

# 洋紫荊(*Bauhinia purpurea*)種子中 胰蛋白酶抑制劑之純化及其特性 Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Bauhinia purpurea* Seeds

洪志宏 \*Chih-Hung Hung      董陳峰 Chen-Feng Dong  
陳韻帆 Yun-Fan Chen          周孝怡 Hsiao-Yi Chou  
黃靖晏 Chin-Yen Huang        王海龍 Hai-Lung Wang

元培科技大學醫學檢驗生物技術系

Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University, Taiwan, ROC

(Received, September 16, 2010; Revised, October 29, 2010; Accepted, November 19, 2010)

**摘 要：**利用硫酸銨分割，Sephadex G-50 凝膠過濾色層分析法，DE-52 cellulose 陰離子交換樹脂及 trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱，可以從洋紫荊(*Bauhinia purpurea*)種子中純化出一種胰蛋白酶抑制劑 (*Bauhinia purpurea* trypsin inhibitor)，簡稱 BPTI。洋紫荊屬於豆目 (Leguminosae)、蘇木科 (Caesalpinaceae)，學名：*Bauhinia purpurea* Linn.，利用 SDS-PAGE 分析所純化之 BPTI，得知其分子量約 20 kDa，由單一多肽鏈所組成，是屬於 Kunitz-type 蛋白酶抑制劑。進一步對此蛋白的性質研究，發現 BPTI 在 60°C 30 分鐘仍保有大於 50% 的活性，但如果到 80 及 100°C，則活性僅殘留 27 及 17% 左右。在廣泛的 pH 範圍及還原劑 DTT 處理，BPTI 其抑制胰蛋白酶的活性仍然非常穩定，故 BPTI 結構的穩定與雙硫鍵的存在沒有明顯的相關性。

**關鍵詞：**洋紫荊、胰蛋白酶抑制劑、Kunitz-type 蛋白酶抑制劑

---

\*Corresponding author



**Abstract:** A trypsin inhibitor (BPTI) was purified from seeds of *Bauhinia purpurea* by 70-90% ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-50 column, DE-52 ion-exchange column and trypsin-Sepharose 4B affinity chromatography. A molecular weight of 20 kDa and single polypeptide chain was estimated by SDS-PAGE. The BPTI was found to be a thermostable Kunitz-type TI that inhibits trypsin at molar ratio 1:1. The stability of BPTI was studied by exposing it to altered conditions of temperature, and measuring the residual inhibitor activity. The inhibitory activity retained at least 50 % activity after being heated to 60 °C for 30 min, but there were 73 and 83% losses of activity at 80 and 100 °C, respectively. The inhibitory activity was stable over a wide pH range and in the presence of DTT. The stability of BPTI is apparently not related to the presence of disulfide bridge.

**Keywords:** Kunitz- type trypsin inhibitor, *Bauhinia purpurea*, BPTI

## 壹、前 言

蛋白酶抑制劑在許多生物中可被發現，尤其是在植物中，蛋白酶抑制劑廣泛分佈在不同的家族，而在儲存器官中如種子和塊莖含量則特別豐富（約佔總蛋白的1-10%）<sup>1,2</sup>。這些蛋白酶抑制劑可以分類為絲胺酸、半胱胺酸、天冬胺酸、金屬蛋白酶抑制劑<sup>3</sup>。其中，絲胺酸蛋白酶抑制劑的研究最多，並已經可以從各種豆科種子分離出來<sup>4</sup>。豆科植物種子內含有各種蛋白酶抑制劑，可分類為：Kunitz-type，Bowman-Birk-type，馬鈴薯I (potato I)，馬鈴薯二 (potato II)，aquash，cereal superfamily，thaumatin-like，Ragi A 1等型抑制劑<sup>1</sup>。植物絲胺酸蛋白酶抑制劑中最常見的兩種型是Kunitz-type和Bowman-Birk-type。這兩種型的差別在於他們的分子量、半胱胺酸含量以及反應位置 (reactive sites) 的數目。Kunitz-type蛋白酶抑制劑的分子量約在20 kDa，半胱胺酸含量較少，並且只有一個反應位置；而Bowman-Birk-type蛋白酶抑制劑分子量約在8~10 kDa，有較高的半胱胺酸含量並有兩個反應位置<sup>3</sup>。

植物的蛋白酶抑制劑特別令人感興趣的是他們是植物天然防禦系統的一部分，使植物進化成能對抗昆蟲捕食<sup>5</sup>。絲胺酸蛋白酶抑制劑可以有效的對抗鱗翅目類 (*Lepidoptera*) 的昆蟲<sup>6-10</sup>，而半胱胺酸蛋白酶抑制劑是有效的打擊一些鞘翅目 (*Coleoptera*) 的昆蟲<sup>11,12</sup>。這些蛋白質利用阻斷幼蟲腸道的消化系統蛋白酶，進而限制了胺基酸由蛋白質食物釋放出來。因此，幼蟲會明顯的有遲緩發展現象，最終死亡。

