

哈密瓜中几丁质酶基因的克隆及表达分析

水蓓蓓, 唐凤仙, 姜富耀, 单春会

(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要: 几丁质酶是一种重要的病程相关蛋白, 在植物抗病中发挥积极作用。为研究哈密瓜中几丁质酶对青霉菌感染的抗性作用, 本研究采用 RT-PCR 的方法, 克隆一段哈密瓜中几丁质酶基因的 cDNA, 并采用相对荧光定量法 (SYBR Green) 分析其表达量。克隆得到的几丁质酶基因片段 *HmCHI* 长 1153 bp, 最大开放阅读框为 445 个核苷酸, 编码 145 个氨基酸, 属于 18 家族 Class III 几丁质酶基因; 推测其所编码蛋白分子量为 15.04 ku, 理论等电点 8.82, 为疏水性蛋白; 预测其有一个信号肽, 为非跨膜蛋白, 定位于细胞间隙; *HmCHI* 氨基酸序列与黄瓜的亲缘关系最近。荧光定量分析显示, 实验组的表达高峰出现时间较晚, 维持高表达量的时间相对较长, 上调幅度明显大于对照组。研究结果表明 *HmCHI* 可能在哈密瓜果实真菌胁迫响应中发挥重要作用。

关键词: 哈密瓜; 几丁质酶; 克隆; 生物信息学; 表达量

文章编号: 1673-9078(2016)12-139-144

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.022

Cloning and Expression Analysis of Chitinase Gene in Hami Melon

SHUI Bei-bei, TANG Feng-xian, JIANG Fu-yao, SHAN Chun-hui

(College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: Chitinase, an important pathogenesis-related protein, plays an active role in disease resistance in plants. In order to explore the resistance of chitinase in Hami melon to *Penicillium*, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to clone the cDNA of chitinase, and relative fluorescence quantitative PCR (SYBR Green) was used to analyze its expression. A gene fragment of 1153 bp was cloned, and was denoted as *HmCHI*. The largest open reading frame in *HmCHI* was 445 nucleotides long, encoded 145 amino acids, and belonged to Class III of Family 18 chitinase genes. Using software prediction, the encoded protein was determined to be a hydrophobic non-transmembrane protein distributed within the intercellular space, with a molecular weight of 15.04 ku, isoelectric point of 8.82, and one signal peptide. The amino acid sequence of *HmCHI* had the closest similarity with *Cucumis sativus* (XP_004145916.1). Fluorescence quantitative analysis showed that the expression peak in the experimental group appeared later and was maintained for a longer time, and that the magnitude of upregulation was significantly higher than the control. These results indicated that *HmCHI* in the Hami melon plays an important role in fungal stress response.

Key words: Hami melon; chitinase; cloning; bioinformatics; expression

几丁质酶 (Chitinase, Ec.3.2.14) 是一种在植物、动物和昆虫中广泛存在的酶, 它能够水解几丁质多聚体中的 β -1,4 糖苷键, 产生 N-乙酰氨基葡萄糖寡聚体。虽然高等植物体内并不含有几丁质, 但很多植物都能产生几丁质酶, 几乎可在植物所有的器官中发现几丁质酶。研究表明, 植物中的一些几丁质酶是一种病程相关蛋白 (PR 蛋白)^[1], 当植物受到病原菌感染时, 往往分泌几丁质酶、 β -1,3 葡聚糖酶等抗微生物分子, 以破坏病原体完整性, 提高自身防御能力^[2]。川杨分别接种落叶松-杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina* Kleb., 简称 MLP) 的非亲和组合菌系 Sb052 和亲和组合菌系 Th053 后, 川杨几丁质酶基因 *PsChiI* 在两种组

收稿日期: 2015-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360412)

作者简介: 水蓓蓓 (1992-), 女, 硕士, 研究方向: 果蔬加工贮藏

通讯作者: 单春会 (1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

合中的各个时段都有表达, 呈先上升后下降的趋势, 在 48 hpi 表达量最高, 由此推测 *PsChiI* 参与了川杨抵抗病原菌的防御机制, 并且在侵染初期发挥抗菌作用^[3]。随着研究的深入, 一些来自植物的几丁质酶或其它 PR 蛋白结合, 在番茄、马铃薯、玉米、花生、芥末和棉花等作物中成功过表达, 从而获得具有抗病原真菌能力的作物^[4]。

