

2.4 KTI 和 BBI 基因序列同源性分析

经 Blastp 比对,翻译后得到的 KTI 氨基酸序列中具有 STI(soybean trypsin inhibitor family of protease inhibitors)超级家族的保守序列(图 5a),通过 DNAMAN 比对氨基酸同源性分析发现其氨基酸序列存在 6 个保守基序(图 6a),分别是 LFL、LPSA、NGG、TVVQS、AVK 和 RLV,以及多个保守氨基酸残基。即墨野生大豆的胰蛋白酶抑制剂 KTI 的氨基酸序列与其它多种豆类的同源序列比对的相似性为

66.10%,说明胰蛋白酶抑制剂 KTI 在豆类中相对较保守,C 端保守性要高于 N 端。

野生大豆的 BBI 氨基酸序列中具有 BBI(Bowman-Birk type proteinase isoinhibitor)家族的保守序列(如图 5b),通过比对 8 种豆类氨基酸同源性可得其氨基酸序列存在 5 个保守基序(图 6b),即墨野生大豆的胰蛋白酶抑制剂 BBI 的氨基酸序列与其它多种豆类的同源序列比对的相似性为 79.79%,说明胰蛋白酶抑制剂 BBI 在豆类中保守性较好。

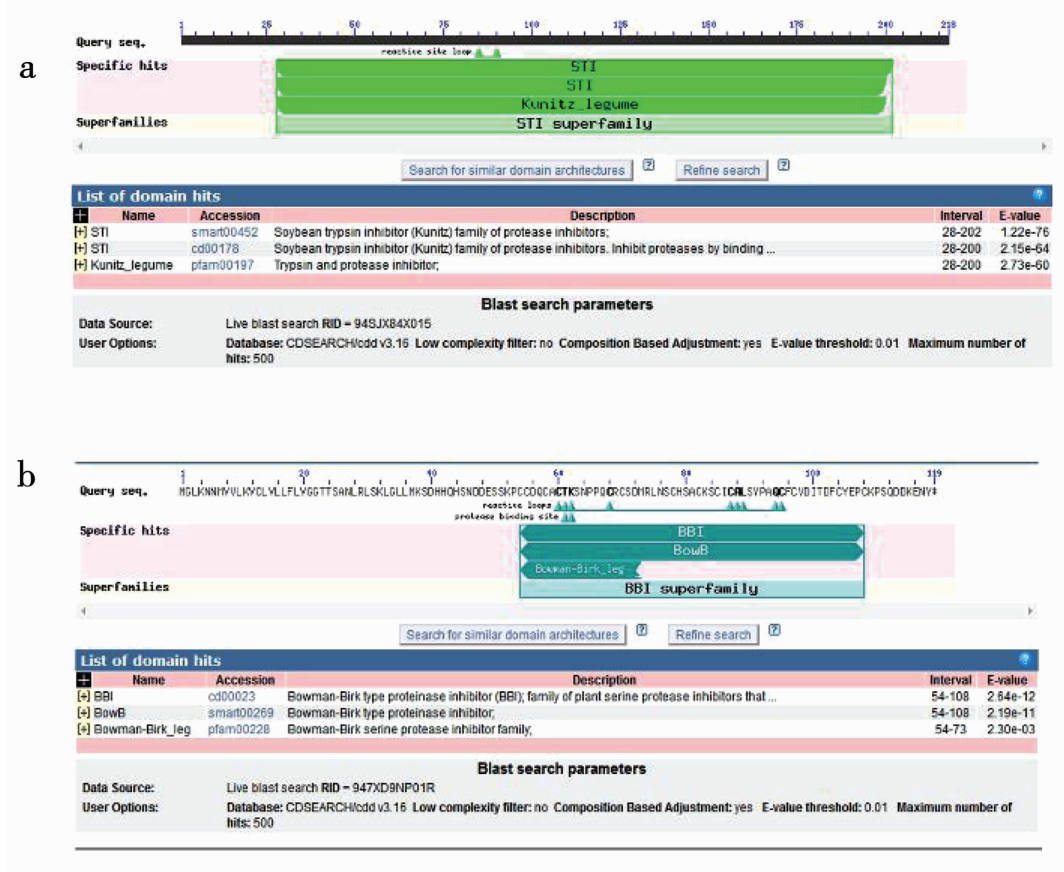
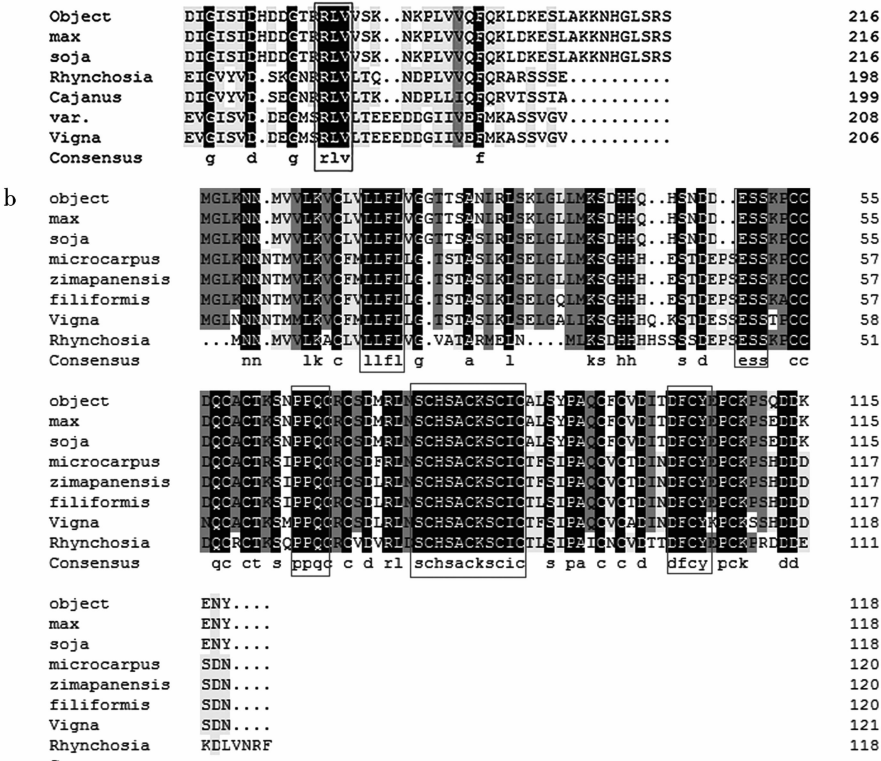


