

# 鵲豆種子中 Bowman-Birk 型的胰蛋白酶抑制劑之純化及特性分析

## Purification and Characterization of a Bowman-Birk-type Trypsin Inhibitor from the Seeds of *Lablab purpureus*

林旻慶 Min-Ching Lin 王海龍 Hai-Lung Wang 洪志宏\* Chih-Hung Hung

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:** 本實驗以鵲豆 (*Lablab purpureus*) 種子為材料，利用硫酸銨分割、Sephadex G-50、DEAE-cellulose 52陰離子交換樹脂及trypsin-Sepharose 4B親和性管柱，可以從鵲豆種子中純化出一種胰蛋白酶抑制劑 (*Lablab purpureus* trypsin inhibitor)，簡稱LPTI。以MALDI-TOF質譜儀分析LPTI，得知其分子量為8.24 kDa，依其分子量大小是屬於Bowman-Birk type胰蛋白酶抑制劑。進一步對此蛋白的性質研究，發現LPTI在溫度到達90及100°C時，其抑制胰蛋白酶的殘留活性仍有90%左右，對溫度具有非常高的耐受性；LPTI在不同pH的緩衝溶液處理下，活性仍保有88%以上，可知其結構的穩定性不受pH值的影響而有所改變；在不同濃度的DTT處理下，抑制胰蛋白酶的活性隨著DTT濃度升高而下降，故維持LPTI活化位置 (active site)的構形穩定與分子內雙硫鍵的存在有明顯的相關性。LPTI抑制胰蛋白酶作用其莫耳數比為1：1。利用Lineweaver-burk double reciprocal plot及Dixon plots分析顯示，LPTI對胰蛋白酶的抑制是屬於競爭性抑制作用，抑制常數 (inhibition constant,  $K_i$ ) 為 $1.9 \times 10^{-9}$  M。

**關鍵字：** 鵲豆、胰蛋白酶抑制劑、Bowman-Birk

**Abstract:** With the *Lablab purpureus* seeds as the test materials, this experiment utilized ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-50, DEAE-cellulose 52 ion exchange resin and affinity chromatography with a trypsin-Sepharose 4B column to purify a kind of *Lablab purpureus* trypsin inhibitor (LPTI). The MALDI-TOF mass spectrometer was used to analyze the LPTI. With a molecular weight of 8.24 kDa, it belongs to the Bowman-Birk type trypsin inhibitor. Further study on the nature of the protein found that the residue activity of the trypsin still remained about 90% when the LPTI was under temperature of 90°C



to 100°C, which showed very high temperature tolerance. When LPTI was treated with buffer solution of different pH values, the trypsin activity remained above 88%, which showed that its structural stability was unchanged under the effect of pH values. When treated by different concentrations of DTT, the activity of the inhibiting trypsin decreases with the increasing DTT concentration, so the conformational stability for maintaining the active site of the LPTI is obviously correlated to the existence of intramolecular disulfide bonds. LPTI inhibits bovine trypsin activity in 1:1 molar ratio. The Lineweaver-burk double reciprocal plot and Dixon plot analyses showed that the inhibition effect of LPTI on the trypsin belongs to competitive inhibition, with the inhibition constant  $k_i$  being  $1.9 \times 10^{-9}$  M.

**Keywords:** *Lablab purpureus*、trypsin inhibitor、Bowman-Birk

## 1. 前言

蛋白酶 (protease) 為一種可以水解胜肽鍵的酵素，在細胞中扮演著重要的角色，蛋白酶抑制劑普遍存在於植物界 (Alves et al., 2010)：如豆科、茄科；動物界 (Hu et al., 2015)：血液、精液、胰臟；微生物界：酵母菌、鏈球菌屬中亦有蛋白酶抑制劑的存在 (Marcello et al., 2007)。

目前蛋白酶的分類主要是依據其活化位置與作用方式的不同分成四大類；絲胺酸型蛋白酶 (serine protease) (Steven et al., 1996)、半胱胺酸型蛋白酶 (cysteine protease) (Sivaraman et al., 2000)、金屬型蛋白酶 (metalloprotease) (Chaudhari et al., 2013)、天門冬胺酸型蛋白酶 (aspartyl protease) (Pinho et al., 2009)，這四種蛋白酶所催化的位置有所不同，其中又以絲胺酸型蛋白酶 (serine protease) 普遍存在於豆科種子中。

