

私立東海大學應用化學研究所  
碩士論文

從Ixosin-B中去設計合成新穎具有活性之抗菌胜肽  
Design, synthesis and antibacterial activity of novel  
peptides derived from Ixosin-B.

指導教授：吳雨珊 博士 (Yu-Shan Wu)

研究生：廖梓捷 (Zih-Jie Liao)

中華民國一百年六月

## 謝誌

上天給人類賦予追求真理、真愛、和平、創造等自由，在此我們用科學人的角度，以謙卑的心將知識及經驗一磚一瓦的堆砌起來，在這龐大世界文明的轉輪下，盡一份給予推前的一小段路，藉由眾人匯聚而成的道路，將世界推向更美好。

時光飛快，轉眼兩年的碩士生涯正式在此告一段落，這當中經歷了許多人事物，有了不一樣的感受，也讓視野變得更加不同，在此感謝我所遇見的這些人。

首先特別感謝吳雨珊老師、龍鳳娣老師與錢偉鈞老師們不遺餘力的指導和建議，以及在東海大學和朝陽科技大學的儀器使用，才能完成這次的計畫。

還有實驗室的學長姐、同學、學弟妹，有你們的幫忙及歡笑讓生活變得更加多采，包括仁志、志遠、正鴻、又誠、志偉、德倫、佩蓉、宜蓉學長姊等，還有昌甫、凱宣、銘軒、惠玲、緬煒及翰維、鈞彥、欣怡、佩臻學弟妹等與你們的相遇。

最後，要特別感謝我的家人，辛苦的栽培與支持及女友宛伶的鼓勵，本篇獻給身邊熱愛的你們，並祝平安、健康。

## 摘要

Ixosin-B 是硬壁蟲唾液腺中具有抗菌活性的胜肽。本研究以 Ixosin-B 為前導胜肽，藉由固相胜肽合成法合成一系列長度從 8 到 12 個胺基酸的短序列胜肽(TSG-6、TSG-7、TSG-8、TSG-8-1、TSG-9、TSG-9-1、TSG-10 及 TSG-11)以期了解 Ixosin-B 中不同序列的抗菌模式，並藉此設計出更具抗菌活性的胜肽。這些胜肽在抗菌實驗中對金黃色葡萄球菌及大腸桿菌的最小抑制濃度約 8~64  $\mu\text{M}$  之間。由原二色光譜中發現這一系列的胜肽二級結構螺旋結構並不明顯，這表示螺旋結構應不影響抗菌能力，另外，在這一系列的藥物較偏向毒殺大腸桿菌，因此推測可能是電荷聚集機制所造成影響。這些胜肽中比較特別的是 TSG-8-1，此胜肽對金黃色葡萄球菌的抑制能力大於大腸桿菌，其最小抑制濃度分別為 8  $\mu\text{M}$  及 16  $\mu\text{M}$ 。因此本研究亦利用 *E.coli* ML-35p 來探討新的抗菌原因，藉由內外膜穿透能力實驗發現它可使細菌外膜產生破裂造成物質流露。對於 TSG-8-1 比起其它胜肽具有較好抗菌能力，從結構上顯示在胜肽的一端若含有較多疏水性的區域有利於其進入細菌膜。在血溶性測試實驗中結果顯示，這一系列的抗菌胜肽不會具有溶血的副作用。此外，我們也嘗試將 TSG-8-1 作用於癌細胞上，在毒殺癌細胞初步測試中發現 TSG-8-1 具有些許抗癌能力。

關鍵字： 抗菌胜肽

## Abstract

Ixosin-B is an antimicrobial peptide isolated from hard tick salivary glands. In this study, we took Ixosin-B as a lead peptide, designed and synthesized shorter peptide fragments of 8 to 12 amino acids by solid phase peptide synthesis, hoping to gain more understandings in the relationship between peptide structures and their antimicrobial activity.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of these peptides ranged from 8 to 64 $\mu$ M for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and higher activity for *Escherichia coli* was observed for majority of the peptides. Since helical structures were not prominent as evidenced in CD spectra, suggesting  $\alpha$ -helix was not the main cause of bacterial death and the antibacterial activity may have been attributed to “Charge Cluster Mechanism”. TSG-8-1 on the other hand showed a completely different trend: the antibacterial activity for *Staphylococcus aureus* is higher than that for *Escherichia coli*. Mechanistic studies suggested that TSG-8-1, rich in hydrophobic amino acid residues, played important role in rupturing bacterial outer membrane. The same effect was not observed for bacterial inner membrane, and thus accounted for the preference in its killing of Gram positive bacteria. All peptides synthesized exhibited no hemolytic side effect.

TSG-8-1 was also tested against breast cancer cell line (MCF-7) and slight cytotoxicity was observed.

Keyword: antibacterial peptide

## 目錄

前言.....	1
第一章 抗菌胜肽.....	3
1-1. 抗菌胜肽簡介.....	3
1-2. 抗菌胜肽的結構與特性.....	5
1-2-1. 結構.....	5
1-2-2. 特定胺基酸的組成.....	7
1-3. 抗菌胜肽的殺菌機制.....	8
1-4. 細菌對胜肽的抗藥性及未來藥物的發展.....	13
1-5. 研究動機.....	14
第二章 實驗方法與材料.....	16
2-1. 固相胜肽合成法.....	18
2-2. 茚三酮測試.....	21
2-3. 逆相高效能液相層析法.....	23
2-4. 基質輔助雷射脫附游離-飛行時間質譜儀.....	25
2-5. 細菌的培養與測試.....	26
2-5-1. 細菌的接種.....	26
2-5-2. 養菌.....	28
2-5-3. 測量細菌的數目.....	28
2-5-4. 細菌的生長曲線實驗.....	30
2-5-5. 最小抑制濃度及最小殺菌濃度.....	31
2-6. 溶血性測試.....	33
2-7. 癌細胞毒殺測試.....	35
2-8. 胜肽的內外膜穿透能力.....	36
2-9. 圓二色光譜實驗.....	39
第三章 結果與討論.....	41
3-1. 胜肽合成設計原理.....	41
3-2. 圓二色光譜的探討.....	44
3-3. 細菌的生長曲線結果.....	55
3-4. 抗菌活性與胜肽性質關係.....	57
3-5. 溶血性測試結果.....	65
3-6. 癌細胞毒殺測試結果.....	66
3-7. EDTA 的 MIC 及 MBC 結果.....	67
3-8. 抗菌機制探討.....	68
第四章 結論.....	71
第五章 未來展望.....	73
第六章 參考文獻.....	75

## 圖目錄

圖 1-1. 各藥物對於細菌的作用目標 <sup>1</sup> .....	2
圖 1-2. 抗菌胜肽對於動物細胞和細菌毒殺選擇性能力 <sup>6</sup> .....	4
圖 1-3. 為 magainin 2 的的 $\alpha$ -螺旋結構 <sup>10</sup> .....	5
圖 1-4. 為 HNP3 及 hBD3 的 $\beta$ -摺疊結構 <sup>12</sup> .....	6
圖 1-5. 為 indolicidin 的無序結構 <sup>10</sup> .....	7
圖 1-6. 形成孔洞機制圖 <sup>17</sup> .....	10
圖 1-7. 電荷聚集機制圖 <sup>18</sup> .....	11
圖 2-1. 為固相胜肽合成流程圖(sigma-aldrich) .....	19
圖 2-2. 茚三酮與胺基酸反應圖 .....	22
圖 2-3. 細菌的生長曲線 .....	30
圖 2-4. 活細胞代謝後所產生 formazan 圖 .....	35
圖 2-5. NCF 反應圖 <sup>37</sup> .....	37
圖 2-6. ONPG 反應圖 <sup>37</sup> .....	37
圖 2-7. 胜肽在圓二色圖譜所出現的結構 <sup>38</sup> .....	40
圖 3-1. TSG-5 之 CD 光譜圖 .....	46
圖 3-2. TSG-6 之 CD 光譜圖 .....	47
圖 3-3. TSG-7 之 CD 光譜圖 .....	48
圖 3-4. TSG-8 之 CD 光譜圖 .....	49
圖 3-5. TSG-8-1 之 CD 光譜圖 .....	50
圖 3-6. TSG-9 之 CD 光譜圖 .....	51
圖 3-7. TSG-9-1 之 CD 光譜圖 .....	52
圖 3-8. TSG-10 之 CD 光譜圖 .....	53
圖 3-9. TSG-11 之 CD 光譜圖 .....	54
圖 3-10. 為大腸桿菌的生長曲線 .....	55
圖 3-11. 為金黃色葡萄球菌的生長曲線 .....	56
圖 3-12. 為綠膿桿菌的生長曲線 .....	56
圖 3-13. TSG-8 的螺旋輪圖 .....	63
圖 3-14. TSG-8-1 的螺旋輪圖 .....	63
圖 3-15. TSG-9 的螺旋輪圖 .....	64
圖 3-16. 為 TSG-8-1 的 $\alpha$ -螺旋結構(參考用示意圖) .....	64
圖 3-17. 為 TSG 系列在 80 $\mu$ M 胜肽濃度下對人類乳癌細胞株(MCF-7)的毒殺能力 .....	66
圖 3-18. TSG-8-1 對 <i>E. coli</i> ML-35p 的外膜穿透能力 .....	69
圖 3-19. TSG-8-1 對 <i>E. coli</i> ML-35p 的內膜穿透能力 .....	70
圖 6-1. TSG-1 .....	79
圖 6-2. TSG-2 .....	80

圖 6-3. TSG-3 .....	81
圖 6-4. TSG-4 .....	82
圖 6-5. TSG-5 .....	83
圖 6-6. TSG-6 .....	84
圖 6-7. TSG-7 .....	85
圖 6-8. TSG-8 .....	86
圖 6-9. TSG-8-1 .....	87
圖 6-10. TSG-9 .....	88
圖 6-11. TSG-9-1 .....	89
圖 6-12. TSG-10 .....	90
圖 6-13. TSG-11 .....	91

## 表目錄

表 1-1.為不同菌種的磷脂質成分 <sup>7</sup> .....	4
表 1-2.胜肽序列分割設計.....	15
表 3-1.為設計的胜肽總序列.....	43
表 3-2.各抗菌胜肽對綠膿桿菌、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌的抑制能力.....	61
表 3-3.各抗菌胜肽的特性.....	62
表 3-4 為 TSG 系列在 100 $\mu$ M 胜肽濃度下所造成溶血性.....	65
表 3-5. TSG-7 和 TSG-8-1 在含有 100 $\mu$ M EDTA 對三種菌的抗菌能力.....	68

## 前言

微生物的感染通常造成疾病或是死亡，當中往往伴隨著經濟上的損失，像是歐洲著名的黑死病即由微生物感染所造成。在 1935 年最早被先發現的抗微生物藥物為磺胺藥，但由於藥物代謝後會產生毒素，因此逐漸被盤尼西林所取代<sup>1</sup>。雖然現今有許多合成或發現的抗生素，但因為抗生素的濫用，導致單一或多重抗藥性的菌株產生，例如著名的抗甲氧西林黃金葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)，在美國每年造成約 19000 人死亡，近年來甚至出現抗萬古黴素黃金葡萄球菌(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)<sup>2</sup>。

這些微生物產生抗藥性的機制相當多，舉例來說：藉由分泌酵素去破壞抗生素原本的結構，如：細菌體內的  $\beta$ -內醯胺酶( $\beta$ -lactamase)能分解含有  $\beta$ -內醯胺環結構的抗生素，或者是由細菌膜上的輸出幫浦(efflux pump)，將抗生素送出微生物體外，進而降低藥物對本身的傷害等等，所以積極修飾現有藥物的活性結構和開發新藥就成了相當重要的事情<sup>2</sup>。

通常對於藥物的開發及應用可藉由微生物體的構造及生長代謝模式去做了解，以現階段抗菌劑為例，主要可分類五種的抗菌機制: (1)

抑制細胞的代謝、(2)抑制細胞壁的合成、(3)作用於細胞膜、(4)干擾蛋白質的合成及(5)干擾核酸的轉譯和複製。抑制細胞的代謝最著名的例子就是磺胺藥，它能抑制四氫葉酸的生成，使得細胞中止生長及分裂。抑制細胞壁的合成會引起溶菌而致死，有此作用的是青黴素 (penicillin)、頭孢菌素(cephalosporins)及萬古黴素(vancomycin)等。有些抗生素則作用於細菌的細胞膜，而影響細胞膜的通透性，如多黏菌素(polymyxin)等。干擾蛋白質的合成，就是無法製造維持生命的必須蛋白質及酵素，這類的有四環黴素(tetracyclines)、氯黴素(chloramphenicol)等。抑制核酸的功能可阻礙細胞分裂或合成必需的蛋白質，這些抗菌劑是 nalidixic acid 及 proflavine(圖 1-1)。

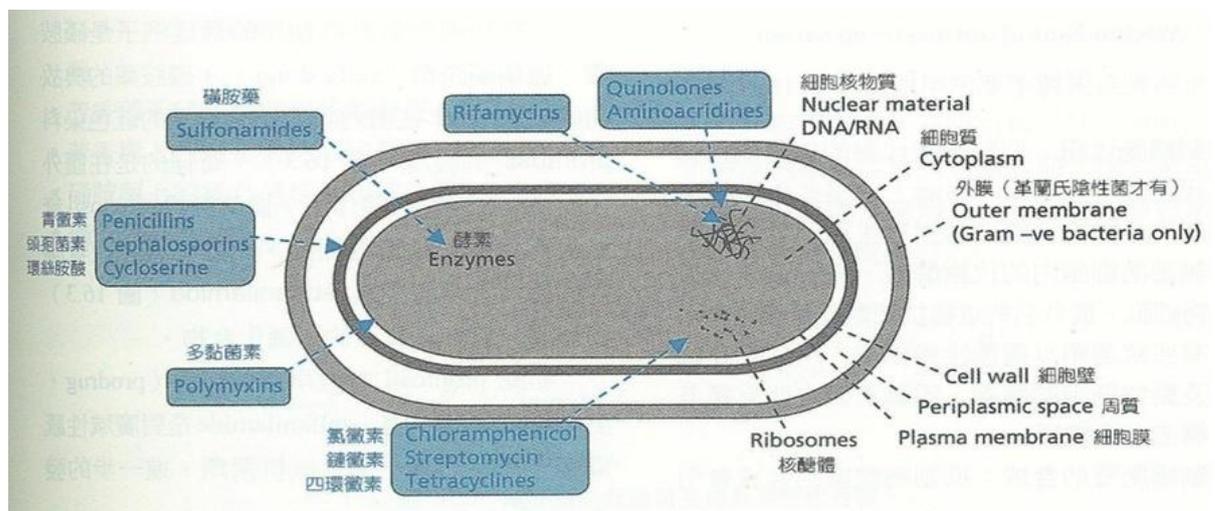


圖 1-1.各藥物對於細菌的作用目標<sup>1</sup>

## 第一章 抗菌胜肽

### 1-1. 抗菌胜肽簡介

抗菌胜肽顧名思義就是由小分子的胺基酸所組成的胜肽，並具有抗菌功能。這些胜肽是一種存在於生物體內的天然防禦機制，用來抵禦外來微生物的入侵，現今已發現它的來源相當廣泛，由昆蟲、兩棲類、哺乳類動物、植物、微生物等都有其蹤跡<sup>3</sup>。這些胜肽除了能抑制細菌、真菌、病毒功能外，近幾年來發現到具有殺死癌細胞的能力<sup>4</sup>，因此對未來有新的開發領域空間。

抗菌胜肽與傳統抗生素有相當大的差異，抗菌胜肽被認為更不具有抗藥性的產生，因為抗菌胜肽能在細菌膜上形成孔洞，造成細菌內物質流失導致細菌死亡，這樣殺菌的機制時間相當的短，因此較不易讓細菌有抗藥性的產生<sup>5</sup>；另外，值得被關注的是抗菌胜肽對於細菌比細胞毒殺性更具有較高的選擇性<sup>6</sup>，原因是細菌膜上含有較高帶負電的磷脂質組成物如 phosphatidylglycerol (PG)、cardiolipin (CL)等，表 1-1 為不同細菌的膜上成分<sup>7</sup>。而動物細胞膜則為雙電性 (Zwitterionic) 磷脂質組成物，像 phosphatidylcholine (PC)、sphingomyelin (SM) 和不帶電荷的 cholesterol 等<sup>4</sup>。所以抗菌胜肽上帶正電性的官能基則會較偏向與擁有帶負電荷膜成分的細菌相互吸引，因此選擇性自然高於動物細胞(圖 1-2)。

Bacterial species	% Total lipid		
	CL	PG	PE
Gram negative bacteria			
<i>E. coli</i>	5	15	80
<i>E. cloacae</i>	3	21	74
<i>Y. kristensenii</i>	20	20	60
<i>P. mirabilis</i>	5	10	80
<i>K. pneumoniae</i>	6	5	82
<i>P. aeruginosa</i>	11	21	60
<i>Caulobacter crescentus</i> <sup>a</sup>	—	40	—
Gram positive bacteria			
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	58	0
<i>Streptococcus pneumonia</i>	50	50	0
<i>Bacillus cereus</i>	17	40	43
<i>Bacillus polymyxa</i>	8	3	60
<i>Bacillus anthracis</i> <sup>b</sup>	17	40	43
<i>B. subtilis</i>	4	70	12

<sup>a</sup> Neither PE or CL were detected. The major lipid component of this bacteria is monoglycosyldiglyceride, corresponding to about 45% of the lipid composition. <sup>b</sup> Assumed to be the same as *Bacillus cereus* to which it is closely related genetically.<sup>71</sup>

表 1-1.為不同菌種的磷脂質成分<sup>7</sup>

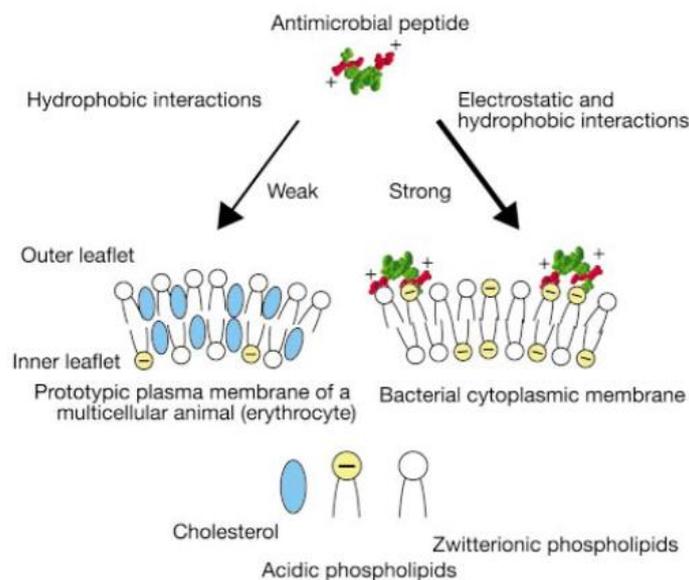


圖 1-2.抗菌胜肽對於動物細胞和細菌毒殺選擇性能力<sup>6</sup>

## 1-2. 抗菌胜肽的結構與特性

抗菌胜肽結構相當的多且序列長度不一，不論是由天然或人為合成而來。而現今主要的區分可由 1.結構及 2.特定胺基酸的組成去做特性討論。

### 1-2-1.結構

#### A. $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ -helix)

一般較常見抗菌胜肽的性質都具有雙性特性 (amphipathic)，第一特性為含有帶正電性的胺基酸(如 Arg. Lys. His)，其目的能與細菌膜上帶負電的脂質互相吸引而靠近。而第二特性是帶較疏水性的胺基酸，當胜肽靠近到膜表面時能藉由較疏水性的一側的插入到膜裡面。這樣的特性通常在具有  $\alpha$ -helix 結構的抗菌胜肽較多。這種雙性特性結構與膜上孔洞形成機制息息相關。如非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 皮膚上所分泌的 magainin 2<sup>8</sup>，及義大利蜂 (*Apis mellifera*) 毒液中的 melittin<sup>9</sup> 等皆是屬於  $\alpha$ -helix 結構。這些皆可用螺旋輪 (helical wheel) 圖來表示會較易判斷。



圖 1-3. 為 magainin 2 的  $\alpha$ -螺旋結構<sup>10</sup>

## B. $\beta$ -摺疊( $\beta$ -sheet)

此類結構較具有剛性且常含有數個不等的胱氨酸 (cystine) 以雙硫鍵方式來幫助形成  $\beta$ -sheet 骨架<sup>11</sup>，這類常見物質在動物體內的免疫系統裡扮演相當重要角色，在系統中的淋巴球可釋放防禦素 (defensin) 經蛋白酶修飾後便具有對付外來的病原菌，舉例來說  $\alpha$ -defensin 如人類的 HNP3，而  $\beta$ -defensin 有人類的 hBD3 等，它們的差異只在於形成雙硫鍵的位置不同<sup>12</sup>。

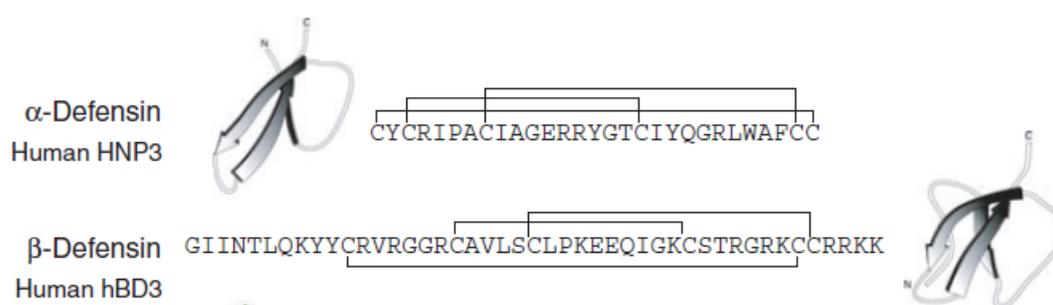


圖 1-4.為 HNP3 及 hBD3 的  $\beta$ -摺疊結構<sup>12</sup>

## C. 其它結構

除了上述明顯的結構外區分外，抗菌胜肽也有以  $\alpha$ -helix 和  $\beta$ -sheet 混合型的結構，像從黑腹果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 中所發現的 drosomycin<sup>13</sup>，另外從小牛嗜中性血球分離出來的 indolicidin 是屬於無序結構(random)<sup>10</sup>，而由斑腹刺蟻蝽(*Podisus maculierntis*) 中發現的 Thanatin 則為迴路結構(loop)<sup>14</sup>，或是環型胜肽的脂胜肽

