

私立東海大學化學系

碩士論文

設計及合成 JJ-02 胜肽衍生物並探
討其抗菌之生物活性

Design and Synthesis of JJ-02 Peptides Analogs to
Study Their Biological Activities

指導教授：龍鳳娣 教授

研究生：黃詩容

中華民國 一零八年 七月

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 黃詩容 君所提之論文

設計及合成 JJ-02 胜肽衍生物並探討其抗菌之生
物活性

Design and Synthesis of JJ-02 Peptides Analogs to
Study Their Antimicrobial Activities

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 龍鳳弟 (簽章)

108年7月3日

東海大學碩士班研究生
論文口試委員審定書

化學系 碩士班 黃詩容 君所提之論文

設計及合成 JJ-02 胜肽衍生物並探討其抗菌之生
物活性

Design and Synthesis of JJ-02 Peptides Analogs to
Study Their Antimicrobial Activities

論文口試委員會 召集人 江碧濤 (簽章)

委員

龍孔璋

程家維

中華民國 108 年 07 月 03 日

謝誌

青蔥鬱樹蟬聲起，鳳凰灼灼遍地紅。風花流年鳥鳴齊，鴻鵠陣陣又一送。
五年匆匆而過，憶起入學時的悶熱與蟬聲大噪，今時景物依舊，只是更勝彼時多了群群火火的鳳凰花開，在東海的時間恰長似短卻彌足珍貴。

謝謝我的父母，即便一顆心懸繫著這個傻女兒，也還是唸叨幾句便為我鼓勁。這幾年來你們沒少關心我，除了謝謝也充滿抱歉，抱歉在外這麼久又不常回家，雖然你們常常說「沒關係」……謝謝你們的包容。謝謝我的 妹妹、弟弟，陪我聊了實驗室的各種大、小事與生活瑣碎事，也謝謝我們家的小貓 三寶，雖然每次回家你都不理我，但看到你所有壓力都會煙消雲散。

謝謝我的同學們，一起陪我走過東海的潮起潮落。我一定會永遠記得，宿舍裡的悄悄話時間、挑燈夜戰、協助趕剩不到十分鐘就要交的作業，還有一起跑步的日子；記得那年熱毒太陽的搬宿，以及小琉球與澎湖的美，還有我們整趟旅行玩得多瘋癲；化學數學的旋轉角度與物理化學的可怕及格紅線；在系館每次跨間格行的詢問「要不要一起訂餐、飲料？」，最不能忘的當然是最愛的圓石。謝謝 品秀、顥萱、乃瑛 在最低潮的時候陪著我一起走過；倩瑜、光明 每次的及時救援與從旁協助，這段時間非常謝謝有你們！

謝謝我的學弟妹，謝謝你們願意包容我這麼不靠譜的學姊。想起你們剛進實驗室的兢兢業業、懵懂無知，對很多事情的一知半解，到後來的專題結束、口頭報告行云流水還有對答間的從容，真的很開心你們能從中學習茁壯。謝謝 向宏 跟著我勞心費神卻不抱怨，還願意陪我一起加班；謝謝 子涵、子勛 在我需要時的各種援助，以及相關實驗的經驗分享，謝謝 佳儀 在那段黑暗中的陪伴，還有 思禹、頌方的貼心幫助，原以為我們會無緣成友，怎料後來可以玩在一起，謝謝你們在我壓力最大的時候，為我添上名為笑聲的彩虹。願你們未來鵬程萬里、飛高飛遠，你們是助我完成學業的莫大鼓勵之一。

謝謝 學長姐，在離開後仍願意幫我解決各種疑難雜症。謝謝 德倫學長 從初見至今的搞笑與遠見，讓我知道何為「義務與責任」；謝謝 冠婷學姊 的指導以及一同努力的日子，真的是猶如定心丸般的存在；謝謝 湛如學姊、宜哲學長 三不五時的關心與解惑。
謝謝實驗室讓我遇見你們，謝謝你們一路相伴。

最後謝謝 龍鳳娣老師 的栽培。

2019.07.30 碩班 黃詩容 上 再見囉~各位

目錄

謝誌.....	I
圖目錄.....	V
表目錄.....	VI
名詞簡稱及縮寫對照表.....	VII
摘要.....	VIII
Abstract.....	IX
第一章 前言.....	1
1-1、前言概述.....	1
1-2、抗藥性的起源.....	2
1-3、癌症的現狀.....	5
第二章 文獻探討.....	6
2-1、什麼是 E、S、P?.....	6
2-1-1、 <i>Escherichia coli</i> (E) 大腸桿菌 (E).....	6
2-1-2、 <i>Staphylococcus aureus</i> (S) 金黃色葡萄球菌 (S).....	6
2-1-3、 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P) 銅綠假單胞菌/綠膿桿菌 (P).....	7
2-2、癌症.....	7
2-2-1、乳癌.....	7
2-2-2、MCF-7 細胞株.....	7
2-3、抗微生物胜肽研究始末.....	8
2-4、抗微生物胜肽分類.....	9
2-5、抗微生物胜肽與細菌細胞間的機轉.....	10
第三章 研究動機與目的.....	11
第四章 實驗設計與流程.....	12
4-1、實驗流程概述.....	12
4-2、抗微生物胜肽之設計.....	12
4-2-1、JJ-02 的修改——SL 系列.....	13
第五章 材料與方法.....	14
5-1、固相胜肽合成法(Solid Phase Peptide Synthesis, 簡稱 SPPS).....	14
5-1-1、固相胜肽合成法之原理.....	14
5-1-2、固相胜肽合成法之流程.....	15
5-2、Ninhydrin test.....	16
5-2-1、Ninhydrin test 原理.....	16
5-2-2、Ninhydrin test 方法與實驗步驟.....	16

5-3、高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	17
5-3-1、高效能液相層析儀原理	17
5-4、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS).....	19
5-4-1、MALDI-TOF MS 原理	19
5-4-2、基質特性、作用及配製方法	19
5-4-3、MALDI-TOF MS 實驗步驟	20
5-5、抗菌活性評估	20
5-5-1、抗菌活性評估實驗流程	20
5-5-2、細菌培養 (菌株活化)	20
5-5-3、無菌操作台及容器的滅菌方法	21
5-5-4、細菌的接種 (劃碟法)	21
5-5-5、細菌的培養 (液態培養)	22
5-5-6、細菌數目的測量	23
5-5-7、抗菌活性評估之最低抑菌濃度 (MIC).....	23
5-6、抗癌活性評估	24
5-6-1、抗癌活性評估實驗流程	24
5-6-2、細胞培養液之配製	24
5-6-3、人類乳癌細胞株 (MCF-7) 之培養	24
5-6-4、細胞之冷凍保存與活化	25
5-6-5、癌細胞存活率之測定—— MTT assay.....	26
5-7、溶血活性評估 (Hemolytic assay)	28
5-7-1、血液樣品前處理	28
5-7-2、溶血活性評估之實驗步驟	29
第六章 實驗結果與討論	30
6-1、胜肽之合成	30
6-2、胜肽之分子量鑑定	31
6-2-1、SL-01 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖	32
6-2-2、SL-02 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖	33
6-2-3、SL-03 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖	33
6-2-4、JJ-02 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖	34
6-3、胜肽之純化	34
6-4、抗微生物活性檢測之結果	35
6-4-1、SL 系列對 <i>E.coli</i> 之抗菌活性評估	35
6-4-2、SL 系列對 <i>S.aureus</i> 之抗菌活性評估	35
6-4-3、SL 系列對 <i>Paeruginosa</i> 之抗菌活性評估	35
6-4-4、SL 系列與 JJ-02 之抗菌活性比較	36
6-5、SL 系列對 MCF-7 之抗癌活性評估	37
6-6、SL 系列對 人類紅血球 之溶血活性評估	37

第七章 結論.....	38
第八章 未來展望.....	38
圖總集.....	39
表總集.....	54
參考文獻.....	57
附錄.....	61



圖目錄

圖 1、實驗流程圖.....	39
圖 2、各胜肽之 Helical Wheel 圖.....	39
圖 3、細菌的培養及抗菌功效測試步驟.....	40
圖 4、畫碟方式.....	40
圖 5、抗癌活性實驗流程圖.....	40
圖 6、SL-01 粗產物 MALDI-TOF MS 圖 (第一次裂解).....	41
圖 7、SL-01 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解).....	42
圖 8、SL-02 粗產物 MALDI-TOF-MS (第一次裂解).....	43
圖 9、SL-02 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解).....	44
圖 10、SL-03 粗產物 MALDI-TOF MS (第一次裂解).....	45
圖 11、SL-03 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解).....	45
圖 12、JJ-02 粗產物 MALDI-TOF MS (第一次裂解).....	46
圖 13、JJ-02 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解).....	46
圖 14、SL-01 粗產物 RP-HPLC 之層析圖.....	47
圖 15、SL-01 MALDI-TOF MS (Pure).....	47
圖 16、SL-02 RP-HPLC (Crude) 層析圖.....	48
圖 17、SL-02 MALDI-TOF MS (Pure).....	48
圖 18、SL-03 RP-HPLC (Crude) 之層析圖.....	49
圖 19、SL-03 MALDI-TOF MS (Pure).....	49
圖 20、JJ-02 RP-HPLC (Crude) 之層析圖.....	50
圖 21、JJ-02 MALDI-TOF MS (Pure).....	50
圖 22、SL 系列對 <i>E.coli</i> 之抗菌結果.....	51
圖 23、SL 系列對 <i>S.aureus</i> 之抗菌結果.....	51
圖 24、SL 系列對 <i>Paeruginosa</i> 之抗菌結果.....	52
圖 25、JJ-02 對 E、S、P 之抗菌結果.....	52
圖 26、SL 系列對 MCF-7 之抗癌活性結果.....	53

表目錄

表 1、設計胜肽之胺基酸序列一覽.....	54
表 2、HPLC 比較一覽表	54
表 3、基質名稱、結構及配方.....	55
表 4、溶液配置圖.....	55
表 5、合成之抗微生物胜肽的物理化學性質.....	56
表 6、各胜肽之活性 (MIC) 一覽表 (單位: μM).....	56
表 7、各胜肽之溶血活性.....	56



名詞簡稱及縮寫對照表

ACN	Acetonitrile
AMPs	Antimicrobial peptide
CD	Circular Dichroism
CFU	Colony forming unit
α -CHCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic-acid
DCM	Dichloromethane
DDW	Distilled-deionized water
DE	Delay extraction
DIEA	N,N-Diisopropylethamine
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
MS	Mass Spectrometry
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MIC	Minimum inhibitory Concentration
MH	Mueller-Hinton
OD	Optical density
RT	Retention time
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography
SPPS	Solid phase peptide synthesis
TFA	Trifluoroethanol
UV	Ultraviolet
NC	Negative control
PC	Positive control

摘要

近年來由於抗生素濫用，導致越來越多致病菌產生抗藥性，所以急迫需要開發新的替代藥物。抗微生物胜肽的抗菌機制不同於抗生素藥物，不需與受體結合即能發揮作用，因此較不易引起抗藥性，且具有廣效性、高效性、選擇性及穩定性，是極具潛力能替代抗生素成為更優良的抗菌藥物。

本實驗室先前發表設計一系列從壁蝨唾液腺中分離的 Ixosin-B 之胜肽類似物，並自行合成、純化及測試生物活性，實驗結果顯示其中的 MAP-0403 胜肽具有最佳的抗菌活性，但溶血性較高。後又以此 (MAP-0403) 為模板胜肽而設計出 JJ 系列，由實驗結果可知，該系列中之 JJ-02 擁有最佳的抗菌活性，且具有低溶血性。因此本實驗以 JJ-02 作為胜肽設計模板，並採取不同策略設計出三段胜肽，分別為 SL-01、SL-02、SL-03，三者並稱為「SL 系列」，以期得到更強的抗菌活性及溶血性更低的抗微生物胜肽。本實驗利用固相胜肽合成法製備所需胜肽；逆相高效能液相層析儀進行純化；基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀進行鑑定分子量，最後得到高純度的目標胜肽，遂利用抗菌活性測試、抗癌活性測試及溶血活性測試進行活性分析。

透過胺基酸置換策略及各胜肽之活性結果可知，Proline 兩端之胺基酸性質對胜肽序列具有一定的影響。總結而論，應是 SL-03 最具有後續研究價值，而 SL-02 可能顯示出其對革蘭氏菌的選擇性，亦可作為後續延伸探討的分支。

Abstract

The widespread use of antibiotics and biocides and the development of tourism and trade contribute to the rapid spread of antimicrobial resistance (AMR) and multiple-drug resistance (MDR). Therefore, it is urgent to develop new antibacterial agents. The antibacterial mechanism of the antimicrobial peptides are different from that of antibiotics. They can work without binding the receptors. It is not only less susceptible to drug resistance, but also has broad-spectrum, high-efficiency, selectivity and stability. Therefore, AMPs are potential to become new antimicrobial agents because of their characteristics. The laboratory published a series of peptides of Ixosin-B isolated from the salivary glands of the tick. The Ixosin-B peptides were prepared and tested by ourselves. The experimental results showed that the MAP-0403 peptide had the best antibacterial activity, but the hemolytic activity was higher. The JJ series used the MAP-0403 as a template peptide. From the experimental results, JJ-02 in this series had the best antibacterial activity and low hemolysis. In this study, we used the JJ-02 as the parent peptide to design its analogs – SL series. All of them were synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS), purified by RP-HPLC, and characterized by MALDI-TOF MS. Their antimicrobial activities were analyzed by using the Micro broth dilution method. Their anticancer activities were analyzed by using the MTT assay. Their hemolytic activities were analyzed by using hemolytic assay. By the amino acid replacement strategy, the results showed that the amino acid properties at both ends of Proline have a certain influence on the peptide sequence. In summary, SL-02 and SL-03 were selected as our leading peptides for subsequent development of antibacterial agents.

第一章 前言

1-1、前言概述

人口老化、少子化、抗生素失效、抗藥性細菌崛起、罹癌率/死亡率攀升.....
隨著人類社會發展，各類公共議題亦如雨後春筍般不斷湧現，其中最棘手、迫不可待的——抗生素失效，最使世界各國苦不堪言，短期之內難以迅速制定應對方針而解決。

近年來因為抗生素的濫用，醫院已然成為培養許多致病細菌的溫床。例如：靜脈內導尿管中，發現有約一半的細菌對青黴素 (Methicillin) 具有抗藥性²；金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 可存活於多項醫療器材；萬古黴素抗藥性腸球菌 (Vancomycin-Resistant Enterococci, VRE) 亦是院內常見的感染病原菌³。這些具有抗藥性之細菌可透過質體將具抗-抗生素的基因傳遞，使得抗生素漸漸失去抗菌功效，因此開發新一代的抗生素是刻不容緩的。

相較於傳統的抗生素，抗微生物胜肽 (Antimicrobial Peptides, AMPs) 具有廣泛及迅速的抗菌功效、殺菌所需劑量少、不易造成微生物抗藥性.....等優勢，而形成該優勢的原因則歸功於與傳統抗生素迥異的抗菌機制。傳統抗生素主要採取"化學抑菌"的方式達到殺菌效果，雖然效果顯著，但因其會直接與微生物細胞內受體(或膜上受體作用)，而容易產生抗藥性。抗微生物胜肽大多則採取"物理殺菌"的方式導致微生物細胞膜的崩解，進而達到殺菌效果。

因此抗微生物胜肽極具潛力可開發成為新一代的抗微生物藥物。在生物體內亦發現含有大量的抗微生物胜肽存在。其主要的功能是幫助生物體抵禦或撲殺外來的病原體、刺激免疫細胞，而增強生物體對抗疾病的免疫力，例如：抗微生物胜肽對於細菌、真菌、病毒及寄生蟲具有去活性、直接殺死細胞或抑制細胞生長等作用。

而基於諸多研究指出，部分抗菌胜肽具有抑制癌細胞增生或狙殺之功效，且對細胞具有一定的選擇性。因此本篇研究除了探討 SL 系列之抗菌活性外，亦會對其進行抗癌活性評估，以利後續對序列之修改及探討。

1-2、抗藥性的起源

近年來美國傳染病學 (the Infectious Diseases Society of America, IDSA) 統整了一系列具抗生素耐藥性之細菌: 糞腸球菌 (*Enterococcus faecium*)、金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、鮑曼不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*)、銅綠假單胞菌/綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和腸桿菌屬 (*Enterobacter spp.*)，並將其縮寫成「ESKAPE」——意旨能夠“逃避”(Escape) 抗生素作用的細菌群¹。

在過去的 80 年的歲月裡，抗生素為人類社會帶來了諸多助力，例如: 現代醫學的進步和農、工業革命性變化，其已然深深融入人們的生活當中，廣泛的使用率就好比於無所不在的細菌一般⁴。然而隨著經濟全球化促進了旅遊和貿易的發展，加速了抗生素在生態循環中的傳播速度，間接助長抗菌素耐藥性

(Antimicrobial resistance, AMR) 的產生速度，且目前已被證明國際農產品貿易網絡可以迅速在全球範圍內傳播潛在的食源性污染物，通過病原自體擴散傳播，在起源上幾乎無法追蹤⁵。其次是近四十年來過度使用抗生素造成了前所未有的選擇壓力，亦導致 AMR 和多重耐藥性 (multiple-drug resistance, MDR) 的發生率逐漸攀升，可能導致“抗生素時代”結束^{1,4,6}。

