

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，源自於基因的改變。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，合出新的具有 XPRK 胜肽序列，利用平板凝膠電泳做測試對 DNA 專一性結合及具切割效果。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。

1-1 序列設計來源之 XPRK 模組

1988 年，Suzuki 教授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 教授使用圓二色光譜（ Circular Dichroism Spectrum ）發現 Ser-Pro-Arg-Lys（ SPRK ） 所呈現之 DNA 結合結構是 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 ）。其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 *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。同時，Churchill 和 Suzuki 也進一步證實 SPKK 單元對 DNA 小凹槽（ minor groove ）中富含 A/T（ Adenine / Thymine ）序列有好的結合現象⁶。

近年來本實驗小組針對類 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 ）

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

因此，依據此構思本實驗小組近年來，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 QPQ-8、KQP-8、PyFR-9、PyMR-9、PyHKR-10 以及 RHR-10。環狀胜肽含 XPRK 模組為 CPy-9 和

CPy-10。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。

| H1 (N-terminal part) | |
|-----------------------|--|
| 1 | S. nuds NH - PA SPQK RAA SPRR SPKK SPRR SPKK KSS SPRR KAKRARASTHPPVAQH |
| 2 | P. angulosus PGSPQKRAASPRK SPRK SPKK SPRK ASA SPRR KAKRARASTHPPVLEM |
| 3 | S. granulosis PGSPQKRAASPRK SPRPG SPKK SP - - - |
| 4 | E. crassa AA SPQK RAA SPRK SPKK SPRK SPKK K SPRK K ARSAAHPPVIDM |
| H2B (N-terminal part) | |
| 5 | L. pictus NH - PR SPSK S SPRKG SPRKG SPRKG SPKR |
| 6 | P. angulosus 1 PR SPAKT SPRKG SPRKG SPRKG SPSRKA SPKR |
| 7 | 2 PR SPAKT SPRKG SPRKG SPSRKA SPKR |
| 8 | 3 P S QK SPTKR SPTKR SPTKR SPQK |
| 9 | P. milialis P S QK SPTKR SPTKR SPQK |

圖 1-1. 海膽組織蛋白 H1 和 H2B

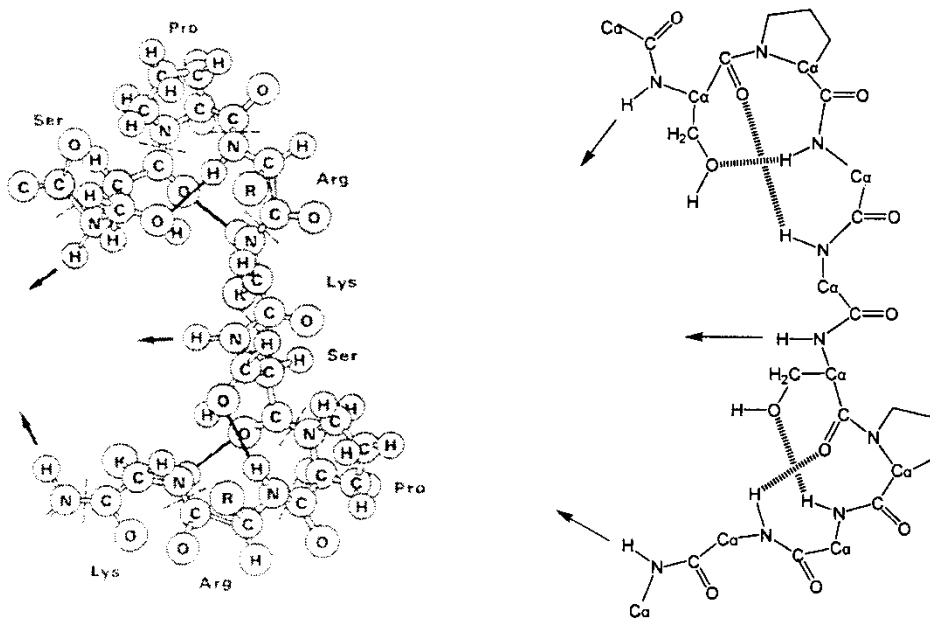


圖 1-2. SPRK 序列 β -turn 結構圖

表 一. 合成之含 XPRK 修飾模組之胜肽序列

| 含 XPRK 修飾模組之胜肽序列 | |
|------------------|---|
| 代號 | 序列 |
| QPQ-8 | Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| KQP-8 | Gln-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| PyFR-9 | Phe-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| PyMR-9 | Met-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| PyHKR-10 | His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |
| RHR-10 | His-Pro-Arg-Lys-His-Pro-Arg-Lys-Pro-His-CONH ₂ |

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

天然抗生素 Netropsin (Net) 和 Distamycin (Dst) 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 (圖 1-3)⁸⁻¹¹。Net 結構中有兩個 pyrrole (py) 結構而 Dst 有三個 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 DNA 小凹槽中 A (adenine) 上的 N (3) 及 T (thymine) 上的 O (2) 形成氫鍵，而 A (adenine) 的 C (2) 會與 Pyrrole ring (py) 上的 C-H 以凡得瓦爾力而增加接合能力 (圖 1-4)¹²⁻¹³。

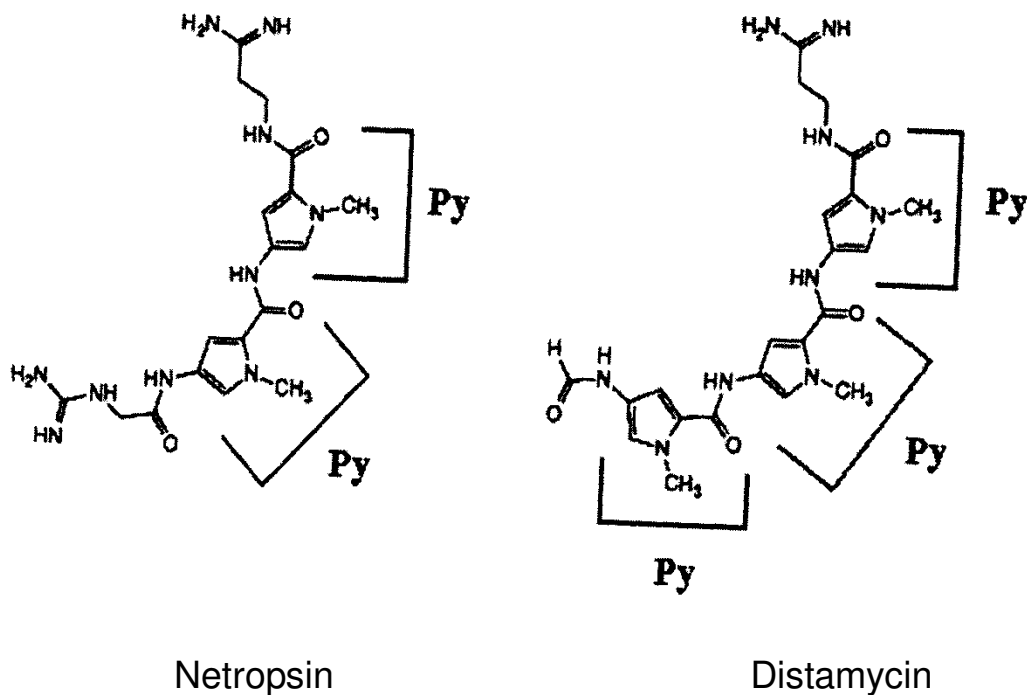


圖 1-3. Netropsin 與 Distamycin 結構圖

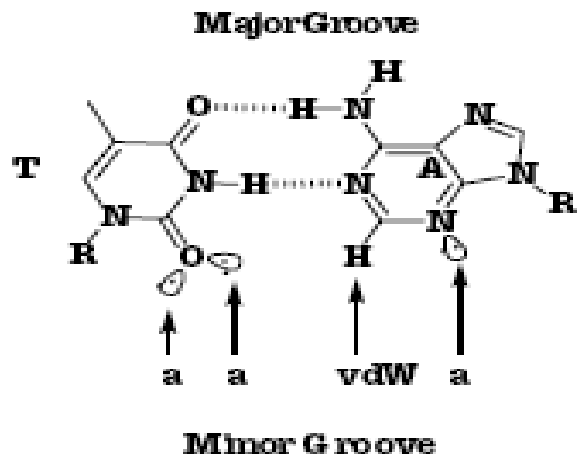
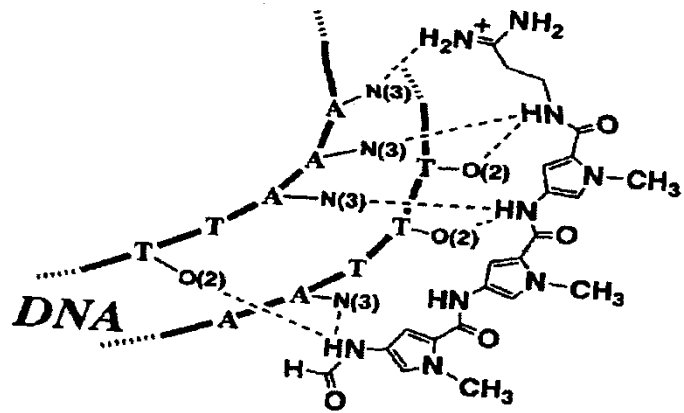
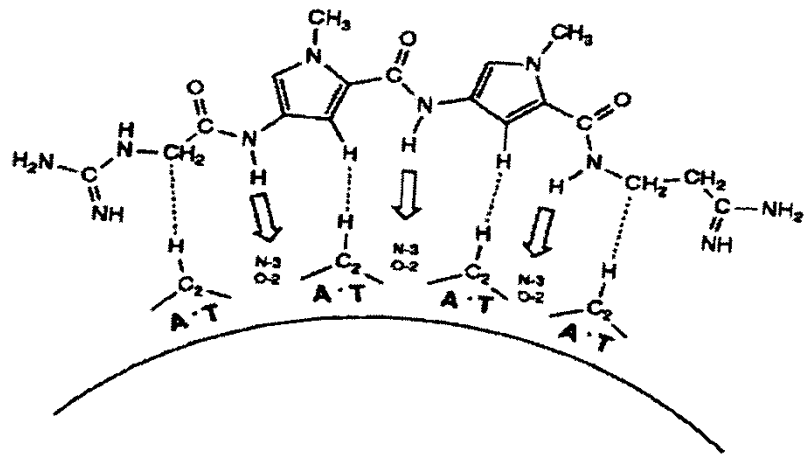


圖 1-4. Netropsin、Distamycin 與 DNA 結合示意圖

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) 能對 GC 序列產生辨識專一性結合 (圖 1-5) ; 另外, Peter Dervan 教授對於 Py 、Im 做了許多相關性的研究, 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 (圖 1-6), 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 G / C 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 (圖 1-7)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 Py 所耦合數目不同會對 DNA 的結合能力也有所影響²¹。依據上述構思, 本實驗小組針對含有 Py 小分子的類似結構之胜肽序列修飾, 提出包括環肽的九種新的胜肽序列 PN3D 、MPN-4 、QPQ-8 、KQP-8 、PyFR-9 、PyMR-9 、PyHKR-10 、CPy-9 、CPy-10 。期望經由修飾後的胜肽序列, 對 DNA 序列能有更專一性的結合。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。

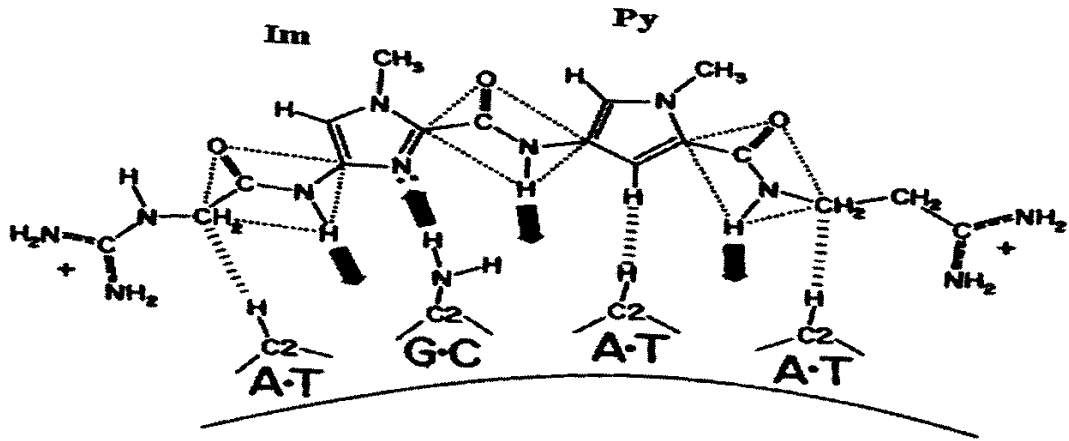


圖 1-5. Py 用 Im 取代之結構圖

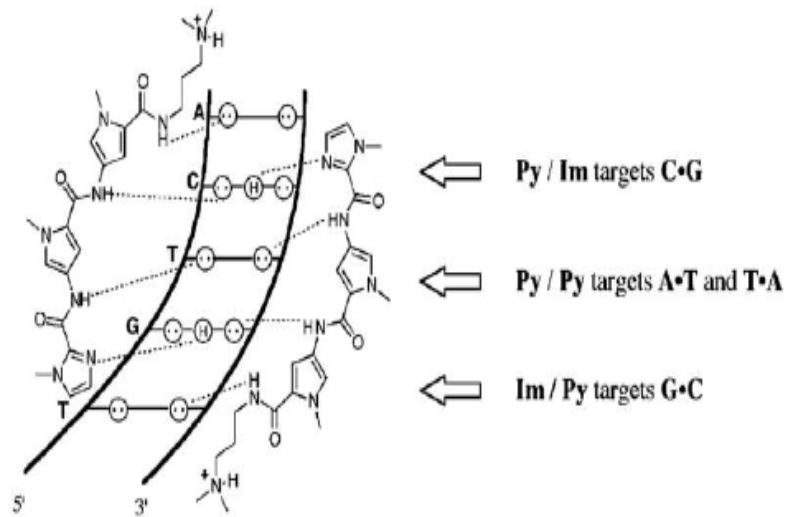


圖 1-6. 2:1 反平行結合模式示意圖

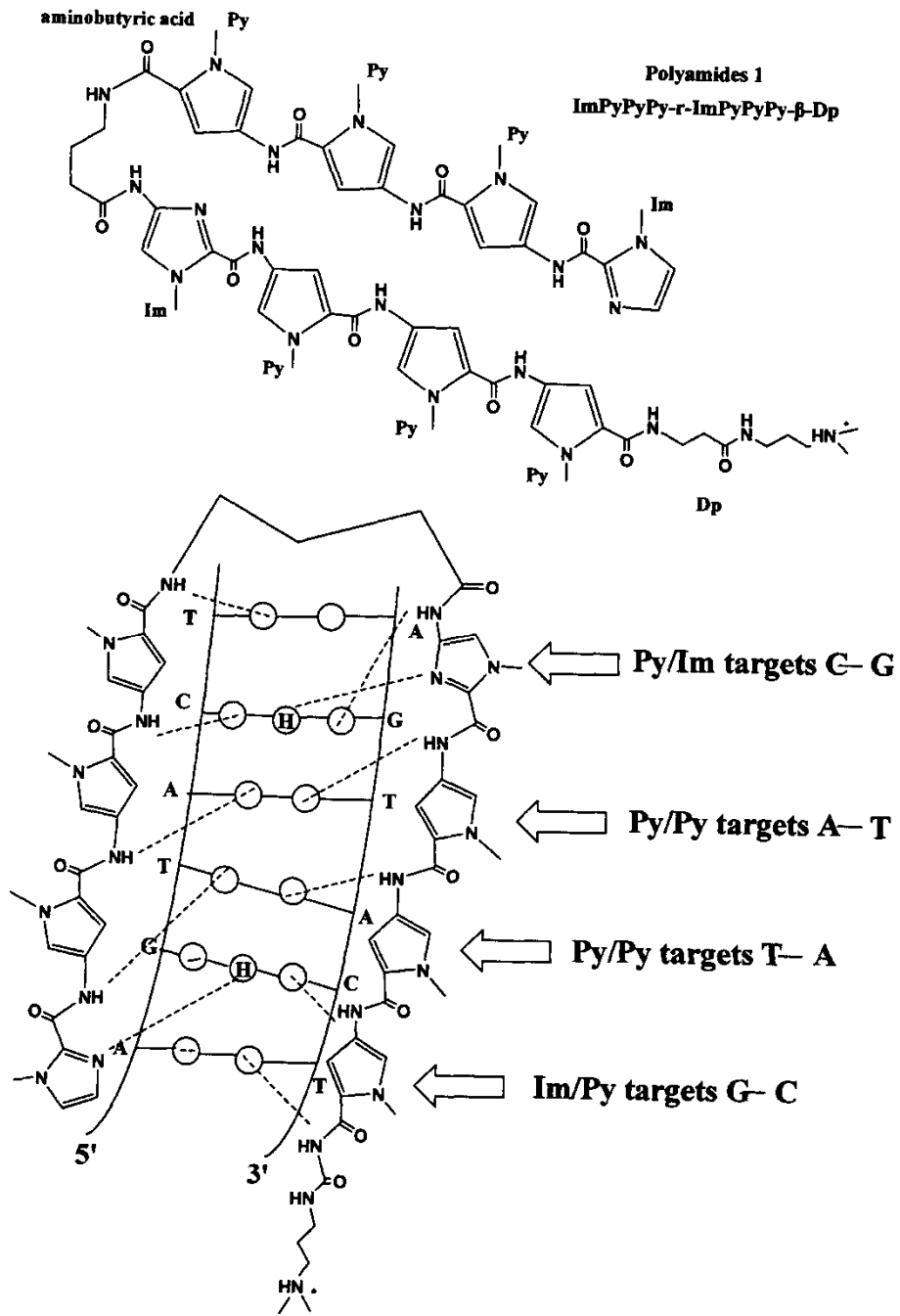


圖 1-7. Py / Im 之專一性結合圖與髮夾型結構示意圖

表 二. 合成之含 Py 結構之胜肽序列

| 含 Py 結構之胜肽 | |
|------------|---|
| 代號 | 序列 |
| PN3D | Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| MPN-4 | Met-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| QPQ-8 | Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| KQP-8 | Gln-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| PyFR-9 | Phe-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| PyMR-9 | Met-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| PyHKR-10 | His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |
| CPy-9 | Cyclo[CH ₂ CO-Gly-Arg-Lys-Py-Py-Py-Lys-Arg-Cys-]CONH ₂ |
| CPy-10 | Cyclo[CH ₂ CO-Gly-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Cys-]CONH ₂ |

1-3 Chlorambucil (CLB) 之胜肽衍生物

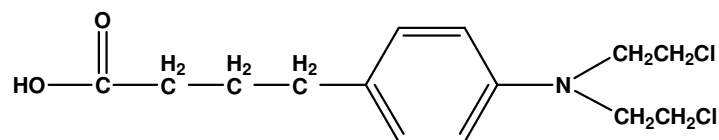
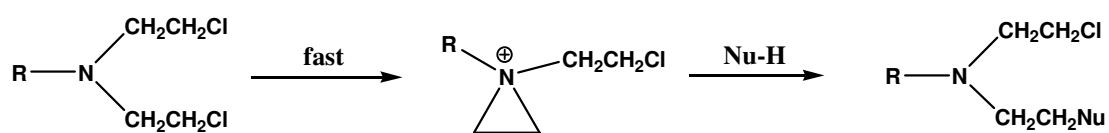
抗腫瘤藥物大致分為烷化劑 (alkylating agent) 、抗代謝物 (antimetabolites) 、抗生素 (antibiotics) 、有絲分裂抑制劑 (mitosis inhibitor) 及激素類 (hormones) 。而抗腫瘤藥物雖然能夠破壞腫瘤細胞並中止細胞的生長、成熟和分裂，但由於這些抗腫瘤藥物並無專一性之辨識能力，所以 Bruce 等人設計出多肽序列，將之做為一種載體成為一分子目標藥物，特別針對病變部位作治療，如此即可使其他正常細胞不受影響，副作用也相對降低²²⁻²⁶。

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 (圖 1-8) 。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-1 位置亦可被烷化 (圖 1-9) 。

烷化劑與 DNA 作用的方式分為三種：

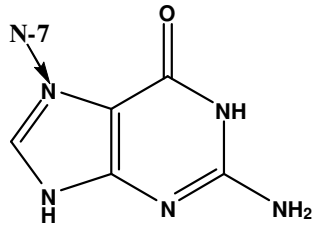
1. 鳥嘌呤與烷化劑結合後，易發生去嘌呤作用 (depurination) ，鳥嘌呤部分由核酸鍵中離去，留下非嘌呤酸 (apurinic acid) ，同時咪唑環 (imidazol) 也很容易由位置 8、9 斷裂 (圖 1-10) 。
2. 若烷化劑帶兩個官能基，則可能在兩個鳥嘌呤之間發生交叉連結 (Cross-linkage) ，如此則在 DNA 之雙股螺旋間發生交叉連結，使雙股螺旋 (Double strand) 距離拉長，構型 (conformation) 改變，而無法成為 RNA 之引子 (primer) (圖 1-11) 。
3. DNA 在鳥嘌呤 N-7 位置烷化後，則不再與胞嘧啶成對，而與胸腺嘧啶 (Thymine) 成對²⁸。

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²⁹，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³⁰。所以我們將具有 XPRK 模組或是已接合 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。表三為本文中合成含有 CLB 結構之胜肽。

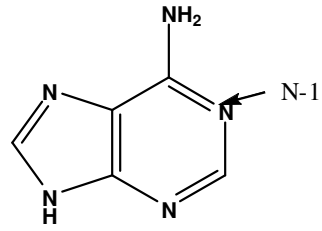


(Chlorambucil, CLB)

圖 1-8. 陽離子形成圖，烷化劑之結構



Guanine



Adenine

圖 1-9. DNA 鹼基被烷化的位置圖

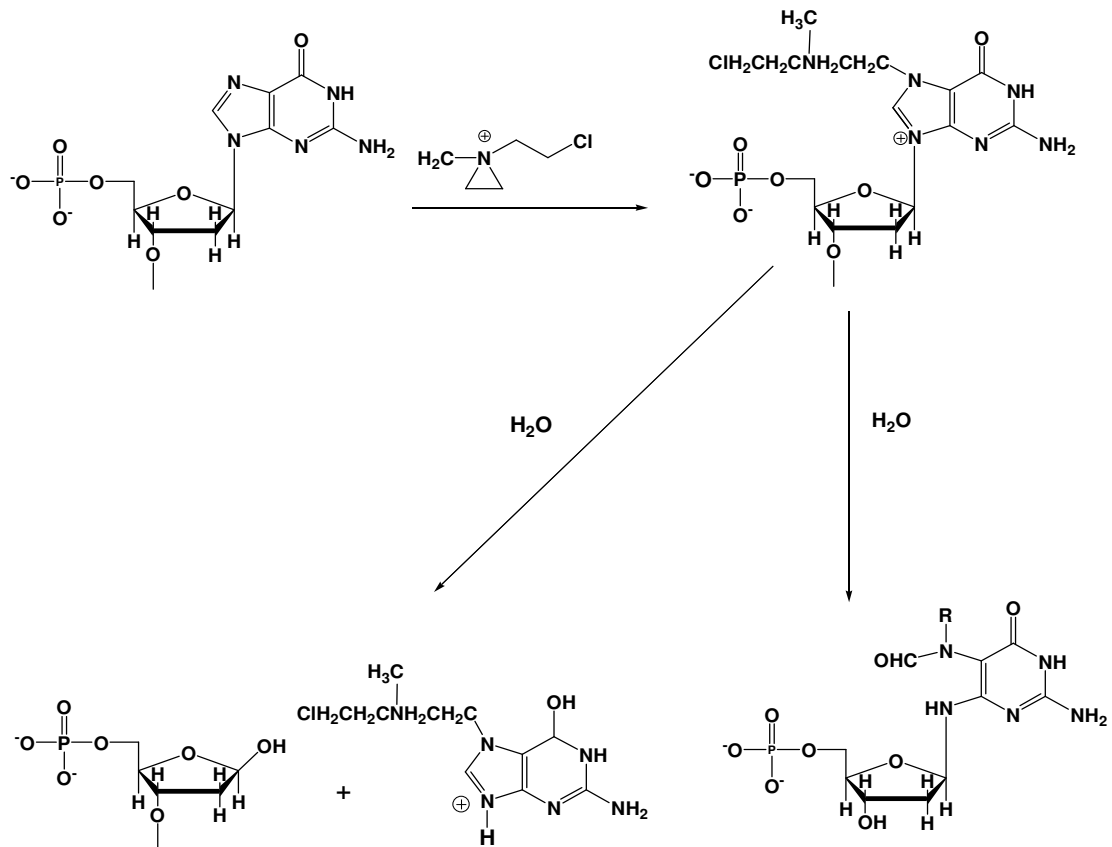


圖 1-10. Guanine 鹼基被烷化後，水解之產物結構圖

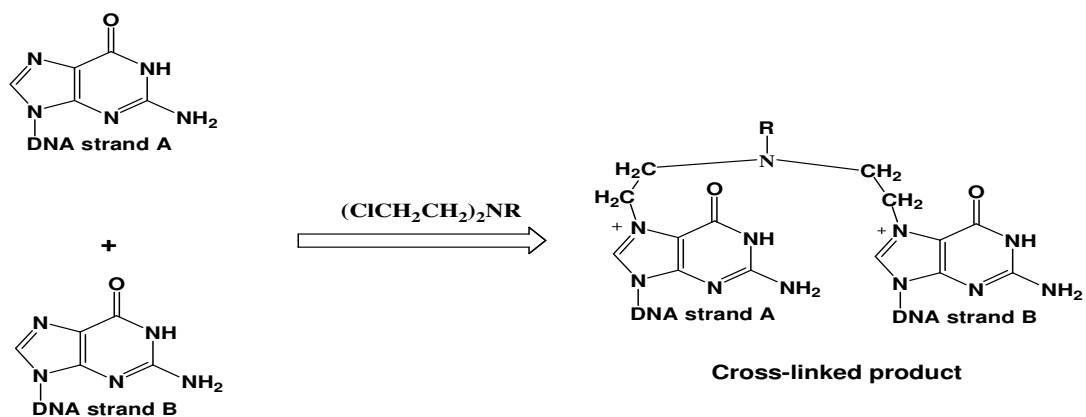


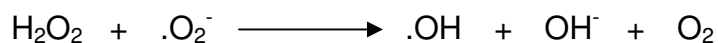
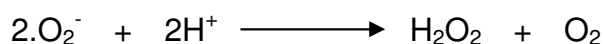
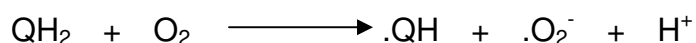
圖 1-11. Guanine 鹼基被烷化後，Cross-linking 結構圖

表三. 含有 CLB 結構之胜肽序列

| 含 CLB 結構之胜肽 | |
|-------------|---|
| 代號 | 序列 |
| CLB-PN3D | CLB-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| CLB-MPN-4 | CLB-Met-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| CLB-PyHR-9 | CLB-His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH ₂ |
| CLB-HyE-10 | CLB-Glu-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |
| CLB-HyS-10 | CLB-Ser-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |
| CLB-PyMK-10 | CLB-Lys-Pro-Met-Arg-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |
| CLB-PyWK-10 | CLB-Lys-Pro-Trp-Arg-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |
| CLB-PyQK-10 | CLB-Lys-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |
| CLB-PyHK-10 | CLB-His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH ₂ |

1-4 苯醌衍生物 2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid (DMQ-MA) 之胜肽衍生物

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) (圖 1-12)³¹ ; 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³²⁻³³。也有其他報告顯示苯醌極易接受電子³⁴⁻³⁷, 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 (Fe²⁺) 在的情況下, 易催化過氧化氫而產生氫氧自由基 (hydroxyl radical)



QH₂ : Hydroquinone

·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³⁸⁻⁴¹。

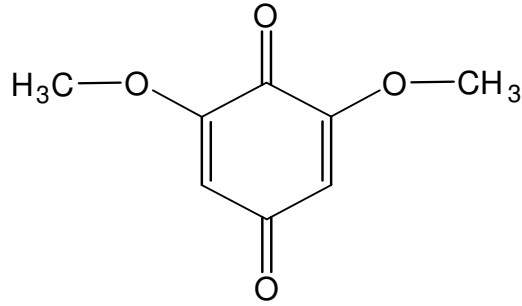


圖 1-12. 2,6-雙甲基苯醌 (DMQ) 結構圖

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⁴²，2,6-雙甲基氫醌-3-硫錯酸 (2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptopoacetic acid, DMQ-MA) (圖 1-13)，增進 DMQ 的水溶性，且 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⁴³⁻⁴⁶。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⁴⁷。

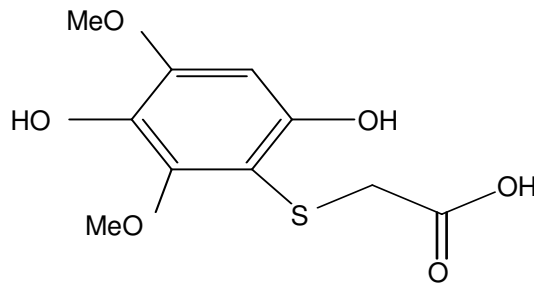


圖 1-13. 2,6-雙甲基氫醌-3-硫錯酸 (DMQ-MA) 結構圖

利用胜肽或放射標識單株抗體 (monoclonal antibody)⁴⁸⁻⁵⁰ 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⁵³。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⁵¹。

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。

DMQ-MA 引入胜肽序列為苯醌衍生物 DMQ-MA-Trp-Arg-OMe (圖 1-14)

進行 EPR 實驗，探討其自由基的訊號。(表四)

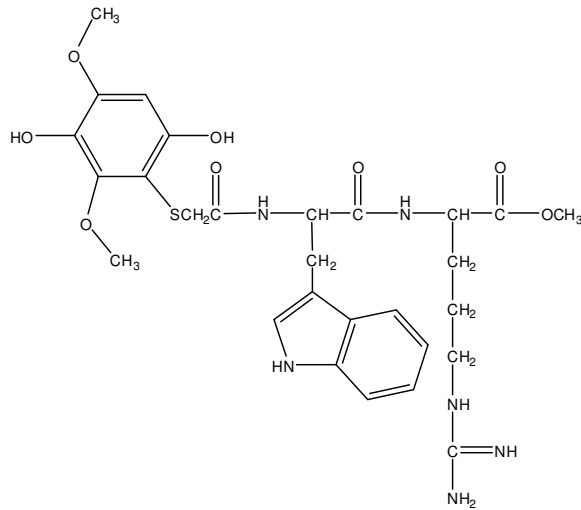


圖 1-14. DMQ-MA-Trp-Arg-Ome 結構圖

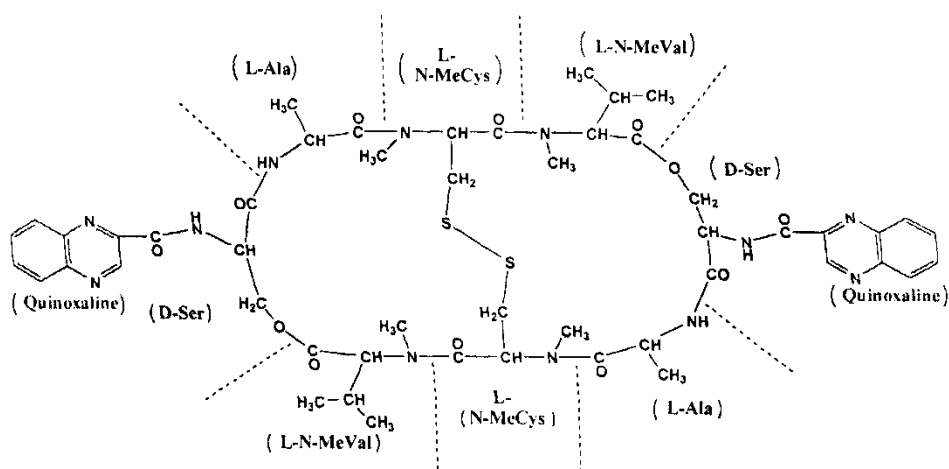
利用電子順磁共振光譜判定當 DMQ-MA 與胜肽衍生物耦合後，以不加入亞鐵離子 (Fe^{2+}) 的狀態進行偵測，觀測化合物是否也會產生自由基，另外以不同 pH 值環境下進行偵測，且觀察其對於時間的衰退，並利用凝膠電泳實驗測試對 DNA 的切割效果進行研究。

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 |
| DWRO | DMQ-MA-Trp-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)⁵²⁻⁵⁷。



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⁵⁸，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，研究環狀胜肽與 DNA 的結合能力(表五)⁵⁹⁻⁶⁴。

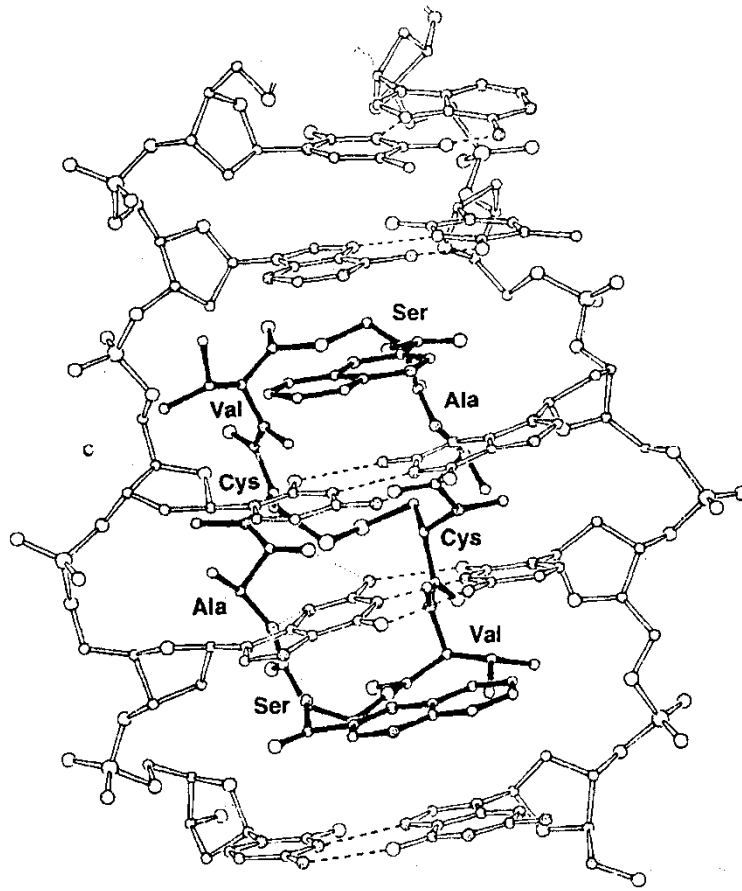


圖 1-15. Triostin A 嵌入 DNA 鹼基對之結構圖

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 |
| CPy-9 | Cyclo[CH ₂ CO-Gly-Arg-Lys-Py-Py-Py-Lys-Arg-Cys-]CONH ₂ |
| CPy-10 | Cyclo[CH ₂ CO-Gly-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Cys-]CONH ₂ |