(lipopeptide) 如 Daptomycin、polymixin B 也皆具有抗菌的功效。



圖 1-5.為 indolicidin 的無序結構<sup>10</sup>

### 1-2-2.特定胺基酸的組成

在抗菌胜肽的序列當中，不難發現某些胺基酸會在胜肽表現出特別的功能或影響結構的特異性，而這些胺基酸的特性可在日後藥物發展上提供重要的訊息。例如富含有脯氨酸 (proline) 一類的抗菌胜肽，在此類研究結果顯示出它具有抗菌活性，且對細胞毒性較低和低溶血性等優點<sup>15</sup>。而富含色胺酸 (tryptophan) 抗菌胜肽由於其疏水性高因素，因此有相當高的抗菌活性。另外也有利用其混合其胺基酸方式來達到特殊的效果，如許多抗菌胜肽在高濃度鹽類環境下，抗菌能力會大幅降低，因此 Tam 等人利用富含胱氨酸 (cystine) 和甘氨酸 (glycine) 來合成耐鹽類的抗菌胜肽。藉由其胱氨酸 (cystine) 以雙硫鍵方式形成較為剛性的  $\beta$ -sheet 結構，及甘氨酸 (glycine) 能較偏向形成  $\beta$ -sheet 穩定特性，使得胜肽結構不易因高鹽類濃度下改變構型，而造成抗菌能力下降<sup>16</sup>。

### 1-3. 抗菌胜肽的殺菌機制

以目前來說抗菌胜肽的殺菌機制相當複雜且繁多，就以胜肽本身的長度、結構、電荷數、疏水性、氫鍵作用等都可能影響其抗菌能力，所以很多原因尚在研究中。但普遍來說都與於細菌膜作用有關，如形成孔洞、造成外膜蛋白功能喪失、中和膜電位外等<sup>17.18.10</sup>；但還是有部分的抗菌胜肽能進到膜內去抑制細菌體內重要的蛋白質、DNA 等<sup>19.20</sup>。就以上而言我們將抗菌機制區分成(1)作用在膜上和(2)膜內裡的物質以便探討。

#### (1)作用在膜上

##### I. 形成孔洞機制<sup>17</sup>

###### A. 桶狀式穿鑿 (barrel-stave mechanism)

一開始抗菌胜肽的親水性面會與膜表面的靠近，也就是與磷脂質極性端(polar head)作用，之後利用疏水性的胺基酸側以垂直的方式插入到細菌膜內的疏水性中心，而胜肽上親水性面會暴露在外側，疏水性面則緊貼附在磷脂質的非極性的長鏈碳，因而形成通道。比較特別的是此作用機制的胜肽長度至少要能貫穿脂雙層(圖 1-6(A))。

###### B. 地毯式包覆 (carpet mechanism)

此機制的抗菌胜肽會用疏水性面以平行方式貼附在膜上，當胜肽

到累積達某個濃度時便開始瓦解整個細菌膜，就像清潔劑一樣最後形成微胞，並造成細菌體內大量物質的流失，導致細菌的死亡(圖 1-6(B))。

### C.超環狀孔洞 (toroidal pore mechanism)

它與桶狀式穿鑿相當類似，也是以垂直方式插入形成孔洞，不同在於超環狀孔洞形成時，在孔洞周圍的磷脂質是呈現連續彎曲的形狀，也就是磷脂質的頭部是向外，這意味著胜肽結合部位都只跟磷脂質極性端作用。也就是說這種由胜肽引起的雙層結構的彎曲，會連接膜的內外側形成孔洞，最後使得細菌內物質流出 (圖 1-6(C))。

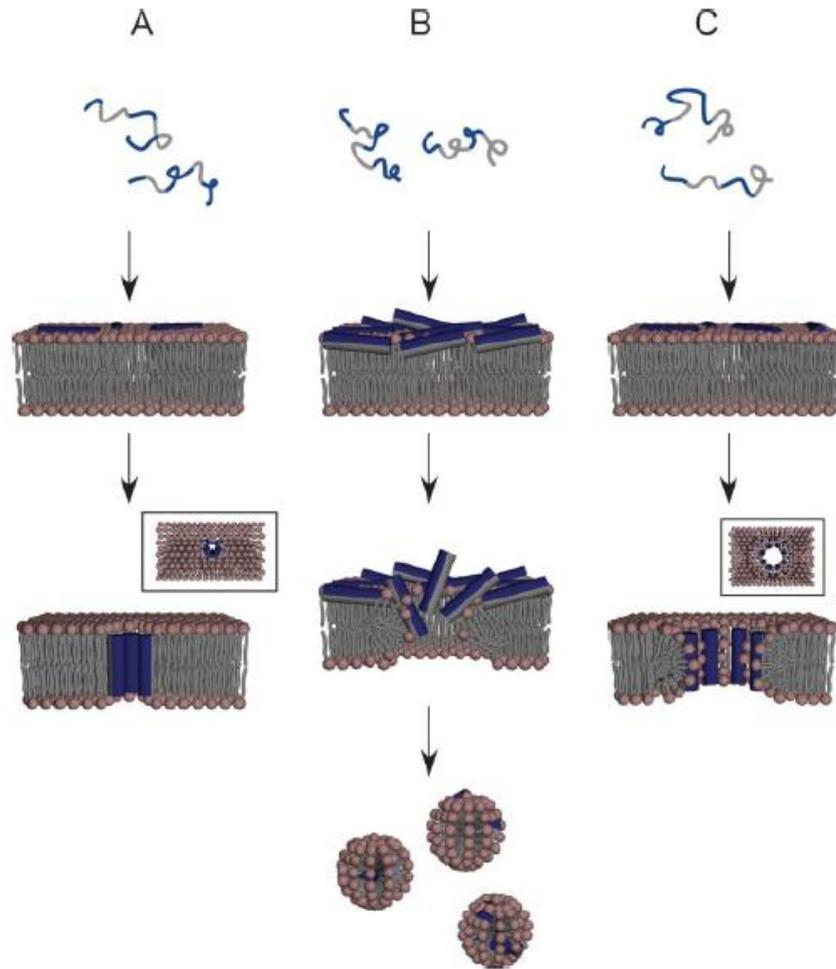


圖 1-6. 形成孔洞機制圖<sup>17</sup>。淺灰色表示為疏水性面，深藍色為親水性面；(A)為桶狀式穿鑿 (barrel-stave mechanism)；(B)地毯式包覆 (carpet mechanism)；(C)超環狀孔洞 (toroidal pore mechanism)。

## II. 電荷聚集機制 (Charge Cluster Mechanism)<sup>18</sup>

由 Epanand 等人提出，此種現象發生在高電荷密度 (charge density) 的抗菌胜肽，因帶正電的胺基酸會吸引周遭的負電磷脂質並產生聚集效應，進而影響細菌膜上重要蛋白質，造成細菌失去正常機能導致死亡。通常此機制對於革蘭氏陰性菌毒殺性較高。

事實上大部分革蘭氏陰性菌的膜不全都為帶負電荷的磷脂質組成，反而較為帶中性的磷脂質，以 *E-coli* 為例：膜上帶負電的磷脂質才共占 20%，包括 phosphatidylglycerol (PG)、cardiolipin (CL) 而帶中性的磷脂質 phosphatidylethanolamine (PE) 為 80%<sup>7</sup>，這些負電的磷脂質會均勻分散到中性的磷脂質，以減少電荷排斥力(圖 1-7)。而帶負電的磷脂質區域正是細菌重要蛋白質的結合區域，當高電荷密度的胜肽與負電荷磷脂質結合，會使得蛋白質構型改變而喪失功能。另外此胜肽的結構較為彈性，不需要很強的  $\alpha$ -helix 構型。

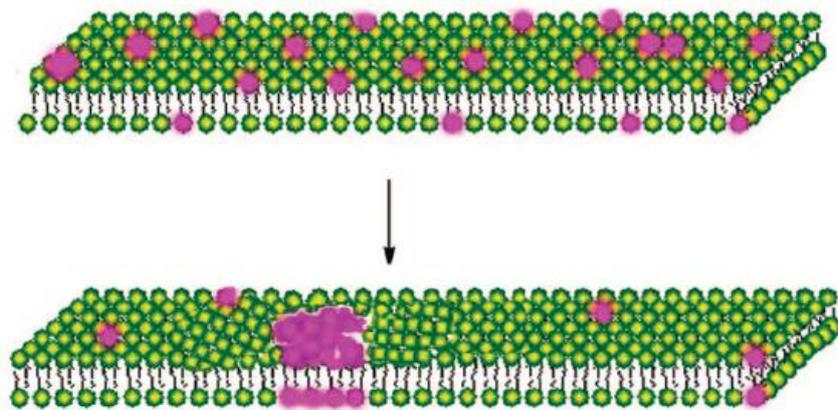


圖 1-7. 電荷聚集機制圖<sup>18</sup>。綠色部分代表為中性的磷脂質；紫色部分為帶負電荷的磷脂質。一般正常狀況下負電荷的磷脂質會均勻分散至表面，而當帶正電荷的胜肽加入後，便會和負電荷的磷脂質產生聚集現象。

## (2)作用在膜內裡的物質

除了上述胜肽對於膜上的抑制外，在細菌體內有許多關於生長代謝因素的分子等，而這些皆有可能成為被抗菌胜肽當作抑制的目標。如由白星花星龜 (*Protoetia brevitarsis*) 中所設計修飾後的抗菌胜肽 9Pbw2 及 9Pbw4，在 DNA 的凝膠電泳實驗上顯示出胜肽濃度為 20  $\mu\text{M}$  時有明顯的移動，這表示出它們與 DNA 有結合，而可能導致細菌功能的缺失或改變<sup>19</sup>。而具有抑制蛋白質活性，像是 histatins 能抑制口腔裡的牙齦類桿菌(*Bacteroides gingivalis*)中的類胰蛋白酶，另外在馬的白血球中 eNAP-2 抗菌胜肽則抑制微生物中的絲胺酸蛋白酶<sup>20</sup>。

還有一類稱為 Lantibiotics 的抗菌胜肽，它的序列含有硫的胺基酸是在革蘭氏陽性菌所發現到，像 Mersacidin 是一種能跟 lipid II 結合的胜肽，由於 lipid II 它是個胜肽聚糖 (peptidoglycan) 的前導物，所以就抑制了細胞壁的合成<sup>21</sup>。而 Lantibiotics 類的抗菌胜肽有廣範的抗革蘭氏陽性菌能力，已經被應用在食品保藏和治療被微生物感染的人和動物<sup>22</sup>。

其它的機制，如能抑制細菌進行分裂的 microcin 25，此胜肽能使細菌無法形成分隔現象<sup>23</sup>。事實上對於細菌內物質作用不只這些，除此之外還有許多的抑制因素還正陸續被發現或釐清。因此抗菌胜肽的機制是相當多元，作為藥物開發可為相當廣泛。

#### 1-4.細菌對胜肽的抗藥性及未來藥物的發展

了解細菌的結構，有助於我們在設計上能有新的抑制細菌模式，同樣的在此也能知道細菌的抗藥性行為。革蘭氏陰性菌與革蘭氏陽菌的差別在於陰性菌擁有外層膜且細胞壁較薄，陽性菌的細胞壁較厚。一般傳統抗生素對於陰性菌較沒有效果，因為它的外膜上含有一種為 Lipopolysaccharide (LPS) 的脂多醣體，它能與細胞壁中一些  $Mg^{+2}$ 、 $Ca^{+2}$  等金屬離子結合使得外膜上的蛋白質更加緊密，造成抗生素不易進入，而在文獻中也指出 LPS 也會影響到抗菌胜肽的抗菌效果<sup>24.17</sup>。

有些研究也指出某些細菌會利用 PhoP/PhoQ 雙系統來調控，以增加對胜肽的靈敏度，藉由加入帶有正電的荷 ethanolamine 和 4-aminoarabinose 來修改調節膜上的組成<sup>6</sup>。這些由細菌產生的對抗胜肽的因素還有相當的多<sup>25.26</sup>，雖然已有部分的抗藥行為，但抗菌胜肽的抑制行為也相當的多。至於在菌株毒殺的選擇性上，不論是廣效型或單一型抗生素都具有發展的潛力，現今廣效型的藥物看似相當較為熱門，但由於廣效型抗生素進入人體內可能會抑制腸道裡的益生菌，進而導致有害的菌繁殖<sup>18</sup>。

## 1-5.研究動機

在自然界中，昆蟲屬於開放式系統，不像哺乳類動物含有淋巴系統來過濾血液中入侵的微生物，因此在昆蟲體內會有自己的防禦機制，也就是抗菌胜肽。因此本實驗利用硬壁蝨 (hard tick, *Ixodes sinensis*) 唾液腺中所發現的 ixosin-B 作為目標物。此胜肽總長含有 32 個胺基酸且在文獻上顯示出它具有抗菌能力<sup>27</sup>。

實驗中將原先 32 個胺基酸序列 ixosin-B (QLKVDLWGTRSGIQPEQHSSGKSDVRRWRSRY-NH<sub>2</sub>)，來做分段區域的設計，從中找尋 ixosin-B 中最具有抗菌活性的區域。由於根據抗原決定基的長度作為標準，已知的最短具有功能的胺基酸序列為六個，因此以五重複的方式去設計五條名為 TSG (tick salivary glands) 的抗菌胜肽，分別為四條十肽的 TSG-1 (QLKVDLWGTR-NH<sub>2</sub>)、TSG-2 (LWGTRSGIQP-NH<sub>2</sub>)、TSG-3 (SGIQPEQHSS-NH<sub>2</sub>)、TSG-4 (EQHSSGKSDV-NH<sub>2</sub>) 及一條十二肽的 TSG-5 (GKSDVRRWRSRY-NH<sub>2</sub>)，由下面表 1-2 所示。另外在設計上不同於一般天然型式胜肽，在 C 端多加上 NH<sub>2</sub> 官能基，其目的增強抵抗被酵素降解能力和增加在胜肽序列上的正價性來加強其抗菌活性。待至找出其較重要的抗菌活性部位，再藉由胺基酸取代和單一胺基酸的切割，增強其抗菌能力及降低序列長度，以便日後降低藥物發展上的成本。

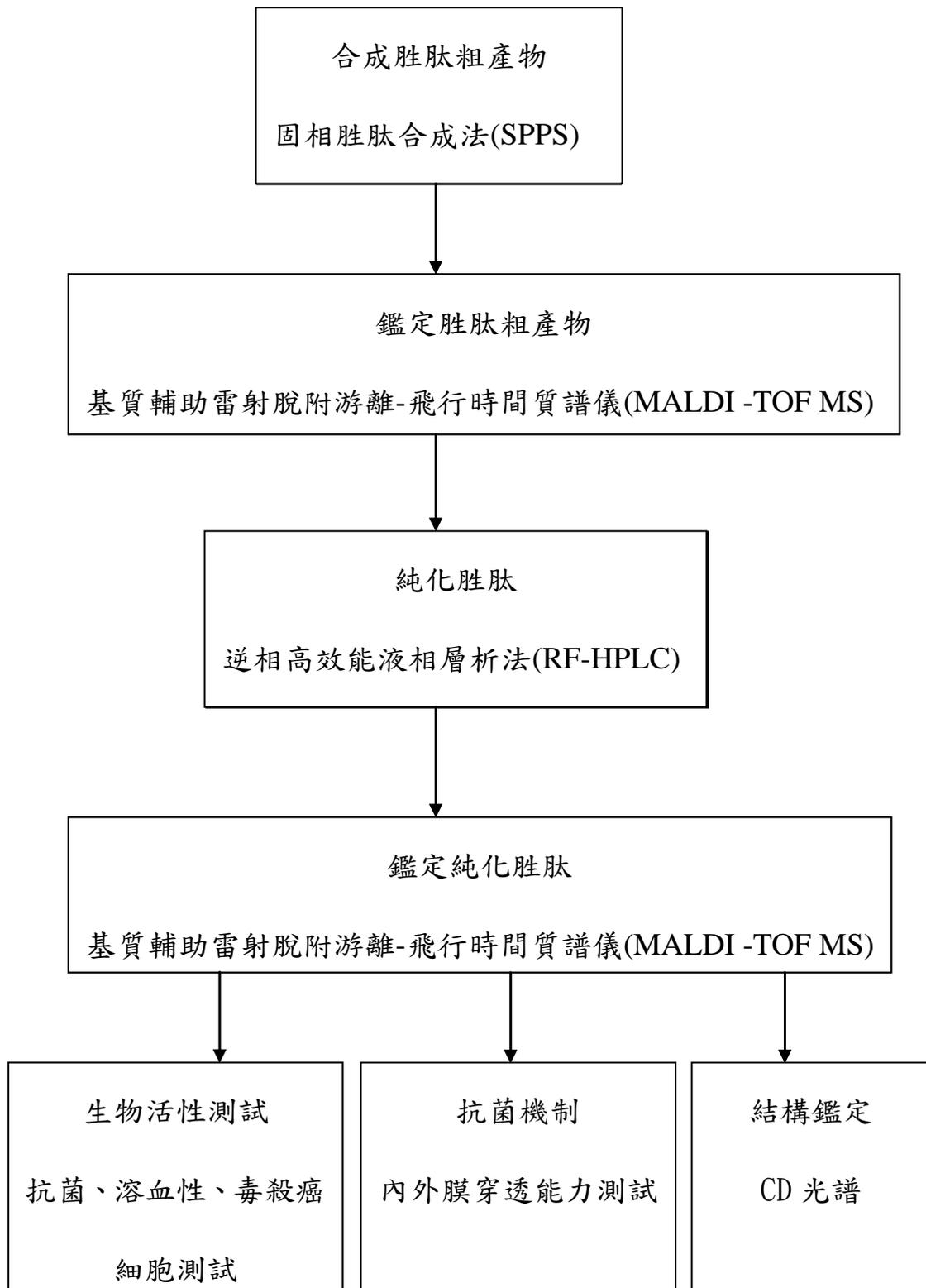
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
Ixosin-B	Q	L	K	V	D	L	W	G	T	R	S	G	I	Q	P	E	Q	H	S	S	G	K	S	D	V	R	R	W	R	S	R	Y	
TSG1	Q	L	K	V	D	L	W	G	T	R																							
TSG2						L	W	G	T	R	S	G	I	Q	P																		
TSG3											S	G	I	Q	P	E	Q	H	S	S													
TSG4																E	Q	H	S	S	G	K	S	D	V								
TSG5																						G	K	S	D	V	R	R	W	R	S	R	Y

表 1-2.胜肽序列分割設計

## 第二章 實驗方法與材料

本實驗一開始利用固相胜肽合成法(Solid phase peptide synthesis, SPPS)合成所需的胜肽，之後以逆相高效能液相層析法(Reversed-phase high performance liquid chromatography, RF-HPLC)純化分離胜肽及基質輔助雷射脫附游離-飛行時間質譜儀(Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight Mass spectroscopy, MALDI -TOF MS)來鑑定是否為正確的胜肽，待胜肽量收集到所需量後再做接下來的實驗測試，而結構鑑定實驗則以圓二色圖譜(Circular Dichroism, CD)判斷胜肽在仿膜系統中的二級結構。後續部分主要以生物活性測試及抗菌機制。而生物活性測試中主要包含抗菌測試，用來針對細菌的抑制能力大小、溶血性測試其目的為胜肽對紅血球是否造成傷害，至於抗菌機制則以內外膜穿透能力測試來探討其物質是否有流露，另外，在生物活性測試中還用毒殺癌細胞測試來了解對癌細胞是否也有抑制生長效果，實驗總流程圖如下。

實驗總流程：



## 2-1.固相胜肽合成法

固相胜肽合成法 (Solid phase peptide synthesis, SPPS)它的最大優點是產率高，且較不易有太多的副產物產生。其原理就是將樹酯 (Resin)當作支撐物，利用樹酯上的官能基與胺基酸的羧基產生鍵結，並以 C 端方向固定上去，接著再把欲接的胺基酸和活化試劑一起加入，以進行偶合反應的肽鍵生成，連續相同的步驟就可得到一長串的胜肽序列，在這中間由於可藉由溶劑將反應完後的產物沖洗，因此可帶走上一部殘留的反應物，進而大大降低副產物的發生。而在胺基酸的氮端的保護主要有兩種保護基被使用，一種為 Boc (t-butyloxycarbonyl)保護基，其切除氮端的保護基試劑是用酸移除，此方法是用於 Merrifield 樹酯，另外的一種為 Fmoc/t-Bu(Fluorenylmethyloxycarbonyl/ tert-buriy)保護基，使用鹼試劑便可移除，這樣的胺基酸保護基常與 Wang 樹酯或 Rink amide AM 樹酯搭配<sup>1</sup>，而本實驗是用 Rink amide AM 樹酯當固定相，它可在胜肽的 C 端多接上一個胺基。最後當胜肽序列合成完畢時，再加入化學試劑將胺基酸側鏈保護基和樹酯給一併切除後便可得到粗產物<sup>28.29.30</sup>，如圖 2-1。另外若要確認胺基酸是否接上，可藉由茚三酮 (Ninhydrin) 的呈色測試便可得知結果。

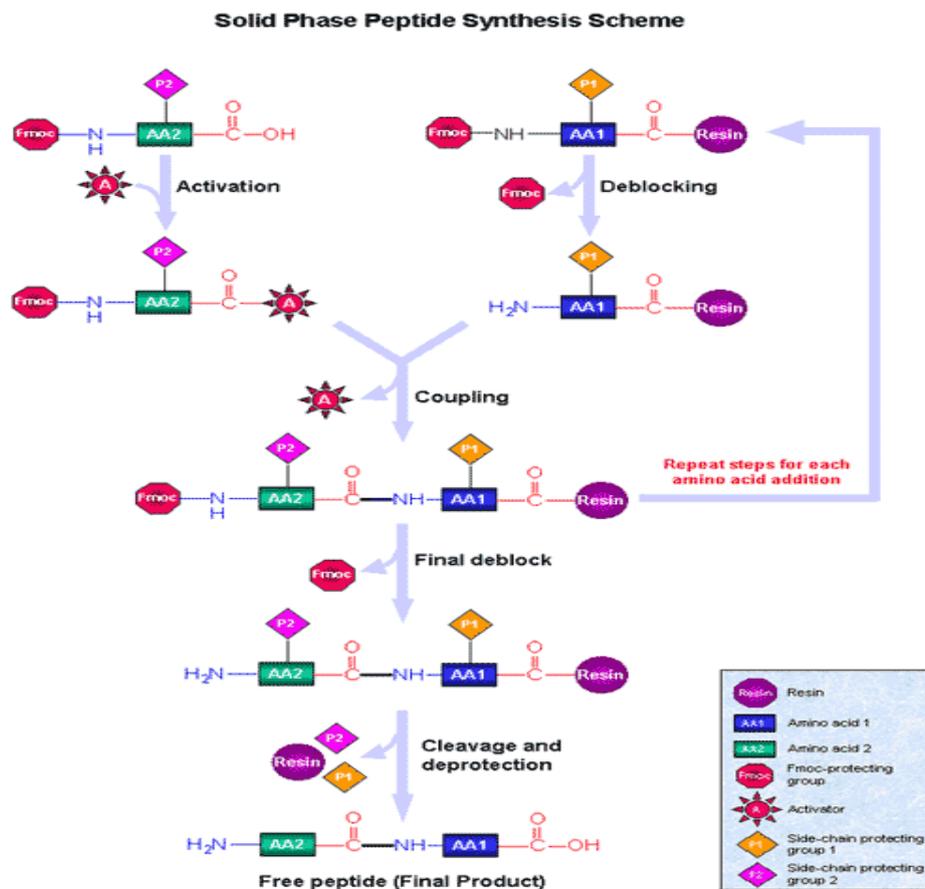


圖 2-1.為固相胜肽合成流程圖(sigma-aldrich)

