جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره دوازدهم/ تابستان ۱۳۸۶/ ۸۳-۷۷

خالص سازی پروتئین مهارکننده تریپسین نوع کونیتز از دانه سویا با کروماتوگرافی میل ترکیبی

یدالله شکیبا[۱]، دکتر علی مصطفایی[۲]، شهرام پروانه[۳]

۱- دانشجوی سال آخر پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲- دانشیار ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (مؤلف مسئول) amostafaie@kums.ac.ir

۳- کارشناس آزمایشگاه

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین مهارکننده تریپسین موجود در سویا با داشتن ۱۸۱ اسید آمینه و دو باند دی سولفیدی تمایل خاصی به آنزیم تریپسین پانکراس دارد. این پروتئین که به میزان قابل توجهی در سویا وجود دارد، مقاومت بالایی در برابر حرارت و مواد شیمیایی از خود نشان می‌دهد. روشهای متعددی مانند ترکیبی از روشهای کروماتوگرافی، کروماتوگرافی جذبی با استفاده از فلزات و استفاده از الکتروفورز برای جداسازی این پروتئین مورد استفاده قرار گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا پودر سویا با متانول چربی‌زدایی شد و بخش باقیمانده در آب دیونیزه عصاره‌گیری گردید. با روش رسوب در نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های ذخیره‌ای محلول حذف گردید. بخش غنی از مهارکننده تریپسین به ستون جذبی وارد شده و پس از شستشوی ستون و خارج نمودن پروتئینهای متصل نشده، مهار کننده تریپسین از ذرات ژل با کاهش دادن pH جدا و از نظر فعالیت و خلوص مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی پروتئین بدست آمده در SDS-PAGE خلوص بالای ۹۹ درصد و وزن ملکولی ۲۰KDa را نشان داد. مهارکننده تریپسین در SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیر احیایی به صورت یک باند مشابه دیده شد که نشان‌دهنده تک زنجیره‌ای بودن این پروتئین است. اشباع نمودن ستون، افزایش ظرفیت تام ستون و انجام کروماتوگرافی در pH=۶-۸ بازدهی و خلوص پروتئین بدست آمده را افزایش داد.

نتیجه‌گیری: به وسیله این روش می‌توان در مدت زمان کم مقادیر قابل توجهی از مهارکننده تریپسین را با خلوص بسیار بالا جداسازی نمود. از ویژگیهای دیگر این روش سادگی، عدم نیاز به دیالیز و یا بافر می‌باشد.

کلید واژه‌ها: سویا، مهارکننده تریپسین، تریپسین، کروماتوگرافی میل ترکیبی

وصول مقاله: ۸۵/۱۱/۵ اصلاح نهایی: ۸۶/۳/۱۰ پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲۴

مقدمه

مهارکننده‌های پروتئازها پروتئین‌های کوچکی هستند که عمدتاً در بافتهای ذخیره‌ای گیاهان وجود دارند و ممکن است تا ۱۰ درصد از میزان پروتئین تام این بافتها را تشکیل دهند. این مهارکننده‌ها احتمالاً در هنگام مواجه شدن با حشرات یا میکروارگانیسمهای پاتوژن در برگهای گیاهان نیز ظاهر شوند (۱). این پروتئین‌ها با مهار پروتئازهای موجود در روده حشرات از تجزیه پروتئینهای گیاهی حاوی اسیدهای آمینه ضروری برای رشد آنها، جلوگیری می‌کنند. در سالهای گذشته