第二章 實驗

2-1 實驗原理

本文採用固相合成法 (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) 合成胜肽序列, 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, 再利用電灑法游離質譜法 (electrospray ionization mass spectrometry, 簡稱 ESI/MS) 進行分子量鑑定。利用平板凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 測定胜肽與 DNA 間結合及切割作用的初步判斷。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 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⁶⁵, 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。

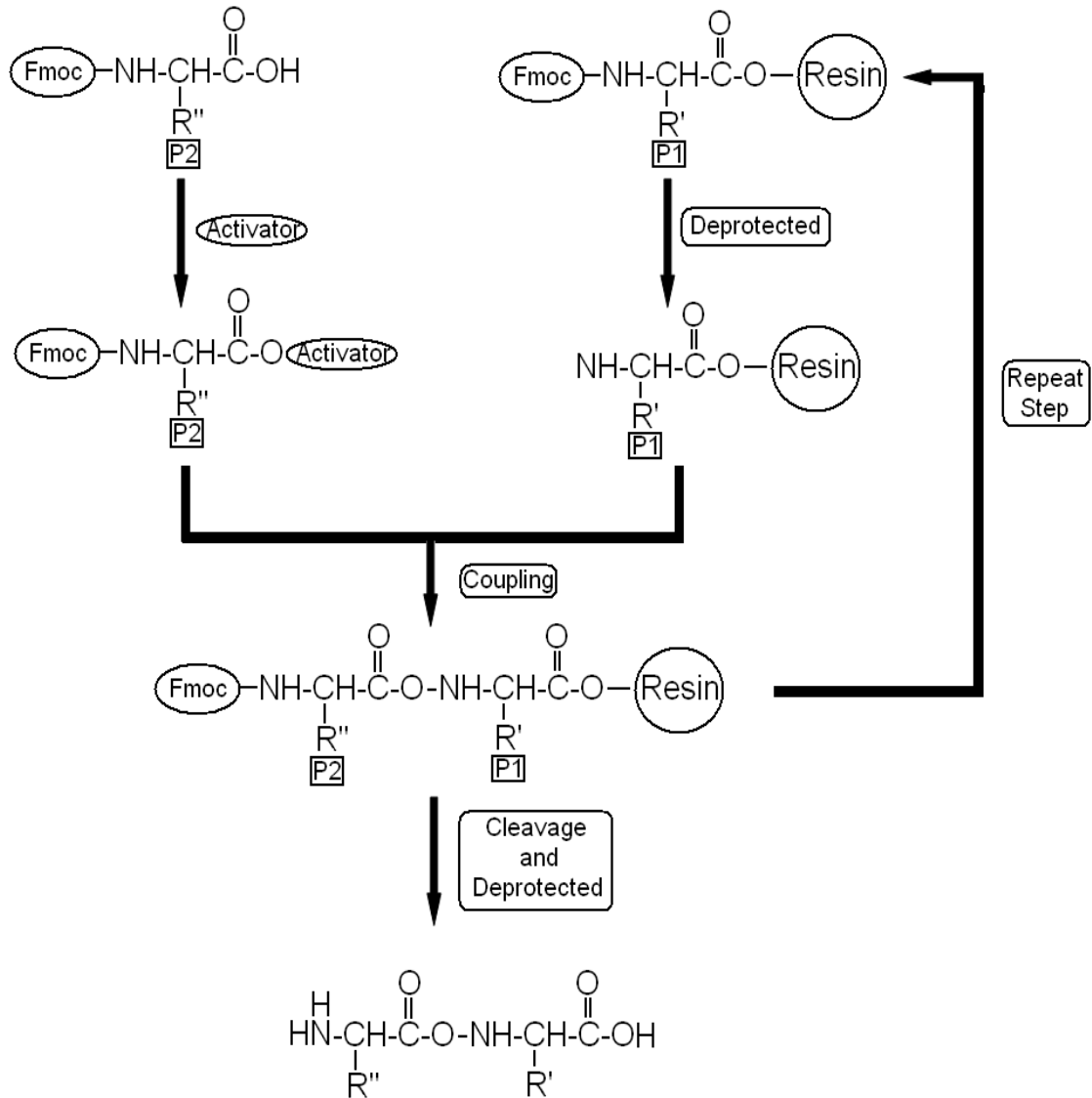
R. B. Merrifield 所提出的想法為利用聚合物構成的固態樹脂連接於第一個胺基酸的羧基端上, 逐步由羧基端往胺基端合成胜肽 (C-terminal 至 N-Terminal), 產物會一直留在樹脂上合成, 直到目標物合成完才由樹脂上切下, 如圖 2-1。固相合成法最大的優點是簡化了中間物的純化工作, 由於固相樹脂不溶於溶劑或水溶液中, 在反應完成後過量的反應試劑或反應副產物都可以被直接洗去, 而胜肽則被留在樹脂上。因此不但節省了操作所需的時間, 也降低了傳統合成法在過濾純化步驟中損耗的產物, 大大提高產率; 且所有反應接在同一反應瓶中進行, 解決液相合成法耗時耗力的缺點⁶⁶。

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⁶⁷⁻⁷⁰。



Fmoc : α -amino acid protecting group

Resin : Solid support

P1、P2 : amino acid side-chain protecting group

圖 2-1. 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 test⁷¹。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（圖 2-2）。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。

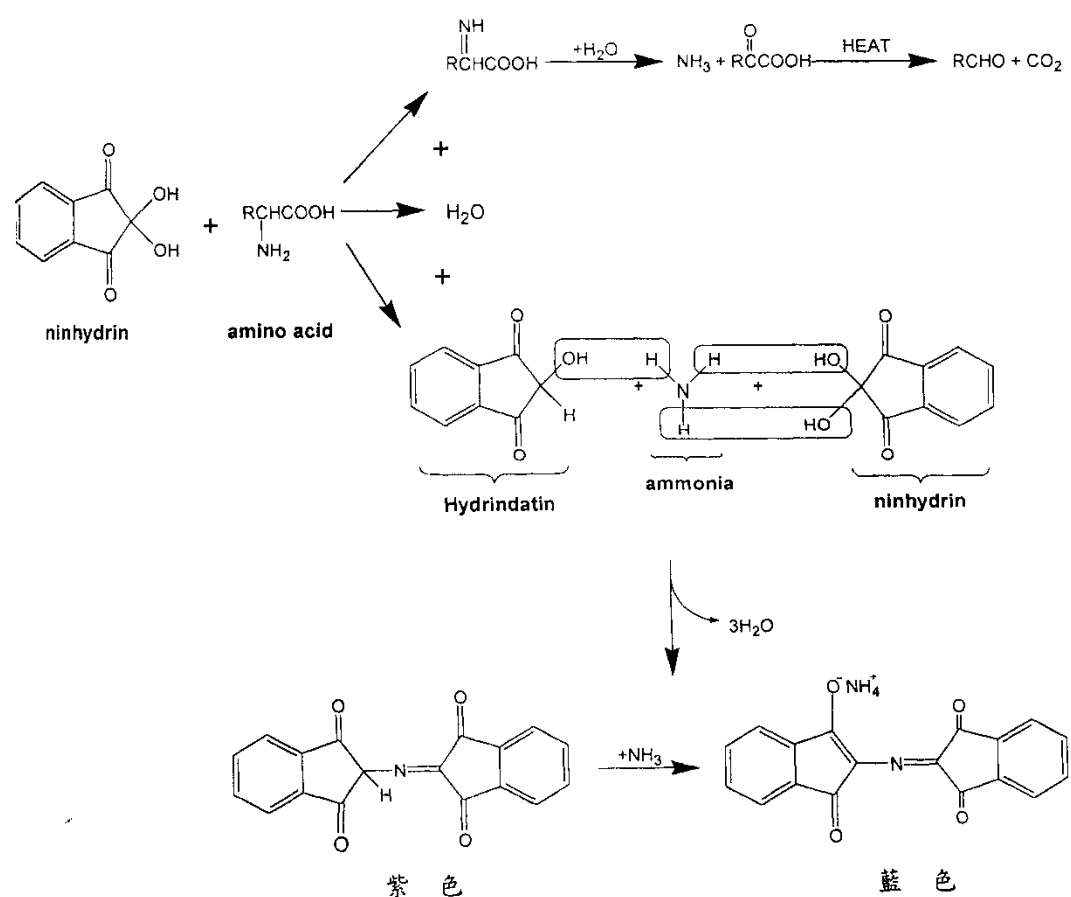


圖 2-2. Kaiser test 示意圖

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

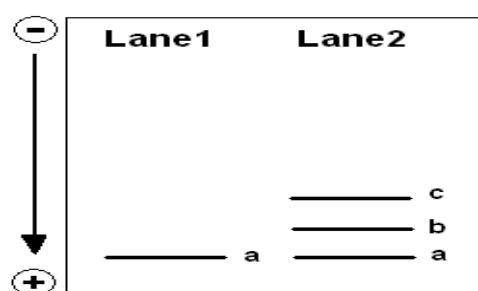
離方法卻是在 1937 年由瑞典科學家 Tiselius 設計出第一台自由電泳儀，建立了移界電泳法（ Moving boundary EP ），於 1948 年獲得諾貝爾獎。

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，不同構型的 DNA 移動速度不同，依序為超螺旋結構 DNA 大於直線 DNA 大於開環的雙鏈環狀 DNA（圖 2-3）。



Lane1 : supercoiled form DNA

Lane2 : a、supercoiled form DNA

B、linear form DNA

C、open-circular form DNA

圖 2-3. 電泳凝膠說明圖

凝膠電泳切割百分比公式⁷²

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

c. 凝膠位移分析 (gel shift assay)

電泳圖(圖 2-3)，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) 基準 (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 2-4)。

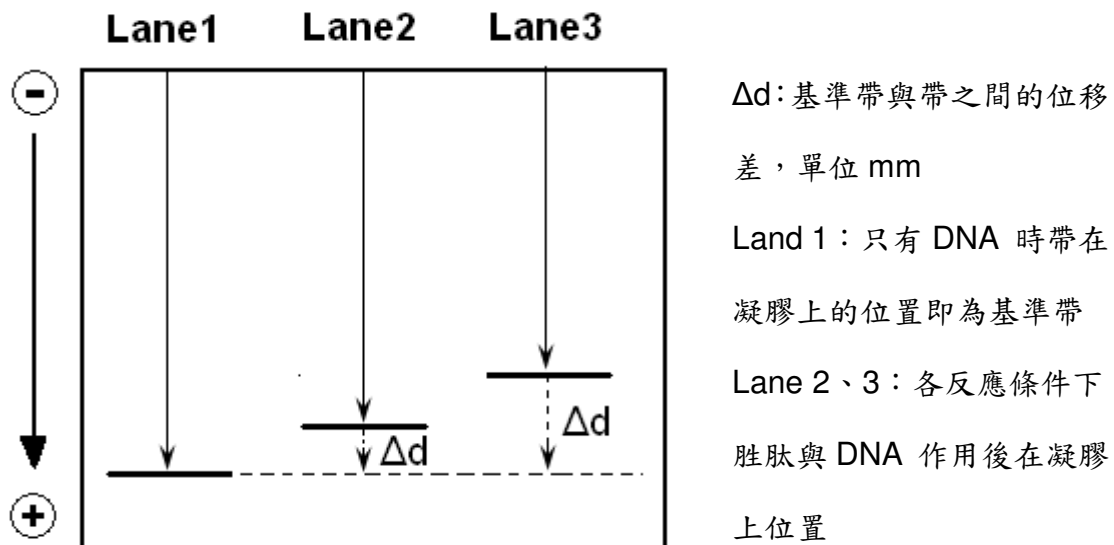


圖 2-4. 凝膠電泳位移示意圖

d. 顯色

在凝膠電泳顯色最常使用的試劑為 Ethidium Bromide 簡稱 EB (圖 2-5)，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。

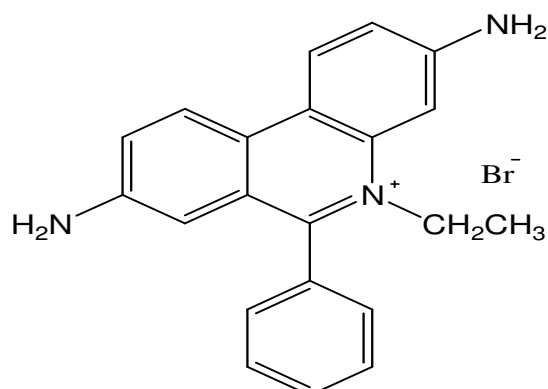


圖 2-5. Ethidium Bromide 結構圖

2-1-3 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 Soviet physicist Yevgeniy Zavoyskiy 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 $\mu_s = g_e \mu_B$ ，其中 μ (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 $\mu = 1/2 g_e \mu$ ，在外加磁場 B_0 存在下，只有兩種可能的能量狀態 $E = \pm 1/2 g_e \mu B_0$ (圖 2-6)。

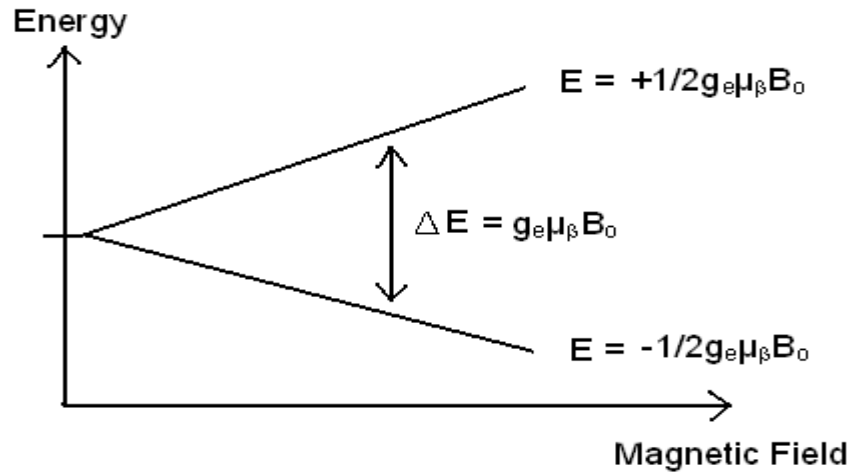


圖 2-6. Zeeman Effect 示意圖

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。

2-2 藥品

2-2-1 固相胜肽合成使用之藥品

| 藥品名稱 | 藥品來源 |
|----------------------------------|------------|
| 1. Rink Amide AM resin | Nova |
| 2. Dichloromethane | Echo |
| 3. N,N-Dimethylformamide | Echo |
| 4. Piperidine | Tedia |
| 5. N-Methylmorpholine | Acros |
| 6. PyBOP | Nova |
| 7. Fmoc-Gln (Trt) -OH | Ana Spec |
| 8. Fmoc-Hyp-OH | Ana Spec |
| 9. Fmoc-Arg (Pmc) -OH | Ana Spec |
| 10. Fmoc-Lys (Boc) -OH | Ana Spec |
| 11. Fmoc-His (Trt) -OH | Ana Spec |
| 12. Fmoc-Cys (Trt) -OH | Ana Spec |
| 13. Fmoc-Gly-OH | Ana Spec |
| 14. Chlorambucil | Sigma |
| 15. Fmoc-Pro-OH | Ana Spec |
| 16. Phenol | Wako |
| 17. Trifluoroacetic acid (99%) | Alfa Aesar |

| | |
|-------------------------|-----------|
| 18. Thioanisole | Fluka |
| 19. 1,2-Ethanedithiol | Fluka |
| 20. Ethyl Ether | Echo |
| 21. Acetic Acid glacial | Echo |
| 22. Pyridine | 聯工 |
| 23. Ninhydrin | Lancaster |
| 24. Ethanol | 景明 |
| 25. Ammonium Carbonate | Showa |

2-2-2 合成 Py 使用之藥品

| 藥品名稱 | 藥品來源 |
|--|------------|
| 1. Boc-4-amino-1-mepyrrole-carboxylic acid | Neosystem |
| 2. Trifluoroacetic acid (99%) | Alfa Aesar |
| 3. Dichloromethane | Echo |
| 4. Natriumcarbonate wasser | Merck |
| 5. 1,4-Dioxane | 皓峰 |
| 6. Fmoc-chloride | Bachem |
| 7. Ethyl Ether | Echo |

2-2-3 HPLC 使用之藥品

| 藥品名稱 | 藥品來源 |
|---------------------------------|------------|
| 1. Methanol | 景明 |
| 2. Trifluoroacetic acid (99%) | Alfa Aesar |

2-2-4 凝膠電泳使用之藥品

| 藥品名稱 | 藥品來源 |
|--|-----------------|
| 1. LE agarose | Sea Kem |
| 2. Tris (hydroxymethyl) aminomethane | Tedia |
| 3. Boric acid | Tedia |
| 4. Disodium Ethylenediamine Tetraacetate | Fisher Chemical |
| 5. Sodium Chloride | Hanawa |
| 6. Potassium Chloride | Wako |
| 7. Sodium Phosphate Dibasic Anhydrous | Tedia |
| 8. Potassium dihydrogenphosphate | Showa |
| 9. DNA (PBR322) | Bio Labs |
| 10. Iron (II) Sulfate heptahydrate | Merck |
| 11. dye | |
| 12. Ethidium Bromide | 益和 |

2-2-5 有機合成使用之藥品

| 藥品名稱 | 藥品來源 |
|--|------------|
| 1. 1,2,3-Trimethoxybenzene | Fluka |
| 2. Ethanol | 景明 |
| 3. Nitric acid | 景明 |
| 4. Ethyl Ether | Echo |
| 5. Acetic acid glacial | Echo |
| 6. n-Hexane (85%) | Tedia |
| 7. Tetrahydrofuran | Tedia |
| 8. Thioglycolic acid | Sigma |
| 9. Dichloromethane | Echo |
| 10. Trifluoroacetic acid (99%) | Alfa Aesar |
| 11. N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimide (99%) | Acros |
| 12. N,N-Dimethylformamide | Echo |
| 13. N-t-Boc-L-Phenylalanine | Sigma |
| 14. N,N-Diisopropylethylamine | Acros |
| 15. L-Arginine Methyl Ester | Sigma |
| 16. N-t-Boc-L-Proline | Sigma |
| 17. Methanol | Echo |
| 18. Chloroform | Echo |

| | |
|-------------------------------------|-------|
| 19. Sea sand | Showa |
| 20. Silica gel 60 (0.04~0.063 mm) | Merck |
| 21. 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

- 固相胜肽合成儀：PS3 ， Automated Solid Phase Peptide Syntesizer ， Rainin
- 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 detedtor / S-3702 ，
Range : 180~610 nm
 - 紀錄器 PC 個人電腦安裝 Hitachi HPLC D-7000 分析軟體
- 冷凍乾燥機：
 - Panchum Freeze Dryer CT-serues
 - Eyela fdu-1200
- 高真空幫浦：Edwards RV-12
- 旋轉濃縮機：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)
 FH-20，Panasonic
 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
 20 × 20 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

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. 切除樹脂 (Resin) 保護基 (Fmoc)

取樹脂約 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。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 5 mL 的活化 (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。Kaiser test 為透明或淡黃色 (-)。

3. 切除胺基酸之保護基 (Fmoc) (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。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 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 次此步驟後進行清洗步驟 4 次。Kaiser

test 為透明或淡黃色 (-)。

5. 切除樹脂 (Cleavage)

胺基酸依序連接好為所需胜肽序列，並切除最後胺基酸 Fmoc 保護基(若為合成環肽、CLB 和 DMQ-MA 之胜肽，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：

切割試劑 (cleavage reagent)

| | | |
|------------------------|----------------|-------------------|
| Phenol : 0.375 g | TFA : 5.0 mL | D.I.W. : 0.225 mL |
| Thioanisole : 0.225 mL | EDT : 0.125 mL | |

以二氯甲烷 (DCM) 清洗反應瓶中的樹脂數次，過濾後先以高真空幫浦抽除 DCM 溶劑，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 30 分。反應完畢，先以高真空幫浦抽除溶劑，再將圓底瓶移至 -70°C 冷凍冰箱中靜置至冷凍，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(PS3 , Peptide Synthesizer)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）：將胺基酸與耦合試劑 PyBOP 溶於 5 mL 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 (0.4 × 25 cm ; 1 × 25 cm) column

紫外光偵測波長：λ = 214 nm

| | | |
|------|---------------------|-------------------|
| 管柱大小 | 0.4 × 2.5 cm column | 1 × 2.5 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% CH ₃ OH | 95% H ₂ O | 0.1% TFA |
| | B 液 | 95% CH ₃ OH | 5% H ₂ O | 0.1% TFA |
| | C 液 | 100% CH ₃ OH | | |

梯度與時間關係設定

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

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 (sidechain to sidechain cyclization) 2.側鏈與主幹環化 (sidechain 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炔基上的 α 碳，離去氯原子，使胜肽環化 (圖 2-7)。

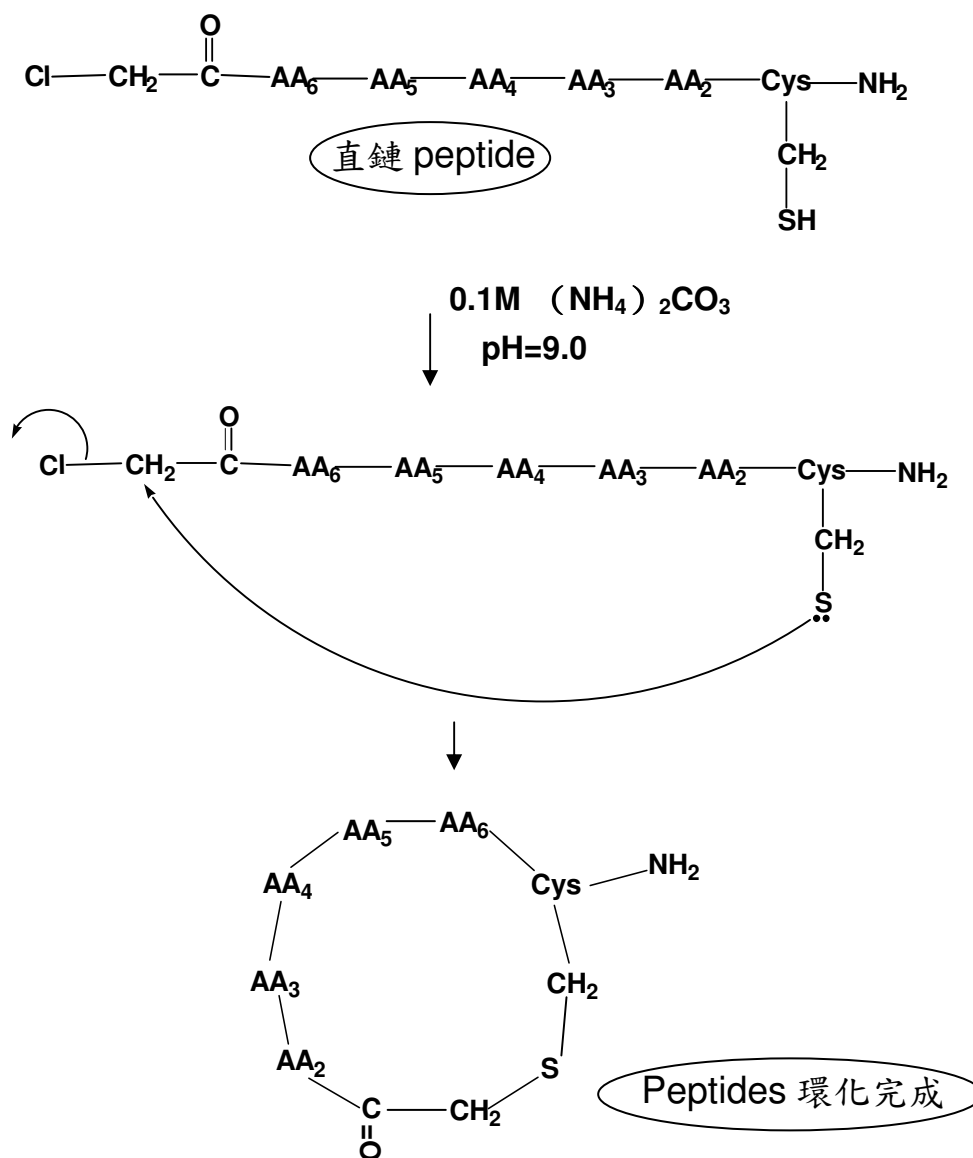
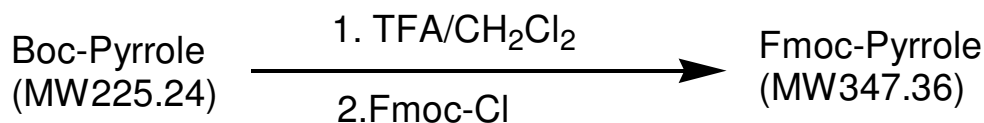


圖 2-7. 環狀胜肽合成法

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 純化抽乾後之環狀粗產物，即可得所需的環狀胜肽。

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（反應機構圖 2-8），利用抽真空水幫浦抽除試劑可得黃色粉末。

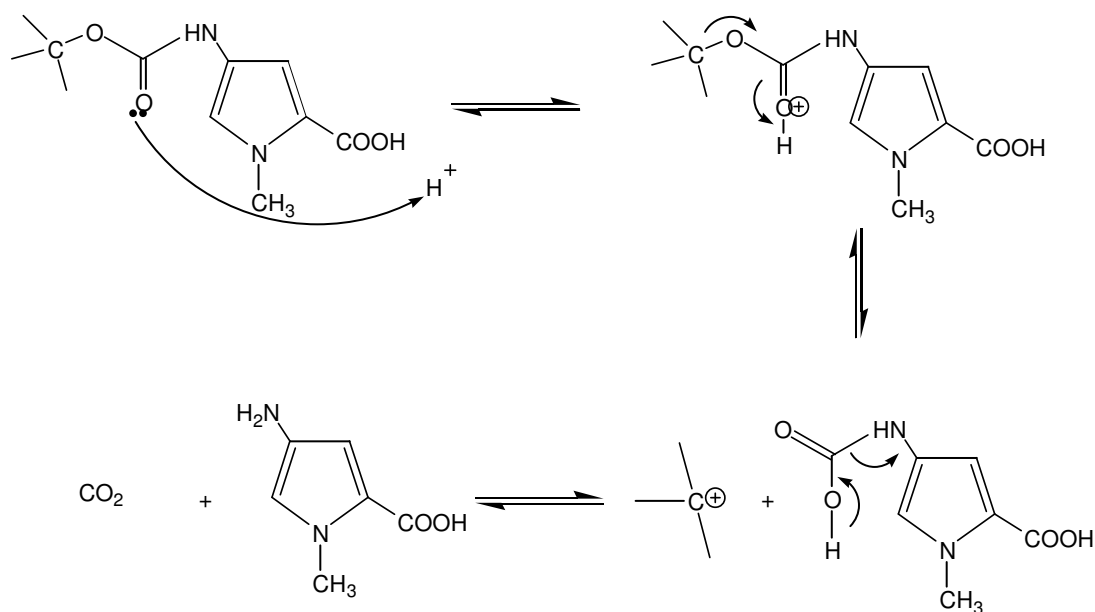


圖 2- 8. Boc-pyrrole 去除氮端上之 Boc 保護基反應機構示意圖

在圓底瓶中加入 2 mL 10 % Na₂CO₃ 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 200 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）。

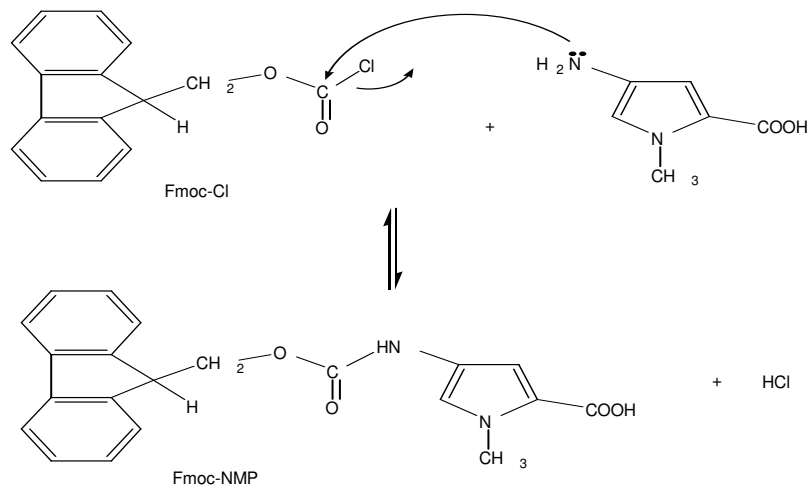


圖 2-9. Fmoc-NMP 合成示意圖

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 0.5 × TBE 中，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

| | | |
|-----------------|----------------------------------|---------------|
| 5× TBE : 54 g | Tris | } 溶於 1 L 去離子水 |
| 27.5 g | Boric acid | |
| 3.7 g | EDTA | |
| 10× 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 0.5 × PBS 製備好。0.6 μL 離心管中加入適量的 DNA (0.225 μg / μL)、buffer、去離子水後，先預熱 8 分鐘，再加入適量胜肽溶液。65 °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 0.5 × 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 0.5 × TBE 溶液 (含 150 mL EthidiumBromide 1 mg / mL) 30 分鐘，再將凝膠浸泡於 0.5 × 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

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%) (圖 2-10)。

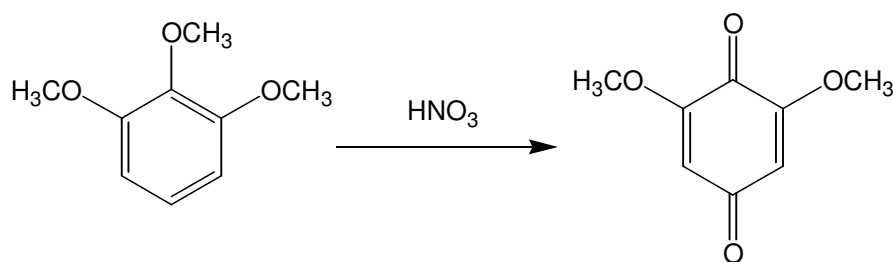


圖 2-10. DMQ 的合成示意圖

2. 2,6-雙甲氧基氫醌-3-硫醋酸 (DMQ-MA) 的合成

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%) (圖 2-11)。

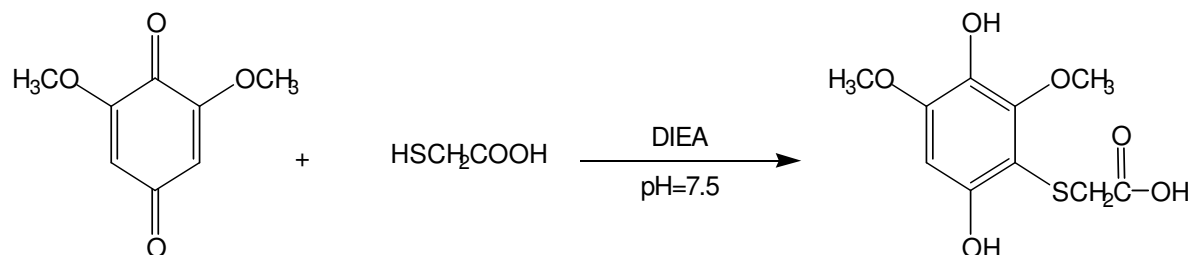


圖 2- 11. DMQ-MA 合成示意圖

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 DCU，抽乾濾液，可得橘紅色黏稠狀液體 DMQ-MA-pfp。

b. DMQ-MA-X-Arg-Ome 的合成

將 X-Arg-OMe (1 當量) 及 DMQ-MA-pfp 分別溶於 0.5mL DMF 中，將兩溶液混合均勻，立即以 DIEA 將溶液調 pH 值至 7.0~7.5 (反應中皆保持此 pH 值)，於室溫下反應 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

將待測樣品溶於 Na_2HPO_4 (2.6×10^{-2} M) 0.55 mL 溶液中，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 . 等時間紀錄圖譜一次。之後利用 WIN-EPR SimFonia 軟體進行數據處理。並改變不同 pH 值 (5.0 、 7.4 、 10.4) 進行偵測。(儀器操作由中興貴儀中心吳小姐代為操作)

第三章 結果與討論

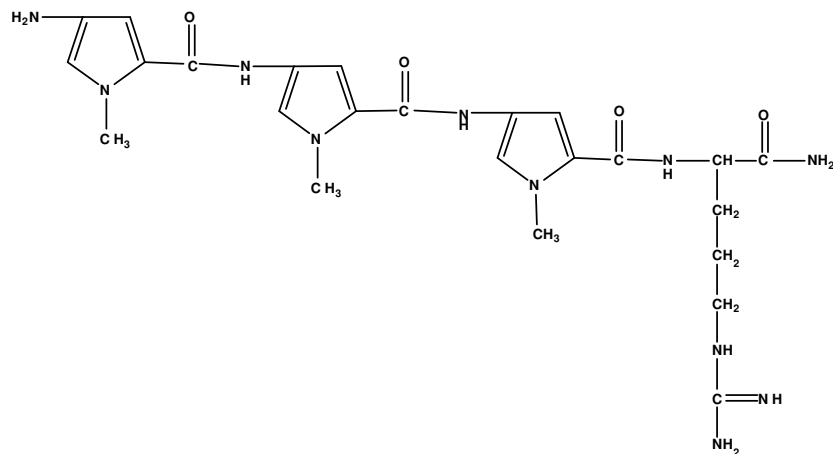
本文利用固相胜肽合成法，合成出含有 Py (Pyrrole) 之直鏈胜肽、環狀胜肽以及含有氮苯芥丁酸 (Chlorambuil, CLB) 小分子的之直鏈胜肽。最初胜肽序列設計源自於海膽精原組織蛋白中的 SPKK 單元，之後由 L. Sheh. 加以研究修飾並發表相關論文，證實 HPRK 單元和 XPRK 單元對 DNA 亦有好的結合能力。因此推測 Arg 和 Lys 均為側鏈為帶正電荷的鹼性胺基酸，易與 DNA 磷酸骨架產生親和性；而在 2001 年，Luscombe, N. M. 提出⁷²了 Arg 和 Lys 易與 DNA 鹼基形成 monodentate 及 bidentate interaction，增加了胜肽與 DNA 的結合力。在含 Py (Pyrrole) 胜肽方面，美國 Dervan, P. B. 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¹⁶⁻²⁰。而氮苯芥丁酸 (Chlorambuil, 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⁴⁴，並於 2001 年提出含 CLB 與 2,6-Dimethoxyhydroquinone-3-mercaptoacetic acid (DMQ-MA) 之胜肽會對 DNA 進行專一性的切割⁴⁵。因此，根據上述理由並加以修飾胺基酸序列，本文提出兩條新的環狀胜肽，八條新的直鏈胜肽和九條新的含有 CLB 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

PN3D

Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₂₄H₃₃N₁₁O₄

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 15.01 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 20.12 mg ; 純化後產物 : 6.33 mg

產率 : 40.24 % ; 純化產率 : 31.46 %

產物為白色固體，熔點 : 121~124 °C

[α]_D²⁵ : -11.05 (6.33 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 539.27 , 實驗值 539.9 (100) , 540.6 (85.09)

