

摘要

本研究共合成出十六段新的胜肽序列，利用固相合成法合成出包含了六種含有 Py(pyrrole)結構的直鏈胜肽、一段含有 Py(pyrrole)結構的環狀胜肽、四段含有 DMQ-MA(2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid)的直鏈胜肽、三段含有 CLB(chlorambucil)結構的直鏈胜肽；也利用液相胜肽合成法合成出含有 DMQ-MA(2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid)的胜肽衍生物 DQRO(DMQ-MA-Gln-Arg-Ome)和 DPRO(DMQ-MA-Pro-Arg-Ome)，其後利用平板凝膠電泳實驗測量這些胜肽對 DNA 作用能力。結果顯示含有 Py 結構的胜肽對於 DNA 都有結合的能力；而含有 DMQ-MA 結構的胜肽對 DNA 有切割的作用，其中唯 DQRO 與 DPRO 具有明顯切割效果；而含有 CLB 結構的胜肽不但對 DNA 有結合的能力也同時具有對 DNA 進行切割的作用。

因平板凝膠電泳結果顯示，DQRO 與 DPRO 對 DNA 具有較明顯的切割作用，所以再利用電子順磁共振光譜對胜肽衍生物 DQRO 與 DPRO 進行其產生自由基之研究，並觀測出自由基的衰退。結果證實含 2,6-雙甲基氫醌之雙胜肽在 Na_2HPO_4 buffer 中，具有穩定的 EPR 自由基訊號，由此證明苯醌衍生物能釋放半醌自由基。

未來可利用足跡實驗與圓二色光譜研究 DNA 與胜肽間的作用，期望找到與 DNA 作用更具專一性及選擇性的胜肽，發展成新的基因調控試劑。

Abstract

This thesis reports the synthesis of various DNA-binding peptides and conjugates : linear peptides bearing the XPRK motif , peptides incorporating 4-amino-1-pyrrole-2-carboxylic acid (Py) , a cyclic peptide , peptide-chlorambucil conjugates , peptides incorporating 2,6-dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid (DMQ-MA).

Agarose electrophoresis studies showed that peptides incorporating XHypPRK motifs (Hyp: 3-hydroxyproline) and Py residues display high DNA binding activities. Peptide-DMQ-MA conjugates and peptide-chlorambucil conjugates were found to exhibit DNA binding ability as well as DNA cleavage property.

2,6-Dimethoxyhydroquinone-dipeptide conjugates were found to produce strong EPR signals in aqueous solution in the absence of ferrous sulfate. The semiquinone radicals generated by 2,6-dimethoxyhydroquinone-dipeptide conjugates are considered to be responsible for the observed DNA cleavage.

目 錄

摘要.....	I
Abstract	II
目 錄.....	III
圖目錄.....	VI
表目錄.....	X
縮寫目	XII
第一章 緒論.....	1
1-1 序列設計來源之 XPRK 模組.....	2
1-2 含 N-methylpyrrole amino acid (Py) 之胜肽.....	5
1-3 Chlorambucil (CLB) 之胜肽衍生物.....	11
1-4 苯醌衍生物 2,6-Dimethoxyhydroquinone-3- mercaptoacetic acid (DMQ-MA) 之胜肽衍生物設計來源.....	14
1-5 環狀胜肽	18
第二章 實驗.....	20
2-1 實驗原理	20
2-1-1 電子順磁共振.....	20
2-1-2 平板凝膠電泳.....	21
2-1-3 固相胜肽合成.....	24
2-2 藥品目錄	27
2-2-1 固相胜肽合成使用之藥品.....	27

2-2-2 合成 Py 使用之藥品.....	28
2-2-3 HPLC 使用之藥品.....	29
2-2-4 凝膠電泳使用之藥品.....	29
2-2-5 有機合成使用之藥品.....	30
2-2-6 EPR 實驗使用之藥品.....	31
2-3 儀器清單.....	31
2-4-1 固相胜肽合成流程.....	34
2-4-2 固相胜肽合成儀儀器操作.....	36
2-4-3 高效能液相層析 (HPLC) 法儀器設定.....	37
2-4-4 液相胜肽合成法.....	38
2-4-5 平版凝膠電泳實驗.....	41
2-4-6 苯醌衍生物合成步驟.....	42
2-4-7 Electron Paramagnetic Resonance (EPR) 實驗步驟.....	45
2-4-8 DMQ-MA (2,6-Dimethoxyhydroquinone-3- mercaptoacetic acid) 結晶實驗步驟.....	45
2-4-9 凝膠電泳切割百分比公式 ⁷⁷	45
第三章 結果與討論.....	46
3-1-1 含有 Py (Pyrrole) 之直鏈胜肽.....	47
3-1-2 含有 Py (Pyrrole) 之環狀胜肽.....	59
3-1-3 含有 CLB 之直鏈胜肽.....	61
3-1-4 結果與討論.....	70

3-2-1 含有 DMA-MA 之直鏈胜肽.....	74
3-2-2 EPR 實驗結果.....	86
3-2-2 結果與討論.....	95
第四章 結論.....	99
第五章 參考文獻.....	100
第六章 附錄.....	106
附錄一 DMA-MA 結晶數據	106
附錄二 胜肽之 ESI-MS 質譜儀分析圖	117

圖目錄

圖 1- 1 海膽組織蛋白 H1 和 H ₂ B.....	2
圖 1- 2 SPRK 序列 β -turn 結構圖	3
圖 1- 3 Netropsin 與 Distamycin 結構圖	5
圖 1- 4 Netropsin、Distamycin 與 DNA 結合示意圖.....	6
圖 1- 5 Py 用 Im 取代之結構圖	8
圖 1- 6 2:1 反平行結合模式示意圖	8
圖 1- 7 Py/Im 之專一性結合圖與髮夾型結構示意圖	9
圖 1- 8 陽離子形成圖，烷化劑之結構.....	12
圖 1- 9 DNA 鹼基被烷化的位置圖	13
圖 1- 10 Guanine 鹼基被烷化後，水解之產物結構圖.....	13
圖 1- 11 2,6-雙甲基苯醌 (DMQ) 結構圖	15
圖 1- 12 2,6-雙甲基氫醌-3-硫酸 (DMQ-MA) 結構圖	15
圖 1- 13 DMQ-MA-Gln-Arg-Ome 結構圖	16
圖 1- 14 DMQ-MA-Pro-Arg-Ome 結構圖	16
圖 1- 15 Triostin A 嵌入 DNA 鹼基對之結構圖	19
圖 2- 1 Zeeman Effect 示意圖	21
圖 2- 2 電泳凝膠說明圖	23

圖 2- 3	凝膠電泳位移示意圖	23
圖 2- 4	Ethidium Bromide 結構圖	24
圖 2- 5	固相胜肽合成法示意圖	25
圖 2- 6	Kaiser test 示意圖	26
圖 2- 7	環狀胜肽合成法	39
圖 2- 8	Boc-pyrrole 去除氮端上之 Boc 保護基反應機構示意圖	40
圖 2- 9	Fmoc-NMP 合成示意圖	41
圖 2- 10	DMQ 的合成示意圖	42
圖 2- 11	DMQ 的合成示意圖	43
圖 3- 1	PN4 純化之 HPLC 層析圖	47
圖 3- 2	RHyE-10 純化之 HPLC 層析圖	49
圖 3- 3	RHyM-10 純化之 HPLC 層析圖	51
圖 3- 4	RHyQ-10 純化之 HPLC 層析圖	53
圖 3- 5	RHyH-10 純化之 HPLC 層析圖	55
圖 3- 6	QPQ-9 純化之 HPLC 層析圖	57
圖 3- 7	CHPy-12 純化之 HPLC 層析圖	59
圖 3- 8	CLB-PN4 純化之 HPLC 層析圖	61

圖 3- 9	CLB-RHyM-10 純化之 HPLC 層析圖	64
圖 3- 10	CLB-RHyQ-10 純化之 HPLC 層析圖	67
圖 3- 11	DMQ-MA 之 X 光單晶繞射圖	72
圖 3- 12	DMQ-MA 之鍵長圖	73
圖 3- 13	DMQ-MA-PN3 純化之 HPLC 層析圖	74
圖 3- 14	DMQ-MA-QPQ-9 純化之 HPLC 層析圖	76
圖 3- 15	DPYR 純化之 HPLC 層析圖	78
圖 3- 16	DPQR 純化之 HPLC 層析圖	80
圖 3- 17	$\ln[A]_t$ 與時間之對照圖	86
圖 3- 18	EPR 波峰分裂圖	87
圖 3- 19	DQRO 之 EPR 圖譜	88
圖 3- 20	DPRO 之 EPR 圖譜	89
圖 3- 21	DVRO 之 EPR 圖譜(由高君翰學長論文提出)	89
圖 3- 22	DMRO 之 EPR 圖譜(由高君翰學長論文提出)	89
圖 3- 23	DQRO EPR 圖譜之 Hyperfine coupling constant 值	90
圖 3- 24	DPRO EPR 圖譜之 Hyperfine coupling constant 值	90
圖 3- 25	DQRO 和 DPRO 在 pH=7.4 各時間的 EPR 光譜圖 .	91
圖 3- 26	DQRO 不同 pH 值之 EPR 訊號變化圖	92
圖 3- 27	DPRO 不同 pH 值之 EPR 訊號變化圖	92

圖 3- 28	16.20 mM DQRO 各 pH 值的 $\ln[A]_t$ 對時間作圖	93
圖 3- 29	17.58 mM DPRO 各 pH 值的 $\ln[A]_t$ 對時間作圖	93
圖 3- 30	16.20 mM DQRO 各 pH 值之 k_{Obs}	94
圖 3- 31	17.58 mM DPRO 各 pH 值之 k_{Obs}	94
圖 3- 32	自由基切割 DNA 之反應機構	97
圖 3- 33	DMQ-MA 衍生物自由基示意圖	98
圖 3- 34	PN4 ESI-MS 質譜儀分析圖	117
圖 3- 35	RHyE-10 ESI-MS 質譜儀分析圖	117
圖 3- 36	RHyM-10 ESI-MS 質譜儀分析圖	118
圖 3- 37	RHyQ-10 ESI-MS 質譜儀分析圖	118
圖 3- 38	RHyH-10 ESI-MS 質譜儀分析圖	119
圖 3- 39	QPQ-9 ESI-MS 質譜儀分析圖	119
圖 3- 40	CHPy-12 ESI-MS 質譜儀分析圖	120
圖 3- 41	CLB-PN4 ESI-MS 質譜儀分析圖	120
圖 3- 42	CLB-RHyM-10 ESI-MS 質譜儀分析圖	121
圖 3- 43	CLB-RHyQ-10 ESI-MS 質譜儀分析圖	121
圖 3- 44	DMQ-MA-PN3 ESI-MS 質譜儀分析圖	122
圖 3- 45	DMQ-MA-QPQ-9 ESI-MS 質譜儀分析圖	122
圖 3- 46	DPYR ESI-MS 質譜儀分析圖	123

圖 3- 47 DPQR ESI-MS 質譜儀分析圖	123
圖 3- 48 DPRO ESI-MS 質譜儀分析圖	124
圖 3- 49 DQRO ESI-MS 質譜儀分析圖	124

表目錄

表 一 合成之含 XPRK 修飾模組之胜肽序列	4
表 二 合成之含 Py 結構之胜肽序列	10
表 三 含有 CLB 結構之胜肽序列	13
表 四 含有 DMQ-MA 結構之胜肽序列	17
表 五 合成之環狀結構之胜肽序列	19
表 六 PN4 之濃度與凝膠滯留係數對照表	48
表 七 RHyE-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表	50
表 八 RHyM-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表	52
表 九 RHyQ-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表	54
表 十 RHyH-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表	56
表 十一 QPQ-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表	58
表 十二 CHPy-12 之濃度與凝膠滯留係數對照表	60
表 十三 CLB-PN4 之濃度與凝膠滯留係數對照表	62
表 十四 CLB-PN4 之濃度與切割百分比對照表	62

表 十五	CLB-RHyM-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....	65
表 十六	CLB-RHyM-10 之濃度與切割百分比對照表.....	65
表 十七	CLB-RHyQ-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....	68
表 十八	之濃度與切割百分比對照表.....	68
表 十九	DMQ-MA-PN3 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表	75
表 二十	DMQ-MA-QPQ-9 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照 表.....	77
表 二十一	DPYR 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表.....	79
表 二十二	DPQR 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表.....	81
表 二十三	DPRO 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表.....	83
表 二十四	DQRO 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表.....	85
表 二十五	EPR 相關數據列表.....	88
表 二十六	DPRO 與 DQRO 各 pH 值之 k_{Obs} 表.....	94

縮寫目

英文縮寫	英文全名
A	Adenine
A.A.	Amino Acid
MeOH	Methanol
AcOH	Acetic acid
ACT	Activation
Ala (A)	Alanine
Arg (R)	Arginine
Asp (D)	Aspartic acid
Asn (N)	Asparagine
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
C	Cytosine
CD	Circular Dichroism
CLB	Chlorambucil
Cys (C)	Cysteine
DCM	Dichloromethane
DCC	N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimide
DEP	Deprotection

DNA	Deoxyribonucleic acid
DIEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMF	N,N-Dimethylformamide
EDT	1,2-Ethanedithiol
EDTA	Disodium Ethylenediamine Tetraacetate
EtOH	Ethanol
ESI-MS	Electrospray ionization mass Spectrometry
EPR (ESR)	Electron Paramagnetic (Spin) Resonance
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
G	Guanine
GAM	Gambogic acid
Gln (Q)	Glutamine
Glu (E)	Glutamic acid
Gly (G)	Glycine
His (H)	Histidine

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyp	4-Hydroxyproline
Ile (I)	Isoleucine
Leu (L)	Leucine
Lys (K)	Lysine
Met (M)	Methionine
MeOH	Methanol
NAG	D(+)-Glucosamine
NMM	N-Methylmorpholine
NMP (Py)	N-Methylpyrrole
Phe (F)	Phenylalanine
Pro (P)	Proline
PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-trispyrrolidino phosphonium hexafluorophosphate
Pfp	Pentafluorophenol
Rt.	Retention time
Ser (S)	Serine
SPPS	Solid Phase Petide Synthesis

T	Thymine
TFA	Trifluoroacetic acid
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Tyrosine
UV	Ultra Violet
Val (V)	Valine

第一章 緒論

許多疾病的產生都是起因於基因異常的表現，特別是癌症的成因，幾乎都是源自基因的改變。因此研究合成 DNA 結合小分子或切割 DNA 的專一性載體在生物化學及醫學上是非常重要的領域。研究報導指出，具特定序列的胜肽能與 DNA 核酸產生作用力；因此，對胜肽分子與核酸的作用機制及生物功能的研究，在生命科學研究領域中佔有極重要的內容。測定胜肽與 DNA 互相作用的親和性及結合選擇性，有利於闡明胜肽分子與 DNA 選擇性和作用以及了解其機制，進一步探討胜肽分子結構與 DNA 作用模式及其生物活性的關係。本文以 DNA 的專一性載體為研究出發點，合成出對 DNA 專一性結合的胜肽以及對 DNA 具切割效果的胜肽衍生物。利用電子順磁共振光譜 (EPR) 探討苯醌衍生物的自由電子所產生之訊號。本文也合出新的具有 XPRK 胜肽序列，並利用平板凝膠電泳做初步測試。

1-1 序列設計來源之 XPRK 模組

Suzuki 教授於 1988 年發表由海膽組織蛋白 (Sea Urchin Spermatogenous Histones) H1 及 H2B 中分離出一段含重複六次 SPXX (X 代表鹼基胺基酸殘基) 單元 (S6 peptide) 的蛋白質序列, 如圖中 1-1 框線部分為 SPKK、SPRR、SPRK 等的 SPXX 模組¹⁻²。且 H1 的一級結構已經由 Von Holt 等人在 1984 年提出³。Suzuki 教授等人利用圓二色光譜 (Circular Dichroism spectrum) 發現 Ser-Pro-Arg-Lys (SPRK) 所呈現之 DNA 結合結構是的 β 轉折 (β -turn) 的結構, 不同於以往的 α 螺旋 (α -helix)、 β 摺板 (β -sheet) 以及鋅手指 (Zn-finger)。SPRK 單元結構內含有兩個分子內氫鍵, 一個氫鍵是由絲胺酸 (Serine) i -th 側鏈羥基上的氧與 $i+2$ -th 胺基上的形成; 另一氫鍵是由 i -th 羧基上的氧與 $i+3$ -th 胺基上的氫所形成; 因此能形成穩定的 β 轉折 (β -turn) 結構有利於與 DNA 結合⁴⁻⁵。之後, Churchill 和 Suzuki 也進一步證實 SPKK 單元對於 DNA 小凹槽 (minor groove) 中富含 A/T (Adenine/Thymine) 序列有的結合性⁶。

H1 (N-terminal part)													
1	S. nudus	NH -	PA	SPQK	RAA	SPRR	SPKK	SPRR	SPKK	KSS	SPRR	KAKR	RASTHPPVAQH
2	P. angulosus		PG	SPQK	RAA	SPRK	SPRK	SPKK	SPRK	ASA	SPRR	KAKR	RASTHPPVLEM
3	S. granulosis		PG	SPQK	RAA	SPRK	SPRR	GSPKK	SP	- - -			
4	E. crassa		AA	SPQK	RAA	SPRK	SPKK	SPRK	SPKKK		SPRKR	K	ARSAAHPPVIDM
H2B (N-terminal part)													
5	L. pictus	NH -	PR	SPSK	S	SPRK	GSPRK	GSPRK	G		SPKR		
6	P. angulosus	1	PR	SPAKT		SPRK	GSPRK	GSPRK	G	SPSRKA	SPKR		
7		2	PR	SPAKT		SPRK	GSPRK	G		SPSRKA	SPKR		
8		3	P	S QK		SPTKR	SPTKR	SPTKR			SPQK		
9	P. mitalis		P	S QK		SPTKR	SPTKR				SPQK		

圖 1- 1 海膽組織蛋白 H1 和 H2B

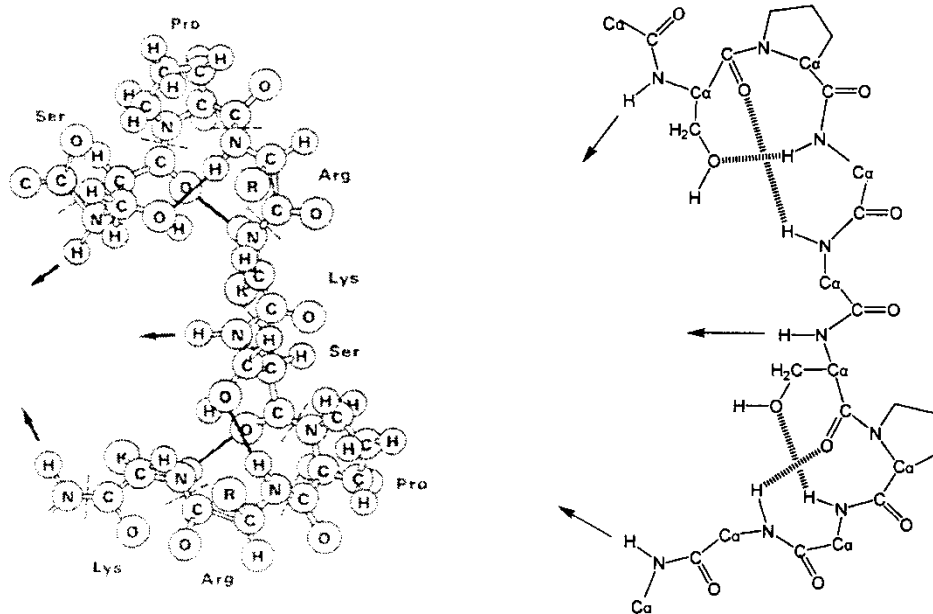


圖 1- 2 SPRK 序列 β -turn 結構圖

近年來，本實驗小組針對 SPXX 之模組，進行內部胺基酸修飾，於 2003 年提出一種新的結合單元 XPRK⁷；文獻中提出三種含 XPRK 單元胜肽，分別為：

1. YR-12 (YPRKYPRKYPRK-NH₂)，其中 X 以 Tyrosine 取代
2. WR-12 (WPRKWPRKWPRK-NH₂)，其中 X 以 Tryptophan 取代
3. SP-30 (SPQKRAASPRKSPRKSPKKSPRKASASPRR-NH₂)

其中 SP-30 胜肽選擇性結合富含 A/T 鹼基對之序列，而 YR-12 以及 WR-12 對於 A/T 序列中包含 GC 檢基 (Guanine、Cytosine) 的 DNA 序列具選擇性結合。

因此，本實驗小組近年來依據此構思，更進一步研究修飾或變更 XPRK 模組對於與 DNA 結合性的影響，希望藉此能找出對於 DNA 結合有更高能力之序列。

本文中所提出直鏈胜肽含有 XPRK 模組為 RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10、

RHyH-10、QPQ-9 以及 CHPy-12 環狀胜肽。CHPy-12 環狀胜肽與高君翰學長

之環狀胜肽 CHPy-11 相比，試著將 NMP 數量增加，研究是否能提升胜肽與 DNA 的結合能力。表一為本文中所提及含有 XPRK 模組之胜肽，反灰部分即為 XPRK 模組在胜肽序列中的位置。

表一 合成之含 XPRK 修飾模組之胜肽序列

含 XPRK 修飾模組之胜肽	
代號	序列
CLB-RHyM-10	CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Met-CONH ₂
CLB-RHyQ-10	CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Gln-CONH ₂
RHyM-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Met-CONH ₂
RHyE-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Glu-CONH ₂
RHyQ-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Gln-CONH ₂
RHyH-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-His-CONH ₂
QPQ-9	Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂
CHPy-12	Cyclo[CH ₂ CO-Gly-His-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Cys] CONH ₂

1-2 含 N-methylpyrrole amino acid (Py) 之胜肽

天然抗生素 distamycin (Dst) 和 netropsin (Net) 由 Streptomyce 提煉出，是第一個被發現對 DNA 小凹槽 (minor groove) 中富含 AT 序列有專一性鍵結的藥物⁸⁻¹¹。從結構中發現 distamycin 有三個 pyrrole (py) 結構而 netropsin 有兩個 pyrrole (py) 結構。而 Pyrrole (py) 結構會與小凹槽中富含 AT 序列位置結合，是因為醯胺中 N 上的 H 質子會與 A (adenine) 上的 N(3) 及 T (thymine) 上的 O (2) 產生氫鍵且 Pyrrole ring (py) 上的 C-H 會以凡得瓦爾力與 adenine 的 C (2) 作用¹²⁻¹³。

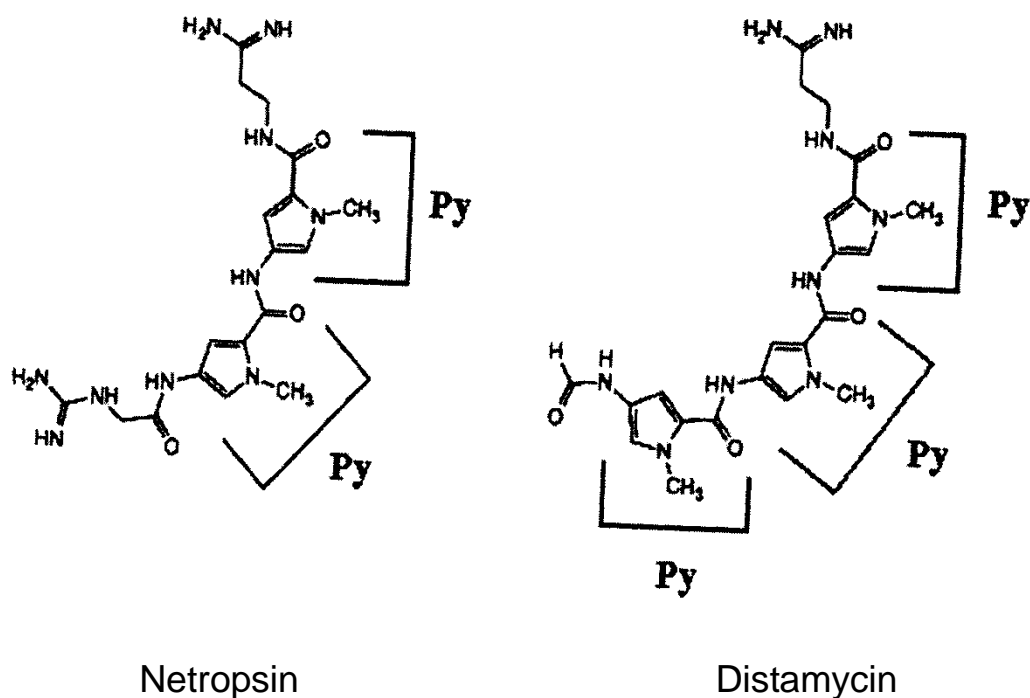


圖 1- 3 Netropsin 與 Distamycin 結構圖

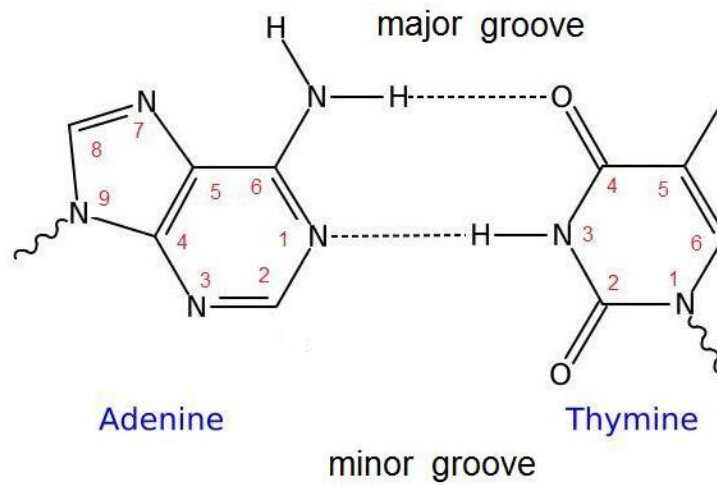
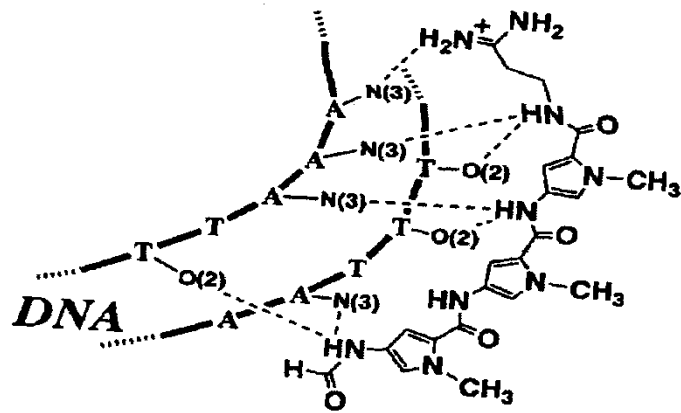
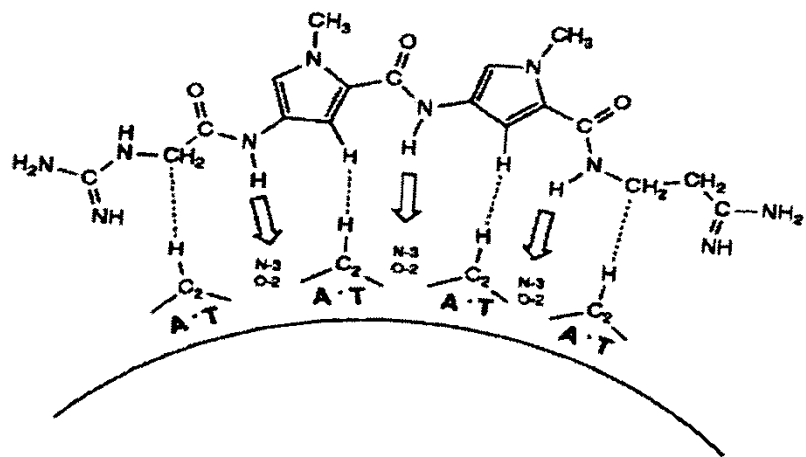


圖 1- 4 Netropsin、Distamycin 與 DNA 結合示意圖

1985年 Dickerson 分析 netropsin 的晶體結構提出了以一個 imidazole (Im) 環狀結構取代一個 pyrrole 用來辨識 GC 鹼基對¹⁴；imidazole (Im) 結構是將 pyrrole 結構中的一個 C-H 以 N 取代。實驗證實 imidazole (Im) 確實能對 GC 序列產生辨識專一性結合。Peter Dervan 教授對於 Py、Im 做了許多相關性的研究，Dervan 教授與其他研究人員經由一連串測試及 NMR 圖譜的解釋，證實了 polyamide 與 DNA 的 2:1 反平行的結合模式，發現將此類小分子配對連接成為一 Polyamide 時，能夠高度辨識 DNA 序列與 DNA 小凹槽產生專一性鍵結，因此發展出 polyamide 的髮夾型 (hairpin) 結構；利用髮夾型結構使 Py 等小分子對序列產生成對的配對，可得到特定的專一性結合。如 Py 與 Im 相對應時，會有效辨識出 C/G (Cytosine/Guanine) 鹼基對；若是 Im 與 Py 相對應時，會辨識出 C/G 鹼基對；而當 Py 與 Py 相對應時，會對 DNA 序列 A/T 或 T/A 進行辨識¹⁵⁻²⁰。

在 2004 年，L.Sheh 提出 HPRK 模組與 polyamide 耦合之胜肽序列對 DNA 特定序列具有辨識性，文獻中證實

1. PyH-12 (HPRK (Py)₄HPRK-NH₂) 胜肽
2. PyH-11 (HPRK (Py)₃HPRK-NH₂) 胜肽
3. PyH-10 (HPRK (Py)₂HPRK-NH₂) 胜肽

大多專一性結合在 158mer Watson 片段連續四個 A 鹼基及 135mer Crick 片段連續四個 T 鹼基的位置，且隨著 Py 的耦合數目不同會對 DNA 的結合能力也有所影響²¹。依據上述構思，本實驗小組對於含有 Py 小分子的類似結構之胜肽序列，提出包括環肽的 12 種新的胜肽序列 PN4、CLB-PN4、DMQ-MA-PN3、RHyM-10、CLB-RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10、CLB-RHyQ-10、RHyH-10、DMQ-MA-QPQ-9、CHPy-12。期望經過修飾後的胜肽序列，對 DNA 序列能有更專一性的結合。

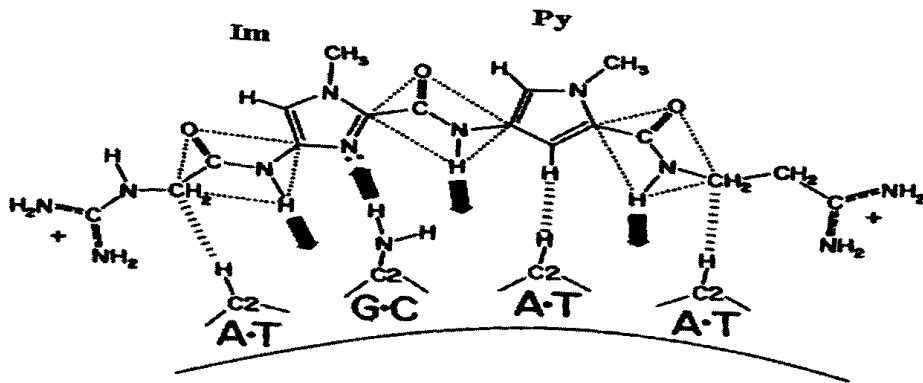


圖 1- 5 Py 用 Im 取代之結構圖

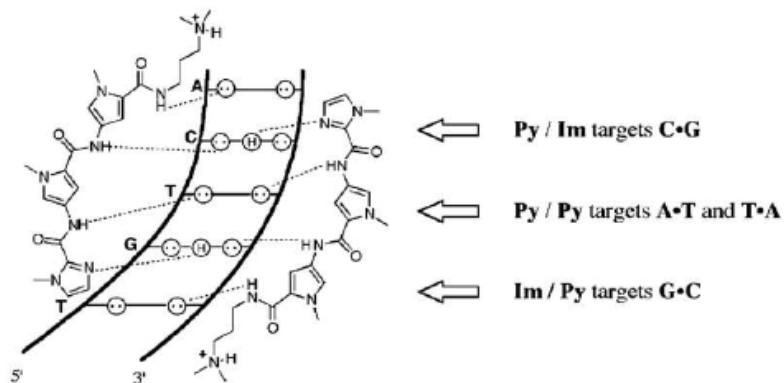


圖 1- 6 2:1 反平行結合模式示意圖

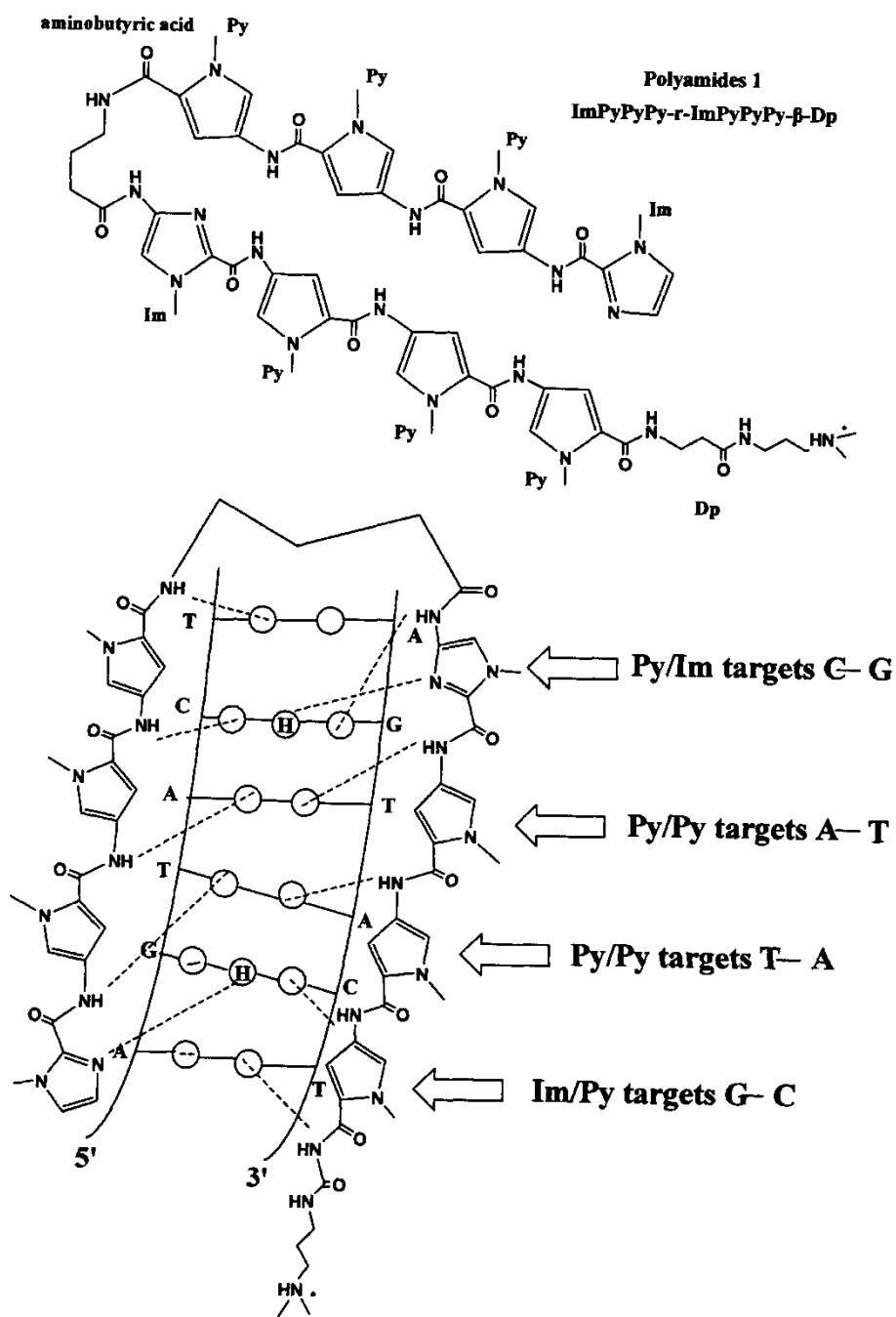


圖 1-7 Py/Im 之專一性結合圖與髮夾型結構示意圖

表二為本文中含有 Py 結構的胜肽序列，反灰部分即為 Py 結構在胜肽序列中的位置。

表 二 合成之含 Py 結構之胜肽序列

含 Py 修飾模組之胜肽	
代號	序列
PN4	Arg-Py-Py-Py-Py -Arg-CONH ₂
CLB-PN4	CLB-Arg-Py-Py-Py-Py -Arg-CONH ₂
DMQ-MA-PN3	DMQ-MA-Arg-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂
RHyM-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Met-CONH ₂
CLB-RHyM-10	CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Met-CONH ₂
RHyE-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Glu-CONH ₂
RHyQ-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Gln-CONH ₂
CLB-RHyQ-10	CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Gln-CONH ₂
RHyH-10	Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-His-CONH ₂
QPQ-9	Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂
DMQ-MA-QPQ-9	DMQ-MA-Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂
CHPy-12	Cyclo[CH ₂ CO-Gly-His-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Cys] CONH ₂

1-3 Chlorambucil (CLB) 之胜肽衍生物

抗腫瘤藥物大致可分為烷化劑 (alkylating agent)、抗代謝物 (antimetabolites)、抗生素 (antibiotics)、有絲分裂抑制劑 (mitosis inhibitor)、激素類 (hormones) 等等。然而抗腫瘤藥物雖然能夠破壞腫瘤細胞並中止細胞的生長、成熟和分裂，但由於這些抗腫瘤藥物並無專一性之辨識能力，所以 Bruce 等人設計出多肽序列，將之做為一種載體成為一分子目標藥物，特別針對病變部位作治療，如此即可使其他正常細胞不受影響，副作用也相對降低²²⁻²⁶。

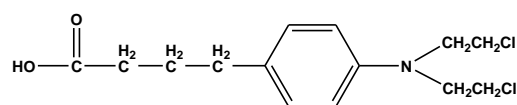
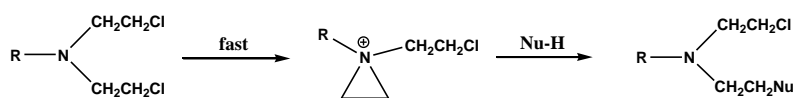
本文所利用的抗腫瘤藥物為氮苯芥丁酸 (Chlorambucil, CLB) 即為烷化劑類藥物。氮苯芥丁酸於 1953 年由 Everett 等人合成²⁷，主要用於治療慢性淋巴性血癌 (chronic lymphatic leukemia)、淋巴瘤 (lymphoma) 及霍奇金氏症 (Hodgkin's disease)。此類藥物在化學反應中很容易與親核中心 (Nucleophilic center) 作用²⁸⁻²⁹，在人體內與烷基化藥劑結合的核心主要為蛋白質及核酸，而核酸中最容易發生作用以證實在 DNA 之鳥嘌呤 (Guanine, G) 上第七位之 Nitrogen (N-7)，此外腺嘌呤 (Adenine, A) 中的 N-3 及 N-1 位置及胞嘧啶 (Cytosine, C) 的 N-1 位置亦可被烷化。

烷化劑與 DNA 作用的方式分為三種：

1. 鳥嘌呤與烷化劑結合後，易發生去嘌呤作用 (depurination)，鳥嘌呤部分由核酸鍵中離去，留下非嘌呤酸 (apurinic acid)，同時咪唑環 (imidazol) 也很容易由位置 8、9 斷裂。

2. 若烷化劑帶兩個官能基，則可能在兩個鳥嘌呤之間發生交叉連結 (Cross-linkage)，如此則在 DNA 之雙股螺旋間發生交叉連結，使雙股螺旋 (Double strand) 距離拉長，構型 (conformation) 改變，而無法成為 RNA 之引子 (primer)。
3. DNA 在鳥嘌呤 N-7 位置烷化後，則不再與胞嘧啶成對，而與胸腺嘧啶 (Thymine) 成對³⁰。

由於本實驗小組研究，純多肽不一定擁有切割能力，但接上 CLB 後即會具有切割效果，其原因是因為 CLB 是一種烷化劑藥物易與 DNA 中的部分鹼基對產生烷化作用，導致 DNA 結構被破壞及斷裂。因此，本實驗小組在 1995 年，經由實驗結果證實與 CLB 耦合之胜肽對 DNA 有選擇性結合及切割作用³¹，並於 2001 年提出含 CLB 與 2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid 之胜肽會對 DNA 進行專一性的切割³²。所以我們將具有 Py 結構的胜肽與 CLB 耦合，希望這些結合能力好的胜肽能對 DNA 更具專一性及選擇性之作用。表四為本文中含有 CLB 結構之胜肽。



(Chlorambucil, CLB)

圖 1- 8 陽離子形成圖，烷化劑之結構

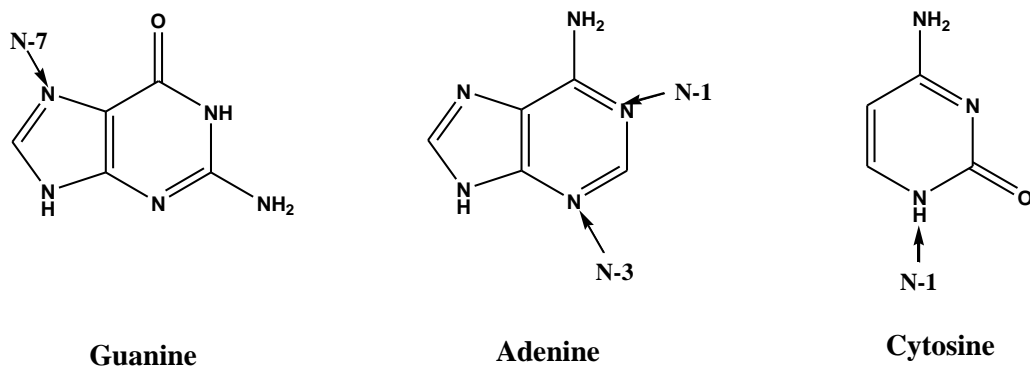


圖 1-9 DNA 鹼基被烷化的位置圖

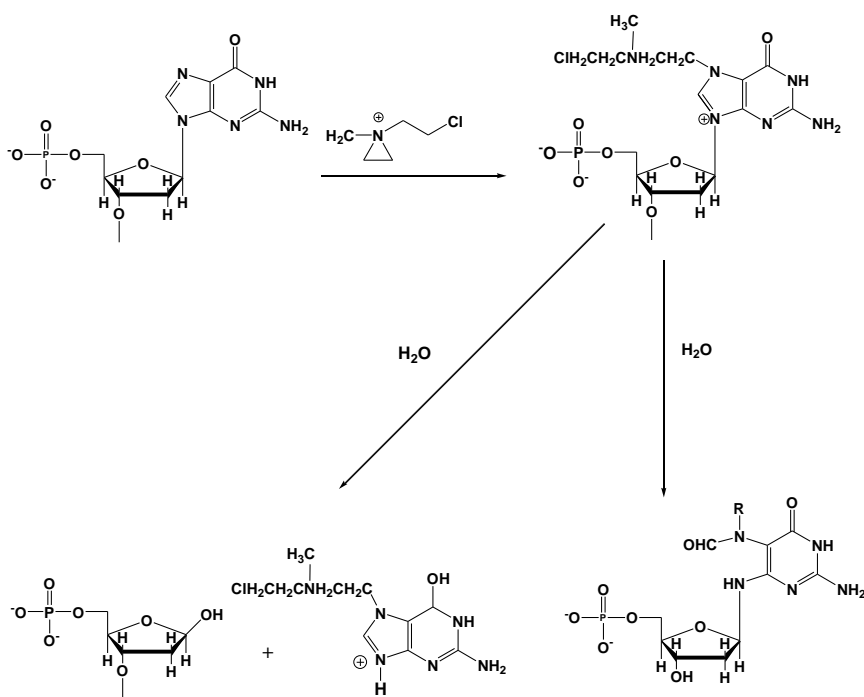


圖 1-10 Guanine 鹼基被烷化後，水解之產物結構圖

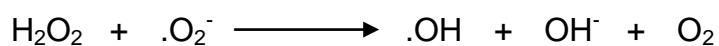
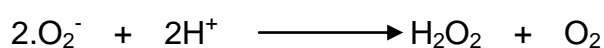
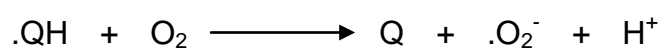
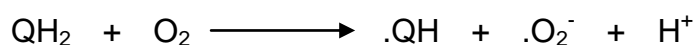
表 三 含有 CLB 結構之胜肽序列