蛋白酶在癌細胞產生的發展上，除了與細胞侵襲及轉移有關外<sup>13</sup>，蛋白酶還可使細胞失去接觸性生長抑制 (contact inhibition) 的性質<sup>14,15</sup>，而使癌細胞毫無限制的生長，甚至發生重疊 (pile up) 現象，並且由於蛋白酶在細胞表面作用，使得細胞膜的性質也發生變化，不但形狀異常，細胞膜上接受器的移動能力會增加，使得親醣蛋白質對其之凝集活性增加，而這些性質在給予蛋白酶抑制劑後均會改善，故如何利用蛋白酶抑制劑來抑制腫瘤細胞的生長，乃為一項極具研究意義的工作<sup>16-18</sup>。



洋紫荊(*Bauhinia purpurea*)，屬於豆目(Leguminosae)、蘇木科(Caesalpinaceae)，學名：*Bauhinia purpurea* Linn.，形態特徵：落葉喬木。單葉互生，由頂端深裂成心形，7—12公分長，約等寬，全緣；總狀花序頂生或腋生；於晚秋或早冬開花；花萼管狀，單側開裂成佛焰苞狀；花瓣5片，粉紅色；有藥雄蕊3—4枚；莢果扁平，約20—30公分長。本研究是利用洋紫荊種子中，萃取胰蛋白酶抑制劑(*Bauhinia purpurea* trypsin inhibitor, BPTI)，並做了一般性質之探討。

## 貳、研究方法

### 一、材料

洋紫荊(*Bauhinia purpurea*)種子收集於新竹元培科技大學，牛胰蛋白酶、*N*-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA)、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 分子量標記、丙烯醯胺(acrylamide)、雙丙烯醯酰胺(bis-acrylamide)及其他電泳試劑皆購買於 SIGMA (St. Louis, MO)。層析法材料由 Pharmacia(Uppsala, Sweden) 提供。其他化學藥品及試劑皆使用分析級。

### 二、BPTI的分離和純化

稱取種子 100 克，洗淨並除去雜質，浸泡於 1 公升 0.01N, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液中，4 °C 下靜置過夜。隔天於 4 °C 的冷房下，進行下列步驟：用均質機打成漿狀，靜置 2-3 小時，以萃取 BPTI。用 Beckman J2-21 M/E 冷凍離心機，在 4 °C 1,000 rpm (JA-14 rotor) 離心 20 分鐘，紗布過濾上清液，上清液慢慢加入固體硫酸銨至 70% 濃度，待沈澱生成穩定之後，以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液，再加入硫酸銨至 90% 濃度，10,000 rpm 離心 20 分鐘，將沈澱物用少許蒸餾水溶解後，移置透析袋，於 4 °C 下，對 0.1N 醋酸 3 公升透析，每隔 12 小時更換透析液，共更換 4 次透析液。透析後以 12,000 rpm 離心 15 分鐘除去不溶之雜質，取上清液通入以 0.01M, pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 Sephadex G-50 (2.7 X 100 公分)，以磷酸鹽緩衝液沖洗，測其波長為 280nm 的吸收可得二個吸收峰，經活性分析得知第二個吸收峰具有活性。將具有活性部分收集並通入預先以 0.01M Tris-HCl pH 8.0 緩衝液平衡過的 DE-52 cellulose 管柱(4.5 X 10 公分)，以含 0 到 0.2M 氯化鈉之 Tris-HCl buffer 梯度沖洗，可得一個蛋白吸收峰並具有活性，將有活性部分收集，對蒸餾水透析，每隔 12 小時更換透析液，共更換 4 次透析液。調整蛋白液的 pH 至 8 左右，12,000 rpm 離心 15 分鐘，將上清液通過先以 0.01M, pH 8.0 磷酸鹽緩衝液平衡過的 trypsin-Sepharose-4B affinity column (2.2X 10 公分)，以含 0.1M 氯化鈉的 0.01M, pH 8.0 磷酸鹽緩衝液沖洗，將非特異性結合的蛋白質除去，最後用 0.01N HCl 溶液沖洗，可得一個蛋白吸收峰，此即所欲純化的 BPTI，其純度可由 SDS-PAGE 決定。