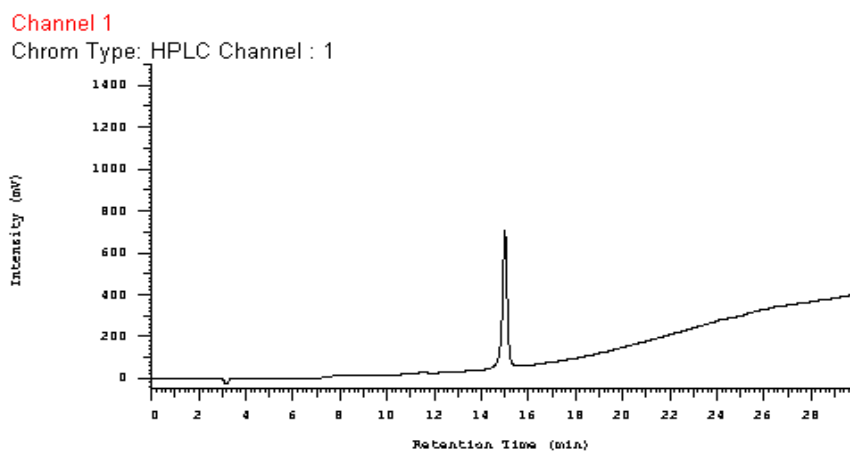


圖 3-1. PN3D 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =15.01 min)

27-PN3D #1-30 RT: 0.01-0.44 AV: 30 NL: 1.12E8
T: +e ESI Q1MS [200.000-2000.000]

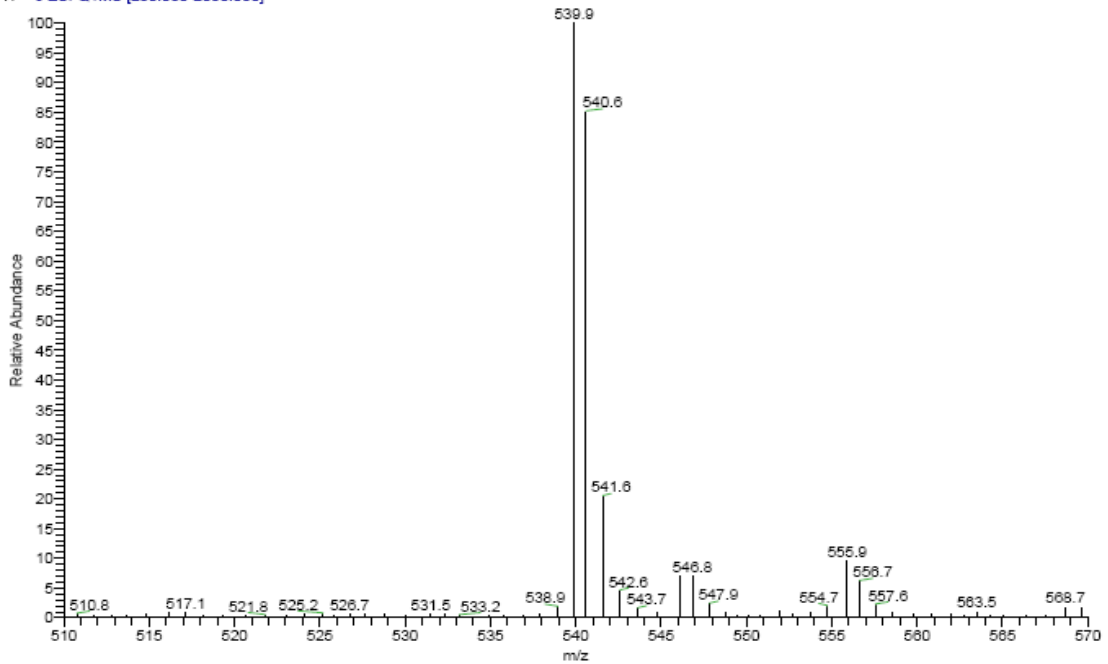


圖 3-2. PN3D ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

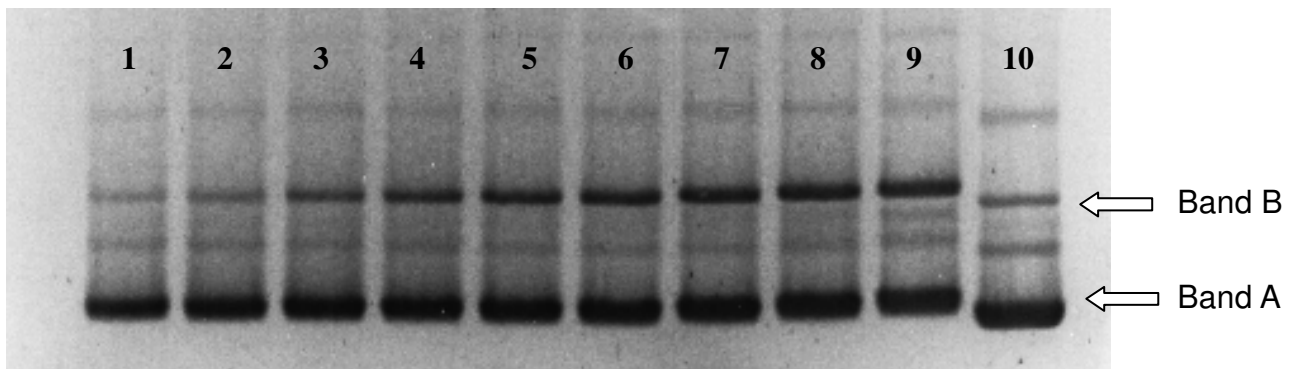
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：PN3D (0.5、1、3、5、8、10、15、20、25 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

PN3D



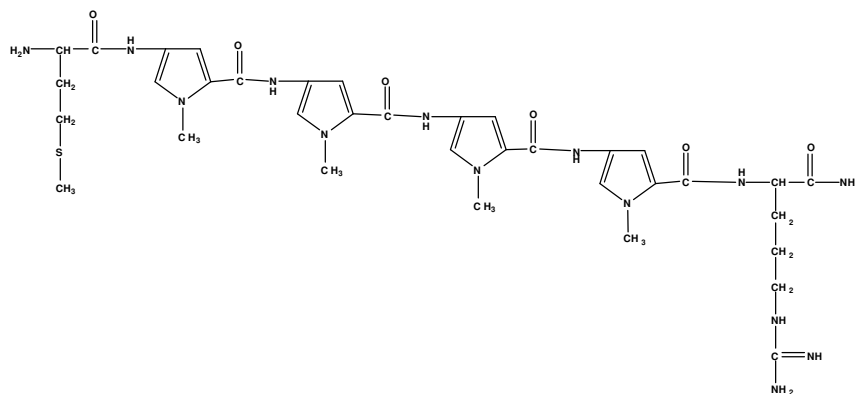
表六. PN3D 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------|-----|---|------|-----|-------|------|-------|-------|-------|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 0.5 | 1 | 3 | 5 | 8 | 10 | 15 | 20 | 25 | --- |
| Band A (mm / μM) | 4 | 2 | 0.6 | 0.3 | 0.125 | 0.1 | 0.067 | 0.075 | 0.08 | --- |
| Band B (mm / μM) | 2 | 1 | 0.33 | 0.2 | 0.125 | 0.05 | 0.03 | 0.05 | 0.072 | --- |

由高君翰學長合成出 PN3 序列⁷⁴，PN3D 比 PN3 少一個 Arg，經過比較之後，PN3 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 5；PN3D 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 2 和 1。Arg 易與 DNA 鹼基形成 monodentate 及 bidentate interaction。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 PN3D 對於 DNA 的結合能力比 PN3 較不佳。

MPN-4

Met-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₃₅H₄₈N₁₄O₆S

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 18.90 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 25.13 mg ; 純化後產物 : 11.03 mg

產率 : 50.26 % ; 純化產率 : 43.89 %

產物為白色固體，熔點 : 150~154 °C

[α]_D²⁵ : -46.98 (14.9 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 792.36 , 實驗值 793.1 (100) , 793.9 (55.18)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

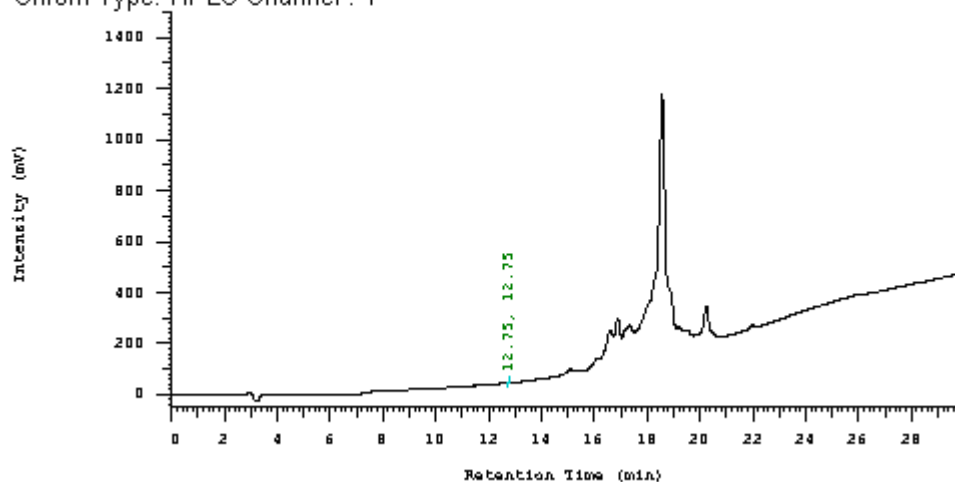


圖 3-3. MPN-4 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt = 18.90 min)

73-MPN-4 #1-30 RT: 0.00-0.47 AV: 30 NL: 2.44E8
 F: + e ESI Q1MS [200.000-2000.000]

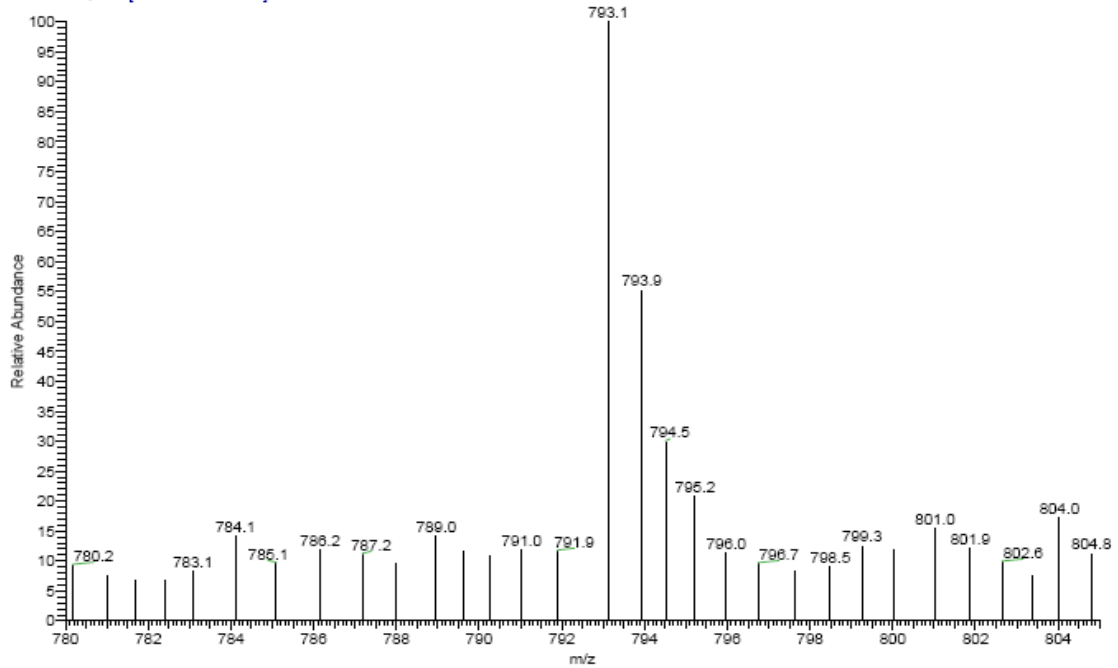


圖 3- 4. MPN-4 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

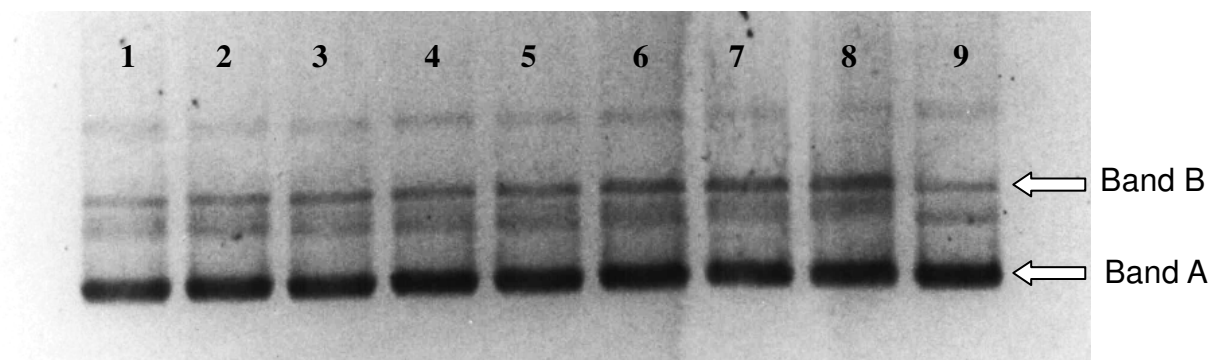
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~8：MPN-4 (1、2、3、5、6、8、10、15 μM)

Lane 9：pBluescript II SK(-) DNA only

MPN-4



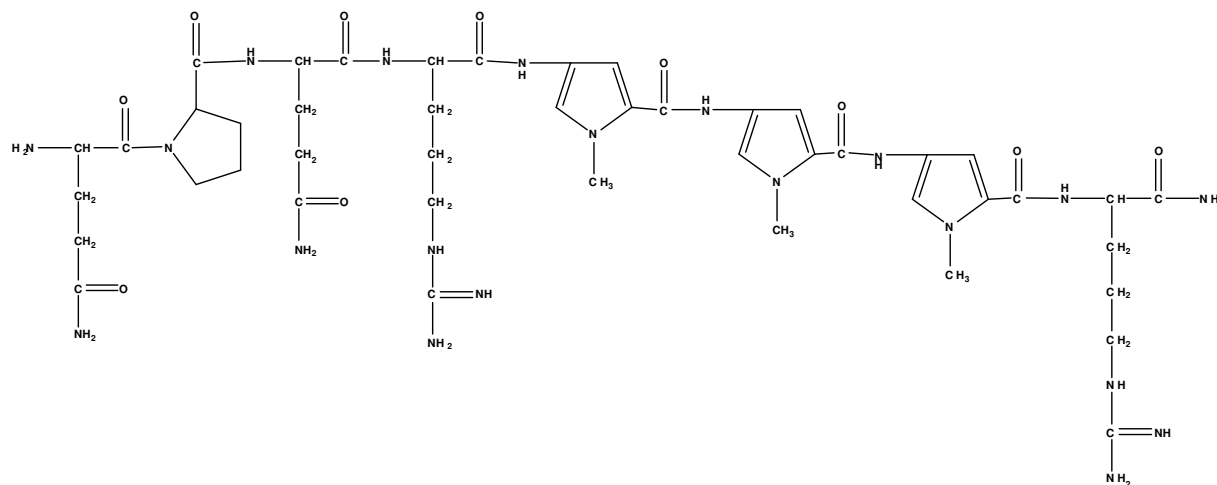
表七. MPN-4 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------------------|-----|-----|-------|-----|------|-------|-----|-------|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 1 | 2 | 3 | 5 | 6 | 8 | 10 | 15 | --- |
| Band A (mm / μM) | 0.2 | 0.1 | 0.067 | 0.1 | 0.17 | 0.188 | 0.2 | 0.13 | --- |
| Band B (mm / μM) | 0.2 | 0.1 | 0.067 | 0.1 | 0.13 | 0.125 | 0.1 | 0.067 | --- |

由王正一同學合成出 PN4 序列⁷⁵, MPN-4 與 PN4 不同處, 是把 PN4 的 Arg 置換成 Met 成 MPN-4 序列, 經過比較之後, PN4 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 1.2 ; MPN-4 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 0.1 。相同濃度下, 凝膠滯留係數越大, 滯留效應越明顯, 因此推斷 MPN-4 對於 DNA 的結合能力比 PN4 較不佳。

QPQ-8

Gln-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₄₅H₆₈N₂₀O₁₀

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =16.30 min

Resin : 60.0 mg

粗產物 : 30.58 mg ; 純化後產物 : 14.19 mg

產率 : 50.97 % ; 純化產率 : 46.40 %

產物為白色固體，熔點 : 131~134 °C

[α]_D²⁵ : -27.45 (5.10 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1048.54 , 實驗值 1049.4 (100) , 1050.3 (78.85)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

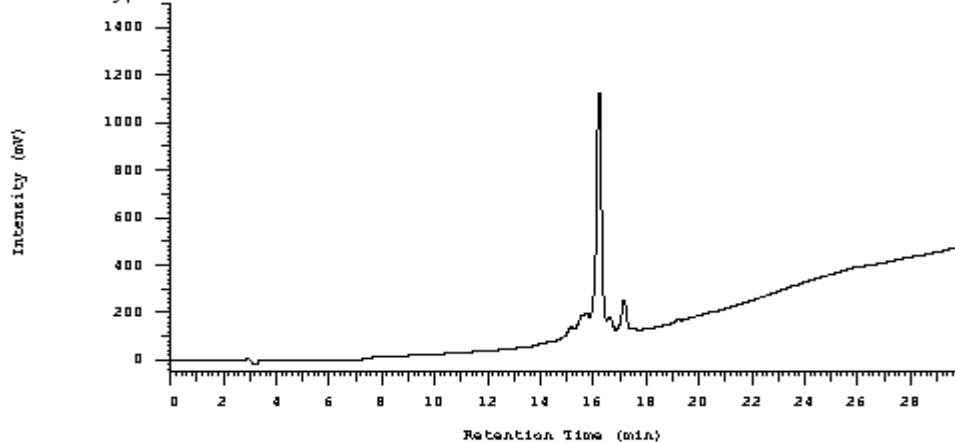


圖 3-5. QPQ-8 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =16.30 min)

77-QPQ-8 #1-30 RT: 0.00-0.47 AV: 30 NL: 1.15E8
T: +c ESI Q1MS [200.000-2000.000]

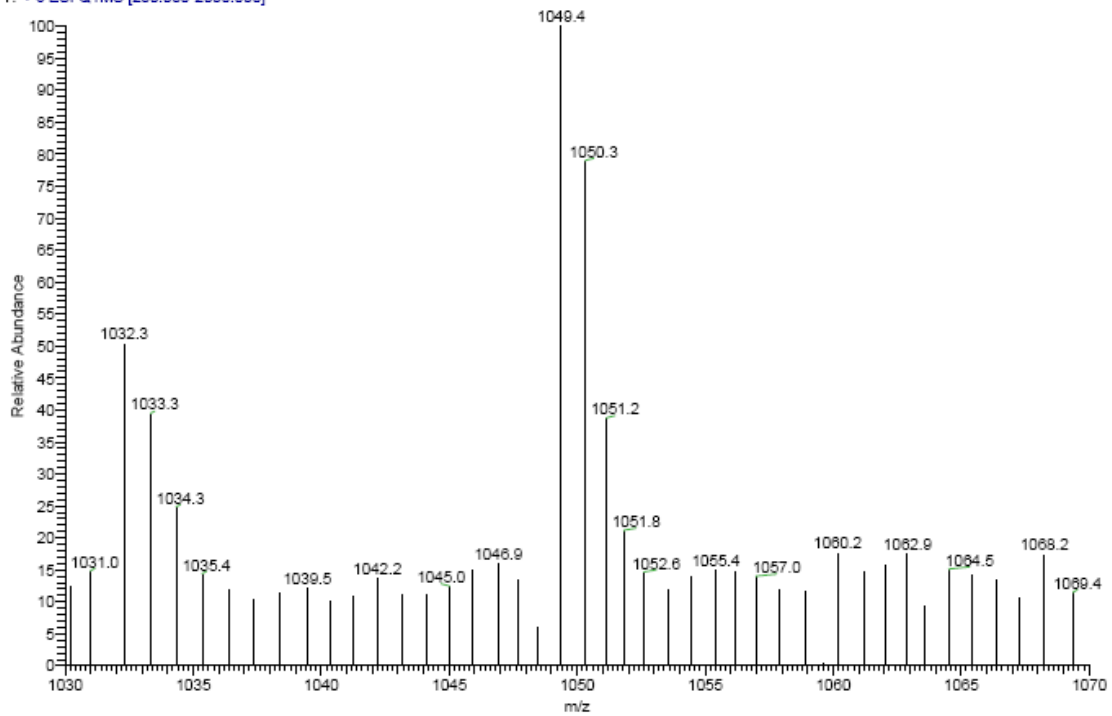


圖 3- 6. QPQ-8 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

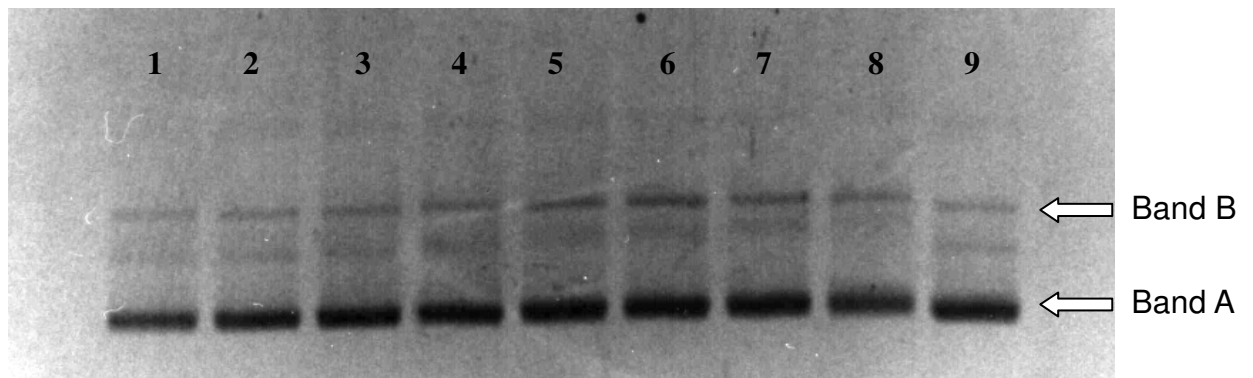
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~8：**QPQ-8** (0.5、1、2、3、5、6、8、10 μM)

Lane 9：pBluescript II SK(-) DNA only

QPQ-8



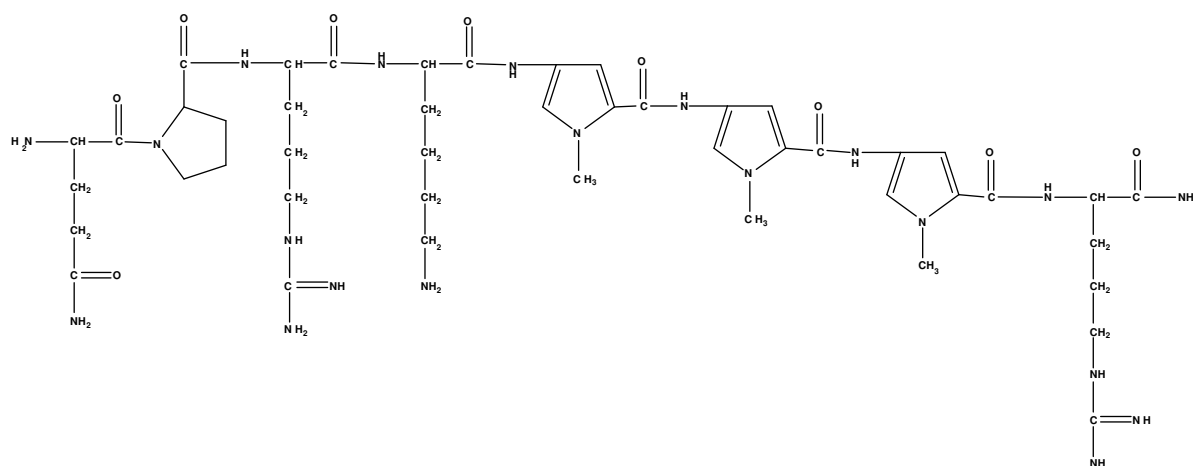
表八. QPQ-8 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------------------|-----|-----|------|------|-----|------|------|------|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 6 | 8 | 10 | --- |
| Band A (mm / μM) | 0.4 | 0.2 | 0.25 | 0.33 | 0.3 | 0.3 | 0.25 | 0.25 | --- |
| Band B (mm / μM) | 1 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.4 | 0.33 | 0.25 | 0.25 | --- |

由王正一同學合成出 QPQ-9 序列⁷⁵，QPQ-8 比 QPQ-9 少一個 Py，經過比較之後，QPQ-9 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 3 和 2；QPQ-8 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 0.2 和 0.5。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 QPQ-8 對於 DNA 的結合能力比 QPQ-9 較不佳。証實 Py 所耦合數目不同會對 DNA 的結合能力也有所影響²²。

KQP-8

Gln-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₄₆H₇₂N₂₀O₉

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 15.80 min

Resin : 60.0 mg

粗產物 : 30.58 mg ; 純化後產物 : 14.19 mg

產率 : 50.97 % ; 純化產率 : 46.40 %

產物為白色固體，熔點 : 153~157 °C

[α]²⁵_D : -49.90 (7.02 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1048.58 , 實驗值 1047.3 (100) , 1048.3 (79.95)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

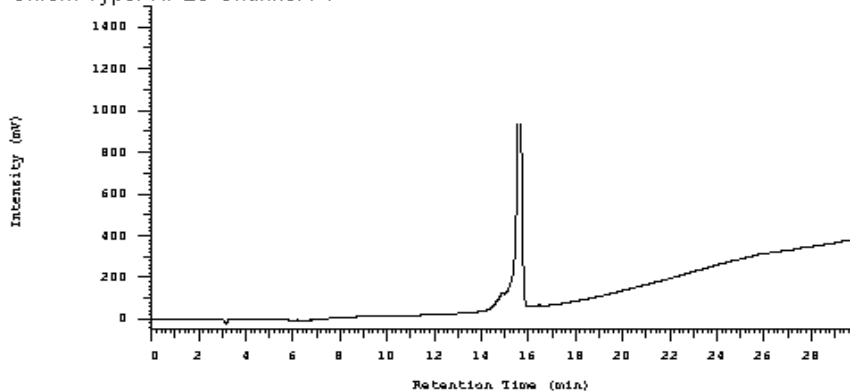


圖 3-7. KQP-8 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt = 15.80min)

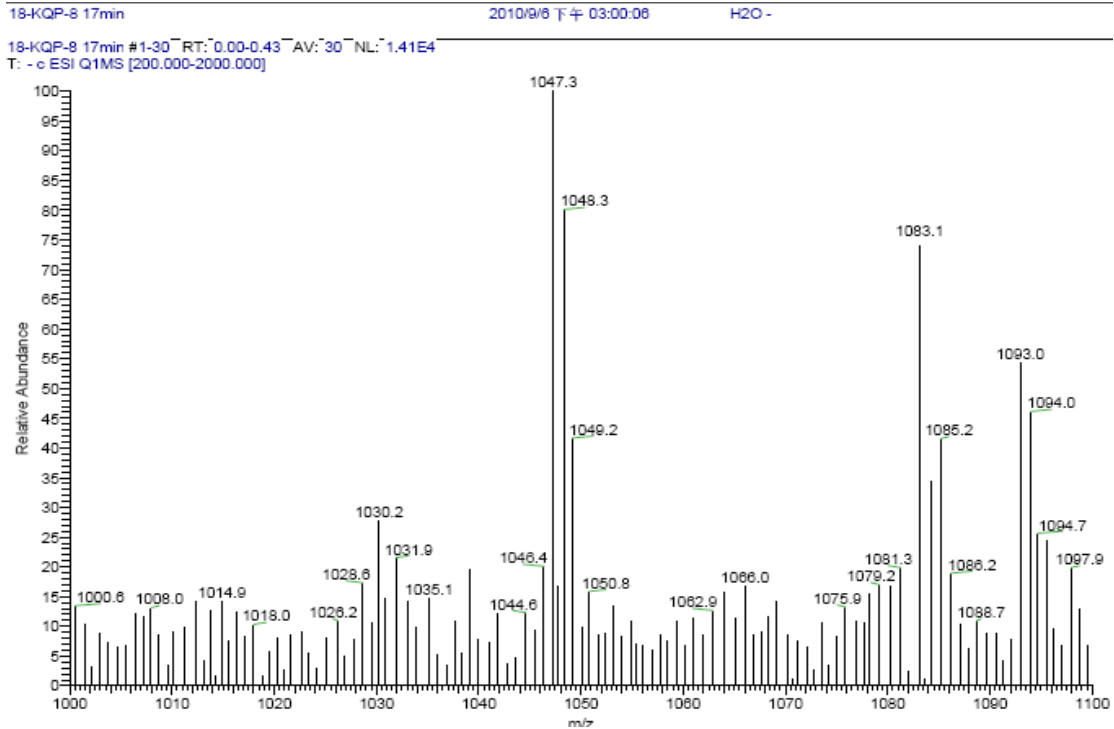


圖 3- 8. KQP-8 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

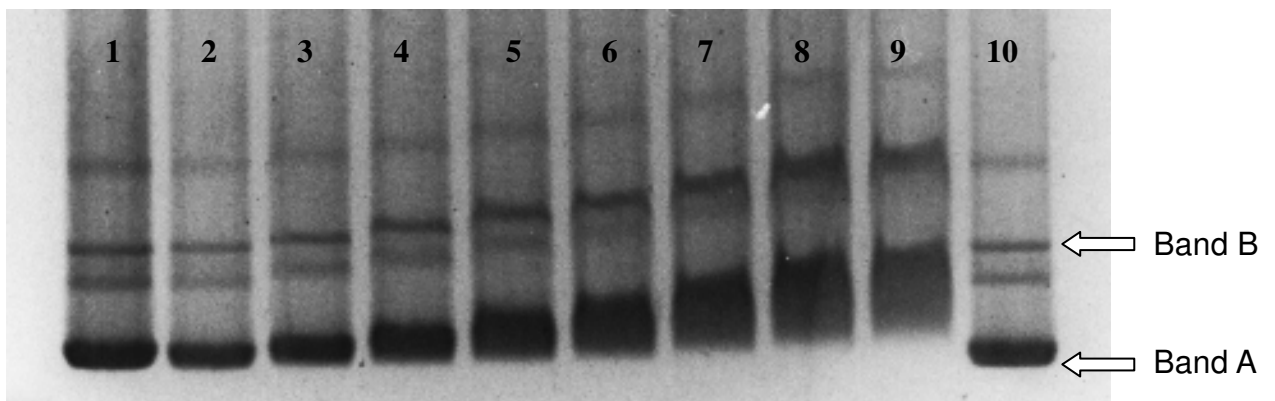
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane1~9：KQP-8 (0.5、1、3、5、8、10、15、20、25 μM)

Lane10：pBluescript II SK(-) DNA only

KQP-8



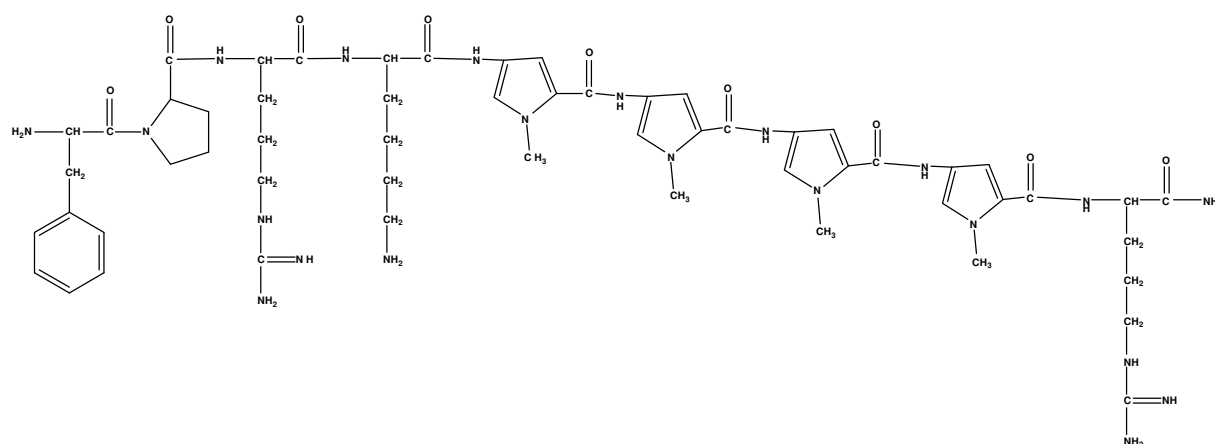
表九. KQP-8 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------|-----|---|-------|------|-------|-----|------|------|------|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 0.5 | 1 | 3 | 5 | 8 | 10 | 15 | 20 | 25 | --- |
| Band A (mm / μM) | 2 | 1 | 0.6 | 0.24 | 0.625 | 0.6 | 0.53 | 0.45 | 0.46 | --- |
| Band B (mm / μM) | 6 | 3 | 1.167 | 1 | 0.75 | 0.8 | 0.6 | 0.55 | 0.46 | --- |

XPRK 模組之直鏈胜肽 KQP-8，KQP-8 與 QPQ-8 一樣相同有三個 Py，不同處為 QPQ-8 第三個位置的 Gln 跟換成 Arg 成 KQP-8，經過比較之後，QPQ-8 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 0.2 和 0.5；KQP-8 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 1 和 3。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 KQP-8 對於 DNA 的結合能力比 QPQ-8 較佳。因 Gln 為中性而 Arg 在中性溶液環境下會帶有正電荷，因此增加 KQP-8 與 DNA 的作用力，導致與 DNA 的結合能力增加。

PyFR-9

Phe-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₅₆H₇₉N₂₁O₉

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 18.80 min

Resin : 60.0 mg

粗產物 : 33.42 mg ; 純化後產物 : 20.13 mg

產率 : 55.70 % ; 純化產率 : 60.23 %

產物為白色固體，熔點 : 131~137 °C

[α]_D²⁵ : -34.77 (20.13 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1189.64 , 實驗值 1189.0 (100) , 1190.1 (44.10)

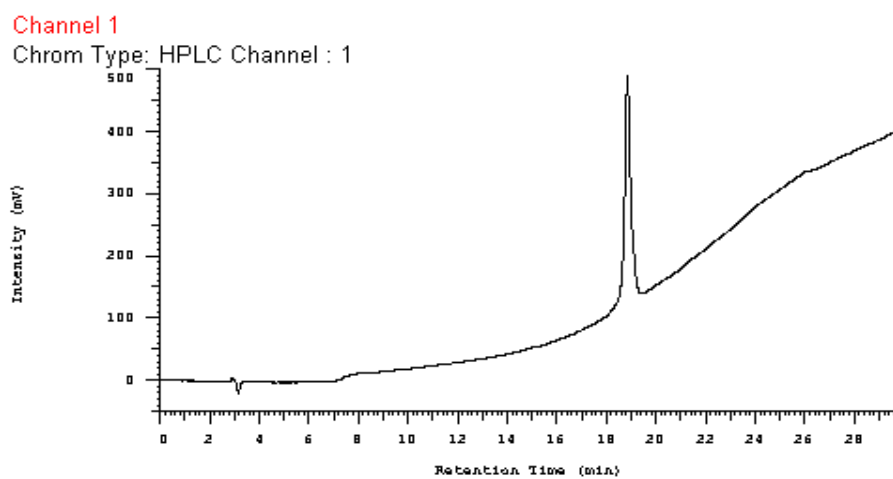


圖 3-9. PyFR-9 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =18.80 min)