而另一項造成 MDR 菌種持續肆虐的原因便是在過去二十年中，主要製藥公司對抗菌藥物研發的投資大幅縮減。與 20 世紀 40 年代早期至 20 世紀 70 年代後期抗生素發現的“黃金時代”形成鮮明對比的是，過去四十年提供的真正新型抗生素類別很少^{7,27}。據估計將一種新型抗生素推向市場的研發計劃須 10 年，涉及漫長而嚴格的臨床試驗，成本在 8 億美元至 17 億美元之間²⁷，加上主要製藥公司和小型生物技術公司對該市場興趣缺缺，與用於慢性疾病或生活用藥物相比，抗生素是極為高風險的投資。如此便導致新型抗菌藥物大量減少，造成目前生產率未能跟上全球 MDR 的進化與傳播速度²⁸。

根據預測結果推斷，抗生素的缺乏將在全球範圍內產生各種各樣的後果，不僅限於公共健康，甚至是可以影響國家安全和國際政治穩定²⁹。認知到“抗生素後時代”(Postantibiotic era)可能提早降臨，相關之國際機構包括世界衛生組織 (WHO)^{29,30}、歐洲疾病預防和控制中心 (the European Centre for Disease Prevention and Control)^{31,32} 和美國傳染病學會 (IDSA)²⁷ 研擬了多項策略，試圖刺激新型抗菌化合物的研究、改善抗生素之相關管理工作，以保留治療藥物的選擇。

人與人之間的接觸是細菌在社區和醫療機構內部的重要傳播方式，尤其是在缺乏基本衛生設施之發展中國家更為普遍。隨著抗生素的發展下降和抵抗力(細菌對抗生素)上升，醫療保健相關感染 (healthcare-associated infections, HAIs) 仍舊是決定患者存活率的最大威脅。除了艱難梭菌感染 (Alongside *Clostridium difficile* infection) 外，還有四大類 HAI：中心線相關血流感染 (central line-associated bloodstream infections)、導管相關的尿路感染 (catheter-associated urinary tract infections)、手術部位感染 (surgical-site infections) 和呼吸機相關性肺炎 (ventilator-associated pneumonia)³³。在美國、歐盟和英國尿路感染是最常見的 HAI 類型；而在發展中國家手術部位感染是最常見的⁸。根據相關統計資料顯示：美國的 HAI 約為 5%³⁴；歐洲為 7.1%³⁵；英國為 3.8%~8.7%⁸。然而這些數據與發展中國家之 HAI —— 15.5% 比較便相形見絀⁸。

截至目前為止的統計資料顯示：2009 年歐洲疾病預防和控制中心 (ECDC) 估計，MDR 細菌每年造成 25,000 人死亡；2015 年法國每年有 12,500 人死於 MDR 細菌。近期聯合國表示抗生素抗性是一種全球性的禍害，預測到 2050 年將有 1000 萬人因無抗生素可用而死亡。因此開闢新型的抗菌藥物及殺菌機制是刻不容緩的⁹。

1-3、癌症的現狀

即便現代醫療進步飛快，相比從前的治療方法增加了諸多選擇，癌症仍是令全球各國的頭疼的健康議題。在台灣自民國 71 年起，癌症高居國人十大死因之首，每年約造成 40,000 人死亡。不但嚴重影響病患及其家屬之生活品質，也促成諸多社會成本，如：醫療費用支出^{36,37}。

在治療方面，現階段多以手術切除、放射線療法、化學療法、標靶藥物與綜合療法為主要手段。其他如基因療法、幹細胞療法、免疫治療……等等，仍處於研究階段。雖然方法繁多，但患者常因各類身體因素，如免疫力下降、食慾不振、細菌感染……等等，間接導致死亡，而非因患癌而致死。

故除了如何有效防治癌症外，開闢新型治療方法、藥物以減輕患者身體負擔，提高術後/化療後存活率，亦是台灣當前重要課題之一。

第二章 文獻探討

2-1、什麼是 E、S、P？

2-1-1、*Escherichia coli* (E) 大腸桿菌 (E)

是一種革蘭氏陰性菌，大多數大腸桿菌是共生的並且佔正常腸道菌群的約0.1%，但是一些菌株本身俱有致病性，導致英國所有菌血症的約 20%¹⁰。通常致病性大腸桿菌菌株會具有黏附因子以使其可定居生長，例如：O157：H7 的菌株系於感染後易造成腸道內出血，更甚者則會破壞肺、腎之微血管，嚴重恐誘發急性腎衰竭^{4,11}。

2-1-2、*Staphylococcus aureus* (S) 金黃色葡萄球菌 (S)

是一種革蘭氏陽性菌，屬於常見皮膚微生物群代表。經統計指出：約60% 的人口被稱為「間歇性攜帶者」- 不規則地攜帶菌株；約 20% 的個體被稱為「持久性攜帶者」- 幾乎總是攜帶菌株¹²。為致病性極高的傷口性病原體，能夠在形成生物膜時導致急性或慢性感染²⁸，是臨床病史中第一種生長為生物膜的微生物¹³。從那時起人們意識到該菌是植入式醫療器材（如動靜脈分流器、機械心臟瓣膜和矯形器械）後慢性感染的主要原因¹⁴。大約 25% 的金黃色葡萄球菌會產生的外毒素可引起中毒性休克綜合徵，而其腸毒素則會導致腸胃炎¹⁵。致病源大多為耐甲氧西林金黃色葡萄球菌（MRSA）——造成「成孔外毒素壞死性出血性肺炎」的主要原因^{16,17}。經疾病篩檢後，超過三分之一的歐盟國家中約有 25% 的致病菌屬 MRSA，部分地區的流行率甚至超過50%^{4,18}。

2-1-3、*Pseudomonas aeruginosa* (P) 銅綠假單胞菌/綠膿桿菌 (P)

是一種革蘭氏陰性菌，是造成革蘭氏陰性菌醫院(院內)感染的主要原因(致病因屬革蘭氏陰性菌之首)。屬機會性致病菌，通常優先攻擊免疫受損的患者，如癌症患者或燒傷病患。同樣擁有革蘭氏陰性菌的保護性外膜，透過其獨特的「過濾方式」——分子量大於 500 Da，需藉由外膜孔蛋白才可運輸置細胞內，因此擁有對抗生素具有內在抗性^{4,19}。

2-2、癌症

2-2-1、乳癌

位居我國女性癌症發生率之首，好發年齡約於 45~69 歲之間。根據台灣衛生署之癌症登記報告顯示 (105 年之數據，107 年出版)，在女性十大癌症排行之中不論原位癌包含與否，乳癌的發生率皆穩居冠位——含原位癌約為 15 % (15018 人 / 10 萬人)，不含原位癌則約為 12.6 % (12672 人 / 10 萬人)。其死亡率則排行第三——約為 2.17 % (2176 人 / 10 萬人)^{36,37}。

2-2-2、MCF-7 細胞株

該細胞株是由 Dr. Soule 等人從一名患有轉移性疾病之 69 歲女性的胸腔積液中分離出來的，其中最重要的發現莫過於關於雌激素受體 (ER) 的相關敘述。屬於一種常用的乳癌細胞系，自發現後已被使用多年，經證實是一種適用於乳癌研究的細胞模型。其為攻擊性高且非侵襲性之細胞系，通常情況下轉移可能性低

20。

2-3、抗微生物胜肽研究始末

生物體利用免疫系統來抵禦外來微生物的侵襲，免疫系統大致上分為先天免疫 (Innate immunity) 和後天免疫 (Adaptive immunity) 兩類。在先天免疫系統中，當生物體遭受到病原菌的危害時，首先產生的防禦分子就是抗微生物胜肽，或稱為類抗生素胜肽 (Antibiotic peptide)。

抗微生物胜肽可用來抵禦各類微生物的危害，例如：細菌、真菌、病毒及寄生蟲等。而抗微生物胜肽除了具有抑制微生物生長的功能外，還參與許多免疫調節的功能，像是幫助清除細菌感染、抑制發炎反應時期細胞因子 (Cytokine) 的生成、以及促進傷口的癒合、亦或調節後天免疫系統反應……等等²¹。另外有些抗微生物胜肽對於哺乳類細胞具有溶血的作用，而有些抗微生物胜肽甚至可以抑制癌細胞的生長。

1980 年瑞典科學家 Boman 等人從惜古比天蠶 (*Hyatophora cecropia*) 的蛹中分離得到具有殺菌活性的小分子胜肽²²。在 80 年代相關的抗微生物胜肽研究主要為探討大型昆蟲，而在 90 年代之後，除了繼續對大型昆蟲進行研究，同時擴展至一些小型昆蟲和其他無脊椎及脊椎動物之探討，因此抗微生物胜肽成為免疫學和分子生物學領域研究的焦點^{21, 23, 24}。

2-4、抗微生物胜肽分類

抗微生物胜肽普遍由大約 12 ~ 50 個胺基酸所組成，其中疏水性殘基占 50 % 以上；而親水性殘基大多數是帶正電（一般約帶有 2 ~ 7 個正電荷），主要由精胺酸 (Arginine) 和離胺酸 (Lysine) 組成，只有少部分是帶負電的，如由天門冬胺酸 (Aspartic acid) 及麩胺酸 (Glutamic acid) 所組成；若將 C 端修飾為醯胺基 (Amide)，可加強胜肽之陽離子特性，以及可能可以抵擋水解酵素的分解而增加安定性³⁸。

抗微生物胜肽的種類很多、分布很廣，大部分的類型都是由疏水性的胺基酸和帶正電的胺基酸所組成，通常以其二級結構來做分類。

1. 具有雙極性的 α -helix (螺旋) 結構的胜肽；
2. 具有 β -sheet (摺板) 結構的胜肽，包含 2~4 個雙硫鍵以穩定其結構，而通常這類胜肽含有一小段 α -helix 結構；
3. 富含有色胺酸 (Tryptophan)、脯胺酸 (Proline) 且形成延展 (extend) 結構的胜肽；
4. 具有 Loop 結構的胜肽。

第三及第四類之胜肽較為稀少²⁴，而帶負電的抗微生物胜肽目前被發現的很少因此未被分類。大多數的帶正電抗微生物胜肽都會形成兩親性結構 (Amphipathic structure)，並在病原體表面的誘導下使帶正電的親水性端和疏水性端分開²⁵。

2-5、抗微生物胜肽與細菌細胞間的機轉

現今抗微生物胜肽的殺菌機制相當複雜且繁多，胜肽本身的許多因素如：長度、親水性、疏水性、電荷數、結構等，都可能影響其抗菌能力與選擇對象。

抗微生物胜肽的作用機制基本上是針對細菌、真菌或腫瘤細胞的生長產生抑制作用的機轉，一般推測是利用胜肽與細菌之細胞膜表面產生交互作用，因而改變膜的通透性 (permeability)，抑制細菌或腫瘤細胞的生長²⁶。

細菌的細胞膜主要是由磷脂質雙層 (phospholipids bilayer) 所構成帶負電荷親水性的表面，兩親性的抗微生物胜肽的帶正電胺基酸會很快的與帶負電的細胞膜接合，使得疏水性的胺基酸嵌入 (insertion) 細菌的細胞膜中，最後導致細菌的細胞膜產生穿透性的孔洞，造成細胞膜內外的膜電位改變或是細胞膜內外的離子濃度失去平衡而導致細菌的死亡。除了在細胞膜上作用之外，抗微生物胜肽也可能對其它標靶部位進行作用，範圍包括細菌細胞壁、細胞質及核酸等²³。

第三章 研究動機與目的

隨著現役抗生素逐漸失效、細菌抗藥性與日增強，其所造成的傷亡更是日夜不減的攀升。原因是抗生素的過度普及(濫用)與不當使用(如:抗生素對病毒通常無效)，然而近年隨著抗菌胜肽被發現，以及相關研究如雨後春筍般不斷增加。

抗菌胜肽是由胺基酸所構成的短小序列，由於其對細菌之作用機制不似抗生素須以受體結合的方式與細菌相互作用，而是可以”穿膜”的方式直接與細菌細胞膜結合，順勢進入細菌細胞內作用達到物理殺菌效果，因此抗菌胜肽較不易使細菌產生抗藥性。此外高度的選擇性、細胞毒性低、不易累積於人體及高度的特異性，皆是讓所有研究者趨之若鶩的優點。然而其最致命的缺陷——低穩定性，便是目前抗菌胜肽之研究仍在努力嘗試突破的主要瓶頸。

近幾年以來逐漸歸類出抗菌胜肽之設計要點，其中包含:(1) 富含陽離子、(2) 兩親性結構、(3) 胜肽序列之長短。其中 (1)、(2) 對其之抗菌活性具決定性因素。故本實驗將利用先前研發之具良好活性的抗菌胜肽—— JJ-02 作為模板，置換脯胺酸鉸鏈 (Proline hinge) 兩側之胺基酸來探討如此設計之衍生物 (SL 系列) 是否可擁有更佳的抗菌活性，以及兩親性結構與胜肽帶電量對抗菌活性的影響；對該系列胜肽進行溶血活性評估，探討對正常人類血球的破壞性高低。而諸多研究指出，部分抗菌胜肽具抑制癌細胞增生功效，且對細胞具有一定的選擇性，因此會對其進行抗癌活性評估，以利後續對序列之修改及探討。

第四章 實驗設計與流程

4-1、實驗流程概述

首先以固相胜肽合成法 (SPPS) 合成出所需之胜肽,後使用 MALDI-TOF MS 鑑定目標胜肽是否存在,再以 RP-HPLC 進行純化,即可得所需要的純胜肽產物 (Pure peptide)。在活性檢測的部分:(1) 培養各細菌株(大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、綠膿桿菌),以測試 SL 系列胜肽對各類菌種的抑制效果;(2) 培養癌細胞株(乳癌細胞株 MCF-7),評估胜肽是否具有抗癌細胞增生之效果;(3) 於溶血活性評估中,探討胜肽是否對真核細胞具有細胞毒性(破壞性)。

4-2、抗微生物胜肽之設計

根據相關研究指出其會受其本身之結構形狀、支鏈連結基團種類、兩親性及帶價電數而有不同的抗菌效果。故本實驗假設:當抗菌胜肽富含陽離子,且結構具高度兩親性,則可能有效提升其抗菌效果。於是將過去實驗室所研究過之抗微生物胜肽再進行部分胺基酸的修改,盼其可提高抑菌效率與殺菌效果。

4-2-1、JJ-02 的修改——SL 系列

選擇實驗室所研發之 JJ-02 作為基礎的胜肽序列模板，因其本身具有高抗微生物活性及低溶血的特性。為使兩親性結構更加極化與明顯，以 JJ-02 原序列 ($K^1 W^2 L^3 R^4 R^5 P^6 W^7 R^8 R^9 W^{10} R^{11}$) 的 P 為分界點，將 5 號胺基酸與 7 號胺基酸分別更換為 L 以及 K。經更換後，可得三條新的胜肽序列，分別為：只更換 5 號胺基酸之序列 ($K^1 W^2 L^3 R^4 L^5 P^6 W^7 R^8 R^9 W^{10} R^{11}$)、只更換 7 號胺基酸之序列 ($K^1 W^2 L^3 R^4 R^5 P^6 K^7 R^9 R^9 W^{10} R^{11}$)、5 號與 7 號胺基酸接更換之序列 ($K^1 W^2 L^3 R^4 L^5 P^6 K^7 R^9 R^9 W^{10} R^{11}$)，並將其暫時命名為 SL 系列，而依序為 SL-01、SL-02、SL-03。

第五章 材料與方法

5-1、固相胜肽合成法(Solid Phase Peptide Synthesis , 簡稱 SPPS)

5-1-1、固相胜肽合成法之原理

利用具有多孔性且不溶的珠狀固體——樹脂 (Resin)，作為胜肽的固相支撐體，並在其可形成肽鏈的部分加上帶有功能的交聯官能基 (Linker)，使之與胺基酸行程共價鍵連接，進而生成一條完整的胜肽鏈。不同的 Linker 需使用不同的切液才可將胜肽鏈從 Resin 上切除，故肽鏈可穩定的固定於 Resin 並於過濾時被保留下來，而副產物及溶劑則會全數清除。

一般的實驗流程為：沖洗 → 去除保護基 → 沖洗 → 耦合 為一循環。將位於 Resin 上的 Fmoc 保護基移除，使樹脂與胺基酸之 N 端裸露出 NH 官能基，與活化後的胺基酸 C 端形成胜肽鍵 (peptide bond)，使胺基酸耦合於樹脂上，當第一個胺基酸成功耦合與樹脂上後，再次將第一個胺基酸的 Fmoc 保護基去除後，使用耦合試劑使第二個胺基酸 C 端活化並使之接上去。重複上述步驟，依序合成胺基酸直至胜肽鏈合成完畢。

5-1-2、固相胜肽合成法之流程

1. 秤取適量樹脂置入 PD-10 管中，並加入 5 mL DCM 膨潤，重複 2 次，每次 5 分鐘。
 2. 將膨潤後的樹脂抽乾，並以 5 mL DMF 洗去 DCM，重複 3 次，每次 5 分鐘。
 3. 抽乾 DMF 並加入 5 mL 30% Piperidine，重複 3 次，每次 15 分鐘。
 4. 以 5 mL DMF 洗淨 30% Piperidine，重複 5 次，並於第三次時進行 Ninhydrin Test，檢驗 Fmoc 是否已被切除。
 5. 確認樹脂 Fmoc 已被切除後，即可加入 AA(amino acid)試劑(AA + HoBt 34 g + HBTU 95 g + DIEA 87.5 mL) 並置於震盪器中 overnight。
- 重複上述 步驟 2.→步驟 5. 直至序列合成完畢

<裂解胜肽>

1. 加入 0.125mL EDT、0.25mL Thioanisole、0.25mL DDW、5mL TFA、0.5mL Phenol 混合兩個小時。
2. 抽氣過濾後取液體，吹氮氣至體積不變。
3. 加入與液體等體積 -20°C 乙醚使胜肽沉澱並離心 2 次。
4. 清除澄清液並以 DDW 及 ACN 將粗胜肽回溶為液體，呈無色透明
5. 以 Parafilm 封口戳上數個小洞，放入 -80°C 的冰箱中，結凍後置入凍乾機中抽乾，即可得到粗產物。

