

抗、感绿豆象绿豆种子差异蛋白的分离与鉴定

成小芳^{1,2}, 王宏民³, 张耀文⁴, 张仙红¹

1 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学 文理学院, 山西 太谷 030801

3 山西农业大学 经济管理学院, 山西 太谷 030801

4 山西省农业科学院 作物科学研究所, 山西 太原 030000

成小芳, 王宏民, 张耀文, 等. 抗、感绿豆象绿豆种子差异蛋白的分离与鉴定. 生物工程学报, 2018, 34(6): 937-944.

Cheng XF, Wang HM, Zhang YW, et al. Separation and identification of differential protein in the insect-resistant and insect-susceptible mungbean. Chin J Biotech, 2018, 34(6): 937-944.

摘要: 为寻找抗绿豆象绿豆种子中的重要抗虫成分, 以抗虫绿豆晋绿 7 号、B20 及感虫绿豆潍绿 2117 为试验材料, 采用蛋白质双向电泳 (2-DE) 和质谱技术, 对抗、感虫绿豆中差异蛋白及功能进行了鉴定与分析。结果表明, 抗、感虫绿豆中差异蛋白表达量超过 2.5 倍的点共有 15 个。其中 6 个蛋白点通过数据库得到了成功鉴定, 涉及 3 种蛋白质, 分别为 8S 球蛋白 (α 亚型和 β 亚型)、核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RuBis CO) 亚基结合蛋白和合成淀粉酶与胰蛋白酶两种抑制剂的前体多肽链。蛋白点 B49 (即 8S 球蛋白 α 亚型) 和 B31 (RuBis CO 亚基结合蛋白) 在抗、感虫绿豆中的差异表达量分别达到 10 000 倍和 23 倍。抗虫绿豆中 8S 球蛋白 α 亚型及 β 亚型、RuBis CO 伴侣蛋白及胰蛋白酶抑制剂的前体作为抗虫物质影响了绿豆象的生长发育甚至导致其死亡, 与抗虫性的量效关系及联合效应还需进一步验证。

关键词: 抗虫绿豆, 感虫绿豆, 双向电泳, 差异蛋白

Separation and identification of differential protein in the insect-resistant and insect-susceptible mungbean

Xiaofang Cheng^{1,2}, Hongmin Wang³, Yaowen Zhang⁴, and Xianhong Zhang¹

1 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

2 College of Arts and Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

3 College of Economics and Management, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

4 Institute of Crop Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030000, Shanxi, China

Abstract: In order to find the insect-resistant composition and differentially expressed proteins of mungbean, Jinlv No.7,

Received: November 20, 2017; **Accepted:** April 8, 2018

Supported by: China Agriculture Research Systems (No. GARS-08-G10), Key Technology Research and Demonstration Project of Organic Dryland farming in Shanxi Province (No. 201703D211002-8), Funding Awards for Outstanding Doctors Volunteering to Work in Shanxi Province (No. SXYBKY201731).

Corresponding author: Xianhong Zhang. E-mail: zxh6288@sina.com

现代农业产业技术体系专项资金 (No. GARS-08-G10), 山西有机旱作农业关键技术研究示范 (No. 201703D211002-8), 山西省优秀博士来晋工作奖励资金 (No. SXYBKY201731) 资助。

网络出版时间: 2018-04-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20180417.1547.001.html>

B20 and Weilv 2117 were used as experimental materials, and the differential proteins and functions of mungbean varieties that are resistant and susceptible to bruchids were compared and analyzed by two dimensional gel electrophoresis (2-DE) and identified by mass spectrometry. Among the samples, 15 protein spots showed a more than 2.5 times reproducible up-regulated, significance 6 of them were successfully identified by the database, and involved three kinds of proteins. They are the alpha and beta subtype 8S globulin, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBis CO) subunits binding protein and the precursor peptide chains for amylase inhibitor and trypsin inhibitor. The protein expressions of B49 (alpha subtype 8S globulin) and B31 (RuBis CO subunits binding protein) of insect-resistant mungbean were 10 000 and 23 times higher than that of insect-susceptible mungbeans. It stunted the growth and even death of the *Callosobruchus chinensis* L. that alpha and beta subtype 8S globulin and RuBis CO subunits binding protein and precursor peptide chains for amylase inhibitor and trypsin inhibitor of insect-resistant mungbean, the bruchid resistance effect of these three proteins need to further verified in terms of the quantity and the combined effect.