實驗方法：

將 DCM (Dichloromethane) 倒入樹酯(0.125 mmole) 中並清洗 2 次各 5 分鐘，使樹酯產生膨鬆，之後加入 5 mL DMF (N,N-dimethylformamide) 清洗 3 次各 5 分鐘，去除上步驟所殘留的 DCM。接著加入 5mL piperidine 將樹酯上的 Fmoc 保護基切除，重覆 4 次反應各 15 分鐘，再加入 5 mL DMF 清洗 5 次各 5 分鐘。將混合好的胺基酸(0.25 mmole 胺基酸, 0.25 mmole HOBt, 0.25 mmole HBTU 及 0.25 mmole DIEA) 倒進樹酯反應 4 小時，假如合成胺基酸

序列越長，則反應時間須更久。反應完後加入 5 mL DMF 清洗 5 次各 5 分鐘，再以茚三酮測試看是否有偶合成功，若要繼續合成，則重複到加入 piperidine 的步驟，暫時結束則加入 5 mL DCM 清洗 2 次各 5 分鐘，完畢後放置 -20°C 保存。

當序列全部合成完畢後，加入混合型切除試劑(4.5 mL TFA、0.125 mL EDT、0.25 mL 水、0.5 mL thioanisole 及 0.372 g phenol)反應 2.5 小時，最後用氮氣將 TFA (Trifluoroacetic acid)吹乾，加入冰乙醚使其沉澱並以離心機離心，倒掉上層液體，將白色固體留下以水和 ACN (Acetonitrile)回溶，並置於 -80°C 中結冰，最後以凍乾機抽除可得到肽粗產物。

材料：

實驗材料	備註	來源
Rink amide AM resin	胺基酸樹脂	ANA SPEC
含有 Fmoc 保護基的胺基酸	N 端及側鏈皆有保護基的胺基酸	ANA SPEC
HBTU (1-hydroxybenzotriazole)	偶合試劑	ANA SPEC
HOBT(O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate)	偶合試劑	ANA SPEC
DIEA (N,N-Diisopropylethamine)	偶合試劑	Sigma-Aldrich

DCM (Dichloromethane)	膨大樹脂	TEDIA
DMF (N,N-dimethylformamide)	清洗樹脂	Fisher scientific
Piperidine	去除 F-moc 保護基	TEDIA
TFA (Trifluoroacetic acid)	切除樹酯及側鏈保護基	Alfa Aesar
EDT(1.2-Ethanedithiol)	切除樹酯及側鏈保護基之輔助試劑	Sigma-Aldrich
Thioanisole	切除樹酯及側鏈保護基之輔助試劑	Sigma-Aldrich
phenol	切除樹酯及側鏈保護基之輔助試劑	SHOWA

## 2-2. 茚三酮測試

茚三酮 (Ninhydrin) 可以與一級胺和二級胺反應產生呈色現象，因此可以用來偵測胺基酸上的胺基<sup>31</sup>，目的主要看是否有將羧酸基上的 Fmoc 給切除，或是用來測在偶合後胺基酸是否有接上，若為一級胺基則呈深藍色，二級胺呈黃色，其它為則為無色，下圖 2-2 則為其反應機制。

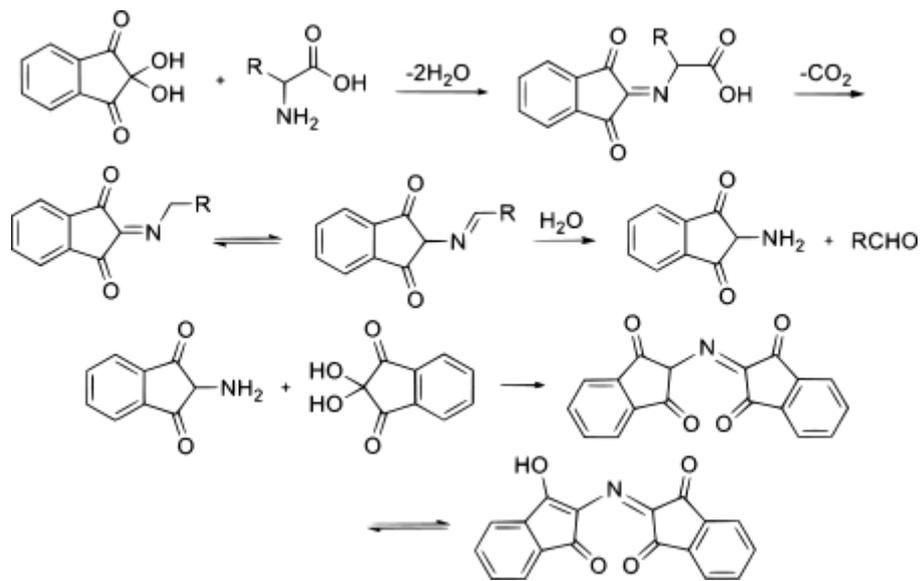


圖 2-2. 茚三酮與胺基酸反應圖(Wikipedia)

實驗方法：

先用刮勺取小量的樣品放到小管後，加入茚三酮試劑套組(共三種)，每種各加入 2  $\mu$ L 並混合均勻，之後加熱至 95 $^{\circ}$ C 約十分鐘，並以顯微鏡觀察若步驟為偶合完後則固體因呈現無色，而步驟為用在 piperidine 去除保護基則固體因呈現深藍色。

材料：

實驗材料	來源
Ninhydrin test kit	Sigma-Aldrich

### 2-3.逆相高效能液相層析法

逆相高效能液相層析法(Reversed-phase high performance liquid chromatography, RF-HPLC)是主要是用來分離胜肽和蛋白質常用的一種方法，其原理是藉由分析物會隨著不同的流洗液梯度而有不同的疏水性作用，藉由這些作用力的大小使的在不同時間裡能夠將分析物給分離。其填充的固定相使用疏水性的物質如 C6、C18 等管柱，而本實驗使用的是 C18 管柱作分離，也就是管柱內壁的 silica gel 表面加上十八烷基，通常分析物的極性大小會反映在滯留時間上，極性越大的物質會越早被沖提出來，反之極性越小物質則越晚流出。而本實驗中以固相胜肽合成法合成出來的胜肽，雖然有高產率及低副產物的優點，但在合成過程中或切除保護基時還是會有部分的副產物產生，因此須藉由 RF-HPLC 來分離。

實驗方法：

樣品前處理：

將胜肽粗產物以 ACN 和去離子水 (D.D water)溶解，並用震盪器震盪，如果胜肽極性較低則加的 ACN 比例較高，反之則較低。接著用 1mL 的小針筒將樣品吸出之後在接頭上裝過濾器，此目的為了防止樣品進入到 HPLC 後造成阻塞。經由以上的步驟後才能注入 HPLC 做分離。

移動相溶劑配制：

A 液：4 L D.D water +0.05% TFA

B 液：4 L ACN +0.05% TFA

加入 TFA 可使分析物較不易拖尾，並分得較開。

梯度的設定：

在 30 分鐘內 A 液/ B 液含量比例由 90:10 到 10:90，接著再轉換成 90:10 維持 2 分鐘，使管柱回到最初平衡狀態，偵測吸收波長設定為 225 nm，此為胜肽鍵的吸收波長。

材料：

實驗材料及設備	來源
ACN (Acetonitrile)	ECHO
TFA (Trifluoroacetic acid)	Lancaster
0.22 $\mu$ m filter	Millipore
微量注射針 (500 $\mu$ L、25 $\mu$ L)	HAMILTON
C-18 column	Waters
RP-HPLC (Pump L-2130、UV detector L-2400)	HITACHI

## 2-4.基質輔助雷射脫附游離-飛行時間質譜儀

現今測量生物大分子儀器所用的通常是用基質輔助雷射脫附游離-飛行時間質譜儀(Matrix –assisted laser desorption/ionization-time of flight Mass spectroscopy, MALDI -TOF MS)或電噴灑游離(electrospray ionization, ESI)，由於傳統的質譜儀會產生許多碎片離子，在鑑定生物大分子如蛋白質相當難以判斷，而 MALDI 與 ESI 它們皆屬於軟性離子化(soft ionization)，可以保持生物大分子的完整性。本實驗主要使用 MALDI 來鑑定胜肽分子<sup>32</sup>，它的離子源是由雷射光及金屬盤所組成，由於分析物和基質會因混合而形成固體的共結晶，當雷射光照射後會使的基質吸收能量並產生質子，因而從金屬盤上脫離而出，這些氣化的基質中會帶出部分的分析物，帶有正電荷離子分析物會經由電場加速到分析器，便可得到質荷比(mass-to-charge ratio 或  $m/z$ )，進而推測其分子量。通常偵測到的分析物主要是帶一個質子，但少數會出現帶 2 到 3 個質子。

實驗方法：

將分析物溶成液體並取 2  $\mu\text{L}$  和 2  $\mu\text{L}$  基質，混合均勻後點置金屬盤上，待自然風乾成固體，即可測 MALDI。本實驗的儀器使用委託張銘軒同學幫忙操作。

基質的配製：

將 D.D water、TFA、CAN 以 49.9：0.1：50 配製成 10 mL 後，  
取 1 mL 與 10 mg 基質混合均勻。

材料：

實驗材料	來源
$\alpha$ -CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)	ALDRICH
ACN (Acetonitrile)	ECHO
TFA (Trifluoroacetic acid)	Lancaster

## 2-5.細菌的培養與測試

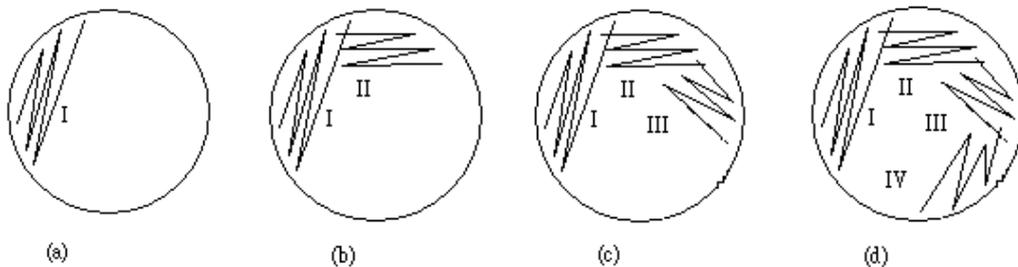
### 2-5-1.細菌的接種

本實驗採用劃碟法，其方法可適用於菌種分離、接種等，由於細菌存放於 4°C 保存，雖然可抑制生長能力，但還是會有緩慢的生長，若存放太久會導致細菌老化或死亡，因此大約每隔一段時間就需接種，來培養細菌下一代。在接種時須選擇單一獨立的菌落，以確認每一次都由同一隻細菌分化而來，另外細菌培養在固定洋菜膠可依比例分為固態 (1.5% agar)、半固態 (0.65~1% agar)，實驗中我們以 1.5% agar

含量培養，而所用的固態培養基裝在塑膠培養皿 (Petri dish) 稱之為平盤培養基 (plate)。

實驗方法：

1. 接種環使用前需以酒精燈火焰燒紅，在培養基空白處上輕搓數次以達到冷卻後接種環。
2. 以接種環輕刮菌落，把培養皿蓋子蓋上。
3. 打開新的空白培養皿，並在上頭來回劃數條線，之後再將接種環用酒精燈燒紅，注意每次劃之前都需要這一步。
4. 將培養皿轉約 90 度劃第二次線，如下圖所示直到第四條線為止。



5. 接種環再次滅菌才能放回。
6. 將培養皿倒置(避免水氣聚集於蓋子面，再滴到 agar 上，干擾細菌分離效果)，置於 37°C 培養箱中培養過夜。

### 2-5-2.養菌

若要將細菌大量培養就是以液態培養方式，而細菌的養分來源就是由液態培養基又稱 broth 而來，在養菌的過程中若細菌為好氧性細菌，則須要在培養箱中搖晃讓空氣能與培養液混合才行。

實驗方法：

- 1.將接種環燒紅後冷卻並刮下菌落。
- 2.打開裝有 1 mL 的培養液的試管管蓋，管口需過火。將沾有菌落的接種環伸入培養液中並敲管壁（使菌落脫離），再次將管口過火，並蓋上蓋。
- 3.接種環再次燒紅才可放置。
- 4.離心管蓋子不能鎖緊（讓細菌有氧氣）。
- 5.於 37°C 培養箱中培養。

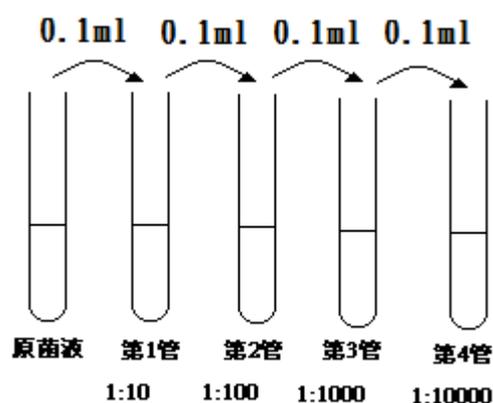
### 2-5-3.測量細菌的數目

用來測量細菌的數目可以用兩種方式，一種為用分光光度計測試，以 0.5 McFarland 標準液當基準，其吸收值在 0.08 換算成菌數約為  $10^8$  CFU/mL (colony forming unit/mL)，所以當菌液配製到 0.08 時便可得

知菌數，另外一種較傳統方式為塗盤數菌其方法如下。

實驗方法：

1.將隔夜培養過的肉湯進行稀釋，先開始從原本裝有菌體的離心管取 0.1 mL 培養液轉移至 0.9 mL 無菌水試管中，混合均勻後，再取 0.1 mL 轉至無菌水試管中，如下圖所示。



2.每管稀釋液各取 0.1 mL，滴在新培養皿上，以 L 型玻璃棒塗抹，並使菌液覆滿整個平盤表面。

3.將所有盤倒置，在 37°C 下培養。

4.計算整個平盤菌落數目，將其乘以該菌液稀釋倍數的倒數，以計算每 mL 的菌數平均值。

#### 2-5-4.細菌的生長曲線實驗

細菌在獨立培養液裡的生長曲線圖一般可分為四個時期：(1)遲滯期(lag phase)、(2)對數期(log phase)、(3)穩定期(stationary phase)及(4)死亡期 (death phase)。一開始細菌處於新的環境中，在這段適應的時間下並不會有大量菌數產生，這現象稱做遲滯期；之後便會進入對數期開始菌數大量繁殖，此時環境中養分大於自己所產生的代謝物；接著便進入穩定期，養分消耗及代謝物生成使得細菌生長能力變得緩慢，最後當養分耗盡和代謝物大量累積造成細菌的死亡，便稱為減數期(圖2-3)。

通常在做下藥實驗測試時，會選擇對數期狀態下的細菌，因為此時的活性較高，而到後面時細菌的活性可能呈現老化現象。而不同種菌株的生長曲線也會有所不同。

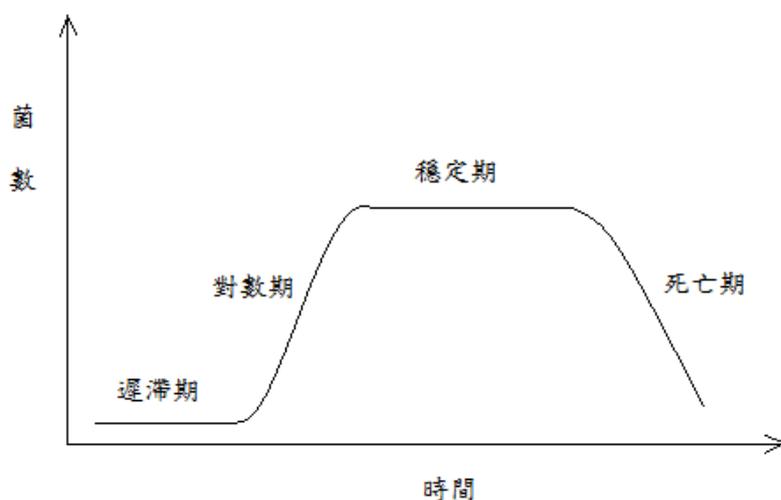


圖 2-3.細菌的生長曲線

實驗方法:

1. 從固態培養基上取下獨立的菌落，以 LB 培養液培養於 37°C 並搖晃。
2. 每隔兩小時測量一次，在吸收值為 600 nm。

#### 2-5-5.最小抑制濃度及最小殺菌濃度

最小抑制濃度(Minimum inhibitory concentration, MIC)是指最小藥量濃度所能達到抑制 90 %的細菌，而最小殺菌濃度(Minimum bactericidal concentration, MBC) 則能抑制 99 %的細菌，實驗中以下藥後培養至 16 小時來當作 MIC 指標，當玻璃管內呈現澄清則為有抑制效果，若沒抑制能力則呈現混濁狀，而繼續培養至 24 小時後，澄清則訂為 MBC。

實驗方法:

1. 先將細菌培養至含有液態培養液的玻璃試管內，在 37°C 培養箱裡培養並要搖晃，直到最佳活性期間，實驗中的綠膿桿菌為 8 小時，金黃色葡萄球菌為 6 小時，而大腸桿菌為 4 小時。
2. 培養完後將菌液稀釋到吸收波在 600 nm 值為 0.8 (大約含  $1 \times 10^8$  菌

數)，之後稀釋到每管為  $5 \times 10^5$  CFU/mL。

3. 將胜肽以 124、64、32、16、8、4、2  $\mu$ M 二分之一稀釋法，再加入  $5 \times 10^5$  CFU/mL 菌量和 MH 培養液，最後玻璃試管內總體積為 1 mL。

4. 培養於 37°C 培養箱裡培養並要搖晃，待 16 小時觀察 MIC，24 小時後觀察 MBC。

EDTA 實驗方法:

1. 重複上述步驟 1~2 後，並同時加入 100  $\mu$ M 的 EDTA、各胜肽濃度及  $5 \times 10^5$  CFU/mL 菌量和 MH 培養液，最後玻璃試管內總體積為 1 mL，並觀察 MIC 及 MBC。

材料：

實驗材料	來源
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	食品工業發展研究所
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	食品工業發展研究所
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	食品工業發展研究所
LB broth	Sigma-Aldrich
Mueller Hinton Broth 2	Sigma-Aldrich
0.5 Mcfarland	CMP
Penicillin G potassium salt	Sigma-Aldrich
Agar	CONDA
EDTA	Sigma-Aldrich

## 2-6.溶血性測試

由於昆蟲體內不像人類有紅血球，因此若藥物設計須進入人體內，必須不能破壞紅血球的功能，文獻中指出雖然部分的抗菌胜肽有極好的殺菌能力，但同時也造成紅血球的破裂<sup>19,33</sup>。而胜肽 Ixosin B 是由昆蟲中所發現的，所以需測試胜肽在細菌和紅血球間是否有選擇性。

本實驗中將具有破膜功能的 Triton x100 當作 100 % 溶血效果，而只含 PBS 的當作 0 % 溶血效果，藉由比較後可得樣品溶血性的大小<sup>34,35</sup>，公式如下：

$$\frac{(\text{OD405 nm sample} - \text{OD405 nm zero lysis})}{(\text{OD405 nm 100\% lysis} - \text{OD405 nm zero lysis})} \times 100 = \text{Hemolysis (\%)}$$

實驗方法：

1. 將新鮮的人類血液離心 3000 rpm ，3 分鐘，並去除上清液。
2. 加入 PBS，pH=7.4，清洗 3 次，離心 1400 rpm，3 分鐘，並去除上清液。若不立即使用則存放於 4°C 保存。
3. 用 PBS 溶每個樣品，且樣品內含有 4% 紅血球和 100 μM 的胜肽，而最後總體積為 200 μL。
4. 100% 溶血性樣品總含有 0.4 % 紅血球和 0.2 % 的 Triton x100 以 PBS 溶，最後總體積為 200 μL。

5. 0% 溶血性樣品總含有 0.4 % 紅血球以 PBS 溶，最後總體積為 200  $\mu\text{L}$ 。
6. 全部樣品在 37°C 下培養 1 小時。
7. 離心 1400 rpm，10 分鐘，取 80  $\mu\text{L}$  上清液，用 ELSA 96well 測量，吸收值為 405 nm。

PBS 的配製：

取 20 mg NaCl、2 g KCl、14.4 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ 、2.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  一起溶於 1000 mL D.D water，之後稀釋 10 倍，pH 值調到 7.4。

材料：

實驗材料	來源
人類血液	自己
Triton x100	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
$\text{Na}_2\text{PO}_4$	Sigma-Aldrich
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck

## 2-7. 癌細胞毒殺測試

MTT 測試常用於生物上的側試，主要針對細胞的存活率及增殖能力，當黃色固體的 MTT 溶於水後，可被活細胞內粒腺體中的琥珀酸去氫酶將它轉換成 MTT formazan，此產物為紫色不溶性沈澱物，將它以 DMSO 溶解後以吸收波長 540 nm 偵測，其結構如下圖 2-4。由於活細胞的粒腺體才具有活性的酵素，因此當吸收光會與活細胞成正比，便可得知細胞的存活率<sup>36</sup>。所以本實驗藉由 MTT 測試來測試抗菌胜肽是否對癌細胞有毒殺的能力。