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تلاشهای زیادی برای افزایش بیان این پروتئینها در گیاهان به منظور مقاوم نمودن آنها انجام گرفته است (۲). مهارکننده‌های پروتئازهای موجود در دانه گیاهان به سه دسته کلی تقسیم می‌شوند: مهارکننده‌های سرین پروتئاز، سیستئین پروتئاز و متالوکربوکسی پروتئاز. مقدار و تنوع ساختاری مهارکننده‌های سرین پروتئاز به مراتب بیشتر از نوع سیستئین پروتئاز است (۳). مهارکننده تریپسین پانکراس که یک سرین پروتئاز است، به صورت گسترده‌ای در دانه‌ها وجود دارد (۳). این پروتئینها به دلیل اثر مهاری روی آنزیمهای هضم‌کننده دستگاه گوارش در انسان و حیوانات به عنوان مواد ضدتغذیه‌ای شناخته می‌شوند. اخیراً فعالیت بیولوژیکی بالقوه این مهارکننده‌ها در زمینه فارماکولوژی، پزشکی و مصارف آرایشی- بهداشتی مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۴). در دانه سویا دو پروتئین با خواص مهارکنندگی تریپسین گزارش شده است. این دو پروتئین مهارکننده نوع Bowman-birk و نوع Kunitz هستند (۵). بعد از مطالعاتی که نشان داد مهارکننده‌های تریپسین نوع کونیتز موجود در سویا در مدلهای آزمایشگاهی و بالینی تغییرات القاءکننده بدخیمی را مهار می‌کنند. توجه به کاربرد درمانی این پروتئینها بیشتر شده است (۷, ۶). از اثرات دیگر گزارش شده این پروتئین، افزایش رشد، قطر و رنگدانه‌های مو (۸) و مهار رگ‌زایی در مدلهای حیوانی را می‌توان نام برد (۹). از آنجا که این پروتئین یکی از عوامل اصلی ایجاد آلرژی در افراد حساس می‌باشد، جدا سازی این عامل از سایر پروتئین‌های سویا، که منبع ارزان و مناسب پروتئین می‌باشند، از لحاظ صنعتی نیز قابل توجه است (۱۰). مهارکننده تریپسین موجود در سویا اولین بار در سال ۱۹۴۵ توسط Kunitz از دانه سویا جدا شد (۱۱). این پروتئین مونومر و غیر گلیکوزیله که دارای ۱۸۱ اسید آمینه و دوباند دی سولفیدی است، تمایل زیادی به آنزیم تریپسین (سرین پروتئاز پانکراس) دارد و به عنوان فاکتور نامحلول در الکل نیز شناخته می‌شود (۱۲). وزن ملکولی این پروتئین ۲۰/۱کیلو دالتون است. توالی اسید آمینه‌های آن توسط Koide و همکاران تعیین شد (۱۳). تاکنون سه ایزوفرم نزدیک به هم از این پروتئین شناسایی شده است (۱۴). روشهای متعددی مانند ترکیبی از روشهای کروماتوگرافی (۱۵)، کروماتوگرافی با استفاده از فلزات (۱۶) و استفاده از الکتروفورز (۱۷) برای جداسازی این پروتئین مورد استفاده قرار گرفته است. در این مطالعه یک روش سریع و ساده و بدون نیاز به بافر و دیالیز برای خالص‌سازی مهار کننده تریپسین بر پایه کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از لیگاند تریپسین معرفی شده است.

روش بررسی

مواد مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از: دانه خام سویا (داخل)، متانول، اسیدکلریدریک، کلرید سدیم، استات سدیم، اسید استیک، کربنات سدیم، گلیسین، فسفات دی هیدروژن سدیم (مرک)، ژل سفارز 4B فعال شده، مواد مورد نیاز برای الکتروفورز و رنگ آمیزی (فارماسیا)، تریپسین گاوی، فنیل متیل سولفونیل فلورید (PMSF)، سوبسترای N-benzoyl-L-arginin-4-nitroanilide (BAPA) (سیگما)،

تهیه ستون میل ترکیبی با لیگاند تریپسین

برای تهیه ستون میل ترکیبی دارای لیگاند تریپسین، ابتدا رزین سفارز 4B سه بار با اسید کلریدریک یک میلی مولار شسته شد تا ذرات رزین متورم شوند. پس از آماده‌سازی رزین، به هر میلی لیتر ژل متورم شده، ۵

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

میلی‌گرم آنزیم تریپسین خالص در بافر کربنات ۰/۱ مولار با pH=۸/۵ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار اضافه شده و به مدت ۲ ساعت به آرامی در دمای اتاق تکان داده شد. میزان تریپسین متصل شده به رزین با اندازه‌گیری میزان پروتئین باقیمانده در مایع رویی محاسبه شد. سپس مناطق فعال باقیمانده روی رزین با بافر گلیسین ۰/۲ مولار حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم مسدود شد. رزین بدست آمده ۵ بار به صورت متناوب با دو بافر استات ۰/۱ مولار حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم با pH=۴ و بافر کربنات ۰/۱ مولار حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم با pH=۸/۵ شسته شد. پس از آماده سازی و شستشو، رزین به داخل یک ستون وارد شده و با حجم کافی از بافر فسفات نمکی شسته شد تا به تعادل بافری رسید. ستون تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

