

原核表达的天花粉蛋白和另外两种蛋白具有体外抗真菌活性*

胡 苹¹ 安成才^{1,2**} 李 毅^{1,2} 陈章良^{1,2}

(¹ 北京大学生命科学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

(² De Montfort University, the Gateway Leicester, LE1 9BH, UK)

提 要 将天花粉蛋白、烟草几丁质酶和烟草 β -1,3-葡聚糖酶的结构基因分别克隆到原核表达系统中进行表达,对三种基因的原核表达产物的粗提取物分别进行体外抗菌活性检测,发现三种蛋白质均有抗真菌活性。三种蛋白中任意两种蛋白的组合,其抗真菌活性显著高于单一组分的抗真菌活性。三种蛋白共同作用时,获得了更好的抗真菌效果。

关键词 天花粉蛋白,烟草几丁质酶,烟草 β -1,3-葡聚糖酶,真菌病害

分类号 Q939.1 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0234-40

长期以来,真菌病害的防治一直是人们所十分关注的问题。真菌病害是植物病害中最严重的一类,几乎所有的高等植物都受到不同程度的危害。主要农作物如水稻、小麦等都受到真菌病害的严重危害,仅小麦真菌病一项每年就给欧洲农业带来近一亿美元的经济损失^[1]。由于真菌的高变异性,使得传统育种方法的应用受到了很大的限制。因此,寻找具有广谱抗真菌活性的蛋白质,利用基因工程的方法培育抗病品种成为近年来农业生物技术研究的一个热点。

天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)是中药天花粉的有效成分。天花粉来源于多年生宿根草质藤本植物栝楼(*Trichosanthes kirilowii* Maxim)的块根。《本草纲目》中就有天花粉入药的记载。对于天花粉蛋白的系统研究则始于本世纪 60 年代之后,研究表明天花粉蛋白是 26kD 的单链碱性蛋白,属于 I 型核糖体灭活蛋白(Ribosome-inactivating Protein, RIP),能专一地水解 28S RNA 中 4324 位的腺苷酸,抑制蛋白质的合成^[2]。最新的研究表明,核糖体灭活蛋白能够特异性地使外源微生物如细菌、真菌等的核糖体失活^[3]。目前已经发现,天花粉蛋白在培养细胞系中对乙型肝炎、柯萨奇 B2、麻疹、乙型肝炎及 HIV 病毒的复制均有一定的抑制作用^[4]。本实验的结果则证明天花粉蛋白在体外对真菌的生长也具有一定的抑制作用。

几丁质酶(Chitinase, EC3.2.1.14)可以催化真菌细胞壁的主要成分——几丁质的 β -1,4-糖苷键的水解, β -1,3-葡聚糖酶(Glucanase, EC3.2.1.39)则可以催化真菌细胞壁中所含的糖类物质中的 β -D-糖苷键的水解。它们都属于植物抵御病原微生物侵害的病原相关蛋白,具有抗真菌活性^[5,6]。目前已从近 20 种高等植物中分离到了五类植物几丁质酶和三类 β -1,3-葡聚糖酶^[7,8],其中多数具有一定的体外抗真菌活性^[8,10],特别是当几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶共同作用时,抗真菌效果更好^[11]。同时 Leah 等人报道^[11],一种从大豆

* 本研究由国家科委医药创新博士项目资助

** 通讯作者

收稿日期:1997-11-21,修回日期:1998-05-14

中提取到的核糖体灭活蛋白——大豆胚乳核糖体灭活蛋白与大豆Ⅱ类几丁质酶或大豆Ⅱ类葡聚糖酶共同作用,抗真菌活性有一定提高。

本文报道对在大肠杆菌中表达的天花粉蛋白、烟草几丁质酶和烟草 β -1,3-葡聚糖酶的抗真菌活性进行检测的结果,为它们在基因工程中的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

采用 *E. coli* 为宿主细胞。*E. coli* 及所用真菌菌株均由本室保存。带有天花粉蛋白基因的质粒 pTCS15 由本室构建并保存。

1.2 酶及试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、显色底物 NBT、BCIP 购自 Promega 公司。Taq 酶, IPTG 购自华美公司。逆转录酶购自 Boehringer 公司,几丁质、昆布多糖购自 Sigma 公司。其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 计算机软件

