

# 几丁质酶及其研究进展\*

蓝海燕 陈正华

(中国科学院遗传研究所, 中国北京, 100101; 新疆农业科学院, 经济作物研究所, 中国乌鲁木齐, 830000)

**摘要** 本文从几丁质酶的分布、分类、发育调节、可诱导性、分子生物学及抗病基因工程等方面近年来的进展进行了综合论述, 并对其进一步的应用提出展望。

**关键词** 几丁质酶基因, 防御反应, 抗真菌病基因工程  
**分类号** Q556, Q78

## Advances in Plant Chitinase Research

LAN Haiyan CHEN Zhenghua

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101, PRC;

Institute of Industrial Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Wulumqi, 830000, PRC)

**Abstract** In this paper, we reviewed advances in research of plant chitinase from following aspects: distribution, classification, developmental regulation, induction, molecular biology and genetic engineering of plant disease resistance, etc.. We can see that chitinase can be found every where in plant when it is attacked by pathogens, especially fungi. We considered that plant chitinase is one of the most attractive genes in fungal disease resistance, however, it have to be modified to adapt plant for such an aim.

**Key words** chitinase gene, defensive reaction, genetic engineering of fungal resistance

几丁质酶及其底物几丁质(Chitin)均广泛存在于自然界。几丁质又称甲壳质或甲壳素, 是一种生物多聚物, 自然界中每年生成的几丁质约占天然聚合物贮量的第二位, 仅次于纤维素。几丁质是多数真菌胞壁的主要成分之一, 同时也大量存在于昆虫和动物的甲壳中<sup>[1,2]</sup>。现已发现很多动物、植物及微生物都可产生几丁质酶。虽然在植物体内至今尚未发现有几丁质存在, 但几丁质酶却普遍存在于高等植物中, 且在植物中此酶常与防卫反应的诱导有关<sup>[3,4]</sup>。至目前为止, 对几丁质酶的研究已涉及到酶的分布、特性、定位、诱导、分子生物学、基因工程等方面, 下面就这些方面对几丁质酶研究进展作一综述。

# 1 几丁质酶的分佈

从 1921 年 Folpmers 首次从细菌和放线菌中获得有水溶性几丁质酶存在以来,人们又相继从多种微生物、动物及植物中分离到几丁质酶<sup>[5]</sup>.

## 1.1 微生物几丁质酶

自 Benecke 首次报道了 *Bacillus chitinovorius* 能够产生几丁质酶以来,又发现了许多产几丁质酶的微生物种类,包括细菌、放线菌、真菌等,其中对 *Serratia marcescens*、*Streptomyces plicatus* 及 *Vibrio vulnificus*<sup>[4-8]</sup> 的研究较多. 包括酶的理化性质、作用机理及纯化方法等方面都做了大量工作.

微生物几丁质酶有其基本性质,通常它们存在于 pH3~9 范围内较稳定. 而当 pH4~7, 温度在 40~50 时酶活性最高. 它们在分子量上差异很大,从 21~69kDa 不等.

几丁酶分为内切和外切酶,外切酶是从链的非还原性末端依次切下几丁质二糖. 纸层析分析表明,微生物几丁质酶的水解产物绝大多数是二糖,属于外切酶,但也有报道. *S. plicatus* 的几丁质酶属于内切酶<sup>[9]</sup>.

## 1.2 动物几丁质酶

与植物和微生物相比,动物几丁质酶的研究工作只限于产生酶的动物种类、酶的基本性质及作用机理等方面. 产几丁质酶的动物种类主要有两栖类、鸟类及昆虫等<sup>[10]</sup>.

研究表明,动物几丁质酶属于内切酶类,可将几丁质水解成二糖或三糖,几丁质酶主要分布在动物消化液、腺体、胃和肠粘膜等部位,它的有无还与食物有关.

## 1.3 植物几丁质酶

目前已在多种植物中分离到各种类型的几丁质酶,植物不含几丁质,但几丁质酶却广泛存在于高等植物中,以下主要就植物中内切几丁质酶的研究进行阐述.

# 2 植物几丁质酶的特性及分类与定位

几丁质酶(EC 3.2.1.14)是一种糖苷酶,它主要催化几丁质的水解. 几丁质是 N-乙酰-D-葡萄糖胺以  $\beta$ -1,4 糖苷键连接起来的直链多聚物. 植物几丁质酶分为内切酶和外切酶两种,目前研究的大多数为几丁质内切酶,它可水解几丁质内部的  $\beta$ -1,4 连接,释放 GLCNAC 的寡糖,而外切酶则从链的非还原端依次切下几丁质二糖<sup>[3]</sup>. 许多纯化的几丁质内切酶还显示不同程度的溶菌酶活性,能水解肽葡聚糖中 N-乙酰胞壁基与 GLCNAC 残基的  $\beta$ -1,4 链. 不少植物的溶菌酶也显示较高的几丁质酶活性<sup>[4,5]</sup>.