胰蛋白酶抑制劑 (trypsin inhibitor) 屬於絲胺酸型蛋白酶抑制劑 (serine protease inhibitor)，依照其特性又可以區分為 Kunitz-type、Bowman-Birk-type、Potato I、Potato II、Squash、Cereal super 等家族。植物中的胰蛋白酶抑制劑依分子量大小和半胱胺酸含量，主要可分成兩類：(1) Kunitz-type：分子量約為 18-24 kDa，含有較少的半胱胺酸，每 100 個胺基酸含有 2 個半胱胺酸，具有一條或兩條胜肽鏈 (polypeptide chain)，通常含有四個半胱胺酸，並可形成兩對雙硫鍵 (Lingaraju et al., 2008)。(2) Bowman-Birk-type：分子量較小，約為 8-10 kDa，含有很高的半胱胺酸，每 100 個胺基酸約含有 20 個半胱胺酸，通常可形成 7-8 對的雙硫鍵 (Paiva et al., 2006)。

胰蛋白酶抑制劑，在農業方面的應用能對抗昆蟲保護重要的經濟作物，在醫學方面的應用可作為對抗癌症等的藥物。首先是由 Hilder et al. (1987 年) 由 *Vigna unguiculata* 的胰蛋白酶抑制劑的基因轉殖到煙草，轉殖菸草可抵抗大多數蟲害，包括鱗翅目昆蟲：*Heliothis* 及 *Spodoptera*；鞘翅目：*Diabrotica*, *Anthonomus*；直翅目：*Locusts*。Bowman-Birk inhibitor 代表



的是在植物生命週期高度調控的種子蛋白基因家族之一 (Goldberg et al., 1989)。

鵲豆，學名：*Lablab purpureus*，豆科 (Fabaceae)，扁豆屬 (Lablab)。別名蛾眉豆、肉豆、扁豆、白豆、眉豆。是廣布於非洲、印度與印尼等熱帶地區的食用作物。扁豆是適合貧窮地區食用的作物之一，因為其容易種植、能在較酸、含鋁較高且較貧瘠的土地生長，且產量豐富又較不受乾旱影響，在乾季仍維持生產。鵲豆也有助於土地肥力的培養，其根可從地底深部吸收養分，且共生的根瘤菌可大幅提升土中的含氮量。

本篇論文是從鵲豆 (*Lablab purpureus*) 種子中純化出一種胰蛋白酶抑制劑 (*Lablab purpureus* trypsin inhibitor)，簡稱LPTI。以15% SDS-PAGE分析LPTI的純度及MALDI-TOF質譜儀分析LPTI的分子量。首先探討LPTI對胰蛋白酶抑制活性特性及其對溫度、pH值、DTT等的耐受性研究，及利用Lineweaver-burk double reciprocal plot及Dixon plots研究LPTI對胰蛋白酶的抑制作用方式及抑制常數 $K_i$ 值。

## 2. 研究方法

### 2.1 LPTI的萃取

取鵲豆種子100克，浸泡於一公升的0.01M，pH 8.0磷酸緩衝液中，置於4°C冰箱過夜。之後利用組織均質機將種子打成漿（每次30秒，15-20次），在4°C下以KUBOTA 7700離心機10,000 rpm離心30分鐘。離心完取上清液，緩緩加入硫酸銨至濃度為50%，待硫酸銨完全溶解後，離心30分鐘（4°C，10,000 rpm）。離心完取沉澱物放入透析袋，並標示為0-50%取得的沉澱物，上清液再加入固體硫酸銨至70%，待硫酸銨完全溶解後，離心30分鐘（4°C，10000 rpm）。離心完取沉澱物放入透析袋，並標示為50-70%取得的沉澱物，將上清液再加入固體硫酸銨至100%，待硫酸銨完全溶解後，離心30分鐘（4°C，10,000 rpm）。離心完取沉澱物放入透析袋，並標示為70-100%取得的沉澱物。

將裝有沉澱物的透析袋浸泡於3公升的0.01M磷酸緩衝液透析，放置4°C透析，每5小時更換一次透析液，約換5次。透析完畢後將透析袋中的內容物取出，離心15分鐘（4°C，10,000 rpm）。離心後，取上清液測量活性，將具有抑制胰蛋白酶活性的上清液通過預先以0.01M pH 8.0的磷酸緩衝液平衡過的Sephadex G-50管柱（1.5×90公分），以0.01M pH 8.0的磷酸緩衝液為沖洗液，以GE Healthacre Frac-920每3ml收集一管。收集完後測波長280 nm的吸收，收集具有抑制胰蛋白酶活性的部分直接通入以0.01M pH 8.0的磷酸緩衝液平衡過的DEAE-52 cellulose管柱（2.2×20公分），以含0到0.2M的氯化鈉梯度之0.01M，pH 8.0的磷酸緩衝液為沖洗液，流速為每小時36 ml，以GE Healthacre Frac-920每3ml收集一管，每管測定波長280nm的吸收，將具有胰蛋白酶抑制劑活性的吸收峰對0.01M，pH 8.0的磷酸緩衝液透析，透析後通過Trypsin-Sepharose 4B親和性管柱（2.2×20公分），先以0.01M，pH 8.0的磷酸緩衝液沖洗，將非特异性結合的蛋白質除去，最後以0.01N的鹽酸溶液沖洗，可得到一個