数据处理所用 Microsoft Excel 6.0 软件为 Microsoft 公司产品。

1.4 基因的克隆

利用逆转录 PCR 法从烟草 (*Nicotina tabacum*, 品种为红花大金元) 中克隆到几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因。PCR 条件为:94℃ 1min, 56℃ 1.5min, 72℃ 2min, 共 35 个循环。

1.5 原核表达质粒的构建

烟草几丁质酶基因和烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因分别插入原核表达载体 pTTQ18 的 BamHI/HindⅢ位点,天花粉蛋白基因插入 pTTQ18 的 HindⅢ/EcoRI 位点。质粒 DNA 的提取、纯化、酶切及连接等操作参见文献[12]。

1.6 原核表达产物的粗提取

将构建好的原核表达质粒分别转入 *E. coli*, 于 37℃ 下在 LB 培养基中培养 6h 后,加入 0.1mg/mL 的 IPTG 于 37℃ 诱导 8 h, 提取总蛋白。4℃ 下, 6000g 离心 10 min, 收集菌体, 用 STE 充分洗涤菌体后, 将菌体重悬于 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5) 中。用超声波破碎仪充分破碎细菌, 于 4℃ 下, 8000g 离心 10 min, 在上清液中加入 65% 的饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4℃ 沉淀过夜。于 4℃ 下, 12000r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5) 重悬。悬浮液对 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5) 透析除盐后, 供活性检测之用。

1.7 天花粉蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western 检测

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳采用不连续垂直板状电泳, Tris-Cly 缓冲系统, 分离胶浓度为 10%。粗提取的天花粉蛋白 30 μ L 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜在 10% BSA 溶液中封闭 2 h, 转移至含有 1% TCS 多克隆抗体的 TBST 溶液中, 室温结合 2 h, 再转移至含有 0.1% 羊抗兔 IgG 的 TBST 溶液中, 室温结合 1 h。膜在 TBST 中漂洗后转移至 10 mL 碱性磷酸酶缓冲液中, 加入 60 μ L BCIP 和 33 μ L NBT, 室温避光显色, 待条带清晰后用大量水漂洗以终止反应。

1.8 烟草几丁质酶分解底物活性检测

参照 Walden K. 等人的方法^[13]纯化几丁质。将购得的粗制几丁质 28g 溶于 750mL 浓盐酸中, 4℃ 提取 24 h, 于 4℃ 下, 5000 g 离心 10 min, 向上清液中加入等体积 0℃ 预冷的无水乙醇, 0℃ 沉淀 2 h, 4℃ 下 8000g 离心 20 min, 弃上清。沉淀依次用 0.5mol/L Tris-HCl (pH8.0)、H₂O、70% 乙醇反复漂洗至洗涤液为中性时停止。沉淀冻干后保存于 -70℃。

取纯化的几丁质 10g 研磨成粉末, 加入到 500mL 蒸馏水中, 加入 1.5% 的琼脂, 121℃ 灭菌后, 倒入已灭菌的平皿中, 待凝固后在其上均匀打孔。向每孔中分别加入 30μL、60μL 和 90μL 几丁质酶粗提取物, 37℃ 温育 10 h。

1.9 烟草 β-1, 3-葡聚糖酶的活性检测

取烟草 β-1, 3-葡聚糖酶的底物昆布多糖 10g 研磨成粉末, 加入 500mL 蒸馏水中, 加入 1.5% 的琼脂, 121℃ 灭菌后, 倒入已灭菌的平皿中, 待凝固后在其上均匀打孔。向每孔中分别加入 30μL、60μL 和 90μL β-1, 3-葡聚糖酶粗提取物, 37℃ 温育 10 h。

1.10 抗真菌活性测定

采用菌丝生长抑制法^[14], 以抑菌圈半径的大小表示样品的抗真菌活性。真菌接种于 PDA (马铃薯 500 g 切成小块, 煮 30 min, 纱布过滤, 向上清液中加入 30 g 蔗糖, 定容至 1 L, 加入 15 g 琼脂, 灭菌后使用。)平板的中央, 28℃ 暗培养 72 h 后, 取出平板, 围绕菌落, 在距菌落外缘约 2cm 处均匀地打孔, 每一孔中加入不同量或不同组合的蛋白质, 28℃ 暗培养 12 h 后, 测量抑菌圈的半径。所得数据经 Microsoft Excel 6.0 软件处理后作图。抑菌效率的计算如下: 抑菌效率 % = (未经处理的菌落圆心至边缘之距离 - 目的蛋白处理后菌落圆心至边缘之距离) / 未经处理的菌落圆心至边缘之距离 × 100%。

