

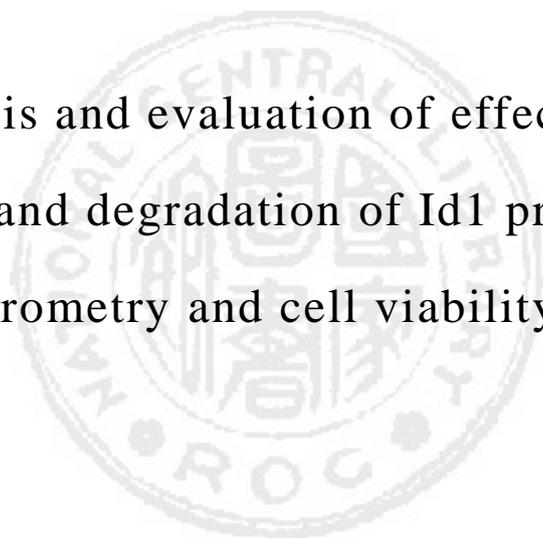
私立東海大學化學系

碩士班論文

指導教授：龍鳳娣 博士

設計、合成胜肽並應用質譜法及細胞活性測試評估其辨識  
及降解 Id1 蛋白質之功效

Design, synthesis and evaluation of effects of peptides on  
recognition and degradation of Id1 protein by mass  
spectrometry and cell viability assay



研究生：楊德倫

中華民國九十九年七月

私立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 楊德倫 君所提之論文

設計、合成胜肽並應用質譜法及細胞活性測試評

估其辨識及降解 Id1 蛋白質之功效

Design, synthesis and evaluation of effects of  
peptides on recognition and degradation of Id1  
protein by mass spectrometry and cell viability assay

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

99 年 7 月 16 日

## 博碩士論文電子檔案上網授權書

(為維護您的權益，請儘速寄回供授權管理用) ID:098THU00065023

本授權書所授權之論文為授權人在東海大學(學院)化學系系所\_\_\_\_\_組98學年度第二學期取得碩士學位之論文。論文題目：設計、合成胜肽並應用質譜法及細胞活性測試評估其辨識及降解Id1蛋白質之功效指導教授：龍鳳娣,Feng-Di Lung

茲同意將授權人擁有著作權之上列論文全文(含摘要)，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印，此項授權係非專屬、無償授權國家圖書館及本人畢業學校之圖書館，不限地域、時間與次數，以微縮、光碟或數位化方式將上列論文進行重製，並同意公開傳輸數位檔案。

上列論文為授權人向經濟部智慧財產局申請專利之附件或相關文件之一(專利申請案號：\_\_\_\_\_)，請於\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日後再將上列論文公開或上載網路。因上列論文尚未正式對外發表，請於2014年07月01日後再將論文數位化檔案上載網路公開。不同意授權。授權人：楊德倫親筆簽名及蓋章：楊德倫  民國99年7月22日身分證字號：J121739407電話：0910637537

傳真：

聯絡地址：桃園縣中壢市華勳街163巷20之1號E-Mail：date0110@yahoo.com.tw

廣告回信

台灣北區郵政管理局登記證

北台字第13611號

100 - 01

國家圖書館閱覽組收

台北市中山南路20號

博碩士論文電子  
全文授權書專用

沿線折疊成明信片尺寸後，請以透明膠帶貼此側寄出

寄

私立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 楊德倫 君所提之論文

設計、合成胜肽並應用質譜法及細胞活性測試評估其  
辨識及降解 Id1 蛋白質之功效

Design, synthesis and evaluation of effects of peptides  
on recognition and degradation of Id1 protein by mass  
spectrometry and cell viability assay

論文口試委員會 召集人 何之 (簽章)

委員 陳暉  
駱怡秀  
龍孔祥

中華民國 99 年 7 月 16 日

## 目錄

## 頁次

1. 摘要 .....	1
2. Id蛋白質 .....	3
3. Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA ; Ironbabe).....	8
4. 胜肽設計 .....	10
5. 固相胜肽合成 .....	11
6. 高效能液相層析儀 .....	19
7. 基質輔助雷射脫附游離法-時間飛行管柱 質譜儀 .....	22
8. 蛋白質電泳 .....	29
9. 細胞繼代培養及存活率測試 .....	33
10. 實驗結果與討論 .....	37
11. 總結 .....	70
12. 後續工作 .....	71
13. 參考文獻 .....	72
14. 附錄 .....	77

## 圖目錄

圖1、Id蛋白質抑制DNA分化基因的轉錄示意圖.....	3
圖2、Id蛋白參與細胞調節及細胞週期.....	5
圖3、Peptide 3C對人類乳癌細胞MCF-7進行細胞活性測試的結果.....	6
圖4、Peptide 3C對人類大腸直腸癌細胞HT-29進行細胞活性測試的結果.....	6
圖5、Peptide 3C對人類上皮細胞HS-68進行細胞活性測試的結果.....	7
圖6、Ironbabe與蛋白質作用不同時間之蛋白質電泳的結果.....	9
圖7、Ironbabe降解蛋白質的機轉.....	9
圖8、市售ProFund™ Protein Interaction Mapping Kit的結構.....	10
圖9、Peptide 3C結構.....	12
圖10、Peptide DIB1結構.....	12
圖11、Peptide DIB2結構.....	12
圖12、Peptide DIB3結構.....	12
圖13、SPPS流程圖.....	15
圖14、SPPS裂解反應流程圖.....	15
圖15、去Fmoc保護基反應機構.....	16
圖16、DIEA催化反應並以HOBT及HBTU活化胺基酸反應機構.....	16
圖17、胺基酸合成在固相支持物上反應機構.....	16
圖18、TFA裂解反應機構.....	17
圖19、具有Fmoc保護基的resin.....	17
圖20、不具moc保護基的resin.....	18
圖21、Nihydrin test成色機制.....	18
圖22、MALDI-TOF MS 之簡圖.....	25
圖23、活細胞代謝產生formazan之反應圖.....	36
圖24、應用RP-HPLC分析peptide 3C粗產物.....	38
圖25、應用MALDI-TOF MS鑑定經RP-HPLC分析純化後之peptide 3C.....	39
圖26、應用RP-HPLC分析peptide 3C.....	39

圖 27、應用 RP-HPLC 分析 peptide DIB1 粗產物 .....	40
圖 28、應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 peptide DIB1 ....	40
圖 29、應用 RP-HPLC 分析 peptide DIB2 粗產物 .....	41
圖 30、應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 peptide DIB2 ....	41
圖 31、應用 RP-HPLC 分析 peptide DIB2 .....	42
圖 32、peptide DIB3 合成步驟流程圖 .....	43
圖 33、peptide DIB3 的合成反應機構 .....	44
圖 34、應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成純化後之 peptide DIB3 .....	45
圖 35、利用 BCA assay 測定 peptide DIB3 的含量 (1) .....	45
圖 36、利用 BCA assay 測定 peptide DIB3 的含量 (2) .....	46
圖 37、應用 MALDI-TOF MS 鑑定 Id1 功能區塊蛋白質 .....	47
圖 38、利用 BCA assay 測定 Id1 功能區塊蛋白質的含量 (1) .....	47
圖 39、利用 BCA assay 測定 Id1 功能區塊蛋白質的含量 (2) .....	48
圖 40、ESI-IT 清潔維護訊號 .....	49
圖 41、應用 ESI – IT MS 正/負電荷模式鑑定 peptide DIB1 與鐵(III)離子螯合的 結果 .....	52
圖 42、應用 ESI – IT MS 正電荷模式鑑定 peptide DIB1 與鐵(III)離子螯合的結 果 (1) .....	52
圖 43、5 $\mu$ M 胜肽濃度與 50 $\mu$ M 鐵(III)離子濃度的 ESI-IT MS 質譜圖 .....	53
圖 44、應用 ESI – IT MS 正電荷模式鑑定 peptide DIB1 與鐵(III)離子螯合的結 果 (2) .....	54
圖 45、應用 ESI – IT MS 正電荷模式鑑定 peptide DIB1 銅(II)離子螯合的結果 .....	55
圖 46、5 $\mu$ M 胜肽濃度與 50 $\mu$ M 銅(II)離子濃度的 ESI-IT MS 質譜圖 .....	56
圖 47、降解蛋白質實驗流程圖 .....	58
圖 48、利用牛血清白蛋白 (BSA) 測試 peptide DIB1 的降解蛋白質效力 .....	59
圖 49、應用 MALDI-TOF MS 以 High mass 模式鑑定螯合金屬離子的 peptide DIB1 與 BSA 反應結果 .....	60

圖 50、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5_20 kDa 模式鑑定混合不同濃度鐵(III)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質反應的結果.....	62
圖 51、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5_20 kDa 模式鑑定混合不同濃度銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質反應的結果.....	63
圖 52、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5_20 kDa 模式鑑定 peptide DIB3 與 Id1 功能區塊蛋白質反應的結果.....	64
圖 53、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5_20 kDa 模式鑑定分別螯合鐵(III)、銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後的結果.....	65
圖 54、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 HighMass 模式鑑定分別螯合鐵(III)、銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後以及 peptide DIB3 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後的結果.....	66
圖 55、tachpyridine 結構.....	68
圖 56、tachpyridine 對人類乳癌細胞 SUM 149 細胞株做 MTT assay 測試細胞存活率.....	68
圖 57、未螯合金屬離子的 peptide DIB1 對人類乳癌細胞 MCF-7 細胞株的細胞存活率測試.....	69

## 表目錄

表一、可抑制 Id 基因表現進而抑制乳癌細胞存活率的結果.....	4
表二、以 MyoD 為模板設計之胜肽類緣物.....	6
表三、peptide 3C 對其他癌細胞的進行細胞活性測試的結果.....	7
表四、設計合成的胜肽序列及預估分子量.....	11
表五、胜肽合成所需之材料、設備及購買廠商.....	13
表六、Nihydrin test 實驗材料及購買廠商.....	18
表七、高效能液相層析所需之材料、設備及購買廠商.....	20
表八、RP-HPLC 純化胜肽移動相分配比例.....	21
表九、常用的 MALDI 基質之結構.....	24
表十、蛋白質電泳所需之材料、設備及購買廠商.....	29
表十一、Acrylamide : Bis 的下膠配製.....	30
表十二、Acrylamide : Bis 的上膠配製.....	30
表十三、sample buffer 配製.....	31
表十四、running buffer 配製.....	31
表十五、染劑 CBR-250 solution 配製.....	32
表十六、退染劑配製.....	32
表十七、細胞培養相關實驗之藥品、試劑、設備及購買廠商.....	33
表十八、實驗總流程.....	37
表十九、實驗之胜肽的純化與鑑定.....	38
表廿、ESI-IT MS 常見的干擾訊號.....	50
表廿一、peptide DIB1 螯合鐵(III)離子 ESI-IT 測試訊號推測.....	52
表廿二、銅(II)離子 ESI-IT 測試訊號推測.....	55
表廿三、利用照膠系統量化 BSA 的殘存量.....	60
表廿四、分別螯合鐵(III)、銅(II)離子的peptide DIB2與Id1功能區塊蛋白質 以及BSA反應後，以及peptide DIB3與Id1功能區塊蛋白質以及BSA反應後的 結果的訊號面積積分.....	67

## 1. 摘要

Id蛋白質是一負調控DNA轉錄的蛋白質，其過度表現會導致腫瘤的形成或腫瘤轉移。Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)是一EDTA螯合鐵(III)離子之化合物，其氧化還原反應具有降解DNA、RNA及蛋白質的能力。以EDTA為模板，設計、合成胜肽(peptide DIB1、peptide DIB2及peptide DIB3)，應用質譜法評估peptide DIB2、peptide DIB3辨識及降解蛋白質之功效。螯合及降解結果顯示，peptide DIB1不但具有螯合鐵(III)、銅(II)離子之能力，也具有降解蛋白質的能力；而peptide DIB2也具有降解Id1蛋白質的功能。在同樣金屬離子濃度下，螯合銅(II)離子的peptide DIB2及peptide DIB1降解蛋白質之效果最佳；螯合鐵(III)離子之peptide DIB3降解蛋白質之能力比螯合同樣鐵(III)離子濃度peptide DIB2降解蛋白質的能力要低。再以細胞活性測試評估peptide DIB1對於MCF-7細胞株於生理條件上的抑制能力，初步結果顯示並無抑制效果。peptide DIB1具有降解之功效，而peptide DIB2也具有專一性，可能是peptide DIB1之胺基酸序列不會影響前導胜肽的活性，並且藉由螯合銅(II)離子達到更佳之降解蛋白質的功效。

## 關鍵字

Id1蛋白質、Ferric nitrilotriacetate、Fe-NTA、胜肽螯合金屬、降解蛋白質、鐵的螯合劑、銅離子

## Abstract

Overexpression of Id proteins which are negative regulators of DNA transcription results in the invasion and Metastasis of tumors. Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), a complex of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) chelated with the iron (III) ion, exhibited the effect of degradation of Id1 protein by redox reaction. We designed a series of peptides (peptides DIB1, DIB2, and DIB3) on the basis of the structure of EDTA, synthesized these peptides by solid phase peptide synthesis, and evaluated effects of these peptides on recognition and degradation of Id1 protein by mass spectrometry and cell viability assay. Results of the chelation and degradation experiments showed that peptide DIB1 not only chelated with the iron (III) ion and the copper (II) ion, but also degraded protein such as bovine serum albumin (BSA). Peptide DIB2 recognized and degraded the Id1 protein. When chelated with the copper (II) ion, peptides DIB1 and DIB2 exhibited stronger degradation effect on protein than the effect of those chelated with the iron (III) ion. The effect of peptide DIB3 chelated with the iron (III) ion on degradation of Id1 protein was lower than the effect of peptide DIB2 which chelated with the iron (III) ion at the same concentration. Furthermore, peptide DIB1 was assayed for its *in vitro* activity in human breast cancer cells MCF-7. Results showed that peptide DIB1 did not exhibit the antiproliferative effect in MCF-7 cancer cells. Taken together, peptide DIB1 had the effect of degradation on protein and peptide DIB2 can degrade Id1 protein specifically. We suggest that the amino acid sequence of peptide DIB1 would not affect the interactions between peptide 3C and Id1 protein, rather, it exhibited stronger degradation effect on Id protein when it was chelated with the copper (II) ion.

## Keywords :

Id1 protein 、 Ferric nitrilotriacetate 、 Fe-NTA 、 degradation of protein 、 copper 、 iron chelators

## 2. Id蛋白質

鹼性的螺旋-環-螺旋(Basic helix-loop-helix) 蛋白結構在細胞增生及細胞分化中扮演重要的轉錄因子的角色。包含此類結構的蛋白已經過證實存在於脊椎及無脊椎動物的各種組織中。包含鹼性的螺旋-環-螺旋的蛋白質之主要功能區域包括兩個雙極性的螺旋結構，並含有許多個鹼性胺基酸序列，這兩個螺旋結構分別座落於環(loop)的兩端<sup>1</sup>，而鹼性胺基酸的主要功能則是與E-box DNA結合，進而促進目標基因的轉錄，螺旋-環-螺旋區塊則會與另一包含鹼性的螺旋-環-螺旋之蛋白形成雙聚合體結構(圖1)。一般來說具有組織特異性的B型bHLH蛋白質會與A型的bHLH蛋白質形成聚合而促使細胞趨向特殊目的<sup>2</sup>，例如骨骼肌的發展是由MyoD，Myf-5，myogenin及MRF4共同參與形成聚合結構，進而控制哺乳動物的肌肉組織發展<sup>3,4</sup>。此外bHLH蛋白質也扮演調控細胞分化的功能性結構因子的角色。

Id基因所轉譯的Id蛋白質分成四大類，分別為Id1、Id2、Id3、Id4，具有螺旋-環-螺旋(helix-loop-helix)蛋白結構，會與bHLH蛋白質形成雙聚合體並且抑制細胞分化，屬於負調節因子；其調節機制是與標的bHLH蛋白質形成高親和性的雙異構聚合體進而阻止bHLH蛋白質與另一組織特異性bHLH形成雙聚合體而抑制了DNA分化基因的轉錄<sup>5</sup>(圖1)。

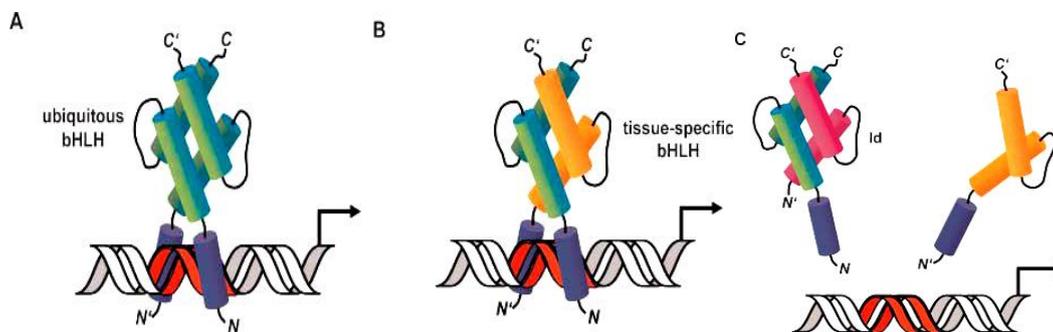
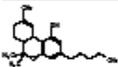
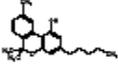
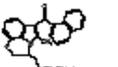
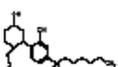
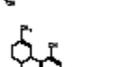
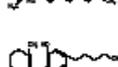


圖1、Id蛋白質抑制DNA分化基因的轉錄示意圖<sup>5</sup>。(A) A型bHLH蛋白質與A型bHLH蛋白質雙聚合體，DNA進行分化基因的轉錄。(B) A型bHLH蛋白質與有組織特異性的B型bHLH蛋白質雙聚合體，DNA進行分化基因的轉錄。(C) A型bHLH蛋白質與Id蛋白質雙聚合體，抑制DNA分化基因的轉錄。

越來越多研究顯示Id蛋白質的過度表現與腫瘤生長或轉移的關係非常密切，其中有研究報告Id1蛋白質在胰臟癌細胞中有過度表現，但是在正常的胰腺細胞很少發現Id1蛋白質的蹤跡。由此歸類出Id蛋白質的過度表現應會導致腫瘤的形成，甚至在其他的研究中指出胚胎的中樞神經統以及血管的形成，Id蛋白質扮演著一重要且關鍵的角色<sup>6</sup>。另外，有關子宮內膜細胞、癌乳癌細胞與Id1蛋白質過度表現的關係與組織切片的研究論文亦在2000及2001年發表<sup>7,8</sup>。

除此之外亦有論文顯示腫瘤組織中Id 2、3和4蛋白的高度表現擁有正相關性。有些研究顯示，若抑制腫瘤細胞的Id蛋白的DNA表現則腫瘤細胞將形成自殺現象，此類研究是利用Id的反模板DNA而達到有效抑制的結果(表一)<sup>9</sup>。

表一、可抑制Id基因表現進而抑制乳癌細胞存活率的結果<sup>9</sup>

	Compound	MDA-MB231	MDA-MB436
	Δ <sup>9</sup> -THC	1.2 (1.0-1.4)	2.5 (1.8-3.4)
	CBN	1.2 (0.9-1.5)	2.6 (1.8-3.7)
	WIN55,212-2	1.7 (1.5-2.2)	2.4 (1.6-3.4)
	CP55,940	2.5 (1.5-4.1)	1.3 (0.7-1.6)
	CBD	1.3 (1.0-1.9)	1.6 (1.1-2.2)
	CBG	2.3 (2.1-2.5)	2.1 (1.5-3.0)

NOTE: Cells were treated with cannabinoid compounds for 3 d and the IC<sub>50</sub> values for the antiproliferative effects of the compounds were calculated. Data are the means and corresponding 95% confidence limits of at least three experiments. IC<sub>50</sub> values are reported in μmol/L.

Id蛋白質已經被認為與致癌基因(oncogene)有互相影響的關係，一般認為當致癌基因被啟動時Id扮演著不可或缺的角色<sup>10-12</sup> (圖2)，之前的學者研究同時轉殖Id gene與Bcl-2 gene或是只單一轉殖Id gene都會讓細胞走向腫瘤或是變異途徑。另外，也有研究顯示若剷除Id家族的基因或是抑制Id基因之後，

將使得腫瘤細胞變得脆弱或是失去了腫瘤轉移的機轉<sup>6</sup>。有學者指出Id蛋白質透過使retinoblastoma protein失去活性，因而增加telomerase的活性或使p53所調節的DNA damage系統受到損害。而在很多臨床組織或細胞實驗中顯示Id蛋白質在許多腫瘤中的表現量很高，而相對的正常細胞或組織的Id蛋白質的表現量較少，主要Id蛋白質被認為是細胞週期路徑中的下游分子而且其機轉被定義成蛋白-蛋白之間的交互作用。所以很多報告指出抑制Id蛋白質的表現量以及減少Id gene的表現可以降低腫瘤細胞的血管增生作用(vascularization)以及抑制腫瘤的轉移<sup>10,13</sup>。

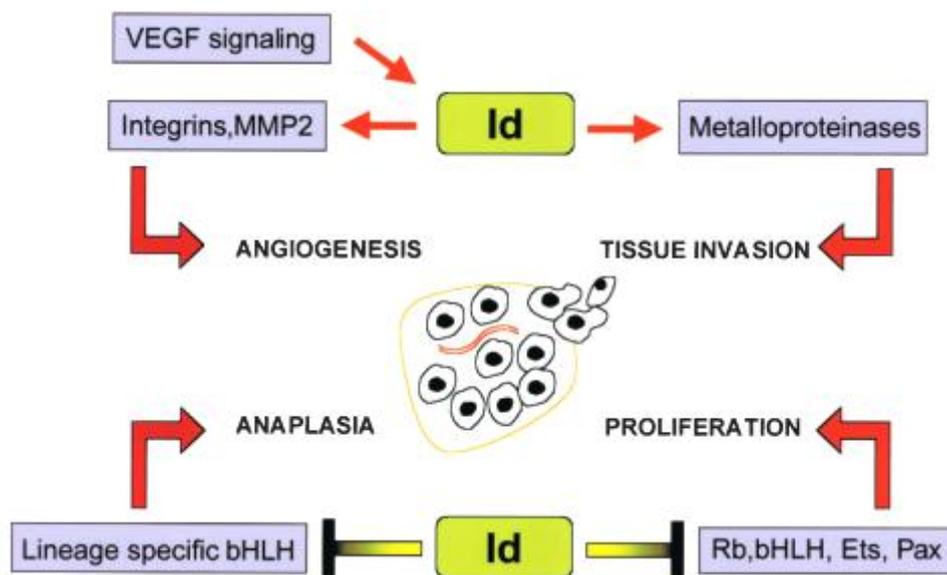


圖2、Id蛋白質參與細胞調節及細胞週期<sup>11,12</sup>

目前的研究中，本實驗室於2010年發表以MyoD為模板的胜肽類緣物(表二)，其中peptide 3C促使HT-29(圖3)、MCF-7(圖4)與部分癌細胞(表三)走向凋亡的效果最好；並證明對於正常的上皮組織細胞不會具有影響<sup>14</sup>(圖5)。因此，選用peptide 3C作為lead peptide。

表二、以 MyoD 為模板設計之胜肽類緣物<sup>14</sup>

	basic region	helix 1	loop	helix 2
MyoD	NADRRKAATMRERRR	LSKVNEAFETLKRST	SSNPNQRLP	KVEILRNAI RYIEGLQALLRDQ
(1A)	H-Asn-Ala-Asp-Arg-Arg-Lys-Ala-Ala-Thr-Met-Arg-Glu-Arg-Arg-NH <sub>2</sub>			
(2A)	H-Leu-Ser-Lys-Val-Asn-Glu-Ala-Phe-Glu-Thr-Leu-Lys-Arg-Ser-Thr-NH <sub>2</sub>			
(3A)	H-Lys-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Ala-Ile-Arg-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-NH <sub>2</sub>			
(3B)	H-Leu-Arg-Asn-Ala-Ile-Arg-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-Cys-NH <sub>2</sub>			
(3C)	H-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-Cys-NH <sub>2</sub>			
(3D)	H-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-NH <sub>2</sub>			

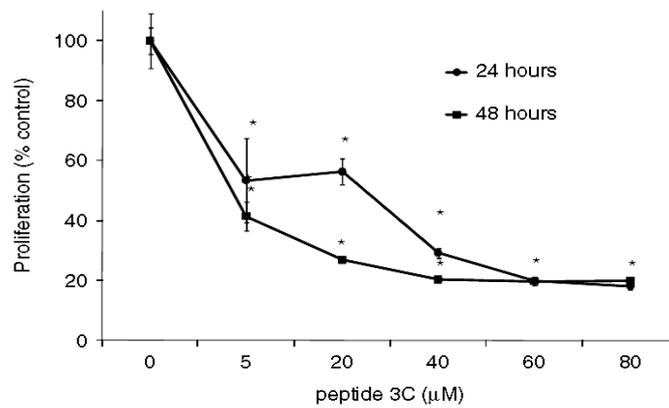


圖 3、Peptide 3C 對人類乳癌細胞 MCF-7 進行細胞活性測試的結果。Peptide 3C 濃度分別為 80、60、40、20、5 以及 0 μM，分別作用 24 及 48 小時<sup>14</sup>。

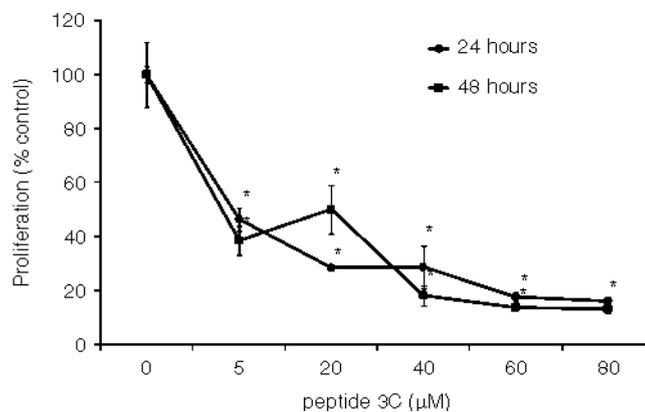


圖 4、Peptide 3C 對人類大腸直腸癌細胞 HT-29 進行細胞活性測試的結果。Peptide 3C 濃度分別為 80、60、40、20、5 以及 0 μM，分別作用 24 及 48 小時<sup>14</sup>。

表三、peptide 3C 對其他癌細胞的進行細胞活性測試的結果<sup>14</sup>

Peptide	IC <sub>50</sub> (μM)				
	HL-60 <sup>a</sup>	HCT116 <sup>b</sup>	Hep 3B <sup>c</sup>	H226 <sup>d</sup>	A498 <sup>e</sup>
<b>3A</b>	30 μM ± 4.1	23.9 μM ± 4.6	>30 μM (81.3 ± 2.6)	>30 μM (64.2 ± 3.7)	>30 μM (82.7 ± 2.6)
<b>3C</b>	30 μM ± 5.5	30 μM ± 2.8	>30 μM (103.4 ± 1.7)	>30 μM (104.9 ± 3.6)	>30 μM (91.3 ± 0.9)

All the cancer cells were treated with the peptides **3A** and **3C** separately for 48 h, and then their inhibitory effects on the proliferation of the peptide-treated cells were analyzed using the MTT assay. Data are the mean value ± SD of three independent experiments,  $p < 0.01$  compared with control.

<sup>a</sup> HL-60, leukemia cells.

<sup>b</sup> HCT116, colon cancer cells.

<sup>c</sup> Hep 3B, hepatoma cancer cells.

<sup>d</sup> NCI-H226, non-small-lung cancer.

<sup>e</sup> A498, renal cancer cells.

