

台灣欒樹種子中胰蛋白酶抑制劑之純化 及特性分析

Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Koelreuteria formosana* Seeds

洪志宏*Chih-Hung Hung

董陳峰 Chen-Feng Dong

王海龍 Hai-Lung Wang

元培醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Yuanpei University of Medical
Technology

摘要：由台灣欒樹(*Koelreuteria formosana*)種子純化出胰蛋白酶抑制劑(*Koelreuteria formosana* trypsin inhibitor)，簡稱 KFTI，純化過程是利用硫酸銨分割(70-90%)、Sephadex G-50 膠體分離管柱、DEAE-cellulose 陰離子交換樹脂及 trypsin-Sepharose 親和性色層分析法，以 15% SDS-PAGE 分析其純度及分子量，得知其分子量約 19 kDa，由 12.3 kDa 及 6.7 kDa 兩條多肽鏈以雙硫鍵連接所組成，屬於 Kunitz type 蛋白酶抑制劑。KFTI 對胰蛋白酶抑制作用其莫爾數比為 1:1，動力學的分析其抑制胰蛋白酶的活性作用是屬於競爭性的抑制作用，解離常數(dissociation constant, K_i)為 1.78×10^{-9} M。進一步對此蛋白的性質研究：以 100°C 高溫處理 10 分鐘，仍具有 70% 抑制胰蛋白酶的活性，可知 KFTI 對熱具有非常高的穩定性；在 pH 值 3.0-10.0 範圍內反應 60 分鐘，顯示 KFTI 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；但在 0.2% SDS 作用 10 分鐘，尚有不到 10% 的活性，可見其構造對 SDS 非常不穩定；以 5 mM DTT 處理 10 分鐘後，KFTI 抑制胰蛋白酶的活性只剩下 5%，可知雙硫鍵對其構形的穩定有絕對的重要性。

關鍵字：台灣欒樹胰蛋白酶抑制劑、Kunitz-type 蛋白酶抑制劑、解離常數

Abstract: A trypsin inhibitor (KFTI) was purified from the seed of *Koelreuteria formosana* by ammonium sulfate precipitation (70-90%), Sephadex G-50 gel filtration, DEAE-cellulose ion-exchange column and trypsin-Sepharose 4B affinity chromatography. 15% SDS-PAGE analysis of KFTI revealed that it is constituted by two polypeptide chains (A-chain, Mr 12.3 kDa and B-chain, Mr 6.7 kDa), the molecular weight being ~19 kDa. The KFTI was found to be a thermostable Kunitz type protein inhibitors. KFTI inhibits bovine trypsin activity in 1:1 molar ratio. Kinetics studies showed that the protein is a competitive inhibitor with a dissociation constant (K_i) of 1.78×10^{-9} M. The stability of KFTI was studied by exposing it to altered conditions of temperature, pH, protein-denaturing agents like SDS and reducing agent DTT, and measuring the residual inhibitor activity. The inhibitory activity

* Corresponding author



retained unchanged over a wide range of temperatures (0-90°C) and pH (3-10). KFTI only retained 10% activity after treatment with 0.2% SDS for 10 min and 5% activity after treatment with 5 mM DTT. The stability of KFTI is apparently related to the presence of disulfide bridge.

Key word : *Koelreuteria formosana* trypsin inhibitor、Kunitz-type protein inhibitor、dissociation constant

1. 前言

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 II (potato II)、Squash、cereal superfamily、thaumatin-like、Ragi A 1 等型抑制劑 (Richardson, 1991)。由植物種子所分離的胰蛋白酶抑制劑，依分子量大小及半胱胺酸含量，可分成較常見的二大類，一種是 Bowman-Birk type 胰蛋白酶抑制劑家族，分子量較小，約 8 至 10 kDa，含有高量的半胱胺酸，每 100 個胺基酸中即含 20 個半胱胺酸，並且通常可形成 7-8 對雙硫鍵，大多數的胰蛋白酶抑制劑是屬於此型。另一種是 Kunitz type 胰蛋白酶抑制劑家族，以大豆胰蛋白酶抑制劑(soybean trypsin inhibitor)為代表，此型的抑制劑較少，分子量約 18 至 24 kDa，半胱胺酸的含量較低，約 100 個胺基酸中，含 2 個半胱胺酸，通常具有一條或多條的多勝鏈(polypeptide chains)並可形成兩對雙硫鍵。屬於絲胺酸蛋白酶抑制劑的 Kunitz type 和 Bowman-Birk type 胰蛋白酶抑制劑已被廣泛研究，包括血液凝固系統，細胞凋亡，激素活化及抑制癌細胞侵入轉移等 (Hung et al, 2014; Azzouz et al, 2005; Ennediy and Wan, 2002; Inoue et al, 2005)。