蛋白吸收峰，此即為純化的LPTI，其純度可由15% SDS-PAGE決定。

## 2.2 胰蛋白質活性測定

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LPTI 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BPTI溶液，其餘步驟與實驗組相同。空白組是以0.5毫升LPTI溶液（實驗空白組）或0.5毫升磷酸鹽緩衝液（對照空白組）依序加入0.5毫升trypsin溶液，0.5毫升10%醋酸溶液，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。BPTI抑制能力的計算方法可以用殘餘酶活性（residual trypsin activity，簡稱R.T.A.）或以抑制百分比（percent inhibitor，簡寫為%I）來表示（Mello, etal 2001）。抑制單位的定義：抑制1毫克胰蛋白酶所需的抑制劑量，謂之1抑制單位（inhibition unit），計算公式如下：

$$\text{R.T.A. (\%)} = \frac{A1-A3}{A2-A4} \times 100\%$$

A1=實驗組之A410 nm

A2=對照組之A410 nm

A3=實驗空白組A410 nm

A4=對照空白組A410 nm

I (%) = 1 - R.T.A. (%)

## 2.3 蛋白質濃度的定量

蛋白質定含量是根據Bradford的方法（Bradford etal, 1976），利用Coomassie Blue G250 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。

## 2.4 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳法（SDS-PAGE）

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 LPTI對胰蛋白質抑制活性的穩定度

### 2.5.1 溫度的影響

LPTI溶液以不同的溫度（37°C-100°C）處理30分鐘，之後加入10 μl的trypsin（2 mg/ml）、5 μl的BAPNA（50 mg/ml），置於37°C反應30分鐘，取出後加入100 μl的50%醋酸（終止反應），以波長410 nm偵測吸收光，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。

### 2.5.2 pH值的影響

測量LPTI對不同pH值的穩定性，LPTI溶於不同的緩衝液（100mM）以相同的容量



稀釋，緩衝液種類如下：檸檬酸鈉（pH 4.0）、醋酸鈉（pH 5.0）、磷酸鈉（pH 6.0、7.0）、Tris-HCl（pH 8.0）、碳酸氫鈉（pH 9.0、10.0）。在37°C水浴中與緩衝液反應30分鐘，再把pH值調整到8.0，加入10 $\mu$ l的trypsin（2 mg/ml）、5 $\mu$ l的BAPNA（50 mg/ml），放入37°C反應30分鐘，取出後加入100 $\mu$ l的50% 醋酸（終止反應），以波長410nm偵測吸收光，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。每次重複三次，取平均值 $\pm$ SE。

## 2.6 3DTT的影響

LPTI與最後濃度1、10、100 mM還原劑DTT（dithiothreitol）37°C反應15、30、60、90分鐘後，藉由加入兩倍DTT濃度的碘醋酸（iodoacetic acid）終止反應，再加入10  $\mu$ l的trypsin（2 mg/ml）、5  $\mu$ l的BAPNA（50 mg/ml），放入37°C反應反應30分鐘，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 $\pm$ SE（Cruz et al, 2013）。

## 2.7 酵素動力學實驗

以不同濃度（0  $\mu$ g、0.13  $\mu$ g、0.26  $\mu$ g）之LPTI處理10  $\mu$ l的trypsin（2 mg/ml），37°C、10分鐘後，取出加入1 ml的0.01M Tris-HCl與1.1 $\mu$ l、2.2 $\mu$ l、4.4 $\mu$ l、6.5 $\mu$ l的BAPNA（50mg/ml），每個濃度反應10分鐘，並在每一分鐘紀錄OD<sub>410</sub>吸光值，之後使用Lineweaver-burk double reciprocal plot，來決定LPTI對trypsin的抑制作用形式。

利用Dixon plot作圖（Dixon, 1953），在不同濃度下的BAPNA，以每分鐘OD<sub>410</sub>吸光值變化量的倒數對不同的LPTI濃度作圖所畫出的兩條直線，求出交叉點的值，即為LPTI對胰蛋白酶的抑制常數（K<sub>i</sub>）。