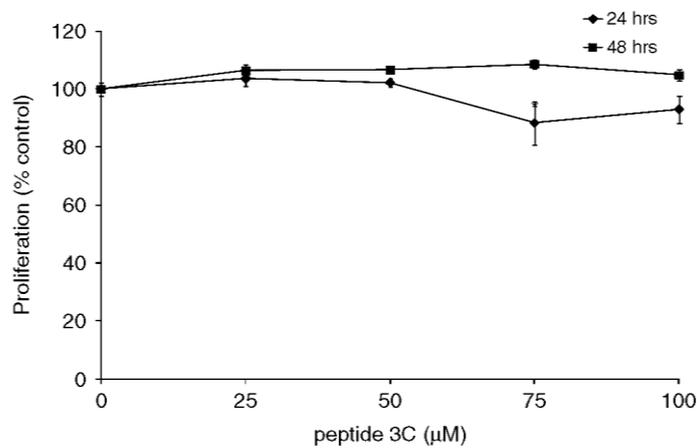


圖 5、Peptide 3C 對人類上皮細胞 HS-68 進行細胞活性測試的結果。Peptide 3C 濃度分別為 100、75、50、25、5 以及 0 μM，分別作用 24 及 48 小時<sup>14</sup>。

### 3. Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA ; Ironbabe)

一般降解/破壞蛋白質的方式多用酵素作用，亦可以用自由基反應。自由基的形成有以下幾種方式<sup>15</sup>：

- (1)藉由能量撞擊或/並吸收一特定能量，產生自由基；其能量分成
  - a. 高能量的光能或離子光束
  - b. 紫外線(UV)
  - c. 對光子敏感並照射可見光
  - d. 有機分子的熱裂解
- (2)藉電子轉移反應(氧化還原反應)，產生自由基；電子轉移方式分為
  - a. 過度金屬離子催化
  - b. 酵素催化

其中，本實驗以氧化還原反應的角度，進行文獻搜索，發現於 1990 年開始，一系列以 Fe-NTA 為具降解能力之酵素實驗，並應用於 DNA、RNA 及蛋白質的降解蛋白質實驗上<sup>16-18</sup>，在這些文獻中證明了 Ironbabe 的確具有如同酵素一般之降解蛋白質能力<sup>18</sup>，從文獻中，作用不同時間的降解蛋白質的蛋白質電泳實驗中，推測 Ironbabe 可能具有一固定降解位置(如圖 6)。

早期文獻中推測 Fe-NTA 在降解蛋白質的反應機轉為：EDTA 螯合的鐵(III)離子與過氧化氫反應，產生自由基反應<sup>19</sup>(如圖 7)，破壞胜肽鍵結，達到降解，再以維生素 C (ascorbic acid)還原所螯合之鐵(III)離子後，再繼續反應。其中，過氧化氫的重要性於 2003 年被證實<sup>16</sup>。而進一步將 Fe-NTA 應用於活體老鼠實驗時，發現 Fe-NTA 會對於腎臟造成傷害<sup>20</sup>。

實驗所用之 Fe-NTA 為市售之商品，商品名為 Ironbabe，而實驗目的以設計一類似 EDTA 之胜肽，進而模仿 Fe-NTA，探討所設計之胜肽是否具有如同 Ironbabe 的降解功能，並將所設計之功能胜肽與前導標靶胜肽結合，探討是否會增加其降解蛋白質之選擇性。

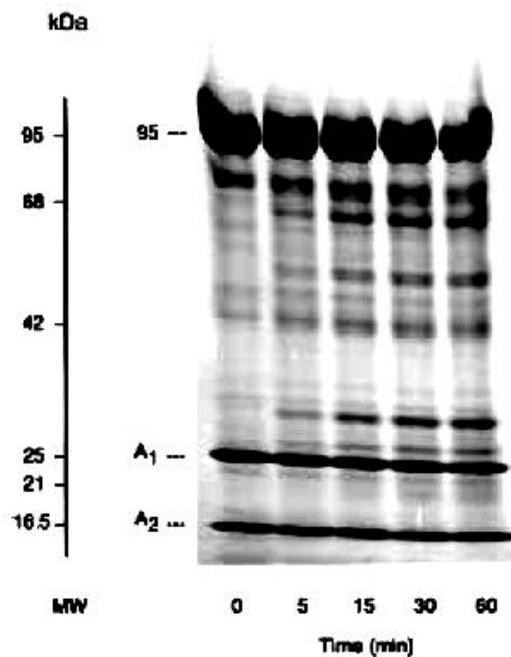


圖 6、Fe-NTA 與蛋白質作用不同時間之蛋白質電泳的結果<sup>18</sup>。

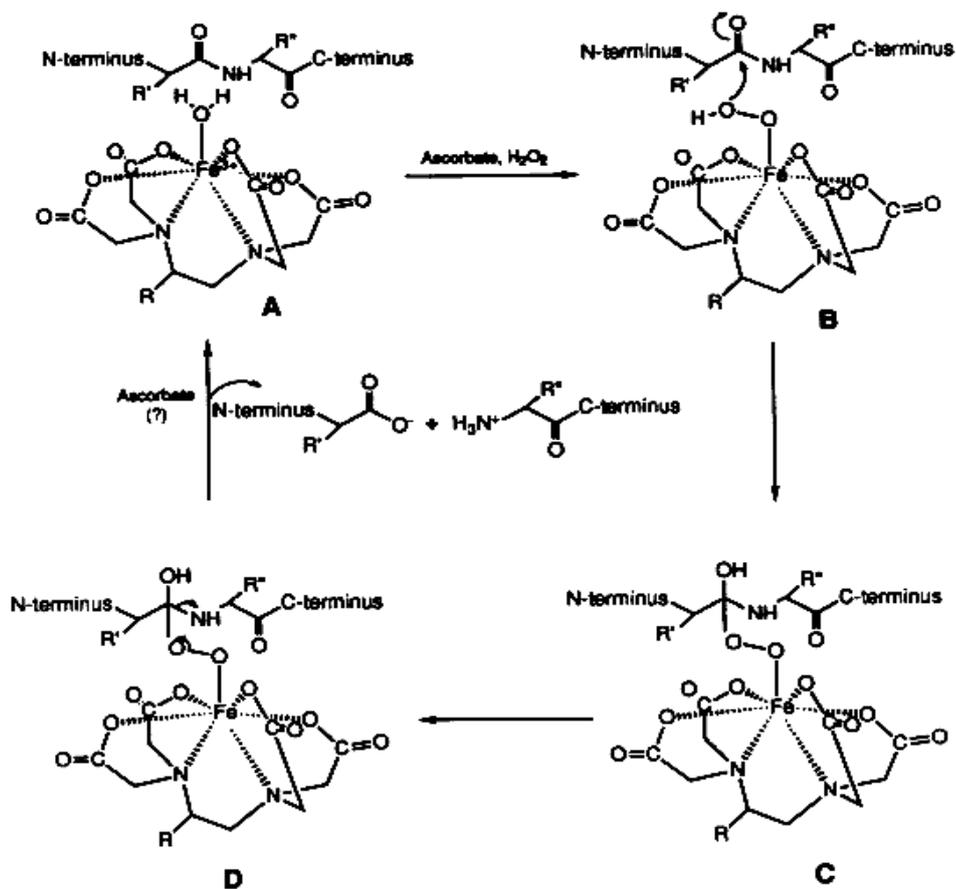


圖 7、Fe-NTA 降解蛋白質的機轉<sup>19</sup>。

#### 4. 設計胜肽

根據市售 ProFund™ Protein Interaction Mapping Kit<sup>21</sup> 的分子主結構，如圖 8，顯示其結構為 EDTA(ethylenediaminetetraacetate)及三價鐵離子。EDTA 具有四個羧基(-COOH)，包含結構上兩個 N 原子，一般認為是具有六牙基之分子；為此，本實驗以 EDTA 的四個羧基為模板，設計一具有四個羧基的功能胜肽序列，功能胜肽序列中四個羧基來源分別為 glutamic acid 及 aspartic acid，鑑於 EDTA 的四個羧基需互相接近，以利螯合金屬離子，因此功能胜肽序列中加入 proline 以符合 EDTA 彎曲之結構。

功能胜肽序列的四個羧基環抱、螯合金屬離子時，由於功能胜肽序列上的羧基對於螯合金屬離子有遠近距離的問題，而且 EDTA 本身為對稱之分子，因此將功能胜肽序列設計為對稱之序列，並將側鏈較長之 glutamic acid 置於較遠的兩端，排列順序為 EDPDE；考慮未來環化之可能性，而將 Cystein 置入序列中，所以設計之線性胜肽序列為 CEDPDEC。進一步以固相胜肽合成法合成所設計之功能胜肽序列、前導標靶胜肽序列、複合功能胜肽的前導標靶胜肽序列。

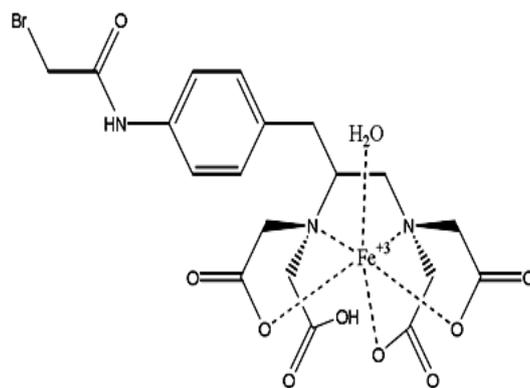


圖 8、市售 ProFund™ Protein Interaction Mapping Kit 的結構<sup>21</sup>。

## 5. 固相胜肽合成法合成胜肽(solid phase peptide synthesis ; SPPS )

本實驗室使用 1963 年 Merrifield 所發表的固相胜肽合成法<sup>22</sup>，來合成胜肽；將目標合成胜肽的 C 端第一個胺基酸與帶有特定官能基的固體小珠粒 (resin) 以胜肽鍵鍵結，並藉此固著在小珠粒上，如此便可以用簡單過濾的方式來沖洗並除去過剩反應物及 side products，而不需額外的分離純化；合成出的胜肽在清洗純化過程中不會有損失，最後便可達成自動化合成的目標，稱為「固相胜肽合成法」。實驗室的胜肽合成並應用 Fmoc 化學<sup>23</sup>，帶有目標合成胜肽 C 端的一個胺基酸的固體小珠粒，其胺基酸 N 端具有 Fmoc 保護基，將其 Fmoc 保護基去掉，再以胜肽鍵鍵結 C 端第二個胺基酸，如此重複之，即可得一線性的固相胜肽；其合成的胜肽序列如表四。

表四、設計合成的胜肽序列及預估分子量

命名	胜肽序列	預估分子量(Da)
Peptide 3C <sup>a</sup> (前導標靶胜肽)	YIEGLQALLRDQC (圖 9)	1520.7
Peptide DIB1 (功能胜肽)	CEDPDEC (圖 10)	808.77
Peptide DIB2 (前導標靶胜肽 複合功能胜肽)	YIEGLQALLRDQCEDPDEC (圖 11)	2209.33
Peptide DIB3 (前導標靶胜肽 複合 Ironbabe)	YIEGLQALLRDQC   CH <sub>2</sub>   S   Fe(III)-NTA (圖 12)	1958

<sup>a</sup> 參考文獻 14



圖 12、Peptide DIB3 結構示意圖

### 5-1 固相胜肽合成實驗材料

固相胜肽合成之材料與設備之相關資料整理於表五。

表五、胜肽合成所需之材料、設備及購買廠商

材 料	備 註	購買廠商
Rink amide resin	胺基酸之固著物	NOVA Biochem.
具 N $\alpha$ -Fmoc 保護基的氨基酸	N 端具 Fmoc，側鏈具保護基之胺基酸	ANA SPEC
HBTU ( O-Benzotriazol -1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate)	活化胺基酸 C 端之試劑	
HOBt (1-hydroxybenzotriazole)	(Coupling reagents)	
DIEA (N,N-Diisopropylethamine)		SIGMA
DMF (N,N-dimethylformamide)	溼潤 resin	ECHO Chemical Company
Piperidine	去除胺基酸 N 端 Fmoc	
DCM (Dichloromethane)	膨大 resin	
TFA (Trifluoroacetic acid)	將合好之胜肽由 resin 切下	Alfa Aesar -Lancaster
Column PD-10 (17-0435-01)	反應針筒	Amersham Biosciences
設 備		購買廠商
自動旋轉器 (Model. SD-50)		Young chenn
真空萃取裝置 (SPE Vacuum manifold)		Great tide
冷凍乾燥機 (FD3-12P)		Kingmech

## 5-2 實驗方法

首先，先將 Rink amide resin 上  $N\alpha$ -Fmoc 保護基去除：於含有 Rink amide resin 的反應針筒內加入 5 ml 的 30% Piperidine/ DMF 混合反應 20 分鐘，重複三次；再加入 5 ml DMF，混合反應 5 分鐘，重複四次，而後將目標序列 C 端第一個具有支鏈保護 (side-chain protected) 的 Fmoc-amino acid ( 2 equivalent) 利用連結劑 ( 2 equivalent of HBTU + 2 equivalent of HOBT + 2 equivalent of DIEA) 結合至 Rink amide resin (1 equivalent) 上，再將結合至 Rink amide resin 之第一個具支鏈保護的 Fmoc-amino acid 的 N 端 Fmoc 保護基利用去保護基試劑 (30% piperidine in DMF) 除去，清洗 (5 ml DMF)，並利用連結劑接上目標序列 C 端第二個具有支鏈保護的 Fmoc-amino acid，重複上述之結合反應，將其餘每一個具支鏈保護 (side-chain protected) 之 Fmoc-amino acid 依序結合至 resin 上，並於 Rink amide resin 上每多五個胺基酸，就於合成流程上多加一次加入 5 ml 的 30% Piperidine/ DMF 混合反應 20 分鐘之流程，得到 Fmoc-aa<sub>1</sub>(protecting group)-aa<sub>2</sub>(protecting group)-aa<sub>3</sub>(protecting group)-...-aa<sub>n</sub>(protecting group)-Rink amide resin, n 代表胜肽中胺基酸 (aa=amino acid) 之位置，見圖 13。最後利用裂解劑 (TFA/H<sub>2</sub>O) 將胜肽 aa<sub>1</sub>-aa<sub>2</sub>-aa<sub>3</sub> ---aa<sub>n</sub> 與 Rink amide resin 裂解分離。胜肽混合液用氮氣 (N<sub>2</sub>) 吹去後呈黏稠狀見圖 14，加冰乙醚沉澱出白色固體即是胜肽粗產物，需要進一步由 RP-HPLC 純化。

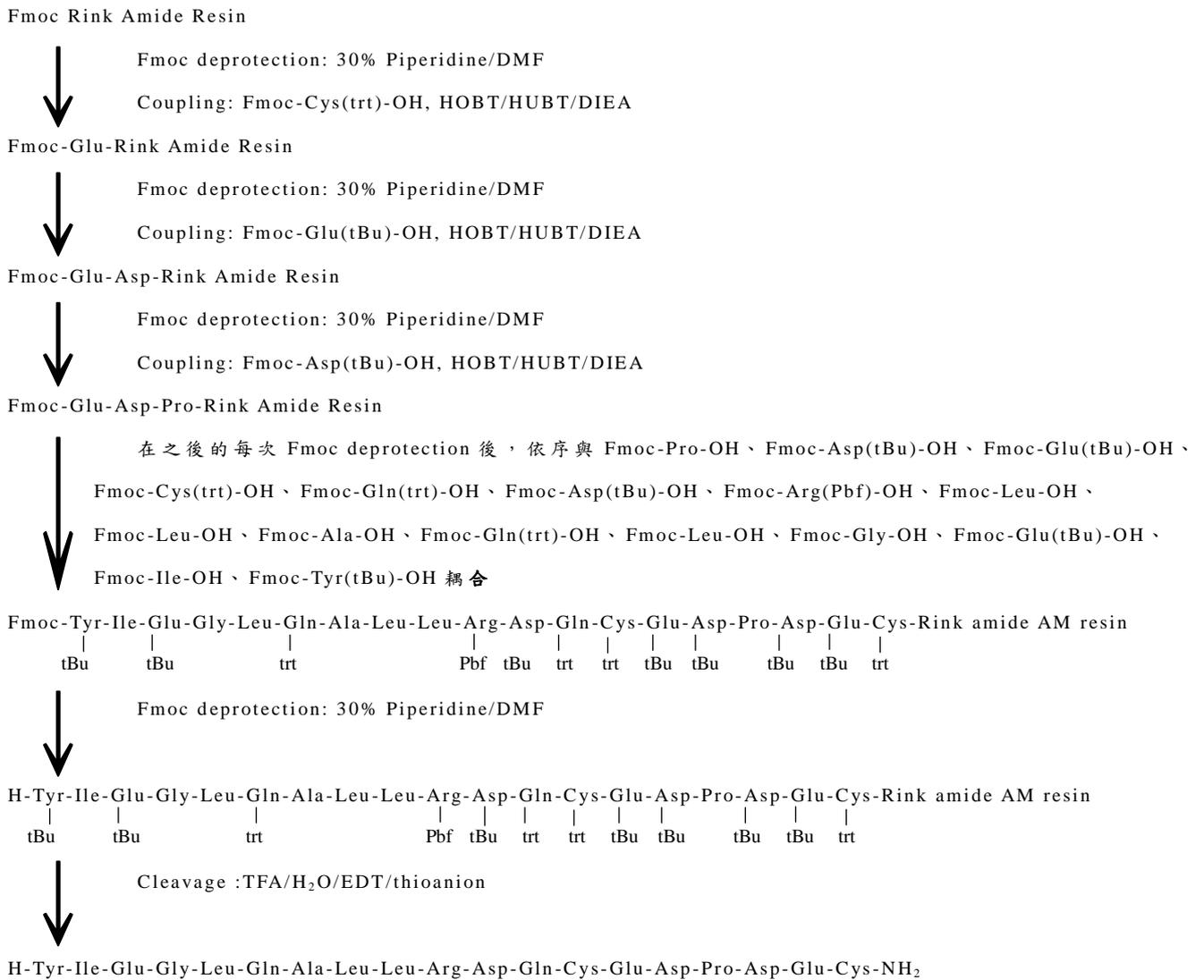


圖 13、SPPS 流程圖(以合成 peptide DIB2 為例)

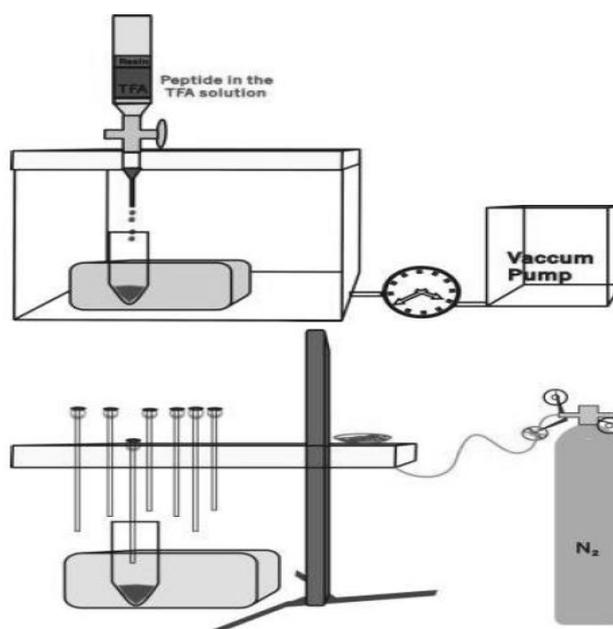


圖 14、SPPS 裂解反應流程圖

### 5-3 反應機構

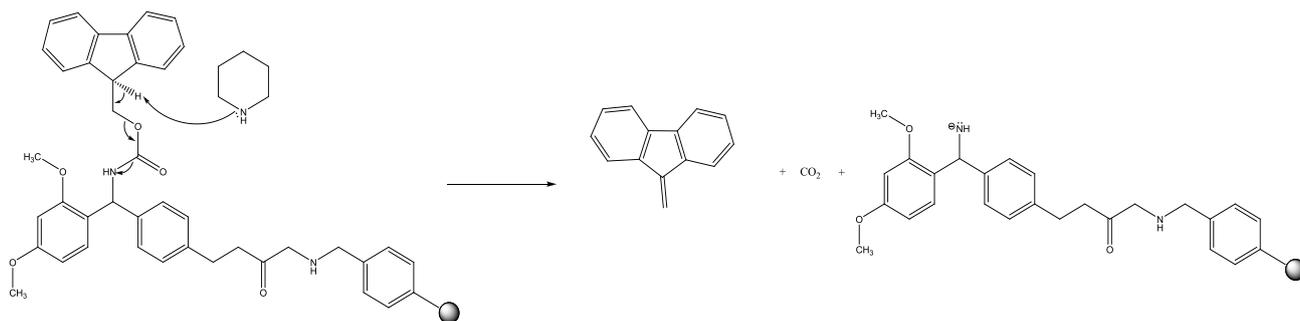


圖 15、去 Fmoc 保護基反應機構

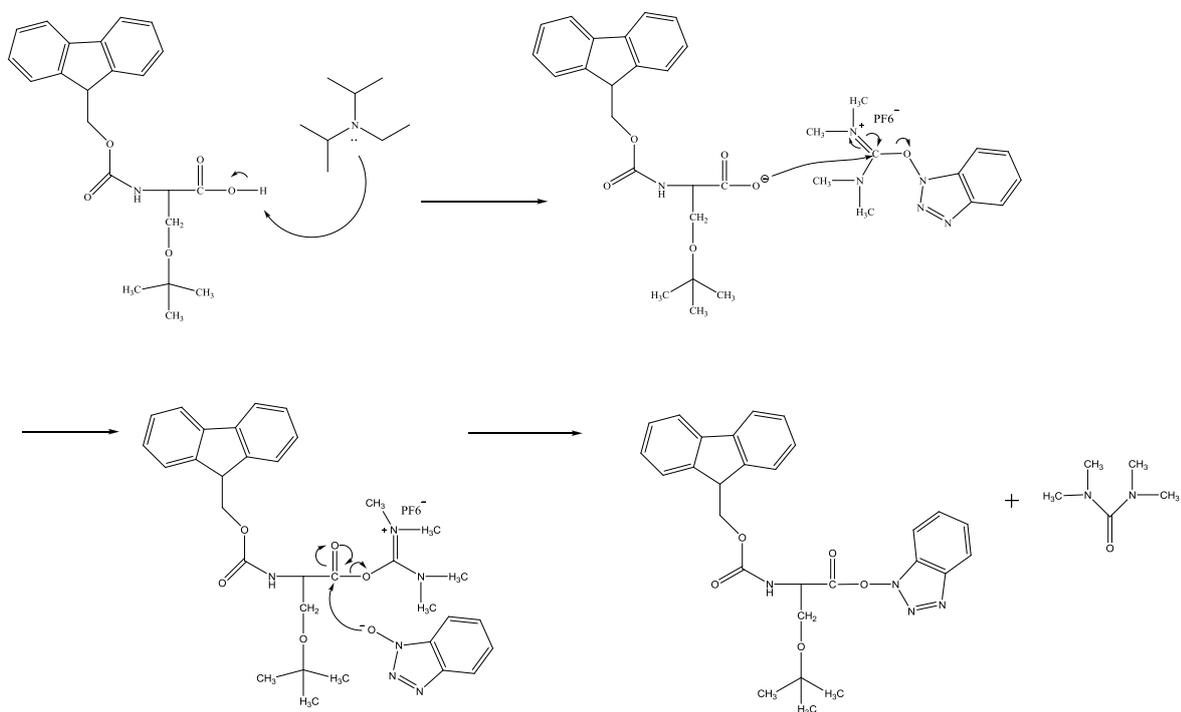


圖 16、DIEA 催化反應並以 HOBT 及 HBTU 活化胺基酸反應機構

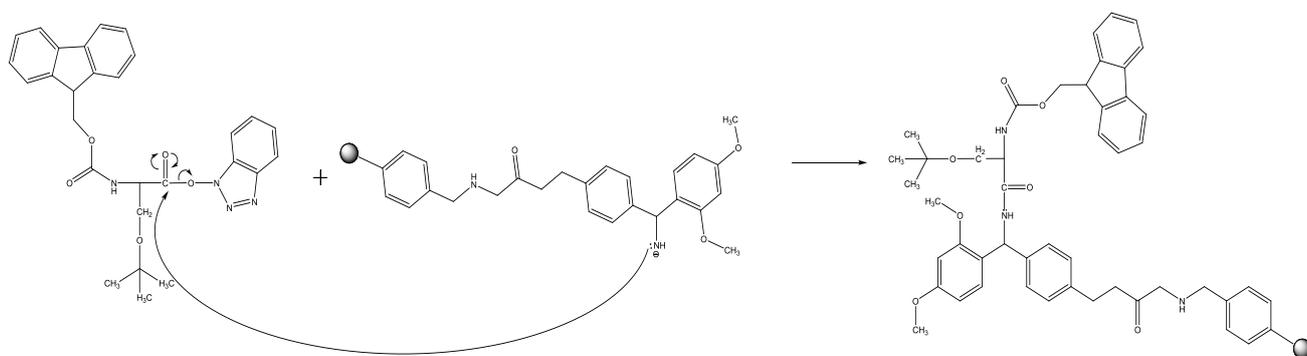


圖 17、胺基酸合成在固相支持物上反應機構

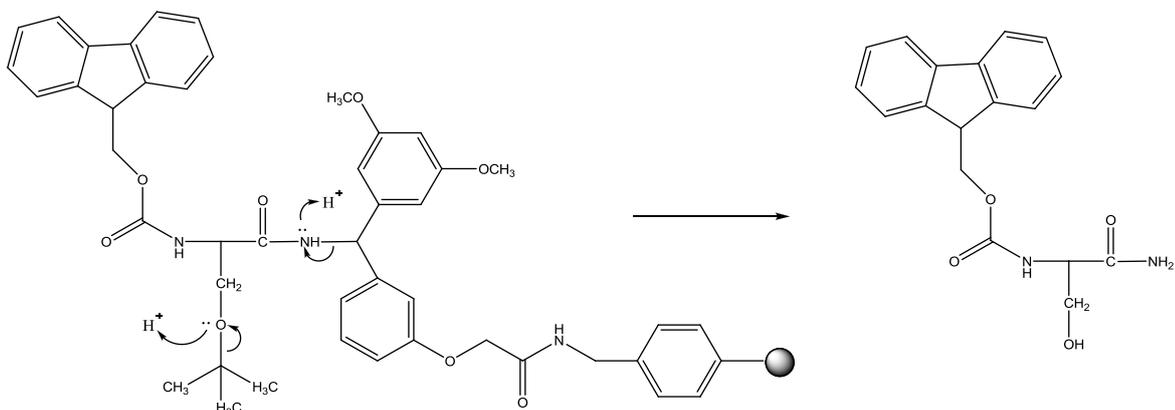


圖 18、TFA 裂解反應機構

### 5-4 Nihydrin test

在胜肽合成過程中，可以使用成色反應來確認胺基酸 N 端的 Fmoc 保護基是否存在。倘若經過 piperidine 後，經由此成色反應測試為透明或是淡黃色，表示胺基酸 N 端的 Fmoc 保護基依然存在；倘若經過 piperidine 後，經由此成色反應測試為深藍色，表示胺基酸 N 端的 Fmoc 保護基已去除。而經過耦合後，因為耦合的胺基酸 N 端具有 Fmoc 保護基，所以應成透明或是淡黃色(圖 19)；反之，成深藍色表示胺基酸未耦合(圖 20)。反應機構<sup>23</sup>如下，圖 21。

主要反應：

若為一級胺基(-NRH<sub>2</sub>) → 深藍色 參見圖 19

若為二級胺基(-NR<sub>2</sub>H) → 黃色 參見圖 20

若為三級胺基 (-NR<sub>3</sub>) → 透明如卵(無色或淡黃色)

Proline 由於其 N 端結構，導致成色反應的顏色不易辨別，所以無法使用此法測試其是否耦合上或是 Fmoc 保護基是否以去除。



圖 19、具有 Fmoc 保護基的 resin

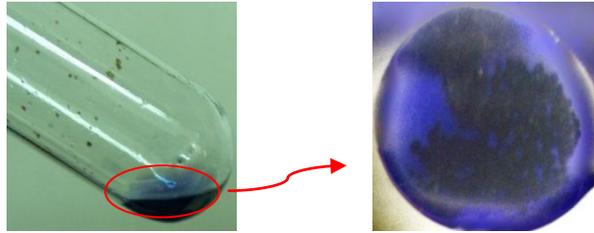


圖 20、不具 Fmoc 保護基的 resin

$\alpha$ -amino acids and amines:

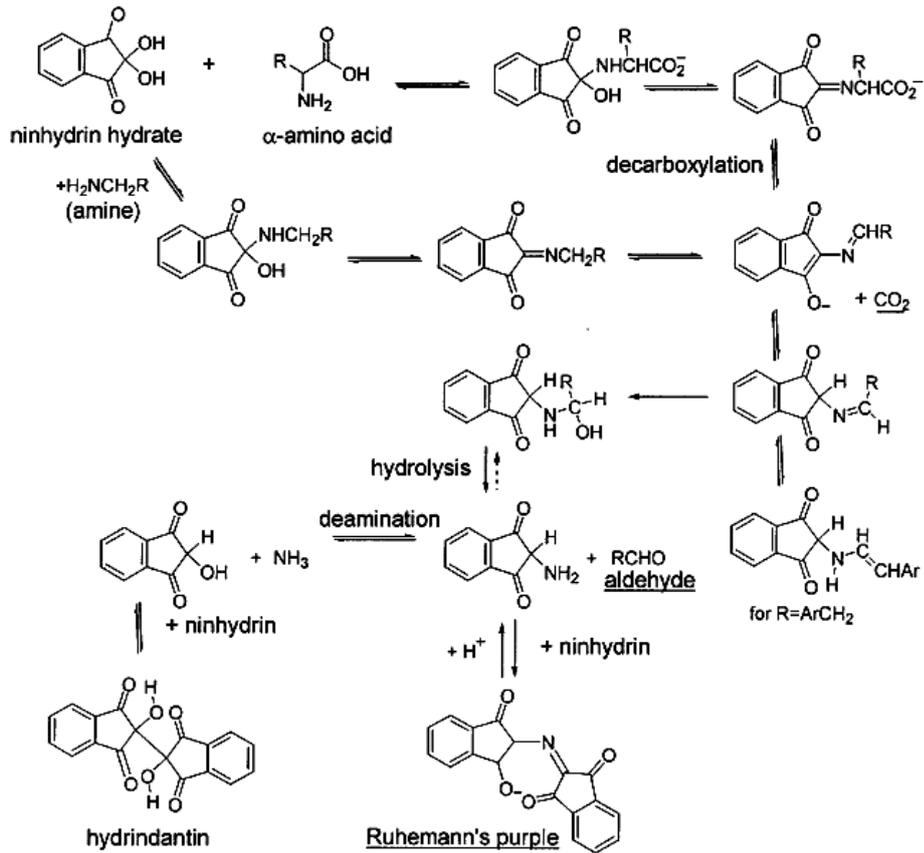


圖 21、Nihydrin test 成色機制是藉由共軛鍵吸收特定波長,而顯示特定顏色(互補色)<sup>24</sup>。

藥品耗材部分整理於下表六。

表六、Nihydrin test 實驗材料及購買廠商

	購買廠商	備註
Nihydrin test Kit	科羅耐	需加溫至 120°C
SZ-CTV 顯微鏡	Olympus	Japan

## 6. 逆相高效能液相層析儀(*reversed-phase high performance liquid chromatography*)純化胜肽

高效能液相層析法(*high performance liquid chromatography*, 簡稱 HPLC)適用於半揮發性和非揮發性化合物或遇熱易被裂解的待測物, 應用此方法進行分析的先決條件是標的待測物(欲分離之合成胜肽)必須溶於作為移動相的溶劑中; 由於移動相的溶劑是在加壓狀況下輸送, 所以最初是被稱為高壓液相層析(*high pressure liquid chromatography*)。高效能液相層析分析的原理係藉移動相通過固定相達到分離的效果; 混合物中的各成份在固定相和移動相之間的分配係數(*partition coefficient*)不相同(即親和力不同), 使其在管柱中的滯留時間不相同而得以分離出來。若化合物與固定相親和力較強, 則沖提較慢(即滯留時間長), 而化合物與移動相的親和力較強, 則沖提較快(即滯留時間短), 依此原理將樣品中的標的待測物與共萃取出來的干擾物分離的方法。