几丁质酶在高等植物中主要分布于植物的茎、叶、种子及愈伤组织中,其分子量在 25~35 kDa 之间,酶分子以单体形式存在. 具有酸性或碱性等电点. 大多数几丁质酶对热稳定,抗蛋白酶水解.

根据几丁质酶的氨基酸序列、等电点、细胞定位等特点可将几丁酶分成 5 类<sup>[4,11-13]</sup>. 几丁酶为碱性蛋白,主要分布于液泡中. 这类酶在氨基酸序列上有两个高度保守区,其中间由可变区分开. N-端的保守区由富含半胱氨酸(8 个半胱氨酸)的约 40 个氨基酸组成,这与麦芽凝集素及 hevein 的结构具同源性. 有研究报道,hevein 能与几丁质发生结合,在浓度

较低的情况下就能对病原菌起抑制作用. 因此, 这一结构域可能参与和几丁质的结合. 类几丁质酶能被病原菌及其激发子、乙烯等因素所诱导, 在体外具有抑菌活性. 类几丁质酶为酸性蛋白, 主要分布在细胞间隙. 与类酶比较, 其主要结构的氨基酸序列类似, 但缺少 N-端富含半胱氨酸区域及 C 端序列. 它不能被病原菌诱导, 在体外无抑菌活性. 类几丁质酶也为酸性蛋白, 定位于胞间隙. 部分氨基酸顺序比较表明, 这类酶相互之间很相似, 但与、类酶无同源性, 也不含富半胱氨酸结构域. 这类酶包括番木瓜、三叶橡胶、爬山虎、悬钩子的双功能酶(包含溶菌酶/几丁质酶的功能)以及黄瓜的几丁质酶. 这类酶虽具溶菌酶活性, 但与细菌几丁质酶不同. 据对其疏水群的分析, 它具有一个含 4 个天冬氨酸和谷氨酸残基的活性部位, 能被病原菌、水杨酸诱导. 类几丁质酶包含一个富半胱氨酸的结构域和一个与类酶相似的高度保守序列, 但由于有 4 个部位的缺失, 这类几丁质酶成熟结构序列只含有 241 ~ 255 个氨基酸, 而类酶含有 300 个氨基酸. 各种植物中的类酶之间同源性为 59% ~ 63%, 而与类间同源性只有 41% ~ 47%, 且二者在血清学上是不同的<sup>[14]</sup>. 类几丁质酶是最近由 Melcher 报道的. 其序列与细菌 *Bacillus circulams*, *Serratia marcescens* 及 *Streptomyces plicatus* 分泌到胞外的几丁质酶主要序列同源, 是烟草在受到外界胁迫诱导下产生的, 已纯化到两种与此相关的几丁质酶, 分别为 41 kDa 和 43 kDa<sup>[15]</sup>.

不同类型的几丁质酶具有不同的定位. 通常类碱性几丁质酶定位于液泡中, 而其它酸性酶则位于胞间隙. 一些研究证明, 细胞内几丁质酶的定向分布与多肽的 C 端序列有关. Jean 报道, 烟草几丁质酶 A 的 C 末端的 7 个氨基酸对其液泡的定位是必需的, 此多肽被称为液泡导向肽<sup>[15]</sup>. 不同植物中的 C 端序列无显著同源性, 但均具有一个糖基化位点, 此位点与 C 端导向肽的切除并使成熟蛋白进入液泡有关<sup>[16]</sup>. Sela-Bunrlage 对烟草类几丁质酶进行了去除 C 端修饰, 结果转基因植株在细胞间隙检测到此酶活性<sup>[17]</sup>. 利用原生质体暂时表达系统将黄瓜的一种胞外几丁质酶附加上导向肽序列, 可引起大多数黄瓜几丁质酶定位于原生质体中. 通常、类几丁质酶与类比较不仅缺乏 N-端富含半胱氨酸结构域, 而且缺乏 C 端序列, 因而分泌于胞外.