Keywords: insect-resistant mungbean, insect-susceptible mungbean, two-dimensional electrophoresis, differential expressed proteins

绿豆象 *Callosobruchus chinensis* L., 属鞘翅目 (Bruchidae) 豆象科 (Coleoptera)。主要危害绿豆 *Vigna radiata*、豌豆 *Pisum sativum*、豇豆 *Vigna unguiculata*、红小豆 *Vigna angularis* 等食用豆类, 尤对绿豆危害最为严重^[1]。植物在长期进化过程中形成了一定的抗虫机制, 目前已知参与抗虫防御体系的物质主要有氰化物、生物碱、萜烯和蛋白质^[2-3]。Sugawara 等曾从完全抗豆象的绿豆野生种 TC1966 中分离出 2 种环肽生物碱, 认为它们与抗豆象有关^[4], 但后来 Kaga 等否认了环肽生物碱抗豆象的观点^[5]; Kaga 等从 TC1966 中分离出一种对豆象有毒性的肽化合物“GIF-5”; Lin 等发现一种富含半胱氨酸的 VRCRP (*Vigna radiata* cysteine rich protein) 蛋白, 该蛋白对绿豆象幼虫有致死作用^[6]。

蛋白质组学及其技术已成为蛋白质组功能和应用研究的基本手段。其中, 聚丙烯酰胺凝胶双向电泳 (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2-DE) 以其在同一块胶上可同时分离数千甚至上万种蛋白的优势, 在蛋白质组学研究中一直处于核心地位^[7]; 肽质量指纹图谱是近年来采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱测量法 (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 发展起来的新型技术, 其优点是操作简便、灵敏

度高、与很多蛋白分离方法相匹配, 运用这两大技术可研究不同时空领域发挥功能的蛋白质组。因此, 这些蛋白质组学技术已成为对差异蛋白质进行比较和鉴定的主要方法。

前期研究表明, 绿豆晋绿 7 号和 B20 对绿豆象具有高抗性^[8], 这些抗虫绿豆是否是由于某些特殊蛋白而对绿豆象具有抗性作用目前还未见报道。为初步了解抗虫绿豆抗绿豆象的生理生化机制, 选取对绿豆象抗性有显著差异的 3 个绿豆品种作为研究对象, 采用 2-DE 比较分析抗、感绿豆象绿豆种子中的差异蛋白, 并结合 MALDI-TOF MS 技术和蛋白质数据库检索, 进行抗、感绿豆象绿豆种子中差异蛋白的研究, 以期为明确抗虫绿豆的抗虫成分提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试绿豆

绿豆品种晋绿 7 号 (92% 抗虫)、B20 (100% 抗虫)、潍绿 2117 (100% 感虫) 由山西省农业科学院作物研究所提供。

1.1.2 主要试剂及仪器

蛋白酶抑制剂 PMSF 为 Amresco 公司产品; 十二烷基磺酸钠、三氟乙酸、胰酶为 Promega 公司产品; 低熔点琼脂糖、胶条覆盖油为 Usb 产品。

真空干燥机 (上海一恒科学仪器有限公司 DZF-6020)、扫描仪 (MICROTEK ScanMaker i800)、电泳槽 (GE ETTAN DALTsix)、分光光度计 (上海沛欧 318C+)、冷冻离心机 (湘仪 H5050R)、超声仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司 Ningbo Scientz Biotechnology Co., LTD JY96-II n)、等电聚焦仪 (GE ETTAN IPGPHOR3)、Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱仪 (德国布鲁克 Bruker Dalton)。

1.2 方法

1.2.1 绿豆蛋白样品制备

将绿豆研成粉末后,加入含等体积 Tris 饱和酚蛋白的提取液,振荡离心后,取上清,再加醋酸铵甲醇溶液振荡,取沉淀-20 ℃过夜,次日离心并弃上清,用甲醇和丙酮分别洗涤沉淀,将沉淀室温干燥即得蛋白质团块,-80 ℃保存备用。

1.2.2 一向等点聚焦

蛋白溶解后,Bradford 法定量测定蛋白^[9],依定量所得数据取相应量的蛋白质,分析胶 (银染) 和质谱胶 (考染) 的上样量分别为 120 μg 和 1 200 μg。干胶条室温 20 ℃泡胀 12 h 后记录胶条号码。一向等电聚焦,程序为: S1 stp 500 V 1 h, S2 grd 1 000 V 1 h, S3 grd 8 000 V 3 h, S4 stp 8 000 V 5.36 h, 整个聚焦过程中所用总电压约为 60 kVh。等电聚焦完成后,置于平衡管,于-70 ℃保存胶条。

