

지황 chitin 분해효소의 전기영동 양상 및 분류

판철호 · 이은아 · 조도현¹ · 김수일*

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및 농업생물 신소재 연구 센터,
¹아주대학교 생물공학과

초 록 : Pathogenesis-related proteins 중 chitinase를 지황에서 추출하고 분류하였다. 지황 chitinase는 chitin affinity column chromatography로 염기성 및 산성 두개 군으로 분류되었으며 native PAGE gel상 효소활성을 조사한 결과 이동도가 작은 염기성 chitinase는 pH 2.9의 산성추출 조건에서, 이동도가 큰 산성은 pH 8.8의 염기성추출 조건에서 상대적으로 많이 추출되었다. 지황에는 염기성 3개, 산성 4개 등 총 7개의 chitinase isoform이 존재하며 이들의 분자량은 28~32 kD내외이고 지상부와 달리 뿌리에는 주로 염기성 chitinase만 검출되어 일부 산성효소는 조직 특이적으로 발현될 가능성을 보여주고 있다.(1998년 9월 2일 접수, 1998년 11월 13일 수리)

서 론

지황(*Rehmannia glutinosa*)은 현삼과에 속하는 다년생 초본식물로 우리 나라에서는 오래 전부터 뿌리를 한약재로 이용하였으며 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 지황은 iridoid, catalpol, leonuride 등과 당류인 stachyose, raffinose, sucrose, mannitol 등을 함유하고 있으며¹⁾ 한방에서는 보혈, 강장, 해열, 완하 등의 처방에 사용된다.²⁾ 지황의 번식은 분근 또는 어린뿌리로 이루어지기 때문에 번식력이 3~5배로 낮다. 번식용 뿌리(중근)는 수확후 옮겨장하여 이듬해 봄에 종묘로 사용하고 있으나 저장하는 동안 병원균의 오염율이 커서 재배에 많은 어려움을 주고 있다. 재배 중에도 잎의 점무늬병, 줄기의 흰비단병, 뿌리의 뿌리썩음병과 시들음병이 알려져 있다. 우리 나라에서는 아직 지황의 병해를 일으키는 병원균 동정도 안 되어 있는 실정이고 일부에서 무병 상태이면서 지황의 번식률을 높이기 위한 인공종자 생산 연구가 시도되고 있다.³⁾

Pathogenesis-related proteins(PR)은 여러가지 병원균에 의한 감염시 식물에서 합성되는 일련의 단백질로 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 감염되어 과민반응을 나타낸 담배에서 처음 보고되었다.⁴⁾ PRs는 식물의 자가방어기작 초기단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 많은 식물에서 그 존재가 확인되었고 이들을 이용한 병저항성 작물 개발연구도 활발하다.⁵⁾ PRs는 5가지로 분류되는데 PR2, PR3, PR5는 각각 β -1,3-glucanase,⁶⁾ chitinase,⁷⁾ thaumatin-like protein⁸⁾으로 동정되었으며 PR1과 PR4는 아직 동정되어 있지 않다. 본 연구는 지황의 내병성 세포주 분리를 위한 생화학적 지표 마련과 지황 PRs의 발현조절 해명을 위한 기초연구로 PRs중 isoform이 가장 많은 것으로 알려진 chitinases를 지황에서 추출하여 확인하고 전기영동 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

지황 시료

본 연구에서 사용한 지황 시료는 농촌진흥청 작물시험장 특용작물과에서 재배한 것으로 중국 중의 개량종이다. 수확기에 지황의 지상부와 뿌리를 따로 채취하여 -70°C에 보관하면서 연구에 사용하였다.

Chitinase 추출 및 조효소 제조

식물의 PRs는 산성 완충용액에서 선택적으로 추출된다. 는 기존의 보고⁹⁾에 따라, 본 연구에서도 이 방법으로 chitinase를 추출하였다. 즉, 지황 지상부(잎 및 줄기) 1 kg을 산성 추출 완충용액(84 mM citric acid, 32 mM disodium-phosphate, 14 mM 2-mercaptoethanol, 6 mM ascorbic acid/pH 2.9) 1 L에 침지한 뒤 마쇄한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 지황 chitinase 추출액으로 하였다. 조효소는 이 추출액을 ammonium sulfate로 90%까지 포화시켜 침전된 단백질을 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 회수하고 이를 증류수에 투석한 뒤 동결 건조하여 제조하였다.