不同植物中所萃取出來的胰蛋白酶抑制劑扮演著許多不同重要角色，特別令人感到有趣的是在天然防禦系統方面，使植物進化能對抗昆蟲捕食(Cruz et al, 2013)。絲胺酸蛋白酶抑制劑可以有效的對抗鱗翅目類(Lepidoptera)的昆蟲(De Leo et al, 2001; Duan et al, 1996; Hilder et al, 1987; McManus et al, 1994; Yeh et al, 1997)，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(Lecardonnell et al, 1999; Leple^ˆ et al, 1995)。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(Ennediy and Wan, 2002)，蛋白酶還可使細胞失去接觸性生長抑制(contact inhibition)的性質，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(Meyskens, 2001; Kennedy et al, 2002; Malkowicz et al, 2003)。

台灣欒樹分布於台灣全島低海拔的闊葉林中，從北到南都有，英文名稱：Flame Gold-rain Tree、Taiwan Golden-rain Tree、Flamegold；學名為 *Koelreuteria formosana* Hayata，無患子科(Sapindaceae)，欒樹屬(*Koelreuteria*)，別名：金苦楝、苦楝公、苦楝舅、台灣欒華、拔仔雞油、苦苓江。在本研究中，我們首先從本土的台灣欒樹種子萃取、純化出一種屬於 Kunitz type 蛋白酶抑制劑，稱為台灣欒樹胰蛋白酶抑制劑(KFTI)，對其蛋白特性及動力學上做相關的研究探討。



2. 研究方法

2.1 KFTI 之萃取純化

秤取台灣欒樹種子 200 克(採自元培醫事科技大學附近丘陵地生長之台灣欒樹)，洗淨並除去雜質，浸泡於 1 公升 0.01M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液中，4°C 下靜置過夜。之後利用果汁機將其打成漿狀，靜置 2-3 小時，利用 KUBOTA 7700 冷凍離心機，在 4°C 以 10,000 rpm (AG-2506 rotor) 離心 15 分鐘，取上清液，慢慢加入固體硫酸銨至 70% 的濃度，4°C 以 10,000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液，再慢慢加入固體硫酸銨至 90% 濃度，4°C 以 10,000 rpm 離心 30 分鐘離心，將沉澱物移置透析袋，於 4°C 下，對 0.01M pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液透析 48 小時，期間換 4 次透析液。透析後，以 4°C 12,000 rpm 離心 20 分鐘除去不溶的沉澱物，取上清液通過預先以 0.01M pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 Sephadex G-50 (1.5 × 90 公分)管柱，以 0.01M pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液為沖洗液，以分液收集器每管收集 5ml，每管測量波長 280 nm 紫外光的吸收及活性，將具有抑制胰蛋白酶活性的部份，通入以 0.01 M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡過的 DEAE-cellulose 管柱(4.5 × 10 公分)，先以上述的磷酸鹽緩衝液沖洗出無法附著於管柱上的蛋白質，再以含 0 至 0.3 N 氯化鈉的磷酸鹽緩衝液(0.01 M，pH 8.0)直線階梯 (linear salt gradient)沖洗。將具有活性的試管收集，直接通過 trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱(2.2 × 20 公分)，先以 0.1 N 氯化鈉，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，最後以 0.01N HCl 溶液沖提，可得到一個具有抑制胰蛋白酶活性的蛋白吸收峰，此即所欲純化的 KFTI，藉由 15% SDS-PAGE 決定其純度及分子量。

2.2 KFTI 活性測定

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 KFTI 與 0.5 毫升胰蛋白酶溶液(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 KFTI 溶液，其餘步驟與實驗組相同。空白組是以 0.5 毫升 KFTI 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(Wu et al., 1993)。所有的實驗都重複做三次。

2.3 蛋白質定量

蛋白質定含量是根據 Bradford 的方法(Bradford, 1976)，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(1mg/ml) 作為蛋白質標準物。

2.4 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。

2.5 KFTI 對胰蛋白酶抑制活性的穩定度



2.5.1 溫度的影響

20 μ l KFTI (1 mg/ml) 在 0.01M Tris-HCl 緩衝溶液中以不同的溫度(37-100 $^{\circ}$ C)處理 10 分鐘，之後加入 10 μ l 胰蛋白酶 (2 mg/ml)、5 μ l BAPNA (50 mg/ml)，放入 37 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，取出後加入 100 μ l 50%醋酸(中止反應)，之後以波長 410 nm 偵測吸收光，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性(Cruz et al, 2013)。