1.2.3 二向 SDS-PAGE

灌胶器装好并调节水平后,加入 12.5% SDS-PAGE 凝胶液,用饱和正丁醇压平液面,凝固过夜。各平衡管加平衡液平衡 2 次后,进行二向电泳,程序为: S1 2 W/gel 60 min, S2 17 W/gel 直到溴酚蓝迁移至凝胶底部。每个样品重复 3 次,凝胶采用银染和考染法染色。

1.2.4 图像采集与分析

凝胶采用 256 灰阶透视扫描模式,于分辨率

为 200 dpi 的扫描仪上扫描后,使用 ImageMaster 2D platinum 5.0 (GE) 软件对凝胶进行分析。

1.2.5 质谱鉴定

将差异蛋白点挖出,置于离心管进行胶内酶切、肽段抽提、点靶后利用 Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱仪进行质谱分析,flexAnalysis 软件 (Bruker Dalton) 过滤基线峰、识别信号峰,并采用 BioTools (Bruker Dalton) 软件搜索 NCBI 数据库获得蛋白质相关信息。

2 结果与分析

2.1 抗、感绿豆种子总蛋白的双向电泳分离图谱

预实验中,采用 pH 3-10 的 IPG 胶条对感虫绿豆潍绿 2117 进行双向电泳 (图 1),结果显示,绿豆蛋白主要分布在 pH 4-7 范围内,因此,为提高双向电泳图谱的分辨率,选用 pH 4-7 的 IPG 胶条对抗、感绿豆进行双向电泳。经多次实验,构建了分辨率高、重复性较好的抗虫绿豆 (晋绿 7 号、B20) 和感虫绿豆 (潍绿 2117) 的蛋白质二维电泳图谱 (图 2)。由图 2 可知,供试绿豆的蛋白质在 2 个方向都得到较好的分离,且较低含量的蛋白也能清晰显现出来。

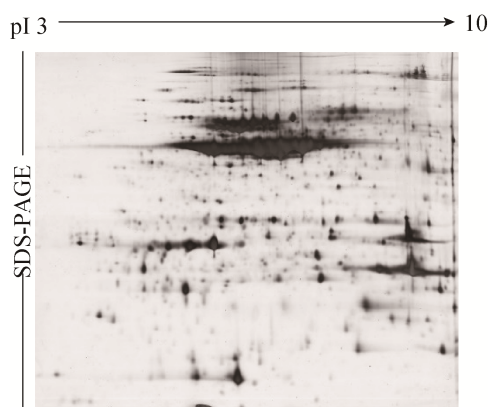


图 1 感虫绿豆潍绿 2117 种子蛋白质的 2-DE 图谱
Fig. 1 2-DE maps of seed proteins from susceptible mungbean Weilv 2117 to bruchids.

2.2 抗、感绿豆差异蛋白点的质谱鉴定与分析

对抗、感 3 组绿豆的 2-DE 图谱 (图 2) 进行 ImageMaster 2D platinum 5.0 (GE) 软件凝胶自动匹配和蛋白点差异筛选, 结果显示, 2 个抗虫绿豆品种晋绿 7 号和 B20 蛋白表达量都上调的蛋白点共有 28 个, 表达量上调 2.5 倍以上的共 15 个蛋白点, 其中, 达到 10 000 倍的有 2 个, 分别为 B47 和 B49, 其余各点仅表现为量的差异 (图 3) (每个蛋白点的量是指构成这个点的所有像素强度值的总和)。

对 15 个差异蛋白点经切胶后挖点、脱色、还原及进一步的烷基化回收, 并用胰蛋白酶酶解,

抽提酶解肽段进行萃取和 ZipTip 脱盐处理, 并利用 MALDI-TOF MS 质谱对获得的蛋白进行肽质量指纹图谱鉴定分析。通过 UniProt 数据库鉴定, 抗虫品种蛋白表达量为感虫品种 10 000 倍的 2 个蛋白斑点中只有 B49 得到成功鉴定, 为 8S 球蛋白; 超过 2.5 倍被成功鉴定出共 5 个蛋白点, 分别为 B13、B31、B34、B41 和 B56 (表 1)。其中, B13、B49 和 B56 属同一种蛋白质, 均为 8S 球蛋白 α 亚型, B56 和 B49 具有相同的等电点和分子量, 而 B13 与它们只是等电点相同而分子量不同; B34 为 8S 球蛋白 β 亚型, 与前 3 个蛋白点的等电