### 3 植物发育及特殊植物组织中的几丁质酶

几丁质酶在植物中的存在通常与植物对真菌的抗性有关. 但是在许多植物发育阶段及特殊的组织中发现几丁质酶的存在. 几丁质酶在整株植物中分布的方式为: 顶部几乎检测不到酶活性, 而在基部老叶及根中的含量占到可溶性蛋白的 1% ~ 4%. Fraser 报道, 在健康烟草植物开花期间, 叶及花的某些部位中有大量几丁质酶的积累<sup>[18, 19]</sup>, 而在油菜叶凋萎过程中也发现几丁质酶表达<sup>[20]</sup>. 不仅如此, Gomez Lim 在乙烯诱导的菜豆脱落层中发现大量的几丁质酶 mRNA 的产生<sup>[21]</sup>. 在大麦的成熟种子中发现至少有 5 种蛋白表现出几丁质酶活性, 而且其中两种在种子吸胀萌发阶段被释放到体外<sup>[22]</sup>. 除此之外, De Jong 发现, 一种糖基化的酸性几丁质酶在胡萝卜体细胞胚早期发育过程中起着重要作用: 一种温敏型胡萝卜细胞突变体在不适宜的温度条件下, 其体细胞胚胎的发生不能逾越球形胚阶段, 但当加入野生型细胞分泌的蛋白时, 则突变体可完成体细胞胚的发生. 更进一步鉴定这些蛋白时, 发现其中有一种 32 kDa 的糖蛋白为酸性几丁质酶. 这一现象可能与植物开花过程中几丁质酶的大量表达有着内在联系. 从以上的这些现象也许表明, 在一些关键的发育阶段上, 植物体本身会

产生一些保护机制以保证在外界环境并非最适合的条件下能顺利完成其整个的发育过程。

在植物的一些特殊组织结构中也发现几丁质酶的存在。Spanu 在 *Allium porrum* L (leek) 的菌根最初形成过程中发现几丁质酶活性的升高, 但随菌根的形成, 其中的酶活性比对照中减少。利用荧光标记的探针对几丁质酶在细胞中的定位研究发现, 几丁质酶分布在液泡及胞间隙, 但在真菌壁上却未检测到<sup>[23]</sup>。这说明在真菌侵入植物根部的早期使植物产生了防御反应, 后来当菌根形成后, 由于激素之间的比例变化, 使防御的反应被抑制。一种热带豆 *Sesbania rostrata* 的共生菌在致瘤过程中, 可使 类酸性几丁质酶大量积累, 研究证明此酶与限制致瘤因子的活性有关<sup>[24, 25]</sup>。

## 4 几丁质酶的可诱导性

植物中的几丁质酶是可诱导的。通常它可受到病原物及其激发子、乙烯、水杨酸、UV 及重金属等的诱导, 在植物体中, 特别是植物顶部幼嫩部分, 几丁酶活性很低, 而被诱导后, 此酶活性迅速提高。

乙烯对几丁质酶的诱导作用在许多植物中都得到证据<sup>[21, 26]</sup>。植物生长素也能诱导几丁质酶产生, 但这种作用似乎是通过乙烯的作用, 因为生长素可刺激乙烯形成; 当乙烯合成受抑后, 几丁质酶活性则不被生长素诱导<sup>[26]</sup>。

Abeles 首先报道了乙烯对蚕豆叶片中几丁质酶的诱导作用<sup>[27]</sup>。之后 Boller 对此现象作了更为详细的研究<sup>[3]</sup>。Vogeli 发现几丁质酶 mRNA 的诱导与乙烯完全相关: 当停止施用乙烯 12 h 后, 几丁质酶含量就停止提高。大量实验发现, 乙烯所诱导产生的几丁质酶为 类碱性几丁质酶, 且它的作用机制已有所研究。Shinshi 在西红柿几丁质酶基因的启动子中发现了乙烯的反应区。在 2 kb 的 Chn 48 启动子中, 从 -422 至 -195 区为乙烯敏感区<sup>[28]</sup>。

植物几丁质酶被病原物的诱导最早来自病毒。许多植物在病毒感染后可使几丁质酶活性急剧升高, 而且会同时产生多种几丁质酶。Trudel 在 TMV 感染的烟草叶组织中发现多种几丁质酶活性。在玉米中, BMV 也能诱导 5 种以上几丁质酶产生<sup>[29, 30]</sup>。Metraux 发现 TMV 不仅能诱导黄瓜几丁质酶局部活性达 600 倍, 而且还能诱导整个系统获得此酶活性<sup>[31]</sup>。

真菌及其激发子 (elicitor) 可诱导植物中几丁质酶的活性急剧增加。在番茄、豌豆、油菜、菜豆等受到病原真菌侵染时均可产生较高的几丁质酶活性, 且多种类型的几丁质酶共存<sup>[32, 33]</sup>。不仅如此, 当用真菌细胞壁或激发子处理胡萝卜和马铃薯时也发现几丁质酶活性增加<sup>[34, 35]</sup>。Roby 研究了诱导因子的诱导效率与寡糖大小的关系, 认为六糖几丁质是最有效的诱导因子<sup>[36, 37]</sup>。