2.5.2 pH 的影響

測量 KFTI 對不同 pH 值的穩定性，20 μ l KFTI (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(pH 值 2-4)，醋酸鈉(pH 值 5)，磷酸鈉(pH 值 6-7)，Tris-HCl (pH 值 8) 和碳酸氫鈉 (pH 值 9-10)。在 37 $^{\circ}$ C 水浴中與緩衝液反應一小時，pH 值調整到 8.0，之後加入 10 μ l 胰蛋白酶(2mg/ml)、5 μ l BAPNA (50mg/ml)，放入 37 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，取出後加入 100 μ l 50%醋酸(中止反應)，之後以波長 410 nm 偵測吸收光，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性(Cruz et al, 2013)。

2.5.3 SDS 的影響

20 μ l KFTI (1 mg/ml)先以不同的 SDS 濃度 (0.05%-1%) 在 37 $^{\circ}$ C 處理 10 分鐘後，之後加入 10 μ l 胰蛋白酶 (2mg/ml)、5 μ l BAPNA (50mg/ml)，放入 37 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，取出後加入 100 μ l 50%醋酸(中止反應)，之後以波長 410 nm 偵測吸收光，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。

2.5.4 DTT 的影響

20 μ l KFTI (1 mg/ml)與最後濃度為 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 和 10 mM 還原劑 DTT (dithiothreitol) 反應，37 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘後，之後加入 10 μ l 胰蛋白酶 (2 mg/ml)、5 μ l BAPNA (50 mg/ml)，37 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，加入兩倍 DTT 濃度的碘醋酸 (iodoacetic acid) 終止 DTT 反應，再加入 100 μ l 50% 醋酸(中止反應)，之後以波長 410 nm 偵測吸收光，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性(Cruz et al, 2013)。

2.6 酵素動力學實驗

以不同濃度(1 μ g、2 μ g)之 KFTI 處理 10 μ l 胰蛋白酶 (2 mg/ml)，37 $^{\circ}$ C 10 分鐘後，取出加入 1ml 0.01M Tris-HCl 與 2.5 μ l、5 μ l、10 μ l BAPNA (50 mg/ml)，每個濃度反應 10 分鐘，記錄每一分鐘 410nm 吸光值變化，之後使用 Beer's law (其中已知 BAPNA 的水解物在波長 410nm 之吸光係數值為 8800 $M^{-1}cm^{-1}$)算出 BAPNA 水解物的濃度，並畫出 Lineweaver-Burk 雙倒數圖來決定其抑制胰蛋白酶作用形式(Navneet et al, 2008)。

利用 Dixon plot 在兩種不同 BAPNA 濃度下決定 KFTI 的解離常數(Ki)，最後以反應速度的倒數 ($nM/min/mL$) $^{-1}$ 對不同的 KFTI 濃度作圖。兩條直線交點數值即為 KFTI 與胰蛋白酶之解離常數 (Dixon, 1953)。

2.7 統計分析

本論文數據至少三重覆之結果，實驗結果以平均值 \pm 標準偏差值(mean \pm SD)表示，各實驗數



據皆使用統計軟體(SPSS v17.0)進行分析。

3. 結果

3.1 台灣欒樹胰蛋白酶抑制劑(KFTI)之純化

KFTI的純化方法是先將台灣欒樹的種子洗淨，以 0.01N 醋酸緩衝溶液浸泡，之後利用組織均質機將種子打成泥狀，以利萃取蛋白質。所得之粗萃取液，利用 70%至 90%的硫酸銨飽和濃度進行鹽度分割，將 70%至 90%硫酸銨飽和濃度沉澱所得到的蛋白質對 0.01N 醋酸作透析。完全透析後，將上清液離心過濾，通過 Sephadex G-50 管柱，利用此管柱分離出不同分子量的蛋白質，以 280nm 測定，可得到兩個吸收峰(圖 1A)。第一個吸收峰收取之液體具有抑制胰蛋白酶的活性。再將具有活性的液體通過陰離子交換樹脂 DEAE-cellulose 管柱，接著以 0 至 0.3N 不同氯化鈉濃度之梯度，沖出蛋白質，結果得到二個吸收峰 (圖 1B)，第二個吸收峰具有抑制胰蛋白酶的活性，收集有活性的部分再通入 Trypsin-Separeose 4B 親和性管柱，此管柱先以 0.01M 磷酸鹽緩衝液 pH8.0 平衡，樣品通入管柱中之後在以上述緩衝液洗至無蛋白質流出為止，最後以 0.01N pH 2.0 鹽酸溶液，將胰蛋白酶抑制劑沖出，可得到一個具有抑制胰蛋白酶活性的吸收峰(圖 1C)。接著利用 15% SDS-PAGE 分析，可得知 KFTI 分子量約為 19 kDa，當加入還原劑 β -mercaptoethanol 時，可發現 KFTI 是由二條 polypeptides 所組成，分子量分別為 12.3 kDa 和 6.7kDa (圖 1D)。KFTI 被純化倍數為 43.7 倍，產率為 23.4 % (表一)。

