

文章编号: 1006-3080(2021)03-0292-08

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20200323001

重组 Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂的性质及抑制机理

刘利¹, 杨帆¹, 李素霞¹, 郭奥¹, 刘晓², 王之可²(1. 华东理工大学生物反应器国家重点实验室, 上海 200237;
2. 上海雅心生物技术有限公司, 上海 200231)

摘要:利用大肠杆菌表达系统, 成功表达并纯化获得了重组 Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂(rBBTI)。对比研究了天然 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂(BBTI)和 rBBTI 的酶学性质和稳定性, 以及分别抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的抑制动力学。结果表明: rBBTI 和 BBTI 都有较好的热稳定性, pH 对 rBBTI 的活性影响较大; rBBTI 和 BBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的 most 条件分别为 pH 8、25 °C 和 pH 9、16 °C; 二者的抑制机理相同, 抑制胰蛋白酶时表现为典型的反竞争性抑制作用, 而抑制糜蛋白酶时表现为典型的非竞争性抑制作用; rBBTI 和 BBTI 对胰蛋白酶的抑制效率均高于对糜蛋白酶的抑制效率, 但 rBBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的效率略低于 BBTI。

关键词: Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂; 重组表达; 抑制动力学; 酶学性质

中图分类号: Q78

文献标志码: A

天然大豆 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂 (Soybean Bowman-Birk Trypsin Inhibitor, BBTI), 是一种双头丝氨酸蛋白酶抑制剂, 蛋白分子大小为 8 kDa, 空间结构支架由 7 对高度保守的二硫键组成^[1-2], 位于分子表面的两个活性位点 P1 (Lys16-Ser17) 和 P2 (Leu43-Ser44)^[3] 可分别抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶。有文献报道, 通过分离 BBTI 与胰蛋白酶、BBTI 与糜蛋白酶形成的二元复合物以及 BBTI 与这两种酶同时结合形成的三元复合物, 验证了 BBTI 有两个不同的活性位点, 而且两个活性位点可以独立特异性识别胰蛋白酶和糜蛋白酶^[4]。

BBTI 具有广泛的应用价值而成为研究的热点, 在转基因烟草植物中导入 BBTI 可增加植物防御病原体 and 害虫的能力^[5], 在后来的研究中发现很多谷物种子中也存在同源性的 BBTI, 可以抵御害虫对种子的伤害^[6], 形成了种子重要的防御系统。除此之外, BBTI 具有抗癌作用, 饮食中摄入大量豆类的人

群患前列腺癌、结肠癌、乳腺癌和皮肤癌的机率更小^[7], 临床实验发现 BBTI 可以有效治疗口腔白斑患者, 且使用后没有发现副作用^[8]。传统获得 BBTI 的方法是从大豆中提取, 来源及生产成本较高, 不利于 BBTI 的工业化生产和应用, 有研究报道通过基因工程技术可将 BBTI 基因进行重组表达, 如 BBTI 在枯草芽孢杆菌中实现了异源表达, 但是表达的部分 BBTI 会降解^[9]。

在本文的研究中, 使 BBTI 以融合蛋白的形式在大肠杆菌中实现可溶性表达, 经纯化后获得较高纯度的重组 BBTI (rBBTI)。对比研究了 BBTI 和 rBBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的酶学性质和抑制机理, 发现二者的酶学性质和抑制机理一致, 抑制胰蛋白酶时为一种典型的反竞争性抑制剂, 而在抑制糜蛋白酶时是非竞争性抑制剂。本实验室研究发现来源于大豆的库仑兹型抑制剂抑制胰蛋白酶时是非竞争性抑制剂^[10]。本文利用分子对接模拟分析了来

收稿日期: 2020-03-23

作者简介: 刘利(1996—), 女, 四川人, 硕士生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: 847796107@qq.com

通信联系人: 李素霞, E-mail: lisuxia@ecust.edu.cn

引用本文: 刘利, 杨帆, 李素霞, 等. 重组 Bowman-Birk 型大豆胰蛋白酶抑制剂的性质及抑制机理 [J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2021, 47(3): 292-299.

Citation: LIU Li, YANG Fan, LI Suxia, et al. Properties and Inhibition Kinetics of Recombinant Bowman-Birk Trypsin Inhibitor[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2021, 47(3): 292-299.

源于大豆的 Bowman-Birk 型抑制剂与胰蛋白酶和糜蛋白酶之间的相互作用,为其抑制这两种蛋白酶时不同的抑制效率和机理作出了合理解释。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

委托上海生工生物工程有限公司合成 BBTI 成熟基因序列。实验中使用的菌体大肠杆菌 *Escherichiacoli* (BL21) 来自实验室。重组胰蛋白酶和重组糜蛋白酶购自上海雅心生物技术有限公司。*N*-苯甲酰-*L*-精氨酸乙酯(BAEE)、*N*-乙酰基-*L*-酪氨酸乙酯(ATEE)、天然 BBTI 均购自美国 Sigma 公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 rBBTI 的诱导表达和亲和纯化 将质粒 pet-28a-UPL-BBTI 转化到菌体 *E. coli* (BL21) 中,进行诱导表达鉴定和培养,再将诱导培养得到的融合蛋白 UPL-BBTI 进行分离纯化。融合蛋白 UPL-BBTI 制备过程中使用的缓冲液为 pH 值 8.0 的 25 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl),镍柱亲和纯化后得到的融合蛋白 UPL-BBTI,经 SUMO(Small Ubiquitin-Like Modifier) 酶酶切后,用阴离子交换树脂 DEAE-FF 进行阴离子层析柱分离纯化,并用 pH 8.0 的 150 mmol/L NaCl、25 mmol/L Tris-HCl 和 pH 8.0 的 450 mmol/L NaCl、25 mmol/L Tris-HCl 溶液等体积线性洗脱,分步收集洗脱液,测定 rBBTI 活性,且合并有活性的样品。