### 三、親合性色層分析管柱(affinity chromatography column)之製備<sup>19</sup>

將 Sepharose 4B 凝膠 100 毫升致於磁漏斗上，以蒸餾水洗去酒精及殺菌劑。加入 200 毫



升的蒸餾水(約 2 倍體積)，以 5N 的氫氧化鈉調至 pH11，隨後加入 10 克的溴化氰，在 pH stat 上以 5N 氫氧化鈉滴定，使溶液維持在 pH 11，並保持 5 到 10°C 間。反應 20 分鐘後(pH 值趨於穩定)，分別以 4°C 的蒸餾水及 0.1M 碳酸氫鈉 pH 9.0 沖洗，最後保存於此緩衝溶液中。將上述活化的 Sepharose-4B 凝膠溶於適量的連接緩衝液(coupling buffer：0.1M 碳酸氫鈉 pH 9.0)，並加入 400 毫克的胰蛋白酶(約 5-10 毫克蛋白/毫升凝膠)，充入氮氣，密封，置於 4°C 溫和攪拌兩小時即可完成。作用後的凝膠，倒入管柱中，並用連接緩衝液沖洗，最後依序以含 0.5M 氯化鈉 0.1M pH 9.0 碳酸氫鈉緩衝液，含 0.5M 氯化鈉 0.1M pH 4.0 醋酸鈉緩衝液，含 0.1M 乙醇胺 0.1M pH 9.0 碳酸氫鈉緩衝液，含 0.5M 氯化鈉 0.1M pH 4.0 醋酸鈉緩衝液及 0.1M pH 8.0 碳酸氫鈉緩衝液沖洗，完畢後，置於 4°C 中備用。

#### 四、BPTI 活性測定<sup>20</sup>

實驗組是將 0.5 毫升溶於 0.01M Tris-HCl, pH 8.0 緩衝溶液中的定量 BCTI 與 0.5 毫升 trypsin 溶液(10mg/ml)混合均勻，置於 37°C 5 分鐘後，再加入 4 微升 BAPNA (N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide)溶液(50mg/ml), 37 °C 反應 20 分鐘後，加入 0.5 毫升 10% 醋酸溶液終止反應，測定 410 nm 吸收。對照組則以 0.5 毫升磷酸鹽緩衝液代替 BCTI 溶液，其餘步驟與實驗組相同。空白組是以 0.5 毫升 BCTI 溶液(實驗空白組)或 0.5 毫升磷酸鹽緩衝液(對照組空白組)依序加入 0.5 毫升 trypsin 溶液，1 毫升 10% 醋酸，再加入 4 微升 BAPNA 溶液，測定 410 nm 的吸光。所有的實驗都重複做三次。

#### 五、蛋白質定量

蛋白質定含量是根據 Bradford 的方法<sup>21</sup>，利用 Coomassie Blue 染色來決定，在 595 nm 吸收波長下測定。牛血清白蛋白(1 毫克/毫升)作為蛋白質標準物。

#### 六、SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳法(SDS polyacrylamide gel electrophoresis)

利用 15% 的 SDS-PAGE 來分析蛋白質。而蛋白質則用 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 染色來偵測。

#### 七、溫度及 pH 的穩定性<sup>22</sup>

BPTI (1 mg/ml 在 0.01M Tris-HCl pH 8.0 緩衝溶液中)在水浴中以不同的溫度(37-100°C)處理 30 分鐘，殘留抑制活性測試之前樣品先冷卻到 0°C。測量 BPTI 對不同 pH 值的穩定性，BPTI (1 mg/ml)用不同緩衝液(100 mM)以相同容量稀釋之，緩衝液種類如下：檸檬酸鈉 (pH2-4)，醋酸鈉 (pH5)，磷酸鈉 (pH6-7)，Tris-HCl (pH8) 和碳酸氫鈉 (pH9-10)。在 37 °C 水浴中與緩衝液反應一小時，pH 值調整到 8.0，再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。所有的實驗都重複做三次。

#### 八、DTT 的影響<sup>22</sup>

BPTI(1 mg/ml) 與最終濃度為 1, 10, 和 100 mM 還原劑 DTT(dithiothreitol)反應，在 37 °C 反



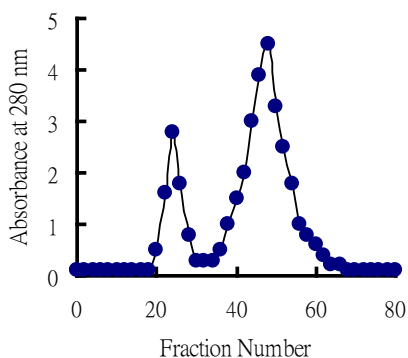
應15—120分鐘。接著加入DTT濃度兩倍量的碘醋酸（iodoacetic acid）終止反應，再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。

