

菜豆几丁质酶基因的克隆、序列分析及其表达

曲 敏^{1,2}, 王全伟², 李新玲²

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院生物系, 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨师范大学生命与环境科学学院, 哈尔滨 150080)

摘要 根据 GenBank 中收录的菜豆几丁质酶基因 mRNA 序列设计一对引物, 以菜豆品种五常油豆总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得一个约 1.1kb 的 DNA 片段 *Bchi*, 将其克隆入 pUC18 载体。测序和序列分析结果表明, 该序列全长 1088bp, 含有一个 981bp 的完整开放读码框, 无内含子, 编码 327 个氨基酸, 编码产物在结构上具有 Class Ia 几丁质酶的结构特征: N-端具有一个 26 个氨基酸的信号肽, 其后是富含 8 个半胱氨酸、长 41 个氨基酸的几丁质结合区和由 249 个氨基酸组成的高度保守的催化区, C-端为由 11 个氨基酸组成的液泡定位多肽。序列与结构上的同源性分析表明 *Bchi* 基因是菜豆 Class Ia 几丁质酶基因。此序列已在 GenBank 中注册, 登录号为 AY357300。以 pQE-30 为原核表达载体, 构建成 pQE-*Bchi* 重组表达载体, 转化表达受体菌 *E. coli* M15, 经 IPTG 诱导后表达出一个约 35kD 的蛋白, 与推测的 *Bchi* 基因编码产物的大小一致, 表明 *Bchi* 基因在大肠杆菌中能够表达, 是一个具有表达功能的基因。

关键词 菜豆; 几丁质酶基因; 克隆; 序列分析; 表达

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0121-06

CLONING, SEQUENCING AND EXPRESSION OF CHITINASE GENE FROM KIDNEY BEAN

QU Min^{1,2}, WANG Quan-wei², LI Xin-ling²

(1. Biology Department of Food Engineering College, Haerbin University of Commerce, Haerbin, 150076; 2. Life Science and Environment Science Institute, Harbin Normal University, Harbin 150080)

Abstract In this study, we designed pair of primers, which based on the mRNA sequences of chitinase gene of bean collected in GenBank, to amplify this gene in the genome of Wuchang bean by PCR. We got a DNA fragment of about 1.1kb, which was named *Bchi*, then we cloned this DNA fragment in pUC18 vector. By sequencing, we found that this fragment was 1088bp and had a ORF of 981bp, which had no introns. This sequence encoded 327 amino acids, whose product had the structure trait of Class Ia chitinase: There was a signal peptide of 26 amino acids on the N end followed by chitin-binding domain of 41 amino acids and highly conservative catalytic region of 249 amino acid; on the C end, there was VTP of 11 amino acids. The homogeneity in structure and sequence showed that this DNA fragment was the gene of Class Ia chitinase of bean, which was registered in GenBank, the accession number:

收稿日期: 2006-10-24

基金项目: 黑龙江省科委攻关项目 (GC04B112)

作者简介: 曲敏 (1966—), 女, 副教授, 在读博士, 从事遗传学工作。E-mail: qumin777@126.com

通讯作者: 王全伟。E-mail: wqw125@126.com。

AY357300. We put this gene into the prokaryote express vector of pQE - 30 and made it express in EcoliM15 by IPTG inducing. At last, we got a protein of 35kD, which was identical to the prediction product of this gene, and this showed that *Bchi* gene was a functional one, which could express in *E. coli*.