2 实验结果

2.1 基因的克隆

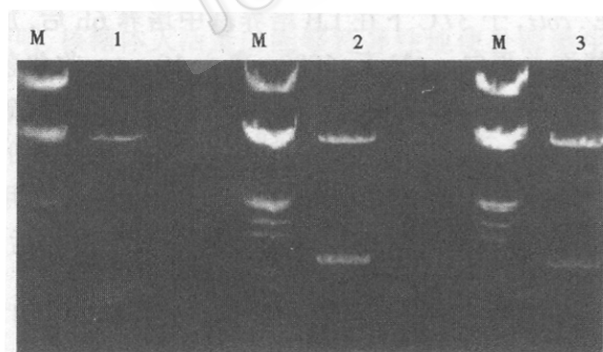


图 1 三种表达质粒的酶切鉴定结果

Fig. 1 Results of enzyme digestion of three kinds of prokaryotic expression plasmids

M. λDNA/Hind III/EcoRI marker; 1. pETCS/Hind III/EcoRI; 2. pECH/BamHI/Hind III; 3. pEGL/BamHI/Hind III.

得到重组质粒 pECH 和 pEGL。BamHI/Hind III 和 EcoRI/Hind III 酶切鉴定结果 (图 1) 表

序列分析结果表明克隆的几丁质酶基因与编码烟草第一类几丁质酶成熟肽的 DNA 序列^[15]的同源性为 97%; 克隆到的 β-1, 3-葡聚糖酶基因与烟草第一类 β-1, 3-葡聚糖酶成熟肽基因^[16]的同源性为 96%。

2.2 原核表达质粒的构建

将天花粉蛋白基因 (tcs) 插入原核表达载体 pTTQ18 的 EcoRI/Hind III 位点之间, 得到重组质粒 pETCS; 烟草几丁质酶基因 (chi) 和烟草 β-1, 3-葡聚糖酶基因 (glu) 分别插入原核表达载体 pTTQ18 的 BamHI/Hind III 位点之间,

明,我们得到了含有天花粉蛋白基因,烟草几丁质酶基因和烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因的原核表达重组质粒。

2.3 原核表达产物的检测

2.3.2 天花粉蛋白粗提物的检测:通过 Western 杂交检测天花粉蛋白粗提物的活性,杂交结果如图 2 所示。得到的原核表达产物有特异性的杂交条带出现,其大小与提纯的栝楼天花粉蛋白的大小相同,说明在蛋白粗提物溶液中确实含有天花粉蛋白。

2.3.2 烟草几丁质酶和烟草 β -1,3-葡聚糖酶的活性检测:烟草几丁质酶蛋白粗提物分解底物的活性检测结果如图版 I -A 所示。当加入的蛋白粗提物具有几丁质酶活性时,它可以分解几丁质平板中的几丁质颗粒,从而在蛋白加样孔周围形成透明圈;而没有酶活性的蛋白加样孔周围则没有透明圈出现。同样,当加入的蛋白粗提物具有 β -1,3-葡聚糖酶活性时,它可以分解昆布多糖平板中的昆布多糖颗粒,形成透明圈(图版 I -B)。从图 I -A, B 中可见两种酶作用后都形成了透明圈,并随着酶浓度的提高而加大。说明我们得到了具有生物活性的烟草几丁质酶和烟草 β -1,3-葡聚糖酶。

2.4 三种蛋白的抗真菌活性测定

2.4.1 单一成分蛋白的抗真菌活性:图版 I - C、D、E 为三种蛋白分别作用于小麦赤霉病菌时的抑菌结果,可以看到 pTTQ18 空载体蛋白粗提物和 Tris - HCl(pH7.5)溶液加样孔周围的真菌都能正常生长,而加入天花粉蛋白、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶蛋白粗提物的加样孔周围的真菌的生长受到了不同程度的抑制,形成了较显著的抑菌圈。蛋白的抑菌能力越强,形成的抑

