园 艺 学 报 2012，39（6）：1073－1080 http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica E-mail: yuanyixuebao@126.com

葡萄果实β－葡萄糖苷酶基因克隆、原核表达及活性检测

董银行，郭家选*

（北京农学院植物科学技术学院，农业应用新技术北京市重点实验室，北京 102206）

摘 要：以‘玫瑰香’葡萄着色期的果肉为试材，通过反转录技术克隆了 ABA 合成相关酶 β－葡萄糖苷酶基因 *VvBG1* 的 1 518 bp 编码区核苷酸序列，其编码 1 个含有 505 氨基酸的多肽。生物信息学分析表明，VvBG1 含有 1 个跨膜区和糖基水解酶 1 超家族保守域。通过 *Bam*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ限制性内切酶将除去信号的编码区克隆到原核表达载体 pET28a（+）中，并转化大肠杆菌表达菌株 BL21（DE3），成功诱导并纯化了 VvBG1 融合蛋白。经过透析复性和超滤浓缩得到了 0.8 mg · mL^{-1} 可溶的融合蛋白。通过纯化蛋白葡萄果肉均浆液孵育试验和 GC－MS ABA 含量分析证实了葡萄果实中 β－葡萄糖苷酶 VvBG1 具有较高的生理活性。

关键词：葡萄；果实；β－葡萄糖苷酶 1；脱落酸；基因；克隆；原核表达

中图分类号：S 663.1 **文献标识码**：A **文章编号**：0513-353X（2012）06-1073-08

Cloning，Procaryotic Expression and Activity Analysis of Grape Berry β-glucosidase Gene

DONG Yin-hang and GUO Jia-xuan*

（*Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique*；*College of Plant Science and Technology*，*Beijing University of Agriculture*，*Beijing* 102206，*China*）

Abstract：To explore the activity of β-glucosidase（VvBG1）in grape berries，in the present study，*VvBG1* gene was first cloned through reverse transcription technique from mesocarp during Hamburg grape berry red-coloring stages. The 1 518 bp sequences encoded a polypeptide with 505 amino acids. Bioinformatics analysis showed that VvBG1 contains both a putative transmembrane region and a glycosyl hydrolase1 superfamily domain. The coding sequence after remove of its signal coding region was cloned into prokaryotic expression vector pET28a（+）and then transformed into *E. coli* strain BL21（DE3）by restriction endonucleases *Bam*Ⅰand *Xho*Ⅰ. The recombinant strains were successfully induced to express fusion protein and permitted to purify the VvBG1 protein. A 0.8 mg · mL^{-1} of soluble protein solution was obtained after dialysis and ultrafiltration. The results gained from a combination of purified protein incubation experiment using grape berry pulp and abscisic acid（ABA）content analysis by GC-MS demonstrated that the grape berry β-glucosidase VvBG1 is of high physiological activity.

收稿日期：2012－02－05；**修回日期**：2012－05－11

基金项目：国家自然科学基金项目（31040006）；国家科技支撑计划项目（2008BAD95B07，2011BAD32B03）；北京市自然科学基金委和北京市教委联合资助重点项目（KZ200910020001）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：gsfmn@tom.com）

Key words：grape；berry；β-glucosidase 1；ABA；gene；cloning；procaryotic expression

葡萄不仅具有重要的经济价值，而且是研究非呼吸跃变型果实理想的材料。脱落酸（abscisic acid，ABA）被认为在葡萄果实成熟过程中起着关键的作用（Coombe，1992）。ABA 合成研究受到了广泛的关注并取得了很大的进展。

高等植物 ABA 生物合成路径中的主要步骤合成酶都已经阐明（Qin & Zeevaart，1999；Nambara & Marion-poll，2005），主要包括玉米黄质环化酶（zeaxanhtin epoxidase，ZEP），9－顺式－环氧类胡萝卜素双氧合酶（9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase，NCED），短链乙醇脱氢酶（a short-chain dehydrogenase/reductase，ABA2），ABA 醛氧化酶（ABA aldehydeoxidase，AAO3）和钼辅硫化酶（molybdenum cofactorsulfurase，MCSU），其中 NCED（EC 1.13.11.52）是 ABA 生物合成的限速酶（任杰 等，2010；朱海生 等，2012）。