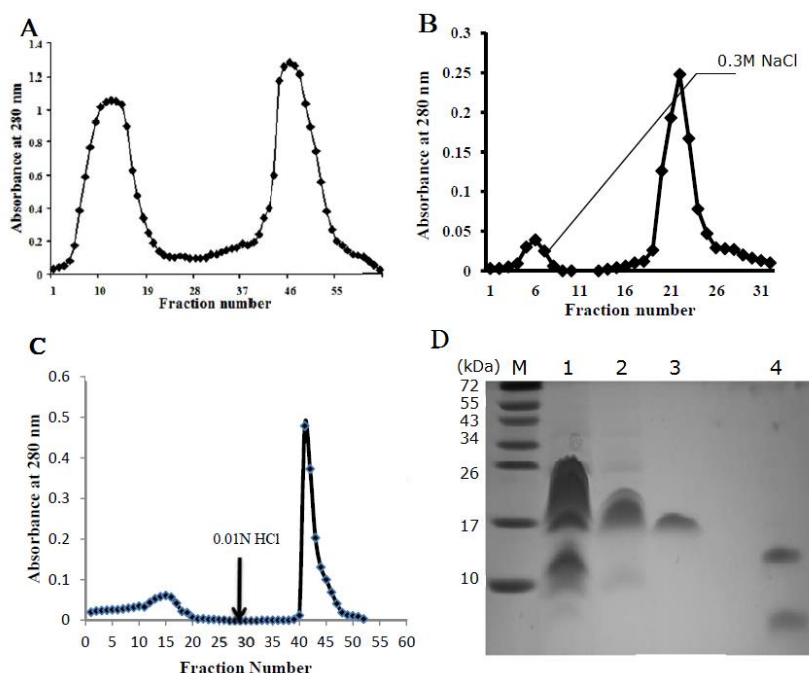


圖 1 KFTI 之純化。(A) 台灣欒樹種子粗萃取液通過凝膠過濾法(Sephadex G-50, 1.5 × 90 公分)，收集具有抑制胰蛋白酶活性的第二個吸收峰，接著利用 DEAE cellulose 離子交換管柱色層分析法(B)，先以 0.01 M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液平衡 DEAE cellulose 管柱(4.5 × 10 公分)，以含 0 到 0.3 M 氯化鈉離子梯度之 0.01 M，pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液為沖洗液，可得一個 OD₂₈₀ 吸收峰，經活性測定後，其具有胰蛋白酶抑制劑的活性。(C)將有活性部分通過



Trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱 (2.2 × 20 公分), 先以含 0.1N 氯化鈉, 0.01M, pH 8.0 磷酸鹽緩衝液沖洗, 將非特異性結合的蛋白質除去, 最後 KFTI 可被 0.01N HCl 溶液沖出。(D) 利用 15% SDS-PAGE 電泳分析。Lane M: 標準蛋白質分子量, Lane 1: Sephadex G-50 膠體分離管柱; Lane 2: DEAE cellulose 離子交換管柱色層分析; Lane 3: Trypsin-Sepharose 4B 親和性管柱所純化的 KFTI, 分子量約為 19 kDa; Lane 4: KFTI 以還原劑 β -mercaptoethanol 處理, 可得到二條帶, 分子量分別為 12.3 kDa 和 6.7kDa。

表一、由台灣欒樹種子純化 KFTI 的產量及活性

| Steps | Total Protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Purification (fold) | Yield (%) |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|-----------|
| Crude extract | 560.5 | 950 | 1.7 | 1 | 100 |
| Fraction 70-90% | 102.2 | 730 | 7.1 | 4.18 | 76.8 |
| Sephadex G-50 | 26.6 | 425 | 16.0 | 9.41 | 44.7 |
| DE-52 cellulose | 16 | 350 | 21.9 | 12.88 | 36.8 |
| Trypsin-Sepharose-4B | 3 | 223 | 74.3 | 43.7 | 23.4 |

3.2 KFTI 對胰蛋白酶抑制活性的穩定度

KFTI 先以不同溫度處理 10 分鐘後, 再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性, 以 100°C 高溫處理 10 分鐘, 仍具有 70% 的活性, 可知 KFTI 對熱具有非常高的穩定性(圖 2A); KFTI 在 pH 值 3.0-10.0 範圍內反應 60 分鐘, 結果顯示 KFTI 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 2B); KFTI 以不同的 SDS 濃度處理 10 分鐘後, 再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性, 在 0.2% SDS 作用 10 分鐘, 尚有不到 10% 的活性, 可見其構造對 SDS 的作用非常敏感(圖 2C)。KFTI 以不同濃度的還原劑 DTT 處理 10 分鐘後再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性, DTT 濃度為 1 mM 時 KFTI 的殘留抑制胰蛋白酶的活性為 50%, 當 DTT 濃度到達 5mM 時只剩下不到 10%, 可知雙硫鍵對其構形的穩定有絕對的重要性(圖 2D)。