也有一些几丁质酶与植物的过敏反应和生长发育有关, 例如 Leonardo M. Galindo González^[5]等研究云杉活动-休眠期间所调用的不同的几丁质酶, 发现休眠相关的几丁质酶, 除了参与病虫害、冷冻等逆境胁迫的防御, 储存氮, 还在植株停止生长之前促进细胞的成熟。Sánchez-Rodríguez C^[6]的研究表明, 几丁质酶样 (CTL) 蛋白影响纤维素的生物合成, 在纤维素微纤维和半纤维素之间相互作用的建立发挥重要的作用。

哈密瓜 (*Cucumis melo* var. *Saccharinus*) 是新疆

地区的主要经济作物之一,然而每年由于病菌侵染,机械损伤等导致贮藏期间的大量腐烂,其中青霉菌是导致哈密瓜采后腐烂的一种主要致病菌^[7]。在本研究中,通过克隆一种哈密瓜中的几丁质酶,研究其在不同时间的表达量,能够为哈密瓜在响应青霉菌胁迫的防御机制提供研究基础,也为哈密瓜的采后保鲜提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样品

青霉菌孢子悬浮液:实验所用青霉菌筛选自哈密瓜的表皮,经过纯化,培养,待其在培养基上长出大量孢子后,用无菌生理盐水配置 1×10^5 spores/mL 的青霉菌孢子悬浮液。

植物材料:新疆哈密瓜晚熟品种伽师瓜,8~9成熟,大小均匀,无病虫害,无机械损伤,表皮新鲜。使用打孔器在哈密瓜表面打直径1 cm,深约1 cm的孔,接入 $10 \mu\text{L}$ 浓度为 1×10^5 spores/mL 的青霉菌孢子悬浮液,用保鲜膜包裹,置于室温。分别于0、12、24、36、48、60和72 h在孔周围取约5 g组织,取样后迅速用液氮冷冻,于-80 °C超低温冰箱保存,用于不同时间点基因表达量的分析。对照组为接入 $10 \mu\text{L}$ 灭菌生理盐水,其余处理相同。

1.1.2 主要试剂及仪器

主要试剂:植物RNA抽提试剂盒74903、RNA-free water和2×Sybrgreen PCR mix均为QIAGEN公司;随机引物、RNA酶抑制剂、AMV均为Invitrogen公司;其他试剂为国产分析纯。

主要仪器:Tissue Ruptor匀浆器,QIAGEN公司;台式高速离心机PICO 17,NANODROP,Thermo公司;凝胶成像系统GIS-1600,上海天能科技有限公司;ABI ViiA7 Real Time PCR System, Applied Biosystems。

1.2 方法

1.2.1 几丁质酶基因的筛选

课题组前期通过Illumina HiSeq 2000高通量测序平台对青霉菌侵染前后哈密瓜转录组进行测序,构建转录组文库,并借助RNA-Seq技术,获取了不同侵染时间(0、48和60 h)的差异表达基因^[8]。本研究在前期的基础上对差异表达的几丁质酶基因进行筛选,共发现16个差异表达的几丁质酶基因(表1),结合几丁质酶基因在不同时间的表达量和不同时间表达量的

差异倍数,选择表达量较高、持续升高、且差异倍数大的几丁质酶基因,最终确定以基因编号为CL4824.Contig1_QHMG的几丁质酶基因来进行本研究。

1.2.2 总RNA提取

使用植物RNA抽提试剂盒74903,依据说明书指导,提取0、12、24、36、48、60和72 h的实验组和对照组的组织中的RNA。

1.2.3 逆转录合成cDNA

在1.5 mL离心管中按顺序加入下列反应物:(8-x) μL DEPC; 0.5 μL RNA酶抑制剂; 2 μL 随机引物; x μL RNA。然后在65 °C水浴处理5 min;室温放置10 min,高速离心5 s;后按下列顺序加在1.5 mL离心管加入下列反应物:0.5 μL RNA酶抑制剂; 4 μL 5×buffer; 2 μL dNTP MIX; 2 μL DTT; 1 μL AMV。水浴40 °C下反应1 h; 90 °C处理5~10 min;冰浴5 min;高速离心5 s。反应结束后将反应液置于-20 °C保存。