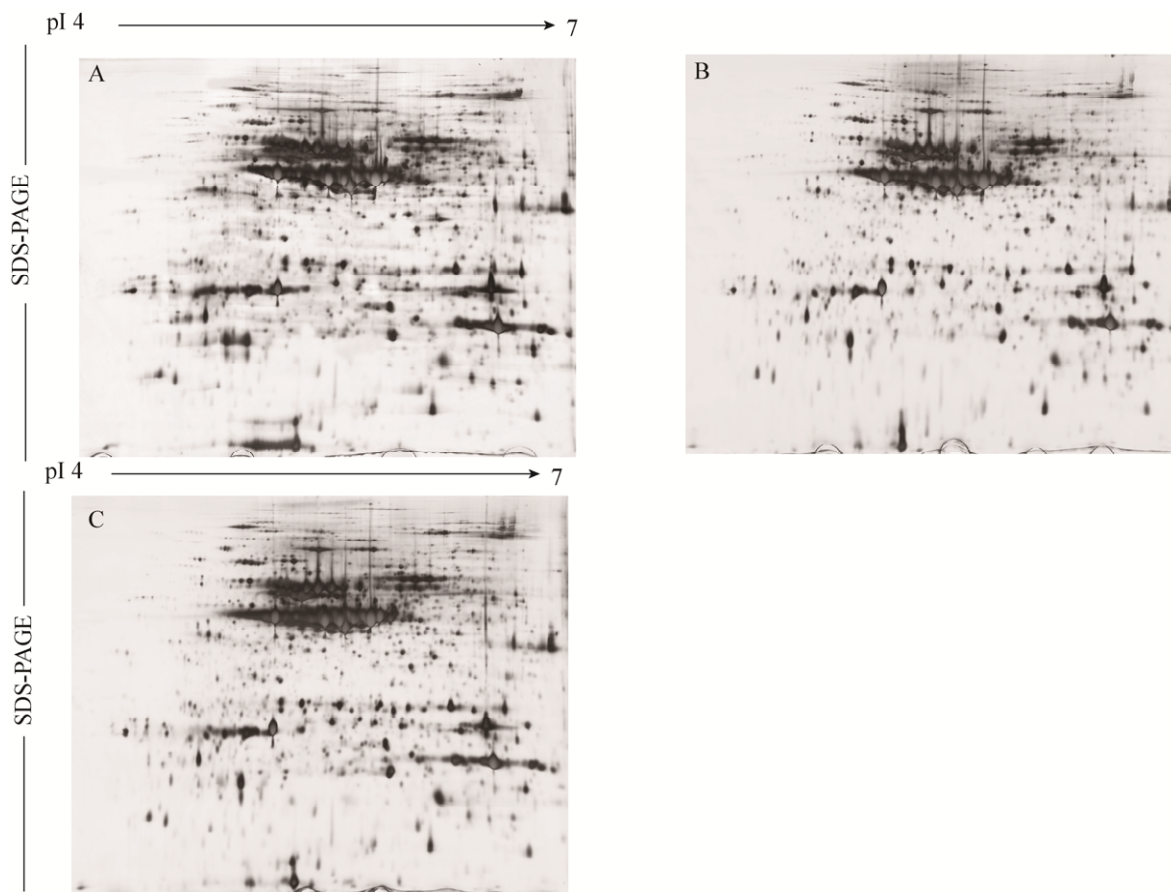


图 2 抗虫绿豆与感虫绿豆种子蛋白的 2-DE 图谱 (第一向用 pH4-7 的胶条等电聚焦, 第二向采用 12.5%的 SDS-PAGE 进行分离, A、B、C 分别代表潍绿 2117 号、晋绿 7 号、B20)

Fig. 2 2-DE maps of seed proteins from resistance and susceptible mungbean to bruchids. The first dimension was run using a pH gradient from 4 to 7, and the second dimension was a 12.5% SDS-PAGE. A, B and C corresponding to Weilv 2117, Jinlv No. 7, B20.