含 CLB 結構之胜肽	
代號	序列
CLB-RHyM-10	CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Met-CONH ₂
CLB-PN4	CLB-Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂
CLB-RHyQ-10	CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Gln-CONH ₂

1-4 苯醌衍生物 2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-

mercaptoacetic acid (DMQ-MA) 之胜肽衍生物設計來源

1952 年 D. J. Cosgrove 等人由小麥胚芽中提煉出 2,6-雙甲基苯醌 (2,6-Dimethoxy-*p*-benzoquinone, DMQ)³³; 1983 年 R. Pethig 等人將維他命 C (L-ascorbic acid) 與 DMQ 混合, 產生維他命 C 與半醌 (semiquinone) 自由基, 對 ascites (腹水癌) 的老鼠產生細胞毒性³⁴⁻³⁵。也有其他報告顯示苯醌極易接受電子³⁶⁻³⁹, 而形成帶有自由基的半醌或氫醌 (hydroquinone); 此兩者皆可將自由電子傳給氧而形成具有強氧化力的帶氧物種 (oxygen species), 如超氧陰離子 (superoxide anion) 和過氧化氫 (hydrogen peroxide)。當有亞鐵離子 (Fe^{2+}) 在的情況下, 易催化過氧化氫而產生氫氧自由基 (hydroxyl radical)



QH_2 : Hydroquinone

$\cdot\text{QH}$: semiquinone

Q : quinone

這些帶氧物種以及半醌自由基都有破壞生物分子的能力，如切斷 DNA、RNA 或脂質形成過氧化物質 (peroxidation)，破壞細胞膜而造成細胞死亡³⁹⁻⁴²。

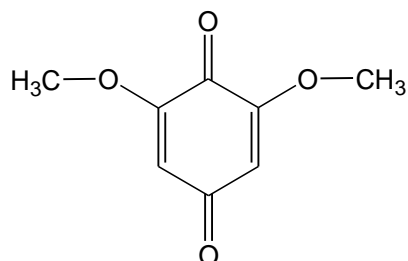


圖 1- 11 2,6-雙甲基苯醌 (DMQ) 結構圖

由於 DMQ 的水溶性不佳，1990 年 L. Sheh 發展出 2,6-雙甲基苯醌的衍生物⁴³，2,6-雙甲基氫醌-3-硫醋酸 (2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid, DMQ-MA)，增進了 DMQ 的水溶性，且此 DMQ-MA 的細胞毒性較 DMQ 優越。1992 年則進一步將 DMQ-MA 接上胺基酸衍生物⁴⁴⁻⁴⁷。從體外實驗 (in vitro) 的報告中顯示，對人類肺腺癌細胞株 (PC-9) 及口腔上皮癌細胞株 (KB) 具有良好的抑制效果⁴⁸。

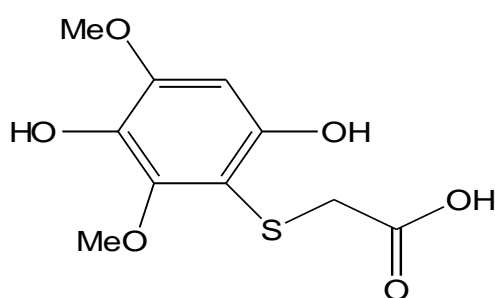


圖 1- 12 2,6-雙甲基氫醌-3-硫醋酸 (DMQ-MA) 結構圖

利用胜肽或放射標識單株抗體 (monoclonal antibody)⁴⁹⁻⁵¹ 來攜帶藥物至目標區，用以提高藥物對目標區的功效，並避免傷害周圍的正常細胞，是抗癌藥物的發展趨勢。有些報告指出，癌細胞表面的平均電價與正常細胞表面的平均電價有所不同。1956 年，E. J. Ambrose 提出老鼠腎臟癌細胞表面的負電價密度是正

常細胞的兩倍⁵²。而 J. N. Mehrishi 於 1970 年的報告中提到帶電價不同的藥物，經由癌細胞表面電價密度的改變，可達到抑制癌細胞生長的作用⁵³。

根據以上的理論，本實驗小組利用 Arg (Arginine) 側鏈在生理溶液的 pH 值 (約 7.4) 中帶正電價，而以含有 Arg 的胜肽與 DMA-MA 耦合不但可加強其水溶性也可用於抗癌試劑研究。

除了 Arg 還引入多種胺基酸合成出苯醌衍生物 DMQ-MA-PN3、

DMQ-MA-QPQ-9、DPYR、DPQR、DQRO、DPRO (表四)。

其中苯醌衍生物 DQRO 和 DPRO 進行 EPR 實驗，探討其自由基的訊號。

(DMQ-MA-Gln-Arg-Ome 和 DMQ-MA-Pro-Arg-Ome 由蔡佩如和吳宜靜學妹合成。)

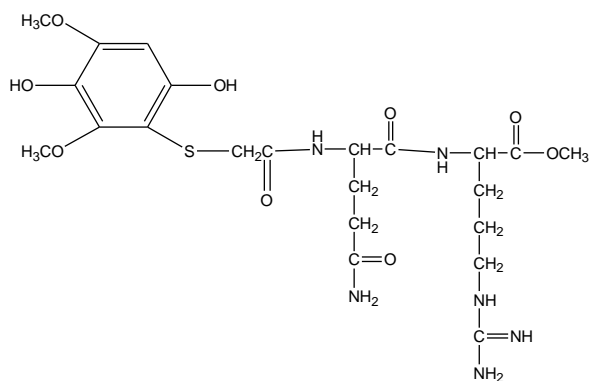


圖 1- 13 DMQ-MA-Gln-Arg-Ome 結構圖

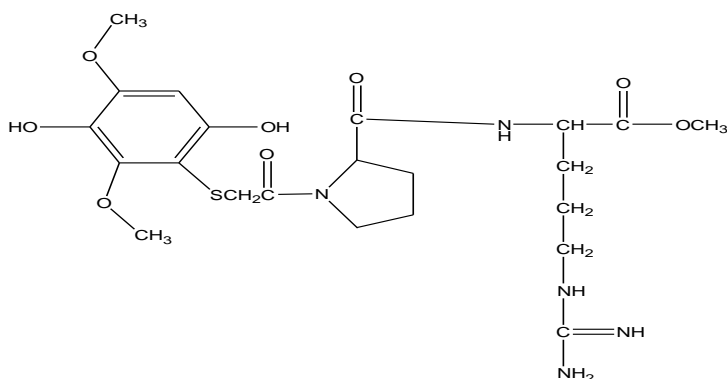


圖 1- 14 DMQ-MA-Pro-Arg-Ome 結構圖

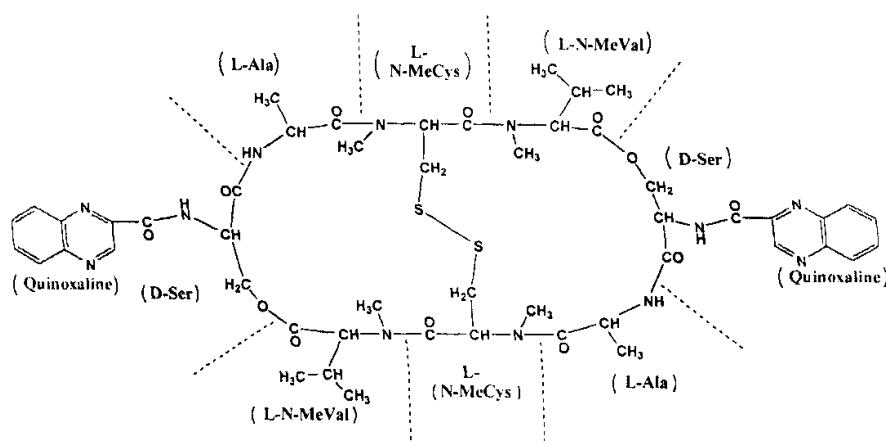
利用電子順磁共振光譜判定當 DMQ-MA 與胜肽衍生物耦合後，以不加入亞鐵離子 (Fe^{2+}) 的狀態進行偵測，觀測化合物是否也會產生自由基，另外以不同 pH 值環境下進行偵測，且觀察其對於時間的衰退，並利用凝膠電泳實驗測試對 DNA 的切割效果進行研究。

表 四 含有 DMQ-MA 結構之胜肽序列

含有 DMQ-MA 結構之胜肽	
代號	序列
DMQ-MA-PN3	DMQ-MA-Arg-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂
DPYR	DMQ-MA-Pro-Tyr-Arg-CONH ₂
DQRO	DMQ-MA-Gln-Arg-OMe
DMQ-MA-QPQ-9	DMQ-MA-Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂
DPQR	DMQ-MA-Pro-Gln-Arg-CONH ₂
DPRO	DMQ-MA-Pro-Arg-OMe

1-5 環狀胜肽

自然界中許多細菌與真菌本身都能產生如青黴素 (β -Lactam) 等抗生素，作為抵抗對其具有破壞性或與之有競爭性的微生物之防禦系統。這類細菌或真菌所產生的天然抗生素大多是大型環狀胜肽分子，如鏈黴菌屬 (*Streptomyces aureus*) 會產生 Echinomycin、Triostin A (圖 1-15)、TANDEM... 等喹啉林抗生素 (Quinoxaline antibiotic) ⁴²⁻⁴⁷。



L. Sheh 曾針對環狀胜肽合成方法做研究，近年來本實驗小組合合成各種環狀天然抗生素之衍生物 ⁴⁸，並探討環狀胜肽與 DNA 的結合作用，可以發現環狀胜肽在構型上較直鏈胜肽固定，其結構較為穩定；而短鏈直線胜肽則構型較易擺動 (vibration)，所以本實驗小組將 XPRK 序列模組概念引入環狀胜肽結構，研究其對 DNA 的結合作用和影響，並將 Pro (Proline) 以 Hyp (Hydroxyproline) 取代，研究環狀胜肽與 DNA 的結合能力(表五) ⁴⁸⁻⁵³。

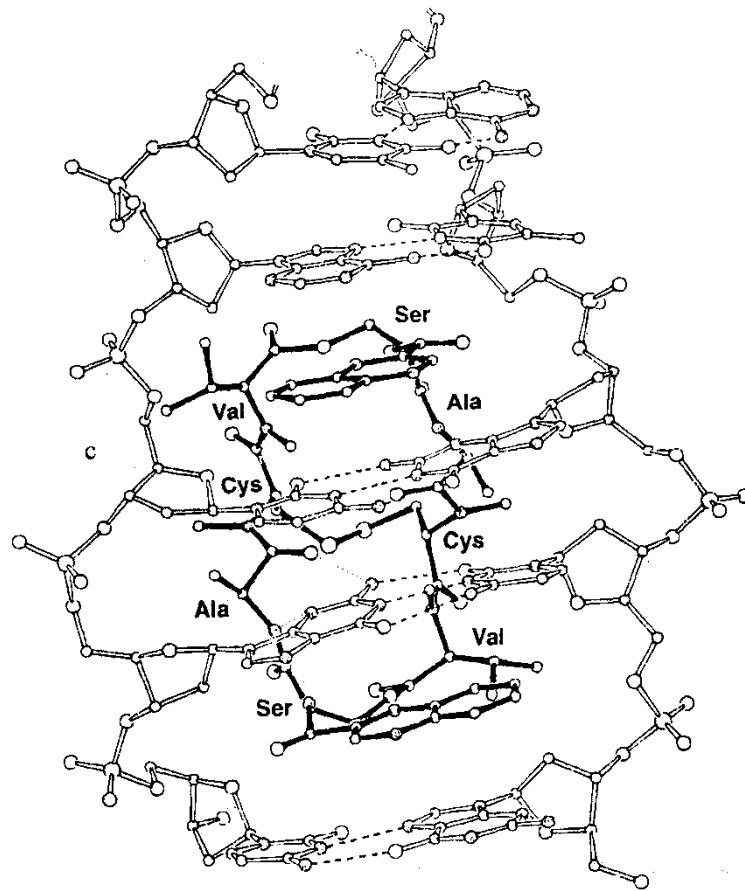


圖 1- 15 Triostin A 嵌入 DNA 鹼基對之結構圖

表 五 合成之環狀結構之胜肽序列

環狀結構之胜肽序列	
代號	序列
CHPy-12	Cyclo[CH ₂ CO-Gly-His-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg -Cys-]CONH ₂

第二章 實驗

2-1 實驗原理

本實驗室合成胜肽序列採用固相合成法 (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), 使用儀器為固相胜肽合成儀 (PS3, Peptide Synthesizer)。純化胜肽粗產物使用高效能液相層析 (HPLC) 法純化。測定胜肽與 DNA 間的初步作用探討利用平板凝膠電泳。環狀胜肽的環化、類胺基酸小分子 Fmoc-NMP (Fmoc-Py) 以及胜肽衍生物採用液相合成法。最後利用電子順磁共振光譜進行研究。

2-1-1 電子順磁共振

電子順磁共振光譜簡稱 EPR 或 ESR, 是一種研究化學物質中帶有一個或多個未成對電子的方法。EPR 的基本物理概念源自於核磁共振光譜 (NMR), 只是將 NMR 的原子核自旋 (nuclei spin) 改為電子自旋 (electron spin) 代替。由於大部分的穩定分子都擁有成對的電子對, 因此 EPR 使用上不如 NMR 來的廣泛。但也由於這項限制, EPR 是一種具有高特異性的化學方法, 對於一般的化學溶劑及物質不會引起 EPR 訊號。EPR 最早於 1944 年被蘇聯物理學家發現, 同年被 Brebis Bleaney 所發展。

EPR 基本原理為, 根據包立不相容原理, 每個分子軌域不能存在兩個相同自旋態的分子, 所以每個分子軌域中成對電子的自旋運動產生的磁矩是相抵消的, 只有存在不成對電子才會產生磁矩。電子自旋產生的磁矩 $\mu_s = g_e \mu_\beta$, 其中 μ_β

為 Bohr magneton = $9.2740 \times 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$ ， g_e 為電子的 g 因子 (g - factor) = 2.0023。單個電子磁矩在磁場方向分量為 $\mu = 1/2g_e\mu_\beta$ ，在外加磁場 B_0 存在下，只有兩種可能的能量狀態 $E = \pm 1/2g_e\mu_\beta B_0$ 。

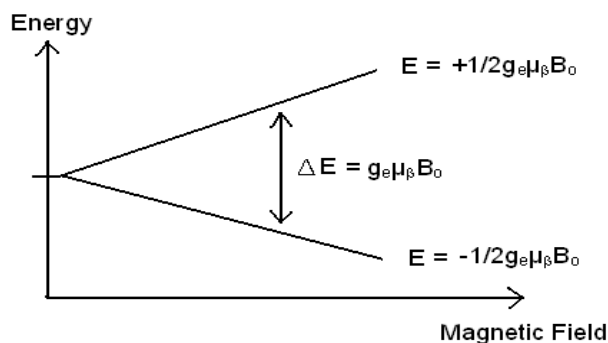


圖 2- 1 Zeeman Effect 示意圖

一個未成對電子經由吸收或放射電磁波能量為 $\epsilon = h\nu$ 可以在兩能階中移動，此為順磁共振現象；這種共振能量 $\epsilon = \Delta E$ 即 $h\nu = g_e\mu_\beta B_0$ 。此即為 EPR 訊號來源。

2-1-2 平板凝膠電泳

a. 電泳基本原理

帶電顆粒在電場作用下向著與其帶電性相反的電極移動，稱為電泳 (electrophoresis，簡稱 EP)。電泳現象在 1808 年就被發現，但作為一種分離方法卻是在 1937 年由瑞典科學家 Tiselius 設計出第一台自由電泳儀，建立了移界電泳法 (Moving boundary EP)，於 1948 年獲得諾貝爾獎。由於移界電泳法電泳時自由溶液受熱後發生密度變化，產生對流使區帶擾亂，分辨率不高；加上 Tiselius 電泳儀價格昂貴不利推廣，因此許多科學家著手改進電泳儀，尋找合適的電泳支持介質。50 年代先後找到了濾紙、醋酸纖維素薄膜、澱粉以及瓊脂糖作為支持物。60 年代發展了以聚丙烯醯胺凝膠作為支持物。而平板凝膠電泳

即以瓊脂糖作為電泳支持物。

蛋白質是由胺基酸組成，而胺基酸帶有可解離的胺基和羧基，是典型的兩性解離物質，在一定的 pH 條件下就會解離而帶電，帶電性質多少取決於分子性質和溶液 pH 值及離子強度。在一 pH 條件下，蛋白質分子所帶正電荷數恰等於負電荷數，及淨電荷為零，此時蛋白質分子在電場中不移動，則溶液的 pH 值稱為該分子的等電點 (pI)。若溶液 pH 值大於 pI ，則蛋白質分子會解離出 H^+ 而帶負電，此時蛋白質分子會向電場中正極移動；若 pH 值小於 pI 則會向負極移動。此為電泳基本原理。

b. DNA 的瓊脂糖凝膠電泳

瓊脂糖凝膠電泳對核酸的分離作用主要依據他們的分子量及分子構型，同時與凝膠的密度也有密切關係。不同構型的 DNA 在瓊脂糖凝膠中的電泳速度差別較大。

根據 Aaij 和 Borst 研究結果顯示，在分子量相當的情況下，構型的 DNA 移動速度不同，依序為超螺旋 DNA 大於直線 DNA 大於開環結構 DNA。

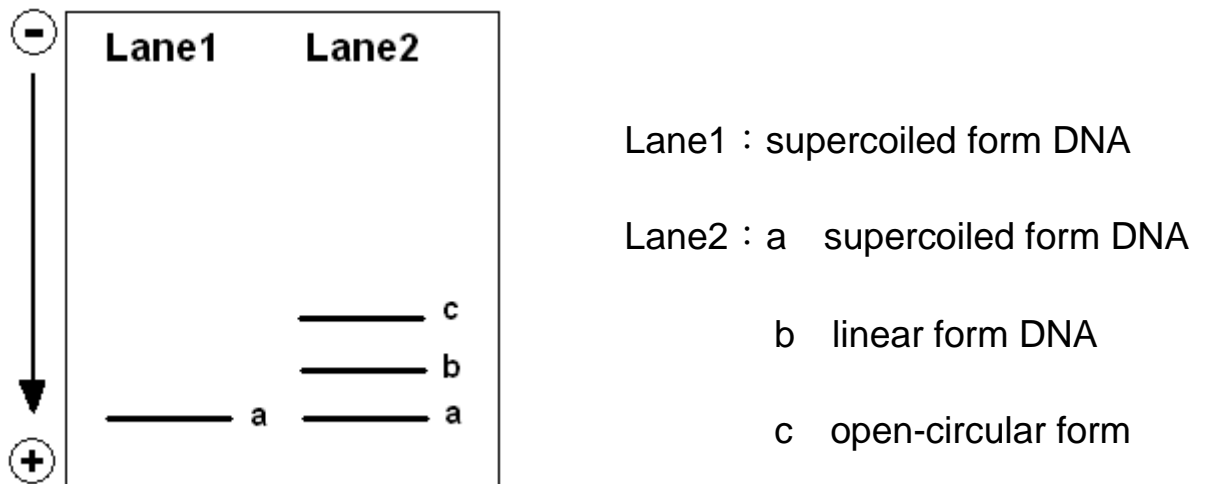


圖 2- 2 電泳凝膠說明圖

c. 凝膠位移分析 (gel shift assay)

電泳圖，上方為負極下方為正極，胜肽與 DNA 作用由負極向正極移動，反應後的凝膠電泳圖可看出各帶 (bands) 與基準帶 (standard band) 的位移差，單位為 mm，此即為凝膠位移 (gel shift)。利用凝膠位移可以探討胜肽與 DNA 作用後的滯留效應 (gel retardation effect) 算出凝膠滯留係數 (gel retardation coefficient)；滯留係數等於該帶與基準帶間的位移差除以該胜肽之濃度 (mm band shift / μM peptide)。

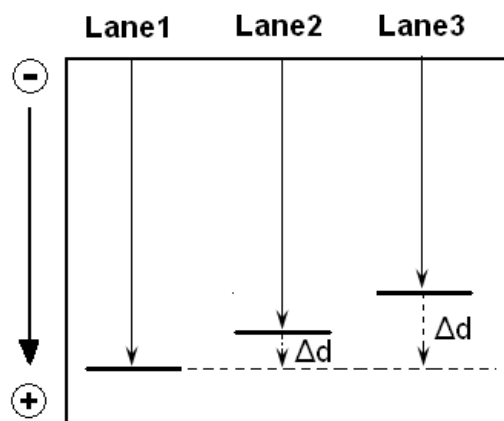


圖 2- 3 凝膠電泳位移示意圖

Δd ：基準帶與帶之間的位移差，單位 mm

Lane 1：只有 DNA 時帶在凝膠上的位置即為基準帶

Lane 2、3：各反應條件下胜肽與 DNA 作用後在凝膠上位置

d. 顯色

在凝膠電泳顯色最常使用的試劑為 Ethidium Bromide 簡稱 EB，EB 的平面結構會嵌入 DNA 的雙股螺旋結構中又不會改變 DNA 結構。經由 UV 光照射後會發出強烈的螢光性質，因此可以用來觀測凝膠電泳中 DNA 的位移情形。

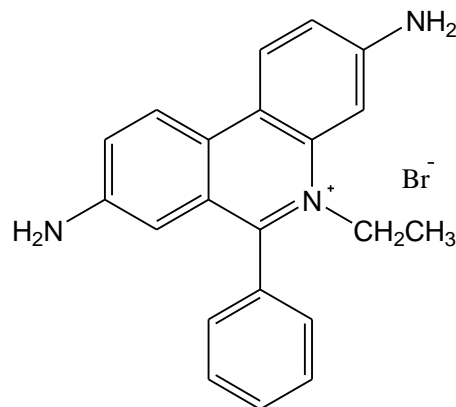


圖 2- 4 Ethidium Bromide 結構圖

2-1-3 固相胜肽合成

a. 固相胜肽合成法

固相胜肽合成法由 R. B. Merrifield 於 1963 年提出⁵⁴，這項技術使得胜肽合成變的簡單且迅速，甚至可以加以自動化。R. B. Merrifield 所提出的想法為利用聚合物構成的固態樹脂連接於第一個胺基酸的羧基端上，逐步由羧基端往胺基端合成胜肽（C-terminal to N-terminal），產物會一直留在樹脂上合成，直

到目標物合成完才由樹脂上切下，如圖 2-5。這種合成法最大的優點是簡化了中間物的純化工作，由於固相樹脂不溶於溶劑或水溶液中，在反應完成後過量的反應試劑或反應副產物都可以被直接洗去，而胜肽則被留在樹脂上。因此不但節省了操作所需的時間，也降低了傳統合成法在過濾純化步驟中損耗的產物，大大提高產率；且所有反應接在同一反應瓶中進行，解決液相合成法耗時耗力的缺點

55。

固相胜肽合成法中常被使用的胺基保護基可以被區分為兩大類：

1. 9 – fluorenylmethyloxycarbonyl group (Fmoc)

2. tert – butyloxycarbonyl group (Boc)

本實驗小組選擇 Fmoc 保護基來進行固相胜肽合成⁵⁶⁻⁵⁹。

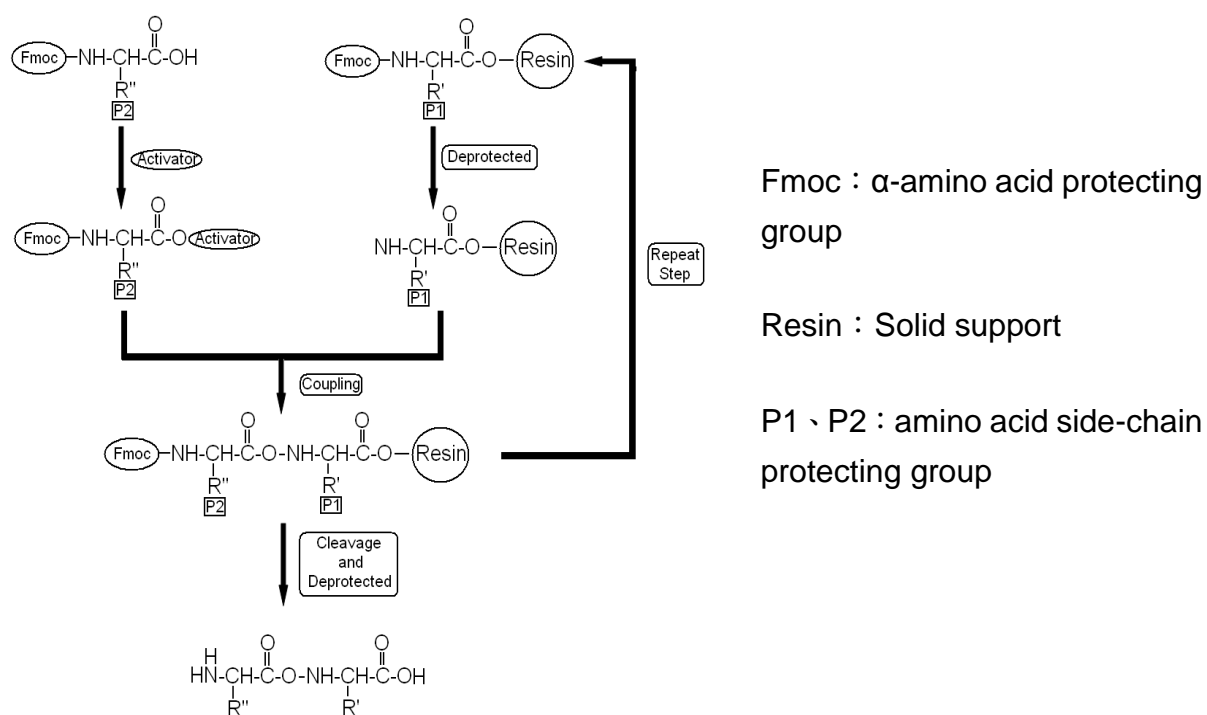


圖 2- 5 固相胜肽合成法示意圖

b. Kaiser test

固相胜肽合成法過程中，檢測耦合反應以及切除保護基與否，所採用的方式為 Kaiser test⁶⁰。主要利用水合茚三酮（ninhydrin）在加熱情況下能與一級胺基形成特徵性藍色，可用來檢測胺基存在與否。水合茚三酮和一級胺基反應產生特徵性藍色反應機構如下：

因此，當保護基被切除後胺端出現一級胺基，Kaiser test 呈現藍色（+）陽性反應，而當耦合反應完成後，胺端被 Fmoc 保護基保護，一級胺不存在下，Kaiser test 呈現黃色（-）的陰性反應。

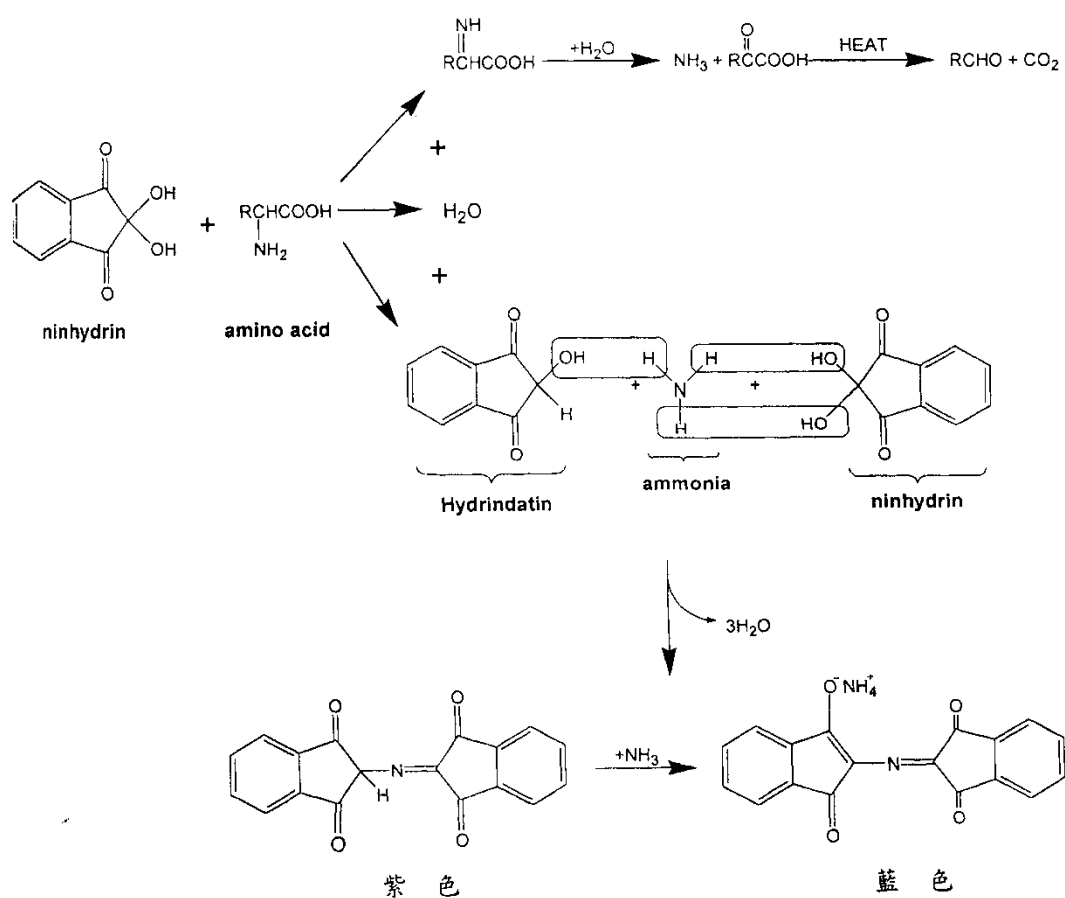


圖 2- 6 Kaiser test 示意圖

2-2 藥品目錄

2-2-1 固相胜肽合成使用之藥品

藥品名稱	藥品來源
1. Acetic Acid glacial	ECHO
2. Ammonium Carbonate	SHOWA
3. Dichloromethane	ECHO
4. 1,2-Ethanedithiol	FLUKA
5. Ethyl Ether	ECHO
6. Fmoc-Arg(Pmc)-OH	AnaSpec
7. Fmoc-Cys(Trt)-OH	AnaSpec
8. Fmoc-Gln(Trt)-OH	AnaSpec
9. Fmoc-His(Trt)-OH	AnaSpec
10. Fmoc-Hyp-OH	AnaSpec
11. Fmoc-Lys(Boc)-OH	AnaSpec
12. Fmoc-Pro-OH	AnaSpec
13. N-Chloroacetylglycine	SIGMA
14. Chlorambucil	SIGMA
15. Ninhydrin	Lancaster
16. N-Methylmorpholine	ACROS

17. N,N-Dimethylformamide	ECHO
18. Phenol	WAKO
19. Piperidine	TEDIA
20. PyBOP	NOVA
21. Pyridine	聯工
22. Rink Amide AM resin	NOVA
23. Sodium Hydroxide	TEDIA
24. Thioanisole	FLUKA
25. Trifluoroacetic acid(99%)	ALFA AESAR

2-2-2 合成 Py 使用之藥品

藥品名稱	藥品來源
1. Boc-4-amino-1-methylpyrrole-carboxylic acid	NEOSYSTEM
2. 1,4-Dioxane	皓峰
3. Ethyl Ether	ECHO
4. Fmoc-chloride	BACHEM
5. Hydrochloric acid	SHOWA
6. Natriumcarbonate wasser	MERCK
7. Dichloromethane	ECHO
8. Trifluoroacetic acid(99%)	ALFA AESAR

2-2-3 HPLC 使用之藥品

藥品名稱	藥品來源
1. Acetonitrile	TEDIA
2. Trifluoroacetic acid(99%)	ALFA AESAR
3. Methanol	ECHO

2-2-4 凝膠電泳使用之藥品

藥品名稱	藥品來源
1. LE agarose	SeaKem
2. Iron(II) Sulfate heptahydrate	MERCK
3. DNA(PBR322)	BioLabs
4. Disodium Ethylenediamine Tetraacetate	FisherChemical
5. Tris(hydroxymethyl)aminomethane	TEDIA
6. Boric acid	TEDIA
7. Sodium Chloride	HANAWA
8. Potassium Chloride	WAKO
9. Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous	TEDIA
10. Potassium dihydrogenphosphate	SHOWA
11. Ethidium Bromide	SIGMA

2-2-5 有機合成使用之藥品

藥品名稱	藥品來源
1. L-Arginine Methyl Ester	SIGMA
2. N-t-Boc-L- glutamine	SIGMA
3. N-Boc-L- Tyrosine	SIGMA
4. N,N'-Dicyclohexyl-carbodimide(99%)	ACROS
5. Pentafluorophenol	ALDRICH
6. N-t-Boc-L-Phenylalanine	SIGMA
7. Dichloromethane	ECHO
8. N,N-Dimethylformamide	ECHO
9. Chloroform	ECHO
10. n-Hexane(85%)	TEDIA
11. Ethyl Ether	ECHO
12. N,N-Diisopropylethylamine	ACROS
13. 1,2,3-Trimethoxybenzene	FLUKA
14. Thioglycolic acid	SIGMA
15. Methanol	ECHO
16. Acetic acid glacial	ECHO
17. Trifluoroacetic acid(99%)	ALFA AESAR

18. Tetrahydrofuran	TEDIA
19. Ethanol	景明
20. Sea sand	SHOWA
21. Silica gel 60 (0.04~0.063mm)	MERCK
22. N ₂	炳輝

2-2-6 EPR 實驗使用之藥品

藥品名稱	藥品來源
1. Hydrochloric acid	景明
2. Sodium Hydroxide	景明
3. Sodium Phosphate Dibasic	景明

2-3 儀器清單

1. 固相胜肽合成儀：PS3，AUTOMATED SOLID PHASE PEPTIDE

SYNTHESIZER，Rainin

2. 高效能液相層析儀（HPLC）：

層析管柱 Reverse Phase（Vydac C18，0.4×25 cm；1×25 cm）

幫浦 HITACHI，L-7100 型

紫外光偵測器 Soma UV-VIS detector/S-3702，Range：180~610nm

紀錄器 PC 個人電腦安裝 Hitachi HPLC D-7000 分析軟體

3. 冷凍乾燥機：

- a. PANCHUM FREEZE DRYER CT-serues
- b. EYELA FDU-1200
4. 高真空幫浦：EDWARDS RV-12
5. 旋轉濃縮機：

旋轉濃縮器 BUCHI R-114

抽真空幫浦 Eyela Aspirator A-3S
6. 循環水槽：FIRSTEK B401L
7. 氮氣產生器：NITROX，VHP nitrogen generator
8. 熔點測定儀：MEL-TEMP II
9. 旋光度測定儀：AUTOPOL II (Automatic polarimeter)
10. 凝膠電泳分析：

電泳槽 HYBAID

電源供應器 Ps500XT DC

UV 光源 SPECTROLINE TC-312A

照相機 DS34，POLAROID (Direct screen instant camera)

底片 Polaroid，Polapan 667
11. 色層管柱分析，裝填 Merck-230-400 mesh ASTM Art 9385 之

60 型矽膠
12. Thin layer chromatography (TLC) (Aluminium sheets silica gel 60F₂₅₄)

20x20 cm layer thickness 0.2 mm)，以 UV 燈 (UVGL-25)

照射，置於酒精燈上烘烤，使其碳化呈色

13. 分子量測定：中興大學貴重儀器中心代測

ESI-MS

高解析 FAB-MS Finnigan/Thermo Quest MAT 95XL

14. EPR 測定：德國 BRUKER，EMX-10

中興大學貴重儀器中心代測

15. X 光單晶繞射，委託中興貴重儀器中心代測，使用 Bruker AXS SMART-1000

單晶繞射儀在化學分子的三維結構鑑定其鍵長及鍵角的結構分析。

2-4 實驗步驟及儀器操作設定

2-4-1 固相胜肽合成流程

1. 樹脂保護基 (Fmoc) 切除

將樹脂約 50 mg (0.0315 mmol) 置於反應瓶中，加入約 2~3 mL 的二氯甲烷(DCM)，使樹脂有效膨脹以利反應。靜置 20 分鐘後抽除 DCM 並進行清洗步驟 4~5 次，注入 15 單位時間 (sec) 的 DMF，以 N₂ 攪動 35 秒後，流除溶液 15 單位時間。清洗完樹脂後，重複 3 次切除保護基反應步驟，注入 3 單位時間 DEP 試劑 (20% piperidine / 80% DMF)，N₂ 攪動反應 15 分鐘後流除溶液 15 單位時間，即可切除樹脂保護基。再進行清洗步驟 4 次。此步驟之 Kaiser test 為藍色 (+)。

2. 胺基酸與樹脂的連接 (Fmoc-A.A.-Resin)

樹脂為 1 當量計算，於樣品瓶中稱取 2 當量的耦合試劑 (coupling reagent) PyBOP 及 2 當量具有 Fmoc 保護基之胺基酸，以約 5 mL 的活化劑 (0.4 M NMM/DMF，8.9 mL NMM/191.9 mL DMF) 溶解，並注入反應瓶中，N₂ 攪動反應 40~50 分鐘後流除溶液 15 單位時間。重複 2 次連接(linkage) 步驟後進行清洗步驟 4 次。此步驟之 Kaiser test 為透明或淡黃色 (-)。

3. 胺基酸保護基 (Fmoc) 之切除 (Deprotection)

注入 3 單位時間 DEP 試劑 (20% piperidine / 80% DMF)，N₂

攪動反應5分鐘後流除溶液15單位時間，重複4次即可切除胺基酸上的Fmoc保護基。切除後進行清洗步驟4次。此步驟之Kaiser test為藍色(+)。

4. 胺基酸耦合 (Coupling)

樣品瓶中秤取2當量的耦合試劑 (coupling reagent) PyBOP及2當量具有Fmoc保護基之胺基酸，加入約5ml的活化劑(0.4 M NMM/DMF, 8.9 mL NMM/191.9 mL DMF)溶解並注入反應瓶中，N₂攪動反應40~50分鐘後流除溶液15單位時間。重複2次此步驟後進行清洗步驟4次。此步驟之Kaiser test為透明或淡黃色(-)。

5. 切除樹脂 (Cleavage)

胜肽序列所需之胺基酸依序連接好，並切除最後胺基酸Fmoc保護基(若為合成環肽，則不需切除保護基)之後，即可進行切除樹脂反應，將胜肽由樹脂上切下。首先，製備切割試劑(cleavage reagent)於樣品瓶備用：

Phenol : 0.375 g

TFA : 5 mL

D.I.W. : 0.25 mL

Thioanisole : 0.25 mL

EDT : 0.125 mL

以二氯甲烷(DCM)清洗反應瓶中的樹脂數次，過濾後並以高真空幫浦

抽除 DCM，將抽乾的樹脂倒入單口圓底瓶中後，緩緩加入製備的切割試劑，室溫下攪動反應 1 小時 50 分。反應完畢，將圓底瓶移至-70°C 冷凍櫃中靜置一晚完全冷凍，再將冷凍後的圓底瓶移至冷凍乾燥機中，抽除切割試劑，即可得到乾燥的胜肽、樹脂與側鏈保護基的混合粗產物。

利用無水乙醚約 40~45 mL 分四次清洗混合粗產物，濾紙過濾洗去殘餘的反應試劑及側鏈保護基，濾紙上殘留胜肽及樹脂；再利用 5%的冰醋酸水溶液洗下吸附於樹脂上的胜肽，再將溶有胜肽的 AcOH 水溶液冰凍後抽乾，即可得到未純化之直鏈胜肽。

將未純化之胜肽以 HPLC 純化，並冷凍抽除溶劑，即可得最終純化胜肽。

6. Kaiser test

取出極少量的樹脂置入小試管中，依序加入 100 μ L Pyridine、75 μ L (8 g phenol / 2 mL EtOH) 及 75 μ L (0.2 g ninhydrin / 2 mL EtOH)。混合均勻後在酒精燈下烘烤即可觀察顏色變化判定反應結果。

2-4-2 固相胜肽合成儀儀器操作

固相胜肽合成儀儀器操作面板如下顯示：

	FILL	MIX	DISP	REP
SOLV	03	00:00 : 35	15	4
DEP	03	00:05 : 00	15	4
ACT	00	00:40 : 00	15	2

FILL：溶劑注入反應瓶單位時間 (sec)

MIX：打入氮氣的單位時間 (hr : min : sec)

DISP：抽除反應瓶內溶劑的單位時間 (sec)

REP：重複反應的次數

SOLV (清洗步驟)：清洗樹脂時注入 DMF 3 單位時間的量，以氮氣攪動 35 秒，

抽除溶劑時間為 15 單位時間以確定溶劑完全抽除。此步驟

重複 4 次。

DEP (切除保護基步驟)：反應中注入 DEP 試劑 (20% piperidine / 80% DMF)

3 單位時間，以氮氣攪動反應 5 分鐘，抽除溶劑單位時

間為 15 單位時間。此步驟重複 4 次。

ACT (耦合步驟)：將胺基酸與偶合試劑 PyBOP 溶於 5ml 活化試劑

(0.4 M NMM/DMF) 加入反應瓶中，FILL 指令不

需注入溶劑，氮氣攪動反應 40 分鐘，抽除溶劑 15

單位時間。此步驟重複 2 次。

2-4-3 高效能液相層析 (HPLC) 法儀器設定

層析管柱：reverse phase C18 (0.4x25 cm ; 1x25 cm) column

紫外光偵測波長： $\lambda = 214 \text{ nm}$

管柱大小	0.4x2.5 cm column	1x2.5 cm column
------	-------------------	-----------------

