

基于转录组数据发掘秃叶黄檗异喹啉类生物碱合成的相关基因

王富华, 曾子参, 李端阳, 袁鑫怡, 田 梅, 高继海, 侯飞侠*

成都中医药大学药学院/现代中药产业学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

摘 要: **目的** 研究秃叶黄檗 *Phellodendron chinense* var. *glabriusculum* 不同组织部位异喹啉类生物碱成分含量差异及生物合成相关基因。**方法** 采用高效液相色谱法对秃叶黄檗根皮、茎皮、叶进行含量测定, 结合转录组测序筛选关键基因, 探讨秃叶黄檗异喹啉生物碱合成机制。**结果** 秃叶黄檗中异喹啉类生物碱在根皮、茎皮与叶中含量差异显著。转录组测序组装获得 85 908 条单基因 (Unigenes), 其中 49 114 (57.17%) 条被成功注释, 参与异喹啉类生物碱成分合成的 38 个差异表达基因被成功鉴定, 并与小檗碱等异喹啉类成分进行相关性分析, 显示 8 个基因与小檗碱含量高度正相关, 其中主要包括 *CNMT*、*NCS*、*TDC*、*BBE*、*TYNA* 等基因, 这些基因可能对于小檗碱基因的合成积累具有重要影响作用, 对差异表达基因进行 qRT-PCR, 结果与转录组数据表达模式具有一致性。**结论** 揭示了秃叶黄檗不同组织部位异喹啉生物碱合成通路相关基因的显著差异表达模式, 为进一步研究异喹啉生物碱生物合成调控分子机制提供线索。

关键词: 秃叶黄檗; 异喹啉生物碱; 转录组; 相关性分析; 生物合成途径; 小檗碱

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)09-3263-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.023

Identifying related genes involved in isoquinoline alkaloids biosynthesis of *Phellodendron chinense* var. *glabriusculum* based on transcriptome data

WANG Fuhua, ZENG Zishen, LI Duanyang, YUAN Xinyi, TIAN Mei, GAO Jihai, HOU Feixia

School of Pharmacy/College of Modern Chinese Medicine Industry, State Key Laboratory of Southwest Chinese Medicine

Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the content difference of isoquinoline alkaloids in different tissue parts of *Phellodendron chinense* var. *glabriusculum* and the genes related to biosynthesis **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the contents of root bark, stem bark and leaves of Amur barberberry, and transcriptome sequencing was used to screen key enzyme genes to explore the synthesis mechanism of isoquinoline alkaloids in *P. chinense* var. *glabriusculum*. **Result** The contents of isoquinoline alkaloids in root bark, stem bark and leaves were significantly different. 85 908 Unigenes were obtained by transcriptome sequencing, of which 49 114 (57.17%) were successfully annotated. 38 differentially expressed genes that catalyzed the production of isoquinoline alkaloids were successfully identified, and correlation analysis was conducted with isoquinoline components such as berberine. Eight genes were highly positively correlated with berberine content, including *CNMT*, *NCS*, *TDC*, *BBE*, *TYNA* and other genes, which may have important effects on the synthesis and accumulation of berberine genes. The expression pattern of differentially expressed genes was consistent with that of transcriptome data by qRT-PCR. **Conclusion** The significantly different expression patterns of isoquinoline alkaloid synthesis pathway related genes in different tissue parts of *P. chinense* var. *glabriusculum* were revealed, providing clues for further research on the molecular mechanism of isoquinoline alkaloid biosynthesis regulation.

Key words: *Phellodendron chinense* Schneis var. *glabriusculum* Schneid.; isoquinoline alkaloids; transcriptome; correlation analysis; biosynthetic pathway; isoquinoline alkaloid

秃叶黄檗 *Phellodendron chinense* Schneis var. *glabriusculum* Schneid. 为川黄檗变种植物, 广泛分布于亚热带和温带地区, 主产于华南地区和西南地区, 垂直分布在海拔

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 四川省中医药管理局项目 (2023zd017)

作者简介: 王富华, 硕士研究生, 研究方向为中药品种、质量与资源开发应用研究。E-mail: 3323444579@qq.com

*通信作者: 侯飞侠, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: houfeixia123@163.com

500~1 500 m 的山区和丘陵地带。在四川、湖北、贵州、云南等地有大面积种植，四川的盆地及周边的山区都是秃叶黄檗的适宜区域^[1]。

秃叶黄檗的树皮具有清热燥湿、泻火解毒等功效。据文献和产地调研，目前川黄柏的主要栽培品种基本为川黄檗的变种秃叶黄檗，其在市场上也是中药川黄柏的主流商品来源。有研究发现秃叶黄檗和川黄檗形态和成分相似，含有丰富的异喹啉类生物碱成分，包括小檗碱、黄柏碱、巴马汀、药根碱与木兰花碱等成分^[2]。其中小檗碱为秃叶黄檗的主要化学成分，具有抗菌抗病毒的作用，在临床上主要用于肠道感染的治疗，同时还具有降血糖、抗炎、心脏保护和免疫调节等作用，在心血管、代谢性疾病以及各种肿瘤性疾病的预防和治疗等多个方面具有显著疗效^[3-4]。

阐明小檗碱类成分生物合成途径对于揭示药材质量形成内在机制具有重要意义，小檗碱为天然异喹啉类生物碱，目前在 4 科 10 属植物中发现^[5]。小檗碱因其重要的经济价值和良好的生物活性，其生物合成途径在分子水平上已经得到深入的研究，近年来，小檗碱生物合成相关的代谢中间体、酶和基因陆续被报道，从而阐明了小檗碱的生物合成途径。小檗碱的合成可分为 2 个阶段^[6]：第一阶段是在细胞质中进行，*L*-酪氨酸通过一系列的反应合成小檗碱的 2 种原料多巴胺与 4-羟基苯醛^[7]；经去甲乌药碱合成酶缩合形成去甲乌药碱，经过几次甲基化形成番荔枝碱。第 2 阶段在内质网囊泡中进行，依次进行基本骨架形成与后修饰阶段，最终形成小檗碱。然而由于基因组资源不足，目前对于异喹啉生物碱合成的了解仍然有限。