1.2.2 抑制剂的抑制活性测定方法 抑制剂的活性测定参照中国药典的方法^[11],根据有无抑制剂时胰蛋白酶和糜蛋白酶活性的差异计算抑制剂活性。

1.2.3 抑制剂最适温度及温度稳定性 将阳性对照组 U0 和实验组 U1,在不同温度(4、16、25、37、55 °C) 中分别孵育 2 h 后测定抑制剂的活性:以最适温度下抑制剂的活性为 100%,计算其他温度下抑制剂的相对活性:以温度为横坐标,抑制剂的相对活性为纵坐标作图。

抑制剂的热稳定性实验,用经上述不同温度处理后的抑制剂,替换实验组 U1 反应体系中的抑制剂,每 2 h 测定一次经不同温度处理后的抑制剂活性。结果为 3 组平行实验平均值:规定未经处理抑制剂的活性为 100%,计算经不同温度和时间处理后的抑制剂的残留活性,以温度为横坐标,以抑制剂的残留活性为纵坐标作图。

1.2.4 抑制剂最适 pH 及 pH 稳定性 将阳性对照组 U0 和实验组 U1 中的测活缓冲液分别替换为不同 pH 值的缓冲液,并放置于 25 °C 下,2 h 后测定抑制

剂的活性。以最适 pH 值的活性为 100%,计算其他 pH 条件下的相对活性,以 pH 值为横坐标,相对活性为纵坐标作图。不同 pH 值缓冲溶液包括 100 mmol/L HAc-NaAc(pH 3.0~6.0), 100 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0~8.0) 和 100 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠 Gly-NaOH(pH 9.0~11.0)。

测定 pH 值对抑制剂稳定性的影响,用经不同 pH 值缓冲液处理 12 h 后的抑制剂,替换实验组 U1 中的抑制剂,测定抑制剂的残余活性,结果为 3 组平行实验平均值:未经处理抑制剂的活性为 100%,以 pH 为横坐标,抑制剂的残留活性为纵坐标作图。**1.2.5 测定 IC₅₀ 值和抑制动力学参数** 改变测活体系中抑制剂的浓度,分别测定抑制相同量的胰蛋白酶和糜蛋白酶的抑制率,将抑制胰蛋白酶或糜蛋白酶一半活性所需的量定义为抑制剂抑制该酶的 IC₅₀ 值。以反应体系中抑制剂的浓度为横坐标,抑制率为纵坐标作图,同时计算出 IC₅₀ 值。通过改变底物浓度,采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图方法,测定抑制常数 *K_i*。公式如式(1)所示:

$$\frac{U_{\max}}{U'_{\max}} = 1 + \frac{\rho}{K_i} \quad (1)$$

其中: *U_{max}* 和 *U'_{max}* 分别为无抑制剂和有抑制剂时酶活性的最大值; ρ 为抑制剂的质量浓度, mg/mL。

2 结果和讨论

2.1 融合蛋白 UPL-BBTI 的诱导表达和纯化

图 1(a) 示出了融合蛋白 UPL-BBTI 诱导表达鉴定。从图 1(a) 中可以看出融合蛋白 UPL-BBTI 在 *E. coli* (BL21) 中成功以可溶形式表达,表观分子量为 28 kDa。经过两步纯化后,SDS-PAGE 电泳检测显示, rBBTI 所在泳道为单一条带,见图 1(c),纯化效率由表 1 所示。相比较之前利用大肠杆菌重组系统得到 rBBTI 的方式^[12-13],本文的方法增加了 rBBTI 的表达量,融合蛋白的可溶性表达形式避免了包涵体变复性操作,纯化方式简单且具有工业化生产的可行性。

2.2 最适温度和温度稳定性

图 2 所示为 rBBTI 和 BBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的最适温度。由图 2 可知, BBTI 和 rBBTI 活性的最适温度一致,抑制胰蛋白酶时为 25 °C,抑制糜蛋白酶时为 16 °C。当温度超过 37 °C,抑制剂的活性明显下降,温度为 55 °C 时, rBBTI 的活性基本丧失,但 BBTI 仍有 15% 的活性。

