might be important DEPs for the biosynthesis of flavonoids in Ningxia, Qinghai and Gansu. Conclusion: The differential proteins related to the biosynthesis of goji flavonoids were identified from the protein level, and the anabolic pathway of goji flavonoids was preliminarily speculated, which laid a foundation for exploring the differences in the biosynthesis of goji flavonoids in different origins.

Keywords goji berry; proteomics; flavonoids; key differentially expressed proteins