点和分子量均不相同；蛋白点 B31 为 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶亚基结合蛋白，作为陪伴蛋白帮助 RuBis CO 在体内正确折叠组装；B41 为合成淀粉酶抑制剂和胰蛋白酶抑制剂的前体多肽链。还有

2 个分子量相同而等电点不同的未知蛋白 (B20、B21)，另外 7 个蛋白点 (B58、B48、B47、B38、B25、B12、B39) 在 UniProt 数据库中没有得到验证。

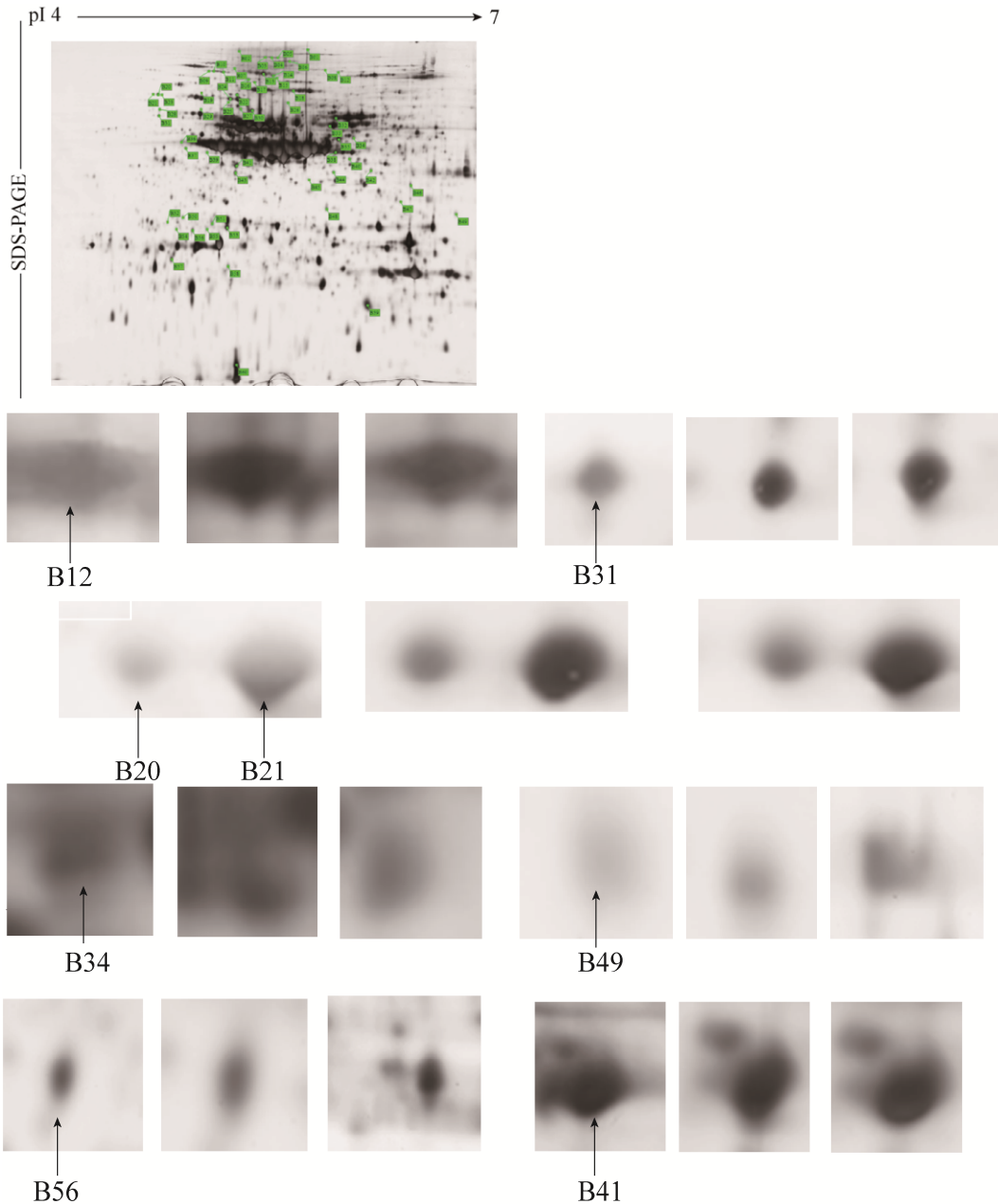


图 3 抗、感绿豆种子差异蛋白点 (箭头所指为差异蛋白点)

Fig. 3 Principal differentiated protein spots from insect-resistant and insect-susceptible mungbean. The differentiated spots are marked by arrows.