BBTI 和 rBBTI 放置在 4、16、25 °C 温度条件下活性均比较稳定,37、55 °C 的温度条件下放置 4 h 以

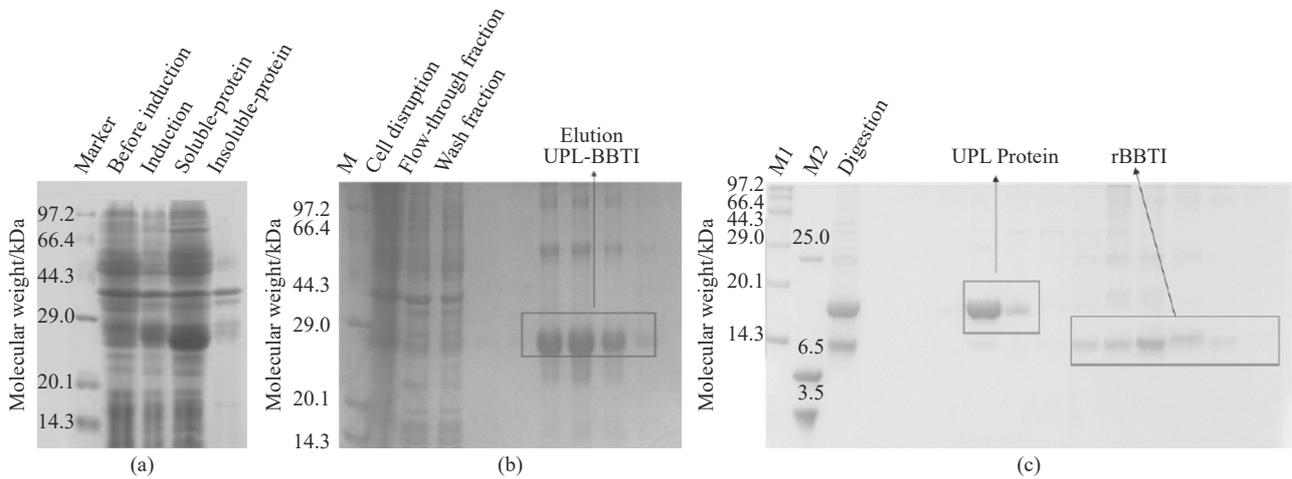


图 1 融合蛋白 UPL-BBTI 诱导表达(a), Ni 柱纯化 UPL-BBTI(b)和 DEAE-FF 层析分离纯化 rBBTI 和 UPL(c)

Fig. 1 Induced expression of fusion protein UPL-BBTI (a), purification of UPL-BBTI with Ni column affinity chromatograph (b) and separation and purification of rBBTI and UPL with DEAE-FF anion-exchange (c)

表 1 rBBTI 的纯化效率

Table 1 rBBTI Purification efficiency

Purification steps	Volume/mL	Total protein mass/ mg	Total protein activity/EPU	Specific activity/(EPU·mg ⁻¹)	Yield of activity/%
Before purification	30	30	7.5	0.24	100
After purification	18	13	4.5	0.36	60
Dialysis	18	13	6.0	0.46	130

EPU—Active unit

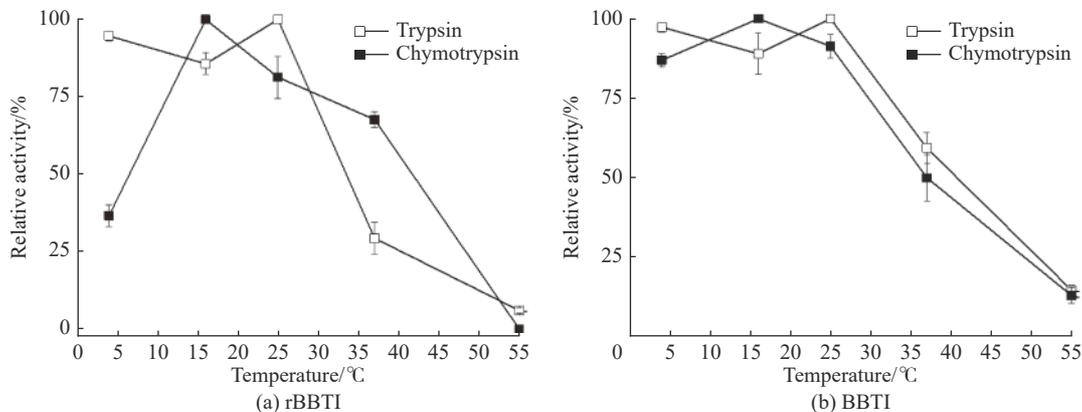


图 2 rBBTI(a)和 BBTI(b)抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的最适温度

Fig. 2 Optimal temperature of rBBTI (a) and BBTI (b) inhibiting trypsin and chymotrypsin

后,活性逐渐降低。在 55 °C 下放置 10 h 后,抑制胰蛋白酶的活性残留率为原来活性的 50% 左右,抑制糜蛋白酶活性残留率为原来活性的 45% 左右,见图 3。总体而言,BBTI 和 rBBTI 都具有较好的温度稳定性,这与以往对于 BBTI 的报道一致。BBTI 空间结构中的 7 对保守的二硫键以及两个活性域中的反平行 β 片层结构,共同决定了 BBTI 较好的热稳定性特征^[2,14]。

2.3 最适 pH 和 pH 稳定性

图 4 示出了 rBBTI 和 BBTI 抑制胰蛋白酶和糜

蛋白酶的最适 pH。由图 4 可知,当 pH 值为 8 时,rBBTI 和 BBTI 抑制胰蛋白酶的活性达到最大;当 pH 值为 9 时,rBBTI 和 BBTI 抑制糜蛋白酶的活性达到最大;在酸性或碱性条件下,rBBTI 和 BBTI 的活性较低。当 pH 值为 3 时,rBBTI 活性全部丧失;当 pH 值高于 10 时,rBBTI 和 BBTI 活性明显降低,见图 4;相比强酸或强碱条件,pH 值在 6~10 范围内,rBBTI 和 BBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶效率较高。