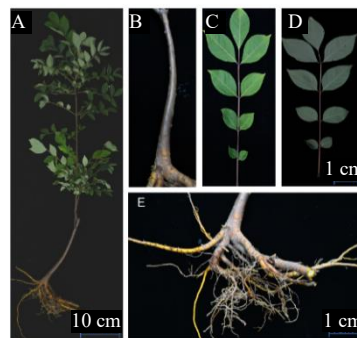
到目前为止，由于现代医学的发展，对各种药物资源的需求正在增加，小檗碱具有多种药理作用，然而植物药用部位生长缓慢，远远不能满足临床上的需求^[8]。在本研究中采用高效液相色谱法测量根皮、茎皮与叶不同组织部位异喹啉生物碱类成分含量，通过转录组测序与转录组学研究，鉴定关键酶基因，为进一步明确异喹啉生物碱的生物合成机制提供研究依据，对于秃叶黄檗优良性状选育与抗逆相关的遗传改良上具有重要意义。

1 材料与仪器

1.1 材料

样品采自于成都中医药大学药用植物园内 (103°48'18.96"E, 30°41'31.89"N, 海拔 504 m)，经

成都中医药大学高继海副教授鉴定为秃叶黄檗 *P. chinense* Schneis var. *glabriusculum* Schneid. 两年生植株，具体形态见图 1。



A-整株秃叶黄檗；B-茎；C-叶正面；D-叶背面；E-根。

A-*P. chinense* var. *glabriusculum* test material; B-stem; C-face of the leaves; D-back of the leaves; E-root.

图 1 秃叶黄檗植株形态

Fig. 1 Morphology of *P. chinense* var. *glabriusculum*

1.2 试剂与仪器

1.2.1 仪器 Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (赛默飞世尔科技公司)，超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司)，SQP 型电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司)，KQ-50E 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司) 全自动样品快速研磨仪 (上海净信科技有限公司) 等。

1.2.2 试剂 对照品盐酸小檗碱 (批号 CHB-Y-039)、盐酸黄柏碱 (批号 CHB201226)、盐酸巴马汀 (批号 CHB-Y-030) 购买于成都克洛玛生物科技有限公司，木兰花碱 (批号 PS2052-0020)、盐酸药根碱 (批号 PS1420-0020) 购于普思生物科技有限公司。质量分数均大于 98%；色谱级乙腈购于赛默飞世尔科技有限公司；其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 样品处理

2023 年 9 月分别采集秃叶黄檗的根、茎、叶样品，分别命名为 HBG、HBJ、HBY，实验设置 3 个重复。用无菌水洗净样品，用灭菌刀取根皮与茎皮，一半液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存，用于转录组分析，另一半 40 °C 烘干，研磨，过三号筛，干燥保存。

2.2 秃叶黄檗根皮、茎皮与叶中有效成分的测定^[9]

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取小檗碱、黄柏碱、药根碱、巴马汀、木兰花碱对照品适量，分别置于 5 mL 量瓶，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，

得到质量浓度为 99、41、37、22、51 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 秃叶黄檗样品, 使用研磨仪粉碎并过三号筛。准确称取秃叶黄檗粉末 50 mg, 置于 100 mL 锥形瓶中。加入 10 mL 甲醇溶液, 超声处理 40 min (功率 300 W、频率 40 kHz)。待溶液冷却至室温后, 用甲醇补足减失的质量。取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 收集滤液于液相小瓶中, 即得供试品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为月旭 Xtimate XB- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~25 min, 10%~18% A; 25~35 min, 18%~25% A; 35~45 min, 25%~40% A; 45~60 min, 40%~60% A), 检测波长 220 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL 。色谱图见图 2。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 0.1、0.4、0.6、0.8、1.2、4 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。在相同色谱条件下, 分别进样 10 μL , 以各目标化合物的质量浓度为自变量 (X), 对应的色谱峰面积响应值为因变量 (Y), 进行线性回归分析。结果表明, 黄柏碱、小檗碱、木兰花碱、巴马汀及药根碱在各自检测范围内均呈现良好的线性相关性, 线性方程分别为 $Y=0.004 X+0.0018$ 、 $Y=0.0031 X+0.002$ 、 $Y=0.0017 X+0.0009$ 、 $Y=0.0023 X+0.0001$ 、 $Y=0.0021 X+0.0048$, 相关系数 (r) 均大于 0.999。

2.2.5 精密度试验 选取秃叶黄檗根皮样品按照

“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 按照“2.2.3”项下的色谱条件, 进样 6 次, 记录秃叶黄檗供试品中黄柏碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀和小檗碱 5 种化学成分的峰面积和保留时间, 求得相对峰面积的 RSD 分别为 0.25%、0.20%、0.52%、0.21%、0.12%。表明精密度方法良好。

2.2.6 稳定性试验 选取秃叶黄檗根皮样品按照“2.2.2”项方法制备秃叶黄檗的供试品溶液, 按照“2.2.3”项下的色谱条件, 分别在 0、2、4、7、12、24 h 进行进样, 记录秃叶黄檗供试品中黄柏碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀和小檗碱 5 种化学成分的峰面积, 求得相对峰面积的 RSD 分别为 0.24%、0.22%、0.44%、0.38%、0.21%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 选取秃叶黄檗根皮样品按照“2.2.2”项方法制备秃叶黄檗的供试品溶液平行制备 6 份, 按照“2.2.3”项下的色谱条件下进行测定, 记录秃叶黄檗供试品中黄柏碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀和小檗碱 5 种化学成分的峰面积, 求得相对峰面积的 RSD 分别为 0.54%、0.26%、0.25%、0.68%、0.38%。表明方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 称取秃叶黄檗样品 25 mg, 平行 6 份, 分别精密加入与样品中待测成分含量相当的混合对照品溶液, 按“2.2.2”项下制备秃叶黄檗的供试品溶液, 进样测定。黄柏碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀和小檗碱平均加样回收率分别为 97.21%、96.47%、96.46%、96.78%、99.98%, RSD 分别为 0.57%、0.47%、0.24%、0.11%。

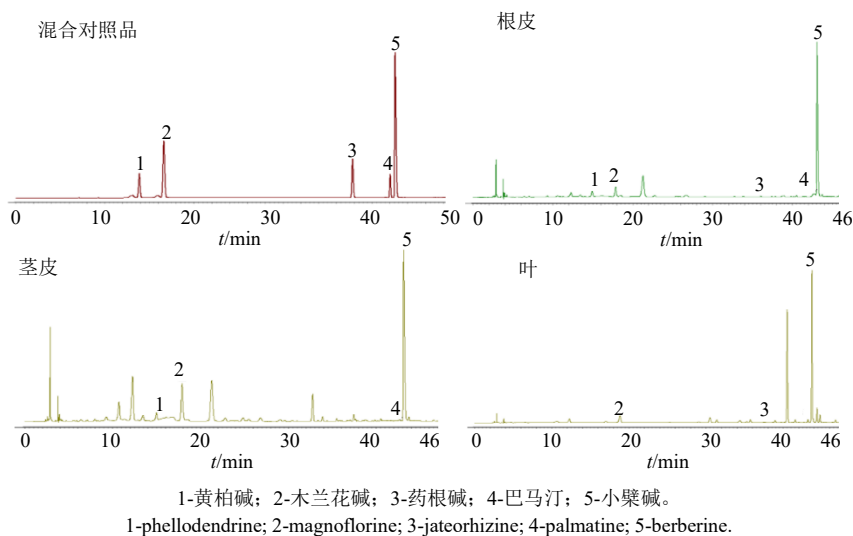


图 2 秃叶黄檗 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of *P. chinense* var. *glabriusculum*