23-PyFR-9 #1-30⁻ RT: 0.01-0.44⁻ AV: 30⁻ NL: 2.82E5
T: -c ESI Q1MS [200.000-2000.000]

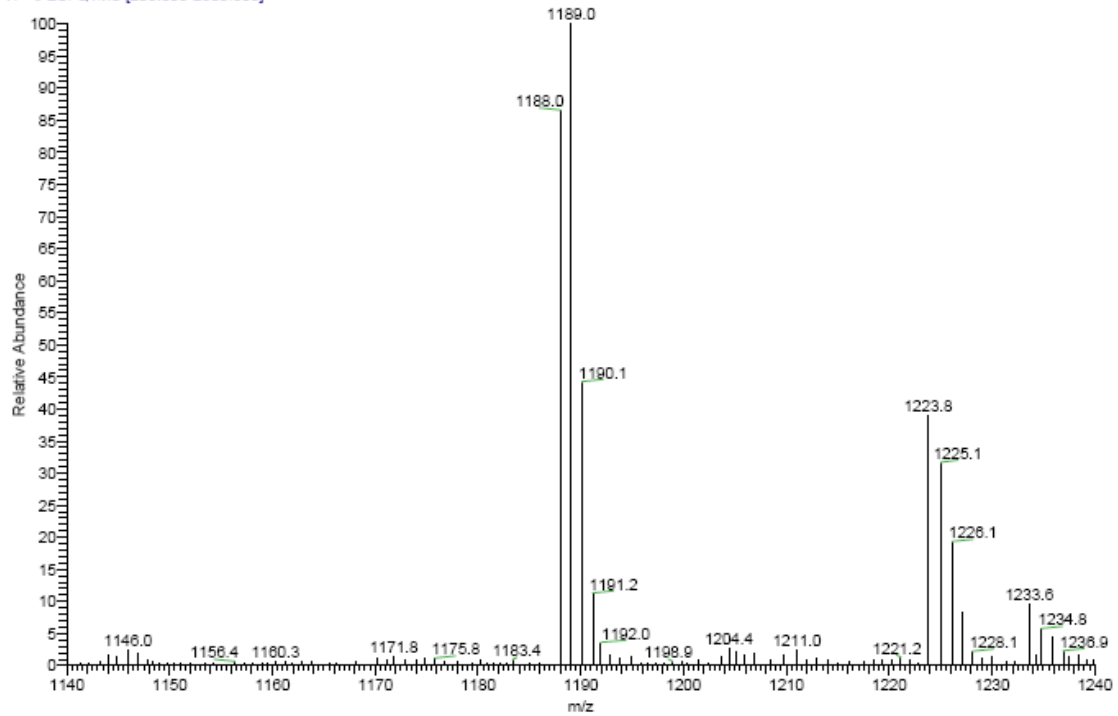


圖 3- 10. PyFR-9 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

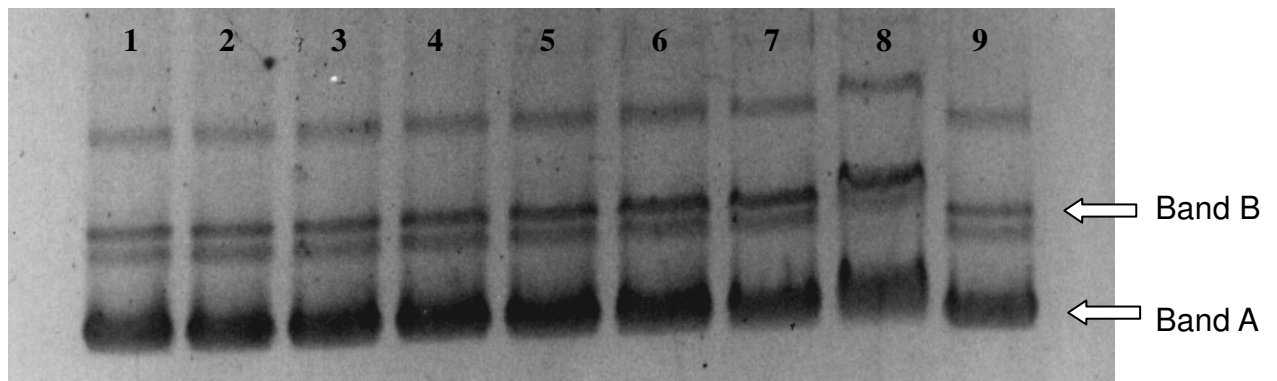
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane1~8：PyFR-9 (0.1、0.5、0.8、1、1.8、2.5、3、5 μM)

Lane9：pBluescript II SK(-) DNA only

PyFR-9



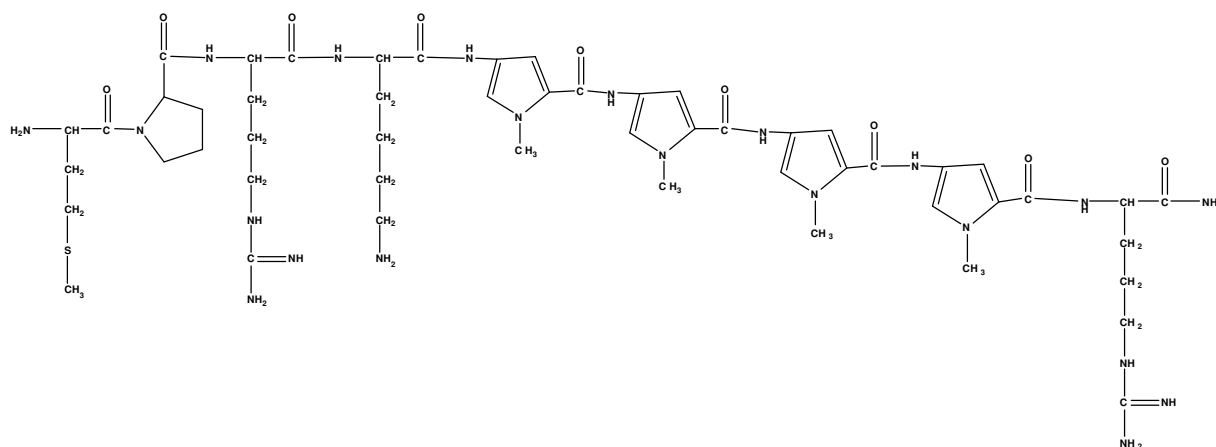
表十. PyFR-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| 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) | 10 | 2 | 1.875 | 2 | 1.11 | 1.2 | 1 | 1 | --- |
| Band B (mm / μM) | 5 | 1 | 1.25 | 1.2 | 1 | 0.8 | 1 | 1 | --- |

由周伊君學姊合成出 PyHR-9 序列⁷⁶，PyHR-9、PyFR-9 與 PyMR-9 不同處是只差一個胺基酸，PyHR-9 和 PyFR-9 經過比較之後，PyHR-9 的凝膠滯留係數為 0.94；PyFR-9 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 2 和 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 PyFR-9 對於 DNA 的結合能力比 PyHR-9 較佳。

PyMR-9

Met-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₅₂H₇₉N₂₁O₉S

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 19.30 min

Resin : 60.0 mg

粗產物 : 30.06 mg ; 純化後產物 : 16.21 mg

產率 : 55.10 % ; 純化產率 : 53.93 %

產物為白色固體，熔點 : 130~134 °C

[α]_D²⁵ : -34.48 (16.24 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1173.61 , 實驗值 1172.0 (100) , 1173.0 (92.23)

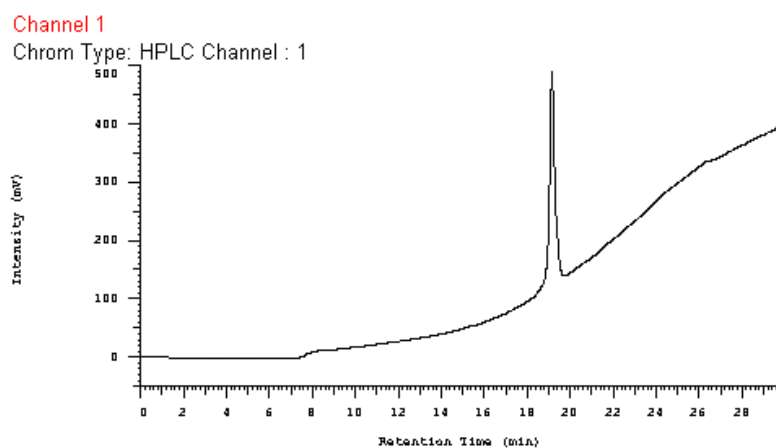


圖 3-11. PyMR-9 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =19.30 min)

25-PyMR-9 #1-30 RT: 0.01-0.43 AV: 30 NL: 3.15E4
T: -c ESI Q1MS [200.000-2000.000]

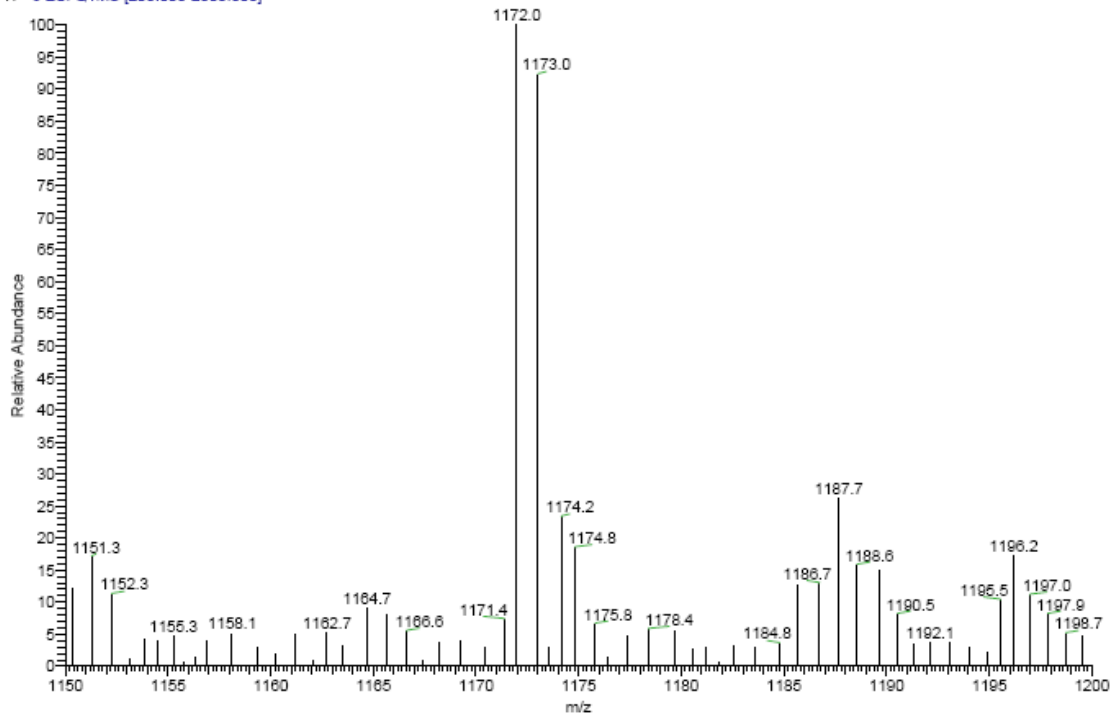


圖 3- 12. PyMR-9 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

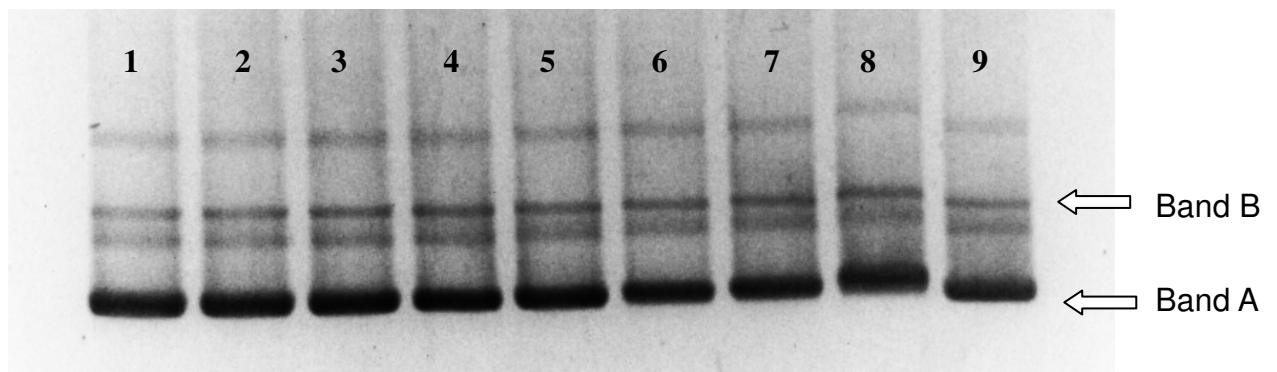
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~8：PyMR-9 (0.1、0.5、0.8、1、1.8、2.5、3、5 μM)

Lane 9：pBluescript II SK(-) DNA only

PyMR-9



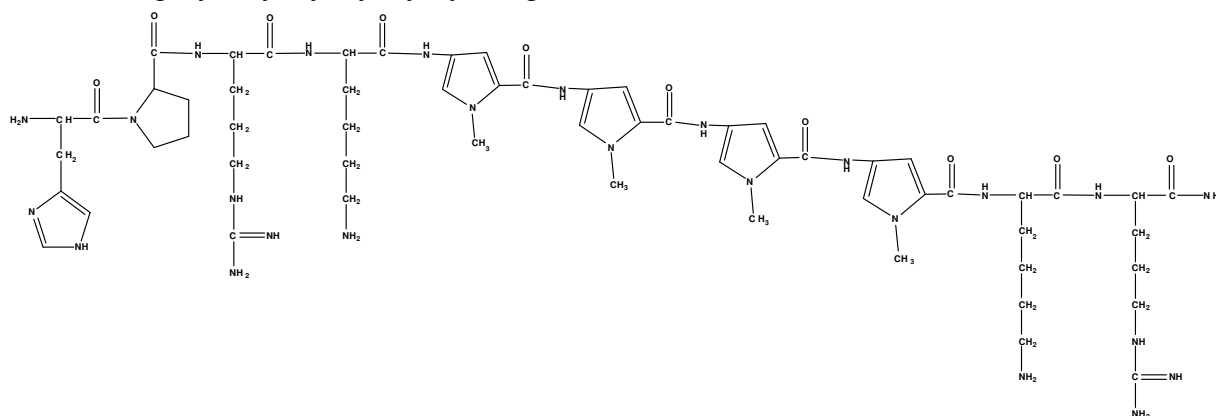
表十一. PyMR-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| 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) | 2 | 0.4 | 0.25 | 0.5 | 0.28 | 0.4 | 0.5 | 0.5 | --- |
| Band B (mm / μM) | 2 | 0.4 | 0.25 | 0.2 | 0.28 | 0.4 | 0.5 | 0.5 | --- |

由周伊君學姊合成出 PyHR-9 序列⁷⁶，PyHR-9、PyFR-9 與 PyMR-9 不同處是只差一個胺基酸，PyHR-9 和 PyMR-9 經過比較之後，PyHR-9 的凝膠滯留係數為 0.94；PyMR-9 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 0.5 和 0.2。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 PyFR-9 對於 DNA 的結合能力比 PyHR-9 較不佳。PyHR-9、PyFR-9 和 PyMR-9 差異之胺基酸側鏈 His、Phe 和 Met，三個胜肽與 DNA 的結合能力一大小排列為：PyFR-9、PyHR-9、PyMR-9。

PyHKR-10

His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH₂



分子式：C₅₉H₈₉N₂₅O₁₀

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 17.30 min

Resin : 60.0 mg

粗產物 : 31.76 mg ; 純化後產物 : 18.41 mg

產率 : 52.93 % ; 純化產率 : 57.97 %

產物為白色固體，熔點 : 135~138 °C

[α]_D²⁵ : -34.22 (18.41 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1307.72 , 實驗值 1305.6 (100) , 1306.7 (70.34)

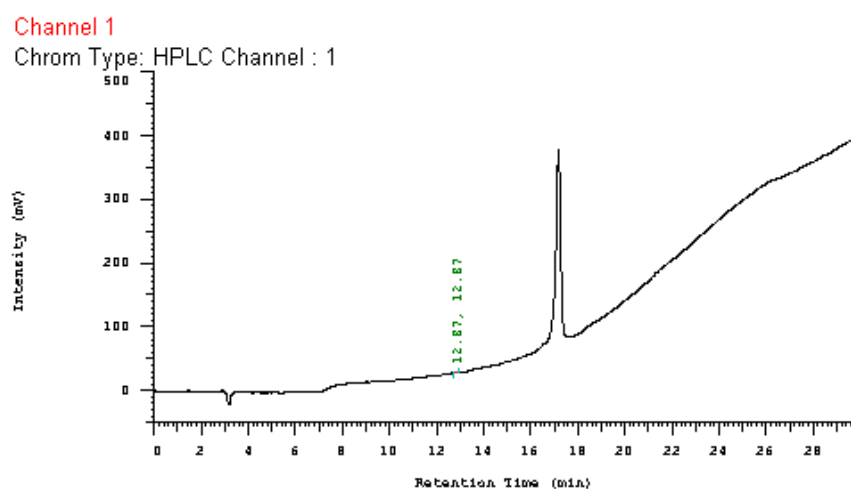


圖 3-13. PyHKR-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =17.30 min)

19-PyHKR-10 #1-30 RT: 0.01-0.44 AV: 30 NL: 6.49E4
T: - c ESI Q1MS [200.000-2000.000]

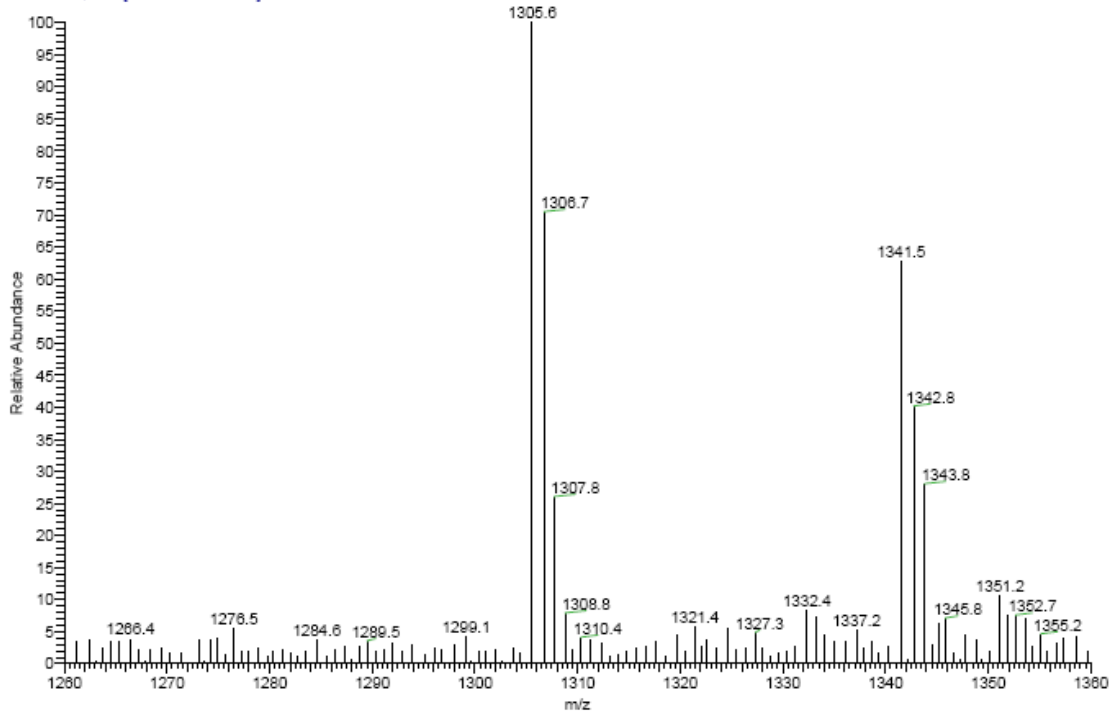


圖 3- 14. PyHKR-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

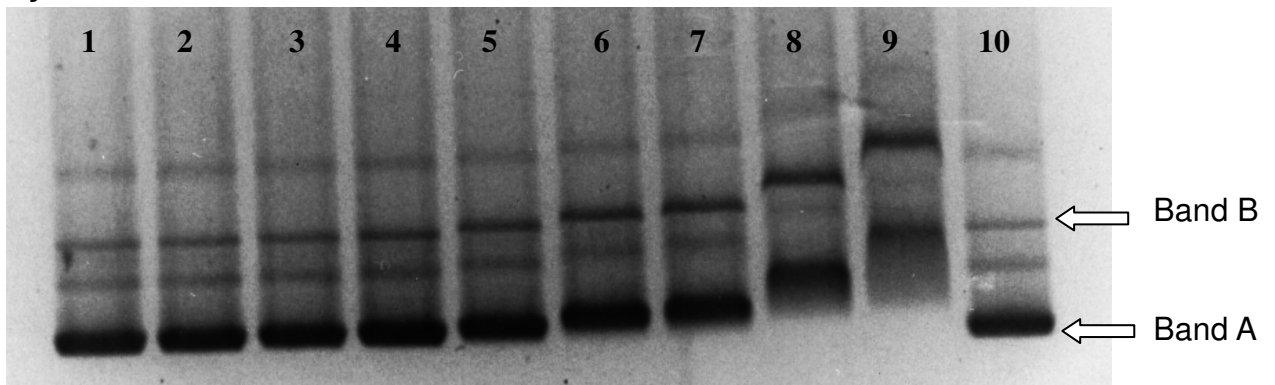
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane1~9：PyHKR-10 (0.1、0.5、0.8、1、1.8、2.5、3、5、8 μM)

Lane10：pBluescript II SK(-) DNA only

PyHKR-10



表十二. PyHKR-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

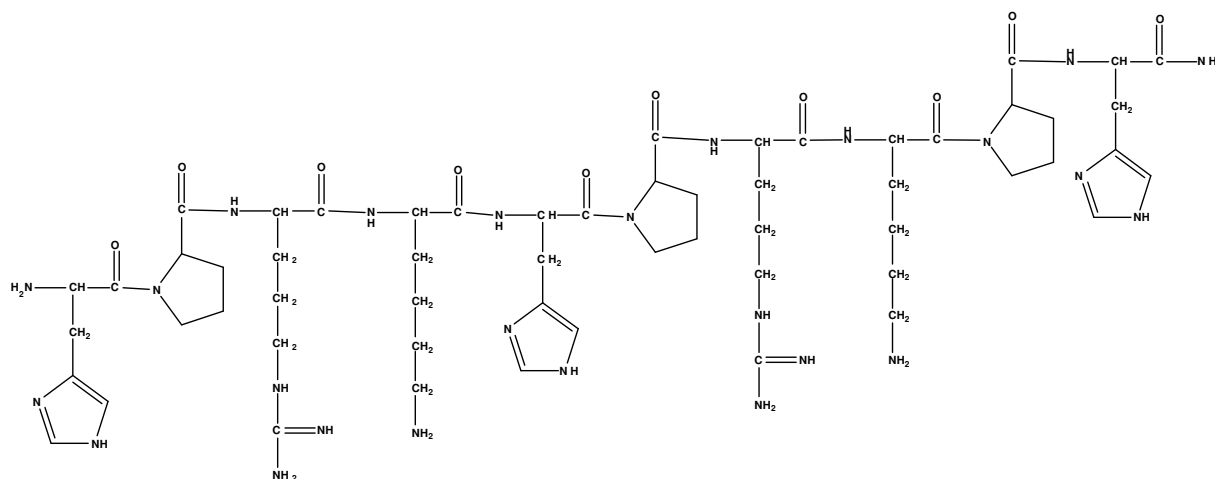
| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------|-----|-----|------|---|------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 0.1 | 0.5 | 0.8 | 1 | 1.8 | 2.5 | 3 | 5 | 8 | --- |
| Band A (mm / μM) | 2 | 1 | 1.25 | 1 | 0.83 | 1 | 1.167 | 1.6 | 1.5 | --- |
| Band B (mm / μM) | 2 | 1 | 1.25 | 1 | 0.83 | 1 | 1 | 1.4 | 1.3 | --- |

由周伊君學姊合成出 PyHR-9 序列⁷⁶，PyHKR-10 比 PyHR-9 多一個 Lys，經過比較之後，PyHR-9 的凝膠滯留係數為 0.94；PyHKR-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 1。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 PyHKR-10 對於 DNA 的結合能力比 PyHR-9 較佳。PyHKR-10 胺基酸側鏈多一個 Lys，在中性溶液下帶有正電荷，推斷帶電荷，導致與 DNA 的結合能力增加。

3-1-2 不含有 Py (Pyrrole) 之直鏈胜肽

RHR-10

His-Pro-Arg-Lys-His-Pro-Arg-Lys-Pro-His-CONH₂



分子式：C₅₇H₉₃N₂₅O₁₀

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =9.40 min

Resin : 100.0 mg

粗產物：82.46 mg；純化後產物：51.57 mg

產率：82.46 %；純化產率：56.54 %

產物為白色固體，熔點：123~127 °C

[α]_D²⁵：+38.08 (11.03 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS：理論值 1287.75，實驗值 1285.7 (100)，1286.6 (73.62)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

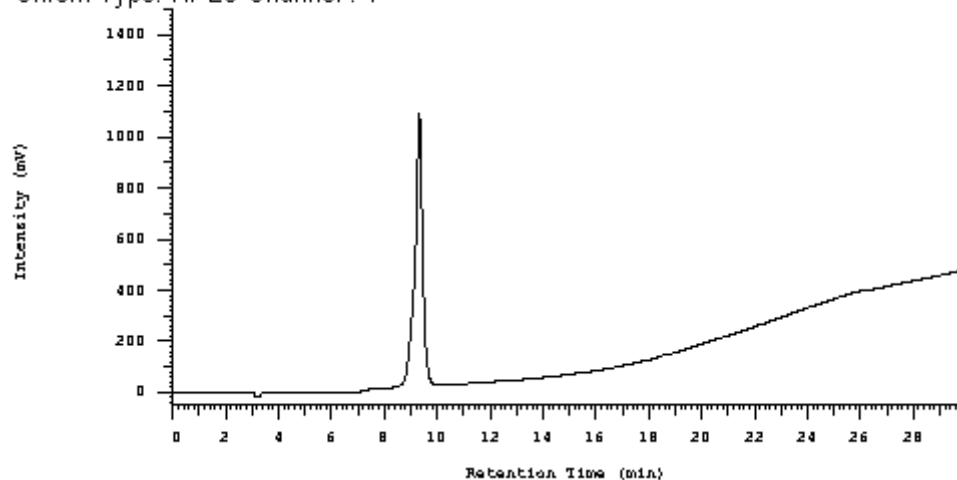


圖 3-15. RHR-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column，Rt =9.40 min)

49-RHR-10 #1-30 RT: 0.00-0.43 AV: 30 NL: 7.71E4
T: - e ESI Q1MS [200.000-2000.000]

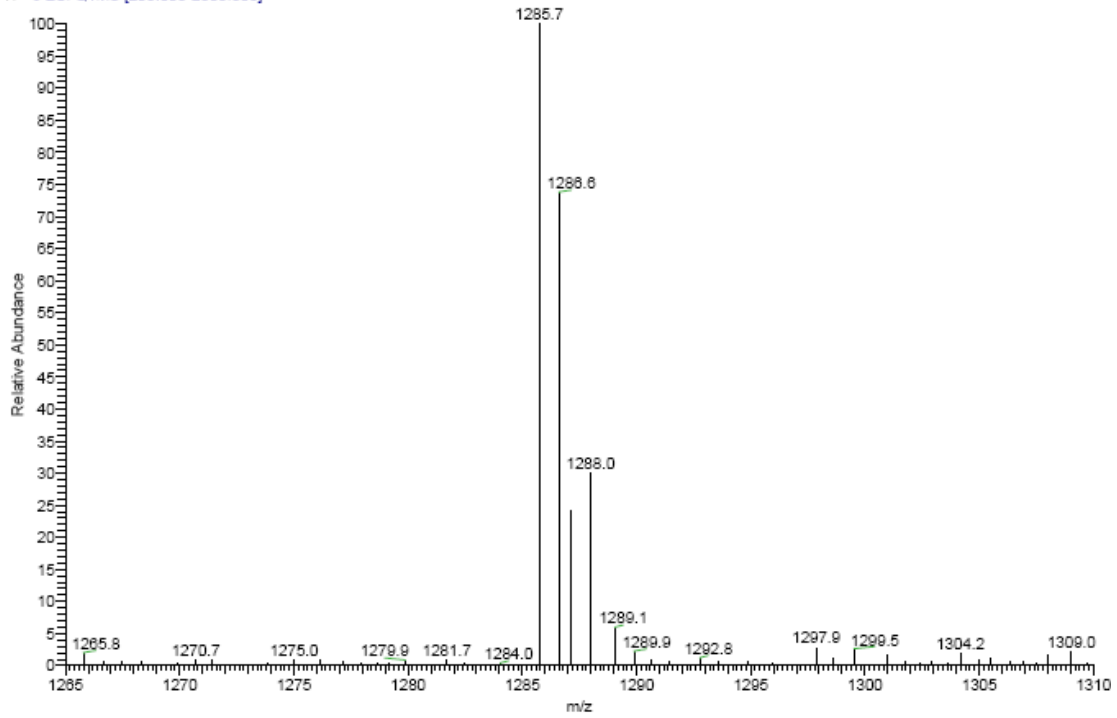


圖 3- 16. RHR-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

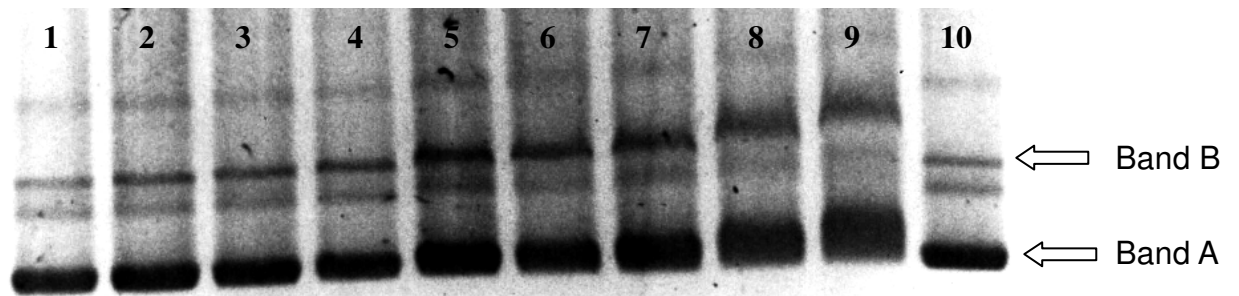
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：RHR-10 (0.1、0.5、0.8、1、1.8、2.5、3、5、8 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

RHR-10



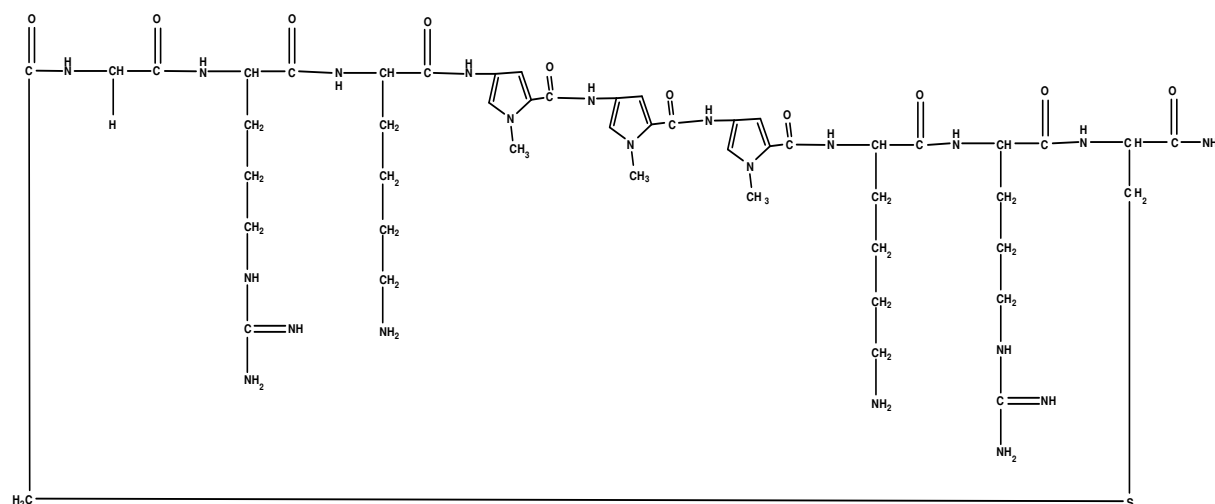
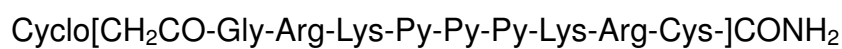
表十三. RHR-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---------------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-------|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 0.1 | 0.5 | 0.8 | 1 | 1.8 | 2.5 | 3 | 5 | 8 | --- |
| Band A (mm / μM) | 2 | 1 | 1 | 1.8 | 1.11 | 0.8 | 1.33 | 1 | 0.875 | --- |
| Band B (mm / μM) | 2 | 1 | 1.25 | 2.5 | 1.39 | 1.2 | 1.33 | 1.2 | 1 | --- |

XPRK 模組之直鏈胜肽 RHR-10，不含有 Py 結構，與高君翰學長合成的 PyHy-6 一樣不含 Py 結構⁷⁴，PyHy-6 在 $1\ \mu\text{M}$ 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 6 和 9；RHR-10 在 $1\ \mu\text{M}$ 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 1.8 和 2.5。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 RHR-10 對於 DNA 的結合能力比 PyHy-6 較不佳。

3-1-3 含有 Py (Pyrrole) 之環狀胜肽

CPy-9



分子式：C₄₉H₇₇N₂₁O₁₀S

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 18.90 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 32.66 mg ; 純化後產物 : 12.78 mg

產率 : 65.32 % ; 純化產率 : 39.13 %

產物為白色固體，熔點 : 126~132 °C

[α]_D²⁵ : -45.60 (12.28 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1151.59 , 實驗值 1150.0 (100) , 1151.0 (59.01)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