한편, 염기성 조건에서 추출되는 chitinase를 산성 조건의 것과 비교하기 위하여 지황 지상부 1 kg을 염기성 추출 완충용액(50 mM Tris-HCl/pH 8.8) 1 L에 침지한 뒤, 상기 방법에 따라 조효소를 제조하였다.

조직에 따른 지황 chitinase isoforms의 양상을 조사하기 위하여 지황 뿌리를 각각 산성조건과 염기성조건에서 상기 방법대로 추출하여 조효소를 얻고 이를 지상부의 것과 전기영동으로 비교하였다.

Chitin affinity column chromatography

Affinity chromatography는 Molano 등¹⁰⁾의 방법에 따라 제

찾는말 : *Rehmannia glutinosa*, chitinase, pathogenesis-related proteins, isoforms

*연락처

조한 regenerated chitin을 이용하였다. 조효소 375 mg(243.8 mg-protein, total chitinase activity 43272.4 cpm)을 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.0)에 용해하고 동일 완충용액으로 평형된 regenerated chitin column(5×27 cm)에 주입하였다. 동일 sodium acetate 완충용액으로 chitin에 흡착되지 않은 단백질을 용출하고, chitin에 흡착된 단백질은 pH를 4.0에서 8.8로 변화하는 discontinuous pH gradient elution 방법을 사용하여 용출하였다. 이때 사용한 완충용액은 50 mM Tris-HCl(pH 8.8), 용출속도는 1 ml/min.로 하였으며 tube당 10 ml씩 분획하였다. 각 분획의 chitinase 활성을 측정하고 활성분획은 증류수에 투석하여 동결 건조하였다.

Chitinase 활성 측정 및 단백질 정량

Chitinase 활성은 삼중수소로 표지한 chitin을 기질로 이용한 방사성동위원소법으로 측정하였다.¹⁰ [³H]-chitin은 5mCi의 방사능을 가진 [³H]-acetic anhydride(DuPont NEN)로 chitosan(Sigma)을 아세틸화시켜 제조하였다. 제조된 [³H]-chitin은 N-acetylglucosamine 1 μmole당 8722.6cpm의 방사능을 보유하였다. 효소 반응은 효소용액에 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0)과 50 μl 기질(3.4×10⁶ cpm/ml)을 넣어 800 μl로 하여 37°C에서 진탕 배양하였다. 반응 후 100% trichloroacetic acid를 100 μl 넣어 잘 섞은 뒤 원심 분리하여 상정액 700 μl를 취하고 여기에 5 ml의 liquid scintillation cocktail(Amersham)을 넣어 liquid scintillation counting하였다. 효소 1 nkat은 37°C에서 1분 동안 1 nmole의 N-acetylglucosamine을 생산하는 효소량으로 정의하였다.

단백질 함량은 bicinchoninic acid를 사용하는 방법으로 측정하였다.¹¹

전기영동 및 gel상 chitinase 활성측정

Native PAGE는 Davis의 방법¹²을 일부 수정하여 8% polyacrylamide gel을 사용하여 수행하였고 단백질 검출은 coomassie brilliant blue R-250 염색방법을 사용하였다. Native PAGE gel상에서의 효소활성 band 검출은 Trudel 등¹³의 방법을 사용한 것으로 전기영동을 실시한 gel 위에 0.01% glycol chitin을 포함하는 pH 5.0의 7.5% polyacrylamide gel을 overlay gel로 사용하여 반응시킨 후 glycol chitin이 분해된 위치를 calcofluor white M2R(Sigma)로 염색하여 UV하에서 chitinase 효소활성을 조사하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법¹⁴을 일부 수정하여 12.5% polyacrylamide gel을 사용하여 수행하였고 단백질 검출은 coomassie brilliant blue R-250 염색방법을 사용하였다. SDS-PAGE gel상 chitinase 활성 측정은 Trudel 등¹³의 방법을 사용한 것으로 0.01% glycol chitin을 포함하는 12.5% polyacrylamide gel에서 SDS-PAGE를 실시한 후 0.1% Triton X-100을 포함하는 10 mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0)에 gel을 넣어 37°C에서 반응시킨 뒤 glycol chitin이 분해된 위치를 calcofluor white M2R(Sigma)로 염색하여 UV하에서 chitinase 효소활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

