

大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (SKTI) 研究进展^{*}

赵洪锬 李启云 王玉民 庄炳昌

(吉林省农业科学院吉林省生物技术重点开放实验室, 公主岭 136100)

摘要 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (SKTI) 是一种典型的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 主要集中在大豆的子叶中。近 60 年来, 对其生化特性及结构已有较多研究, 通常认为这种蛋白酶抑制剂具有贮藏、调节内源蛋白酶活性及植物防御等作用。研究表明, 这种蛋白酶抑制剂抗虫谱广, 能显著抑制幼虫的生长发育, 不易产生抗性, 对人畜无害, 因此对其进行研究及开发利用具有重要的经济和社会效益。迄今为止, 至少已有 4 种基因被克隆, 通过转基因技术在烟草、水稻、小麦等作物获得了抗性植株。本文从 SKTI 的类型、基因克隆及生理功能等方面作一简单综述。

关键词 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (SKTI); 类型; 基因克隆; 生理功能

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2002)03-0218-05

大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂属典型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 自从 1945 年由 Kunitz 发现以来, 科学家们从此展开了大量的研究, 在生理生化及分子生物学等多方面都取得了进展, 发现其生理功能除了作为种子贮藏蛋白, 调节内源蛋白酶的活性以外, 更重要的是具有保护种子不受昆虫和病原菌等的侵害。随着分子生物学的发展, 一些基因已经被克隆, 而对于其抗虫的分子机制的研究有相当大一部分工作集中在转基因植物上, 已经培育出了抗虫烟草、水稻及小麦等转基因植物。为了更好的进一步开展大豆胰蛋白酶抑制剂方面的研究, 本文将从以下几个方面对其国内外研究进展做一简单综述。

1 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的发现、类型及分布频率变化

20 世纪 40 年代人们发现了植物中含有蛋白酶抑制剂, 在植物的贮藏器官特别是种子中, 其含量常常高达总蛋白的 10%^[1]。经过对它们结构和性质的研究, 发现这些抑制剂可以分为两大类: 其中一类为 Browan-Birk (BBTi) 抑制剂, 分子量约为 8KD, 含较多二硫键, 一个抑制剂分子可以结合二个分子的胰蛋白酶, 是一个双头抑制剂; 另一类为 Kunitz 抑制剂 (KTI), 分子量为 21KD, 含有二对二硫键, 一个抑制剂分子可以结合一分子的胰蛋白酶, 属单头

抑制剂^[2]。这两类抑制剂均属典型丝氨酸蛋白酶抑制剂。与其它类型的蛋白酶抑制剂相比较, 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性位点的突变频率较高, 显示这些突变体可能受到植物为抵御各种不同害虫或病菌的侵害所产生的选择压力的影响, 因此, 丝氨酸蛋白酶抑制剂在植物抗性研究中起着重要作用。

在大豆种子中, 上述两类蛋白酶抑制剂类型都有发现, 其中 KTI 类型在大豆种子中含量最丰富, 特异抑制胰蛋白酶; 而 BBTi 类型蛋白酶抑制剂则对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶及弹性蛋白酶三种相关的蛋白酶发生特异抑制。

Kunitz 于 1945 年由首先从大豆种子中分离 Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制剂 SBTi-A2, 并获得并纯化结晶^[3]。之后就展开了大量的研究表明: 大豆中至少有 4 种胰蛋白酶抑制剂, 其中最主要的是 SBTi-A2^[4], 属于 KTI 型。Singh 等人观察到 SBTi-A2 具有电泳变异类型, Hymowitz 等人论证了大豆种子蛋白的提取物经电泳后, 出现 Rf 值分别为 0.79、0.75、0.83 三个互为显性的等位基因 ti^a 、 ti^b 、 ti^c , 同时还存在着一种极少量的无 SBTi-A2 的隐性等位基因 (ti)^[5]。由这 3 个显性等位基因编码的相应蛋白为 Ti^a 、 Ti^b 、 Ti^c , 聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移率相对大小为 $Ti^c > Ti^a > Ti^b$, 抑制剂的活力为 $Ti^a \approx Ti^c > Ti^b$, 其中 Ti^a 在自然界中普遍存在, 而 Ti^b 和 Ti^c 较少见到。这些 SBTi-A2 蛋白的一级结