## 參、實驗結果

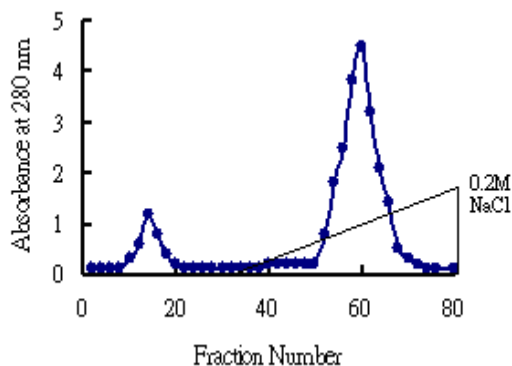
### 一、BPTI的純化

本研究主要利用trypsin-Sepharose 4B親和性管柱來純化BPTI，由100克種子純化出8.0毫克的BPTI，產率為26%。取100克的洋紫荊種子經由硫酸銨分割後，活性介於70-90%。再利用凝膠過濾法Sephadex G-50，離子交換層析DE-52 cellulose管柱，親和性層析trypsin-Sepharose管柱可分離出均質化的BPTI。在Sephadex G-50凝膠過濾管柱可得到二個吸收峰[圖1(A)]，第二個吸收峰具有胰蛋白酶抑制劑活性。將具有活性部分的蛋白質通入DE-52 cellulose管柱[圖1(B)]，不鍵結於管柱上可得到一蛋白吸收峰，以含0到0.2M氯化鈉離子梯度沖提時可得到一個蛋白吸收峰，經活性測定後，得知以0到0.2M氯化鈉離子梯度沖提時所得到的蛋白峰具有胰蛋白酶抑制劑的活性。將有活性部分通過trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱[圖1(C)]，即可將BPTI純化，親和性層析管柱提供一個很方便的步驟，可以用來分離出這個抑制劑。其純度及分子量可由SDS-PAGE分析[圖1(D)]。經SDS-PAGE分析得知其已均質化(homogenous)，分子量約20 kDa，是屬於Kunitz-type蛋白酶抑制劑。BPTI被純化倍數為22倍，產率為26.7%（表1）。

(A)



(B)



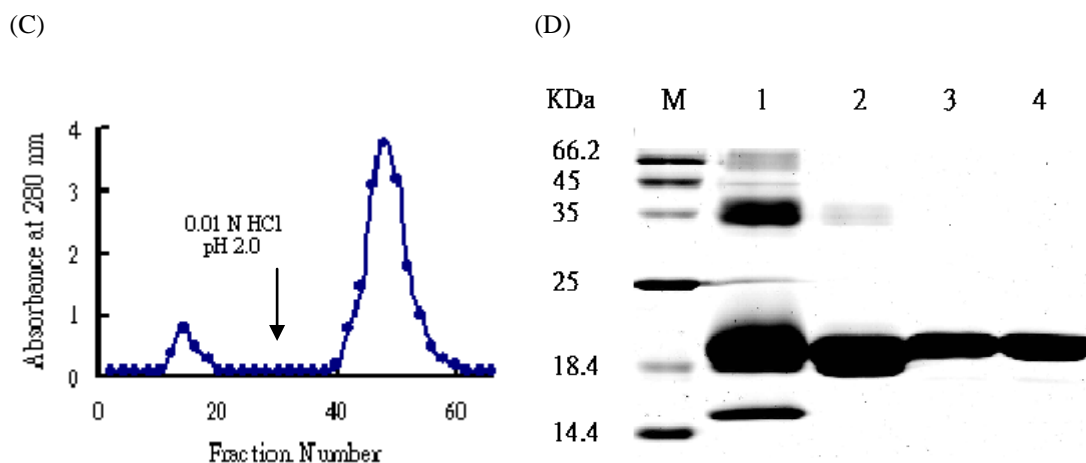


圖1 (A)粗萃取液通過凝膠過濾法(Sephadex G-50, 2.7 X 100公分), 收集具有抑制胰蛋白酶活性的第二個吸收峰, 接著利用DE-52 cellulose離子交換管柱色層分析法(B), 先以0.01M, pH 8.0的磷酸鹽緩衝液平衡DE-52 cellulose管柱(4.5 X 10公分), 以含0到0.2 M氯化鈉離子梯度之0.01M, pH 8.0的磷酸鹽緩衝液為沖洗液, 可得二個蛋白的吸收峰, 經活性測定後, 知與樹脂鍵結的蛋白峰具有胰蛋白酶抑制劑的活性。(C)將有活性部分通過trypsin-Sepharose 4B affinity column (2.2 X 10公分), 先以含0.1N氯化鈉, 0.01M, pH 8.0 磷酸鹽緩衝液沖洗, 將非特异性結合的蛋白質除去, 最後BPTI可被0.01N鹽酸溶液沖出。(D)純化過程各階段利用15% SDS-PAGE電泳分析。Lane 1: Sephadex G-50; Lane 2: DE-52 cellulose; ; Lane 3: trypsin-Sepharose 4B affinity column; Lane 4: BPTI以5% 2-mercaptoethanol還原處理; Lane M: 標準蛋白質分子量。

表1 由洋紫荊種子純化BPTI的產量及活性

Steps	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	660.5	1050	1.59	1	100
Fraction 70-90%	112.2	830	7.3	4.59	79
Sephadex G-50	36.6	460	12.7	7.99	43.8
DE-52 cellulose	16	320	20	12.58	30.5
Trypsin-Sepharose-4B	8	280	35	22.01	26.7