植物几丁质酶还可受一些物理及化学因素诱导。当大麦和油菜根暴露于  $\text{Cr}(\text{III})$  ( $\text{CrO}_3$ ) 两天后, 在叶片中检测到几丁质酶活性的系统诱导, 而对于  $\text{Cr}(\text{VI})$  ( $\text{CrCl}_3$ ) 却无这种反应。盐溶液喷洒于黄瓜后也有类似的反应<sup>[3]</sup>。菜豆几丁质酶在受伤、紫外辐射时都会被诱导<sup>[38]</sup>。几丁质酶活性在水杨酸或升汞处理时也会被诱导<sup>[39]</sup>。

几丁质酶在不同诱导条件下表达方式不同, 也即由不同机制所控制。如在玉米中, 几丁质酶能被升汞所诱导却不能被乙烯和水杨酸诱导。在花生细胞培养中, 只有一种几丁质酶的 mRNA 在诱导物作用下大量产生, 而其它几丁质酶水平不受影响。Wu 分别在水中和脱落酸

中发芽的种子中发现两种几丁酶 pCH2 及 pCH11 均在胚中出现转录,且前者的 mRNA 水平比后者略高。利用接种和不接种 *A. flavus* 的玉米进行 Northern 杂交分析糊粉层和胚中的总 RNA,未接种的没有 pCH2 和 pCH11 的表达;而接种后的则产生两种 mRNA,且前者高于后者。但玉米损伤组织与 *A. flavus* 在同一平板上生长一周后,引起相应的 pCH2 而不是 pCH11 的转录<sup>[40]</sup>。由此可看出,不同几丁质酶其调节机制各异。

## 5 几丁质酶与植物的防卫反应机制

植物在受到外界胁迫条件下,产生许多 PR 蛋白(Pathogenesis-Related),而在此蛋白中,多数具有几丁质酶及葡聚糖酶活性。可见几丁质酶与植物防卫反应机制密切相关。几丁质酶之所以一直被认为与植物抗病相关,原因可能有:a)植物几丁质酶在病原物作用下被大量诱导;b)几丁质在植物中至今未被发现,但却是真菌细胞壁的主要组成成份。许多体外抑菌实验表明,几丁质酶对胞壁中含有几丁质的真菌有抑制作用。电镜观察结果显示,几丁质酶常作用于菌丝顶端新合成的几丁质壁,使顶端壁合成中的代谢平衡被破坏,使顶端膨胀并融解,从而达到抑菌效果<sup>[41]</sup>。从真菌胞壁组成结构看,其成熟胞壁最外层为无定形葡聚糖层;次外层为糖蛋白网;紧接的为蛋白质层;最内层为几丁质微纤丝<sup>[42]</sup>。新生壁还未覆盖蛋白和葡聚糖,因而容易被几丁质酶所分解,而成熟胞壁却能抵抗几丁质酶降解。免疫化学技术直接证明了体内几丁质酶与真菌胞壁间的作用,并观察到侵入植物体内的真菌胞壁周围有几丁质酶沉积<sup>[43]</sup>。当几丁质酶与葡聚糖酶共同作用于真菌胞壁时,它们常会协同作用,使抗菌活性和抗菌广谱性都增强<sup>[17]</sup>。

不同类型的几丁质酶及其在细胞中定位的不同,使其在抗真菌中的作用也不同。体外抑菌试验中,类碱性几丁质酶具有最高抗菌活性,而、类则几乎无抑菌活性。但在植物体内,细胞间隙定位的、类几丁质酶被认为与宿主早期防御反应有关。它可以间接地释放真菌诱导因子从而激发进一步的防卫反应。

## 6 几丁质酶的分子生物学

### 6.1 几丁质酶基因特性

植物几丁质酶基因的研究最早见于菜豆。Brogli 以菜豆 mRNA 为模板,经反转录构建了 cDNA 文库。通过差异原位杂交方法获得了菜豆几丁质酶基因。对其中一个全长 1 146 bp 的克隆 pCH18 进行了测定。其 5'端非翻译区有 33 bp 富含 AT 区,开放阅读框为 984 个核苷酸,距 Poly(A<sup>+</sup>)尾部 115 个核苷酸处终止。TCA 终止在下游 54 位碱基处重复出现。3'端非翻译区存在为加尾所需的 6 个核苷酸序列(AAUA AA),并在 1 038 和 1 042 位置上重复发生,第三个这样的序列位于 1 113 处。6 个克隆中有 5 个利用下游位置,只有一个利用较上游位置。并且此几丁质酶存在着翻译后的加工过程。菜豆几丁质酶含有 328 个氨基酸,N-端有 27 个氨基酸残基的信号肽。且 C 端有一导向肽序列。在脱去信号肽,并通过糖基化切除 C 端导向肽后进入液泡成为成熟的几丁质酶<sup>[44]</sup>。