图 5 即墨野生大豆 KTI(a) 和 BBI(b) 的氨基酸 Blastp 比对结果

Fig. 5 The amino acid Blastp result of of KTI (a) and BBI (b) of Glycine soja

a	Object	MK.....STIFFALFFCAFTISLPSAIDDFVLNEGNTFNGGTYIYLSDITAFGG	53
	max	MK.....STIFFALFFCAFTISLPSAIDDFVLNEGNTFNGGTYIYLSDITAFGG	53
	soja	MK.....STIFFALFFCAFTISLPSAIDDFVLNEGNTFNGGTYIYLSDITAFGG	53
	Rhynchosia	MK...G..TATLLSLIVFZFA.SLPSATSFDFLDTDCILLNGGTYVAVKRGSGG	53
	Cajanus	MK...G..ITILLSLFLFGLFT.SLPSATADFVLDTGKLLNGGTYVVFVKRGSGG	54
	var.	MKTLIAFIPSTIFFSLFLSIFT.SLPSAADVVTIRGDAFNNGGTYHILFLFGVRDG	59
	Vigna	MKSLIA..STYFFESLFLSIFT.SLPSAADVVTIRGDAFNNGGTYHILFLFGVRDG	57
	Consensus	mk.....lflf.....s.....lpssa.....d.....g.....l.....ngg.....y.....g.....	
	Object	.IRAAFTGERTCPITVVQSRN.ELDKIGITIISSPYRIRFIAEGHPLSLKFSFAVIMLC	111
	max	.IRAAFTGERTCPITVVQSRN.ELDKIGITIISSPYRIRFIAEGHPLSLKFSFAVIMLC	111
	soja	.IRAAFTGERTCPITVVQSRN.ELDKIGITIISSPYRIRFIAEGHPLSLKFSFAVIMLC	111
	Rhynchosia	GIELTATGERTCPITVVQSRN.EVSKGKPVTLYSAILLYINQNFPIRIGFTISAPT...	109
	Cajanus	GIELATGERTCPITVVQSRN.KASKGNPCLVLSILFAYITPNFPQINFASVPT...	110
	var.	GVELATGERTCPITVVQSRNISKIFRGLPVIISSEYRIAYINEALILNLAFSPSPS...	116
	Vigna	GVELATGERTCPITVVQSRNISKIFRGLPVIISSEYRIAYINEGLILNLAFSPSPS...	114
	Consensus	tg e cp tvvqs.....g.....s.....i.....f.....s.....c.....	
	Object	VGIFTBWSVEDLEGEAVKIGENKDAMDGWRRLERVSDDEFNNYALVFCPQQAEDDRCG	171
	max	VGIFTBWSVEDLEGEAVKIGENKDAMDGWRRLERVSDDEFNNYALVFCPQQAEDDRCG	171
	soja	VGIFTBWSVEDLEGEAVKIGENKDAMDGWRRLERVSDDEFNNYALVFCPQQAEDDRCG	171
	Rhynchosia	APT.SINTIVEGLEGEAVKIGDYDDARSGSKIKKVSE.DSHDYKTVFCSG...DDTICE	164
	Cajanus	APT.LLITVVDGLEGEAVKIGGYRDARSGAQVQKASHRGCNHYLDLFC...DDTICE	165
	var.	APTTPKWTIVKLDLEGEAVKIPGYSSTVSGWKEIKSSL..EYLYKVVFCARS..GGICG	172
	Vigna	APTTPKWTIVKLDLEGEAVKIPGYSSTVSGWKEIKSSL..EYLYKVVFCARS..GGICG	170
	Consensus	w v l eg avk.....g f.....s.....yk fc.....c.....	