Key words Bean; Chitinase gene; Cloning; Sequence analysis; Expression

属于水解酶的几丁质酶广泛存在于许多动植物及微生物中,能降解真菌细胞壁的主要成分几丁质,催化植物病原菌细胞壁的水解,从而抑制真菌的生长与繁殖^[1~3]。几丁质酶为单基因编码,植物几丁质酶的产生可分为组成型和诱导型。高等植物本身不含作为真菌细胞壁组分之一的几丁质,或有机植物在正常情况下体内就有几丁质酶,但含量较低,当植物受到外源因子如病原真菌、细菌、病毒侵染后,或植物受伤后及用乙烯处理后,植物体内几丁质酶活性会迅速升高,增加几倍至几百倍^[11]。由于许多危害植物的病原真菌的细胞壁的组成成分之一是几丁质,而植物中尚未发现几丁质酶的天然底物,所以几丁质酶在防御病原真菌侵害中具有重要作用,是植物防御系统的重要组成部分。因此,普遍认为几丁质酶与植物对病原微生物的抗性有关^[4]。植物几丁质酶作为抗真菌蛋白已经用于花卉、蔬菜等植物的抗真菌病基因工程,表达几丁质酶的转基因植株的抗病性显著强于对照植株^[5,6]。几丁质酶基因的抗真菌作用在水稻、烟草、黑杨等多种作物中也得到证实^[7]。因此,在植物抗真菌基因工程中,人们广泛使用几丁质酶基因作为目的基因^[1,8~10]。而且近年来,随着对几丁质酶研究的深入,发现该酶在植物发育、共生固氮及抗胁迫、抗细菌、抗虫害等方面都发挥着重要的作用^[12],因此,几丁质酶已成为植物分子生物学研究领域中的重要研究对象和作物抗真菌病害基因工程的研究热点。本文根据 GenBank 中收录的菜豆几丁质酶基因 mRNA 序列设计引物,从菜豆基因组中分离、克隆了几丁质酶基因 *Bchi*,对其进行了 DNA 序列测定和分析,并与 GenBank 中收录的植物几丁质酶基因序列及其编码的氨基酸序列进行了同源性比较。同时将 *Bchi* 基因与原核表达载体 pQE - 30 重组,在 *E. coli*M15 中得到表达。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

菜豆品种为五常油豆,由黑龙江省农科院园艺

研究所提供。转化受体菌 *E. Coli*JM109、克隆载体 pUC18 由本实验室保存。限制性内切酶、X - gal、IPTG 购自 Promega 公司,T₄DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司,ExTaqDNA 聚合酶购自 Takara 公司,柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海 Sangon 公司,氨苄青霉素、琼脂糖购自 Sigma 公司,其余试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计 根据 GenBank 中收录的菜豆 mRNA 序列,采用软件 Primer Premier5.0 并结合引物设计原则设计了一对 PCR 扩增引物,为进一步构建植物表达载体的需要,在引物 5' 端分别引入了限制性核酸内切酶 SacI 及 BamHI 位点,并在每个引物前均加上了两个保护碱基 GG。引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成,序列如下:

P1 (5' 端引物): 5' GG GGATCC AGAGAAAT-
BamH I
GAAGAAGAATAGG 3'

P2 (3' 端引物): 5' GG GAGCTCATTTATTGATAGATG-
Sac I
GTGGG 3'

1.2.2 菜豆基因组总 DNA 的提取 参照文献^[13]采用 CTAB 法小量提取基因组 DNA。

1.2.3 菜豆几丁质酶基因的 PCR 扩增 以菜豆总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系: 1x Buffer, 0.2 mM dNTP, 引物 P1、P2 各 0.4 μ M, ExTaqDNA 聚合酶 1.25 U, 模板 DNA 0.1 ~ 1 μ g, 加 ddH₂O 至 25 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.4 PCR 产物的克隆 PCR 产物用柱式 DNA 胶回收试剂盒回收, 方法参照试剂盒说明书。回收产物经限制性内切酶 SacI、BamHI 酶切后, 与经同样酶切的 pUC18 克隆载体连接, 连接体系: pUC18 载体 50 ng, PCR 产物 50 ~ 100 ng, 1 X Ligase Buffer, T₄ DNA 连接酶 1 U, 加 ddH₂O 至 20 μ L。23 $^{\circ}$ C ~ 26 $^{\circ}$ C

连接 2 h。连接产物按常规方法转化*E. Coli*JM109感受态细胞^[14],在含有氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 筛选平板上进行蓝白斑筛选,提取若干白斑和 1 个蓝斑菌落质粒进行酶切鉴定。