BBTI 和 rBBTI 在不同 pH 值下放置 12 h 后,残

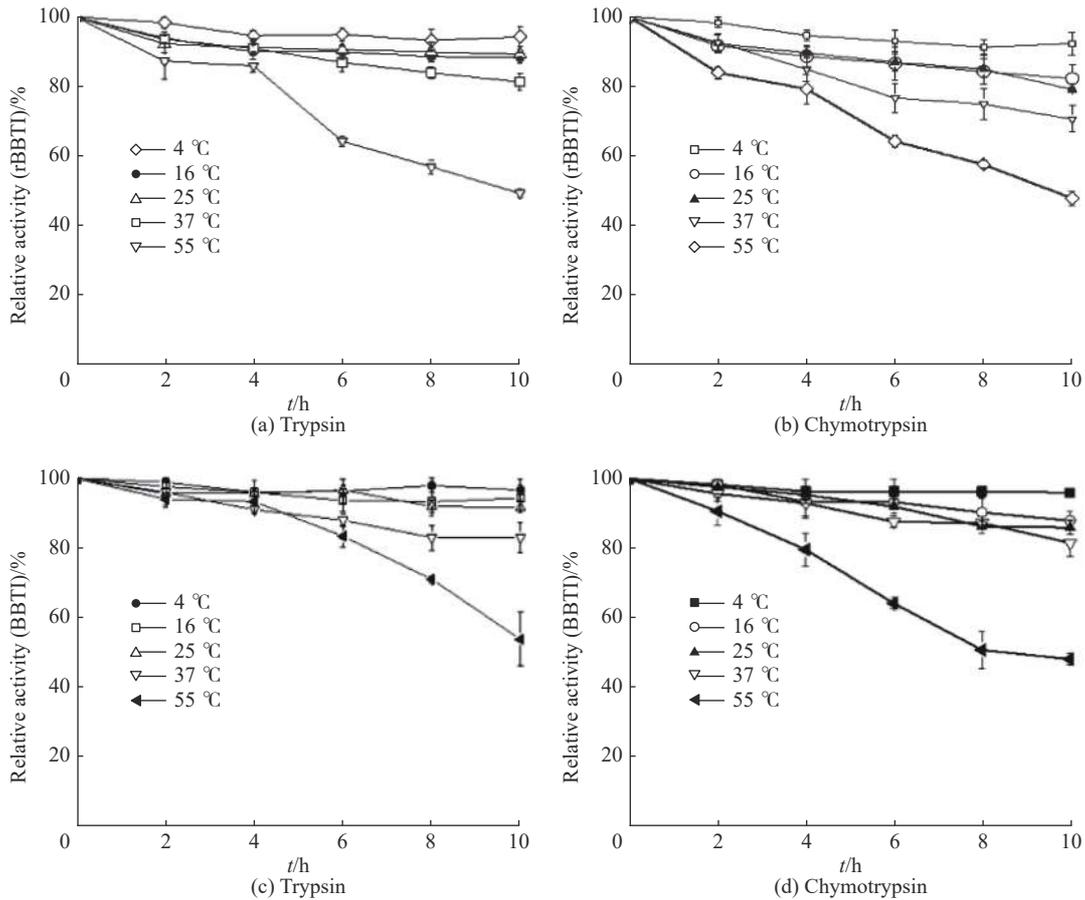


图3 rBBTI抑制胰蛋白酶(a)、rBBTI抑制糜蛋白酶(b)、BBTI抑制胰蛋白酶(c)和BBTI抑制糜蛋白酶(d)的热稳定性

Fig. 3 Thermal stability of rBBTI inhibiting trypsin (a) , rBBTI inhibiting chymotrypsin (b), BBTI inhibiting trypsin (c) and BBTI inhibiting chymotrypsin (d)

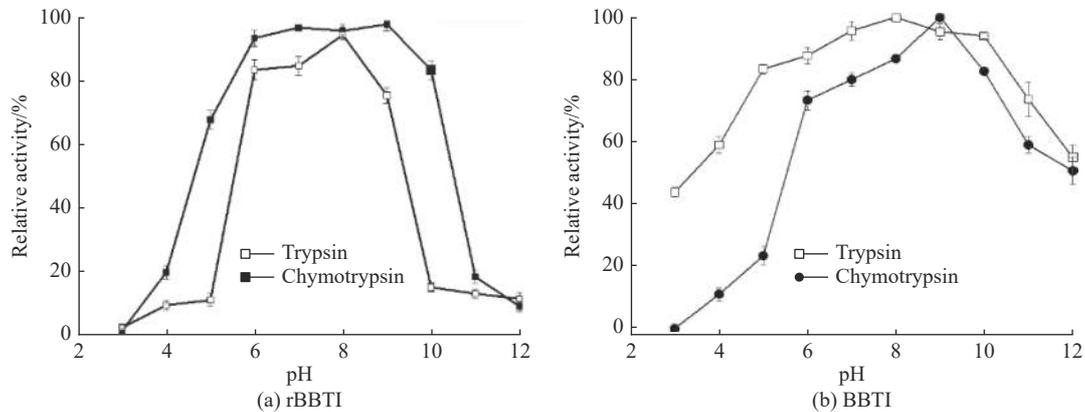


图4 rBBTI(a)和BBTI(b)抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的最适pH

Fig. 4 Optimal pH of rBBTI (a) and rBBTI (b) inhibiting trypsin and chymotrypsin

留的活性如图5所示,二者的活性变化趋势一致,当pH值范围在7~9时,抑制活性相对稳定。BBTI和rBBTI在pH=8条件下,抑制胰蛋白酶的活性最稳定,在pH=7条件下,抑制糜蛋白酶的活性最稳定。