图中方框表示保守结构域，深色区域为保守氨基酸。选取的物种与其所对应的 Genebank 号分别为：a: *Glycine soja* Sieb. et Zucc (NP_001238611.2), *Glycine soja* (BAF95191.1), *Glycine max* (BAD04941.1), *Vigna radiata* var. *radiata* (XP_014492684.1), *Vigna angularis* (XP_017418043.1), *Rhynchosia sublobata* (ALA09301.1), *Cajanus cajan* (XP_020224523.1); b: *Glycine soja* Sieb. et Zucc (BAB86783.1), *Glycine max* (NP_001238547.2), *Glycine soja* (KHM99782.1), *Phaseolus microcarpus* (CAL64060.1), *Phaseolus zimapanensis* (CAQ52360.1), *Phaseolus filiformis* (CAL69281.1), *Vigna subterranea* (AHY03234.1), *Rhynchosia sublobata* (ALA09300.2)。

Boxes indicate the conserved motif. The sequences taken from GenBank are as follows: a: *Glycine soja* Sieb. et Zucc (NP_001238611.2), *Glycine soja* (BAF95191.1), *Glycine max* (BAD04941.1), *Vigna radiata* var. *radiata* (XP_014492684.1), *Vigna angularis* (XP_017418043.1), *Rhynchosia sublobata* (ALA09301.1), *Cajanus cajan* (XP_020224523.1); b: *Glycine soja* Sieb. et Zucc (BAB86783.1), *Glycine max* (NP_001238547.2), *Glycine soja* (KHM99782.1), *Phaseolus microcarpus* (CAL64060.1), *Phaseolus zimapanensis* (CAQ52360.1), *Phaseolus filiformis* (CAL69281.1), *Vigna subterranea* (AHY03234.1), *Rhynchosia sublobata* (ALA09300.2)

图6 KTI(a)和BBI(b)同源序列分析

Fig. 6 Homologous sequence analysis of KTI (a) and BBI (b)