1.2.4 几丁质酶基因克隆

根据CL4824.Contig1_QHMG的序列,运用Primer Express Software v2.0设计引物:上游引物:GAAACAAACACAACAAAATCACAAAGG;下游引物:GGGAGGGTATATATTAATAAATATG。反应体系如下:H₂O 34.8 μL , 5×Buffer 10 μL , dNTP 1 μL ,上下游引物各1 μL , Template 2 μL , Taq 0.2 μL 。按如下程序进行PCR扩增:94 °C、3 min; 94 °C、30 s, 51 °C、40 s, 72 °C、45 s,循环39次; 72 °C、7 min。反应结束后将反应液于4 °C保存。将PCR产物经过凝胶电泳检测合格后进行克隆测序。

1.2.5 序列分析及编码蛋白质生物信息学分析

运用ORF Finder分析所得序列的开放阅读框,推测其氨基酸序列;运用ProtParam, ProtScale, Signal3.0 Server、TMHMM Serverv.2.0和ProtComp9.0分析蛋白质的理化性质,亲/疏水性,信号肽,跨膜结构域和蛋白质的亚细胞定位。将所得序列最大开放阅读框所编码氨基酸序列进行Blast分析,选取有相似性的序列,使用MAGE 5.0构建系统发育树。

1.2.6 基因表达分析

根据目标基因序列,使用Primer Express Software v2.0设计荧光定量PCR引物,引物由华大基因公司合成。上游引物:GAAGAAACAATGGCTGCCCA;下游引物:TTGTCCCAATAGATGGCGA。以甜瓜的GAPDH基因作为内参基因^[8],上下游引物分别为:GAPDH-F:CTTTCGGTGTTCCTACCGTT; GAPDH-R:CAGTGTACCCCAAATTCCTCC。以反转录后得到的cDNA为模板,使用染料法对目的基因进行实时荧光

定量检测。构建如下反应体系：H₂O 5 μL；2×SYBGEEN PCR mix 8 μL；上下游引物各 1 μL；反转录产物即 cDNA 1 μL，混匀。PCR 反应程序如下：95 °C 预变性 2 min，94 °C、10 s，60 °C、10 s，72 °C、40 s，40 个循环。反应于 ABI ViiA7 Real Time PCR 仪中进行，反应结束后分析目的基因与内参基因的扩增曲线和溶解曲线。不同时间点的样品设置两个生物学重复，每个生物学样品进行三次技术重复。

数据采用相对定量方法进行分析，计算公式为相对表达量=2^{-ΔΔCt}[9]，并用 SPSS 17.0 软件对数据进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 RT-PCR 产物分析

RT-PCR 的产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测，在约 1200 bp 处有明显条带，与预期结果相符（图 1），可进行下一步实验。



图 1 扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR products

```

1  TGGAAACAACAACAAAATCACAAGGAGAAAGAGAAAGAAAAGCTCACTAGAAGAAAAC
63  ATGGCTGCCCAAAAATCACAACCCATCCATCATCTCTCTCTCTGCTGCTCCA
1  M A A Q K I I T T L S I I S F L L A S
121 TATTCGGATCTCCGATGCTGCCGATCGCCATCTATTGGGACAAAACGGCAACGAGG
20  I F R S S D A A G I A I Y W G Q N G N E
181 GCTCTCTGCTCCACTTGGCTACTGGAACCTACCAGATCGTCAACATAGCATTTCTTT
40  G S L A S T C A T G N Y Q I V N I A F L
241 CCTCTCGGTAGCGGCGAACTCCGCTCAACCTCGGGGTCATTGTAACCTAATA
60  S S F G S G R T P V L N L A G H C N P N
301 ACAACAATGGTTGACTCTTGTAGTAGCCAAATCAAATCTTGCCAAAGTCGAGGCATCA
80  N N N G C T F L S S Q I K S C Q S R G I
361 AAGTCCTTCTCCTATTGGCGGAGGCGTGGGAGTTATCACTCTCTCCGCAATGATG
100  K V L L S I G G G A G S Y S L S S A N D
421 AAGACAAGTTGTAATCACATCTGGAACAACCTACCTCGGTGTCAGTCGAACTCACGACC
120  E D K L L I T S G T T T S V V S R T H D
481 GCTCGGCAACGCTGTTTGAACGGTGTGATTTTGATATCGAAGCTGGCTCTGGCCAGTT
140  R S A T L F *
541 TTGGGATGATATTGGCTCGAGAAGCTGAAGAACAAGCGGAGTCACTCTTTCTGCCGCACC
601 CCAAGTCCGATCCCGACCGCACTTAGACGCTGCCATTAAGACAGGTTGTTGATTT
661 CGTTTGGGTTCAATCTACAACAATCCGCTGATGATGCAAAATGGAAACGTCACAC
721 TCTCTGAATCTTGGAAACCGGTGGACGGGTTCCGGTTGGGAAGCTGACATGGGACT
781 ACCGGCGCATCTGCAGCTGCACCGAGCGGGGTTTATCCGGCAACGTCCTAACT
841 TCAGGTTCTTCCAAGGATTAAGAAATCTGCGCAAGTATGGAGGAATATGCTGTGGAGTAA
901 GGCATTTGATAATGGCTACAGTAACGCCATTAAGGAAGCTTTGAGCTTCTCTCTTGA
961 TCATCAATAAACTTATTAGCCATGAATAAGTAAATATAAAGAAATGGAAAGAAAATGG
1021 GATTGTGGCCTATTTATATATATATCATCACTATGATGCAATAAAATCACTTTTTA
1081 TTATAGTAACTTTTCATGCAAAACATATACAATCATACATGAAAACATATTTTTTAA
1141 TATATACCTCC
    
```