逆相高效液相色譜層析法 (RP-HPLC), 是一種能將蛋白質和 *peptides* 依其極性大小加以分離的方法。原理是利用蛋白質樣本的各個成份, 藉由移動相(*mobile phase*)攜帶通過帶有非極性官能基之固定相(*stationary phase*), 透過蛋白質在非極性固定相之間不同的疏水性之交互作用, 而達到分離的效果。其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, 如由 C4、C8、C18 所組成的長烷鏈。其所適用之 pH 值範圍為 2~10。而移動相沖提液則是極性強度偏中等的溶劑, 如乙睛(氟甲烷)、甲醇等與水所組成的混合物。RP-HPLC 之分離機制係利用蛋白質與固定相之間相互疏水作用力(*hydrophobic interaction*)不同, 使樣本於移動相沖提之下所形成之滯留時間不同而分離出來, 極性最大的物質與管柱填充物表面間作用力最小, 故最早被沖提出; 反之, 極性越小的物質與管柱填充物表面間作用力越強, 故越晚被沖提出。

RP-HPLC 分析法之優點有:(1) 分離效率高: RP-HPLC 藉由改變沖提液參數, 包括沖提液之 pH、有機溶劑之極性等, 可大大提高分離效率, 獲得

較高之解析能力(resolution)。(2) 應用範圍廣：由於乙腈-水系統為 RP-HPLC 常用緩衝移動相，而且乙腈相較於其他有機溶劑具有令人滿意的特性，如低紫外光密度(lowultraviolet strength)、低溶氧度(low oxygen solubility)和沖提強度高(elution strength)等，使 RP-HPLC 分離純化蛋白質中具有很高分辨與解析能力；再者，RP-HPLC 在蛋白質與 peptides 的分離上，相對於其他的層析分離方法，為一具有快速和高回收率之蛋白質分離方法。

因此 RP-HPLC 常被選用為蛋白質或 peptides 和諸多生物物質的分離或純化步驟中的最後一階段。其應用範圍廣泛，包括可應用於生化、製藥、食品、工業化學品、環境污染物及臨床醫學等。另一方面，RP-HPLC 也由於具有高解析與分辨能力的優點，常是純化製程中重要的步驟。

### 6-1 HPLC 實驗材料及設備

高效能液相層析所需之材料及設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表七。

表七、高效能液相層析所需之材料、設備及購買廠商

材 料	購 買 廠 商
TFA (Trifluoroacetic acid)	Alfa Aesar -Lancaster
Acetonitrile	ECHO Chemical Company
0.2 μM filter	MSI
設 備	購 買 廠 商
高效能液相層析儀	Hitachi
RP-HPLC column (250 × 10.0 mm, particle size 5 μm, Polaris 5u C-18A, 100 RP-18)	Varian
微量注射器 (CHA-750RN)	KONTES
玻璃過濾裝置 (AK95375-00000)	

## 6-2 實驗方法

欲分析或純化的樣品需於分析或純化前，先以孔徑 0.2  $\mu\text{M}$  針筒過濾器 (filter) 過濾。過濾後之樣品注射至儀器前，須先去除儀器微流管柱內及移動相氣泡 (purge)，在不注射樣品的條件下讓儀器以我們所設之沖洗管柱，以確認管柱內沒有殘存的干擾物。若有雜訊出現，應設定適當條件 (流速、溶劑配比係數) 將管柱清洗乾淨後，再行樣品分析。樣品注入樣品注射閥，此時樣品仍停留於閥內，注射閥箭頭停留在 load 位置；待 RP-HPLC 儀與積分儀的同步化操作完成，將閥門往下推至 inject，樣品就進入 RP-C18 管柱進行層析。積分儀隨著樣品成分於不同時間出現面積大小不一的波峰 (peak)，此時若要進行純化可依積分儀出現的波峰，個別收集每個波峰出現時 RP-HPLC 所層析出的液體，經冷凍乾燥，便得到純化的白色乾燥粉末。HPLC 溶劑配製為：solution A 是 4L D.I. Water + 0.05 % Trifluoroacetic acid (TFA)，solution B 是 4 L Acetonitrile + 0.05 % Trifluoroacetic acid (TFA)，分配比例如下表八。

表八、RP-HPLC 純化胜肽移動相分配比例

時間 (min)	dd water + 0.05 % TFA	ACN + 0.05 % TFA
0	100	0
4	100	0
24	60	40
35	10	90
36	10	90
43	100	0
44	100	0

## 7. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法鑑定胜肽分子量

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法 ( Matrix-Assisted Laser Desorption/Inoization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS ) 在 1985 年由德國科學家 Michael Karas 和 Franz Hillenkamp 共同提出，其基質輔助雷射脫附游離法是藉由基質吸收雷射光的能量後，再傳遞給分析物，使得分析物進行脫附游離的一種游離方式；可以用以輔助分析高極性的胺基酸分子。在 1988 年將可偵測質量上限擴展至上萬質量單位的蛋白質，MALDI 通常搭配著 TOF MS，因此通常稱為 MALDI-TOF MS。而基質的功能在於吸收雷射能量，而分析物本身則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。由於基質扮演著能量緩衝的角色，使得一些熱不穩定的樣品，可以避免直接得到大量能量的輸入而產生熱裂解的現象，此屬於軟性離子化法，現今常被應用於生化樣品的分析。

### 7-1 樣品製備方式

一般傳統的製備方式，是將有吸光性質之有機酸溶於適合的有機溶劑中當做基質溶液，基質溶液通常濃度皆趨於飽和狀態，接著將基質溶液以適當比例跟分析物溶液均勻混合，最後取 1  $\mu$ L ~2  $\mu$ L 混合液置於樣品盤上在空氣中自然風乾 (air-dried)。由於混合液中含有大量的小分子有機酸與少量的分析物，因此等溶液中的水與有機溶劑揮發後，在樣品盤上會形成共結晶 (co-crystallization)，此時即可將樣品盤置入質譜儀中進行分析。然而在分析時是否可以得到分析物的訊號，基質與樣品溶液的配製是重要的因素，基質與分析物的莫耳比、溶劑之極性等均會影響共結晶的形成而造成結果的差異，一般來說，基質與分析物的莫耳濃度比大約都在 1000 : 1 以上，但對於一些生物巨分子而言，會因為其分子愈大，而基質的莫耳濃度也需要調整至較高的濃度<sup>25</sup>。將含有樣品的樣品盤送入離子源後，以脈衝式雷射光照射並

於真空的環境下進行脫附游離，產生氣相分析物離子後，以質量分析器進行偵測。由於在共結晶中基質的含量遠多於分析物，因此當雷射照射時，雷射能量會由基質吸收且在極短的時間內將能量傳遞給所環繞的分析物分子<sup>26</sup>，此區域內的分子會在真空的狀態下，在極短的時間內被迅速加熱，而由固相轉變為氣相，此時當相轉移的速率大於分析物受熱分解的速度時，分析物即不會分解，即可保持分析物結構之完整性並脫附至氣態，此過程即為脫附(desorption)，而在過程中，電荷轉移反應也會同時進行，產生一連串離子-分子反應，分子因而被游離化而產生電荷，乃游離化之過程(ionization)。

## 7-2 基質的特性與功用

MALDI-TOF MS 進行分析時，添加了基質來幫助分析物分子進行脫附游離，正因如此 MALDI-TOF MS 可以藉由基質分子先吸收雷射能量後，再傳遞給分析物使之脫附游離，而得到完整的分子離子訊號。早期被研究發展出來的基質多屬於具芳香環的有機酸(如 sinapinic acid 及 2,5-dihydroxybenzoic acid) 會在 UV 範圍內吸收雷射能量，迄今已有八十餘種此類基質被發展出來。常用的 MALDI 基質包括有 Sinapinic Acid、2,5-DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid)、2,4,6-trihydroxyacetophenon、HABA (2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid)、 $\alpha$ -CHCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)、等，多達數十種以上(表九)。根據研究顯示，對不同種類的分析物而言，選擇了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。

基質通常都具低揮發性，因為質譜在真空狀態下操作，若是基質容易揮發則無法穩定覆蓋於分析物的周圍扮演好基質的功用，這樣會造成分析上和圖譜判斷上的困擾，因此一般而言，基質需要具備以下三種必要的功用：

(1)有效吸收雷射能量並轉移給分析物

基質分子應具有吸收雷射能量的能力，並且能夠有效率的將能量傳遞給相鄰的分析物分子，使得分析物分子能夠獲得足夠的能量進行脫附游離。

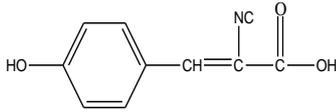
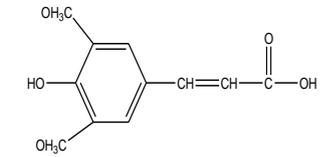
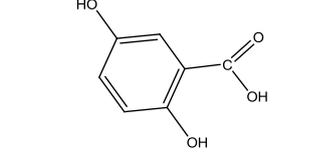
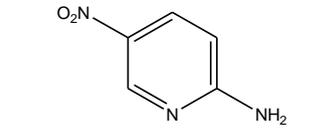
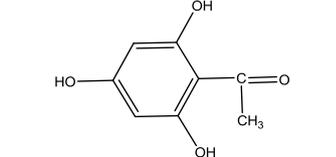
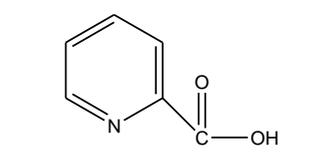
(2) 有效地防止分析物聚集

如果在共結晶的過程中，分析物太過於集中將會影響能量傳遞的效率以及脫附游離的過程。因此基質分子的含量通常高於分析物，以便於有效地將分析物分子隔開而形成較佳的共結晶，這樣才能更有效率的進行分析的工作。

### (3) 提供氫離子，幫助分析物游離化

基質大多數為具羧基的芳香族有機物，可有效地提供氫離子給分析物，使分析物帶上電荷，而獲取質子的方式主要是由於分析物分子與基質離子在氣相中進行一連串離子-分子反應，使分析物形成分子離子。基質在此所扮演的角色為氫離子供應者，可幫助分析物游離化。

表九、常用的 MALDI 基質之結構<sup>27</sup>

基質名稱	結構式	主要適用的分析物
$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA)		胜肽、蛋白質
3,5-dimethoxy-4-Hydroxycinnamic acid (Sinapinic acid, SA)		胜肽、蛋白質
2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)		胜肽、蛋白質、 碳水化合物
2-amino-5-nitropyridine		核苷酸
2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,4,6-THAP)		胜肽、核苷酸
2-pyridine carboxylic acid (picolinic acid)		胜肽、蛋白質、 核糖核酸

### 7-3 飛行時間質量分析器的原理

飛行時間質量分析器（Time of Flight mass analyzer, TOF analyzer）為質量分析器的基質輔助雷射脫附游離-時間飛行管質譜儀；在真空狀態下，以脈衝式雷射（氮氣雷射或是 Nd-YAG 雷射）照射樣品進行脫附游離的動作。共結晶固體（包含分析物與基質）被照射之後，大部分的能量會直接被基質吸收，然後傳遞給分析物分子，使得分析物分子得以在極短的時間內（pico sec~nano sec）由固態昇華至氣態而脫附（desorption）；脫附過程中會同時進行電荷轉移的反應和一連串的離子-分子反應，分析物分子因而被游離化並帶電荷。但由於 MALDI 是以雷射光作為游離化能量來源，所以除了傳統脫附游離法中常見的離子-分子反應之外，還包含光游離及光化學反應。

飛行時間質量分析器是由離子加速電場與無場區域所組成。當分析物氣態離子產生後，在進入飛行管之前會有一電壓使所有離子集中在同一起始位置後（此過程稱為：延遲萃取 delay extraction, DE，再經電場加速送入飛行管，不同質荷比（ $m/z$ ）的分析物離子將會在不同時間到達偵測器（圖 22）。

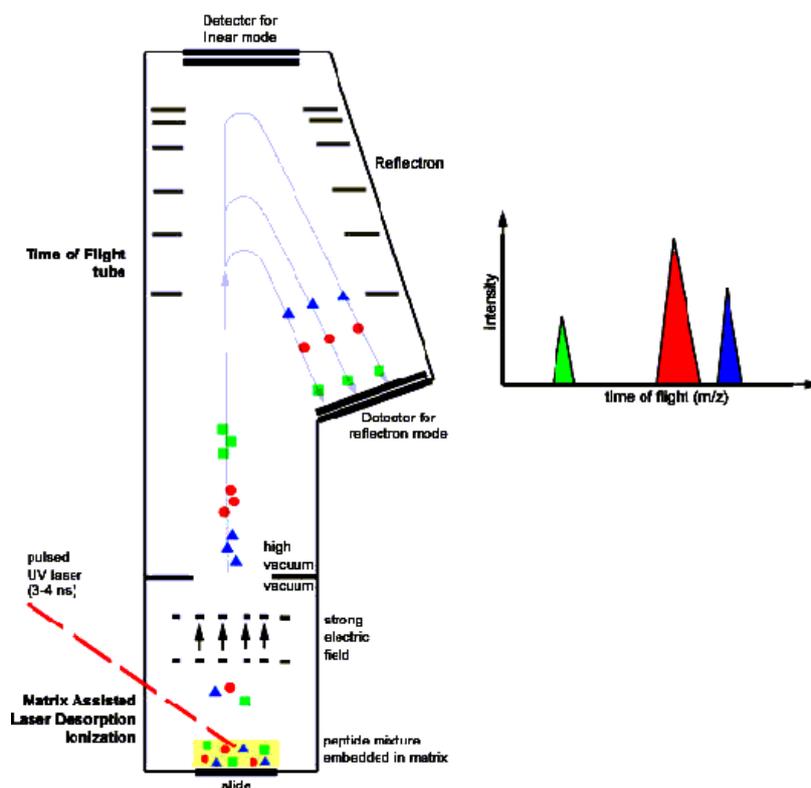


圖 22、MALDI-TOF MS 之簡圖。直線/反射型 MALDI-TOF MS<sup>37</sup>。

一開始，加速電位提供的能量會讓所有氣態離子具有相同的動能，進入無場區域飛行後，不同的離子會因質荷比不同而有不同速度；質量大的離子具有較小的速度，所以會比質量小的離子慢到達偵測器，便可藉由到達偵測器的時間長短求得質荷比並分別不同質荷比的離子。但分析物分子在被雷射激發形成氣態離子之後，同質荷比的分析物離子可能得到不同大小的能量而有不同的速度，或是在游離源中不同位置下形成離子造成進入飛行管的時間不一，這些因素都會造成相同分析物離子被偵測為不同質荷比而誤判的現象，在飛行管之前設置延遲萃取的原因便在此。

目前時間飛行管的形式共有四種，包括直線式（linear）、反射式（reflective）、W 型及多次折返式，後兩種時間飛行管是近幾年研發出的高解析 TOF 儀器，普及率尚不及直線式與反射式。標準直線式時間飛行管長度約為 1 公尺，加速電位為 30kV，解析度較低。反射式與直線式不同在於反射式時間飛行管會在直線飛行管末端施加正電場，使分析物正離子在這個區域因為電性相斥的關係減速，最後由於正電場的持續影響而轉向、加速，並由另一端的偵測器所偵測。反射式時間飛行管的解析度大約比直線式的提高 10 倍。反射式時間飛行管的另一特點就是擁有類似二次質譜的離子源裂解技術（post source decay, PSD），利用反射式 TOF 設計，發展出一種稱為游離源後碎裂的功能（post source decay, PSD），因為有些介穩離子（metastable ions）在飛行經 TOF 管至偵測器的過程當中分析，會因為本身內能過高導致碎裂，由於碎裂離子和其母離子只是動能不同但仍具有相同的飛行速度，若以線型式飛行時間管終端的偵測器偵測，則因其到達偵測器的時間相同而無法分辨，但反射式飛行時間質譜儀則可根據離子動能的不同加以區分。因為具有較小動能的碎裂離子會較快被反向電場減速轉彎，而較早到達另一端偵測器；具有較大動能的離子則反之，如此就可以區分碎裂離子和其母離子，並可應用於分析物結構的判定。能夠得到特定母離子的碎片離子圖譜，亦可運用於結構分析；雖然此法之準確度與靈敏度皆不及串聯式質譜（tandem mass spectrometry, MS/MS），但因為基質輔助雷射脫附游離-時間飛行管質譜

儀有著操作簡單、偵測時間短、靈敏度高、偵測範圍廣以及準確度高、又容許少量鹽類干擾等優點，現今商業化的產品相當普遍且被大量運用在蛋白質體學的研究上。

#### 7-4 MALDI-TOF MS 中抑制現象之解決方法

MALDI-TOF MS 現今雖然已經成為分析生化分子不可缺少的技術，但還是有其無法避免之問題要克服，例如：基質與分析物的共結晶不均勻而導致某些結晶點的訊號特別高、雷射能量調太高或太低導致無訊號或基線過高、來自於樣品中的鹽類物質和界面活性劑會抑制離子訊號，常常會影響到分析物信號，進而影響分析物在 MALDI-TOF MS 中之判斷，所以決定是否能得到最佳的結果是和基質的選擇及樣品製備有很大的關係，因此根據上述問題有幾個比較常見之解決方法如下：

##### (1) 去除鹽類

樣品中如含有大量鹽類時對 MALDI-TOF MS 來說是很大的致命傷，會造成定量上之困難，含量過高時甚至無分析物訊號產生，因此可購買已有商品化之 Zip-Tip 或是將樣品過固相萃取管柱(Solid-Phase Extraction)之前處理來去除樣品中之鹽類物質。

##### (2) 選擇適當的基質

由於需考慮到樣品和基質的互溶性，因此基質的選擇是在實驗過程中考量的因素之一，所以針對不同極性的樣品需使用不同極性大小的基質才能有較好的共同結晶化並進而得到較好的脫附游離效率，並且可以避免訊號集中點 (sweet spots) 的產生，避免質譜圖中訊號再現性降低而增加了分析上的困難。另一個與基質相關的考量因素即是基質與分析物之間的比例，通常分子尺寸愈大的分析物，在樣品製備中基質所佔的比例也需相對提高，因此在測量分析物時，先了解分析物的各種物理性質是必要的，以便於找尋適當的基質和基質比例。

## 7-5 MALDI-TOF MS 的優勢

MALDI-TOF MS 在目前的使用已愈來愈普遍，已經成為偵測生化分子與有機高分子必備的儀器之一，這都該歸功於它本身具有一些其他質譜儀所沒有的特點，其主要的特點如下：(1) 高的靈敏度，可偵測到 femtomole 甚至 attomole 的分析物。(2) 極高的偵測質量範圍。(3) 其操作簡單而且分析快速。(4) 極少的分析樣品需求量。(5) 較高的鹽類承受能力。因此 MALDI-TOF/MS 成為蛋白質快速鑑定及特性分析的主軸。

本研究就是利用基質輔助雷射脫附游離/飛行時間質譜技術，來偵測所設計之胜肽在與金屬離子進行螯合作用後，是否具降解蛋白質功能，MALDI-TOF-MS 系統購自 Bruker，型號為 **microflex** 系統。使用 Bruker 原廠設定的方法，胜肽部分使用 RP (reflection positive)\_0-3 kDa 偵測 peptide 3C、DIB1、DIB2 以及 DIB3，而蛋白質的偵測使用 LP (linear positive)\_5-20 kD 及 LP\_highmass 模式進行偵測。鑑定胜肽(peptide 3C、DIB1、DIB2 以及 DIB3) 時使用  $\alpha$ -CHCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)，鑑定蛋白質(BSA、Id1 蛋白質)時使 SA(3,5-dimethoxy-4-Hydroxycinnamic acid)，基質與樣品以體積比一比一(濃度比至少為一千比一)的方式混合，並於有 seed layer 的樣品盤上乾燥，待測。

## 8. 蛋白質電泳

### 8-1 蛋白質電泳實驗材料及設備

相關耗材及其資料整理於下表十。

表十.蛋白質電泳所需之材料、設備及購買廠商

材 料	購 買 廠 商
SDS	USB
Tris	USB
30% Acrylamide : Bis	Bio-red
APS	Bio-red
TEMED	Bio-red
設 備	購 買 廠 商
電泳槽	Bio-red
製膠器	Bio-red
保鮮盒	
Gel logic 100 imaging system	Kodak

### 8-2 實驗方法

#### 製下膠步驟

首先，先將玻璃清洗擦乾備用(先用超音波震洗，再用酒精擦拭，用拭鏡紙擦)；接著將洗淨擦乾之玻璃裝置在製膠器上並用酒精測試(2 mL)玻璃與製膠器是否有滲漏。確定無滲漏後，依照表十一於 50 mL 離心管中依序加入 tris (1.5 M, pH 8.8)、二次水(DDW)、30% Acrylamide : Bis 及 10% SDS，並震盪混合。最後加入 10% APS 及 TEMED 後，震盪 5 秒，立即將混合液加入玻璃夾層中(加入 10% APS、TEMED 便會開始膠凝)。將混合液加至玻璃夾層後(注意需要保留尺梳空間以製備上膠)，需再加入大約 2 mL 的酒精，由於酒

精的密度較低，會在膠的上方壓膠，待瓶中剩餘混合液凝固後即可著手製備上膠。

### 製上膠步驟

將下膠上層的酒精倒出，並用拭鏡紙將多餘的酒精擦拭乾淨，並且依照表十二於 50 mL 離心管中依序加入 tris (0.5 M, pH 6.8)、二次水(DDW)、30% Acrylamide : Bis 及 10% SDS，並震盪混合。最後加入 10% APS 及 TEMED 後，震盪 5 秒，立即將混合液加入玻璃夾層中，將玻璃夾層加滿後，在玻璃夾層中插入尺梳，待瓶中剩餘混合液凝固後即可準備跑膠。

*p.s.*上膠用量不多可以配一片用的上膠製兩片上膠。

表十一、不同比例 Acrylamide : Bis 的下膠配製比例

	10%		12%		15%	
	一片	兩片	一片	兩片	一片	兩片
1.5 M tris pH 8.8 (mL)	2.5	5	2.5	5	2.5	5
DDW (mL)	4.04	8.08	3.53	7.06	2.37	4.74
30% Acrylamide : Bis (mL)	3.33	6.66	3.84	7.68	5	10
10% SDS (mL)	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
Total volume (mL)	10	20	10	20	10	20
10% APS ( $\mu$ L)	100	200	100	200	100	200
TEMED ( $\mu$ L)	10	20	10	20	10	20

表十二、不同比例 Acrylamide : Bis 的上膠配製比例

	小膠通用	
	一片	兩片
0.5 M tris pH 6.8 (mL)	1	2
DDW (mL)	2.3	4.6
30% Acrylamide : Bis (mL)	0.63	1.26
10% SDS ( $\mu$ L)	40	80
Total volume (mL)	4	8
10% APS ( $\mu$ L)	40	80
TEMED ( $\mu$ L)	4	8

## 跑膠步驟

將 sample 與 sample buffer 以體積比 1 : 1 混合加熱至 95°C 5~10 分鐘。將前後有玻璃片夾著之膠體置入電極配件(electrode assembly)，先將 running buffer 倒入膠體與膠體的內部空間(inner chamber)，測試是否會漏；若不會漏，將內部空間再用 running buffer 倒滿，迷你槽(mini tank)用 running buffer 倒半滿，並將尺梳拔起。

在尺梳所造成之膠體空間內加入 20  $\mu$ L 加熱後之 sample 與 sample buffer 混合液。將電泳槽裝置完成後，設定起始電壓為 50 V，電流為 50 A，直至 sample 與 sample buffer 混合液跑離上膠(大約 10 分鐘)，電壓改為 100 V，電流維持 50 A。直到 sample 與 sample buffer 混合液移動至下膠，距離下膠及玻璃底部約 1 公分，即可將電壓停止。卸除電泳槽裝置，並將上下包夾膠體玻璃掀開其中一片，上膠用取膠塑膠刀切除，把下膠放入 CBR-250 solution 中染色(10~20 分鐘)。再以退染劑退染，直至膠體褪至無色或淡藍色，將膠體置入照膠系統，照膠。

表十三、sample buffer 配製比例

	取量
DDW	4.0 mL
0.5 M Tris-HCl	1.0 mL
Glycerol	0.8 mL
10% SDS	1.6 mL
$\beta$ -mercaptoethanol	0.4 mL
bromophenol blue 0.05% (w/v)	0.2 mL

表十四、running buffer 配製比例

	取量
Tris Base	5 g
Glycine	14.4 g
SDS	1 g

表十五、染劑 CBR-250 solution 配製比例

	取量
Coomassie Brilliant Blue R-250	0.75 g
DDW	250 mL
Methanol	250 mL
Acetic acid	50 mL

表十六、退染劑配製比例

	取量
DDW	700 mL
Methanol	200 mL
Acetic acid	100 mL

本實驗利用蛋白質電泳，來佐證所設計之胜肽在與金屬離子進行螯合作用後，是否具降解蛋白質功能。

## 9. 細胞實驗

### 9-1 細胞培養之常用藥品與試劑

細胞培養相關實驗之常用藥品與試劑，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表十七。

表十七、細胞培養相關實驗之藥品、試劑、設備及購買廠商

材 料	備 註	購 買 廠 商
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) Medium	細胞培養	GIBCO
Trypsin		
Penicillin-Streptomycin		
Fetal Bovine Serum (FBS)		Biological industries
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PBS 配製	Merck
KCl		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		Sigma
NaCl		
Trypan blue	細胞染色	
NaHCO <sub>3</sub>	Medium 配置	
DMSO (dimethyl sulfoxide)	抗凍劑	
MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)	細胞存活實 驗	Merck
Ethanol	消毒	ECHO Chemical Company
0.2 μM Filter	過濾	NALGENE®

## 9-2 細胞培養液的配製

將 DMEM 粉末溶於 4.5 公升已滅菌 Mili-Q 去離子水中，加入 23.5 公克的 NaHCO<sub>3</sub>，再用 HCl 調整 pH 至 7.2~7.4 後以 Mili-Q 已滅菌去離子水補足體積至 5 公升，再以 0.22 μm 過濾器過濾滅菌。配置好的 DMEM 細胞培養液需再添加抗生素(Penicillin-Streptomycin, 0.1 %)與 10%的胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS) ，儲存於 4°C 冰箱備用。

## 9-3 人類乳癌細胞株的培養

實驗進行前，無菌室和無菌操作臺以紫外燈照射 36-60 分鐘，以 70%的酒精擦拭無菌操作臺面，並開啟無菌操作颱風扇運轉 10 分鐘後，才開始實驗操作。所有進入無菌操作臺的器物均需先噴灑 70%酒精，有蓋容器旋開瓶蓋前均需先過火。

人類雌激素依賴型乳癌細胞株(human estrogen receptor (ER)- positive breast cancer cells, MCF-7)<sup>30</sup>購自新竹食品工業研究所。MCF-7 以 DMEM 培養液培養於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中；繼代培養時(subculture)，先以 PBS 清洗 1 至 2 次，再加入約 2 ml 的 Trypsin- EDTA 搖晃 30 秒倒去，再置入 CO<sub>2</sub> 培養箱約 5 分鐘，再以約 10 ml 的培養液將細胞沖下，最後分種於新的細胞培養瓶(Flask)中，每一培養瓶注入約 1~5×10<sup>6</sup> 個細胞，定期以 Trypan blue 染色，利用血球計數盤(Hemocytometer)計數細胞數目，維持細胞密度與總數。

