

# 山葡萄 UDP-葡萄糖:类黄酮 5-O-葡萄糖基转移酶 (5GT) 等位基因的克隆与分析

李丹丹<sup>1</sup>, 傅佩宁<sup>2</sup>, 杨宏志<sup>1</sup>, 朱磊<sup>1</sup>, 梁英<sup>1</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319)

(2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100000)

**摘要:** 山葡萄中大量的双糖苷花色苷严重影响山葡萄酒品质, 而 5GT 是合成双糖苷花色苷的关键酶。研究不同葡萄品种间 5GT 等位基因的差异, 为抑制双糖苷花色苷的合成奠定基础, 对提高山葡萄酒的品质有重要意义。本研究克隆了‘赤霞珠’、‘左山一’、‘哈桑’和‘左红一’中的 5GT 等位基因, 并用软件对其进行了序列分析和生物信息学分析, 共获得了 7 个 5GT 等位基因, 均位于葡萄 9 号染色体上, 分别编码 297~464 个氨基酸。序列分析结果表明, 4 个 5GT 等位基因由于基因突变可能丧失了 5GT 功能; 7 个 5GT 等位基因均没有信号肽, 属于 GT1 家族中的 5GT 亚家族。不同葡萄品种中的 5GT 等位基因存在一定差异, 推测这 7 个 5GT 等位基因中可能只有 3 个 5GT 可以合成双糖苷花色苷。

**关键词:** UDP-葡萄糖:类黄酮 5-O-葡萄糖基转移酶 (5GT); 山葡萄; 等位基因; 花色苷

文章编号: 1673-9078(2018)06-122-129

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.017

## Cloning and Analysis of UDP-Glucose:Flavonoid 5-O-Glucosyl

### Transferase(5GT) Allele in *Vitis amurensis*

LI Dan-dan<sup>1</sup>, FU Pei-ning<sup>2</sup>, YANG Hong-zhi<sup>1</sup>, ZHU Lei<sup>1</sup>, LIANG Ying<sup>1</sup>

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

(2. China Agricultural University, College of Food Science and Nutrition Engineering, Beijing 100000, China)

**Abstract:** A large number of diglucosidic anthocyanins in *Vitis amurensis* seriously affect the quality of wines, and 5GT is the key enzyme for the synthesis of diglycoside anthocyanins. Therefore, studying the differences of 5GT alleles among different grape varieties lay the foundation for inhibiting the synthesis of diglucosidic anthocyanins, which is of great significance for improving the quality of wines made from *Vitis amurensis* grapes. The 5GT alleles in ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Zuoshanyi’, ‘Hasang’ and ‘Zuohongyi’ were cloned and analyzed in this study by sequence analysis and bioinformatics analysis, and seven 5GT alleles were all on chromosome 9 and encoded 297~464 amino acids. The results of sequence analysis showed that four 5GT alleles might lose the function of 5GT due to the gene mutation, seven 5GT alleles had no signal peptide and belongs to the 5GT subfamily of GT1. There were some differences in 5GT alleles among different grape varieties. from which we could speculate that only three alleles could synthesize diglucosidic anthocyanins.

**Key words:** UDP-glucose:flavonoid 5-O-glucosyl transferase(5GT); *Vitis amurensis*; allele; anthocyanin

花色苷是葡萄果皮呈现多种颜色的主要原因, 而糖基转移酶是生成花色苷的关键酶<sup>[1]</sup>。研究表明糖基

收稿日期: 2018-01-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (3101828); 黑龙江省自然科学基金青年科学基金项目 (QC2017024); 黑龙江省教育厅科研项目 (12541579); 大庆市指导性科技计划项目 (zd-2016-108); 黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动计划资助项目 (XYB2013-16)

作者简介: 李丹丹 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 葡萄分子生物学  
通讯作者: 朱磊 (1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 葡萄生理与葡萄酒化学等研究工作; 梁英 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物的活性研究

转移酶几乎存在于所有的生物体中, 直接参与低聚糖、单糖苷和聚糖苷等生物合成, 目前已形成超基因家族<sup>[2]</sup>。葡萄中最常见的两种糖基转移酶是 UDP-葡萄糖:类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶 (UDP-Glucose:flavonoid-3-O-Glucosyltransferase, 3GT) 和 UDP-葡萄糖:类黄酮 5-O-葡萄糖基转移酶 (UDP-Glucose:flavonoid-5-O-Glucosyltransferase, 5GT), 二者属于 GT1 家族中不同的亚家族<sup>[3]</sup>。花色苷在 3GT 的作用下生成 3-O-单葡萄糖苷, 而 3-O-单葡萄糖苷在 5GT 作用下进一步反应生成 3,5-O-双葡萄糖苷。

葡萄中 3GT 的研究报道较多, 而 5GT 报道相对

较少。植物中 5GT 的研究最早是从花卉中开始的, 花卉植物中的 5-O-糖基化作用是使花色多样化的重要原因。目前已在很多植物中发现了能催化 3-O-单葡萄糖苷生成 3,5-O-双葡萄糖苷的 5GT, 最早发现于朝颜剪秋罗(*Silene dioica*)<sup>[4]</sup>、矮牵牛(*Petunia hybrid*)<sup>[5]</sup>、紫罗兰(*Matthiola incana*)<sup>[6]</sup>和紫苏(*Perilla frutescens*)<sup>[7]</sup>中, 后续又在大丽花(*Dahlia variabilis*)<sup>[8]</sup>、花菖蒲(*Iris ensata*)<sup>[9]</sup>、荷兰鸢尾(*Iris hollandica*)<sup>[10]</sup>、三花龙胆(*Gentiana triflora*)<sup>[11]</sup>、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)<sup>[12]</sup>和芍药(*Paeonia lactiflora*)<sup>[13]</sup>等多种鲜花中发现。在野生马铃薯(*Solanum Sogarandinum*)<sup>[14]</sup>、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[15]</sup>和茄子(*Solanum melongena*)<sup>[16]</sup>等植物中也发现了 5GT。对于葡萄中双糖苷花色苷的研究, Jánváry 等<sup>[17]</sup>在欧美杂交葡萄品种‘Regent’中克隆出 2 个功能不同的 5GT 等位基因, 分别为来自‘Chambourcin’能催化 3-O-单葡萄糖苷生成 3,5-O-双葡萄糖苷的 *Cha5GT*, 和‘Diana’不能催化合成 3,5-O-双葡萄糖苷的 *Dia5GT*, 并证实 *Dia5GT* 不能合成双糖苷花色苷是由氨基酸突变和提前终止密码子导致 C-末端的截断造成的, 说明欧亚种葡萄不能合成双糖苷花色苷的原因是 5GT 等位基因由于突变而丧失 5GT 酶活性。但近期有报道称在欧亚种葡萄中检测到痕量级双糖苷花色苷<sup>[18-20]</sup>。Yang 等<sup>[19]</sup>在欧亚种葡萄中发现多个丧失功能的 5GT 等位基因。He 等<sup>[21]</sup>在山葡萄‘左山一’中克隆出一个 5GT 基因, 并通过异源表达证实其能够催化合成 3,5-O-双葡萄糖苷。