1987 年,Shinshi 等人构建了烟草几丁质酶的 cDNA 文库,并首先利用<sup>32</sup>P 标记的探针筛选阳性克隆,然后用菜豆几丁质酶的抗体与阳性克隆体外翻译产物反应进一步筛选。将其

中插入片段约 1 kb 的克隆 pCHN50 进行分析表明, 它包含一个单一的 310 个氨基酸的阅读框架, 并包括了成熟几丁质酶的全部氨基酸序列, 虽不包含 5'-非编码区和起始密码子, 但具有 3'-非编码区, 其中包括两个 AAUAAA 区, 能用以加 Poly(A<sup>+</sup>) 尾. 该氨基酸序列和已报道的菜豆几丁质酶 N-端 30 个氨基酸完全吻合<sup>[44]</sup>.

随后, Zhu 以蚕豆几丁质酶基因片段为探针, 从水稻基因组文库分离到几丁质酶 RCH10 基因的全部核苷酸序列, 它含有一个无内含子的开放阅读框, 编码 336 个氨基酸的多肽. 具有一个 21 个氨基酸的信号肽, 一个结构区和一个催化区. 与双子叶植物几丁质酶基因相比, RCH10 在核苷酸水平上有 63% 同源, 在氨基酸水平上有 75% 同源. 分析确定, 它有 2 个转录起始点, 分别位于翻译起始密码子上游的第 53 和 55 碱基对处, 3' 区含有一个 AATAA 多腺苷酸信号. Northern 印迹分析显示, 水稻几丁质酶转录在根中累计水平很高, 而在茎、叶组织中却很低<sup>[45]</sup>.

## 6.2 几丁质酶的基因组结构

迄今为止, 已对多种植物如烟草、黄瓜、水稻、菜豆、大麦、蕃茄、马铃薯等的几丁质酶基因组结构进行了分析, 结果发现不同类型几丁质酶其基因组各具特点, 但均由小的多基因家族组成, 且在一组染色体中, 含有一至多个几丁质酶基因. Broglie 用 类几丁质酶 cDNA 对菜豆基因组 DNA 的 Southern 杂交分析发现, 类几丁质酶是由 4 个成员的多基因家族编码<sup>[46]</sup>. 烟草中酸性和碱性几丁质酶分别由 2~4 个基因编码. Shinshi 对烟草不同类型几丁质酶基因结构研究结果表明, 此类基因含有两个内含子, 并通过转座子过程将半胱氨酸富集域引入编码区, 其 类酸性几丁质酶是通过 类碱性酶失去半胱氨酸富集域而获得<sup>[12]</sup>. 在大麦基因组中几丁质酶基因分布在 1 号染色体上, 并且是多拷贝的. 来自拟南芥的 类几丁质酶基因是单拷贝基因编码的, 在它的基因中有两个内含子, 第二个内含子在进化中已丢失<sup>[47]</sup>. 水稻、马铃薯几丁质酶基因则不含内含子. 这些内含子中富含 A+T, 其内含子与外显子交界处也遵从 GT-AG 规则, 且内含子都处于催化区内<sup>[13]</sup>. 由此可设想, 几丁质酶基因内含子很少或无, 这似乎对于植物在外界胁迫条件下, 当 mRNA 剪接功能障碍时, 能正常合成这类蛋白质很有利 (Gaynor, unpublished manuscript).

随着研究的深入, 对几丁质酶分子生物学的认识将不断完善, 这必将为进一步了解其作用机制及今后的利用提供详实的依据.