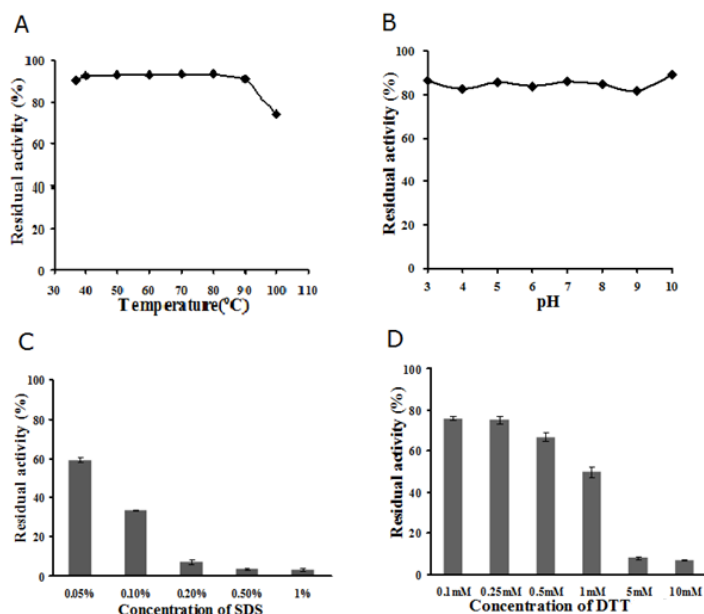


圖 2 KFTI 對溫度、pH、SDS 及 DTT 的穩定度測定。(A) KFTI 先以不同溫度下處理 30 分鐘, 冷卻樣品後, 再測量其殘留抑制胰蛋白酶活性的百分比。(B) KFTI 用不同 pH 緩衝液(100 mM) 以相同容量稀釋之, 在 37°C 水浴中與緩衝液反應一小時, pH 值調整到 8.0, 再測量其殘留抑



制胰蛋白酶的活性。(C)KFTI 的活性對變性劑 SDS 的穩定度測試。KFTI 先以不同 SDS 濃度(0.05%-1%)下處理 10 分鐘，再測量其殘留抑制胰蛋白酶活性的百分比。(D)KFTI 的活性對還原劑 DTT 的穩定度測試。KFTI 先以不同 DTT 濃度(0.1mM-10mM)下處理 10 分鐘，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活性的百分比。每次重複三次，取平均值 SE。

3.3 酵素動力學

而由圖 3 顯示不同量 KFTI 對定量胰蛋白酶的抑制情形。可知胰蛋白酶與 KFTI 作用的莫耳數比為 1: 1。

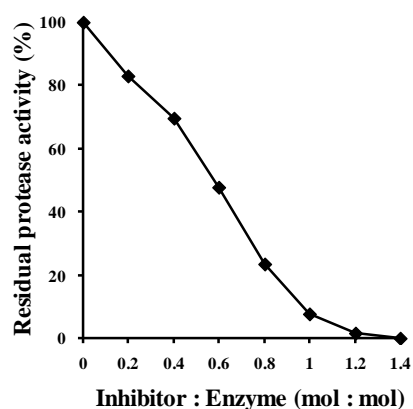


圖 3 KFTI 對胰蛋白酶抑制作用的活性分析。不同濃度的 KFTI 與固定濃度的胰蛋白酶，在 37°C 反應 5 分鐘，再加入 5 μ l BAPNA 溶液(50mg/ml)，37°C 反應 20 分鐘後，加入 0.5 ml 10% 醋酸溶液終止反應，抑制程度由測定 410 nm 吸收值而定。

以不同濃度(1 μ g、2 μ g)之 KFTI 處理胰蛋白酶，37°C、10 分鐘後，取出加入 1ml 0.01M Tris-HCl 與 2.5 μ l、5 μ l、10 μ l BAPNA (50mg/ml)，每個濃度反應 10 分鐘，並在每分鐘時記錄 410nm 吸光值，之後使用 Beer' s law (其中已知 BAPNA 的水解物在波長 410nm 之吸光係數值為 8800 $M^{-1}cm^{-1}$)算出 BAPNA 水解物的濃度，並畫出 Lineweaver-Burk 雙倒數圖來決定其抑制胰蛋白酶作用形式 (圖 4A)，三條直線方程式相交於 y 軸，可知 KFTI 對胰蛋白酶的抑制作用是屬於競爭性的抑制作用。

由利用 Dixon plot 在兩種不同 BAPNA 濃度下決定 KFTI 的解離常數(K_i)，最後以反應速度的倒數對不同的 KFTI 濃度作圖。兩條直線交點數值即為 KFTI 與胰蛋白酶之解離常數， K_i 為 1.78×10^{-9} M (圖 4B)。