沖提速度	1 mL/min	2.5 mL/min
------	----------	------------

電腦軟體：Hitachi HPLC D-7000 分析軟體

沖提液系統	A 液	5% MeOH	95% H ₂ O	0.1% TFA
	B 液	95% MeOH	5% H ₂ O	0.1% TFA
	C 液	100% MeOH		

梯度與時間關係設定

B 液	0%	30%	70%	100%
	0min	10min	20min	30min

2-4-4 液相胜肽合成法

1. 環狀胜肽之環化步驟

環化方式大略分為三種形式：1.側鏈與側鏈環化（side chain to sidechain cyclization） 2.側鏈與主幹環化（side chain to backbone cyclization） 3.頭與尾環化（head to tail cyclization），不同的環化方式會產生不同的環化結果。本實驗室採用的環化方法為側鏈與主幹環化，利用胜肽序列前端 Cysteine 側鏈上的硫分子攻擊直鏈胜肽主幹尾端乙烯基上的 α 碳，離去氯原子，使胜肽環化（圖 2-7）。

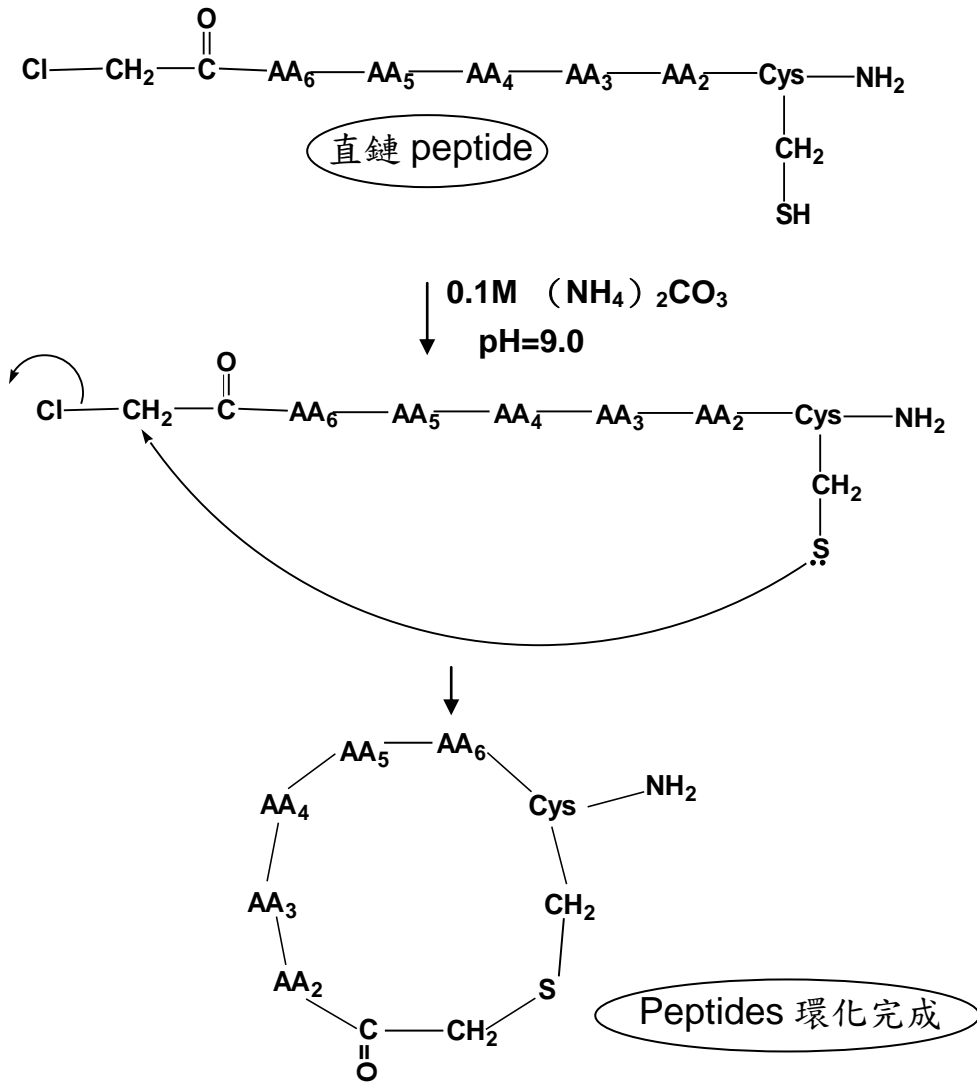
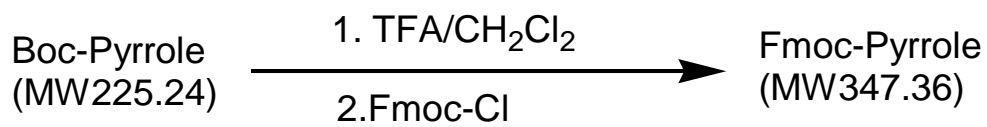


圖 2-7 環狀胜肽合成法

實驗步驟將純化後的直鏈胜肽置入圓底瓶中，加入 0.1 M (NH₄)₂CO₃ (0.672 g / 70 mL D.I.W.)，利用 NaOH 溶液調 pH 值至 9.0 左右，於室溫下 (25~30 °C) 攪動反應 8 小時，冷凍抽乾去除溶劑，再以 HPLC 純化抽乾後之環肽粗產物，即可得所需的環肽。

2. Fmoc-4-amino-1-methylpyrrole-2-carboxylic acid (NMP) 合成步驟



取 100 mg Boc-pyrrole 至於圓底瓶中，加入 1.1 mL TFA 和 1 mL DCM，在室溫下攪動反應 1 小時，以去除氮端上之 Boc 保護基（反應機構如下），利用抽真空水幫浦抽除試劑可得黃灰色粉末。

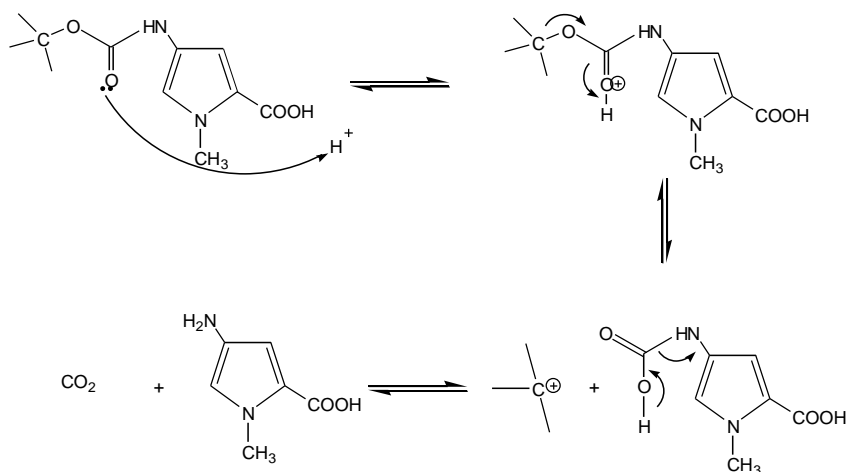


圖 2- 8 Boc-pyrrole 去除氮端上之 Boc 保護基反應機構示意圖

於圓底瓶中加入 2 mL 10 % Na_2CO_3 和 2 mL 1,4-Dioxane，攪動使粉末溶解，再加入 100 mg Fmoc-Cl 冰浴反應 4 小時，移至室溫下反應 8 小時；反應結束後加入 100 mL 去離子水稀釋，利用 150 mL 乙醚分 3 次進行萃取，收集水層置於 4 °C 冰箱冷卻 30 分鐘，再利用 6 N HCl 滴定至 pH=2 左右，靜置 4 °C 冰箱一晚使產物沉澱，過濾即可得淡褐色產物 Fmoc-NMP。

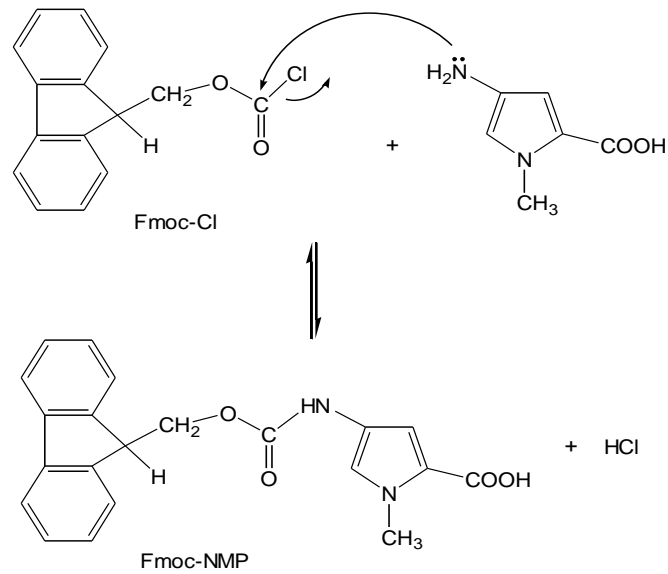


圖 2-9 Fmoc-NMP 合成示意圖

2-4-5 平版凝膠電泳實驗

1. 製備 0.5% gel

秤取 0.369 g 的 LE agarose gel 溶於 74 mL 0.5x TBE 中，利用微波爐加熱至 agarose gel 溶解，將膠液緩慢倒入電泳槽中，避免產生氣泡，靜置至凝結。

2. Buffer 配製

5x TBE : 54 g	Tris	} 溶於 1 L 去離子水
27.5 g	Boric acid	
3.7 g	EDTA	

10x PBS : 8.5 g	NaCl	} 溶於 1 L 去離子水
0.2 g	KCl	
1.15 g	Na ₂ HPO ₄	
0.2 g	KH ₂ PO ₄	

3. 胜肽與 DNA 的配製

將胜肽依照濃度利用 0.5x PBS 製備好。0.6 μ L 離心管中加入適量的 DNA (0.225 μ g/ μ L)、buffer、去離子水後，先預熱 8 分鐘，再加入適量胜肽溶液。65 $^{\circ}$ C 下反應 25 分鐘，反應完成移至冰水域中 4 分鐘終止反應，再加入 dye 和 buffer。混合均勻即可依序注入倒滿 0.5x TBE buffer 電泳槽中的凝膠小孔。電壓 100 V，電流 30 A，時間約為 2.5 小時。

4. 顯像

取出凝膠浸泡在 500 mL 0.5x TBE 溶液 (含 150 mL EthidiumBromide 1 mg/mL) 30 分鐘，再將凝膠浸泡於 0.5x TBE buffer 10 分鐘，最後把凝膠置於 UV 光源下顯影並照相，得電泳膠圖。

2-4-6 苯醌衍生物合成步驟

1. 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMQ) 的合成

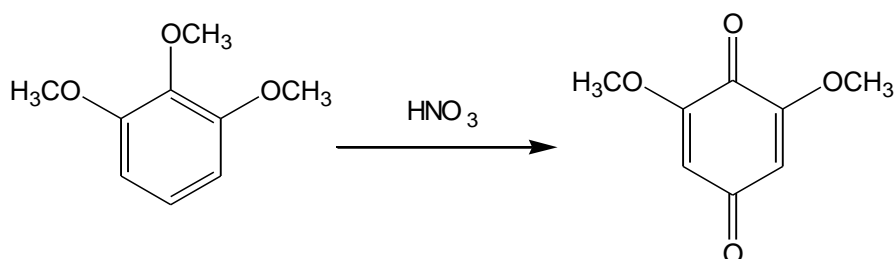


圖 2- 10 DMQ 的合成示意圖

取 5 g 1,2,3-Trimethoxybenzene 溶於 25 mL 乙醇中，2 小時內滴入硝酸水溶液 (12.2 mL H₂O + 12.8 mL HNO₃) 並在冰浴

下攪動反應（逐漸產生大量黃色沉澱物），之後移至室溫在攪動 2

小時反應，過濾沉澱物並用適量的去離子水以及乙醇清洗，可

得亮黃色粗產物。以熱的冰醋酸做再結晶，可得亮黃色針狀晶體，

過濾用正己烷清洗，抽乾溶劑即可得 DMQ（產率約 50~60%）。

2. 2,6-雙甲氧基氫醌-3-硫醋酸（DMQ-MA）的合成

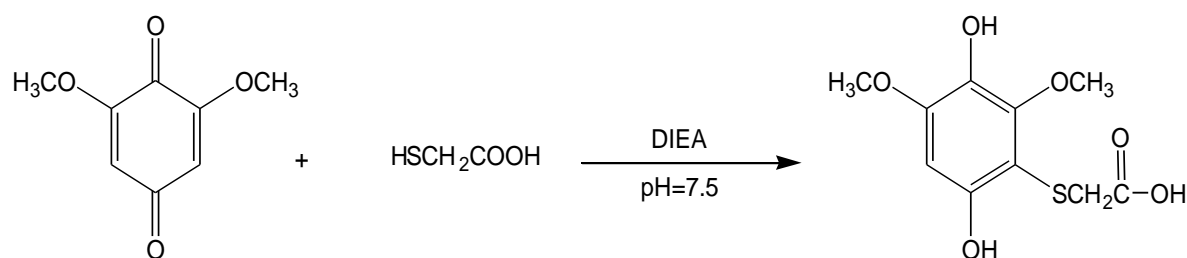


圖 2- 11 DMQ 的合成示意圖

反應瓶放入 1 g DMQ 溶於 11 mL EtOH、3 mL H₂O、7.5 mL THF，冰浴且避光，將 Thioglycolic acid 溶在 5 mL EtOH 於 1 小時內加入反應瓶中，攪動 1 小時後移至室溫反應 3 小時，以 TLC 偵測反應情形，反應完畢後溶液成橘紅色，用旋轉濃縮機抽除溶劑，再以高真空幫浦抽乾，得紅色黏稠狀產物。用 THF 及乙醚做再結晶，可得深紅色固體 DMQ-MA（產率約 50~60%）。

3. Boc-X-Arg-OMe 的合成

取 N-t-BOC-L-X 0.2 g(設為 1 當量)溶於 1 mL DCM 中，冰浴攪動 5 分鐘，冰浴下加入 1.5 當量五氟酚 (pfp) 攪動 5 分鐘，再加入 1 當量 DCC 攪動 10 分鐘，移至室溫下反應 1 小時 30 分鐘，過濾 DCM，抽乾濾液，可得白色黏稠狀液體 N-t-BOC-L-pfp。冰浴下加入白色固體 H-Arg-OMe · 2HCl 以及 1 mL DMF，

立即以 DIEA 將溶液調 pH 值至 7.0~7.5 (反應中皆保持此 pH 值)，冰浴下攪拌 20 分鐘(每 10 分鐘測量 pH 值為 7.0~7.5)後移至室溫反應 1.5 小時過濾、旋轉濃縮機抽乾，再利用減壓蒸餾法除去剩餘溶劑，得白色黏稠液體粗產物，再以液態色層分析法純化，可得白色固體 BOC -X-Arg-OMe (產率約 50~60%)。

3. 胜肽與 2,6-雙甲氧基氫醌-3-硫醋酸的耦合

a. DMQ-MA 的製備

取 DMQ-MA 0.2 g (設為 1 當量) 溶於 1 mL DCM 中，冰浴攪動 5 分鐘，冰浴下加入 1.5 當量五氟酚 (pfp) 攪動 5 分鐘，再加入 1 當量 DCC 攪動 10 分鐘，移至室溫下反應 1 小時 30 分鐘，過濾 DCM，抽乾濾液，可得橘紅色黏稠狀液體 DMQ-MA-pfp。

b. Boc-X-Arg-OMe 的製備

將 BOC-X-Arg-OMe(1 當量) 溶於 1mL DCM 以及 1.1mL TFA 中，於室溫反應一小時，過濾、旋轉濃縮機抽乾得白色固體 X-Arg-OMe。

c. DMQ-MA-X-Arg-OMe 的合成

冰浴下將 X-Arg-OMe (1 當量) 溶於 0.5mL DMF 中，DMQ-MA-pfp 溶於 0.5mL DMF 中，將兩溶液混合均勻，立即以 NMM 將溶液調 pH 值至 7.0~7.5 (反應中皆保持此 pH 值)，冰浴下攪拌 20 分鐘(每 10 分鐘測量 pH 值為 7.0~7.5)後移至室溫反應 1.5 小時，過濾、旋轉濃縮機抽乾，再利用減壓蒸餾法除去剩餘溶劑，得橘紅黏稠液體粗產物，再以液態色層分析法純

化，可得橘紅色固體 DMQ-MA-X-Arg-OMe (產率約 20~40%)。

2-4-7 Electron Paramagnetic Resonance (EPR) 實驗步驟

將待測樣品與 Na_2HPO_4 溶於 550 μL 去離子水中，混合均勻後迅速倒入 EPR cell 中，開始進行測量。每 2 min. 5 min. 10 min. 15 min. 20 min. 25 min. 30 min. 35 min. 40 min. 45 min. 50 min. 55 min. 60 min. 65 min. 70 min. 等時間紀錄圖譜，之後改變不同 pH 值偵測訊號改變情形。處理圖譜可利用 WIN-EPR SimFonia 軟體進行數據處理，積分圖譜可得訊號積分值。(儀器操作由中興貴重儀中心吳小姐代為操作)

2-4-8 DMQ-MA (2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptopropionic acid) 結晶實驗步驟

將 30mg DMQ-MA 溶於 2ml DMC 中置於 20ml 樣品瓶中，搖晃至全溶，加入 0.5 ml 乙醚，將蓋子打洞，使 DMC 自然揮發，一至兩天瓶底得淡粉色結晶，委託中興貴重儀器中心代測。

2-4-9 凝膠電泳切割百分比公式⁷⁷

$$\% \text{ cleavage} = \frac{(\text{band c} + \text{b}) / 1.4}{\text{band a} + (\text{band c} + \text{b}) / 1.4}$$

第三章 結果與討論

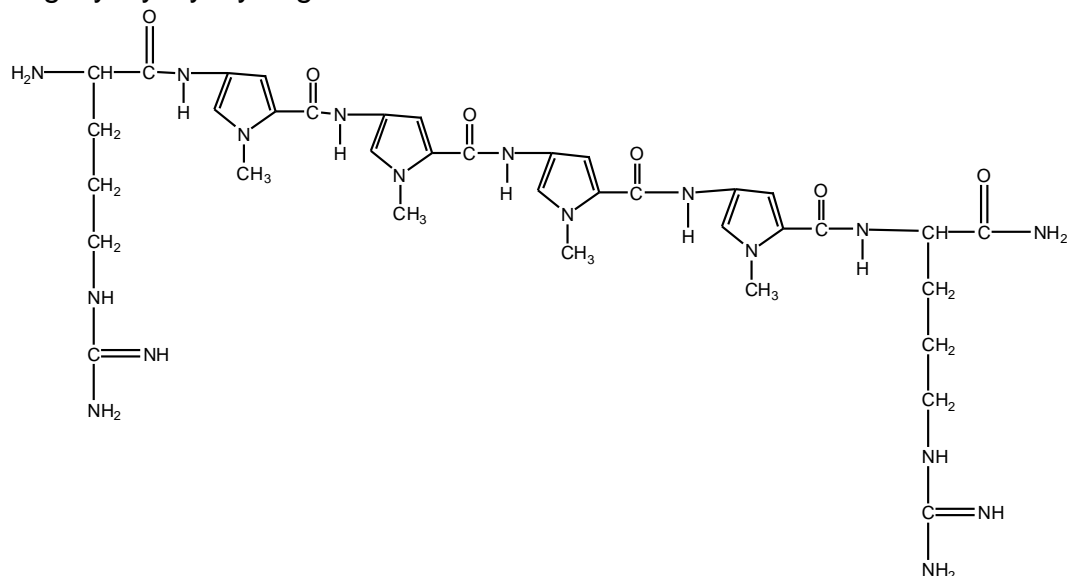
本文利用固相胜肽合成法，合成出含有 Py (Pyrrole) 之直鏈胜肽、環狀胜肽以及含有氮苯芥丁酸(Chlorambuil, CLB)小分的之直鏈胜肽以及含有 DMQ-MA(2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid)的直鏈胜肽。最初胜肽設計源自於海膽精原組織蛋白中的 SPKK 單元，之後 L. Sheh. 加以研究修飾並發表相關論文，證實 HPRK 單元和 XPRK 單元對 DNA 亦有好的結合能力。此推測 Arg 和 Lys 均為側鏈為帶正電荷的鹼性胺基酸，易與 DNA 磷酸骨架產生親和性；而 Luscombe 2001 年⁶¹提出了 Arg 和 Lys 易與 DNA 鹼基形成 monodentate 及 bidentate interaction，增加了胜肽與 DNA 的結合力。在含 Py (Pyrrole) 胜肽方面，美國 Dervan 教授提出很多相關研究證實 Py (Pyrrole) 確實對 DAN 有良好的結合性⁶²⁻⁶⁶。而 CLB 則是對 DNA 的烷化試劑，本實驗小組在 1995 年，經由實驗結果證實與 CLB 耦合之胜肽對 DNA 有選擇性結合及切割作用，並於 2001 年提出含 CLB 與 DMQ-MA 之胜肽會對 DNA 進行專一性的切割。因此，根據上述理由並加以修飾胺基酸序列，本文提出一條新環狀胜肽，六條新直鏈胜肽，三條新的含有 CLB 之直鏈胜肽，以及六條含有 DMQ-MA 之直鏈胜肽。

合成所需序列後，利用高效能液相層析分析儀進行純化，並將純化後之胜肽以 ESI-MS 測定結構正確性；之後測定胜肽的物理性質如：旋光度、熔點；最後利用平板凝膠電泳進行胜肽與 DNA 作用的基本測試。

3-1-1 含有 Py (Pyrrole) 之直鏈胜肽

PN4

Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₃₆H₅₁N₁₇O₆

HPLC (0.4x25 cm column) Rt = 17.80 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 25.61 mg ; 純化後產物 : 8.3 mg

產率 : 51.22 % ; 純化產率 : 32.40 %

產物為白色固體，熔點 : 120~122 °C

[α]_D²⁵ : 35.56 (1.61 x 10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 817.42 , 實驗值 817.90

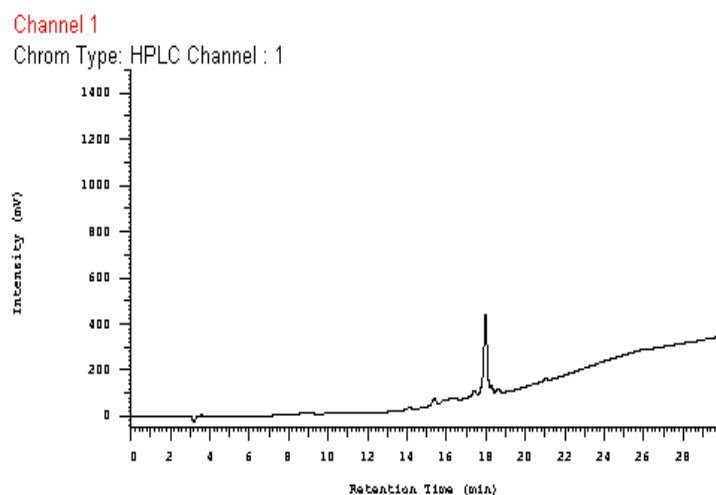


圖 3- 1 PN4 純化之 HPLC 層析圖

(0.4x25 cm column , Rt =17.80 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~8：PN4 (0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0 μM)

Lane9：pBR322 DNA only

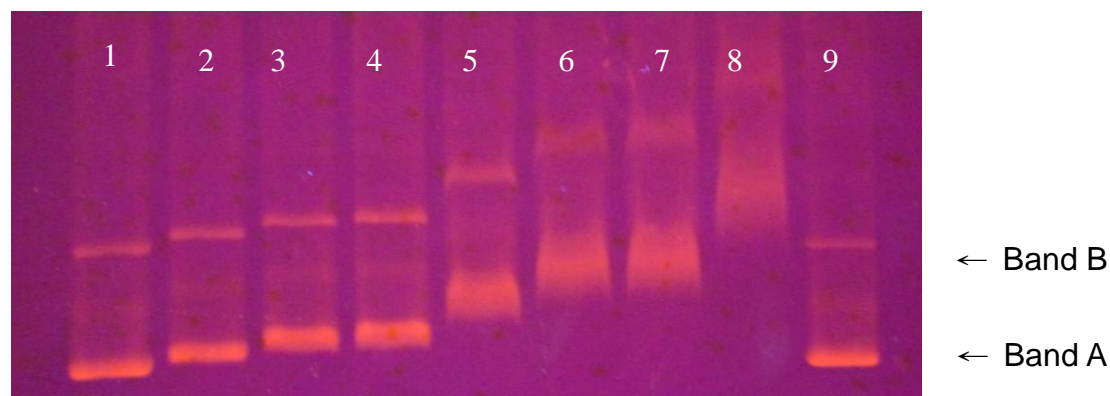


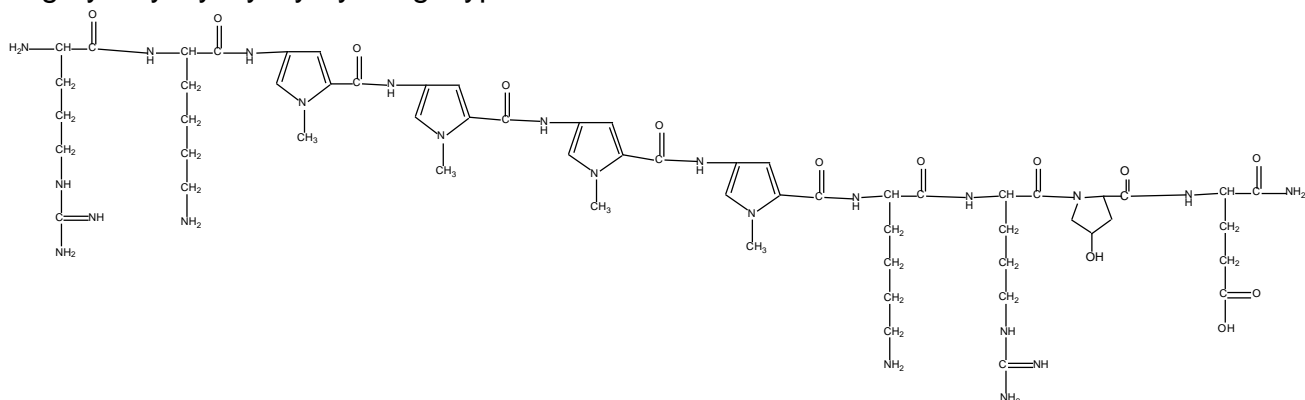
表 六 PN4 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Drug 濃度 (μM)	0.5	1	1.5	2	3	5	7	10	---
Band A (mm/μM)	0.2	1.2	1.87	1.5	3	2.8	2.1	2.6	---
Band B (mm/μM)	0.2	1.2	2	1.5	3	2.6	2.1	2.3	---

單純含有 Py 結構與 Arg 的胜肽 PN2 及 PN3 已由高君翰學長合成出⁶⁹，PN4 含有 4 個 Py 結構，經過與 PN2 及 PN3 凝膠電泳的比較，PN2 在 0.5 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 4，而在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 4；PN3 在 0.5 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 2，而 1 μM 的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 5；PN4 在 0.5 μM 時的 Band A 和 Band B 凝膠滯留係數皆為 0.2，而 1 μM 的 Band A 和 Band B 凝膠滯留係數皆為 1.2。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 PN4 對於 DNA 的結合能力比 PN2 及 PN3 較不佳。

RHyE-10

Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Glu-CONH₂



分子式：C₅₈H₈₉N₂₃O₁₃

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 13.90 min

Resin : 100.0 mg

粗產物：60.53 mg；純化後產物：17.32 mg

產率：60.53 %；純化產率：28.6 %

產物為白色固體，熔點：130~134 °C

[α]_D²⁵ : -21.67 (17.01 × 10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1315.70，實驗值 1316.47

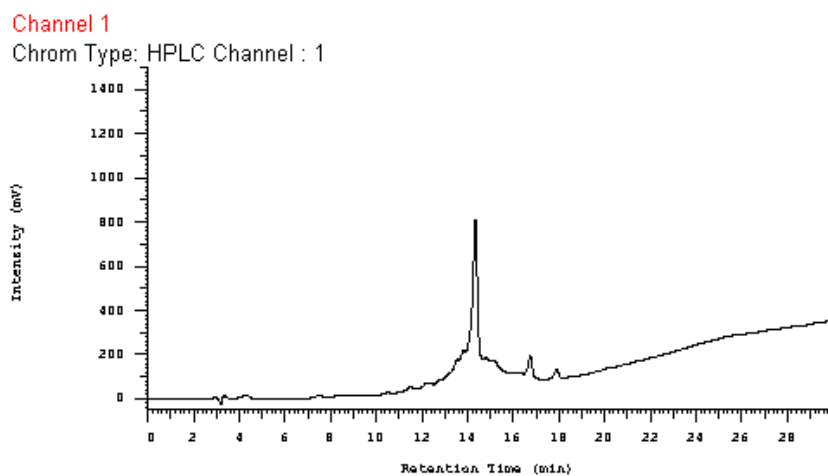


圖 3- 2 RHyE-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4×25 cm column , Rt = 13.90in)

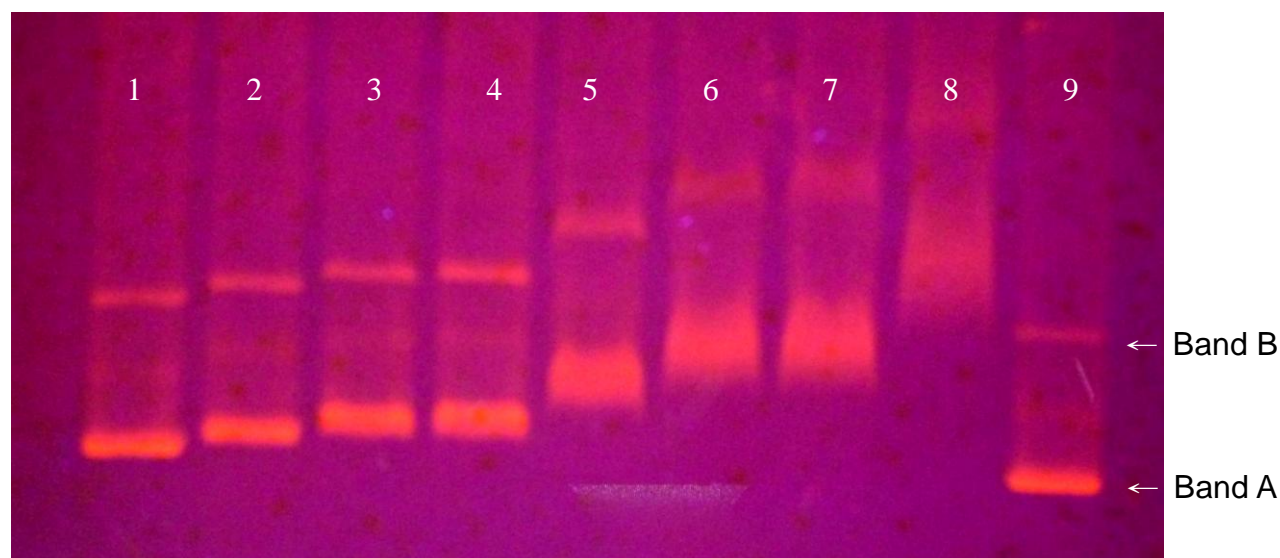
凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5xTBE，pH 7.4

Lane1~8：RHyE-10 (0.1、0.5、0.8、1.0、1.8、2.5、3.0、5.0 μM)

Lane9：pBR322 DNA only



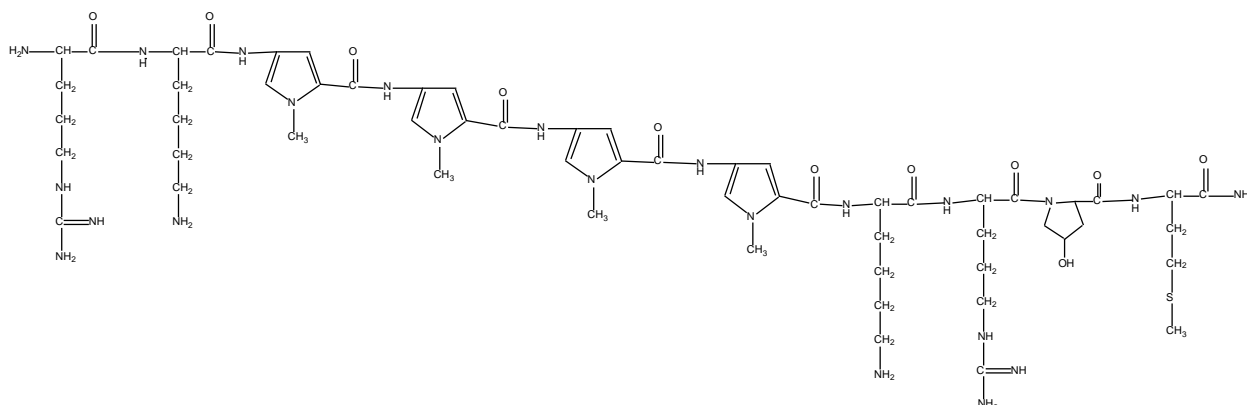
表七 RHyE-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.5	0.8	1	1.8	2.5	3	5	---
Band A (mm/μM)	47	11.4	8.75	6.5	5	7.6	6.7	6.6	---
Band B (mm/μM)	48	14	8.38	7	5.6	7.2	7	6.2	---

由周依君學姐合成之直鏈胜肽 HyE-10，凝膠滯留係數為 3.6，與 RHyE-10 在 1 μM 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 6.5、Band B 為 7 相比，相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 RHyE-10 對於 DNA 的結合能力比 HyE-10 較好。而觀察 RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10 以及 RHyH-10 四者結構發現，RHyE-10、RHyM-10、RHyH-10、RHyQ-10 四者只差一個胺基酸側鏈，RHyE-10 差異之胺基酸側鏈 Glu 在中性溶液環境下會帶有負電荷，RHyH-10 差異之胺基酸側鏈 His 在中性溶液環境下會帶有正電荷，RHyM-10、RHyQ-10 兩者之胺基酸側鏈 Met、Gln 均為中性，四個胜肽與 DNA 的結合能力依大小排列為 RHyE-10、RHyH-10、RHyM-10、RHyQ-10，推測帶電荷之側鏈，尤其是負電荷，可能會增加胜肽與 DNA 的作用力，導致與 DNA 的結合能力增加。

RHyM-10

Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Met-CONH₂



分子式：C₅₈H₉₁N₂₃O₁₁S

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 16.90 min

Resin : 100.0 mg

粗產物 : 57.27 mg ; 純化後產物 : 12.15 mg

產率 : 57.27 % ; 純化產率 : 21.21 %

產物為白色固體，熔點 : 131~138 °C

[α]_D²⁵ : -19.15 (4.82 × 10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1317.70，實驗值 1318.56

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

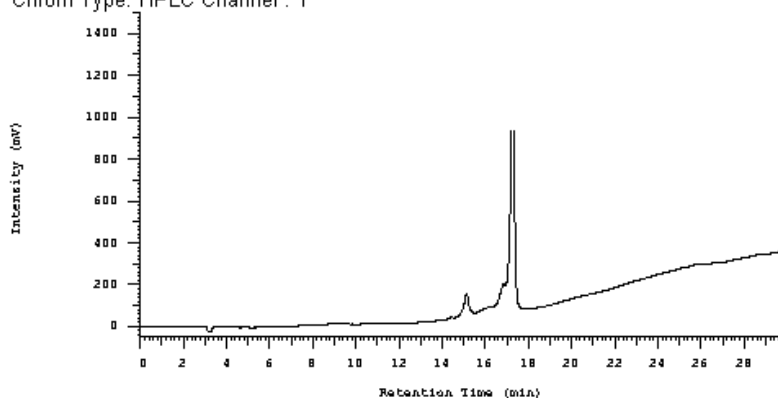


圖 3- 3 RHyM-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4×25 cm column，Rt = 16.90min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5xTBE，pH 7.4

Lane1~8：RHyM-10 (0.1、0.5、0.8、1.0、1.8、2.5、3.0、5.0 μM)

Lane9：pBR322 DNA only

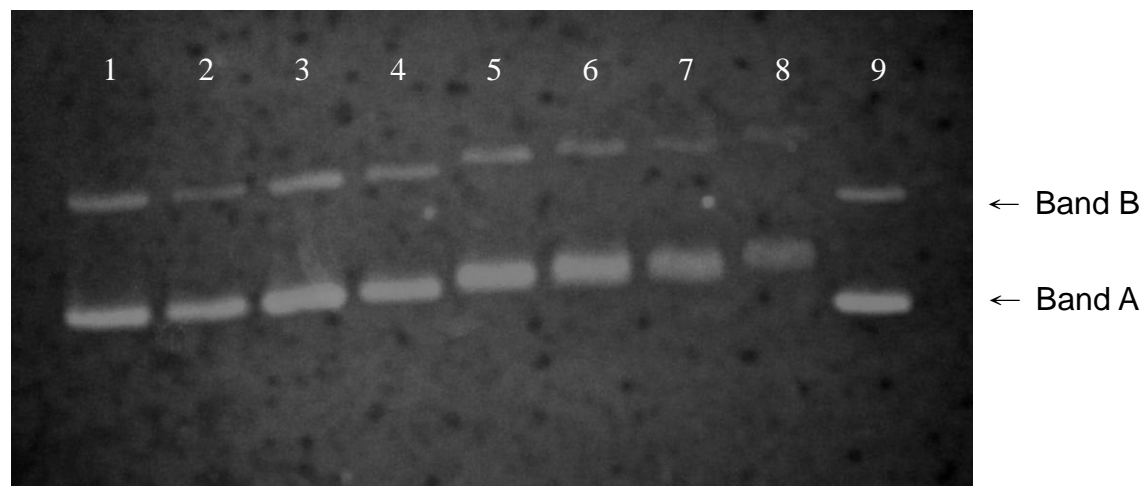


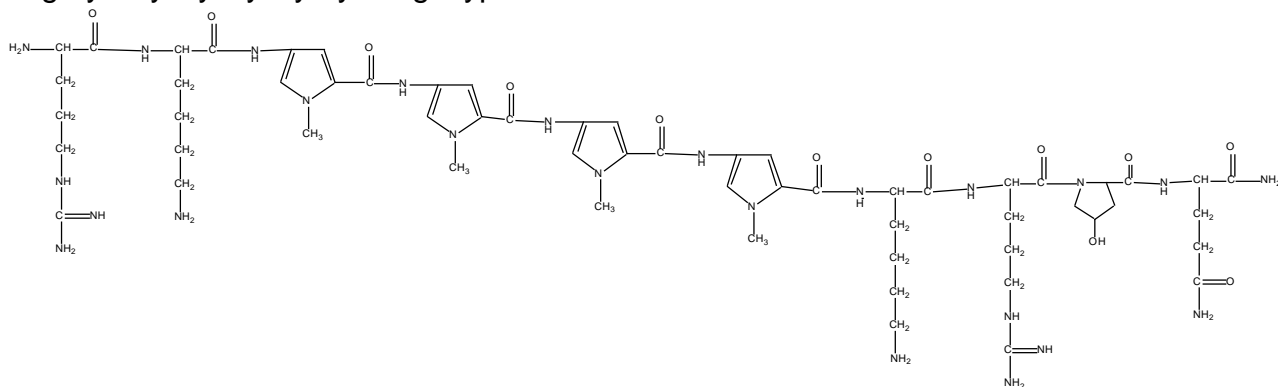
表 八 RHyM-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.5	0.8	1	1.8	2.5	3	5	---
Band A (mm/μM)	1	1	2.25	2.5	2.22	1.68	1.67	1.6	---
Band B (mm/μM)	5	3.6	3.13	3.7	3.33	2.48	2.27	1.8	---

由周依君學姐合成之直鏈胜肽 HyM-10，凝膠滯留係數為 5.3，與 RHyM-10 在在 1 μM 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 2.5、Band B 為 3.7 相比，相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 HyM-10 對於 DNA 的結合能力比 RHyM-10 較好。

RHyQ-10

Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Gln-CONH₂



分子式：C₅₀H₉₀N₂₄O₁₂

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 15.9 min

Resin : 100 mg

粗產物：70.73 mg；純化後產物：22.17 mg

產率：70.73%；純化產率：31.34%

產物為白色固體，熔點：135~137 °C

[α]_D²⁵：-20.77 (22.17mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS：理論值 1314.72，實驗值 1315.49

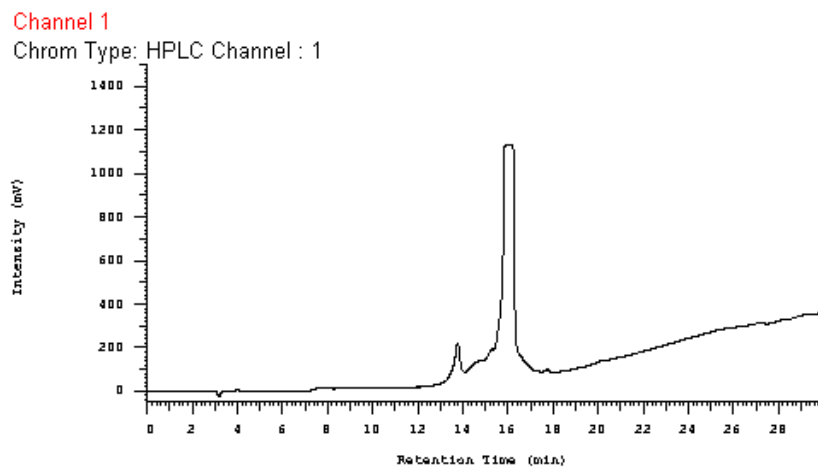


圖 3- 4 RHyQ-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4×25 cm coloume , Rt= 15.9min)