山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr)在我国主要分布在东北三省, 具有极强的抗寒能力。山葡萄果实成熟后呈紫黑色, 具有粒小皮厚、汁少籽多、酸高糖低、单宁多、色素浓等特点, 不宜鲜食, 主要用于酿酒<sup>[22-24]</sup>。山葡萄酒是中国独有的特殊葡萄酒种, 颜色呈宝石红, 因其色泽浓郁、果香独特和口感醇厚等特点而广受消费者喜爱<sup>[25]</sup>。但山葡萄中存在大量双糖苷花色苷, 严重影响葡萄酒的陈酿品质。目前, 关于山葡萄双糖苷花色苷合成机制的研究较少, 本研究选取了 4 种酿酒葡萄品种, 分别是欧洲种‘赤霞珠’、山葡萄‘左山一’、山欧杂交品种‘哈桑’和‘左红一’为实验材料, 通过 PCR 等技术克隆 5GT 等位基因, 分析山葡萄及山欧杂交品种中 5GT 等位基因的差异, 为解析山葡萄及其杂交品种间糖基化花色苷组成差异的机制提供基础数据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 植物材料

‘赤霞珠’(*V. vinifera* L.cvCabernet Sauvignon)、‘左

山一’(*V. amurensis* Rupr)、‘哈桑’(*V. vinifera*, *V. amurensis*)、‘左红一’(*V. vinifera*, *V. amurensis*)的叶片采集于中国农业大学北京上庄实验站葡萄种质资源圃, 取葡萄枝顶端第五片完全展开的无病害幼叶, 用镊子装进 5 mL 离心管中, 置于液氮罐中速冻, 保存于 -80 °C 冰箱。

### 1.2 基因组 DNA 提取

取适量葡萄叶片于液氮中研磨成粉, 用优化改良的 CTAB 法提取高质量葡萄基因组 DNA (gDNA)<sup>[26]</sup>, 用 1%琼脂糖凝胶电泳和 Nano-drop 浓度仪检测 DNA 质量, -20 °C 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

引用 Jánváry 等<sup>[17]</sup>克隆欧亚种葡萄中 5GT 的引物, Forward Primer: 5’-CACTTTCACCTGAGACACC-3’和 Reverse Primer: 5’-CAGTACATCAAACGCCACTC-3’, 以葡萄 gDNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到目的片段, PCR 产物预期大小为 1455 bp。PCR 反应体系为 50  $\mu$ L, 包括 35  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ L dNTP, 5  $\mu$ L 10 $\times$ pfu reaction buffer, 正反引物各 2  $\mu$ L, 1.5  $\mu$ L gDNA, 0.5  $\mu$ L pfu 聚合酶。反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 240 s, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

### 1.4 TA 克隆与鉴定

通过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物大小是否与预期一致, 并用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收目的片段。将纯化的目的基因连接到 pLB 载体上, 再用热激法转化到大肠杆菌感受态细胞 DH-5 $\alpha$  中, 转化成功后挑取单菌落, 进行菌落 PCR, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆, 并随机选取阳性克隆送至博迈德生物技术有限公司测序。

### 1.5 序列分析

序列拼接利用 SeqMan 软件完成; 序列校准、开放阅读框查找及氨基酸序列翻译利用 Editseq 软件完成; 多序列比对利用 DNAMAN8.0 软件完成; 同源性序列检索利用 NCBI 数据库中 BLAST 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 完成。

### 1.6 生物信息学分析

系统进化树的构建利用 MEGA5.1 软件完成, 采用 Neighbor-joining 法; 蛋白跨膜区分析和预测利用在线软件 THXHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/>

services/TMHMM/)完成;氨基酸序列分析利用蛋白质家族数据库 Pfam24.0(<http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>)完成;信号肽分析和预测利用在线软件 SignalP4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)完成;亚细胞定位预测和分析利用在线软件 TargetP1.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)完成;预测 5GT 蛋白质二级结构利用在线软件 GOR([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)), 预测理化性质等信息有在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)完成;预测蛋白质三维立体结构利用在线网站 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>)完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 gDNA 质量检测

通过改良的 CTAB 法提取葡萄幼叶中 gDNA, 经 1%琼脂糖凝胶电泳检验, 条带清晰完整, 没有拖尾和弥散现象, 无蛋白污染或降解。

通过 Nano-drop 浓度仪测定 DNA 浓度, 均在 1000~1300 ng/μL 范围内, OD<sub>260/280</sub> 值在 1.8~2.0 范围, OD<sub>230/280</sub> 值在 2.0~2.2 范围, DNA 质量较好, 无杂质污染, 可以用于后续实验。

### 2.2 5GT 等位基因的克隆

葡萄中 5GT 基因没有内含子<sup>[19]</sup>, 将 NCBI 上发表的‘左山一’*Va5GT*(KF996717.1)核苷酸序列放入葡萄基因组网站 (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>)中 BLAST, 找到黑比诺中一个位于 9 号染色体上的 5GT 基因, 全长 1395 bp, 两条核苷酸序列比对同源性>99%, 我们确定位于 9 号染色体上的 5GT 基因组序列没有内含子。将测序结果拼接后与 Jánváry 等<sup>[17]</sup>在欧美杂种葡萄‘Regent’中发现的 *Cha5GT* 和 NCBI 上已发表的山葡萄 *Va5GT*(KF996717.1)比对后发现同源性>99%, 说明 7 个目的基因均为 5GT 等位基因。