1.2.5 DNA 序列测定与分析 经鉴定为阳性的重组克隆送至上海博亚生物技术有限公司,利用 ABI377 荧光自动序列分析仪进行序列测定,测序结果用软件 DNAMAN 进行序列比较分析,序列的同源性比较在 <http://www.ncbi.nlm.gov> 网站上用 BLAST 程序进行。将所获得的目的基因命名为 *Bchi*,阳性重组克隆质粒命名为 pUC - *Bchi*。

1.2.6 菜豆几丁质酶基因在大肠杆菌中的表达 用 SacI 和 BamHI 对质粒 pUC - *Bchi* 进行双酶切,回收 *Bchi* 基因,与经同样酶切的载体 pQE - 30 连接,构建重组表达载体 pQE - *Bchi*,转化*E. Coli*M15 感受态细胞,筛选阳性重组子。挑取转化皿上的单菌落接种于 10 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 ℃ 振荡培养过夜,以 1: 100 转接到 10 mL 含有以上浓度抗生素的 LB 液体培养基,培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 h,加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mM,37 ℃、200 rpm 振荡培养 3.5 h,诱导几丁质酶基因表达,取 1 mL 培养物进行 SDS - PAGE 电泳分析。

2 结果与分析

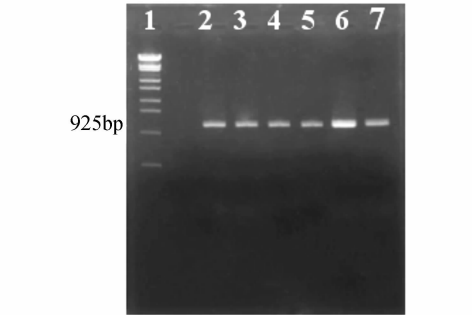
2.1 菜豆几丁质酶基因的 PCR 扩增

采用所设计的几丁质酶基因 PCR 扩增引物 P1 和 P2、优化的 PCR 反应体系及程序,成功从菜豆总 DNA 中扩增出一特异性条带,大小约 1.1kb,与预期设想的相符,将其命名为 *Bchi*(图 1)。

2.2 重组克隆质粒的鉴定

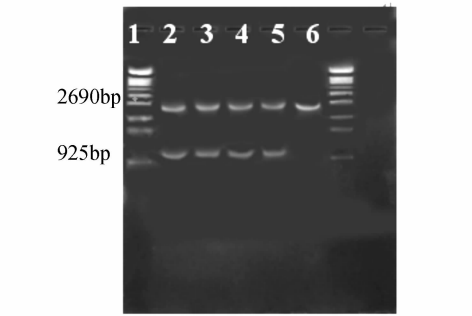
将回收的 PCR 产物插入到 pUC18 载体的 SacI、BamHI 位点,转化 *E. Coli*JM109 感受态细胞,提取若干白斑和 1 个蓝斑质粒,经 SacI 和 BamHI 双酶切鉴定,白斑质粒电泳显示出约 2.7kb(pUC18 载体)和 1.1kb(目的 DNA 片段)两条带,而作为对照的蓝斑质粒只显示出约 2.7kb(pUC18 载体)一条带(图 2),表明 1.1kb 目的基因片段得到克隆,将重组质粒命名为 pUC - *Bchi*。以重组质粒为模板,P1、P2 为引物进行 PCR 扩增,也得到了约 1.1kb 的目的 DNA 片段(图略),进一步验证质粒重组是正确的。

2.3 DNA 测序结果与序列分析



1:λ - EcoT14 I marker 2~7:PCR product *Bchi*
图 1 PCR 产物的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 1.0% Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product



1:λ - EcoT14 I marker 2~5:pUC18 + *Bchi*(white spot)
6:pUC18(blue spot)

图 2 重组质粒 pUC - *Bchi* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pUC - *Bchi* by restriction enzyme SacI + BamHI