近年来研究发现，拟南芥中 β－葡萄糖苷酶 AtBG1（β-glucosidase，EC 3.2.1.21）响应环境和发育信号促进了活性 ABA 的快速积累，即通过把无活性的结合态 ABA 葡萄糖苷（ABA-GE）直接转化为有活性游离的 ABA（Lee et al.，2006）。王延书等（2010）以始熟期花后 7～11 周的玫瑰香葡萄果肉为试材，利用荧光定量 PCR 分析了 *VvNCED1* 和 *VvBG1* 在 5 个时期的表达量，研究发现 *VvNCED1* 在花后第 7～8 周表达量很高，随后快速降低至最低值，随着果实着色，表达量略有升高；*VvBG1* 基因在果实始熟前表达量较低，随着果实始熟启动和果实着色，表达量基本呈持续升高的趋势，始熟后 ABA 的积累主要归因于 *VvBG1* 的高水平表达。当玫瑰香葡萄果实中 ABA 水平达到高峰时，部分游离 ABA 将以 ABA-GE 形式储藏起来（Sun et al.，2010）。Li 等（2012）研究发现，在西瓜果实发育的早期，*ClBG1* 表达水平相对较低，随着果实成熟，表达量快速增加。

综上所述，尽管前人通过基因转录分析揭示了 *VvBG1* 基因可能在果实成熟期起着重要的作用（Sun et al.，2010；王延书 等，2010；Li et al.，2012），但果实中 VvBG1 蛋白酶活特点目前还不清楚。为了检测果实中 β－葡萄糖苷酶的活性，本研究中以玫瑰香葡萄果肉为试材，将 *VvBG1* 转化大肠杆菌表达并亲和层析纯化外源表达蛋白，通过葡萄果实匀浆液温育试验检测了 VvBG1 具有较高的生理活性。该研究为从分子水平操纵葡萄果实成熟奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

以玫瑰香葡萄（*Vitis vinifera* L.‘Muscat Hamburg’）果实采自在北京农学院葡萄种质资源圃。2011 年在果实转红期（50%果面着色，于 8 月 5 日花后 70 d）取出果肉，液氮速冻于－80 ℃冰箱保存备用。

大肠杆菌 DH5α、BL21（DE3）、DNA marker、pEASY^{TM}-T1 Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司；pET28a（+）由本实验室保存；RNA 提取试剂盒购自北京博迈德生物科技有限公司；限制性内切酶、反转录酶、DNA 酶、T4 DNA 连接酶、LA-*Taq* 酶均购自 TaKaRa 公司；引物合成及测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司完成；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 重组原核表达质粒构建及目的蛋白表达

根据本实验室克隆得到的 *VvBG1*（GenBank 登录号：GU480917）的 CDS 序列（去除信号肽序列，预测网址 http：//www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/或 http：//genome. cbs. dtu. dk/services/TargetP/）

设计原核表达基因全长引物（正义引物：5′-GGATCCGAAAATATCACCAGAGGAAG-3′和反义引物 5′-CTCGAGGGGAGAATTCAAGAAGTTC-3′，并分别在引物的 5′端引入了 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ酶切位点（下划线部分）。以葡萄果肉 cDNA 为模板，通过 PCR 克隆获得目的基因片段，连接 pEASYTM-T1 Simple 克隆载体后与 pET28a（+）载体用 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ限制性内切酶同时双酶切，用 T4 DNA 连接酶将 VvBG1 目的片段与 pET28a（+）载体连接形成 pET28a-BG1 重组表达质粒并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，经菌落 PCR 筛选及序列测定后转化 *E. coli* BL21（DE3）表达菌株。挑取阳性转化子于含有 50 μg · mL^{-1} 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基 37 ℃，220 r · min^{-1} 培养至 OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时，加入 1 mmol · L^{-1} IPTG 诱导表达 3 ~ 4 h。收集少量菌体超声破碎后，SDS-PAGE 鉴定蛋白表达。

1.3　融合蛋白纯化与复性

收集菌体于 50 mL 离心管中，按每克菌体鲜样质量加入 30 mL 洗涤缓冲液Ⅰ（50 mmol · L^{-1} Tris-Cl、2 mmol · L^{-1} EDTA，100 mmol · L^{-1} NaCl、0.5% triton X-100），用超声波破碎仪（宁波东芝 JY92-II）冰浴超声破碎（工作时间 5 s，间歇时间 5 s，60 次循环），8 000 r · min^{-1} 离心 5 min 收集包涵体，用洗涤缓冲液Ⅰ和洗涤缓冲液Ⅱ（50 mmol · L^{-1} Tris-Cl，100 mmol · L^{-1} NaCl）各洗涤 2 到 3 次，加入适量 8 mol · L^{-1} 尿素，震荡混匀后 4 ℃溶解过夜。