## 9-4 細胞冷凍保存

細胞冷凍的原則為慢凍，且在約為 80-90%緻密度可使冷凍保存之細胞生長良好且處於存活率高之狀態，仍需注意冷凍保護劑之品質，DMSO 應為試劑級等級，無菌且無色(以 0.22 micron FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品)，以 5-10 mL 小體積分裝，4°C 避光保存，勿作多次解凍。冷凍保存之細胞濃度：2~8×10<sup>6</sup> cells/mL。冷凍保存劑濃度為 10% DMSO。

細胞冷凍保存之操作步驟為：冷凍前一日更換培養液，觀察細胞生長情

形。配製冷凍保存溶液：將 DMSO 加入新鮮培養液中，最後濃度為 10%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液(約 0.1 mL)計數細胞濃度。之後離心 1500 rpm，5 分鐘，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，使細胞濃度為  $2\sim 8\times 10^6$  cells/mL，混合均勻，分裝於已標示完全之冷凍保存管中，1 mL/vial。冷凍保存方法：冷凍管放入 5 公分厚的保麗龍盒中置於-80°C 冰箱，24 小時之後隔日置入液態氮中長期儲存。

### 9-5 冷凍細胞之活化

冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞之死亡。細胞活化後，繼代一至二代(約莫六日)，其細胞生長或特性表現才會恢復正常。冷凍的細胞快速解凍的方法為：將冷凍管由液態氮筒中取出，立即放入 37 °C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內全部融化，以 70%酒精擦拭保存管的外部，移入無菌操作臺內。取出解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養液之細胞培養瓶中，混合均勻，放入 CO<sub>2</sub> 培養箱培養。在解凍培養後隔日將培養液更新且利用倒立式位像差顯微鏡觀察細胞貼附生長情形。

### 9-6 人類乳癌細胞存活率之測定

此部分實驗目的在於觀察我們所設計之不同濃度的胜肽是否會影響人類乳癌細胞 MCF-7 的細胞存活率。本實驗使利用 MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)法判定。

MTT Assay 或稱 Tetrazolium assay 是一般常用的細胞毒性試驗方法，原理為 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 黃色水溶性固體可被細胞內粒腺體(mitochondria)中的去氫酵素(dehydrogenase)代謝，將 tetrazolium ring 切斷還原呈紫色不溶性沈澱物 formazan (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl-formazan)堆積在細胞中<sup>31</sup>(圖 23)，而後以 DMSO 溶解，其吸光值(O.D.)為 540 nm。因活細胞才具有活性的粒腺

體酵素，故所測得的吸光值會與活細胞數量成正比關係，因此我們利用 formazan 產量的多寡來評估細胞的存活率。

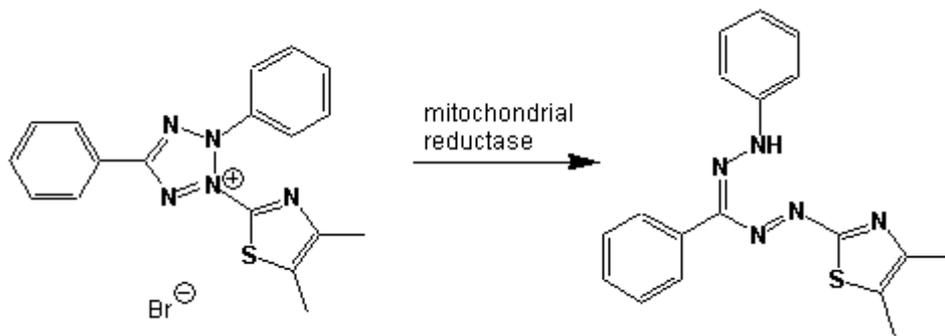


圖 23、活細胞代謝產生 formazan 之反應圖<sup>32</sup>。

### 9-7 細胞存活率實驗步驟

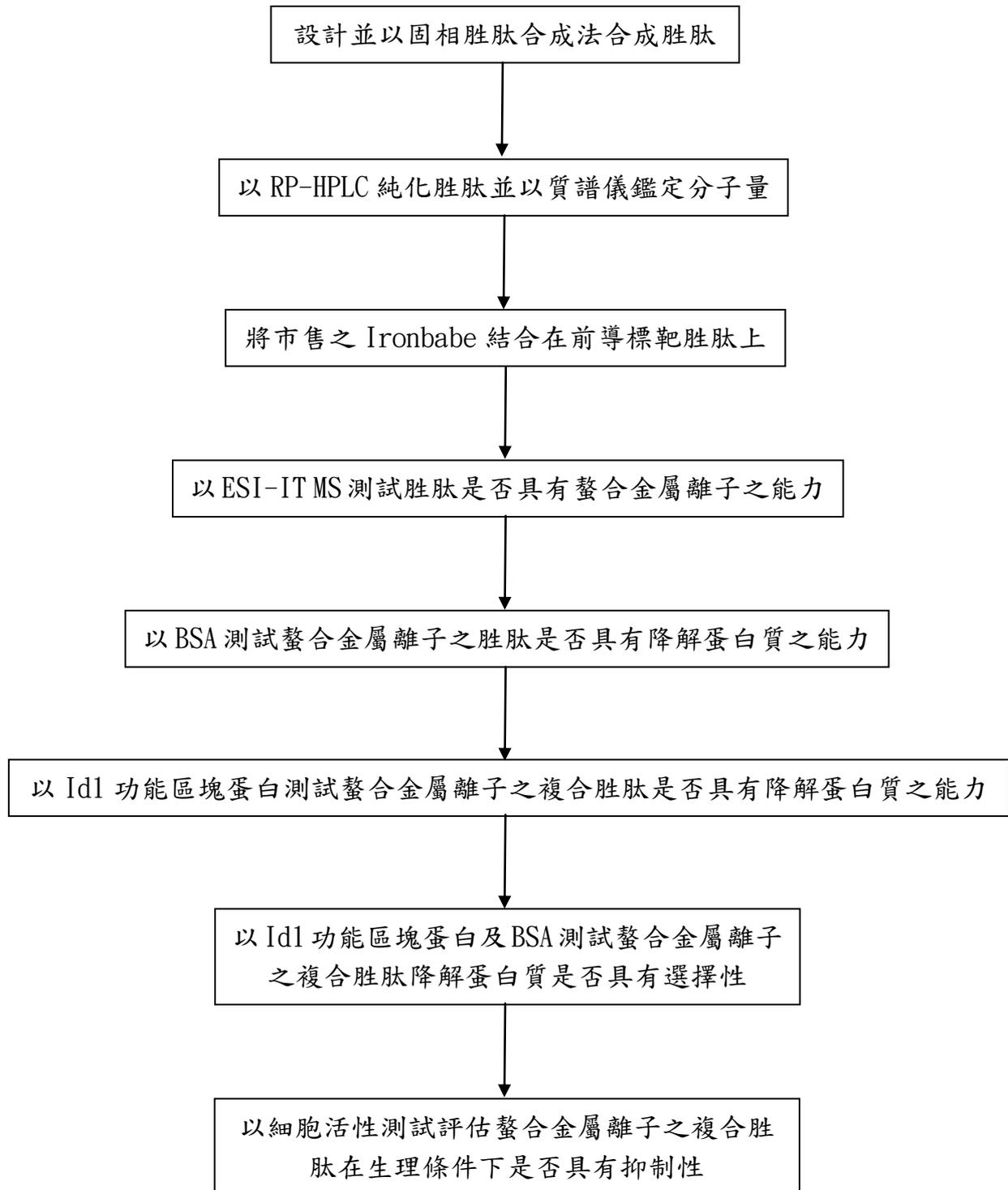
將含有  $5 \times 10^4$  cells/mL 之人類乳癌細胞以 DMEM 培養液，培養細胞於 24 孔細胞培養盤(200  $\mu$ L/well)中，加入不同濃度之合成胜肽(終濃度為 25、50、75 與 100  $\mu$ M)，在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 的條件下，分別培養 24 與 48 小時後，加入 150  $\mu$ L/well 之 MTT 試劑與細胞共同培養 1 小時後，再加入 300  $\mu$ L/well 之 DMSO，最後利用 ELISA reader (Versamax, Sunnyvale, CA, USA)測量 540 nm 之吸光值。

本實驗利用細胞存活率實驗，來進一步觀察所設計之胜肽在與金屬離子進行螯合作用後，下是否具降解蛋白質之功能。

## 10. 實驗結果與討論

首先，將本實驗之總流程整理於表十八。

表十八、實驗總流程



### 胜肽純化、鑑定

依照固相胜肽合成本實驗之胜肽，並應用 HPLC 純化胜肽，進一步將 HPLC 純化之胜肽應用 MALDI-TOF 質譜儀鑑定，整理如下表十九。並於表後附上詳細圖譜。

表十九、本實驗之胜肽的純化與鑑定

	預估分子量(Da)	實測分子量(Da)	滯留時間(min)
Peptide 3C	1520.7	1521.5	13.60
Peptide DIB1	808.77	809.19	14.91
Peptide DIB2	2209.33	2210.5	22.25

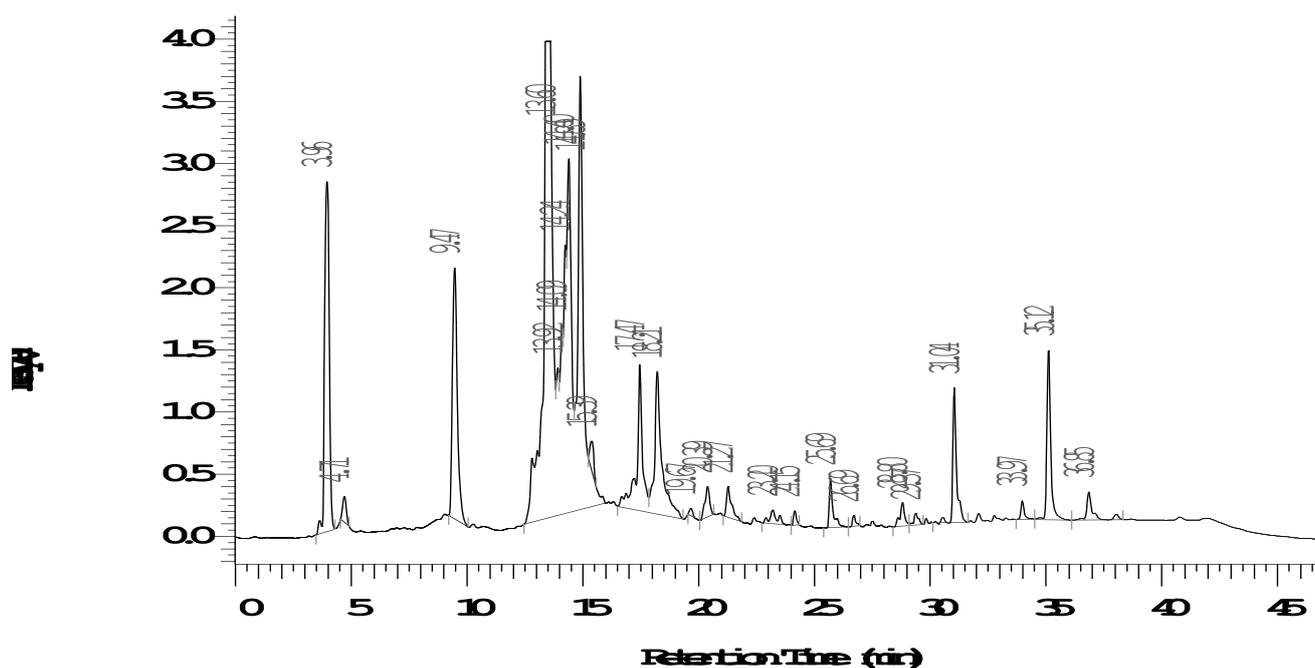


圖 24、應用 RP-HPLC 分析 peptide 3C 粗產物，主產物的滯留時間為 13.43 分鐘。

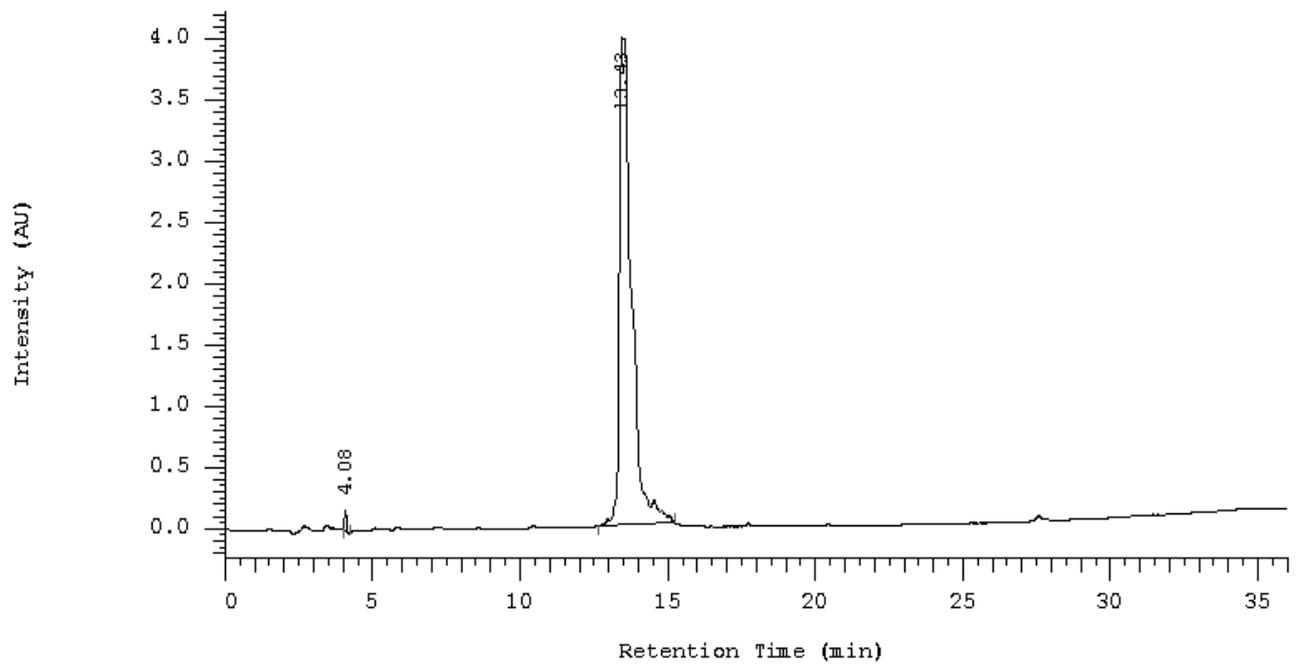


圖 25、應用 RP-HPLC 分析 peptide 3C。

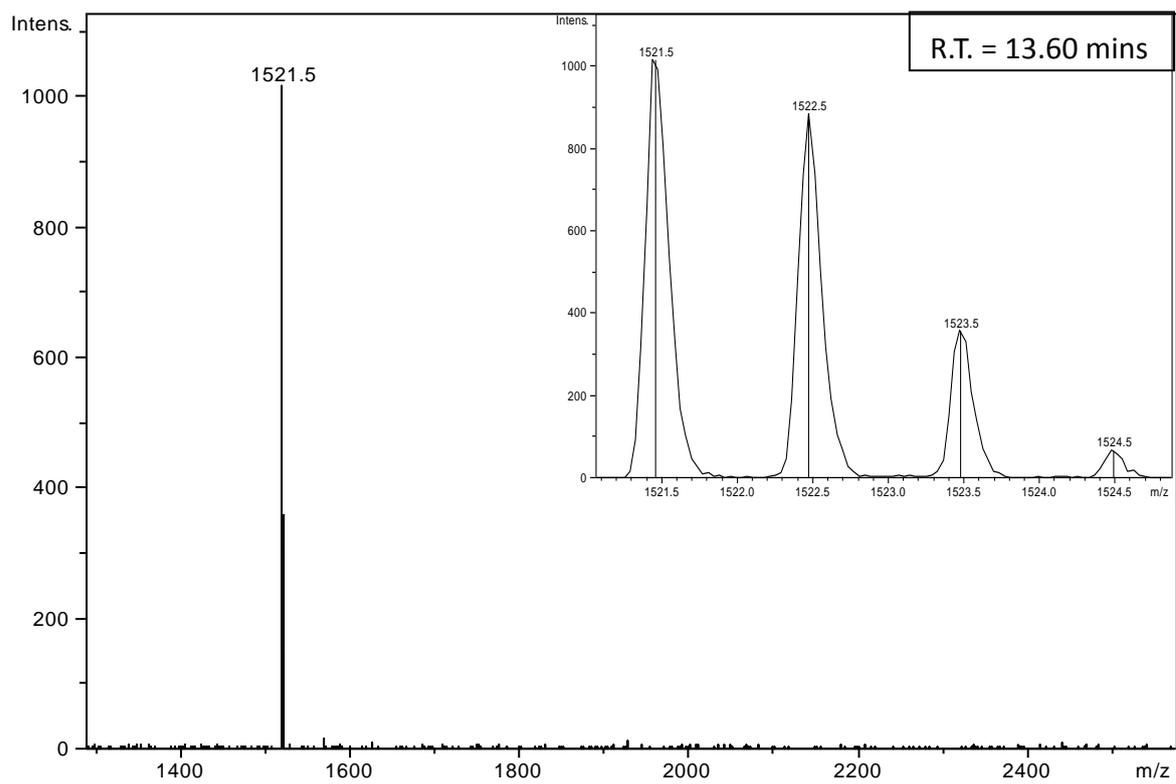


圖 26、應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 peptide 3C。

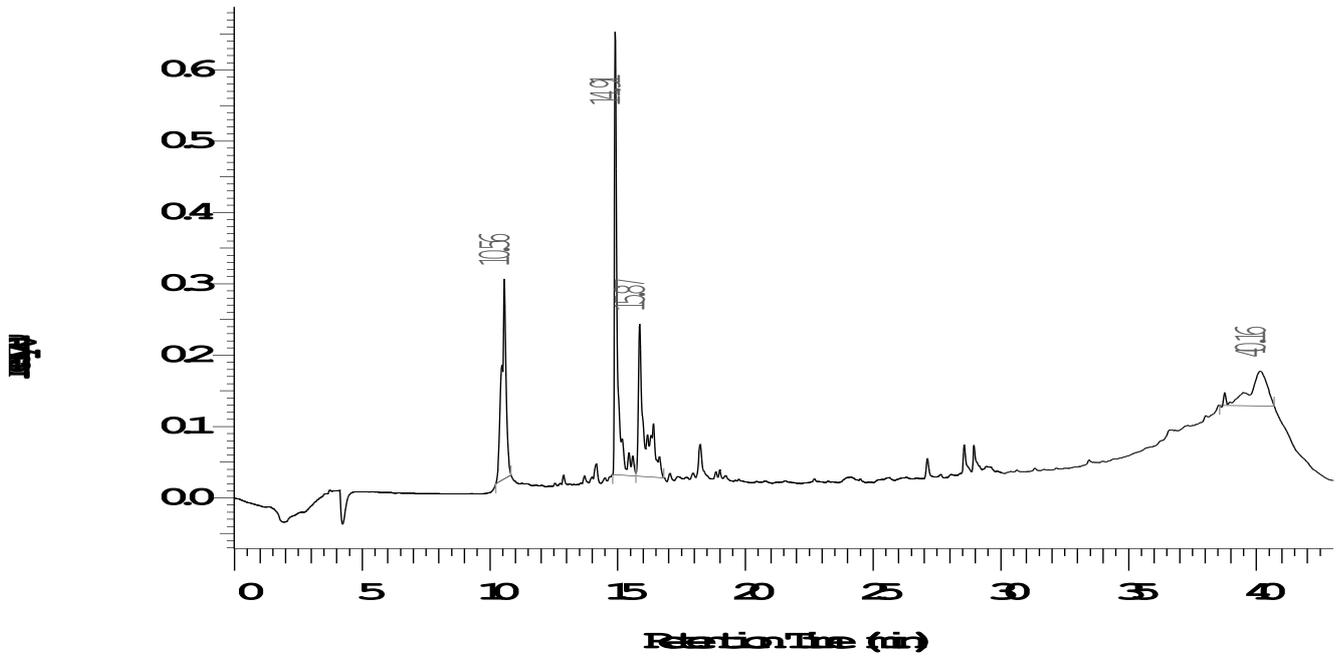


圖 27、應用 RP-HPLC 分析 peptide DIB1 粗產物

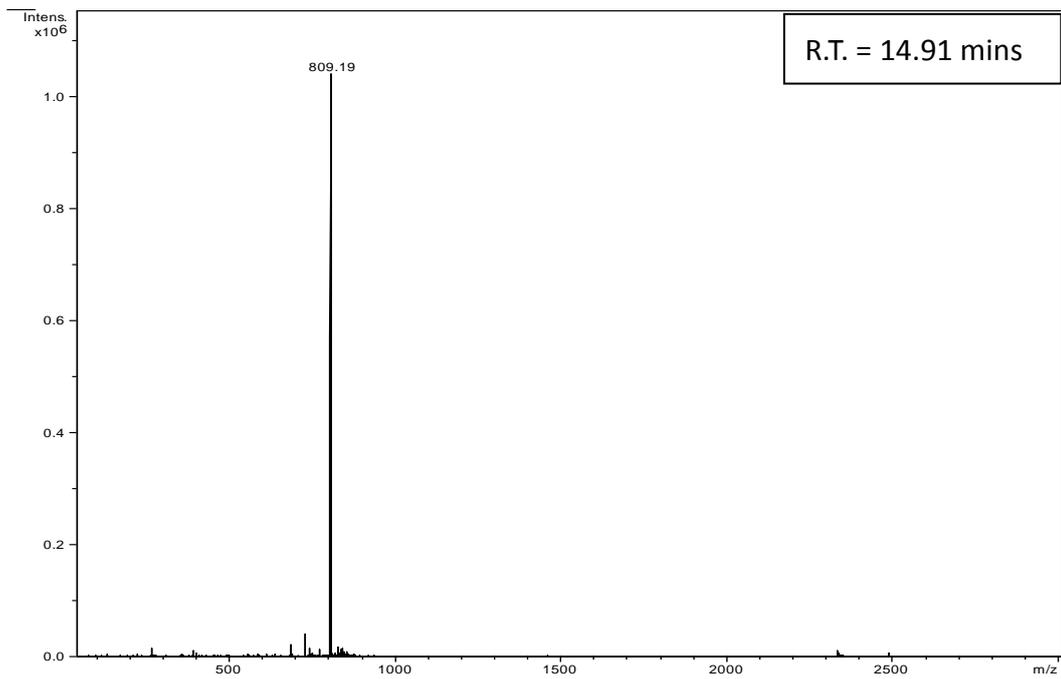


圖 28、應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 peptide DIB1。

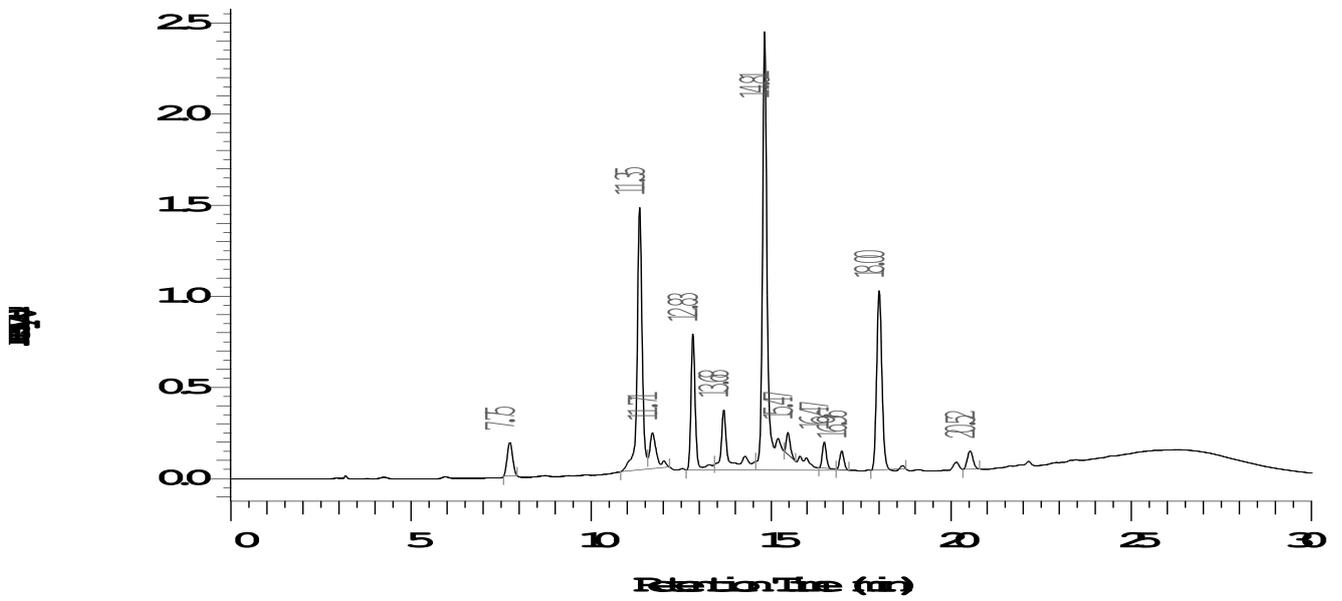


圖 29、應用 RP-HPLC 分析 peptide DIB2 粗產物。

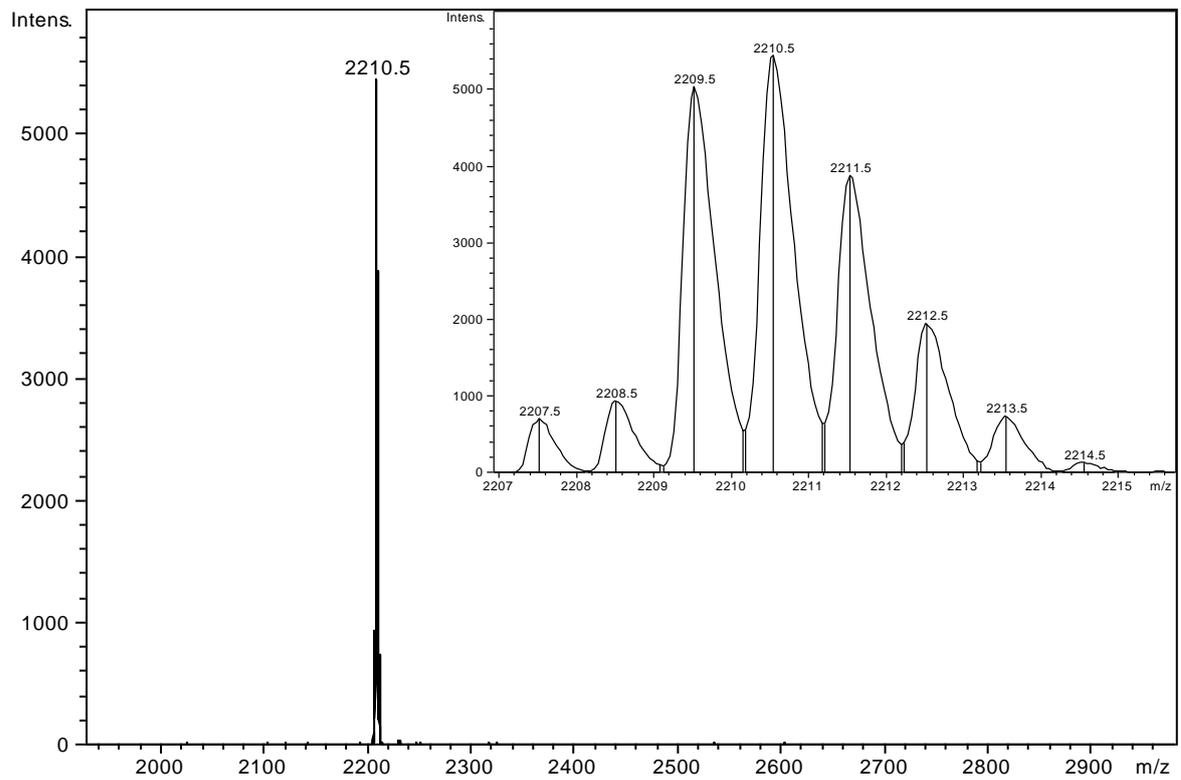


圖 30、應用 MALDI-TOF MS 鑑定經 RP-HPLC 分析純化後之 peptide DIB2。

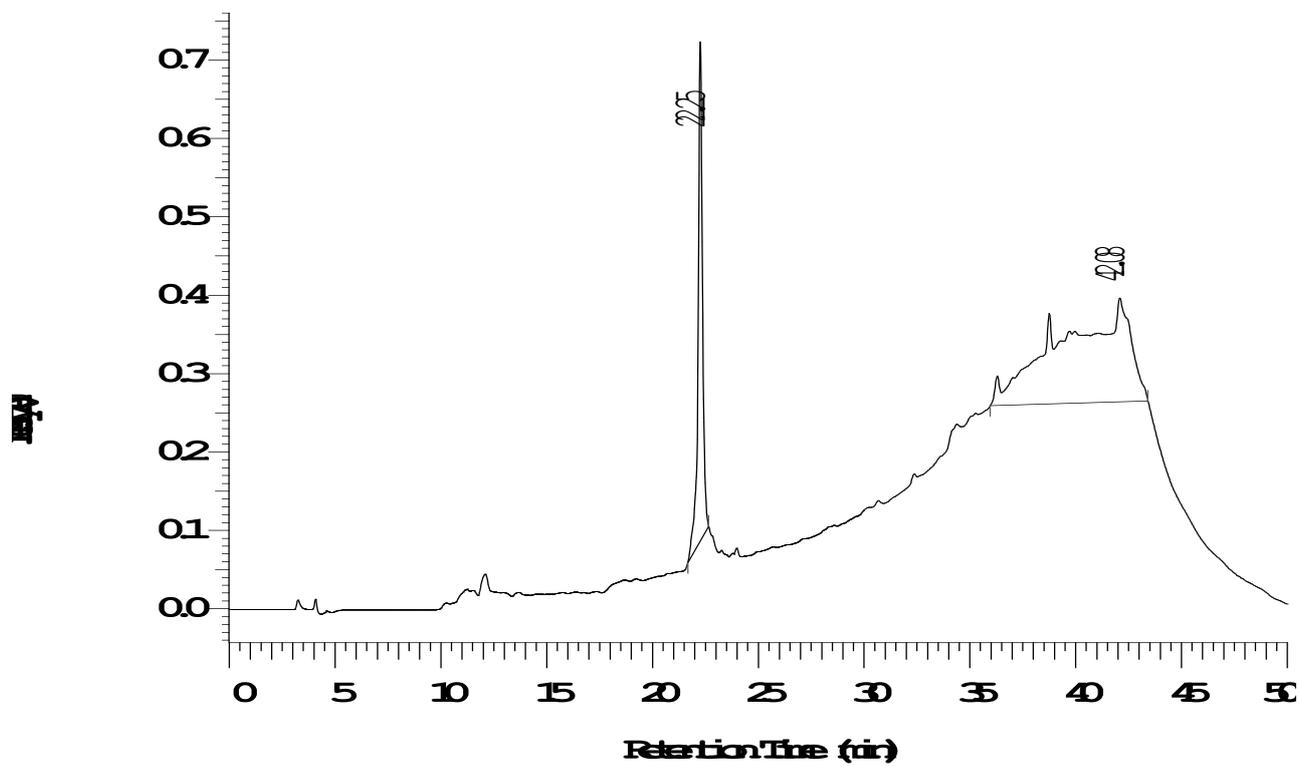


圖 31、應用 RP-HPLC 分析 peptide DIB2。

## Peptide DIB3 合成、定量

依照 ProFund™ Protein Interaction Mapping Kit 說明書上之合成步驟流程製成流程圖(圖 32)。將經 HPLC 純化(圖 25)、MALDI-TOF MS 鑑定(圖 26)後之前導標靶胜肽 peptide 3C 經由合成步驟合成 peptide DIB3，並應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成後之分子量(圖 34)。Peptide DIB3 之預估分子量應為 1959 Da。而合成反應機構如下圖 33。