2.3 RNA 提取与测序

按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441, 天根) 提取要求取适量样本进行 RNA 提取; 提取完的总 RNA 使用 NanoDrop 2000&8000 微量分光光度计进行纯度检测, 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 与 Agilent RNA 6000 Nano Kit 进行浓度与完整性检测, 之后完成 cDNA 建库; 利用通过 Illumina NovaSeq 6000 测序技术平台进行测序。

2.4 测序数据质控与组装

将测序得到的原始读段的低质量、含接头和未知碱基 N 含量的 Reads 进行去除, 从而获得高质量读段 (clean reads)。利用 Trinity^[10] 软件进行组装获得单基因 (Unigene)。

2.5 基因功能注释和分类

利用 BLAST 软件将基因分别与非冗余蛋白质序列数据库 (non-redundant protein sequence database, NR)^[11]、真核生物同源蛋白簇 (EuKaryotic orthologous groups, KOG)^[12]、同源蛋白簇 (clusters of orthologous groups, COG)^[13]、基因进化谱系: 非监督直系同源群 (evolutionary genealogy of genes: Non-supervised orthologous groups, eggNOG)^[14]、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)^[15]、蛋白序列数据库 (Swiss protein knowledgebase, Swiss-Prot)^[16] 等数据库进行比对注释, 获得基因的注释信息。

2.6 差异表达基因分析

采用 Bowtie^[17] 将测序得到的 Reads 与 Unigene 库进行比对, 根据比对结果, 结合 RSEM^[18] 进行表达量水平估计。利用 FPKM^[19] 值表示对应 Unigene 的表达丰度, 设置标准为错误发现率 FDR (false discovery rate) < 0.05 且 log₂ fold change 绝对值 ≥ 2。对筛选的差异表达基因进行 KEGG 富集分析, 筛选秃叶黄檗中异喹啉合成相关的差异表达基因。运用 TBtools 绘制筛选的差异基因在不同组织相对表达量热图, 采用 pearson 相关性算法, 计算筛选的基因与异喹啉生物碱成分积累水平的关系。

2.7 qRT-PCR 验证

总 RNA 提取同“2.3”项, 实验过程按照 FastReal qPCR PreMix 试剂盒说明书在 BIO-RAD CFX96 仪进行, 反应条件为两步法: 95 °C、3 min; 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 72 °C、10 s, 40 个循环, 以肌动蛋白基因 (Actin) 为内参, 使用 2^{-ΔΔCt} 方法 *PSOMT1*、*BBE*、*NCS*、*CNMT* 等基因相对表达量。为确保实验的重现性和可靠性, 对样品进行 3 个生物重复和 3 次技术重复。运用单因素方差分析 (ANOVA) 的方法, 以邓肯氏新复极差法分析不同处理间的差异显著性 ($P \leq 0.05$), 采用 Prism 8.0 统计数据并制图。相关引物全部由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 1 Primers for real-time fluorescence quantitative PCR

基因名称	引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>BBE_TRINITY_DN11766_c0_g1</i>	BBE-F	TGTCGGTTCATGGGATAGCTT
	BBE-R	GTTTCCGGCATTTGGGTGTT
<i>NCS_TRINITY_DN5798_c1_g1</i>	NCS-F	AGGCCAATACCCAGAGAGTAGT
	NCS-R	AGGTAGCGGGATGGAATGTG
<i>TYNA_TRINITY_DN5316_c0_g1</i>	TYNA_1-F	CCGCAACTCAGGAAAAGACG
	TYNA_1-R	AACGGGACGGATCAGAAACG
<i>TYNA_TRINITY_DN10162_c0_g1</i>	TYNA_2-F	TGAATGAGCTTGGGGTTCCG
	TYNA_2-R	CGTCTTTGGTTCTTCCACAACGTG
<i>TDC_TRINITY_DN624_c0_g1</i>	TDC-F	CATAGCCATGGAGAATGGTGTT
	TDC-R	CCTGGCTGAACTTGGCTGAG
<i>PSOMT1_TRINITY_DN14539_c0_g1</i>	PSOMT1-F	AGGAGTTTTACCGCGCATA
	PSOMT1-R	AGCAAGTGTTTGCTCCGAGT
<i>CNMT_TRINITY_DN1541_c0_g1</i>	CNMT-F	TGCCCATAGCCATCAACACC
	CNMT-R	AGCATCCTCTAAGGTGGCTG

3 结果与分析

3.1 秃叶黄檗中有效成分的含量测定

秃叶黄檗根皮、茎皮、叶 HPLC 色谱分析结果如表 2 所示, 木兰花碱与小檗碱在秃叶黄檗根皮、茎皮、叶中均可检测到, 在叶中的黄柏碱与巴马汀,

和在茎皮中的药根碱含量均低于仪器检测限, 不做计算记为“0”。

黄柏碱与巴马汀在茎皮的含量显著高于根皮, 显著高于叶; 药根碱在叶中的含量显著高于根皮与叶; 与此相反木兰花碱在根皮与茎皮中含量相似,

表 2 秃叶黄檗 5 个异喹啉类成分含量测定结果

Table 2 Determination results of five isoquinoline alkaloids in *P. chinense* var. *glabriusculum*

部位	黄柏碱/%	木兰花碱/%	药根碱/%	巴马汀/%	小檗碱/%
根皮	0.21±0.05 b	0.26±0.08 a	0.03±0.01 b	0.01±0.01 b	1.47±0.06 a
茎皮	0.56±0.01 a	0.25±0.03 a	0 b	0.53±0.02 a	1.23±0 b
叶	0.02±0.02 c	0.01±0.01 b	0.16±0.07 a	0 b	0.08±0.07 c

不同字母表示差异性显著, $P<0.05$ 。
different letters indicate significant differences, $P<0.05$.