将溶解后的蛋白于 4 ℃，13 000 × g 离心 30 min，收集上清用 0.45 μm 滤膜过滤后，过镍离子金属螯合亲和层析柱，用 8 倍柱床体积的 Binding buffer（8 mol · L^{-1} 尿素，20 mmol · L^{-1} Tris-Cl，pH 7.9，5 mmol · L^{-1} 咪唑，300 mmol · L^{-1} NaCl）洗涤，500 μL 依次收集的洗脱蛋白，收集总量为 2.5 mL Elution buffer（8 mol · L^{-1} 尿素，20 mmol · L^{-1} Tris-Cl，pH 7.9，300 mmol · L^{-1} 咪唑，300 mmol · L^{-1} NaCl），SDS-PAGE 分析依次收集纯化浓度及纯度。

纯化后的目的蛋白用 Elution buffer 稀释至 20 ~ 50 μg · mL^{-1}，加入到截留分子量为 10 kD 的透析袋中分别于下列透析液中冰浴震荡透析 5 ~ 8 h。透析液Ⅰ：6 mol · L^{-1} 尿素，50 mmol · L^{-1} Tris-Cl，0.5 mmol · L^{-1} EDTA，50 mmol · L^{-1} NaCl，5 mmol · L^{-1} DTT，4 mmol · L^{-1} GSH，0.5 mmol · L^{-1} GSSH，8%甘油，0.2% PEG 4000；透析液Ⅱ：2 mol · L^{-1} 尿素，50 mmol · L^{-1} Tris-Cl，0.5 mmol · L^{-1} EDTA，50 mmol · L^{-1} NaCl，5 mmol · L^{-1} DTT，4 mmol · L^{-1} GSH，0.5 mmol · L^{-1} GSSH，8%甘油，0.2% PEG 4000；透析液Ⅲ：50 mmol · L^{-1} Tris-Cl，0.5 mmol · L^{-1} EDTA，50 mmol · L^{-1} NaCl。收集透析袋中蛋白溶液，用截留分子量为 10 kD 的超滤管超滤浓缩，BCA 法测定蛋白含量后，立即使用或加入 20%甘油冻存于－20 ℃备用。

1.4　VvBG1 活性检测

取着色期葡萄果实（50%果面着色）为材料，去掉果皮和种子后，加入少许石英砂于研钵中研磨至匀浆，分别称取 0.5 g 匀浆液置于 3 个 10 mL 的玻璃试管中。A 管加入 500 μL 无菌水，B 管加入 500 μL 透析液Ⅲ，C 管加入 500 μL 复性蛋白液，轻轻吹打混匀，室温中孵育 1 h。分别加入铜试剂以及适量预冷的 80%甲醇和 D3-ABA，4 ℃冰箱过夜，GC-MS 法测定各管中 ABA 含量（王延书 等，2010）。

2　结果与分析

2.1　葡萄 β－葡萄糖苷酶基因片段的克隆

根据 GenBank 上已公布的拟南芥 β-glucosidase 基因序列通过 BLAST 比对得到一个类似葡萄 BG1 mRNA 序列，设计特异引物（正向引物：5′-ATGGCGTTCGGAAGATTCATCG-3′，反向引物：

5′-TTAGGGAGAATTCAAGAAGTTCTTAAACC-3′），以玫瑰香葡萄果肉 cDNA 文库为模板，通过 RT-PCR 技术克隆得到 *VvBG1* 的 1 518 bp 编码区核苷酸序列，其编码了 505 个氨基酸的多肽（GenBank No. GU480917.1，图 1）。