غلظت پروتئین با روش برادفورد محاسبه شد (۱۸). در این روش با معرف برادفورد (شامل ۰/۱ گرم کوماسی آبی G-250، ۵۰ میلی لیتر اتانل ۹۵ درصد و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۸۵ در حجم نهایی یک لیتر)، غلظت پروتئین با استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

غلظت مهارکننده تریپسین خالص نیز به روش uv طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

ضریب خاموشی مهار کننده تریپسین / جذب در ۲۸۰ نانومتر = (mg/ml) غلظت پروتئین

ضریب خاموشی مهارکننده تریپسین خالص ۹/۹۴ = $E^{1\%}$ در نظر گرفته شد (۱۹).

خالص سازی مهار کننده تریپسین

دانه سویا توسط آسیاب به آرد تبدیل شد و با استفاده از متانول چربی زدایی شد. به هر ۱۰۰ گرم پودر سویا یک لیتر متانول اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه هم زده شد. پس از آن مایع رویی خارج شده و رسوب باقیمانده در دمای اتاق در عرض ۲۴ ساعت خشک گردید. ماده بدست آمده در یک لیتر آب مقطر حل شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه هم زده شد. به منظور جلوگیری از تخریب احتمالی پروتئینهای محلول توسط پروتئازها، PMSF در غلظت نهایی ۰/۳ میلی مولار به محلول اضافه شد (۲۰). پس از آن محلول در ۵۰۰۰ ×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جدا شد. به منظور رسوب و جدا سازی پروتئینهای ذخیره‌ای سویا (گلیسینین و بتا کانگلایسینین)، pH این مایع با اسید کلریدریک نیم مولار به آرامی در عرض ۱ ساعت به ۴/۸ کاهش داده شد (۲۱). مخلوط حاصله سانتریفیوژ و پس از جدا نمودن مایع رویی، pH آن با هیدروکسید سدیم یک مولار به ۷ رسانده شد و یک ساعت در دمای ۴ درجه قرار داده شد. سپس محلول مجدداً سانتریفیوژ گردید. مایع رویی شفاف حاوی مهارکننده تریپسین بلافاصله به ستون میل ترکیبی با لیگاند تریپسین وارد شد. پروتئینهای متصل نشده به ستون با شستشوی ستون با آب مقطر خارج گردید. به منظور جداسازی پروتئینهای غیر اختصاصی با اتصال ضعیف، ستون با ۵ حجم از محلول نیم مولار کلرید سدیم شستشو داده شد. سپس ستون با دو حجم آب دیونیزه شستشو شد. مهار کننده تریپسین متصل شده به لیگاند تریپسین با اسید کلریدریک ۰/۰۱ مولار از ستون جدا گردید. غلظت پروتئینهای خارج شده از ستون با میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر مشخص شد.

برای تعیین بیشترین میزان بازدهی، محلول غنی از مهارکننده تریپسین طی آزمایشات جداگانه در pH های مختلف وارد ستون شده و بهترین pH اتصال مشخص گردید. پروتئین خالص شده در مقابل آب دیونیزه دیالیز شده و در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد برای سنجش فعالیت و آزمون‌های بعدی نگهداری گردید.

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی تریپسین

فعالیت مهارکنندگی پروتئین بدست آمده با روش ارائه شده توسط انجمن شیمی غلات آمریکا (AACC) اندازه‌گیری شد (۲۲). در این روش ابتدا غلظتهای مختلف مهارکننده تریپسین در حجم ۲ میلی‌لیتر تهیه گردید. سپس ۲ میلی لیتر از محلول تریپسین ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر به هر لوله اضافه شد و دقایقی محتویات لوله‌ها به آرامی مخلوط گردید. پس از آن به هر لوله ۵ میلی لیتر محلول ۰/۴ میلی‌گرم در میلی لیتر از سوبسترای تریپسین (BAPA) اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. واکنش بین تریپسین و سوبسترای آن با اضافه نمودن یک میلی لیتر اسید استیک گلاسیال ۳۰ درصد متوقف شد و میزان رنگ تولید شده در هر لوله در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. واحد فعالیت این پروتئین مهارکننده بر اساس میزان کاهش جذب (ممانعت از اثر تریپسین بر سوبسترا) محاسبه شد. هر واحد فعالیت پروتئین مهارکننده به صورت ۰/۰۱ کاهش جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر تعریف شد (۲۲).