# 3. 結果

## 3.1 鵲豆胰蛋白質抑制劑（LPTI）之純化

LPTI的純化方法是先將鵲豆的種子洗淨，以0.01N磷酸緩衝溶液浸泡，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，利用不同濃度的硫酸銨進行分割，將具有活性的70%至100%硫酸銨飽和濃度沉澱的蛋白質對0.01N磷酸緩衝溶液進行透析，將透析液離心過濾，將上清液，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）。第二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-52 cellulose管柱，接著以0至0.2M不同氯化鈉濃度之梯度，沖出蛋白質，結果得到三個吸收峰（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-Sepharose 4B親和性管柱，此管柱先以0.01M磷酸鹽緩衝液pH 8.0，含0.2N氯化鈉平衡，樣品通入管柱中，之後再以上述緩衝液洗至無蛋白質流出為止，最後以0.01N pH2.0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%的SDS-PAGE分析（圖1D），得到一條純化的蛋白質，將LPTI加入還原劑 $\beta$ -mercaptoethanol處理後，仍只



得到一條色帶，表示LPTI是由單一多肽鏈所組成。將蛋白質以MALDI-TOF質譜儀分析後得知分子量為8.24 kDa（圖2）。表一顯示在純化鵲豆胰蛋白酶抑制劑時，每一個步驟獲得的回收產率及純化倍數，最後經Trypsin-Sepharose 4B affinity column純化，LPTI其回收率為19.5%。由圖3顯示不同量LPTI對定量胰蛋白酶的抑制作用，可知LPTI與胰蛋白酶作用的莫耳數比為1：1。

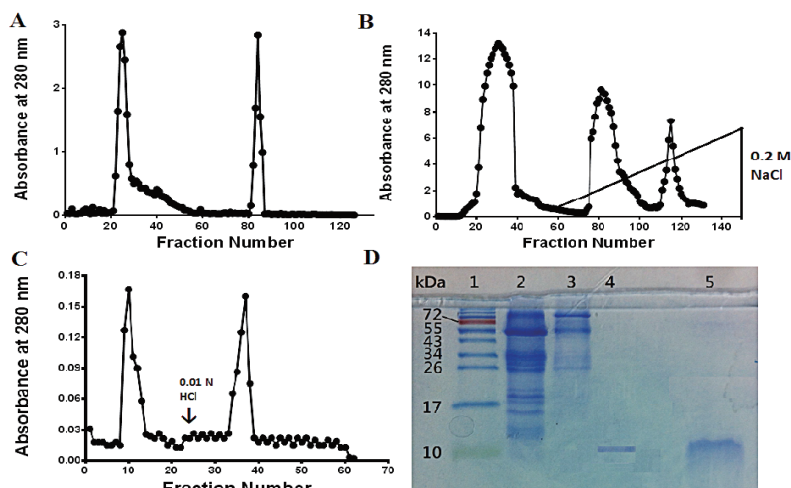


圖1 LPTI的純化。(A) Sephadex G-50膠體分離管柱純化。將鵲豆 (*Lablab purpureus*) 種子萃取液經過70%-100%硫酸銨鹽析、透析後，將上清液通過Sephadex G-50膠體分離管柱，分析發現有兩個波峰，經活性分析發現第二個波峰具有抑制胰蛋白酶的活性。接著將第二個具有活性的波峰利用DEAE-cellulose 52離子交換管柱分析 (B)，以含0到0.2M的氯化鈉離子梯度之0.01M，pH8.0的磷酸鹽緩衝溶液為沖提液，偵測到二個波峰，經活性分析試驗發現第一個波峰具有抑制胰蛋白酶活性。(C) 將具有活性的部分通入Trypsin-Sepharose 4B親和性管柱，以0.01M，pH8.0的磷酸鹽緩衝液將非特異性結合的蛋白去除後，以0.01 N HCl溶液沖提，可將LPTI沖出。(D) 利用15% SDS PAGE電泳分析。Lane 1：Marker；Lane 2：粗萃取物；Lane 3：DEAE-cellulose 52離子交換管柱分析；Lane 4：Trypsin-Sepharose 4B親和性管柱後所純化後的LPTI；Lane 5：LPTI以還原劑 $\beta$ -mercaptoethanol處理。

表一 由鵲豆種子純化LPTI的產量及活性。

Steps	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	790	1422	1.8	1	100
Fraction 70-100%	158	1100	7.0	3.9	77.3
Sephadex G-50	44.7	670	15	8.3	47.5
DE-52 cellulose	18.3	622	34	18.9	43.8
Trypsin-Sepharose-4B	3.7	277	75	41.7	19.5