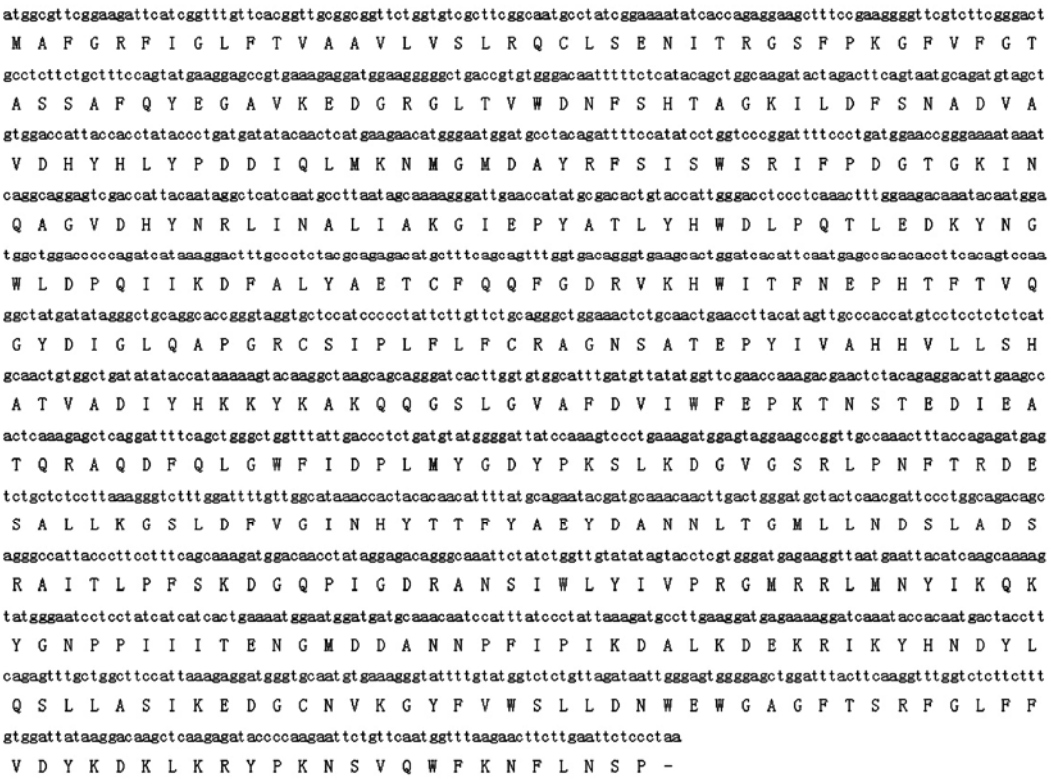

图 1 葡萄果实中 *VvBG1* 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and its deduced amino sequences of *VvBG1* gene in grape berry

2.2 葡萄 β－葡萄糖苷酶基因生物信息学分析

基于 VvBG1 蛋白 NCBI BLAST（http：//blast. ncbi. nlm. nih. gov/Blast. cgi，）同源性序列分析表明，VvBG1 与蓖麻（*Ricinus communis*，XP_002512097.1）、大豆（*Glycine max*，XP_003556662.1）、杨树（*Populus trichocarpa*，XP_002311330.1）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*，NP_173978.1）、苜蓿（*Medicago truncatula*，XP_003607794.1）、草莓（*Fragaria* × *ananassa*，gene04638 in https：//strawberry. Plant and food. co. nz/index. html）、高粱（*Sorghum bicolor*，XP_002465651.1）和水稻（*Oryza sativa*，AAK92581.1）的同源基因相似性较高，分别为 77%、76%、75%、75%、75%、74%、71%和 71%。该序列推测蛋白含有一个葡萄糖基水解酶 1 家族保守序列（图 2），表明已成功克隆到了 *VvBG1*。

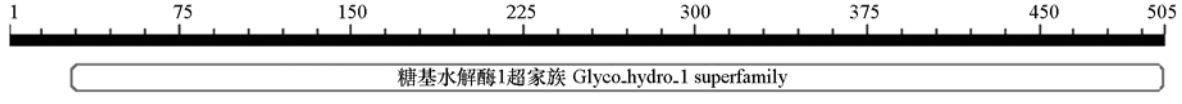

图 2 VvBG1 氨基酸保守序列

Fig. 2 The deduced conserved amino acid sequence of VvBG1

葡萄与上述 8 种植物 BG1 蛋白质序列用 MEGA 4.1 软件采用邻接法（NJ）和 Bootstrap 的 1 000 次重复检测方法进行亲缘关系分析，结果表明在遗传进化上 BG1 主要分为单子叶和双子叶植物两大类。在双子叶植物中，葡萄首先与蓖麻和杨树聚为一类，然后再与草莓，最后与拟南芥、大豆和苜蓿聚为一类（图 3）。