## 7 几丁质酶在防治植物病原真菌中的应用

随着对几丁质酶在植物防卫反应中机制的深入研究, 几丁质酶在基因工程中的应用也广泛地开展起来. 目前, 利用克隆的几丁质酶在抗真菌病方面的应用已开辟了多种途径. 较早的有: Shapira 从 *S. marcescens* 中克隆了编码几丁质酶 (58 kDa) 的 ChiA 基因, 并利用大肠杆菌强表达启动子使其在原核生物中得到高效表达, 其表达产物对 *Sclerotium rolfii* 表现明显抗性. 用此菌发酵并纯化得到的几丁质酶可掺入种衣中与种子同时播种, 从而防止苗期土传真菌病害, 但此酶在土壤中的稳定性还未调查<sup>[48]</sup>. Shapira 及同事还将此大肠杆菌 (表达几丁质酶基因) 菌株加入灌溉水中, 此方法对防治苗期真菌病害具有明显作用. Jach 等人将此 *S. marcescens* 的几丁质酶基因 ChiA 用来构建植物表达载体并转化烟草. 在烟草叶、茎及根中检测到此基因的表达, 并且转基因的烟草幼苗对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia*

*solani*) 比对照具明显抗性。

随后在 1990 年, Broglie 首次将组成型表达的菜豆 类碱性几丁质酶基因导入烟草, 获得的转基因植株对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 具有较高抗性。这为植物几丁质酶基因工程的应用奠定了基础。与此同时, Toyoda 从 *Streptomyces griseus* 中纯化出几丁质酶并将其处理离体大麦胚芽鞘以观察对白粉菌 (*Erysiphe graminis f. sp. hordei*) 的作用。结果发现在 2 h 内, 病菌吸胞被完全消解。而当用酶注射活体大麦胚芽鞘时, 出现两种结果: 对正在发育中的真菌吸胞可完全消解, 而已成熟的病菌吸胞并未改变形状, 但菌丝的伸长却受到抑制<sup>[49]</sup>。作者基于这一结果认为, 若将几丁质酶导入大麦, 则可望获得抗白粉病的材料。

1996 年, Grison 等人将组成型表达的几丁质酶基因导入甘蓝型油菜中。利用 3 种病原菌: *Cylindrosporium concentricum* (柱孢霉菌)、*Phoma lingam* (茎点霉菌)、*Sclerotinia sclerotiorum* (菌核菌) 做接种试验, 结果表明转基因植株对病害的田间耐性比对照明显增强<sup>[50]</sup>。

最近, Marchant 等人将水稻 类碱性几丁质酶基因导入栽培玫瑰 (*Rosa hybrida* L) 中, 从而使其增强了对黑斑病菌 (*Diplocarpon rosae*) 的抗性<sup>[51]</sup>。

几丁质酶与葡聚糖酶常常在植物体内被同时诱导, 并在体外具协同抑菌作用, 因而将两者同时导入植物中, 将会大大加强作用的效果。Zhu 利用两种基因得到组成型表达的转基因烟草能有效地抑制烟草蛙眼病 (*Cercospora nicotiana*) 的侵染<sup>[52]</sup>。

## 8 展望

利用几丁酶的基因工程已获得了多种转基因植物包括: 烟草、大豆、棉花、水稻、玉米、番茄、马铃薯、油菜、莴苣、甜菜等作物。并且在抗真菌病害方面获得了良好的效果。由于几丁质酶的底物几丁质不仅存在于真菌中, 也存在许多昆虫中, 由此, 也可发挥几丁质酶在抗虫转基因植物中的效果。

值得提出的是, Neuhaus 将组成型表达的 类碱性几丁质酶基因导入烟草中, 虽然在转基因植株中几丁质酶含量比对照中高 120 倍, 但仍不能明显抑制烟草蛙眼病 (*C. nicotiana*) 的侵染<sup>[53]</sup>。这使我们认识到, 几丁质酶的种类多, 且在植物细胞中具有不同的定位, 这些都增加了此酶与真菌之间互作的复杂性。而且, 在植物与病原真菌互作过程中, 除几丁质酶外, 还有许多其它的酶的作用, 如葡聚糖酶、纤维素酶等等。因此, 利用这些酶与几丁质酶共同导入植物可望获得更强、更广谱的抗菌效果。

## 参 考 文 献

- 1 吴东儒. 糖类的生物化学, 北京: 高等教育出版社, 1987. 349 ~ 352
- 2 陈西广等. 几丁质的研究与进展. 生物工程进展, 1997, 17(3): 5 ~ 9
- 3 Boller J, Gehri A, Mauch F et al. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta*, 1983, 157: 22 ~ 31
- 4 Cohen-Kupiec R et al. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9: 270 ~ 277
- 5 陈三凤等. 几丁质酶研究历史和发展前景. 微生物学通报, 1993, 20(3): 156 ~ 160
- 6 Clarke PH, Tracey MV. The occurrence of chitinase in some bacteria. *J Gen Microbiol*, 1956, 14: 188