### 2.3 序列分析

用软件找到 7 个 5GT 等位基因的开放阅读框, 将其翻译成氨基酸序列, 再与 *Cha5GT*、*Dia5GT* (由慕尼黑大学的施瓦布教授提供)、NCBI 上已发表的山葡萄 *Va5GT*(KF996717.1)、圆叶葡萄 *5GT*(KT327064.1)和已经完成全基因组测序的欧亚种葡萄‘黑比诺’一起进行序列比对, 结果如图 1。通过葡萄基因组网站 BLAST 确定以上 5GT 基因均位于 9 号染色体上。

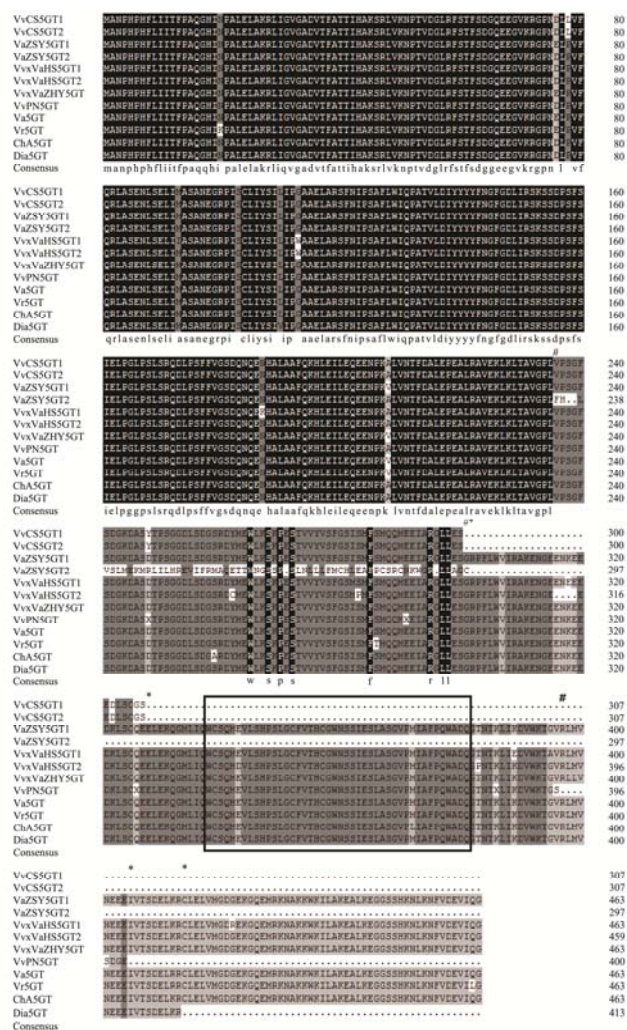


图 1 5GT 等位基因多序列比对图

Fig.1 Multiple sequence alignment of 5GT alleles

注: 方框内是 PSPG-Box, 序列中“.”表示氨基酸缺失, 序列上方“\*”表示终止密码子位置, “#”表示移码突变起始位置; 黑色阴影表示序列相似性=100%, 深灰色阴影表示序列相似性>75%; 浅灰色阴影表示>50%。*VvCS5GT1* 和 *VvCS5GT2* 是从‘赤霞珠’中克隆的 5GT 等位基因; *VaZSY5GT1* 和 *VaZSY5GT2* 是从‘左山一’中克隆的 5GT 等位基因; *VvXVaHS5GT1* 和 *VvXVaHS5GT2* 是从‘哈桑’中克隆的 5GT 等位基因; *VvXVaZHY5GT* 和是从‘左红一’中克隆得到的 5GT 等位基因; *VvPN5GT* 是‘黑比诺’(*V. vinifera* L. cv. Pinot Noir) 5GT; *Va5GT*(KF996717.1)是 NCBI 发表的山葡萄‘左山一’(*V. amurensis* Rupr. Zuoshanyi) 5GT; *Vv5GT*(KT327064.1)是圆叶葡萄(*V. rotundifolia*) 5GT; *Cha5GT* 是从‘Regent’中分离出的来自‘Chambourcin’的有功能的 5GT 等位基因, *Dia5GT* 是从‘Regent’中分离出的来自‘Diana’丧失功能的 5GT 等位基因。

从‘赤霞珠’中克隆出两个 5GT 等位基因, 命名为 *VvCS5GT1* 和 *VvCS5GT2*。*VvCS5GT1* 核苷酸序列全长 1394 bp, 在欧亚种葡萄中普遍存在, 由于第 902 位碱基缺失, 导致其氨基酸序列从第 301 个氨基酸开始移

码突变 (G301#), 并在第 328 位产生提前终止密码子 (E328\*), 造成 C-末端的截断, 丧失 UGT 家族均有的一个由 44 个氨基酸组成的保守序列 (PSPG-box) [27-29]。而 *VvCS5GT2* 比 *VvCS5GT1* 在欧亚种葡萄中相对少见, 只有 8% 的比例存在 [19]。与 *VvCS5GT1* 相比, *VvCS5GT2* 缺失第 1182 和 1183 位 'AG' 两个碱基, 因此全长仅 1392 bp。用 Editseq 软件寻找开放阅读框发现两个基因的开放阅读框完全相同, 都是 924 bp, 编码 307 个氨基酸, 预测分子量为 33.57 ku, 等电点为 4.768。与有正常 5GT 酶功能的 *Cha-5GT* 和 *Va5GT* 相比, *VvCS5GT1* 和 *VvCS5GT2* 的序列特征是由于碱基缺失产生提前终止密码子和移码突变导致肽链缩短, 因此推测 *VvCS5GT1* 和 *VvCS5GT2* 的转录产物均丧失 5GT 酶的正常功能, 不能生成双糖苷花色苷, 这与 Yang 等 [19] 人和 Xing 等 [20] 人的结论相符。'赤霞珠' 中的两个 5GT 等位基因 *VvCS5GT1* 和 *VvCS5GT2* 与其他葡萄品种 5GT 基因序列比对发现还存在两个氨基酸突变 P78L (第 78 个氨基酸由 P 变成 L) 和 D248Y, 这也许是 '赤霞珠' 5GT 的品种特征性突变。