5-2、Ninhydrin test

5-2-1、Ninhydrin test 原理

是一種利用 Ninhydrin 與一級胺反應會生成深藍色產物的特性所衍生出的檢測方法。於 SPPS 實驗中被應用於檢測樹脂與胺基酸是否耦合(coupling)成功，進而確認樹脂上之胜肽鏈中的胺基酸 N 端 Fmoc 是否已被切除。然而在 20 個胺基酸存有一例外：脯胺酸(Proline)，因為其 N 端本身為二級胺，即便切除 Fmoc 也無法利用呈色反應判定結果。

溶液置備

A 液: Ninhydrine 500 mg + 10 mL 正丁醇 (或乙醇)

B 液: Phenol 8 g (7.55 mL) + 2 mL 正丁醇

C 液: 200 μ L (KCN 濃度) + 9.8 mL Pyridine

- KCN 為列管藥品，需記錄使用量；廢液須到入廢液回收桶

5-2-2、Ninhydrin test 方法與實驗步驟

1. 各取 A 液、B 液、C 液 2 μ L 置於微量離心管 (Eppendorf) 中
2. 將少量樹脂加入含有 A、B、C 混合試劑中
3. 以 95°C 加熱，約 3~5 分鐘
4. 檢查呈色反應:

一級胺 → 樹脂呈深藍色；二級胺 → 樹脂呈黃色

無一級或二級胺 → 樹脂呈透明卵黃色(藕合成功)

5-3、高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

5-3-1、高效能液相層析儀原理

利用移動相通過固定相將不同極性的物質分離。將稀釋過後的混合樣品溶液注射入進樣槽後，當混合液通過分離管柱時，其中的物質會因受移動相的極性和非極性的固定相的分配係數不同(即親和力不相同)，因此造成樣品在管柱中所滯留的時間不同而達到分離純化的效果。

5-3-2、正相-HPLC 及逆相-HPLC 的比較

兩者比較將統整於表，詳見表 2。

5-3-2、RP-HPLC 固定相 (Stationary phase)

固定相管柱表面的填充材質為低至中極性的物質，通常是鍵結很強的非極性官能基團。 C_4 、 C_8 、 C_{18} 為逆相層析管柱，主鏈為聚矽氧化合物，側鏈則由不同長度的碳鏈所組成。根據分離物質的大小來選擇固定相，本實驗室所使用的逆相層析管柱為 C_{18} 。

5-3-3、RP-HPLC 移動相 (Mobile phase)

為用來帶動混合樣品的沖提液，以形成極性梯度。

A 液：DDW (經過濾膜 0.22 μm) 4 L + TFA 2 mL。

B 液：ACN 4 L + TFA 2 mL。

5-3-4、RP-HPLC 操作流程

<樣品製備>

1. 先取一 Eppendorf 並秤其空管重 (確實紀錄之)
2. 待天秤 (連同 Eppendorf) 歸零後，取適量胜肽粗產物並置於其中，待天平穩定後記錄數據 *此數據可利於計算產率
3. 再加入過濾後的 DDW 及 ACN 以 1:1 的方式溶解胜肽粗產物
*其比例隨胜肽溶解性質而有所調整
4. 將溶液以小飛碟 (0.22 μm 濾片) 過濾，確保其中無雜質
*若其中含有雜質便直接流經管柱進行純化，可能會造成損壞

<粗胜肽溶液之純化>

1. 設定 UV 偵測波長為 225 nm (胜肽平均最大吸收波長)，流速為 4 mL/min 以制定最適當之離析率。
2. 以每分鐘改變一梯度的原始梯度跑完 RP-HPLC 一次，收集每一根峰 (強度超過 0.5)，再經由 MALDI-TOF MS 鑑定是否含有目標胜肽。
3. 重新調整梯度，使目標胜肽與雜訊峰分離。確認最終梯度後，再進行大量純化，並將純化的產物收集於 50 mL 離心管中。
4. 將純化後的產物經冷凍乾燥成粉末儲存，並以 MALDI-TOF MS 鑑定純度。

5-4、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS)

5-4-1、MALDI-TOF MS 原理

MALDI-TOF MS 的主要原理是基質和分析物產生共結晶 (co-crystallization) 後，利用基質容易吸收 UV 雷射波長的特性，在極短時間內傳遞巨大的雷射能量於分析物，使分析物在被脫附氣化形成氣態分子，並由周圍環境中接受質子而游離成正離子。在飛行時間質譜儀的離子源中，經由電場加速獲得動能，進入飛行管中進行分離及質荷比 (m/z) 的檢測，而繪製出一張質量電荷比 (m/z) 與其所對應的強度 (intensity) 的質譜圖形。所使用的基質具有能與雷射產生共振吸收苯環或不飽和鍵，且具提供質子的羧酸官能基 (-COOH)。

5-4-2、基質特性、作用及配製方法

基質的主要功能在於吸收雷射能量。分析物本身不一定吸收雷射能量，因此基質輔助分析物脫附與游離，使分析物能由凝相脫附成氣體分子，並游離成為氣體離子，在游離源經外加電壓作用而得到一加速動能而進入無場飛行管中，依據分析物離子到達偵測器的時間不同而達到質量分析的目的。

基質需要具備以下三種必要的功用：吸收雷射能量使分析物游離、防止分析物聚集及提供氫離子，適合用來分析完整的生化分子。對不同種類的分析物，選擇適合的基質與分析物形成良好的共結晶之後，就可以得到較好的分析結果。一般常用的基質是小分子有機酸如 α -CHCA 應用於檢測分子量 3000 以下小肽；或 SA 用於檢測分子量 5000 以上大蛋白質。

5-4-3、MALDI-TOF MS 實驗步驟

1. 先在樣品盤點上 2 μ L 基質，待其自然風乾。
2. 將分析物與基質以等體積 2 μ L 混合，點於步驟 1. 的基質上，待其風乾，待測物和基質產生共結晶後，即可進行 MALDI-TOF MS 分析。
3. 將樣品盤放至離子源部份，而基質中的有機物質會吸收雷射光，將能量轉移至肽樣品上，使肽離開基質表面進入飛行管柱中。
4. 使用電腦分析，觀看分析物內的分子量分布。

5-5、抗菌活性評估

5-5-1、抗菌活性評估實驗流程

實驗流程圖，詳見圖 6。

5-5-2、細菌培養 (菌株活化)

首先將購買自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC) 的菌株 {*Escherichia coli* (ATCC25922)、*Staphylococcus aureus* (ATCC25923)、*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)} 塗佈洋菜膠培養基 (Agar) 上，採用畫線分離稀釋培養或以無菌 L 型玻璃棒均勻塗抹，以此檢驗菌種之純度及活化情形。剩餘菌株則全部移入其它培養基內，並在 37°C 培養箱中培育之。由於綠膿桿菌遲滯期 (Lag period) 較長，必須培養二倍時間後才能長出，所以需經過一、二次繼代培養 (Subculture) 後才能正常生長。

5-5-3、無菌操作台及容器的滅菌方法

進行實驗前無菌操作臺需以紫外光燈（UV 燈）照射 30~60 分鐘，而後以 75 % 的酒精擦拭其檯面，並同時開啟操作台風扇運轉約 10 分鐘，才開始實驗操作。所有進入操作台內的器物均需先噴灑 75 % 酒精確保無菌才可放入操作台內，且有瓶蓋之容器在旋開瓶蓋前，均需先以火烤後才能使用。

※ 酒精能滲入細菌體內，使組成細菌的蛋白質凝固。然而酒精濃度過高時，便會使菌體表面迅速凝固而形成一層包覆外膜，阻止酒精繼續向其內部滲透。故使用 70%~75% 的酒精，既能有效阻止細菌蛋白質的合成，更不會促使包膜形成，使酒精能有效作用而持續滲透，達到徹底消毒殺菌的目的。

5-5-4、細菌的接種 (劃碟法)

目的：用於細菌的純系培養、短暫保存純系細菌於培養基上。

方法與步驟：

1. 將菌株從 -80°C 冰箱中取出，並置入恆溫水槽中快速解凍。
2. 將接種環置入酒精燈火燄中燒紅，其上方部份亦得以火燄燒之。過火後稍待片刻使其降溫，再將其於培養基邊緣處輕搓數次，確認冷卻與否。
3. 待冷卻後，沾取微量離心管中的菌株液，打開富有一層培養基之培養皿，將沾有菌落的接種環於其上輕輕來回連畫數條橫線後，將培養蓋置回。

4. 再次將接種環在酒精燈火燄上燒紅 並使冷卻。將培養皿旋轉約 90 度，劃第二次線，依此進行直到第四條線為止。
5. 再次將接種環以酒精燈燒紅滅菌，並浸泡於 75% 酒精溶液中。
6. 將培養皿倒放，置於 37°C 培養箱中至隔夜。

5-5-5、細菌的培養 (液態培養)

目的: 適用於細菌的大量培養、菌液的稀釋及長久保存。

方法與步驟:

1. 依菌株數量準備相對應之試管與透氣試管蓋 (3 組), 將之過火後於管身標明「日期、菌種、操作者(姓名)」, 並於各組試管中排入 2000 μL 之培養液 (LB broth)。
2. 以 10 μL Tip 輔以 Pipette 刮下單一菌落 (1 個), 並將 Tip 排入含培養液之試管中。過程中 Tip 盡量不接觸試管內壁。
3. 將各菌於 37 °C、70 r.m.p 的培養箱中培養。
4. 欲進行抗菌實驗, 則將之培養至半對數生長期 (mid-log phase)。
➔大腸桿菌: 4 小時、金黃色葡萄球菌: 6 小時、綠膿桿菌: 8 小時

5-5-6、細菌數目的測量

1. 測量培養完後的 LB 菌液之 OD 值。
2. 根據 McFarland Standard 0.5 的 $OD_{595} = 0.082$ 之菌數為 1×10^8 CFU/mL。
以滅菌後的 DDW (滅菌水) 稀釋菌液直至 $OD_{595} = 0.082$ 。
3. 再使用 MH broth 培養液稀釋，將菌數 1×10^8 CFU/mL 配製成 5×10^5 CFU/mL。

5-5-7、抗菌活性評估之最低抑菌濃度 (MIC)

1. 取 200 μ L 稀釋菌液排入 96 微孔盤中，而後於各孔抽取 2 μ L 並棄之，再於各孔中加入 2 μ L 不同濃度的胜肽、藥物。以 MH broth 作為正調控組 (positive control; PC)，稀釋菌液作為負調控組 (negative control; NC)，並於培養箱中以 37 $^{\circ}$ C、70 r.m.p 培養 16 小時。
2. 使用微量盤分光光譜儀測量菌液 OD_{595} 值而後帶入計算公式後分析之。
制定最小抑制濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)，達到 90% 以上的抑菌效果。

$$\text{公式：MIC}_{90} \leq [(A_{\text{peptide}} - A_{\text{PC}}) / (A_{\text{NC}} - A_{\text{PC}})]$$

5-6、抗癌活性評估

5-6-1、抗癌活性評估實驗流程

實驗流程圖，詳見圖 8。

5-6-2、細胞培養液之配製

先於 1 L 量杯中倒入少量滅菌水 (約 400 mL)，並將培養液粉末 (DMEM) 與磁石置於溶液中，再啟動攪拌器進行初步混合。依序加入其他試劑並將溶液定量至 800 mL，待混合均勻後使用 pH meter 檢測其 pH 值，使用 HCl 將之調整為 pH = 7.38~7.4 (DMEM)。最後將溶液體積補足至 1 L，再於無菌操作台中以 0.22 μ M Filter 過濾之，並存於 4 °C 冷藏備用。

5-6-3、人類乳癌細胞株 (MCF-7) 之培養

1. 先於細胞培養盤中排入 5 mL DMEM 培養液，並輕晃培養盤使溶液均勻散布。以 Pipette 抽取 MCF-7 細胞液，均勻分散的排入盤中。
2. 於顯微鏡下檢查盤中是否有細胞存在，而後將之放入 37 °C、5% CO₂ 培養箱中。
3. 進行繼代培養 (subculture) 時，先以 1X PBS 清洗細胞 1~2 次，再加入 2000 μ L Trypsin-EDTA 緩慢輕晃使溶液均勻反應約 30 s ~ 60 s 並抽除之，後放入培養箱中約 5 分鐘。之後排入 2000 μ L DMEM 培養液沖洗培養盤，使細胞懸浮於培養液中，並將其以每新盤下 500 μ L 細胞液培養。

5-6-4、細胞之冷凍保存與活化

A. 冷凍保存細胞

*進行冷凍前一日，需更換培養液。 *基本原則:緩慢冷凍。

1. 取少量 (約 5 μ L) 之細胞懸浮液計數細胞濃度。
2. 將細胞液以 1500 r.p.m 離心 5 分鐘後除去上清液，加入適量細胞保存液 (10% DMSO)，使細胞液濃度為 $2 \sim 8 \times 10^6$ cell/mL。
3. 待混合均勻後分裝於具標示 (日期、細胞株名稱、細胞代數、操作者) 之冷凍保存管中 (1 mL/vial)。
4. 將冷凍管放入 (至少 5 cm) 厚保麗龍盒或細胞凍存盒中置於 -20°C 冰箱 0.5~1 小時後，再放置 -80°C 冰箱 24 小時，隔日才可放入液態氮桶中長期保存。

B. 冷凍細胞的活化

*基本原則:快速解凍，避免冰晶對細胞造成二次傷害。

1. 將冷凍管從液態氮桶中取出，放入 37°C 的恆溫水槽中。
過程中輕晃冷凍管，使其中冰塊於 3 分鐘內全數消溶。
2. 以 75% 酒精擦拭保存管後，將之放入無菌操作臺中。取出解凍後之細胞液並緩慢排入裝有培養液之細胞培養盤中，爾後輕晃使之均勻分布。
3. 將培養盤放入 37°C 、5% CO_2 培養箱中放置隔日。

4. 以顯微鏡觀察細胞生長情況。並於活化為始之第二天再更換培養液，使細胞有足夠時間於以貼附置培養盤面。
5. 活化細胞後對其進行繼代培養約 1~2 代，待其生長特性(外觀、增生速度)恢復如常。

5-6-5、癌細胞存活率之測定—— MTT assay

A. 實驗原理

MTT 全名為 (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)，是常用於細胞活性檢測之化合物。因其本身結構的親脂性側鏈基團和正淨電荷之特性，MTT 能夠通過細胞膜並與粒線體中的電子傳遞鏈之 H^+ 結合而開環，形成不溶於水的紫色甲臍 (formazan) 結晶。因為甲臍含量與活細胞數量呈正比，於是可利用 DMSO 將之回溶再檢測其吸光值反推細胞存活率。

B. 實驗流程

大致可以分為三部分：細胞分盤 → 下藥 → MTT。

1. 細胞分盤：

先將細胞以 1X PBS 清洗細胞 2 次，再加入 1000 μ L Trypsin-EDTA 緩慢輕晃使溶液均勻反應約 30 s ~ 60 s 並抽除之，後放入培養箱中約 5 分鐘。之後排入 2000 μ L DMEM 培養液沖洗培養盤，使細胞懸浮於培養

液中，並將細胞液轉移至離心管中以 1200 r.p.m 的轉速離心而後移除上清液。加入 5 mL DMEM 緩慢吸排始之混合均勻，再進行細胞計數估算該原液中之細胞總量，並依實驗所需配置細胞稀釋液，若是使用 24 孔盤，則為 300 μL $10^5/\text{well}$ 的稀釋液；96 孔盤，則為 100 μL $10^4/\text{well}$ 的稀釋液。最後置入培養箱中 24 小時，使細胞貼合孔盤。

2. 下藥:

將孔盤中培養液抽盡，切記不可觸碰孔底以免破壞細胞，再加入預混合之待測物(樣品/medium)，若是使用 24 孔盤，則為 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的混合液；96 孔盤，則為 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的混合液。後置入培養箱中反應 24 小時。

3. MTT assay

將孔盤中培養液抽盡，切記不可觸碰孔底以免破壞細胞，再加入 MTT 溶液 (1g/mL)，若是使用 24 孔盤，則為 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ ；96 孔盤，則為 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的混合液。而後放入培養箱中反應(結晶) 1.5~1.75 小時。待達反應時間後將 MTT 液抽除，留下孔中紫色甲臆結晶，並加入 DMSO 將之溶解，若是使用 24 孔盤，則為 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的混合液；96 孔盤，則為 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的混合液。靜置約 15~20 分鐘後便可測其 OD_{540} 的吸光值。

5-7、溶血活性評估 (Hemolytic assay)

溶血活性評估主要用以檢測胜肽是否對真核細胞具有破壞性，在此以人類紅血球 (Red blood cell; RBC) 作為測試樣品。若溶血性越低，代表對真核細胞的影響性越小，傷害也越低。除此之外，也可因此了解胜肽對真核及原核細胞膜的選擇性，有助於做為胜肽後續發展性與序列再設計的初步判斷。

5-7-1、血液樣品前處理

1. 取人體血液 (1~3 mL) 緩慢排入 15ml 離心管中，並於 4°C 下離心 (3000 rpm) 10 分鐘，之後去除上清液 (此為血清部分)。
2. 加入冰 PBS (pH= 7.4) 清洗紅血球。將 PBS 延離心管壁排入，血液與 PBS 隻體積比為 1:2，之後以緩慢「繞 8 字」的方式使兩者混和均勻，以離心管底無成塊血球為基準。後在 4°C 下離心 (3000 rpm) 5 分鐘，再去除上清液 (此為壞死之紅血球)，重複三次。最後移除大部分上清液(若不慎抽到血液不排回)，僅留少部分上清液，並將紅血球保存於 4°C 冰箱。
*只能放 4°C 保存兩個禮拜。
3. 需使用時，再用冰 PBS (pH=7.4) 清洗紅血球一次，去除上清液，最後用冰的 PBS 稀釋成(體積濃度) 2% 的紅血球溶液。