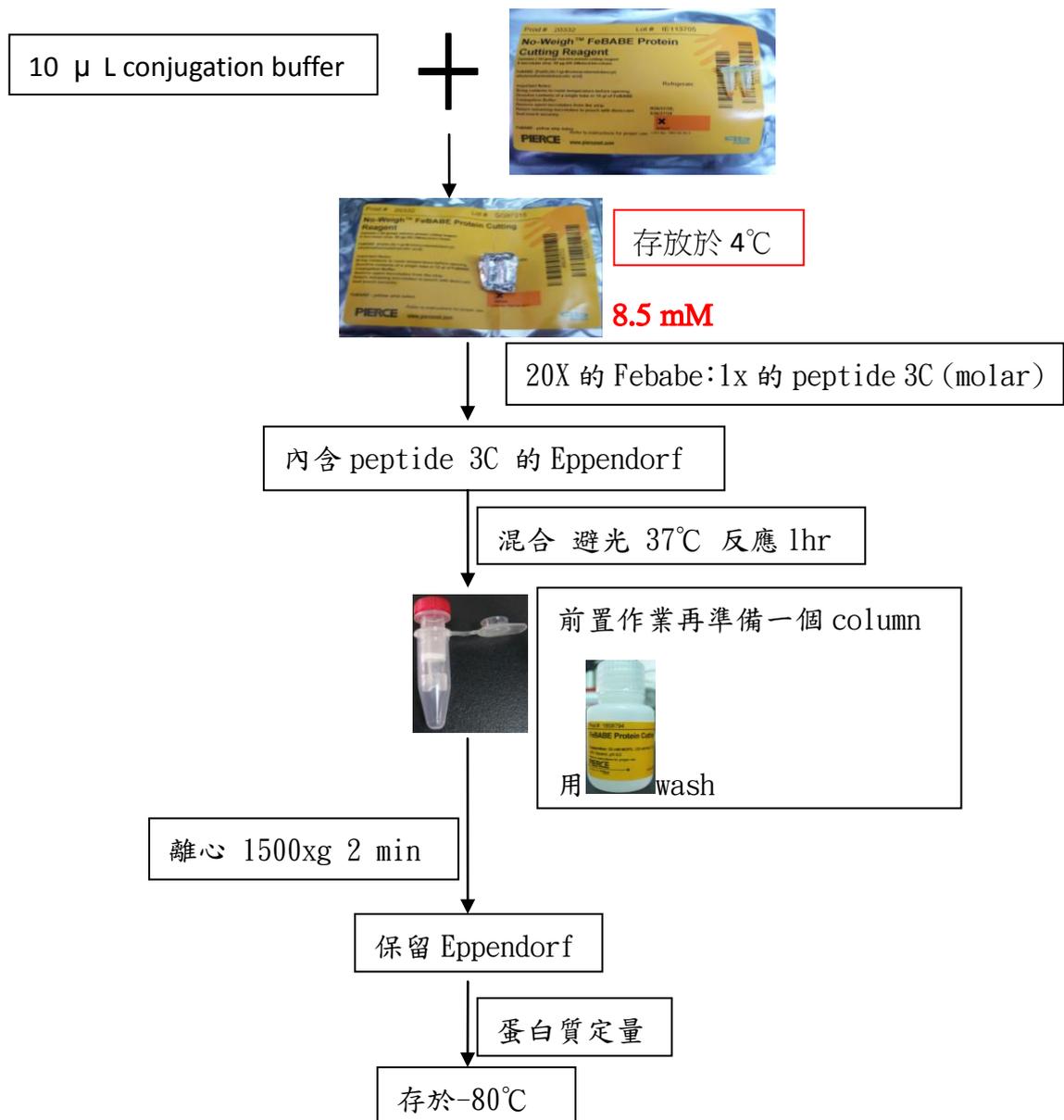


圖 32、peptide DIB3 合成步驟流程圖。

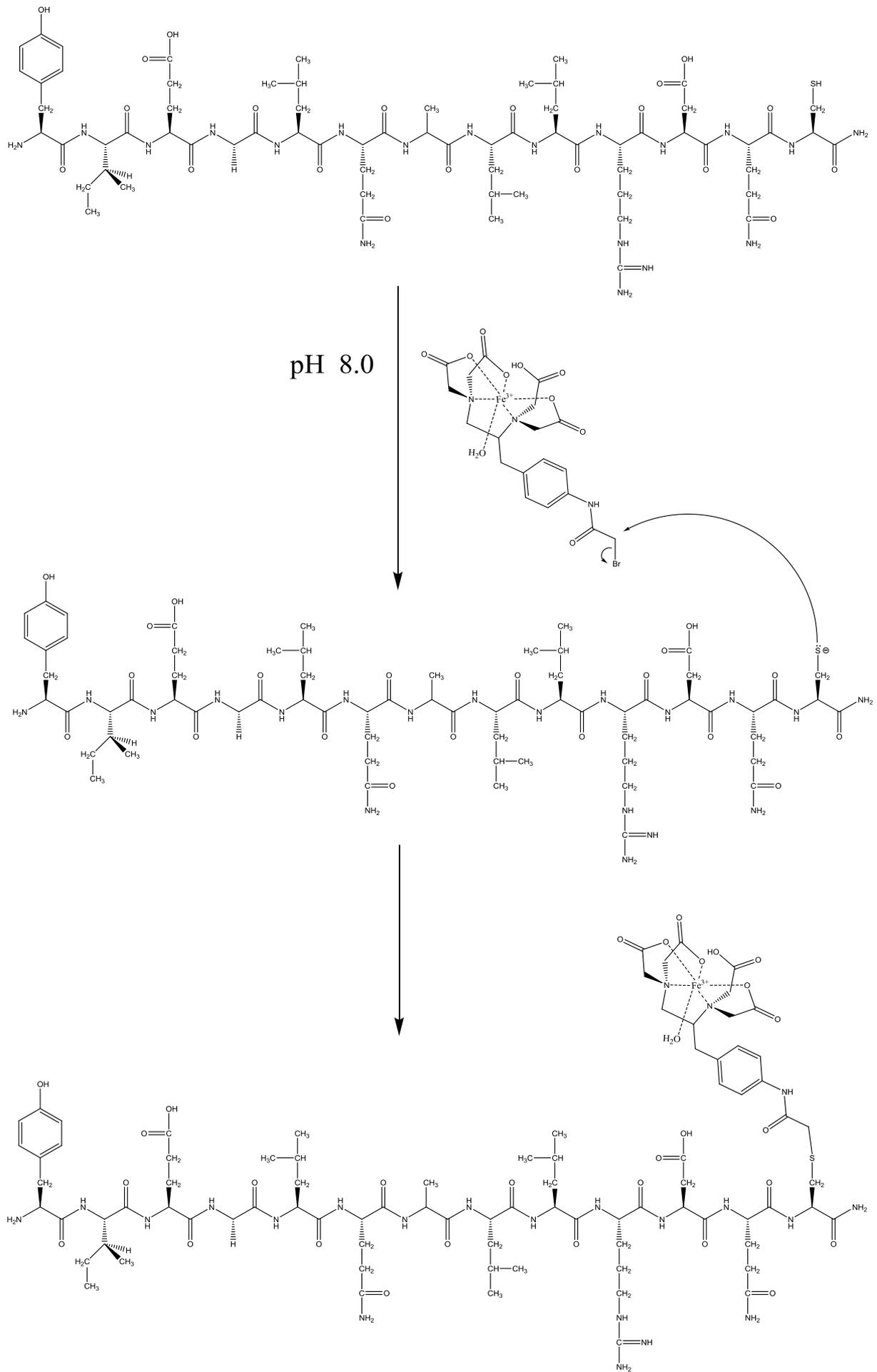


圖 33、peptide DIB3 的合成反應機構。

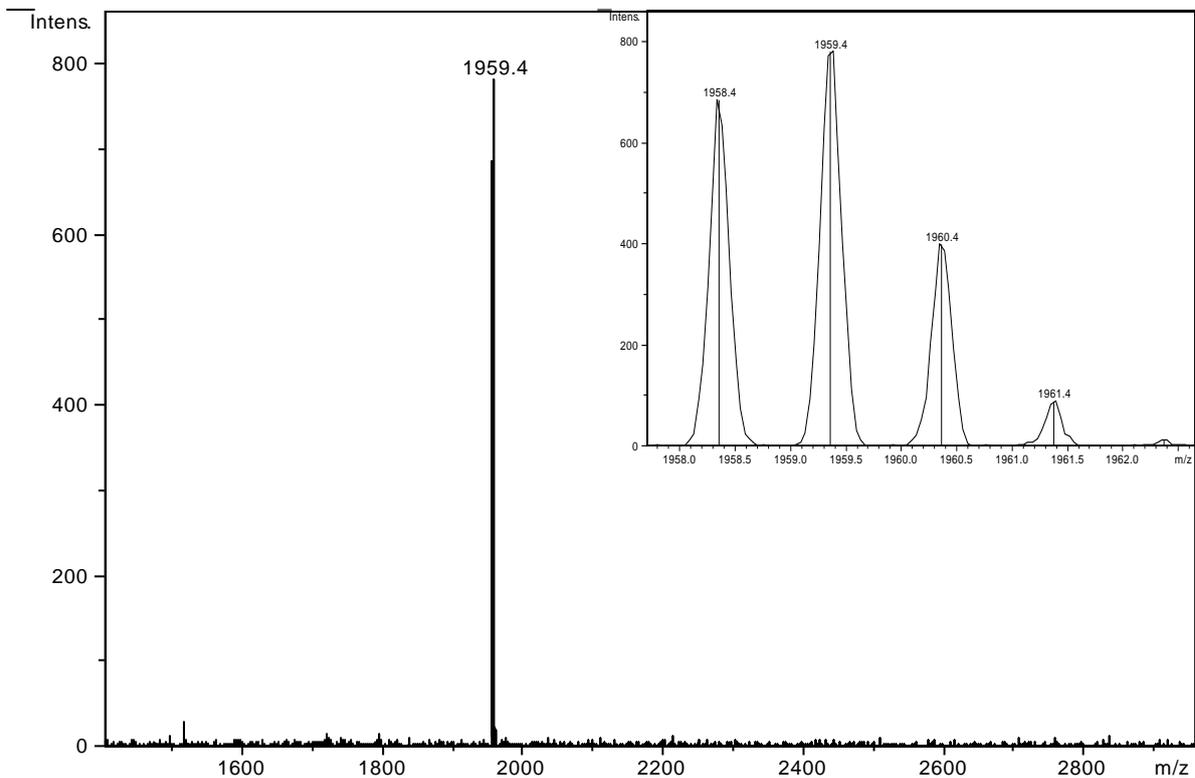


圖 34、應用 MALDI-TOF MS 鑑定合成純化後之 peptide DIB3。

將經 MALDI-TOF 質譜儀鑑定之 peptide DIB3 以蛋白質定量(BCA assay) 測定 peptide DIB3 的含量(圖 35、36)。

Plate#1													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													Endpoint
B													Lm1 562
C													Automix: Off
D	0.372	0.250	0.170	0.127	0.114	0.117			0.145	0.125			Calibrate: On
E	0.369	0.251	0.166	0.132	0.114	0.109			0.144	0.131			Plate Last Read:
F	0.376	0.246	0.168	0.135	0.119	0.116							04:53 下午 2010/3/21
G													
H													

Wavelength Combination: lLm1  
Mean Temperature: 33.7  
Data Mode: Absorbance

圖 35、利用 BCA assay 測定 peptide DIB3 的含量(1)。左邊 D1~D6、E1~E6 及 F1~F6 分別為 500、250、125、62.5、31.25 及 15.625  $\mu\text{g/mL}$  的 BSA 蛋白質，作為標準品；右邊 D9 及 E9 為未稀釋之 peptide DIB3，D10 及 E10 為兩倍稀釋之 peptide DIB3。

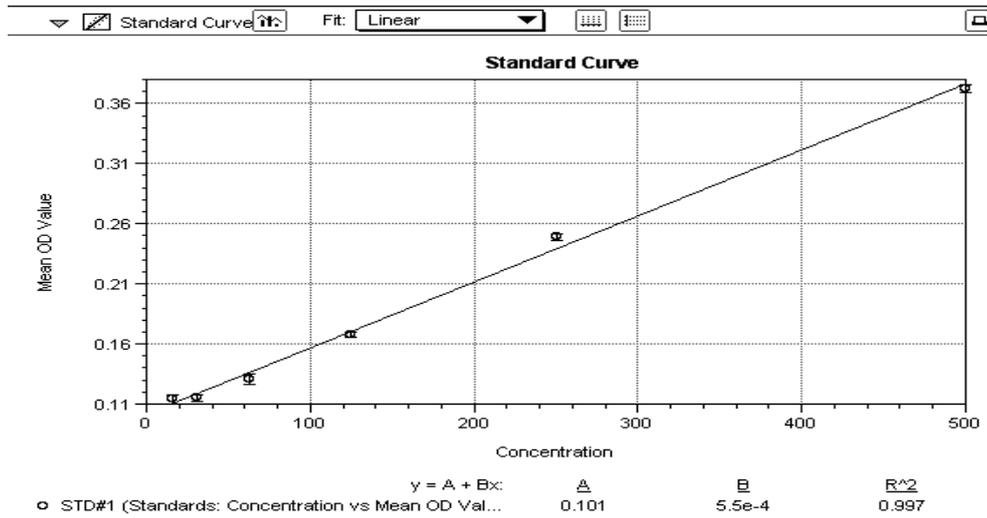


圖 36、利用 BCA assay 測定 peptide DIB3 的含量(2)。利用 BSA 吸光值作標準曲線圖，並測定 peptide DIB3 的含量為  $77 \mu\text{g}$ 。

結果測得 peptide DIB3 濃度為  $77 \mu\text{g/mL}$ ，換算為莫耳濃度為  $39 \mu\text{M}$ 。

## Id1 蛋白的定量

Id1 功能區塊蛋白質是由弘光科技大學生物科技系 陳擘老師所提供。Id1 功能區塊蛋白質經 MALDI-TOF 質譜儀鑑定分子量約為 6 KDa (如圖 37)，Id1 功能區塊蛋白質以 BCA assay(圖 38、39)。

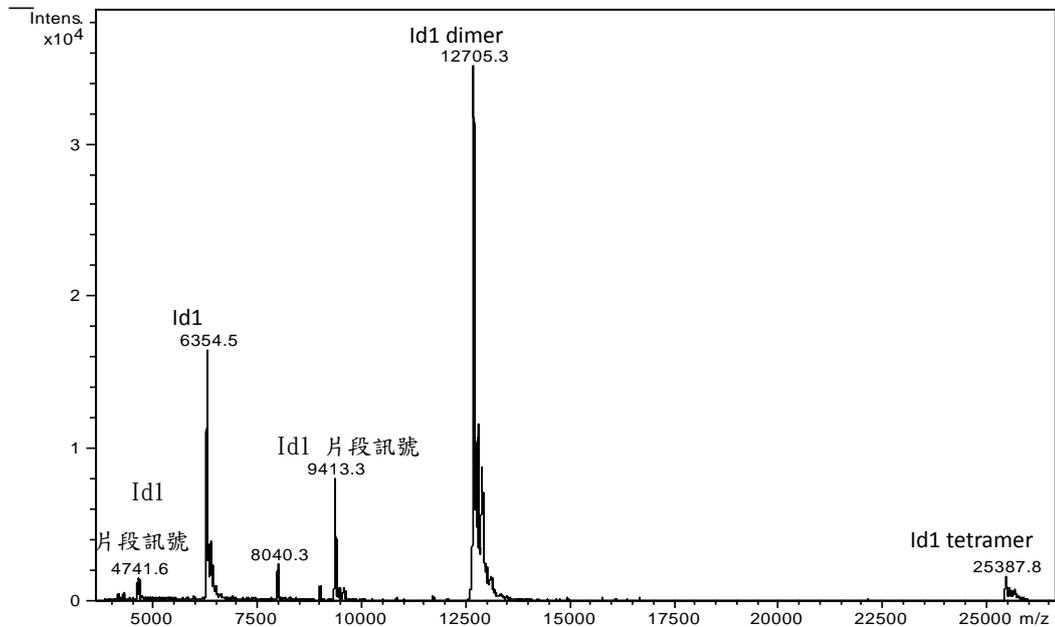


圖 37、應用 MALDI-TOF MS 鑑定 Id1 功能區塊蛋白質

Plate#1														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	0.441	0.262	0.183	0.102	0.078			0.143					Endpoint	
B	0.468	0.280	0.170	0.101	0.074			0.149					Lm1 562	
C	0.438	0.279	0.176	0.098	0.076			0.144					Automix: Off	
D													Calibrate: On	
E													Plate Last Read:	
F													11:21 下午 2010/3/25	
G														
H														

Wavelength Combination: !Lm1  
 Temperature Set Point: 37.0 Mean 37.0  
 Data Mode: Absorbance

圖 38、利用 BCA assay 測定 Id1 功能區塊蛋白質的含量(1)。左邊 A1~A5、B1~B5 及 C1~C5 分別為 1000、500、250、125 和 62.5  $\mu\text{g/mL}$  的 BSA 蛋白質，作為標準品；右邊 A8、B8 及 C8 為未稀釋之 Id1 功能區塊蛋白質。

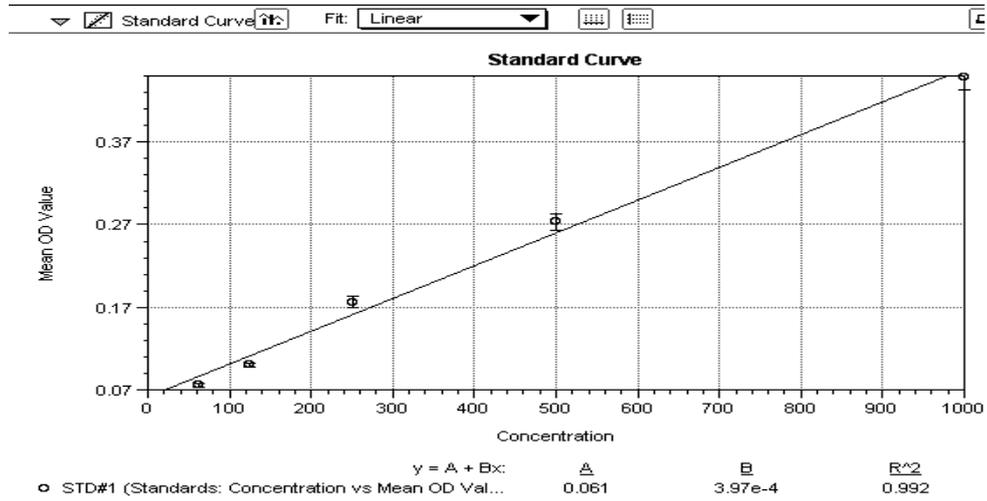


圖 39、利用 BCA assay 測定 Id1 功能區塊蛋白質的含量(2)。利用 BSA 吸光值作標準曲線圖，並測定 Id1 功能區塊蛋白質的含量為 200  $\mu\text{g}$ 。

結果顯示 Id1 功能區塊蛋白質濃度為 200  $\mu\text{g/mL}$ ，約莫為 30  $\mu\text{M}$ 。

## 胜肽進行整合測試

進行整合測試之前，必須先將 ESI-IT 質譜儀的雜訊降低，必須以二次水及 ACN 清洗(如圖 40)，二次水清洗雜訊強度須降至 1000 以下，ACN 清洗雜訊強度須降至 2000 以下，以排除雜訊對訊號的干擾(表廿)。

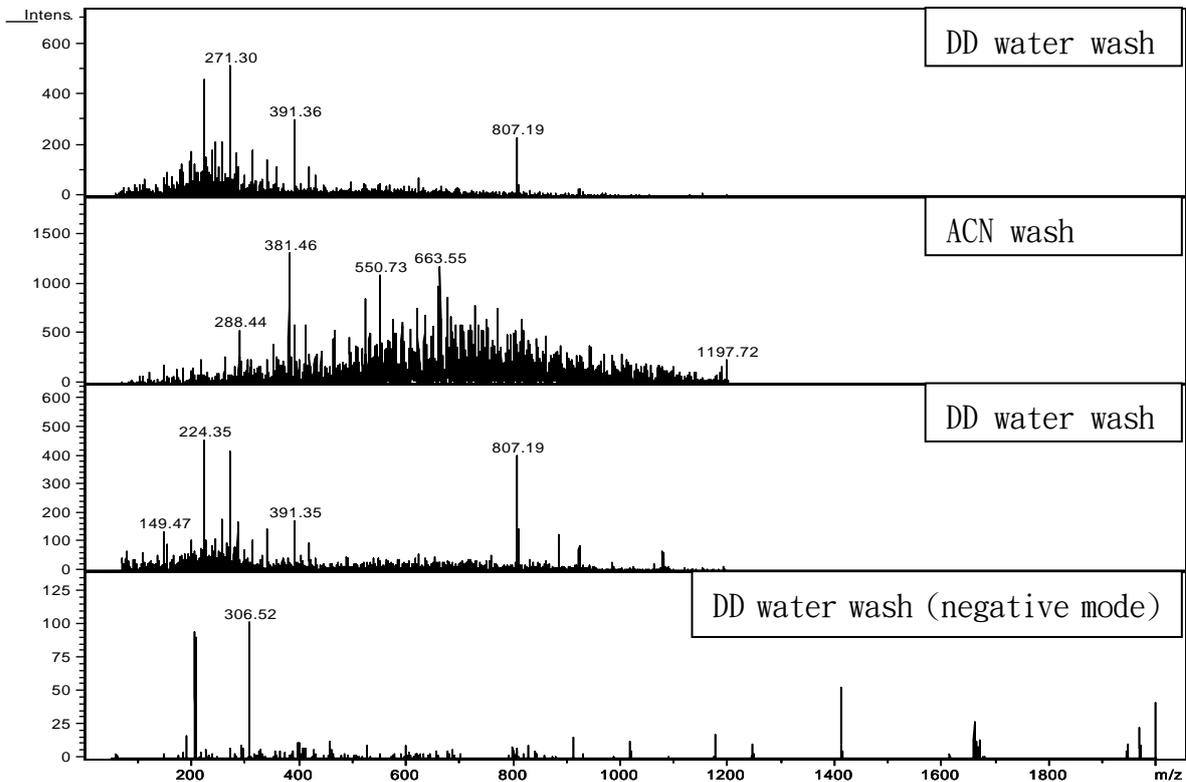


圖 40、ESI-IT 清潔維護訊號，將雜訊清洗到強度為 1000 以下。分別用二次水洗一次，再用 ACN 洗一次，最後再用二次水洗一次。最後用負電荷模式測試。

ESI-IT 質譜儀有兩種模式，分別是正電荷模式與負電荷模式，於進行整合測試前，須確定測試條件，因此，進行正、負電荷模式測試(如圖 41)，以統一接下來之測試實驗方法。

表廿、ESI-IT MS 常見的干擾訊號

## Common Background Ions for Electrospray (Positive Ion)

m/z	Ion	Compound	m/z	Ion	Compound
101	(M+Na) <sup>+</sup>	DMSO	267	(M+H) <sup>+</sup>	tributylphosphate
102	(M+H) <sup>+</sup>	triethylamine (TEA)	273	M <sup>+</sup>	monomethoxytrityl cation (MMT)
104/106	(M+Cu) <sup>+</sup>	acetonitrile	279	(M+H) <sup>+</sup>	dibutylphthalate (plasticiser)
105	(2M+Na) <sup>+</sup>	acetonitrile	282		plasticizer in polyethylene
120	(M+Na+CH <sub>3</sub> CN) <sup>+</sup>	DMSO	301	(M+Na) <sup>+</sup>	dibutylphthalate (plasticiser)
122	(M+H) <sup>+</sup>	Tris	317	(M+K) <sup>+</sup>	dibutylphthalate (plasticiser)
123	(M+H) <sup>+</sup>	dimethylaminopyridine (DMAP)	336	(M+H) <sup>+</sup>	tributyl tin formate
130	(M+H) <sup>+</sup>	diisopropylethylamine (DIPEA)	338	(M+H) <sup>+</sup>	erucamide
137	(M+ACN+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	DMSO	360	(M+Na) <sup>+</sup>	erucamide
144	(M+H) <sup>+</sup>	tripropylamine (TPA)	371	(M+H) <sup>+</sup>	polysiloxane, followed by 388
145/147	(2M+Cu) <sup>+</sup>	acetonitrile	391	(M+H) <sup>+</sup>	diisooctyl phthalate (plasticiser)
146	(3M+Na) <sup>+</sup>	acetonitrile	413	(M+Na) <sup>+</sup>	diisooctyl phthalate (plasticiser)
150	(M+H) <sup>+</sup>	phenyldiethylamine	425	(M+Na) <sup>+</sup>	unidentified contaminant
153	(M+H) <sup>+</sup>	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)			(plasticiser)
157	(2M+H) <sup>+</sup>	DMSO	429	(M+K) <sup>+</sup>	diisooctyl phthalate (plasticiser)
159	(M+Na)	sodium trifluoroacetate	445	(M+H) <sup>+</sup>	polysiloxane, followed by 462
179	(2M+Na) <sup>+</sup>	DMSO	449	(2M+H) <sup>+</sup>	dicyclohexyl urea (DCU)
186	(M+H) <sup>+</sup>	tributylamine	454	(M+Na+CH <sub>3</sub> CN) <sup>+</sup>	diisooctyl phthalate (plasticiser)
214		Unknown surfactant	522		Unknown <sup>†</sup>
217		Unidentified contaminant	550		Unknown <sup>†</sup>
225	(M+H) <sup>+</sup>	dicyclohexyl urea (DCU)	798	(2M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	diisooctyl phthalate (plasticiser)
231	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	Unknown <sup>†</sup>	803	(2M+Na) <sup>+</sup>	diisooctyl phthalate (plasticiser)
239/241	(M.HCl)2-Cl <sup>+</sup>	triethylamine	PFG polymers exhibit peaks 44 amu apart		
242	M <sup>+</sup>	tetrabutylammonium (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N) <sup>+</sup>	<b>Common Adducts:</b>		
243	M <sup>+</sup>	trityl cation	(M+NH <sub>4</sub> ) <sup>+</sup>	(M+18)	<b>CU (M<sub>n</sub> = 63.5)</b>
257	(3M+H) <sup>+</sup>	DMSO	(M+Na) <sup>+</sup>	(M+23)	
			(M+K) <sup>+</sup>	(M+39)	