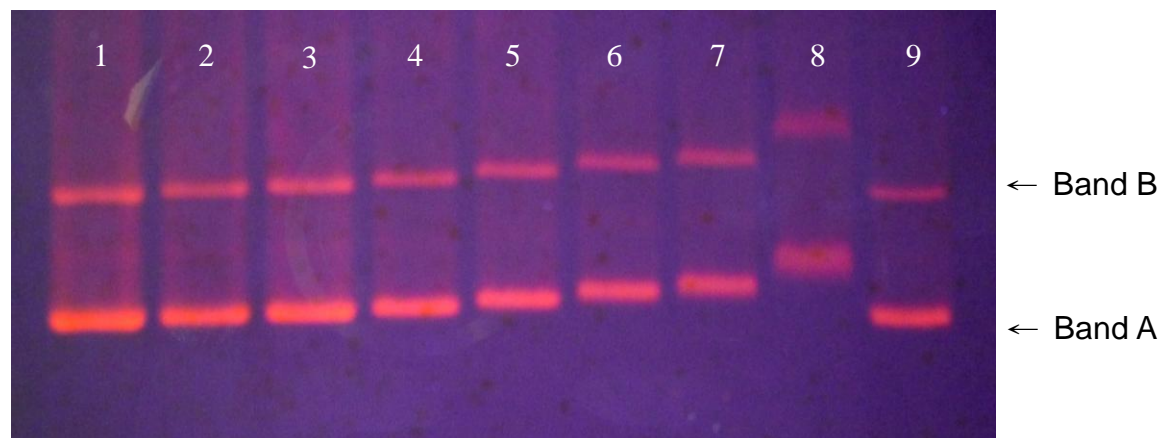
凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~8：RHyQ-10 (0.1、0.5、0.8、1.0、1.8、2.5、3.0、5.0 μM)

Lane9：pBR322 DNA only



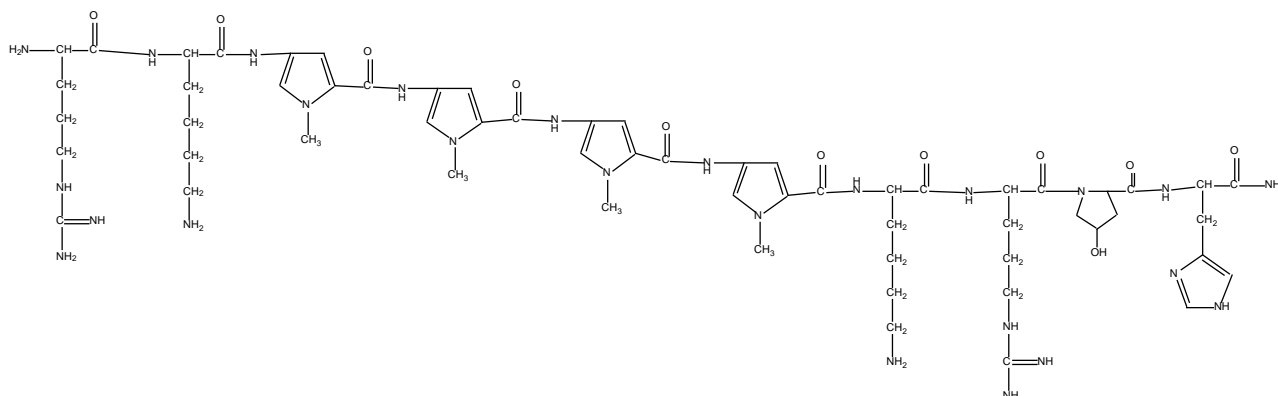
表九 RHyQ-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.5	0.8	1.0	1.8	2.5	3.0	5.0	---
Band A (mm/μM)	10	3.6	2.25	2.5	1.67	1.6	1.57	1.4	---
Band B (mm/μM)	5	1.6	1.5	2.22	1.67	1.8	1.67	1.72	---

由許全壹學長合成之直鏈胜肽 HyQ-10，在 1 μM 凝膠滯留係數為 0.4，與 RHyQ-10 在在 1 μM 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 2.5、Band B 為 2.22 相比，相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 RHyQ-10 對於 DNA 的結合能力比 HyQ-10 較好。

RHyH-10

Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-His-CONH₂



分子式：C₅₉H₈₉N₂₅O₁₁

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 15.6min

Resin : 50 mg

粗產物：42.35 mg；純化後產物：9.45 mg

產率：84.7%；純化產率：22.31%

產物為白色固體，熔點：131~137°C

[α]_D²⁵：-19.62 (9.45mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS：理論值 1323.72，實驗值 1324.50

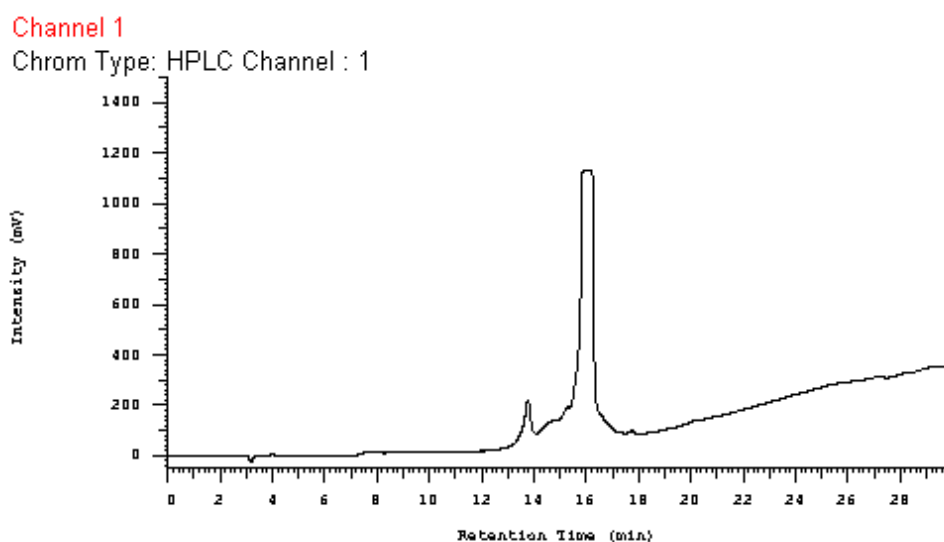


圖 3- 5 RHyH-10 純化之 HPLC 層析圖

(0.4×25 cm columne , Rt=15.6min)

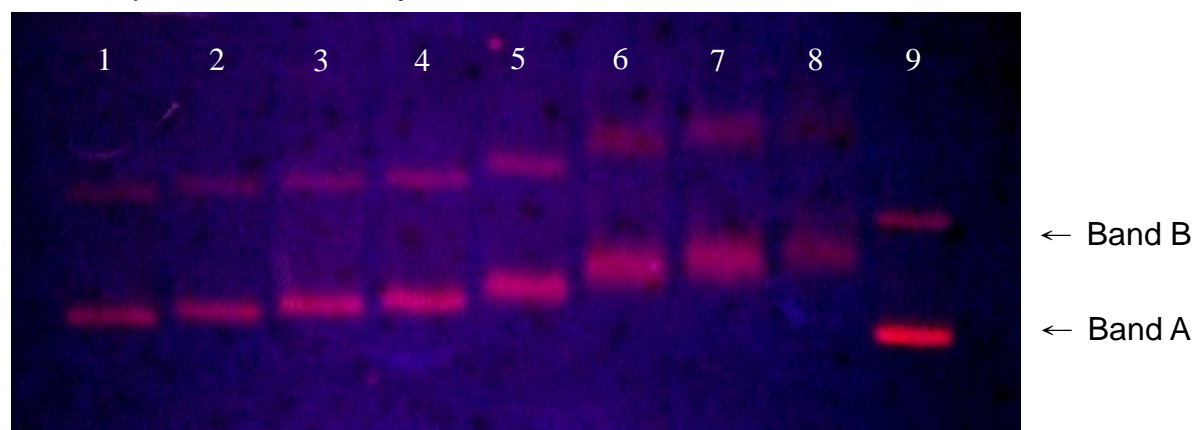
凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~8：RHyH-10 (0.1、0.5、0.8、1.0、1.8、2.5、3.0、5.0 μM)

Lane9：pBR322 DNA only



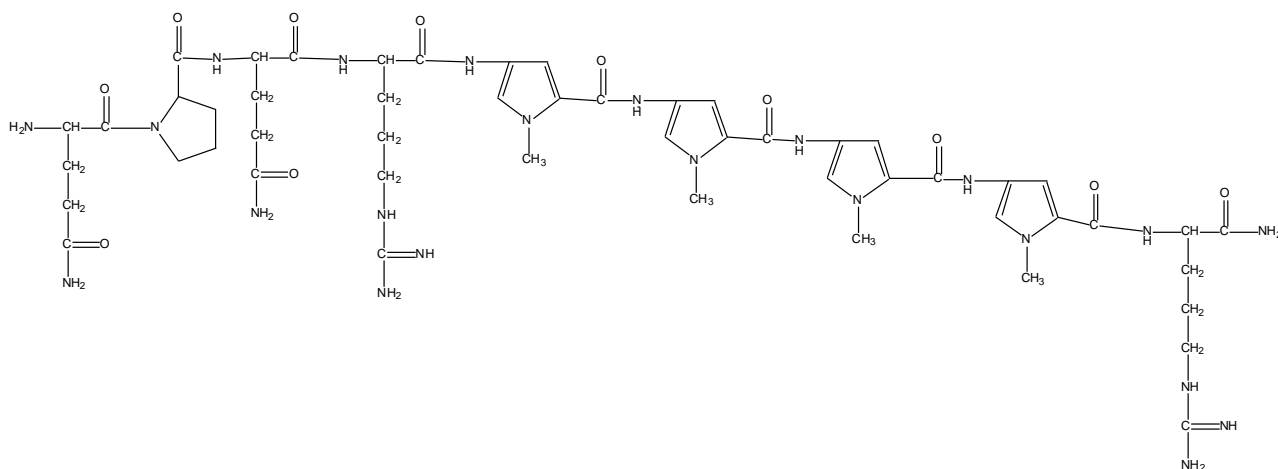
表十 RHyH-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.5	0.8	1	1.8	2.5	3	5	---
Band A (mm/μM)	12	4	3.5	3.8	2.67	2.88	2.67	2.6	---
Band B (mm/μM)	12	2.4	3.88	4	3.17	3.68	3.67	3	---

含有 XPRK 模組的胜肽之直鏈胜肽 RHyH-10，在 1 μM 時凝膠滯留係數 Band A 為 3.8、Band B 為 4，而觀察 RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10 以及 RHyH-10 四者結構發現，RHyE-10、RHyM-10、RHyH-10、RHyQ-10 四者只差一個胺基酸側鏈，RHyE-10 差異之胺基酸側鏈 Glu 在中性溶液環境下會帶有負電荷，RHyH-10 差異之胺基酸側鏈 His 在中性溶液環境下會帶有正電荷，RHyM-10、RHyQ-10 兩者之胺基酸側鏈 Met、Gln 均為中性，四個胜肽與 DNA 的結合能力依大小排列為 RHyE-10、RHyH-10、RHyM-10、RHyQ-10，推測帶電荷之側鏈，尤其是負電荷，可能會增加胜肽與 DNA 的作用力，導致與 DNA 的結合能力增加。

QPQ-9

Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₅₁H₇₄N₂₂O₁₁

HPLC (0.4x25 cm column) Rt = 17.9min

Resin : 80 mg

粗產物 : 64.69 mg ; 純化後產物 : 12.29mg

產率 : 80.86 % ; 純化產率 : 19.00 %

產物為白色固體，熔點 : 157~159 °C

[α]_D²⁵ : -40.03 (12.29 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1170.59, 實驗值 1171.27

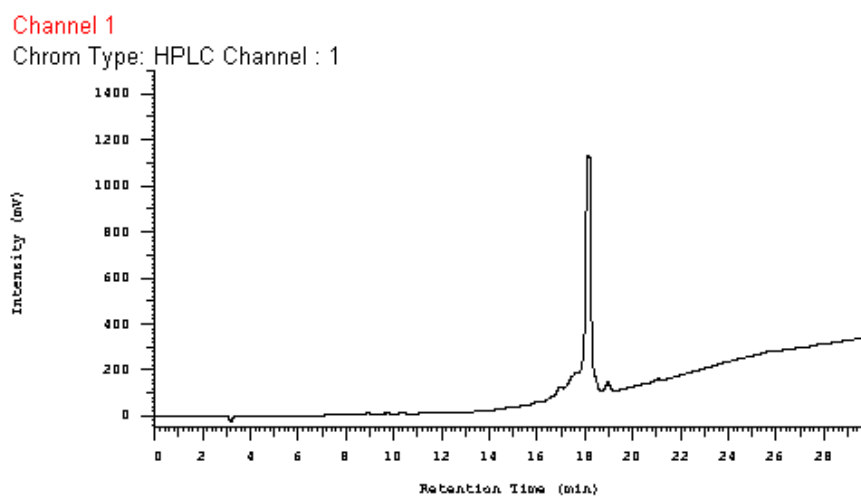


圖 3- 6 QPQ-9 純化之 HPLC 層析圖

(0.4x25 cm coloume , Rt=17.9 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~8：QPQ-9 (0.1、0.5、0.8、1.0、1.8、2.5、3.0、5.0 μM)

Lane9：pBR322 DNA only

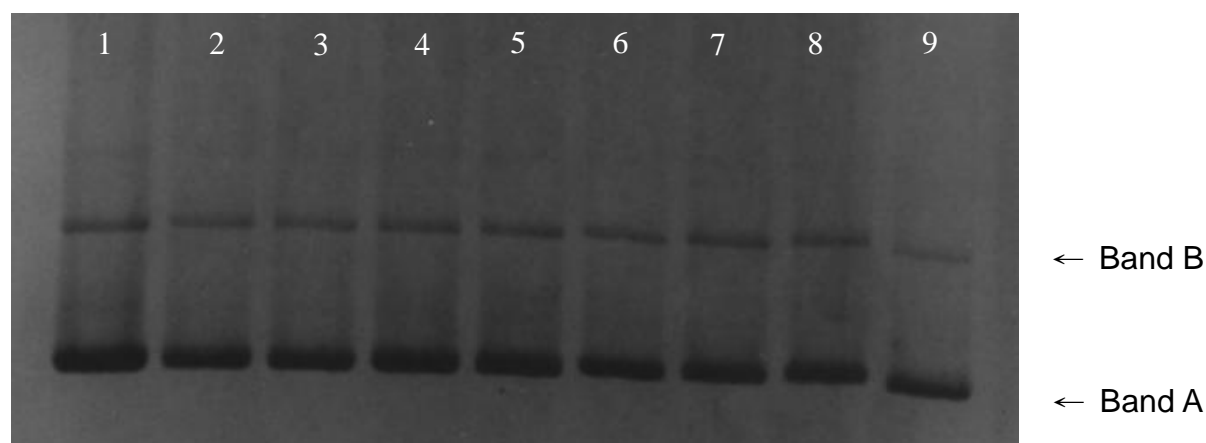


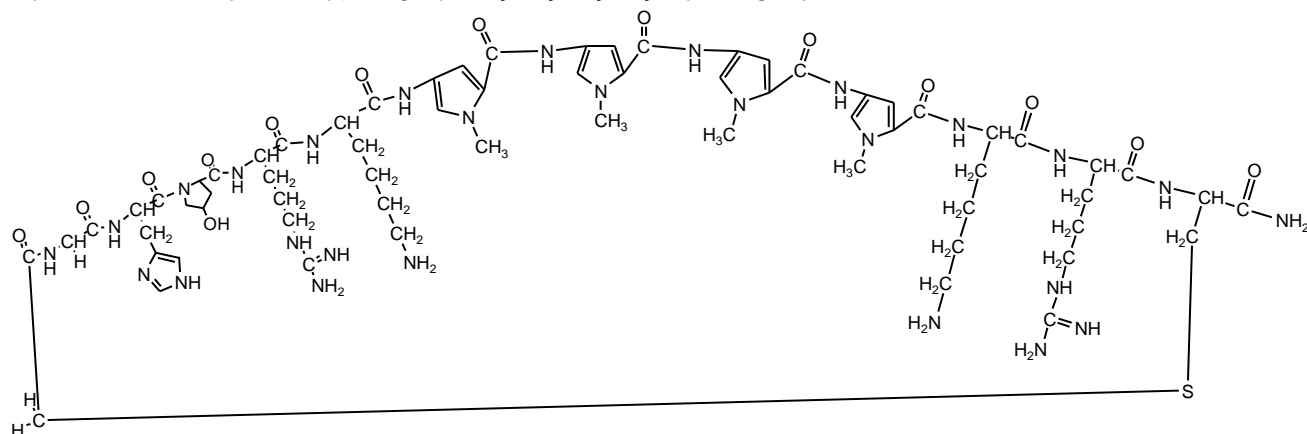
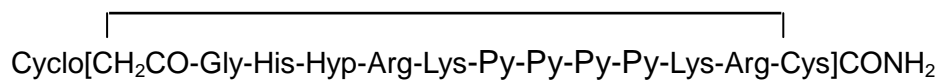
表 十一 QPQ-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.5	0.8	1	1.8	2.5	3	5	---
Band A (mm/μM)	30	7.4	4.38	3	1.39	0.88	0.5	0.3	---
Band B (mm/μM)	30	7	4.75	3.2	1.67	1	0.6	0.36	---

XPRK 模組去除 Lys 胺基酸之直鏈胜肽 QPQ-9，在 1 μM 時凝膠滯留係數 Band A 為 3、Band B 為 3.2，與相似序列 RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10 以及 RHyH-10 相比。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，QPQ-9 的滯留效應不明顯，對於 DNA 的結合能力較差。推論可能是因為去除在 pH 為中性時帶正電價之 Lys 胺基酸，使直鏈胜肽 QPQ-9 與 DNA 的作用力下降，使滯留效應下降。

3-1-2 含有 Py (Pyrrole) 之環狀胜肽

CHPy-12



分子式：C₆₆H₉₆N₂₆O₁₅S

HPLC (0.4x25 cm column) Rt = 18.1min

Resin : 100 mg

粗產物： 70.67 mg ; 純化後產物： 13.32 mg

產率： 70.67 % ; 純化產率： 18.85 %

產物為白色固體，熔點： 125~130°C

[α]_D²⁵ : -56.13 (13.32 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1524.73 , 實驗值 1525.70

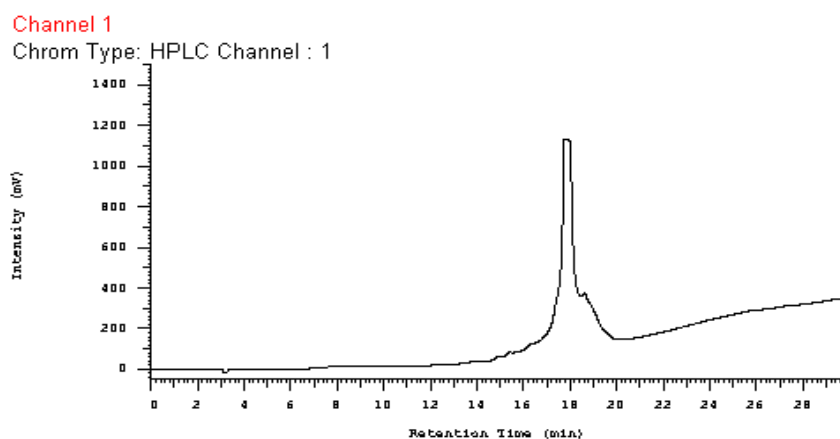


圖 3- 7 CHPy-12 純化之 HPLC 層析圖

(0.4x25 cm columne , Rt=18.1 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~8：CHPy-12 (0.1、0.5、0.8、1.0、1.8、2.5、3.0、5.0 μM)

Lane9：pBR322 DNA only

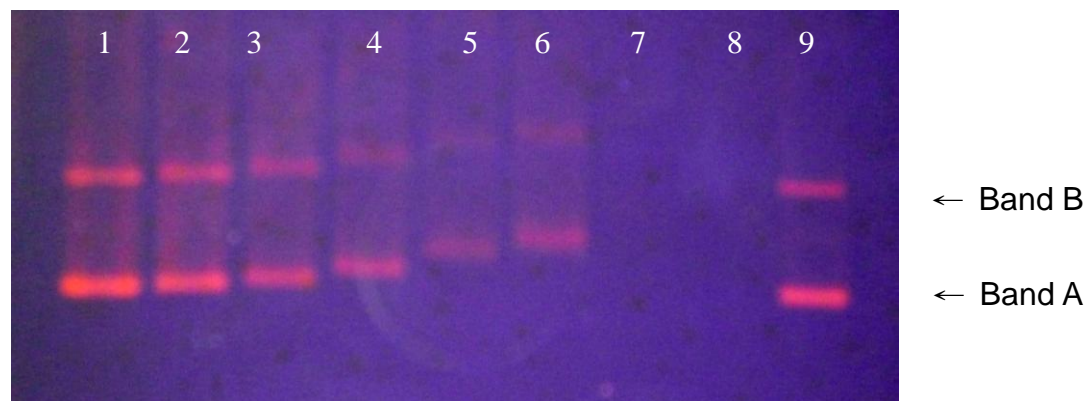


表 十二 CHPy-12 之濃度與凝膠滯留係數對照表

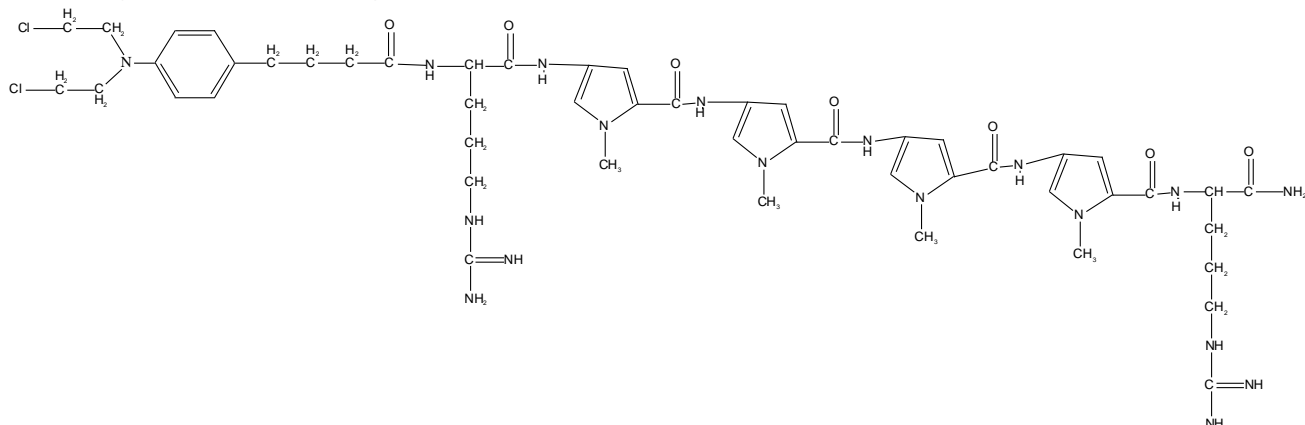
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Drug 濃度 (μM)	0.5	1	2	3.5	5	6	8	10	---
Band A (mm/μM)	6	3.2	2	1.66	1.7	1.63	---	---	---
Band B (mm/μM)	3.6	2.1	1.6	1.46	1.56	1.47	---	---	---

環狀胜肽 CHPy-12 是將 XPRK 模組引入環狀胜肽設計中並將 Pro 換成 Hyp，並且同時具有 Py 的結構，期望能將環狀胜肽結構的優點加上 XPRK 模組以及 Py 結構的優點，增加胜肽與 DNA 的結合作用。高君翰學長合成之環狀胜肽 CHPy-11，在 1 μM 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 1、Band B 為 2.5，CHPy-12，在 1 μM 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 3.2、Band B 為 2.1。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此 CHPy-12 對於 DNA 的結合能力比 CHPy-11 較好。原因是增加一個 Py 結構，使 DNA 與胜肽 CHPy-12 的作用力增加，滯留效應也增加。

3-1-3 含有 CLB 之直鏈胜肽

CLB-PN4

CLB-Arg-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₅₀H₆₈Cl₂N₁₈O₇

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 24.00 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 26.27 mg ; 純化後產物 : 7.49 mg

產率 : 52.54 % ; 純化產率 : 28.5 %

產物為白色固體，熔點 : 147~150 °C

[α]_D³¹ : -26.02 (2.97 ×10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1102.49, 實驗值 1104.10

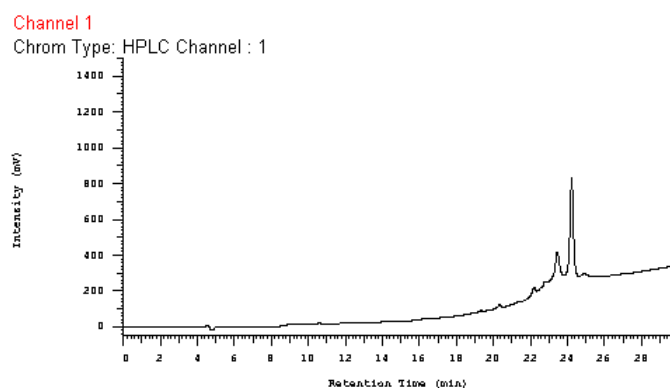


圖 3- 8 CLB-PN4 純化之 HPLC 層析圖
(0.4×25 cm column , Rt = 24.00 min)

凝膠電泳實驗

反應時間 : 25 min ; 反應溫度 : 65 °C

Buffer : 0.5×TBE , pH 7.4

Lane1~9 : CLB-PN4

(0.1、0.5、0.8、1.0、3.0、5.0、8.0、10.0、20.0 μM)

Lane10 : pBR322 DNA only

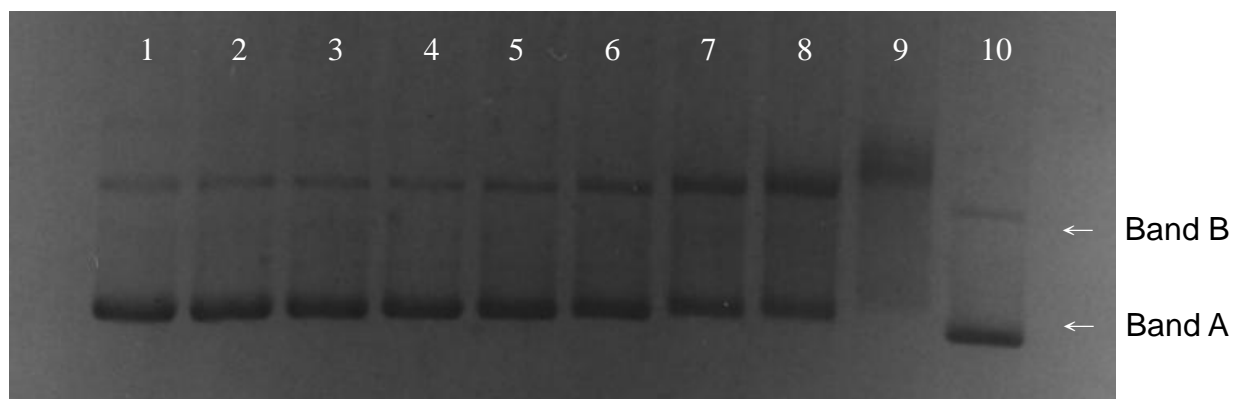


表 十三 CLB-PN4 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.5	0.8	1	3	5	8	10	20	---
Band A (mm/μM)	28	5.6	4	3	1	0.6	0.38	0.28	0.25	---
Band B (mm/μM)	30	6.4	4.75	3.8	1.07	0.64	0.44	0.32	0.25	---

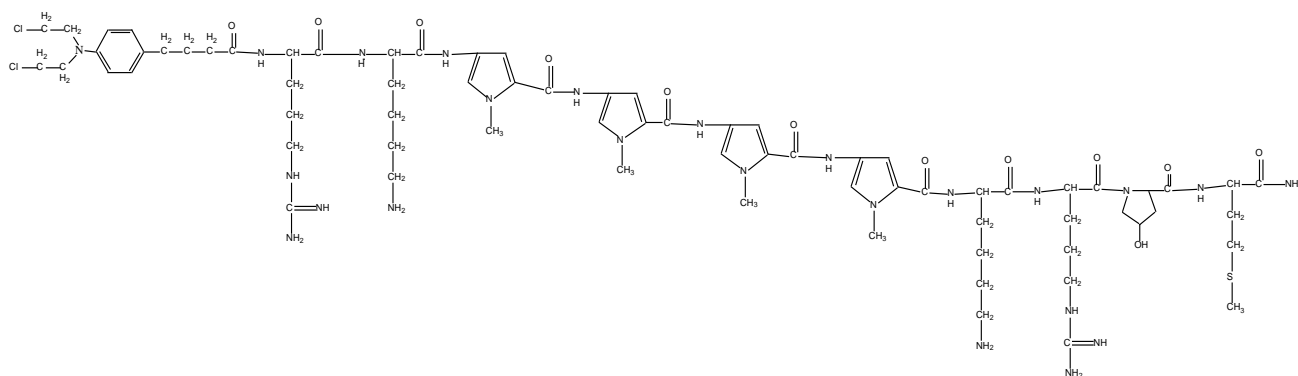
表 十四 CLB-PN4 之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	切割百分比	反應溫度時間
Lane1	CLB-PN4	0.1	42%	65 °C 25 min
Lane2	CLB-PN4	0.5	45%	
Lane3	CLB-PN4	0.8	47%	
Lane4	CLB-PN4	1	48%	
Lane5	CLB-PN4	3	52%	
Lane6	CLB-PN4	5	56%	
Lane7	CLB-PN4	8	69%	
Lane8	CLB-PN4	10	76%	
Lane9	CLB-PN4	20	---	
Lane10	---	---	---	

結合上 CLB 的胜肽對 DNA 同時具有結合及切割的能力，CLB-PN3 由高君翰學長合成出，CLB-PN4 在結構上與之相比多出一個 Py 結構。CLB-PN3 在 1 μM 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 1、Band B 為 2.5，CLB-PN4 在 1 μM 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 3、Band B 為 3.8。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此 CLB-PN4 對於 DNA 的結合能力比 CLB-PN3 較好。原因是增加一個 Py 結構，使 DNA 與胜肽 CLB-PN4 的作用力增加，滯留效應也增加。CLB-PN3 在 0.5 μM 時的切割百分比為 16.85%，隨 CLB-PN4 濃度的增加切割百分比在 10 μM 時最高為 45.41%；CLB-PN4 在 0.1 μM 時的切割百分比為 42%，隨 CLB-PN4 濃度的增加切割百分比在 10 μM 時最高為 76%，因此增加一個 Py 結構，使 DNA 與胜肽 CLB-PN4 的作用力增加，也導致切割能力增加。

CLB-RHyM-10

CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Met-CONH₂



分子式：C₇₂H₁₀₈Cl₂N₂₄O₁₂S

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 12.03 min

Resin : 140.0 mg

粗產物：66.12 mg；純化後產物：33.71 mg

產率：47.23 %；純化產率：50.98 %

產物為白色固體，熔點：146~149 °C

[α]_D²⁵：-26.66 (33.71×10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

ESI-MS：理論值 1602.77，實驗值 1604.75

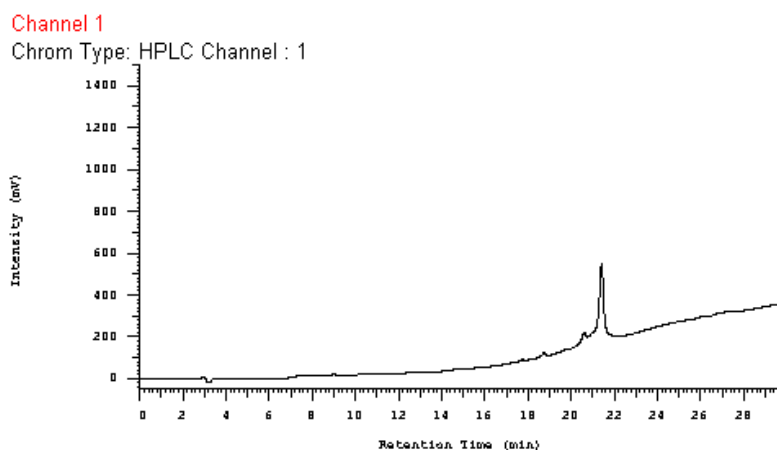


圖 3- 9 CLB-RHyM-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4×25 cm column，Rt = 21.50 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min；反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~9：**CLB-RHyM-10**

(0.1、0.3、0.5、0.8、1.0、2.0、5.0、8.0、10.0、μM)

Lane10：pBR322 DNA only

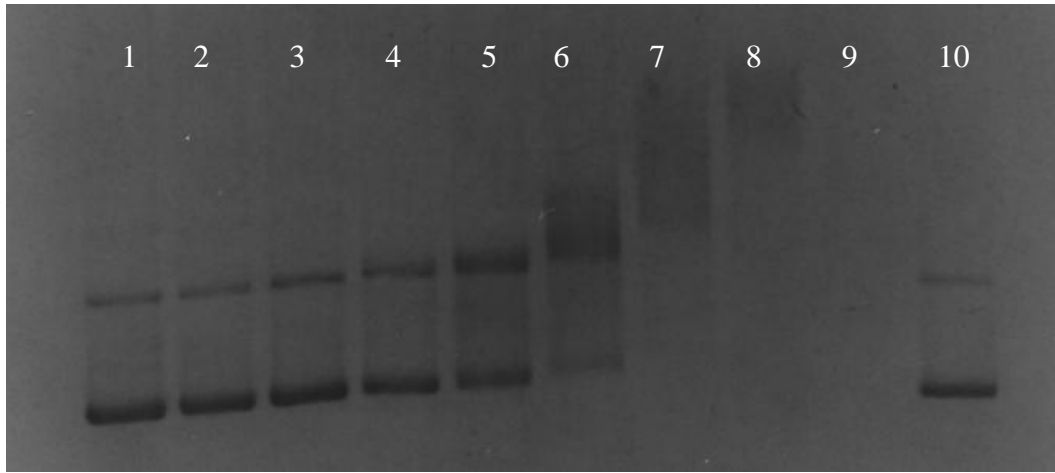


表 十五 CLB-RHyM-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.3	0.5	0.8	1	2	5	8	10	---
Band A (mm/μM)	12	3.33	2.4	2	1.9	3	3.4	3.3	---	---
Band B (mm/μM)	5	3	2	2	1	3	---	---	---	---

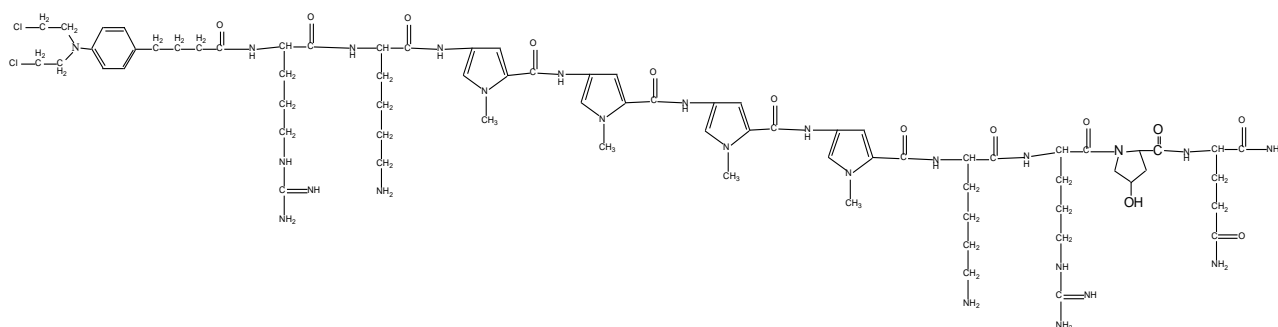
表 十六 CLB-RHyM-10 之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	切割百分比	反應溫度 時間
Lane1	CLB-RHyM-10	0.1	47%	65 °C 25 min
Lane2	CLB-RHyM-10	0.3	48%	
Lane3	CLB-RHyM-10	0.5	51%	
Lane4	CLB-RHyM-10	0.8	58%	
Lane5	CLB-RHyM-10	1	75%	
Lane6	CLB-RHyM-10	2	---	
Lane7	CLB-RHyM-10	5	---	
Lane8	CLB-RHyM-10	8	---	
Lane9	CLB-RHyM-10	10	---	
Lane10	---	---	---	

結合上 CLB 的胜肽對 DNA 同時具有結合及切割的能力，CLB-HyM-10 由吳佳蓉學姐合成出，本文置換胺基酸順序合成出 CLB-RHyM-10。CLB-HyM-10 的凝膠滯留係數 4.5，CLB-RHyM-10 在 1 μ M 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 1.9、Band B 為 1。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此 CLB-RHyM-10 對於 DNA 的結合能力比 CLB-HyM-10 略差。CLB-HyM-10 在 0.1 μ M 時的切割百分比為 53.31%，隨 CLB-HyM-10 濃度的增加切割百分比在 3 μ M 時最高為 65.70%；CLB-RHyM-10 在 0.1 μ M 時的切割百分比為 47%，隨 CLB-RHyM-10 濃度的增加切割百分比在 1 μ M 時最高為 75%，因此置換胺基酸順序，推論可能因為方位效應，導致切割能力增加。

CLB-RHyQ-10

CLB-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Hyp-Gln-CONH₂



分子式：C₇₂H₁₀₇Cl₂N₂₅O₁₃

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 20.9min

Resin : 100 mg

粗產物：69.69 mg；純化後產物：14.52 mg

產率：69.69 %；純化產率：20.84 %

產物為白色固體，熔點：136~139 °C

[α]_D²⁵：-30.89 (14.52 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS：理論值 1599.79，實驗值 1601.69

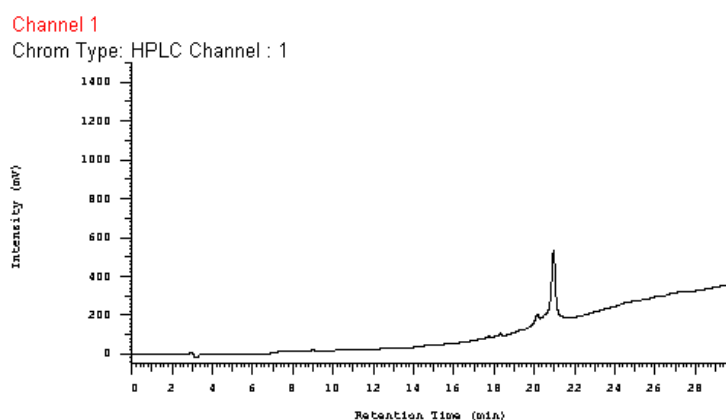


圖 3- 10 CLB-RHyQ-10 純化之 HPLC 層析圖

(0.4×25 cm volume, Rt=20.9 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min；反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~9：CLB-RHyQ-10 (0.1、0.3、0.5、0.8、1.0、2.0、5.0、8.0、10.0 μM)

Lane10：pBR322 DNA only

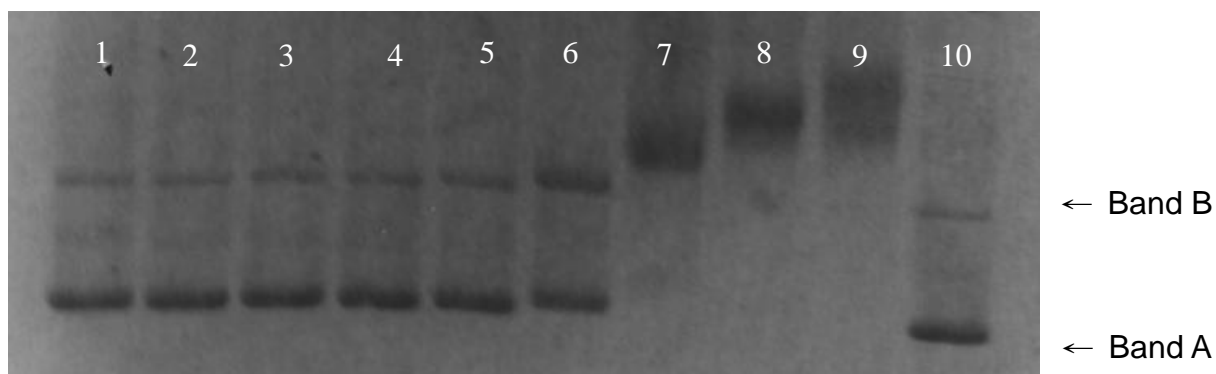


表 十七 CLB-RHyQ-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Drug 濃度 (μM)	0.1	0.3	0.5	0.8	1	2	5	8	10	---
Band A (mm/μM)	40	13.67	8.4	5.25	3.5	1.9	1.4	3.3	3	---
Band B (mm/μM)	40	15.33	10.4	4.63	4	1.6	1.5	---	---	---

表 十八之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	切割百分比	反應溫度 時間
Lane1	CLB-RHyQ-10	0.1	52%	65 °C 25 min
Lane2	CLB-RHyQ-10	0.3	52%	
Lane3	CLB-RHyQ-10	0.5	51%	
Lane4	CLB-RHyQ-10	0.8	53%	
Lane5	CLB-RHyQ-10	1	56%	
Lane6	CLB-RHyQ-10	2	73%	
Lane7	CLB-RHyQ-10	5	---	
Lane8	CLB-RHyQ-10	8	---	
Lane9	CLB-RHyQ-10	10	---	
Lane10	---	---	---	

結合上 CLB 的胜肽對 DNA 同時具有結合及切割的能力，CLB-HyQ-10 由吳佳蓉學姐合成出，本文置換胺基酸順序合成出 CLB-RHyQ-10。CLB-HyQ-10 的凝膠滯留係數 6.0，CLB-RHyM-10 在 1 μ M 時的凝膠滯留係數之 Band A 為 3.5、Band B 為 4。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此 CLB-RHyQ-10 對於 DNA 的結合能力比 CLB-HyQ-10 略差。CLB-HyQ-10 在 1 μ M 時的切割百分比為 42.17%，隨 CLB-HyM-10 濃度的增加切割百分比在 3 μ M 時最高為 69.45%；CLB-RHyM-10 在 0.1 μ M 時的切割百分比為 52%，隨 CLB-RHyM-10 濃度的增加切割百分比在 2 μ M 時最高為 73%，因此置換胺基酸順序，推論可能因為方位效應，導致切割能力增加。

3-1-4 結果與討論

一系列含有 XPRK 模組的胜肽 HyM-10、HyE-10、以及 HyQ-10 已分別由周依君學姐⁶⁷、許全壹學長⁶⁸，對於 DNA 都有不錯的結合能力，本文置換胺基酸順序合成出 RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10 以及 RHyH-10 同樣與 DNA 也有不錯的結合作用，而觀察 RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10 以及 RHyH-10 四者結構發現，RHyE-10、RHyM-10、RHyH-10、RHyQ-10 四者只差一個胺基酸側鏈，RHyE-10 差異之胺基酸側鏈 Glu 在中性溶液環境下會帶有負電荷，RHyH-10 差異之胺基酸側鏈 His 在中性溶液環境下會帶有正電荷，RHyM-10、RHyQ-10 兩者之胺基酸側鏈 Met、Gln 均為中性，四個胜肽與 DNA 的結合能力依大小排列為 RHyE-10、RHyH-10、RHyM-10、RHyQ-10，推測帶電荷之側鏈，尤其是負電荷，可能會增加胜肽與 DNA 的作用力，導致與 DNA 的結合能力增加。而由凝膠電泳圖可看出，含有 XPRK 與 Py 結構之直鏈胜肽對 DNA 有不錯效果。單純含有 Py 結構與 Arg 的胜肽 PN2 及 PN3 已由高君翰學長合成出⁶⁹，PN4 含有 4 個 Py 結構，經過與 PN2 及 PN3 凝膠電泳的比較，PN4 對於 DNA 的結合能力較不佳。