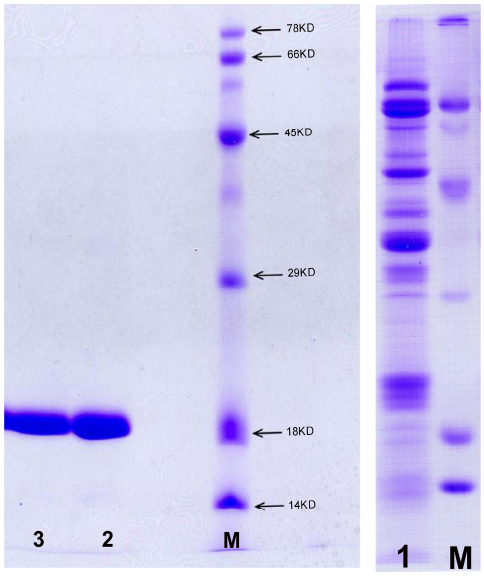
الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی (۲۳) در ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد تحت شرایط احیایی و غیر احیایی انجام شد. چهار حجم نمونه به یک حجم بافر نمونه (۵X) افزوده شد و پنج دقیقه درآب جوش قرار گرفت.۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و در ولتاژ ثابت۱۵۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی آبی R-350 (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد. وزن ملکولی مهارکننده تریپسین توسط پروتئین‌های استاندارد با وزن مولکولی مشخص که اطلاعات آنها در اشکال مربوطه آمده است، تعیین گردید.

یافته‌ها

حدود ۳۰ درصد دانه سویا از پروتئین تشکیل شده است. همانطور که در شکل۱ مشخص است دانه سویا دارای پروتئینهای زیادی با اوزان مولکولی متنوع است. در این میان پروتئینهای با وزن مولکولی بالا درصد قابل توجهی را به خود اختصاص داده و میزان مهارکننده نسبت به آنها بسیار کمتر است. این پروتئینها را بر اساس ضریب رسوب‌دهی (واحد سودبرگ) دسته‌بندی می‌کنند. بر این اساس می‌توان پروتئینهای سویا را به ۴ دسته کلی تقسیم نمود: ۱- پلیمر گلیسینین ۱۵s، ۲- گلیسینین ۱۱s، ۳-آلفا، بتا و گاما کانگلایسینین ۷s و ۴- سیتوکروم c و مهارکننده تریپسین ۲s. با توجه به شکل ۱ مشخص است که بیشتر پروتئینهای سویا را پروتئینهای ذخیره‌ای با وزن ملکولی بالا تشکیل می‌دهند. در این مطالعه، پس از حذف پروتئینهای پر مقدار ذخیره‌ای با روش رسوب در نقطه ایزوالکتریک، محلول غنی از مهارکننده تریپسین در pH های مختلف به ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی وارد شده و مشخص گردید که در pH بین ۸-۶ این پروتئین بیشترین اتصال را با لیگاند تریپسین برقرار می‌کند. در pHهای پائین‌تر میزان

اتصال این پروتئین به تریپسین کاهش یافته به طوری که با کاهش pH به ۲ این پروتئین به طور کامل از ژل جدا می‌شود. فوق اشباع نمودن ظرفیت ستون در کاهش اتصال غیر اختصاصی پروتئینها و افزایش خلوص پروتئین بدست آمده مؤثر بود. به علاوه شستشوی ستون با کلرید سدیم نیم مولار، نقش مؤثری در بالا بردن خلوص پروتئین داشت. الکتروفورز در حضور سدیم دودسیل سولفات در شرایط احیایی و غیر احیایی نشان داد که محصول بدست آمده شامل یک باند پروتئینی با وزن ملکولی حدود ۲۰ کیلو دالتون است که ناخالصی در الگوی آن دیده نمی‌شود (شکل ۱). فعالیت مهاری این پروتئین بر اساس میزان کاهش جذب رنگ تولید شده در اثر تأثیر تریپسین بر سوبسترا در ۴۱۰ نانومتر مشخص شد. هر واحد مهارکنندگی تریپسین به صورت ۰/۰۱ کاهش جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر تعریف گردید. بر اساس نتایج بدست آمده، فعالیت پروتئین خالص شده TIU / mg ۳۶۰۰ تخمین زده شد.