- 7 Reynolds DM. Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp. *J Gen Microbiol*, 1954, 11: 150 ~ 159
- 8 Berger LB, Reynolds DM. The chitinase system of a strain of *streptomyces griseus*. *Biochimica et Biophysica*, 1958, 29: 522 ~ 534
- 9 Robbins PW et al. Cloning and expression of a *streptomyces plicatus* chitinase (Chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1988, 263(1): 443 ~ 447
- 10 Jeuniaux C. Chitinase: an addition to the list of hydrolases in the digestive tract of vertebrates. *Nature*, 1961, 192: 135 ~ 136
- 11 Shinshi H, Neuhaus JM, Ryals J et al. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase gene can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol*, 1990, 14: 357 ~ 368
- 12 Leo SM, Marion AG, Jan AVK et al. A new class of tobacco chitinase homologous to bacterial exochitinases displays antifungal activity. *Plant Journal*, 1994, 5(4): 469 ~ 480
- 13 陈三凤等. 植物几丁质酶的结构、基因及其表达, 1998, 18(2): 33 ~ 36
- 14 Rasmussen U, Bojsen K, Collinge DB. Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 277 ~ 287
- 15 Jean MN, Maciej P, Thomas B. Mutation analysis of the C-terminal vacuolar targeting peptide of tobacco chitinase: low specificity of the sorting system, and gradual transition between intracellular retention and secretion into the extracellular space. *Plant Journal*, 1994, 5: 45 ~ 54
- 16 Shinshi H et al. Evidence for N- and C-terminal processing of a plant defense-related enzyme: primary structure of tobacco prepro- $\beta$ -1, 3-glucanase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988, 85: 5541 ~ 5545
- 17 Sela-Bunrlage M et al. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and  $\beta$ -1, 3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol*. 1993, 101: 857 ~ 863
- 18 Fraser RSS. Evidence for the occurrence of the "pathogenesis-related" proteins in leaves of healthy tobacco plant during flowering. *Physiological Plant Pathology*, 1981, 19: 69 ~ 76
- 19 Neale, AD et al. Chitinase,  $\beta$ -1, 3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell*, 1990, 2: 673 ~ 684
- 20 Hanfrey C et al. Leaf senescence in *Brassica napus*: Expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 597 ~ 609
- 21 Gomez Lim MA et al. Identification of chitinase mRNA in abscission zones from bean (*Phaseolus vulgaris* Red Kidney) during ethylene-induced abscission. *Plant Cell and Environment*, 1987, 10: 741 ~ 746
- 22 Mark Swegle et al. Properties of barley seed chitinases and release of embryo-associated isoforms during early stages of imbibition. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1009 ~ 1014
- 23 Spanu Pietro et al. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Plant*, 1989, 177: 447 ~ 455
- 24 Goormachtig S et al. Expression of cell cycle genes during *Sesbania rostrata* stem nodule development. *MPMI*, 1997, 10: 316 ~ 325
- 25 Goormachtig S et al. Srchi 13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class chitinases. *The Plant Cell*, 10: 905 ~ 915
- 26 Mauch F et al. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol*. 1984, 76: 607 ~ 611
- 27 Abeles F B et al. Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiol*. 1970, 47: 129 ~ 134

- 28 Shinshi H et al. Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol Biol*, 1995, 27: 923 ~ 932
- 29 Nasser W et al. Identification and characterization of maize pathogenesis-related protein. *Pl. Mol Biol*. 1988, 11: 529 ~ 538
- 30 Nasser W et al. Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of 1, 3- $\beta$ -glucanases and chitinases induced by bromemosaic virus infection or mercuric chloride treatment. *Physiol Mol Pl Path.* 1990, 36: 1 ~ 14
- 31 Metraux JP et al. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol Mol Pl Path.* 1988, 33: 1 ~ 9
- 32 Joosten M HAJ et al. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1, 3- $\beta$ -glucanases and chitinases. *Plant Physiol*, 1989, 89: 945 ~ 951
- 33 Mauch F et al. Antifungal hydrolases in pea tissue. *Pl Physiol*, 1988, 87: 325 ~ 333
- 34 Kombrink E et al. Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1, 3- $\beta$ -glucanases and chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 782 ~ 786
- 35 Kurosaki F et al. Chitinase isoenzyme induced in carrot cell culture by treatment with ethylene. *Phytochemistry*, 1989, 28: 2989 ~ 2992
- 36 Roby D et al. Induction of chitinases and of translatable mRNA for these enzymes in melon plants infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Pl Sci*, 1987a, 52: 175 ~ 185
- 37 Roby D et al. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987b, 143: 885 ~ 892
- 38 Margis-Pinheiro M et al. Isolation of a complementary DNA encoding the bean PR4 chitinase: an acidic enzyme with an amino-terminus cysteine-rich domain. *Pl Mol Biol*, 1991, 17: 243 ~ 253
- 39 Jung JL. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol (ROCKV)*, 1993, 101(3): 873 ~ 880
- 40 曾艳等. 几丁质酶与植物防卫反应. *生物工程进展*, 1997, 17: 31 ~ 34
- 41 Burnett JH. *Fundamentals of Mycology* (2nd ed) New York, 1976, 61
- 42 周与良等编. *真菌学*. 北京: 高等教育出版社, 1987. 28 ~ 31
- 43 Wubben JP et al. Subcellular localization of plant chitinases and 1, 3- $\beta$ -glucanase in *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*)-infected tomato leaves. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1992, 41(1): 23 ~ 32
- 44 Shinshi H et al. Regulation of a plant pathogenesis related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 89 ~ 93
- 45 Zhu Q et al. Isolation and characterization of a rice gene encoding a basic chitinase. *Mol Gen Genet*, 1991, 226: 289 ~ 296
- 46 Broglie KE et al. Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986, 83: 6820 ~ 6824
- 47 Samac DA et al. Isolation and characterization of the genes encoding basic and Acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Pl Physiol*. 1990, 93: 907 ~ 914
- 48 Shapira R et al. Control of plant diseases by chitinase expression from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathology*, 1989, 79: 1246 ~ 1249
- 49 Toyoda H et al. Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells. *Plant Cell Reporter*, 1991, 10: 217 ~ 220