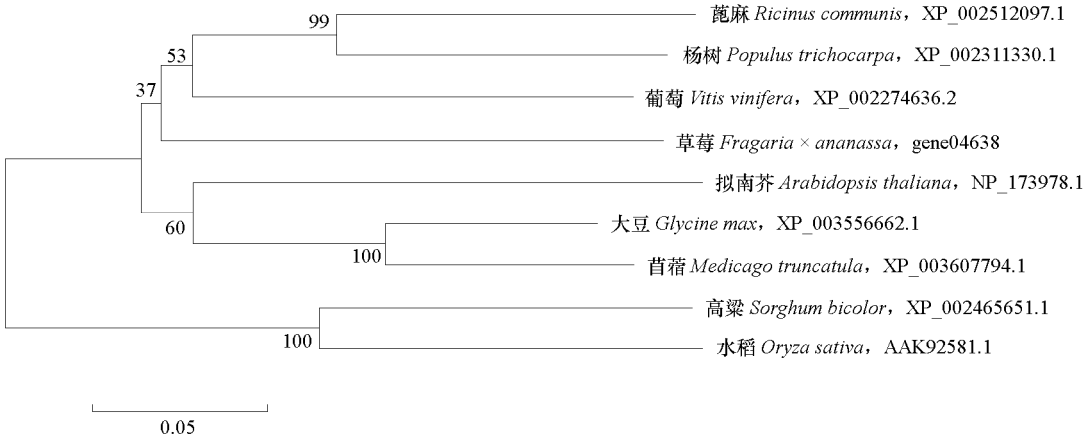

图 3　葡萄与其他物种之间 β－葡萄糖苷酶 1 的聚类分析

节点旁数据为 1 000 次 bootstrap 检测后的置信度（%）。

Fig. 3　Phylogenetic analysis of BG1 in grapevine and other species homologues

The numbers at notes represent bootstrap values（%）with 1 000 replicate.

使用网络 DAS 服务器（http：//www. sbc. su. se/~miklos/DAS）对 VvBG1 蛋白序列进行跨膜结构预测。在 strict cut-off 严格条件限制下，该蛋白分别在 8 ~ 18 氨基酸之间存在 1 个跨膜区域，推测该序列为信号肽序列（图 4）。

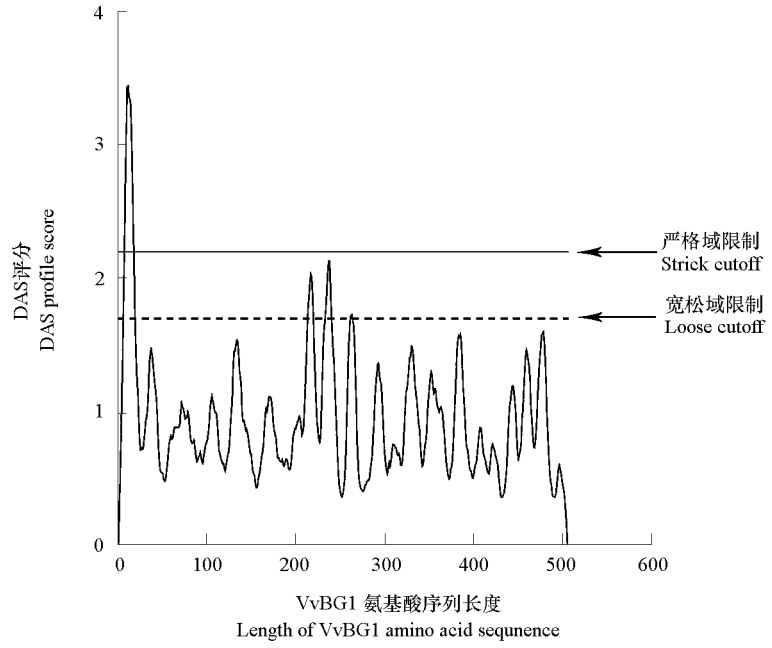

图 4　DAS 服务器对葡萄中 VvBG1 氨基酸序列跨膜区域的预测

Fig. 4　Transmembrane domain of grapevine VvBG1 amino acid sequence predicted by DAS server

2.3 *VvBG1* 原核表达载体的构建、表达及融合蛋白的纯化

根据信号肽预测（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP）发现 VvBG1 信号肽断裂点位于 24 与 25 氨基酸之间，设计不含信号肽序列的原核表达引物。正义引物：5′-GGATCCGAAAATATCACCAGAGGAAG-3′，反义引物：5′-CTCGAGGGGAGAATTCAAGAAGTTC-3′，并分别在引物 5′端引入了 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ酶切位点（下划线部分）。将 PCR 扩增目的表达基因片段（图 5，A，白色箭头），通过 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ限制性内切酶构建 pET28a-VvBG1 重组表达质粒（图 5，B，白色箭头），然后转化 *E. coli* BL21（DE3）进行诱导表达。由图 6，A 中可以看出，随着诱导时间的增加，60 kD 融合蛋白表达量逐渐增加，至 3 ~ 4 h 达到最高值。通过 HIS 标签亲和层析得到融合蛋白含量高达 1.2 mg · mL^{-1}，纯度在 90%以上（图 6，B）。