5-7-2、溶血活性評估之實驗步驟

A. (於 微量離心管 中進行)

1. 100 μL 紅血球 + 100 μL PBS 為負調控組，至少 3 重複。
2. 100 μL 紅血球 + 100 μL 0.2 % Triton X-100 為正調控組，至少 3 重複。
3. 取 100 μL 紅血球 + 100 μL 濃度 200 μM 的各胜肽溶液混合，胜肽最終濃度為 100 μM ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、70 r.p.m 之培養箱中反應一小時。

B. (轉移至 96 孔盤中)

4. 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心 (3000 rpm) 10 分鐘，取上清液 60 μL ，於 405 nm 偵測吸收值。
5. 以 PBS 為負調控組，0.2 % Triton X-100 為正調控組。

公式：Hemolysis (%) = $[(A_{\text{peptide}} - A_{\text{PBS}}) \div (A_{\text{Triton}} - A_{\text{PBS}})] \times 100$

第六章 實驗結果與討論

6-1、胜肽之合成

此系列胜肽在進行固相胜肽合成 (SPPS) 時，皆有一共同問題——序列中的「精胺酸 (Arginine, R)」和「色胺酸 (Tryptophan, W)」較難順利合成上。目前較合理的推論為胺基酸分子與整體胜肽皆帶正電荷會產生靜電力互斥，且其側鏈及保護基體積龐大容易形成立體障礙，導致合成上的困難。目前的解決方法為：(1) 多次加入活化後的胺基酸混和液，並延長耦合的反應時間，確保合成成功的產率上升；(2) 製備活化的胺基酸混合液時，將各類試劑及胺基酸之使用量等比例提升，使混合液中分子數目增加，將合成概率提升而達到成功耦合之目的；(3) 採用較大網孔 (Mesh) 之樹脂 (Resin) 減少耦合過程中的立體障礙。

此外，此系列胜肽的副產物極多，是因 Arginine 的側鏈保護基「Pbf」為一酸穩定之保護基，在固相胜肽合成時的化學裂解過程中較不易裂解完全。目前的處理方式為：(1) 增長化學裂解的時間，以及加入強還原劑苯酚 (Phenol) 等試劑，與裂解後的胺基酸保護基做結合，避免逆反應發生；(2) 直接進行二次裂解；(3) 調整裂解液中 TFA 之體積百分濃度。

6-2、胜肽之分子量鑑定

有鑑於模板序列 (JJ-02) 有產率不高的問題，由於 SL 系列為其衍生物，可能同樣有此問題，故為有效提高產率而將於裂解後先進行一次分子量鑑定，探查其中副產物的多寡。若與目標產物相比，副產物之質譜訊號強度相對較低，則可進行純化步驟；若相對較高，則需再次進行保護基裂解，待裂解完畢再次判斷相對強度，才可進行純化步驟。

在第一次裂解後，SL-01、SL-02 之質譜圖皆有許多副產物訊號峰，而目標產物之訊號峰則相對較低，SL-03 之質譜圖甚至無目標產物訊號峰。經由計算，SL 系列皆含有 1~2 個 Pbf 保護基 (或其他保護基)，為有效提高產率，遂進行二次裂解將剩餘保護基盡量切除。在第二次裂解後，各類 SL 胜肽之副產物訊號峰雖然依舊存在，卻也有明顯降低；各類目標產物之訊號峰強度亦有明顯提升，其中 SL-03 之目標分子量也同樣出現。

經由質譜鑑定後之結果圖推斷，若執意在胜肽已脫離樹酯且大部分保護基已切除的狀態下將剩餘保護基切除，恐有導致胜肽序列斷裂成數段之虞，遂決定於二次裂解後，先將目標產物及副產物(僅存有一保護基)進行分離，再針對副產物進行裂解，以避免裂解次數過多導致無目標產物或降低產率的結果。

*所有相關質譜結果圖之訊號分析論述將記於該圖頁面，詳見圖總集。

6-2-1、SL-01 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖

於第一次裂解後，將 SL-01 粗產物 (Crude) 進行 MALDI-TOF MS 鑑定其中內容物及目標產物(目標分子量)存在與否。透過圖 6 可知，由於胜肽所含 Arg 保護基 (Pbf) 過多並未完全切除，為提高產率故須二次裂解。

在進行二次裂解後，透過 MALDI-TOF MS 鑑定可以發現原副產物 (圖 6 中的 A、B、C、D) 僅剩 副產物 A 仍有明顯的訊號峰，而目標分子量(即 SL-01) 相對於 圖 9 已明顯提高許多。其餘 圖 7 中未標示之其餘分子量訊號為二次裂解後所產生的副產物，由該訊號值所顯示之分子量進行推估，其有可能是因為胜肽在大多數保護基被切除且離開樹脂的狀態下，故相對脆弱且易於與切液進行反應，從而導致序列遭截斷而形成副產物。

6-2-2、SL-02 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖

於第一次裂解後，將 SL-02 粗產物 (Crude) 進行 MALDI-TOF MS 鑑定其中內容物及目標產物(目標分子量)存在與否。透過圖 8 可知，由於胜肽所含 Arg 保護基 (Pbf) 過多並未完全切除，為提高產率故須二次裂解。

在進行二次裂解後，透過 MALDI-TOF MS 鑑定可以發現原副產物 (圖 8 中的 A、B、C、D) 僅剩 副產物 A 仍有明顯的訊號峰，而目標分子量(即 SL-02) 相對於 圖 8 已明顯提高許多。其餘 圖 9 中未標示之其餘分子量訊號為二次裂解後所產生的副產物，由該訊號值所顯示之分子量進行推估，其有可能是因為胜肽在大多數保護基被切除且離開樹脂的狀態下，故相對脆弱且易於與切液進行反應，從而導致序列遭截斷而形成副產物。

6-2-3、SL-03 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖

於第一次裂解後，將 SL-03 粗產物 (Crude) 進行 MALDI-TOF MS 鑑定其中內容物及目標產物(目標分子量)存在與否。透過圖 10 可知，由於胜肽所含保護基並未完全切除，且根本無目標產物之訊號值，故為提高產率須二次裂解。在進行二次裂解後，透過 MALDI-TOF MS 鑑定可以發現其中含有目標產物(之目標分子量)及副產物 (圖 11 A)。其餘 圖 11 中未標示之其餘分子量訊號為二次裂解後所產生的副產物，由該訊號值所顯示之分子量進行推估，其有可能是因為胜肽在大多數保護基被切除且離開樹脂的狀態下，故相對脆弱且易於與切液進行反應，從而導致序列遭截斷而形成副產物。

6-2-4、JJ-02 粗產物之 MALDI-TOF MS 圖

於第一次裂解後，將 JJ-02 粗產物 (Crude) 進行 MALDI-TOF MS 鑑定其中內容物及目標產物(目標分子量)存在與否。透過圖 12 可知，由於胜肽所含保護基並未完全切除，且根本無目標產物之訊號值，故為提高產率須二次裂解。在進行二次裂解後，透過 MALDI-TOF MS 鑑定可以發現其中含有目標產物(之目標分子量)及副產物 (圖 13 A)。其餘圖 13 中未標示之其餘分子量訊號為二次裂解後所產生的副產物，由該訊號值所顯示之分子量進行推估，其有可能是因為胜肽在大多數保護基被切除且離開樹脂的狀態下，故相對脆弱且易於與切液進行反應，從而導致序列遭截斷而形成副產物。

6-3、胜肽之純化

確認粗產物中有目標產物存在後，便開始進行分離純化之步驟。透過一分鐘改變一個梯度的方式，將偵測粗產物中各物質訊號，並將其個別收集遂以 MALDI-TOF MS 鑑定各訊號值的分子量，進而確認目標產物之滯留時間與訊號值。由圖 14、16、18、20 分別可知 SL 系列及 JJ-02 的滯留時間 (R_t)，而圖 15、17、19、21 則為純化後之純產物質譜圖鑑定。

*所有相關層析結果圖詳見圖總集。

6-4、抗微生物活性檢測之結果

6-4-1、SL 系列對 *E.coli* 之抗菌活性評估

由圖 22 可知，在肽類濃度為 2.5 μM 時已有輕微的抗菌效果。然而隨著濃度增加，可以發現 SL-02 的抗菌活性與 SL-01、SL-03 出現明顯分歧，於 10~20 μM 時 SL-02 之細菌存活率不再下降，而 SL-01、SL-03 仍有下降趨勢。由該圖解果可知，在針對 *E.coli* 時所表現之抗菌活性的優劣順序為：
SL-03 \geq SL-01 $>$ SL-02 。

6-4-2、SL 系列對 *S.aureus* 之抗菌活性評估

由圖 23 可知，在肽類濃度為 2.5 μM 時已有明顯的抗菌效果，特別是 SL-03。然而隨著濃度增加，SL-03 的抗菌活性反而由強轉弱，於 10 μM 時 SL-02 表現出最佳抗菌活性。然而當肽類濃度達 20 μM 時，所有肽類皆有抗菌活性降低的趨勢，且 SL-03 尤為明顯。故可知，在低濃度(2.5~5 μM)時，肽類之抗菌活性的優劣順序為：SL-03 $>$ SL-02 $>$ SL-01；在高濃度(10~20 μM)時，優劣順序則為：SL-02 $>$ SL-01 $>$ SL-03。

6-4-3、SL 系列對 *P.aeruginosa* 之抗菌活性評估

由圖 24 中結果可知，各肽類在 2.5 μM 時僅有輕微的抗菌效果。在 5 μM 時也只有 SL-03 的抗菌活性稍有進步，其後隨著濃度上升而表現出劑量相關性。SL-01、SL-02 雖然抗菌活性不比 SL-03，亦同表現出劑量相關性。故可知，其抗菌效果的優劣順序為：SL-03 $>$ SL-02 $>$ SL-01。

6-4-4、SL 系列與 JJ-02 之抗菌活性比較

由表 6 與圖 25 可知，SL 系列胜肽之抗菌活性均未優於 JJ-02。JJ-02 在濃度為 2.5 μM 時，於 *E.coli*、*S.aureus* 便達 MIC_{90} 的效果；於 5 μM 時，於 *P.aeruginosa* 亦是。而 SL 系列胜肽的濃度，即便上調至 20 μM 也無法表現出如同 JJ-02 般的抗菌效果。

就設計而論，經過胺基酸置換後可能導致胜肽結果有所改變，雖然保留了疏水端分佈以期望保有胜肽對細菌膜的作用能力，其中的側鏈分佈及相互作用力可能與 JJ-02 相去甚遠，故導致抗菌活性不如預期。

經由實驗結果，推測出相關假設：(1) 胜肽整體結構未能進入細菌細胞膜內造成細胞崩解；(2) 胜肽僅進入細菌內，並不與細胞膜作用；(3) 胜肽僅於細菌細胞外游離、徘徊，不與其作用，或作為其養分遭分解；(4) 胜肽濃度不足；(5) 胜肽與細菌細胞膜有相互作用，但無法破壞細胞膜結構殺死細菌。

6-5、SL 系列對 MCF-7 之抗癌活性評估

由圖 26 結果顯示，於 0~20 μM 時 MCF-7 之細胞存活率皆大於 100%，故可知無任何胜肽表現出抗癌細胞增生之功效。

雖然 SL 系列胜肽富含陽離子胺基酸(帶正電)，理論上而言該設計及其結構有利於胜肽與癌細胞膜結合(癌細胞膜帶負電)，然而實驗結果卻非如此，故做出以下相關之可能推論：(1) 胜肽整體結構未能進入癌細胞膜內造成細胞崩解；(2) 胜肽僅進入癌細胞內，並不與其作用；(3) 胜肽僅於癌細胞外游離、徘徊，不與癌細胞作用，或作為其養分遭分解；(4) 胜肽濃度不足。

6-6、SL 系列對 人類紅血球 之溶血活性評估

由表 7 可知各類胜肽的溶血活性，以 PBS 作為負調控組，Triton-100 作為正調控組，其中 SL-03 活性最低 (11.09%)，而 SL-02 最高 (13.30%)。所有 SL 系列胜肽之溶血活性均高於 JJ-02，故可推論所置換之胺基酸位置對溶血活性具有一定程度的影響。依實驗結果推估 SL-02 最高的原因可能為「靜電感應」，造成血球之細胞膜不穩定(通常成電中性)，進而導致血球破裂。

第七章 結論

雖然 SL 系列是源自於 JJ-02 的衍生物，但經過胺基酸置換後並沒有達到預期所假設之效果。三條胜肽 (SL-01、SL-02、SL-03) 皆未表現出更有效的抗菌活性；在抗癌活性中，三者皆未能表達出抗癌活性；在溶血活性中三者活性均高於 JJ-02。故由此推之，胜肽的兩親性及帶電量對其抗菌活性具有一定的影響力。其中 SL-02 表現出對革蘭氏陰/陽性菌的選擇性，而 SL-03 則具有(相對)較廣域之活性。總結而論，應是 SL-03 最具有後續研究價值，而 SL-02 可能顯示出其對革蘭氏菌的選擇性，亦可作為後續延伸探討的分支。

第八章 未來展望

針對實驗結果，可整理出未來主要的探討方向，將其整理如下：

1. 對 SL 系列胜肽進行結構探討 → CD 光譜之鑑定。
2. 對 SL-02、SL-03 進行作用機制的探討 → 穿膜實驗、螢光探針。
3. 對該系列胜肽進行化學性的修飾(如:環化或甲基化)，進而探討相關影響。

圖總集



圖 1、實驗流程圖

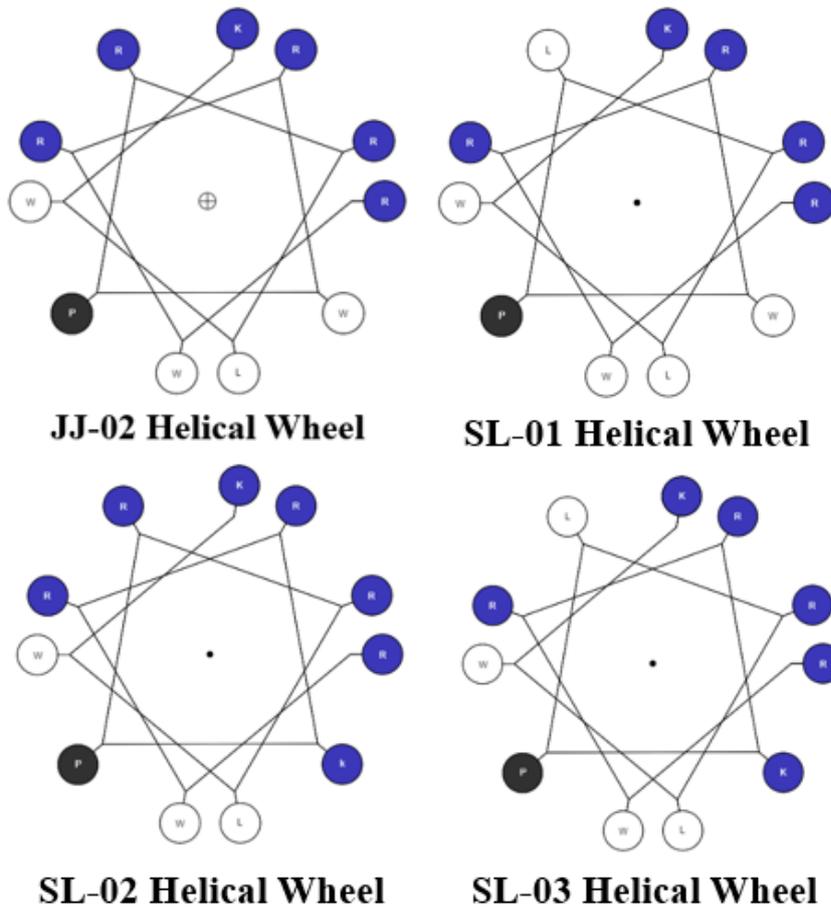


圖 2、各胜肽之 Helical Wheel 圖

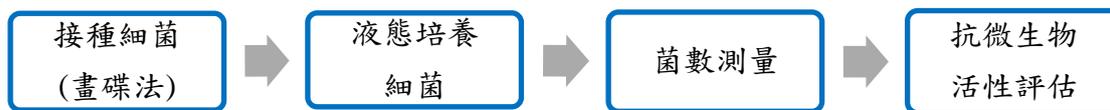


圖 3、細菌的培養及抗菌功效測試步驟

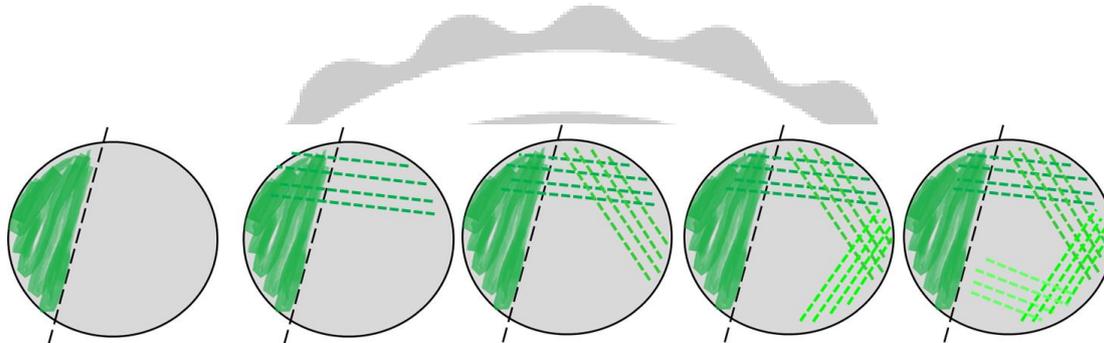


圖 4、畫碟方式



圖 5、抗癌活性實驗流程圖

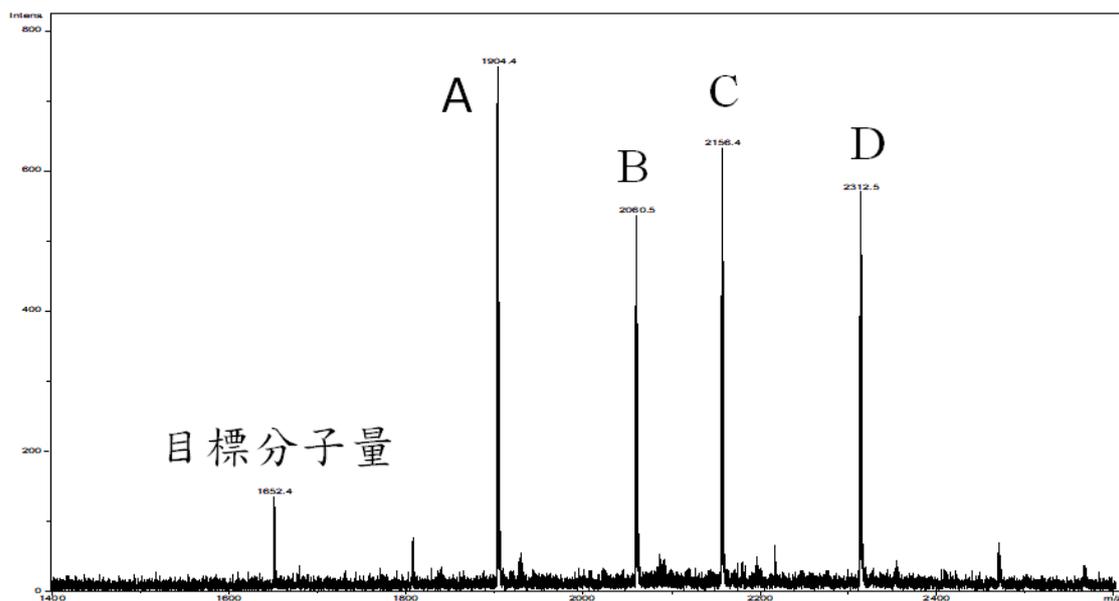


圖 6、SL-01 粗產物 MALDI-TOF MS 圖 (第一次裂解)