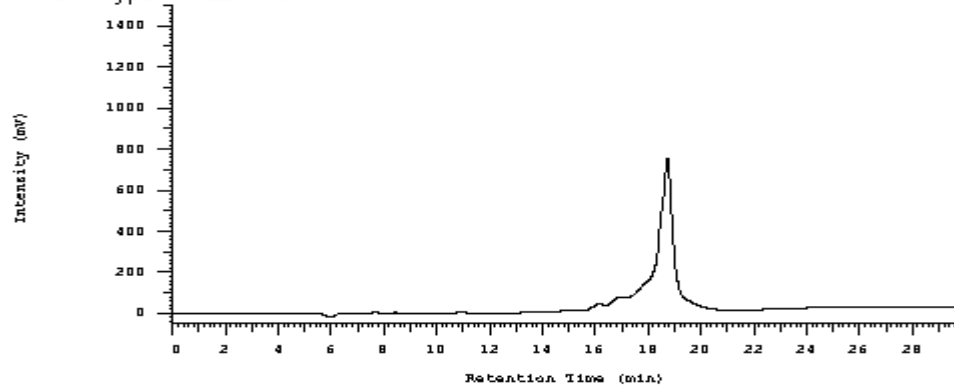


圖 3-17. CPy-9 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt = 18.90 min)

29-CPy-9 #1-30 RT: 0.01-0.43 AV: 30 NL: 6.04E4
T: - e ESI Q1MS [200.000-2000.000]

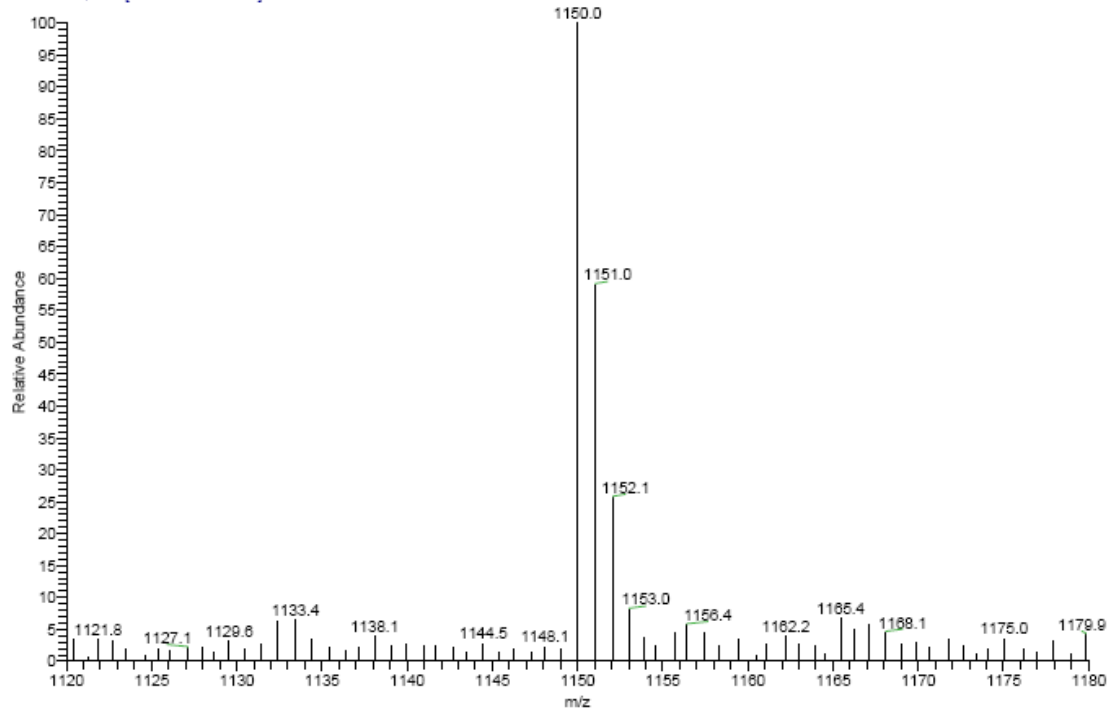


圖 3- 18. CPy-9 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

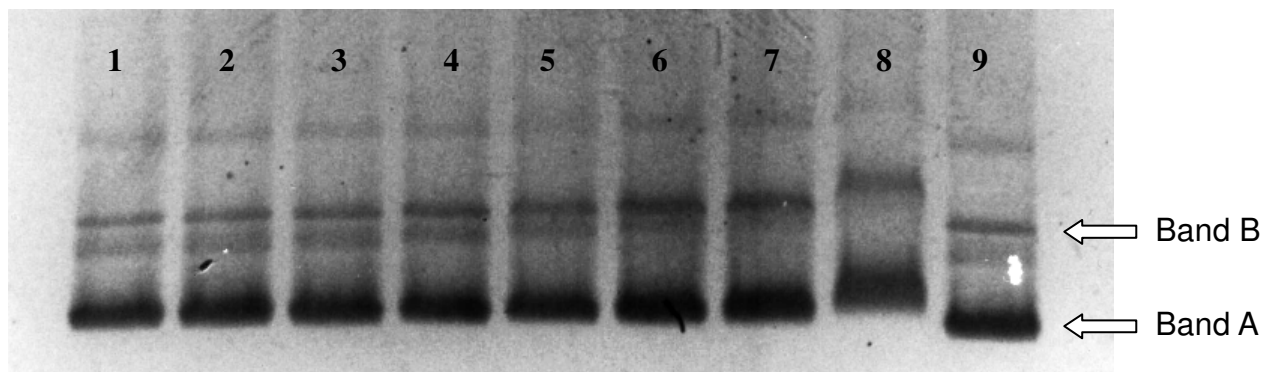
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~8：CPy-9 (0.5、1、2、3、5、6、8、10 μM)

Lane 9：pBluescript II SK(-) DNA only

CPy-9



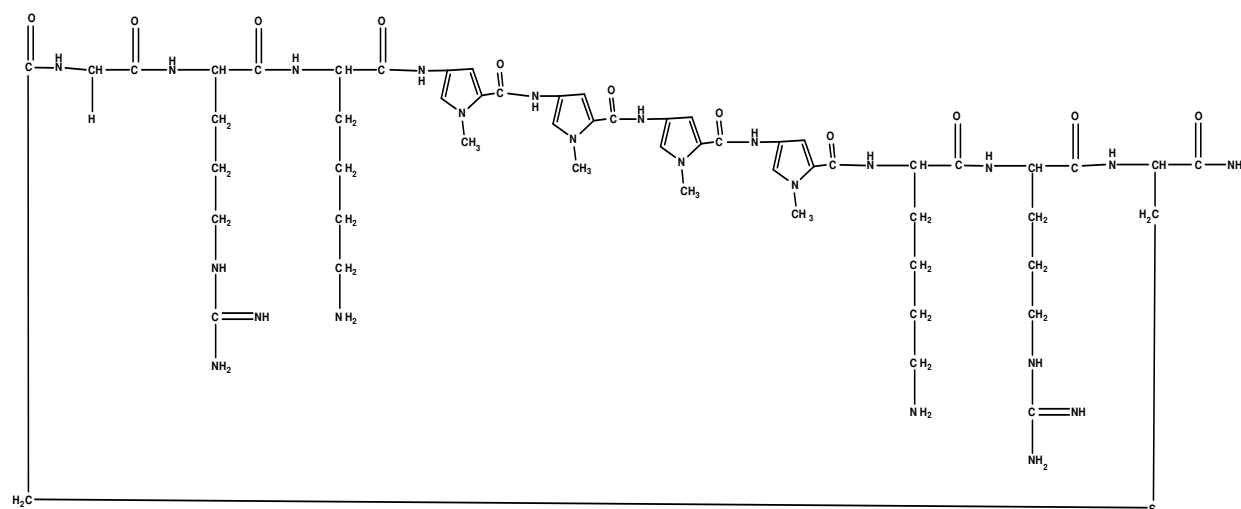
表十四. CPy-9 之濃度與凝膠滯留係數對照表

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------------------|-----|---|------|------|-----|------|-------|------|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 6 | 8 | 10 | --- |
| Band A (mm / μM) | 4 | 2 | 1.1 | 0.73 | 0.5 | 0.42 | 0.35 | 0.65 | --- |
| Band B (mm / μM) | 2.4 | 2 | 1.25 | 0.93 | 0.6 | 0.5 | 0.438 | 0.6 | --- |

環狀胜肽 CPy-9 含有 3 個 Py 結構，與高君翰學長合成的 CHPy-11⁷⁴，不同處為 CPy-9 少了 His 和 Hyp，CHPy-11 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 1 和 2.；CPy-9 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 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 CPy-9 對於 DNA 的結合能力比 CHPy-11 較佳。

CPy-10

Cyclo[CH₂CO-Gly-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-Cys-]CONH₂



分子式：C₅₅H₈₃N₂₃O₁₁S

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =20.80 min

Resin : 40.0 mg

粗產物：20.66 mg；純化後產物：3.95 mg

產率：51.65 %；純化產率：19.12 %

產物為白色固體，熔點：125~131 °C

[α]_D²⁵：-48.61 (14.40 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS：理論值 1273.64，實驗值 1271.6 (100)，1272.7 (69.90)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel: 1

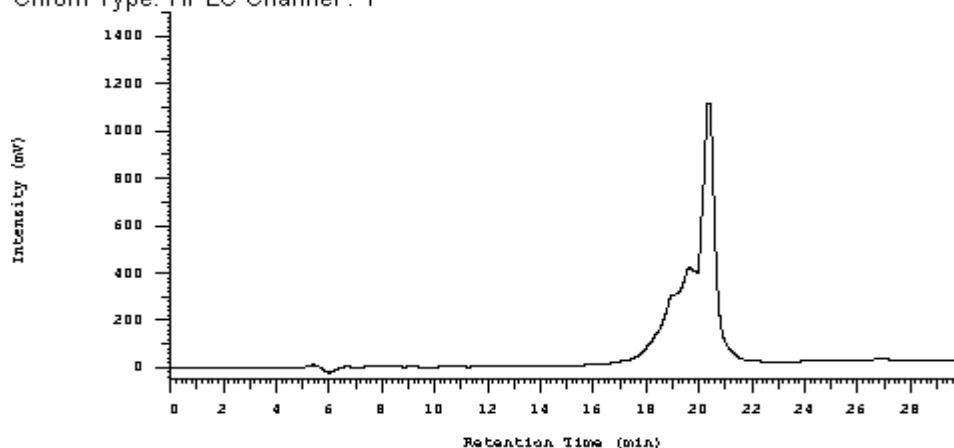


圖 3-19. CPy-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =20.80 min)

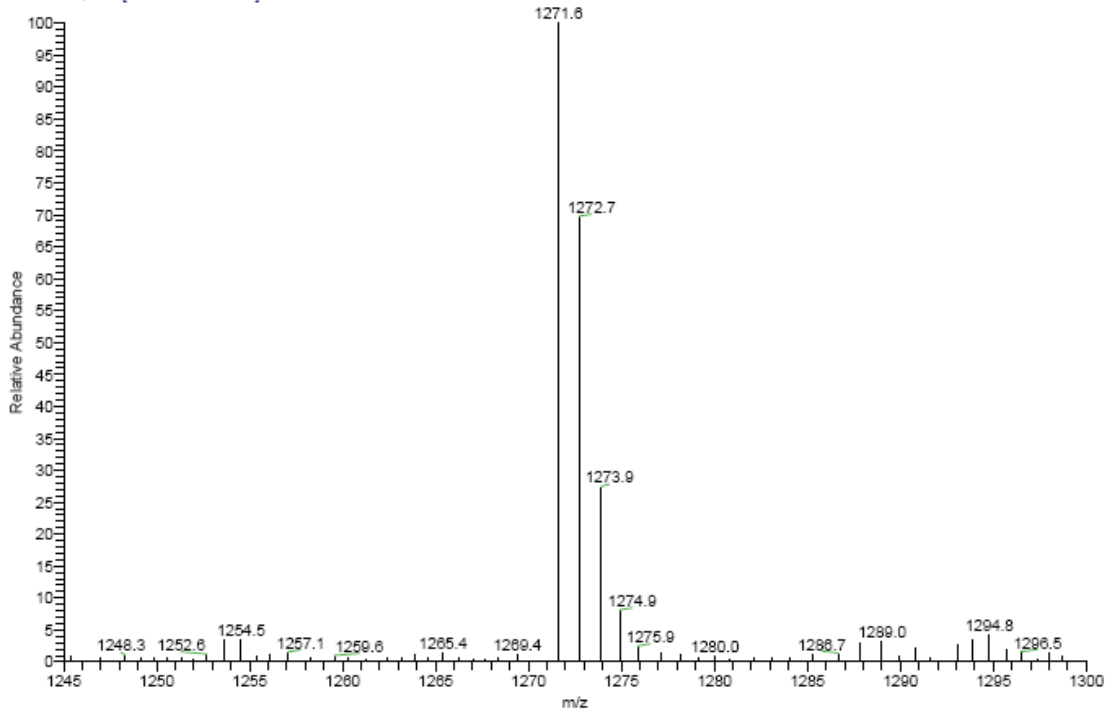
33-CPy-10 #1-30 RT: 0.00-0.43 AV: 30 NL: 1.54E5
T: -c ESI Q1MS [200.000-2000.000]

圖 3- 20. CPy-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

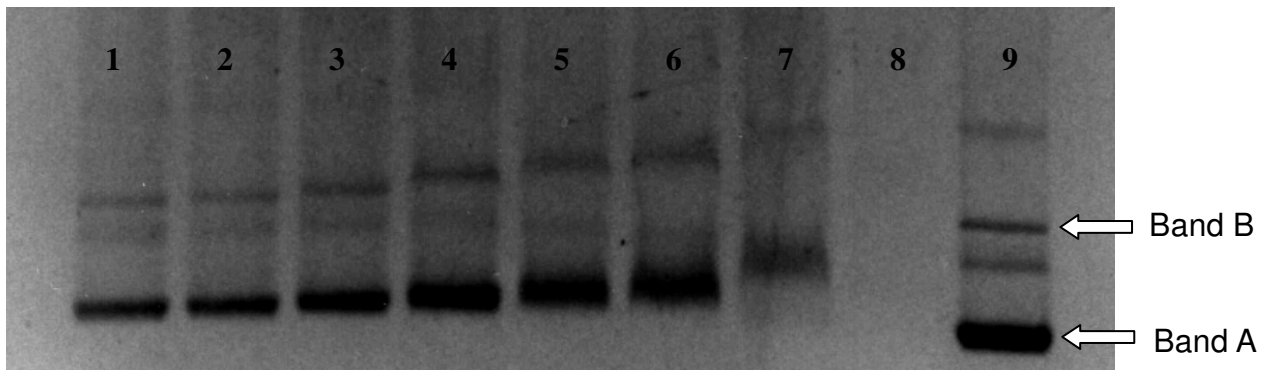
凝膠電泳實驗

反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~8：CPy-10 (0.5、1、2、3、5、6、8、10 μM)

Lane 9：pBluescript II SK(-) DNA only

CPy-10

表十五. CPy-10 之濃度與凝膠滯留係數對照表

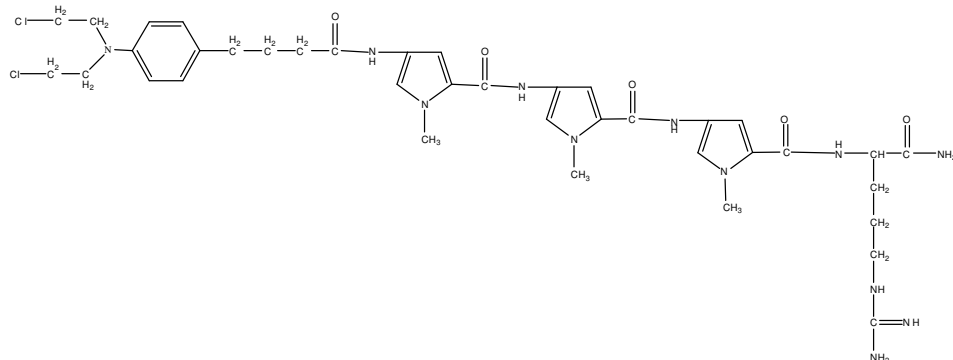
| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------------------------------|-----|---|-----|------|------|------|-------|-----|-----|
| Drug 濃度 (μM) | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 5 | 6 | 8 | 10 | --- |
| Band A (mm / μM) | 8 | 5 | 2.5 | 1.73 | 1.24 | 1.17 | 1.375 | --- | --- |
| Band B (mm / μM) | 7 | 4 | 2.5 | 2.33 | 1.8 | 1.67 | 1.625 | --- | --- |

環狀胜肽 CPy-10 含有四個 Py 結構，與王正一同學合成的 CHPy-12⁷⁵，不同處為 CPy-10 少了 His 和 Hyp，CHPy-12 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 3.2 和 2.1；CPy-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 5 和 4。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 CPy-10 對於 DNA 的結合能力比 CHPy-12 較佳。而 CPy-10 又比 CPy-9 多了一個 Py 結構，滯留效應越明顯，証實 Py 所耦合數目不同會對 DNA 的結合能力也有所影響²²

3-1-4 含有 CLB 之直鏈胜肽

CLB-PN3D

CLB-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₃₈H₅₀Cl₂N₁₂O₅

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 25.50 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 35.95 mg ; 純化後產物 : 17.37 mg

產率 : 71.90 % ; 純化產率 : 44.60 %

產物為白色固體，熔點 : 146~149 °C

[α]_D²⁵ : -7.91 (17.71 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 824.34 , 實驗值 825.2 (100) , 826.1 (68.37) , 827.2 (87.62)

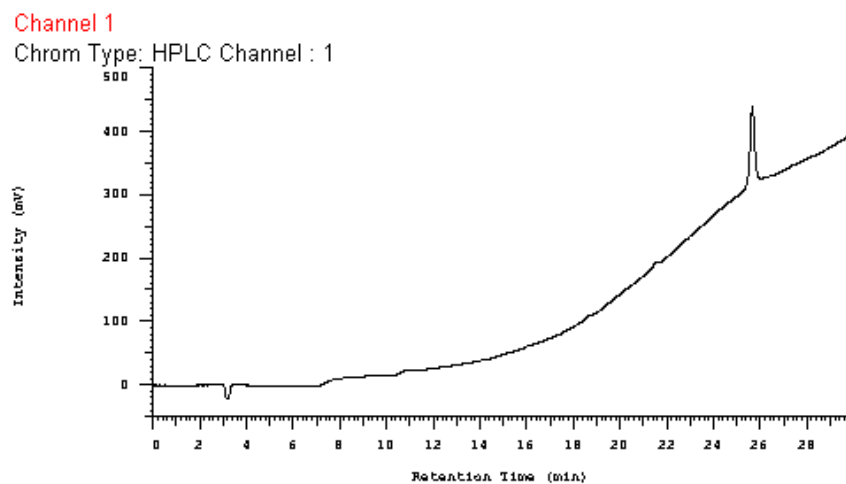


圖 3-21. CLB-PN3D 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =25.50 min)

71-CLB-PN3D #1-30 RT: 0.01-0.48 AV: 30 NL: 1.51E8
T: +c ESI Q1MS [200.000-2000.000]

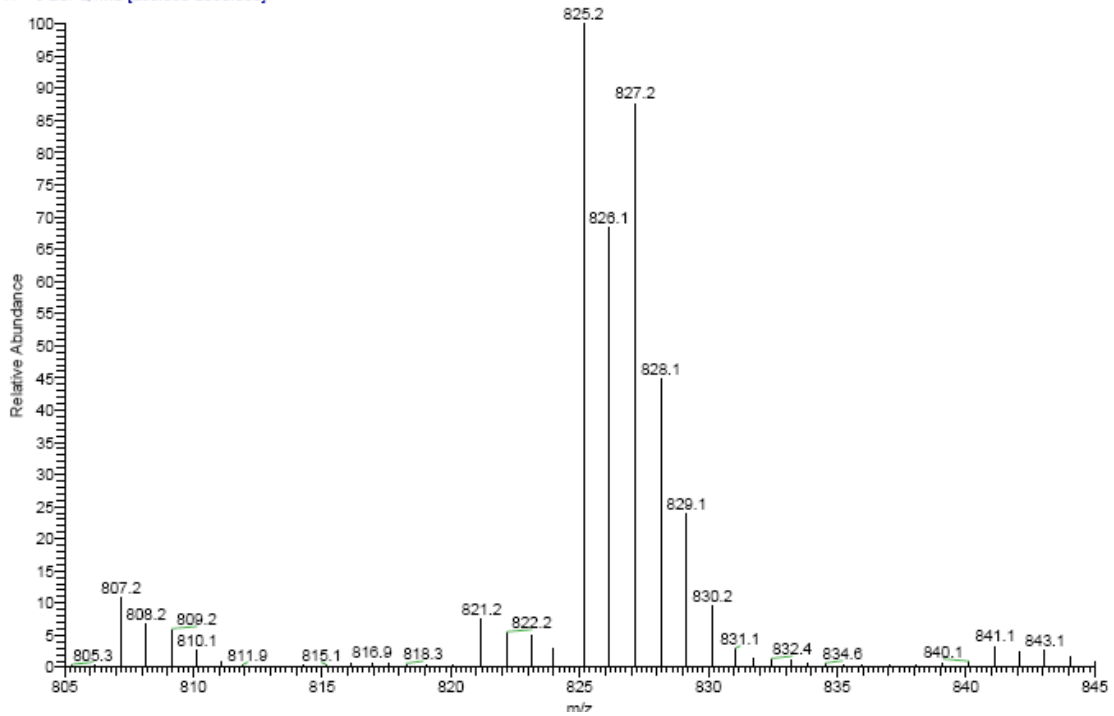


圖 3-22. CLB-PN3D ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

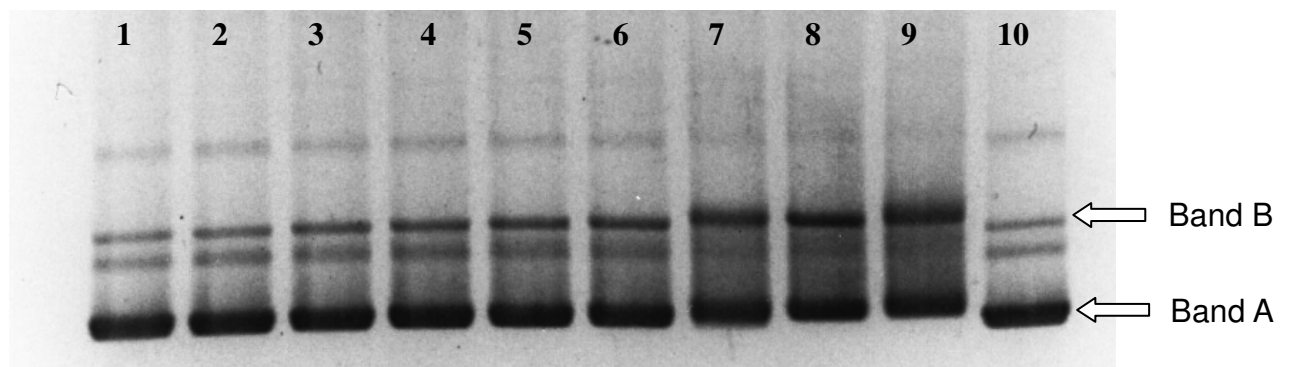
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-PN3D (0.5、1、3、5、8、10、15、20、25 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-PN3D



表十六. CLB-PN3D 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) | 0.5 | 1.0 | 3 | 5 | 8 | 10 | 15 | 20 | 25 | --- |
| Band A (mm / μM) | 1 | 1 | 0.33 | 0.24 | 0.15 | 0.12 | 0.12 | 0.1 | 0.1 | --- |
| Band B (mm / μM) | 1 | 0.5 | 0.33 | 0.24 | 0.15 | 0.12 | 0.08 | 0.05 | 0.048 | --- |

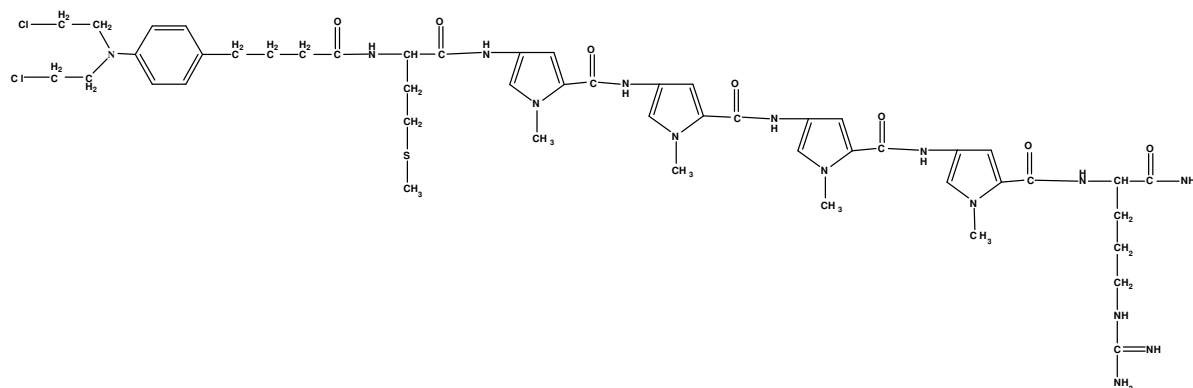
表十七. CLB-PN3D 之濃度與切割百分比對照表

| 序號 | Drug | Drug 濃度 (μM) | 切割百分比 (%) | 反應溫度 時間 |
|--------|----------|------------------------------|--------------|-----------------|
| Lane1 | CLB-PN3D | 0.5 | 35 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-PN3D | 1 | 36 | |
| Lane3 | CLB-PN3D | 3 | 37 | |
| Lane4 | CLB-PN3D | 5 | 38 | |
| Lane5 | CLB-PN3D | 8 | 38 | |
| Lane6 | CLB-PN3D | 10 | 38 | |
| Lane7 | CLB-PN3D | 15 | 40 | |
| Lane8 | CLB-PN3D | 20 | 40 | |
| Lane9 | CLB-PN3D | 25 | 41 | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

由高君翰學長合成出 CLB-PN3 序列⁷⁴，CLB-PN3D 比 CLB-PN3 少一個 Arg，經過比較之後，CLB-PN3 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 2 和 3；CLB-PN3D 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 1 和 0.5。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 CLB-PN3D 對於 DNA 的結合能力比 CLB-PN3 較不佳。CLB-PN3 在 0.1 μM 時的切割百分比為 16%，隨 CLB-PN3 濃度的增加切割百分比在 10 μM 時最高為 45%；CLB-PN3D 在 0.1 μM 時的切割百分比為 35%，隨 CLB-PN3D 濃度的增加切割百分比在 25 μM 時最高為 41%。推斷 CLB-PN3D 比 CLB-PN3 切割效果略差。

CLB-MPN-4

CLB-Met-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₄₉H₆₅Cl₂N₁₅O₇S

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =26.40 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 33.25 mg ; 純化後產物 : 10.21 mg

產率 : 66.50 % ; 純化產率 : 30.70 %

產物為白色固體，熔點 : 147~150 °C

[α]_D²⁵ : -9.10 (15.38 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1077.43 , 實驗值 1078.3 (93.15) , 1079.3 (100) ,
1080.1 (90.01)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

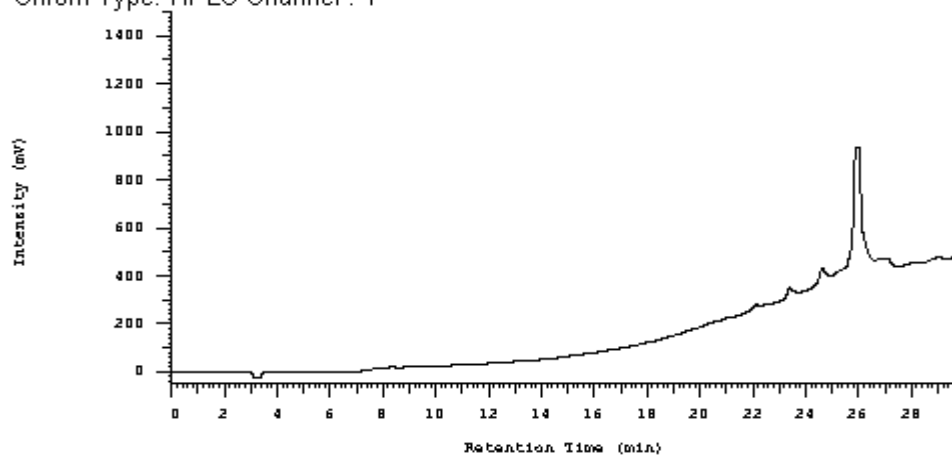


圖 3-23. CLB-MPN-4 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =26.40 min)

75-CLB-MPN-4 #1-30⁻ RT: 0.00-0.47⁻ AV: 30⁻ NL: 1.97E7
 T: + c ESI Q1MS [200.000-2000.000]

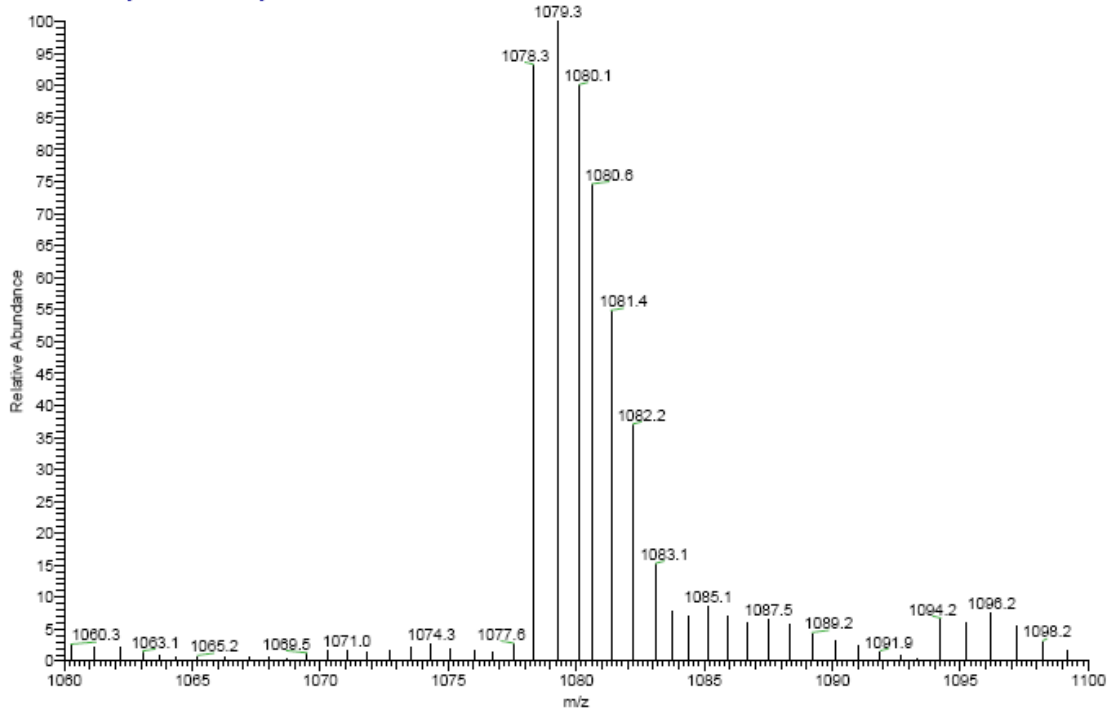


圖 3- 24. CLB-MPN-4 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

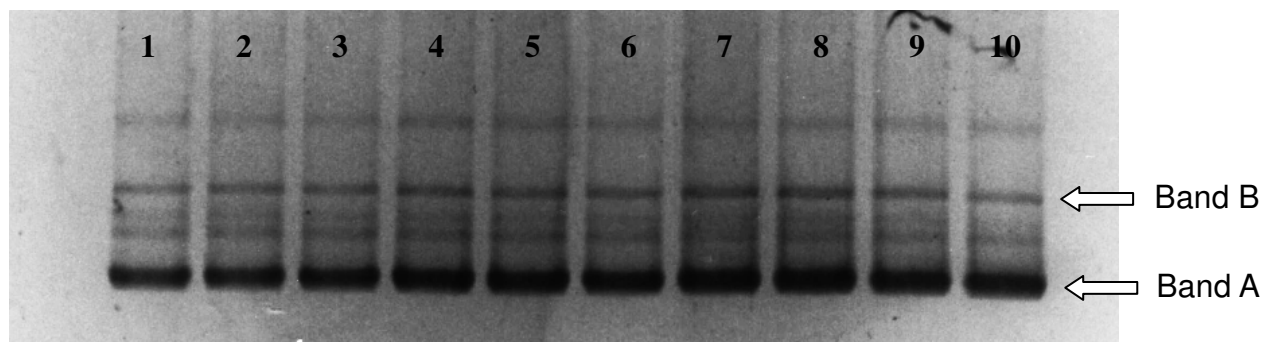
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-MPN-4 (0.5、1、3、5、8、10、15、20、25 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-MPN-4



表十八. CLB-MPN-4 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) | 0.5 | 1.0 | 3 | 5 | 8 | 10 | 15 | 20 | 25 | --- |
| Band A (mm / μM) | 3 | 1.2 | 0.33 | 0.2 | 0.063 | 0.05 | 0.033 | 0.025 | 0.008 | --- |
| Band B (mm / μM) | 2.4 | 1.2 | 0.4 | 0.24 | 0.125 | 0.1 | 0.067 | 0.05 | 0.04 | --- |

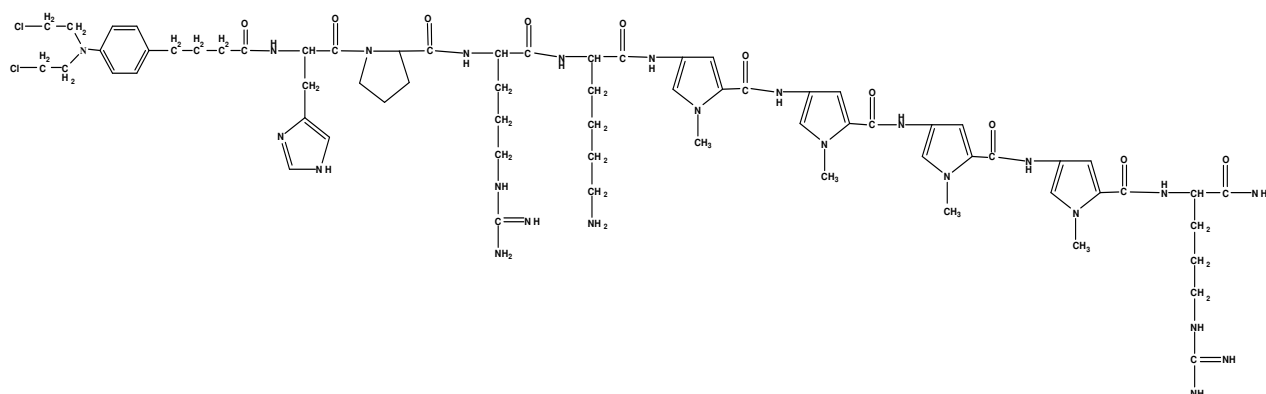
表十九. CLB-MPN-4 濃度與切割百分比對照表

| 序號 | Drug | Drug 濃度 (μM) | 切割百分比 (%) | 反應溫度 時間 |
|--------|-----------|------------------------------|--------------|-----------------|
| Lane1 | CLB-MPN-4 | 0.5 | 38 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-MPN-4 | 1 | 38 | |
| Lane3 | CLB-MPN-4 | 3 | 38 | |
| Lane4 | CLB-MPN-4 | 5 | 38 | |
| Lane5 | CLB-MPN-4 | 8 | 38 | |
| Lane6 | CLB-MPN-4 | 10 | 38 | |
| Lane7 | CLB-MPN-4 | 15 | 39 | |
| Lane8 | CLB-MPN-4 | 20 | 38 | |
| Lane9 | CLB-MPN-4 | 25 | 38 | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