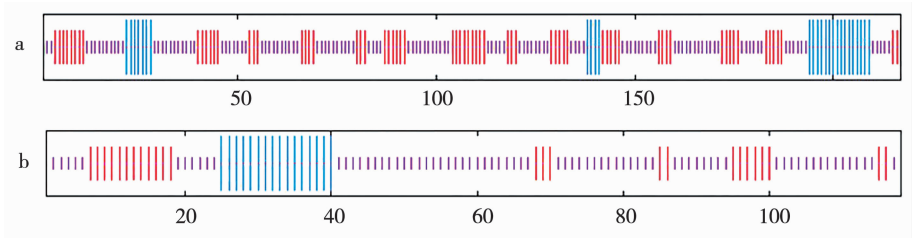
2.5 KTI 和 BBI 基因的二级结构分析

蛋白质序列分析结果表明(图7a),KTI 蛋白质二级结构主要由无规则卷曲(Random coil)、α 螺旋(Alpha helix)和延伸链(Extended strand)组成。其中 α 螺旋占 12.44%,主要分布在序列的 N 端和 C 端;延伸链占 31.34%;无规则卷曲比例最大占 51.22%,分布在整个序列中。BBI 蛋白质二级结构(图7b)也是由无规则卷曲、α 螺旋和延伸链组成。其中 α 螺旋为 13.56%,延伸链为 21.29%,都主要分布在序列靠近 N 端的位置;无规则卷曲为 65.25%,同样所占比例最大。

2.6 KTI 和 BBI 蛋白空间结构分析

通过在线软件 SWISS-MODEL 分析,将大豆的

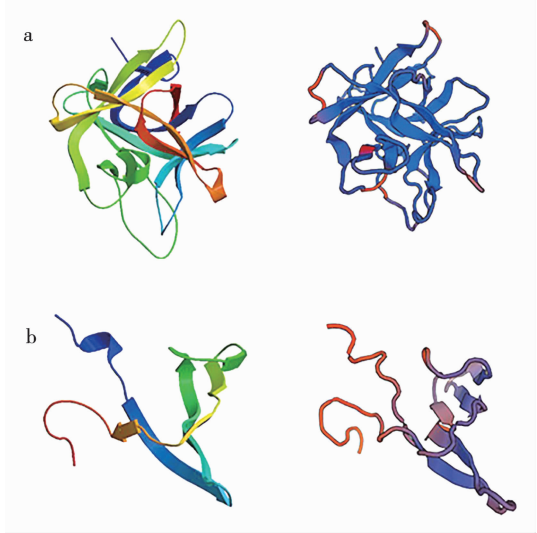
α-射线检测晶体结构作为参比模板,构建了野生大豆 KTI 和 BBI 的比较三维结构模型。图 8a 为 KTI 蛋白 26 ~ 202 位之间区域的比较三维结构模型,两种 KTI 序列相似率达 100%,说明 KTI 的保守性非常高。通过三维结构分析可知该区域主要是由无规则卷曲和延伸链构成,α 螺旋几乎没有,这与二级结构预测结果相符。通过同样方法构建野生大豆 BBI 蛋白 47 ~ 117 位之间区域的比较三维结构模型,由图 8b 可知两种 BBI 序列相似率达到 98.58%,体现了 BBI 的高保守性。BBI 的主要结构由延伸链和无规则卷曲构成,没有 α 螺旋,这与二级结构预测结果同样一致。



蓝色部分代表 α 螺旋;红色部分代表延伸链;紫色部分代表无规则卷曲。
The part of blue/red/purple represent the alpha helix/extended strand/random coil.

图 7 即墨野生大豆 KTI (a) 和 BBI (b) 的二级结构预测

Fig. 7 Prediction of secondary structure of KTI (a) and BBI (b) in *Glycine soja* Sieb. et Zucc.



左:SWISS-MODEL 模板库中收录的 KTI 和 BBI 三维结构;右:野生大豆 KTI 和 BBI 经 SWISS-MODEL 预测的三维结构。
Left:KTI and BBI 3D structure stored in SWISS-MODEL Template Library; Right: The 3D structure of KTI and BBI protein of *Glycine soja* deduced by SWISS-MODEL.

图 8 即墨野生大豆 KTI (a) 和 BBI (b) 蛋白三维结构预测
Fig. 8 The three-dimensional structure of deduced KTI (a) and BBI (b) protein of *Glycine soja*

3 结论与讨论

本研究成功克隆了野生大豆胰蛋白酶抑制剂 KTI 和 BBI 基因,并对 WSTI 目的基因测序并做了生物信息学分析。

通过基因克隆,成功扩增野生大豆胰蛋白酶抑制剂两个基因 KTI 和 BBI。本文扩增 K 型抑制剂,选用大豆种子进行 RNA 的提取培养,能够提高胰蛋白酶抑制剂的表达率,预测序列属于 KTI₃类型,序列含有一个 ORF 开放阅读框,共 654 bp,与 Birk^[8]的研究结果相一致。KTI 氨基酸序列中含有 STI 家族的保守序列,比对氨基酸同源性分析发现其氨基酸序列存在 6 个保守结构域,分别是 LFL、LPSA、NGG、TVVQS、AVK 和 RLV,以及多个保守氨基酸残基,与其它多种豆类的同源序列比对的相似性为