SL-01 目標分子量: 1652.4 Da

(理論分子量: 1652.99 Da) * Pbf = 252 (Da)

副產物 A : 1904.4 Da (具 1 個 Pbf 保護基)

副產物 B : 2060.5 Da (具 1 個 Pbf 保護基及 5 Na、1 K)

副產物 C : 2156.4 Da (具 2 個 Pbf 保護基)

副產物 D : 2312.5 Da (具 2 個 Pbf 保護基及 5 Na、1 K)

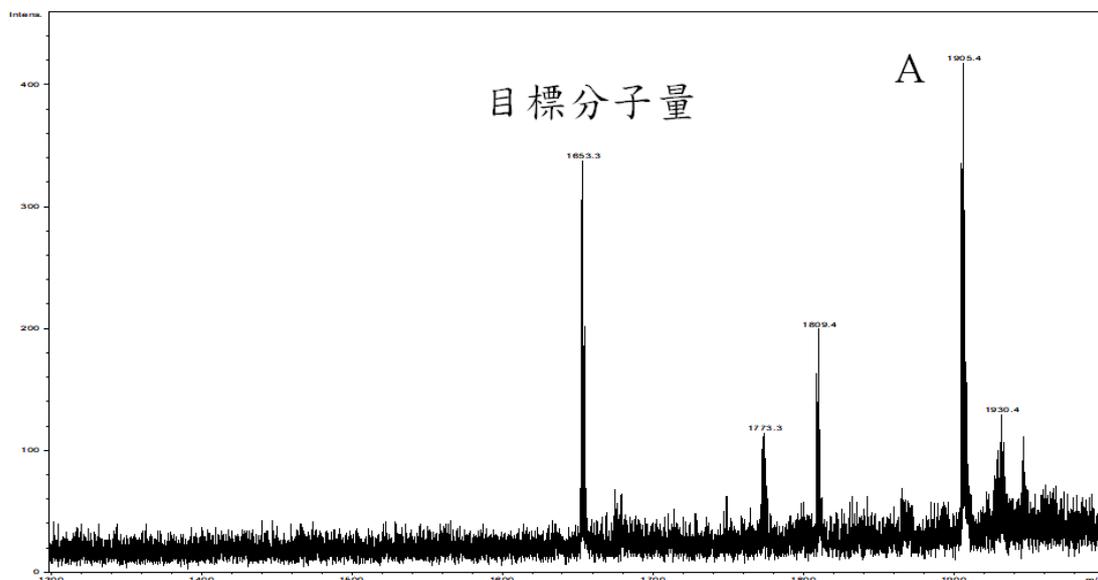


圖 7、SL-01 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解)

SL-01 目標分子量 : 1653.3 Da

(理論分子量: 1652.99 Da) * Pbf = 252 (Da)

副產物 A : 1905.4 Da (具 1 個 Pbf 保護基)

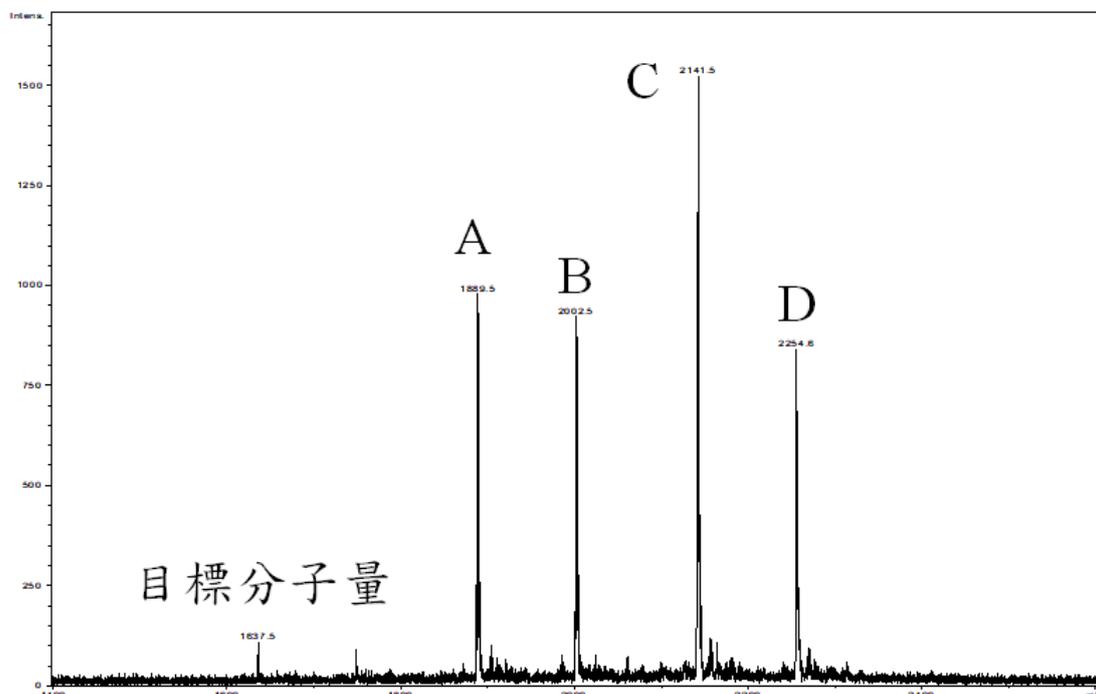


圖 8、SL-02 粗產物 MALDI-TOF-MS (第一次裂解)

SL-02 目標分子量：1637.5 Da (理論分子量: 1637.98 Da)

副產物 A：1889.5 Da (具 1 個 Pbf 保護基)

副產物 B：2060.5 Da (具 1 個 Pbf 保護基及 5 Na)

副產物 C：2141.5 Da (具 2 個 Pbf 保護基)

副產物 D：2254.6 Da (具 2 個 Pbf 保護基及 5 Na)

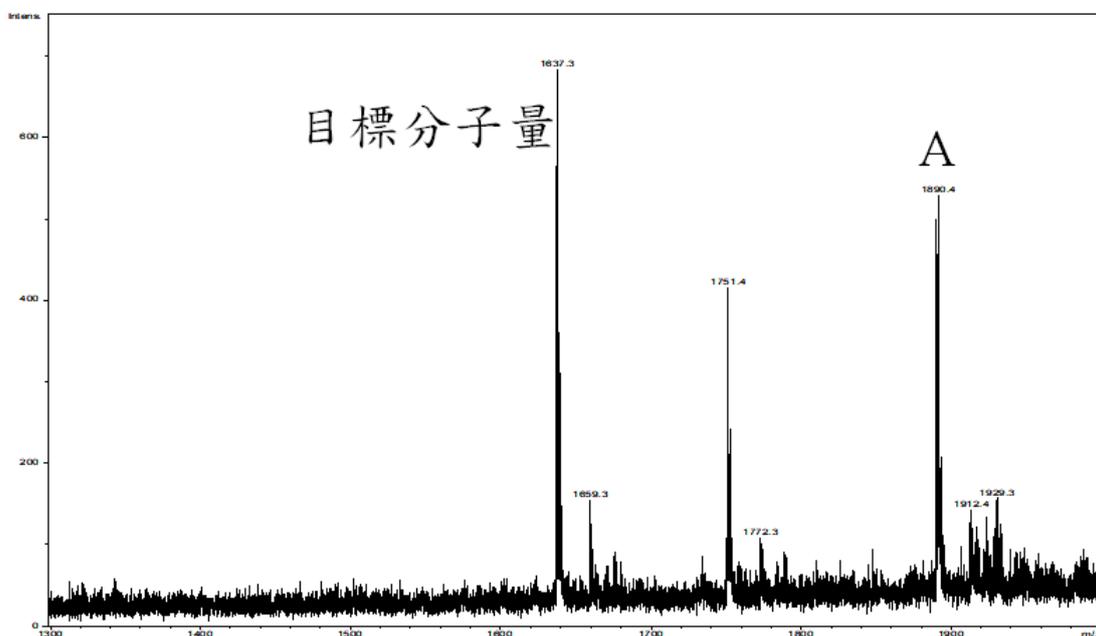


圖 9、SL-02 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解)

SL-02 目標分子量: 1637.3 Da (理論分子量: 1637.98 Da)

副產物 A: 1890.4 Da (具 1 個 Pbf 保護基)

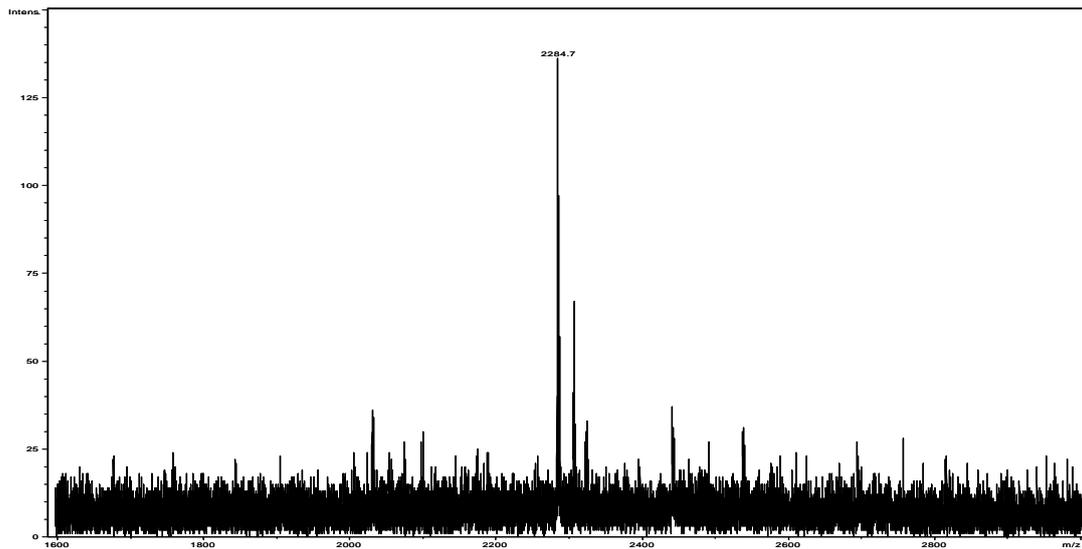


圖 10、SL-03 粗產物 MALDI-TOF MS (第一次裂解)

SL-03 理論分子量: 1594.95 Da

副產物分子量 : 2284.7 Da

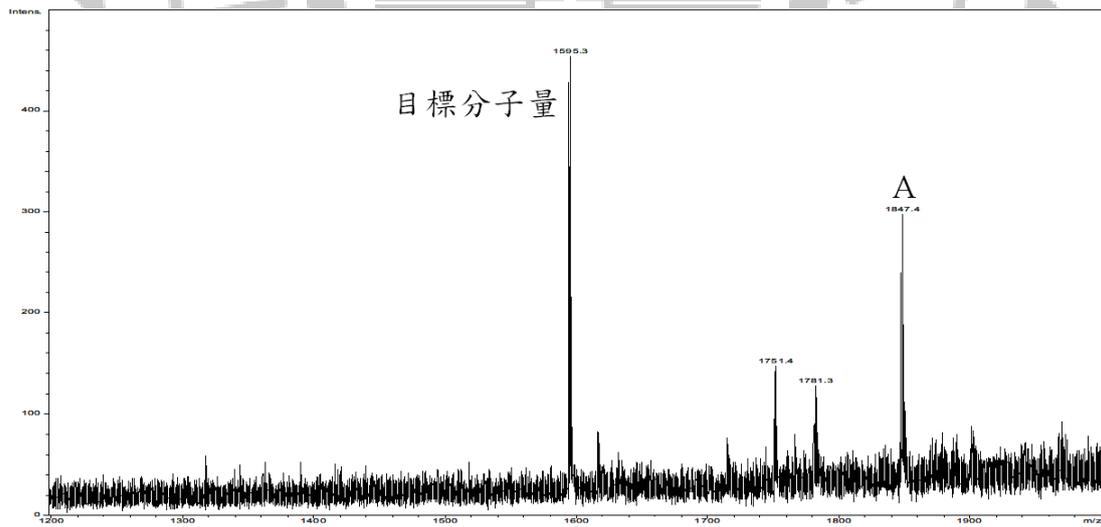


圖 11、SL-03 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解)

SL-03 目標分子量 : 1595.3 Da (理論分子量: 1594.95 Da)

副產物 A : 1847.4 Da (具 1 個 Pbf 保護基)

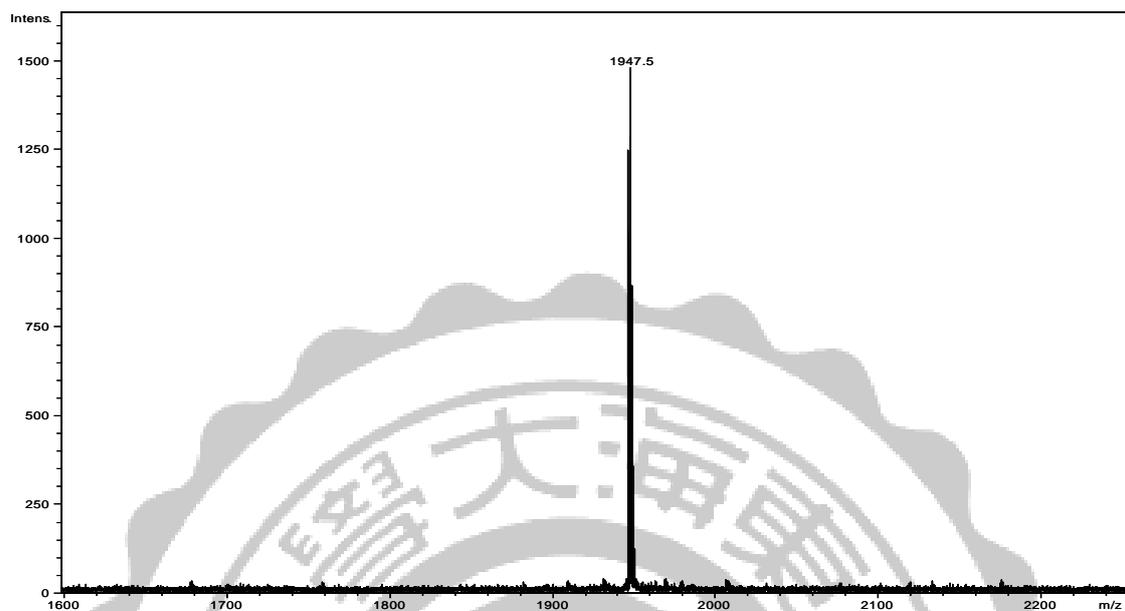


圖 12、JJ-02 粗產物 MALDI-TOF MS (第一次裂解)

JJ-02 理論分子量: 1696.02 Da

副產物分子量 : 1947.5 Da (具 1 個 Pbf 保護基)