شکل ۱: الکتروفورز پروتئنهای دانه سویا در شرایط احیایی (ستون۱) و مهارکننده تریپسین خالص شده به ترتیب در شرایط احیایی (ستون۲) و غیر احیایی (ستون۳). M : مارکرهایی با اوزان از پایین به بالا ۱۴،۱۸،۲۹،۴۵، ۶۶ و ۷۸ کیلو دالتون است.

بحث

مقدار مهارکننده‌های تریپسین موجود در سویا در مقایسه با سایر دانه‌ها بیشتر است. بدین لحاظ دانه سویا منبع مناسبی برای خالص سازی این پروتئین محسوب می‌شود. تخلیص این مهارکننده‌ها از سویا از جنبه‌های متعددی اهمیت داشته و قابل استفاده است. برای مثال به دلیل اینکه این پروتئین از یک زنجیره پلی پپتیدی غیرگلیکوزیله تشکیل شده است و در شرایط احیایی و غیر احیایی به صورت یک باند ظاهر می‌شود، از آن می‌توان به عنوان یک پروتئین استاندارد مطلوب استفاده نمود. بعلاوه جداسازی این پروتئین به منظور جلوگیری از اثرات ضد تغذیه‌ای و آلرژی در فرآورده‌های غذایی مانند شیر خشک نیز حائز اهمیت است (۲۴). از شکل خالص شده این پروتئین همچنین می‌توان برای بررسی اثرات آن روی سیستمهای بیولوژیک مانند فرایند رگزایی در سلولهای اندوتلیال یا اثرات محافظتی آن علیه مواد سرطان‌زا استفاده نمود. قسمت عمده پروتئینهای سویا را دو پروتئین ذخیره‌ای گلایسینین و کان گلایسینین تشکیل می‌دهند. گلایسینین (پروتئین ۱۱s) از ۱۲ واحد پروتئینی با وزنی معادل ۳۷۵ کیلو دالتون تشکیل شده است. این پروتئین در pH=۵/۸ رسوب می‌کند. بتا کانگلایسینین (پروتئین ۷s) دومین پروتئین عمده ذخیره‌ای سویا با وزن ۱۵۰ کیلو دالتون است که در pH=۴/۸ رسوب می‌کند (۲۵). روشهای مختلفی مانند پائین آوردن pH با استفاده از اسید یا گاز دی‌اکسیدکربن (۲۱) برای رسوب‌دهی و تخلیص این دو پروتئین استفاده شده است. در مقاله حاضر با استفاده از اسیدکلریدریک نیم مولار و پایین آوردن pH این دو پروتئین رسوب کرده و محلول غنی از مهارکننده تریپسین بدست آمد. با ترکیبی از این روش و استفاده از

ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی مهارکننده تریپسین با خلوص بالای ۹۹ درصد به دست آمده و وزن ملکولی آن با استفاده از الکتروفورز در حضور SDS معادل ۲۰ کیلو دالتون تعیین گردید. میزان فعالیت این پروتئین ۳۶۰۰TIU/mg بود که در مقایسه با نوع تجاری در دسترس، قابل مقایسه بود (۲۶). در این مطالعه برای خالص سازی این پروتئین با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی از بافر استفاده نشد و تنها از آب مقطر با ۷-pH=۶ استفاده گردید. این روش در مقایسه با سایر روشهای خالص سازی در مدت زمان بسیار کمتری قابل انجام است و هزینه کمتری در بر دارد. با استفاده از روش فوق می‌توان در مدت زمان کوتاهی مقادیر قابل توجهی مهارکننده تریپسین با خلوص بالا بدست آورد. از آنجا که در الکتروفورز این پروتئین ناخالصی دیده نمی‌شود، با اطمینان می‌توان از پروتئین بدست آمده توسط این روش در کارهای تحقیقاتی به منظور بررسی اثرات مختلف آن استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از همکاری آقایان امیرکیانی و خانم مریم چلبی در اجرای این مطالعه قدردانی و تشکر نمایند.