^{*} 收稿日期: 2001-09-25

作者简介: 赵洪锬 (1974-), 女, 助理研究员, 主要从事大豆分子生物学研究。

构也已被先后阐明。它们均含 181 个氨基酸残基, 都在相同位置含有二硫键, 活性位点为 Arg63—Ile64, 在组成上有少量差异。七十年代 Hymowitz^[4] 对美国大豆种质资源 4000 余份进行了 Ti 分析, 表明 89% 的美国大豆资源含有 Tia 基因型的胰蛋白酶抑制剂, 而 Ti^c 则只在大豆资源的 0.3% 中出现, 并且于 1978 年^[7] 发现了两份不含 SBTi—A2 的 ti 型材料(P. I. 157440, P. I. 196168)。

80 年代以来, 中国也开始了这项研究^[8-10], 通过对 1.9 万份大豆(栽、野)种质资源的胰蛋白酶抑制剂(SBTi)等位基因电泳分析结果指出, 中国大豆种子蛋白中均含有胰蛋白酶抑制剂。包括三种基因类型, 三种类型出现的频率分别为 98.2%、1.3% 和 0.2%。53 份材料出现了双带, 即 Ti^a+Ti^b 或 Ti^a+Ti^c 同时存在, 其出现频率为 0.3%。表明中国大豆种子蛋白中的胰蛋白酶抑制剂跟美国的大豆资源一样, 以 Ti^a 为主要基因型。通过 Ti 类型在栽培种与野生种之间的比较, 发现有明显的差异, 栽培种的 SBTi 类型单一, 其中 Ti^a 类型占绝对优势。野生种除 Ti^a 型为主外, 还较多地出现了 Ti^b 和 Ti^c 型, 说明野生种进化程度低, 其特性不稳定, 变异大。通过分区研究还表明, 中国大豆 Ti 类型的分布特点是, Ti^a 型分布广泛, Ti^b 主要分布在黄淮海流域夏大豆区和北方春大豆区, 而 Ti^c 型主要分布在东南区的福建省内。研究并没有发现不含有胰蛋白酶抑制剂的 Ti 型优质资源。

在对我国 15000 余份大豆资源的 Ti 分析过程中, 赵述文等(1991, 1992)^[11, 12] 从甘肃省的一份栽培大豆材料中发现一份的 SBTi—A2 的电泳迁移率不同于已知的 Ti^a, Ti^b, Ti^c 三种蛋白, 经遗传分析和某些生化分析数据证明不同于其它 3 种 Ti, 严晴燕等(1996, 1998)^[13] 纯化该蛋白并对它的一些生化特性, 包括氨基酸组成, CNBr 裂解片段的电泳行为等进行了分析, 表明这新发现的 SBTi—A2 应是第 4 个显性等位基因控制的蛋白产物, 并命名为 Ti^d。李严等(1999)^[15] 还对来源于我国的多年生野生大豆的大豆胰蛋白酶抑制剂做了初步研究, 发现了胰蛋白酶同工酶抑制剂, 明显区别于一年生野生大豆和栽培大豆。

2 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因差异表达与基因克隆

随着分子生物学的发展, 对大豆 Kunitz 型胰蛋

白酶抑制剂的遗传组成和发育调控也进行了大量的研究。早期的研究指出 KTi 基因只包括 Ti^a, Ti^b, Ti^c 三个等位基因来编码只有个别氨基酸变化的大豆胰蛋白酶抑制剂, 通过对大豆种子蛋白转录和转录后调控进行了研究, 表明在大豆的基因组中至少存在 10 个不同的 KTi 基因, 是一个多基因家族, 有些前后形成串联结构。在这十个基因中, 至少有四个(KTi1, KTi2, KTi3, KTi4)基因在大豆种子幼胚阶段表达, Jofuku K. D. 等(1989)^[16] 就克隆 KTi1, KTi2, KTi3 这三个基因并进行了测序, 研究发现这三个基因在大豆生活周期中是差异表达, 发现 KTi3 编码了大豆种子主要的胰蛋白酶抑制剂并与早期发现的 Tia 基因相对应。与 KTi1 及 KTi2 相比, KTi3 有将近 20% 的核苷酸不一样。KTi1 及 KTi2 由于没有活性位点的必需氨基酸 Arg—63 及 Ile—64, 它们对大豆种子胰蛋白酶抑制剂抑制活性并没有什么贡献。KTi1 及 KTi2 除了在大豆种子中表达, 还在叶、茎、根等器官中有表达, 只是表达的量比幼胚中期表达量的千分之一还要低。相反, KTi3 除了在种子及幼胚中有表达外, 在茎或根中并没有检测到表达。高越峰等(1997, 1998)^[17, 18] 从未成熟大豆子叶中, 利用 RT—PCR 的方法克隆到了大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因 SKTI, 并采用农杆菌介导转化方法获得了转基因烟草, 获得的转基因烟草经抗虫实验表明, 具有明显的抗棉铃虫能力, 并且通过对照研究表明, SKTI 对胰蛋白酶活性的抑制能力明显高于豇豆胰蛋白酶抑制剂 CpTI。忻骅等(1999)^[19] 在赵述文等(1992)^[11] 的工作基础上, 克隆了 Tid 这个新类型 cDNA 全序, 并在大肠杆菌中获得了表达, 并在室内条件下进行了人工饲料喂养, 初步研究了抗虫性。