'左山一' 中得到 2 个 5GT 等位基因, 命名为 *VaZSY5GT1* 和 *VaZSY5GT2*, 二者之间有 3 处碱基突变, 产生 3 处氨基酸差异, 分别为 E76D、V208A, 及第 703 位碱基缺失导致 *VaZSY5GT2* 从第 234 个氨基酸开始移码突变 (V236#) 并产生提前终止密码子 (R302\*)。 *VaZSY5GT1* 全长为 1395 bp, 开放阅读框为 1395 bp, 编码 464 个氨基酸, 预测分子量为 51.48 ku, 等电点为 5.069。 *VaZSY5GT2* 全长 894 bp, 编码 297 个氨基酸, 预测分子量 33.02 ku, 等电点 6.424。 *VaZSY5GT1* 与 NCBI 上发表的山葡萄 '左山一' *Va5GT* 同源性高达 99.93%, 核苷酸序列只有一个碱基差异, 即氨基酸差异 R412K, 与 *Cha5GT* 序列同源性高达 99.71%, 只有 4 个碱基差异, 氨基酸变化为 D76E、A208V、A259S、L372M, 推测 *VaZSY5GT1* 有 5GT 酶功能, 而 *VaZSY5GT2* 因移码突变和 C-末端截断丧失此酶功能。

'哈桑' 中得到 2 个 5GT 等位基因, 命名为 *Vv×VaHS5GT1* 和 *Vv×VaHS5GT2*, 两者之间共有 16 处碱基差异, 是四种葡萄中内部差异最大的品种。其中 5 处是无义突变, 所以存在 11 处氨基酸差异。非保守区氨基酸突变有 I93M、S103G、K187N、Y262C、S283P、ENKE316-319、T383P、E389K、A395G、R422G, 保守区氨基酸突变仅有 E343D。 *Vv×VaHS5GT1* 核苷酸序列全长为 1395 bp, 开放阅读框也为 1395 bp, 编码 464 个氨基酸, 预测分子量为 51.66 ku, 等电点为 4.976; *Vv×VaHS5GT2* 全长为 1383 bp, 开放阅读框为 1383 bp, 编码 460 个氨基酸, 预测

分子量为 50.95 ku, 等电点为 5.093。将 *Vv×VaHS5GT1* 与其他 5GT 比对发现几处错义突变 M93I、G113W、N187K、I282M、K318E、K389E、G422R, 没有碱基缺失、移码突变和提前终止密码子; 而将 *Vv×VaHS5GT2* 与其他 5GT 比对发现不仅有错义突变 S103G、G113W、Y262C、I282M、S283P、E343D、T383P, 还有因缺失 12 个碱基导致的框内缺失突变 ENKE316-319, 其中 S103G、S283P、ENKE316-319、T383P 四处氨基酸突变在甜冬葡萄 (*V. cinerea*) 中也存在, 而且甜冬葡萄中双糖苷花色苷含量 <15% [18,28-30], '哈桑' 中双糖苷花色苷占总花色苷含量的 10% [31]。 *Vv×VaHS5GT1* 被推测可以正常发挥 5GT 酶功能, *Vv×VaHS5GT2* 由于氨基酸缺失、错义突变则可能丧失 5GT 酶正常功能。G113W、I282M 突变在 *Vv×VaHS5GT1* 和 *Vv×VaHS5GT2* 中均有出现, 且只存在于 '哈桑' 中, 可推测 '哈桑' 5GT 品种特征性突变。

'左红一' 中克隆出两个 5GT 等位基因, 其中一个命名为 *Vv×VaZHY5GT*, 另一个 5GT 基因经比对发现和 '左山一' 中 *VaZSY5GT2* 核苷酸序列完全相同, 即 '左红一' 与 '左山一' 拥有一个共同的 5GT 基因 *VaZSY5GT2*。 *Vv×VaZHY5GT* 全长 1395 bp, 开放阅读框为 1395 bp, 编码 464 个氨基酸, 预测分子量为 51.43 ku, 等电点为 5.069; *Vv×VaZHY5GT* 与 *VaZSY5GT1* 只有一个碱基差异 T1195A, 氨基酸变化为 L399M。将 *Vv×VaZHY5GT* 与有功能的 *Va5GT* 和 *Cha5GT* 序列比对发现同源性 >99%, 且没有提前终止密码子或移码突变, 只有几个位于非保守区的错义突变, 而 '左红一' 中双糖苷花色苷占总花色苷含量的 31% [31], 因此推测 *Vv×VaZHY5GT* 可以催化合成双糖苷花色苷。

将所得 5GT 基因序列在葡萄基因组网站 (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) 中 BLAST, 找到 '黑比诺' 5GT 基因, 全长 1395 bp, 与 *Va5GT* 和 *Cha5GT* 的碱基序列同源性 >99%, 开放阅读框为 1203 bp, 编码 400 个氨基酸, 从第 396 个氨基酸开始移码突变并存在提前终止密码子, 因此推测 '黑比诺' 5GT 基因没有功能。NCBI 上发表圆叶葡萄 5GT 基因部分核苷酸序列长 1394 bp, 部分蛋白质序列由 464 个氨基酸组成。与其他 5GT 基因序列比对后, 发现圆叶葡萄 5GT 没有终止密码子, 但序列同源性较高, 只有三个圆叶葡萄品种特征性等位变异 N20K、S286T 和 Q462L。除此之外, 圆叶葡萄 5GT 与 *Cha5GT* 有 2 处等位变异 D76E 和 A208V, 但是这两个氨基酸位置保守性非常低, *Vv×VaZHY5GT*、*VaZSY5GT1*、*Va5GT* 和圆叶葡萄 5GT 的第 76 个和第 208 个氨基酸为谷氨酸 (E) 和缬氨酸 (V), 而在

*VvCS5GT1*、*VvCS5GT2*、*VaZSY5GT2*、*Vv×VaHS5GT1*、*Vv×VaHS5GT2*、‘黑比诺’*5GT*、*Cha5GT* 和 *Dia5GT* 中为天冬氨酸 (D) 和丙氨酸 (A)，可见这两个氨基酸位置不影响 *5GT* 酶的功能。此外，圆叶葡萄中只存在双糖苷花色苷<sup>[31]</sup>，因此推测圆叶葡萄 *5GT* 有功能。