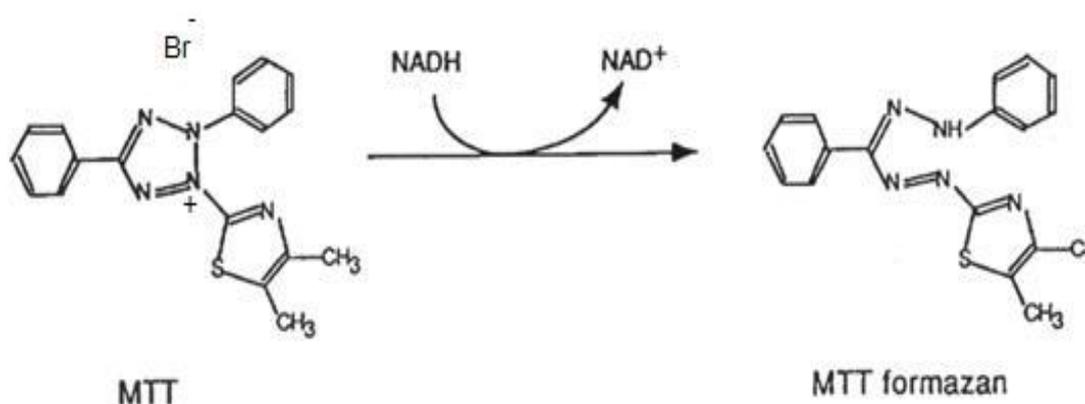


圖 2-4. 活細胞代謝後所產生 formazan 圖

實驗方法:

1. 將含有  $5 \times 10^5$  cells/mL 人類乳癌細胞株(MCF-7)以 DMEM 培養液，培養在 24well，體積為 1 mL 並加入一系列的胜肽，其濃度為 80  $\mu$ M。
2. 培養 24 小時後加入 MTT 試劑，並與細胞共同培養 2 小時。

3.結束後加入 DMSO 溶解 MTT formazan，用 ELISA 測量以 540 nm 之吸光值。

材料：

實驗材料	來源
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	GIBCO Corporation
MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)	Merck
DMSO (dimethyl sulfoxide)	Merck
MCF-7(human estrogen receptor (ER)-dependent breast cancer cells)	食品工業發展研究所

## 2-8. 胜肽的內外膜穿透能力

*E. coli* ML-35p 是一種 *E. coli* 突變的菌株，在它的細胞質裡含有  $\beta$ -半乳糖酶 ( $\beta$ -galactosidase)，但缺乏 lac permease，而在周質空間內擁有  $\beta$ -內醯胺酶 ( $\beta$ -lactamase) 的載體。此實驗目的為了瞭解胜肽作用機制為何，看它穿透能力是只針對外膜或能進入到內膜<sup>24.37.38</sup>。在針對胜肽對外膜穿透能力，實驗中使用 NCF (Nitrocefin) 是種含有  $\beta$ -內醯胺環的化合物，但由於它無法穿越細菌外膜，因此無法與  $\beta$ -內醯胺酶反應，但假如胜肽具有強力穿越外膜能力，便可允許 NCF 進入並被  $\beta$ -內醯胺酶開環而產生顏色，藉由顏色的變化就可偵測到，此產

物吸收波長在 450 nm，反應圖 2-5 如下<sup>37</sup>。

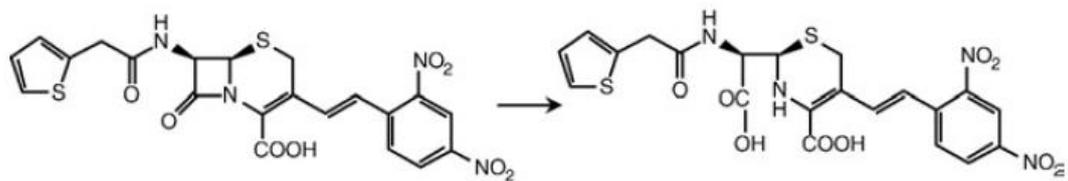


圖 2-5. NCF 反應圖<sup>37</sup>

另外偵測穿透內膜能力，則使用 ONPG (o-nitrophenyl-3-D-galactoside) 試劑，由於此突變菌株缺乏 lac permease 造成外在 ONPG 無法進入內膜，因此  $\beta$ -半乳糖酶所在的周質空間形成一個獨立狀態，假設胜肽有能力穿越內膜，ONPG 就會被  $\beta$ -半乳糖酶給切除形成有顏色的產物，此吸收波長在 405 nm，反應圖 2-6 如下<sup>37</sup>。

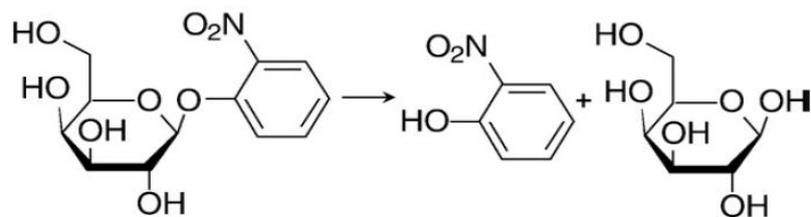


圖 2-6.ONPG 反應圖<sup>37</sup>

實驗方法:

外膜穿透能力:

1. 以 pH=7.4 的 PBS 配製樣品在 ELSA well，每個 well 體積為 200  $\mu$ L，且含有個別不同濃度的胜肽、*E. coli* ML-35p 的  $1 \times 10^8$  CFU/mL 菌數

及 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NCF 濃度。

2.不同濃度的胜肽在 200  $\mu\text{L}$  裡濃度分別為 10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、60  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 。

3.實驗中對照組為含有菌液、NCF 的 PMX (polymyxin B sulphate) 其濃度有 5  $\mu\text{M}$  及 10  $\mu\text{M}$  兩種。

4.吸收值用 540 nm，並連續培養觀測 90 分鐘。

內膜穿透能力:

1.以 pH=7.4 的 PBS 配製樣品在 ELSA well，每個 well 體積為 200  $\mu\text{L}$ ，且含有個別不同濃度的胜肽、*E. coli* ML-35p 的  $1 \times 10^8$  CFU/mL 菌數及 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ONPG 濃度。

2.不同濃度的胜肽在 200 $\mu\text{L}$  裡濃度分別為 10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ 、60  $\mu\text{M}$ 、80  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 。

3.實驗中對照組為含有菌液、ONPG 的 PMX 其濃度有 5  $\mu\text{M}$  及 10  $\mu\text{M}$  兩種。

4.吸收值用 405 nm，並連續培養觀測 8 小時。

材料：

實驗材料	來源
<i>E. coli</i> ML-35p	中興大學蘇鴻麟老師實驗室
NCF (Nitrocefin)	Merck

ONPG(o-nitrophenyl-3-D-galactoside)	ACROS
PMX (polymyxin B sulphate)	Merck

## 2-9. 圓二色光譜實驗

圓二色圖譜(Circular Dichroism, CD)廣泛用於DNA、蛋白質結構上的鑑定，其原理是利用具有光學活性分子可產生左旋光(levorotatory)和右旋光(dextrorotatory)兩種偏極光的不同吸收而來，其電子躍遷會受到鄰近分子的官能基及整體結構而影響，因而在不同條件環境中產生不同光譜，以蛋白質或胜肽的二級結構來講，它就可能包括 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -摺疊、迴路(turn)、無序纏捲(random coil)，以上這些結構和胜肽鍵( $C_{\alpha}$ -N)的構型有關，所以設定波長通常介於180~270 nm 之間，此波長範圍是屬於 $n \rightarrow \pi^*$ 和 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的電子能階躍遷，這個能階能差會隨二級結構不同而有所差異，其CD光譜圖2-7如下<sup>39</sup>。藉由這樣的特性可以得知合成出來的胜肽在SDS (sodium dodecyl sulfate) 仿膜系統中與在DDW裡的結構上的變化。

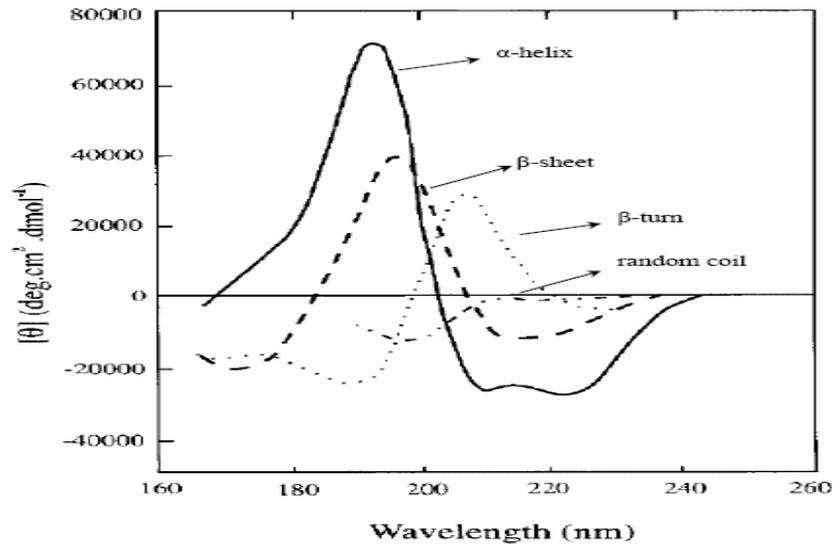


圖 2-7. 胜肽在圓二色圖譜所出現的結構<sup>38</sup>

實驗方法:

1. 將胜肽配製成 5  $\mu$ M 溶於 25 mM SDS。
2. 將胜肽配製成 5  $\mu$ M 溶於 D.D water。

材料：

實驗材料	來源
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich

### 第三章 結果與討論

#### 3-1. 胜肽合成設計原理

由 32 個胺基酸序列 ixosin-B (QLKVDLWGTRSGIQPEQHS SGKSDVRRWRSRY-NH<sub>2</sub>)，做分段區域的設計而來的 TSG-1(QLKVDLWGTR-NH<sub>2</sub>)、TSG-2(LWGTRSGIQP-NH<sub>2</sub>)、TSG-3(SGIQPEQHSS-NH<sub>2</sub>)、TSG-4(EQHSSGKSDV-NH<sub>2</sub>) 及 TSG-5(GKSDVRRWRSRY-NH<sub>2</sub>) 在大腸桿菌、金黃色葡萄球菌和綠膿桿菌，用 100 μM 初步篩選上皆無抑制能力，但以序列中的所組成胺基酸來看，發現到在 TSG-5 序列裡帶有較多負電荷的胺基酸，包括精胺酸 (Arginine) 和賴胺酸 (Lysine)，因而推測可能此序列有抗菌活性的潛力。

從文獻中得知富含精胺酸和色胺酸(Tryptophan) 具有較好的抗菌能力且在短序列下就有抗菌效果<sup>40</sup>，因此設計 TSG-6 用較疏水性的色胺酸來取代甘胺酸(圖 3-2)，而在 MIC 結果顯示對於大腸桿菌有抑制效果。為了更進一步得到更好的抗菌活性，TSG-7 使用序列上已含有疏水性的酪胺酸(Tyrosin)將序列上帶負電的天冬胺酸 (Aspartic acid)給取代掉(圖 3-3)，而不用色胺酸取代的原因是因為過多的色胺酸會造成溶血效應<sup>40</sup>，實驗發現 TSG-7 對三種菌皆有抑制效果。

在 TSG-6 和 TSG-7 序列上的設計上皆含有 12 個胺基酸，但以藥

物開發的成本考量上希望能降低其序列長度，因此接下來的設計則以最有效的 TSG-7 序列一次減少一個胺基酸，也就是 11 肽、10 肽、9 肽及 8 肽，分別命名為 TSG-8、TSG-9、TSG-10 和 TSG-11。而因為從 TSG-6 到 TSG-7 序列差異在於 N 端的色胺酸，實驗發現 MIC 的結果大幅度的下降，因此 N 端上的色胺酸扮演重要抗菌活性的角色，而序列遞減就由 C 端的方向，由右至左(表 3-1)。

當胜肽靠近細菌膜後，不管是作用在膜上或膜內必會插入膜中，而是以胜肽的 N 端或 C 端進入便不得而知，而從先前設計的 TSG-6 到 TSG-11 都有抗菌活性，且發現到皆有一個共同特徵在 N 端上皆有一個色胺酸，因此設計由 TSG-8 及 TSG-9 衍生而來的 TSG-8-1 和 TSG-9-1，在它們的 N 端分別擁有兩個色胺酸與兩個賴胺酸，來推測可能造成的原因。

	Peptide sequence	MW	Net charge	RT
<b>ixosin-B</b>	QLKVDLWGTRSGIQPEQHSSGKSDVRRWRSRY-NH2	3813.3	5.1	8.37
<b>TSG-1</b>	QLKVDLWGTR-NH2	1214.4	2	10.45
<b>TSG-2</b>	LWGTRSGIQP-NH2	1113.3	2	9.96
<b>TSG-3</b>	SGIQPEQHSS-NH2	1068.1	0.1	5.75
<b>TSG-4</b>	EQHSSGKSDV-NH2	1072.1	0.1	4.35
<b>TSG-5</b>	GKSDVRRWRSRY-NH2	1564.8	5	7.73
<b>TSG-6</b>	WKSDVRRWRSRY-NH2	1693.9	5	8.20
<b>TSG-7</b>	WKSIVRRWRSRY-NH2	1742	6	9.42
<b>TSG-8</b>	WKSIVRRWRSR-NH2	1578.8	6	8.73
<b>TSG-8-1</b>	WWSIVRRWRSR-NH2	1636.9	5	10.00
<b>TSG-9</b>	WKSIVRRWRS-NH2	1422.7	5	9.74
<b>TSG-9-1</b>	KKSIIVRRWRS-NH2	1364.6	6	8.01
<b>TSG-10</b>	WKSIVRRWR-NH2	1335.6	5	9.21
<b>TSG-11</b>	WKSIVRRW-NH2	1179.4	4	8.87

表 3-1. 為設計的胜肽總序列。RT(retention time)為滯留時間; Net charge

<sup>41</sup> 為在 pH =7 時的淨電荷值。

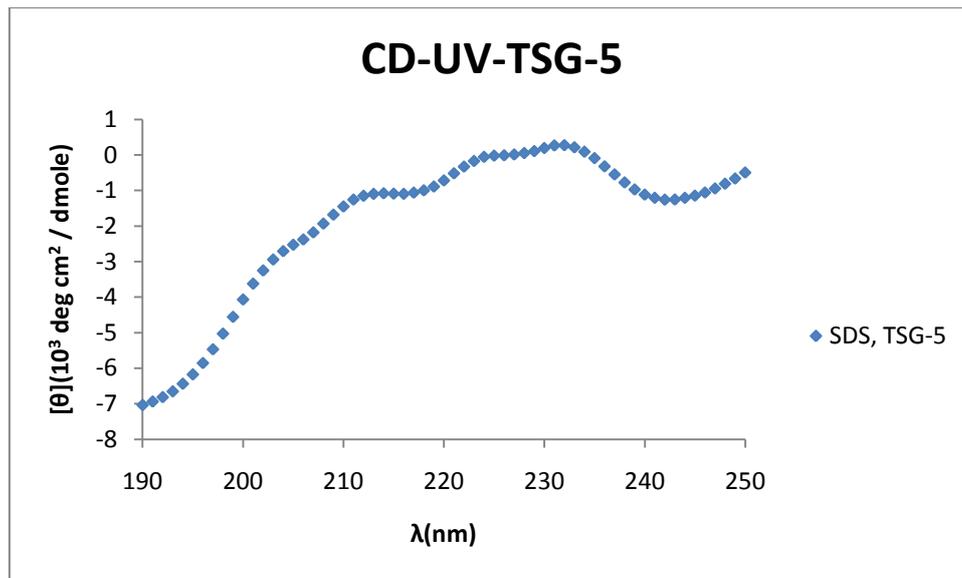
### 3-2.圓二色光譜的探討

實驗中所有胜肽皆以 5  $\mu$ M 濃度溶在 25 mM SDS (sodium dodecyl sulfate)的仿膜環境做測試。TSG-5 和 TSG-6 的結構相似，皆在 CD 光譜中顯示在靠近 190 nm 有個最低值，顯示出可能擁有迴路結構，其餘並無其他明顯訊號，可能是還有其它結構混合所導致。利用 K2D2 程式<sup>42</sup>來分析 CD 光譜，發現 TSG-5 和 TSG-6 的  $\alpha$ -螺旋結構所佔比例約 8 %。而 TSG-7 的 CD 光譜在 190 nm 及 210 nm 到 220 nm 有個最低值，在 205 nm 有個最高值，其結構是由不同二及結構所組成， $\alpha$ -螺旋結構所佔比例為 13 %。TSG-8 及 TSG-9 則具有  $\alpha$ -螺旋結構的外觀，在接近 192 nm 有個最高值，在靠近 208 nm 和 222 nm 皆有最低值，經 K2D2 程是分析它們的  $\alpha$ -螺旋結構所佔的比例約為 39 %與 30%。另外，比較特別是 TSG-8-1 此序列在圖譜上未顯示特定二及結構，它的 CD 光譜在 195 nm 有個最高值，並在 215 nm 出現最低值，但經由分析後結果卻顯示擁有 38 %的  $\alpha$ -螺旋結構。

至於 TSG-9-1 的 CD 譜中在 190 nm 有最低值，205 nm 有個最高值，其結構較偏向於迴路結構，在分析比對的  $\alpha$ -螺旋結構只有約 2 %相當低。TSG-10 在光譜中在接近 190 nm 有最低值，200 nm 有個高值，在 215 nm 和 225 nm 有兩個相對低值，推測是由不同二及結構所組成，比對的  $\alpha$ -螺旋結構為約 2 %。最後的 TSG-11 在靠近 197 nm 是

個最低值，而在 215 nm 出現高值，推測較偏向無序結構，而所含的  $\alpha$ -螺旋結構約為 5%。

A



B

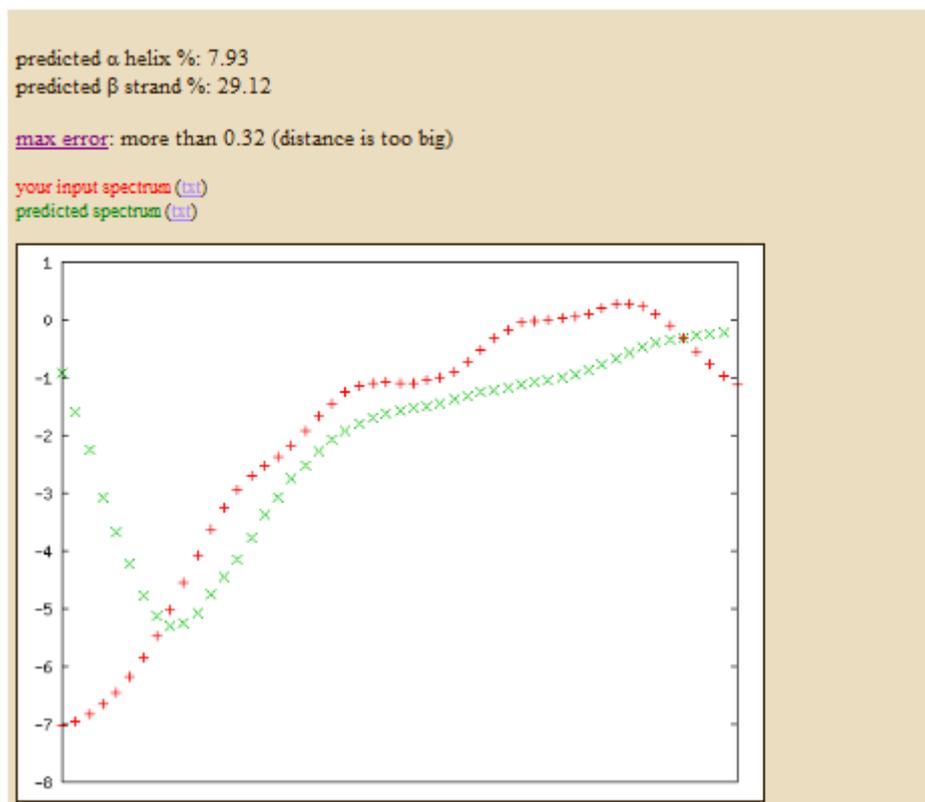
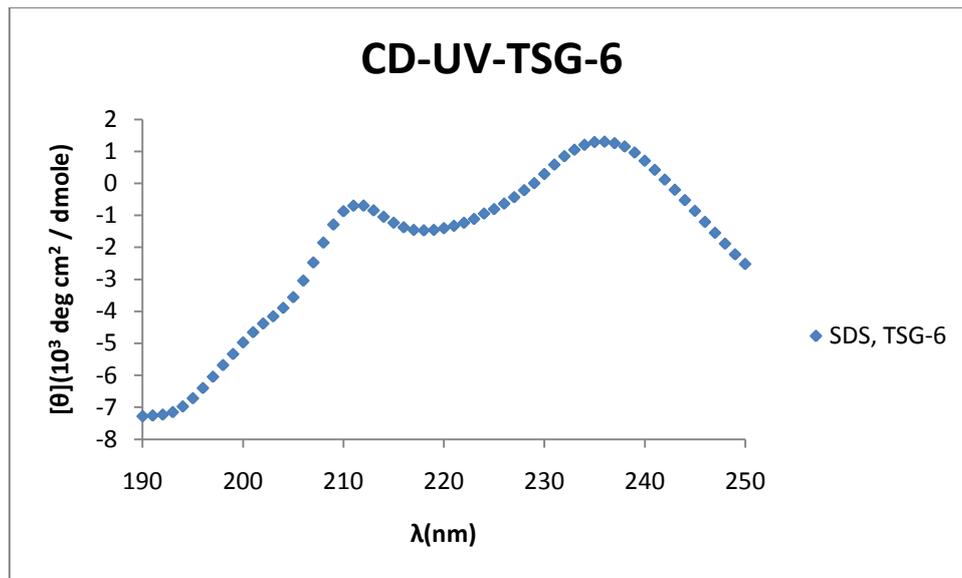