## 二、BPTI抑制胰蛋白酶的濃度效應

圖2顯示不同量BPTI對定量胰蛋白酶的抑制情形。可知胰蛋白酶與BPTI作用的莫耳數比為1: 1。



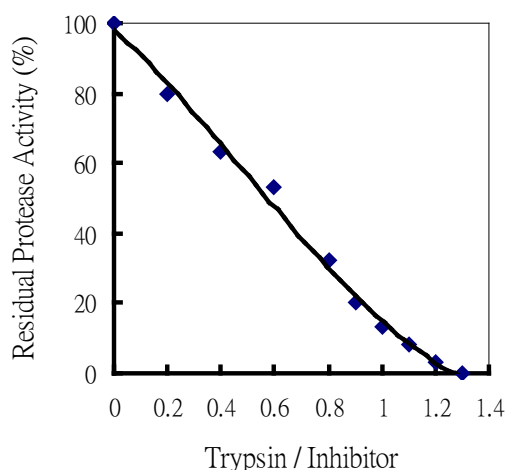
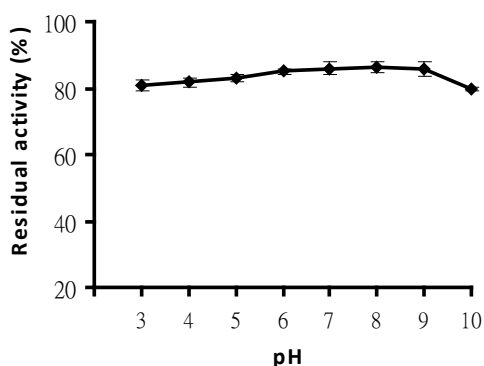


圖2 BPTI對胰蛋白酶抑制作用的活性分析。不同濃度的BPTI與固定濃度的trypsin，在37°C反應5分鐘，再加入4微升BAPNA溶液(50mg/ml)，37°C 反應20分鐘後，加入0.5 毫升10%醋酸溶液終止反應，抑制程度由測定410 nm吸收值而定。

### 三、抑制劑活性的穩定性

這項研究顯示出溫度對抑制劑的影響，可以看到溫度達60°C反應30分鐘後，抑制劑可以保留大於50%的活性；但到達80及100°C時，活性分別損失了73及83%[圖3(A)]，可知BPTI對熱具有非常高的穩定性。抑制劑在pH值3.0-10.0範圍內反應60分鐘，結果顯示BPTI抑制胰蛋白酶的活性在廣泛的pH值環境下，仍保持其結構的穩定性，活性不受pH值的影響[圖3(B)]。圖4顯示，當抑制劑暴露在不同濃度的DTT下，不論反應時間長短（15~120分鐘），其抑制活性皆不受影響，可知雙硫鍵對其構形的穩定並非重要的因素之一。

(A)



(B)

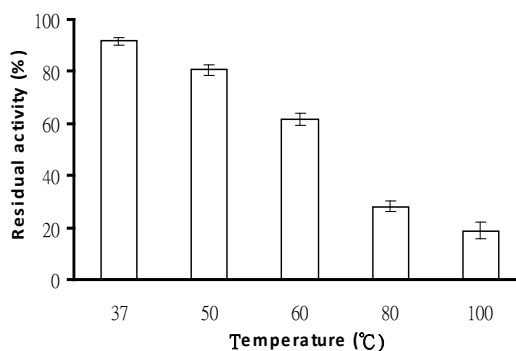


圖3 BPTI對溫度與pH的穩定度測定。(A) BPTI用不同pH緩衝液(100 mM)以相同容量稀釋之，在37°C水浴中與緩衝液反應一小時，pH值調整到8.0，再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。(B) BPTI先以不同溫度下處理30分鐘，冷卻樣品後，再測量其殘留抑制胰蛋白酶活性的百分比。每個實驗皆重複三次，取平均值± SE。

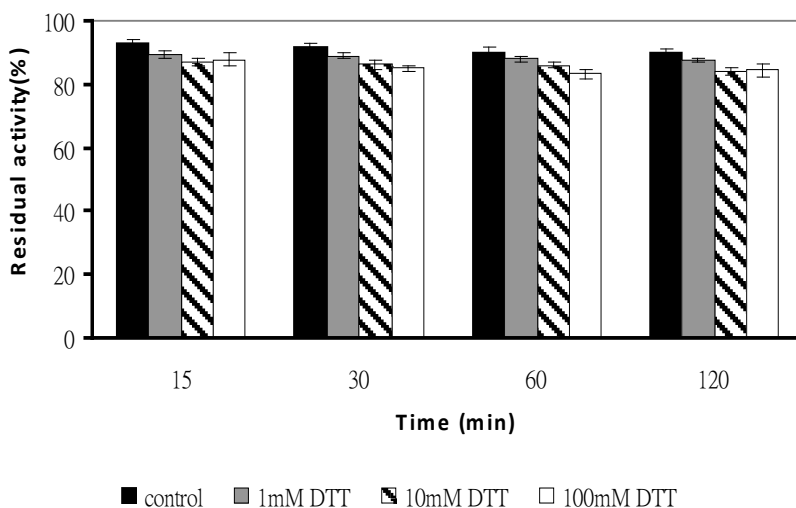


圖4 還原劑DTT對BPTI 胰蛋白酶抑制作用的活性分析。BPTI與最後濃度為1, 10, 100mM還原劑DTT反應，37°C反應10-120分鐘後，藉由加入兩倍DTT濃度的碘醋酸（iodoacetic acid）終止反應，再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。每次重複三次，取平均值± SE。