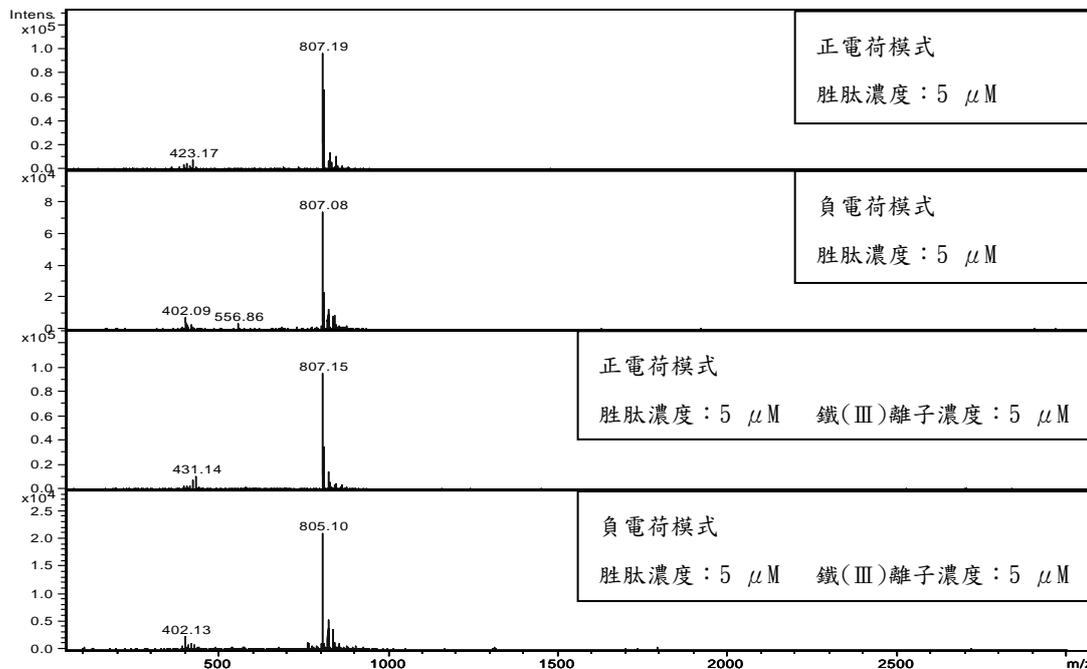


圖 41、應用 ESI – IT MS 正/負電荷模式鑑定 peptide DIB1 與鐵(III)離子螯合的結果。

由圖 41 的質譜圖顯示：在同樣的肽濃度下，正電荷模式的肽質荷比訊號強度高於負電荷模式的肽質荷比訊號強度，而且，正電荷模式下有出現螯合鐵(III)離子後，整個化合物帶二價的質荷比訊號 431；而負電荷模式無法有此質荷比訊號，反而有一疑似肽雙聚體且帶二價的質荷比訊號 402；比較之下，正電荷模式比較適合本實驗之測試，故選用正電荷模式來進行肽螯合金屬離子之測試。

### Peptide DIB1 螯合金屬離子實驗設定

固定肽濃度為 5  $\mu\text{M}$ ，分別對 5  $\mu\text{M}$ 、25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、500  $\mu\text{M}$  的金屬離子螯合後，用 ESI-IT 測定其分子量。

### 鐵(III)離子 ESI-IT 測試

首先，先推測螯合鐵(III)離子後，可能之訊號如表廿一。並依本次實驗設定，依序將螯合不同鐵(III)離子濃度之肽溶液經由 ESI-IT 質譜儀之正電荷模式鑑定其化合物分子量(如圖 42)。

表廿一、peptide DIB1 螯合鐵(III)離子 ESI-IT 測試訊號推測

一個 peptide 與一個離子	862.77
帶一價	862.77
帶二價	431.885
帶三價	288.2567

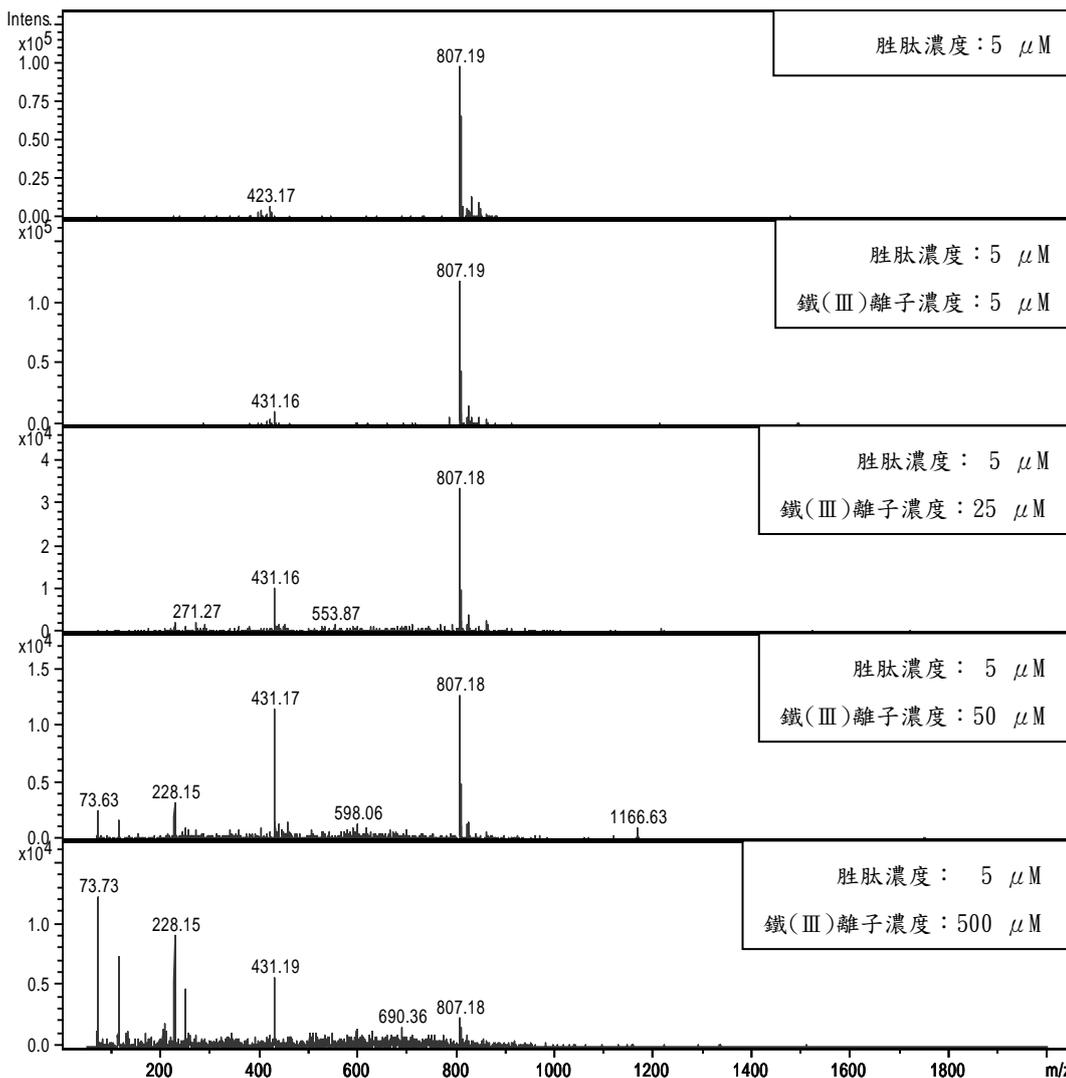


圖 42、應用 ESI-IT MS 正電荷模式鑑定 peptide DIB1 與鐵(III)離子螯合的結果(1)。胜肽濃度固定為 5 μM，鐵(III)離子分別為 0，5，25，50，500 μM (由上到下)。

自圖 42 結果顯示：

1. 胜肽分子量的訊號(807)峰質有隨著鐵(III)離子濃度越高，而越來越低的趨

勢，顯示胜肽的確進行螯合鐵(III)離子之反應。

2. 由 5  $\mu\text{M}$  胜肽分別與 5  $\mu\text{M}$ 、25  $\mu\text{M}$  及 50  $\mu\text{M}$  鐵(III)離子螯合後的質譜圖，可以輔助推測：胜肽確實與鐵(III)離子耦合，並出現螯合訊號於質荷比訊號為 431 之處，符合為其帶二價電荷之推測結果。
3. 檢視其中 5  $\mu\text{M}$  胜肽濃度與 50  $\mu\text{M}$  鐵(III)離子濃度的質譜圖(圖 43)，發現推測為帶二價電荷之化合物的同位素效應之質荷比訊號差異為 0.5 而非 1，證明其訊號為一帶二價之化合物。

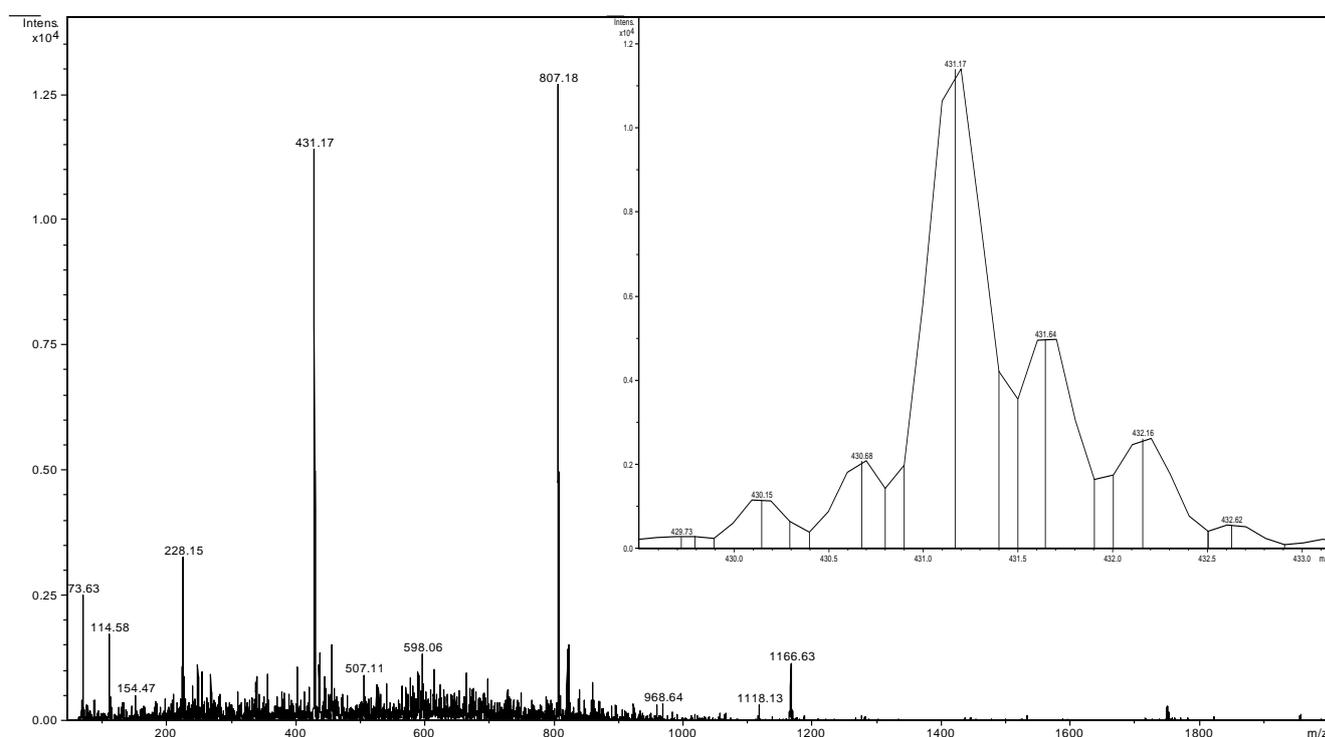


圖 43、5  $\mu\text{M}$  胜肽濃度與 50  $\mu\text{M}$  鐵(III)離子濃度的 ESI-IT MS 質譜圖。

4. 由 5  $\mu\text{M}$  胜肽分別與 25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$  及 500  $\mu\text{M}$  鐵(III)離子螯合後的質譜圖發現：胜肽分子量的訊號峰質隨著鐵(III)離子濃度越高而越低，但是胜肽螯合鐵(III)離子訊號卻未隨鐵(III)離子濃度越高而越高，推測可能是因為鐵(III)離子濃度過高影響胜肽的離子化，而非胜肽與鐵(III)離子螯合所致。
5. 比較 5  $\mu\text{M}$  胜肽分別與 5  $\mu\text{M}$ 、25  $\mu\text{M}$  及 50  $\mu\text{M}$  鐵(III)離子螯合後的質譜圖推測：胜肽與 25  $\mu\text{M}$  (五倍)鐵(III)離子濃度進行反應後，訊號強度達到最強質，顯示很可能只要一倍的胜肽與五倍的鐵(III)離子反應，及可達到螯合

之最大量。

6. 由 5  $\mu\text{M}$  胜肽分別與 50  $\mu\text{M}$ 、500  $\mu\text{M}$  鐵(III)離子螯合後的質譜圖顯示：質荷比訊號 228 及 73，有隨著鐵(III)離子濃度越高而訊號強度越高。為驗證質荷比訊號 228、73 與鐵(III)離子關係，需要單純鐵(III)離子的質譜圖(如圖 44)，以便進一步做比較。

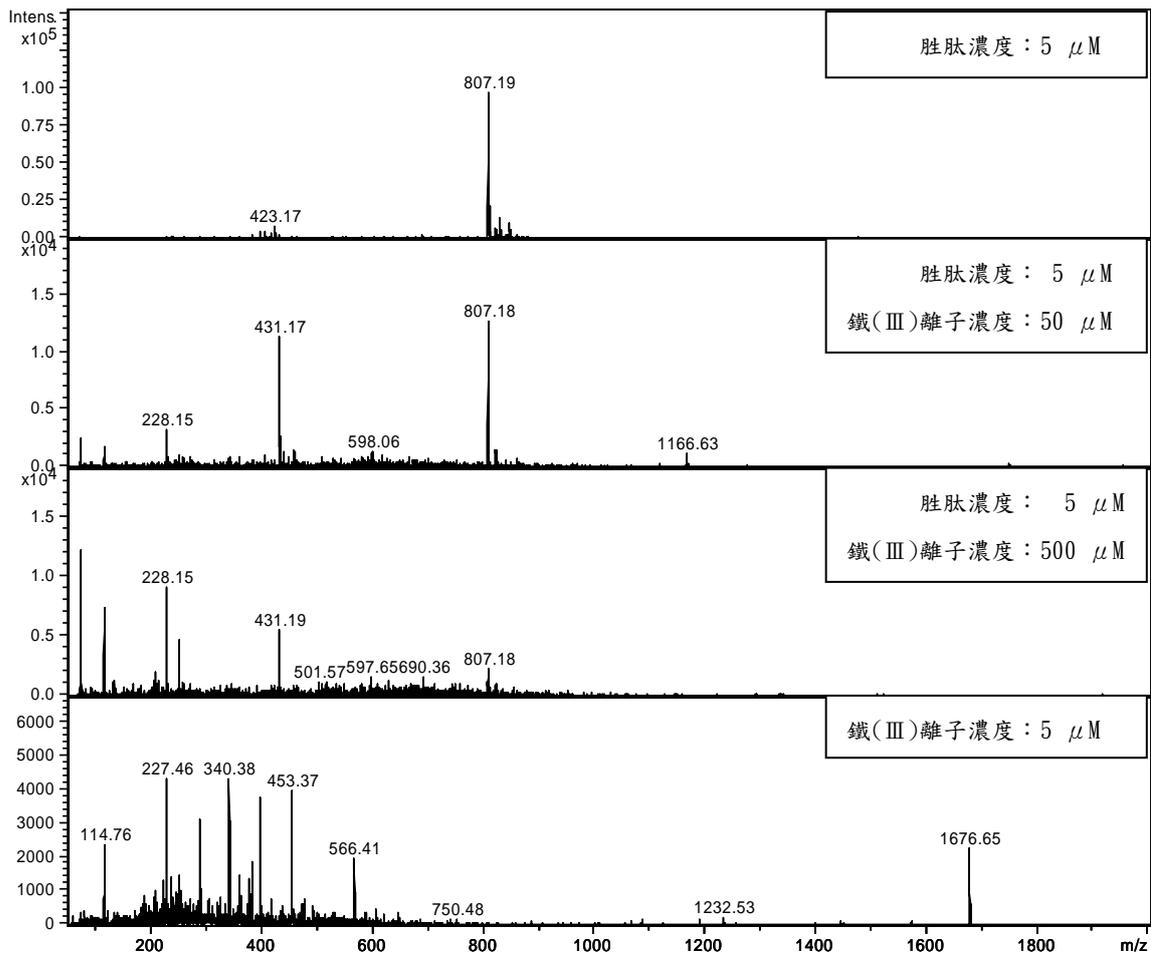


圖 44、應用 ESI-IT MS 正電荷模式鑑定 peptide DIB1 與鐵(III)離子螯合的結果(2)。胜肽濃度固定為 5  $\mu\text{M}$ ，鐵(III)離子分別為 0，50，500 $\mu\text{M}$  (由上到下)，以及單純鐵(III)離子。

由圖 44 可以得知：

質荷比訊號 228、73 的確會隨鐵(III)離子濃度越高而訊號越高，而且質荷比訊號 73 是來自於鐵(III)離子訊號中的 228 或是 114 帶多電荷的訊號；因此，質荷比訊號 228、73 的確是來自鐵(III)離子的訊號。

## 銅(II)離子 ESI-IT 測試

首先，先推測整合銅(II)離子後，可能之訊號如表廿二。並依本次實驗設定，依序將整合不同銅(II)離子濃度之胜肽溶液經由 ESI-IT 質譜儀之正電荷模式鑑定其分子量(如圖 44)。

表廿二、銅(II)離子 ESI-IT 測試訊號推測

一個 peptide 與一個金屬離子	870.77
帶一價	870.77
帶二價	435.885
帶三價	290.9233
帶四價	218.4425

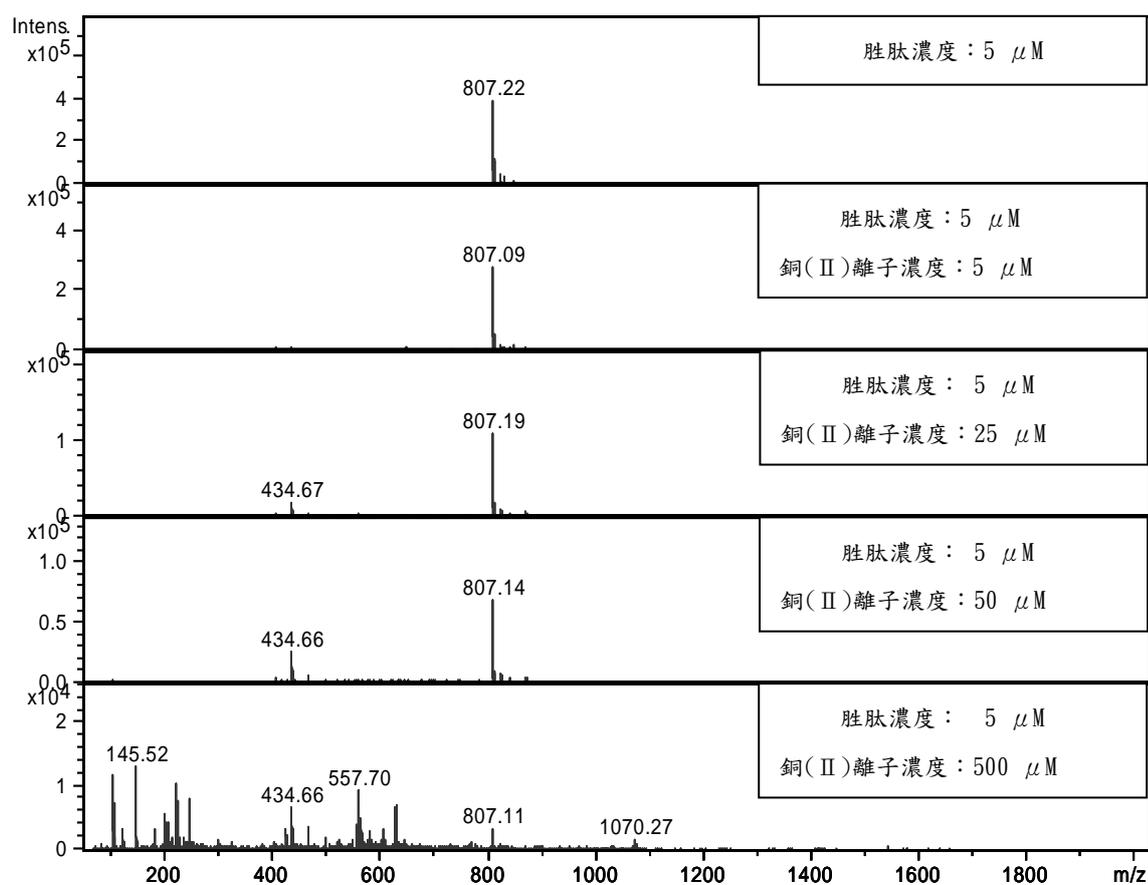


圖 45、應用 ESI-IT MS 正電荷模式鑑定 peptide DIB1 銅(II)離子整合的結果。胜肽濃度固定為 5  $\mu\text{M}$ ，銅(II)離子分別為 0，5，25，50，500 $\mu\text{M}$  (由上到下)。

由圖 45 可知：

1. 胜肽同樣也會與銅(II)離子進行螯合反應，且藉由表廿二之銅(II)離子 ESI-IT 測試訊號推測表得知胜肽可能是以一個 peptide 與一個金屬離子之方式形成一帶二價電荷之化合物。
2. 檢視其中  $5 \mu\text{M}$  胜肽濃度與  $50 \mu\text{M}$  銅(II)離子濃度的質譜圖(圖 46)，發現推測為帶二價電荷之化合物的同位素效應之質荷比訊號差異為 0.5 而非 1，證明其訊號為一帶二價之化合物。

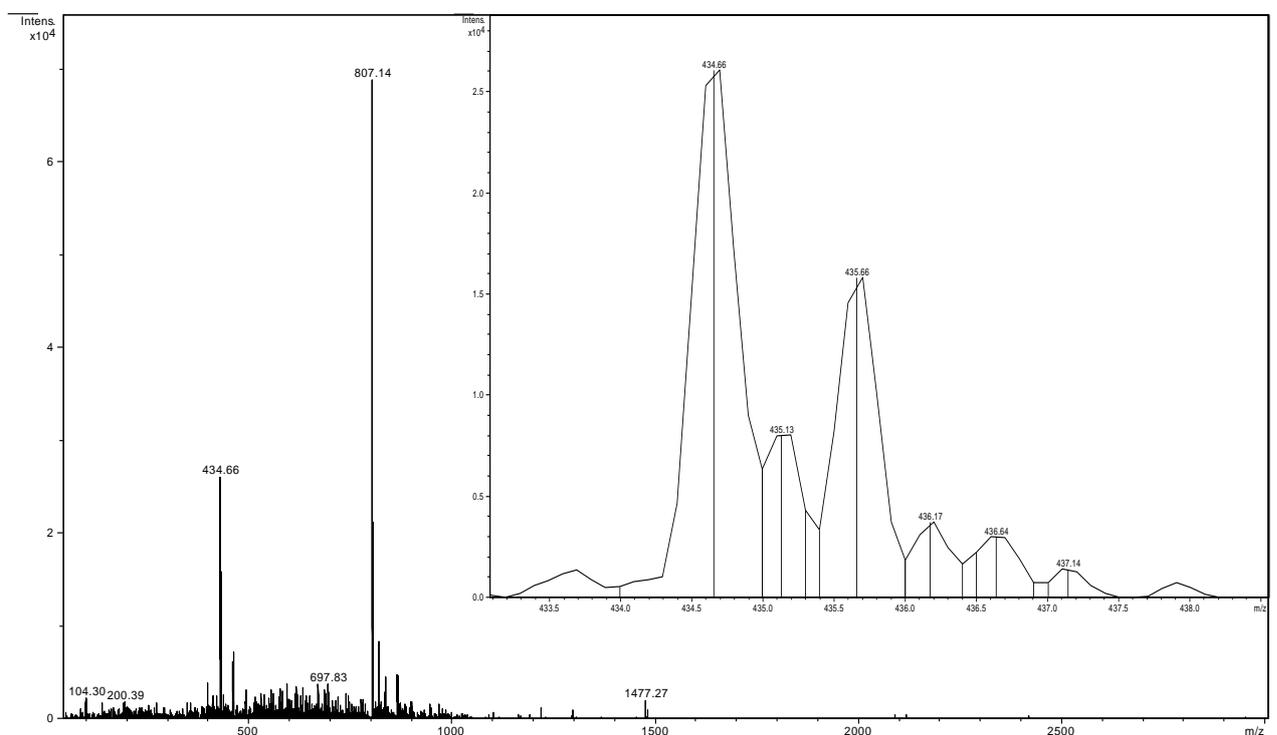


圖 46、 $5 \mu\text{M}$  胜肽濃度與  $50 \mu\text{M}$  銅(II)離子濃度的 ESI-IT MS 質譜圖。

3. 胜肽質荷比訊號強度隨銅(II)離子濃度越高，胜肽質荷比訊號強度越弱，而胜肽與銅(II)離子濃度比為 1:100 時，產物訊號強度反倒減弱，此實驗結果和胜肽與鐵(III)離子反應之結果相同；不同的是，胜肽與鐵(III)離子的螯合反應自  $5 \mu\text{M}$  鐵(III)離子及有明顯之螯合訊號，反觀胜肽與銅(II)離子反應，螯合訊號並未自  $5 \mu\text{M}$  銅(II)離子及有明顯之螯合訊號；而是到了胜肽與銅(II)離子濃度比為 1:5(當銅(II)離子濃度為  $25 \mu\text{M}$  時)，產物訊號突然出現且明顯；到了胜肽與銅(II)離子濃度比為 1:10 時，產物訊號強度

與濃度比為 1:5 的產物訊號強度差不多。顯示胜肽對鐵(III)離子的螯合反應性比胜肽對銅(II)離子的螯合反應性還高。

綜合胜肽螯合鐵(III)離子、銅(II)離子之實驗訊號推測可知：胜肽既可以與鐵(III)離子進行螯合反應，也可以與銅(II)離子進行螯合反應，也就是所設計的功能胜肽可以如同 EDTA 與金屬離子進行螯合反應。

### 胜肽(Peptide DIB1)降解蛋白测试

確認 peptide DIB1 具有螯合金屬離子之能力後，接下來需驗證螯合金屬離子之 peptide DIB1 是否與市售之 Ironbabe 一樣，具有降解的能力。

將市售之 Ironbabe 的使用說明書中的降解實驗步驟整理成流程圖(圖 47)，螯合金屬離子之 peptide DIB1 依此流程進行降解蛋白質能力之實驗，由於此時並未有前導胜肽，所降解之蛋白質不具有特定性，因此，降解蛋白質能力之實驗選用牛血清白蛋白(BSA)進行實驗。