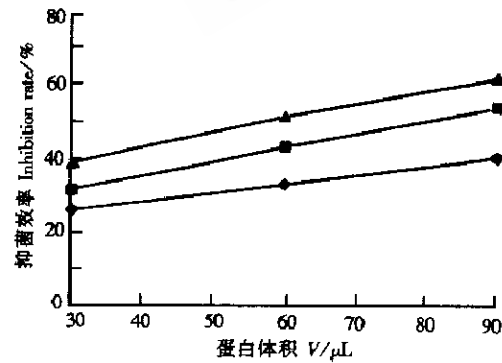


图 3 三种蛋白对小麦赤霉病菌生长的抑制效率与其加入量的关系
Fig.3 Effects of different amount of proteins on growth inhibiting rate against *Gibberella saubimeti*
1. TCS; 2. β -1,3-Glucanase; 3. Chitinase.



图 2 天花粉蛋白粗提物的 Western 杂交结果
Fig.2 Result of Western Blot for TCS
Lane 1. Purified TCS extracted from *Trichosanthes kirilowii* Maxim; Lane 2. Prokaryotic expressed TCS; Lane 3. Prokaryotic expressed pTTQ18 vector.

菌圈半径就越大。图 3 显示了加入不同量蛋白质对小麦赤霉病菌的抑菌效率。可见随着蛋白质浓度的增加,抑菌效率也相应提高。对于其他八种真菌的检测情况与对小麦赤霉病菌的检测情况类似,三种蛋白对我们所检测的九种真菌均有明显的抑制作用。其中又以几丁质酶的抑菌活性为最强, β -1,3-葡聚糖酶的抑菌活性次之,天花粉蛋白的抑菌活性又次之(表 1)。

2.4.2 多种组分蛋白组合的抗真菌活性:图版 I -F 显示了两种蛋白组合及三种蛋白组合作用于小麦赤霉病菌时的结果,可见加入 pTTQ18 空载体蛋白粗提物和 Tris-HCl 溶液的加样孔周围的真菌仍能正常生长,而加入多种组分蛋白组合的抑菌能力较单一成分蛋白的抑菌能力有

较大的提高。同样,当多种组分蛋白共同作用于其他八种真菌时,其抑菌活性都得到了显著的提高,特别是三种蛋白同时作用时,抑菌活性最强,最高者抑菌效率达到了 80% 左右,不同蛋白组合对九种真菌的抑制效率比较见表 1。经统计学计算,不同蛋白质组合与三种蛋白单独作用的抗真菌活性存在显著差异(该计算数据未列于本文中)。可见,不同蛋白质组合抗真菌活性的提高并非仅由于蛋白质质量的增加。由此可得出如下结论:几丁质酶与葡聚糖酶,几丁质酶与天花粉蛋白,葡聚糖酶与天花粉蛋白联合作用时,抗真菌活性均有显著提高。三种蛋白同时作用可得到更强的抗真菌活性。而且,三种蛋白质均表现出广普抗真菌活性。

表 1 三种蛋白及其不同组合对于九种真菌的抑菌效率

Table 1 The inhibition rate of three kinds of proteins and different combinations of them against growth of nine types of fungi

真菌种类 Fungus Species	抑菌效率 Inhibition Rate/ %						
	T	G	C	T+G	T+C	C+G	T+C+G
小麦赤霉病菌 <i>Gibberella saubimeti</i>	33.6±2.8	43.4±1.1	51.3±1.6	56.8±0.2	63.7±3.3	68.4±2.3	78.4±2.8
玉米大斑病菌 <i>Helminthosporium triticum</i>	24.3±3.0	26.1±1.7	30.2±2.7	37.3±2.5	40.6±2.3	40.1±3.1	50.1±2.9
瓜果霜霉菌 <i>Pythialn aphidemalum</i>	40.9±9.1	49.7±6.7	48.1±11.3	66.8±3.9	71.2±2.9	71.8±1.8	82.6±5.7
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	24.9±5.5	28.3±5.1	47.7±1.6	58.6±2.3	61.7±2.3	63.3±3.4	70.6±1.5
绿色木霉 <i>Frichoderma vivide</i>	32.9±2.6	44.1±5.3	49.2±2.8	58.0±2.1	60.7±0.6	62.9±1.3	69.6±2.4
烟草赤星病菌 <i>Altermaria longipes</i>	16.5±4.8	24.1±6.3	29.3±5.6	43.3±2.0	52.7±2.8	51.5±1.5	61.3±2.3
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporumf rasiinfectum</i>	22.4±4.3	33.9±1.4	48.0±4.4	61.6±4.6	66.4±2.1	64.7±3.9	74.3±3.2
稻瘟病菌 <i>Piricularia oryzae</i>	19.7±0.9	24.7±1.1	28.8±2.2	53.8±5.1	55.9±4.3	59.1±5.4	66.7±4.3
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporumf tyxopersici</i>	31.6±9.8	29.8±1.6	40.9±9.5	65.1±3.6	68.9±4.8	68.4±1.4	79.1±2.5