图 2 *HmCHI* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence and inferred amino acid sequence of *HmCHI*

注：划线部分为最大 ORF 序列；ATG 为起始密码子，TGA 为终止密码子。

2.2 哈密瓜几丁质酶基因序列分析

将测序所得序列进行拼接，最终获得一段长度为 1153 bp 的基因片段，此段序列的最大开放阅读框为 438 bp，编码 145 个氨基酸（图 2），使用 Blast 对其氨基酸保守序列（CDs）进行分析，结果表明所得到的序列为 18 家族 Class III 几丁质酶，将其命名为 *HmCHI*。

2.3 哈密瓜几丁质酶基因 *HmCHI* 编码蛋白结构分析

构分析

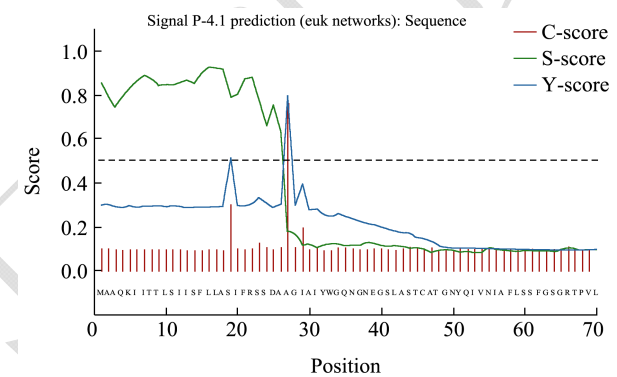


图 3 哈密瓜 *HmCHI* 编码蛋白的信号肽预测

Fig.3 Prediction of signal peptide in *HmCHI* protein

用 ProtParam 软件对 *HmCHI* 编码蛋白的理化性质进行预测。推测该蛋白分子量为 15.04 ku，理论等电点 8.82；不稳定系数为 28.38，为稳定蛋白；总平均亲水性为 0.155，为疏水蛋白。信号肽预测结果表明，此蛋白中有一个信号肽，成熟位点在 26 到 27 之间的 A 与 A 之间（图 3）。即前 26 个氨基酸为几丁质酶的 N-端信号区，与之相连的为催化区，缺少几丁质结合域（CBD），符合 Class III 类几丁质酶的结构特征。跨膜结构预测表明，整条肽链位于细胞膜外，为非跨膜蛋白。利用 ProtComp9.0 对蛋白质的亚细胞定位进行预测，*HmCHI* 编码蛋白是一种分泌蛋白，定位于细胞间隙。这与黄瓜中叶片中的 Class III 几丁质酶定位相似^[10]，即 *HmCHI* 为胞外几丁质酶。

2.4 系统进化分析

运用 Blast 中的 protein blast 对 *HmCHI* 编码蛋白的氨基酸序列进行比对，发现其与甜瓜（*Cucumis melo*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）、栝楼（*Trichosanthes kirilowii*）、西瓜（*Citrullus lanatus*）、笋瓜（*Cucurbita maxima*）、南瓜（*Cucurbita moschata*）、苜蓿（*Medicago*

truncatula) 和大豆 (*Glycine max*) 等物种的序列相似性分别为 98%、93%、85%、85%、80%、74%、68% 和 64%。根据氨基酸序列, 使用 MEGA 5.1 建立系统发育树 (图 9), 可知 *HmCHI* 氨基酸序列与黄瓜的亲缘关系最近, 与胡杨及马铃薯等亲缘关系较远。