利用 M13 通用引物对目的 DNA 片段进行核苷酸序列测定。测序及序列分析结果表明:*Bchi* 基因全长 1088bp,其中 T、C、G、A 分别为 232bp (21.3%)、330bp (30.3%)、276bp (25.4%)、250bp (23.0%),在 7bp 处有起始密码子 ATG,在 988bp 处有终止密码子 TGA,在 1008bp 和 1082bp 处各有一个 poly (A) 附加信号。该基因内部含有一个 981bp 的完整开放读码框,无内含子,编码 327 个氨基酸,推测分子量为 35.3kD,等电点 pI 为 7.93。*Bchi* 编码的多肽产物符合 Class Ia 几丁质酶前体的结构特点:其 N - 端具有一个 26 个氨基酸的信号肽,其中疏水性氨基酸为 18 个,约占 69%,信号肽剪切位点在 G₂₆ - E₂₇ 之间,与几丁质酶的细胞定位有关,在成熟肽中将被切除;其后是富含 8 个半胱氨酸(Cys)、长 41 个氨基酸的几丁质结合区;还有由 249 个氨基酸组成的高度保守的催化区,在几丁质结合区和催化区之间无富含脯氨酸(Pro)的可变交连区;C - 端有由 11 个氨基酸组成的前导肽序列,

是几丁质酶的液泡定位信号,称为液泡定位多肽 (VTP)(图 3)。因此 *Bchi* 基因编码的蛋白产物属于 Class Ia 几丁质酶,且为碱性内切几丁质酶。该基因序列已被 GenBank 收录,登录号为 AY357300。

1	AGAGAAATGAAGAAGAATAGGATGATGATTATGATATGCAGTGTAGGAGTGGTGTGGATG
1	<u>M K K N R M M I M I C S V G V V W M</u>
	(1)
61	CTGTTAGTTGGAGGAAGCTACGGAGAGCAGTGTGGAAGGCAAGCAGGAGGTGCACTCTGC
19	<u>L L V G G S Y G E Q C G R Q A G G A L C</u>
	(2)
121	CCAGGGGGCAACTGTTGCAGCCAGTTCGGGTGGTGCGGTCCACCACTGACTACTGCGGC
39	<u>P G G N C C S Q F G W C G S T T D Y C G</u>
181	AAGGATTGCCAGAGCCAGTGCAGGGGACCGTCTCCTGCTCCTACTGATCTCAGCGCCCTC
59	<u>K D C Q S Q C G G</u> P S P A P T D L S A L
241	ATATCCAGGTCCACCTTCGACCAGGTGCTCAAACATCGCAACGACGGAGTATGCCAGCC
79	I S R S T F D Q V L K H R N D G V C P A
301	AAAGGCTTCTACACTACGATGCCTTCATCGCCGCCGCCAAGGCTTACCCAGCTTCGGA
99	K G F Y T Y D A F I A A A K A Y P S F G
361	AACACCGGAGACACGGCCACTCGCAAGAGGGAGATTGCGGCCTTCTGGGGCAAAAGTCT
119	N T G D T A T R K R E I A A F L G Q T S
421	CACGAAACAACCGGGGATGGGCCACTGCGCCCGACGGACCATACGCATGGGGATACTGC
139	H E T T G G W A T A P D G P Y A W G Y C
481	TTCGTGAGGGAGCGGAACCCAGTGCCTACTGCTCCGCCACTCCCCAATCCCTGCGCC
159	F V R E R N P S A Y C S A T P Q F P C A
	(3)
541	CCTGGGCAGCAGTACTACGGCAGGGGTCCCATCCAGATATCCTGGAACAACATATGGT
179	P G Q Q Y Y G R G P I Q I S W N Y N Y G
601	CAGTGCGGAAGGGCCATTGGGGTTGACTTGCTCAACAACTGATCTAGTCGCCACTGAC
199	Q C G R A I G V D L L N K P D L V A T D
661	TCTGTCTCTCCTTCAAGTCCGCCCTCTGGTTCTGGATGACCGCACAGTCCCCAAACCT
219	S V I S F K S A L W F W M T A Q S P K P
721	TCCTCCCACGACGTATCACCTCTCGATGGACCCCTCCTCTGCCGACGTCGCCGCCGCG
239	S S H D V I T S R W T P S S A D V A A R
781	CGGCTTCCCGCTACGGCACTGTGACGAACATCATCAACGAGGCCTGGAGTGCGGGCGA
259	R L P G Y G T V T N I I N G G L E C G R
841	GGACAGGACAGCAGGTTCAAGACCGCATCGGATTCTCAAGAGATACTGTATCTGCTT
279	G Q D S R V Q D R I G F F K R Y C D L L
901	GGAGTTGGTTATGGCAACAACCTTGACTGCTACTCTCAGACTCCATTGGAAATTCACCT
299	G V G Y G N N L D C Y S Q T P F G N <u>S L</u>
961	TTCCTCTCTGACCTTGTCACCTCTCAGTGAAGTGGCATCCCATCAGAATAAATAAACTC
319	<u>F L S D L V T S Q</u> * (5)
	(4)
1021	ATAAATCTGTGTTTCCCTTTCTGATCACAACCTTTCCAATAACACTTTTCCACCATCTAT
1081	CAATAAAT
	(6)