### 2.4 系统进化树的构建

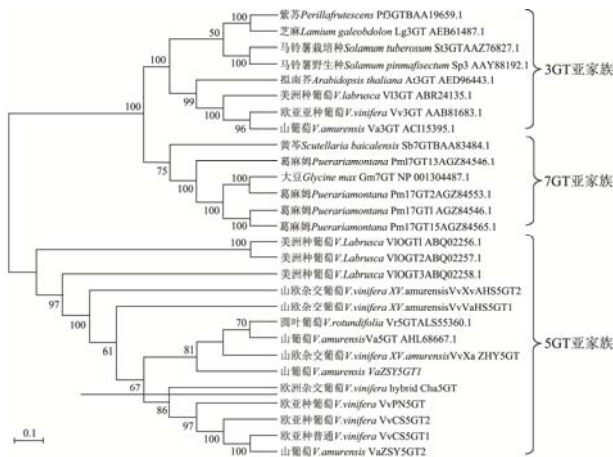


图2 系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree

将所得 *5GT* 序列 *VvCS5GT1*、*VvCS5GT2*、*VaZSY5GT1*、*VaZSY5GT2*、*Vv×VaHS5GT1*、*Vv×VaHS5GT2*、*Vv×VaZHY5GT* 置于 NCBI 数据库中 BLASTP，找到其他葡萄糖基转移酶蛋白质序列，用 MEGA5.1 软件邻接法构建系统进化树，结果如图 2。

在 NCBI 中搜索与花色苷生物合成有关的葡萄糖基转移酶基因，将其与本研究克隆的 7 个 *5GT* 序列比对并用邻接法构建系统进化树。如图 2 所示，进化树

根据区域选择性分成三簇，根据每簇的基因组成判断三个簇为 UGT 家族中的三个亚家族，分别为 3GT 亚家族，7GT 亚家族和 5GT 亚家族。从‘赤霞珠’、‘哈桑’、‘左红一’和‘左山一’中克隆出的 7 个 *5GT* 基因全部位于 5GT 亚家族，而且被推测在葡萄中不能合成双糖苷花色苷的无功能 *5GT* 基因除 *Vv×VaHS5GT2* 外全部聚集在横线下方，特点是均存在移码突变和提前终止密码子，而有功能的 *5GT* 基因则聚集在横线上方，聚集紧密说明遗传距离较近。

*Vv×VaHS5GT2* 虽然被推测为无功能 *5GT* 基因，但其与 *Vv×VaHS5GT1* 序列同源性最高，且没有移码突变或提前终止密码子，故与划分在横线上方的 *Vv×VaHS5GT1* 遗传距离较近。

### 2.5 亚细胞定位预测

通过 THXHMM2.0 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对 7 个 *5GT* 等位基因进行蛋白跨膜区分析和预测，结果表明均不存在跨膜区，不属于膜结合蛋白。用 Pfam24.0 在线网站 (<http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>) 分析蛋白质，结果表明 7 个 *5GT* 均属于 GT1 家族，GT-B 型折叠。用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测和分析以上 7 个 *5GT* 蛋白信号肽，结果表明均不属于膜结合蛋白，无信号肽，非分泌蛋白。通过 TargetP1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 对 *5GT* 蛋白进行亚细胞定位预测和分析，结果如表 1，说明 *5GT* 均存在于细胞中除线粒体、叶绿体外的其他部位，且再次验证不存在信号肽。

表 1 亚细胞定位分析表

Table 1 Subcellular localization analysis

| <i>5GT</i> 等位基因    | Len | cTP   | mTP   | SP    | other | RC |
|--------------------|-----|-------|-------|-------|-------|----|
| <i>VvCS5GT1</i>    | 307 | 0.079 | 0.063 | 0.220 | 0.556 | 4  |
| <i>VvCS5GT2</i>    | 307 | 0.079 | 0.063 | 0.220 | 0.556 | 4  |
| <i>VaZSY5GT1</i>   | 464 | 0.065 | 0.068 | 0.200 | 0.577 | 4  |
| <i>VaZSY5GT2</i>   | 297 | 0.065 | 0.067 | 0.219 | 0.580 | 4  |
| <i>Vv×VaHS5GT1</i> | 464 | 0.071 | 0.067 | 0.240 | 0.553 | 4  |
| <i>Vv×VaHS5GT2</i> | 460 | 0.067 | 0.066 | 0.243 | 0.563 | 4  |
| <i>Vv×VaZHY5GT</i> | 464 | 0.065 | 0.068 | 0.200 | 0.577 | 4  |

注：Len 表示蛋白质长度，cTP 表示叶绿体转运肽，mTP 表示线粒体转运肽，SP 表示信号肽，other 代表细胞其它部位，RC 表示预测可信度 (1~5，1 表示可信程度最高，5 表示可信程度最低)<sup>[32]</sup>。

### 2.6 蛋白质结构预测

通过 GOR 网站 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)) 预测 *5GT* 蛋白质二级结构，结果表明：*VvCS5GT1* 中  $\alpha$ -螺旋占

37.46%，延伸链占 14.98%，无规则卷曲占 47.56%；*VvCS5GT2* 中  $\alpha$ -螺旋占 37.46%，延伸链占 14.98%，无规则卷曲占 47.56%；*VaZSY5GT1* 中  $\alpha$ -螺旋占 33.62%，延伸链占 20.47%，无规则卷曲占 45.91%；*VaZSY5GT2* 中  $\alpha$ -螺旋占 36.53%，延伸链占 21.60%，

无规则卷曲占 41.87%; *Vv*×*VaHS5GT1* 中  $\alpha$ -螺旋占 38.15%, 延伸链占 17.89%, 无规则卷曲占 43.97%; *Vv*×*VaHS5GT2* 中  $\alpha$ -螺旋占 33.70%, 延伸链占 19.78%, 无规则卷曲占 46.52%; *Vv*×*VaZHY5GT* 中  $\alpha$ -螺旋占 34.70%, 延伸链占 19.83%, 无规则卷曲占 45.47%。