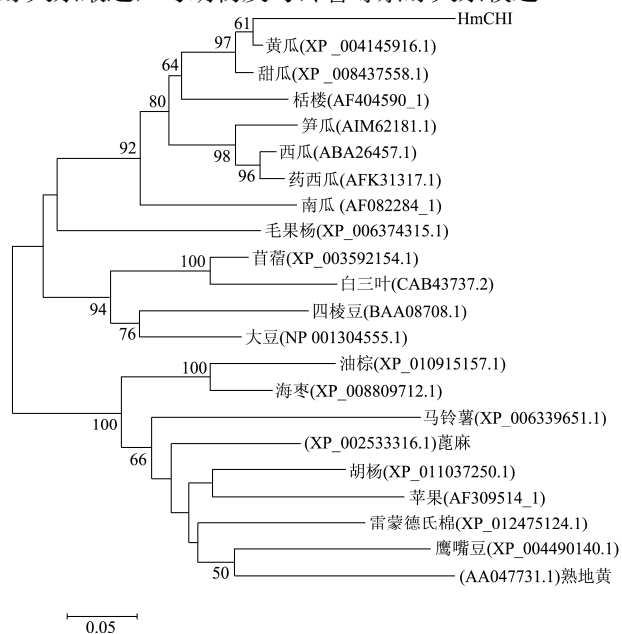


图4 哈密瓜 *HmCHI* 编码氨基酸及其他物种几丁质酶系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of *HmCHI* of Hami melon and chitinase of other species

2.5 哈密瓜几丁质酶基因 *HmCHI* 的表达量分析

HmCHI 与管家基因 *GAPDH* 的扩增曲线拐点清楚, 指数期明显, 整体平行性较好, 各管扩增效率相近; 熔解曲线都只存在一个峰, 表明荧光定量 PCR 产物单一, 引物特异性强。

几丁质酶参与植物的自身防御, 往往在植物受到胁迫时迅速反应, 与其它酶共同作用, 构成第一道防线。通过 Real-Time PCR 技术, 对哈密瓜中几丁质酶基因 *HmCHI* 在受到青霉菌侵染后的表达进行了初步研究。结果表明, 在前 24 h 对照组 (不接菌) 的表达量持续上调, 在 24 h 时转录水平最高, 约为 0 h 的 153 倍, 而实验组的表达量虽呈现上升趋势, 幅度却小于对照组。可能此时实验组处于信号识别时期, 对于侵染的响应较弱。之后, 对照组的表达量持续下降, 在 60 h 达最低, 约为 0 h 的 10 倍, 在 72 h 表达量有回升; 而实验组的相对表达量大大幅度持续上升, 60 h 时达到峰值, 约为 0 h 的 282 倍, 之后急剧下降。相较对照组, 实验组的表达高峰出现时间较晚, 维持高表达量的时间较长, 上调幅度明显较大 (图 5)。由此推断,

几丁质酶在哈密瓜应对青霉菌的侵染时发挥积极作用, 是一种反应迅速有效的酶。Collinge 等^[11]研究表明, 胞外几丁质酶在侵染早期发挥着重要作用, 它们产生并释放激发子, 参与感染信号的传达, *HmCHI* 的表达结果符合此说法。

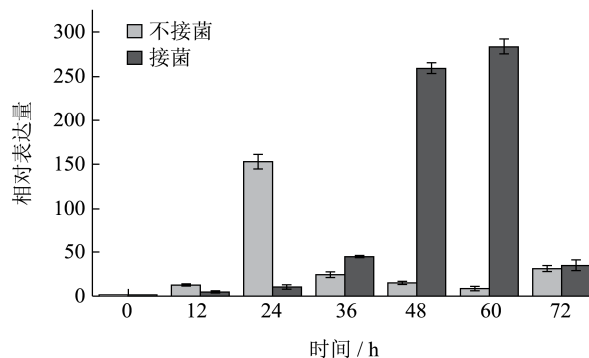


图5 哈密瓜 *HmCHI* 基因在不同时间点表达量

Fig.5 The relative expression of *HmCHI* at different time points

几丁质酶包括糖基水解酶 18 和 19 两个家族, 18 家族几丁质酶广泛分布于自然界中, 包括细菌、真菌、病毒、昆虫、动物及植物, 19 家族几丁质酶主要存在于植物中。根据其氨基酸序列同源性, 三维结构, 以及催化反应的水解机制, 植物几丁质酶被进一步分为 Class I~Class VI 六类。植物几丁质酶的 Class III 和 Class V 属于 18 家族, 其余的都属于 19 家族^[12]。不同类型的几丁质酶在不同的植物体内发挥的作用也不同。