66. 10%,说明胰蛋白酶抑制剂 KTI 在豆类中相对比较保守。其中第 80 位的丝氨酸和第 90 位的精氨酸构成其活性位点,蛋白二级结构预测结果与比较三维结构模型结果一致。BBI 在野生大豆和栽培大豆中是多基因家族,在大豆叶片中优势表达^[27],所以必须长至叶片后进行 RNA 的提取以完成 B 型抑制剂的扩增,发现序列含有 1 个 ORF,共 357 bp,通过基因比对,属于 BBI-A 型^[28]。氨基酸序列中具有 BBI 家族的保守序列,存在 5 个保守结构域,与其它多种豆类的同源序列比对的相似性为 79. 79%,说明 BBI 在豆类中保守性比较好。预测得到野生大豆 BBI 蛋白的二级结构,主要由 α 螺旋、延伸链和无规则卷曲组成,与 Wu 等^[29]的研究结果证实普通大豆 BBI 的构象不含 α -螺旋构型不同,这一结果说明野生大豆与普通大豆胰蛋白酶抑制剂有着非常大的差别,推测可能与野生大豆抗逆性有关。构建了野生大豆 BBI 比较三维结构模型,与二级结构预测结果相符。

本研究利用分子生物学技术分别对两种野生大豆胰蛋白酶抑制剂基因进行扩增和生物信息学分析,通过对两种野生大豆胰蛋白酶抑制剂的序列同源性及蛋白高级结构分析,为后期试验利用大肠杆菌、酵母菌以及高等植物等表达系统异源表达提高分子生物学资料,为进一步基因表达以及转基因抗虫植物和抗肿瘤蛋白的研究奠定了基础。

参考文献

[1] Laskowski J M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases[J]. Annual Review of Biochemistry, 1980, 49(1): 593-626.

[2] Liener I E. Effects of processing on antinutritional factors in legumes: The soybean case [J]. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 1996, 44(4 Suppl 1): 48S-54S.

[3] Gando S, Kameue T, Matsuda N, et al. Systemic inflammation and disseminated intravascular coagulation in early stage of ALI and ARDS: Role of neutrophil and endothelial activation[J]. Inflammation, 2004, 28(4): 237-244.

[4] 张莉,汪东风,张宾,等. 豆类植物蛋白酶抑制剂研究进展[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 314-319. (Zhang L, Wang D F, Zhang B, et al. Advances in the study of protease inhibitors from leguminous plants[J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 314-319.)

[5] Dey P M. Methods in plant biochemistry [M]. Academic Press, 2012.

[6] Bowles D J. Defense-related proteins in higher plants[J]. Annual Reviews,1990,59:873-907.

[7] 吴非,霍贵成. 酶法钝化大豆胰蛋白酶抑制剂的研究[J]. 食品研究与开发, 2002, 23(6): 26-28. (Wu F, Huo G C. Inactivation of trypsin inhibitors in soybean by proteolytic enzymes[J]. Food Research and Development,2002, 23(6): 26-28.)

[8] Birk Y. Trypsin and chymotrypsin inhibitors from soybeans[J]. Methods in Enzymology, 1976, 45: 700-707.

[9] 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[J]. 大豆科学, 2007, 26(5): 757-761. (Wang C L, Zhang Y Z, Sun Z G. Progress on the research of bowman-birk soybean trypsin inhibitor[J]. Soybean Science, 2007, 26(5): 757-761.)

[10] 杨志宏,周三,关崎春雄,等. 山东产野生大豆胰蛋白酶抑制剂的初步研究[J]. 西北植物学报, 2009 (8): 1562-1567. (Yang Z H, Zhou S, Guanqi C X, et al. Study of trypsin inhibitor of wild soybean (*Glycine soja*) in Shandong[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2009 (8): 1562-1567.)

[11] 赵洪锟,李启云,王玉民,等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (SKTI) 研究进展[J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 218-222. (Zhao H K, Li Q Y, Wang Y M, et al. The progress of the studies on soybean Kunitz trypsin inhibitor [J]. Soybean Science, 2002, 21(3): 218-222.)