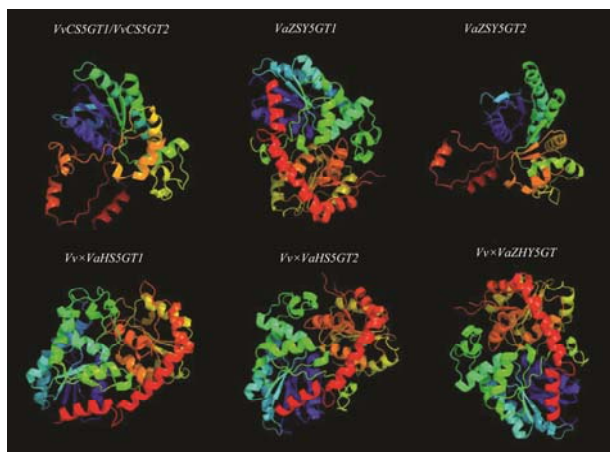


图3 三级结构预测图

Fig.3 Tertiary structure prediction

用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 5GT 蛋白质理化性质, 结果如表 2。肽链相对完整的 *Vv*×*VaHS5GT1*、*Vv*×*VaHS5GT2*、*Vv*×*VaZHY5GT* 和 *VaZSY5GT1* 消光系数较大, 而由于提前终止密码子而截断的 *VvCS5GT1*、*VvCS5GT2*、*VaZSY5GT2* 消光系数相对较小, 说明肽链缩短对消光系数有一定影响。7 个 5GT 等位基因的体外半衰期均达到 30 h, 不稳定系数均 >40, 因此均为不稳定蛋白质。亲水性数值越低蛋白质亲水性越强, 数值越高疏水性越强, *VaZSY5GT2* 为疏水性蛋白, 其余 5GT 均有一定亲水性。用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/>) 预测 5GT 蛋白质三维立体结构, 如图 3 所示, *VvCS5GT1* 和 *VvCS5GT2* 拥有相同三级结构, 前面被推测为有 5GT 酶功能的 *Vv*×*VaHS5GT1*、*Vv*×*VaZHY5GT* 和 *VaZSY5GT1* 蛋白结构折叠紧密且相对完整, 而被推测为无 5GT 酶功能的 *VvCS5GT1*、*VvCS5GT2*、*VaZSY5GT2* 结构均松散且不完整。虽然 *Vv*×*VaHS5GT2* 蛋白结构相对完整, 但与 *Vv*×*VaHS5GT1* 相比可以看出部分蛋白结构缺失。

表 2 5GT 蛋白质理化性质的预测

Table 2 Prediction of physicochemical properties of 5GT protein

| 5GT 等位基因                    | 消光系数/(M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) | 体外半衰期/h | 不稳定系数(II) | 脂肪系数  | 总平均亲水性 |
|-----------------------------|--|---------|-----------|-------|--------|
| <i>VvCS5GT1</i>             | 23045                                    | 30      | 50.78     | 89.64 | -0.106 |
| <i>VvCS5GT2</i>             | 23045                                    | 30      | 50.78     | 89.64 | -0.106 |
| <i>VaZSY5GT1</i>            | 56295                                    | 30      | 45.51     | 85.75 | -0.269 |
| <i>VaZSY5GT2</i>            | 24200                                    | 30      | 51.61     | 97.61 | 0.016  |
| <i>Vv</i> × <i>VaHS5GT1</i> | 61795                                    | 30      | 48.10     | 85.56 | -0.278 |
| <i>Vv</i> × <i>VaHS5GT2</i> | 60305                                    | 30      | 44.93     | 85.24 | -0.246 |
| <i>Vv</i> × <i>VaZHY5GT</i> | 56295                                    | 30      | 45.51     | 86.59 | -0.264 |

### 3 讨论

葡萄中糖基化花色苷包括单糖苷花色苷和双糖苷花色苷, 在不同葡萄品种中糖基化花色苷的组成差异明显, 如山葡萄‘左山一’、山欧杂种葡萄‘左红一’和‘哈桑’中双糖苷花色苷分别占总花色苷含量的 82%、31% 和 10%<sup>[31]</sup>, 而决定葡萄糖基化花色苷组成的重要原因是双糖苷花色苷的关键酶基因 5GT 的基因型。因此, 本研究选择‘左山一’、‘左红一’和‘哈桑’这 3 个山葡萄/山欧杂交品种和 1 个欧亚种葡萄‘赤霞珠’作为实验材料, 通过基因克隆等技术得到 5GT 等位基因的核苷酸序列, 探究 5GT 等位基因的核苷酸突变情况和氨基酸组成差异, 并利用生物信息学软件对 5GT 等位基因进行结构分析和功能预测。在实验过程中, 四种葡萄样品共送样测序近 100 个单克隆, 此外还有 PCR 产物直接测序以及分段测序多个样品, 而且实验期间换过高保真聚合酶、DNA 模板、引物和测序公司等实验条件

以保证实验结果的准确性。

Yang 等<sup>[19]</sup>人在 8 个葡萄种中共发现 54 个 5GT 等位基因, 并按照突变特点分类。其中 36 个不存在移码突变或提前终止密码子的 5GT 属于 W 型, 可能有 5GT 酶功能, 剩余 18 个 5GT 基因由于移码突变或提前终止密码子可能丧失 5GT 酶活性, 根据移码突变或终止密码子的位置分成 A~G 七种类型。Yang 等<sup>[19]</sup>人发现的 54 个 5GT 等位基因中有 6 个与本研究结果一致, *VvCS5GT1* 与 Yang 等<sup>[19]</sup>人发现的 5GT 基因型 A1 一致, *VvCS5GT2* 与 A2 一致, A1 和 A2 只存在于欧亚种野生型 (*V. vinifera* ssp. *sylvestris*) 葡萄和欧亚种栽培品种 (*V. vinifera* ssp. *vinifera*) 中, A 型 5GT 基因的突变特征是从第 301 个氨基酸开始移码突变(G301#)。 *VaZSY5GT2* 与 B1 一致, B1 不仅存在于欧亚种葡萄(*V. vinifera*) 中, 还在一些杂交品种中出现, B 型突变特征是从第 234 个氨基酸开始移码突变 (V236#)。 *VaZSY5GT1* 与 W5 一致, W5 来自山葡萄 (*V.*