3 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂生理功能

蛋白酶抑制剂广泛存在于植物的各种组织中。近六十年来, 对其生化特性及结构已有较多研究, 但它在体内的主要功能仍不很清楚, 通常认为这种蛋白酶抑制剂具有贮藏、调节内源蛋白酶活性及植物防御等作用。

3.1 贮藏蛋白

大豆的蛋白酶抑制剂主要集中在子叶中^[1], 约占大豆种子总蛋白的 6%, 除了营养性器官, 在大豆的其它器官如根、茎、叶中也发现有极其微量的表

达,但在这些组织中存在的时间非常短暂,这表明大豆胰蛋白酶抑制剂可能是主要充当一种种子贮藏蛋白。

3.2 调节内源蛋白酶活性^[20] Ofelt 等(1955)在研究大豆中的蛋白酶抑制剂的存在情况后,认为植物的蛋白酶抑制剂不抑制内源性的蛋白酶,但10年后Sham和Mayer的发现推翻了这一结论,他们在莴苣中发现了一种能抑制内源性蛋白酶活性的蛋白酶抑制剂。根据研究发现,这种内源性的蛋白酶具有类胰蛋白酶的专一性。在种子萌发的过程中,随着蛋白酶的活力增加,抑制剂逐渐消失,这一现象说明,在植物体内,蛋白水解酶可能与抑制剂结合,以无活性的形式存在,或者酶以前体的形式合成,受到激活后,中和掉抑制剂从而表现出逐渐增强的酶活力。

3.3 抗虫作用及机制的研究

早在半个多世纪以前,人们就观察到了植物蛋白酶抑制剂的抗虫作用,1947年Mickel和Standish发现有些昆虫无法在大豆制品上正常生长,这些观察结果使得Lipke等在50年代初开始了大豆抑制剂对杂拟谷盗(*Tribolium confusum*)生长发育的研究,他们发现,大豆浸提物能使杂拟谷盗生长缓慢,发育不良,同时还检测到大豆浸提物对杂拟谷盗幼虫肠道蛋白酶有抑制作用。后来,Birk等发现大豆浸提物能抑制重要害虫赤拟谷盗(又称谷蛀, *Tribolium Castaneum*)幼虫的生长。经分离纯化结果表明,该抑制物是一种胰蛋白酶抑制剂,这些结果提示人们,植物蛋白酶抑制剂可能是一种新的抗虫物质,从此以后,人们开始了对植物蛋白酶抑制剂抗虫作用的研究^[21]。

植物蛋白酶抑制剂对许多植食性昆虫的生长发育具有明显的抑制作用,在离体情况下,低浓度的大豆胰蛋白酶抑制剂STI(soybean trypsin inhibitor)及马铃薯蛋白酶抑制剂PI-2(potato typsin inhibitor II)能抑制甜菜夜蛾(*Spodopera exigua*)幼虫肠道的绝大部分胰蛋白酶的活性,活体试验表明,当喂有含有这两种抑制剂的人工饲料时,幼虫的取食量明显下降,表现出营养不良,虫体变轻,幼虫生长期增长等现象^[22]。王琛柱等(1995)^[23]研究了大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响,表明蛋白酶抑制剂对昆虫抗营养效应在于它对蛋白酶的激活和抑制作用,从而导致各种蛋白酶间的协调性破坏,昆虫消化过程受阻。王琛柱等(1996)^[24]同时研究了大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚

或丹宁混用对棉铃虫中肠蛋白酶和生长率的影响,表明大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚或丹宁的协同作用比三者的单独作用更能有效的抑制幼虫的生长发育和中肠蛋白酶活性,进一步阐明了蛋白酶抑制剂与一些抗虫次生性物质之间存在着增效作用,这为我们进行利用转基因改良植物抗虫性时给予了一个提示,外源与内源抗虫物质的协调性应予以重视,如果将外源蛋白酶抑制剂基因转入具有内源性抗虫次生性物质的植物,可能我们会获得高抗虫性的新品种。

目前蛋白酶抑制剂有相当大一部分工作集中在转基因植物上,转基因技术已逐渐成为控制病虫害的有效工具,较之使用大量农药的传统方法而言,通过转基因技术获得转基因作物具有对环境毒害小,成本低等优点,渐渐受到青睐。自从1987年Hilder^[25]等首次将豇豆胰蛋白酶抑制剂转入烟草叶片并表达成功后,已有多种植物蛋白酶抑制剂顺利转到其它的作物中去。Terras等(1994)^[26]来源于大麦的胰蛋白酶抑制剂基因导入小麦获得抗真菌抗性植株。高越峰等(1997,1998)^[17,18]从未成熟大豆子叶中,利用RT-PCR的方法克隆到了大豆Kunitz型胰蛋白酶抑制剂基因SKTI,并采用农杆菌介导转化方法获得了转基因烟草,获得的转基因烟草,经抗虫实验表明,具有明显的抗棉铃虫能力,并且通过对照研究表明,SKTI对胰蛋白酶活性的抑制能力明显高于豇豆胰蛋白酶抑制剂CpTI。Lee等(1999)^[27]将大豆胰蛋白酶抑制剂基因导入水稻,获得了抗棕色planthopper(*Nilaparvata lugens* Stal.)的转基因水稻。

当然,将蛋白酶抑制剂转入不同的植物,不仅可使受体植物获得抗性,转入的蛋白酶抑制剂还通过抑制蛋白酶的水解活力,保护其它的防御蛋白不被降解,有效提高植物防御机制,而且也可以为我们对胰蛋白酶抑制剂的抗性机制的研究提供一定的线索。据已有的数据显示,许多昆虫肠道的消化蛋白酶非常类似于动物的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶,并能受植物蛋白酶抑制剂的抑制,其中重要的农业害虫——鳞翅目昆虫幼虫肠道蛋白酶以胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶为主,鞘翅目昆虫幼虫肠道蛋白酶以半胱氨酸蛋白酶为主,植食性昆虫如果摄入含有大量植物蛋白酶抑制剂的食物,肠道中的蛋白酶受到抑制,使昆虫消化不良,造成必需氨基酸缺乏,从而使昆虫的生长发育受阻,甚至死亡。从这一点看来,植物营养性器官中抑制剂浓度高达可溶性蛋白的6%—10%,以及受到昆虫侵食时候,抑制剂在番茄和马

铃薯叶片内浓度可迅速累积至 1%, 都说明对它的研究是非常有必要的。

关于蛋白酶抑制剂的抗虫机制还不是很清楚。Broadway 和 Duffey (1986)^[22] 以 TAME 为底物测定了美洲棉铃虫和甜菜夜蛾长期取食 0.18% SKTI 后肠内胰蛋白酶的变化, 发现该种酶活性显著增高, 由此推断蛋白酶抑制剂对昆虫的作用方式是由于诱导类胰蛋白酶的大量有害产生而造成一些营养物质缺乏所致。王琛柱等 (1995)^[23] 研究了大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响, 表明蛋白酶抑制剂对昆虫抗营养效应在于它对蛋白酶的激活和抑制作用, 从而导致各种蛋白酶间的协调性破坏, 昆虫消化过程受阻。Hahnenberger 等 (1997)^[28] 认为抗虫作用可能主要源于抑制剂的存在使消化酶过度分泌, 造成必需氨基酸的缺乏而非对蛋白酶的直接抑制。蛋白酶抑制剂影响的不仅仅是昆虫肠道蛋白酶, 它们还影响到昆虫的水平衡, 蜕皮以及体内酶的调节。详细机制尚待进一步研究。