均显著高于在叶中的含量;小檗碱在根中含量最高,其次为茎皮,在叶中含量最少。

3.2 秃叶黄檗转录组质量分析与组装结果

完成秃叶黄檗根皮、茎皮、与叶 3 个组织部位 9 个样品的转录组测序,质控获得 62.62 Gb Clean Data,各样品 Clean Data 均达到 6 Gb 以上, Q_{30} 碱基百分比在 92.86%及以上,说明此次测序质量较好、较完整。使用 Trinity 软件组装后共获得 85 908 条 Unigene。其中长度在 1 kb 以上的 Unigene 有 19 580 条, Unigene 的 N_{50} 为 1 342 bp, 组装完整性较高, 适合进一步分析。

3.3 秃叶黄檗转录组 unigenes 功能注释

3.3.1 注释结果汇总 使用 DIAMOND 软件,将获得的 Unigene 序列在 NR、GO、KEGG、eggNOG4.5、Swiss-Prot 数据库中比对,使用 KOBAS 得到 Unigene 在 KEGG 中的 KEGG Orthology 结果, InterProScan 利用 InterPro 整合的数据库分析新基因的 GO Orthology 结果,预测完 Unigene 的氨基酸序列之后使用 HMMER 软件与 Pfam 数据库比对,共有 49 114 条 Unigene 获得基因注释信息。占全部 Unigene 的 57.17%,见表 3。

3.3.2 NR 注释 通过将组装的 Unigene 注释与 NR 数据库进行比对,见图 3,共计 47 452 条 Unigene

表 3 各数据库 Unigenes 数量注释信息统计

Table 3 Annotated statistics of Unigenes in various databases

数据库	数量	占比/%
COG_Annotation	9 386	10
GO_Annotation	38 627	44
KEGG_Annotation	29 537	34
KOG_Annotation	24 305	28
Pfam_Annotation	24 957	29
Swissprot_Annotation	28 808	33
TrEMBL_Annotation	46 141	53
eggNOG_Annotation	37 582	43
nr_Annotation	47 452	55
All_Annotated	49 114	57

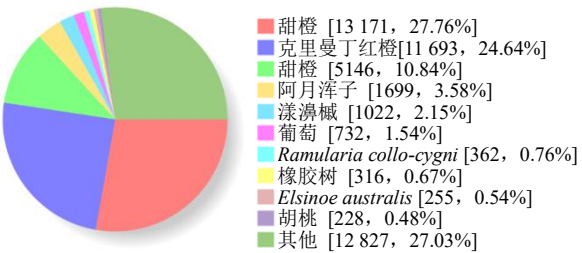


图 3 NR 注释统计物种分布图

Fig. 3 NR annotated statistical species distribution map

得到注释。红橘 *Citrus clementina* Hort. ex Tanaka、柑橘 *Citrus reticulata* Blanco、阿月浑子 *Pistacia vera* L.、漾濞槭 *Acer yangbiense* Y. S. Chen & Q. E. Yang、葡萄释结果。甜橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck、克里曼丁 *Vitis vinifera* L.、*Ramularia collo cygni* B. Sutton & J. M. Waller (Rcc)、橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.、*Elsinoë australis* Bitanc. & Jenkins、胡桃 *Juglans regia* L.。其中与同为芸香科的甜橙、克里曼丁红橘与柑橘拥有最多的相似序列,分别为 27.76%、24.64%与 10.84%,其次为阿月浑子的 3.58%,与漾濞槭、葡萄、橡胶树相似序列较少,分别为 2.15%、1.54%和 0.67%。

3.3.3 GO 注释统计 共有 38 627 条 Unigene 注释到 GO 数据库,按功能可分为生物过程(CC)、细胞成分(MF)、分子功能(BP)3类,共有 45 个小组(图 4),参与的生物过程主要为细胞过程,共 18 997 条 Unigenes 得到注释,其次为代谢过程,有 16 399 条注释的 Unigenes。参与细胞的组分的注释 Unigenes 最多的为细胞解剖实体,有 20 518 条,其次为细胞内的,有 13 018 条。分子功能结合的 Unigenes 数最多,为 18 905 条,其他如转录调节活性较少,为 1 321 条。

秃叶黄檗根茎叶转录组数据中有 24 305 条 Unigenes 获得 KOG 注释,分为 25 个不同的 KOG 功能类群,见图 5,种类覆盖全面,包括大多数的生命活动。一般功能预测注释比率最高为 23.44%,其