*amurensis*), *Vv*×*VaHS5GT2* 与 W23 一致, W23 来自甜冬葡萄 (*V. cinerea*), *Vv*×*VaHS5GT1* 与 W19 一致, 而 W19 在甜冬葡萄 (*V. cinerea*)、美洲葡萄 (*V. labrusca*)、夏葡萄 (*V. aestivalis*) 以及一些杂交葡萄品种中均有出现。只有 *Vv*×*VaZHY5GT* 不存在于 Yang 等<sup>[19]</sup>发现的 54 个 *5GT* 等位基因中, 但与 W5 相似性最高, 只有一个碱基差异 A1195T, 相应的氨基酸变化为 M399L, 可能是一个未被发现的新 *5GT* 基因型。He 等<sup>[21]</sup>在‘左山一’中克隆出一个 *Va5GT*, 通过研究其表达及生化特征证实其有 *5GT* 酶活性, 可以合成双糖苷花色苷。而本研究从‘左山一’中克隆的 *VaZSY5GT1* 与 *Va5GT* 比对后发现有一个碱基差异 G1235A, 即氨基酸差异 R412K 了, 但在 Yang 等人<sup>[19]</sup>报道的 54 个 *5GT* 等位基因中并未找到与 *Va5GT* 完全相同的基因型, *Va5GT* 可能也是一个新的 *5GT* 等位基因。

虽然基因突变的随机性很大, 但也能发现一些突变规律, 如 *Vv*×*VaHS5GT2* 和甜冬葡萄都在碱基位置 947-958 缺失 12 个碱基, 造成连续四个氨基酸框内缺失 (ENKE316-319), *Vv*×*VaHS5GT1* 和夏葡萄 (*V. aestivalis*) 在该区域存在共同的氨基酸突变 K318E, 说明该区域是突变热点区, 氨基酸的组成和数量都是可变的<sup>[19]</sup>。另一个突变规律是第 76 位氨基酸存在三种突变形式, D76E 出现在山葡萄和圆叶葡萄中, D76N 出现在欧亚种葡萄中, D76Y 也出现在圆叶葡萄中<sup>[19]</sup>。

以被证实有功能的 *5GT-Cha* 为参照序列, 根据突变特征, 将 *5GT* 等位基因分成三种类型: I 型、II 型和 III 型。I 型 *5GT* 等位基因的突变特征是存在提前终止密码子和移码突变, 包括 *VvCS5GT1*、*VvCS5GT2*、*VaZSY5GT2*、*Dia5GT* 和‘黑比诺’*5GT*; 而 *Vv*×*VaHS5GT2* 属于 II 型突变, 特征是框内缺失突变, 无移码突变或提前终止密码子; III 型突变特征是仅发生氨基酸置换, 包括 *Vv*×*VaHS5GT2*、*Vv*×*VaZHY5GT*、*VaZSY5GT1*、*Va5GT* 和圆叶葡萄 *5GT*。显然, I 型和 II 型突变都可能使 *5GT* 酶失去活性, 而 III 型突变则不会影响 *5GT* 酶活性。这与前面序列分析的结果相符, 与 Yang 等人<sup>[19]</sup>的结果也一致。

*VvCS5GT1*、*VvCS5GT2*、*VaZSY5GT2* 中发生肽链截断, 因此推测其编码的蛋白质不能正常发挥 *5GT* 酶功能, 从而使葡萄中的双糖苷花色苷含量降低。‘赤霞珠’中 2 个 *5GT* 基因均没有功能, 这也许是‘赤霞珠’中几乎不含有双糖苷花色苷的原因, 因此纯欧亚种葡萄酿造的葡萄酒陈年潜力更好。‘哈桑’、‘左红一’和‘左山一’中均含有一个功能性 *5GT* 等位基因, 但双糖苷花色苷占比却有明显差异, 有一种可能性是其他染色体上也存在 *5GT* 等位基因, 说明位于 9 号染色体上的

*5GT* 等位基因还不足以解释山葡萄及其杂交品种中花色苷的组成差异。还有一种可能是基因序列差异导致转录产物的酶功能和活性不同, 使双糖苷花色苷合成量不同。Xing 等<sup>[20]</sup>人在欧亚种葡萄 (*V. vinifera*) ‘赤霞珠’中发现 5 个 *5GT* 候选基因 *Vv5GT1*、*Vv5GT2*、*Vv5GT3*、*Vv5GT4*、*Vv5GT5*, 其中 *Vv5GT1* 就是本研究中的 *VvCS5GT1* 和 Yang 等人<sup>[19]</sup>报道的 A1, 其余四个基因经比对发现 *Vv5GT2* 位于 17 号染色体, 而 *Vv5GT3*、*Vv5GT4* 和 *Vv5GT5* 则位于 5 号染色体。Hall 等人<sup>[33]</sup>在美洲种葡萄 (*V. labrusca*) 中发现的四个类似 *5GT* 基因 *OGT1*、*OGT2*、*OGT3*、*OGT4* 经比对发现位于 5 号染色体上。因此, 继续在其他染色体上寻找更多的 *5GT* 等位基因并且验证基因功能, 是我们下一步研究的重要内容, 为探究不同山葡萄品种间糖基化花色苷组成差异的机制奠定基础。

#### 4 结论

从‘赤霞珠’、‘左山一’、‘哈桑’、‘左红一’4 个葡萄品种中共克隆出 7 个等位基因, 均位于 9 号染色体上。‘左红一’和‘左山一’中有一个相同的 *5GT* 等位基因。经序列比对发现 *VvCS5GT1*、*VvCS5GT2*、*Vv*×*VaHS5GT2*、*VaZSY5GT2* 中存在氨基酸缺失、移码突变或提前终止密码子, 因此推测这 4 个 *5GT* 等位基因失去 *5GT* 酶活性, 不能合成双糖苷花色苷; 而 *Vv*×*VaHS5GT1*、*Vv*×*VaZHY5GT*、*VaZSY5GT1* 仅有基础氨基酸置换, 与有功能的 *Cha5GT* 一致性>99%, 因此推测这三个序列可以合成双糖苷花色苷。

#### 参考文献

- [1] He F, Mu L, Yan G L, et al. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes [J]. *Molecules*, 2010, 15 (12): 9057-9091
- [2] Campbell J A, Davies G J, Bulone V, et al. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities [J]. *Biochemical Journal*, 1997, 326(3): 929-942
- [3] Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Fukui Y, et al. Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose: anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1652-1663
- [4] Kamsteeg J, Brederode J V, Hommels C H, et al. Identification, properties and genetic control of UDP-glucose: cyaniding 3-rhamnosyl (1-6)-glucose 5-O-glucosyltransferase isolated from petals of the Red Champion (*Silene dioica*)[J].