表 1 抗、感绿豆种子差异蛋白点的鉴定结果

Table 1 Identification of differentially expressed protein spots from insect-resistant and insect-susceptible mungbean

Spot number	Accession number	Protein name	Mr/pI	Sequence coverage (%)	Score	Function
B13	Q198W5_VIGRA	Alpha subtype 8S globulin protein	5.85/51 944	36	103	Nutrient storage
B20	V7BRF6_PHAVU	Uncharacterized protein	5.20/65 239	25	133	
B21	V7BRF6_PHAVU	Uncharacterized protein	5.56/65 239	31	172	
B31	G3E7M5_SOYBN	RuBis CO subunits binding protein	5.12/61 804	22	108	Chaperonin
B34	Q198W3_VIGRA	Beta subtype 8S globulin protein	6.49/51 751	43	66	Nutrient storage
B49	Q198W4_VIGRA	Alpha subtype 8S globulin protein	5.58/51 599	13	80	Nutrient storage
B56	Q198W4_VIGRA	Alpha subtype 8S globulin protein	5.58/51 599	29	241	Nutrient storage
B41	P16159	Precursor peptide chains for	5.38/16 122	31	68	Compound amylase inhibitor and trypsin inhibitor

3 讨论

目前,双向电泳和质谱技术已成为生物学领域对细胞或组织内蛋白质进行分离和鉴定的核心技术。本研究采用双向电泳和质谱技术,结合 UniProt 蛋白质数据库,成功鉴定出抗、感虫绿豆的 15 个差异蛋白点,其中抗虫绿豆与感虫绿豆蛋白表达差异为 10 000 倍的蛋白点有 2 个,分别为 α 亚型 8S 球蛋白和未知蛋白;抗虫绿豆与感虫绿豆蛋白表达差异为 23 倍的蛋白点有 1 个,是核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RuBis CO) 亚基结合蛋白。

据报道,8S 球蛋白 α 亚型与大豆 β 伴大豆球蛋白约有 61% 的序列一致性,与大豆 β 伴大豆球蛋白 β 肽链序列有 71.4% 的一致性^[10-11]。大豆抗原中的主要致敏因子 β 伴大豆球蛋白可导致饲料中的蛋白质利用率降低,而不利於畜禽的生长发育,尤其是对于低龄动物,因其肠道发育不成熟,严重者会引起小肠绒毛脱落^[12]。在本研究中,抗虫绿豆品种中 4 个 8S 球蛋白 α 亚型及 β 亚型的表达量均为感虫绿豆 2.5 倍以上,其中一个 8S 球蛋白 α 亚型蛋白点达 10 000 倍,推测抗虫绿豆中 8S 球蛋白 α 亚型及 β 亚型可能与大豆 β 伴大豆球蛋白有同样的作用,影响到绿豆象对蛋白的吸收利

用,尤其是在卵发育为幼虫初期,严重影响了幼虫对营养的正常吸收,从而阻碍了绿豆象的正常生长发育。我们的前期实验表明,当绿豆象取食抗虫绿豆后,绿豆种子内存在大量低龄死亡幼虫,且成虫羽化率显著下降^[13],推测可能与这些抗虫品种中含有较多的抗虫性 8S 球蛋白有关。

核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶伴侣蛋白 (RuBis CO),即分子伴侣 60 (Cpn60),也能作为细胞表面受体与各种配体和细菌作用,作为毒素发挥作用^[14-17]。据报道,昆虫体内的 RuBis CO 伴侣蛋白与细菌的生长繁殖密切相关^[18-20]。在本试实中,抗虫绿豆 RuBis CO 伴侣蛋白表达量是感虫绿豆的 23 倍,当绿豆象取食抗虫绿豆后其体内 RuBis CO 伴侣蛋白增多,是促进了绿豆象体内细菌的繁殖,或与其他配体结合形成毒素导致绿豆象发育受阻甚至死亡,还有待进一步验证,核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶伴侣蛋白与绿豆象的互作机制还有待进一步研究。