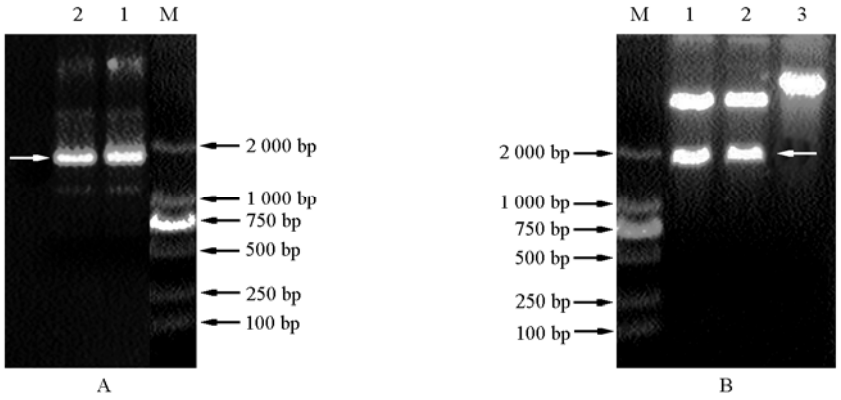

图 5 pET28a-*VvBG1* 载体构建

A：*VvBG1* PCR 扩增产物（1、2：两个不带信号肽的扩增条带；M：分子量标准，DL2000）；
B：pET28a-*VvBG1* 酶切鉴定（1、2：两个重组质粒酶切条带；3：重组质粒；M：分子量标准，DL2000）。

Fig. 5 Construction of pET28a-*VvBG1* vectors

A：PCR amplified products of *VvBG1*（1，2：Two PCR amplified bands without signaling peptide；M：Marker，DL2000）；
B：Identification of pET28a-*VvBG1* using restriction endonucleases（1，2：Two digested bands；
3：One non-digested band；M：Marker，DL2000）.

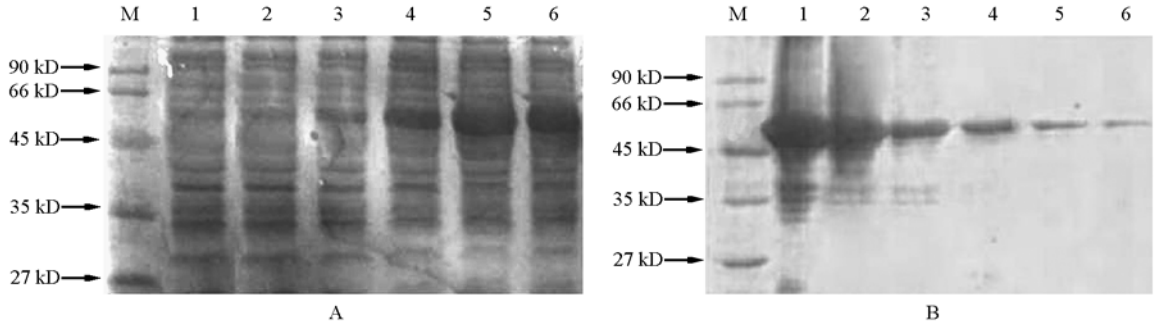

图 6 IPTG 诱导蛋白表达及纯化

A：随时间的诱导表达（1. pET28a 空载体；2. 诱导 0 h；3. 诱导 1 h；4. 诱导 2 h；5. 诱导 3 h；6. 诱导 4 h。M：蛋白 Marker）；
B：表达蛋白洗脱纯化（1. 纯化前；2 ~ 6. 纯化 500 μL 依次收集的洗脱蛋白，浓度分别依次为
1.2、0.95、0.46、0.22、0.12、0.09 mg · mL^{-1}。M：蛋白 Marker）。

Fig. 6 IPTG-induced expression and purification

A：Induced expression with time going on（1. Empty pET28a vector；2. 0 h induction；3. 1 h induction；4. 2 h induction；
5. 3 h induction；6. 4 h induction. M：Marker）；B：Expressed protein elution and purification（1. Before purification；
2 - 6. Collecting elution purified protein one by one with 500 μL and in turn gaining their concentrations
at 1.2，0.95，0.46，0.22，0.12，0.09 mg · mL^{-1}，respectively. M：Marker）.