環狀胜肽 CHPy-12 是將 XPRK 模組引入環狀胜肽設計中並將 Pro 換成 Hyp，並且同時具有 Py 的結構，期望能將環狀胜肽結構的優點加上 XPRK 模組以及 Py 結構的優點，增加胜肽與 DNA 的結合作用，利用凝膠電泳可以看出 CHPy-12 對於 DNA 有結合能力。

CLB 這類抗癌藥物能夠破壞腫瘤細胞並終止其生長，但由於此類抗腫瘤藥物並無專一性的辨識能力，因此我們希望經由所設計的胜肽做為載體，將其作為一分子目標藥物，結合上 CLB 的胜肽對 DNA 同時具有結合及切割的能力。CLB-PN3 而 CLB-HyM-10、CLB-HyQ-10 分別由吳佳蓉學姐⁷⁰和高君翰學長合成出，對 DNA 有結合和不錯的切割能力，本文利用相似的序列，合出 CLB-PN4、CLB-RHyM-10、CLB-RHyQ-10，經過凝膠電泳的實驗結果比較，CLB-PN4 結合能力和切割效果都比 CLB-PN3 較優。CLB-HyM-10、CLB-HyQ-10、CLB-RHyM-10、CLB-RHyQ-10 結合能力相似，CLB-HyM-10、CLB-HyQ-10 相對較強一些。而對 DNA 的切割能力來說，CLB-RHyM-10 和 CLB-RHyQ-10 的切割能力比 CLB-HyM-10 和 CLB-HyQ-10 強。

3-2 苯醌衍生物研究

苯醌衍生物 DQRO 和 DPRO 由吳依靜與蔡佩如學妹合成出，L. Sheh. 於 2004 論文中已證實 DMQ-MA 衍生物 DVRO 以及 DBRO 有自由基的產生⁷²；對於 DNA 確實具有切割能力。因此，本文以 DQRO 和 DPRO 進行電子順磁共振光譜 (EPR) 實驗證實自由基存在，並且以不加入亞鐵離子 (Fe^{2+}) 的狀態進行偵測，並且改變反應時的 pH 值，觀察其對於時間的衰退。同樣利用平板凝膠電泳測試苯醌衍生物與 DNA 的作用，並且以不加入亞鐵離子 (Fe^{2+}) 的狀態進行實驗。

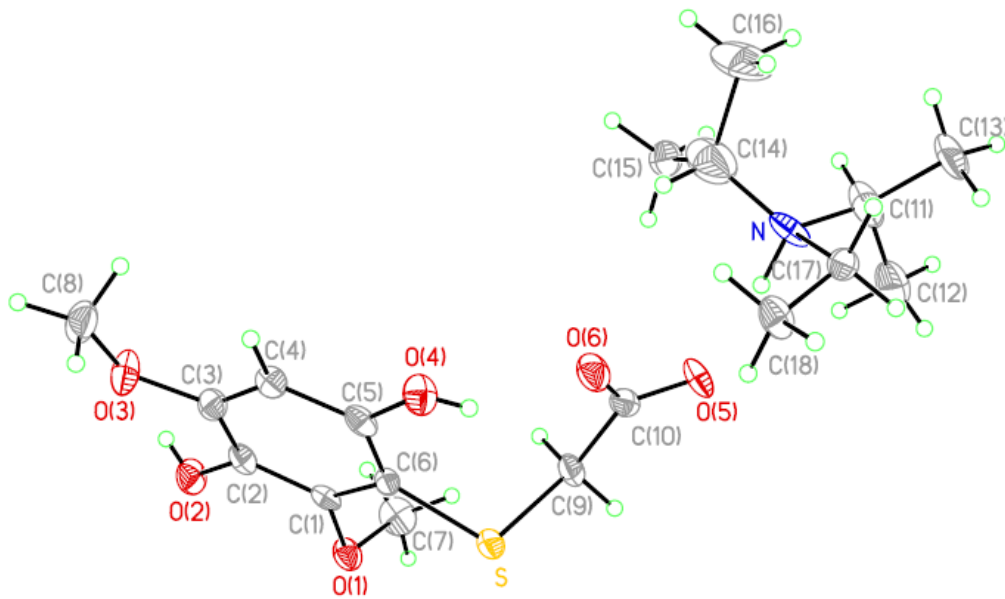


圖 3- 11 DMQ-MA 之 X 光單晶繞射圖

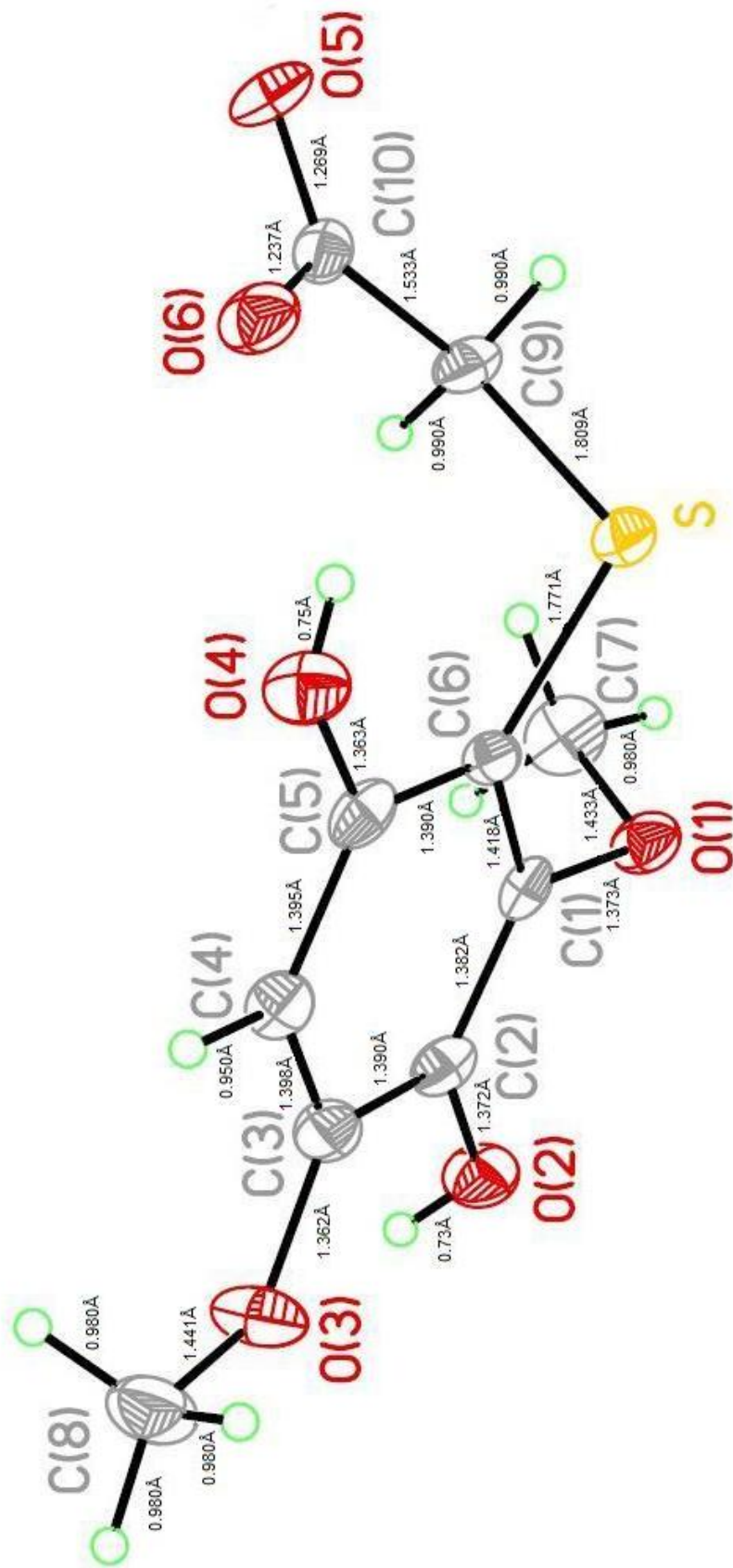
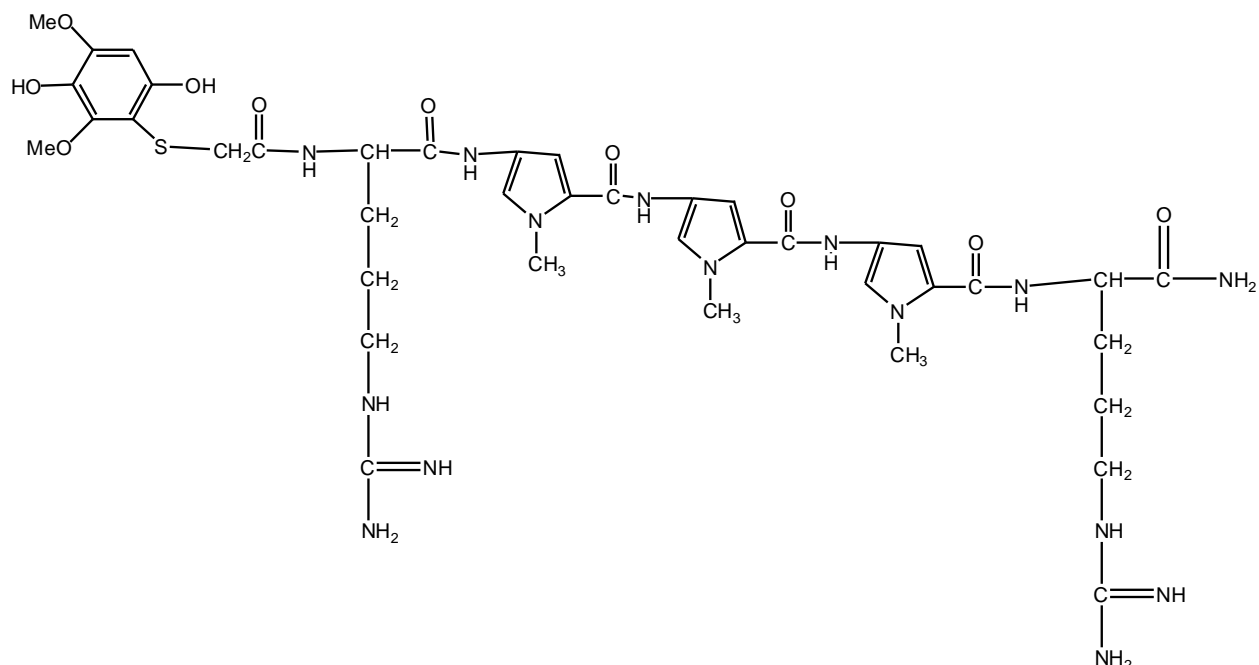


圖 3- 12 DMQ-MA 之鍵長圖

3-2-1 含有 DMQ-MA 之直鏈胜肽

DMQ-MA-PN3

DMQ-MA-Arg-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₄₀H₅₅N₁₅O₁₀S

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 14.5min

Resin : 50.0 mg

粗產物： 26.12 mg；純化後產物：5.55mg

產率： 52.24 %；純化產率：21.25 %

產物為白色固體，熔點：128~131 °C

[α]_D²⁵ : 44.37 (1.48 × 10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 937.40，實驗值 938.02

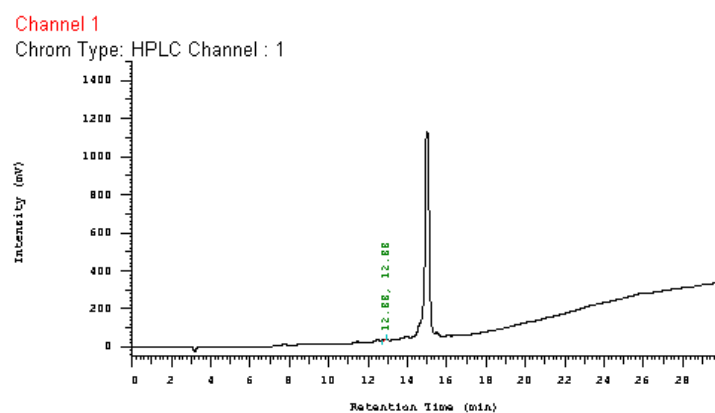


圖 3- 13 DMQ-MA-PN3 純化之 HPLC 層析圖
(0.4×25 cm column，Rt = 14.5 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~5：DMQ-MA-PN3 +Fe²⁺ (0.1、0.3、0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、5.0 μM)

Lane6：DMQ-MA-PN3 (pBR322 DNA+Fe²⁺)

Lane7~11：DMQ-MA-PN3(0.5、1.0、2.0、5.0、10.0μM)

Lane12：pBR322 DNA only

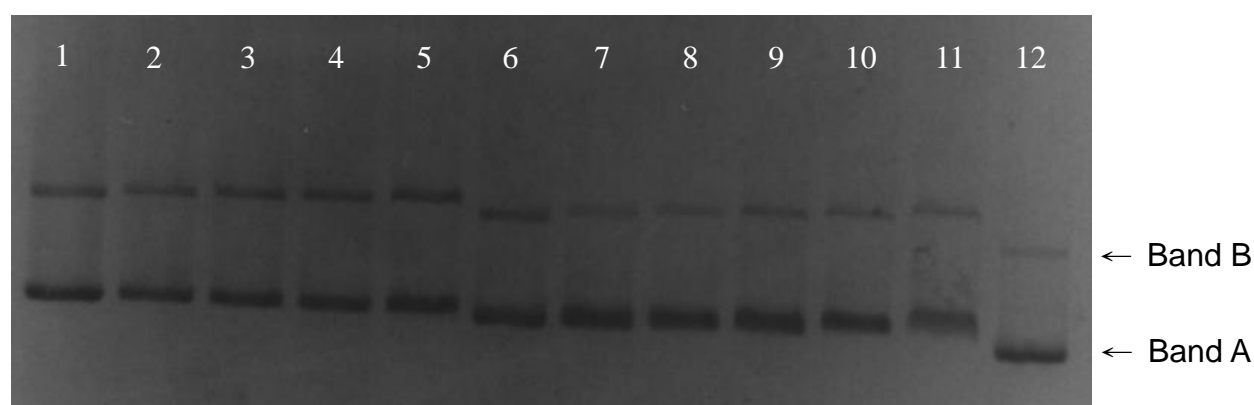


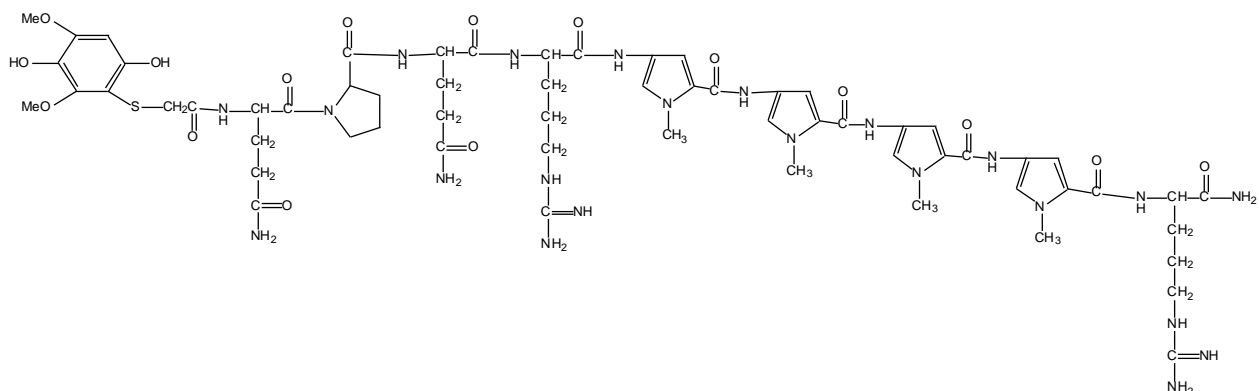
表 十九 DMQ-MA-PN3 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	Fe ²⁺ (μM)	切割百分比	反應溫度 時間
Lane1	DMQ-MA-PN3	0.1	1	50%	65 °C 25 min
Lane2	DMQ-MA-PN3	0.3	1	54%	
Lane3	DMQ-MA-PN3	0.5	1	59%	
Lane4	DMQ-MA-PN3	1	1	61%	
Lane5	DMQ-MA-PN3	2	1	61%	
Lane6	DMQ-MA-PN3	---	1	---	
Lane7	DMQ-MA-PN3	0.5	---	49%	
Lane8	DMQ-MA-PN3	1	---	50%	
Lane9	DMQ-MA-PN3	2	---	52%	
Lane10	DMQ-MA-PN3	5	---	52%	
Lane11	DMQ-MA-PN3	10	---	57%	
Lane12	---	---	---	---	

經由凝膠電泳切割百分比公式計算⁷⁷，DMQ-MA-PN3 之切割百分比在有鐵離子存在下，0.1 μM DMQ-MA-PN3 之切割百分比為 50%，切割百分比隨 DMQ-MA-PN3 濃度上升最高增加至 61%。在沒有鐵離子存在下，0.5 μM 時切割百分比為 49%，切割百分比隨 DMQ-MA-PN3 濃度上升而增加至 57%。原因為鐵離子可幫助切割，我們期望在沒有鐵離子的幫助下也能達到切割的效果，但 DMQ-MA-PN3 並未達到期望之切割效果。

DMQ-MA-QPQ-9

DMQ-MA-Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₆₁H₈₄N₂₂O₁₆S

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 18.4min

Resin : 50 mg

粗產物： 33.97 mg；純化後產物：5.55mg

產率： 67.94 %；純化產率：16.34 %

產物為白色固體，熔點：130~136 °C

[α]_D²⁵： -35.66 (5.55 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1412.62，實驗值 1413.52

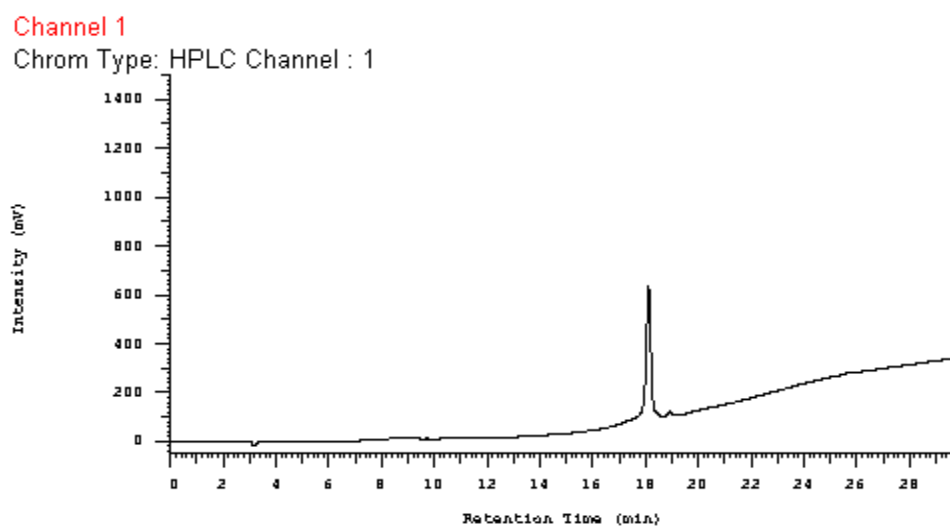


圖 3- 14 DMQ-MA-QPQ-9 純化之 HPLC 層析圖

(0.4×25 cm column , Rt=18.4min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~5：DMQ-MA-QPQ-9 +Fe²⁺

Lane6：DPQR (pBR322 DNA+Fe²⁺)

Lane7~11：DMQ-MA-QPQ-9

Lane12：pBR322 DNA only

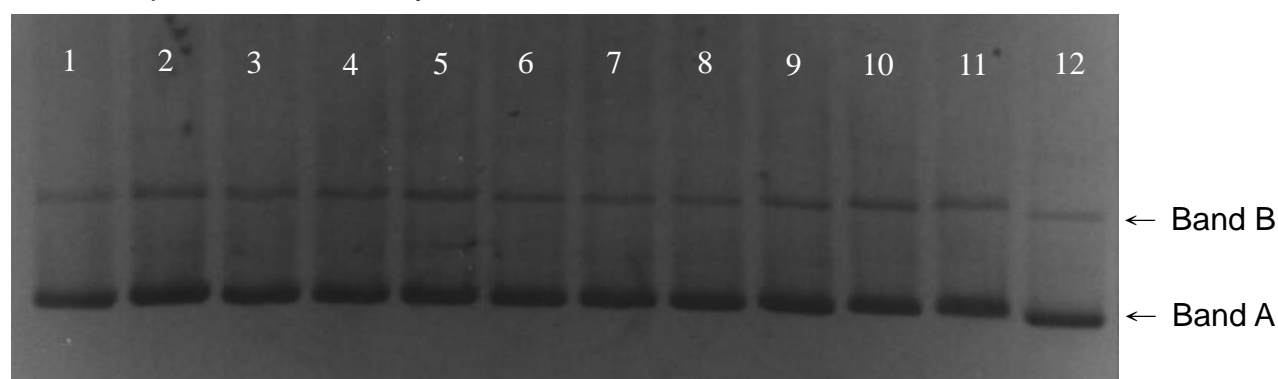


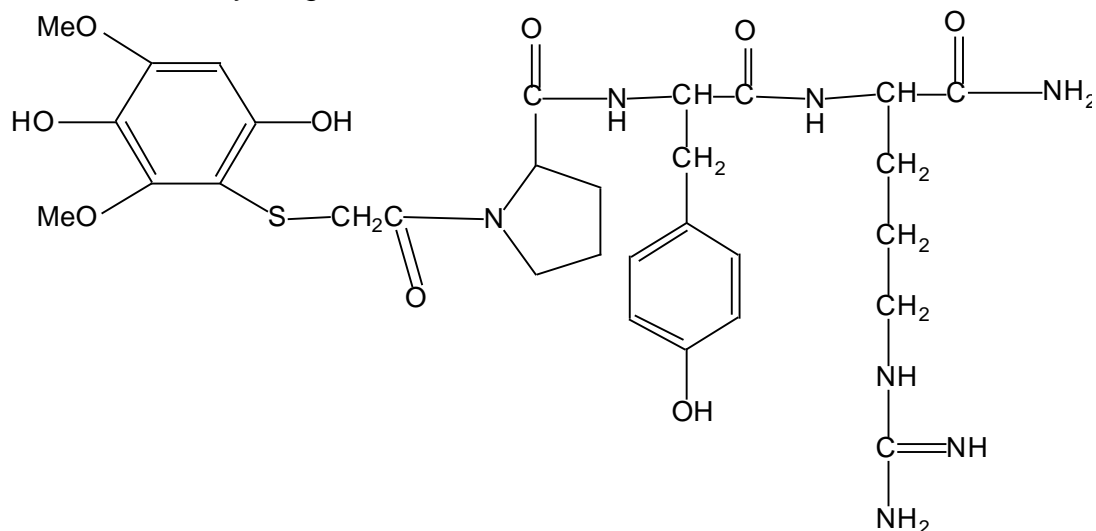
表 二十 DMQ-MA-QPQ-9 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	Fe ²⁺ (μM)	切割百分比	反應溫度 時間
Lane1	DMQ-MA-QPQ-9	0.1	1	45%	65 °C 25 min
Lane2	DMQ-MA-QPQ-9	0.3	1	45%	
Lane3	DMQ-MA-QPQ-9	0.5	1	46%	
Lane4	DMQ-MA-QPQ-9	1	1	50%	
Lane5	DMQ-MA-QPQ-9	2	1	51%	
Lane6	DMQ-MA-QPQ-9	---	1	---	
Lane7	DMQ-MA-QPQ-9	0.5	---	47%	
Lane8	DMQ-MA-QPQ-9	1	---	46%	
Lane9	DMQ-MA-QPQ-9	2	---	46%	
Lane10	DMQ-MA-QPQ-9	5	---	50%	
Lane11	DMQ-MA-QPQ-9	10	---	47%	
Lane12	---	---	---	---	

經由凝膠電泳切割百分比公式計算，DMQ-MA-QPQ-9 之切割百分比在有鐵離子存在下，0.1 μM DMQ-MA-QPQ-9 之切割百分比為 45%，切割百分比隨 DMQ-MA-QPQ-9 濃度上升最高增加至 51%。在沒有鐵離子存在下，0.5 μM 時切割百分比為 47%，切割百分比隨 DMQ-MA-QPQ-9 濃度上升最高增加至 50%。原因為鐵離子可幫助切割，我們期望在沒有鐵離子的幫助下也能達到切割的效果，但 DMQ-MA-PN3 並未達到期望之切割效果。

DPYR

DMQ-MA-Pro-Tyr-Arg-CONH₂



分子式：C₃₀H₄₁N₇O₉S

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 4.60min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 26.12 mg ; 純化後產物 : 5.55mg

產率 : 52.24 % ; 純化產率 : 21.25 %

產物為白色固體，熔點 : 131~135 °C

[α]_D²⁵ : -23.65 (2.00 x10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 675.27 , 實驗值 675.75

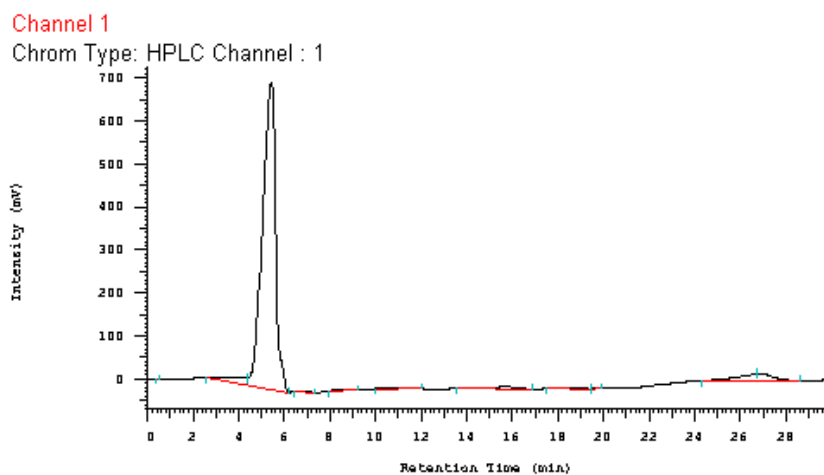


圖 3- 15 DPYR 純化之 HPLC 層析圖
(0.4×25 cm column , Rt = 4.60 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5xTBE，pH 7.4

Lane1~5：DPYR +Fe²⁺(1.0、5.0、10、20、50 μM)

Lane6：DPYR (pBR322 DNA+Fe²⁺)

Lane7~11：DPYR(20.0、50.0、100.0、200.0、300.0μM)

Lane12：pBR322 DNA only

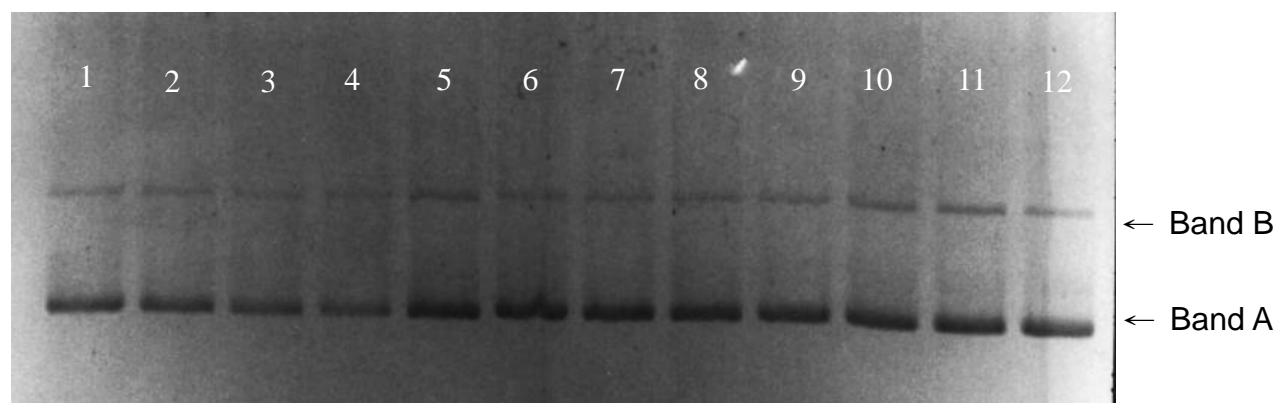


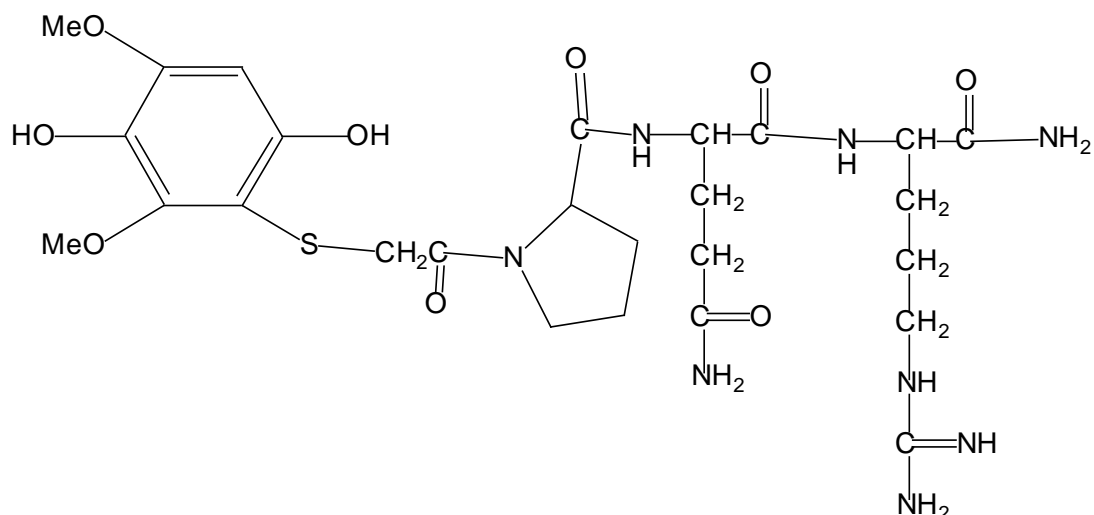
表 二十一 DPYR 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	Fe ²⁺ (μM)	切割百分比	反應溫度 時間
Lane1	DPYR	1	1	60%	65 °C 25 min
Lane2	DPYR	5	1	59%	
Lane3	DPYR	10	1	61%	
Lane4	DPYR	20	1	63%	
Lane5	DPYR	50	1	52%	
Lane6	DPYR	---	1	---	
Lane7	DPYR	20	---	51%	
Lane8	DPYR	50	---	51%	
Lane9	DPYR	100	---	52%	
Lane10	DPYR	200	---	54%	
Lane11	DPYR	300	---	54%	
Lane12	---	---	---	---	

經由凝膠電泳切割百分比公式計算，DPYR 之切割百分比在有鐵離子存在下，1 μM DPYR 之切割百分比為 60%，切割百分比隨 DPYR 濃度上升最高增加至 63%。在沒有鐵離子存在下，20 μM 時切割百分比為 51%，切割百分比隨 DPYR 濃度上升最高增加至 54%。原因為鐵離子可幫助切割，我們期望在沒有鐵離子的幫助下也能達到切割的效果，但 DPYR 並未達到期望之切割效果。

DPQR

DMQ-MA-Pro-Gln-Arg-CONH₂



分子式：C₂₆H₄₀N₈O₉S

HPLC (0.4×25 cm column) Rt = 5.6min

Resin : 50 mg

粗產物 : 35.23 mg ; 純化後產物 : 5.7 mg

產率 : 70.46 % ; 純化產率 : 16.18 %

產物為白色固體，熔點 : 130~136 °C

[α]²⁵_D : -22.42 (2 mg / 100 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 640,26，實驗值 640.71

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

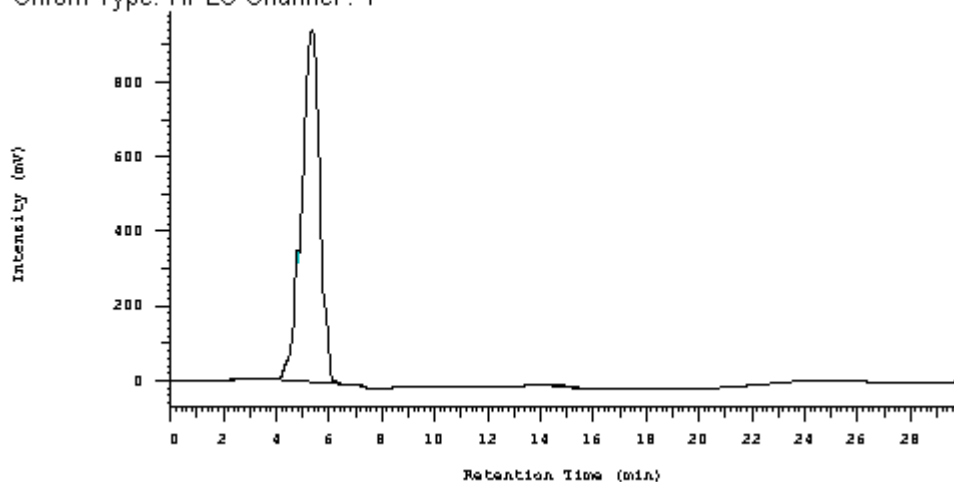


圖 3- 16 DPQR 純化之 HPLC 層析圖

(0.4×25 cm colume , Rt=5.6 min)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~5：DPQR +Fe²⁺

Lane6：DPQR (pBR322 DNA+Fe²⁺)

Lane7~11：DPQR

Lane12：pBR322 DNA only

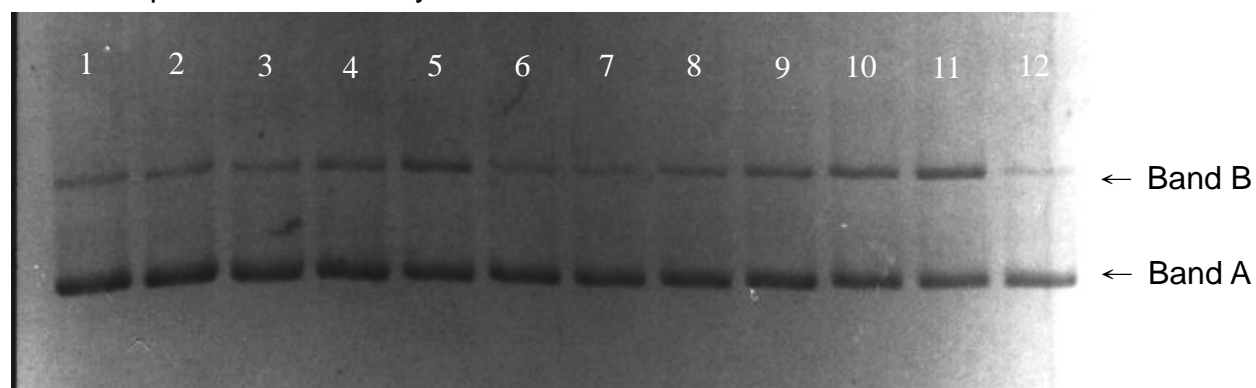


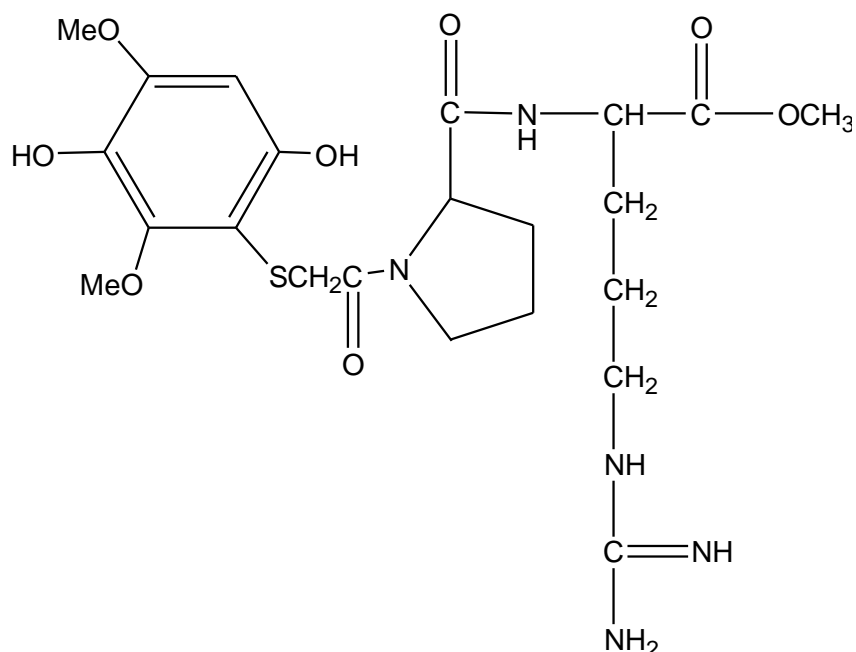
表 二十二 DPQR 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	Fe ²⁺ (μM)	切割百分比	反應溫度 時間
Lane1	DPQR	1	1	49%	65 °C 25 min
Lane2	DPQR	5	1	48%	
Lane3	DPQR	10	1	51%	
Lane4	DPQR	20	1	51%	
Lane5	DPQR	50	1	58%	
Lane6	DPQR	---	1	---	
Lane7	DPQR	20	---	53%	
Lane8	DPQR	50	---	55%	
Lane9	DPQR	100	---	56%	
Lane10	DPQR	200	---	60%	
Lane11	DPQR	300	---	68%	
Lane12	---	---	---	---	

經由凝膠電泳切割百分比公式計算，DPQR 之切割百分比在有鐵離子存在下，1 μM DPQR 之切割百分比為 49%，切割百分比隨 DPQR 濃度上升最高增加至 58%。在沒有鐵離子存在下，20 μM 時切割百分比為 53%，切割百分比隨 DPQR 濃度上升最高增加至 68%。原因為鐵離子可幫助切割，我們期望在沒有鐵離子的幫助下也能達到切割的效果，但 DPQR 並未達到期望之切割效果。

DPRO

DMQ-MA-Pro-Arg-OMe



分子式： $C_{22}H_{34}N_6O_9S$

ESI-MS：理論值 527.20，實驗值 527.59

產率：50.12 %；

產物為紅色固體，熔點：131~136 °C

$[\alpha]_D^{25}$ ：-22.11 (5.01 x10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min；反應溫度：65 °C

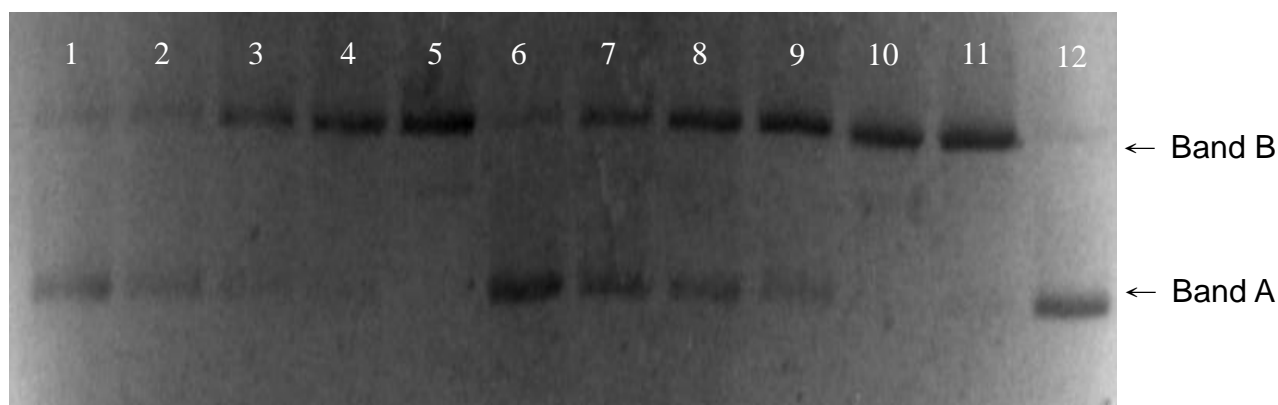
Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane1~5：DPRO +Fe²⁺ (1.0、5.0、10.0、20.0、50.0μM)

Lane6：DPRO (pBR322 DNA+Fe²⁺)

Lane7~11：DPRO (20.0、50.0、100.0、200.0、300.0μM)

Lane12：pBR322 DNA only



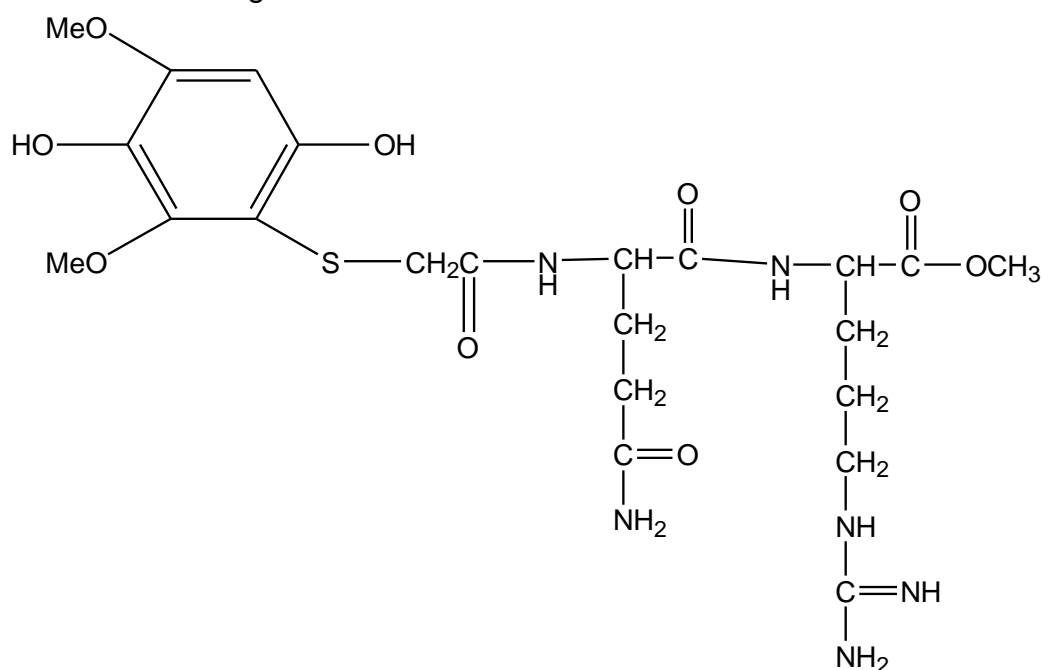
表二十三 DPRO 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度	Fe ²⁺ 濃度	切割百分比	反應 溫度時間
Lane1	DPRO	1 μ M	1 μ M	70%	60°C 25min
Lane2	DPRO	5 μ M	1 μ M	73%	
Lane3	DPRO	10 μ M	1 μ M	81%	
Lane4	DPRO	20 μ M	1 μ M	87%	
Lane5	DPRO	50 μ M	1 μ M	94%	
Lane6	---	---	1 μ M	---	
Lane7	DPRO	20 μ M	---	75%	
Lane8	DPRO	50 μ M	---	82%	
Lane9	DPRO	100 μ M	---	88%	
Lane10	DPRO	200 μ M	---	93%	
Lane11	DPRO	300 μ M	---	96%	
Lane12	---	---	---	---	