## 肆、討 論

絲胺酸蛋白酶抑制劑，特別是從多種植物所分離的Kunitz-type抑制劑，已被證明他們對於害蟲的成長及發育會造成明顯的影響<sup>23</sup>。本研究從洋紫荊種子純化出一種新的胰蛋白酶抑制劑(BPTI)。以SDS-PAGE分析，BPTI一種分子量約20 kDa的蛋白質，在還原劑（5% 2-mercaptoethanol）存在下只有觀察到一條多肽鏈，結構類似分子量約18-24 kDa，由一條或兩條多肽鏈所組成的Kunitz-type胰蛋白酶抑制劑<sup>24-26</sup>。

蛋白酶抑制劑的活性功能與它們的構形有絕對的關係，故會影響其構形穩定的物理、化學變性劑如溫度、pH、清潔劑和還原劑，都會影響其活性。BPTI 在不同溫度下反應 30 分鐘，結果在 60 °C 胰蛋白酶抑制活性僅喪失 40%，加熱至 80 和 100°C 時，活性才大幅度的下降，此與 ECTI·ILTI 及 DMTI-IIu 有相似的結果<sup>22,24,27</sup>，但與從 *Putranjiva roxburghii*·*Carica papaya* 及 *Pyralidae dubium* 所分離的蛋白酶抑制劑不同，他們在 80°C 反應 30 分鐘，仍具有約 80% 的殘留活性<sup>28-30</sup>。觀察不同 pH 值對 BPTI 抑制活性的影響，BPTI 不論在高酸性(pH3)或高鹼性(pH10)的環境下其抑制活性並不受太大的影響，與 ECTI 及 DMTI-II 有相似的結果<sup>22,27</sup>。一





般胰蛋白酶抑制劑其分子內雙硫鍵是負責穩定構形的功能，如從雙花扁豆(*Dolichos biflorus*)及油菜(*Brassica campestris*)種子中所分離的 Bowman-Birk-type 蛋白酶抑制劑<sup>31,32</sup>與從相思樹(*Acacia confusa*)、*Erythrina caffra*、*Peltophorum dubium*、*Plathymenia foliolosa* 種子中所純化出的 Kunitz-type 抑制劑<sup>33-36</sup>，這些抑制劑經還原劑 DTT 處理，其殘留抑制胰蛋白酶的活性皆明顯的下降，但 BPTI 暴露在不同濃度的 DTT 下，不論反應時間長短(15~120 分鐘)，其抑制活性及穩定性皆不受影響，顯示 BPTI 的雙硫鍵對其構形的穩定並非重要，此與 DMTI-II<sup>22</sup> 及分離自 *Bauhinia sp.* 種子的抑制劑結果相似，且已知分離自 *Bauhinia sp.* 種子的抑制劑發現其不具有雙硫鍵及半胱氨酸殘基也不影響其抑制胰蛋白酶的活性<sup>37</sup>。

## 參考文獻

1. Richardson, M., "Seed Storage Proteins: The Enzyme Inhibitors," in: Rogers, J. L. Ed. *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*; Academic Press: New York, 1991, pp. 259-305.
2. Ussuf, K. K., Laxmi, N. H. and Mitra, R., "Proteinase Inhibitors: Plant Derived genes of Insecticidal Protein for Developing Insect-resistant transgenic Plants," *Current Science*, Vol. 180, 2001, pp. 847-853.
3. Laskowski, M. and Qasim, M. A., "What can the Structures of Enzyme Inhibitor Complexes Tell Us About the Structures of Enzyme Substrate Complexes?," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1477, 2000, pp. 324-337.
4. Giri, A. P., Harsulkara, A. M., Ku, M. S. B., Gupta, V. S., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K. and Franceschi, V. R., "Identification of Potent Inhibitors of *Helicoverpa armigera* Gut Proteinases from Winged Bean Seeds," *Phytochemistry*, Vol. 163, 2003, pp. 523-532.
5. Falco, M. C. and Silva-Filho, M. C., "Expression of Soybean Proteinase Inhibitors in Transgenic Sugarcane Plants: Effects on Natural Defense Against *Diatraea saccharalis*," *Plant Physiology Biochemistry*, Vol. 41, 2003, pp. 761-766.
6. De Leo, F., Bonade´Bottino, M., Ceci, L. R., Gallerani, R. and Joannin, L., "Effects of a Mustard Trypsin Inhibitor Expressed in Different Plants on Three Lepidopteran Pests," *Insect Biochemistry Molecular Biology*, Vol. 31, 2001, pp. 593-602.
7. Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-El-Saad, M. and Xu, D., "Transgenic Rice Plants Harboring an Introduced Potato Proteinase Inhibitor II Gene are Insect Resistant," *Nature Biotechnology*, Vol. 14, 1996, pp. 494-498.
8. Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Baker, R. F. and Boulter, D., "A Novel Mechanism of Insect Resistance Engineered into Tobacco," *Nature*, Vol. 330, 1987, pp. 160-163.
9. McManus, M. T., White, D. W. R. and McGregor, P. G., "Accumulation of a Chymotrypsin Inhibitor in Transgenic Tobacco can Affect the Growth of Insect Pests," *Transgenic*