2.4 动力学参数测定

2.4.1 IC₅₀值 BBTI和rBBTI抑制蛋白酶活性的抑制曲线如图6所示,rBBTI在抑制胰蛋白酶和糜蛋白

酶的IC₅₀值分别为0.13 mg/mL和0.8 mg/mL,显然rBBTI抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的抑制效率不同。BBTI抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的IC₅₀值分别为0.048 mg/mL和0.05 mg/mL,在抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶时的抑制效率差异较小。

2.4.2 抑制常数K_i值 通过Lineweaver Burk双倒数方法作图得到图7(图中V代表反应速度,S代表底

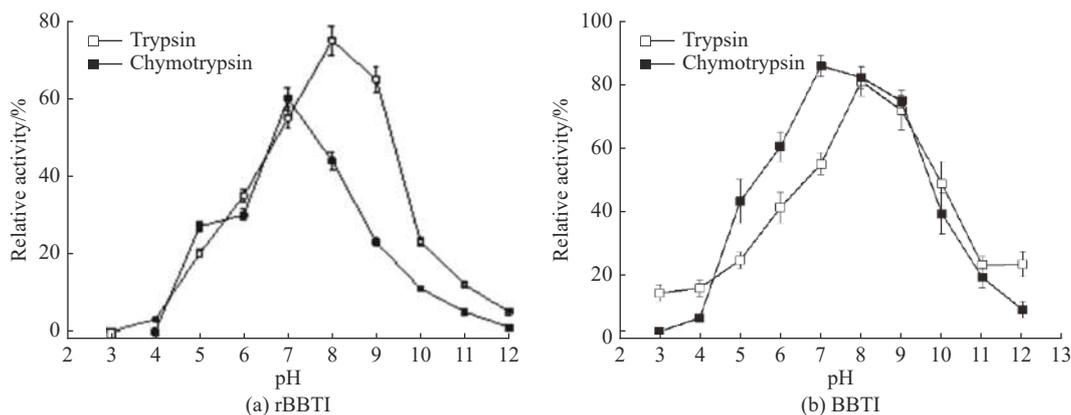


图 5 rBBTI(a)和 BBTI(b)的 pH 稳定性

Fig. 5 pH Stability of rBBTI (a) and BBTI (b)

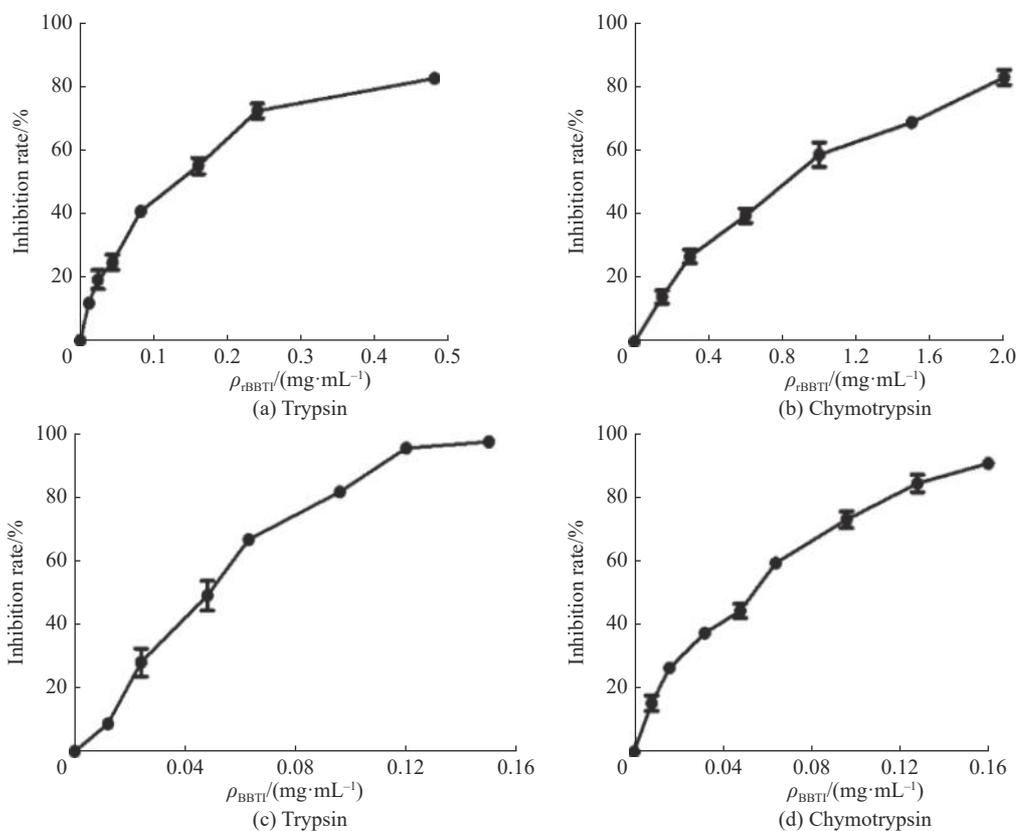


图 6 rBBTI 抑制胰蛋白酶活性(a)、rBBTI 抑制糜蛋白酶活性(b)、BBTI 抑制胰蛋白酶活性(c)和 BBTI 抑制糜蛋白酶活性(d)的抑制曲线

Fig. 6 Inhibition curves of rBBTI inhibiting trypsin activity (a), rBBTI inhibiting chymotrypsin activity (b), BBTI inhibiting trypsin activity (c) and BBTI inhibiting chymotrypsin activity (d)