T:Adding 90μL TCS extraction; G: Adding 90μL β-1, 3-Glucanase extraction; C: Adding 90μL Chitinase extraction; T+ C: Adding 45μL Chitinase and TCS extractions respectively; T+ G: Adding 45μL β-1, 3-Glucanase and TCS extractions respectively; C+ G: Adding 45μL Chitinase and β-1, 3-Glucanase extractions respectively; T+ C+ G: Adding 30μL Chitinase, β-1, 3-Glucanase and TCS extractions respectively.

3 讨论

几丁质酶和葡聚糖酶的表达都受到多种因素的影响,如植物激素中的乙烯、生长素,外源微生物的入侵等^[17]。当高等植物被病原微生物侵染时,几丁质酶和 β-1, 3-葡聚糖酶都可以被诱导表达^[15, 16],在高等植物的动态防御机制中起重要作用。本文的结果揭示了一种利用基因工程获得抗真菌病植株的新途径,即将编码上述三种蛋白的基因中的一种连接于组成表达或病原诱导型表达的启动子之后,转入植物,提高转基因植物的抗真菌能

力。更重要的是,可以将两种以上的抗病基因同时转入同一株植物,以获得更好的抗病性。而且,同时转入两种以上的基因可以较好地预防由于病原微生物的高变异性而带来的抗病性的退化。Guido Jach 等人成功地将几丁质酶基因和一种来源于大豆的分泌型核糖体灭活蛋白的基因一起转入烟草,获得的转基因植株比单独转入其中一种基因的植株具有更强的抗病能力^[18]。根据我们的实验结果可以预计同时转入几丁质酶基因-葡聚糖酶基因,几丁质酶基因-天花粉蛋白基因,葡聚糖酶基因-天花粉蛋白基因的植株应当具有更强的抗病能力。

从本文的结果可以看出天花粉蛋白单独作用时,其抗真菌活性较低,而与几丁质酶或 β -1,3-葡聚糖酶中的任何一种联合作用后,抗真菌活性即有非常显著的提高。推测其可能原因是当天花粉蛋白与几丁质酶或 β -1,3-葡聚糖酶共同作用时,真菌细胞壁受到比较严重的破坏,便于天花粉蛋白进入真菌细胞内发挥核糖体灭活蛋白的作用。当天花粉蛋白单独作用时,大量蛋白只能堆积于胞外,因而抑菌效率较低。我们认为几丁质酶或 β -1,3-葡聚糖酶与天花粉蛋白共同转入植物是一种很有希望的获得抗真菌病植株的途径。这两种蛋白质分别作用于真菌的两种不同细胞结构,能够更好地克服由于真菌的高变异性而造成的对转基因植物的抗性,因为某一菌株同时发生两个无关突变的机率在统计学上较小。

