

摘要

本文利用固相合成法合成出十九段新的胜肽序列，包含了七段含有 Py(pyrrole) 結構的直鏈胜肽、一段不含有 Py(pyrrole) 結構的直鏈胜肽、兩段含有 Py(pyrrole) 結構的環狀胜肽、九段含有 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 DWRO(DMQ-MA-Trp-Arg-Ome)，經由平板凝膠電泳實驗測試這些胜肽對 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；含有 CLB 結構的胜肽不但對 DNA 有結合的能力也同時具有切割的作用；而含有 DMQ-MA 結構的胜肽 DWRO 對 DNA 有切割的作用。

因平板凝膠電泳結果顯示，DWRO 對 DNA 具有切割作用，所以再利用電子順磁共振光譜對 DWRO 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，沒有亞鐵離子存在時，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。

未來期望針對 XPRK 模組進一步深入研究，篩選出對 DNA 具有專一性結合的胜肽，可利用足跡實驗、圓二色光譜和研究 DNA 與胜肽間的作用，發展成新的基因調控試劑。

關鍵字：DNA、Peptide、固相胜肽合成

Abstract

This thesis reports the solid-phase synthesis of seven peptides containing 4-amino-1-pyrrole-2-carboxylic acid residues (Py), two novel cyclic peptides, and nine chlorambucil-peptide conjugates. A new 2,6-dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid-dipeptide conjugate was also synthesized. Agarose gel electrophoresis was used to determine the gel retardation and DNA cleavage abilities of these compounds, revealing that a number of these new synthetic peptides and conjugates display good DNA binding and DNA cleavage activities. Electron paramagnetic resonance (EPR) showed that the new quinone conjugate DWRO readily produces strong semiquinone radicals that are ultra-stable and has DNA cleavage activity.

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	V
表目錄.....	VIII
縮寫目.....	X
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.....	15
1-5 環狀胜肽.....	18
第二章 實驗.....	20
2-1 實驗原理.....	20
2-1-2 平板凝膠電泳.....	22
2-1-3 電子順磁共振.....	25
2-2 藥品.....	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 實驗步驟及儀器操作設定.....	33
2-4-1 固相胜肽合成流程.....	33
2-4-2 固相胜肽合成儀(PS3, Peptide Synthesizer)儀器操作.....	35
2-4-3 高效能液相層析 (HPLC) 法儀器設定.....	36
2-4-4 液相胜肽合成法.....	36
2-4-5 平版凝膠電泳實驗.....	39
2-4-6 苯醌衍生物合成步驟.....	40
2-4-7 Electron Paramagnetic Resonance (EPR) 實驗步驟.....	41
第三章 結果與討論.....	42
3-1-1 含有 Py (Pyrrole) 之直鏈胜肽.....	43
3-1-2 不含有 Py (Pyrrole) 之直鏈胜肽.....	64
3-1-3 含有 Py (Pyrrole) 之環狀胜肽.....	67
3-1-4 含有 CLB 之直鏈胜肽.....	73
3-1-5 結果與討論.....	100
3-2-1 EPR 實驗結果.....	102
3-2-2 凝膠電泳實驗結果.....	107
3-2-3 結果與討論.....	108
第四章 結論.....	112
第五章 參考文獻.....	113

圖目錄

圖 1-1.海膽組織蛋白 H1 和 H ₂ B.....	3
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. Guanine 鹼基被烷化後，Cross-linking 結構圖.....	14
圖 1-12. 2,6-雙甲基苯醌 (DMQ) 結構圖.....	16
圖 1-13. 2,6-雙甲基氫醌-3-硫酸 (DMQ-MA) 結構圖.....	16
圖 1-14. DMQ-MA-Trp-Arg-Ome 結構圖.....	17
圖 1-15. Triostin A 嵌入 DNA 鹼基對之結構圖.....	19
圖 2-1.固相胜肽合成法示意圖.....	21
圖 2- 2. Kaiser test 示意圖.....	22
圖 2-3.電泳凝膠說明圖.....	23
圖 2- 4.凝膠電泳位移示意圖.....	24
圖 2-5. Ethidium Bromide 結構圖.....	25
圖 2-6. Zeeman Effect 示意圖.....	26
圖 2-7.環狀胜肽合成法.....	37
圖 2-8. Boc-pyrrole 去除氮端上之 Boc 保護基反應機構示意圖.....	38
圖 2- 9. Fmoc-NMP 合成示意圖.....	39