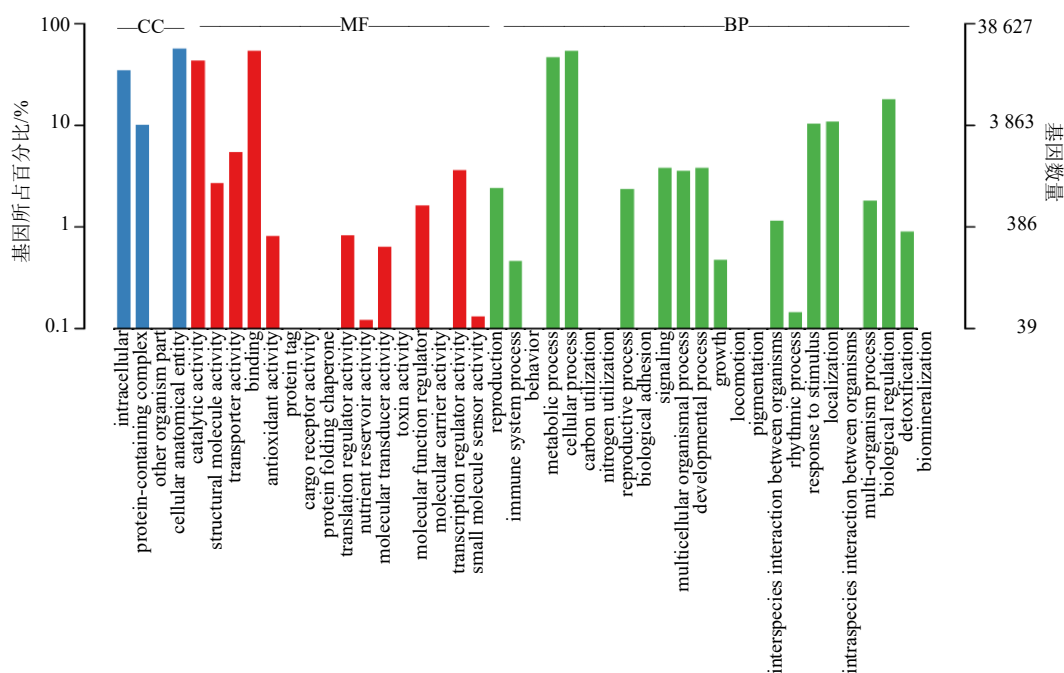


图4 差异基因的GO功能分类

Fig. 4 GO functional classification of DEGs

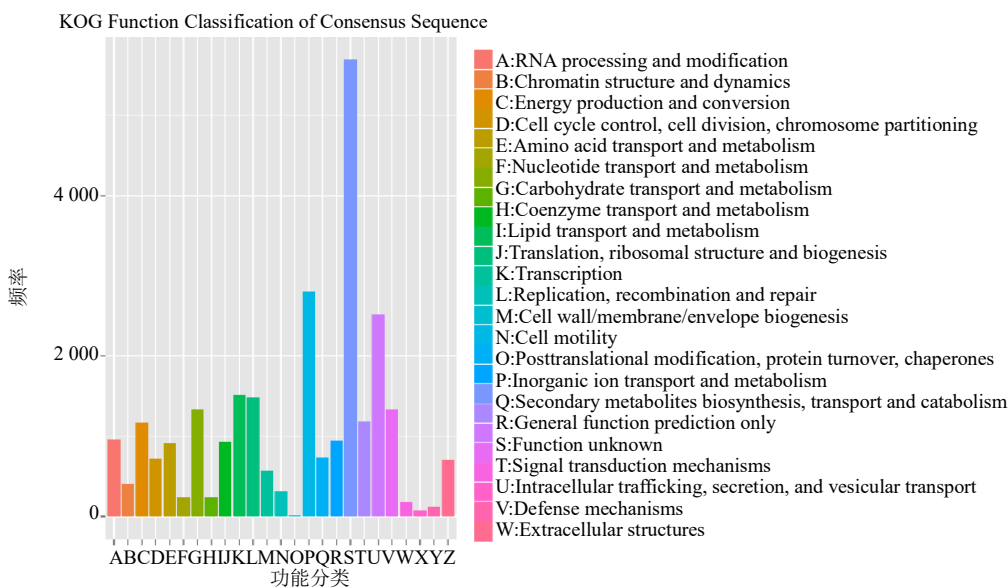


图5 差异基因的KOG功能分类

Fig. 5 KOG functional classification of DEGs

次为翻译后修饰、蛋白质反转、伴侣蛋白的注释率为11.51%、信号传导机制的10.38%的注释率。此外次生代谢物生物合成、转运和分解代谢有3.9%的注释率,表明秃叶黄檗根茎叶转录组中包含信号传导和次生代谢相关基因,为后续转录组数据额挖掘提供依据。

3.4 差异表达基因分析

通过分析比较转录组数据(表4),根vs茎存在3319条差异表达基因,上调为1706条,下调为1613条;根vs叶中有8735条差异表达基因,上调为4698条,下调为4037条;茎vs叶中有6091条差

表 4 差异表达基因分析

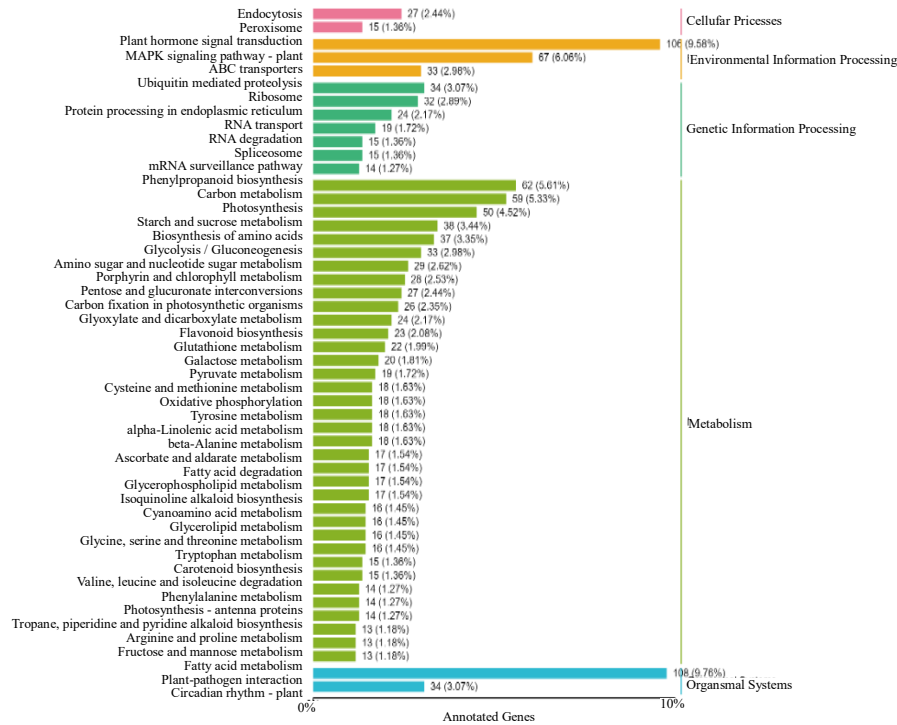
Table 4 Analysis of DEGs

比较组	差异表达基因数	上调差异表达基因数	下调差异表达基因数
根vs茎	3 319	1 706	1 613
根vs叶	8 735	4 698	4 037
茎vs叶	6 091	3 483	2 608

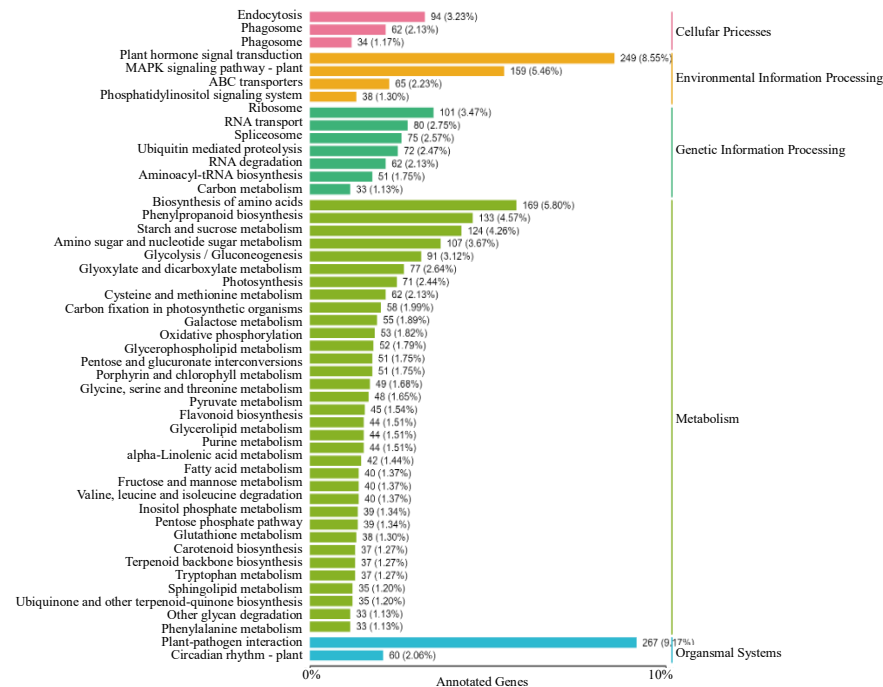
异表达基因，上调为 3 483 条，下调为 2 608 条。所有差异表达基因中为根与叶中的差异表达基因为最多。