4 展望

大量的研究已经阐明了大豆胰蛋白酶抑制剂的性质及一些功能, 但是要对其做全面的认识, 特别是对其抗性机制的应用研究, 尚需做进一步的研究。到目前为止, 还很少有文献对多年生野生大豆的胰蛋白酶抑制剂进行报道, 鉴于多年生野生大豆和一年生野生大豆中都存在一些优异的抗性资源, 其中从我国 24°N 的 2 种多年生野生大豆多毛豆 (*G. tomentella*) 和脮豆 (*G. tabacina*)^[2], 对大豆蚜虫具有较强的抗性, 因此我们可能将从中获得具有更强抗性的基因源。并且, 我们除了进行转基因研究对其功能进行应用研究外, 我们是否可以直接利用一些表达系统直接表达具有活性的胰蛋白酶抑制剂蛋白, 如酵母表达系统, 大肠杆菌表达系统及病毒表达系统等, 为开发生物农药提供新的途径。

大豆子粒也是我们日常生活的主要食物来源, 但是胰蛋白酶抑制剂在子粒中的大量存在, 直接影响了消化和吸收, 通常我们只有通过加热来使之失活, 但与此同时也降低了大豆种子丰富蛋白的可溶性, 因此, 科学家们正在进行大量的研究试图找到一些低含量或不含胰蛋白酶抑制剂的大豆品种。迄今为止, 我国尚未发现不含大豆胰蛋白酶抑制剂的基因源。丁安林等 (1999)^[29] 报道了无胰蛋白酶抑制

剂的优质大豆新品种中豆 28, 但是它的血缘有来源于美国的大豆品种 P. I. L83—4387。不过由于大豆胰蛋白酶抑制剂具有重要的防护功能, 并且大豆胰蛋白酶抑制剂为含有丰富的含硫氨基酸, 降低其含量就会降低其营养性, 因此最好的途径是培育或发现积累无活性胰蛋白酶抑制剂的品种, 而不是统统的将胰蛋白酶抑制剂去除, 这就需要我们寻找一些大豆胰蛋白酶抑制剂突变新品种。Krishnan (2001)^[30] 就对一份大豆胰蛋白酶抑制剂积累含量很低的大豆品种 (P. I. 196168) 做了 DNA 序列分析, 其编码区发生了两个缺失和 G/T 颠换的突变, 这些突变引起 4 个终止密码子的引入, 导致了不正常的截断的无活性蛋白的形成, Northern 杂交也证明其 KTi3 mRNA 积累水平在种子中很低, 这为我们寻找优异的大豆基因源提供了一个借鉴。

参 考 文 献

- 1 Rackis J. J., Anderson, R. L., Isolation of four Soybean trypsin inhibitors by DEAE—Cellulose chromatography [M]. Biochem. Biophys Res. commun. 1964, 15: 320—335.
- 2 庄炳昌主编. 中国野生大豆生物学研究 [M]. 科学出版社, 1999, 144—146.
- 3 Kunitz M., Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean [J]. Science, 1945, 101(2635): 668—669.
- 4 Orf J. H., Hymowitz, Inheritance of a second trypsin inhibitor variant in seed protein of Soybeans [J]. Crop Sci., 1976, 17: 811—813.
- 5 刘兴媛, 林国庆, 李中平, 等. 中国大豆种子蛋白中胰蛋白酶抑制剂等位基因的频率及分布 [J]. 中国油料, 1994, 16(4): 32—35.
- 6 Hymowitz T., Electrophoretic analysis of SBTi—A2 in the USDA soybean germplasm collection [J]. Crop Sci. 1973, 13(4): 420—421.
- 7 Hymowitz T., Screening the USDA Soybean germplasm Collection for Kunitz trypsin inhibitor variants [J]. Soybean Genetics Newsletters, 1978, 5: 19—22.
- 8 王衍桐, 李福山, 常汝镇. 从种子蛋白电泳分析我国大豆品种 Ti 和 SPI 位点等位基因分析 [J]. 作物学报, 1986, 12(1): 31—37.
- 9 胡志昂, 王洪新. 检测大豆种子蛋白 SPI 位点基因频率及分布 [J]. 大豆科学, 1991, 10(1).
- 10 徐豹, 赵述文, 邹淑华, 等. 中国野生大豆 (*G. soja*) 种子蛋白的电泳分析: Ti 和 Spl 各等位基因频率、地理分布与大豆起源问题 [J]. 大豆科学, 1985, 4(1): 7—12.
- 11 赵述文, 邹淑华, 胡明祥, 等. 东北三省栽培大豆种子蛋白 Ti 和 Spl 各等位基因频率及分布 [J]. 大豆科学, 1991, 10(1): 71—88.
- 12 赵述文. 大豆 (*G. max*) 种子蛋白 SBTi 位点新类型的发现及甘肃省大豆 SBTi 位点各等位基因频率的研究 [J]. 大豆科学, 1992, 11(1): 93—96.
- 13 严晴燕, 曹凯鸣, 徐隼, 等. 大豆 (*G. max*) 胰蛋白酶抑制剂