圖 3-1.TSG-5 之 CD 光譜圖

A. 5 $\mu$ M TSG-5在25mM的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-5在K2D2線上比對之CD結構預測圖。

A



B

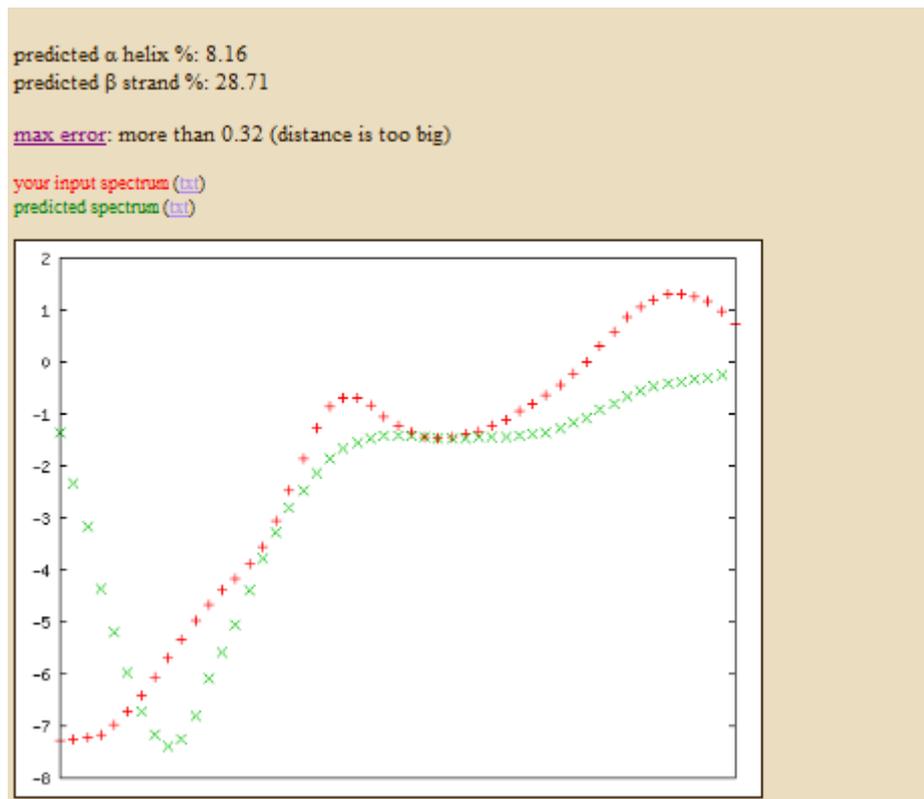
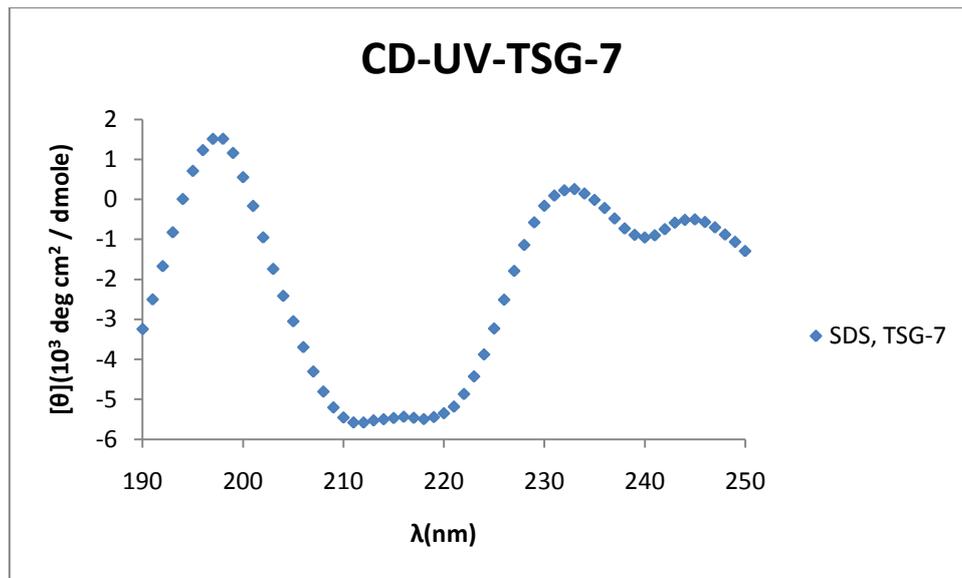


圖 3-2.TSG-6 之 CD 光譜圖

A. 5 $\mu$ M TSG-6在25mM的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-6在K2D2線上比對之CD結構預測圖。

A



B

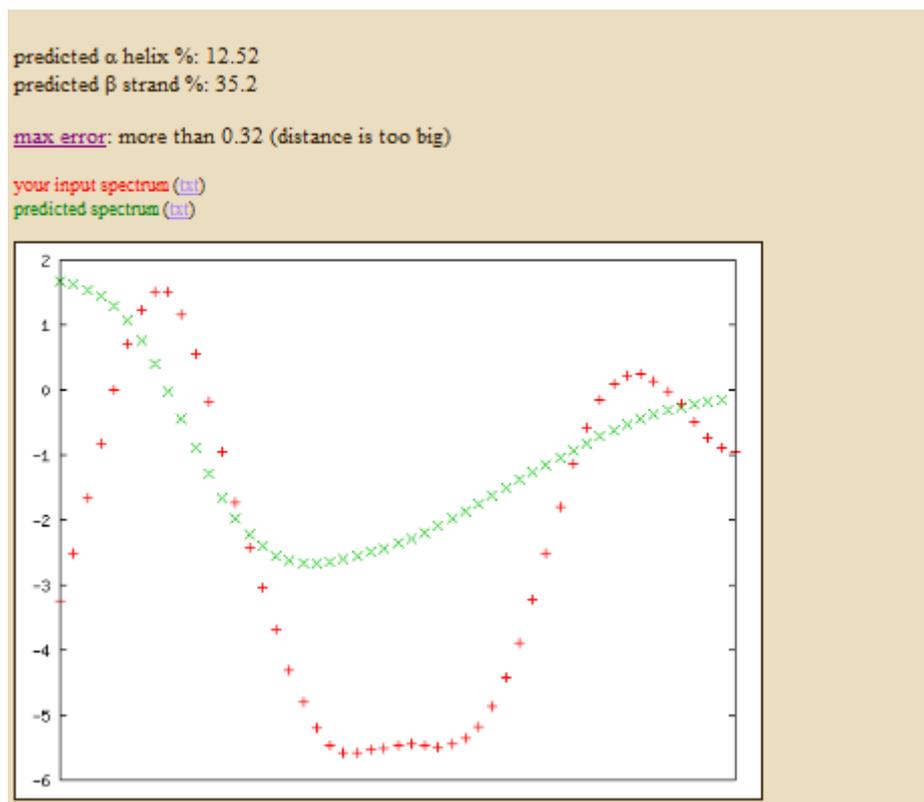
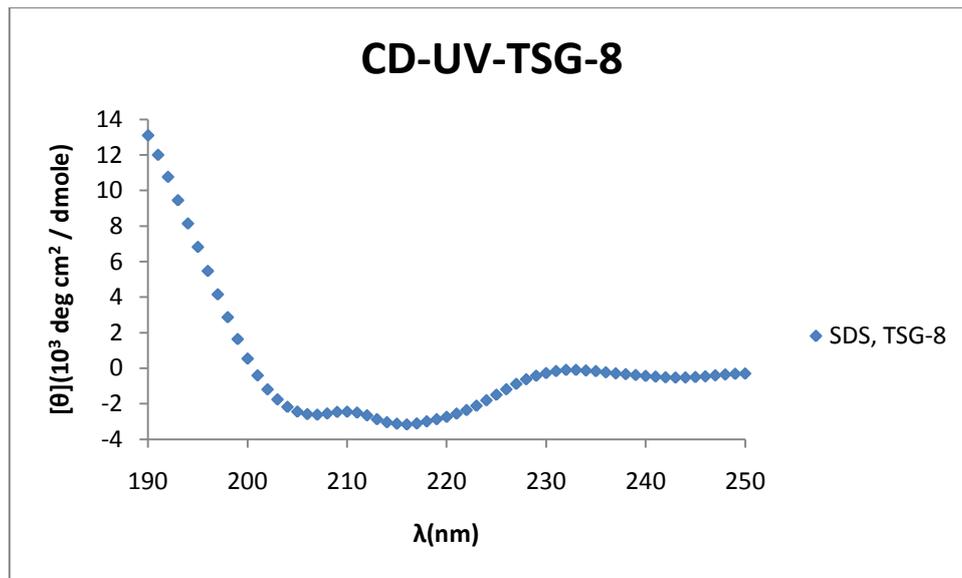


圖 3-3.TSG-7 之 CD 光譜圖

A. 5 $\mu$ M TSG-7在25mM的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-7在K2D2線上比對之CD結構預測圖。

A



B

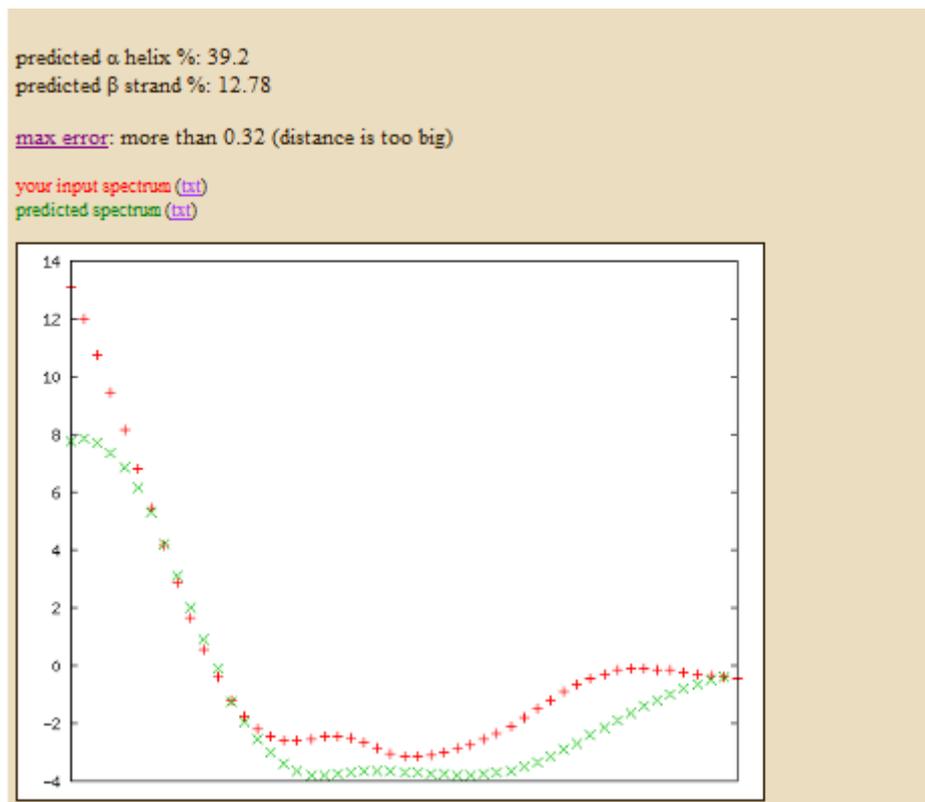
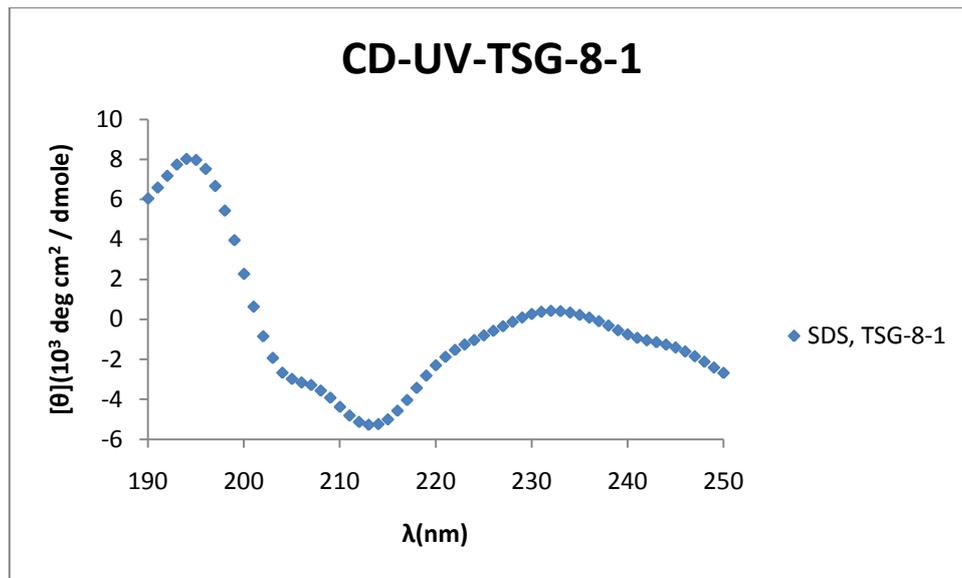


圖 3-4.TSG-8 之 CD 光譜圖

A. 5 $\mu$ M TSG-8在25mM的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-8在K2D2線上比對之CD結構預測圖。

A



B

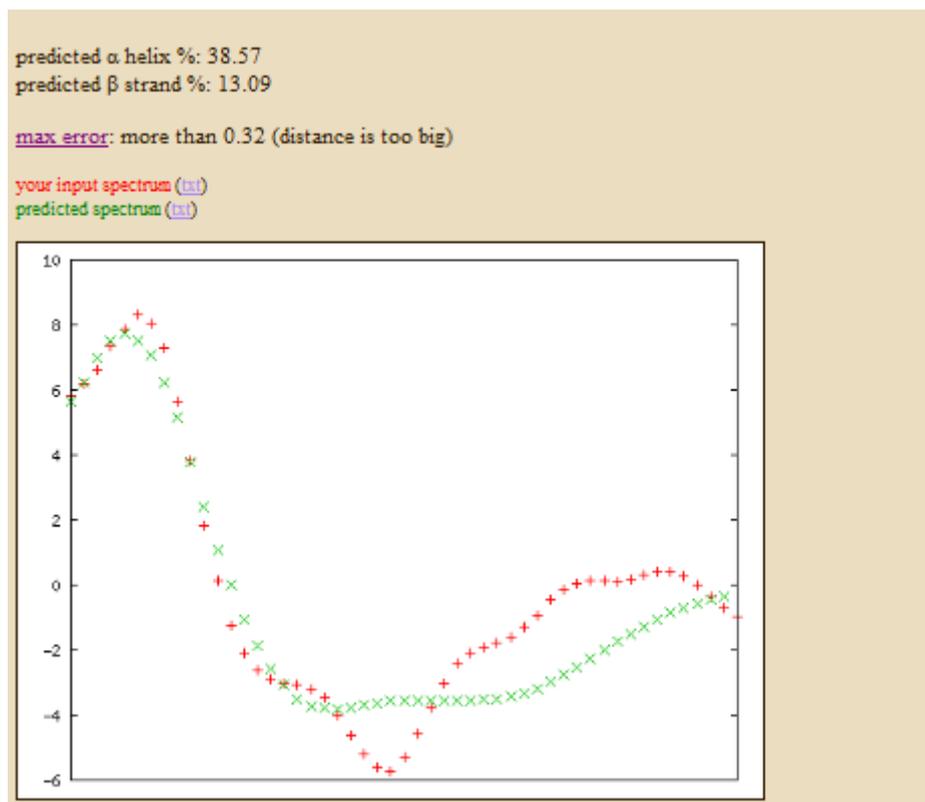
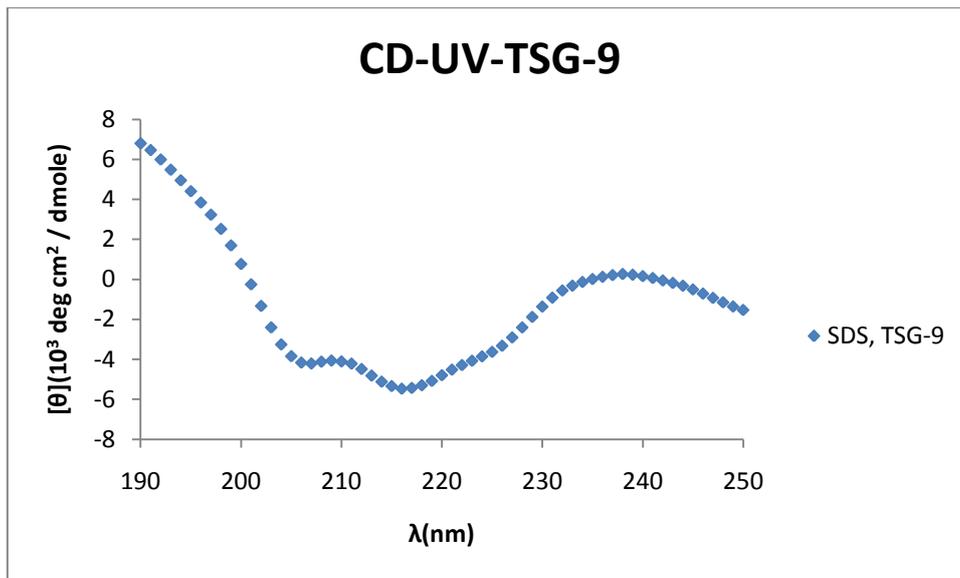


圖 3-5.TSG-8-1 之 CD 光譜圖

A. 5 $\mu$ M TSG-8-1在25mM的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-8-1在K2D2

線上比對之CD結構預測圖。

A



B

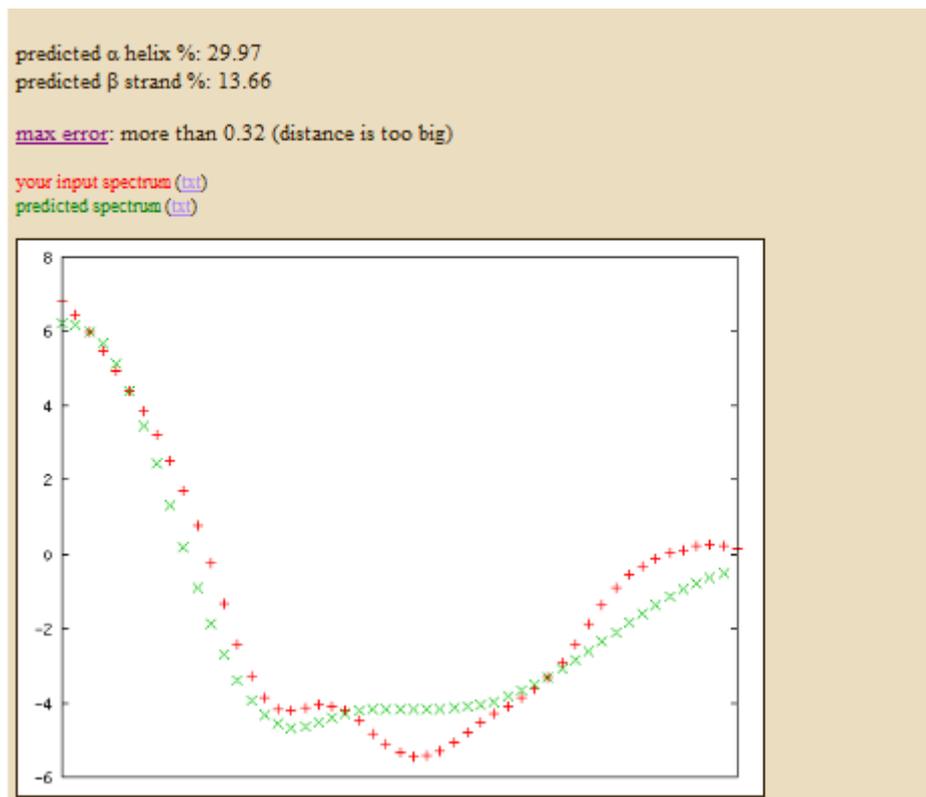
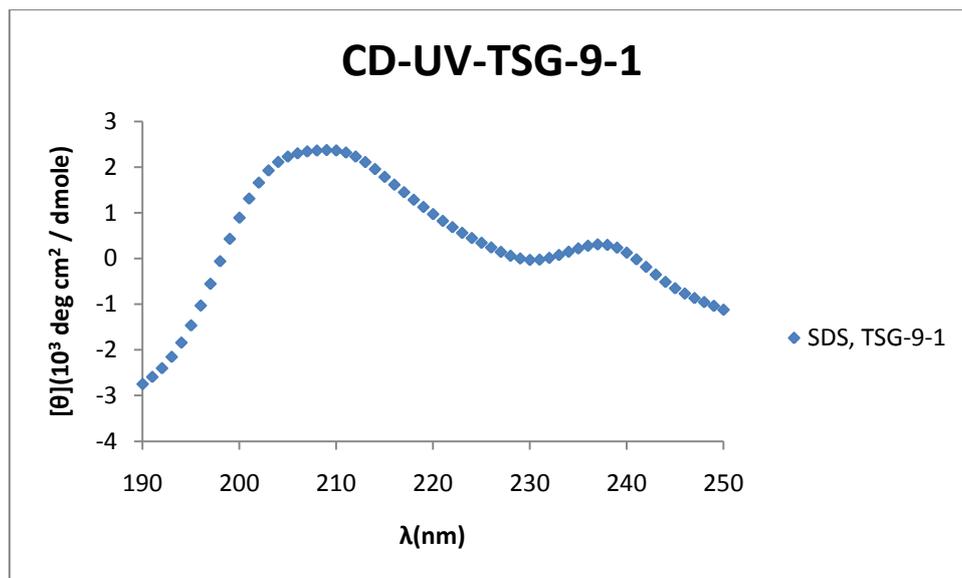