3.5 差异表达基因 KEGG 富集分析

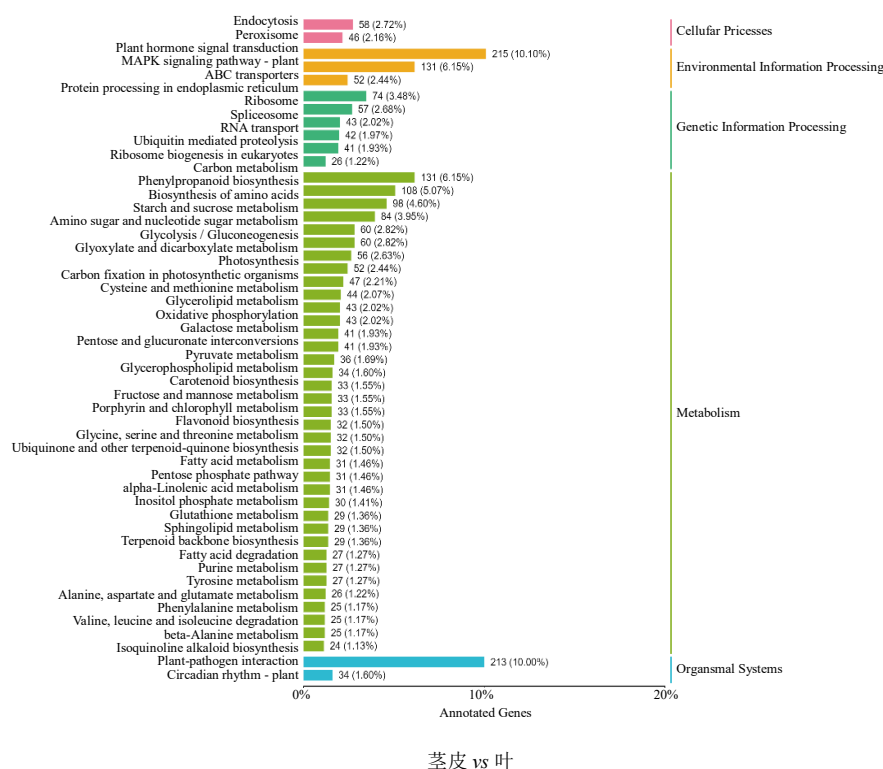
根 vs 茎、根 vs 叶、茎 vs 叶比较组分别有 2 050、5 508、3 928 条差异表达基因得到注释。图 6 只显



根皮 vs 茎皮



根皮 vs 叶



茎皮 vs 叶
图 6 差异表达基因的 KEGG 富集分析
Fig. 6 KEGG pathways enriched for DEGs

示前 20 条代谢通路。在根 vs 茎中，植物-病原体互作 (plant-pathogen interaction, ko04626) 差异表达基因最多为 108 条，然后依次为植物激素信号传导 (plant hormone signal transduction, ko04075) 的 106 条，植物 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway - plant, ko04016) 的 67 条。在根 vs 叶与茎 vs 叶中，植物-病原体互作、植物激素信号传导代谢通路仍然拥有最多的差异表达基因，在根 vs 叶中分别有 267、249 条，在茎 vs 叶中分别 213、215 条。有异喹啉生物碱合成有 29 条差异表达基因。在茎 vs 叶中，异喹啉生物碱合成 (isoquinoline alkaloid biosynthesis, ko00950) 在不同组织比较中也显著富集，分别为 17、29、24 条。为后续挖掘参与秃叶黄檗的异喹啉生物碱合成基因挖掘提供重要依据。

3.6 与秃叶黄檗异喹啉生物碱合成相关的候选基因

如图 7 所示，去甲乌药碱合成酶 [(S)-norcoclaurine synthase, NCS]、番荔枝碱 7-氧-甲基转移酶 [(R,S)-reticuline 7-O-methyltransferase, PSOMT1]、(S)-乌药碱-N-甲基转移酶 [(R,S)-1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline N-methyltransferase, CNMT]、天冬氨酸转氨酶 (aspartate

amino- transferase, GOT) 等这些部分潜在差异表达基因被注释到参与异喹啉生物碱合成通路。NCS、CNMT、可待因 3-O-去甲基酶基因 (codeine 3-O-demethylase, CODM)、伯胺氧化酶 (primary-amine oxidase, TYNA) 与色氨酸脱羧酶 (L-tryptophan decarboxylase, TDC) 在根中总体表达较高，而 PSOMT1 在茎中表达较高，小檗碱桥酶 (berberine bridge enzymes, BBE)、酪氨酸氨基转移酶 (tyrosine aminotransferase, TAT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, ASP5)、双功能天冬氨酸转氨酶和谷氨酸/天冬氨酸预苯酯转氨酶 (bifunctional aspartate aminotransferase and glutamate/aspartate-prephenate aminotransferase, PAT) 在叶中表达量较高。

为了确定这些基因与异喹啉类生物碱成分积累的关系，对这些差异基因与 5 种异喹啉成分的相关性进行分析。结果见图 7-B，其中 CNMT (TRINTTY_DN1541_c0_g1)、TDC (TRINTTY_DN4417_c0_g1)、BBE (TRINTTY_DN11766_c0_g1)、TYNA (TRINTTY_DN5458_c0_g1)、TDC (TRINTTY_DN14118_c0_g1)、NCS (TRINTTY_DN5798_c1_g1)、TYNA (TRINTTY_DN5316_c0_g1)、TDC