由王正一同學合成出 CLB-PN4 序列⁷⁵，CLB-MPN-4 與 CLB-PN4 不同處，是把 CLB-PN4 的 Arg 換成 Met 成 CLB-MPN-4 序列，經過比較之後，CLB-PN4 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 3 和 3.8；CLB-MPN-4 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 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 CLB-MPN-4 對於 DNA 的結合能力比 CLB-PN4 較不佳。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%；CLB-MPN-4 在 0.5 μM 時的切割百分比為 38%，隨 CLB-MPN-4 濃度的增加切割百分比在 25 μM 時最高為 38%，推斷 CLB-MPN-4 隨著濃度增加並不會增加切割效果。

CLB-PyHR-9

CLB-His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Arg-CONH₂



分子式：C₆₇H₉₄Cl₂N₂₄O₁₀

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =22.30 min

Resin : 50.0 mg

粗產物：30.05 mg；純化後產物：7.96 mg

產率：60.10 %；純化產率：26.49 %

產物為白色固體，熔點：136~139 °C

[α]_D²⁵：-30.06 (13.97 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS：理論值 1464.70，實驗值 1465.6 (100)，1466.6 (82.82)，
1467.6 (95.40)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

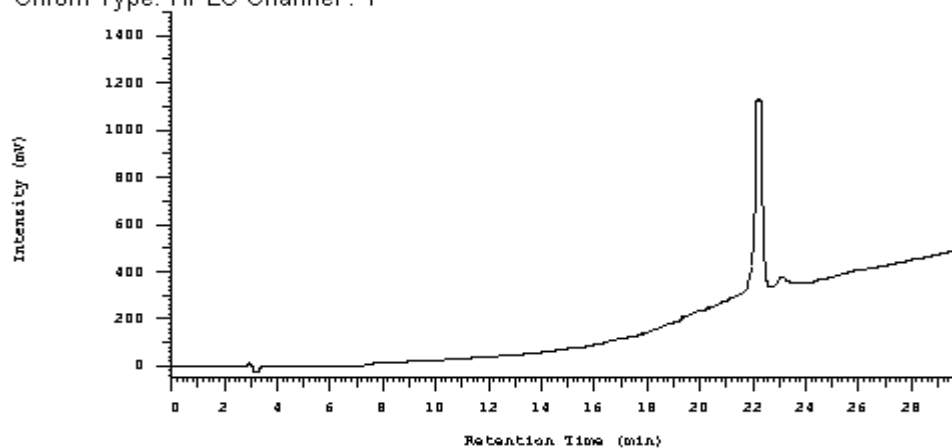


圖 3-25. CLB-PyHR-9 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =22.30 min)

13-CLB-PyHR-9-2 #1-39 RT: 0.02-0.99 AV: 39 NL: 6.26E6
T: +c ESI Full ms [150.00-2000.00]

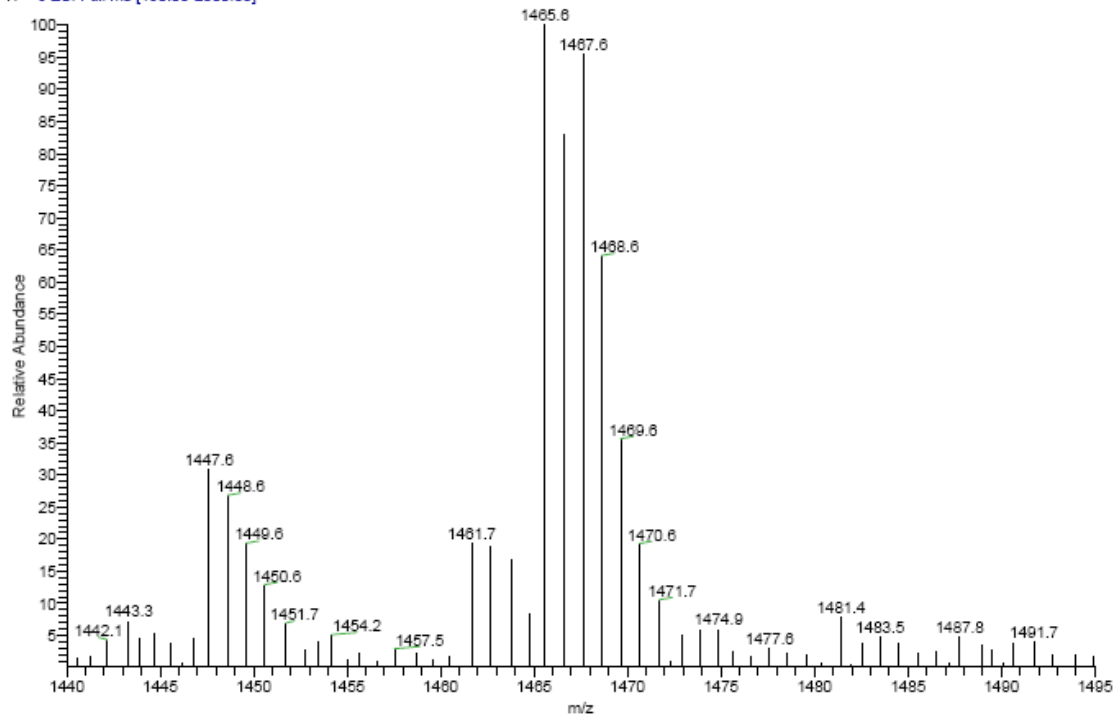


圖 3- 26. CLB-PyHR-9 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

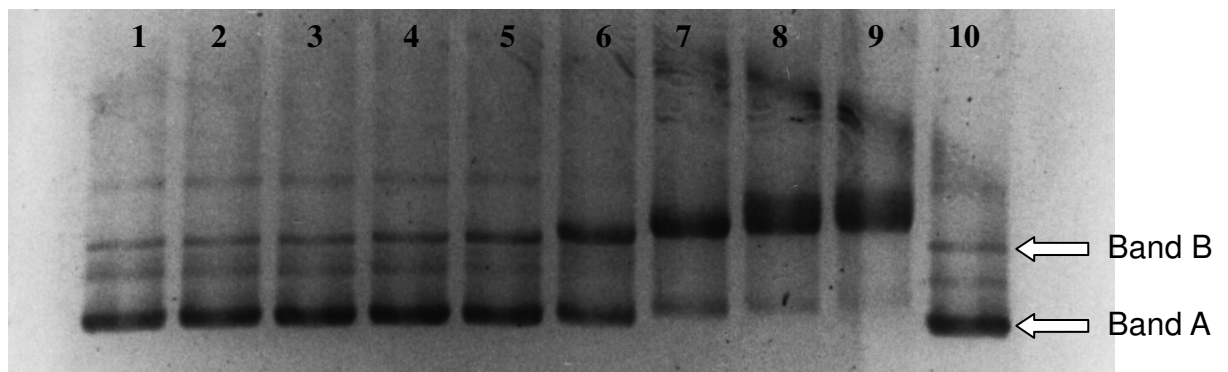
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-PyHR-9 (0.1、0.3、0.5、0.8、1、2、5、8、10 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-PyHR-9



表二十. CLB-PyHR-9 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) | 10 | 4 | 4 | 2.5 | 1.5 | 0.6 | 0.4 | --- | --- | --- |
| Band B (mm / μM) | 15 | 6.67 | 4 | 2.5 | 2 | 0.9 | 0.8 | 0.625 | 0.6 | --- |

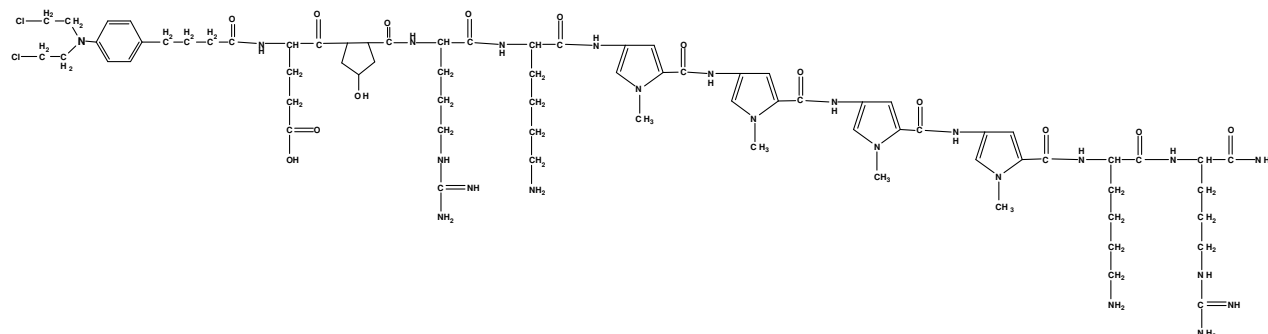
表二十一. CLB-PyHR-9 之濃度與切割百分比對照表

| 序號 | Drug | Drug 濃度 (μM) | 切割百分比 (%) | 反應溫度 時間 |
|--------|------------|------------------------------|--------------|-----------------|
| Lane1 | CLB-PyHR-9 | 0.1 | 38 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-PyHR-9 | 0.3 | 38 | |
| Lane3 | CLB-PyHR-9 | 0.5 | 38 | |
| Lane4 | CLB-PyHR-9 | 0.8 | 39 | |
| Lane5 | CLB-PyHR-9 | 1 | 40 | |
| Lane6 | CLB-PyHR-9 | 2 | 42 | |
| Lane7 | CLB-PyHR-9 | 5 | 45 | |
| Lane8 | CLB-PyHR-9 | 8 | 46 | |
| Lane9 | CLB-PyHR-9 | 10 | --- | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

XPRK 模組成出 CLB-PyHR-9 序列，CLB-PyHR-9 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 1.5 和 2。CLB-PyHR-9 在 0.1 μM 時的切割百分比為 38%，隨 CLB-PyMK-10 濃度的增加切割百分比在 8 μM 時最高為 46%。

CLB-HyE-10

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



分子式：C₇₃H₁₀₇Cl₂N₂₃O₁₄

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =21.30 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 32.98 mg ; 純化後產物 : 10.12 mg

產率 : 65.96 % ; 純化產率 : 30.69 %

產物為白色固體，熔點 : 130~135 °C

[α]_D²⁵ : -27.49 (15.28 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1599.77 , 實驗值 1601.7 (99.79) , 1602.7 (81.50) ,
1603.7 (100)

Channel 1

Chrom Type: HPLC Channel : 1

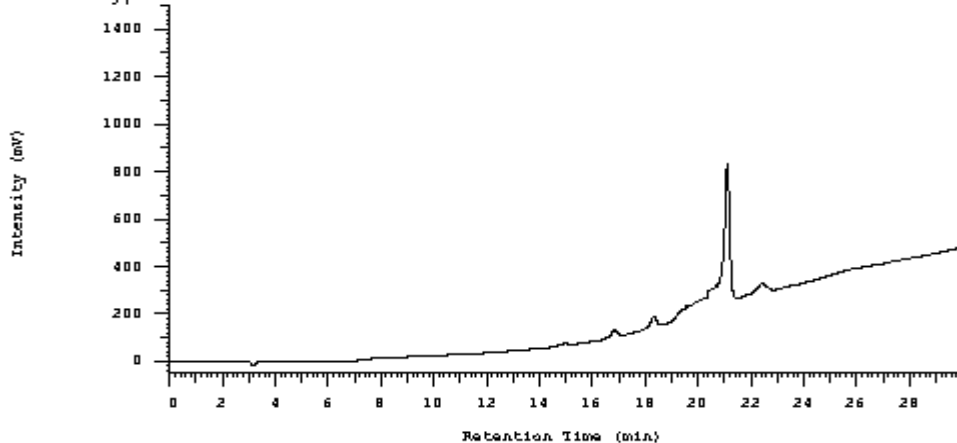


圖 3-27. CLB-HyE-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =21.30 min)

21-CLB-HyE-10 #1-30 RT: 0.01-0.75 AV: 30 NL: 7.18E6
T: +c ESI Full ms [150.00-2000.00]

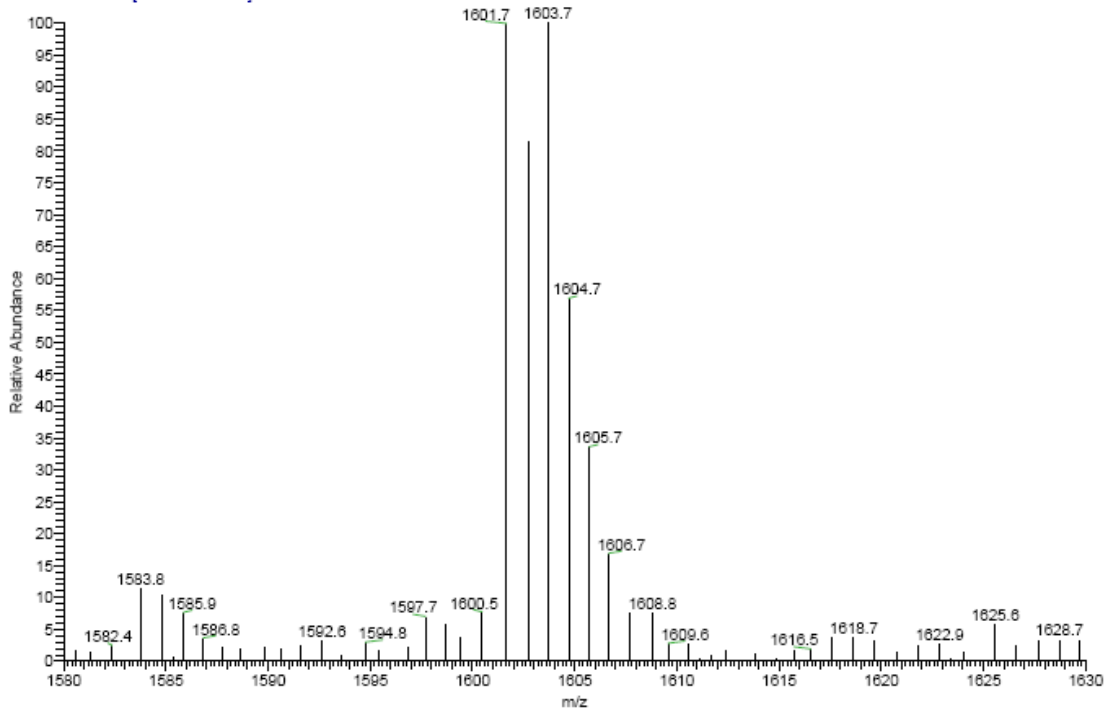


圖 3- 28. CLB-HyE-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

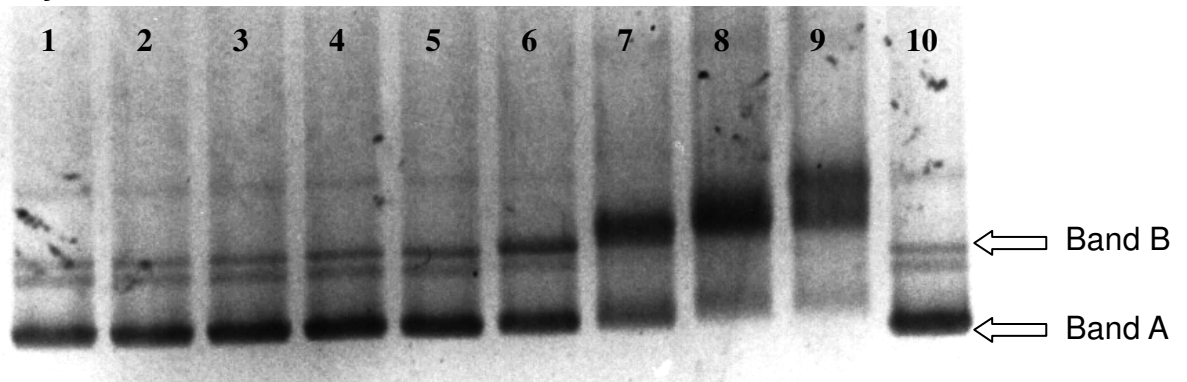
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-HyE-10 (0.1、0.3、0.5、0.8、1、2、5、8、10 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-HyE-10



表二十二. CLB-HyE-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) | 5 | 1.67 | 1 | 1.25 | 1 | 0.75 | 0.5 | 0.438 | 0.45 | --- |
| Band B (mm / μM) | 5 | 1.67 | 1 | 1.25 | 1 | 0.24 | 0.8 | 0.75 | 0.85 | --- |

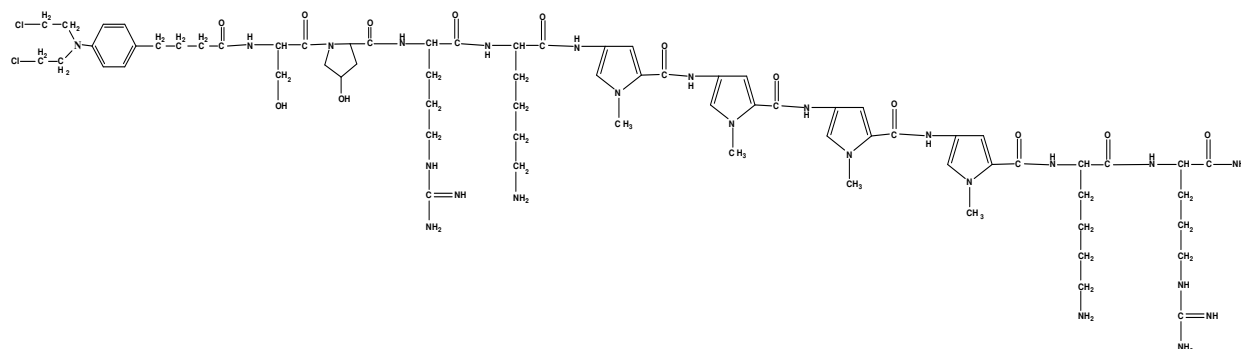
表二十三. CLB-HyE-10 之濃度與切割百分比對照表

| 序號 | Drug | Drug 濃度 (μM) | 切割百分比 (%) | 反應溫度 時間 |
|--------|------------|------------------------------|--------------|-----------------|
| Lane1 | CLB-HyE-10 | 0.1 | 39 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-HyE-10 | 0.3 | 39 | |
| Lane3 | CLB-HyE-10 | 0.5 | 39 | |
| Lane4 | CLB-HyE-10 | 0.8 | 39 | |
| Lane5 | CLB-HyE-10 | 1 | 41 | |
| Lane6 | CLB-HyE-10 | 2 | 44 | |
| Lane7 | CLB-HyE-10 | 5 | --- | |
| Lane8 | CLB-HyE-10 | 8 | --- | |
| Lane9 | CLB-HyE-10 | 10 | --- | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

由吳佳蓉學姊合成出 CLB-HyQ-10 序列⁷⁷，CLB-HyE-10 差異在一個側鏈胺基酸 Gln 置換成 Glu，經過比較之後，CLB-HyQ-10 的凝膠滯留係數為 6.0；CLB-HyE-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 1。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 CLB-HyE-10 對於 DNA 的結合能力比 CLB-HyQ-10 差。CLB-HyQ-10 在 1 μM 時的切割百分比為 42.17%，隨 CLB-HyQ-10 濃度的增加切割百分比在 3 μM 時最高為 69.45%；CLB-HyE-10 在 0.1 μM 時的切割百分比為 39%，隨 CLB-HyE-10 濃度的增加切割百分比在 2 μM 時最高為 44%。推斷 CLB-HyQ-10 為中性，CLB-HyE-10 在中性溶液帶有負電荷，可能因此影響切割效果。

CLB-HyS-10

CLB-Ser-Hyp-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH₂



分子式：C₇₀H₁₀₄Cl₂N₂₄O₁₃

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =21.90 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 37.67 mg ; 純化後產物 : 17.39 mg

產率 : 75.34 % ; 純化產率 : 46.16 %

產物為白色固體，熔點 : 134~137 °C

[α]_D²⁵ : -30.23 (16.21 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1558.76 , 實驗值 1559.7 (83.96) , 1560.6 (77.43) ,
1561.6 (100)

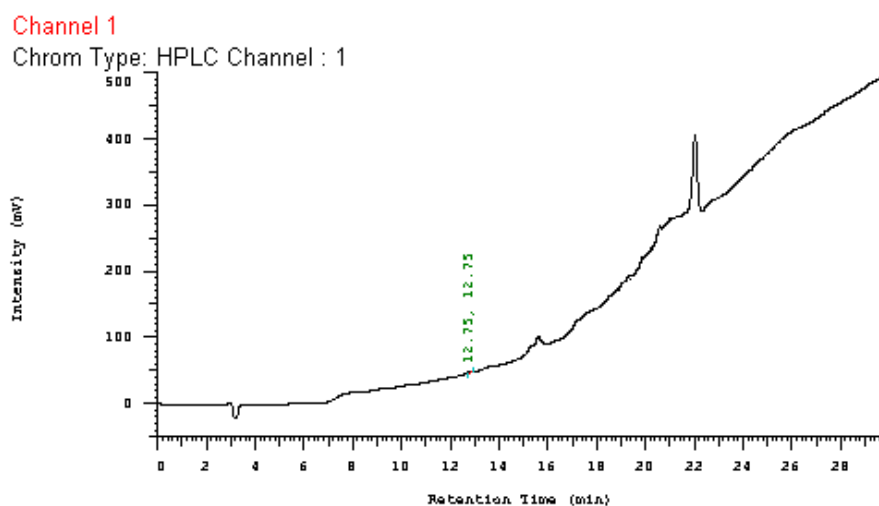


圖 3-29. CLB-HyS-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =21.90 min)

06-CLB-HyS-10 #1-39 RT: 0.02-1.00 AV: 39 NL: 1.15E8
T: +c ESI Full ms [150.00-2000.00]

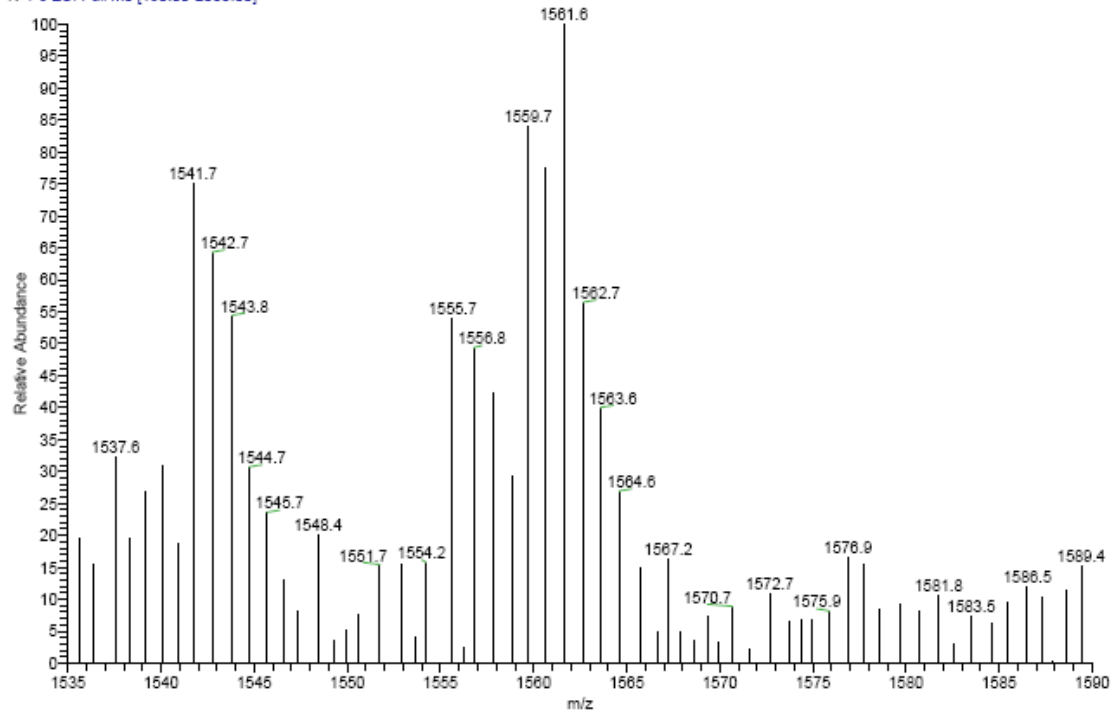


圖 3- 30. CLB-HyS-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

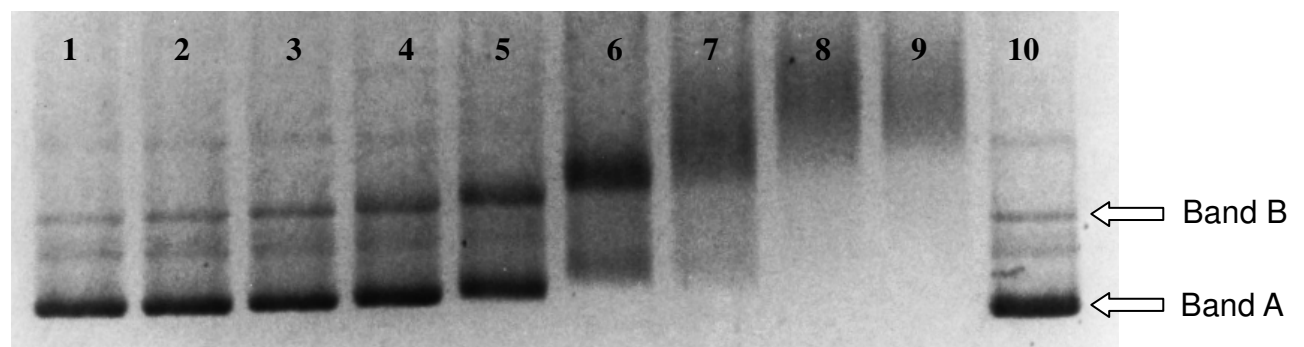
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-HyS-10 (0.1、0.3、0.5、0.8、1、2、5、8、10 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-HyS-10



表二十四. CLB-HyS-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) | 2 | 1.67 | 2.4 | 2.5 | 3 | 2.5 | --- | --- | --- | --- |
| Band B (mm / μM) | 2 | 1.67 | 2 | 2.25 | 2.5 | 3.5 | 2.4 | 2.125 | 1.8 | --- |

表二十五. CLB-HyS-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-HyS-10 | 0.1 | 37 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-HyS-10 | 0.3 | 38 | |
| Lane3 | CLB-HyS-10 | 0.5 | 39 | |
| Lane4 | CLB-HyS-10 | 0.8 | 39 | |
| Lane5 | CLB-HyS-10 | 1 | 41 | |
| Lane6 | CLB-HyS-10 | 2 | --- | |
| Lane7 | CLB-HyS-10 | 5 | --- | |
| Lane8 | CLB-HyS-10 | 8 | --- | |
| Lane9 | CLB-HyS-10 | 10 | --- | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

由吳佳蓉學姊合成出 CLB-HyM-10 序列⁷⁷，CLB-HyS-10 差異在一個側鏈胺基酸 Met 置換成 Ser，經過比較之後，CLB-HyM-10 的凝膠滯留細數為 4.5；CLB-HyS-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 3 和 2.5。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 CLB-HyS-10 對於 DNA 的結合能力比 CLB-HyM-10 略差。CLB-HyM-10 在 0.1 μM 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 μM 時最高為 65.70%；CLB-HyS-10 在 0.1 μM 時的切割百分比為 37%，隨 CLB-HyE-10 濃度的增加切割百分比在 1 μM 時最高為 41%。推斷 CLB-HyS-10 比 CLB-HyM-10 切割效果略差。

03-CLB-PyMK-10 #1-30 RT: 0.01-0.77 AV: 30 NL: 1.08E6
T: + e ESI Full ms [150.00-2000.00]

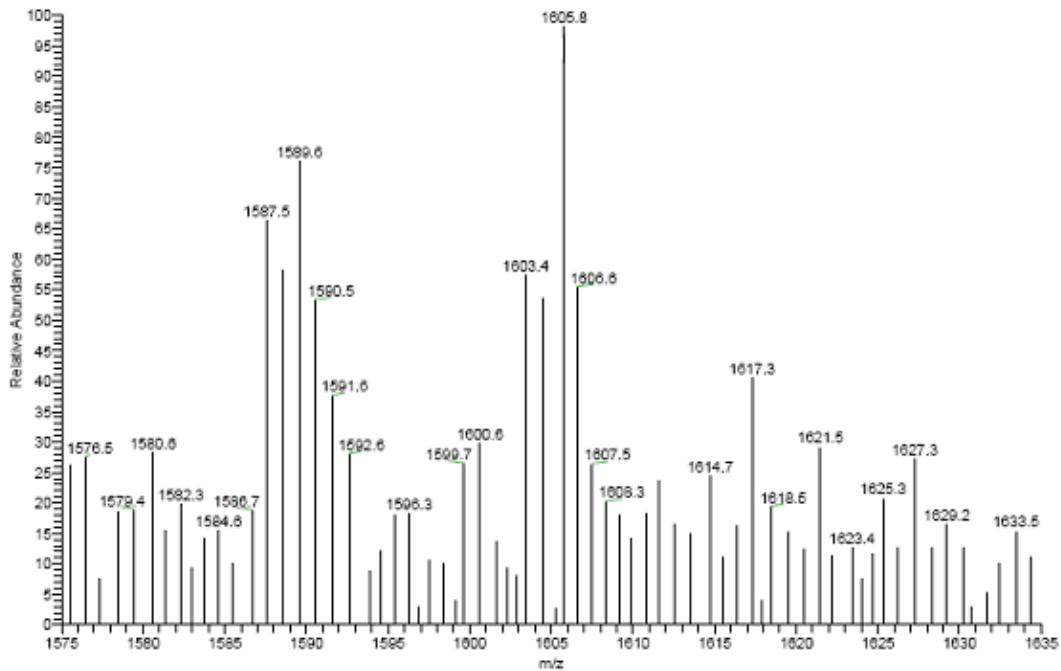


圖 3-32. CLB-PyMK-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

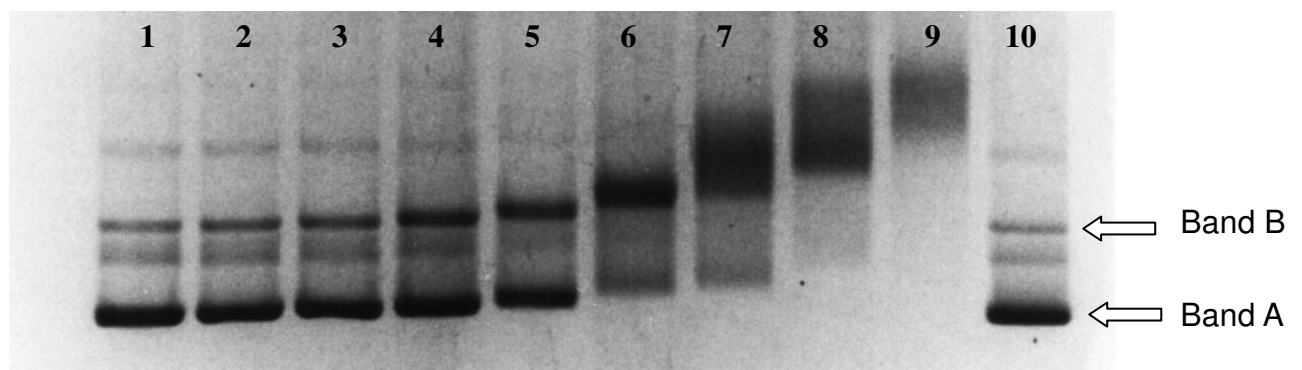
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane1~9：CLB-PyMK-10 (0.1、0.3、0.5、0.8、1、2、5、8、10 μM)

Lane10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-PyMK-10



表二十六. CLB-PyMK-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) | 2 | 3.33 | 2.4 | 1.875 | 2.8 | 2.5 | 1.1 | --- | --- | --- |
| Band B (mm / μM) | 5 | 3.33 | 2 | 1.5 | 1.5 | 2.5 | 2.2 | 1.75 | 1.9 | --- |

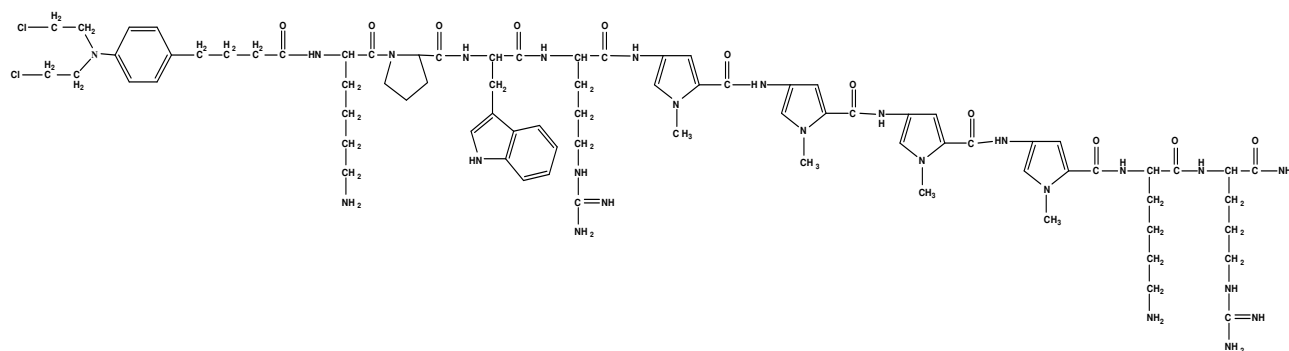
表二十七. CLB-PyMK-10 之濃度與切割百分比對照表

| 序號 | Drug | Drug 濃度 (μM) | 切割百分比 (%) | 反應溫度 時間 |
|--------|-------------|------------------------------|--------------|-----------------|
| Lane1 | CLB-PyMK-10 | 0.1 | 37 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-PyMK-10 | 0.3 | 38 | |
| Lane3 | CLB-PyMK-10 | 0.5 | 39 | |
| Lane4 | CLB-PyMK-10 | 0.8 | 40 | |
| Lane5 | CLB-PyMK-10 | 1 | 41 | |
| Lane6 | CLB-PyMK-10 | 2 | 44 | |
| Lane7 | CLB-PyMK-10 | 5 | 45 | |
| Lane8 | CLB-PyMK-10 | 8 | --- | |
| Lane9 | CLB-PyMK-10 | 10 | --- | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

XPRK 模組成出 CLB-PyMK-10 序列，CLB-PyMK-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 2.8 和 1.5。CLB-PyMK-10 在 0.1 μM 時的切割百分比為 37%，隨 CLB-PyMK-10 濃度的增加切割百分比在 5 μM 時最高為 45%。

CLB-PyWK-10

CLB-Lys-Pro-Trp-Arg-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH₂



分子式：C₇₈H₁₀₉Cl₂N₂₅O₁₁

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 23.00 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 30.56 mg ; 純化後產物 : 8.87 mg