- Research*, Vol. 3, 1994, pp. 50-58.
10. Yeh, K. W., Lin, M. I., Tuan, S. J., Chen, Y. M., Lin, C. Y. and Kao, S. S., "Sweet Potato (*Ipomea batatas*) Trypsin Inhibitors Expressed in Transgenic Tobacco Plants Confer Resistance Against *Spodoptera litura*," *Plant Cell Reports*, Vol. 16, 1997, pp. 696-699.
  11. Lecardonnell, A., Chauvin, L., Jouanin, L., Beaujean, A., Prevost, G. and Sangwan-norreel, B., "Effects of Rice Cystatin I Expression in Transgenic Potato on Colorado Potato Beetle Larvae," *Plant Science*, Vol. 140, 1999, pp. 71-79.
  12. Leple, J. C., Bonade-Bottino, M., Augustin, S., Pilate, G., Dumanois-Le, T.V., Delplanque, A., Cornu, D. and Jouanin, L., "Toxicity to *Chrysomela Tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of Transgenic Poplars Expressing a Cysteine Proteinase Inhibitor," *Molecular Breed*, Vol. 1, 1995, pp. 319-328.
  13. Ennedly, A. R. and Wan, X. S., "Effects of the Bowman-Birk Inhibitor on Growth, Invasion, and Clonogenic Survival of Human Prostate Epithelial Cells and Prostate Cancer Cells," *Prostate*, Vol. 50, 2002, pp. 125-133.
  14. Burger, M. M., "Proteolytic Enzyme Initiating Cell Division and Escape from Contact Inhibitor of Growth," *Nature*, Vol. 227, 1970, pp. 170-171.
  15. Sefton, B. M. and Rubin, H., "Release from Density Dependent Growth Inhibitor by Proteolytic Enzymes," *Nature*, Vol. 227, 1970, pp. 843-845.
  16. Meyskens, F. L., "Development of Bowman-Birk Inhibitor for Chemoprevention of Oral Head and Neck Cancer," *Annals of New York Academy Sciences*, Vol. 952, 2001, pp. 116-123.
  17. Kennedy, A. R., Billings, P. C., Wan, X. S. and Newberne, P. M., "Effects of Bowman-birk Inhibitor on Rat Colon Carcinogenesis," *Nutrition Cancer*, Vol. 43, 2002, pp. 174-186.
  18. Malkowicz, S. B., Liu, S. P., Broderick, G. A., Wein, A. J., Kennedy, A. R. and Levin, R. M., "Effect of the Bowman-birk Inhibitor (A Soy Protein) on In Vitro Bladder Neck/Urethral and Penile Corporal Smooth Muscle Activity," *Neurourology and Urodynamics*, Vol. 22, 2003, pp. 54-57.
  19. Axen, R. and Ernback, S., "Chemical Fixation of Enzyme to Cyanogens Halide Activated Polysaccharide Carrier," *European Journal of Biochemistry*, Vol. 18, 1971, pp. 351-360.
  20. Mello, G. C., Oliva, M. L. V., Sumikawa, J. T., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. and Macedo, M. L. R., "Purification and Characterization of a New Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra Mollis* Seeds," *Journal of Protein Chemistry*, Vol. 20, 2001, pp. 625-632.
  21. Bradford, M. M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-dye Binding," *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, 1976, pp. 248-254.
  22. Mello, G. C., Oliva, M. L. V., Sumikawa, J. T., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. and Macedo, M. L. R., "Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from