지황 chitinases의 전기영동 양상

1 kg의 지황 지상부로부터 산성 또는 염기성 완충용액으로 추출한 조효소의 단백질양은 각각 118 mg과 332 mg이었으며 chitinase 비활성은 각각 48.3 nkat/mg-protein과 65.1 nkat/mg-protein이어서 염기성조건에서의 추출이 산성에서의 추출보다 단백질양으로는 2.8배, chitinase 비활성은 1.4배 더 높게 나타났다. 이들 두 가지 조효소의 polyacrylamide gel 전기영동 양상을 protein 및 chitinase activity, 두 가지로 염색하여 비교하였다. 8% native PAGE에서는 산성 및 염기성 추출시료 모두에서 단백질 band 2개(P1, P2)가 주로 나타났으나 chitinase 활성 band로는 이들 2개 단백질 band 이외에 P2보다 이동도가 높은 여러 개의 band들이 산성 및 염기성 추출조건 모두에서 더 관찰되었다(Fig. 1, I and B). Coomassie blue 염색으로는 검출되지 않았던 band

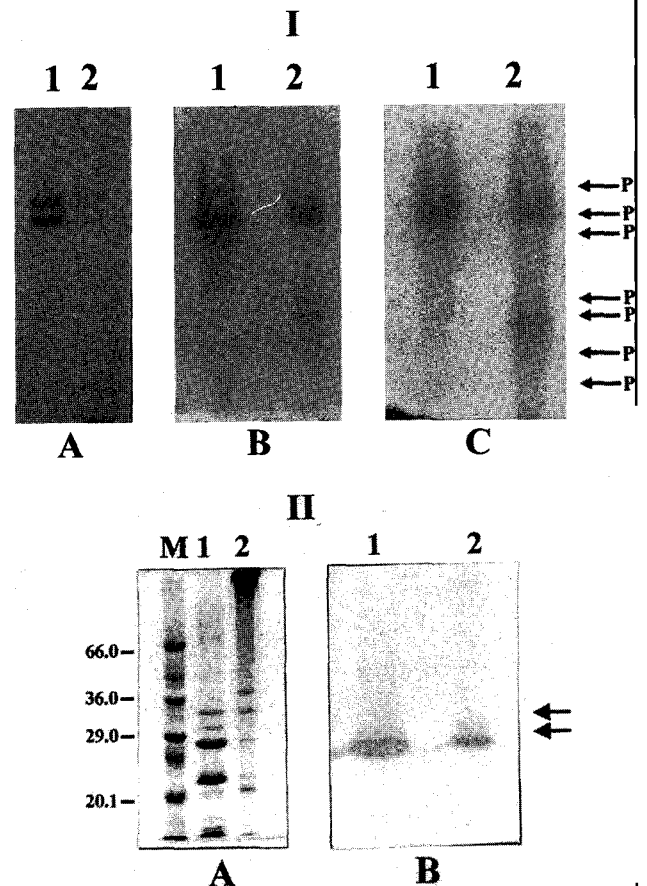


Fig. 1. Native and SDS-PAGE of crude chitinases from leaf and stem of *Rehmannia glutinosa* I, Native PAGE; II, SDS-PAGE. Panel A: protein staining with Coomassie brilliant blue, Panel B: chitinase activity staining with Calcofluor white M2R after 1 hr incubation, Panel C: chitinase activity staining with Calcofluor white M2R after 4 hr incubation, lane 1: extracted with acidic buffer, lane 2: extracted with basic buffer, M: molecular weight marker. The numbers of left side mean molecular weight kD and the arrow indicates chitinase activity band.

효소활성 염색으로 검출된 사실은 사용한 효소활성 염색 방법이 단백질 염색방법보다 훨씬 검출감도가 높음을 의미한다. 이러한 효소활성 방법에서의 전기영동 gel상의 chitinase 측정에는 사용한 기질 glycol chitin과의 작용시간에 따라 검출정도가 높아져서 1시간 보다 4시간 반응에서 보듯 많은 band들이 검출되었다(Fig. 1, I-B and C). SDS-PAGE결과 이들 chitinase는 분자량이 28~32 kD내외에 분포하는 것으로 추정된다(Fig. 1, II-A and B).