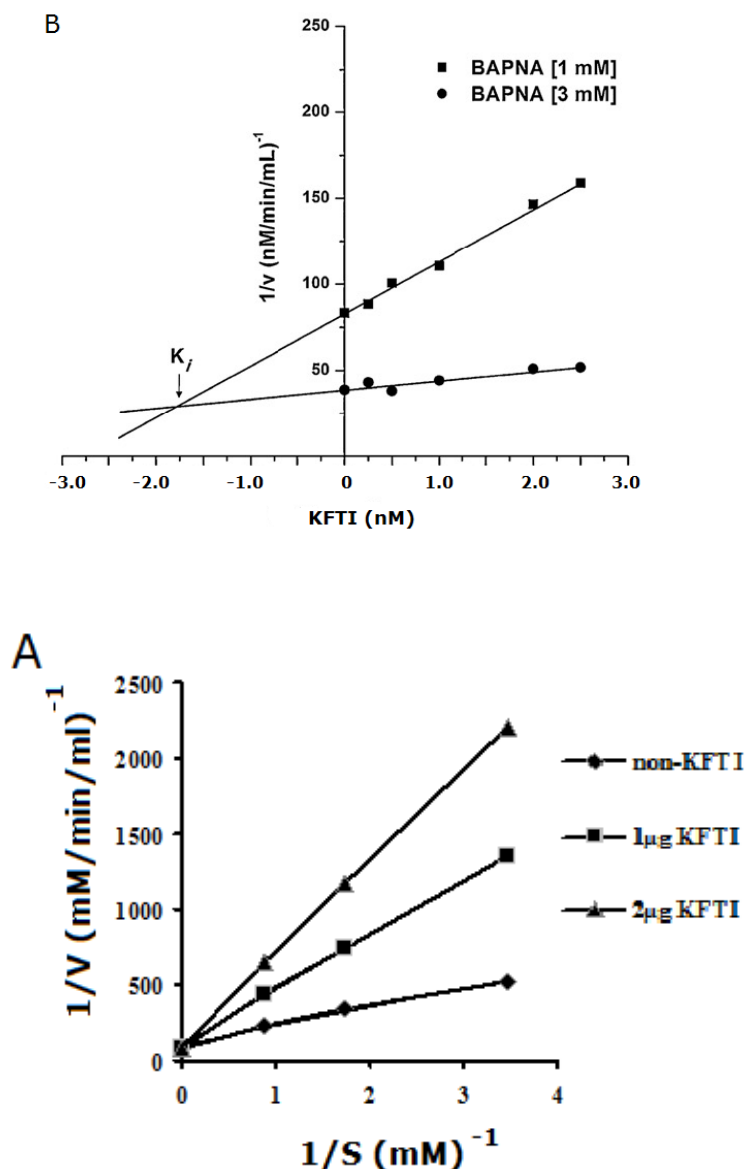


圖 4 酵素動力學實驗。(A)以不同濃度 KFTI 處理胰蛋白酶反應 10 分鐘，之後加入不同濃度受質 BAPNA 測其在 410nm 吸光值，將其測得吸光值帶入 Beer's law 公式(已知 BAPNA 水解物在波長 410nm 之吸光值為 $8800M^{-1}cm^{-1}$)求出 BAPNA 水解物濃度後，畫出 Lineweaver-Burk 雙倒數圖得知交於 Y 軸，為競爭型抑制作用。(B)利用 Dixon plot 在兩種不同 BAPNA 濃度下決定 KFTI 的解離常數(K_i)，最後以反應速度的倒數對不同的 KFTI 濃度作圖。

4. 討論

在最近的研究發現，胰蛋白酶抑制劑在抵抗害蟲、抑制發炎反應、凝血功能及誘導癌細胞凋亡的產生，都扮演著重要的角色(Rufino et al., 2013 ; Oliva et al., 2010 ; Fang et al., 2010 ; Xu et al., 2011 ; Lee et al., 2012)。

本研究從台灣欒樹種子純化出一種新的胰蛋白酶抑制(KFTI)，以 15% SDS-PAGE 分析，得



知其分子量約 19 kDa，由 12.3 kDa 及 6.7 kDa 兩條多肽鏈以雙硫鍵連接所組成，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，KFTI 被純化倍數為 43.7 倍，產率為 23.4 % (表一)。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。KFTI 先以不同溫度處理 10 分鐘後，以 100°C 高溫處理 10 分鐘，仍具有 70% 的活性，可知 KFTI 對熱具有非常高的穩定性；觀察不同 pH 值對 KFTI 抑制活性的影響，KFTI 不論在 pH3~pH10 的環境下其抑制活性並不受太大的影響，與 ECTI、PmTKI、PdKI-4 及 TfgKTI 有相似的結果(Mello et al., 2001; Cruz et al., 2013; Rufino et al., 2013; Oddepally et al., 2013)。