(1)N – 端信号肽(2)几丁质结合区 (3)催化区 (4)前导肽 (5)(6)poly(A)附加信号
(1)N – terminal signal region (2)chitin – binding domain (3) catalytic region (4)propeptide (5)(6)poly(A) addition
图 3 菜豆几丁质酶基因 *Bchi* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the bean chitinase gene *Bchi*

2.4 菜豆几丁质酶基因序列及其氨基酸序列的同源性检索

将 *Bchi* 基因 1088bp 的核苷酸序列与编码的 327 个氨基酸序列在 <http://www.ncbi.nlm.gov> 上进行 blast 同源性检索分析,结果在 GenBank 数据库中显示出 206 条有同源性的核苷酸序列,99 条有同源性的氨基酸序列。这些序列均为几丁质酶基因,同源性较高的依次为菜豆、豇豆、豌豆、苜蓿和水稻等,相应区段的核苷酸序列同源率在 80% 以上,氨基酸序列同源性多在 70% 以上(表 1),充分证明 *Bchi* 基因是植物几丁质酶基因家族的成员。

表 1 *Bchi* 与其他植物几丁质酶核苷酸及氨基酸序列的同源性比较

Table1	Alignment of nucleotide and amino acid sequence homologies of <i>Bchi</i> and other plant chitinase in GenBank					
	菜豆	菜豆	豇豆	豌豆	苜蓿	水稻
	<i>Phaseolus</i>	<i>Phaseolus</i>	<i>Vigna</i>	<i>Pisum</i>	<i>Medicago</i>	<i>Oryza</i>
	<i>vulgaris</i>	<i>vulgaris</i>	<i>sesquipedalis</i>	<i>sativum</i>	<i>sativa</i>	<i>sativa</i>
GenBank						
登录号	M13968	AJ297395	AF307511	L37876	U83592	D16223D
Accession	P06215	CAB97002	AAG23965	AAA75196	AAB41325	BAA03751
No. in GenBank						
与 <i>Bchi</i> 核苷酸序列同源率	98.3%	94.6%	89%	82%	85%	80%
Homology (%)						
与 <i>Bchi</i> 氨基酸序列同源率	97.6%	90.8%	87%	75%	75%	67%
Homology (%)						

2.5 菜豆几丁质酶基因在大肠杆菌中的表达

将构建的原核表达重组质粒 pQE - *Bchi* 转入表达宿主菌 *E. Coli*M15 中,37 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 约 0.6 时,加入总浓度为 1.0 mM 的 IPTG,37 ℃ 诱导 3 h 后,用 SDS - PAGE 凝胶电泳检测表达产物,结果得到分子量约为 35kD 的特异带,与推测的 *Bchi* 编码蛋白质产物的分子量大致相同;而诱导前的 *E. Coli*M15 (pQE - *Bchi*) 和经同样处理的 *E. Coli*M15 (pQE - 30) 则没有此特异性条带,说明菜豆几丁质酶基因 *Bchi* 在大肠杆菌中得到了正确表达(图 4)。