圖 3-6.TSG-9 之 CD 光譜圖

A. 5 $\mu$ M TSG-9在25mM的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-9在K2D2線上比對之CD結構預測圖。

A



B

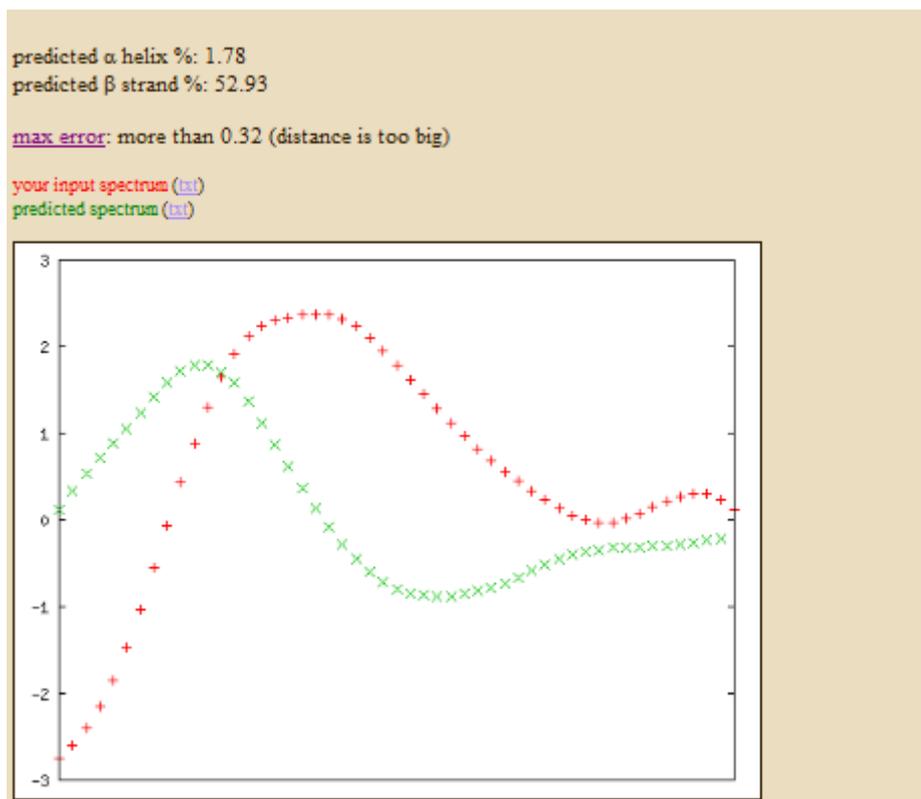
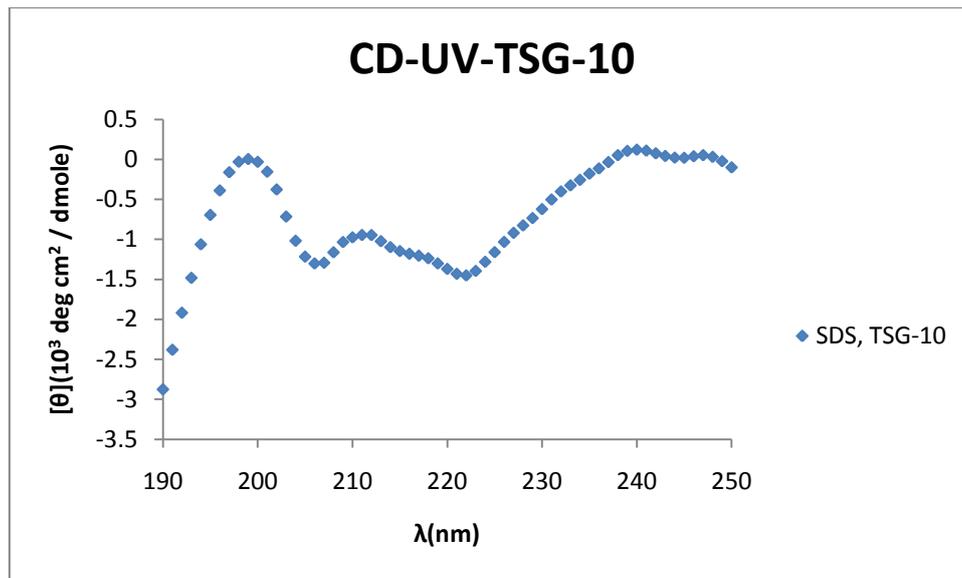


圖 3-7.TSG-9-1 之 CD 光譜圖

A.  $5\mu\text{M}$  TSG-9-1在25mM的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-9-1在K2D2

線上比對之CD結構預測圖。

A



B

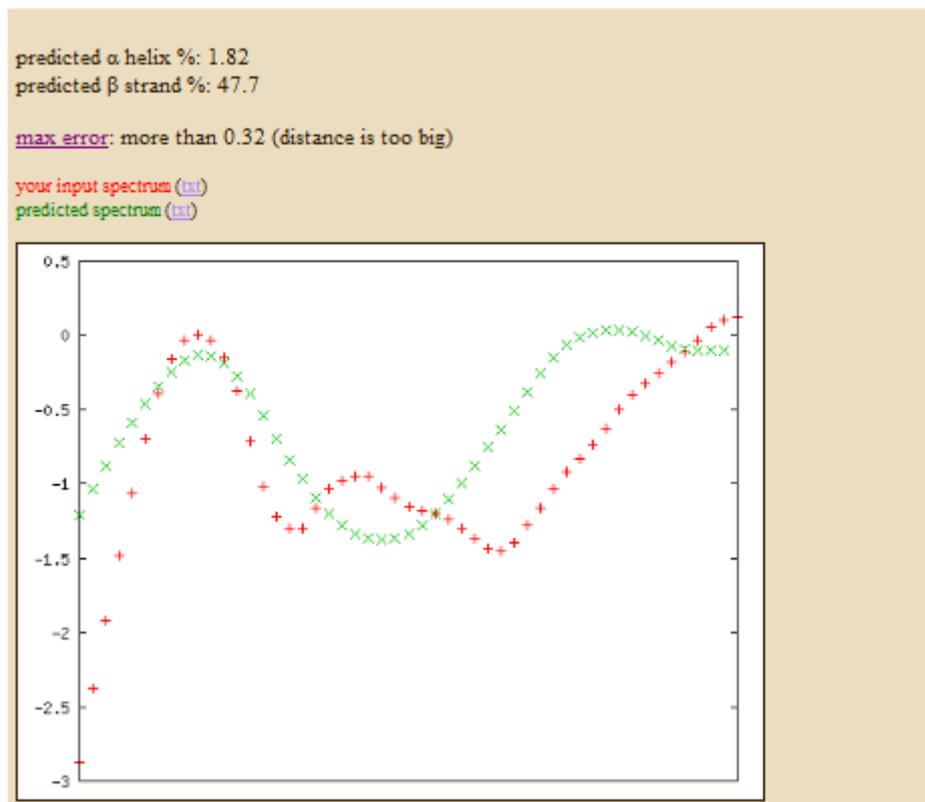
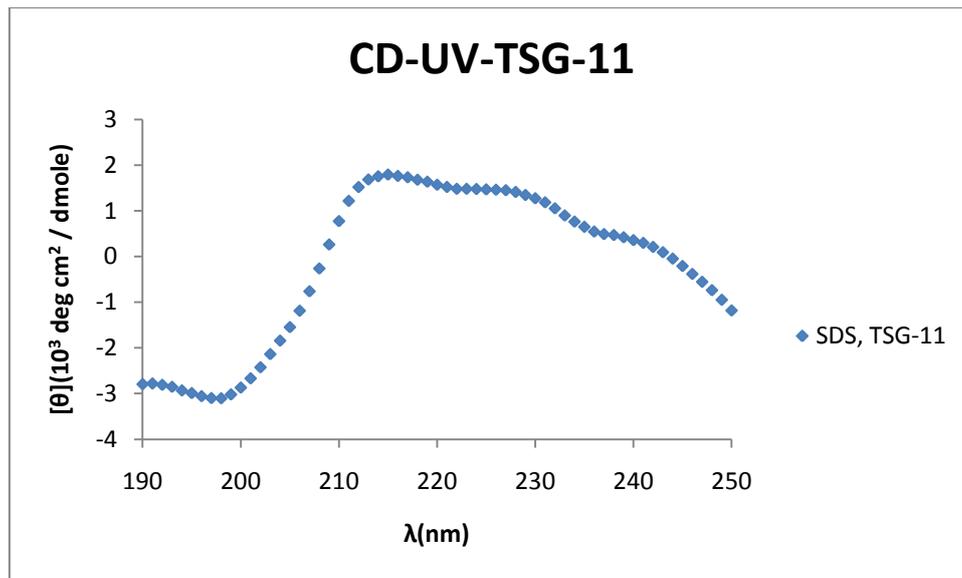


圖 3-8.TSG-10 之 CD 光譜圖

A.  $5\mu\text{M}$  TSG-10在 $25\text{mM}$ 的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-10在K2D2線上比對之CD結構預測圖。

A



B

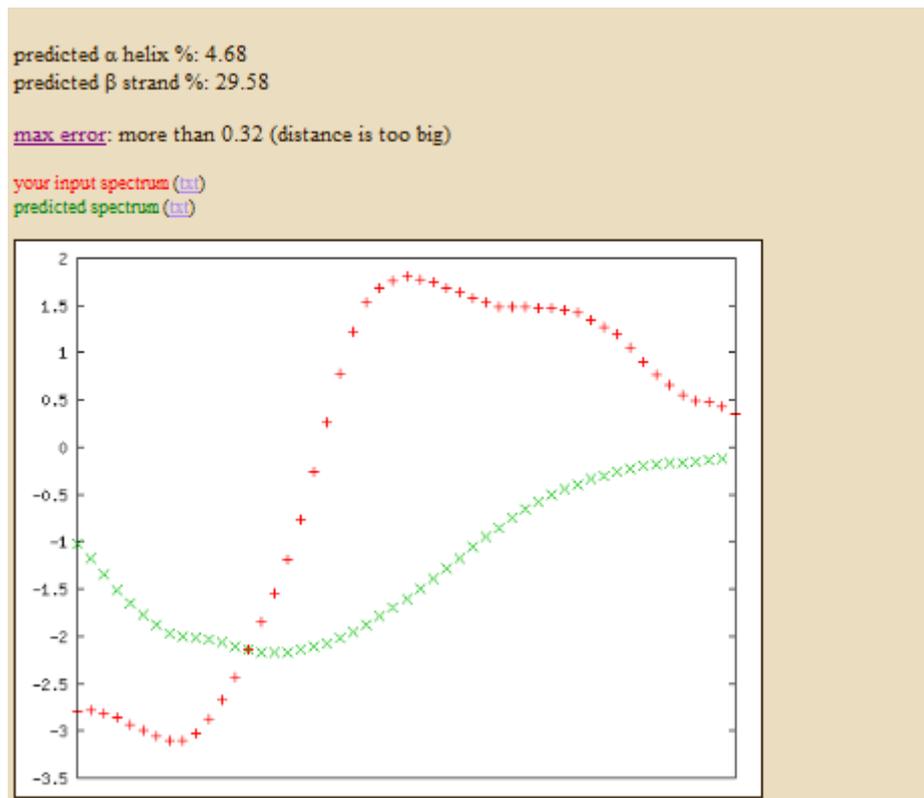


圖 3-9.TSG-11 之 CD 光譜圖

A.  $5\mu\text{M}$  TSG-11在 $25\text{mM}$ 的SDS下之CD光譜圖。B. TSG-11在K2D2線上比對之CD結構預測圖。

### 3-3.細菌的生長曲線結果

由於在 MIC 實驗之前，必須先知道細菌的生長曲線，才能得到其最佳活性時間，以確保實驗中所使用的細菌處在一個活性高的狀態，而非較差的情況，增加藥物在 MIC 測試的準確性。實驗結果顯示生長速率快慢為：大腸桿菌 > 金黃色葡萄球菌 > 綠膿桿菌，它們的對數期分別為 1~5 小時、2~7 小時及 2~9 小時，實驗中大腸桿菌以培養到 4 小時才做 MIC 測試，金黃色葡萄球菌和綠膿桿菌則分別至 6、8 小時(圖 3-10、3-11、3-12)。

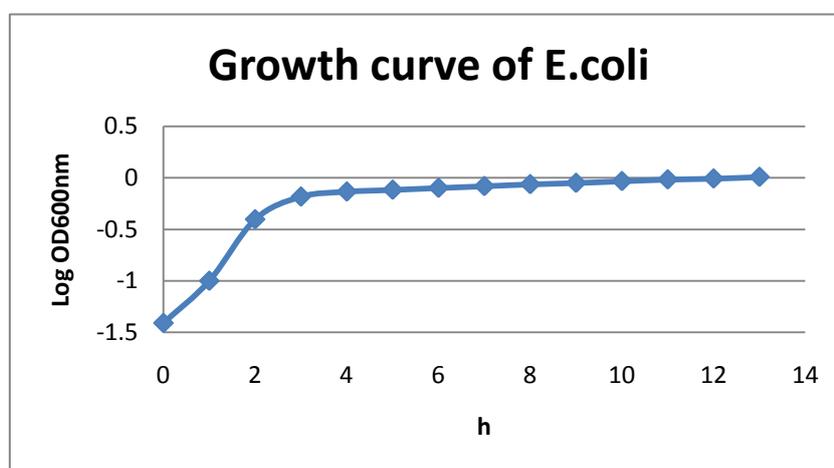


圖 3-10.為大腸桿菌的生長曲線

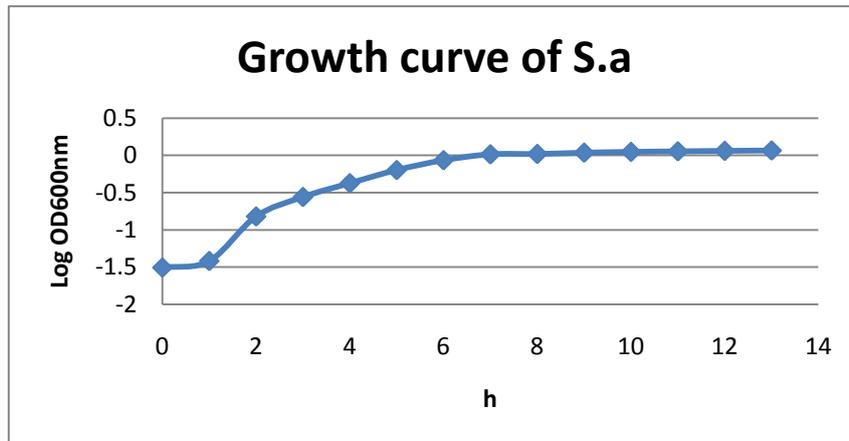


圖 3-11.為金黃色葡萄球菌的生長曲線

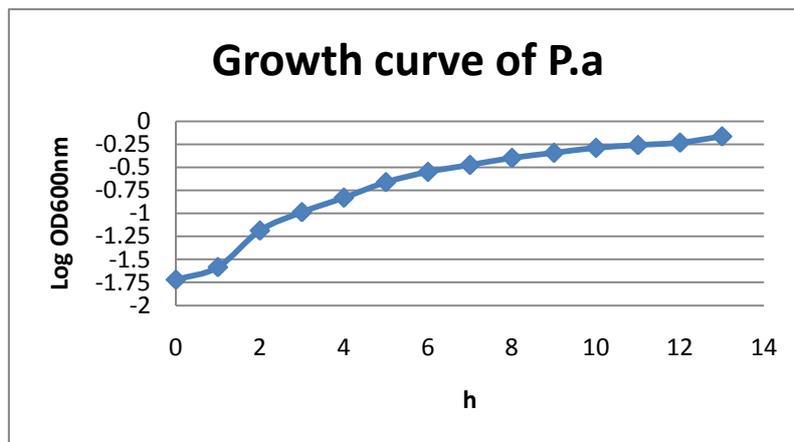


圖 3-12.為綠膿桿菌的生長曲線

### 3-4. 抗菌活性與胜肽性質關係

由 MIC 結果得知 TSG-1、TSG-2、TSG-3、TSG-4 及 TSG-5 皆無抗菌活性，其原因可由能是由於 TSG-3 和 TSG-4 的疏水性胺基酸只有一個，不利於穿過疏水性的細菌膜，而沒有抗菌活性( $>100 \mu\text{M}$ )。另外 TSG-1 及 TSG-2 雖然平均疏水性較高為 0 及 -0.4(表 3-3)，但序列中無較多的正電性胺基酸能吸引靠近細菌，因此也不具抗菌活性( $>100 \mu\text{M}$ )。至於 TSG-5 雖然擁有較多的正電性胺基酸，但無抗菌能力( $>100 \mu\text{M}$ )，推測為疏水性太低造成，而 CD 光譜也間接證明此胜肽在仿膜環境中並無明顯的  $\alpha$ -螺旋結構(圖 3-1)。

新設計的 TSG-6 以疏水性大的色胺酸取代原先疏水性小的甘胺酸，使平均疏水性值從 1 降至 0.7(表 3-3)，並出現對大腸桿菌的 MIC 為  $64 \mu\text{M}$  的抑制效果。而 TSG-7 在設計上我們將帶負電的天冬胺酸以酪胺酸取代，使得正價性電荷上升為 6，同時也增加其疏水性從 0.7 變到 0.2(表 3-3)。TSG-7 的抗菌效果在綠膿桿菌的 MIC 為  $100 \mu\text{M}$ ，金黃色葡萄球菌為  $32 \mu\text{M}$ ，大腸桿菌為  $16 \mu\text{M}$ (表 3-2)。由 CD 光譜來看在 TSG-5、TSG-6 及 TSG-7 的  $\alpha$ -螺旋結構所佔的比例差不多，但是其抗菌活性不盡相同，由此推測  $\alpha$ -螺旋結構並不是影響抗菌能力的主要原因，抗菌能力的增加推測是由於疏水性上升的因素。

在序列遞減的設計中，少掉酪胺酸的十一肽 TSG-8，它的抗菌效

果和 TSG-7 差不多，只有對於綠膿的抑制反而無效果，可能是疏水性下降因素，而在 CD 光譜中出現明顯  $\alpha$ -螺旋結構 (圖 3-4)，這樣的結果與 TSG-7 的結構與抗菌能力相比較下，表示擁有較完整的  $\alpha$ -螺旋結構可造成較好的抗菌效果影響並非為絕對性的。再去掉一個精胺酸的十肽 TSG-9，藉由螺旋輪<sup>43</sup> (helical wheel)圖中顯示，雖然有完整的疏水性面(圖 3-15)，在 CD 光譜  $\alpha$ -螺旋結構比例也相當的高(圖 3-6)，但對於大腸桿菌抑制能力不如預期好，MIC 為 64  $\mu$ M，其他兩種菌皆無抑制能力，這差異可能為正電荷減少使得降低吸引細菌膜的能力所造成。而去掉絲胺酸(Serine) 九肽的 TSG-10，抗菌效果和 TSG-9 差不多，只在於金黃色葡萄球菌降到 64  $\mu$ M。最後為八肽的 TSG-11 抗菌效果變比其它的序列遞減的設計還差，原因可能是正電荷數較低造成。此外有往下設計合成出七、六及五肽(由王凱宣同學幫忙合成，此部分圖文中未顯示)，在三種菌的 MIC 皆 >100  $\mu$ M，而這三條胜肽在 N 端部分分別去掉色胺酸、精胺酸及精胺酸，因此推測可能是失去重要的疏水性和帶電胺基酸的關係。

從 TSG-8 特別衍生的 TSG-8-1 同樣也是十一肽，實驗中發現在金黃色葡萄球菌的效果較好 MIC 為 8  $\mu$ M。對於其它細菌則與 TSG-8 的藥效相同。在螺旋輪圖中 TSG-8-1 的疏水性面並不完整(圖 3-14)，且 CD 光譜中  $\alpha$ -螺旋結構高比例相當高，和擁有較連續疏水性面

TSG-8 所含的  $\alpha$ -螺旋結構相近(圖 3-4 及圖 3-5)，這樣的結果表示  $\alpha$ -螺旋結構的兩性特質並不是影響 TSG-8-1 抗菌能力的因素。而如果以序列 TSG-8 與 TSG-8-1 比較來看，它們最大的差異為 TSG-8 在 N 端只有一個色胺酸，而 TSG-8-1 的 N 端有兩個連續疏水性色胺酸，所以推測若當 TSG-8-1 靠近細菌膜後，可能利用疏水性 N 端方向的兩個色胺酸形成較大的疏水性區域進入到膜內(圖 3-16)，因此抗菌效果比較好。而從 TSG-9 衍生的 TSG-9-1，對三種菌株皆無抗菌效果，這樣巨大的差異顯示色胺酸在尾端的重要性，若與 TSG-8-1 在序列 N 端上為疏水性的兩個色胺酸比較，或許可推測 N 端親水性的兩個賴胺酸之形成區域不利於幫助肽進入膜內，造成活性喪失。

對於以上總體的抗菌能力來看，這一系列設計的抗菌肽對於大腸桿菌的抑制能力最好，其次是金黃色葡萄球菌，綠膿桿菌則最差，針對此差異的因素利用電荷聚集機制 (Charge Cluster Mechanism) 解釋，是否為革蘭氏陰菌膜上的 phosphatidylethanolamine (PE) 影響，從表 3-3 中將已知文獻中具有其機制能力的 MSI-78<sup>24</sup>、MSI-103<sup>24</sup> 及 RR-9<sup>44</sup> 來做比較，可看到平均價電荷都在 0.3 以上，其平均疏水性大約介於 0.2 到 0.4 之間，在金黃色葡萄球菌/大腸桿菌的 MIC 比值(S/E) 皆大於 1，這是由於大腸桿菌上 PE 存在較利於電荷聚集機制所造成，而從有抗菌性效果的 TSG-5、TSG-6、TSG-7、TSG-8、TSG-8-1、TSG-9、

TSG-10 與 TSG-11 平均價電荷皆大於 0.3，而在 S/E 值大部分在 1 以上，除了 TSG-8-1 和 TSG-10 各為 0.5 及 1，再看平均疏水性則介於-0.2 到 0.7 之間，其中平均疏水性最低值為-0.2 的 TSG-11 及最高值 0.7 的 TSG-6 在 S/E 都大於 1，且平均價電荷也相當高，因此平均疏水性值的差異影響電荷聚集機制並不大，主要判斷在於 S/E 通常會大於 1 與擁有較高的平均價電荷，所以推測較偏向毒殺大腸桿菌的原因主要是由於電荷聚集機制的關係，至於綠膿桿菌沒有抑制能力的因素尚待確認。

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<b>ixosin-B</b>	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D	80 µM	N.D
<b>TSG-1</b>	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D
<b>TSG-2</b>	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D
<b>TSG-3</b>	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D
<b>TSG-4</b>	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D
<b>TSG-5</b>	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D	>100 µM	N.D
<b>penicillin</b>	>100 µM	N.D	0.125 µM	N.D	>100 µM	N.D
<b>TSG-6</b>	>100 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM	64 µM	100 µM
<b>TSG-7</b>	100 µM	>100 µM	32 µM	64 µM	16 µM	32 µM
<b>TSG-8</b>	>100 µM	>100 µM	32 µM	64 µM	16 µM	32 µM
<b>TSG-8-1</b>	>100 µM	>100 µM	8 µM	16 µM	16 µM	32 µM
<b>TSG-9</b>	>100 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM	64 µM	100 µM
<b>TSG-9-1</b>	>100 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM
<b>TSG-10</b>	>100 µM	>100 µM	64 µM	100 µM	64 µM	64 µM
<b>TSG-11</b>	>100 µM	>100 µM	100 µM	100 µM	64 µM	100 µM