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(Lehle et al., 1996; Hung et al., 2003)與從相思樹(*Acacia confusa*)、*Erythrina caffra*、*Peltophorum dubium*、*Plathymenia foliolosa* 及 *Piptadenia moniliformis* 種子中所純化出的 Kunitz-type 抑制劑(Hung et al., 1994; Lehle et al., 1996; Macedo et al., 2003; Ramos et al., 2008; Oddepally et al., 2013)，這些胰蛋白酶抑制劑經還原劑 DTT 處理，其殘留抑制胰蛋白酶的活性皆明顯的下降，KFTI 在不同濃度的還原劑 DTT 處理 10 分鐘後，其殘留抑制胰蛋白酶的活性也是有明顯的下降，可知 KFTI 的雙硫鍵對其構形的穩定，與其胰蛋白酶抑制劑有相似的結果扮演著重要的角色。而 KFTI 在 0.2% SDS 濃度處理 10 分鐘後，再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性不到 10%，可見其構造對 SDS 非常敏感不穩定。

探討其酵素動力學，以 Lineweaver-burk double reciprocal plot 分析，KFTI 其對胰蛋白酶的抑制作用是屬於競爭性的抑制作用，與由其他植物種子中所分離的 DtTCI、PdKI-4、TfgKTI 及 PmTKI 相同 (Arindam et al., 2009; Rufino et al., 2013; Oddepally et al., 2013; Cruz et al., 2013)，然而有一些 Kunitz type 蛋白酶抑制劑顯示出是屬於非競爭性的(non-competitive)抑制作用，如從 *Adenanthera pavonina*、*Caesalpinia bonduc* 及 *Tamarindus indica* [19]純化的胰蛋白酶抑制劑(Macedo et al., 2004; Bhattacharyya et al., 2007; Araujo et al., 2005)。利用 Dixon plot 作圖求得其對胰蛋白酶的 K_i 值為 1.78×10^{-9} M，顯示 KFTI 對胰蛋白酶具有很高的親和性，其 K_i 值與其他的 Kunitz type 蛋白酶抑制劑有相似的數值，如 EAKTI ($K_i 1.75 \times 10^{-9}$ M)、PmTKI ($K_i 1.5 \times 10^{-9}$ M)、PdKI-4 ($K_i 5.7 \times 10^{-10}$ M)及 TfgKTI ($K_i 3.01 \times 10^{-9}$ M)(Oliveira et al., 2012; Cruz et al., 2013; Rufino et al., 2013; Oddepally et al., 2013)。

參考文獻

- [1] Araujo, C. L., Bezerra, I. W., A. S., Moura, O. F. T., Macedo, L. L., Gomes, C. E., Barbosa, A. E., Macedo, F. P., Souza, T. M., Franco, O.L., Bloch, J. C. and Sales, M. P., "In vivo Bioinsecticidal Activity toward *Ceratitis capitata* (fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea Weevil) and in vitro Bioinsecticidal Activity toward Different Orders of Insect Pests of a Trypsin Inhibitor Purified from Tamarind Tree (*Tamarindus indica*) Seeds," *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 2005, pp. 4381-4387.
- [2] Arindam, B. and Cherukuri, R. B., "Purification and Biochemical Characterization of a Serine



- Proteinase Inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into Structural and Antimalarial Features,” *Phytochemistry*, Vol. 70, 2009, pp. 703-712.
- [3] Azzouz, H., Cherqui, A., Campan, E.D.M., Rahbe, Y., Duport, G., Jouanin, L., Kaiser, L. and Giordanengo, P., “Effects of Plant Protease Inhibitors, Ooryzacystatin I and Soybean Bowman – Birk Inhibitor, on the Aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and Its Parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphaenidae),” *Journal of Insect Physiology*, Vol. 51, 2005, pp. 75-86.
- [4] Bhattacharyya, A., Rai, S. and Babu, C. R., “A Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor from *Caesalpinia bonduc* Seeds: Isolation, Partial Characterization and Insecticidal Properties,” *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 45, 2007, pp. 169-177.
- [5] 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.
- [6] Cruz, A. C. B., Massena, F. S., Migliolo, L., Macedo, L. L. P., Monteiro, N. K. B., Oliveira, A. S., Macedo, F. P., Uchoa, A. F., Grossi de Sá, M. F., Vasconcelos, I. M., Murad, A. M., Franco, O. L. and Santos, E. A., “Bioinsecticidal Activity of a Novel Kunitz Trypsin Inhibitor from *Catanduva* (*Piptadenia moniliformis*) Seeds,” *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 70, 2013, pp. 61-68.
- [7] De Leo, F., Bonade-Bottino, M., Ceci, L. R., Gallerani, R. and Joaunin, L., “Effects of a Mustard Trypsin Inhibitor Expressed in Different Plants on Three Lepidopteran Pests,” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 31, 2001, pp. 593-602.
- [8] Dixon, M., “The determination of enzyme inhibitor constants,” *Biochemical Journal*, Vol. 55, 1953, 170-171.
- [9] 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.
- [10] Ennedy, 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. 125-33.
- [11] Fang, E. F., Wong, J. H. and Ng, T. B., “Thermostable Kunitz Trypsin Inhibitor with Cytokine Inducing, Antitumor and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activities from Korean Large Black Soybeans,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 109, 2010, pp. 211-217.
- [12] 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.
- [13] 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*, Vol. 10, 2003, pp. 13-22.
- [14] Hung, C. H., Wu, C. C. and Wang, H.L., “Inhibition of Invasion in Human Colon