추출용액의 pH에 따른 지황 chitinases의 전기영동 양상을 비교해본 결과, 염기성 추출 조건에서 P3보다 이동도가 낮은 chitinases(Fig. 1, I-B and C-1,2) 및 분자량이 큰 단백질들이 많이 추출되는 것으로 나타났다(Fig. 1, II-A-1,2). 이 단백질 조성 면에서는 Van Loon 등¹⁶⁾이 담배의 경우 산성 추출로 chitinase가 포함된 PR-protein을 선택적으로 추출할 수 있다는 보고와 비슷한 결과이나 추출양이나 비활성면에서는 염기성 추출물에서 더 높아서 chitinase 추출조건을 결정하는 것은 추출대상 식물 및 연구목적에 따라 다르게 해야할 것으로 생각된다.

지황 chitinase의 분류

지황부의 산성추출 조효소를 sodium acetate 완충용액(pH 4.0)에 평형시킨 regenerated chitin column chromatography를 한 결과 흡착되지 않고 용출되는 분획 F1과 pH 8.8에서 용출되는 분획 F2를 얻었다(Fig. 2). 이들을 native PAGE로 분석한 결과 분획 F1은 주로 P1, P2, P3를, 분획 F2는 P3보다 이동도가 높은 4개의 chitinase(P4-P7)를 포함하였다(Fig. 1-D). Chitin affinity chromatography에 의하여 분리된 지황 chitinase의 전기영동 양상은 *Hevea brasiliensis*,¹⁵⁾ *Beta vulgaris*,¹⁶⁾ *Cicer arietinum* L.¹⁷⁾ 등에서 음이온 교환 chromatography로 분리된 chitinase의 양상과 동일하였다. 즉, chitin affinity chromatography의 비흡착은 염기성 chitinase로 분류되는 음이온 교환 chromatography의 비흡착에 해당하였다. chitin affinity chromatography의 흡착은 산성 chitinase로

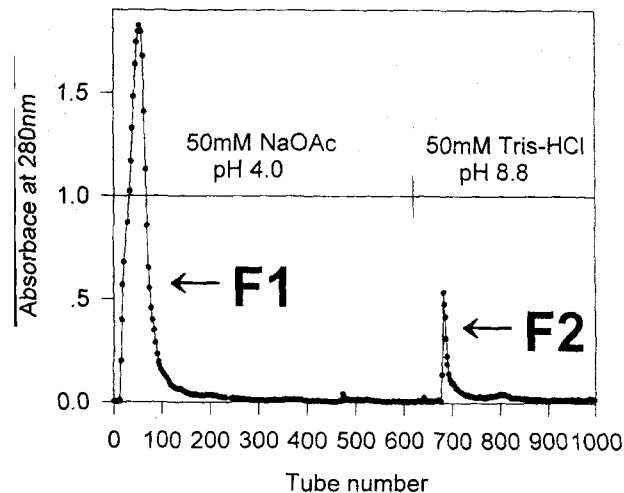


Fig. 2. Chitin affinity chromatogram of crude chitinase from leaf and stem of *Rehmannia glutinosa*.

분류되는 음이온 교환 chromatography의 흡착에 해당하였다. 따라서 본 연구에서도 pH 4.0에서 흡착되지 않고 용출되는 P1, P2, P3를 염기성 chitinase group으로, pH 8.8에서 용출되는 전기이동도가 상대적으로 높은 것을 산성 chitinase group으로 분류하였다. 염기성 chitinase의 분자량은 28 kD 내외, 산성 chitinase는 28 및 32 kD 내외이며 이들 염기성 및 산성 분획은 chitinase이외에 다양한 분자량을 가진 다른 단백질들이 같이 존재함을 보여주고 있다(Fig. 3, II-A and B).

지황 지상부의 산성추출 조효소의 총 chitinase활성 중 염기성 group은 41.13%, 산성 group은 51.43%를 차지하는 것으로 나타났으며 염기성과 산성 chitinase group의 비활성은 각각 16.2와 952 nkat/mg-protein으로 산성 group이 염기성 group보다 58.8배 높게 나타났다.