表 3-2.各抗菌胜肽對綠膿桿菌、金黃色葡萄球菌、大腸桿菌的抑制能力。MIC(Minimum inhibitory concentration)為最小抑制濃度，MBC (Minimum bactericidal concentration)為最小殺菌濃度； Penicillin 為對照組；N.D (no detection)為未測試。

	charge	residue	Charge per residue	<i>S. aureus</i> / <i>E. coli</i>	Average hydrophilicity
ixosin-B	5.1	32	0.16	-	0.4
TSG-1	2	10	0.2	-	0
TSG-2	2	10	0.2	-	-0.4
TSG-3	0.1	10	0.01	-	0.2
TSG-4	0.1	10	0.01	-	0.8
TSG-5	5	12	0.42	-	1
TSG-6	5	12	0.42	>1.56	0.7
TSG-7	6	12	0.5	2	0.2
TSG-8	6	11	0.55	2	0.5
TSG-8-1	5	11	0.45	0.5	-0.1
TSG-9	5	10	0.5	>1.56	0.2
TSG-9-1	6	10	0.6	-	0.8
TSG-10	5	9	0.56	1	0.2
TSG-11	4	8	0.5	1.56	-0.2
MSI-78	10	22	0.45	2	0.4
MSI-103	7	21	0.33	15.6	0.2
RR-9	5	9	0.56	64	0.3

表 3-3.各抗菌胜肽的特性。Charge<sup>42</sup> 為在 pH =7 時的值；Charge per residue 為 residue / charge (長度/電荷)；*S. aureus* /*E. coli* 為金黃色葡萄球菌/大腸桿菌的 MIC 比值；Average hydrophilicity<sup>42</sup> 值越低表示疏水性越大；MSI-78<sup>24</sup>、MSI-103<sup>24</sup> 及 RR-9<sup>44</sup> 為文獻上用來比較的胜肽。

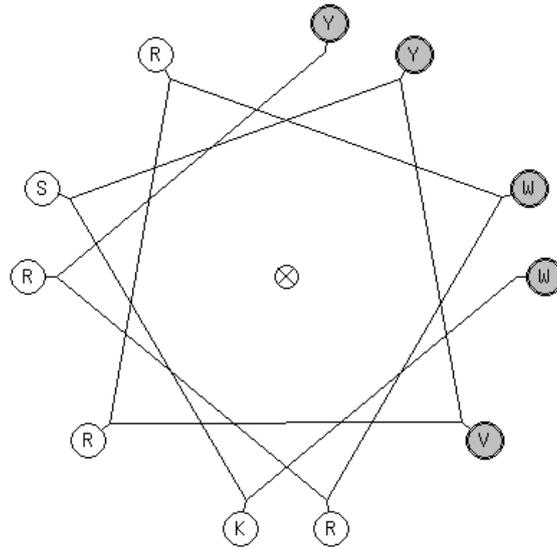


圖 3-13.TSG-8 的螺旋輪圖。灰色部分為疏水性；白色部分為親水性。

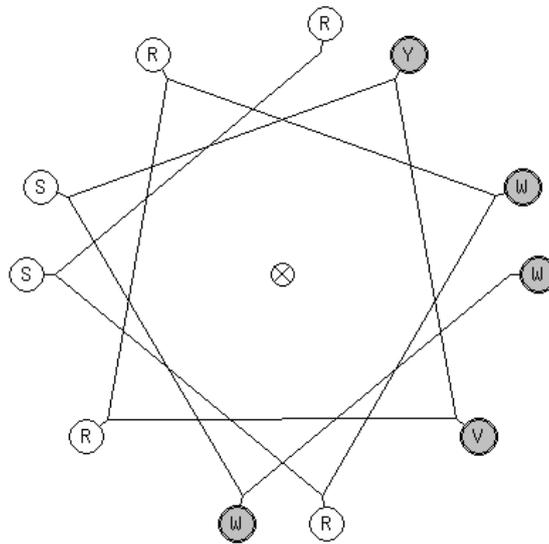


圖 3-14.TSG-8-1 的螺旋輪圖。灰色部分為疏水性；白色部分為親水性。

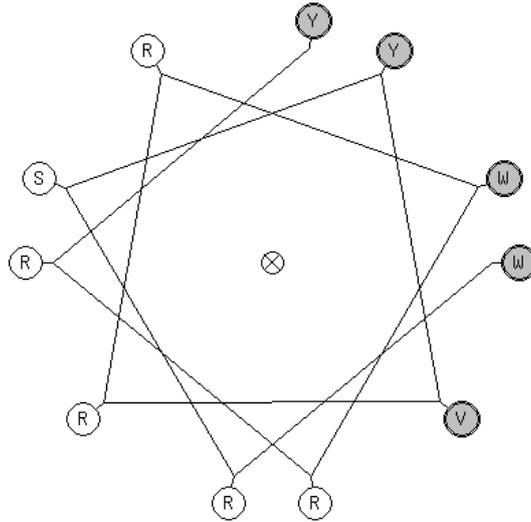


圖 3-15.TSG-9 的螺旋輪圖。灰色部分為疏水性；白色部分為親水性。

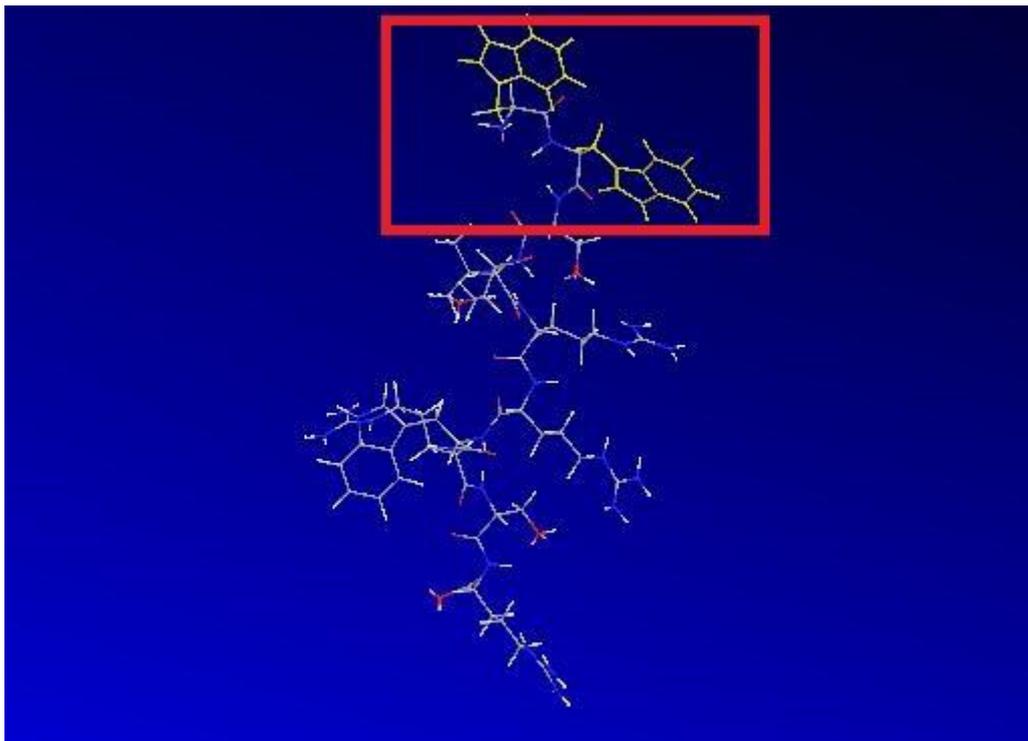


圖 3-16.為 TSG-8-1 的  $\alpha$ -螺旋結構(參考用示意圖)。由上到下方向為 N 到 C 端，尾端黃色部分為疏水性的色胺酸(在紅色框圖內)。

### 3-5.溶血性測試結果

由溶血測試實驗中，大部分的胜肽在 100  $\mu$ M 濃度下都不具有明顯的溶血性，這表示對於胜肽在正常細胞和細菌間選擇性，比較偏向毒殺細菌(大腸桿菌及金黃色葡萄球菌)，除了 TSG-9-1 在細菌和正常細胞兩者沒有活性外，其它都能顯現出差異(表 3-2 和 3-4)。當然這當中 TSG-8-1 還是有比其他胜肽的溶血性高一點，原因由於所含的色胺酸較多所導致，但這也可以證明在先前一開始的設計上疏水性的色胺酸若過多可能導致溶血性質偏大<sup>40</sup>。

	<b>Hemolysis %</b>
<b>TSG-6</b>	0.276 $\pm$ 0.85%
<b>TSG-7</b>	1.522 $\pm$ 1.41%
<b>TSG-8</b>	-1.167 $\pm$ 2.55%
<b>TSG-8-1</b>	3.411 $\pm$ 1.30%
<b>TSG-9</b>	-0.366 $\pm$ 0.54%
<b>TSG-9-1</b>	-0.566 $\pm$ 1.63%
<b>TSG-10</b>	1.111 $\pm$ 1.32%
<b>TSG-11</b>	2.011 $\pm$ 0.26%

表 3-4 為 TSG 系列在 100  $\mu$ M 胜肽濃度下所造成溶血性

### 3-6.癌細胞毒殺測試結果

有些抗菌胜肽同時也有毒殺癌細胞的功能，因此實驗中以人類雌激素依賴型乳癌細胞株(human estrogen receptor (ER)-dependent breast cancer cells, MCF-7)做測試，在胜肽方面選擇具有抗菌活性的 TSG-6、TSG-7、TSG-8、TSG-8-1、TSG-9、TSG-10 及 TSG-11，結果可看到當藥在 80  $\mu$ M 時，幾乎都不沒有毒殺癌細胞的能力，只有 TSG-8-1 有些許的毒殺能力，大約有抑制百分之二十的效果。這表示色胺酸多寡可影響毒殺癌細胞能力(圖 3-17)。

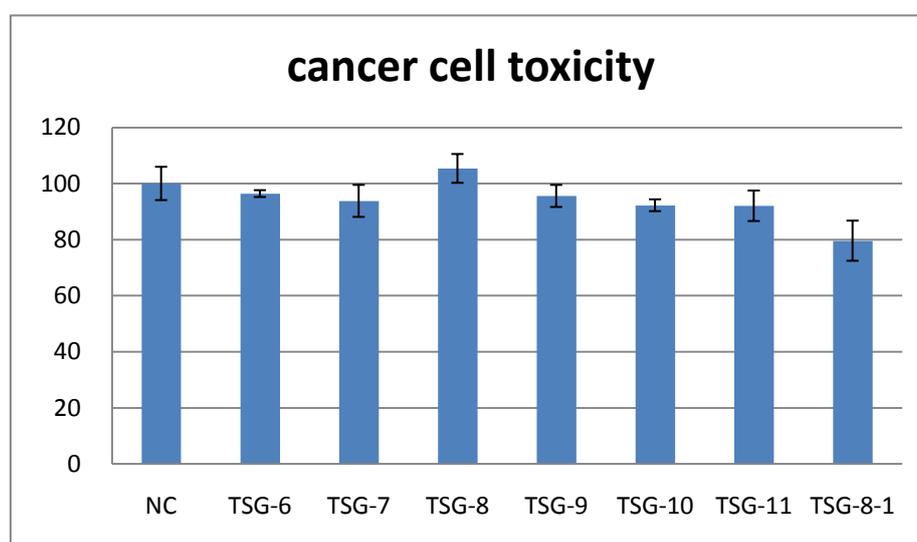


圖 3-17.為 TSG 系列在 80  $\mu$ M 胜肽濃度下對人類乳癌細胞株(MCF-7)的毒殺能力。NC 表示 negative control；Y 軸為細胞存活率；X 軸為各抗菌胜肽名稱。

### 3-7.EDTA 的 MIC 及 MBC 結果

由於革蘭氏陰性菌細胞壁上含有 LPS，其本生具有帶部分負電荷能與細胞壁裡的一些  $Mg^{+2}$ 、 $Ca^{+2}$  等離子結合，使得細胞壁變的更加緊密堅固<sup>17</sup>。因此在實驗設計中加入能與  $Mg^{+2}$ 、 $Ca^{+2}$  等二價離子螯合的 EDTA。一開始先在三種菌中加入 25  $\mu M$ 、50  $\mu M$  和 100  $\mu M$  的 EDTA 看是否會導致細菌的死亡，實驗後發現當培養至 16 小時後，其試管內皆呈現混濁狀態，表示 EDTA 濃度達到 100  $\mu M$  並不會造成細菌的毒殺，因此接下將 TSG-7 和 TSG-8-1 各加入 100  $\mu M$  EDTA 做測試，結果顯示出加入 EDTA 的 TSG-7 和 TSG-8-1 與沒加入的相比較，在綠膿桿菌的 MIC 下降為 64  $\mu M$ ，而大腸桿菌的 MIC 也分別下降為 16  $\mu M$  及 4  $\mu M$ ，至於 MBC 方面則沒什麼影響，另外在金黃色葡萄球菌的 MIC 及 MBC 都不變(表 3-5)。

實驗裡有加入 EDTA 都對革蘭氏陰性菌的 MIC 有下降，這是由於 EDTA 將細胞壁中的  $Mg^{+2}$ 、 $Ca^{+2}$  等離子捉住，造成 LPS 沒辦法與離子結合，因此細胞壁無法較緊密，使得抗菌胜肽較有利穿越。而相對的革蘭氏陽性菌並沒有 LPS，所以對其影響性不大。

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
TSG-7	100 $\mu$ M	>100 $\mu$ M	32 $\mu$ M	64 $\mu$ M	16 $\mu$ M	32 $\mu$ M
TSG-7 with EDTA	64 $\mu$ M	>100 $\mu$ M	32 $\mu$ M	64 $\mu$ M	16 $\mu$ M	32 $\mu$ M
TSG-8-1	>100 $\mu$ M	>100 $\mu$ M	8 $\mu$ M	16 $\mu$ M	16 $\mu$ M	32 $\mu$ M
TSG-8-1 with EDTA	64 $\mu$ M	>100 $\mu$ M	8 $\mu$ M	16 $\mu$ M	4 $\mu$ M	8 $\mu$ M

表 3-5. TSG-7 和 TSG-8-1 在含有 100  $\mu$ M EDTA 對三種菌的抗菌能力

### 3-8. 抗菌機制探討

實驗中 *E. coli* ML-35p 為突變的菌株，在外膜方面因為在周質空間內擁有  $\beta$ -內醯胺酶的載體，所以能分解含有  $\beta$ -內醯胺環的化合物，而我們使用的 NCF 雖然具有  $\beta$ -內醯胺環，但它並無法穿越 ML-35p 的外膜，所以並不會有產物的產生。因此由胜肽的內外膜穿透能力實驗裡，利用 polymyxin B 能造成細菌物質的流出機制當作指標來判別合成出來的胜肽是否也具有相同的能力。從圖 3-18 中可看到 polymyxin B 約在 5 分鐘左右就有破膜的現象產生，導致  $\beta$ -內醯胺酶能分解 NCF 而偵測到吸收度，而本實驗選用抗菌能力最好的 TSG-8-1 來做測試，測試結果可以發現到 TSG-8-1 能造成吸收度上升的趨勢，較特別的是在低濃度下(10  $\mu$ M、20  $\mu$ M)反而比在高濃度(40  $\mu$ M、60  $\mu$ M、80  $\mu$ M、100  $\mu$ M)的吸收值來的高，這樣的因可能是胜肽在高濃度時會聚集在細菌膜上，造成阻礙物質的流出，反之在低濃度下則不具有這現象<sup>38</sup>。另外實驗中 TSG-8-1 大約在 15 分鐘左右，就有開始

破膜的現象，這表示它能穿透細菌外膜，造成內部  $\beta$ -內醯胺酶的物質流出，才能和外面的 NCF 反應，也就是說 TSG-8-1 抗菌機制可導致物質流出，使得細菌死亡(圖 3-18)。

在內膜實驗中，由於 *E. coli* ML-35p 缺乏 lac permease，造成受質 ONPG 無法進入，而  $\beta$ -半乳糖酶存在內膜的細胞質內，所以形成獨立空間，使得產物無法生成，從圖 3-18 與 3-19 比較，TSG-8-1 穿越內膜的能力來的較外膜差，且近入內膜的時間比外膜時間來的較長，這是因為肽鏈會因被細胞壁排除或與 LPS 結合，使得到達內膜所花費的時間較長<sup>38</sup>，隨著時間的增加可看到 PMX 和 TSG-8-1 還是有少量的產物生成，表示還是有少部分的物質會流出(圖 3-19)。

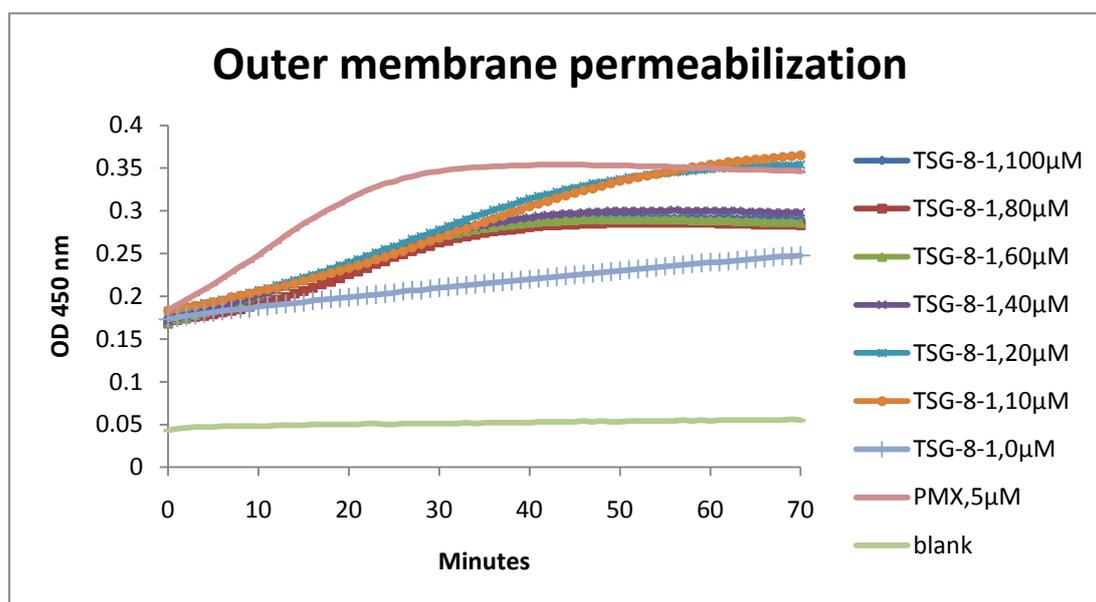


圖 3-18. TSG-8-1 對 *E. coli* ML-35p 的外膜穿透能力。Blank 為只含 PBS。

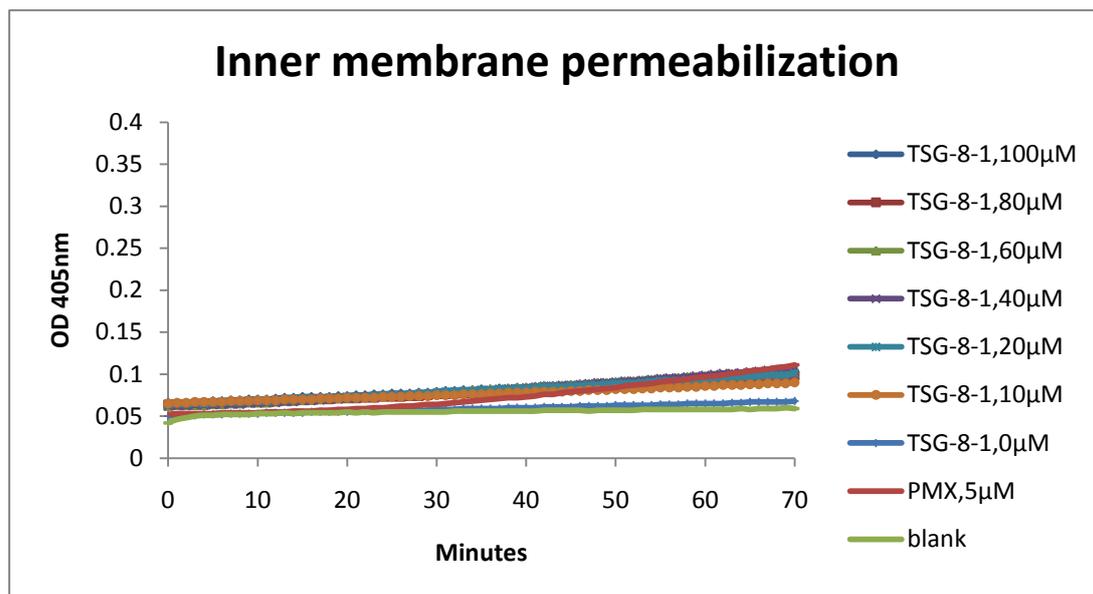


圖 3-19. TSG-8-1 對 *E.coli* ML-35p 的內膜穿透能力。Blank 為只含 PBS。

## 第四章 結論

從含有 32 個胺基酸序列的 ixosin-B 中，成功的找到可能含有活性的片段 TSG-5，並設計出較短序列且具有抗菌活性的胜肽，其中最長的 TSG-11 只含有 8 個胺基酸。在這一系列設計中發現到擁有抗菌活性的都有個共通點，那就是序列在 N 端上皆含有疏水性的色胺酸，表示這個位置上的色胺酸扮演一個重要的活性部位。另外從 TSG-8-1 及 TSG-9-1 序列上的比較後發現抗菌胜肽可能有選擇偏向以 N 端疏水性區域進入，才造成兩者間抗菌能力有很大的差異。而在這一系列的胜肽實驗結果若要有抗菌能力，還須滿足一定的條件像是序列長度不能太短、疏水性不能太低及帶正電的胺基酸須足夠，而從這一系列的設計來看，在二級結構方面不管是否能形成  $\alpha$ -螺旋結構並不是絕對重要，以實驗中設計出 TSG-9 為例，它的平均疏水性和 TSG-7 差不多，而  $\alpha$ -螺旋結構所含比例卻比 TSG-7 高出許多，但抗菌效果卻來的比 TSG-7 差。

另外實驗中比較在三菌株的 MIC 測試，大部分的有抗菌效果的胜肽都針對大腸桿菌有較好的抑制效果，推測可能是電荷聚集機制所造成的關係，除了 TSG-8-1 外。

針對溶血性結果，所設計出的胜肽幾乎沒有很明顯的溶血性，而

若要嚴格的看只有 TSG-8-1 有稍微的溶血性，這表示含有較多的色胺酸可造成溶血性。另外，在癌細胞毒殺實驗中 TSG-8-1 具有約抑制 20% 癌細胞存活。

在含有 EDTA 的抗菌測試中，對於革蘭氏陰性菌包括綠膿桿菌和大腸桿菌的 MIC 都有下降，而革蘭氏陽性菌的金黃色葡萄球菌則維持不變，這是因為革蘭氏陰性菌外膜的 LPS 會與  $Mg^{+2}$ 、 $Ca^{+2}$  等離子結合，使的肽鏈不好穿越細菌的膜，而 EDTA 的加入能與金屬離子結合，使革蘭氏陽性菌外膜變的結構不穩定，因此 MIC 值才會下降，革蘭氏陽性菌的膜不含 LPS，所以 EDTA 不會對它造成影響。