3 讨论

信号肽具有引导蛋白质的转运、定位和分泌的功能,其主要特征有:在氨基端有一段带正电荷的氨基酸序列;在中间有一个疏水的核心区,常含亮氨酸

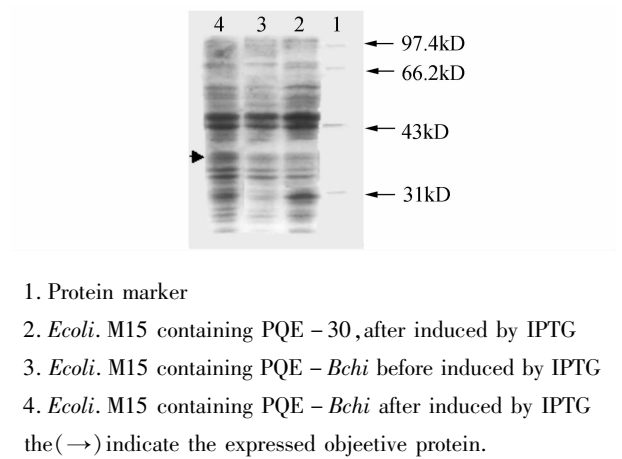


图 4 *Bchi* 基因表达产物的 SDS - PAGE 分析

Fig.4 SDS - PAGE analysis of expression product of *Bchi*
或异亮氨酸残基;在羧基端有一个能被信号肽酶水解的位点,这个位点常在丙氨酸之后,或在甘氨酸或丝氨酸之后^[15]。本研究克隆的菜豆 *Bchi* 基因编码的蛋白产物 N - 端含有一段 26 个氨基酸的多肽序列,其氨基端有 2 个带正电荷的赖氨酸(K)和 1 个精氨酸(R);中间有 18 个富含亮氨酸和异亮氨酸疏水性氨基酸,占此多肽序列的 69%,构成了一个疏水的核心区;第 26 位的甘氨酸符合典型的信号肽剪切位点的特征(图 3)。可见该序列具备一般信号肽的所有主要特征,因此是几丁质酶的信号肽,其作用是引导几丁质酶运输到内质网,在几丁质酶成熟肽中将被切除。

Bchi 基因编码的蛋白产物在 C - 端有一个 11 个氨基酸的多肽序列,是几丁质酶的液泡定位信号,使 *Bchi* 基因编码的成熟几丁质酶分泌到液泡中。该序列在不同植物几丁质酶间没有相似性,但也存在一定规律,即液泡定位多肽都有负电荷,末端残基为甲硫氨酸或其它脂肪族氨基酸或有一个糖基化位点^[16],胞外几丁质酶都不具有这种序列。

Bchi 基因编码的多肽链含有一个由 41 个氨基酸组成的几丁质结合域(CBD),序列为:EQCGRQAGGALCPGGNCCSQFGWCGSTTDYCGKDCQSQC GG,其中半胱氨酸(Cys)有 8 个,占 20%;而 Cys 在整个多肽链中只占 5.1%。Cys 在不同几丁质酶的 CBD 中位置基本固定,表现出高度的保守性,彼此之间形成二硫键。*Bchi* 基因多肽的 CBD 区分别在 Cys₃ - Cys₁₈、Cys₁₂ - Cys₂₄、Cys₁₇ - Cys₃₁、Cys₃₆ - Cys₄₀(以 CBD 内的氨基酸为序)半胱氨酸之间形成 4 对二硫键,其中前 3 对二硫键相互重叠,在第 3 到第 31 氨基酸残基间形成了 CBD 的