致谢 感谢王晓晨,明小天,吴 思的大力帮助。

参 考 文 献

- [1] Lamb C J, Ryals J A, Ward E R *et al.* *Bio/Technology*, 1992, **10**:1436~1445.
- [2] Girbes T, Ferreras J M, Iglesias R *et al.* *Cell Mol Biol*, 1996, **42**:461~471.
- [3] Stirpe F, Battelli L G, Soria M *et al.* *Bio/Technology*, 1992, **10**:405~412.
- [4] Mcgrath M S, Hwang K M, Caldwell S E *et al.* *Proc Natl Aca Sci USA*, 1989, **86**:2844~2848.
- [5] Schlumbaum A, Mauch F, Vogeli U *et al.* *Nature*, 1986, **324**:365~367.
- [6] Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P *et al.* *EMBO J*, 1989, **6**:3209~3213.
- [7] Collinge D B, Kargh K M, Mikkeisen J D *et al.* *Plant J*. 1993, **3**(1):31~40.
- [8] Neuhaus J M, Fritig B H, Linthorst J M *et al.* *Plant Mol Biol Rep*, 1996, **14**(2):102~104.
- [9] Melchers L S, Marion Apotheker-de Groot, Jan A. Van der Knaap *Plant J*. 1994, **5**(4):469~480.
- [10] Isabel A, Carmen C, Rosa C *et al.* *Plant Mol Biol*, 1996, **32**:1171~1176.
- [11] Leah, R, Tommerup H, Svendsen I *et al.* *J Biol Chem*, 1991, **266**:1464~1573.
- [14] 刘进元,刘 玮,潘乃穗等.植物学报,1991, **33**(2):157~161.
- [15] Hideaki Shinshi, Debra Mohnen, Frederick Meins, Jr *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:89~93.
- [16] Yuji Fukuda, Hideaki Shinshi. *Plant Mol. Biol*, 1994, **24**:485~493.
- [17] Horst V, Monica A, Uwe M *et al.* *J Plant Physiol*, 1994, **143**:337~343.
- [18] Guido J, Birgit G, John M *et al.* *The Plant J*, 1995, **8**(1):97~109.

PROKARYOTIC EXPRESSED TRICHOSANTHIN AND OTHER TWO PROTEINS HAVE ANTI-FUNGAL ACTIVITY IN VITRO *

Hu Ping¹ An Chengcai^{1,2**} Li Yi^{1,2} Chen Zhangling^{1,2}

(¹The National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering,

College of Life Sciences, Peking University, Beijing, 100871)

(²De Montfort University, The Gateway Leicester. LE1 9BH, UK)

Abstract DNAs encoding Trichosanthin, tobacco class I Chitinase and tobacco class I β -1, 3-Glucanase were expressed in *E. coli*, respectively. The expression products were assayed for their anti-fungal activity. All of three kinds of proteins show anti-fungal activity. When two of them combined, this activity was enhanced greatly. When three of them combined, the stronger anti-fungal activity was observed.

Key words Trichosanthin, Chitinase, β -1, 3-Glucanase, Fungal pathogen

图版说明

Explanation of plate

A. 几丁质酶粗提物的分解底物活性检测; B. β -1, 3-葡聚糖酶粗提物的分解底物活性检测; C. 天花粉蛋白对小麦赤霉病菌生长的抑制; D. 几丁质酶对小麦赤霉病菌生长的抑制; E. 葡聚糖酶对小麦赤霉病菌生长的抑制; F. 多组分蛋白组合对小麦赤霉病菌生长的抑制。

1. 加入 90 μ L 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5) (作为负对照); 2. 加入 90 μ L pTTQ18 空载体原核表达产物 (作为负对照); 3, 4, 5. 相应加入蛋白粗提物 30, 60, 90 μ L; 6. 加入几丁质酶和天花粉蛋白粗提物各 45 μ L; 7. 加入葡聚糖酶和天花粉蛋白粗提物各 45 μ L; 8. 加入几丁质酶和葡聚糖酶粗提物各 45 μ L; 9. 加入几丁质酶, 葡聚糖酶和天花粉蛋白粗提物各 30 μ L。

A. Substrate-hydrolyzing activity of chitinase; B. Substrate-hydrolyzing activity of glucanase; C. Fungal growth inhibiting activity of Trichosanthin; D. Fungal growth inhibiting activity of chitinase; E. Fungal growth inhibiting activity of glucanase; F. Fungal growth inhibiting of different protein combinations;

1. Adding 90 μ L 50mmol/L Tris-HCl(pH7.5); 2. Adding 90 μ L prokaryotic expressed pTTQ18 extraction; 3, 4, 5. Adding 30, 60, 90 μ L protein extraction respectively; 6. Adding 45 μ L chitinase and Trichosanthin respectively; 7. Adding 45 μ L glucanase and Trichosanthin respectively; 8. Adding 45 μ L chitinase and glucanase respectively; 9. Adding 30 μ L chitinase, glucanase and Trichosanthin respectively.

* This work was supported by Doctor's New Medicine Grant of the National Science Committee

** To whom correspondence should be addressed