- Adenocarcinoma Cells by Acacia confusa Trypsin Inhibitor,” *Journal of Health Management*, Vol. 12, 2014, pp. 49-60.
- [15] 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.
- [16] Inoue, K., Takano, H., Yanagisawa, R., Sakurai, M., Shimada, A., Yoshino, S., Sato, H. and Yoshikawa, T., “Protective role of Urinary Trypsin Inhibitor in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide,” *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 230, 2005, pp. 281-287.
- [17] Kennedy, A. R., Billings, P. C., Wan, X. S. and Newberne, P. M., “Effects of Bowman-Birk Inhibitor on Rat Colon Carcinogenesis,” *Nutrition and Cancer*, Vol. 42, 2002, pp. 174-186.
- [18] 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.
- [19] Lee, S. H., Kim, H. J., Han, H. J., Li, M., Kwak, S. H. and Park, S., “Urinary Trypsin Inhibitor Attenuates Lipopolysaccharide-induced Neutrophil Activation,” *Korean Journal of Anesthesiology*, Vol. 63, 2012, pp. 540-546.
- [20] 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 Physicochemical Characterization,” *Nature Biotechnology*, Vol. 14, 1996, pp. 476-480.
- [21] Leplé, 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 Breeding*, Vol. 1, 1995, pp. 319-328.
- [22] 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.
- [23] Macedo, M. L., de Sa, C. M., Freire, M. D. and Parra, J. R., “A Kunitz-type Inhibitor of Coleopteran Proteases, Isolated from Adenanthera pavonina L. Seeds and Its Effect on Callosobruchus maculatus,” *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, 2004, pp. 2533-2540.
- [24] 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.
- [25] Meyskens, F. L., “Development of Bowman-Birk Inhibitor for Chemoprevention of Oral Head and Neck Cancer,” *The Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 952, 2001, pp. 116-23.



- [26] 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.
- [27] Muricken, D. G., Gowda, L. R., "Functional Expression of Horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk Inhibitor and Its Self-association," *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1804, 2010, pp.1413-1423.
- [28] Navneet, S. C., Chandan, S., Asimul, I., Faizan, A., Dinesh, Y., Pravindra, K. and Ashwani, K. S., "Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds" , *Phytochemistry*, Vol. 69, 2008, pp. 2120-2126.
- [29] Oddepally, R., Sriram, G. and Guruprasad, L., "Purification and Characterization of a Stable Kunitz Trypsin Inhibitor from *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) Seeds," *Phytochemistry*, Vol. 96, 2013, pp. 26-36.
- [30] Oliva, M. L., Silva, M. C., Sallai, R. C., Brito, M. V. and Sampaio, M.U., "A novel Subclassification for Kunitz Proteinase Inhibitors from Leguminous Seeds.," *Biochimie*, Vol. 92, 2010, pp. 1667-1673.
- [31] Oliveira, C. F. R., Vasconcelos, I. M., Aparicioc, R., Freire, M. G. M., Baldasso, P. A., Marangonia, S. and Macedoe, M. L. R., "Purification and Biochemical Properties of a Kunitz-type Trypsin Inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) Seeds," *Process Biochemistry*, Vol. 47, 2012, pp. 929-935.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Rufino, F. P., Pedroso, V. M., Araujo, J. N., França, A. F., Rabêlo, L. M., Migliolo, L., Kiyota, S., Santos, E. A., Franco, O. L. and Oliveira, A. S., "Inhibitory Effects of a Kunitz-type Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) Seeds Against Insect-pests' Digestive Proteinases," *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 63, 2013, pp. 70-76.
- [35] Yeh, K.W., Lin, M. I., Tuan, S. J., Chen, Y. M., Lin, C. Y., 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.
- [36] Xu, Y., Qin, X., Zhou, J., Tu, Z., Bi, X., Li, W., Fan, X. and Zhang, Y., "Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 Inhibits the Growth and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells and Is Inactivated in Human Hepatocellular Carcinoma," *Oncology Letters*, Vol. 2, 2011, pp. 779-783.