2.4　纯化 β－葡萄糖苷酶活性检测

纯化蛋白经过复性和超滤浓缩，获得可溶蛋白浓度在 0.8 mg · mL^{-1} 左右。用 0.5 g 着色期果肉匀浆液和 500 μL 0.8 mg · mL^{-1} 进行 25 ℃孵育 1 h 酶解反应。GC－MS 分析 ABA 含量。结果如图 7 所示，水、洗脱缓冲液（Elution buffer）和复性蛋白（VvBG1）各处理管 ABA 含量分别约为 3.6、4.2 和 35 ng · L^{-1}。试验结果表明，葡萄果实中 VvBG1 具有较高的葡萄糖基水解酶活性。

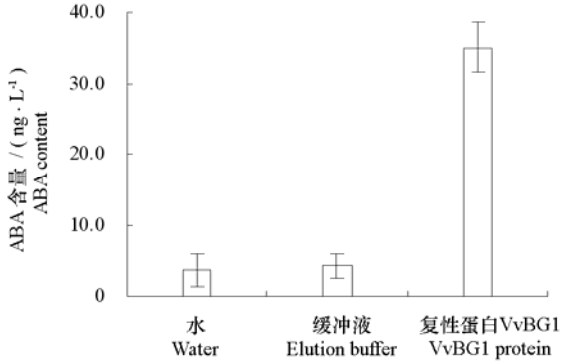

图 7　纯化蛋白葡萄果肉温育试验及 ABA 含量的测定

Fig. 7　Grape pulp-homogeneity-incubation test and ABA content analysis

3　讨论

近年来研究发现，ABA 在果实发育中起着重要的作用（Yu et al.，2006；Zhang et al.，2009；Sun et al.，2010，2012；Jia et al.，2011）。来自模式植物拟南芥的研究证实，ABA 的水平一方面受生物合成的决定，另一方面还要受到 ABA 代谢的调控：前者主要受 NCED 调控；后者主要受 ABA 羟基化反应（形成 7′-，8′- 和 9′-OH ABA）和结合作用（主要形成 ABA 葡萄糖苷 ABA-glucose ester，ABA-GE）调控（Nambara & Marion-poll，2005）。Xu 等（2002）研究发现，一种受 ABA 诱导的葡萄糖基转移酶 ABA-GTase（ABA-glucosyltransferase，EC 2.4.1.35）可以把游离的 ABA 转化为 ABA-GE。过去的研究认为，ABA 葡萄糖苷（ABA-GE）是一个没有活性的终产物（Lehmann & Schutte，1984；Zeevaart，1999）。但是，随着拟南芥上 β－葡萄糖苷酶 AtBG1 首次鉴定，对以上认识发生了根本地改变：即该酶能把无活性的结合态 ABA 葡萄糖苷直接转化为有活性的游离态 ABA，从而促进活性 ABA 的快速积累（Lee et al.，2006）。

近年来借鉴模式植物的研究成果，β－葡萄糖苷酶在果实发育中作用已有少量报道（Sun et al.，2010；王延书 等，2010；Li et al.，2012）。例如，当玫瑰香葡萄果实中 ABA 水平达到高峰时，部分游离 ABA 将以 ABA-GE 形式储藏起来，说明果实发育后期存在 ABA-GE 库（Sun et al.，2010）。王延书等（2010）在玫瑰香葡萄果实成熟期检测到了 *VvBG1* 基因的高水平表达。Li 等（2012）在西瓜果实发育的后期也发现了 *ClBG1* 随着果实成熟表达量快速增加。以上研究在转录分析方面揭示了 *BG1* 可能在果实成熟期起着重要的作用，但以上研究 BG1 蛋白酶活特点并没有阐述。本研究中通过玫瑰香葡萄果实匀浆液温育试验检测到了外源表达蛋白 VvBG1 具有较高的生理活性。该结果进一步证实了王延书等（2010）的推测：VvBG1 与始熟后 ABA 的积累存在密切的关系。

从生化代谢的能量和步骤来看，ABA 从头生物合成涉及了一系列复杂的生化代谢反应（Nambara & Marion-poll，2005），而 BG 途径可以直接将大量的无活性的结合态 ABA 葡萄糖苷转化为有活性的游离态 ABA。因此，BG 途径合成 ABA 比 NCED 途径要简单的多，解离途径合成 ABA 不但节省

了大量的能量，而且更迅速（王延书 等，2010）。因此，如何通过基因工程或生物化学途径操纵果实中 β－葡萄糖酯酶的活性进而快速调控 ABA 的水平，对于果实成熟调控及果品生产具有重要的意义。

References

Coombe B G. 1992. Research on development and ripening of the grape berry. American Journal of Enology and Viticulture，43 (1)：101－110.