References

1. Ryan CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu Rev Phytopath1999; 28: 425-449.
2. F De Leo, M Volpicella, F Licciulli, S Liuni, R Gallerani, and LR Ceci PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. Nucleic Acids Res 2002; 30: 347-348.
3. Valueva, TA and Mosolov, VV. Protein inhibitors of proteinases in seeds: Classification, distribution, structure, and properties. Russian J Plant Physiol 1999; 46: 362-378.
4. Clawson, GA. Protease inhibitors and carcinogenesis: a review. Cancer Invest 1996; 14: 597-608.
5. Domoney, C. Inhibitors of legume seeds In: PR Shewry and R Casey, (Editors) Seed proteins, Kluwer Academic Publishers: Amsterdam. 1999. p. 635-655.
6. Clawson GA. Protease inhibitors and carcinogenesis: a review. Cancer Invest 1996; 14: 597-608.
7. Kennedy AR. Chemopreventive agents: protease inhibitors. Pharmacol Ther 1998; 78: 167-209.
8. Seiberg M, Liu JC, Babiarz L, Sharlow E and Shapiro S. Soymilk reduces hair growth and hair follicle dimensions. Exp Dermatol 2001; 10: 405-413.
9. Muramatsu M, Katada J, Hayashi I and Majima M. Chymase as a proangiogenic factor. J Biol Chem 2000; 275: 5545-5552.
10. Santiago Q, Mar FN, Florentino P, Joaquin S. Soybean trypsin inhibitor is an occupational inhalant. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 178
11. Kunitz M. Crystallization of trypsin inhibitor from soybean. Science 1945; 101: 668.
12. Liu K. Trypsin inhibitors. IN: Liu K, Editor. Soybean: Chemistry, technology and utilization. Chapman & Hall: New York 1997: 48-55.
13. Koide T and Ikenaka T. Studies on soybean trypsin inhibitors 3. Amino acid sequence of the carboxyl terminal region and the complete amino acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). Eur J Biochem 1973; 32: 408-416.
14. Kim SH, Hara S, Hase S, Ikenaka T, Toda H, Kitamura K and Kaizuma N. Comparative study on amino acid sequences of Kunitz-type soybean trypsin inhibitors, Ti^a, Ti^b, and Ti^c. J Biochem 1985; 98: 435-448.
15. Yamamoto M and Ikenaka T. Studies on soybean trypsin inhibitors. Purification and characterization of two soybean trypsin inhibitors. J Biochem 1967; 62: 141-149.

16. Gupta MN, Jain S and Roy I. Immobilized metal affinity chromatography without chelating ligands: purification of soybean trypsin inhibitor on zinc alginate beads. Biotechnol Prog 2002; 18: 78-81.
17. Kassell B. Trypsin and chymotrypsin inhibitors from soybeans. Methods Enzymol 1970; 19: 853-862.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
19. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II: general properties. J Gen Phisiol 1947; 30: 311.
20. Graber M and Condoret JS. Preparative anion-exchange chromatography of soybean trypsin inhibitor: the alternative of column-overload methods J Chromatogr. 1992; 584: 115-20.
21. Golubovic M, van Hateren SH, Ottens M, Witkamp GJ, van der Wielen LA. Novel method for the production of pure glycinin from soybeans. J Agric Food Chem 2005; 53: 5265-5269
22. AACC, American Association of Cereal Chemistry, Measurement of trypsin inhibitor activity of soy products-spectrophotometric method. Approved Methods, St. Paul, MN, 1999.
24. American academy of pediatrics. Committee on nutrition soy protein-based formulas: Recommendations for use in infant feeding. Pediatrics 1998; 101: 148-153.
25. Maruyama N, Prak K, Motoyama S, Choi SK, Yagasaki K, Ishimoto M, Utsumi S. Structure-physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines. J Agric Food Chem 2004; 52: 8197-201.
26. Duranti M, Barbiroli A, Scarafoni A, Tedeschi G, Morazzoni P. One-step purification of Kunitz soybean trypsin inhibitor Protein. Expr Purif 2003; 30: 167-70.