保守内核区。有的几丁质酶由于缺失或增加一个或几个半胱氨酸而导致形成的二硫键少于或多于4个^[17]。在 *Bchi* 基因编码多肽的 CBD 内部还存在着大量的亲水性氨基酸残基,与多糖的结合有关。

几丁质结合域虽然具有结合几丁质的功能,但酶催化活性的发挥并不依赖于它,有它可能增强酶对几丁质的亲和性,从而在一定程度上提高酶的活性^[18,19],但是这种亲和性受底物的影响。有研究表明,几丁质结合域能够提高几丁质酶对胶状几丁质的催化作用,但对可溶性几丁质来说,CBD 的有无对酶的催化作用影响不大^[19],这似乎表明几丁质结合域与不溶性几丁质具有更强的亲和力。另外,CBD 的数目对于几丁质酶降解几丁质的亲和力也无大的影响^[20]。

参 考 文 献

- [1] Mauch F, Mauch Mani B, Boller T. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue : II. Inhibition of fungal growth by combinations of Chitinase and β -1,3-Glucanase[J]. Plant Physiology, 1988, 88: 936-942.
- [2] Meins F J. The biology of plants transformed with chimeric class I chitinase and β -1,3-glucanase Gene[J]. Workshop On Engineering Plants Against Pest And Pathogens. 1993, 1: 11-13.
- [3] Zhu Q, Maher E A, Masoud S, et al. Enhanced protection against fungal attack by constitutive expression of chitinase and Glucanase genes in transgenic tobacco[J]. Biotechnology, 1994, 12(8): 807-812.
- [4] 张志忠, 吴菁华, 吕柳新, 等. 植物几丁质酶及其应用研究进展[J]. 福建农林大学学报, 2005, 34(4): 494-499.
- [5] Grison R, Grezes Besset B, Schneider M, et al. Molecular farming of recombinant antibodies in plants [J]. Biology Chemistry, 1996, 380: 825-83.
- [6] Pasoene HL, Seppanen SK, Degefu Y, et al. Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases[J]. Theory Applied Genetics, 2004, 109: 562-570.
- [7] 冯道荣, 许新萍, 卫剑文, 等. 使用双价抗真菌蛋白基因提高水稻抗病性的研究[J]. 植物学报, 1999, 11: 1126-1131.
- [8] Mauch F, Hadwiger L A, Boller T. Antifungal Hydrolases in Pea Tissue : I. Purification and characterization of two Chitinases and two β -1,3-Glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection[J]. Plant Physiology. 1988, 87: 325-333.
- [9] Sela Bluurlage M B. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and β -1,3-glucanase exhibit antifungal activity[J]. Plant physiology 1993, 101: 857-863.
- [10] 程红梅, 简桂良, 倪万潮, 等. 转几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因提高棉花对枯萎病和黄矮病的抗性[J]. 中国农业科学, 2005, 38(6): 1160-1166.
- [11] Linthort H J M. Pathogenesis-related proteins of plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1991, 10: 123-150.
- [12] 欧阳石文, 赵开军, 冯兰香. 植物中几丁质酶的作用[J]. 生物学通报, 2002, 37(6): 13-14.
- [13] 王关林, 方宏钧. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [15] Von Heijne G. Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implication for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells[J]. EMBO J, 1984, 3: 2315-2318.
- [16] 曾艳, 赵南明, 刘进元. 几丁质酶与植物防卫反应. 生物工程进展[J], 1997, 17(4): 31-34.
- [17] Beintema J J. Structural features of plant chitinase and chitin-binding proteins[J]. FEBS Letters, 1994, 350: 159-163.
- [18] Payne G, Ahl P, Moyer M, et al. Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco[J]. Proceedings National Academy Sciences USA, 1990, 87: 98.
- [19] Iseli B, Boller T, Neuhaus T M. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity[J]. Plant Physiology, 1993, 103: 221-226.
- [20] 欧阳石文, 冯兰香, 谢丙炎, 等. 芥菜新型几丁质酶基因在酵母中的分泌表达[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(1): 33-35.