圖 2-10. DMQ 的合成示意圖.....	40
圖 2-11. DMQ-MA 合成示意圖.....	41
圖 3-1. PN3D 純化之 HPLC 層析圖.....	43
圖 3-2. PN3D ESI-MS 質譜儀分析圖.....	44
圖 3-3. MPN-4 純化之 HPLC 層析圖.....	46
圖 3-4. MPN-4 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	47
圖 3-5. QPQ-8 純化之 HPLC 層析圖.....	49
圖 3-6. QPQ-8 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	50
圖 3-7. KQP-8 純化之 HPLC 層析圖.....	52
圖 3-8. KQP-8 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	53
圖 3-9. PyFR-9 純化之 HPLC 層析圖.....	55
圖 3-10. PyFR-9 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	56
圖 3-11. PyMR-9 純化之 HPLC 層析圖.....	58
圖 3-12. PyMR-9 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	59
圖 3-13. PyHKR-10 純化之 HPLC 層析圖.....	61
圖 3-14. PyHKR-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	62
圖 3-15. RHR-10 純化之 HPLC 層析圖.....	64
圖 3-16. RHR-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	65
圖 3-17. CPy-9 純化之 HPLC 層析圖.....	67
圖 3-18. CPy-9 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	68
圖 3-19. CPy-10 純化之 HPLC 層析圖.....	70
圖 3-20. CPy-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	71
圖 3-21. CLB-PN3D 純化之 HPLC 層析圖.....	73
圖 3-22. CLB-PN3D ESI-MS 質譜儀分析圖.....	74
圖 3-23. CLB-MPN-4 純化之 HPLC 層析圖.....	76
圖 3-24. CLB-MPN-4 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	77

圖 3-25. CLB-PyHR-9 純化之 HPLC 層析圖.....	79
圖 3-26. CLB-PyHR-9 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	80
圖 3-27. CLB-HyE-10 純化之 HPLC 層析圖.....	82
圖 3-28. CLB-HyE-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	83
圖 3-29. CLB-HyS-10 純化之 HPLC 層析圖.....	85
圖 3-30. CLB-HyS-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	86
圖 3-31. CLB-PyMK-10 純化之 HPLC 層析圖.....	88
圖 3-32. CLB-PyMK-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	89
圖 3-33. CLB-PyWK-10 純化之 HPLC 層析圖.....	91
圖 3-34. CLB-PWK-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	92
圖 3-35. CLB-PyWK-10 純化之 HPLC 層析圖.....	94
圖 3-36. CLB-PyQK-10ESI-MS 質譜儀分析圖.....	95
圖 3-37. CLB-PyHK-10 純化之 HPLC 層析圖.....	97
圖 3-38. CLB-PyHK-10 ESI-MS 質譜儀分析圖.....	98
圖 3-39.直鏈胜肽對 DNA 的凝膠滯留係數.....	101
圖 3-40.含 Py 之環狀胜肽對 DNA 的凝膠滯留係數.....	101
圖 3-41.含 CLB 之直鏈胜肽對 DNA 的凝膠滯留係數.....	102
圖 3-42. $\ln[A]_t$ 與時間之對照圖.....	102
圖 3-43. EPR 波峰分裂圖.....	103
圖 3-44. DWRO 之 EPR 圖譜.....	104
圖 3-45. DWRO pH=10.4 EPR 圖譜之 Hyperfine coupling constant 值.....	104
圖 3-46. DWRO pH=7.4 各時間的 EPR 光譜圖.....	105
圖 3-47. DWRO 不同 pH 值之 EPR 訊號變化圖.....	106
圖 3-48. 14.56mM DWRO 各 pH 值的 $\ln[At]_t$ 對時間作圖.....	106
圖 3-49. 14.56mM DWRO 各 pH 值之 k_{obs}	107
圖 3-50. 自由基切割 DNA 之反應機構.....	110

圖 3-51. DMQ-MA 衍生物自由基示意圖.....111

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.....14

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. PN3D 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....45

表七. MPN-4 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....48

表八. QPQ-8 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....51

表九. KQP-8 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....54

表十. PyFR-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....57

表十一. PyMR-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....60

表十二. PyHKR-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....63

表十三. RHR-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....66

表十四. CPy-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....69

表十五. CPy-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....72

表十六. CLB-PN3D 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....75

表十七. CLB-PN3D 之濃度與切割百分比對照表.....75

表十八. CLB-MPN-4 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....78

表十九. CLB-MPN-4 濃度與切割百分比對照表.....78

表二十. CLB-PyHR-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....81

表二十一. CLB-PyHR-9 之濃度與切割百分比對照表.....81

表二十二. CLB-HyE-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....84

表二十三. CLB-HyE-10 之濃度與切割百分比對照表.....	84
表二十四. CLB-HyS-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....	87
表二十五. CLB-HyS-10 之濃度與切割百分比對照表.....	87
表二十六. CLB-PyMK-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....	90
表二十七. CLB-PyMK-10 之濃度與切割百分比對照表.....	90
表二十八. CLB-PyWK-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....	93
表二十九. CLB-PyWK-10 之濃度與切割百分比對照表.....	93
表三十. CLB-PyQK-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....	96
表三十一. CLB-PyQK-10 之濃度與切割百分比對照表.....	96
表三十二. CLB-PyHK-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表.....	99
表三十三. CLB-PyHK-10 之濃度與切割百分比對照表.....	99
表三十四. EPR 相關數據列表.....	103
表三十五. DWRO 之濃度與切割百分比對照表.....	108

縮寫目

英文縮寫	英文全名
A	Adenine
A.A.	Amino Acid
ACN	Acetonitrile
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	Eletrospray 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 Chromatogrphy
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