잎 및 줄기를 포함한 지상부이외에 뿌리로 부터 산성 및 염기성 조건으로 chitinases를 추출하여 chitinases의 조직별 발현 특이성 여부를 일차 검토하였다. Native 및 SDS-PAGE의 전기영동 양상을 단백질 및 효소활성별로 염색하여 비교해본 결과, 산성 및 염기성 chitinase가 같이 존재하는 지상부와는 달리, 뿌리에는 염기성 chitinase가 주로 검출되어 이들이 조직 특이적으로 발현될 가능성을 보여주고 있다(Fig. 4, I and II). 또한 뿌리의 경우는 염기성 추출보다는 산성 추출방법이 chitinases를 효과적으로 추출하는 방법으로 나타났다. 실제적으로 Xu 등¹⁸⁾은 벼에 존재하는 여러 가지 chitinase 유전자 중 RC24는 뿌리와 줄기에서만 발현되고 잎에서는 발현되지 않음을 보고하여 chitinase의 조직 특이적 발현을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면 지황에는 적어도 7종류의 chitinases가 isoform으로 존재하며 이들은 염기성 및 산성, 두가지 group으로 분류될 수 있고 뿌리에는 주로 염기성 chitinase가 존재하며 분자량은 28 kD내외에 분포하는 것으로 추정되었다. 한 식물에 이처럼 chitinase의 isoform들이 많이 존재하는 것은 추출과정에서의 degradation 때문으로 생각할 수도 있지만 추출완충용액에 protease inhibitor인 phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)를 첨가한 경우에도 본 연구결과와 동일하여 일단 추출과정에서 degradation은 없는 것으로 생각되었다. 또한, chitinase이외에도 lysozyme, cellulase, β -1,3-glucanase 등이 chitin 분해활성을 보유하는 것으로 보고^{19,20)}되어 본 연구의 추출물에 대해서도 이들 효소의 활성을 측정된 결과 단지 β -1,3-glucanase 활성만이 측정되었으며, gel상 β -1,3-glucanase 활성을 측정하여 P1부터 P7까지의 chitinase 활성 band와는 다른 위치임을 확인하였다. 따라서 본 연구의 P1부터 P7까지는 모두 다른 chitinase isoform으로 결론되었으며, 이것은 담배, 벼, sweet orange 등 한 식물에서 여러 chitinase isoform들이 보고^{19,21)}된 예와 유사한 결과를 보였다.

Collinge 등¹⁹⁾은 단백질의 일차구조를 기준으로 식물 chitinase를 4개의 class로 분류하였다. 이 중 class I, IV는 아미노 말단에 chitin binding domain으로 알려진 hevein domain을 가지고 있으며, class II, III는 hevein domain이 없는데, hevein domain은 chitinase와 기질인 chitin의 친화도