Jia H F，Chai Y M，Li C L，Lu D，Luo J J，Qin L，Shen Y Y. 2011. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. Plant Physiology，157：188－199.

Lee K H，Piao H L，Kim H Y，Choi S M，Jiang F，Hartung W，Hwang I，Kwak J M，Lee I J，Hwang I. 2006. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. Cell，126：1109－1120.

Lehmann H，Schutte H R. 1984. Abscisic-acid metabolism in intact wheat seedlings under normal and stress conditions. Journal Plant Physiology，117：201－209.

Li Q，Li P，Sun L，Wang Y，Ji K，Sun Y，Dai S，Chen P，Duan C，Leng P. 2012. Expression analysis of β-glucosidase genes that regulate abscisic acid homeostasis during watermelon（*Citrullus lanatus*）development and under stress conditions. Journal Plant Physiology，169 (1)：78－85.

Nambara E，Marion-poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annual Review of Plant Biology，56：165－185.

Qin X，Zeevaart J A D. 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. Proceedings of the National Academy of Science，96：15354－15361.

Ren Jie，Wu Jie-fang，Leng Ping，Sun Liang，Zhao Sheng-li. 2010. Cloning and expression analysis of *NCED* gene from sweet cherry fruit. Acta Horticulturae Sinica，37 (6)：891－898. (in Chinese)

任 杰，吴洁芳，冷 平，孙 亮，赵胜利. 2010. 甜樱桃果实 *NCED* 基因的克隆及其表达. 园艺学报，37 (6)：891－898.

Sun L，Sun Y，Zhang M，Wang L，Ren J，Cui M，Wang Y，Ji K，Li P，Li Q，Chen P，Dai S，Duan C，Wu Y，Leng P. 2012. Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase，which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis，alters fruit texture in transgenic tomato. Plant Physiology，158：283－298.

Sun L，Zhang M，Ren J，Qi J，Zhang G，Leng P. 2010. Reciprocity between abscisic acid and ethylene at the onset of berry ripening and after harvest. BMC Plant Biology，10：257－268.

Wang Yan-shu，Li Chun-li，Jia Hai-feng，Qin Ling，Gao Dong-sheng，Shen Yuan-yue. 2010. Studies on transcriptional level of *VvNCED1* and *VvBG1*，two key genes related to ABA accumulation around the veraison of grape berry ripening. Acta Horticulturae Sinica，37 (5)：801－804. (in Chinese)

王延书，李春丽，贾海锋，秦 岭，高东升，沈元月. 2010. 葡萄果实始熟前后 ABA 积累关键酶基因 *VvNCED1* 和 *VvBG1* 转录水平的研究. 园艺学报，37 (5)：801－804.

Xu Z J，Nakajima M，Suzuki Y，Yamaguchi I. 2002. Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. Plant Physiology，129 (3)：1285－1295.

Yu X C，Li MJ，Gao G F，Feng H Z，Geng X Q，Peng C C，Zhu X Y，Wang X J，Shen Y Y，Zhang D P. 2006. Abscisic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry. Plant Physiology，140：558－579.

Zeevaart J A D. 1999. Abscisic acid metabolism and its regulation // Hooykaas P J J，Hall M A，Libbenga K R. Biochemistry and molecular biology of plant hormones. Amsterdam：Elsevier Science：189－207.

Zhang M，Leng P，Zhang G，Li X. 2009. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase（NCED）genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. J Plant Physiol，166：1241－1252.

Zhu Hai-sheng，Li Yong-ping，Hua Xiu-feng，Wen Qing-fang. 2012. Cloning and expression analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene *FaNCED* in strawberry. Acta Horticulturae Sinica，39 (1)：40－48. (in Chinese)

朱海生，李永平，花秀凤，温庆放. 2012. 草莓 9－顺式－环氧类胡萝卜素双加氧酶基因 *FaNCED* 的克隆及表达分析. 园艺学报，39 (1)：40－48.