使用液相胜肽合成法合成之苯醌衍生物 DPRO，經由凝膠電泳切割百分比公式計算，DPRO 之切割百分比在有鐵離子存在下，1 μ M DPRO 之切割百分比為 70%，切割百分比隨 DPRO 濃度上升而增加，在最高濃度 50 μ M 時增加至 94%。在沒有鐵離子存在下，20 μ M 時切割百分比為 75%，切割百分比隨 DPRO 濃度上升而增加，在最高濃度 300 μ M 時增加至 96%。原因為鐵離子可幫助切割，我們期望在沒有鐵離子的幫助下也能達到切割的效果，DPRO 達到期望之切割效果，因此利用 DPRO 做 EPR 實驗，進行自由基相關之研究。

DQRO

DMQ-MA-Gln-Arg-OMe



分子式：C₂₂H₃₄N₆O₉S

ESI-MS：理論值 558.21，實驗值 558.61

產率：52.24 %

產物為紅色固體，熔點：130~135 °C

[α]_D²⁵：-23.00 (5.10 x 10⁻³ g / 7 mL 去離子水)

凝膠電泳實驗

反應時間：25 min；反應溫度：65 °C

Buffer：0.5×TBE，pH 7.4

Lane 1~5：DQRO + Fe²⁺ (1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μM)

Lane 6：DQRO (pBR322 DNA + Fe²⁺)

Lane 7~11：DQRO (20.0、50.0、100.0、200.0、300.0 μM)

Lane 12：pBR322 DNA only

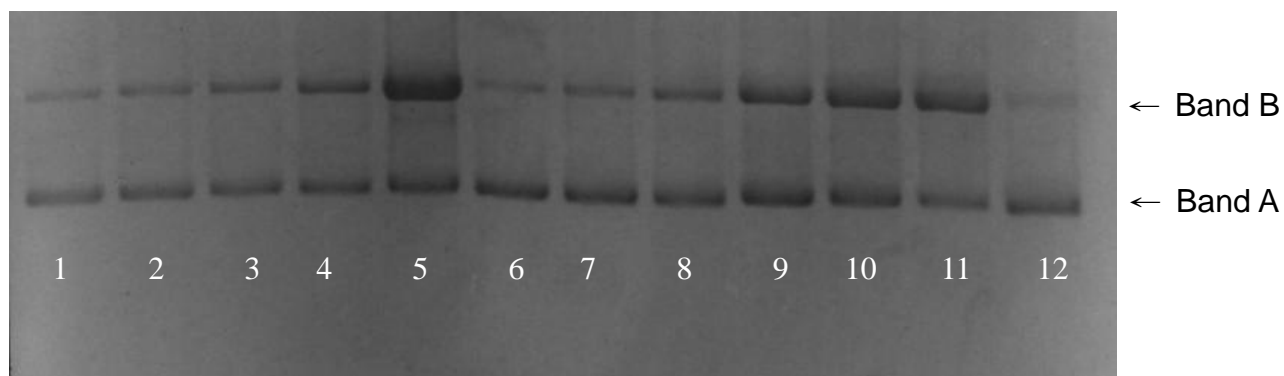


表 二十四 DQRO 有否鐵離子之濃度與切割百分比對照表

序號	Drug	Drug 濃度 (μM)	Fe^{2+} (μM)	切割百分 比	反應溫度 時間
Lane1	DQRO	1	1	63	65 °C 25 min
Lane2	DQRO	5	1	63	
Lane3	DQRO	10	1	67	
Lane4	DQRO	20	1	71.	
Lane5	DQRO	50	1	99	
Lane6	DQRO	---	1	---	
Lane7	DQRO	20	---	56	
Lane8	DQRO	50	---	63	
Lane9	DQRO	100	---	66	
Lane10	DQRO	200	---	79	
Lane11	DQRO	300	---	89	
Lane12	---	---	---	---	

使用液相胜肽合成法合成之苯醌衍生物 DQRO，經由凝膠電泳切割百分比公式計算，DQRO 之切割百分比在有鐵離子存在下，1 μM DQRO 之切割百分比為 63%，切割百分比隨 DQRO 濃度上升而增加，在最高濃度 50 μM 時增加至 99%。在沒有鐵離子存在下，20 μM 時切割百分比為 56%，切割百分比隨 DQRO 濃度上升而增加，在最高濃度 300 μM 時增加至 89%。原因為鐵離子可幫助切割，我們期望在沒有鐵離子的幫助下也能達到切割的效果，DQRO 達到期望之切割效果，因此利用 DQRO 做 EPR 實驗，進行自由基相關之研究。

3-2-2 EPR 實驗結果

經由 EPR 實驗所得到的圖譜結果以及利用軟體 WINEPR SimFonia 得到之模擬圖譜。由模擬圖譜可標示出圖形的中心點 g -factor，並可以推出 Hyperfine coupling constant，其中 A_{OR}^{H} 是被三個氫所耦合，是取每個波峰之間的 G 值，而 $A_{\text{ring}}^{\text{H}}$ 則是被一個氫所耦合，取的是第二個波峰和第三個波峰之間平均值的 G 值。兩種苯醌衍生物 DPRO 與 DQRO 的模擬圖檔皆以 5 min 為標準，因為 2 min 還在反應階段，圖譜尚未穩定，所以取 5 min 已達平衡作為標準⁷²。

將圖譜利用 EPR 程式積分圖譜，得到圖譜之訊號值對時間做圖，求出其平均的半衰期。高君翰學長以不同濃度之苯醌衍生物 DVRO 與 DMRO 做 EPR 實驗測試，得到訊號值之 $\ln[A]_t$ 對時間 t 作圖，可得一直線，推論其為一級反應， $\ln[A]_t$ 對時間 t 作圖之斜率為衰退的一級常數 k_{obs} ⁶⁹。

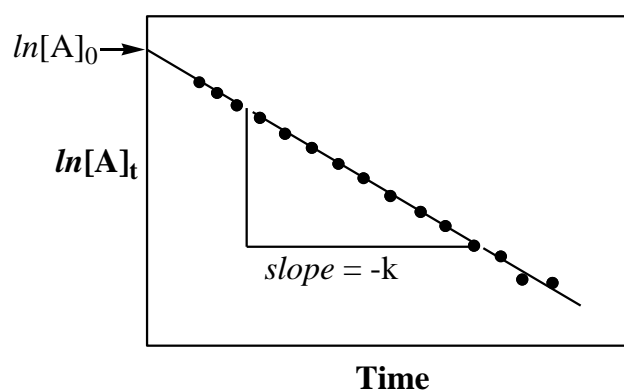


圖 3- 17 $\ln[A]_t$ 與時間之對照圖

EPR 波峰數量計算⁷³：

同核 $(2ni + 1)$

異核 $(2n_{H1}i + 1)(2n_{H2}i + 1)$

n =同性核數目

i =自旋量子數

以 DMQ-MA 衍生物為例子

A_{ring}^H 同核 $(2ni + 1) = 2 \times 1 \times (1/2) + 1 = 2$

A_{OR}^H 異核 $(2n_{H1}i + 1)(2n_{H2}i + 1) = (2 \times 1 \times (1/2) + 1)(2 \times 3 \times (1/2) + 1) = 2 \times 4 = 8$

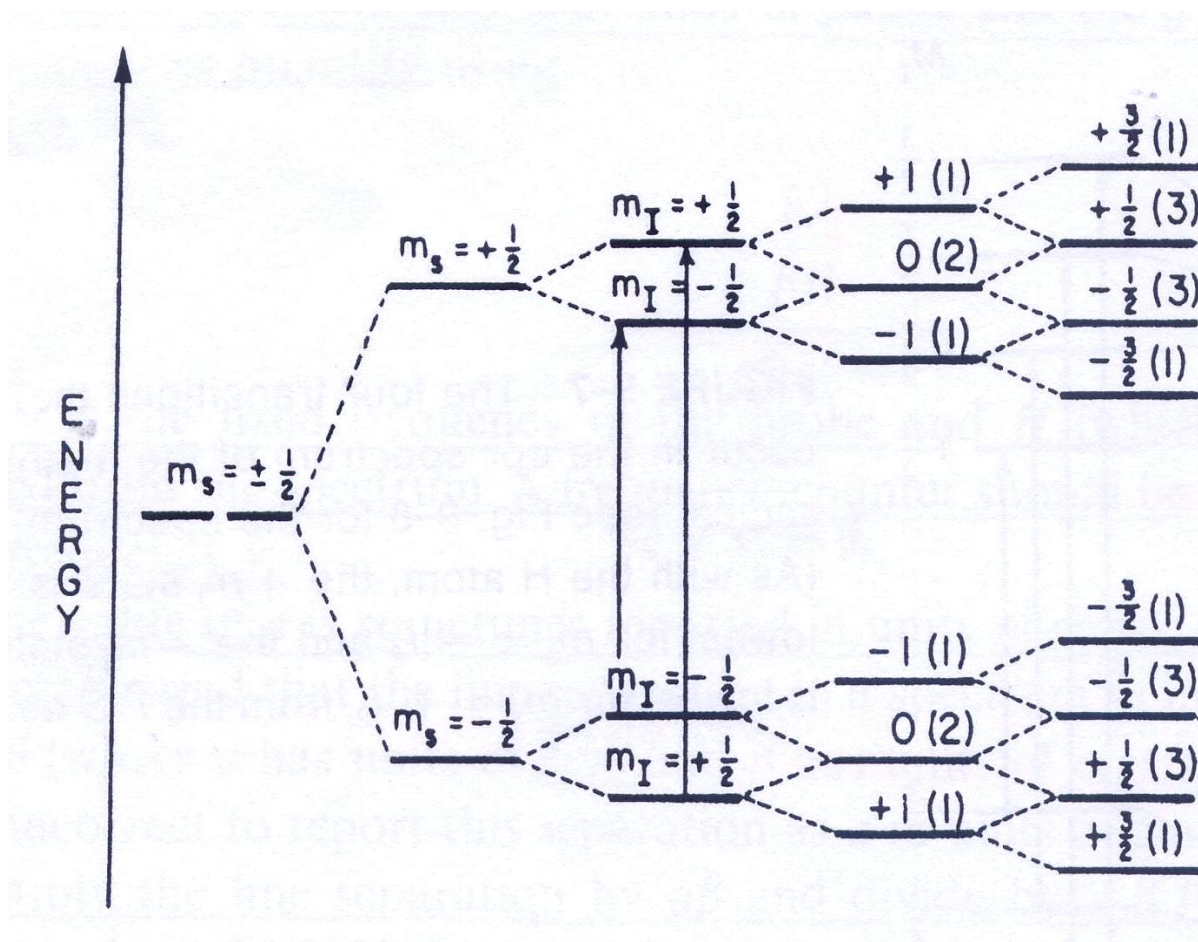


圖 3- 18 EPR 波峰分裂圖

表 二十五 EPR 相關數據列表

Semiquinone	R group	Hyperfine coupling constant		Electron g-Factor	EPR receiver gain
		A_{OR}^H (G)	A_{ring}^H (G)		
DQRO	Glutamine				
	pH=5.0	0.738	1.108	2.00491	1.00×10^4
	pH=7.4	0.738	1.112	2.00491	1.00×10^4
	pH=10.4	0.735	1.110	2.00490	1.00×10^4
	pH=11.4	0.742	1.108	2.00492	1.00×10^4
DPRO	Proline				
	pH=5.0	0.737	1.014	2.00488	1.00×10^4
	pH=7.4	0.738	1.015	2.00484	1.00×10^4
	pH=10.4	0.736	1.013	2.00488	1.00×10^5
	pH=11.4	0.735	1.012	2.00488	1.00×10^4
DVRO	Valine				
	pH=7.4	0.74	0.97	2.005153	1.00×10^5
DMRO	Methionine				
	pH=7.4	0.74	1.03	2.005016	1.00×10^5

(EPR receiver gain 為放大倍率和 EPR 訊號強度成反比)

將 EPR 實驗得到之 Hyperfine coupling constant，其中 A_{OR}^H 是被三個氫所耦合， A_{ring}^H 則是被一個氫所耦合，將 A_{OR}^H 與 A_{ring}^H 數值輸入模擬程式 WINEPR SimFonia，代入實驗之背景數據與波峰寬度，模擬可得模擬圖譜，模擬圖譜可排除溶液背景以及儀器雜訊干擾值，得到最原始之模擬圖譜。

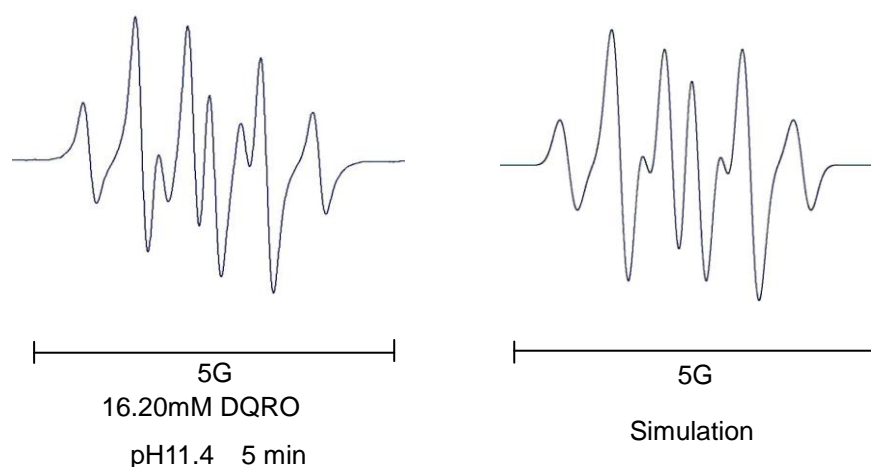


圖 3- 19 DQRO 之 EPR 圖譜

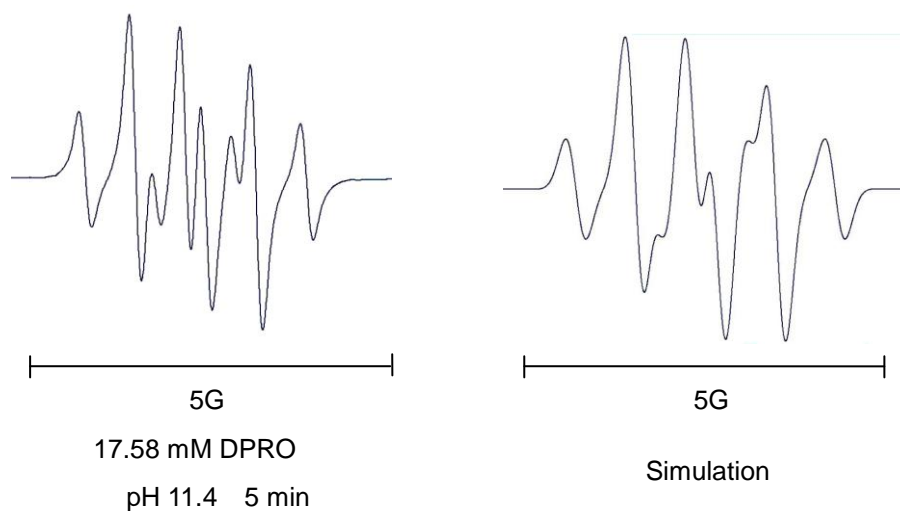


圖 3- 20 DPRO 之 EPR 圖譜

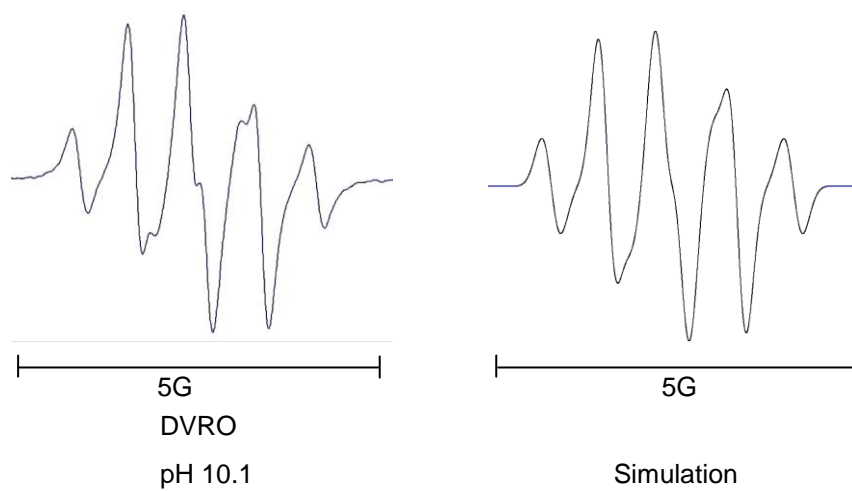


圖 3- 21 DVRO 之 EPR 圖譜(由高君翰學長論文提出)

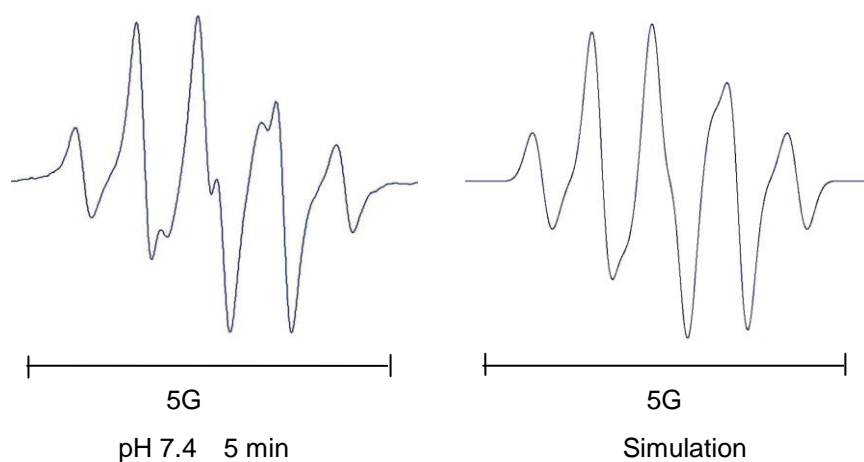


圖 3- 22 DMRO 之 EPR 圖譜(由高君翰學長論文提出)

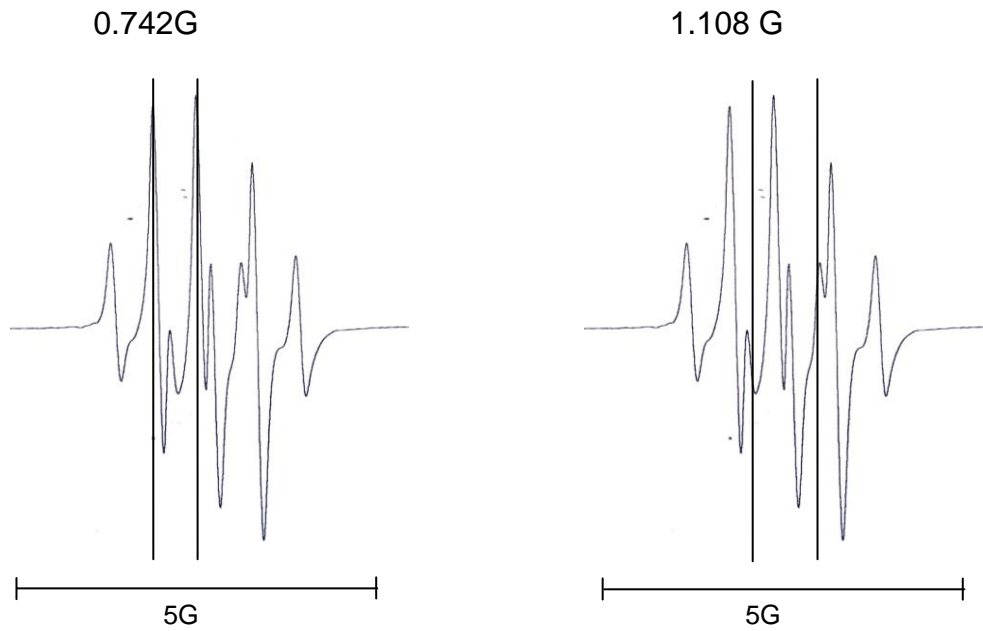


圖 3- 23 DQRO EPR 圖譜之 Hyperfine coupling constant 值

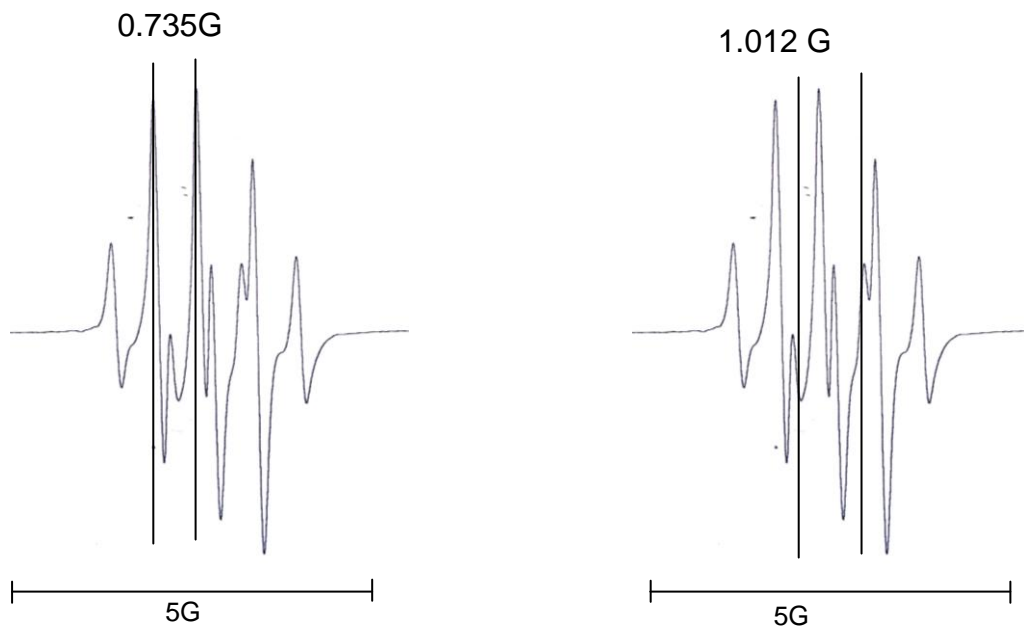


圖 3- 24 DPRO EPR 圖譜之 Hyperfine coupling constant 值

異核的 A_{OR}^H 6 個 Hyperfine coupling constant 的值為左上 4 個波峰與右下 4 個波峰的間距，在各 pH 皆接近為 0.738。左上第二個波峰與左上第三個波峰之間的中間點與右下第二個波峰與右下第三個波峰的中間點，這兩個點之間的間距為同核之 A_{ring}^H 的 Hyperfine coupling constant 的值，在 pH=7.4 時 DQRO 為 1.112，DPRO 為 1.015。

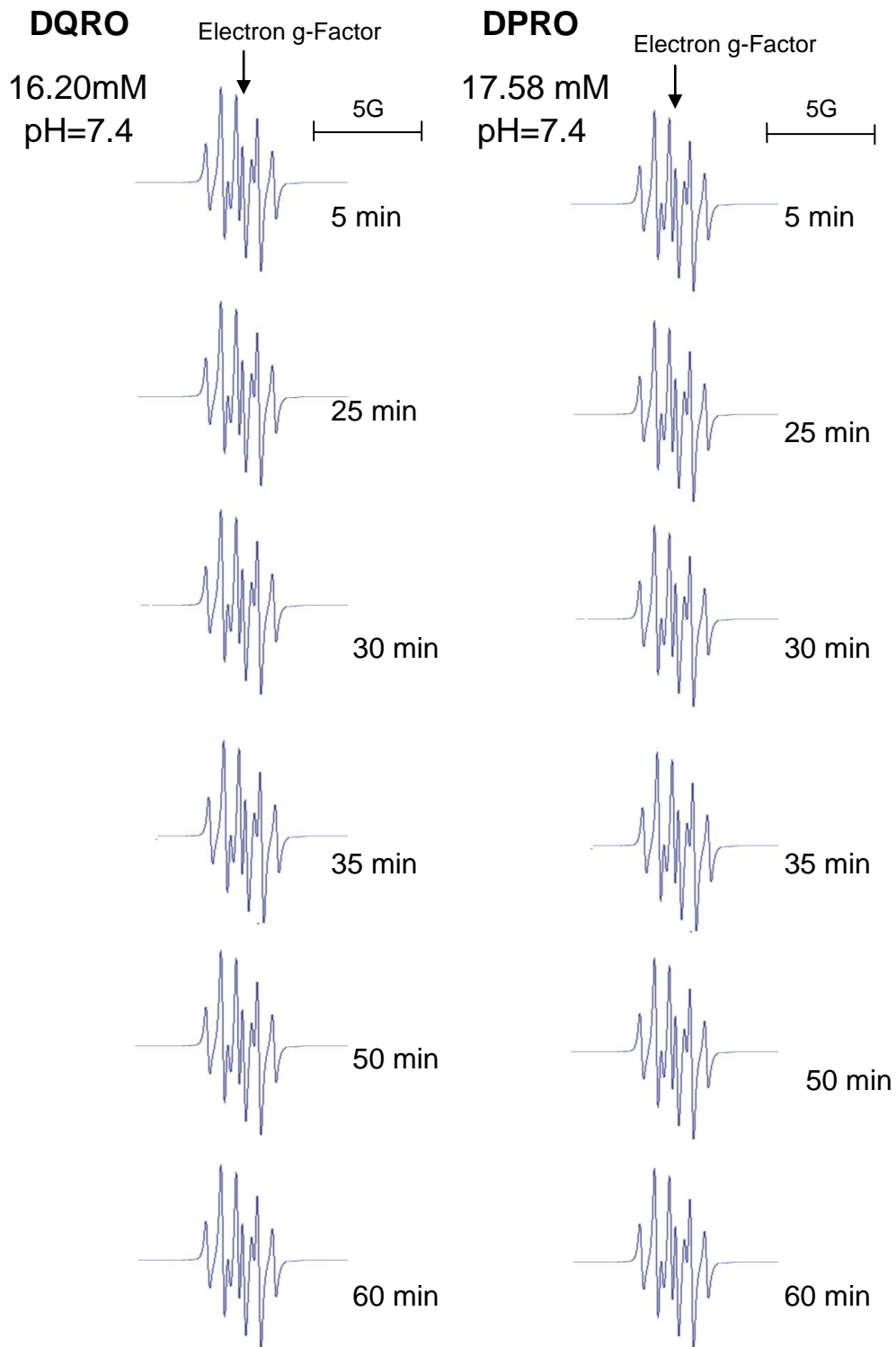


圖 3- 25 DQRO 和 DPRO 在 pH=7.4 各時間的 EPR 光譜圖

由圖 3- 25 可看出 DQRO 和 DPRO 在 pH=7.4 各時間的 EPR 圖形，波型很穩定，DQRO 的 Electron g-Factor 值 2.00491 與 DPRO 的 Electron g-Factor 值 2.00484 都沒隨時間變化而改變。

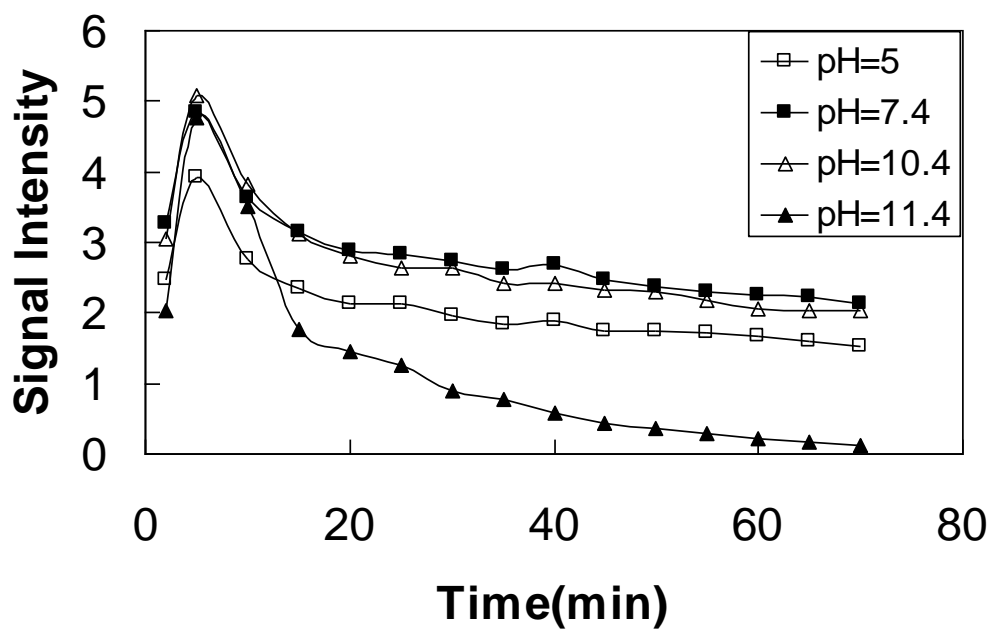


圖 3- 26 DQRO 不同 pH 值之 EPR 訊號變化圖

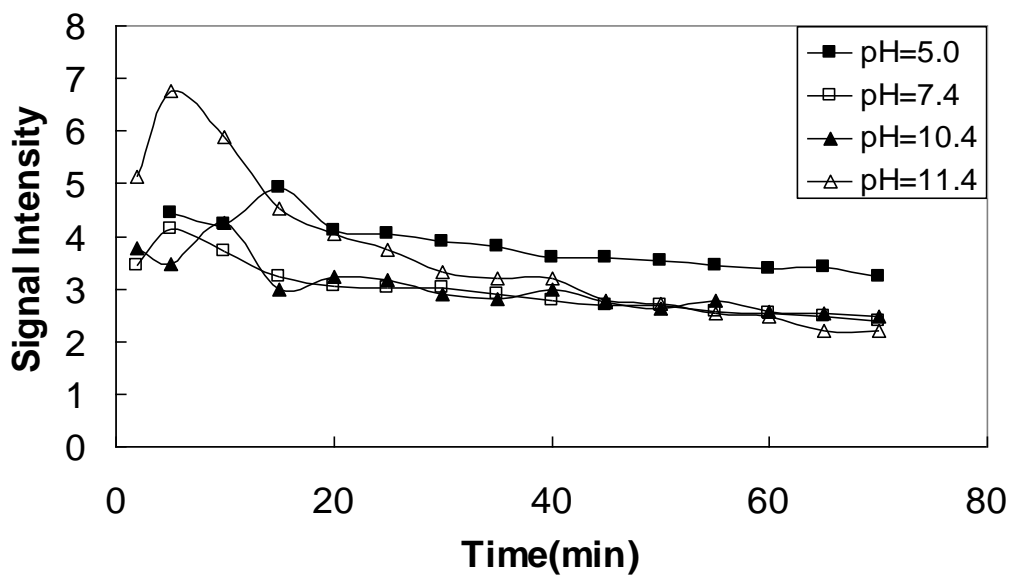


圖 3- 27 DPRO 不同 pH 值之 EPR 訊號變化圖

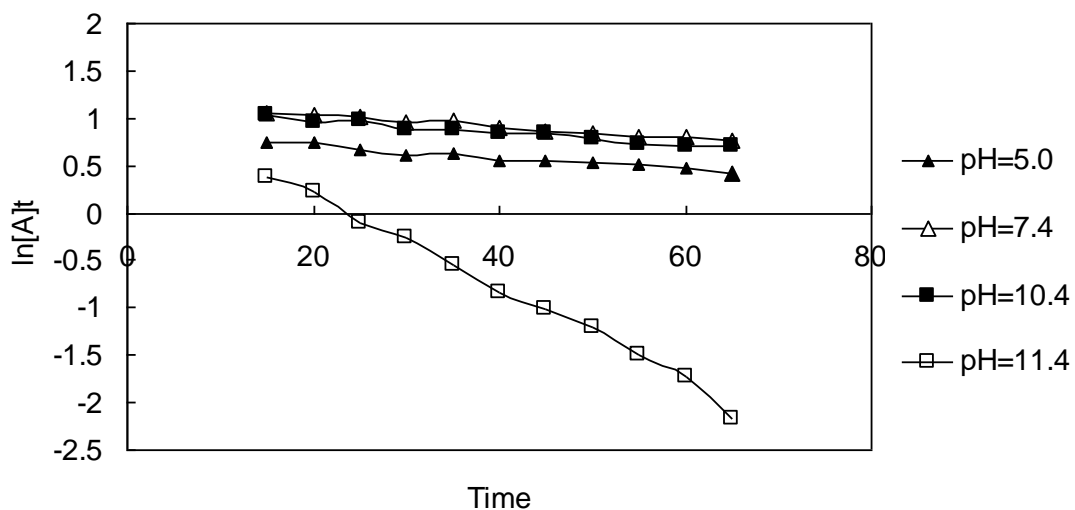


圖 3- 28 16.20 mM DQRO 各 pH 值的 $\ln[A]_t$ 對時間作圖

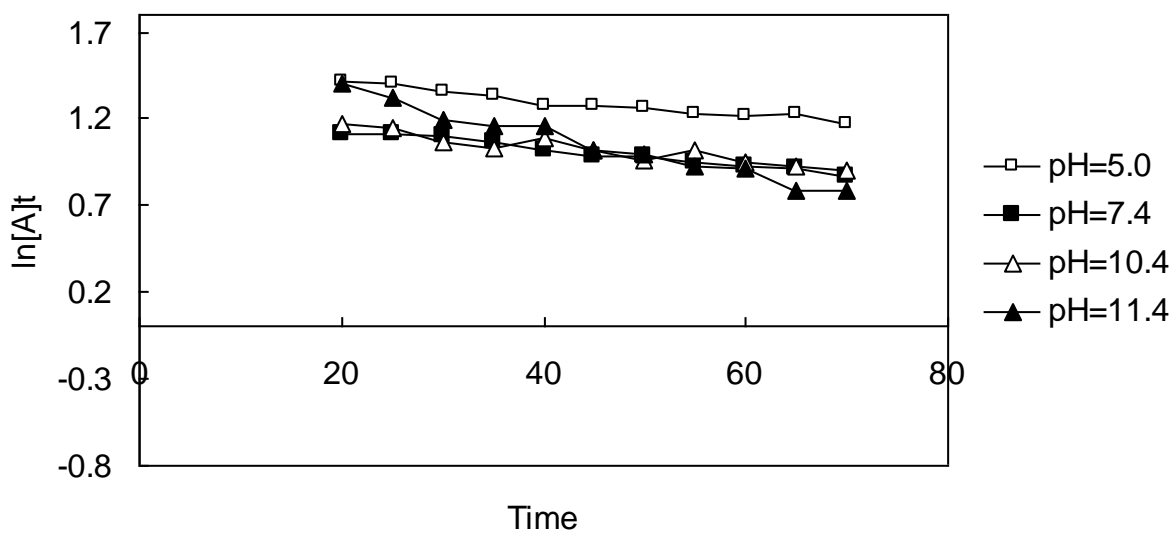


圖 3- 29 17.58 mM DPRO 各 pH 值的 $\ln[A]_t$ 對時間作圖

表 二十六 DPRO 與 DQRO 各 pH 值之 k_{Obs} 表

	pH= 5	pH=7.4	pH=10.4	pH=11.4
DQRO	-0.0063	-0.0063	-0.0066	-0.0493
DQRO	-0.0047	-0.0051	-0.005	-0.0122

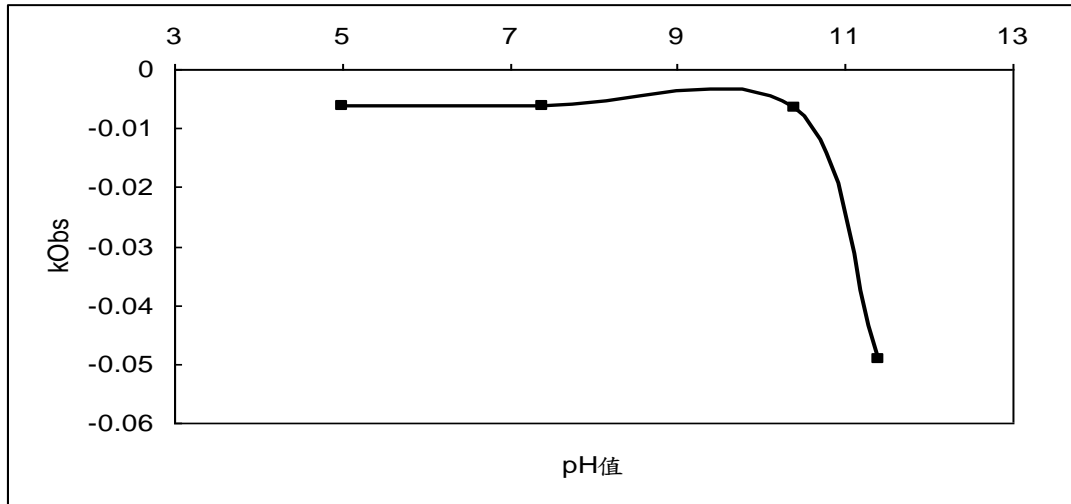


圖 3- 30 16.20 mM DQRO 各 pH 值之 k_{Obs}

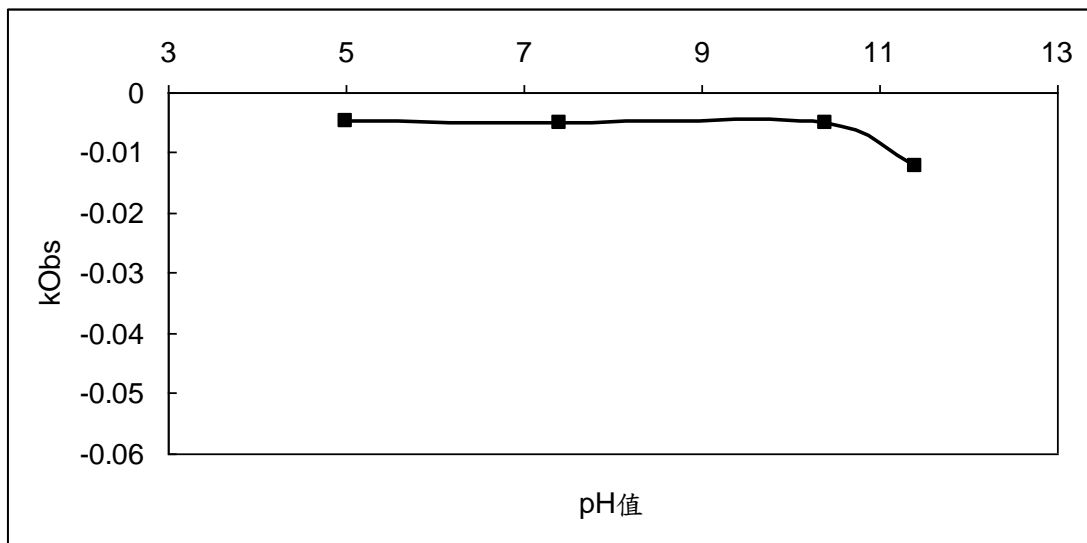


圖 3- 31 17.58 mM DPRO 各 pH 值之 k_{Obs}

訊號值之 $\ln[A]_t$ 對時間 t 作圖，可得一直線，推論其為一級反應， $\ln[A]_t$ 對時間 t 作圖之斜率為衰退的一級常數 k_{Obs} 。由 DQRO 各 pH 值之 k_{Obs} 與 DPRO 各 pH 值之 k_{Obs} 比較得知，在中性及酸性之 k_{Obs} 值很小且變化不大，在鹼性環境 pH 值為 11.4 時之 k_{Obs} 較大，衰退速率較快。而將 DQRO 與 DPRO 比較得知，DPRO 的 k_{Obs} 值比 DQRO 的 k_{Obs} 值小，且在 pH 值為 11.4 時衰退速率也較小，高穩定性的特質與此藥物更具有發展潛力。

3-2-2 結果與討論

已知若一藥物具備切割 DNA 性質，可將 DNA 結構由超螺旋結構(supercoil)切為開環結構(open-circular)，切割性質增強可再將開環結構切割為線性結構(linear)。根據此理論，將一系列 DMQ-MA 胜肽衍生物 DMQ-MA-PN3、DMQ-MA-QPQ-9、DPYR、DPQR、DQRO、DPRO，進行平板凝膠電泳實驗，經由電泳圖可以看出，DMQ-MA 胜肽衍生物具備切割 DNA 的性質，在不含有亞鐵離子的狀態下也皆具備切割 DNA 的性質，經由楊菀澈學姐論文之凝膠電泳切割百分比公式計算得知，DMQ-MA-PN3、DMQ-MA-QPQ-9、DPYR、DPQR 的切割效果較不佳，推論可能是因為經由 HPLC 純化時含有水溶液，使半醌自由基大量放出，使 DMQ-MA 胜肽衍生物失去效果，如使用 column 在無水狀態下純化應該可以改善此情況。而使用液相胜肽合成法合成之 DQRO 和 DPRO 切割能力最佳，進行後續之 EPR 自由基的研究。

根據本實驗小組先前發表論文中表示⁷⁴，胜肽衍生物 DVRO 是利用自由基對 DNA 產生破壞⁷⁵，圖 3-32 是自由基切割 DNA 的反應機構。因此，利用 EPR 實驗證實 DQRO 及 DPRO 自由基的存在。由 EPR 實驗結果看出 DQRO 和 DPRO 皆具自由基訊號，DQRO 的自由基訊號較強；經由圖譜比較 DQRO 自由基強度經長時間反應衰退情況較明顯，利用積分軟體計算出訊號值對時間作圖可得 DQRO 及 DPRO 之半衰期，DQRO 其半衰期在中性條件下大約是 50 min，而 DPRO 則相對穩定性較高，直到反應進行到 70 min 還未達到半衰期，高穩定性

的特質與此藥物更具有更具有發展潛力。

在含有亞鐵離子的狀態下會產生超氧陰離子(superoxide anion)和氫氧自由基(hydroxyl radical)有助於對 DNA 的切割作用，所以有較強的切割能力；而不含有亞鐵離子存在下則會產生半醌自由基(semiquinone radical)和過氧化氫(hydroperoxide)皆會對 DNA 造成切割的作用。此特點使我們可以將 2,6-dimethoxyhydroquinone-dipeptide 當作抑制癌症細胞的藥物。

而在相同濃度不同 pH 值下進行反應偵測的結果，發現當酸鹼度偏鹼時，其自由基訊號強度明顯強上許多，而當酸鹼度在中性和酸性時則自由基訊號強度較弱，但其訊號強弱在鹼性環境下的衰退較為明顯，且衰退至 20 分鐘時其訊號強度已大致和在中性和酸性環境下反應 70 分鐘左右的自由基訊號值相同。我們推論是因為在鹼性環境下，半醌自由基能被快速且大量的激發出來(圖 3-33)，造成訊號強度增加。