胰蛋白酶抑制剂 (Trypsin inhibitor, TI) 是一类具有抑制胰蛋白酶活性的多肽或蛋白质,也是参与抗虫防御体系中最重要蛋白质之一^[21]。据报道,豇豆籽粒内所含的胰蛋白酶抑制剂对四纹豆象生长发育有很好的阻滞作用,且对其他鳞翅目和部分鞘翅目害虫如玉米根甲 *Diabrotica*

undocinpunctata、棉铃象甲 *Anthonomus grandis*、杂拟谷盗 *Tribolium confusum* 等也有抑制作用^[22]。Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂 (BBI) 可抑制甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫肠道内的胰蛋白酶活性,使幼虫体重变轻、发育历期延长^[23]。BBI 对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hubner 的抗营养效应在于它激活和抑制了棉铃虫体内的蛋白酶活性,导致其体内蛋白酶之间的相互协调性遭到破坏,使进入中肠的蛋白质不能有效消化吸收,从而使昆虫的正常生长发育受阻^[24],据报道,绿豆胰蛋白酶抑制剂 Lys 片段活性中心序列在体外成功地合成了对 furin 蛋白有强抑制活力的 16 肽^[25],表明胰蛋白酶抑制剂的前体加工酶的前体肽具有特异性抑制剂的功能。本研究中,抗虫绿豆合成胰蛋白酶抑制剂的前体物质含量显著高于感虫绿豆,其抗虫作用可能是这些前体物质本身或其在绿豆象体内合成蛋白酶抑制剂抑制了绿豆象体内的蛋白酶活性,从而使绿豆象的生长发育受到影响。

综上所述,在抗、感虫绿豆中差异较大的蛋白点 8S 球蛋白 α 和 β 亚型、RuBis CO 伴侣蛋白及胰蛋白酶抑制剂的前体,在抗虫绿豆中存在的作用可能是作为抗虫物质中一种单独作用或几种物质联合作用,影响了绿豆象的生长发育甚至导致死亡,这些差异蛋白与抗虫性的量效关系及联合效应还需要进一步验证。

REFERENCES

- [1] Wang Y, Talekar NS, Chen B, et al. Study on the influence of legume varieties on the growth and oviposition preference of *Callosobruchus chinensis* (L.). J Yunnan Agric Univ, 2010, 25(1): 34–39 (in Chinese).
王燕, Talekar NS, 陈斌, 等. 绿豆象在不同豆类上的生长发育及产卵选择性研究. 云南农业大学学报, 2010, 25(1): 34–39.
- [2] Wang XF, Gao WQ, Liu JF, et al. Plant defensive strategies and environment-driven mechanisms. Chin J Ecol, 2015, 34(12): 3542–3552 (in Chinese).
王小菲, 高文强, 刘建锋, 等. 植物防御策略及其环境驱动机制. 生态学杂志, 2015, 34(12): 3542–3552.
- [3] Zhang B, Liu Y, Zhang YH, et al. Research progress in regulatory mechanism and proteomics of plant induced insect resistance. Hebei J For Orch Res, 2016, 31(3): 239–244 (in Chinese).
张斌, 刘洋, 张玉贺, 等. 植物诱导抗虫性的调控机制及蛋白组学研究进展. 河北林果研究, 2016, 31(3): 239–244.
- [4] Sugawara F, Ishimoto M, Le-Van N, et al. Insecticidal peptide from mungbean: a resistant factor against infestation with azuki bean weevil. J Agric Food Chem, 1996, 44(10): 3360–3364.
- [5] Kaga A, Ishimoto M. Genetic localization of a bruchid resistance gene and its relationship to insecticidal cyclopeptide alkaloids, the vignatic acids, in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Mol Gen Genet, 1998, 258(4): 378–384.
- [6] Lin C, Chen CS, Horng SB. Characterization of resistance to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in mungbean variety VC6089A and its resistance-associated protein VrD1. J Econ Entomol, 2005, 98(4): 1369–1373.
- [7] Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. Nature, 1999, 402(6763): 715–720.
- [8] Zhu HJ, Zhao XY, Yan HB, et al. Breeding of bruchid resistant mung bean variety Jinlyudou 7. J Shanxi Agric Sci, 2012, 40(6): 606–607, 612 (in Chinese).
朱慧珺, 赵雪英, 阎虎斌, 等. 抗豆象绿豆新品种晋绿豆 7 号的选育. 山西农业科学, 2012, 40(6): 606–607, 612.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [10] Bernardo AEN, Garcia RN, Adachi M, et al. 8S globulin of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]: cloning and characterization of its cDNA isoforms, expression in *Escherichia coli*, purification, and crystallization of the major recombinant 8S isoform. J Agric Food Chem, 2004, 52(9): 2552–2560.
- [11] Liu H, Kang YF. Research progress on globulins of edible legumes. Cer Oil, 2013, 26(5): 5–8 (in Chinese).