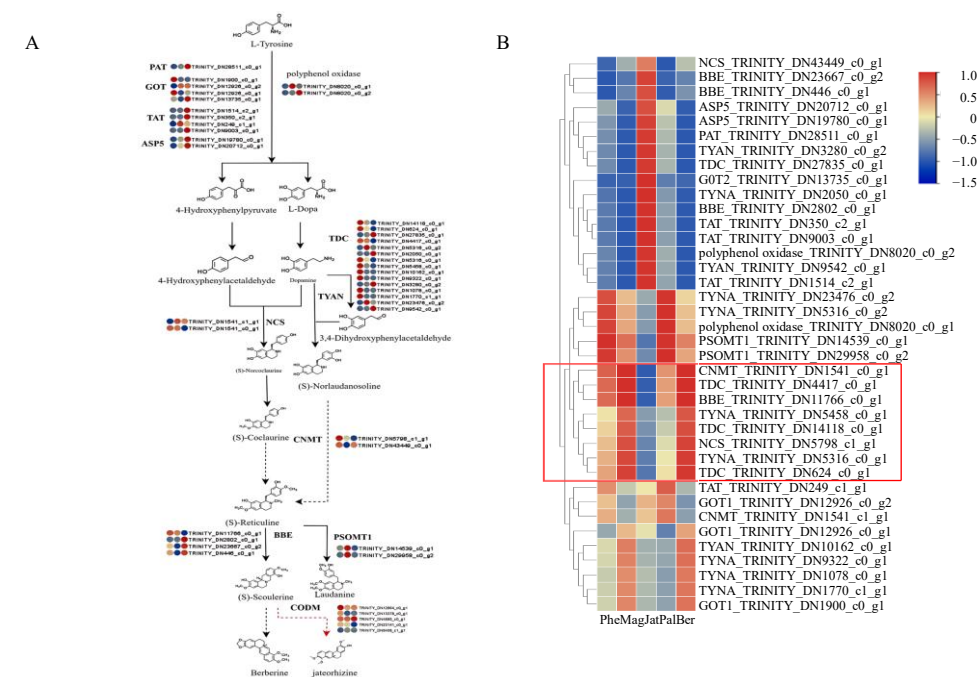


图 7 异喹啉类生物碱合成途径差异基因表达 (A) 与成分相关性分析 (B)

Fig. 7 Isoquinoline alkaloid synthesis pathway DEGs (A) and composition correlation analysis (B)

(TRINTTY_DN624_c0_g1) 等 8 个基因与小檗碱、木兰花碱含量高度正相关, 与药根碱含量负相关, 其中小檗碱、木兰花碱与药根碱在根皮、茎皮与叶的含量分布上呈现负相关性, 这些基因的表达与异喹啉生物碱类成分含量分布趋势具有一致性, 对于秃叶黄檗异喹啉类生物碱成分合成积累具有重要影响作用。

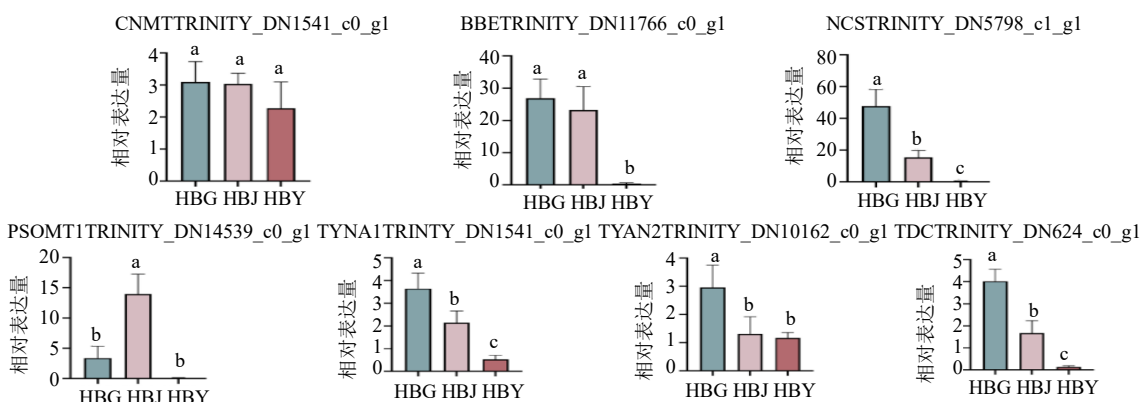
3.7 qRT-PCR 验证

将筛选到的 *BBE*、*NCS*、*PSOMT1*、*CNMT* 等基

因使用 qRT-PCR 技术进行验证 (图 8)。qRT-PCR 的基因表达结果以叶为对照组计算所得的结果, RNA-seq (FPKM) 与 qRT-PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 两者表达趋势一致。除 *PSOMT1* 基因外, 其余基因在根中总体表达较高。

4 讨论

在本研究中, 使用高效液相色谱法对秃叶黄檗不同组织部位展开有效成分含量测定, 测得异喹啉类生物碱中的木兰花碱与小檗碱的含量均为根皮 >



HBG、HBJ、HBY 分别对应秃叶黄檗根皮、茎皮、叶, 不同字母表示差异性显著, $P < 0.05$ 。

HBG, HBJ and HBY correspond to root bark, stem bark and leaf of *P. chinense* var. *glabriusculum* and different letters indicate significant differences, $P < 0.05$.

图 8 qRT-PCR 对转录组测序数据的验证

Fig. 8 Selective validation of transcriptome sequencing data by qRT-PCR

茎皮>叶,与先前研究结果一致^[20],而黄柏碱含量差异与先前结果存在差异,黄柏碱与巴马汀在茎皮中含量较高,药根碱在叶中含量为最高。

为探讨异喹啉类生物碱在秃叶黄檗合成积累的内在调控机制,使用 Illumina HiSeq 平台对秃叶黄檗不同组织部位进行转录组学分析,共获得 62.62 Gb Clean Data,为进一步挖掘异喹啉生物碱生物合成相关的关键基因提供了研究基础。差异基因分析表明,来自 3 个不同组的差异基因主要富集于植物激素信号传导与植物-病原体互作通路,在异喹啉生物碱生物合成途径的通路基因也具备显著差异,共鉴定了 38 个参与异喹啉生物碱生物合成的差异基因,其中大多数结构基因如 NCS、PSOMT1 和 TAT 等多集中于该类成分合成通路的上游,该结果与大多通过植株不同组织部位转录组进行异喹啉类生物碱合成通路研究趋于一致^[21-22]。

有研究表明多巴胺对于小檗碱的合成具有重要的影响作用^[23],且多巴胺和 4-羟基苯醛为已知小檗碱合成前体物质,因此研究多巴胺生物合成相关基因也具有重要意义,参与多巴胺合成的 TDC (TRINTTY_DN4417_c0_g1)、TDC (TRINTTY_DN624_c0_g1) 与 TDC (TRINTTY_DN14118_c0_g1) 的表达量与小檗碱含量高度相关,且主要表达于根皮中。