- SBTi—A2 新类型 TiX 的纯化及其性质研究[J] . 复旦学报(自然科学版), 1996, 35(2): 150—156.
- 14 严晴燕, 曹凯鸣, 黄伟达, 等. 大豆(*G. max*)胰蛋白酶抑制剂 SBTi—A2 新类型 Tid 突变位点的初步研究[J] . 复旦学报(自然科学版), 1998, 37(2): 229—232.
- 15 李严, 宗晖, 黄小莺, 等. 中国野生大豆胰蛋白酶抑制剂的初步研究[J] . 复旦学报(自然科学版), 1999, 38(5): 529—532.
- 16 Jofuku K D, Goldberg R B. Kunitz inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plant[J] . Plant Cell, 1989, 1: 1079—1093.
- 17 高越峰, 朱祯, 朱玉, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及其转基因烟草抗虫性初探[J] . 高技术通讯, 1997, 9: 5—9.
- 18 高越峰, 朱祯, 肖桂芳, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的分离及其在抗虫植物基因工程中的应用[J] . 植物学报, 1998, 40(5): 405—411.
- 19 忻骅, 曹凯鸣, 谢可方, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂新类型 Tid 的全序列分析[J] . 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(4): 671—673.
- 20 谢可方. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的抗性及其基因表达的研究[D] . 硕士学位论文, 2000, 5—14.
- 21 Ryan C. A. . Protease inhibitors in plant: genes for improving defense against insect and pathogens[J] . Annu Rev Phytopathol, 1990, 28: 425—449.
- 22 Broadway, R. M. , Duffey, S. S. . Plant proteinase inhibitors mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*[J] . J. Insect Physiol., 1986, 32(10): 827—833.
- 23 王琛柱, 项秀芬, 张书芳, 等. 大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫消化生理和生长发育的影响[J] . 昆虫学报, 1995, 38(3): 272—277.
- 24 王琛柱, 钦俊德. 大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚或丹宁混用对棉铃虫中肠蛋白酶和生长率的影响[J] . 昆虫学报, 1996, 39(4): 337—341.
- 25 Hilder V. A., Catehous A. M. R., Sheeman S. E, et al.. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco[J] . Nature, 1987, 330(6126): 160—163.
- 26 Terras. W. R., Ferreira C.. Insect digestive enzyme: Properties compartmentalization and function[J] . Comp Biochem Physiol., 1994, 109 B (1) : 1—62.
- 27 Lee JH, Arumuganathan K. . Metaphase chromosome accumulation and flow karyotypes in rice (*Oryza sativa* L.) root tip meristem cells [J] . Mol Cells. 1999 Aug 31; 9(4): 436—9.
- 28 Hahnenberger K. M., Kurtz, S. E.. Avoiding protease—mediated resistance I herbivorous pest[J] . Tibtech, 1997, 15: 4—6.
- 29 丁安林, 孙君明. 无胰蛋白酶抑制剂的优质大豆新品种中豆 28 [J] . 作物杂志, 1999, 3: 29.
- 30 Krishnan HB, Characterization of a soybean[J] . Plant Sci. 2001, 160(5): 979—986.

THE PRONGRESS OF THE STUDIES ON SOYBEAN KUNITZ TRYPSIN INHIBITOR

Zhao Hongkun Wang Yumin Li Qiyun Zhuang Bingchang

(Jilin Provincial Key Lab. On Agro—Biotechnology, Jinlin Academy of Agricultural Sciences 136100)

Abstract Kunitz trypsin inhibitor, an abundant soybean seed protein, is specific for serine proteases. It has been proposed that trypsin inhibitors are storage proteins, regulators of endogenous proteinases during seed maturation and germination, or protectors of plants against insects and microorganism by biochemistry and structure studied in the past sixty years. And it has extensive resistance to inhibit the larva development with little accumulating tolerance, so there is a significant economic and social benefit to study and apply it in production. There are at least 4 genes which have been isolated and introduced into tobacco, rice and wheat etc, now transgenic plants were obtained with resistance. In this paper, the variants, gene cloning and physiological functions were reviewed.

Key words Soybean Kunitz trypsin inhibitor; Variants; Gene cloning; Physiological functions