研究表明 Class III 在植物中的作用主要有促进生长发育, 应对环境胁迫, 参与固氮, 贮存蛋白, 以及抵抗病原真菌, 获得系统抗性^[13]。如在黄瓜中, 编码 Class III 几丁质酶基因的表达量在植物的生长过程中逐渐增加, 基因转录积累水平从根部 (最老的部分) 到顶部 (最年轻的部分) 呈下降趋势^[14]。后来也有研究表明 Class III 几丁质酶能够响应环境胁迫, 如在正常生长条件下, Class I 和 IV 在拟南芥的大多数器官中都有表达, 然而当受到环境胁迫时, 尤其是盐和伤口胁迫, 则只有 Class III 几丁质基因表达。在本研究中, *HmCHI* 的表达量受青霉菌诱导, 说明哈密瓜中 Class III 几丁质酶也具有抗真菌能力, 在哈密瓜应对青霉菌的侵染中起积极的调控作用。未来可通过基因工程的手段调控 *HmCHI* 的表达, 以提高哈密瓜的抗病性, 延长采后贮存期。

3 结论

本研究获得一段 1153 bp 的哈密瓜几丁质酶基因 *HmCHI*, 通过生物信息学分析判断 *HmCHI* 为 18 家族 Class III 几丁质酶基因, 预测其编码蛋白的理化性质和结构特征, 为后期对此蛋白的研究提供基础。利用实

时荧光定量 PCR 对哈密瓜在受到青霉菌侵染后 *HmCHI* 的表达量进行检测, 侵染后期实验组的基因表达量上调幅度远大于对照组, 60 h 的相对表达量最大,

72 h 急剧下降, 说明它在哈密瓜自身对病原菌的防御前期发挥重要作用。研究结果为进一步调控基因表达量, 增强哈密瓜果实的抗病能力提供一定理论基础。

表 1 哈密瓜差异表达几丁质酶基因

Table 1 Differentially expressed genes of chitinase in Hami melon

GeneID	0 h-RPKM	48 h-RPKM	log2Ratio (0 h-VS-48 h)
Unigene8343_QHMG	-	76.15	12.89
Unigene8344_QHMG	-	148.62	13.86
Unigene22455_QHMG	-	5.71	9.16
CL4824.Contig1_QHMG	4.39	826.96	7.56
CL2231.Contig2_QHMG	107.54	14493.83	7.07
CL2231.Contig1_QHMG	2.45	324.35	7.05
CL4824.Contig2_QHMG	0.83	73.74	6.47
Unigene17882_QHMG	2.61	34.10	3.71
Unigene17906_QHMG	3.29	34.60	3.39
Unigene13259_QHMG	302.10	1266.18	2.07
Unigene19961_QHMG	17.67	5.10	-1.79
Unigene29851_QHMG	7.47	1.47	-2.34
Unigene16405_QHMG	8.92	1.45	-2.62
Unigene18657_QHMG	26.43	3.82	-2.79
CL726.Contig4_QHMG	6.28	0.75	-3.06
Unigene19548_QHMG	59.74	3.25	-4.20

GeneID	60-RPKM	log2Ratio(0 h-VS-60 h)	Blast nr
Unigene8343_QHMG	76.15	13.55	gi 312191345 gb ADQ43720.1 /1.0686e-07/class I chitinase [Casuarina equisetifolia]
Unigene8344_QHMG	148.62	14.81	gi 449508755 ref XP_004163402.1 /5.07591e-58/PREDICTED: endochitinase-like [Cucumis sativus]
Unigene22455_QHMG	1.49	7.22	gi 8272386 dbj BAA96445.1 /3.42173e-29/endo-chitinase class III [Pyrus pyrifolia]
CL4824.Contig1_QHMG	1607.41	8.52	gi 449456357 ref XP_004145916.1 /9.6435e-161/PREDICTED: acidic endochitinase-like [Cucumis sativus]
CL2231.Contig2_QHMG	25398.46	7.88	gi 23496435 dbj BAB40817.2 /0/endochitinase MCHT-2 [Cucumis melo]
CL2231.Contig1_QHMG	608.04	7.96	gi 449508755 ref XP_004163402.1 /6.25909e-69/PREDICTED: endochitinase-like [Cucumis sativus]
CL4824.Contig2_QHMG	95.46	6.84	gi 7595839 gb AAF64474.1 AF241266_1/4.9124e-169/chitinase 1 [Cucumis melo]
Unigene17882_QHMG	46.15	4.14	gi 449454971 ref XP_004145227.1 /2.50706e-159/PREDICTED: endochitinase PR4-like [Cucumis sativus]
Unigene17906_QHMG	33.09	3.33	gi 449457929 ref XP_004146700.1 /0/PREDICTED: acidic mammalian chitinase-like [Cucumis sativus]
Unigene13259_QHMG	1799.97	2.57	gi 5919201 gb AAD56239.1 AF184884_1/5.78869e-163/class III chitinase [Benincasa hispida]