- 6 Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cell by electroporation. Proc Natl Acad Sci U SA, 1985, 82: 5824 ~ 5828
- 7 梁建生. 生物弹技术在禾谷类植物基因转移中的应用. 细胞生物学杂志, 1992, 14(1): 13 ~ 15
- 8 Neuhaus G, Spangenberg G, Scheid OM et al. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryos. Theor Appl Genet, 1987, 75(1): 30 ~ 36
- 9 朱祯, 李向辉. 植物遗传工程研究进展. 生物工程进展, 1991, 11(5): 35 ~ 43
- 10 Weber G, Monajembashi S, Greulich KO et al. Uptake of DNA in chloroplasts of *Brassica napus* facilitated by a UV-laser microbeam. European J Cell Biology, 1989, 49: 73 ~ 79
- 11 王兰岚, 宋桂英. 利用激光微束将外源基因导入高等植物细胞的研究. 激光生物学, 1995, 5(1): 809 ~ 811
- 12 王兰岚, 傅荣昭. 利用激光微束穿刺法将外源基因导入小麦的研究. 遗传学报, 1995, 22(5): 394 ~ 399
- 13 Hess D. Investigation on the intra- and interspecific transfer of Anthocyanin genes using pollen as vectors. Z. Pflanzenphysiol. Bd, 1980, 98: 321 ~ 327
- 14 DeWet JM J. The experimental manipulation of ovules tissue. In: GR Chapman et al. ed. published by longman Inc NY, 1983, 197
- 15 Ohta Y. High efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 715 ~ 719
- 16 Gangyu Zhou et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. Methods in Enzymology, 1983, 101: 433 ~ 448
- 17 黄骏麒等. 外源海岛棉 DNA 导致陆地棉性状变异. 遗传学报, 1981, 8(1): 56
- 18 丁群星, 谢友菊等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究. 中国科学 B 辑, 1993, 23(7): 707 ~ 713
- 19 谢道昕等. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因植株. 中国科学 B 辑, 1991, 8: 830 ~ 834
- 20 Pena A, Lorz H, Schell J. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. Nature, 1987, 325: 274 ~ 276
- 21 巩振辉, Milner JJ. 拟南芥基因转移新方法—真空渗入法的研究. 西北植物学报, 1996, 16(3): 277 ~ 283
- 22 王蓓, 谈家祯. 低压脉冲电泳介导的水稻转基因植株再生. 中国科学 B 辑, 1995, 25(3): 295 ~ 301
- 23 王国英, 张宏. 几种玉米基因转移技术的研究及转基因植株的获得. 生物工程学报, 1996, 23(1): 45 ~ 49
- 24 田桂英. 向植物导入外源 DNA 方法的研究与发展. 生物工程进展, 1996, 2: 4 ~ 7

(上接 171 页)

- 50 Grison R et al. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. Nature Biotechnology, 1996, 14: 643 ~ 646
- 51 Marchant R et al. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarp on rosae* Wolf). Molecular Breeding, 1998, 4: 187 ~ 194
- 52 Zhu Q et al. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Biotechnology, 1994, 12: 807 ~ 812
- 53 Neuhaus JM et al. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. Pl. Mol Biol, 1991, 16: 141 ~ 151