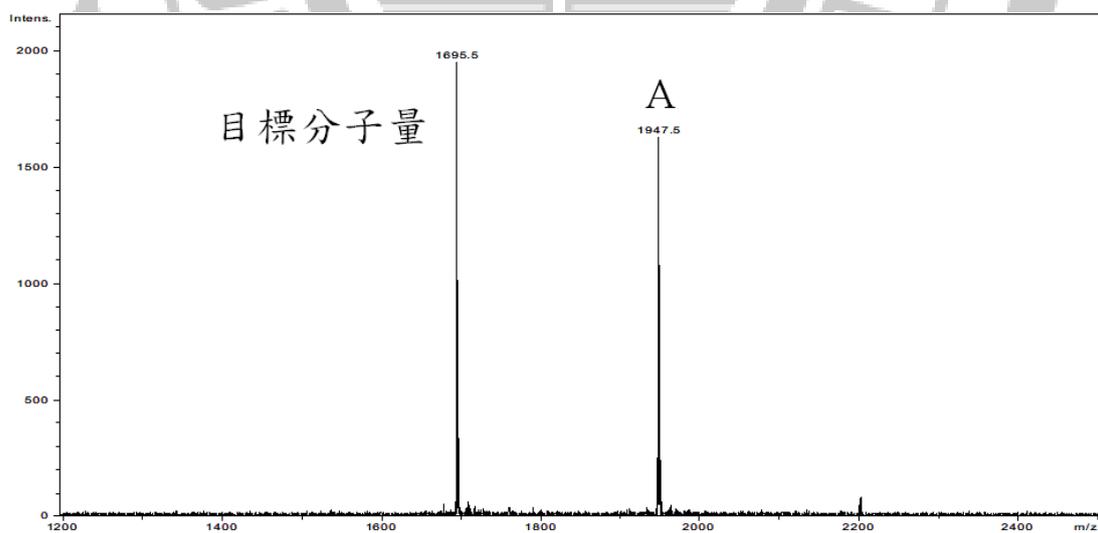


圖 13、JJ-02 粗產物 MALDI-TOF MS (第二次裂解)

JJ-02 目標分子量 : 1695.5 Da (理論分子量: 1696.02 Da)

副產物 A: 1947.5 Da (具 1 個 Pbf 保護基)

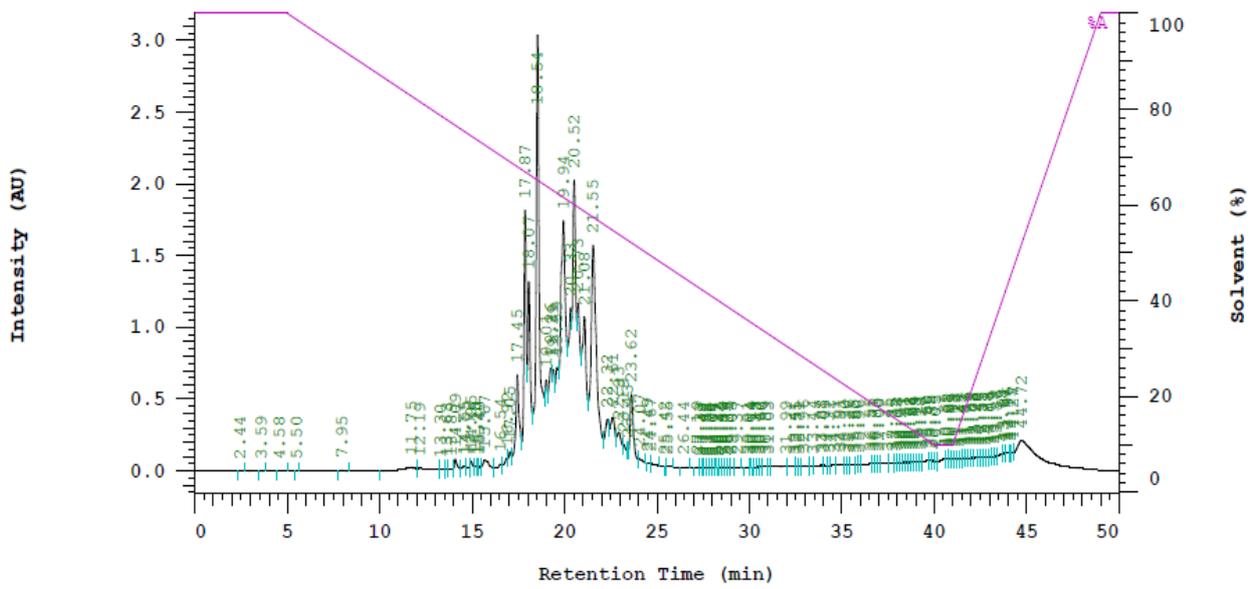


圖 14、SL-01 粗產物 RP-HPLC 之層析圖

目標產物 R_t : 18.54 分鐘

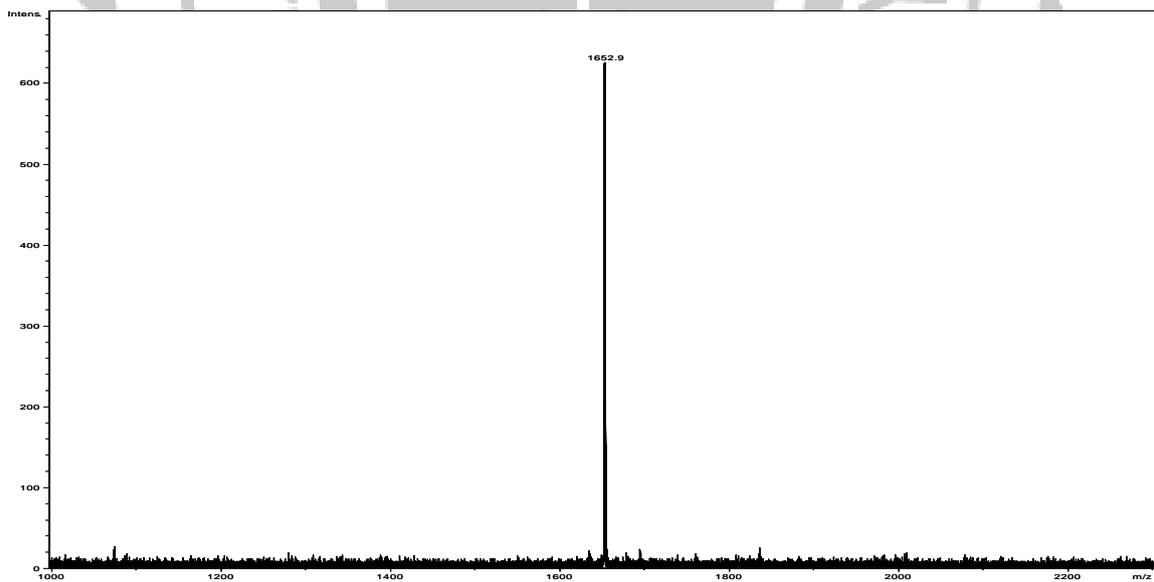


圖 15、SL-01 MALDI-TOF MS (Pure)

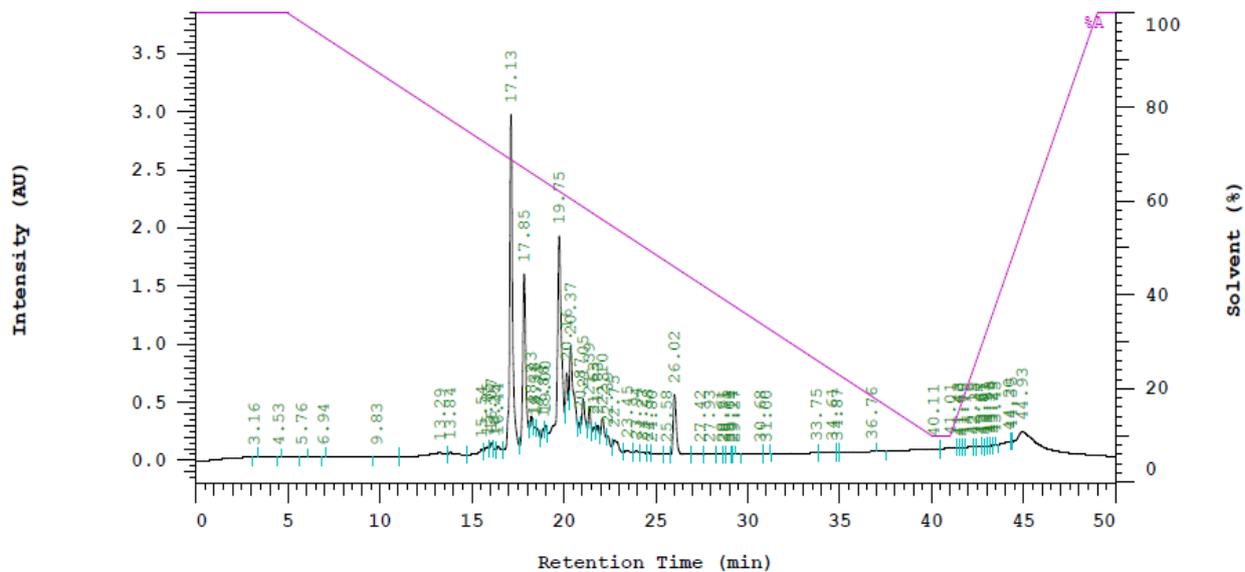


圖 16、SL-02 RP-HPLC (Crude) 層析圖

目標產物 Rt: 17.13 分鐘

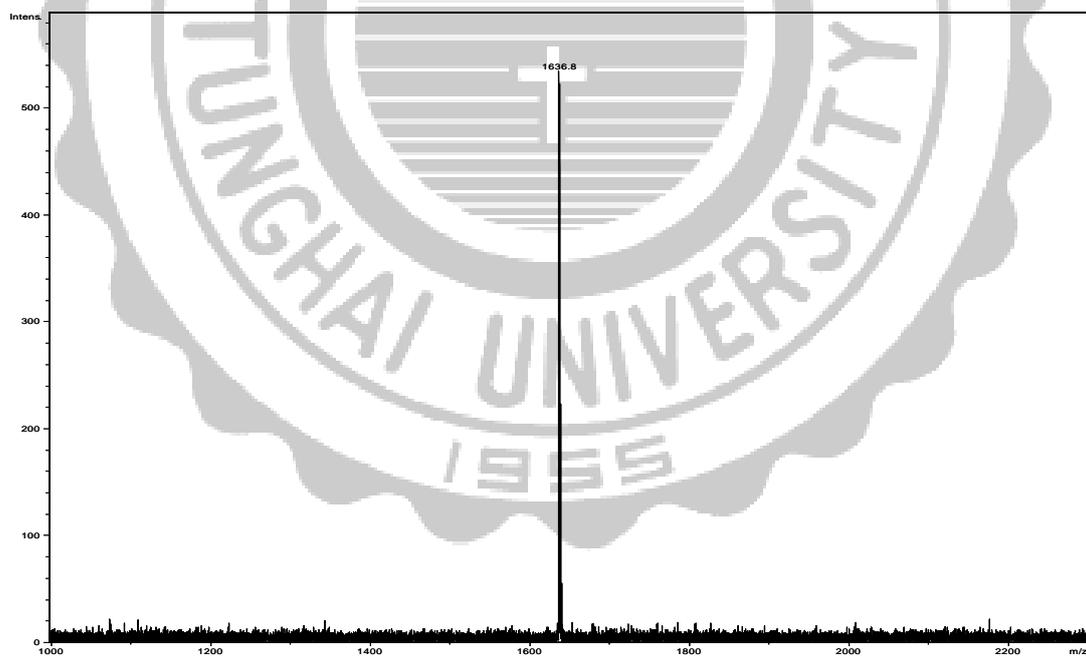


圖 17、SL-02 MALDI-TOF MS (Pure)

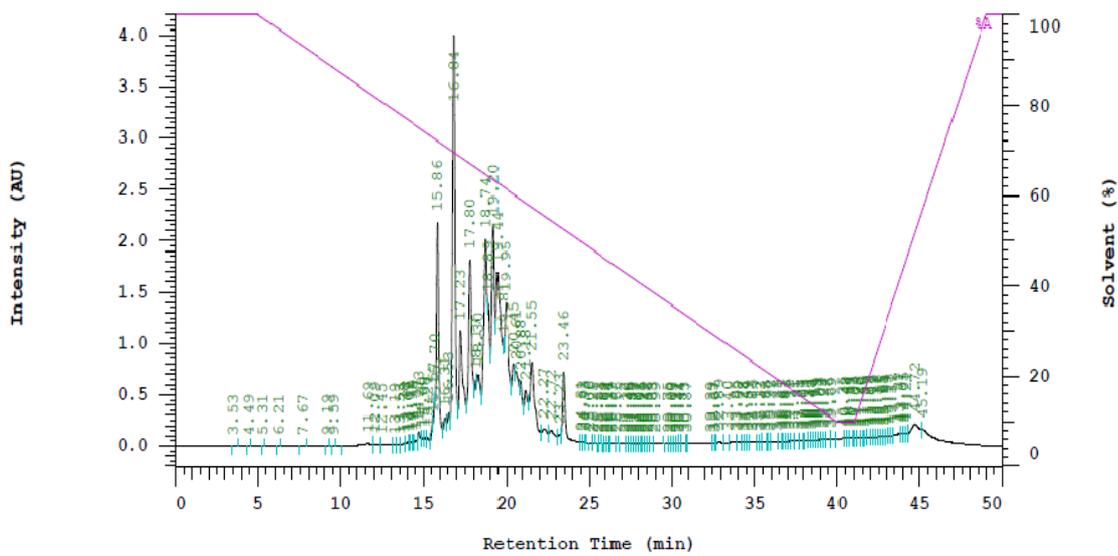


圖 18、SL-03 RP-HPLC (Crude) 之層析圖

目標產物 Rt: 16.04 分鐘

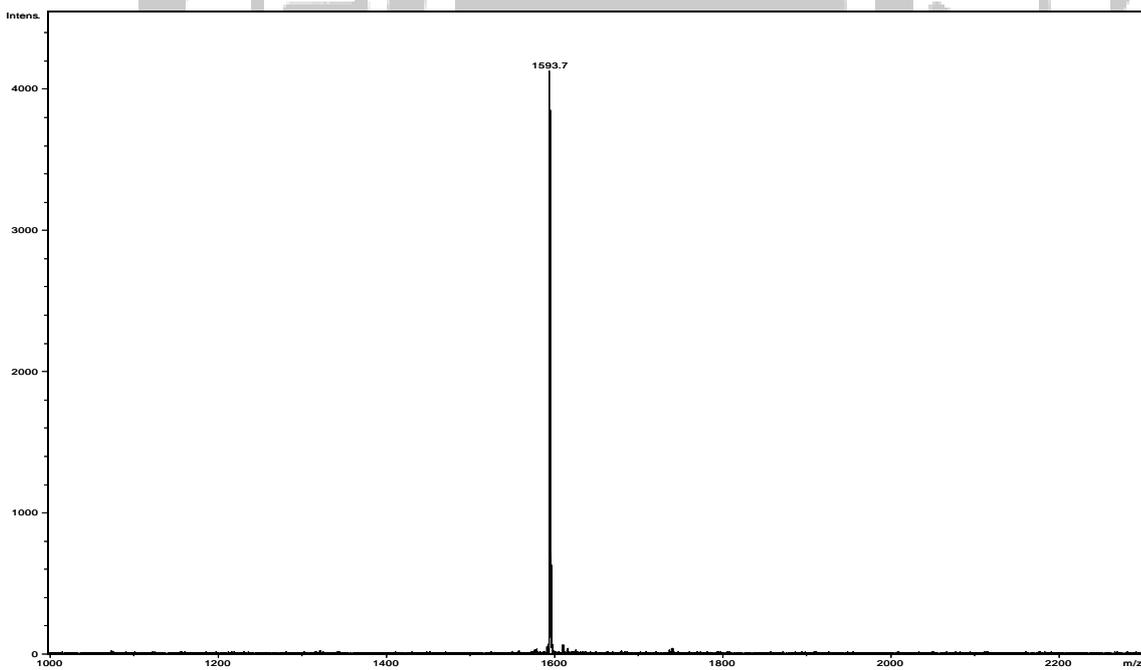


圖 19、SL-03 MALDI-TOF MS (Pure)