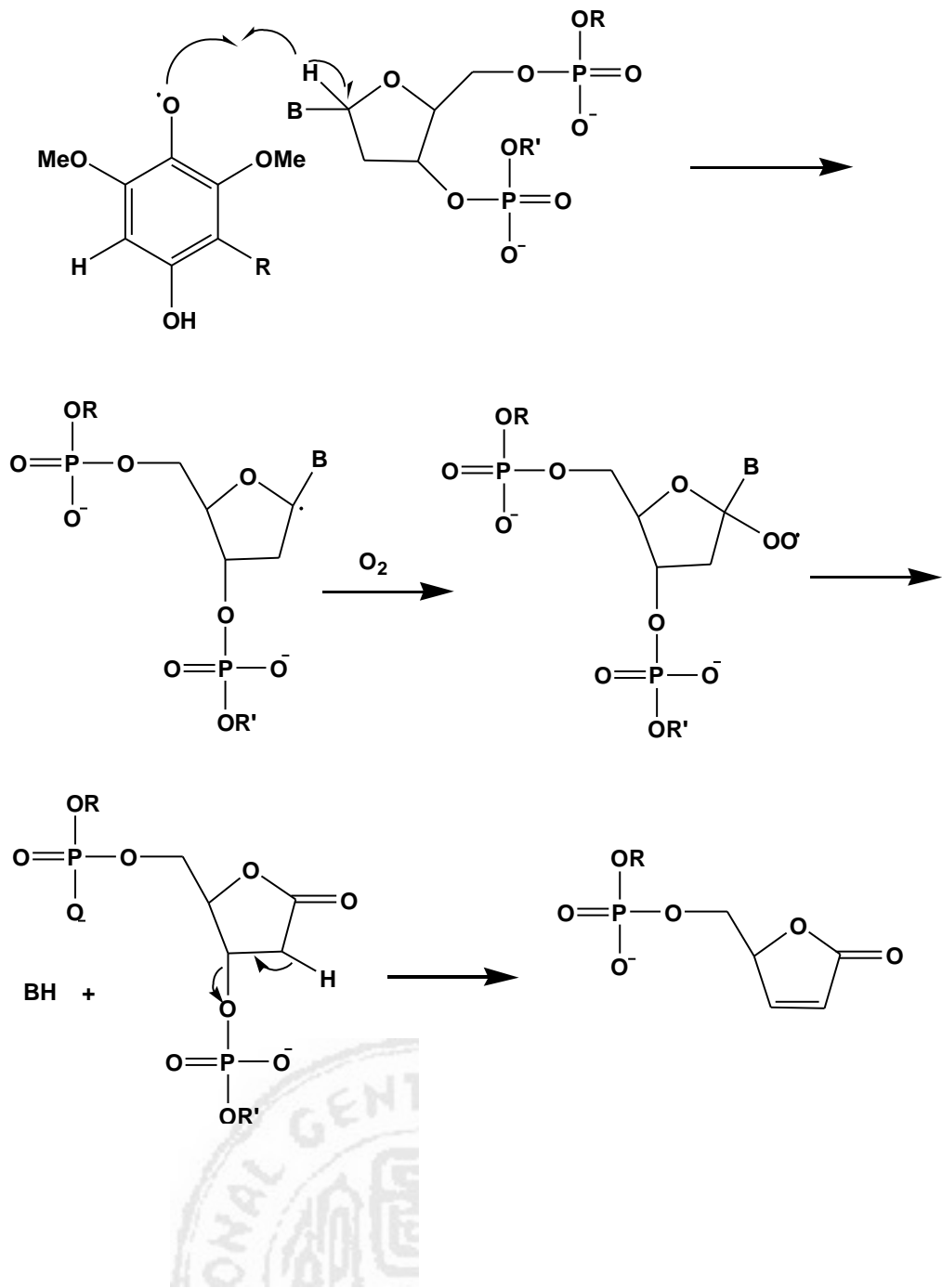


圖 3- 32 自由基切割 DNA 之反應機構

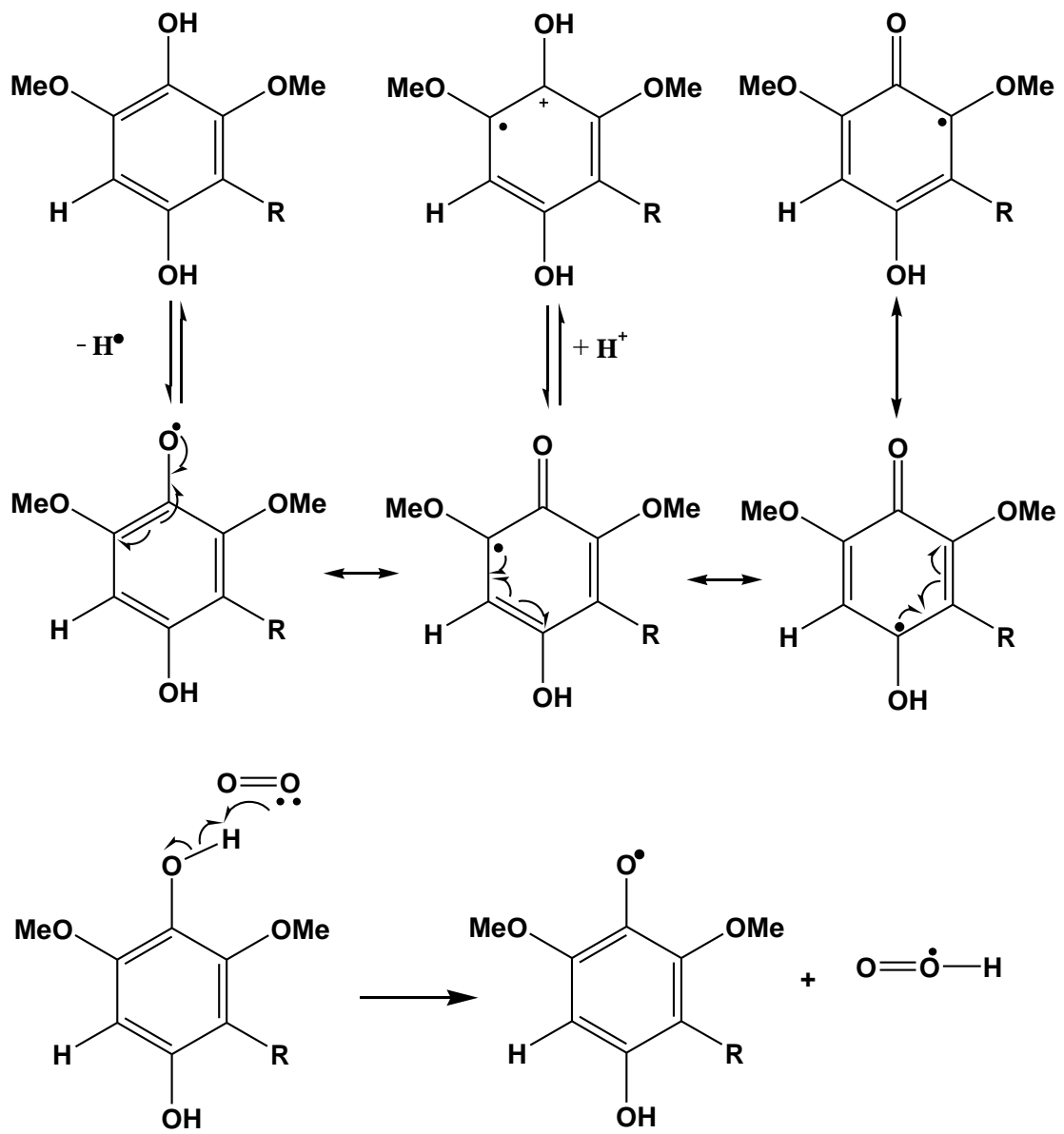


圖 3- 33 DMQ-MA 衍生物自由基示意圖

第四章 結論

本文所合成新的胜肽序列，經由平板凝膠電泳測試發現含有 Py 結構的直鏈胜肽 PN4、RHyM-10、RHyE-10、RHyQ-10 以及 RHyH-10 與含有 Py 結構的環狀胜肽 CHPy-12 與 DNA 皆有不錯的結合作用。含有 CLB 結構的直鏈胜肽 CLB-PN4、CLB-RHyQ-10、CLB-RHyM-10 不但對 DNA 有結合的能力也同時具有對 DNA 進行切割的作用，其中以 CLB-RHyQ-10 結合效果最好，切割效果以 CLB-PN4 最好。因此對於修飾 XPRK 模組的新胜肽，未來由榮總小進行足跡實驗以及 CD 的測試。期望一連串的研究能夠找到對 DNA 更具專一性或選擇性的胜肽序列，對於基因調控藥物的發展會有助益。

DMQ-MA(2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid)胜肽衍生物是有別於結合型胜肽的一種 DNA 切割試劑。本文經由電子順磁共振光譜 (EPR)，可以發現 DPRO 與 DQRO 沒有亞鐵離子的情況下，胜肽衍生物同樣也具有強烈的自由基訊號，且自由基的訊號相當的穩定，同時發現在鹼性環境下其自由基訊號會有增強的趨勢；而且自由基的產生不需靠外界激發。也由平板凝膠電泳發現，DPRO 與 DQRO 在沒有加入亞鐵離子的狀態下對 DNA 仍具有切割作用，其原因是在沒有亞鐵離子的存在下也同時會具有半醌自由基 (semiquinone radical) 和過氧化氫 (hydrogen peroxide) 對 DNA 相同有切割的作用。因為自由基具有破壞生物分子如 DNA、RNA 等能力，因此期望藉本文實驗可以提供往後抗癌藥物的研究有重大的幫助。

第五章 參考文獻

1. Suzuki, M. *Proc. Japan. Acad.* **1988a**, 64B, 29.
2. Suzuki, M. *J. Mol. Biol.* **1990**, 207, 61.
3. Von Holt, C., de Groot, P., Schwager, S. and Brandt, W. F. In Stein, G. S., Stein, J. L. and Marzluff, W. F. (eds), *Histone Genes*. Wiley-Interscience, New York, PP. **1984**, 65
4. Suzuki, M. *The EMBO Journal*. **1989**, 8, 797
5. Churchill, E. A.; Suzuki, M. *The EMBO Journal*. **1989**, 8, 4189
6. Suzuki, M. *Proc. Japan. Acad.* **1988b**, 64B, 33.
7. Yang, C. H.; Chou, P. J.; Luo, Z. L.; Chou, I. C.; Chang, J. C.; Cheng, C. C.; Martin, C. R. H.; Waring, M. J.; Sheh, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 3279.
8. Ragnarsson, U.; Grehn, L. *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3492.
9. Patel, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sic. U.S.A.* **1982**, 79, 6424.
10. Pelton, J.G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sic. U.S.A.* **1982**, 79, 6424.
11. Pelton, J.G.; Wemmer, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sic. U.S.A.* **1989**, 86, 5723.
12. Bailly, C.; Chaires, B. C. *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9, 513.
13. Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sic. U.S.A.* **1985**, 82, 1376.

14. Wurtz, N. R.; Dervan, P. B. *Chemistry & Biology*. **2000**, 7, 153.
15. Warren, S. W.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8783.
16. White, S.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Biochemistry*. **1996**, 35, 12532.
17. Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6160.
18. Parks, M. E.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6147.
19. Michelle, E. P.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7983.
20. White, S.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8756.
21. Chang, J. C.; Yang, C. H.; Chau, P. J.; Yang, W. H.; Chau, I. C.; Lu, C. T.; Sheh, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 53.
22. Bruce B. B.; kanganis, D. L.; Liebes, F.; Robert, S. *Cancer Research*. **1989**, 49, 554-559
23. Hall, A.; Robson, C. N.; Hickson, I. D.; Harris, A.L.; Proctor, S. J.; Cattani, A. R. *Cancer Research*. **1989**, 49, 6265-6268
24. Cullis, P. M.; Davies L. M.; Weaver, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8033-8034
25. Frahm, A. W.; Heinz H.; Kratz, F. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2701-2708.

26. Hovinen, J. L.; Silvennoinen, R.; Vilpo. *J. Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 91-93.
27. Everett, J. L.; Roberts, J. J.; Ross, W. C. J. *J. Chem. Soc.* **1953**, 2386.
28. Hall, A.; Robson, I. D.; Harris, A. L.; Proctor, S. J.; Cattar, A. R. *Cancer Res.* **1989**, 49, 6265
29. Bruce, B. B.; Denise, K.; Leonard, L. F.; Silber, R. *Cancer Res.* **1989**, 49, 554.
30. Hynes, R. O. *Cell.* **1992**, 69, 11-25.
31. Sheh, L. et al.. *Anti-Cancer Drug Design*, **1995**, 10, 373
32. Sheh, L. et al.. *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 870
33. D. J. Cosgrove, *Nature* **1952**, 169, 966
34. Murger, C.; Ellis, A.; Woods, K.; Randolph, J.; Yanovich, S.; Gewirtz, D. *Cancer Res.* **1988**, 48, 2404.
35. R. Pethig; Peter R. C.; Gascoyne, J. A. McLaughlin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1983**, 80, 129
36. G. Powis *Free Radical Biology & Medicine.* **1989**, 6, 63.
37. J. G. Lewis; W. Stewart; D. O. Adams. *Cancer Res.* **1988**, 48, 4762.
38. Noto. Vincenzo; S. Taper. Henryk; Yi-Hua Jiang; Jaak Janssens; Jan Bonte; William De Loecker *Cancer.* **1989**, 63, 901.

39. P. Pellack-Walker; J. L. Blumer *Mol. Pharmacol.* **1986**, 30, 42
40. Y. Sun *Free Radical Biology & Medicine.* **1990**, 8, 583.
41. K. S. Birandra; G. M. Edward *Free Radical Biology & Medicine.* **1990**, 8, 567.
42. P. Sangeetha; V. N. Das. *Free Radical Biology & Medicine.* **1990**, 8, 15.
43. Sheh, L. *United States Patent.* **1990**, 978, 783.
44. Sheh, L.; Li, C. J.; Dai, H. Y.; Cheng, V.; Chiang, C. D.; Shen, N. K.; Yu, C. Y. *Anti-Cancer Drug Des.* **1992**, 7, 315.
45. Sheh, L.; Li, C. J.; Dai, H. Y.; Cheng, V.; Chiang, C. D. *Anti-Cancer Drug Des.* **1993**, 8, 237.
46. Sheh, L.; Chiang, C. D.; Chang, S.; Lo, V.; Wong, R. N.; Chen, S. L. *Anti-Cancer Drug Des.* **1998**, 13, 501.
47. Minnock, A.; Lin, L. S.; Morgan, J.; Crow, S. D.; Waring, M. J.; Sheh, L. *Bioconjug. Chem.* **2001**, 12, 870.
48. 莊名朱，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**1994**
49. J. P. F. Bai; M. Hu; P. Srbramanian; H. I. Mosberg; G. L. Amidon, *J. Pharm. Sci.* **1992**, 81(2), 113.
50. H. M. Etilinger *Immunol. Today.* **1992**, 13(2), 52
51. R. Arnon; B. Schechter; M. Wilchek. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1991**,

303, 79.

52. E. J. Ambrose; A. M. James; J. H. B. Lowick. *Nature*. **1956**, 177, 476.

53. J. N. Mehrishi. *Nature*. **1970**, 228, 364

54. R. B. Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.

55. R. B. Merrifield. *Science*. **1986**, 232, 341.

56. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748.

57. Carpino, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4427.

58. Bodanszky, Miklos "*Principles of peptide synthesis*" 1984, Berlin,

Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.

59. Miklos, B. *J. Peptide Protein Res.* **1985**, 25, 449.

60. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. J. *Anal. Biochem.*

1970, 84, 595.

61. Luscombe, N. M.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. *Nucleic Acids Res.*

2001, 29, 2860.

62. White, S.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *Biochemistry*. **1996**, 35, 12532.

63. Trauger, J. W.; Baird, E. E.; Mrksich, M.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.*

1996, 118, 6160.

64. Parks, M. E.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118,

6147.

65. Michelle, E. P.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983.
66. White, S.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8756.
67. 周依君，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2004**
68. 許全壹，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2005**
69. 高君翰，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2009**
70. 吳佳蓉，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2007**
71. Amorosa, Michele; Lipparini, Luigi. *Annali di Chimica (Rome, Italy)* **1955**,
45, 977-82.
72. 林筱筑，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2008**
73. Physical Methods for Chemists RUSSELL S. DRAGO
74. Yang, C. H.; Chen, W. F.; Jong, M. C.; Jong, B. J.; Chang, J. C.; Waring, M.
J.; Ma, L.; Sheh, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8104.
75. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089
76. Sabrina D, Tatiana D, Anna F, Lucio M , Sergio P, Nives C, Paola P,
Michelandrea D. C, Graziella P, Franco Z *J. Med. Chem.* **2000**, *43*,
3963-3969
77. 楊菟澈，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2003**

第六章 附錄

附錄一 DMA-MA 結晶數據

Table 1. Crystal data and structure refinement for dmqma.

Identification code	dmqma	
Empirical formula	C ₁₈ H ₃₁ N O ₆ S	
Formula weight	389.50	
Temperature	110(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P 21	
Unit cell dimensions	a = 10.8024(5) Å	α = 90°.
	b = 8.2588(3) Å	β = 114.475(5)°.
	c = 12.1734(5) Å	γ = 90°.
Volume	988.46(7) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.309 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.197 mm ⁻¹	
F(000)	420	
Crystal size	0.66 x 0.56 x 0.27 mm ³	
Theta range for data collection	3.08 to 29.09°.	
Index ranges	-8 ≤ h ≤ 14, -11 ≤ k ≤ 9, -15 ≤ l ≤ 16	
Reflections collected	4599	
Independent reflections	3584 [R(int) = 0.0169]	
Completeness to theta = 26.00°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	1.00000 and 0.90437	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3584 / 1 / 266	
Goodness-of-fit on F ²	1.048	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0442, wR2 = 0.1060	
R indices (all data)	R1 = 0.0545, wR2 = 0.1090	
Absolute structure parameter	0.13(9)	
Largest diff. peak and hole	0.720 and -0.297 e.Å ⁻³	

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for dmqma. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
S	6956(1)	590(1)	7264(1)	21(1)
O(1)	7064(2)	333(2)	4826(2)	24(1)
O(2)	7699(2)	-2292(3)	3853(2)	27(1)
O(3)	8443(2)	-5085(3)	5106(2)	31(1)
O(4)	7421(2)	-2889(3)	8268(2)	25(1)
O(5)	3563(2)	253(3)	7743(2)	28(1)
O(6)	5354(2)	-1388(3)	8395(2)	28(1)
C(1)	7293(3)	-1104(4)	5446(2)	18(1)
C(2)	7657(3)	-2438(4)	4960(2)	20(1)
C(3)	8023(3)	-3864(4)	5623(3)	21(1)
C(4)	7921(3)	-3998(4)	6728(2)	20(1)
C(5)	7509(3)	-2662(4)	7194(2)	20(1)
C(6)	7228(3)	-1191(4)	6584(2)	18(1)
C(7)	5660(3)	700(5)	4117(2)	31(1)
C(8)	9005(3)	-6505(4)	5831(3)	34(1)
C(9)	5154(2)	624(4)	6897(2)	22(1)
C(10)	4682(3)	-253(4)	7765(2)	20(1)
N	2465(2)	-1600(4)	9017(2)	26(1)
C(11)	1049(4)	-961(6)	8751(4)	48(1)
C(12)	929(4)	763(6)	8398(4)	51(1)
C(13)	623(5)	-1251(6)	9791(4)	65(1)
C(14)	2463(5)	-3219(5)	8461(4)	56(1)
C(15)	1855(5)	-3194(5)	7157(4)	55(1)
C(16)	1884(4)	-4574(5)	9010(4)	57(1)
C(17)	3311(6)	-1226(9)	10373(4)	23(2)
C(18)	4799(7)	-1402(11)	10736(5)	26(2)
C(17')	3685(6)	-2132(10)	10172(5)	15(2)
C(18'')	4330(12)	-604(16)	10809(8)	42(3)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for dmqma.

S-C(6)	1.771(3)
S-C(9)	1.809(3)
O(1)-C(1)	1.373(3)
O(1)-C(7)	1.433(3)
O(2)-C(2)	1.372(3)
O(2)-H(2A)	0.73(4)
O(3)-C(3)	1.362(4)
O(3)-C(8)	1.441(4)
O(4)-C(5)	1.363(3)
O(4)-H(4A)	0.75(4)
O(5)-C(10)	1.269(3)
O(6)-C(10)	1.237(3)
C(1)-C(2)	1.382(4)
C(1)-C(6)	1.418(4)
C(2)-C(3)	1.390(4)
C(3)-C(4)	1.398(4)
C(4)-C(5)	1.395(4)
C(4)-H(4B)	0.9500
C(5)-C(6)	1.390(4)
C(7)-H(7A)	0.9800
C(7)-H(7B)	0.9800
C(7)-H(7C)	0.9800
C(8)-H(8A)	0.9800
C(8)-H(8B)	0.9800
C(8)-H(8C)	0.9800
C(9)-C(10)	1.533(4)
C(9)-H(9A)	0.9900
C(9)-H(9B)	0.9900
N-C(14)	1.498(6)
N-C(11)	1.521(5)
N-C(17')	1.540(6)
N-C(17)	1.551(5)
N-H(0A)	0.95(4)
C(11)-C(12)	1.477(6)
C(11)-C(13)	1.535(5)
C(11)-H(11A)	1.0000

C(12)-H(12A)	0.9800
C(12)-H(12B)	0.9800
C(12)-H(12C)	0.9800
C(13)-H(13A)	0.9800
C(13)-H(13B)	0.9800
C(13)-H(13C)	0.9800
C(14)-C(15)	1.445(6)
C(14)-C(16)	1.561(5)
C(14)-H(14A)	1.0000
C(15)-H(15A)	0.9800
C(15)-H(15B)	0.9800
C(15)-H(15C)	0.9800
C(16)-H(16A)	0.9800
C(16)-H(16B)	0.9800
C(16)-H(16C)	0.9800
C(17)-C(18)	1.487(10)
C(17)-H(17A)	0.9900
C(17)-H(17B)	0.9900
C(18)-H(18A)	0.9800
C(18)-H(18B)	0.9800
C(18)-H(18C)	0.9800
C(17')-C(18')	1.494(14)
C(17')-H(17C)	0.9900
C(17')-H(17D)	0.9900
C(18'')-H(18D)	0.9800
C(18'')-H(18E)	0.9800
C(18'')-H(18F)	0.9800
C(6)-S-C(9)	105.48(14)
C(1)-O(1)-C(7)	114.8(2)
C(2)-O(2)-H(2A)	110(3)
C(3)-O(3)-C(8)	117.1(2)
C(5)-O(4)-H(4A)	106(3)
O(1)-C(1)-C(2)	118.2(2)
O(1)-C(1)-C(6)	120.7(3)
C(2)-C(1)-C(6)	121.1(3)
O(2)-C(2)-C(1)	118.8(3)
O(2)-C(2)-C(3)	121.8(3)

C(1)-C(2)-C(3)	119.3(2)
O(3)-C(3)-C(2)	115.4(2)
O(3)-C(3)-C(4)	124.0(3)
C(2)-C(3)-C(4)	120.6(3)
C(3)-C(4)-C(5)	119.6(3)
C(3)-C(4)-H(4B)	120.2
C(5)-C(4)-H(4B)	120.2
O(4)-C(5)-C(6)	123.1(3)
O(4)-C(5)-C(4)	116.2(3)
C(6)-C(5)-C(4)	120.7(2)
C(5)-C(6)-C(1)	118.5(3)
C(5)-C(6)-S	121.2(2)
C(1)-C(6)-S	120.0(2)
O(1)-C(7)-H(7A)	109.5
O(1)-C(7)-H(7B)	109.5
H(7A)-C(7)-H(7B)	109.5
O(1)-C(7)-H(7C)	109.5
H(7A)-C(7)-H(7C)	109.5
H(7B)-C(7)-H(7C)	109.5
O(3)-C(8)-H(8A)	109.5
O(3)-C(8)-H(8B)	109.5
H(8A)-C(8)-H(8B)	109.5
O(3)-C(8)-H(8C)	109.5
H(8A)-C(8)-H(8C)	109.5
H(8B)-C(8)-H(8C)	109.5
C(10)-C(9)-S	117.0(2)
C(10)-C(9)-H(9A)	108.1
S-C(9)-H(9A)	108.1
C(10)-C(9)-H(9B)	108.1
S-C(9)-H(9B)	108.1
H(9A)-C(9)-H(9B)	107.3
O(6)-C(10)-O(5)	124.9(3)
O(6)-C(10)-C(9)	120.6(3)
O(5)-C(10)-C(9)	114.5(3)
C(14)-N-C(11)	113.6(3)
C(14)-N-C(17')	89.9(4)
C(11)-N-C(17')	134.3(4)
C(14)-N-C(17)	123.3(4)

C(11)-N-C(17)	104.7(4)
C(17')-N-C(17)	35.0(3)
C(14)-N-H(0A)	104(2)
C(11)-N-H(0A)	108(2)
C(17')-N-H(0A)	103(2)
C(17)-N-H(0A)	102(2)
C(12)-C(11)-N	110.9(3)
C(12)-C(11)-C(13)	111.7(4)
N-C(11)-C(13)	112.9(4)
C(12)-C(11)-H(11A)	107.0
N-C(11)-H(11A)	107.0
C(13)-C(11)-H(11A)	107.0
C(11)-C(12)-H(12A)	109.5
C(11)-C(12)-H(12B)	109.5
H(12A)-C(12)-H(12B)	109.5
C(11)-C(12)-H(12C)	109.5
H(12A)-C(12)-H(12C)	109.5
H(12B)-C(12)-H(12C)	109.5
C(11)-C(13)-H(13A)	109.5
C(11)-C(13)-H(13B)	109.5
H(13A)-C(13)-H(13B)	109.5
C(11)-C(13)-H(13C)	109.5
H(13A)-C(13)-H(13C)	109.5
H(13B)-C(13)-H(13C)	109.5
C(15)-C(14)-N	113.5(3)
C(15)-C(14)-C(16)	113.6(4)
N-C(14)-C(16)	111.9(3)
C(15)-C(14)-H(14A)	105.7
N-C(14)-H(14A)	105.7
C(16)-C(14)-H(14A)	105.7
C(14)-C(15)-H(15A)	109.5
C(14)-C(15)-H(15B)	109.5
H(15A)-C(15)-H(15B)	109.5
C(14)-C(15)-H(15C)	109.5
H(15A)-C(15)-H(15C)	109.5
H(15B)-C(15)-H(15C)	109.5
C(14)-C(16)-H(16A)	109.5
C(14)-C(16)-H(16B)	109.5

H(16A)-C(16)-H(16B)	109.5
C(14)-C(16)-H(16C)	109.5
H(16A)-C(16)-H(16C)	109.5
H(16B)-C(16)-H(16C)	109.5
C(18)-C(17)-N	112.6(6)
C(18)-C(17)-H(17A)	109.1
N-C(17)-H(17A)	109.1
C(18)-C(17)-H(17B)	109.1
N-C(17)-H(17B)	109.1
H(17A)-C(17)-H(17B)	107.8
C(17)-C(18)-H(18A)	109.5
C(17)-C(18)-H(18B)	109.5
H(18A)-C(18)-H(18B)	109.5
C(17)-C(18)-H(18C)	109.5
H(18A)-C(18)-H(18C)	109.5
H(18B)-C(18)-H(18C)	109.5
C(18')-C(17')-N	105.8(8)
C(18')-C(17')-H(17C)	110.6
N-C(17')-H(17C)	110.6
C(18')-C(17')-H(17D)	110.6
N-C(17')-H(17D)	110.6
H(17C)-C(17')-H(17D)	108.7
C(17')-C(18')-H(18D)	109.5
C(17')-C(18')-H(18E)	109.5
H(18D)-C(18')-H(18E)	109.5
C(17')-C(18')-H(18F)	109.5
H(18D)-C(18')-H(18F)	109.5
H(18E)-C(18')-H(18F)	109.5

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for dmqma. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2}U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
S	22(1)	24(1)	22(1)	-4(1)	14(1)	-4(1)
O(1)	25(1)	25(1)	26(1)	6(1)	16(1)	2(1)
O(2)	34(1)	30(2)	24(1)	0(1)	19(1)	1(1)

O(3)	41(1)	30(1)	30(1)	3(1)	21(1)	14(1)
O(4)	30(1)	30(1)	18(1)	6(1)	13(1)	5(1)
O(5)	24(1)	40(2)	28(1)	7(1)	20(1)	3(1)
O(6)	32(1)	30(1)	29(1)	6(1)	20(1)	3(1)
C(1)	12(1)	21(2)	20(1)	3(1)	7(1)	-3(1)
C(2)	17(1)	28(2)	19(1)	1(1)	10(1)	-1(1)
C(3)	15(1)	23(2)	24(1)	0(1)	6(1)	2(1)
C(4)	17(1)	21(2)	20(1)	6(1)	7(1)	3(1)
C(5)	13(1)	30(2)	15(1)	2(1)	5(1)	-2(1)
C(6)	16(1)	20(2)	20(1)	-4(1)	10(1)	-2(1)
C(7)	30(2)	36(2)	26(1)	11(2)	9(1)	6(2)
C(8)	37(2)	25(2)	43(2)	3(2)	21(2)	11(2)
C(9)	21(1)	27(2)	22(1)	0(1)	14(1)	0(2)
C(10)	22(1)	24(2)	15(1)	-4(1)	10(1)	-6(1)
N	16(1)	43(2)	18(1)	10(1)	6(1)	-7(1)
C(11)	47(2)	63(3)	54(2)	-7(2)	40(2)	-8(2)
C(12)	42(2)	52(3)	79(3)	-6(2)	44(2)	3(2)
C(13)	88(3)	76(3)	72(3)	-31(2)	72(3)	-36(3)
C(14)	54(3)	43(3)	86(3)	25(2)	43(2)	11(2)
C(15)	94(3)	38(2)	69(3)	-23(2)	70(3)	-25(2)
C(16)	53(2)	45(3)	75(3)	33(2)	28(2)	-2(2)
C(17)	27(3)	26(4)	17(2)	-7(2)	11(2)	-8(3)
C(18)	23(3)	41(4)	14(2)	2(3)	8(2)	0(3)
C(17')	16(3)	17(5)	13(3)	0(3)	7(2)	1(3)
C(18')	48(7)	48(7)	29(4)	-11(4)	15(4)	-22(6)

Table 5. 3d coordinates

	x	y	z	U(eq)
H(2A)	7490(40)	-3040(50)	3520(40)	38(13)
H(4A)	7000(40)	-2200(50)	8320(30)	40(13)
H(4B)	8131	-4992	7159	24
H(7A)	5587	1739	3706	47

H(7B)	5179	766	4645	47
H(7C)	5252	-155	3517	47
H(8A)	9266	-7292	5362	50
H(8B)	8324	-6988	6068	50
H(8C)	9809	-6200	6555	50
H(9A)	4864	1770	6844	26
H(9B)	4670	143	6085	26
H(0A)	2870(30)	-900(50)	8630(30)	39(10)
H(11A)	398	-1576	8038	58
H(12A)	1225	906	7744	77
H(12B)	1503	1418	9094	77
H(12C)	-21	1107	8122	77
H(13A)	-287	-802	9578	98
H(13B)	1273	-720	10523	98
H(13C)	612	-2417	9937	98
H(14A)	3441	-3499	8703	68
H(15A)	2279	-2339	6872	82
H(15B)	878	-2982	6863	82
H(15C)	1996	-4244	6851	82
H(16A)	1917	-5616	8637	86
H(16B)	940	-4320	8854	86
H(16C)	2432	-4638	9882	86
H(17A)	3115	-105	10544	27
H(17B)	3027	-1969	10865	27
H(18A)	5287	-1144	11595	39
H(18B)	5088	-659	10259	39
H(18C)	5002	-2518	10592	39
H(17C)	3377	-2803	10686	18
H(17D)	4338	-2769	9969	18
H(18D)	5123	-868	11554	63
H(18E)	3671	8	11006	63
H(18F)	4618	50	10285	63

Table 6 Cartesian coordinates

S	5	0.00000	0.00000	0.00000
O1	4	0.10545	-0.21234	-3.01563
O2	4	0.73027	-2.38081	-4.48506

H2A	2	0.52434	-3.00153	-4.80111
O3	4	1.46119	-4.68754	-3.29172
O4	4	0.45715	-2.87344	1.01406
H4A	2	0.04201	-2.30423	1.27032
O5	4	-3.33606	-0.27832	2.10185
O6	4	-1.57585	-1.63346	2.09414
C1	1	0.33135	-1.39909	-2.36384
C2	1	0.68825	-2.50065	-3.11877
C3	1	1.04859	-3.67881	-2.47480
C4	1	0.94835	-3.78922	-1.08444
H4B	2	1.15499	-4.61061	-0.65419
C5	1	0.54305	-2.68598	-0.33293
C6	1	0.26650	-1.47084	-0.94911
C7	1	-1.27505	0.09035	-3.25020
H7A	2	-1.34638	0.94834	-3.71834
H7B	2	-1.74756	0.14542	-2.39342
H7C	2	-1.67555	-0.61568	-3.79933
C8	1	2.01423	-5.85962	-2.66150
H8A	2	2.27044	-6.50980	-3.34855
H8B	2	1.34401	-6.25842	-2.06807
H8C	2	2.80434	-5.60769	-2.13932
C9	1	-1.77241	0.02805	0.35939
H9A	2	-2.05725	0.97391	0.42501
H9B	2	-2.24831	-0.36942	-0.41239
C10	1	-2.23601	-0.69681	1.62797
N	3	-4.41569	-1.80930	4.14347
H0A	2	-4.01914	-1.23400	3.49674
C11	1	-5.80772	-1.28093	4.45345
H11A	2	-6.44820	-1.78923	3.87775
C12	1	-5.92608	0.14223	4.07825
H12A	2	-5.63538	0.26056	3.14986
H12B	2	-5.36180	0.68376	4.66879
H12C	2	-6.85959	0.42693	4.16707
C13	1	-6.22676	-1.52080	5.91102
H13A	2	-7.12166	-1.14978	6.05892
H13B	2	-5.58799	-1.08212	6.51097
H13C	2	-6.23805	-2.48361	6.09344
C14	1	-4.41831	-3.14598	3.46822

H14A	2	-3.45620	-3.37766	3.32436
C15	1	-5.01566	-3.12530	2.15228
H15A	2	-4.59862	-2.41953	1.61527
H15B	2	-5.97655	-2.95012	2.23244
H15C	2	-4.87687	-3.99222	1.71686
C16	1	-4.98720	-4.26533	4.39484
H16A	2	-4.95459	-5.12535	3.92611
H16B	2	-5.91557	-4.05558	4.62839
H16C	2	-4.44871	-4.31802	5.21195
C17	1	-3.58460	-1.49993	5.41637
H17A	2	-3.77655	-0.57458	5.71132
H17B	2	-3.86314	-2.11330	6.14183
C18	1	-2.12136	-1.64513	5.19167
H18A	2	-1.64111	-1.43233	6.01900
H18B	2	-1.83738	-1.03175	4.48209
H18C	2	-1.92158	-2.56701	4.92587
C17'	1	-3.21603	-2.24836	5.00424
H17C	2	-3.51894	-2.80241	5.76672
H17D	2	-2.57417	-2.77430	4.46434
C18'	1	-2.58242	-0.98632	5.49112
H18D	2	-1.80238	-1.20417	6.04292
H18E	2	-3.22984	-0.48087	6.02571
H18F	2	-2.29934	-0.44591	4.72415

附錄二 胜肽之 ESI-MS 質譜儀分析圖

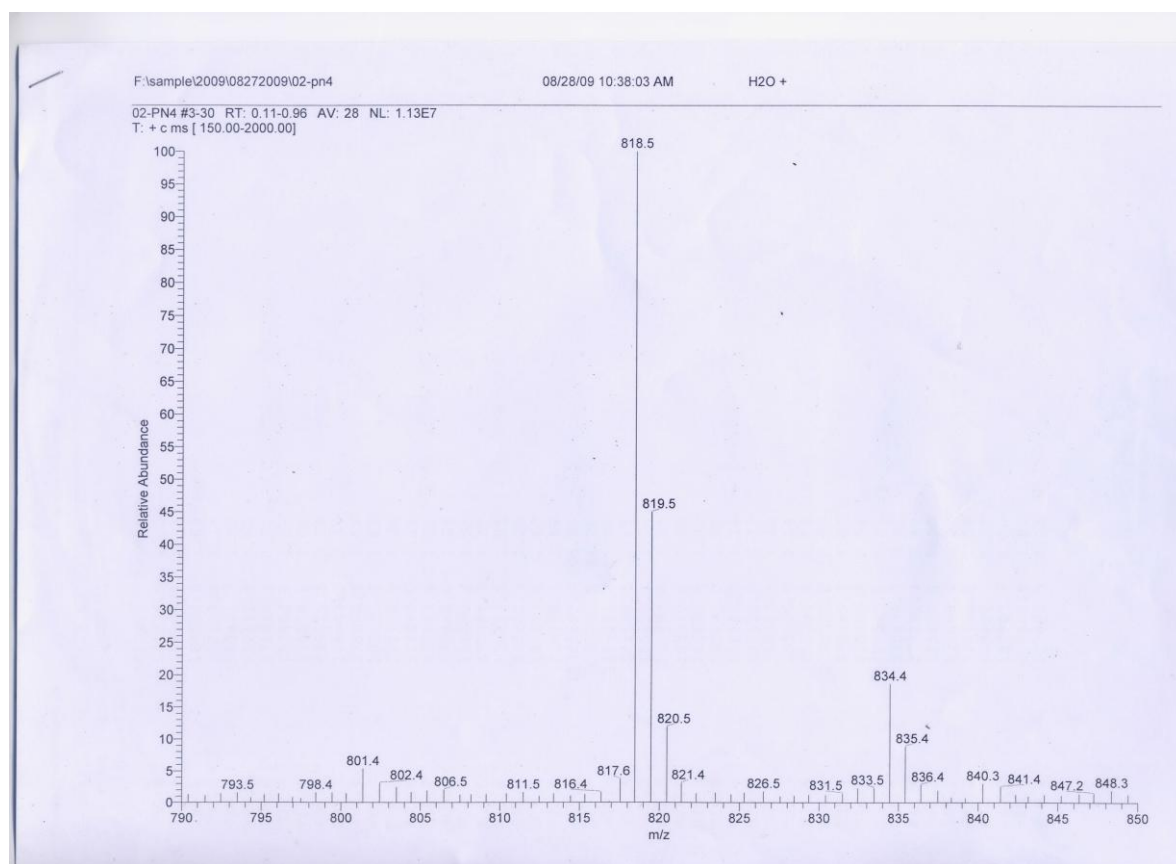


圖 3- 34 PN4 ESI-MS 質譜儀分析圖

C:\Documents and Settings\...25-RHyE-10

2010/5/14 下午 02:41:36

H2O +

25-RHyE-10 #1-30 RT: 0.00-0.77 AV: 30 NL: 5.71E6
 T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