转下页

接上页

Unigene19961_QHMG	4.65	-1.93	gi 449433057 ref XP_004134314.1 /2.15232e-175/PREDICTED: acidic endochitinase-like [Cucumis sativus]
Unigene29851_QHMG	2.65	-1.50	gi 449503856 ref XP_004162209.1 /1.45418e-73/PREDICTED: chitinase-like protein 2-like [Cucumis sativus]
Unigene16405_QHMG	0.58	-3.95	gi 13548699 dbj BAB40818.1 /1.07288e-94/endochitinase MCHT-3 [Cucumis melo]
Unigene18657_QHMG	3.60	-2.87	gi 449503856 ref XP_004162209.1 /1.99192e-103/PREDICTED: chitinase-like protein 2-like [Cucumis sativus]
CL726.Contig4_QHMG	0.21	-4.94	gi 13548699 dbj BAB40818.1 /3.08819e-94/endochitinase MCHT-3 [Cucumis melo]
Unigene19548_QHMG	0.65	-6.52	gi 449456861 ref XP_004146167.1 /4.86281e-65/PREDICTED: basic endochitinase-like [Cucumis sativus]

参考文献

- [1] Delaunoy B, Colby T, Belloy N, et al. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 24-38
- [2] Delaunoy B, Jeandet P, Clément C, et al. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies [J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 1-28
- [3] 王琼,川杨几丁质酶基因 PsChi I 全长克隆及表达分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013
WANG Qiong. Cloning and expression analysis of pschii gene from populus szechuanica [D]. Yangling: North West Agriculture and Forestry University, 2013
- [4] Cletus J, Balasubramanian V, Vashisht D, et al. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance [J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(11): 1719-1732
- [5] Leonardo M, Galindo González, Walid El Kayal, et al. Diverse chitinases are invoked during the activity-dormancy transition in spruce [J]. Tree Genetics & Genomes, 2015, 11(3)
- [6] Sánchez-Rodríguez C. Chitinase-like1/pom-pom1 and its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. [J]. Plant Cell, 2012, 24(2): 589-607
- [7] 柳涛,童军茂,马伟荣,等.哈密瓜采后冷藏中主要病原菌的分离鉴定[J].现代食品科技,2013,(29)8:2030-2034
LIU Tao, TONG Jun-mao, MA Wei-rong, et al. Separation and identification of main pathogen in Hami melon during cold storage [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 2030-2034
- [8] 单春会.哈密瓜响应青霉菌侵染的转录组和蛋白组研究及相关抗性酶变化分析[D].无锡:江南大学,2015
SHAN Chun-hui. Transcriptomics and proteomics of hami melon responding to *Penicillium* infection and change analysis of resistance-related enzymes [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408
- [10] Flach J, Pilet P E, Jolles P. What's new in chitinase research? [J]. Experientia, 1992, 48(8): 701-716
- [11] Collinge D B, Kragh K M, Mikkelsen J D, et al. Plant chitinases [J]. The Plant Journal, 1993, 3(1): 31-40
- [12] Arakane Y, Muthukrishnan S. Insect chitinase and chitinase-like proteins [J]. Cellular & Molecular Life Sciences Cmls, 2010, 67(2): 201-216
- [13] Kasprzewska A. Plant chitinases--regulation and function [J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2003, 8(3): 809-24
- [14] Lawton K A, Beck J, Potter S, et al. Regulation of cucumber class III chitinase gene expression [J]. Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI, 1994, 7(1): 48-57