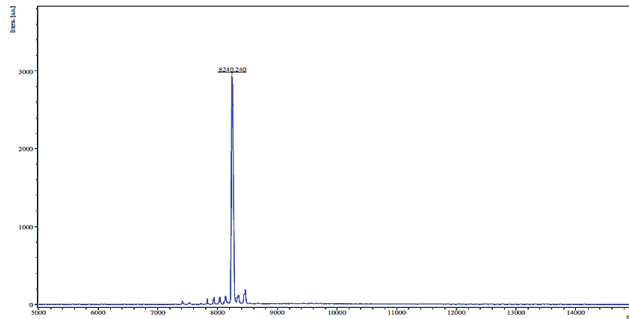


圖2 MALDI-TOF質譜儀分析LPTI的分子量。可得到LPTI的分子量為8.24 kDa。

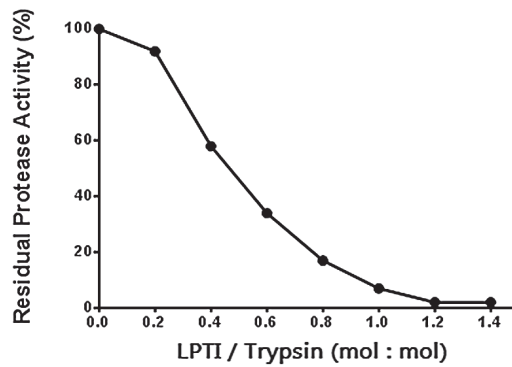


圖3 LPTI對胰蛋白酶抑制作用的活性分析。不同濃度的LPTI與固定濃度的胰蛋白酶，在37°C反應5分鐘，再加入4 $\mu$ l的BAPNA溶液（50mg/ml），37°C反應30分鐘，再加入0.5ml的10% 醋酸溶液終止反應，抑制程度由測定410nm吸收值而定。

### 3.2 酵素動力學實驗

以不同濃度（0 $\mu$ g、0.13 $\mu$ g、0.26 $\mu$ g）之LPTI處理10 $\mu$ l的trypsin（2mg/ml），37°C、10分鐘後，取出加入1ml的0.01M Tris-HCl與1.1 $\mu$ l、2.2 $\mu$ l、4.4 $\mu$ l、6.5 $\mu$ l四種不同的BAPNA（50mg/ml），每個濃度反應10分鐘，並在每一分鐘紀錄吸光值，之後使用每分鐘OD<sub>410</sub>吸光值的變化量的倒數（1/A<sub>410 nm</sub>）對1/（受質濃度）作Lineweaver-burk double reciprocal plot，三條直線方程式相交於y軸，表示胰蛋白酶的最大反應速率不變，Km值變大，可知LPTI對胰蛋白酶的抑制作用是屬於競爭性抑制作用（圖4A）。

利用Dixon plot在兩種不同BAPNA濃度下決定LPTI的解離常數（Ki），最後以反應速度的倒數（1/A<sub>410 nm</sub>）對不同的LPTI濃度作圖。兩條直線交點數值即為KFTI與胰蛋白酶之抑制常數，Ki為1.9 $\times 10^{-9}$  M（圖4B）。



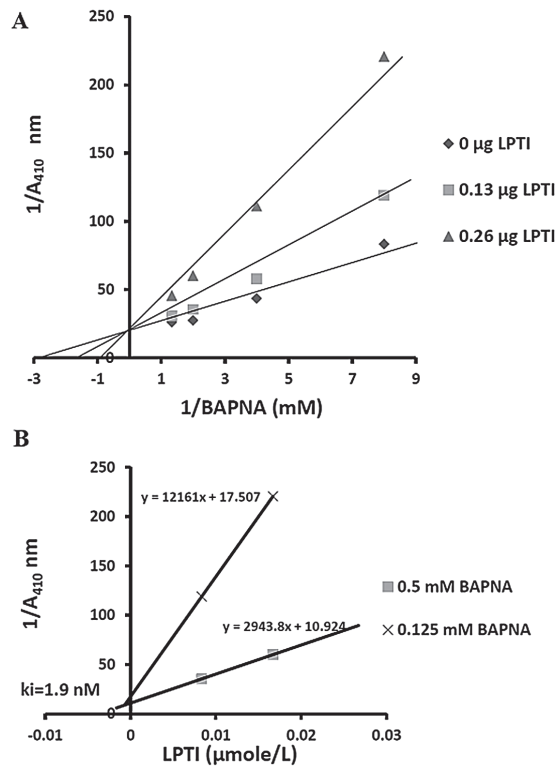


圖4 LPTI酵素動力學分析。(A)以不同濃度LPTI處理胰蛋白酶反應10分鐘，之後加入不同濃度受質BAPNA測其每分鐘410nm吸光值得變化量，並以 $1/A_{410} \text{ nm}$ 對 $1/S$ 作圖畫出Lineweaver-burk double reciprocal plot，得知三條直線方程式交於y軸，因此LPTI對胰蛋白酶的抑制作用是屬於競爭性抑制作用。(B)利用Dixon plot 決定LPTI對胰蛋白酶的抑制常數( $K_i$ )。在不同濃度下的BAPNA，以 $1/A_{410} \text{ nm}$ 對LPTI的濃度作圖所畫出的兩條直線，求出交叉點的值，即為LPTI對胰蛋白酶的抑制常數( $K_i$ )，其 $K_i$ 值為 $1.9 \times 10^{-9} \text{ M}$ 。