產率 : 61.12 % ; 純化產率 : 29.02 %

產物為白色固體，熔點 : 132~138 °C

[α]_D²⁵ : -24.33 (17.26 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1641.81 , 實驗值 1642.5 (95.94) , 1643.6 (86.56) ,
1644.5 (100)

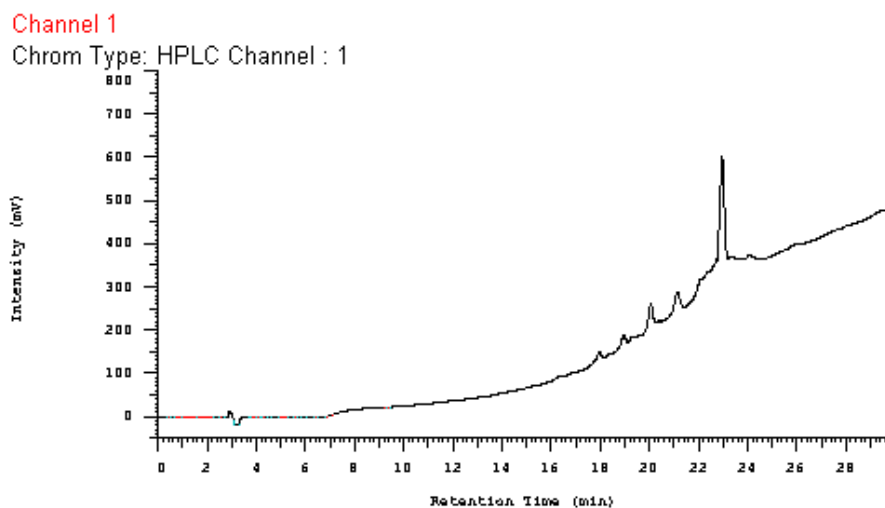


圖 3-33. CLB-PyWK-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =23.00 min)

11-CLB-PyWK-10 #1-78 RT: 0.02-2.00 AV: 78 NL: 2.22E6
T: +c ESI Full ms [150.00-2000.00]

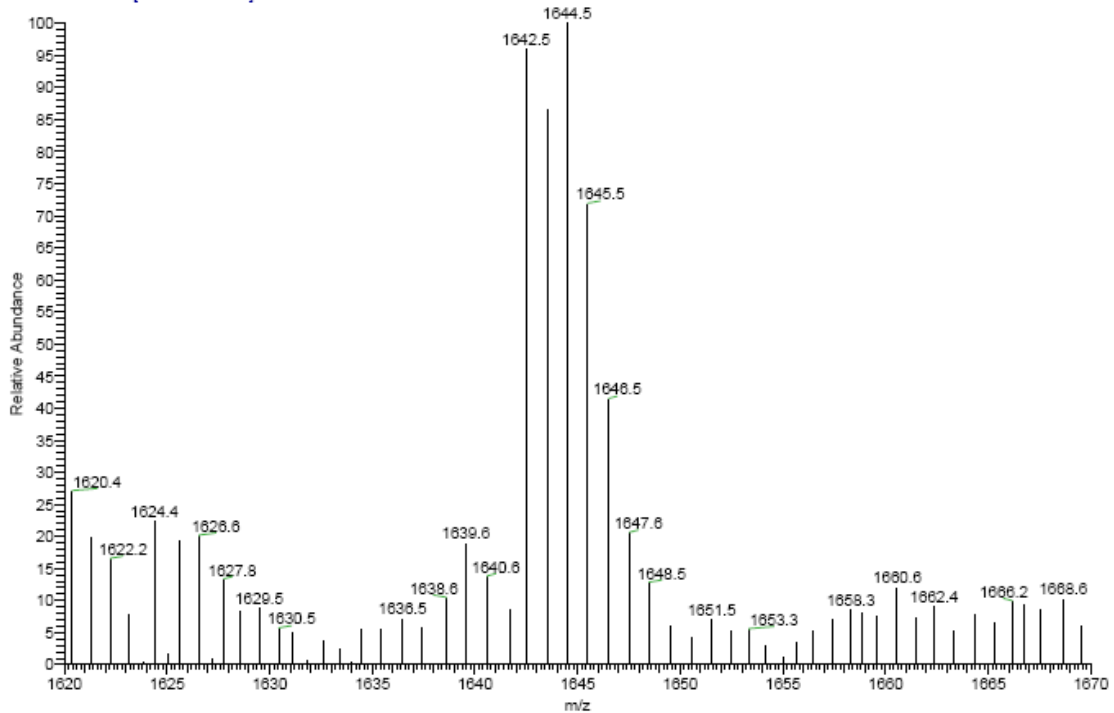


圖 3- 34. CLB-PWK-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

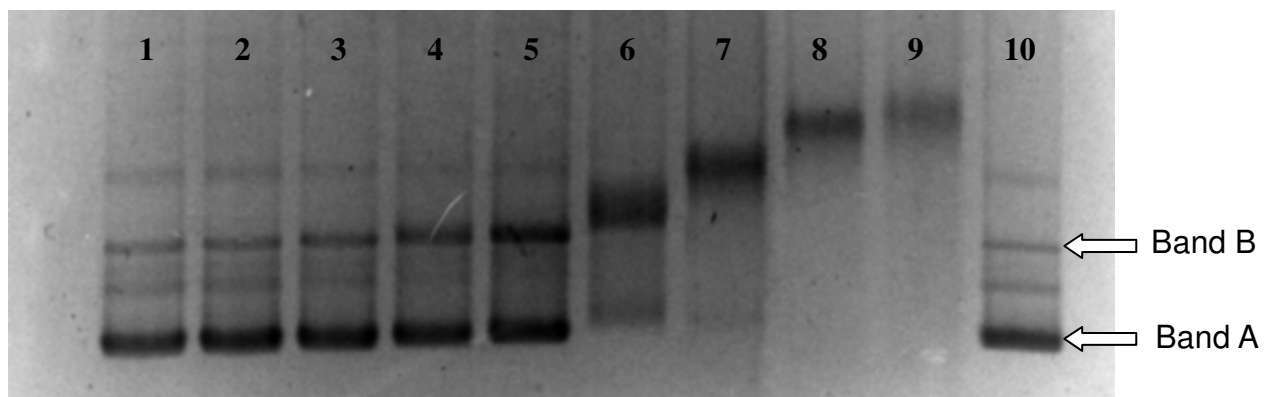
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-PyWK-10 (0.1、0.3、0.5、0.8、1、2、5、8、10 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-PyWK-10



表二十八. CLB-PyWK-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) | 5 | 3.33 | 2.4 | 2.5 | 2.2 | 2 | --- | --- | --- | --- |
| Band B (mm / μM) | 5 | 3.33 | 2.4 | 2.5 | 2.2 | 3.5 | 2.3 | 2.25 | 1.95 | --- |

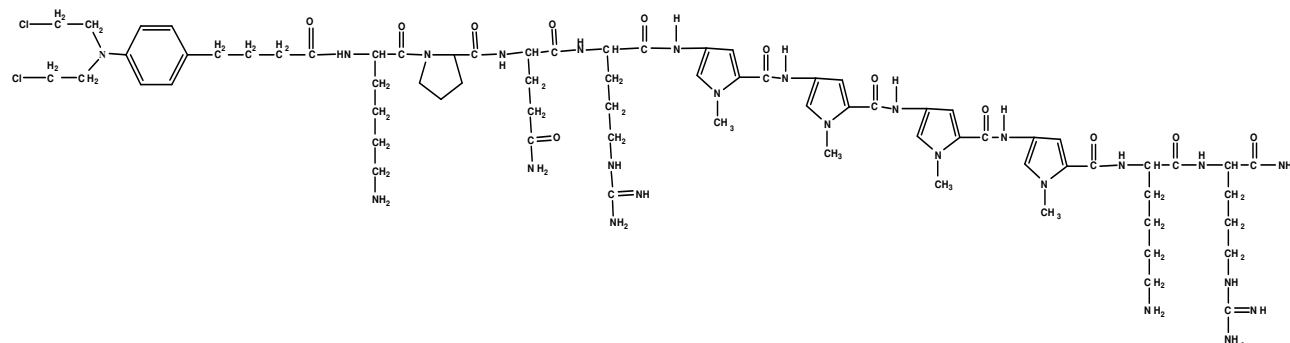
表二十九. CLB-PyWK-10 之濃度與切割百分比對照表

| 序號 | Drug | Drug 濃度 (μM) | 切割百分比 (%) | 反應溫度 時間 |
|--------|-------------|------------------------------|--------------|-----------------|
| Lane1 | CLB-PyWK-10 | 0.1 | 38 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-PyWK-10 | 0.3 | 38 | |
| Lane3 | CLB-PyWK-10 | 0.5 | 39 | |
| Lane4 | CLB-PyWK-10 | 0.8 | 40 | |
| Lane5 | CLB-PyWK-10 | 1 | 41 | |
| Lane6 | CLB-PyWK-10 | 2 | --- | |
| Lane7 | CLB-PyWK-10 | 5 | --- | |
| Lane8 | CLB-PyWK-10 | 8 | --- | |
| Lane9 | CLB-PyWK-10 | 10 | --- | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

XPRK 模組成出 CLB-PyWK-10 序列，CLB-PyWK-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 2.2。CLB-PyMK-10 在 0.1 μM 時的切割百分比為 38%，隨 CLB-PyMK-10 濃度的增加切割百分比在 1 μM 時最高為 41%。

CLB-PyQK-10

CLB-Lys-Pro-Gln-Arg-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH₂



分子式：C₇₂H₁₀₇Cl₂N₂₅O₁₂

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt =22.40 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 36.43 mg ; 純化後產物 : 13.79 mg

產率 : 72.86 % ; 純化產率 : 47.85 %

產物為白色固體，熔點 : 135~140 °C

[α]²⁵_D : -24.44 (14.32 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1583.79 , 實驗值 1584.5 (73.20) , 1585.5 (61.60) ,
1586.5 (100)

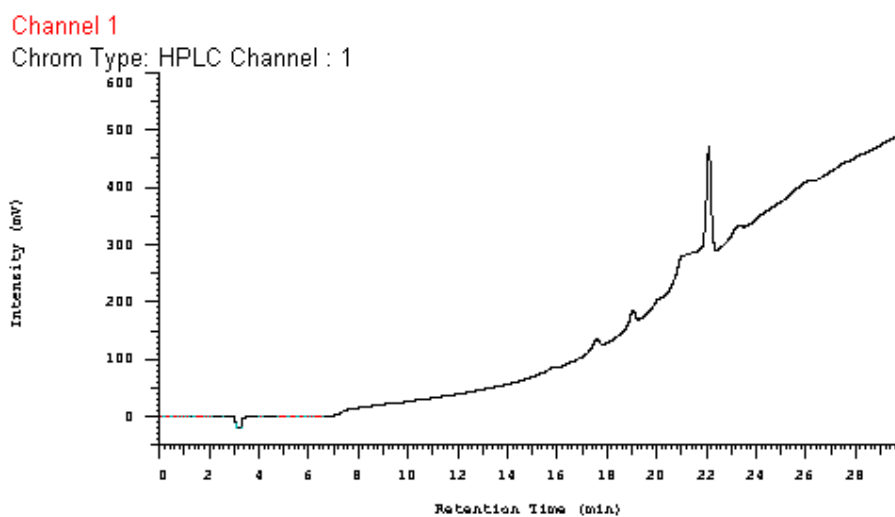


圖 3-35. CLB-PyQK-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =22.40 min)

34-CLB-PyQK-10 #1-30⁻ RT: 0.02-0.76⁻ AV: 30⁻ NL: 2.47E8
T: +c ESI Full ms [150.00-2000.00]

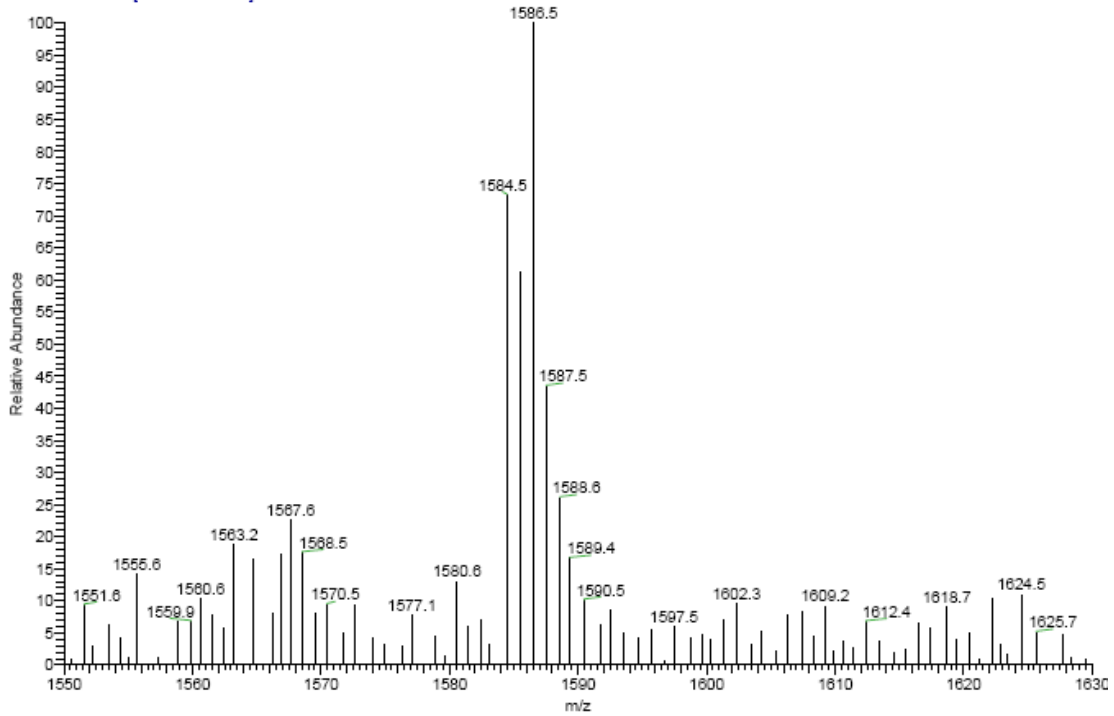


圖 3- 36. CLB-PyQK-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

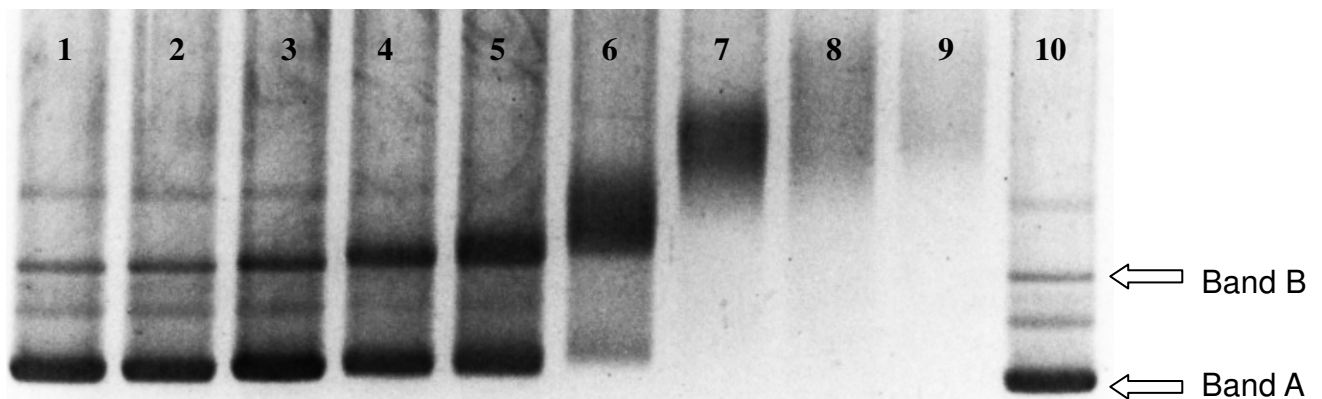
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-PyQK-10 (0.1、0.3、0.5、0.8、1、2、5、8、10 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-PyQK-10



表三十. CLB-PyQK-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) | 2 | 1.67 | 2 | 2.25 | 2 | 1.6 | --- | --- | --- | --- |
| Band B (mm / μM) | 5 | 3.33 | 2 | 2.25 | 3 | 4 | 3.6 | --- | --- | --- |

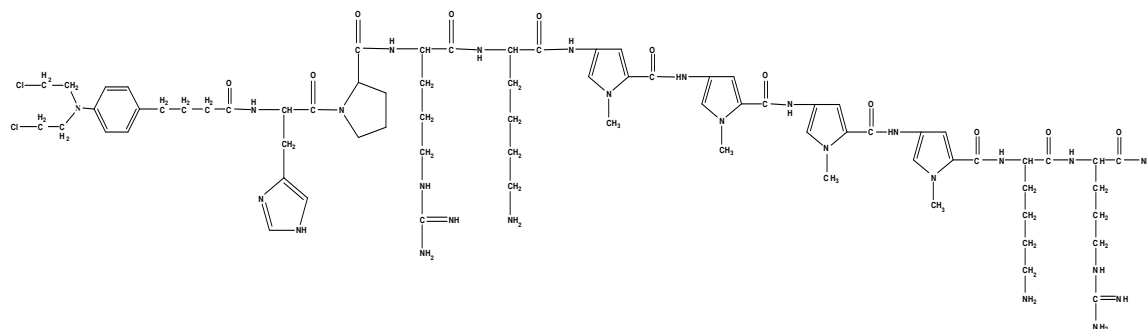
表三十一. CLB-PyQK-10 之濃度與切割百分比對照表

| 序號 | Drug | Drug 濃度 (μM) | 切割百分比 (%) | 反應溫度 時間 |
|--------|-------------|------------------------------|--------------|-----------------|
| Lane1 | CLB-PyQK-10 | 0.1 | 37 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-PyQK-10 | 0.3 | 38 | |
| Lane3 | CLB-PyQK-10 | 0.5 | 39 | |
| Lane4 | CLB-PyQK-10 | 0.8 | 41 | |
| Lane5 | CLB-PyQK-10 | 1 | 42 | |
| Lane6 | CLB-PyQK-10 | 2 | 47 | |
| Lane7 | CLB-PyQK-10 | 5 | --- | |
| Lane8 | CLB-PyQK-10 | 8 | --- | |
| Lane9 | CLB-PyQK-10 | 10 | --- | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

XPRK 模組成出 CLB-PyQK-10 序列，CLB-PyQK-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 2 和 3。CLB-PyQK-10 在 0.1 μM 時的切割百分比為 37%，隨 CLB-PyMK-10 濃度的增加切割百分比在 1 μM 時最高為 42%。CLB-PyQK-10、CLB-PyWK-10 和 CLB-PyMK-10 分別在序列中有一個胺基酸差異為 Gln、Trp 和 Met，其中 CLB-PyQK-10 凝膠滯留效果最佳，其次是 CLB-PyMK-10 和 CLB-PyWK-10。而切割效果三者都相當。

CLB-PyHK-10

CLB-His-Pro-Arg-Lys-Py-Py-Py-Py-Lys-Arg-CONH₂



分子式：C₇₃H₁₀₆Cl₂N₂₆O₁₁

HPLC (0.4 × 25 cm column) Rt = 21.60 min

Resin : 50.0 mg

粗產物 : 36.43 mg ; 純化後產物 : 13.79 mg

產率 : 72.86 % ; 純化產率 : 47.85 %

產物為白色固體，熔點 : 130~136 °C

[α]_D²⁵ : -25.38 (19.31 mg / 7 mL 去離子水)

ESI-MS : 理論值 1592.79 , 實驗值 1593.6 (100) , 1594.6 (75.89) ,
1595.5 (80.70)

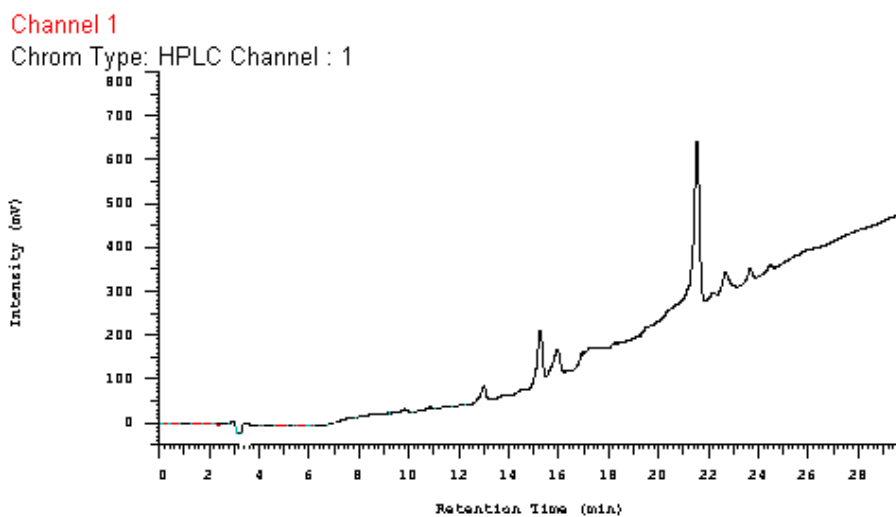


圖 3-37. CLB-PyHK-10 純化之 HPLC 層析圖
(0.4 × 25 cm column , Rt =21.60 min)

24-CLB-PyHK-10 #1-78 RT: 0.01-2.00 AV: 78 NL: 1.26E6
T: +c ESI Full ms [150.00-2000.00]

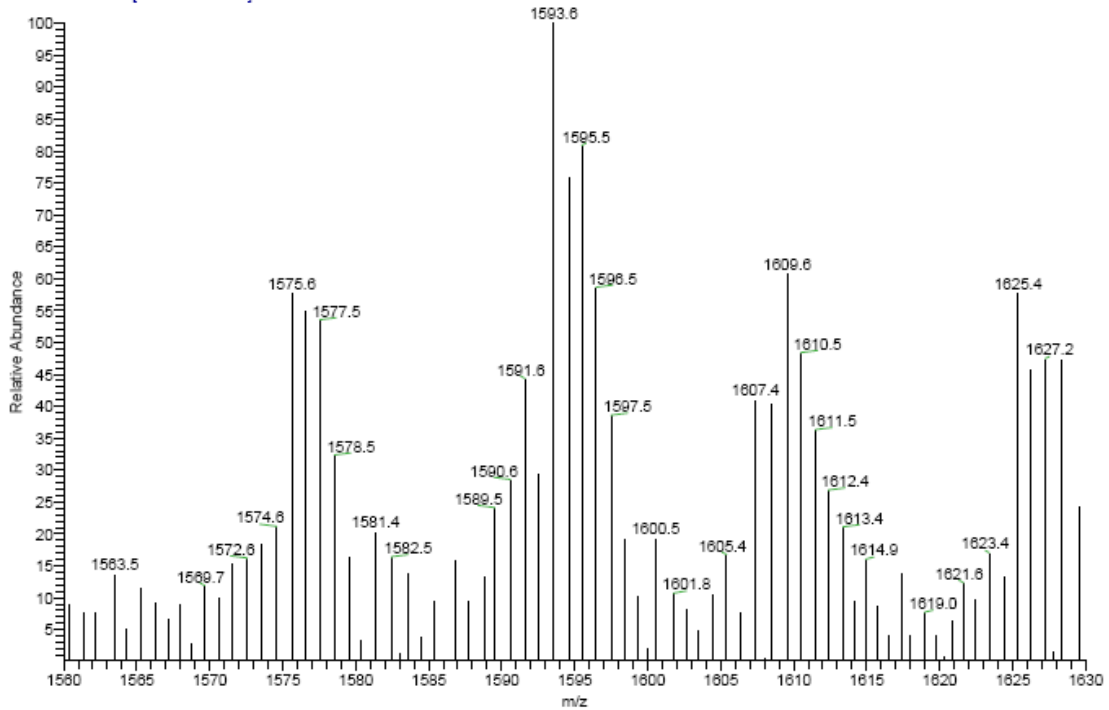


圖 3- 38. CLB-PyHK-10 ESI-MS 質譜儀分析圖

凝膠電泳實驗

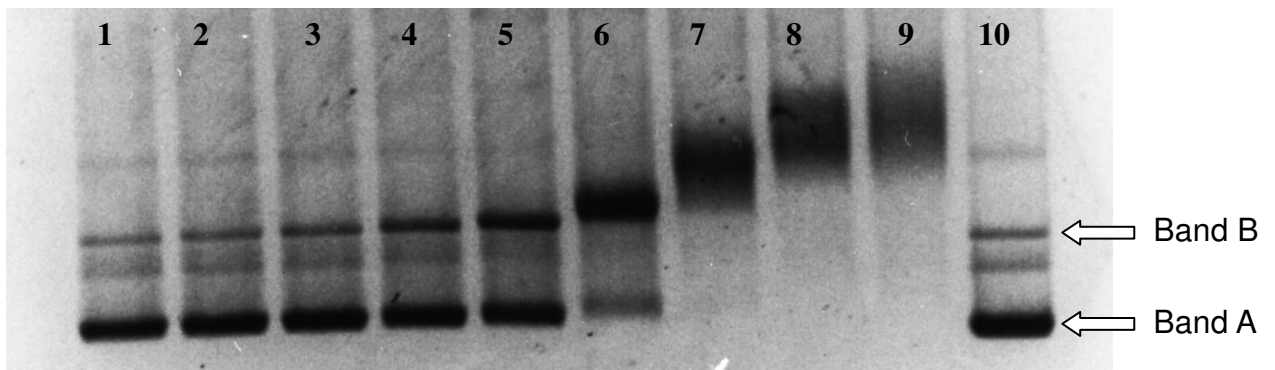
反應時間：25 min ； 反應溫度：65 °C

Buffer：0.5 × TBE，pH 7.4

Lane 1~9：CLB-PyHK-10 (0.1、0.3、0.5、0.8、1、2、5、8、10 μM)

Lane 10：pBluescript II SK(-) DNA only

CLB-PyHK-10



表三十二. CLB-PyHK-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) | 10 | 3.33 | 2.4 | 2 | 2 | 1.5 | --- | --- | --- | --- |
| Band B (mm / μM) | 5 | 3.33 | 2.4 | 2 | 2 | 2.5 | 2.2 | 1.875 | 1.8 | --- |

表三十三. CLB-PyHK-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-PyHK-10 | 0.1 | 36 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | CLB-PyHK-10 | 0.3 | 37 | |
| Lane3 | CLB-PyHK-10 | 0.5 | 38 | |
| Lane4 | CLB-PyHK-10 | 0.8 | 39 | |
| Lane5 | CLB-PyHK-10 | 1 | 41 | |
| Lane6 | CLB-PyHK-10 | 2 | 46 | |
| Lane7 | CLB-PyHK-10 | 5 | --- | |
| Lane8 | CLB-PyHK-10 | 8 | --- | |
| Lane9 | CLB-PyHK-10 | 10 | --- | |
| Lane10 | --- | --- | --- | |

XPRK 模組成出 CLB-PyHK-10 序列，CLB-PyHK-10 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數皆為 2。CLB-PyHK-10 在 0.1 μM 時的切割百分比為 36%，隨 CLB-PyMK-10 濃度的增加切割百分比在 2 μM 時最高為 46%。CLB-PyHK-10 類似 CLB-PyHR-9，比 CLB-PyHR-9 多一個 Lys 胺基酸，CLB-PyHR-9 在 1 μM 時的 Band A 和 Band B 的凝膠滯留係數分別為 1.5 和 2，在 0.1 μM 時的切割百分比為 38%，隨 CLB-PyHR-9 濃度的增加切割百分比在 8 μM 時最高為 46%。相同濃度下，凝膠滯留係數越大，滯留效應越明顯，因此推斷 CLB-PyHK-10 對於 DNA 的結合能力比 CLB-PyHR-9 略佳，而切割效果 CLB-PyHK-10 比 CLB-PyHR-9 較佳。

3-1-5 結果與討論

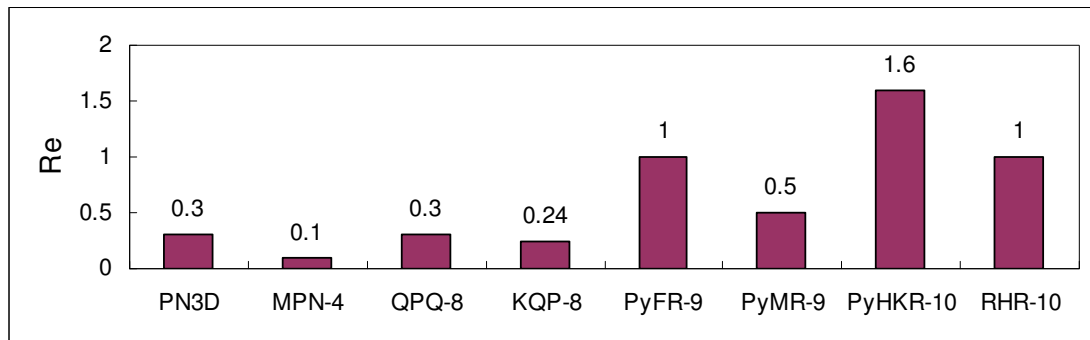
單純含有 Py 結構和 Arg 的胜肽 PN3、PN4 已由高君翰學長⁷⁴和王正一同學合成出⁷⁵，對於 DNA 都有不錯的結合能力，本文利用相似序列，修飾胺基酸序列合成出 PN3D 和 MPN-4，經過與 PN3 及 PN4 凝膠電泳的比較，PN3D 和 MPN-4 對於 DNA 的結合能力較不佳。一系列含有 XPRK 模組的胜肽 QPQ-9、PyHR-9 已由王正一同學⁷⁵和周怡君學姊⁷⁶合成出，對於 DNA 都有不錯的結合能力，本文利用相似序列合成出 QPQ-8、KQP-8、PyFR-9、PyMR-9、PyHKR-10，其中 QPQ-8 和 KQP-8 經凝膠電泳的比較，對於 DNA 的結合能力相當；PyHR-9 置換胺基酸合成出 PyFR-9 和 PyMR-9，經凝膠電泳的比較，PyFR-9 對於 DNA 的結合能力較佳，其次是 PyHR-9 和 PyMR-9；PyHKR-10 比 PyHR-9 多一個胺基酸 Lys，經凝膠電泳的比較，PyHKR-10 對於 DNA 的結合能力較佳。

而 PyHy-6 已分別由高君翰學長合出⁷⁴，並且對於 DNA 都有不錯的結合能力，本文利用相似的序列，合成出不含 Py 結構的胜肽 RHR-10，經過比較 RHR-10 就算沒有含有 Py 結構也是有不錯的結合能力。

環狀胜肽 CPy-9 和 CPy-10 具有 Py 的結構，CPy-10 比 CPy-9 多一個 Py，經凝膠電泳可以看出 CPy-10 對於 DNA 有結合能力比 CPy-9 較佳。證實 Py 所耦合數目不同會對 DNA 的結合能力也有所影響。

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、CLB-PN4、CLB-HyQ-10 和 CLB-HyM-10 已由高君翰學長⁷⁴、王正一同學⁷⁵和吳佳蓉學姊⁷⁶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-PN3D、CLB-MPN-4、CLB-PyHR-9、CLB-HyE-10、CLB-HyS-10、CLB-PyMK-10、CLB-PyWK-10、CLB-PyQK-10

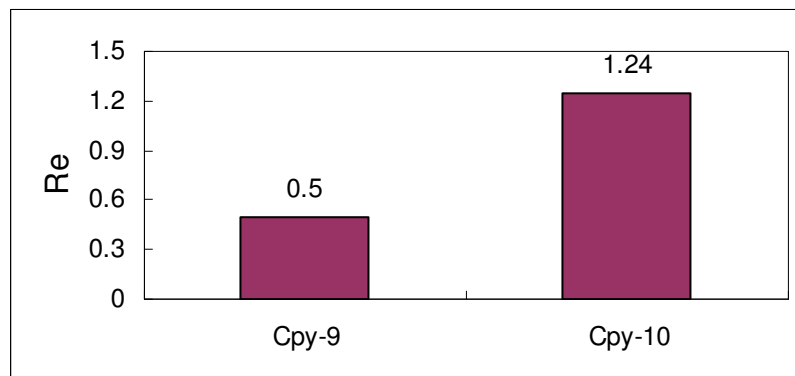
和 CLB-PyHK-10，經凝膠電泳比較，CLB-PN3D、CLB-MPN-4 結合效果和切割效果都比 CLB-PN3、CLB-PN4 較不佳；CLB-HyE-10、CLB-HyS-10 結合效果和切割效果都比 CLB-HyQ-10、CLB-HyM-10 略差；CLB-PyMK-10、CLB-PyWK-10、CLB-PyQK-10 結合效果和切割效果相當；CLB-PyHR-9 和 CLB-PyHK-10 切割效果相當，結合效果 CLB-PyHK-10 略佳。



Re : Gel retardation coefficient (mm band shift / 5 μ M peptide)

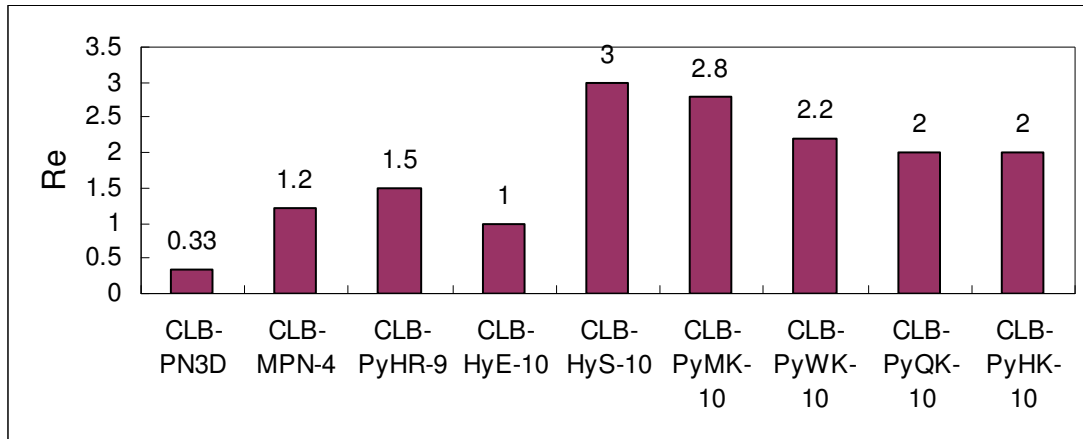
RHR-10 為不含 Py 之直鏈胜肽

圖 3-39.直鏈胜肽對 DNA 的凝膠滯留係數



Re : Gel retardation coefficient (mm band shift / 5 μ M peptide)

圖 3-40.含 Py 之環狀胜肽對 DNA 的凝膠滯留係數



Re : Gel retardation coefficient (mm band shift / 1 μ M peptide)

圖 3-41. 含 CLB 之直鏈胜肽對 DNA 的凝膠滯留係數

3-2-1 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^{H}_{OR} 是被三個氫所耦合，是取每個波峰之間的 G 值，而 $A^{\text{H}}_{\text{ring}}$ 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。苯醌衍生物 DWRO 的模擬圖檔以 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⁷⁸。

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。EPR 實驗測試結果，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} ⁷⁴。