- Dimorphandra Mollis* Seeds,” *Journal of Protein Chemistry*, Vol. 20, 2001, pp. 625-632.
23. Bhattacharyya, A., Leighton, S. M. and Babu, C. R., “Bioinsecticidal Activity of *Archidendron Ellipticum* Trypsin Inhibitor on Growth and Serine Digestive Enzymes During Larval Development of *Spodoptera Litura*,” *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 145, 2007, pp. 669-677.
  24. Macedo, M. L. R., Garcia, V. A., Freire, M. G. M. and Richardson, M., “Characterization of a Kunitz Trypsin Inhibitor with a Single Disulfide Bridge from Seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd,” *Phytochemistry*, Vol. 68, 2007, pp. 1104-1111.
  25. Oliveira, C., Santana, L. A., Carmona, A. K., Cezari, M. H., Sampaio, M. U., Sampaio, C. A. and Oliva, M. L., “Structure of Cruzipain/Cruzain Inhibitors Isolated from *Bauhinia Bauhinioides* Seeds,” *Biological Chemistry*, Vol. 382, 2001, pp. 847-852.
  26. Cruz-Silva, I., Gozzo, A. J., Nunes, V. A., Carmona, A. K., Faljoni-Alario, A., Oliva, M. L. V., Sampaio, M. U., Sampaio, C. A. M. and Araujo, M. S., “A Proteinase Inhibitor from *Caesalpinia Echinata* (Pau-brasil) Seeds for Plasma Kallikrein, Plasmin and Factor XIIa,” *Biological Chemistry*, Vol. 385, 2004, pp. 1083-1086.
  27. Batista, I. F. C., Oliva, M. L. V., Araujo, M. S., Sampaio, M. U., Richardson, M., Fritz, H. and Sampaio, C. A. M., “Primary Structure of a Kunitz-type Trypsin Inhibitor from *Enterolobium Contortisiliquum* Seeds,” *Phytochemistry*, Vol. 41, 1996, pp. 1017-1022.
  28. Azarkhan, M., Dibiani, R., Groomaghtigh, E., Raussens, V. and Baeyens-Volant, D., “The Papaya Kunitz-type Trypsin Inhibitor is a Highly Stable B-Sheet Glycoprotein,” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1764, 2006, pp. 1063-1072.
  29. Macedo, M. L. R., Freire, M. G. M., Cabrini, E. C., Toyama, M. H., Novello, J. C. and Marangoni, S., “A Trypsin Inhibitor from *Peltophorum Dubium* Seeds Active Against Pest Proteases and Its Effect on the Survival of *Anagasta Kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae),” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1621, 2003, pp. 170-182.
  30. Chaudhary, N. S., Shee, C., Islam, A., Ahmad, F., Yernoolc, D., Kumar, P. and Sharma, A. K., “Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Putranjiva Roxburghii* Seeds,” *Phytochemistry*, Vol. 69, 2008, pp. 2120-2126.
  31. Lehle, K., Kohnert, U., Stern, A., Popp, F. and Jaenicke, R., “Effect of Disulfide Bonds on the Structure, Function, and Stability of the Trypsin/tPA Inhibitor from *Erythrina Caffra*: Site-directed Mutagenesis, Expression, and Physiochemical Characterization,” *Nature Biotechnology*, Vol. 14, 1996, pp. 476-480.
  32. Hung, C. H., Huang, C. C., Tsai, W. S., Wang, H. L. and Chen, Y. L., “Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Brassica Campestris* Seeds,” *Journal of Yuanpei University Science Technology*, Vol. 10, 2003, pp. 13-22.
  33. Hung, C. H., Lee, M. C. and Lin, J. Y., “Inactivation of *Acacia Confusa* Trypsin Inhibitor by Site-specific Mutagenesis,” *FEBS Letters*, Vol. 353, 1994, pp. 312-314.



34. Lehle, K., Kohnert, U., Stern, A., Popp, F. and Jaenicke, R., "Effect of Disulfide Bonds on the Structure, Function, and Stability of the Trypsin/tPA Inhibitor from *Erythrina Caffra*: Site-directed Mutagenesis, Expression, and Physiochemical Characterization," *Nature Biotechnology*, Vol. 14, 1996, pp. 476-480.
35. Macedo, M. L. R., Freire, M. G. M., Cabrini, E. C., Towama, M. H., Novello, J. C. and Marangoni, S., "A Trypsin Inhibitor from *Peltophorum Dubium* Seeds Active Against Pest Proteases and Its Effect on the Survival of *Anagasta Kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1621, 2003, pp. 170-182.
36. Ramos, V. S., Silva, G. D. S., Freire, M. G. M., Machado, O. L. T., Parra, J. R. P. and Macedo, M. L. R., "Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Plathymenia Foliolosa* Seeds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 56, 2008, pp. 11348-11355.
37. Oliva, M. L. V., Santomauro-Vaz, E. M., Andrade, S. A., Juliano, M. A., Pott, V. J., Sampaio, M. U. and Sampaio, C. A. M., "Synthetic Peptides and Fluorogenic Substrates Related to the Reactive Site Sequence of Inhibitors Isolated from *Bauhinia*: Interaction with Human Plasma Kallikrein," *Biological Chemistry*, Vol. 382, 2001, pp. 109-113.