### 3.3 LPTI對胰蛋白酶抑制活性的穩定性

LPTI先以不同溫度處理30分鐘後，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性，以 $100^\circ\text{C}$ 高溫處理30分鐘，仍具有90%的活性，可得知LPTI對熱具有非常高的穩定性(圖5A)；LPTI在pH值3.0-10.0範圍內反應60分鐘，測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性，結果顯示LPTI在pH 10的環境下，活性仍保持88%，其結構的穩定性不受pH值的影響而有所改變(圖5B)；LPTI以不同濃度的DTT處理15、30、60、90分鐘，之後測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性(圖5C)，可得到LPTI隨著處理DTT濃度及時間的增加，殘留的胰蛋白酶抑制活性隨著降低，當處理10mM DTT 90分鐘後，LPTI只剩下48%的活性，處理100mM DTT 90分鐘，活性僅剩下23%，可知雙硫鍵對其結構的穩定度有絕對的重要性。





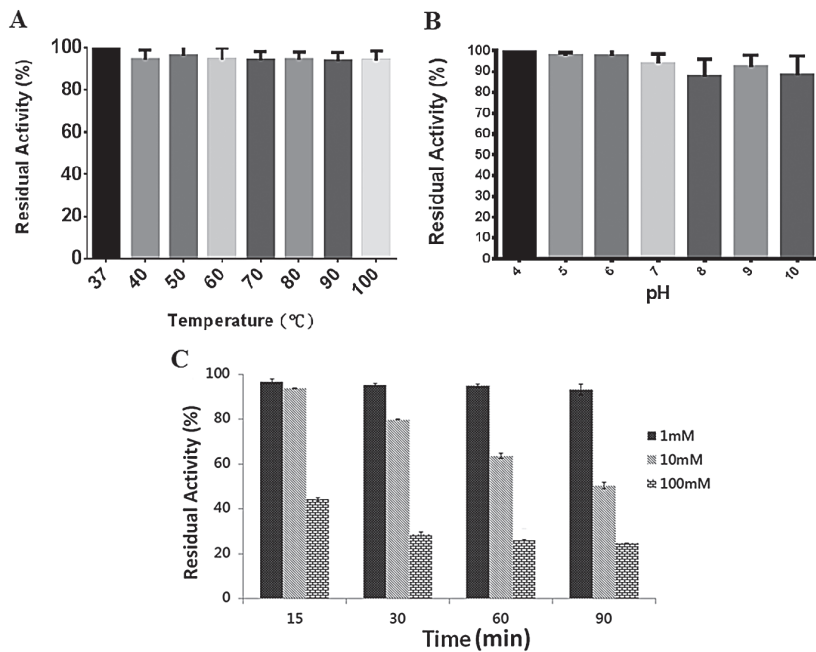


圖5 LPTI對溫度、pH及DTT的穩定度測定。(A)LPTI先以不同溫度下處理30分鐘，冷卻樣品後，再測量其殘留抑制胰蛋白酶活性的百分比。(B) LPTI用不同pH緩衝液（100mM）以相同容量稀釋之，在37°C水浴中與緩衝液反應一小時，pH值調整到8.0，再測量其殘留抑制胰蛋白酶的活性。(C) 還原劑DTT對LPTI胰蛋白酶抑制作用的活性分析。LPTI先以不同濃度DTT（1mM、10mM、100mM）下處理15、30、60、90分鐘，藉由加入兩倍DTT濃度的碘醋酸（iodoacetic acid）終止反應，再測量其殘留抑制胰蛋白酶活性的百分比。每次重複三次，取平均值±SE。

#### 4. 討論

蛋白酶（protease）普遍存在於自然界，而植物中的胰蛋白酶抑制劑屬於絲胺酸型蛋白酶抑制劑（serine protease inhibitor），而其中以Kunitz-type和Bowman-Birk-type最為常見。Kunitz-type分子量約為18-24 kDa，且會形成兩對雙硫鍵含有較少的半胱胺酸，大約只佔了2%，具有一條或兩條polypeptide chain並可形成兩對雙硫鍵。另一類為Bowman-Birk-type，分子量較小約為8-10 kDa，含有很高的半胱胺酸，大約佔了20%，通常可形成7-8對雙硫鍵（Fang et al., 2010；Barbosa et al., 2007；Machado et al., 2013）。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）。