物浓度)。图 7(a)反映出 BBTI 和 rBBTI 在抑制胰蛋白酶时呈现出的典型的反竞争性抑制剂的特征;而图 7(b)可以表明 BBTI 和 rBBTI 在抑制糜蛋白酶时表现出了非竞争性抑制剂的特征。BBTI 和 rBBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的动力学参数测定结果见表 2, 胰蛋白酶和 BAEE 反应时, 米氏常数(K_m)为 $4.9 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 最大反应速度(V_{\max})为 $60 \mu\text{mol/min}$, 当加入 rBBTI 后, K_m 为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, V_{\max} 为 $28 \mu\text{mol/min}$,

K_i 值为 $4.7 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$, 当加入 BBTI 时, K_m 为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, V_{\max} 为 $20 \mu\text{mol/min}$, K_i 值为 $7.8 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。对比 BBTI 和 rBBTI 的 K_i 值以及 IC_{50} 值, 发现 rBBTI 可以有效抑制胰蛋白酶, 其抑制效率略微低于 BBTI。

以糜蛋白酶和 ATEE 为底物反应的 K_m 为 $2.6 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, V_{\max} 为 $265 \mu\text{mol/min}$, 加入 rBBTI 后, K_m 为 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, V_{\max} 为 $122 \mu\text{mol/min}$, K_i 值为

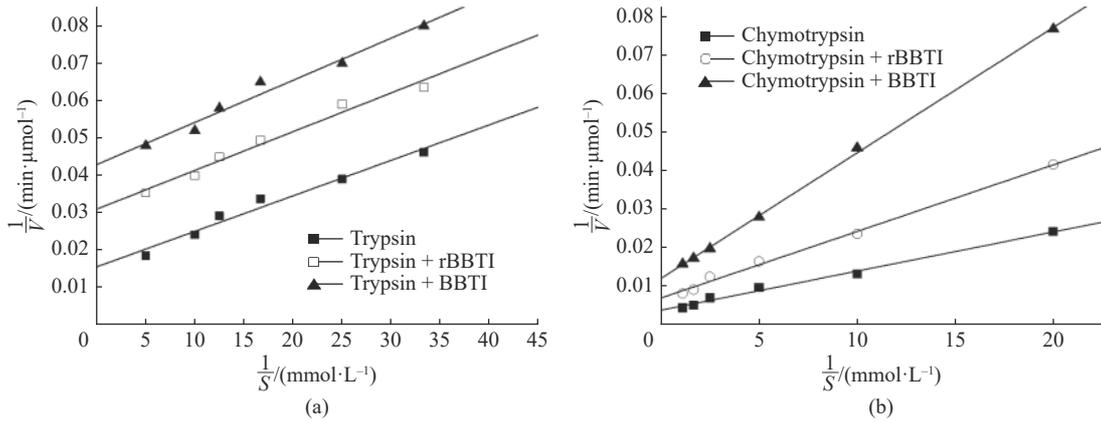


图 7 Lineweaver-Burk 双倒数法分析 rBBTI 和 BBTI 抑制胰蛋白酶(a)和糜蛋白酶(b)的动力学
Fig. 7 Lineweaver-Burk plots analysis of the kinetics of rBBTI and BBTI inhibiting trypsin (a) and chymotrypsin (b)

表 2 rBBTI 和 BBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的动力学参数
Table 2 Kinetic parameters of rBBTI and BBTI to inhibit trypsin and chymotrypsin

Proteases and inhibitors	$K_m/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$V_{\text{max}}/(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1})$	$K_i/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
Trypsin	4.9×10^{-5}	60	
Trypsin+rBBTI	2.0×10^{-5}	28	4.7×10^{-2}
Trypsin+BBTI	1.0×10^{-5}	20	7.8×10^{-3}
Chymotrypsin	2.6×10^{-4}	265	
Chymotrypsin+rBBTI	2.5×10^{-4}	122	1.7×10^{-1}
Chymotrypsin+BBTI	2.3×10^{-4}	63	5.0×10^{-2}

$1.7\times 10^{-1} \text{ mol/L}$; 当加入 BBTI 时, K_m 为 $2.3\times 10^{-4} \text{ mol/L}$, V_{max} 为 $63 \mu\text{mol}/\text{min}$, K_i 值为 $5.0\times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 。根据 BBTI 和 rBBTI 抑制胰蛋白酶和糜蛋白酶的动力学特征参数, 发现两者在抑制胰蛋白酶时是一种反竞争性抑制剂^[15], 抑制糜蛋白酶时是一种非竞争性抑制剂^[16]。导致 BBTI 和 rBBTI 抑制效率差异的主要原因可能是 BBTI 的纯度比 rBBTI 的纯度高。