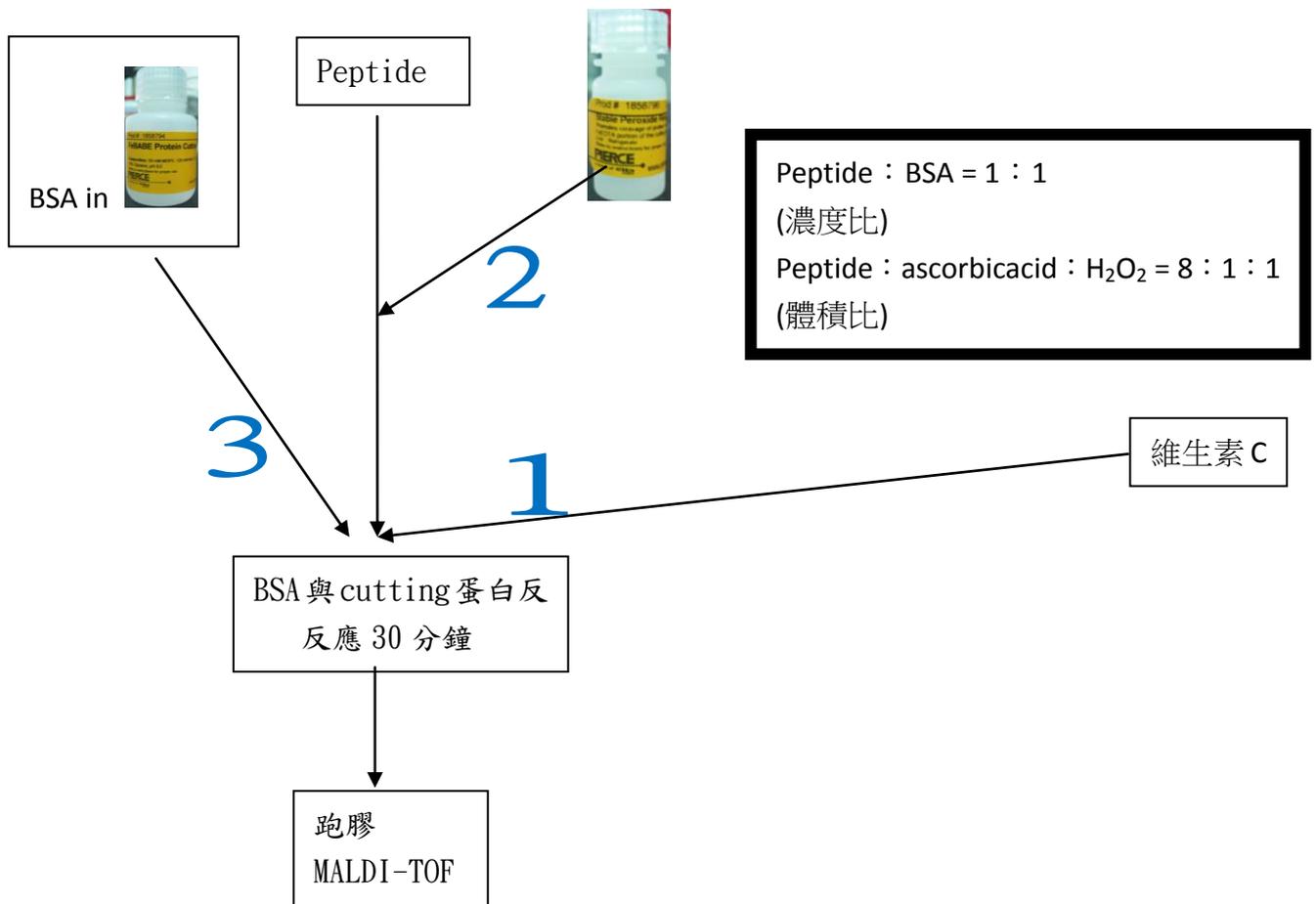


圖 47、降解蛋白質實驗流程圖

## 以 BSA 進行螯合金屬離子之 peptide DIB1 的降解蛋白質能力測試

根據，Peptide DIB1 與金屬離子以濃度比 1:1 混合，按照 Ironbabe 的使用說明書中的降解實驗步驟加入與 Peptide DIB1 同樣濃度之 BSA，螯合金離子的胨肽體積八分之一的 ascorbic acid 及  $H_2O_2$ 、於常溫下反應半小時，進行蛋白質電泳(如圖 48)，並進一步使用照膠系統推測反應後所剩之 BSA 含量(如表廿三)。

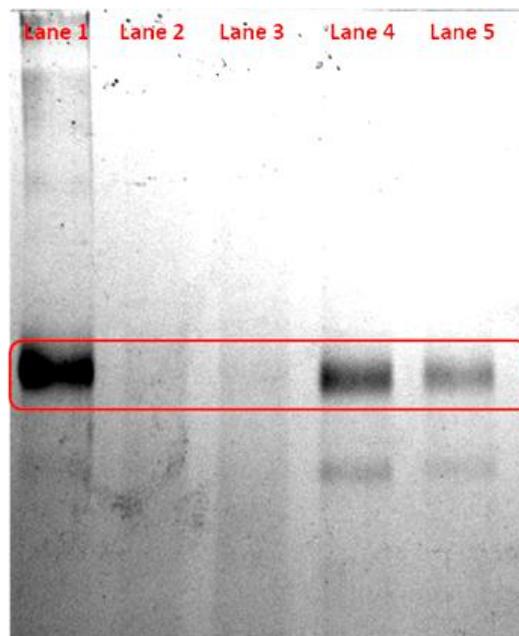


圖 48、利用牛血清白蛋白(BSA)測試 peptide DIB1 的降解蛋白質效力。

從左到右，Lane 1：只有牛血清白蛋白(BSA)；

Lane 2：牛血清白蛋白(BSA)混合螯合銅(II)離子的 peptide DIB1；

Lane 3<sup>a</sup>：牛血清白蛋白(BSA)混合螯合銅(II)離子的 peptide DIB1；

Lane 4<sup>b</sup>：牛血清白蛋白(BSA)混合螯合鐵(II)離子的 peptide DIB1；

Lane 5：牛血清白蛋白(BSA)混合螯合鐵(III)離子的 peptide DIB1。

<sup>a</sup> 在之前初步測試時螯合銅(II)離子的 peptide DIB1 的降解力強，在此多一次 BSA 混合螯合銅(II)離子的 peptide DIB1 是為了重複驗證螯合銅(II)離子的 peptide DIB1 的降解蛋白質的能力是否真的如此強。

<sup>b</sup> Fe(III)-NTA 是利用氧化還原來達到降解之功效，Fe(II)本身亦可氧化還原，因此試將 Fe(III)置換為 Fe(II)，測試 Fe(II)降解效果是否如同 Fe(III)的降解效果。

表廿三、利用照膠系統量化 BSA 的殘存量

	照膠系統量 化結果(ng)	BSA 所剩含 量百分比(%)
BSA (only)	285700	100.00
BSA 與螯合銅(II)之 peptide DIB1 反應半小時後	6357	2.23
BSA 與螯合銅(II)之 peptide DIB1 反應半小時後	10560	3.70
BSA 與螯合鐵(II)之 peptide DIB1 反應半小時後	179900	62.97
BSA 與螯合鐵(III)之 peptide DIB1 反應半小時後	101400	35.49

隨後並將反應半小時之混合物以 MALDI-TOF 質譜儀進行鑑定，觀測 BSA 被螯合金屬離子之 peptide DIB1 降解之情況(如圖 49)。

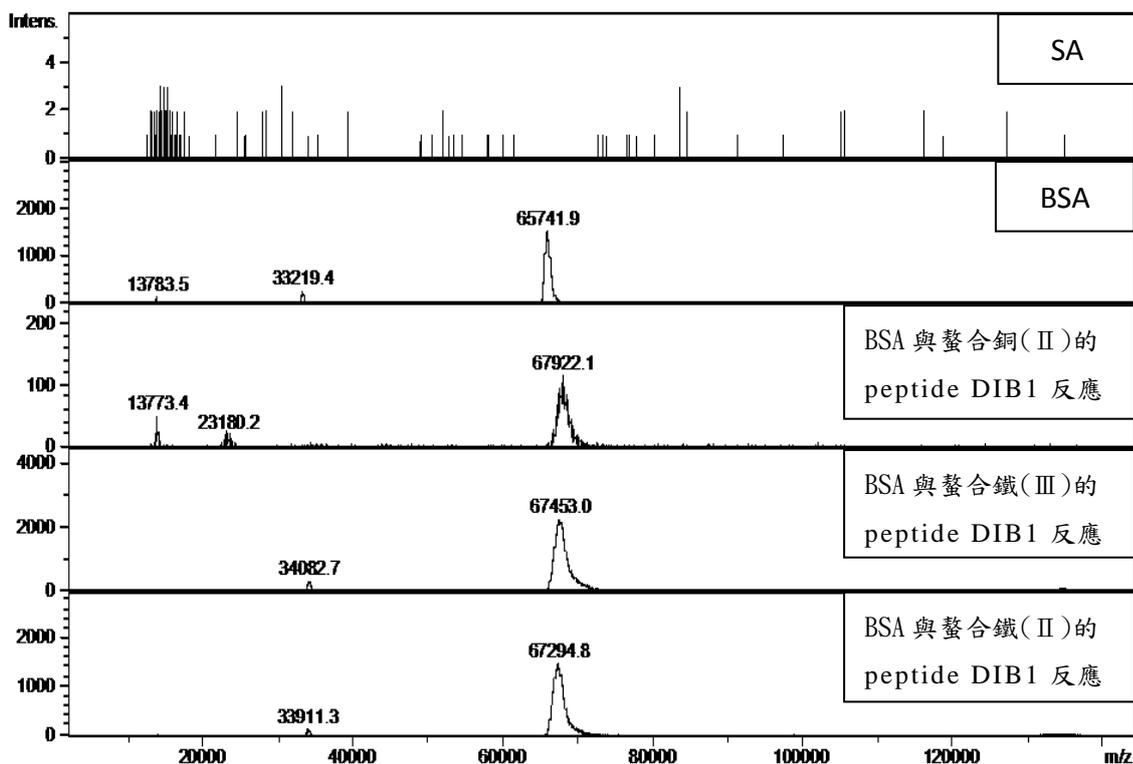


圖 49、應用 MALDI-TOF MS 以 High mass 模式鑑定螯合金屬離子的 peptide DIB1 與 BSA 反應結果。peptide DIB1 分別螯合同樣濃度之銅(II)、鐵(II)、鐵(III)離子。

BSA 分別與含有同樣濃度的銅(II)、鐵離子(III)之 peptide DIB1 反應，不論在蛋白質電泳實驗(圖 48)中，或是質譜儀鑑定(圖 49)實驗中，其結果皆顯示 peptide DIB1 螯合銅(II)離子降解蛋白質的能力最佳，這樣的結果證實螯合金屬離子之胜肽與市售之 Ironbabe 一樣，具有降解蛋白質之效力。其中，胜肽對於螯合銅(II)的能力並未比螯合鐵(III)的能力好，但是在降解蛋白質的能力上，卻發現是功能胜肽螯合銅(II)的效果為最佳。

比較圖 48 與圖 6(第 8 頁)發現，螯合鐵(III)的 peptide DIB1 可能與 Fe(III)-NTA 作用不太一樣，實驗中得到的電泳圖並未如圖 6 一般，具有一固定的作用點。可能比較像 carboxypeptidase，將之切成較小的胺基酸。

值得注意的是：胜肽分別螯合鐵(III)離子與鐵(II)離子後，所造成的降解效果有差異性，由照膠系統量化後的比例發現其降解效果差了一倍。在此提出一個大膽之假設：降解效果以高氧化態的金屬離子為佳，可能是因為在反應過程中，金屬離子是先還原再氧化，因此降解效果以高氧化態的金屬離子較佳。

*Id1* 功能區塊蛋白質與螯合金屬離子之 peptide DIB2 反應，以 MALDI-TOF 質譜儀鑑定 *Id1* 功能區塊蛋白質是否會被降解

驗證選擇性實驗設定為

胜肽濃度：牛血清白蛋白濃度：*Id1* 功能區塊蛋白濃度為 1：1：1；

胜肽濃度：金屬離子濃度為 2：1；1：1；1：10；

胜肽體積：過氧化氫體積：維他命 C 體積為 8：1：1，

反應 30 分鐘後，以 1:1 與基質混合，並使其於樣品盤上乾燥，應用 MALDI-TOF 質譜儀檢測。

由於功能胜肽 N 端有一段前導標靶胜肽，所以 peptide DIB2 分別螯合鐵(III)、銅(II)後，依上述實驗設定對 *Id1* 功能區塊蛋白質進行降解蛋白質實驗(圖 50、圖 51)，並比較螯合不同比例之金屬離子對降解蛋白質之能力差異性。

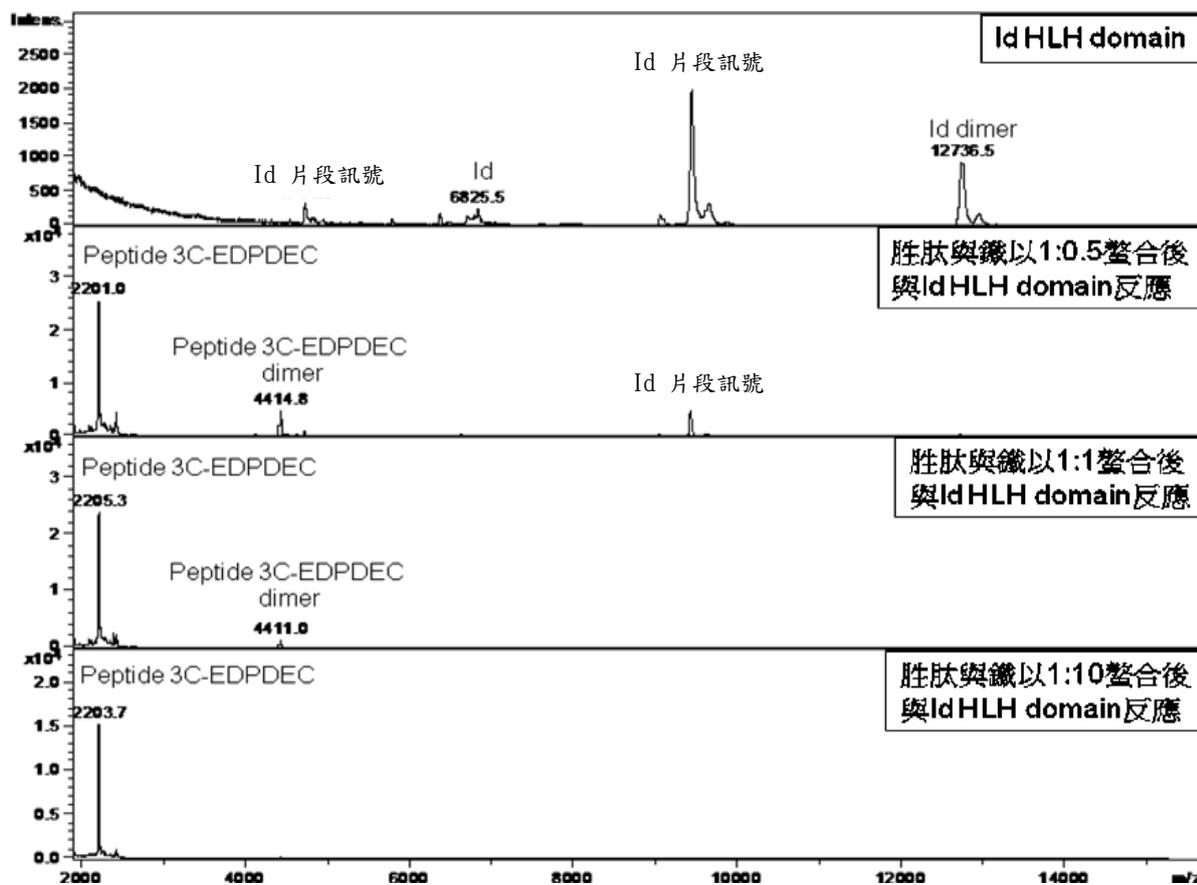


圖 50、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5\_20 kDa 模式鑑定混合不同濃度比例的鐵(III)離子的 peptide DIB2 與 *Id1* 功能區塊蛋白質反應的結果。

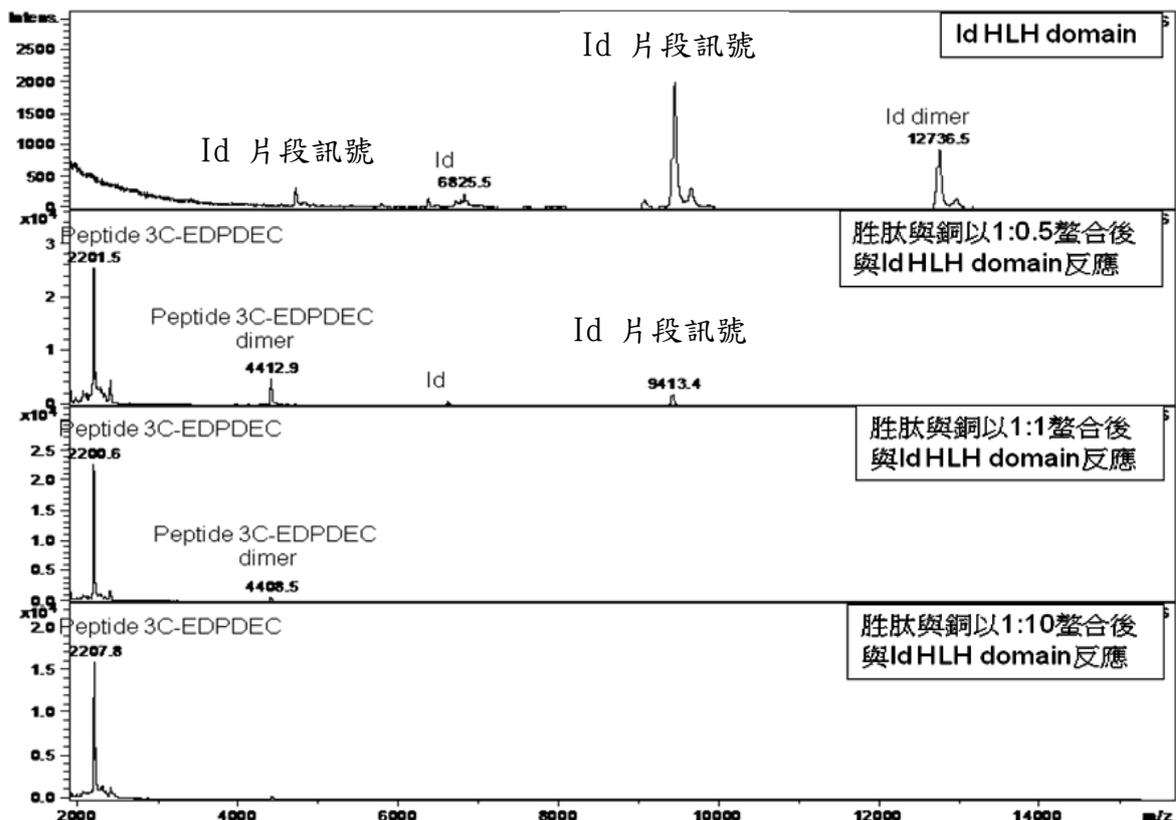


圖 51、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5\_20 kDa 模式鑑定混合不同濃度比例的銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質反應的結果。

比較同樣比例濃度的鐵(III)、銅(II)離子發現：實際運用在蛋白質降解實驗上，似乎兩種金屬離子的功效差異不大，與之前 peptide DIB1 對於 BSA 進行降解實驗測試有出入；可能是因為 peptide DIB2 於 N 端比 peptide DIB1 多了一段對於 Id1 功能區塊蛋白質專一性較佳的胜肽，多了前導標靶胜肽對於降解 Id1 功能區塊蛋白質的功效似乎較佳。證實前導標靶胜肽的確對於 Id1 功能區塊蛋白質具有極高之專一性，進而克服螯合不同金屬離子所具有之降解蛋白質能力差異。

相較不具前導標靶胜肽之 peptide DIB1 進行降解 BSA 蛋白質實驗測試與具有前導標靶胜肽之 peptide DIB2 進行降解 Id1 功能區塊蛋白質實驗測試，不具前導標靶胜肽之 peptide DIB1 進行降解 BSA 蛋白質實驗測試要較高的金屬含量有明顯之效果；而具有前導標靶胜肽之 peptide DIB2 進行降解 Id1 功能區塊蛋白質實驗測試只要一半的金屬含量即具有相似的效果。因為金屬與胜肽為一比一可能會有未被螯合的過剩離子被 BSA 蛋白質螯合，由於 BSA

蛋白質會形成二聚體，進而發生降解 BSA 蛋白質之情況，導致不易比較是否具有選擇性，因此未來將以金屬與胜肽為一比二的方式進行選擇性降解蛋白質實驗。

具有市售 Ironbabe 之 peptide DIB3，對 Id1 功能區塊蛋白質進行降解蛋白質實驗(圖 52)，以確定 peptide DIB3 是否具有降解蛋白質之能力。

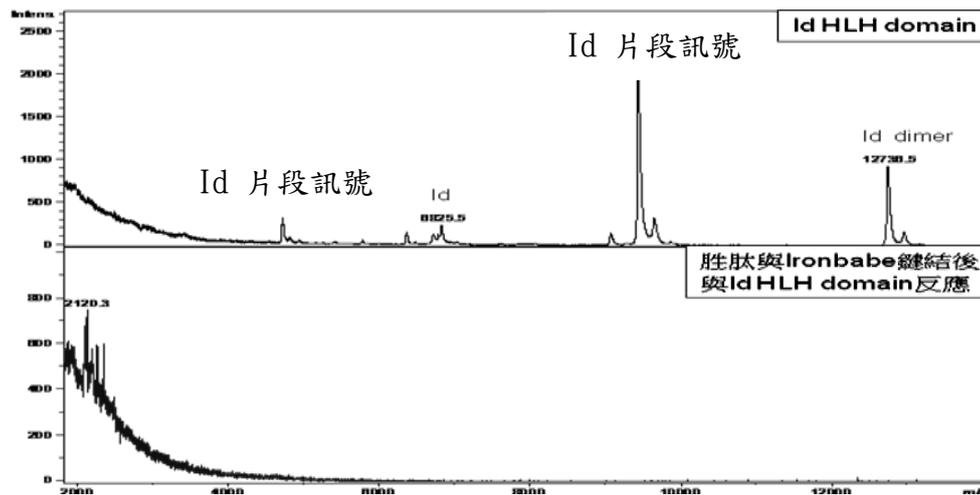


圖 52、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5\_20 kDa 模式鑑定 peptide DIB3 與 Id1 功能區塊蛋白質反應的結果。Peptide DIB3 的濃度與 Id1 功能區塊蛋白質的濃度相同。

從圖 52 中可以發現: peptide DIB3 降解能力相當好，推測是因為本實驗室固定胜肽濃度，而使 peptide DIB3 降解蛋白質之能力遠遠大於胜肽與金屬離子以二比一的方式進行實驗之結果。

比較圖 50、圖 51 及圖 52，發現 peptide DIB2 的確與 peptide DIB3 具有降解蛋白質之能力。在前導標靶胜肽 C 端再接續功能胜肽序列似乎並未影響前導標靶胜肽對於目標蛋白質之親和力及功能胜肽之功能性。

## peptide DIB2、peptide DIB3 對 Id1 功能區塊蛋白質是否具有選擇性降解蛋白質的測試

### 實驗設定

胜肽濃度：牛血清白蛋白濃度：Id1 功能區塊蛋白濃度為 1：1：1；

胜肽濃度：金屬離子濃度為 2：1；

胜肽體積：過氧化氫體積：維他命 C 體積為 8：1：1，

反應 30 分鐘後，以 1：1 與基質混合，並使其於盤上乾燥，送入 MALDI-TOF MS 檢測。

先將 peptide DIB2 分別螯合鐵(III)、銅(II)離子後，依上述之實驗設定分別進行是否具有選擇性降解蛋白質之測試(圖 53)。

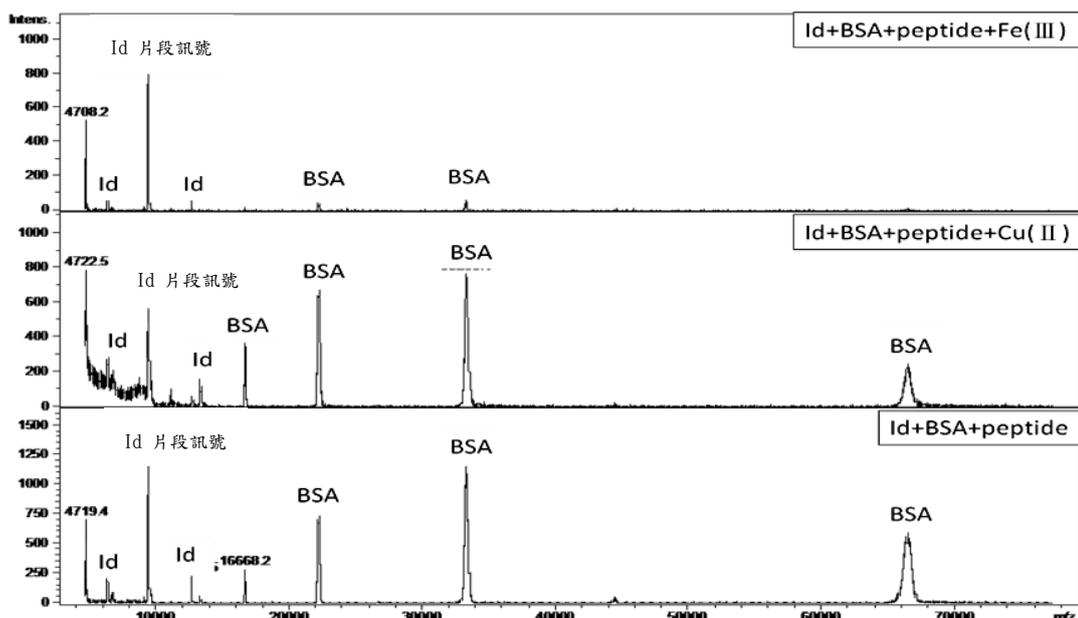


圖 53、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 LP 5\_20 kDa 模式鑑定分別螯合鐵(III)、銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後的結果。

結果顯示，降解蛋白質的選擇性上，peptide DIB2 螯合銅(II)離子的專一性比 peptide DIB2 螯合鐵(III)離子的專一性來的高，且降解能力似乎也以 peptide DIB2 螯合銅(II)離子降解蛋白質的能力較佳。

試著將 peptide DIB3 與 peptide DIB2 分別螯合鐵(III)、銅(II)離子，並依上述之實驗設定(但 peptide DIB3 的濃度照金屬離子之濃度)分別進行是否

具有選擇性降解蛋白質之測試(圖 54)比較。

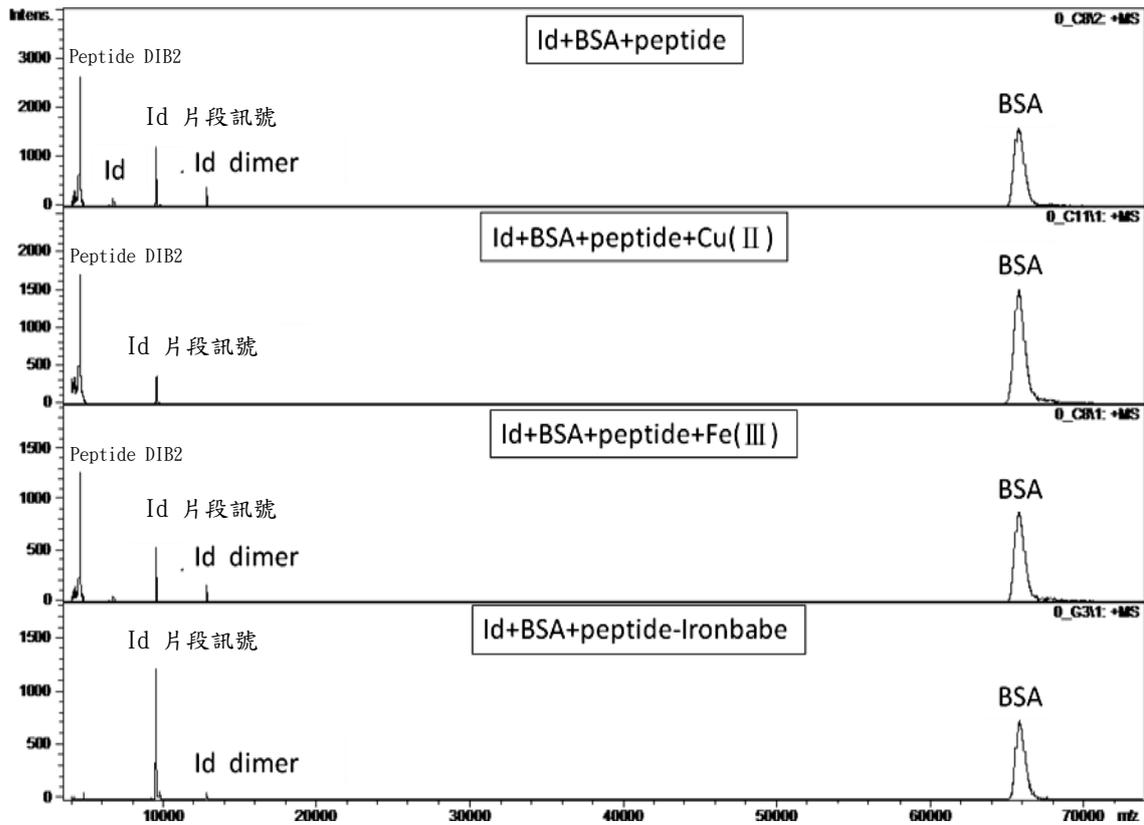


圖 54、應用 MALDI-TOF 質譜儀以 HighMass 模式鑑定分別螯合鐵(III)、銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後以及 peptide DIB3 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後的結果。

實驗結果再次驗證 peptide DIB2 螯合銅(II)離子的專一性比 peptide DIB2 螯合鐵(III)離子的專一性來的高，且降解能力似乎也以 peptide DIB2 螯合銅(II)離子降解蛋白質的能力較佳；且在同樣都是螯合鐵(III)離子，peptide DIB2 螯合鐵(III)離子的降解蛋白質的效果比 peptide DIB3(前導標靶胜肽鍵結市售 Ironbabe)的降解蛋白質的效果要明顯。

對於 peptide DIB3 於一系列之實驗驗證下，推測有可能是 C 端的 Cystein 對於前導標靶胜肽與 Id1 功能區塊蛋白質之間的作用力有影響，使得蛋白質與生態的作用力變小，導致反應性變差。