本研究以鵲豆種子為材料，將70%-100%硫酸銨飽和濃度沉澱後的粗萃取物經透析、離心，將其通過Sephadex G-50管柱，將其具有活性的部分再通過DEAE-cellulose 52管柱和Trypsin-Separeose 4B親和性管柱，可純化出LPTI。再以15% SDS-PAGE分析可得知LPTI是由單一多肽鏈所組成的。以MALDI-TOF質譜儀分析，獲得LPTI的分子量為8.24kDa。由分子量大小可知其屬於Bowman-Birk -type蛋白酶抑制劑。

接著探討會影響結構穩定的物理、化學變性劑：如溫度、pH值、還原劑，是否會改變蛋白酶抑制劑的構形，進而影響到其抑制胰蛋白酶之活性，首先將LPTI以不同溫度處理30分鐘後，再測量其殘留活性，發現經過100°C處理後，仍有90%左右的活性，由此可得知LPTI對熱具有非常高的穩定性，與從羅氏核果木（*Putranjiva roxburghii*）、番木瓜（*Carica papaya*）和巴西盾柱木（*Peltophorum Dubium*）所分離的蛋白酶抑制劑有相似的結果（Chaudhary et al., 2008；Azarkan et al., 2006；Macedo et al., 2003）。LPTI在pH值4-10的環境下處理30分鐘，其抑制胰蛋白酶之活性並不受太大的影響，與KBTI有相似的結果（Fang et al., 2010）。一般的胰蛋白酶抑制劑其分子內雙硫鍵是負責穩定結構的作用，如從油菜（*Brassica campestris*）、雙花扁豆（*Dokichos biflorus*）種子中分離的Bowman-Birk-type蛋白酶抑制劑（Lehle et al., 1996；Hung et al., 2003）與從相思樹（*Acacia confusa*）、火炬刺桐（*Erythrina caffra*）、巴西盾柱木（*Peltophorum dubium*）、*Plathymenia foliokosa*及台灣欒樹（*Koelreuteria formosana*）種子中所純化出來的Kunitz-type抑制劑（Lehle et al., 1996；Hung et al., 2003；Hung et al., 1994；Macedo et al., 2003；Ramos et al., 2008；Hung et al., 2015），這些抑制劑經還原劑DTT處理過後，其殘留抑制胰蛋白酶的活性皆明顯下降，而LPTI也隨著處理DTT濃度及時間的增加，殘留的胰蛋白酶抑制活性隨著降低，可知雙硫鍵對LPTI的結構穩定度也有絕對的重要性。

Bowman-Birk-type蛋白酶抑制劑對胰蛋白酶具有很高的親和性抑制作用，常以競爭性或非競爭性抑制機制作用，以Lineweaver-burk double reciprocal plot分析LPTI對胰蛋白酶抑制作用的形式，結果LPTI對胰蛋白酶的抑制作用是屬於競爭性的抑制作用，D<sub>i</sub>TCI也是競爭性的抑制作用（Bhattacharyya et al., 2009），然而部分的Bowman-Birk-type蛋白酶抑制劑是屬於非競爭性的抑制作用，如BgPI（Prasad et al., 2010）。利用Dixon plot作圖求得其對胰蛋白酶的K<sub>i</sub>值為 $1.9 \times 10^{-9}$  M，對胰蛋白酶具有很高的親和性，其K<sub>i</sub>值與其他的Bowman-Birk-type胰蛋白酶抑制劑有相似的數值，如決明（*Senna tora*）、榼藤子屬（*Entada acaciifolia*）、香草（*Trigonella foenum-graecum*）、巴西芸香（*Dimorphandra mollis*）、巴西盾柱木（*Peltophorum dubium*）、柔毛艾納香（*D. mollis*）其抑制常數分別為 $2.3 \times 10^{-10}$  M、 $1.75 \times 10^{-9}$  M、 $3.01 \times 10^{-9}$  M、 $5.3 \times 10^{-10}$  M、 $4.0 \times 10^{-10}$  M、 $1.7 \times 10^{-9}$  M（Muricken et al., 2010）。