- Biochemical Genetics, 1978, 16(11-12): 1059-1071
- [5] Jonsson L M V, Aarsman M E G, Diepen J V, et al. Properties and genetic control of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrid* [J]. *Planta*, 1984, 160(4): 341-347
- [6] Teusch M, Forkmann G, Seyffert W. Genetic control of UDP-glucose: anthocyanin 5-O-glucosyltransferase from flowers of *Matthiola incana* R. Br [J]. *Planta*, 1986, 168(4): 586-591
- [7] Yamazaki M, Gong Z, Fukuchi-Mizutani M, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display of plant forms regarding anthocyanin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(11): 7405-7411
- [8] Ogata J, Sakamoto T, Yamaguchi M, et al. Isolation and characterization of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase from flowers of *Dahlia variabilis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, 158(6): 709-714
- [9] Yabuya T, Yamaguchi M, Imayama T, et al. Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in flowers of *Iris ensata* [J]. *Plant Science*, 2002, 162(5): 779-784
- [10] Yoshihara N, Imayama T, Fukuchi-Mizutani M, et al. cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Iris hollandica* [J]. *Plant Science*, 2005, 169(3): 496-501
- [11] Nakatsuka T, Sato K, Takahashi H, et al. Cloning and characterization of the UDP-glucose: anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene from blue-flowered gentian [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59: 1241-1252
- [12] Matsuba Y, Sasaki N, Tera M, et al. A Novel Glucosylation reaction on anthocyanins catalyzed by acyl-glucose-dependent glucosyltransferase in the petals of carnation and delphinium [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(10): 3374-3389
- [13] Zhao D Q, Tao J, Han C X, et al. Flower color diversity revealed by differential expression of flavonoid biosynthetic genes and flavonoid accumulation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(12): 11263-11275
- [14] Lorenc-Kukuła K, Korobczak A, Aksamit-Stachurska A, et al. Glucosyltransferase: the gene arrangement and enzyme function [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2004, 9: 936-946
- [15] Tohge T, Nishiyama Y, Hirai M, et al. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor [J]. *The Plant Journal*, 2005, 42(2): 218-235
- [16] 李翔. 茄子花青素生物合成关键基因的克隆和表达分析 [D]. 上海: 上海交通大学, 2012
- LI Xiang. Cloning and expression characterization of the athocyanin biosynthesis key genes in eggplant (*Solanum melongena* L.) [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2012
- [17] Jánváry L, Hoffmann T, Pfeiffer J, et al. A double mutation in the anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene disrupts enzymatic activity in *Vitis vinifera* L. [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(9): 3512-3518
- [18] Cruz A A D, Hillbert G, Riviere C, et al. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* ssp. accessions by using LC-MS and LC-NMR [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 732(10): 145-152
- [19] Yang Y Z, Labate J A, Liang Z C, et al. Multiple loss-of-function 5-O-glucosyltransferase alleles revealed in *Vitis vinifera*, but not in other *Vitis* species [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127(11): 2433-2451
- [20] Xing R R, Li S Y, He F, et al. Mass spectrometric and enzymatic evidence confirm the existence of anthocyanidin 3,5 O Diglucosides in cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape berries [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(12): 3251-3260
- [21] He F, Chen W K, Yu K J, et al. Molecular and biochemical characterization of the UDP-glucose:anthocyanin 5-O-glucosyltransferase from *Vitis amurensis* [J]. *Phytochemistry*, 2015, 117: 363-372
- [22] 张金柱, 戴永平, 王万民. 山葡萄资源开发及利用 [J]. 中国林副特产, 2002, 5: 256-257
- ZHANG Jin-zhu, DAI Yong-ping, WANG Wan-min. Exploitation and utilization of *Vitis amurensis* resources [J]. *Forest By-product and Speciality in China*, 2002, 5: 256-257
- [23] 方志. 山葡萄与山葡萄酒 [J]. 酿酒科技, 2003, 6: 93-94
- FANG Zhi. Wild grape and wild grape wine [J]. *Liquor-Making Science Technology*, 2003, 6: 93-94
- [24] 王军, 葛玉香, 包怡红. 东北山葡萄品种特性比较 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(1): 29-31
- WANG Jun, GE Yu-xiang, BAO Yi-hong. Comparison of Characteristics of *Vitis amurensis* Rupr. Varieties [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2004, 32(1): 29-31
- [25] 潘俊生. 长白山葡萄酒酿造法简介 [J]. 酿酒, 1988, 3: 52-54
- PAN Jun-sheng. A brief introduction of Changbai Mountain wine brewing [J]. *Liquor Making*, 1988, 3: 52-54
- [26] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法 [J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16



- LI Rong-hua, XIA Yan-shi, LIU Shun-zhi, et al. CTAB-improved method of DNA extraction in plant [J]. Research and Exploration in Laboratory, 2009, 28(9): 14-16
- [27] Mackenzie P, Owens I S, Burchell B, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence [J]. Pharmacogenetics, 1997, 7(4): 255-269
- [28] Ross J, Li Y, Lim E, et al. Higher plant glycosyltransferases [J]. Genome Biology, 2001, 2(2): 3004.1-3004.6
- [29] Anderson D W, Julian E A, Kepner R E, et al. Chromatographic investigation of anthocyanin pigments in *Vitis cinerea* [J]. Phytochemistry, 1970, 9(7): 1569-1578
- [30] Liang Z C, Yang Y Z, Cheng L L, et al. Polyphenolic composition and content in the ripe berries of wild *Vitis* species [J]. Food Chemistry, 2012, 132(2): 730-738
- [31] Zhu L, Zhang Y L, Lu J. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and origins [J]. International Journal of Molecular Science, 2012, 13(3): 3492-3510
- [32] Wilkins M R, Gasterger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server [J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112: 571-607
- [33] Hall D, Yuan X X, Murata J, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of the UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase from Concord grape (*Vitis labrusca*) [J]. Phytochemistry, 2012, 74(3): 90-99