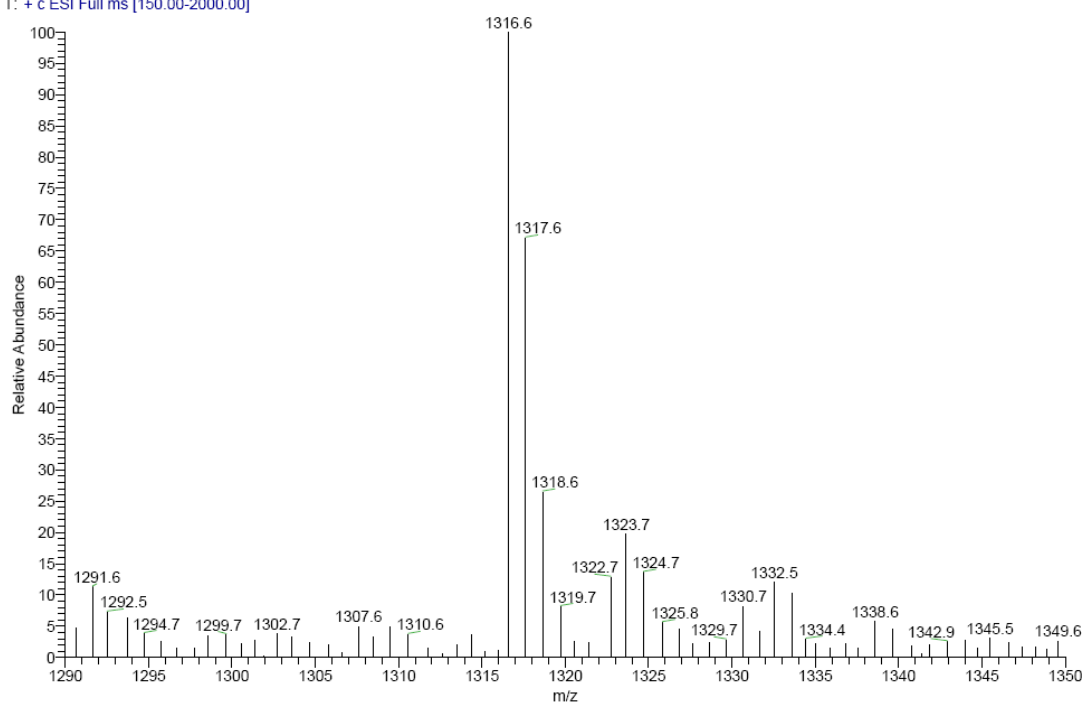


圖 3- 35 RHyE-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

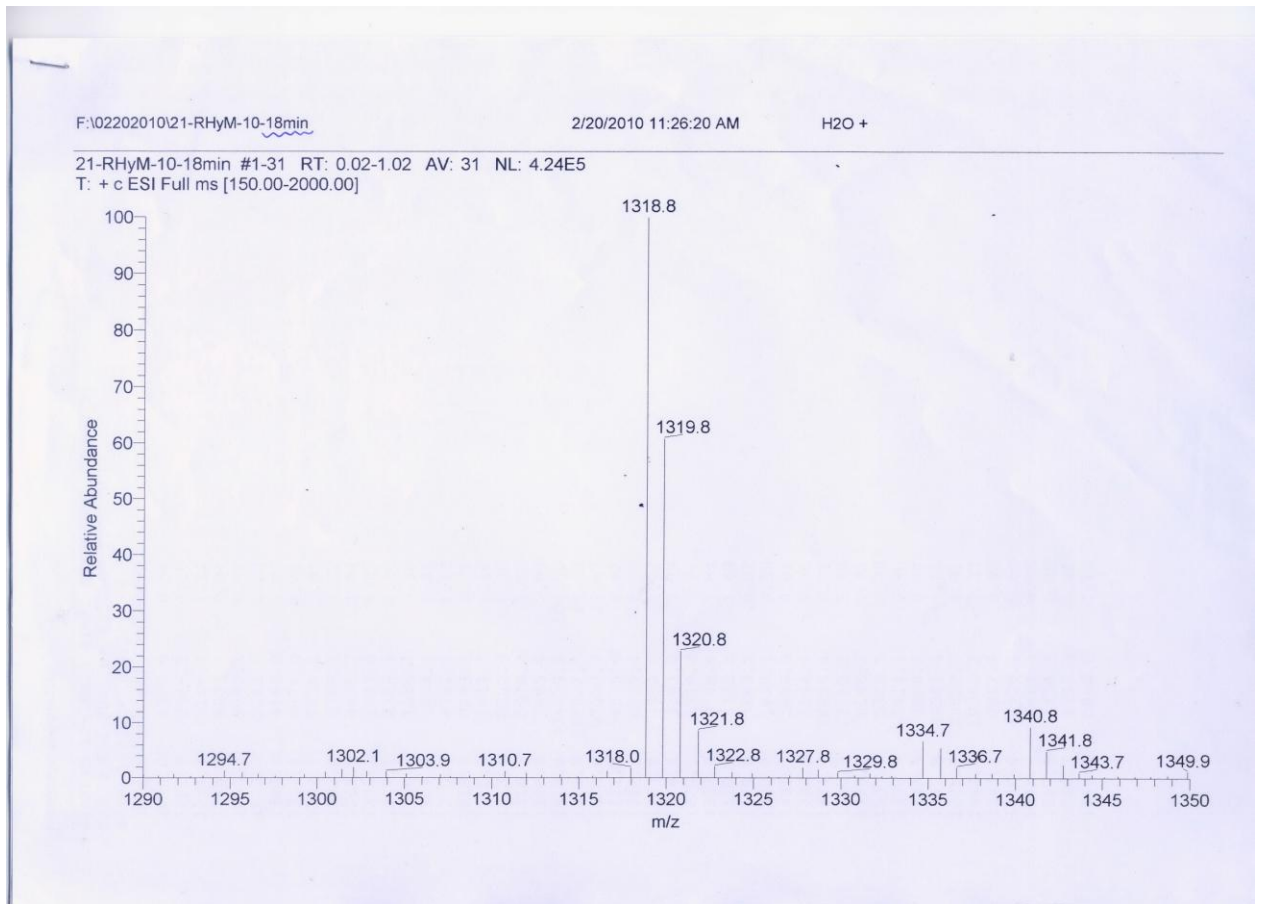


圖 3- 36 RHyM-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

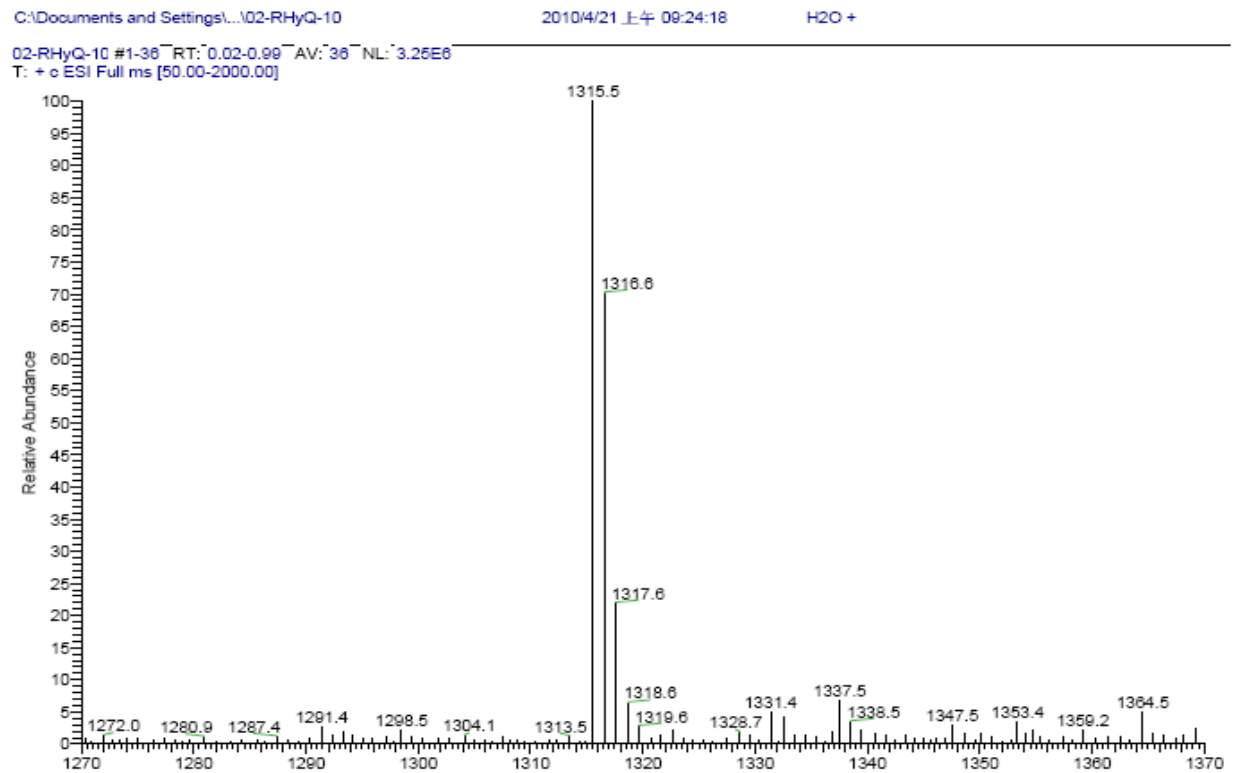


圖 3- 37 RHyQ-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

04-RHyH-10 #1-36 RT: 0.02-1.00 AV: 36 NL: 1.28E6
T: + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

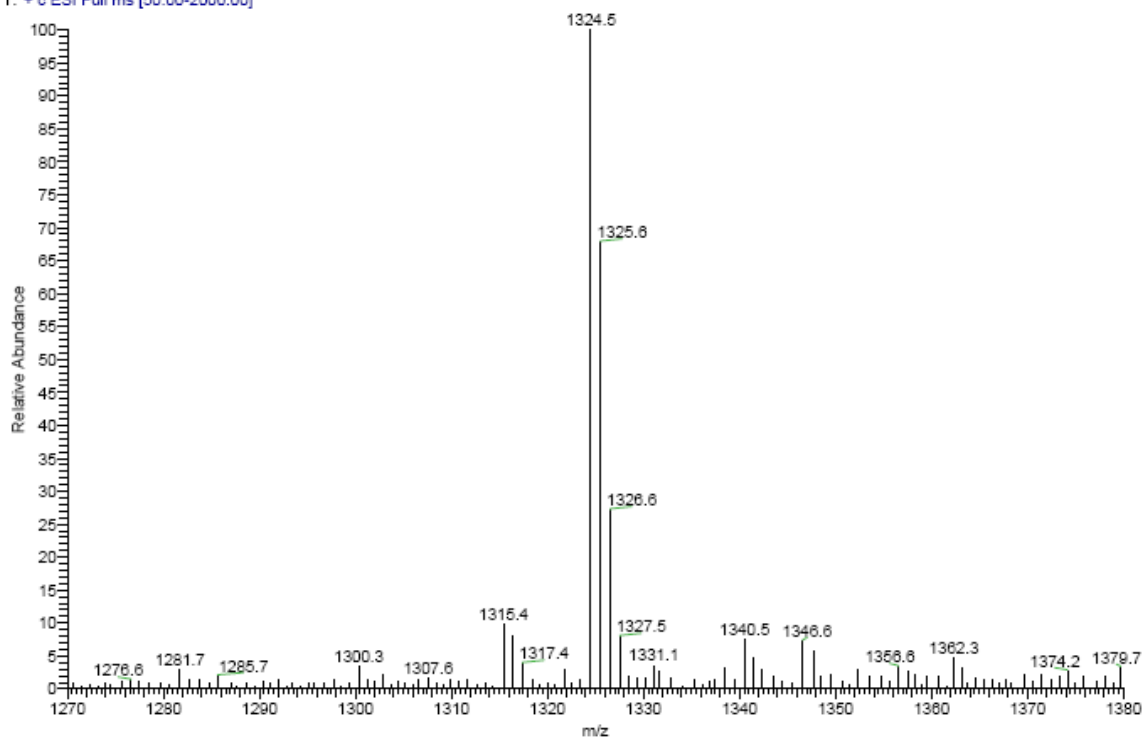


圖 3- 38 RHyH-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

03-QPQ-9 19min-990513 #1-30 RT: 0.01-0.82 AV: 30 NL: 1.45E7
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

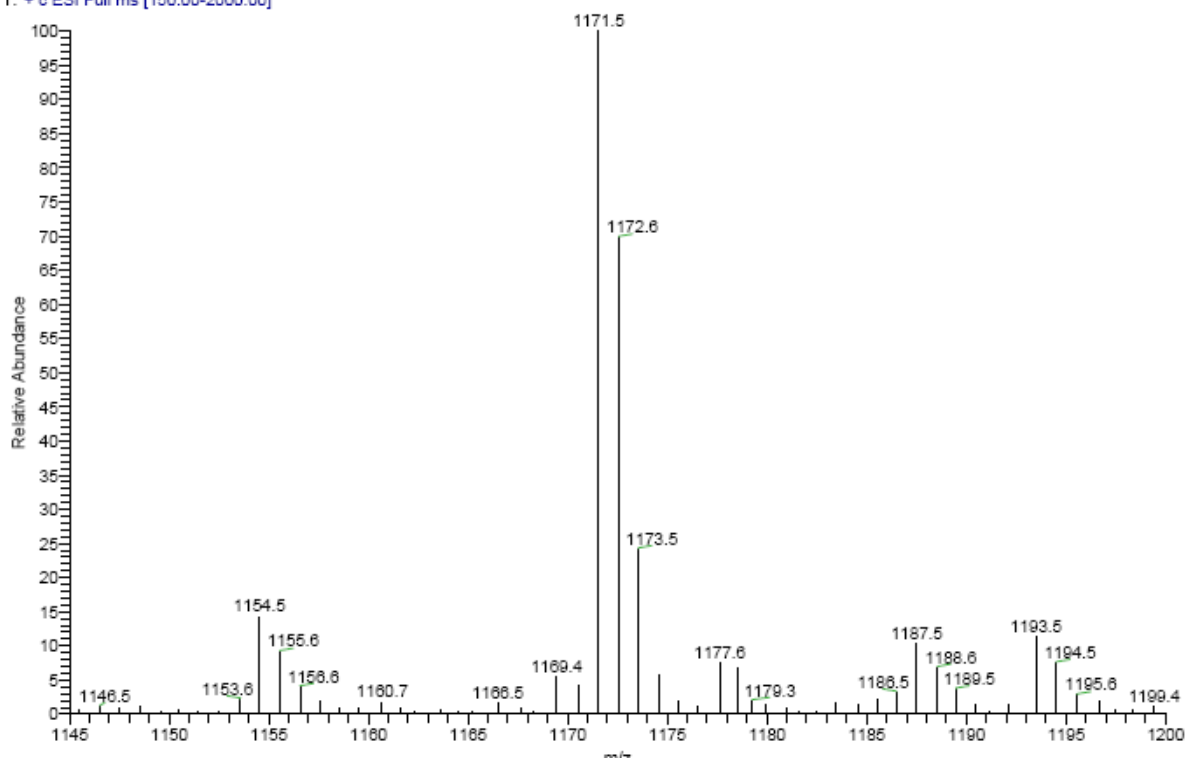


圖 3- 39 QPQ-9 ESI-MS 質譜儀分析圖

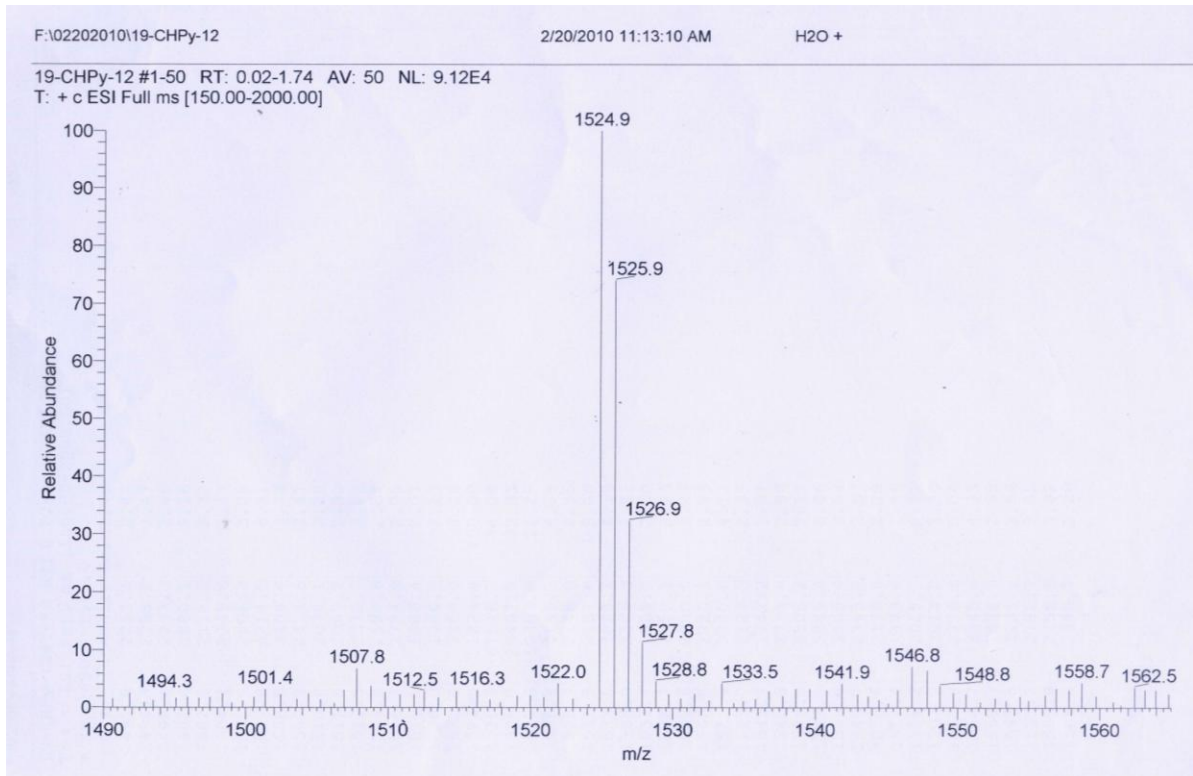


圖 3- 40 CHPy-12 ESI-MS 質譜儀分析圖

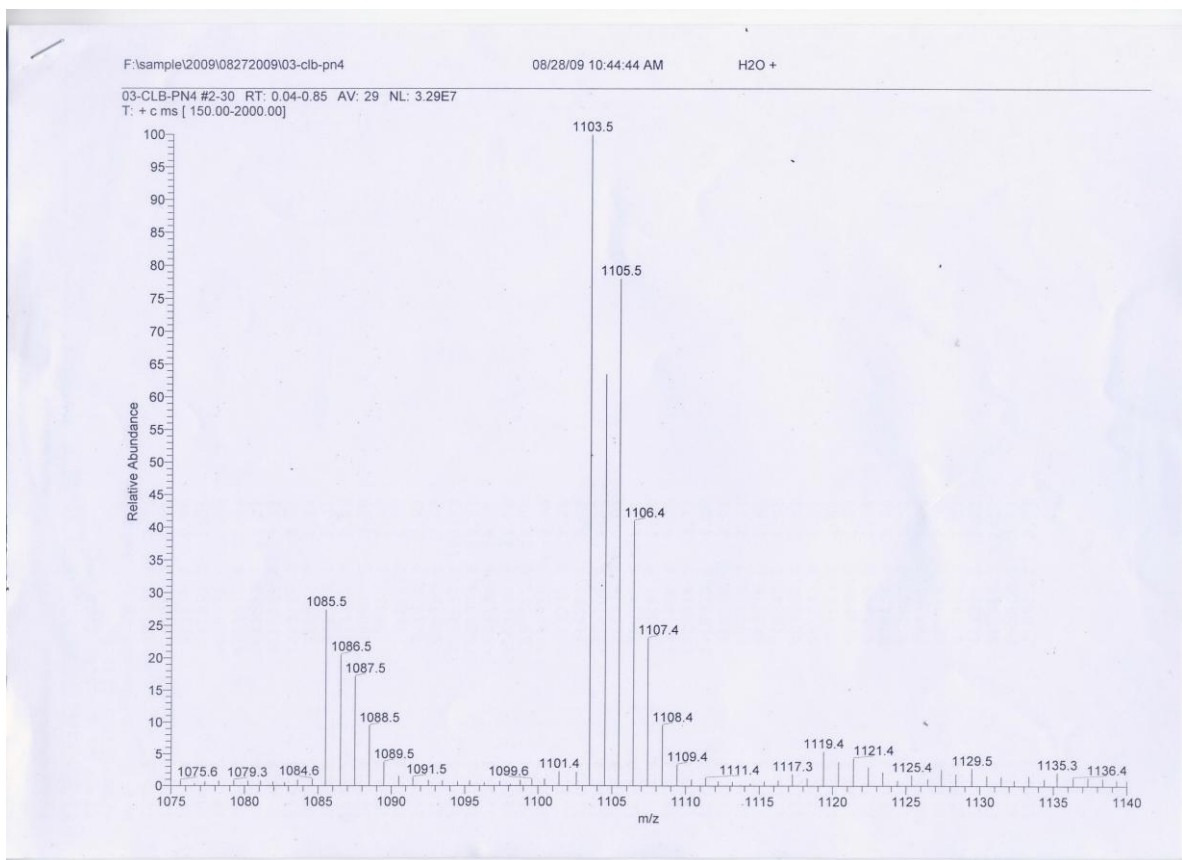


圖 3- 41 CLB-PN4 ESI-MS 質譜儀分析圖

24-CLB-RHyM-10 #1-37 RT: 0.01-0.99 AV: 37 NL: 3.79E6
T: + c ESI Full ms [50.00-2000.00]

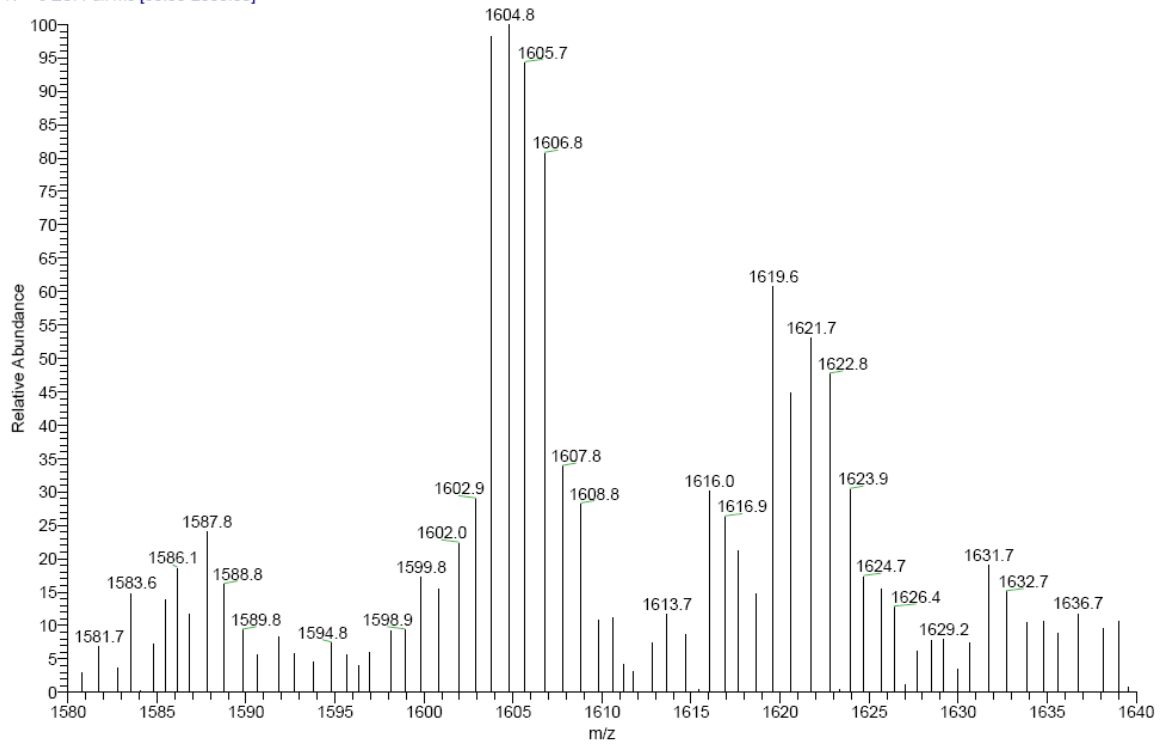


圖 3- 42 CLB-RHyM-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

16-CLB-RHyQ-10 #1-30 RT: 0.00-0.77 AV: 30 NL: 2.64E6
T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

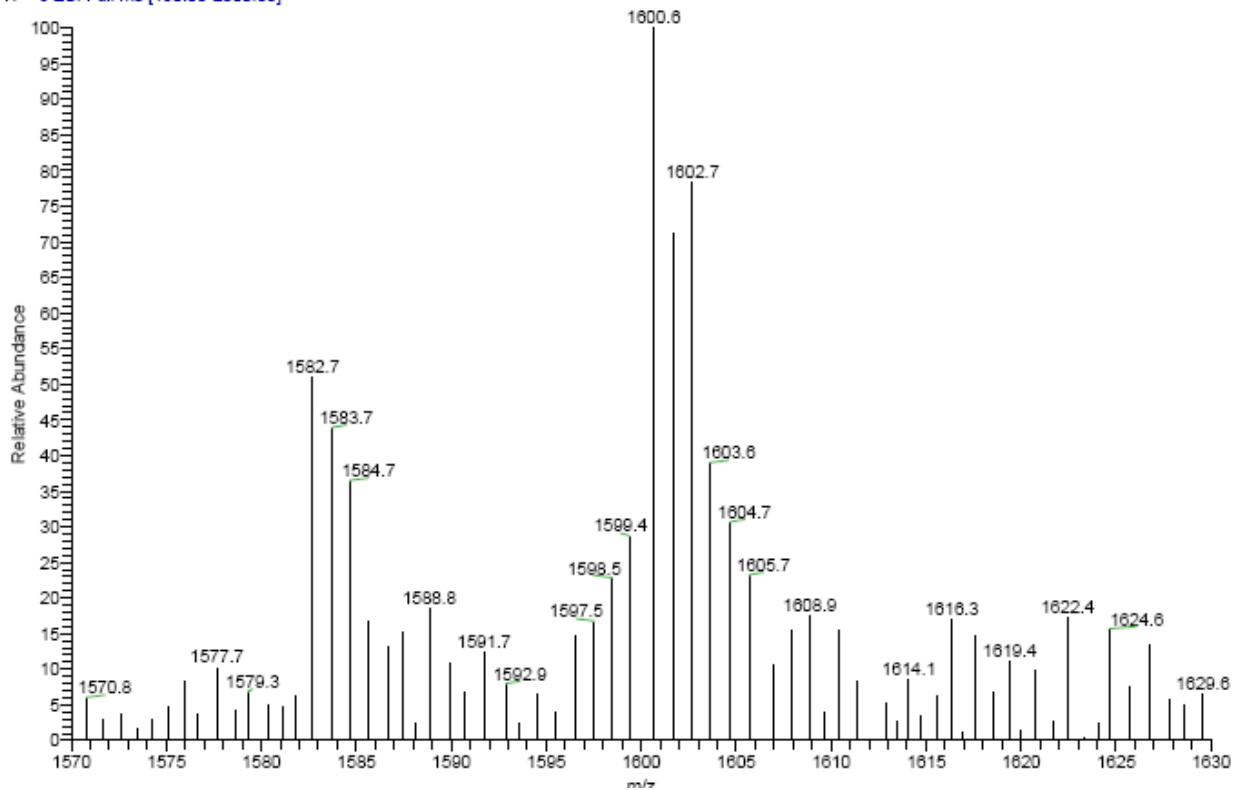


圖 3- 43 CLB-RHyQ-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

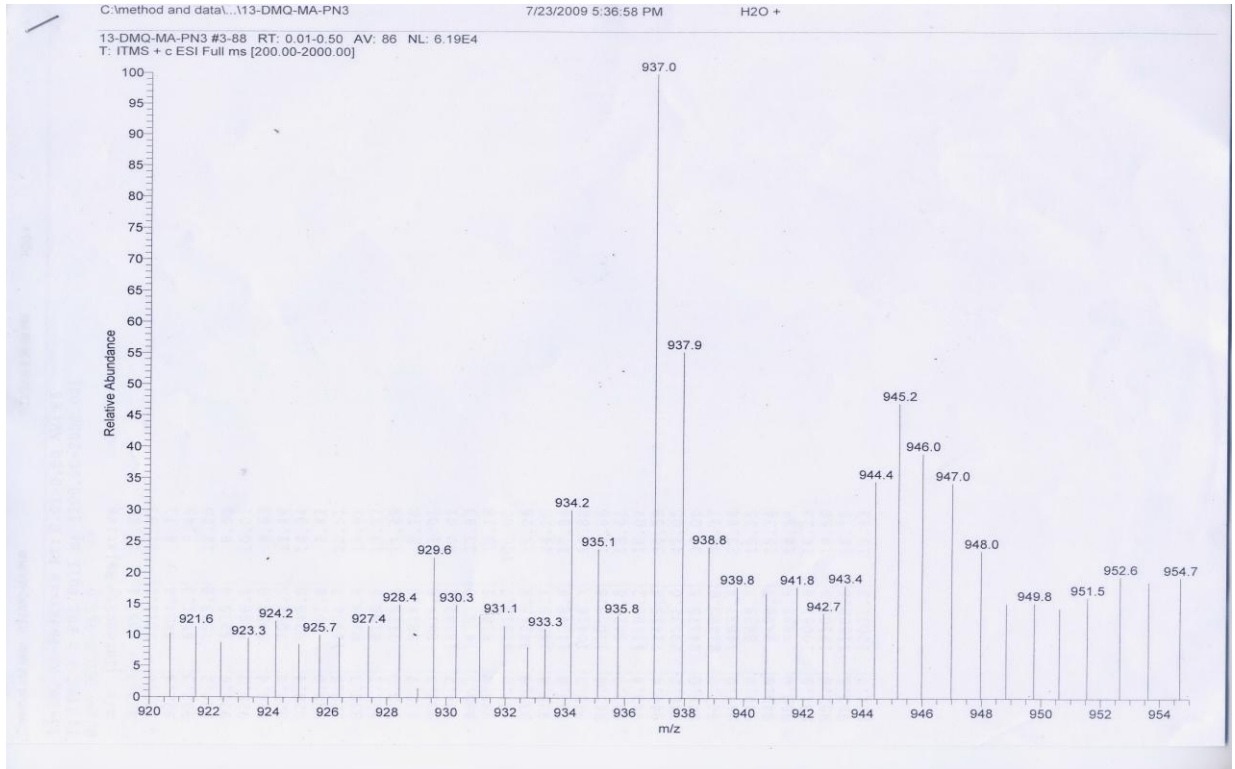


圖 3- 44 DMQ-MA-PN3 ESI-MS 質譜儀分析圖

16-QPQ-DMQ #1-30 RT: 0.03-0.82 AV: 30 NL: 8.21E4
 T: - c ESI Full ms [95.00-2000.00]

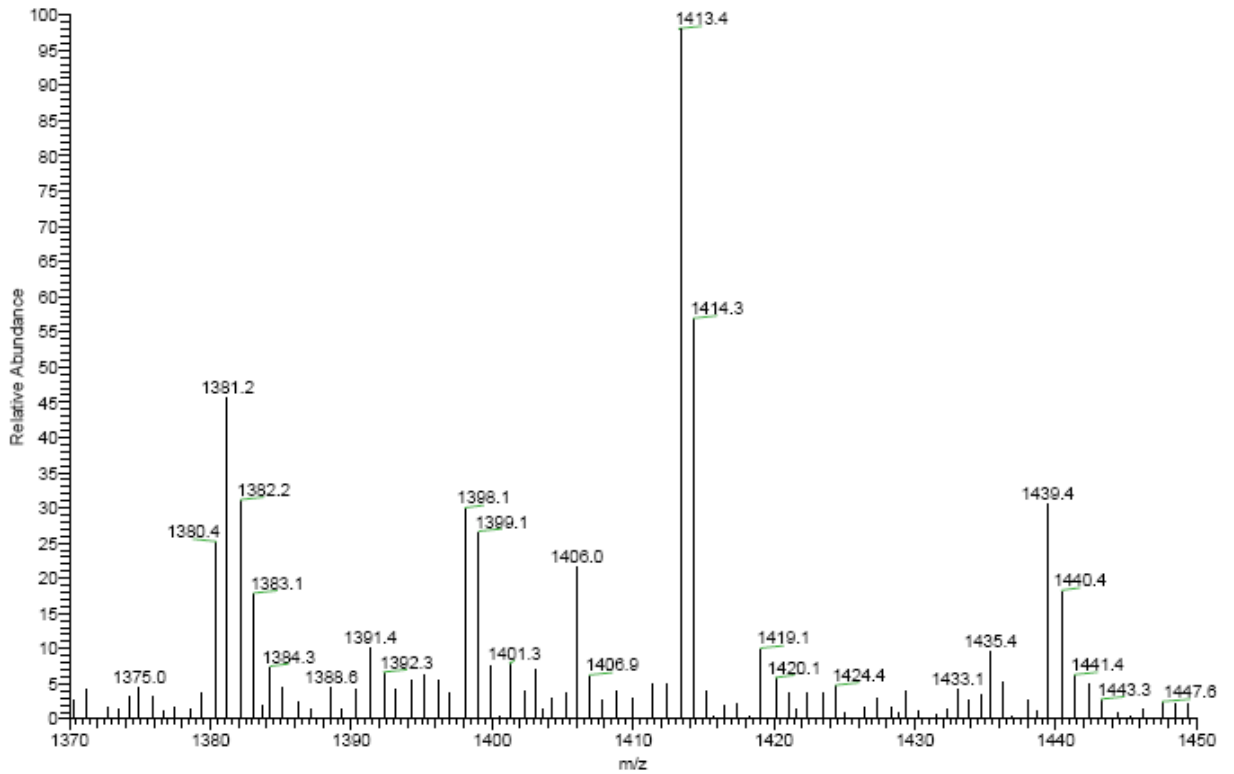


圖 3- 45 DMQ-MA-QPQ-9 ESI-MS 質譜儀分析圖

12-DPYR #1-30 RT: 0.00-0.77 AV: 30 NL: 1.14E5
T: + c ESI Full ms [95.00-2000.00]

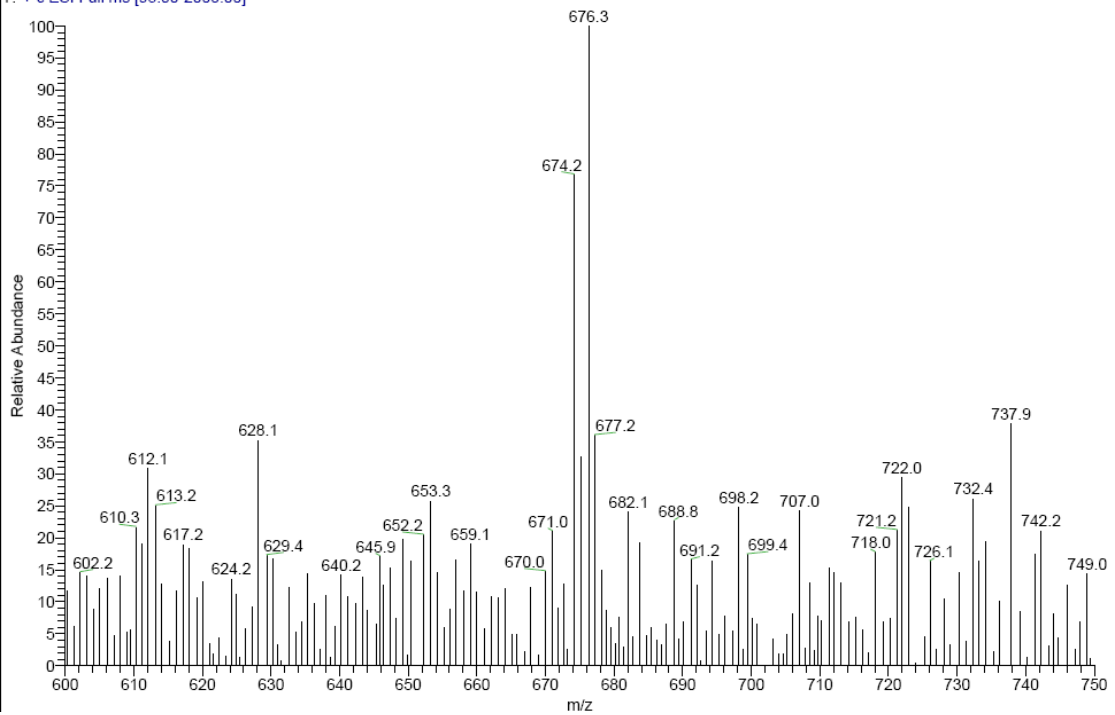


圖 3- 46 DPYR ESI-MS 質譜儀分析圖

11-DPQR #1-30 RT: 0.01-0.89 AV: 30 NL: 7.73E5
T: + c ESI Full ms [95.00-2000.00]

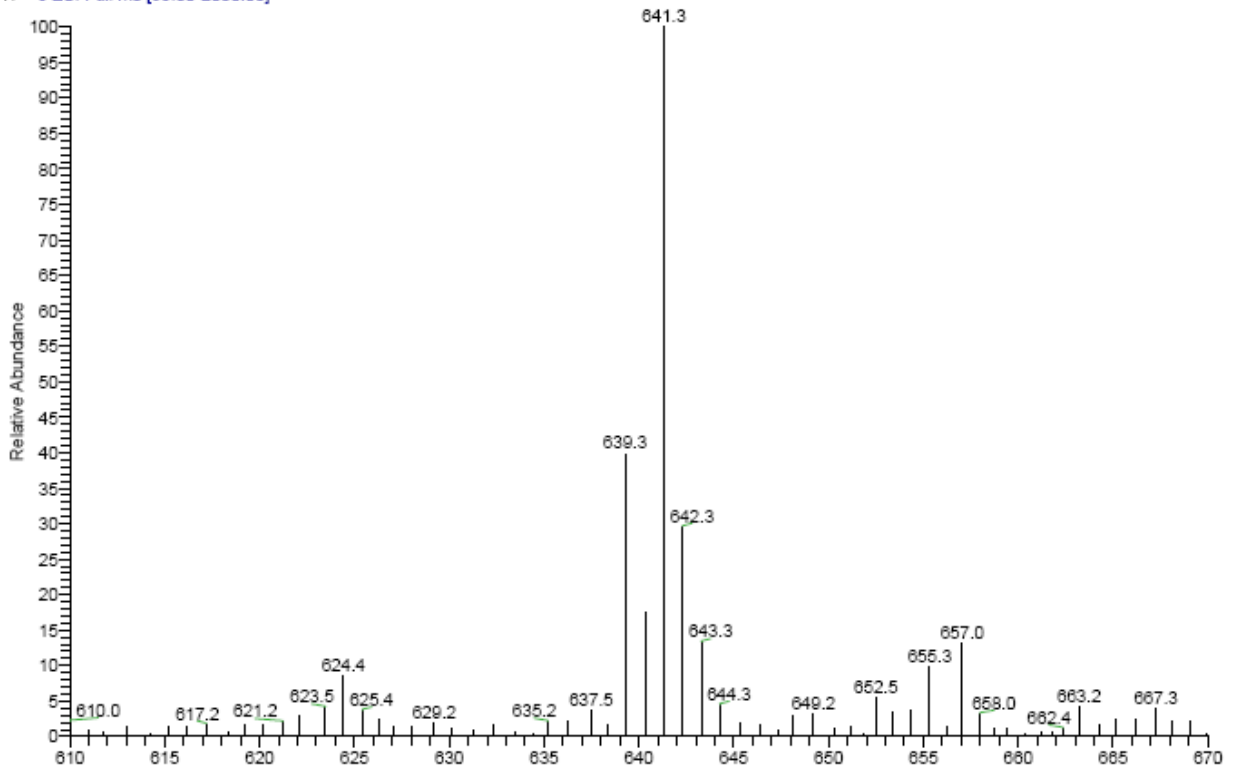


圖 3- 47 DPQR ESI-MS 質譜儀分析圖

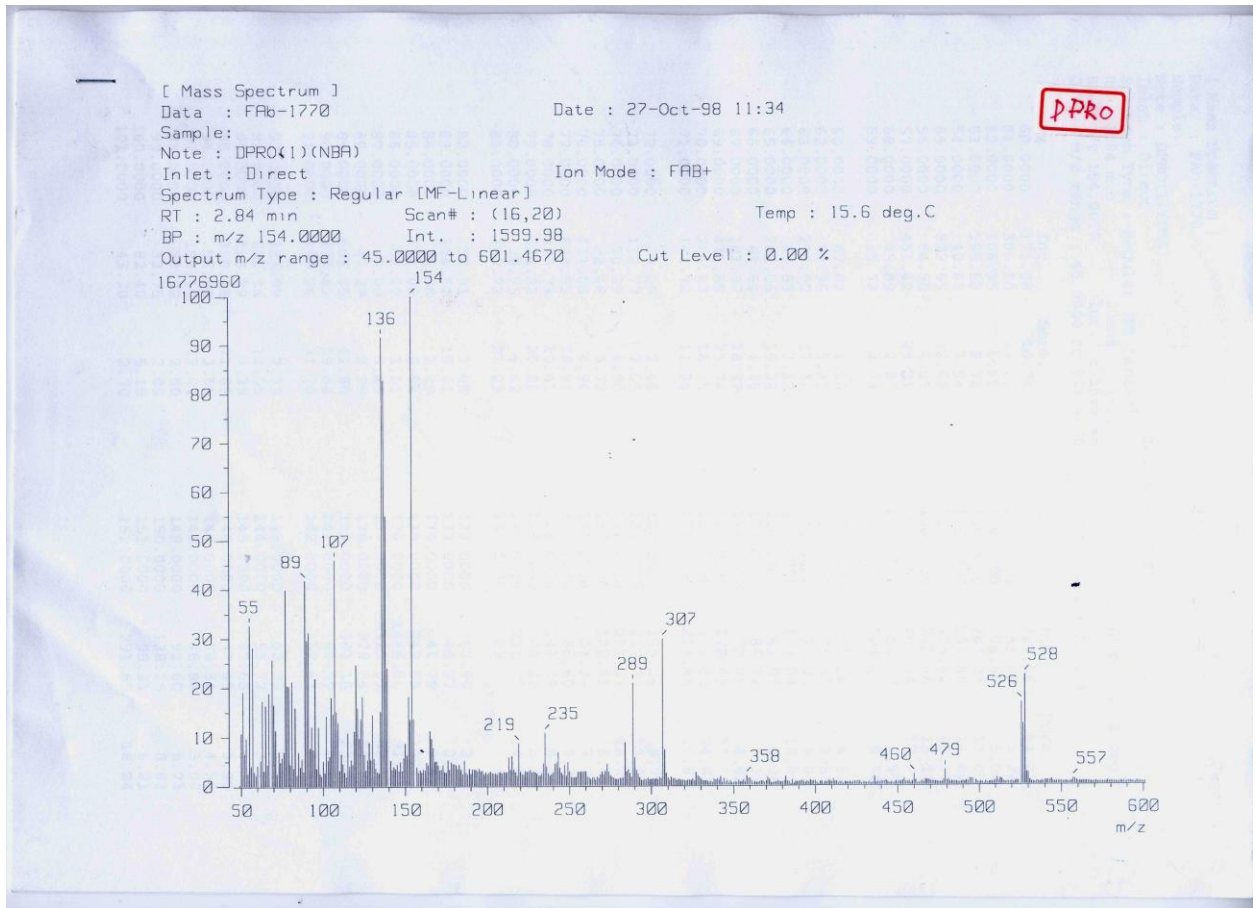


圖 3- 48 DPRO ESI-MS 質譜儀分析圖

C:\Documents and Settings\...21-DQRO

2010/5/14 下午 02:04:15

CHCl3 +

21-DQRO #1-30 RT: 0.00-0.75 AV: 30 NL: 2.56E7
 T: + c ESI Full ms [150.00-2000.00]

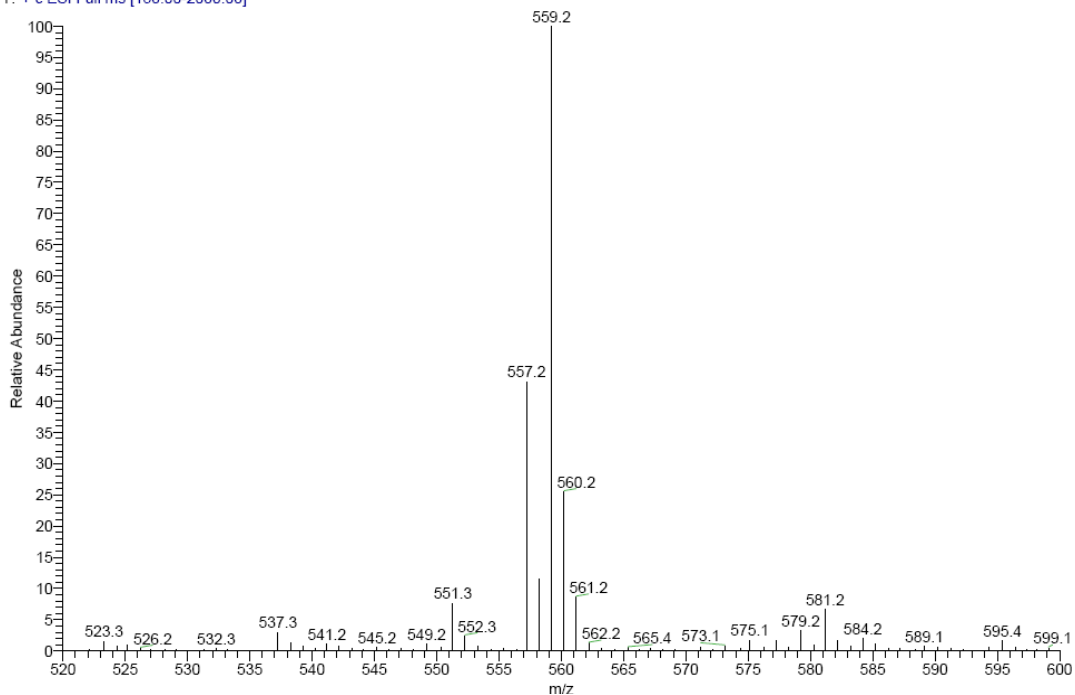


圖 3- 49 DQRO ESI-MS 質譜儀分析圖