BBTI 和 rBBTI 抑制胰蛋白酶的效率均比抑制糜蛋白酶的效率高, 抑制常数 K_i 也表明了抑制剂与胰蛋白酶之间的亲和力强弱。已有的二元复合物的晶体结构表明 BBTI 与胰蛋白酶之间主要存在氢键相互作用, 而且比 BBTI 与糜蛋白酶之间的疏水相互作用要强^[17]。BBTI 活性位点 P1 的 LYS 残基可与胰蛋白酶活性域的氨基酸残基形成 4 对氢键, 首先 LYS-16 的羧基可分别和 GLY-193、SER-195 的主链氨基形成键长为 2.8、2.3 nm 的氢键, 同时 LYS-16 的氨基与 SER-214 的羧基形成键长为 2.8 nm 的氢键, 除此之外, ASN-18 与 PHE-41 主链的氨基形成了键长为 2.5 nm 的氢键(见图 8(a))。在胰蛋白酶的活性域中, ASP-189 为胰蛋白酶与底物(BAEE)的结合位点^[18], 胰蛋白酶的催化三联体(HIS-57-ASP-102-SER-195)通过电子传递对底物进行作用, 当 BBTI 抑制胰蛋白酶时, BBTI 活性位点的 LYS-16 会与胰蛋白酶三联体中的 SER-195 形成氢键, 影响胰蛋白酶催化底物时催化三联体之间的电子传递效率, 使

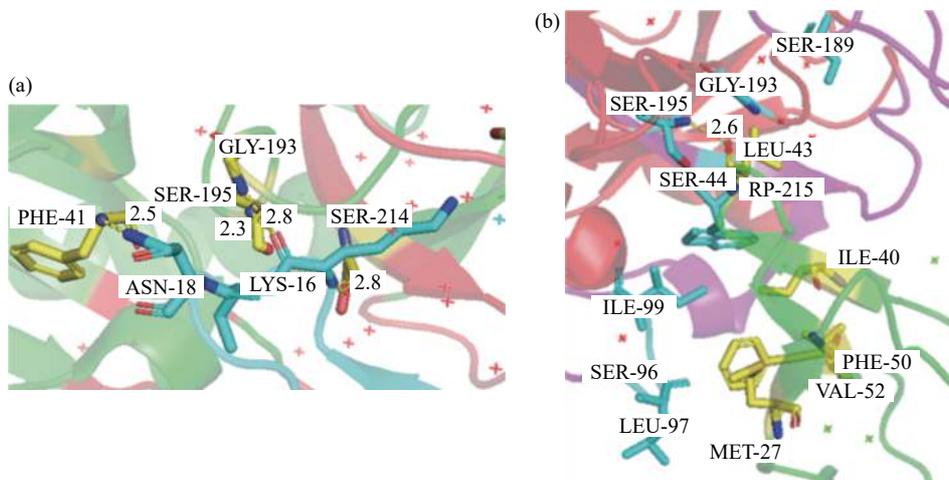


图 8 BBTI 与胰蛋白酶之间的氢键作用(a)和 BBTI 与糜蛋白酶之间的疏水作用(b)
Fig. 8 Hydrogen bond interaction of BBTI with trypsin (a) and hydrophobic interaction of BBTI with chymotrypsin (b)

BBTI表现出能有效地抑制胰蛋白酶的特征。BBTI抑制胰蛋白酶时, BBTI和底物分别作用于胰蛋白酶的不同位点, 这符合BBTI作为反竞争性抑制剂的特征, 且在实验过程中发现在体系中先加入底物再加入rBBTI的抑制率, 比先加入相同量rBBTI再加入底物的抑制效率更高, 这恰好符合反竞争性抑制剂在抑制酶活性时, 反应体系中酶先与底物结合后再与抑制剂结合的特点。

而BBTI和糜蛋白酶之间主要存在相对较弱的疏水作用, BBTI的糜蛋白酶活性域中存在疏水链(ILE-40, PHE-50, MET-27, VAL-52)^[19], 当BBTI靠近糜蛋白酶的活性域时, BBTI的疏水链上残基的侧链会明显地旋转而更利于与糜蛋白酶的疏水性残基(LEU-97, ILE-95, TRP-215)形成疏水接触面^[20](图8(b))。除此之外, BBTI的P2位点LEU-43残基的羧基, 可与糜蛋白酶SER-195主链的氨基形成键长为2.6 nm微弱氢键, BBTI主要通过疏水作用靠近糜蛋白酶的催化位点, 没有和底物竞争同一个结合位点(SER-189), 这也正符合BBTI抑制糜蛋白酶为非竞争性抑制剂的实验结果。BBTI与上述两种蛋白酶之间相互作用的差异, 是BBTI抑制两种酶效率不同的主要原因。

3 结 论

(1)利用新的重组表达系统成功实现了BBTI的可溶性表达, 通过简单且有效的纯化方式得到了rBBTI。

(2)对比研究了天然BBTI和rBBTI的酶学性质, 发现BBTI和rBBTI抑制胰蛋白酶的最适条件是pH 8, 25 °C, 抑制糜蛋白酶的最适条件是pH 9, 16 °C。

(3)天然BBTI和rBBTI的抑制动力学研究表明, 抑制胰蛋白酶时是一种反竞争性抑制剂, 抑制糜蛋白酶时是一种非竞争性抑制剂, 且两者抑制胰蛋白酶时效率更高。

参考文献:

- [1] PRAKASH B, SELVARAJ S, MURTHY M R, *et al.* Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 42(5): 560-569.
- [2] HE H, LI X, KONG X, *et al.* Heat-induced inactivation mechanism of soybean Bowman-Birk inhibitors[J]. *Food chemistry*, 2017, 232(5): 712-720.
- [3] BIRKY. The Bowman-Birk inhibitor of trypsin and chymotrypsin from soybeans[J]. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 2010, 25(2): 113-131.
- [4] SEIDL D S, LIENER I E. Isolation and properties of complexes of the Bowman-Birk soybean inhibitor with trypsin and chymotrypsin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247(11): 3533-3538.
- [5] HILDER V A, BARKER R F, SAMOUR R A, *et al.* Protein and cDNA sequences of Bowman-Birk protease inhibitors from the cowpea[J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 13(6): 701-710.
- [6] ECKELKAMP C, EHMANN B, PFER P, *et al.* Wound-induced systemic accumulation of a transcript coding for a Bowman-Birk trypsin inhibitor-related protein in maize seedlings[J]. *FEBS Letters*, 1993, 323(1/2): 70-76.
- [7] KENNEDY A R. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1998, 68(6): 1406-1412.
- [8] ARMSTRONG W B, WAN X S, KENNEDY A R, *et al.* Development of the Bowman-Birk inhibitor for oral cancer chemoprevention and analysis of Neu immunohistochemical staining intensity with Bowman-Birk inhibitor concentrate treatment[J]. *Laryngoscope*, 2003, 113(10): 1687-1702.
- [9] VOGTENTANZ G, COLLIER K D, BODO M, *et al.* *Bacillus subtilis* fusion protein system to produce soybean Bowman-Birk protease inhibitor[J]. *Protein Expression & Purification*, 2007, 55(1): 40-52.
- [10] XU Y, ZHANG P, LI S X, *et al.* Preparation and irreversible inhibition mechanism insight into a recombinant kunitz trypsin inhibitor from *Glycine max* L. seeds[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191: 1207-1222.
- [11] 高灵枝. 大豆蛋白酶抑制剂活性的测定[J]. *首都医科大学学报*, 1995, 16(1): 36-41.
- [12] FLECKER P. Chemical synthesis, molecular cloning and expression of gene coding for a Bowman-Birk-type proteinase inhibitor[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 166(1): 151-156.
- [13] PHILIPP S, KIM Y M, WENZL I G, *et al.* Mutational analysis of disulfide bonds in the trypsin-reactive subdomain of a Bowman-Birk-type inhibitor of trypsin and chymotrypsin: Cooperative versus autonomous refolding of subdomains[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 251(3): 854-862.
- [14] VOSS R H, ERMLER U, ESSEN L O, *et al.* Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28 nm resolution: Structural peculiarities in a folded protein conformation[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 242(1): 122-131.
- [15] 苏子健, 孙乐常, 颜龙杰, 等. 黑豆胰蛋白酶抑制剂性质分析及高温对其清化特性的影响[J]. *大豆科学*, 2019, 38(4): 597-606.
- [16] BERNHARD B, ULRICH Q. Soybean trypsin inhibitor

- (Kunitz) is doubleheaded: Kinetics of the interaction of α -chymotrypsin with each side[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 657(1): 58-72.
- [17] HIRONO, AKAGAWA S. The 0.25 nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 212(2): 549-555.
- [18] JÜRGEN K, ERMLER U, WARKENTIN E, *et al.* Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3Å resolution: Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 298(3): 477-491.
- [19] WERNER M H, WEMMER D E. Identification of a protein-binding surface by differential amide hydrogen-exchange measurements: Application to Bowman-Birk serine-protease inhibitor[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 225(3): 873-889.
- [20] LARSEN T A, OLSON A J. Morphology of protein-protein interfaces[J]. *Structure*, 1998, 6(4): 421-427.

Properties and Inhibition Kinetics of Recombinant Bowman-Birk Trypsin Inhibitor

LIU Li¹, YANG Fan¹, LI Suxia¹, GUO Ao¹, LIU Xiao², WANG Zhike²

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Yaxin Biotechnology Co. Ltd, Shanghai 200231, China)

Abstract: Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor (BBTI), extracted from soybean (*Glycine max* L.) seeds, possesses insect resistance and anti-tumor properties. However, its specific mechanisms of action are still unknown. An efficient method to produce recombinant BBTI (rBBTI) in *E. coli* was reported. Some biochemical properties of rBBTI were revealed and the inhibition mechanism of BBTI was discussed. The rBBTI was successfully expressed with *E. coli* (BL21) expression system, and was further purified by Ni affinity chromatography and DEAE-FF column efficiently. The BBTI and rBBTI showed similar biochemical properties. The optimum conditions for inhibiting trypsin were pH 8 and 25 °C, and the optimum conditions for inhibiting chymotrypsin were pH 9 and 16 °C. BBTI and rBBTI were stable below 37 °C. The inhibition kinetics assay of BBTI and rBBTI against trypsin as Lineweaver-Burk plots analysis showed an increased Michaelis constant (K_m) and a decreased maximum reaction rate of enzyme (V_{max}) with *N*-benzoyl-*L*-arginine ethyl ester(BAEE) as substrate. It suggested that BBTI and rBBTI were anti-competitive inhibitors interacted with trypsin. Both the inhibition kinetics assay of BBTI and rBBTI against chymotrypsin as Lineweaver-Burk plots analysis showed an unchanged K_m and a decreased V_{max} with *N*-acetyl-*L*-tyrosine ethyl ester(ATEE) as substrate. It suggested that BBTI and rBBTI were anti-competitive inhibitors interacted with chymotrypsin. Molecular modeling showed that LYS-16 of BBTI (trypsin active site of BBTI) interacted with residues of trypsin, forming effective hydrogen bonding interactions. However, there were hydrophobic residues at chymotrypsin activity domain of BBTI, and forming hydrophobic interactions with residues of chymotrypsin. These provide a reference for understanding the inhibition mechanism of BBTI, and the different inhibition rate of BBTI against trypsin or chymotrypsin.

Key words: Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor; recombination expression; inhibition kinetics; enzymatic properties