此外,CNMT(TRINTTY_DN1541_c0_g1)、NCS (TRINTTY_DN5798_c1_g1)、BBE (TRINTTY_DN11766_c0_g1)、TYNA (TRINTTY_DN5458_c0_g1)、TYNA (TRINTTY_DN5316_c0_g1) 与小檗碱含量正相关,(S)-去甲乌药碱合成酶[(S)-norcoclaurine synthase, NCS]与小檗碱桥酶被认为是异喹啉类生物碱合成途径上的限速酶^[24]。NCS 基因在唐松草、罂粟、岩黄连及其他属黄连植物中被陆续报道,并验证 NCS 具有催化生成去甲乌药碱的功能,对于异喹啉生物碱进化和多样化是一个重要的酶^[25-27];BBE 是小檗碱生物合成的关键酶,在 BBE 的催化作用下,番荔枝碱 N-甲基环化而形成小檗碱的完整 C 环,从而构成原小檗碱的基本骨架-金黄紫堇碱,Ziegler 等^[28]和 Dittrich 等^[29]从加州罂粟 *Eschscholzia californica* 中分离并鉴定出 *EcBBE* 基因在酵母中表达,建立了通过大肠杆菌和酵母共培养的方式实现左旋金黄紫堇碱的生物合成途径。

在本研究中,参与吗啡合成的可待因-3-氧-脱甲基酶 (codeine 3-O-demethylase, CODM) 得到注

释,但在秃叶黄檗中不存在例如吗啡类的成瘾性成分,该结果的一方面的原因可能是基因功能注释方式的不完善,另一方面可能是与其他合成吗啡类植物分离时留下的进化残留。在最近的一项研究中发现,CODM 以 (S)-tetrahydrocolumbamine 为底物脱甲基产生 demethyl-tetrahydrocolumbamine,在秃叶黄檗中,除药根碱外大多异喹啉类成分 C-3 羟基存在甲基化,因此药根碱的合成可能需要脱甲基酶的参与^[30]。部分 CODM 在秃叶黄檗叶组织中有较高的表达量,对于药根碱的合成具有重要影响作用。

本研究通过对秃叶黄檗根皮、茎皮与叶不同组织部位进行 5 种生物碱成分的含量测定,结合转录组数据进行分析,极大地丰富秃叶黄檗的生物学信息,挖掘了参与秃叶黄檗异喹啉生物碱合成通路的关键基因与表达规律,为后续秃叶黄檗的育种、遗传变异与生长发育的研究提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谭荣,张静,谭尔,等.川渝地区黄柏两种基源品种的野生资源调查[J].亚太传统医药,2016,12(13):33-35.
- [2] 方清茂,曹浩,舒光明.川黄柏中盐酸小檗碱的含量及其道地性研究[J].华西药学杂志,2004,19(4):275-276.
- [3] 陈美琳,李芝奇,范琦琦,等.小檗碱药理作用及其相关作用机制研究进展[J].中草药,2022,53(18):5861-5872.
- [4] Feng X J, Sureda A, Jafari S, et al. Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: From mechanisms to therapeutics [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1923-1951.
- [5] Cicero Arrigo F G, Alessandra B. Berberine and its role in chronic disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 928: 27-45.
- [6] Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, et al. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(1): 367-372.
- [7] Minami H. Fermentative production of plant benzyloquinoline alkaloids in microbes [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2013, 77(8): 1617-1622.
- [8] Xiao D P, Liu Z B, Zhang S S, et al. Berberine derivatives with different pharmacological activities via structural modifications [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2018, 18(17): 1424-1441.
- [9] 谭尔,罗尚华,林升得,等.HPLC 测定秃叶黄皮树和黄皮树中 5 种有效成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(23):135-139.
- [10] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. Full-length

- transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(7): 644-652.
- [11] 邓泱泱, 荔建琦, 吴松峰, 等. nr 数据库分析及其本地化 [J]. 计算机工程, 2006, 32(5): 71-73.
- [12] Koonin E V, Fedorova N D, Jackson J D, *et al.* A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes [J]. *Genome Biol*, 2004, 5(2): R7.
- [13] Tatusov R L, Galperin M Y, Natale D A, *et al.* The COG database: A tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 33-36.
- [14] Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Forslund K, *et al.* eggNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D286-D293.
- [15] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, *et al.* The KEGG resource for deciphering the genome [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Database issue): D277-D280.
- [16] Apweiler R, Bairoch A, Wu C H, *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Database issue): D115-D119.
- [17] Langmead B, Trapnell C, Pop M, *et al.* Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome [J]. *Genome Biol*, 2009, 10(3): R25.
- [18] Li B, Dewey C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [19] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(5): 511-515.
- [20] 季可可, 谢红旗, 蔡松, 等. 黄皮树不同部位生长过程中主要生物碱成分的累积研究 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3462-3466.
- [21] Xu D Q, Lin H F, Tang Y P, *et al.* Integration of full-length transcriptomics and targeted metabolomics to identify benzyloquinoline alkaloid biosynthetic genes in *Corydalis yanhusuo* [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 16.
- [22] 周兴乾, 耿应敏, 张体操, 等. 大黄藤中黄藤素生物合成途径关键酶基因的筛选 [J]. 药学报, 2024, 59(6): 1873-1882.
- [23] Kulma A, Szopa J. Catecholamines are active compounds in plants [J]. *Plant Sci*, 2007, 172(3): 433-440.
- [24] 刘金凤, 黄鹏, 卿志星, 等. 苄基异喹啉类生物碱生物合成与代谢工程研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(8): 2194-2200.
- [25] 冯飞雪, 吕瑞华, 李依民, 等. 延胡索去甲乌药碱合成酶基因 CyNCS1 克隆及其表达模式分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2024, 52(3): 146-154.
- [26] He S M, Liang Y L, Cong K, *et al.* Identification and characterization of genes involved in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis* species [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 731.
- [27] Chen D X, Pan Y, Wang Y, *et al.* The chromosome-level reference genome of *Coptis chinensis* provides insights into genomic evolution and berberine biosynthesis [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 121.
- [28] Ziegler J, Facchini P J. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 735-769.
- [29] Dittrich H, Kutschan T M. Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essential to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(22): 9969-9973.
- [30] Wu L, Zhao B, Deng Z, *et al.* A biosynthetic network for protoberberine production in *Coptis chinensis* [J]. *Horticulture research*, 2024, 11(1): uhad259.

[责任编辑 时圣明]