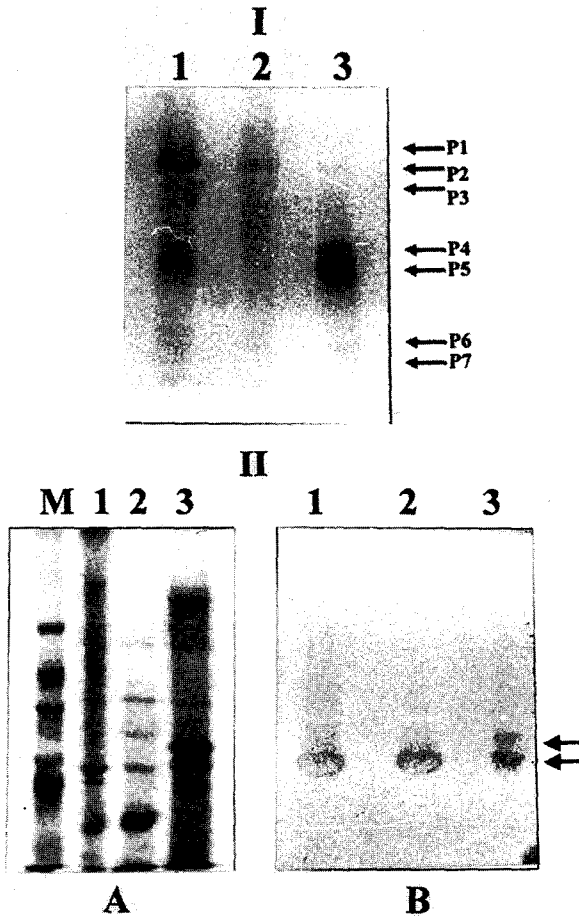


Fig. 3. Native and SDS-PAGE of crude chitinase fractions on chitin affinity column. I, Native PAGE: chitinase activity staining with Calcofluor white M2R after 4hr incubation, II: SDS-PAGE, A: protein staining with Coomassie brilliant blue, B: chitinase activity staining with Calcofluor white M2R after 4 hr incubation, lane 1: crude, lane 2: F 1, lane 3: F 2, M: molecular weight marker. The numbers of left side mean molecular weight of kD and the arrow indicates chitinase activity band.

에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 chitin affinity chromatography는 바로 hevein domain의 유무에 따른 chitin과의 친화도 차이를 이용하여 지황 chitinase isoform을 구분하려는 목적으로 수행되었다. 그러나, chitinase isoform들이 hevein domain의 유무에 의하여 분리되었는지는 각 isoform들의 아미노산 서열이 밝혀져야 확인할 수 있을 것이다.

식물의 병저항성, 내병성, 그리고 병원균과 기주식물과의 상호작용에 대한 생화학적 또는 분자생물학적 연구는 주로 식량작물과 채소작물을 대상으로 하여 많이 연구되었으며 고부가가치를 가진 약용작물에서는 거의 수행된 것이 없었다. 본 논문에서는 약용작물인 지황에서 처음으로 PRs의 하나인 chitinases와 그의 isoforms를 확인하였다. 이들 결과를 토대로 하여 앞으로 각 isoforms을 순수분리하여 그의 특성을 조사하고, 이들이 기존에 chitinase의 발현을 유도하는 것으로 알려진 여러 가지 자극에 대하여 어떻게 반응하며, 지황과 병원균의 상호작용에서 어떤 역할을 할 것인가

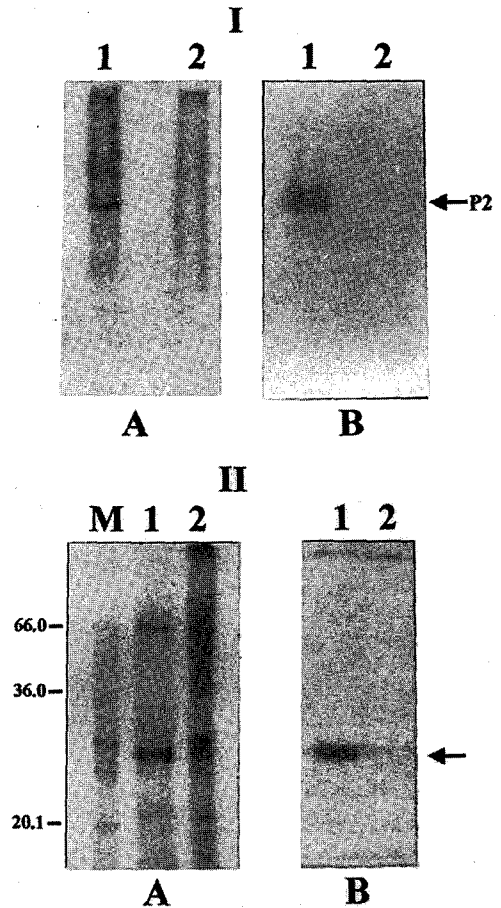


Fig. 4. Native and SDS-PAGE of crude chitinases from root of *Rehmannia glutinosa*. I, Native PAGE; II, SDS-PAGE, A: protein staining with Coomassie brilliant blue, B: chitinase activity staining with Calcofluor white M2R after 4hr incubation, lane 1: extracted with acidic buffer, lane 2: extracted with basic buffer, M: molecular weight marker. The numbers of left side mean molecular weight of kD and the arrow indicates chitinase activity band.

에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이다. 장래 이들의 성질을 연구하고 상호 비교를 하기 위하여는 여러가지 chromatography방법을 통한 이들의 순수분리가 우선 필요한 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 농림기술관리센터의 첨단과제 지원에 의한 것으로 이에 감사 드리고, 지황 시료를 제공해 주신 농촌진흥청 작물시험장 성낙술 박사님께도 감사드립니다.