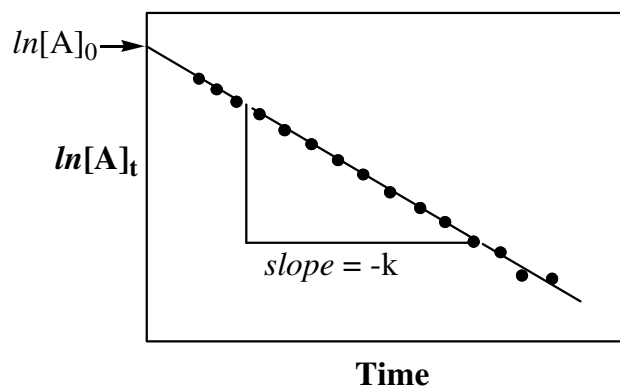


圖 3- 42. $\ln[A]_t$ 與時間之對照圖

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 $(2n_{H1}i + 1)(2n_{H2}i + 1) = (2 \times 1 \times (1/2) + 1)(2 \times 3 \times (1/2) + 1) = 2 \times 4 = 8$

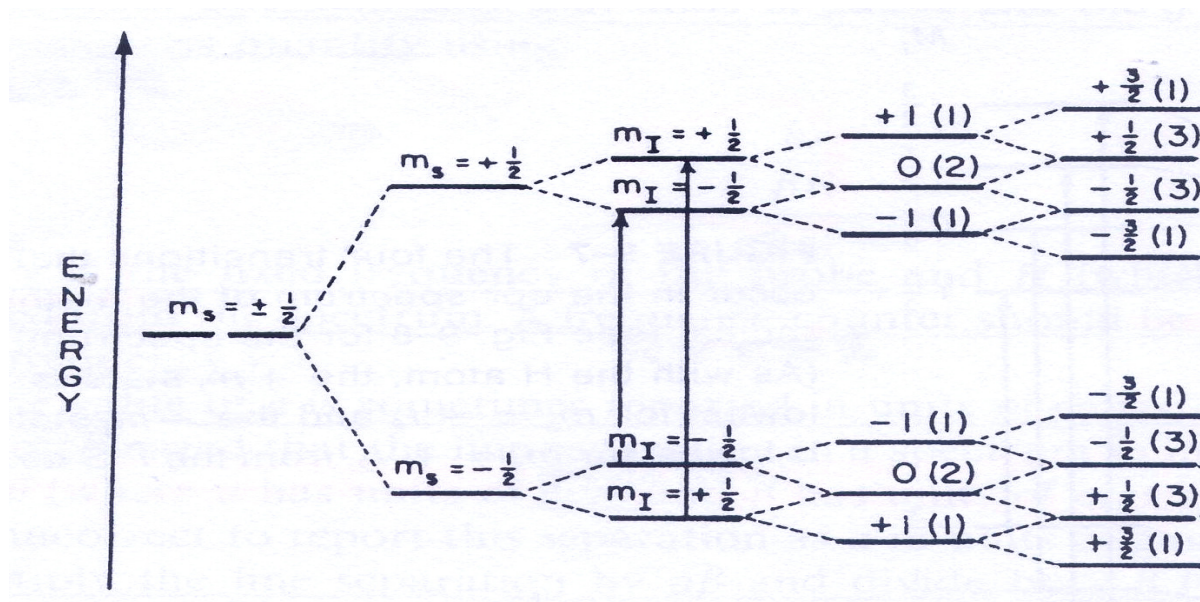


圖 3- 43. EPR 波峰分裂圖

表三十四. 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) | | |
| DWRO | Tryptophan | | | | |
| | pH = 5.0 | 0.746 | 1.162 | 2.00483 | 1.00×10^5 |
| | pH = 7.4 | 0.746 | 1.160 | 2.00486 | 1.00×10^5 |
| | pH = 10.4 | 0.746 | 1.165 | 2.00490 | 1.00×10^5 |

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

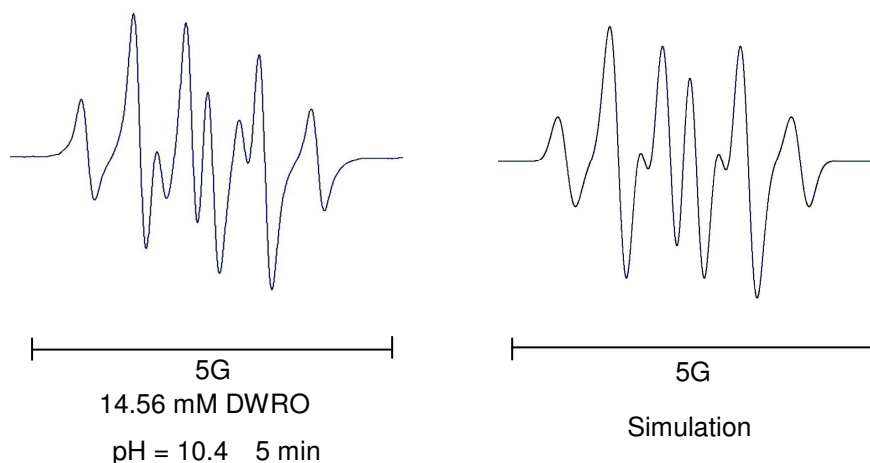


圖 3-44. DWRO 之 EPR 圖譜

將 EPR 實驗得到之 Hyperfine coupling constant，其中 A^{H}_{OR} 是被三個氫所耦合， $A^{\text{H}}_{\text{ring}}$ 則是被一個氫所耦合，將 A^{H}_{OR} 與 $A^{\text{H}}_{\text{ring}}$ 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。

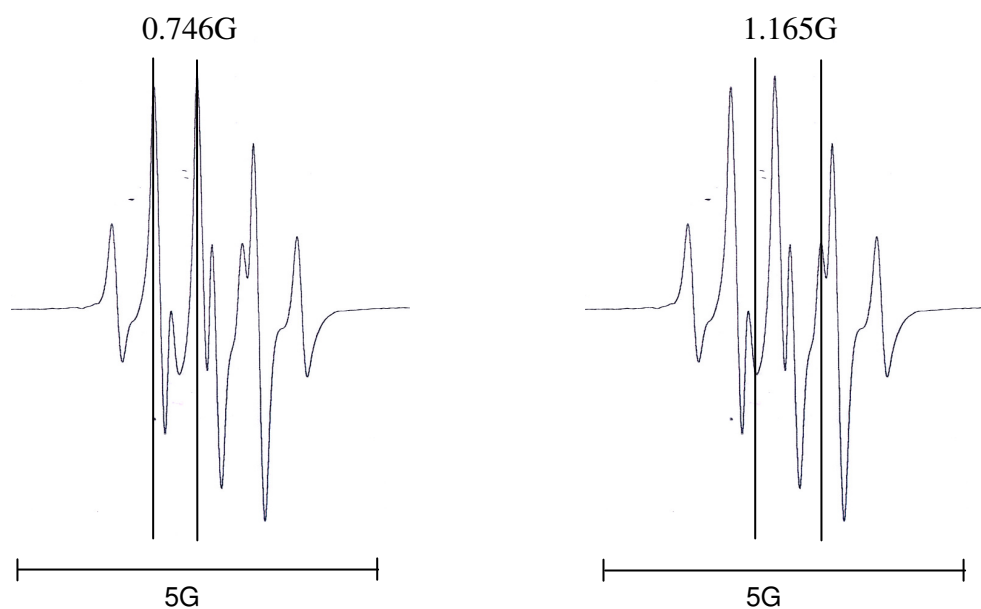


圖 3-45. DWRO pH = 10.4 EPR 圖譜之 Hyperfine coupling constant 值

異核的 A^{H}_{OR} 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 pH = 5、pH = 7.4、pH = 10.4 皆為 0.746。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^H_{ring} 的 Hyperfine coupling constant 的值，在 pH = 5 、pH = 7.4 、pH = 10.4 時 DWRO 各為 1.162 、1.160 、1.165 。

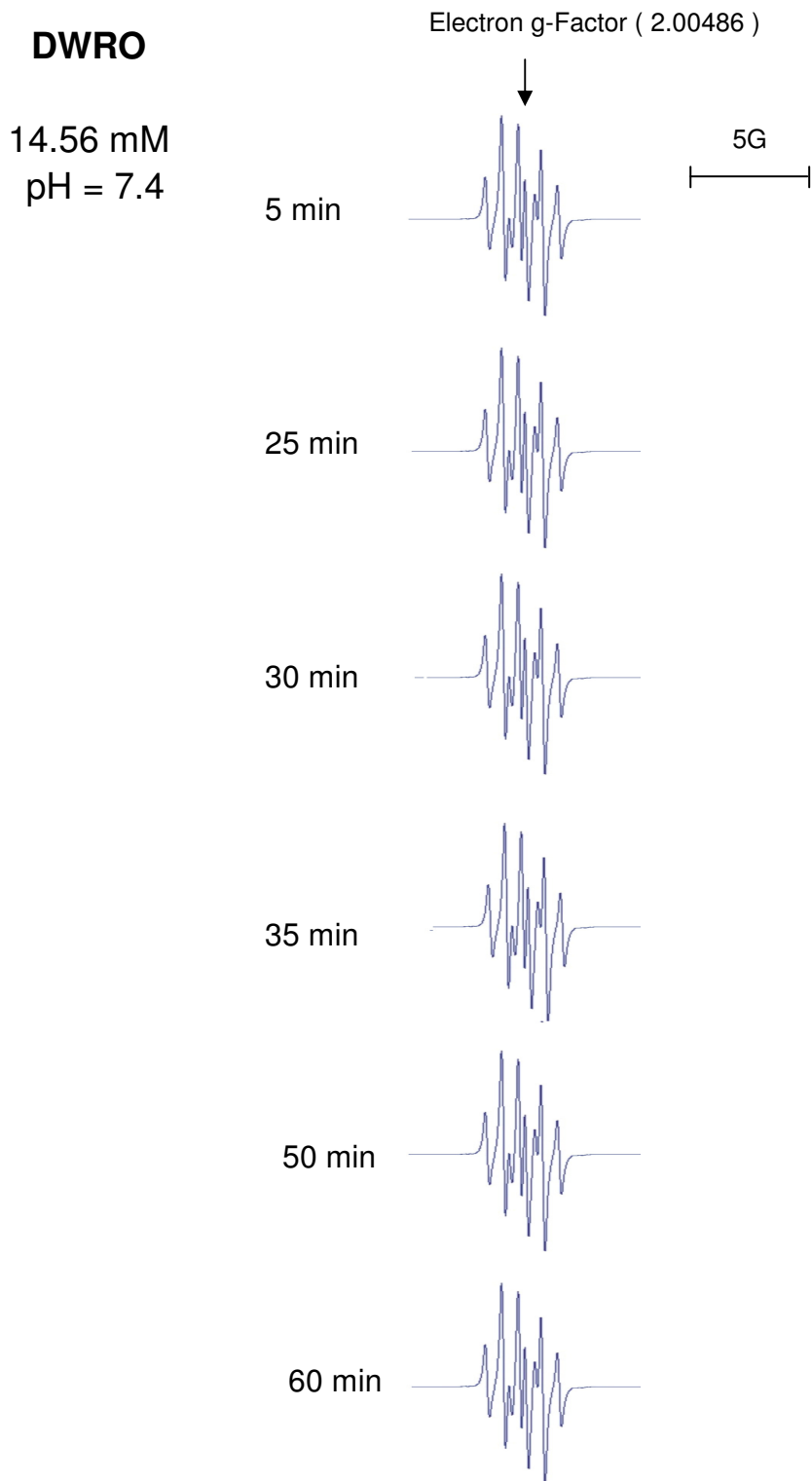


圖 3- 46. DWRO pH = 7.4 各時間的 EPR 光譜圖

由圖 3-45 可看出 DWRO 在 pH = 7.4 各時間的 EPR 圖形，波型很穩定，Electron g-Factor 值 2.00486 都沒隨時間變化而改變。

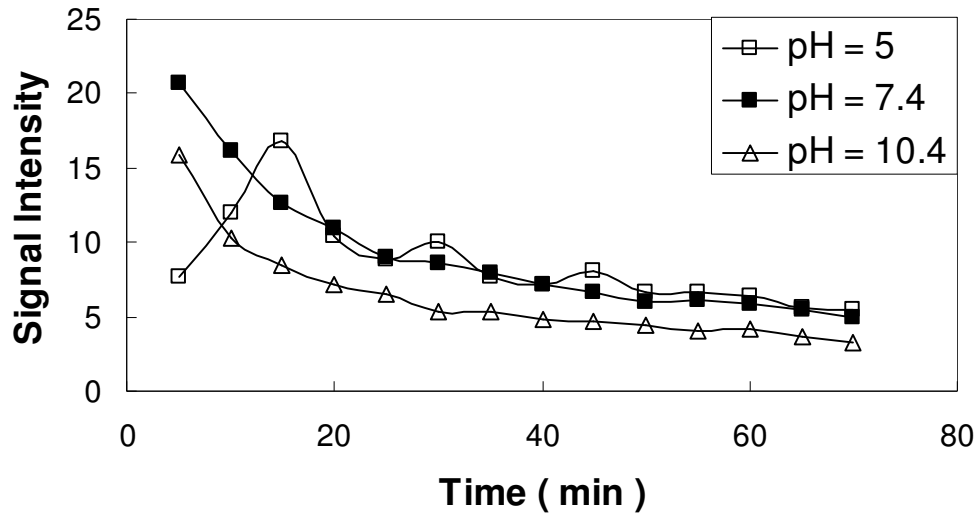


圖 3-47. DWRO 不同 pH 值之 EPR 訊號變化圖

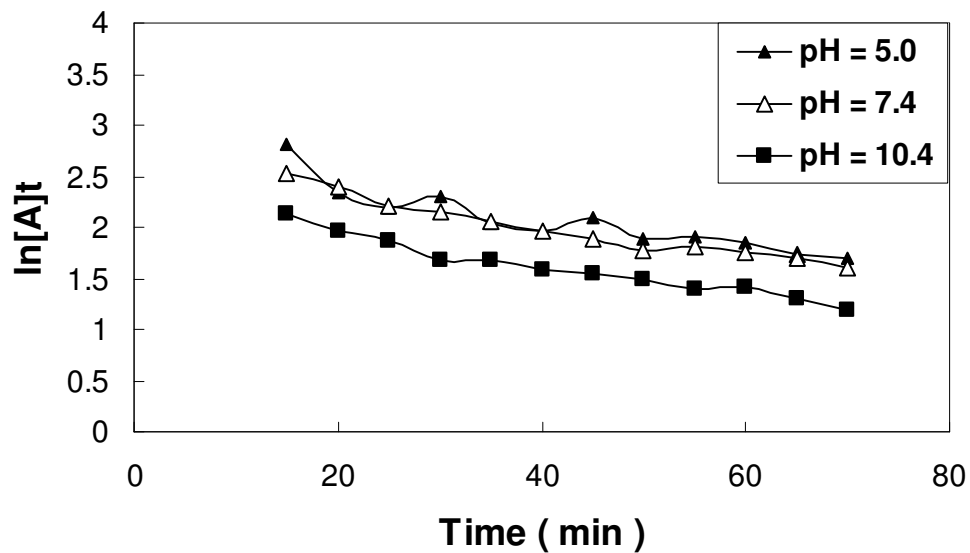


圖 3-48. 14.56 mM DWRO 各 pH 值的 $\ln[A]_t$ 對時間作圖

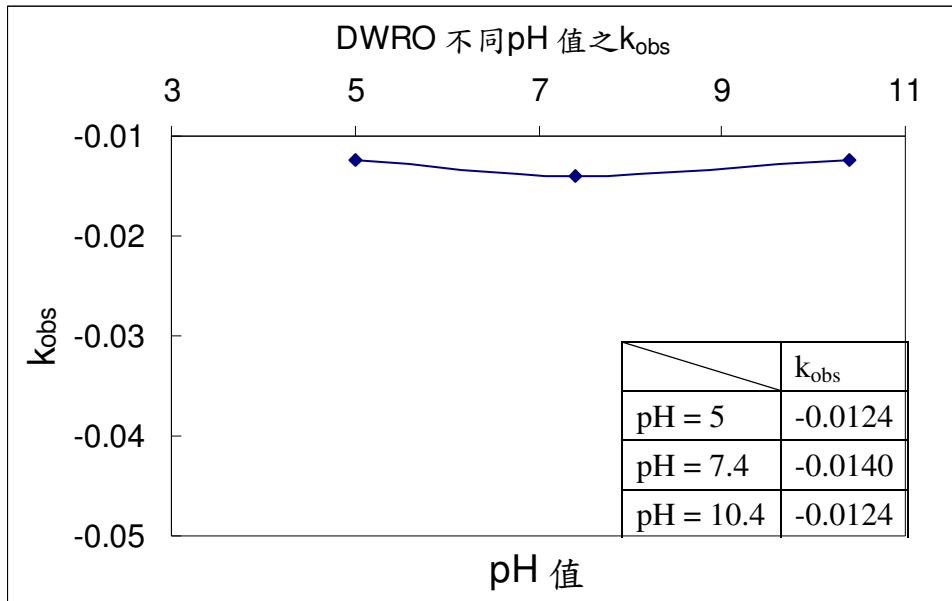


圖 3-49. 14.56 mM DWRO 各 pH 值之 k_{obs}

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 DWRO 各 pH 值之 k_{Obs} 得知 k_{Obs} 值很小且變化不大。

3-2-2 凝膠電泳實驗結果

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

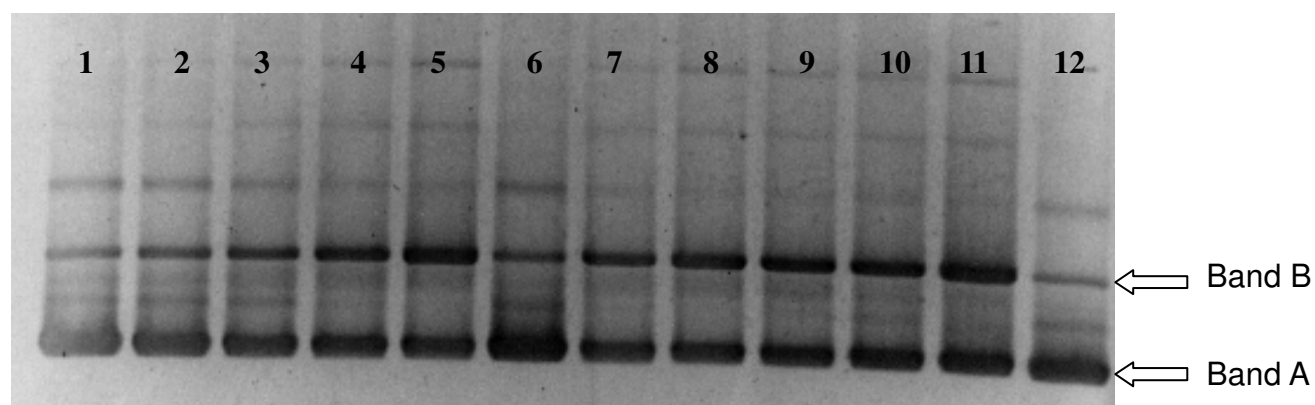
Lane1~5：DWRO + 1 μM Fe²⁺ (1、5、10、20、50 μM)

Lane6：pBluescript II SK(-) DNA + 1 μM Fe²⁺

Lane7~11：DWRO (20、50、100、200、300 μM)

Lane12：pBluescript II SK(-) DNA only

DWRO



表三十五. DWRO 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 | DWRO | 1 | 1 | 47 | 65 °C 25 min |
| Lane2 | DWRO | 5 | 1 | 47 | |
| Lane3 | DWRO | 10 | 1 | 48 | |
| Lane4 | DWRO | 20 | 1 | 50 | |
| Lane5 | DWRO | 50 | 1 | 52 | |
| Lane6 | --- | --- | 1 | --- | |
| Lane7 | DWRO | 20 | --- | 50 | |
| Lane8 | DWRO | 50 | --- | 50 | |
| Lane9 | DWRO | 100 | --- | 50 | |
| Lane10 | DWRO | 200 | --- | 50 | |
| Lane11 | DWRO | 300 | --- | 51 | |
| Lane12 | --- | --- | --- | --- | |

3-2-3 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，經由電泳圖可以看出，DWRO 在不含有亞鐵離子的狀態下皆具備切割 DNA 的性質。

根據本實驗小組先前發表論文中表示⁷⁹，胜肽衍生物 DVRO 是利用自由基對 DNA 產生破壞⁸⁰，圖 3-50 是自由基切割 DNA 的反應機構。因此，利用 EPR 實驗證實 DWRO 自由基的存在。由 EPR 實驗結果看出 DWRO 具自由基訊號，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 DWRO 其半衰期在中性條件下大約是 50 min。

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 3-51)，造成訊號強度增加。

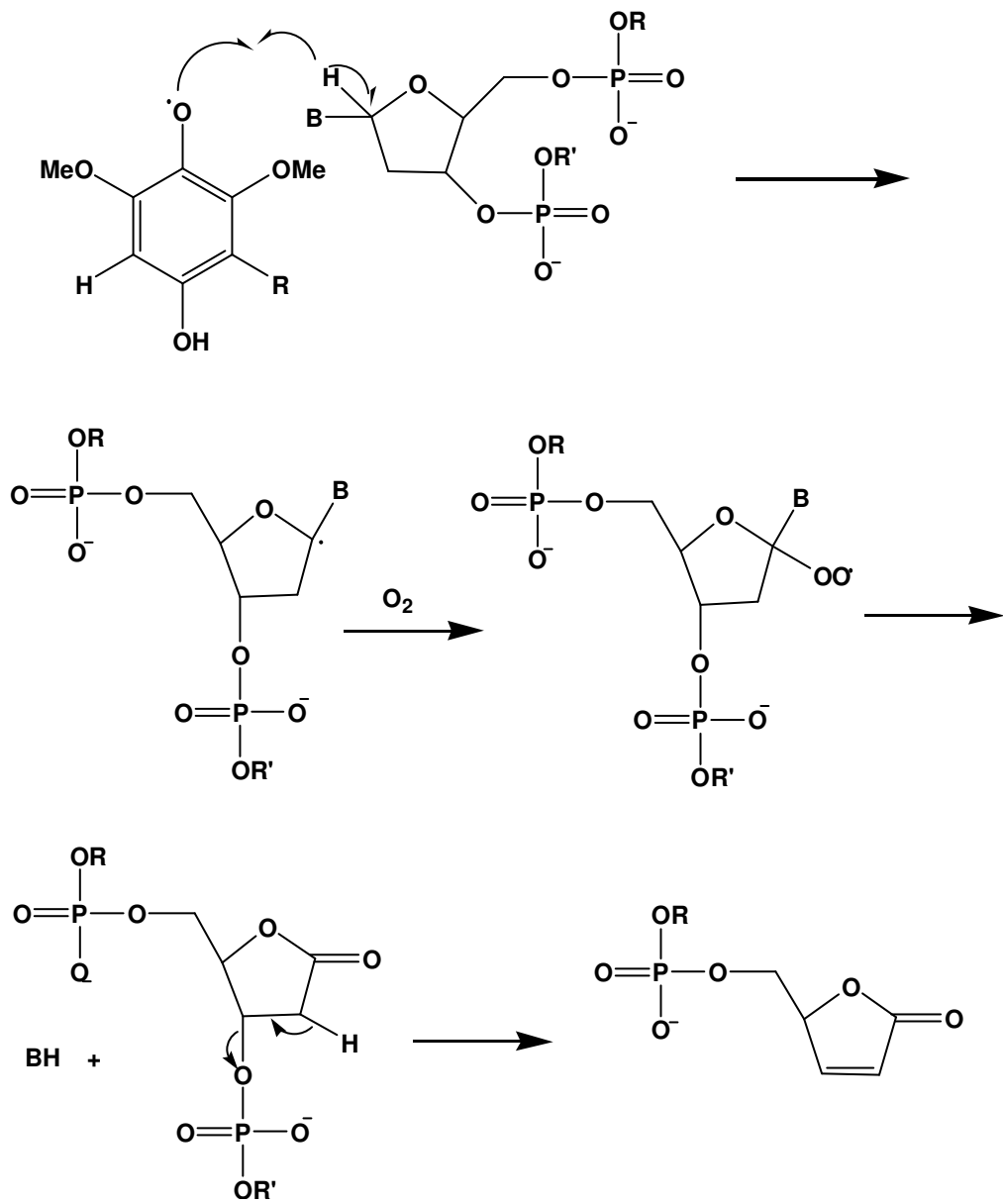


圖 3-50. 自由基切割 DNA 之反應機構

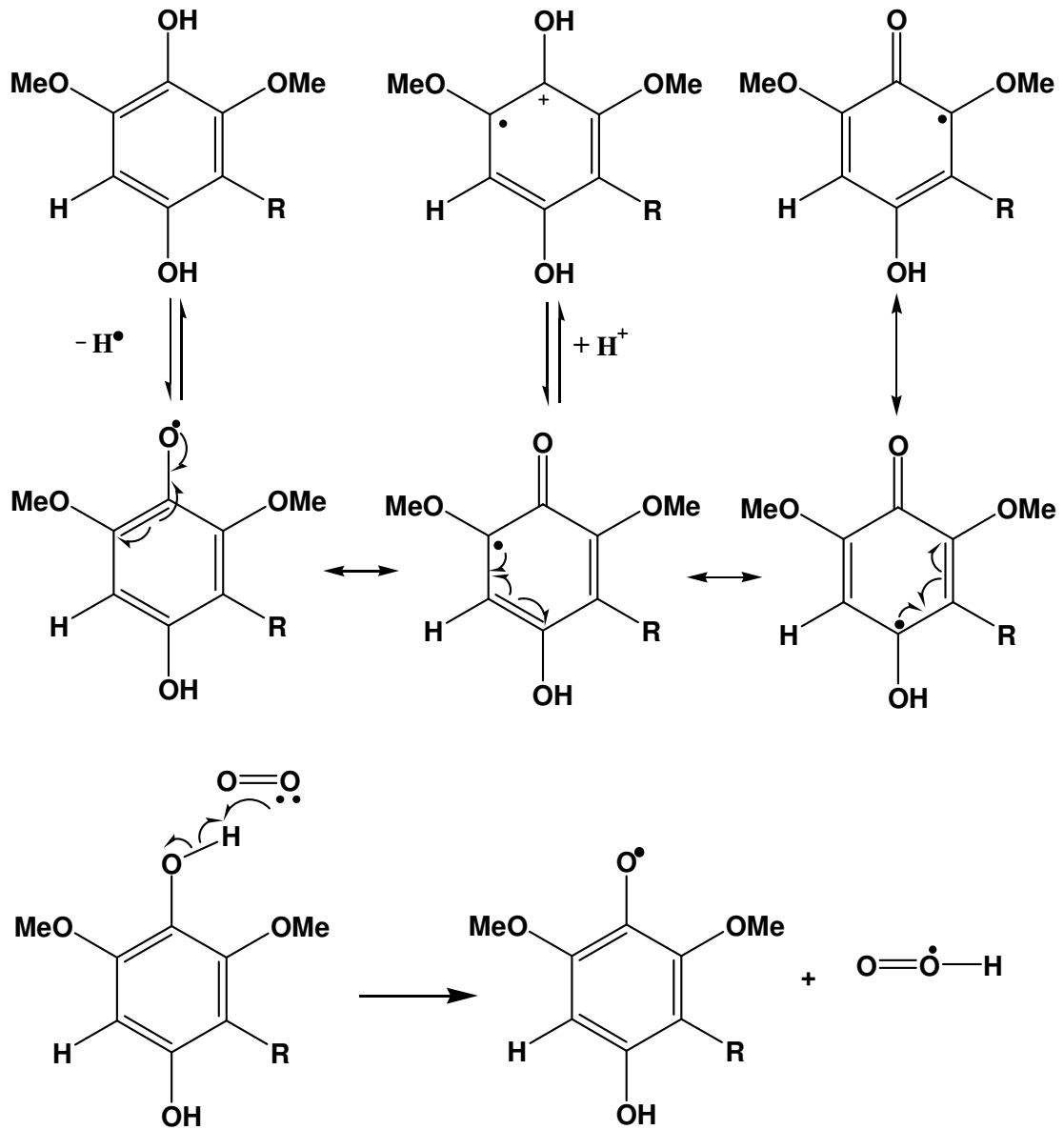


圖 3-51. DMQ-MA 衍生物自由基示意圖

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 PN3D、MPN-4、QPQ-8、KQP-8、PyFR-9、PyMR-9、PyHKR-10，其中以 PyFR-9 和 PyHKR-10 皆有不錯的結合作用(圖 3-39)。同樣的含有 Py 結構的環狀胜肽 CPy-9 和 CPy-10 對 DNA 也會有結合(圖 3-40)；而未含有 Py 結構的直鏈胜肽 RHR-10 與 DNA 有相同結合能力(圖 3-39)。含有 CLB 結構的直鏈胜肽 CLB-PN3D、CLB-MPN-4、CLB-PyHR-9、CLB-HyE-10、CLB-HyS-10、CLB-PyMK-10、CLB-PyWK-10、CLB-PyQK-10、CLB-PyHK-10，皆有不錯的結合作用(圖 3-41)，其中 CLB-HyE-10、CLB-HyS-10、CLB-PyWK-10、CLB-PyQK-10、CLB-PyHK-10 對 DNA 的切割的能力較佳。因此對於修飾 XPRK 模組的新胜肽，未來由榮總小組進行足跡實驗以及 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。

胜肽衍生物是有別於結合型胜肽的一種 DNA 切割試劑。本文中的胜肽衍生物是由 DMQ-MA 延伸設計出，經由電子順磁共振光譜 (EPR)，可以發現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，DWRO 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 有相同切割的作用。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.; Cattan. 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. Hynes, R. O. *Cell*. **1992**. *69*, 11-25.
29. Sheh, L.; Chang, H. W.; Ong, C. W.; Chen, S. L.; Bailly, C.; Linssen, R. C. M.; Waring, M. J. *Anti-Cancer Drug Design* **1995**, *10*, 373.
30. Minnock, A.; Lin, L. S.; Morgan, J.; Crow, S.; Waring, M. J. and Sheh, L. *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 870
31. D. J. Cosgrove, *Nature* **1952**, *169*, 966
32. Murger, C.; Ellis, A.; Woods, K.; Randolph, J.; Yanovich, S.; Gewirtz, D. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2404.
33. R. Pethig; Peter R. C.; Gascoyne, J. A. McLaughlin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1983**, *80*, 129

34. G. Powis *Free Radical Biology & Medicine*. **1989**, 6, 63.
35. J. G. Lewis; W. Stewart; D. O. Adams. *Cancer Res*. **1988**, 48, 4762.
36. Noto. Vincenzo; S. Taper. Henryk; Yi-Hua Jiang; Jaak Janssens; Jan Bonte; William De Loecker *Cancer*. **1989**, 63, 901.
37. P. Pellack-Walker; J. L. Blumer *Mol. Pharmacol*. **1986**, 30, 42
38. Y. Sun *Free Radical Biology & Medicine*. **1990**, 8, 583.
39. K. S. Birandra; G. M. Edward *Free Radical Biology & Medicine*. **1990**, 8, 567.
40. P. Sangeetha; V. N. Das. *Free Radical Biology & Medicine*. **1990**, 8, 15.
41. Sheh, L. *United States Patent*. **1990**, 978, 783.
42. 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.
43. Sheh, L.; Li, C. J.; Dai, H. Y.; Cheng, V.; Chiang, C. D. *Anti-Cancer Drug Des*. **1993**, 8, 237.
44. Sheh, L.; Chiang, C. D.; Chang, S.; Lo, V.; Wong, R. N.; Chen, S. L. *Anti-Cancer Drug Des*. **1998**, 13, 501.
45. Minnock, A.; Lin, L. S.; Morgan, J.; Crow, S. D.; Waring, M. J.; Sheh, L. *Bioconjug. Chem*. **2001**, 12, 870.
46. 莊名朱，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**1994**
47. J. P. F. Bai; M. Hu; P. Srbramanian; H. I. Mosberg; G. L. Amidon *J. Pharm. Sci*. **1992**, 81(2), 113.
48. H. M. Etilinger *Immunol. Today*. **1992**, 13(2), 52
49. R. Arnon; B. Schechter; M. Wilchek. *Adv. Exp. Med. Biol*. **1991**, 303, 79.
50. E. J. Ambrose; A. M. James; J. H. B. Lowick. *Nature*. **1956**, 177,476.
51. J. N. Mehrishi. *Nature*. **1970**, 228, 364
52. Chu, T. W.; Plattner, J. J.; Katz, L. *J. Med. Chem*. **1996**, 39, 3853.

53. Alfredson, T. V.; Maki, A. H.; Waring, M. J. *Biochemistry*. **1991**, *30*, 9665.
54. Dell, A.; Williams, D. H.; Morris, H. R.; Smith, G. A.; Feeney, J.; Roberts, G. C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2497.
55. Hossain, M. B.; van der Helm; D.; Olsen, R. K.; Jones, P. G.; Sheldrick, G. M.; Egert, E.; Kennard, O.; Waring, M. J.; Viswamitra, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3401.
56. McMurry, L.; Petrucci, R. E. Jr.; Levy, S. B. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **1980**, *77*, 3974.
57. Wang, H. J.; Ughetto, G.; Quigley, G. J.; Hakoshima, T.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Science*. **1984**, *225*, 1115
58. Sheh. L.; Cheng, C. Y.; Kuan, Y. H.; Chen, C. F. *Int. J. Peptide Res.* **1990**, *35*, 55.
59. Sheh. L.; Li, C. J.; Dai, H. Y.; Cheng, V.; Chiang, C. D.; Shen, N. K.; Yu, C. Y. *Anti-Cancer Drug Design* **1992**, *7*, 315.
60. Sheh. L.; Dai, H. Y.; Kuan, Y. H.; Li, C. J.; Chiang, C. D.; Cheng, V. *Anti-Cancer Drug Design* **1993**, *8*, 237.
61. Sheh, L.; Lin, H. H.; Jeng, K. C. G.; Chen, C. F. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4302.
62. Sheh, L.; Chang, H. W.; Ong, C. W.; Chen, S. L.; Bailly, C.; Linssen, R. C. M.; Waring, M. J. *Anti-Cancer Drug Design* **1995**, *10*, 373.
63. Chen, S. L.; Wong, R. N. S.; Lo, V.; Chang, S.; Chiang, C. D.; Sheh, L. *Anti-Cancer Drug Design* **1998**, *13*, 501.
64. Cheng, C. T.; Lo, V.; Chen, J.; Chen, W. C.; Lin, C. Y.; Lin, H. C.; Yang, C. H.; Sheh, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1493.
65. R. B. Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
66. R. B. Merrifield. *Science*. **1986**, *232*, 341.

67. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748.
68. Carpino, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4427.
69. Bodanszky, Miklos “*Principles of peptide synthesis*” 1984, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
70. Miklos, B. *J. Peptide Protein Res.* **1985**, *25*, 449.
71. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. J. *Anal. Biochem.* **1970**, *84*, 595.
72. 楊菟澈，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2003**
73. Luscombe, N. M.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2860.
74. 高君翰，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2009**
75. 王正一，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2010**
76. 周依君，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2004**
77. 吳佳蓉，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2007**
78. 林筱筑，碩士論文，私立東海大學應用化學研究所，**2008**
79. 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.
80. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089.