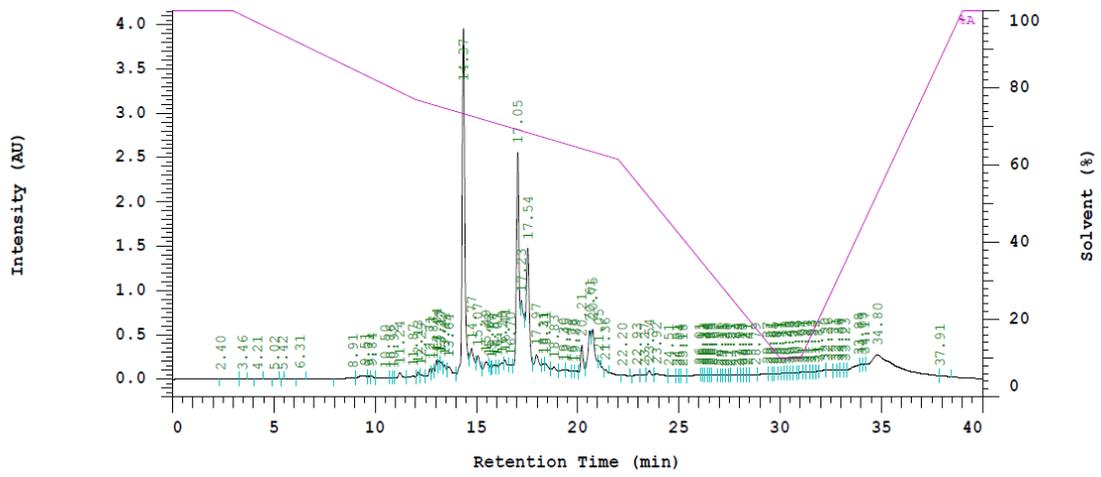


圖 20、JJ-02 RP-HPLC (Crude) 之層析圖

目標產物 Rt: 14.07 分鐘

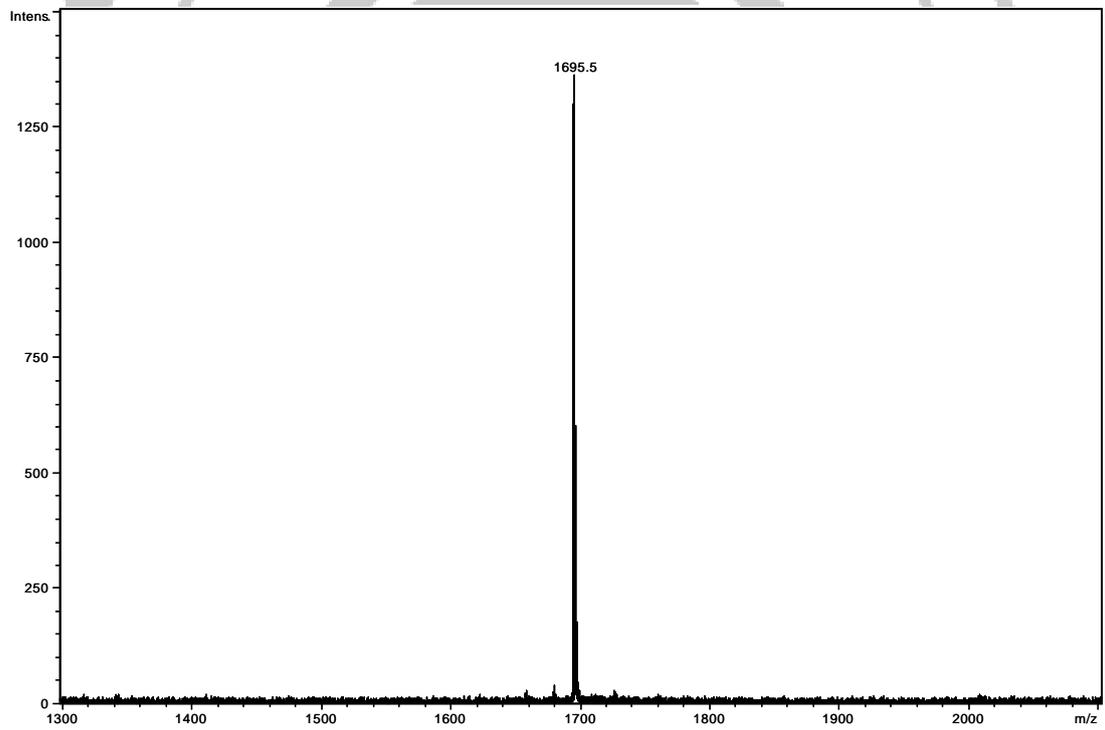


圖 21、JJ-02 MALDI-TOF MS (Pure)

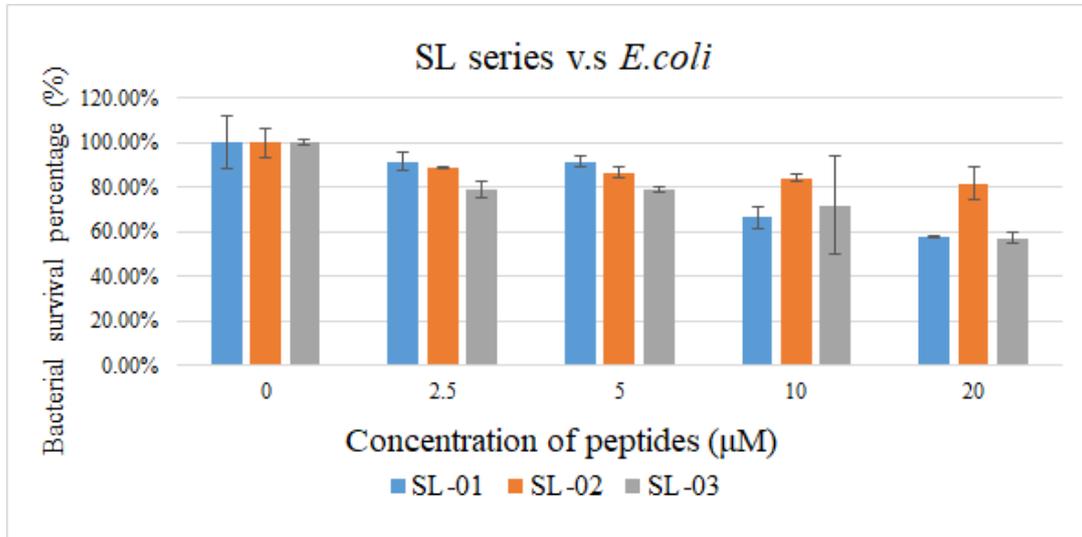


圖 22、SL 系列對 *E.coli* 之抗菌結果

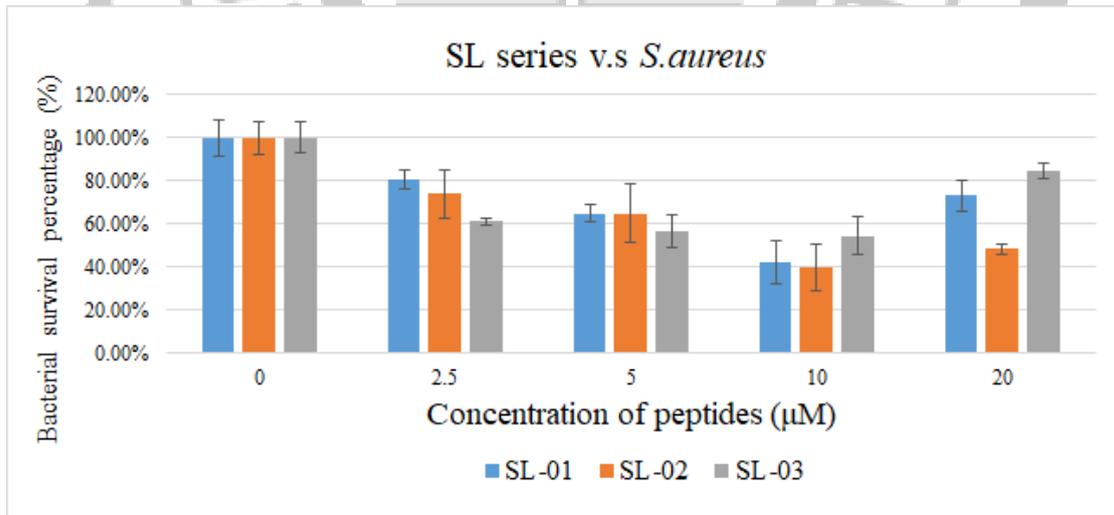


圖 23、SL 系列對 *S.aureus* 之抗菌結果

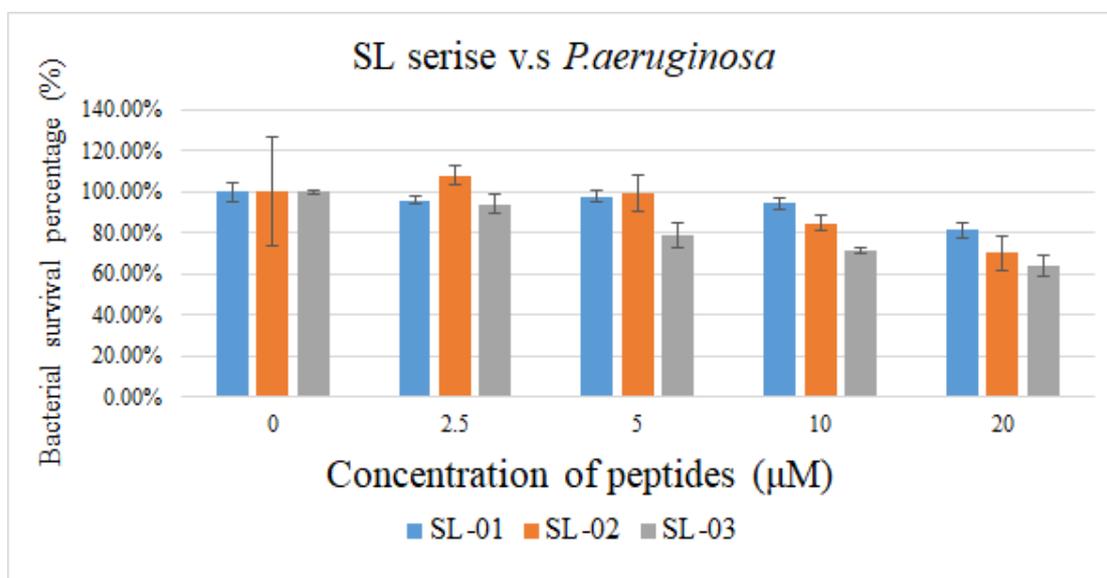


圖 24、SL 系列對 *P.aeruginosa* 之抗菌結果

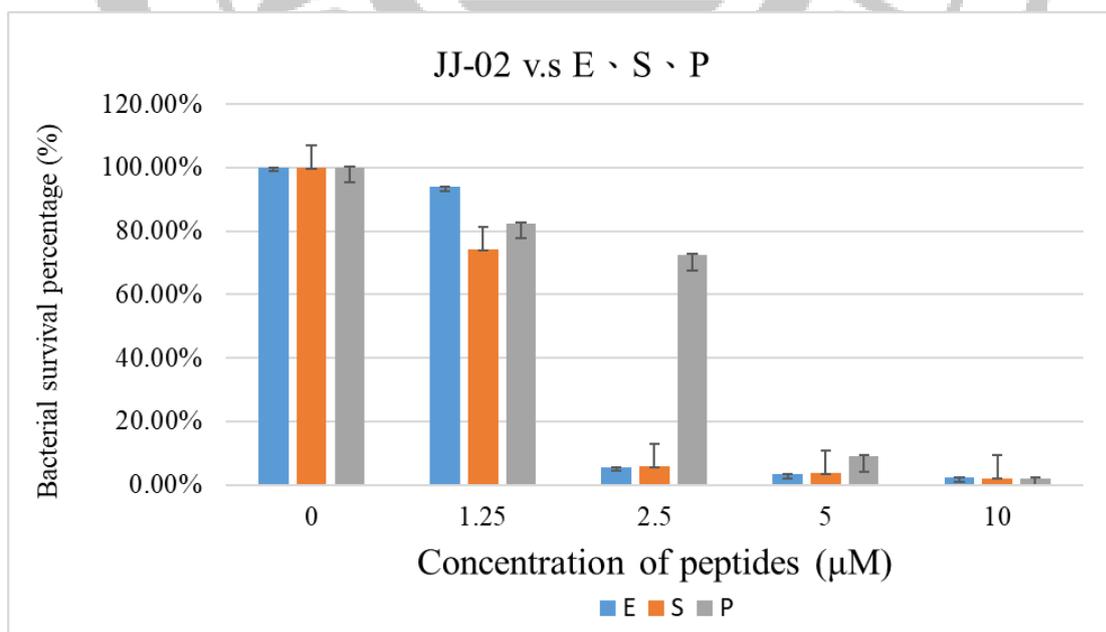


圖 25、JJ-02 對 E、S、P 之抗菌結果

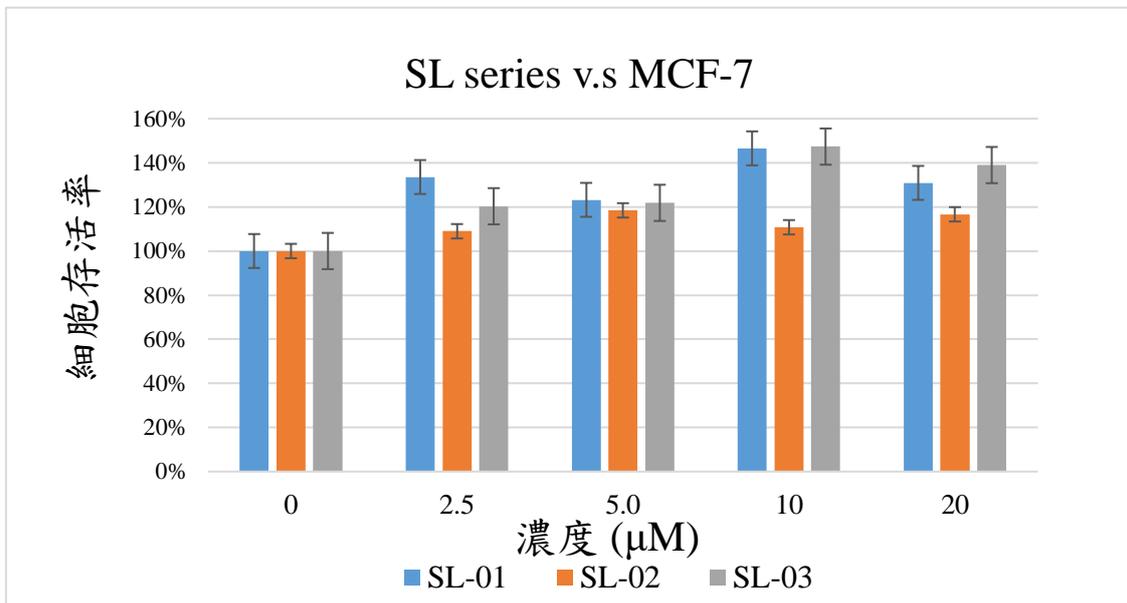


圖 26、SL 系列對 MCF-7 之抗癌活性結果

表總集

表 1、設計胜肽之胺基酸序列一覽

Peptide	Sequence										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
JJ-02	K	W	L	R	R	P	W	R	R	W	R
SL-01	K	W	L	R	L	P	W	R	R	W	R
SL-02	K	W	L	R	R	P	K	R	R	W	R
SL-03	K	W	L	R	L	P	K	R	R	W	R

表 2、HPLC 比較一覽表

HPLC 種類	移動相	固定相	沖提順序
正相	非極性	極性	1. 非極性 2. 弱極性 3. 極性
逆相	極性	非極性	1. 極性 2. 弱極性 3. 非極性

表 3、基質名稱、結構及配方

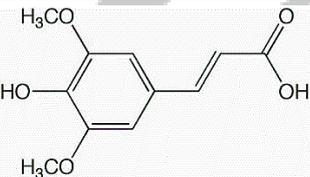
基質	內容物
<p>α-CHCA</p> 	<p>α-CHCA : 10 mg 、 ACN : 500 μL 、 [1 mL DDW + 1 μL TFA] : 500 μL</p>
<p>SA</p> 	<p>SA : 15 mg 、 ACN : 500 μL 、 [1 mL DDW + 1 μL TFA] : 500 μL</p>

表 4、溶液配置圖

溶液	配方
10X PBS (1 L)	80 g NaCl + 2 g KCl + 27.2 g Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O + 2.4 g KH ₂ PO ₄
DMEM (1 L)	DMEM 粉末 1 包 + 3.7 g NaHCO ₃ + 55 mL HEPES + 5 mL PS + 50 mL FBS + 900 mL 滅菌水
MTT 試劑	100mL 1X PBS + 30 mg MTT
10% DMSO	*DMSO 須先以 0.22 micro FGLP Teflon 於無菌操作臺過濾之 10 mL 細胞培養液 + 1 mL DMSO (原液)

表 5、合成之抗微生物胜肽的物理化學性質

Peptide	Net Charge ^a	Mass (Theoretical, Da) ^a	Mass (Da) ^b	R _f ^c
JJ-02	6	1696.02	1695.5	14.37
SL-01	5	1652.99	1653.3	18.54
SL-02	7	1637.98	1636.8	17.13
SL-03	6	1594.95	1593.7	16.04

- a. 胜肽靜電荷及理論分子量計算網址 <http://pepcalc.com/>
 b. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF MS) 偵測值
 c. 逆向高效能液向層析儀 (RP-HPLC) 之偵測滯留時間

表 6、各胜肽之活性 (MIC) 一覽表 (單位: μM)

胜肽	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
JJ-02	2.5	2.5	5
SL-01	>20	>20	>20
SL-02	>20	>20	>20
SL-03	>20	>20	>20

表 7、各胜肽之溶血活性

樣品 (100 μM)	溶血活性 (%)
JJ-02	3.4
SL-01	12.43
SL-02	13.30
SL-03	11.09
PBS	0
Triton-100	100