참고문헌

- Hasegawa, T., K. Koike, S. Takahashi, and U. Ariyoshi (1982) Constituents of leaves and roots of Kaikei Jio (*Rehmannia glutinosa* Libosch. *formahueichingensis* Hsiao). *Shoyakugaku Zasshi* 36, 1-5.
- Han, D. S. (1992) In Pharmacognosy : *Rhemannia*, 4th Ed., p.

- 229-230 Dongmyongsa, Seoul, Korea.
3. Nishioka, I. (1988) Clonal multiplication of medical plant by tissue culture. *Shoyakugaku Zasshi* **42**, 1-11.
 4. van Loon, L. C. and A. van Kammen (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 199-211.
 5. Zhu, Q., E. A. Maher, S. Masoud, R. A. Dixon, and C. J. Lamb (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *BIO/TECHNOLOGY* **12**, 807-812.
 5. Kauffmann, S., M. Legrand, P. Geoffroy, and B. Fritig (1987) Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.* **6**, 3209-3212.
 7. Legrand, M., S. Kauffmann, P. Geoffroy, and B. Fritig (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6750-6754.
 8. Cornelissen, B. J. C., R. A. M. Hooft van Huijsduijnen, and J. F. Bol (1986) A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. *Nature* **321**, 531-532.
 9. van Loon, L. C. (1985) Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **4**, 111-116.
 10. Molano, J., A. Duran, and E. Cabib (1977) A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Anal. Biochem.* **83**, 648-656.
 11. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
 12. Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis II-method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
 13. Trudel, J. and A. Asselin (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **178**, 362-366.
 14. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head protein of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 15. Martin, M. N. (1991) The Latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozymes. *Plant Physiol.* **95**, 469-476.
 16. Nielsen, K. K., K. Bojsen, P. Roepstorff, and J. D. Mikkelsen (1994) A hydroxyproline-containing class IV chitinase of sugar beet is glycosylated with xylose. *Plant Mol. Biol.* **25**, 241-257.
 17. Vogelsang, R. and W. Barz (1993) Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta* **189**, 387-401.
 18. Xu, Y., Q. Zhu, W. Panbangred, K. Shirasu, and C. Lamb (1996) Regulation, expression and function of a new basic chitinase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **30**, 387-401.
 19. Collinge, D. B., K. M. Kragh, J. D. Mikkelsen, K. K. Nielsen, U. Rasmussen, and K. Vad (1993) Plant chitinases. *Plant J.* **3**, 31-40.
 20. Um, S. Y. and S. I. Kim (1994) Isolation and properties of a protein, RCG-2, having chitinase, β -1,3-glucanase and lysozyme activities from rice leaves. *Agri. Chem. Biotc.* **37**, 49-55.
 21. Mayer, R. T., T. G. McCollum, R. P. Niedz, C. J. Hearn, R. E. McDonald, E. Berdis, and H. Doostdar (1996) Characterization of seven basic endochitinases isolated from cell cultures of *Citrus sinensis*(L.). *Planta* **200**, 289-295.

Electrophoretic pattern and classification of chitinolytic enzymes from *Rehmannia glutinosa*

Cheol-Ho Pan, Eun-A Lee, Do-Hyun Jo¹ and Su-Il Kim*(*Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-materials in Agriculture, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, ¹Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 441-749, Korea*)

Abstract : Chitinase, which is one of the pathogenesis-related proteins, was examined from *Rehmannia glutinosa*. *Rehmannia* chitinases were classified into basic and acidic groups by chitin affinity column chromatography. According to the chitinase pattern by native PAGE, basic chitinases of low Rf values were extracted more under an acidic condition (pH 2.9) than a basic condition (pH 8.8), while acidic chitinases having high Rf values were mainly detected in basic extracts. There were in total seven chitinase isoforms of three basic and four acidic isoforms in *Rehmannia*. The range of molecular weight of *Rehmannia* chitinase was from 28 to 32 kD. It showed the possibility of tissue specific expression of acidic chitinases and basic chitinases were mainly detected in root.

Key words : *Rehmannia glutinosa*, chitinase, pathogenesis-related proteins, isoforms

*Corresponding author