將分別螯合鐵(III)、銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後，以及 peptide DIB3 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後的結果以廠商 Bruke 的軟體轉為面積量化顯示為下表廿四。

表廿四、分別螯合鐵(III)、銅(II)離子的 peptide DIB2 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後，以及 peptide DIB3 與 Id1 功能區塊蛋白質以及 BSA 反應後的結果的訊號面積積分值

	Id 蛋白質	Id 蛋白質所剩含量 (%) <sup>a</sup>	BSA 蛋白質	BSA 蛋白質所剩含量 (%) <sup>b</sup>	Id 蛋白質的相對含量 (%) <sup>c</sup>
降解作用前	108809	100	1058023	100	9.33
以銅(II)離子進行降解作用後	23023	21.16	1061978	100.37	2.12
以鐵(III)離子進行降解作用後	43841	40.29	240646	22.74	15.41
以 Fe(III)-NTA 進行降解作用後	46368	42.61	278276	26.30	14.28

<sup>a</sup> (Id 的訊號面積)/(降解作用前 Id 的訊號面積)\*100%

<sup>b</sup> (BSA 的訊號面積)/(降解作用前 BSA 的訊號面積)\*100%

<sup>c</sup> (Id 的訊號面積)/(Id 的訊號面積+BSA 的訊號面積)\*100%

由表廿四的 Id 蛋白質所剩含量中可知：螯合銅(II)離子的 peptide DIB2 降解 Id 蛋白質的效果最佳，此結果亦可藉由 Id 蛋白質的相對含量比較得出。若以螯合金屬離子進行降解作用後，Id 蛋白質的相對含量低於未進行降解作用前的 Id 蛋白質的相對含量，因為其中 Id 的訊號面積迅速下降，而 BSA 的訊號面積不變，進而 Id 蛋白質的相對含量降低，表示降解作用對 Id1 蛋白質專一性較強；若以螯合金屬離子進行降解作用後，Id 蛋白質的相對含量高於或是等於未進行降解作用前的 Id 蛋白質的相對含量，則表示其專一性較弱。從 Id 蛋白質的相對含量、所剩含量及 BSA 的所剩含量，可推知：螯合銅(II)離子的 peptide DIB2 其為一具專一性、選擇性及降解效力之胜肽。

## 細胞實驗

peptide DIB1 的功用就如同是鐵的螯合劑<sup>32-35</sup>，參考國際期刊發表之金屬螯合劑相關論文，發現鐵的螯合劑可以應用於抗癌藥物，如 2004 年 Rong Zhao et. al 發表 tachpyridine (圖 55)於 16  $\mu\text{M}$  下，對於人類乳癌細胞(SUM 149)就有明顯的抑制效果<sup>36</sup>(圖 56)。

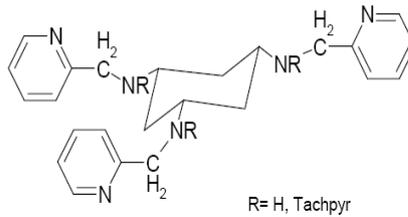


圖 55、tachpyridine 結構<sup>35</sup>。

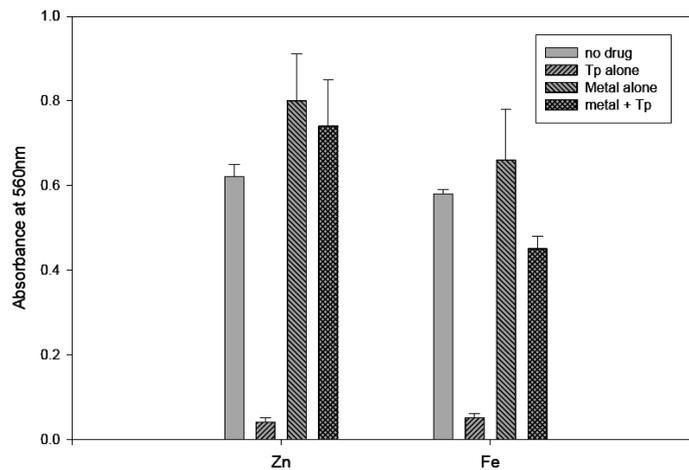


Fig. 7. Protection from tachpyridine cytotoxicity by pre-treatment with zinc or iron. SUM149 cells were treated for 24 h with growth medium containing no additional metals, 25  $\mu\text{M}$  zinc sulfate or 200  $\mu\text{M}$  iron sulfate. After 24 h cells were washed, the medium replaced with medium containing no supplements, and 16  $\mu\text{M}$  tachpyridine added. Incubation was continued for 72 h and viable cells assessed by an MTS assay. Means and standard deviations of three replicate cultures are shown. A representative experiment of three independent experiments is shown.

圖 56、tachpyridine 對人類乳癌細胞 SUM 149 細胞株做 MTT assay 測試細胞存活率。內有單純添加 tachpyridine、單純添加金屬離子、同時添加 tachpyridine 與金屬離子<sup>35</sup>。

由於 tachpyridine 於 16  $\mu\text{M}$  下，對於人類乳癌細胞(SUM 149)就有很明顯的抑制性，因此，細胞實驗先以未螯合金屬離子的 peptide DIB1 以 25  $\mu\text{M}$  及 50  $\mu\text{M}$  進行細胞實驗(圖 57)，觀察具有螯合金屬離子功能之 peptide DIB1 是

否也具有類似的抑制效果。

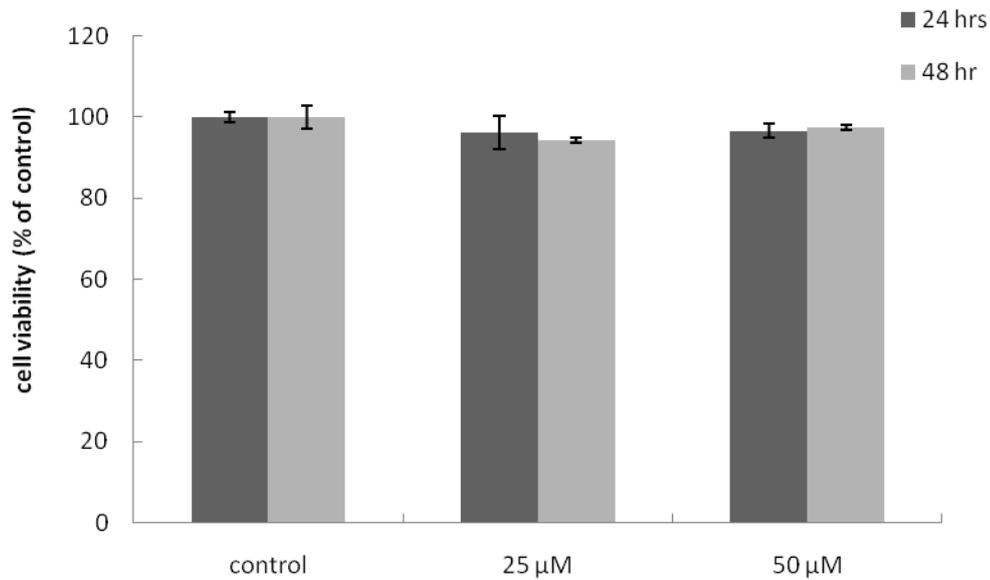


圖 57、未螯合金屬離子的 peptide DIB1 對人類乳癌細胞 MCF-7 細胞株的細胞存活率測試。胜肽濃度為 25 μM 及 50 μM，測試 24 小時及 48 小時的細胞存活率。

結果顯示藥效與胜肽濃度並無相關，且顯示胜肽無抑制細胞存活率，與其他鐵的螯合劑所顯示的效力不同。推測原因為胜肽帶過多負電荷，導致胜肽無法進入細胞中。建議解決方式為：(1)具有穿透性前導胜肽，peptide 3C(即為本篇 peptide 3C)為實驗室內部已證實具有抑制力的胜肽，而具有抑制力的胜肽推測應有穿透性，可以以 Peptide DIB2 作為細胞存活率測試來驗證。；(2)使用 liposome 將胜肽送入細胞內。

## 11. 總結

總合本篇論文，實驗到目前為止，幾個重要實驗結果如下：

- a. 本篇論文所設計之功能性胜肽確實與市售之 ProFund™ Protein Interaction Mapping Kit 中 Ironbabe 的能力相仿，都具有降解蛋白質的功能(圖 48、圖 49、表廿三)。
- b. 本實驗所設計之胜肽與市售之 ProFund™ Protein Interaction Mapping Kit 分別於 N 端接了前導標靶胜肽後，對於降解蛋白質都具有選擇性(圖 54)，並未影響其降解功能，似乎也未影響前端標靶胜肽的功能。
- c. 本實驗所設計之 peptide DIB2 螯合銅(II)離子的專一性比 peptide DIB2 螯合鐵(III)離子的專一性來的高，且降解能力似乎也以 peptide DIB2 螯合銅(II)離子降解蛋白質的能力較佳；且在同樣都是螯合鐵(III)離子，peptide DIB2 螯合鐵(III)離子的降解蛋白質的效果比 peptide DIB3(鍵結市售 Ironbabe)的降解蛋白質的效果要明顯(圖 54、表廿四)。  
探討其可能的因素為銅(II)離子在非磷酸根緩衝溶液中，銅(II)離子與羧基的結合比鐵(III)離子與羧基的結合更穩定<sup>36</sup>，而使螯合銅(II)離子之作用功效較佳。
- d. 就目前的細胞實驗部分，peptide DIB1 雖然為金屬的螯合劑，但是於細胞活性實驗中，並未發現 peptide DIB1 對於細胞之活性具有抑制效果(圖 57)。

## 12. 後續工作

本篇論文，實驗到目前為止，尚有部分實驗尚待釐清或加以驗證，實驗如下：

- a. 未螯合金屬離子的 peptide DIB2 做細胞活性測試 (含維他命 C 與穩定過氧化物的溶液)。
- b. 分別螯合金屬離子的 peptide DIB1 與 peptide DIB2 細胞活性測試 (不含維他命 C 與穩定過氧化物的溶液)。
- c. 分別螯合金屬離子的 peptide DIB1 與 peptide DIB2 做細胞活性測試 (含維他命 C 與穩定過氧化物的溶液)。
- d. 維他命 C 與過氧化物溶液的細胞活性測試。
- e. 使用 SPR 測試 peptide DIB2 與 Id1 蛋白質的親和力。(余亮 博士)
- f. 以低濃度的金屬離子( $2.5 \mu\text{M}$ )與胜肽( $5 \mu\text{M}$ )以 ESI-IT MS 分析，確認是否有形成化合物。(駱碧秀 博士)
- g. 以結晶或 NMR 定化合物之結構。(陳擘 博士)
- h. 以螯合金屬離子的 peptide DIB1 測試圖 6 的蛋白質，藉以驗證 peptide DIB1 是否對其他蛋白質是否亦有降解之能力。(陳擘 博士)
- i.  $\text{H}_2\text{O}_2$  對螯合銅(II)離子的 peptide DIB2 的降解能力之影響。(駱碧秀 博士)
- j. 螯合金屬離子的 peptide DIB1 降解 BSA 蛋白質的電泳圖應加入 marker 及 Fe(III)-NTA 與 BSA 蛋白質反應。(駱碧秀 博士、陳擘 博士)
- k. 以更小的 iron chelator 與胜肽鍵結，以增加胜肽對蛋白質的親和力。  
(余亮 博士)

### 13. 參考文獻

1. Jan, Y. N.; Jan, L. Y., Functional gene cassettes in development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, (18), 8305-7.
2. Olson, E. N.; Klein, W. H., bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev* **1994**, 8, (1), 1-8.
3. Weintraub, H., The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* **1993**, 75, (7), 1241-4.
4. Murre, C.; Bain, G.; van Dijk, M. A.; Engel, I.; Furnari, B. A.; Massari, M. E.; Matthews, J. R.; Quong, M. W.; Rivera, R. R.; Stuiver, M. H., Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* **1994**, 1218, (2), 129-35.
5. Kiewitz, S. D.; Kruppa, M.; Riechers, A.; Konig, B.; Cabrele, C., Recognition of the helix-loop-helix domain of the Id proteins by an artificial luminescent metal complex receptor. *J Mol Recognit* **2008**, 21, (2), 79-88.
6. Lyden, D.; Young, A. Z.; Zagzag, D.; Yan, W.; Gerald, W.; O'Reilly, R.; Bader, B. L.; Hynes, R. O.; Zhuang, Y.; Manova, K.; Benezra, R., Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* **1999**, 401, (6754), 670-7.
7. Lin, C. Q.; Singh, J.; Murata, K.; Itahana, Y.; Parrinello, S.; Liang, S. H.; Gillett, C. E.; Campisi, J.; Desprez, P. Y., A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* **2000**, 60, (5), 1332-40.
8. Takai, N.; Miyazaki, T.; Fujisawa, K.; Nasu, K.; Miyakawa, I., Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* **2001**, 165, (2), 185-93.
9. McAllister, S. D.; Christian, R. T.; Horowitz, M. P.; Garcia, A.; Desprez, P. Y.,

Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2007**, 6, (11), 2921-7.

- 10.** Fong, S.; Itahana, Y.; Sumida, T.; Singh, J.; Coppe, J. P.; Liu, Y.; Richards, P. C.; Bennington, J. L.; Lee, N. M.; Debs, R. J.; Desprez, P. Y., Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100, (23), 13543-8.
- 11.** Perk, J.; Iavarone, A.; Benezra, R., Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5, (8), 603-14.
- 12.** Lasorella, A.; Uo, T.; Iavarone, A., Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene* **2001**, 20, (58), 8326-33.
- 13.** Fong, S.; Debs, R. J.; Desprez, P. Y., Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med* **2004**, 10, (8), 387-92.
- 14.** Chen, C. H.; Kuo, S. C.; Huang, L. J.; Hsu, M. H.; Lung, F. D., Affinity of synthetic peptide fragments of MyoD for Id1 protein and their biological effects in several cancer cells. *J Pept Sci* **2010**, 16, (5), 231-41.
- 15.** Slater, T. F.; Cheesemann, K. H.; Davies, M. J.; Proudfoot, K.; Xin, W., Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proce Nutri Sci* **1987**, 46, 1-12.
- 16.** Iqbal, M.; Okazaki, Y.; Okada, S., In vitro curcumin modulates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced peroxidation of microsomal membrane lipids and DNA damage. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement* **2003**, 1, 151-160.
- 17.** Biswas, R.; Ledman, D. W.; Fox, R. O.; Altman S.; Gopalan V., Mapping RNA-Protein Interactions in Ribonuclease P from Escherichia coli using Disulfide-linked EDTA-Fe. *J Mol Biol* **2000**, 296, 19-31.
- 18.** Ghaim, J. B.; Greiner, D. P.; Meares, C. F.; Gennis, R. B., Proximity

mapping the surface of a membrane protein using an artificial protease: demonstration that the quinone-binding domain of subunit I is near the N-terminal region of subunit II of cytochrome *bd*. *Biochem* **1995**, *34*, 11311-15.

- 19.** Rana T. M. ; Mearest, C. F., Transfer of oxygen from an artificial protease to peptide carbon during proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88*, 10578-82.
- 20.** Khan, N.; Sharma, S.; Sultana, S., Amelioration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress and tumor promotion response by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats. *Cancer Lett* **2004**, *210*, 17–26.
- 21.** ProFund™ Protein Interaction Mapping Kit
- 22.** Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the Amer Cheml Soci* **1963**, *85*, 2149-54.
- 23.** Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J.; Makofske, R. C.; Chang, C. D., Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids. *Int J Pept Protein Res* **1979**, *13*, (1), 35-42.
- 24.** Friedman M., Applications of the Ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, 385-406.
- 25.** Schriemer, D. C.; Li, L., Combining avidin-biotin chemistry with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **1996**, *68*, (19), 3382-7.
- 26.** Hill, J. A.; Annan, R. S.; Biemann, K., Matrix-assisted laser desorption ionization with a magnetic mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1991**, *5*, (9), 395-9.

27. Carda-Broch, S.; Berthod, A.; Armstrong, D. W., Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, 17, (6), 553-60.
28. Pieves, U.; Zurcher, W.; Schar, M.; Moser, H. E., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **1993**, 21, (14), 3191-6.
29. Galvani, M.; Hamdan, M.; Righetti, P. G., Two-dimensional gel electrophoresis/matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of a milk powder. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, 14, (20), 1889-97.
30. Saceda, M.; Grunt, T. W.; Colomer, R.; Lippman, M. E.; Lupu, R.; Martin, M. B., Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology* **1996**, 137, (10), 4322-30.
31. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, 65, (1-2), 55-63.
32. Gharagozloo, M.; Amirghofran, Z., Effects of silymarin on the spontaneous proliferation and cell cycle of human peripheral blood leukemia T cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **2007**, 133, (8), 525-32.
33. Gharagozloo, M.; Khoshdel, Z.; Amirghofran, Z., The effect of an iron (III) chelator, silybin, on the proliferation and cell cycle of Jurkat cells: a comparison with desferrioxamine. *Eur J Pharmacol* **2008**, 589, (1-3), 1-7.
34. Gharagozloo, M.; Moayedi, B.; Zakerinia, M.; Hamidi, M.; Karimi, M.; Maracy, M.; Amirghofran, Z., Combined therapy of silymarin and desferrioxamine in patients with beta-thalassemia major: a randomized

- double-blind clinical trial. *Fundam Clin Pharmacol* **2009**, 23, (3), 359-65.
35. Zhao, R.; Planalp, R. P.; Ma, R.; Greene, B. T.; Brechbiel, M. W.; Torti, F. M.; Torti, S. V., Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Biochem pharmacol* **2004**, 67, (9), 1677-88.
36. White, V. E.; Knowles, C. J., Degradation of copper-NTA by *Mesorhizobium* sp. NCIMB 13524. *Int Biodeterior Biodegradation* **2003**, 52, 143-50.
37. [http://www.proteomicsnijmegen.nl/Maldi\\_pages/Maldi-about.htm](http://www.proteomicsnijmegen.nl/Maldi_pages/Maldi-about.htm)

## 14. 附錄

### 1. 關於 Id1 蛋白質訊號及其訊號面積積分值

未加入金屬離子			Peptide DIB2-Cu(II)			Peptide DIB2-Fe(III)			Peptide DIB3		
#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area
202	6751.6	408	297	9534	287	9	9536.1	12384	1	9527.6	15787
203	6753.4	246	298	9541.5	796	10	9548.2	7373	2	9538.4	9421
204	6754.3	246	299	9550.2	1355	11	9551.6	4473	3	9542.4	5378
205	6758	425	300	9565.6	3913	12	9556.3	1954	4	9550.1	15782
206	6760.2	238	301	9569	638	13	9559.7	1445	總面積		46368
207	6762.3	166	302	9571.4	1078	14	12810	6461			
208	6765.1	464	303	9572.5	1078	15	12813	658			
209	6766.5	192	304	9575.4	671	16	12817	1353			
210	6768.5	291	305	9579.9	1374	17	12821	1547			
211	6772.2	396	306	9582.1	479	18	12826	3074			
212	6775.1	289	307	9584.1	1453	19	12839	3119			
213	6776.8	518	308	9589.7	961	總面積		43841			
214	6785.1	395	309	9592.2	719						
215	6789	368	310	9595	730						
216	9555.5	34461	311	9598.2	1723						
217	9561.2	48210	312	9602.4	938						
218	9625.9	410	313	9605.8	697						
219	12803	2729	314	9607.7	1363						
220	12812	2445	315	9611.8	642						
221	12820	2688	316	9622.5	702						
222	12822	962	317	9641.4	843						
223	12827	1309	318	9648.9	583						
224	12830	4268	總面積		23023						
225	12841	6685									
總面積		108809									

2. 關於 BSA 蛋白質訊號及其訊號面積積分值

未加入金屬離子											
#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area
226	65103	1893	262	65698	14411	298	66136	10207	334	66570	1595
227	65119	1981	263	65714	8579	299	66153	5989	335	66577	1290
228	65133	2365	264	65719	5747	300	66169	9350	336	66589	709
229	65141	1623	265	65726	11533	301	66180	2272	337	66593	1379
230	65154	1770	266	65741	20166	302	66189	13363	338	66611	382
231	65163	2306	267	65748	14341	303	66209	8269	339	66622	794
232	65179	2580	268	65764	14319	304	66227	10643	340	66627	634
233	65193	4075	269	65769	11401	305	66248	4422	341	66641	588
234	65216	6533	270	65781	14121	306	66260	5143	342	66645	978
235	65246	10622	271	65793	13880	307	66271	6536	343	66663	756
236	65272	10833	272	65805	8316	308	66295	9201	總面積		90124
237	65300	14202	273	65813	8258	309	66328	3329			
238	65322	13166	274	65819	10970	310	66338	1294			
239	65346	14772	275	65827	13407	311	66343	1953			
240	65353	2647	276	65838	5287	312	66348	4248			
241	65375	16779	277	65843	15665	313	66362	1129			
242	65459	83721	278	65856	7781	314	66370	2230			
243	65472	10684	279	65861	12934	315	66378	1107			
244	65501	31387	280	65872	5156	316	66385	4376			
245	65506	4633	281	65877	25612	317	66399	2544			
246	65517	14133	282	65894	14663	318	66411	4344			
247	65523	7244	283	65908	32538	319	66443	2099			
248	65530	12296	284	65936	8990	320	66452	4228			
249	65554	22549	285	65942	23984	321	66456	3018			
250	65572	23594	286	65965	8369	322	66476	1102			
251	65579	8017	287	65972	10329	323	66482	1079			
252	65582	13369	288	65976	4130	324	66488	676			
253	65598	24299	289	66004	7456	325	66499	1695			
254	65612	16602	290	66014	3679	326	66504	1341			
255	65622	16860	291	66042	8533	327	66514	1582			
256	65630	5598	292	66054	6687	328	66523	563			
257	65645	22698	293	66065	17776	329	66531	1930			
258	65664	26149	294	66084	4644	330	66545	528			
259	65672	20683	295	66092	9047	331	66550	523			
260	65686	8724	296	66107	12798	332	66557	783			
261	65694	8737	297	66122	9405	333	66567	786			

Peptide DIB2-Cu( II )														
#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area
319	65033	556	355	65543	23272	391	65956	12437	427	66391	2234	463	66728	447
320	65043	999	356	65549	7066	392	65968	6171	428	66402	2196	464	66731	1510
321	65052	1018	357	65558	11817	393	65972	19920	429	66408	2623	465	66741	816
322	65071	1491	358	65577	21688	394	65999	3802	430	66421	4031	466	66761	723
323	65085	1589	359	65594	20054	395	66005	18386	431	66435	1442	467	66782	749
324	65089	1240	360	65599	7699	396	66026	5304	432	66443	3164	468	66790	544
325	65096	890	361	65608	10248	397	66031	7014	433	66465	3054	469	66797	881
326	65119	4045	362	65626	20813	398	66041	10124	434	66472	1700	總面積		257581
327	65127	1085	363	65636	13258	399	66051	4886	435	66481	825			
328	65147	3621	364	65645	16230	400	66057	3208	436	66494	1635			
329	65157	3293	365	65655	8100	401	66063	4771	437	66503	1648			
330	65179	4004	366	65664	13450	402	66069	10771	438	66512	2327			
331	65183	5612	367	65674	16156	403	66085	4549	439	66527	1429			
332	65194	2233	368	65688	13632	404	66091	6015	440	66533	1063			
333	65198	4534	369	65699	16255	405	66101	7391	441	66538	1385			
334	65205	1130	370	65714	19157	406	66109	2832	442	66545	1315			
335	65213	1152	371	65727	24523	407	66116	11070	443	66558	2324			
336	65243	11631	372	65745	16253	408	66131	3982	444	66571	610			
337	65266	8634	373	65748	16253	409	66140	16377	445	66573	1519			
338	65297	14528	374	65756	13417	410	66167	7202	446	66584	871			
339	65303	2022	375	65778	10416	411	66177	4706	447	66594	1489			
340	65310	6261	376	65793	10455	412	66185	11385	448	66602	893			
341	65330	8918	377	65799	10497	413	66205	6435	449	66608	1747			
342	65343	7145	378	65810	10380	414	66217	6031	450	66621	1301			
343	65362	10098	379	65819	10235	415	66234	3843	451	66633	500			
344	65381	14185	380	65833	12756	416	66239	4630	452	66640	1243			
345	65394	7580	381	65837	12812	417	66257	6269	453	66651	1437			
346	65404	9574	382	65847	15135	418	66267	3442	454	66655	477			
347	65429	23673	383	65858	4940	419	66282	7567	455	66662	451			
348	65447	12523	384	65863	9771	420	66295	2385	456	66671	1451			
349	65458	9288	385	65874	16724	421	66303	3168	457	66673	1451			
350	65495	40280	386	65887	6915	422	66329	2807	458	66681	707			
351	65501	6435	387	65898	15983	423	66338	2086	459	66689	704			
352	65507	6474	388	65915	11073	424	66348	5494	460	66699	1248			
353	65517	8724	389	65924	13005	425	66363	6207	461	66705	1712			
354	65526	11116	390	65937	19001	426	66384	1742	462	66719	673			

Peptide DIB2-Fe(III)								
#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area
20	65309.6	715	56	65651	2590	92	65981	4610
21	65319.4	563	57	65656	2586	93	66002	2375
22	65335.4	1511	58	65664	4340	94	66012	1384
23	65341.9	724	59	65675	3466	95	66017	1830
24	65353.2	1287	60	65701	7481	96	66025	2618
25	65356.8	2087	61	65710	2512	97	66041	2069
26	65374.4	3055	62	65717	3413	98	66056	2541
27	65383.4	1042	63	65725	4287	99	66062	2372
28	65390	1797	64	65736	1696	100	66084	4164
29	65420.7	5773	65	65745	3442	101	66087	4164
30	65427.5	901	66	65752	1681	102	66098	1054
31	65437.4	2342	67	65757	2484	103	66106	1028
32	65444.7	1949	68	65763	1641	104	66111	1584
33	65453.5	2048	69	65770	2502	105	66127	1814
34	65463.6	2130	70	65776	3333	106	66138	2611
35	65479.1	3972	71	65784	4794	107	66153	1056
36	65496.9	4253	72	65802	3125	108	66164	1252
37	65502	1933	73	65808	4714	109	66172	696
38	65507.6	1300	74	65823	3813	110	66184	1555
39	65517.9	4093	75	65832	3004	111	66199	852
40	65529.2	3422	76	65841	4230	112	66208	1160
41	65540.9	3487	77	65853	1366	113	66224	1287
42	65550.4	2898	78	65858	2767	總面積		88833
43	65556.2	1501	79	65865	1351			
44	65562.1	2270	80	65870	3313			
45	65568.8	3665	81	65885	2030			
46	65587.1	5301	82	65890	2046			
47	65600.2	3110	83	65896	3314			
48	65602.6	4686	84	65906	1923			
49	65608.5	1602	85	65914	3188			
50	65614.8	2456	86	65925	6061			
51	65622.3	2458	87	65945	1689			
52	65626.6	1671	88	65951	1115			
53	65631.6	1700	89	65956	1645			
54	65636.5	2551	90	65965	2129			
55	65644.8	2580	91	65973	2666			

Peptide DIB3								
#	m/z	Area	#	m/z	Area	#	m/z	Area
5	65391	924	41	65752	11054	77	66095	1817
6	65404	1254	42	65777	4514	78	66104	1298
7	65411	639	43	65790	3607	79	66111	3029
8	65434	3134	44	65796	6111	80	66114	3029
9	65447	1834	45	65818	6101	81	66126	1251
10	65480	6353	46	65825	2614	82	66134	3553
11	65484	1323	47	65830	2583	83	66160	2895
12	65497	1303	48	65839	4259	84	66170	1391
13	65502	887	49	65850	1675	85	66177	1357
14	65507	1363	50	65857	4278	86	66187	965
15	65515	1389	51	65866	5863	87	66196	1584
16	65543	7372	52	65886	4974	88	66205	4106
17	65547	9122	53	65897	3338	89	66236	892
18	65557	3057	54	65902	2484	90	66239	445
19	65563	1907	55	65909	4734	91	66248	1143
20	65576	4029	56	65923	2292	92	66278	369
21	65588	5740	57	65931	3756	93	66283	364
22	65606	4447	58	65945	2133	94	66294	1826
23	65613	2290	59	65956	3558	總面積		122071
24	65619	1542	60	65963	2075			
25	65628	3115	61	65968	3409			
26	65635	4876	62	65983	3349			
27	65638	4876	63	65991	3371			
28	65648	5022	64	65994	3371			
29	65666	7660	65	66002	4539			
30	65677	2542	66	66016	4794			
31	65683	2550	67	66033	1709			
32	65690	2597	68	66036	1709			
33	65695	1746	69	66039	2291			
34	65700	1753	70	66048	2275			
35	65712	5319	71	66050	2275			
36	65720	1775	72	66054	4894			
37	65725	2721	73	66071	1511			
38	65732	2742	74	66077	1497			
39	65743	1814	75	66084	973			
40	65750	11054	76	66088	921			