[12] 吕品,柴晓杰,王丕武,等. 大豆胰蛋白酶抑制剂 KSTI3 基因的克隆及其植物表达载体的构建[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(3): 275-278. (Lyu P, Chai X J, Wang P W, et al. Cloning and construction of expression vector on KSTI3 gene of soybean Kunitz-type trypsin inhibitor[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2007, 29(3): 275-278.

[13] Wang W, Zhu Z, Gao Y, et al. Obtaining a transgenic upland cotton harboring two insecticidal genes[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(4): 384-388.

[14] 林春晶,林秀峰,董英山,等. Ti ~ d 基因对水稻的转化及转基因植株的抗虫性[J]. 高技术通讯,2003(5):33-37,64. (Lin C J, Lin X F, Dong Y S, et al. Tid gene transformation rice plants and the plants insect-resistant[J]. High Technology Letters, 2003 (5):33-37,64.)

[15] Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, et al. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation[J]. Clinical and Experimental Metastasis, 2004, 21(2): 159-166.

[16] 黄高霞,张莉,汪东风,等. 大豆胰蛋白酶抑制剂对饮食肥胖小鼠的减肥作用[J]. 大豆科学, 2012, 31(2): 284-287. (Huang G X, Zhang L, Wang D F, et al. Soybean trypsin inhibitor shows anti-obesity effect in high fat diet-induced obesity mice [J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 284-287.)

[17] McGuinness E E, Morgan R G, Wormsley K G. Fate of pancreatic nodules induced by raw soya flour in rats[J]. Gut, 1987, 28 (Suppl): 207-212.

[18] Zhou T, Han S, Li Z, et al. Purification and quantification of Kunitz trypsin inhibitor in soybean using two-dimensional liquid chromatography[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(10): 3350-3360.

[19] Harini T, Basetty S, Jasti L S, et al. Recovery of functionally active trypsin inhibitor (SBTI) and lipoxygenase (LOX) from soymilk via multimodal technique[J]. Reactive and Functional Polymers, 2017, 121: 45-50.

[20] 王旻. 即墨野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. et Zucc) 的营养评价及其胰蛋白酶抑制剂的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2013. (Wang M. Study on the nutritional evaluation and trypsin inhibitor of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc) in Jimo[D]. Qingdao:Ocean University of China,2013.)

[21] Odani S, IKENAKA T. Studies on soybean trypsin inhibitors; VI-II. disulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor [J]. The Journal of Biochemistry, 1973, 74(4): 697-715.

[22] Jin T, Yu H, Wang D, et al. Bowman-Birk inhibitor concentrate suppresses experimental autoimmune neuritis via shifting macrophages from M1 to M2 subtype[J]. Immunology Letters, 2016, 171: 15-25.

[23] Li J, Ye L, Cook D R, et al. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor inhibits neurotoxicity of LPS-activated macrophages[J]. Journal of Neuroinflammation, 2011, 8(1): 15.

[24] Safavi F, Rasouli J, Mari E, et al. Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) induces IL10 production in human T cells and suppresses effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by Tr1 induction[J]. 2013, 19(11): 233-233.

[25] Ma T C, Guo L, Zhou R H, et al. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) blocks HIV entry into macrophages[J]. Virology, 2018, 513: 91-97.

[26] 陈焱丽,王清连,石明旺,等. 野生大豆种子最佳发芽条件研究[J]. 河南农业科学, 2007, 36(3): 39-42. (Chen Y L, Wang Q L, Shi M W, et al. Methods promoting the germination of wild soybean seeds [J]. Henan Agricultural Sciences,2007, 36(3): 39-42.)

[27] 张茜,臧晓南,张学成,等. 聚球藻 *hox1* 基因的克隆和序列分析[J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2010, 40(S): 110-116. (Zhang Q, Zang X N, Zhang X C, et al. Cloning and sequence analysis of *hox1* gene from *Synechococcus cedrorum* [J]. Periodical of Ocean University of China(Natural Science Edition), 2010,40(S):110-116.)

[28] Wang Y P, Chen X T, Qiu L J. Novel alleles among soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor gene families[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 51(8): 687-692.

[29] Li J, Xiang Q, Liu X, et al. Inactivation of soybean trypsin inhibitor by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma[J]. Food chemistry, 2017, 232: 515-522.