- 刘红, 康玉凡. 食用豆类球蛋白研究进展. 粮食与油脂, 2013, 26(5): 5-8.
- [12] Wang JX, Qin GX, Long GH, et al. Stability and immunoreactivity of β -conglycinin to hydrolysis *in vitro*. Chin J Anim Sci, 2014, 50(9): 45-49 (in Chinese).
王锦欣, 秦贵信, 龙国徽, 等. B-伴大豆球蛋白解物的抗消化性及免疫活性变化的研究. 中国畜牧杂志, 2014, 50(9): 45-49.
- [13] Cheng XF, Zhang YW, Zhang XH. Effects of insect-resistant mung bean on development and activities of several enzymes of Chinese bean weevil *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae). J Plant Protect, 2017, 44(3): 420-426 (in Chinese).
成小芳, 张耀文, 张仙红. 抗虫绿豆对绿豆象生长发育及体内几种酶活性的影响. 植物保护学报, 2017, 44(3): 420-426.
- [14] Yong ZH. *In vitro* reassembly of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the function of chaperone[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2007 (in Chinese).
勇振华. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的体外重组及分子伴侣蛋白的功能[D]. 北京: 中国科学院, 2007.
- [15] Ashida H, Danchin A, Yokota A. Was photosynthetic RuBisCO recruited by acquisitive evolution from RuBisCO-like proteins involved in sulfur metabolism? Res Microbiol, 2005, 156(5/6): 611-618.
- [16] Chen HM, Chen Y, Wang D, et al. The role of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in resistance of plant to abiotic stresses. Plant Physiol J, 2016, 52(11): 1637-1648 (in Chinese).
陈候鸣, 陈跃, 王盾, 等. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶在植物抗逆性中的作用. 植物生理学, 2016, 52(11): 1637-1648.
- [17] Zhou L. Study on agronomic traits and resistance to salt of rice lines over-expressed chloroplast Chaperonin 60[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015 (in Chinese).
周丽. 水稻叶绿体伴侣蛋白 Cpn60 超表达株系农艺性状和抗盐性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [18] Henderson B, Fares MA, Lund PA. Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions. Biol Rev, 2013, 88(4): 955-987.
- [19] Horwich AL, Apetri AC, Fenton WA. The GroEL/GroES *cis* cavity as a passive anti-aggregation device. FEBS Lett, 2009, 583(16): 2654-2662.
- [20] Sakamoto M, Ohkuma M. Usefulness of the *hsp60* gene for the identification and classification of Gram-negative anaerobic rods. J Med Microbiol, 2010, 59(11): 1293-1302.
- [21] Ruan JJ, Yan J, Han XY, et al. Extraction of trypsin inhibitor from walnut seeds by reverse micelle and study on anti-insect. J Environ Entomol, 2016, 38(2): 418-423 (in Chinese).
阮景军, 严俊, 韩学易, 等. 反胶束法萃取核桃胰蛋白酶抑制剂及其抗虫研究. 环境昆虫学报, 2016, 38(2): 418-423.
- [22] Xu HL, Zhai HL, Wang F, et al. Cowpea trypsin inhibitor gene (*cpti*) and its application in insect resistance transgenic plants. J Agric Sci Technol, 2008, 10(1): 18-27 (in Chinese).
徐鸿林, 翟红利, 王锋, 等. 豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*cpti*)及其在抗虫转基因作物中的应用. 中国农业科技导报, 2008, 10(1): 18-27.
- [23] Broadway RM, Duffey SS. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera-exiqua*. J Insect Physiol, 1986, 32(10): 827-833.
- [24] Wang CL, Zhang YZ, Sun ZG. Progress on the research of Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor. Soybean Sci, 2007, 26(5): 757-761 (in Chinese).
王长良, 张永忠, 孙志刚. Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂研究进展. 大豆科学, 2007, 26(5): 757-761.
- [25] Qi RF. The gene cloning and expression of mung bean trypsin inhibitor[D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2005 (in Chinese).
祁瑞峰. 绿豆胰蛋白酶抑制剂的基因克隆及其表达[D]. 兰州: 西北师范大学, 2005.

(本文责编 郝丽芳)