## 參考文獻

- [1] Alves, M., Chaves, I., Carrilho, D., Veloso, M. and Ricardo, C. P., “Detection of Novel Trypsin Inhibitors in the Cotyledons of Phaseolus vulgaris Seeds” *Journal of Plant Physiology*, Vol. 167, 2010, pp. 848-854.
- [2] Azarkan, M., Dibiani, R., Goormaghtigh, E., Raussens, V. and Baeyens-Volant, D., “The Papaya Kunitz-type Trypsin Inhibitor is a Highly Stable  $\beta$ -Sheet Glycoprotein,” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1764, 2006, 1063-1072.
- [3] Bhattacharyya, A. and Babu, C. R., “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.
- [4] Bradford, M. M., “Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding,” *Analytical Biochemistry*, Vol.72, 1976, 248-254.
- [5] Chaudhari, P. N., Chaudhari, B. L. and Chincholkar, S. B., “Iron Containing Keratinolytic Metallo-protease Produced by *Chryseobacterium gleum*,” *Process Biochemistry*, Vol. 48, 2013, pp. 144-151.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Dixon, M., “The Determination of Enzyme Inhibitor Constants,” *Biochemical Journal*, Vol. 55, 1953, pp. 170-171.
- [9] 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.
- [10] Goldberg, R. B., Barker, S. J. and Perez-Grau, L., “Regulation of Gene Expression during Plant Embryogenesis,” *Cell*, Vol. 56, 1989, pp. 149-160.



- [11] Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Barker, R. F. and Boulter, D. A., “Novel Mechanism of Insect Resistance Engineered into Tobacco” *Nature*, Vol. 300, 1987, pp. 160-163.
- [12] Hu, W., Tinghao, K., Bo, Y. K., Kwang, S. L., Jianhong, L. and Byung, R. J., “AvCystatin, a Novel Cysteine Protease Inhibitor from Spider (*Araneus ventricosus*) Venom,” *Journal of Asia-Pacific Entomology*, Vol. 18, 2015, pp. 13-18.
- [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 Science Technology*, Vol. 10, 2003, pp. 13-22.
- [14] 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.
- [15] Hung, C. H., Dong, C. F. and Wang, H. L., “Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Koelreuteria formosana* Seeds,” *Journal of Health Management*, Vol. 13, 2015, pp. 1-12.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Lingaraju, M. H. and Gowda, L. R., “A Kunitz Trypsin Inhibitor of *Entada scandens* Seeds: Another Member with Single Disulfide Bridge,” *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1784, 2008, pp. 850-855.
- [19] 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.
- [20] Machado, S.W., de Oliveira, C. F. R., Bezerra, C. S., Freire, M. G.M., Kill, M. R., Machado, O. L. T., Marangoni, S. and Macedo, M. L. R., “Purification of a Kunitz-type Inhibitor from *Acacia polyphylla* DC Seeds: Characterization and Insecticidal Properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae),” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 61, 2013, pp. 2469-2478.



- [21] Marcello, P., Carlotta, F. O., Lara, G., Roberto, E., Andrea, C., Elisabetta, B., Samuele, P. and Cristina, M., "Identification and Characterization of an Aspartyl Protease from *Cryptococcus neoformans*," *FEBS Letters*, Vol. 581, 2007, pp. 3882-3886.
- [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 New Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra mollis* Seeds," *Journal of Protein Chemistry*, Vol. 20, 2001, pp. 625-632.
- [23] Muricken, D. G. and 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.
- [24] 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.
- [25] Paiva, P. M. G., Oliva, M. L. V., Fritz, H. L., Coelho, C. B. B. and Sampaio, C. A. M., "Purification and Primary Structure Determination of Two Bowman-Birk Type Trypsin Isoinhibitors from *Cratylia mollis*," *Phytochemistry*, Vol. 67, 2006, pp. 545-552.
- [26] Pinho, R. T., Beltramini, L. M., Alves, C. R. and De-Simone, S. G., "*Trypanosoma cruzi*: Isolation and Characterization of Aspartyl Proteases," *Experimental Parasitology*, Vol. 122, 2009, pp. 128-133.
- [27] Prasad, E. R., Dutta-Gupta, A. and Padmasree, K., "Purification and Characterization of a Bowman-Birk Proteinase Inhibitor from the Seeds of Black Gram (*Vigna mungo*)," *Phytochemistry*, Vol. 71, 2010, pp. 363-72.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Sivaraman, J., Nögler, D. K., Zhang, R., Ménard, R. and Cygler, M., "Crystal Structure of Human Procathepsin X: a Cysteine Protease with the Proregion Covalently Linked to the Active Site Cysteine," *Journal of Molecular Biology*, Vol. 295, 2000, pp. 939-951.



- [31] Steven, C. B. and Russ, B. A., “Conserved Features in the Active Site of Nonhomologous Serine Proteases,” *Folding and Design*, Vol. 1, 1996, pp 371-379.
- [32] 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.