參考文獻

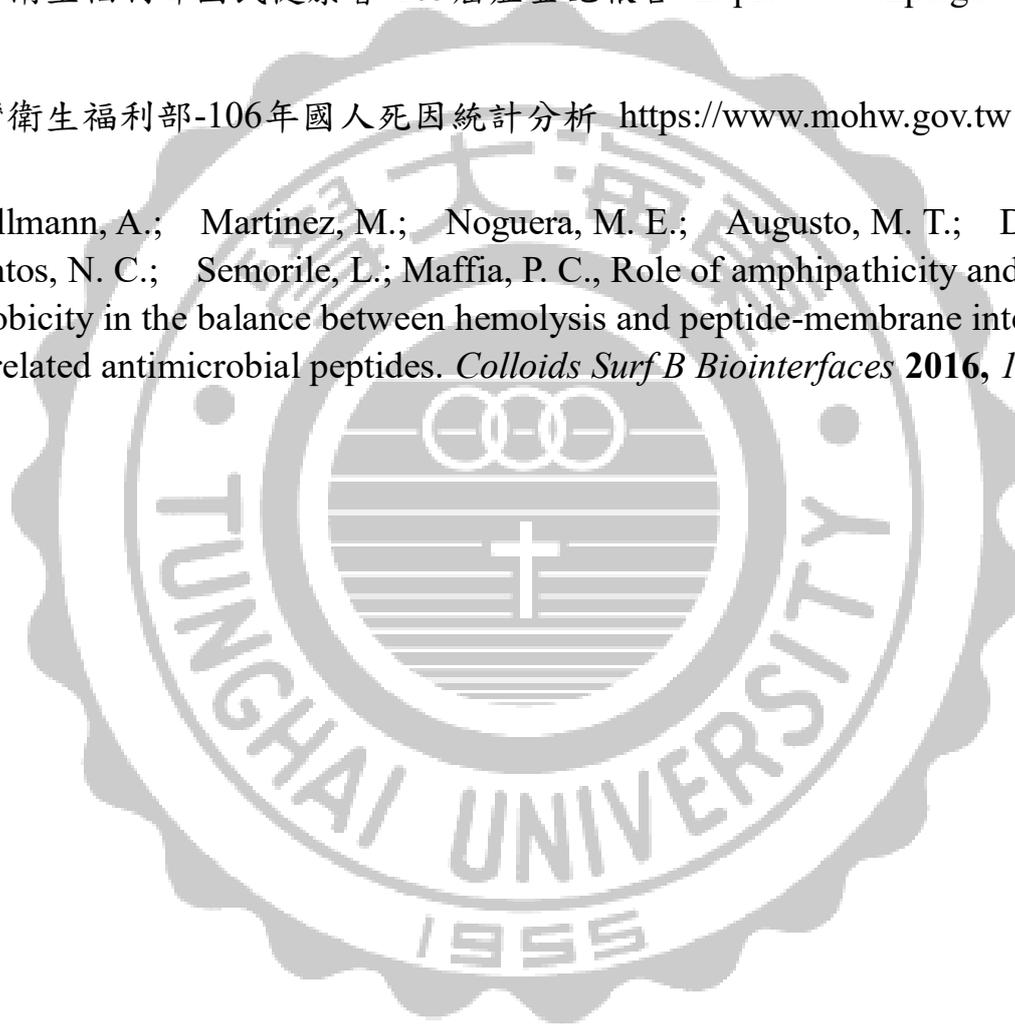
1. Rice, L. B., Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* **2008**, *197* (8), 1079-81.
2. Roder, B. L.; Wandall, D. A.; Frimodt-Moller, N.; Espersen, F.; Skinhoj, P.; Rosdahl, V. T., Clinical features of Staphylococcus aureus endocarditis: a 10-year experience in Denmark. *Arch Intern Med* **1999**, *159* (5), 462-9.
3. Sieradzki, K.; Roberts, R. B.; Haber, S. W.; Tomasz, A., The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. *N Engl J Med* **1999**, *340* (7), 517-23.
4. Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F., Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2013**, *11* (3), 297-308.
5. Ercsey-Ravasz, M.; Toroczka, Z.; Lakner, Z.; Baranyi, J., Complexity of the international agro-food trade network and its impact on food safety. *PLoS One* **2012**, *7* (5), e37810.
6. Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J., Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2009**, *48* (1), 1-12.
7. Lewis, K., Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. *Nature* **2012**, *485* (7399), 439-40.
8. Allegranzi, B.; Bagheri Nejad, S.; Combescure, C.; Graafmans, W.; Attar, H.; Donaldson, L.; Pittet, D., Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet* **2011**, *377* (9761), 228-41.
9. Abat, C.; Fournier, P. E.; Jimeno, M. T.; Rolain, J. M.; Raoult, D., Extremely and pandrug-resistant bacteria extra-deaths: myth or reality? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2018**, *37* (9), 1687-1697.
10. Livermore, D. M.; Hope, R.; Brick, G.; Lillie, M.; Reynolds, R.; Surveillance, B. W. P. o. R., Non-susceptibility trends among Enterobacteriaceae from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother* **2008**, *62* Suppl

2, ii41-54.

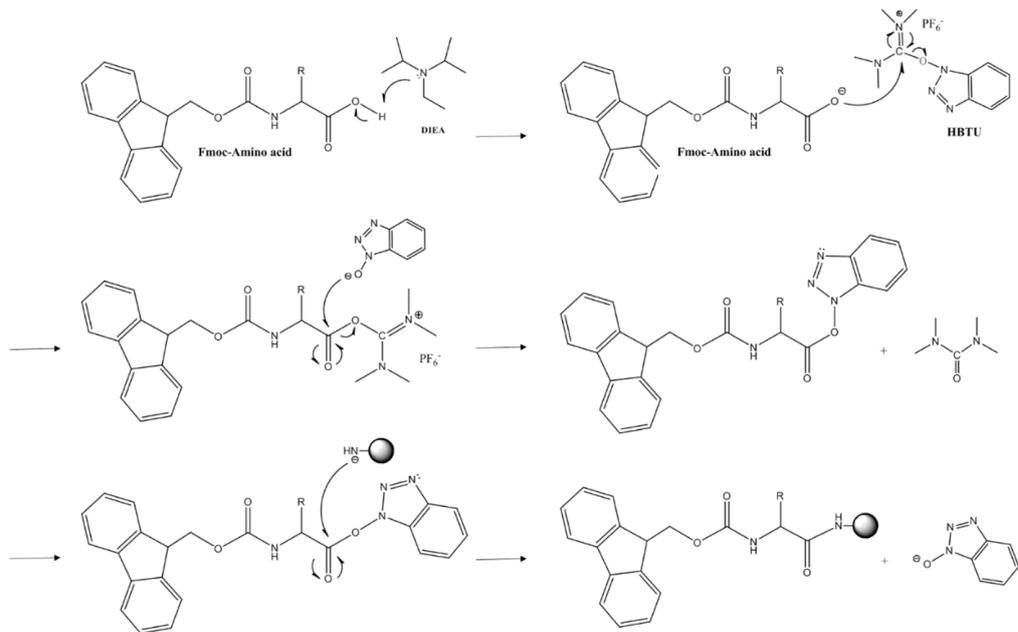
11. Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L., Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2004**, 2 (2), 123-40.
12. Kluytmans, J.; van Belkum, A.; Verbrugh, H., Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* **1997**, 10 (3), 505-20.
13. Marrie, T. J.; Nelligan, J.; Costerton, J. W., A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* **1982**, 66 (6), 1339-41.
14. Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **1999**, 284 (5418), 1318-22.
15. Parsonnet, J.; Hansmann, M. A.; Delaney, M. L.; Modern, P. A.; Dubois, A. M.; Wieland-Alter, W.; Wissemann, K. W.; Wild, J. E.; Jones, M. B.; Seymour, J. L.; Onderdonk, A. B., Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *J Clin Microbiol* **2005**, 43 (9), 4628-34.
16. Lina, G.; Piemont, Y.; Godail-Gamot, F.; Bes, M.; Peter, M. O.; Gauduchon, V.; Vandenesch, F.; Etienne, J., Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* **1999**, 29 (5), 1128-32.
17. Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M. C.; Lina, G.; Nimmo, G. R.; Heffernan, H.; Liassine, N.; Bes, M.; Greenland, T.; Reverdy, M. E.; Etienne, J., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* **2003**, 9 (8), 978-84.
18. External, c., European Centre for Disease Prevention and Control publishes Annual epidemiological report 2011. *Euro Surveill* **2011**, 16 (45).
19. Nikaido, H., Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **2003**, 67 (4), 593-656.
20. Comsa, S.; Cimpean, A. M.; Raica, M., The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res* **2015**, 35 (6), 3147-54.

21. Ganz, T., Antimicrobial polypeptides. *J Leukoc Biol* **2004**, 75 (1), 34-8.
22. Hultmark, D.; Steiner, H.; Rasmuson, T.; Boman, H. G., Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* **1980**, 106 (1), 7-16.
23. Hancock, R. E.; Chapple, D. S., Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, 43 (6), 1317-23.
24. Brogden, K. A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3 (3), 238-50.
25. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, 415 (6870), 389-95.
26. Liu, Z.; Liu, H.; Liu, X.; Wu, X., Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2008**, 149 (4), 557-61.
27. Infectious Diseases Society of America. Bad Bugs, No Drugs. As Antibiotic Discovery Stagnates. A Public Health Crisis Brews. (2004).
28. Standing Medical Advisory Committee, Sub-Group on Antimicrobial Resistance. The path of least resistance. (1998).
29. WHO: Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2 (2001).
30. WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance - options for action (2012). <http://tinyurl.com/blhxofz>
31. European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency. ECDC/EMA Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. (2009).
32. European Centre for Disease Prevention and Control. Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance. COM 748 (2011).
33. Centers for Disease Control and Prevention. Types of Healthcare-Associated Infections. <http://tinyurl.com/cc47zqq>

34. Centers for Disease Control and Prevention. Healthcare-associated Infections (HAIs) - The Burden. www.cdc.gov
35. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1(8575 - 6), 57 - 58 (1988).
36. 台灣衛生福利部國民健康署-105癌症登記報告 <https://www.hpa.gov.tw>
37. 台灣衛生福利部-106年國人死因統計分析 <https://www.mohw.gov.tw>
38. Hollmann, A.; Martinez, M.; Noguera, M. E.; Augusto, M. T.; Disalvo, A.; Santos, N. C.; Semorile, L.; Maffia, P. C., Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2016**, *141*, 528-536.



附錄



活化胺基酸之反應機構

SPPS 所需儀器設備及其廠商

藥品及設備	購買廠商
Column PD-10 (17-0435-01)	Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA)
自動旋轉器 (Model. SD-50)	揚程儀器 (蘆竹鄉, 桃園縣, 台灣)
抽氣馬達	GAST mech
真空萃取裝置 (SPE Vacuum manifold)	宏濬儀器 (台北市, 台灣)
冷凍乾燥機 (FD3-12P)	Kingmech

SPPS 所需藥品及其廠商

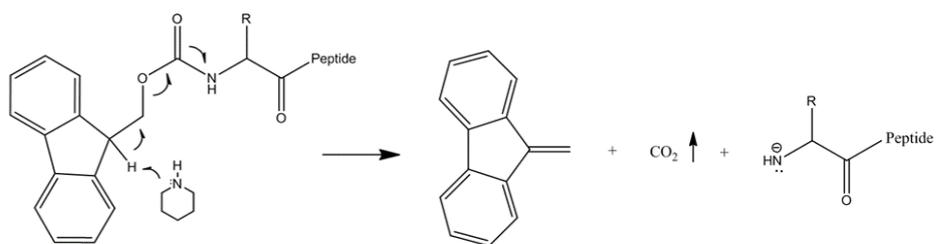
藥品	用途	購買廠商
HOBt	耦合試劑，活化	Scientific
HBTU	耦合試劑，活化	Agene Max
DIEA	耦合試劑，催化	SIGMA
thioanisole	裂解試劑	SIGMA
TFA	裂解試劑，把胜肽從 resin 切除下來	Alfa Aesar - Lancaster
Phenol	裂解試劑	SHOWA, JAPAN
EDT	裂解試劑	MERCK
Ethyl Ether	幫助沉澱胜肽	TEDIA
Rink amide-Knorr Resin	胺基酸固相支撐物	NOVA Biochem. (San Diego, CA, USA)

溶血性分析所使用之藥品、設備與供應廠商

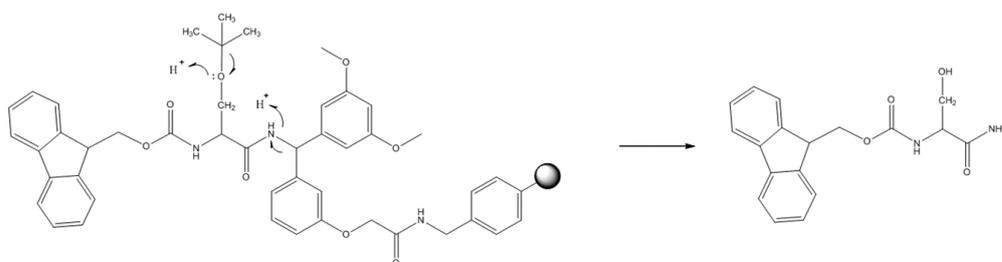
藥品設備	廠商
人體血液	黃詩容、薛向宏 同學提供
PBS	自行製備
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
桌上型微量管高速離心機 (Centrifuge 5415 D)	Eppendorf

SPPS 胺基酸試劑列表

胺基酸	Fmoc 保護基	分子量
Alanine (Ala, A)	Fmoc-Ala-OH	311.30
Cysteine (Cys, C)	Fmoc-Cys (Trt)-OH	585.70
Aspartic acid (Asp, D)	Fmoc-Asp (tBu)-OH	411.50
Glutamic acid (Glu, E)	Fmoc-Glu (tBu)-OH	425.50
Phenylalanine (Phe, F)	Fmoc-Phe-OH	387.40
Glycine (Gly, G)	Fmoc-Gly-OH	297.30
Histidine (His, H)	Fmoc-His (Trt)-OH	619.70
Isoleucine (Ile, I)	Fmoc-Ile-OH	353.40
Lysine (Lys, K)	Fmoc-Lys (Boc)-OH	468.55
Leucine (Leu, L)	Fmoc-Leu-OH	353.40
Methionine (Met, M)	Fmoc-Met-OH	371.50
Asparagine (Asn, N)	Fmoc-Asn (Trt)-OH	596.70
Proline (Pro, P)	Fmoc-Pro-OH	337.40
Glutamine (Gln, Q)	Fmoc-Gln (Trt)-OH	610.70
Arginine (Arg, R)	Fmoc-Arg (Pbf)-OH	648.80
Serine (Ser, S)	Fmoc-Ser (tBu)-OH	383.40
Threonine (Thr, T)	Fmoc-Thr (tBu)-OH	397.50
Valine (Val, V)	Fmoc-Val-OH	339.40
Tryptophan (Trp, W)	Fmoc-Trp-OH	426.50
Tyrosine (Tyr, Y)	Fmoc-Tyr (tBu)-OH	459.60



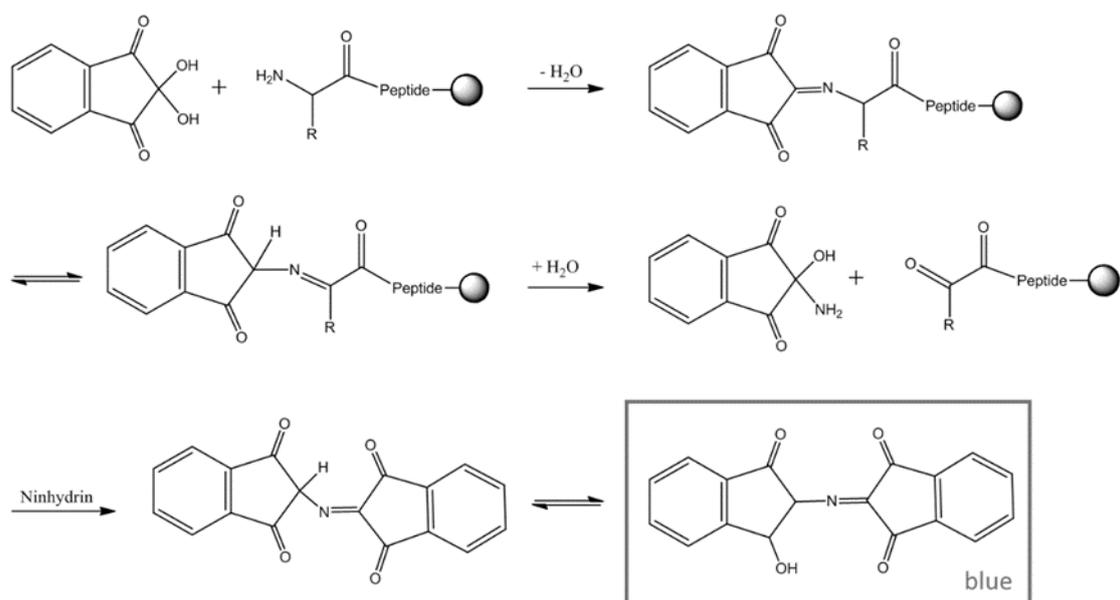
Piperidine 去 N 端保護基 Fmoc 之反應機構



以 TFA 裂解胜肽之反應機構

Ninhydrin 所需試劑及購買廠商

材料、試劑	購買廠商
Ninhydrin	Alfa Aesar
pyridine	Riedel-de Haen
KCN	科成化學 臺偉實業有限公司
n-butanol	J.T.Baker
Phenol	SHOWA, JAPAN



Ninhydrin test 呈色機制

RP-HPLC 所需藥品、設備及其所購廠商

藥品設備	購買廠商
Acetonitrile (ACN)	景明化工 (頭份鎮, 苗栗縣, 台灣)
Trifluoroethanoic acid (TFA)	Alfa Aesar –Lancaster (Ward Hill, MA, USA)
RP-HPLC	Hitachi(Tokyo, Japan)
RP-HPLC column (250 ×10.0 mm, particle size 5 μm, Polaris 5u C-18A, 100 RP-18)	Varian (Palo Alto, CA, USA)
0.22 μm filter	MSI (中和市, 台北縣, 台灣)
微量注射器 (CHA-750RN)	KONTES (Vineland, NJ, USA)
玻璃過濾裝置 (AK95375-00000)	

MALDI-TOF MS 所使用之藥品、設備與所購廠商

藥品設備	購買廠商
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA
Sinapinic acid	Alfa Aesar, UK
MALDI-TOF MS (microflex)	Bruker
ACN	景明化工(頭份鎮,苗栗縣,台灣)
TFA	Alfa Aesar –Lancaster (Ward Hill, MA, USA)

細菌培養及抗菌活性測試時所使用之藥品設備與供應廠商

藥品設備	購買廠商
LB broth 培養基	Merck, Whitehouse Station, NJ, USA
MH broth 培養基	
Ager	伸求企業有限公司
接種環	
L 型玻璃棒	
培養皿	
酒精燈	GeneDirex
96 孔盤	
微量盤分光光譜儀 (VersaMax TM)	Molecular Devices
McFarland Standard	Creative Microbiologicals, Ltd.