在內外膜的穿透能力實驗，從外膜實驗中發現 TSG-8-1 的抗菌機制它能造成細菌物質流出，導致細菌的死亡，此外實驗中發現到肽鏈在低濃度的物質流露程度反而比高濃度高，這樣的原因可能是在高濃度時肽鏈會聚集在細菌膜上面，進而阻礙細菌內物質流出，至於在內膜方面，TSG-8-1 不太影響內膜的穿透。

## 第五章 未來展望

實驗裡 TSG-8-1 為最有抑制效果的抗菌胜肽，因此將以它做為前導化合物，在先前已知它的作用可能由 N 端方向進入，因此將原本序列為 WWSYVRRWRSR-NH<sub>2</sub>，在 N 端上的 NH<sub>2</sub> 基之親水性特質移除，將它修改成乙醯基序列 Acetyl-WWSYVRRWRSR-NH<sub>2</sub>，看是否能會因乙醯基與色胺酸在疏水性區域更連續，而使胜肽更易進入到膜內，看往後有類似  $\alpha$ -螺旋結構存在的胜肽，以這樣方式的設計是否能提升抗菌效果。

另外針對未來胜肽的設計上，色胺酸若使用適當可更快幫助我們達到預期的抗菌能力，且在某些位置上的色胺酸並不會都會造成溶血性的產生<sup>5</sup>，這部分若能找出規律性對往後會有相當大的幫助，尤其在實驗中設計最短具有抗菌能力的八肽。

在未來胜肽藥物使用方式也可以混合其它化合物搭配抗菌使用，像是與傳統抗生素搭配看是否更能有效抑制細菌能力，而從 EDTA 實驗中給一個新的嶄新的方向，抗菌胜肽的使用或許能搭配一些對人體不具毒性且能與金屬離子結合的化合物，來達到更有療效的抗菌能力。

如果要胜肽要進入到人體內，還須克服容易被酵素代謝的缺點，

在自然界中通常以 L 型胺基酸為比較常見，而人體內的水解蛋白酶會對 L 型胺基酸較具有專一性，因此可將實驗中所設計胜肽胜肽藉由胺基酸的鏡像異構物的 D 型胺基酸做取代，達到抵抗被降解的能力，且已知鏡像異構物的胜肽抗菌效果差異不大<sup>45,46</sup>。或者以非天然胺基酸取代在容易遭降解的胜肽位置<sup>47</sup>，也是可以達到相同目的。

## 第六章 參考文獻

1. Patrick 著, G. L., 吳天賞等編輯, 藥物化學. 藝軒圖書出版:台北縣, 2007.
2. Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. antibiotics for emerging pathogen. *Science*. **2009**, 325, 1089-1093.
3. Wimley, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *Acs.Chemicalbiology*. **2010**, 5, 905–917.
4. Virtanen, J. A.; Cheng, K. H.; and Somerharju, P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95, 4964-4969.
5. Ando, S.; Mitsuyasu, K.; Soeda, Y.; Hidaka, M.; Ito, Y.; Matsubara, K.; Shindo, M.; Uchida, Y.; Aoyagi, H. Structure-activity relationship of indolicidin, a Trp-rich antibacterial peptide. *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 171–177.
6. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. **2002**, 415, 389-395.
7. Epanand, R. M.; Epanand, R. F. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Mol. Biophys.* **2009**, 5, 580-587.
8. Gallucci, E.; Meleleo, D.; Micelli, S.; Picciarelli, V. Magainin 2 channel formation in planar lipid membranes: the role of lipid polar groups and ergosterol. *Eur Biophys J.* **2003**, 32, 22–32.
9. Toraya, S.; Nagao, T.; Norisada, K.; Tuzi, S.; Saito, H.; Izumi, S.; and Naito, N. Morphological Behavior of Lipid Bilayers Induced by Melittin near the Phase Transition Temperature. *Biophysical Journal*. **2005**, 89, 3214–322.
10. Powers, J. P. and Hancock, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. **2003**, 24, 1681-1691.
11. Selsted, M. E.; Harwig, S. S.; Ganz, T.; Schilling, J.W.; Lehrer, R. I. Primary structure of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* **1985**, 76, 1436-1439.
12. Hancock, R. E. W.; Sahl, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*. **2006**, 24, 1551-1557.
13. Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J. L.; Hoffmann, D. Antimicrobial

peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **1999**, 23, 329–344.

14. Mandard, N.; Sodano, P.; Labbe H, Bonmatin, J. M.; Bulet, P.; Hetru, C.; et al. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *Eur J Biochem.* **1998**, 256, 404–10.

15. Park, K. H.; Park, Y.; Park, I. S.; Hahm, K. S.; Shin, S. Y. Bacterial selectivity and plausible mode of antibacterial action of designed Pro-rich short model antimicrobial peptides. *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 876–882.

16. Tam, J. P.; Lu, Y. A.; Yang, J. L. Design of Salt-Insensitive Glycine-Rich Antimicrobial Peptides with Cyclic Tricystine Structures. *Biochemistry* . **2000**, 39, 7159-7169.

17. Toke, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers.* **2005**, 80, 717-35.

18. Eband, R. M.; Rotem, S.; Mor, A.; Berno, B. Bacterial Membranes as Predictors of Antimicrobial Potency. *J. Am. Chem.* **2008**, 130, 14346-14352.

19. Shin, S.; Kim, J. K.; Lee, J. Y.; Jung, K. W.; Hwang, J. S.; Lee, J.; Lee, D. G.; Kim, I.; Shin, S. Y.; Kim, Y. Design of potent 9-mer antimicrobial peptide analogs of protaetiamycine and investigation of mechanism of antimicrobial action. *J. Pept. Sci.* **2009**, 10, 1002.

20. Andreu, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers.* **1998**, 47, 415–433.

21. Brotz, H.; Bierbaum, G.; Leopold, K.; Reynolds, P. E.; Sahl, H. G. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 154–160 .

22. Van, K. C.; De, V. W. M.; Siezen, R. J.; Kuipers, O. P. Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 575-587.

23. Salomon, R. A.; Farias, R. N. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 7428–7435.

24. Eband, R. F. ; Maloy, W. ; Ramamorrthy, A. Probing the “Charge Cluster Mechanism” in Amphipathic Helical Cationic Antimicrobial Peptides. *Biochemistry.* **2010**, 49, 4076-4084.

25. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* **2005**, 3, 238-50.

26. Li, M.; Lai, Y.; Villaruz , A. E.; Cha, D. J.; Sturdevant, D. E.; Otto, M.

Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system. *Pans.* **2007**, 104, 9465-9474.

27. Liu, Z.; Liu, H.; Liu, X.; Wu, X. Purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* **2008**, Part B 149, 557–561.

28. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society.* **1963**, 85, 2149-2154.

29. Carpino, L. A.; Han, G.Y. The 9-fluorenylmethoxy-carbonyl amino protecting group. *J Org Chem.* **1972**, 37, 3404-3409.

30. Hammer, R. P.; et al. Practical approach to solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions based on a photolysable anchoring linkage. *Int J Pept Protein Res.* **1990**, 36(1), 31-45.

31. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Analytical Biochemistry.* **1970**, 34, 595.

32. Hillenkamp, F.; Karas, M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* **1990**, 193, 280-295.

33. Chen, Y.; Mant, C. T.; Farmer, S. W.; Hancock, R. E. W.; Vasil, M. L.; Hodges, R. S. Rational Design of  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *Biochemistry.* **2005**, 280, 12316–12329.

34. Čerňovský, V.; Slaninová, J.; Fucík, V.; Huláčková, H.; Boroviczková, L.; Jezek, R.; Bednářová, L. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. *Peptide.* **2008**, 29, 992–1003.

35. Čerňovský, V.; Budešický, M.; Hovorka, O.; Cvac̣ka, J.; Voburka, Z.; Slaninová, J.; Boroviczková, L.; Fucík, V.; Bednářová, L.; Votruba, I.; Straka, J. Lasioglossins: Three Novel Antimicrobial Peptides from the Venom of the Eusocial Bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *ChemBioChem.* **2009**, 10(12), 2089-99.

36. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **1983**, 65, (1-2), 55-63.

37. Junkes, C.; Harvey, R. D.; Bruce, K. D.; Dölling, R.; Bagheri, M.; Dathe, M. Cyclic antimicrobial R-, W-rich peptides: the role of peptide structure and *E. coli* outer and inner membranes in activity and the mode

- of action. *Eur Biophys J.* **2011**, 40(4), 515-28.
38. Epanand, R. F.; Mowery, B. P.; Lee, S. E.; Stahl, S. S.; Lehrer, R. I.; Gellman, S. H.; Epanand, R. M. Dual Mechanism of Bacterial Lethality for a Cationic Sequence-Random Copolymer that Mimics Host-Defense Antimicrobial Peptides. *J. Mol. Biol.* **2008**, 379, 38–50.
39. Kelly, S. M.; Price, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.* **1997**, 1338, 161–185.
40. Chan, D. I.; Prenner, E. J.; Vogel, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, 1758, 1184-1202.
41. <http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>
42. <http://www.ogic.ca/projects/k2d2/>
43. <http://kael.net/helical.htm>
44. Epanand, R. M.; Epanand, R. F.; Arnusch, C. J.; Papahadjopoulos-Sternberg, B.; Wang, G.; Shai, Y. Lipid clustering by three homologous arginine-rich antimicrobial peptides is insensitive to amino acid arrangement and induced secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, 1798(6), 1272-80.
45. Lee, J.; Lee, D. G. Structure-antimicrobial activity relationship between pleurocidin and its enantiomer. *Exp.Mol.Med.* **2008**, 40, 370-376.
46. Lee, J.; Park, C.; Park, S.C.; Woo, E.R.; Park, Y.; Hahm, K.S.; Lee, D. G. Cell selectivity-membrane phospholipids relationship of the antimicrobial effects shown by pleurocidin enantiomeric peptides. *J.Pept. Sci.* **2009**, 15, 601-606.
47. Knappe, D.; Piantavigna, S.; Hansen, A.; Mechler, A.; Binas, A.; Nolte, O.; Martin, L. L.; Hoffmann, R. Oncocin (VDKPPYLPRPRPPRRIYNR-NH<sub>2</sub>): A Novel Antibacterial Peptide Optimized against Gram-Negative Human Pathogens. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5240-5247.

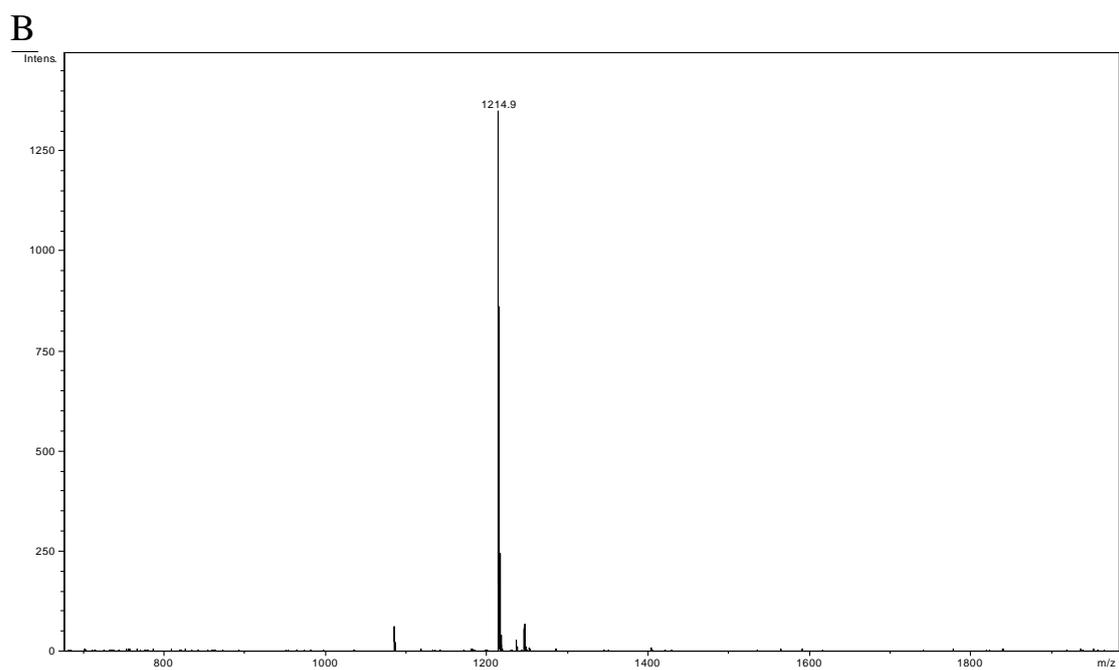
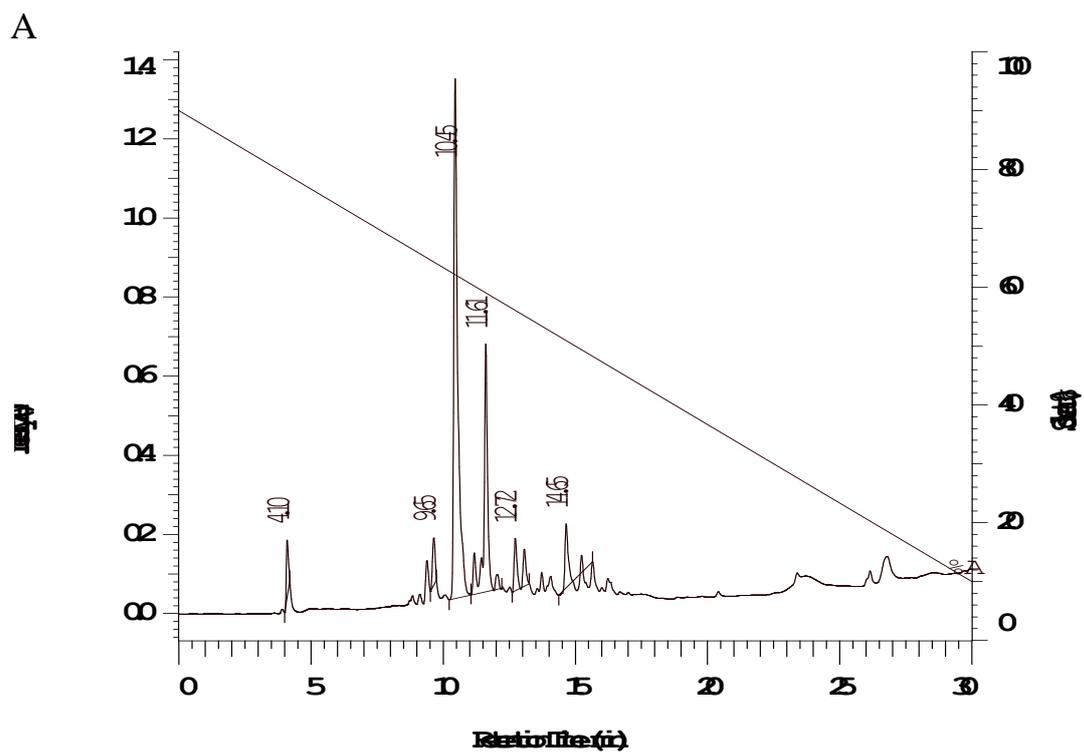


圖 6-1.TSG-1

A.TSG-1之HPLC圖，滯留時間為10.45 min。B.TSG-1之MALDI圖，分子量為1214.9。

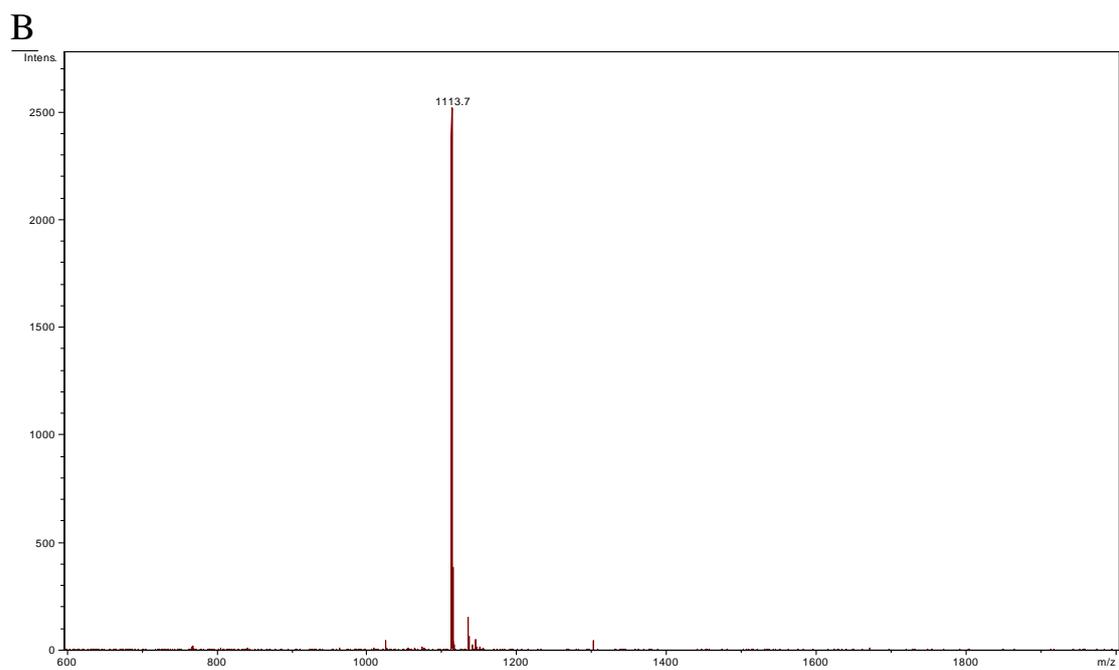
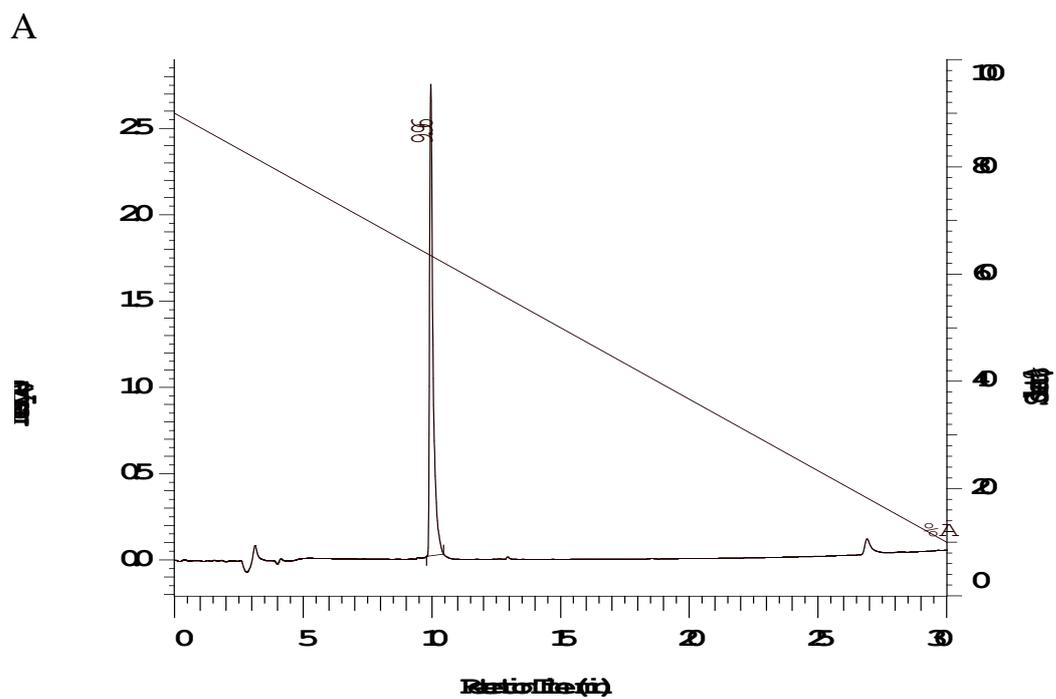
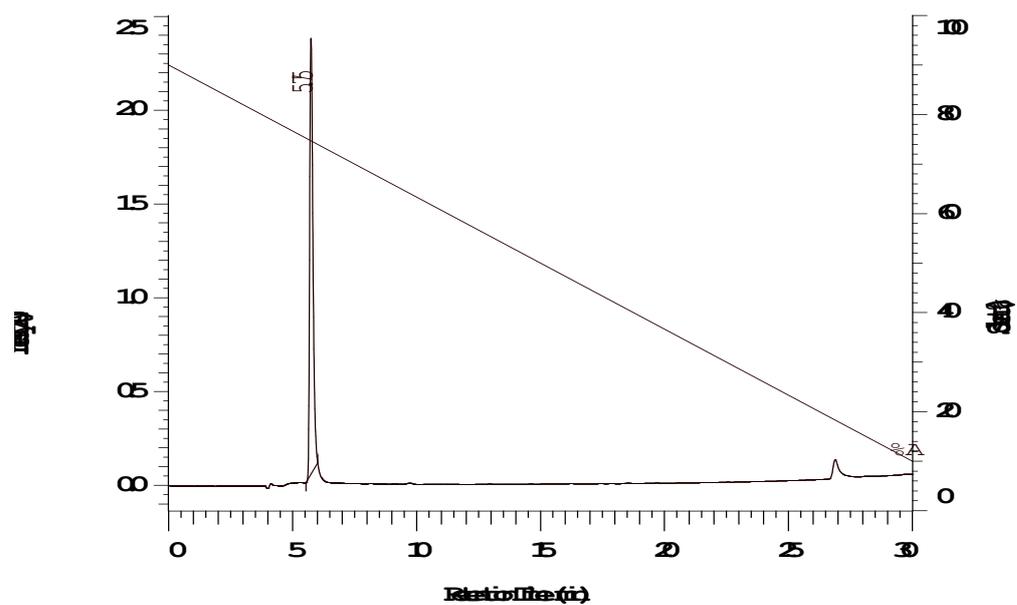


圖 6-2.TSG-2

A.TSG-2之HPLC圖，滯留時間為9.96 min。B. TSG-2之MALDI圖，分子量為1113.7。

A



B

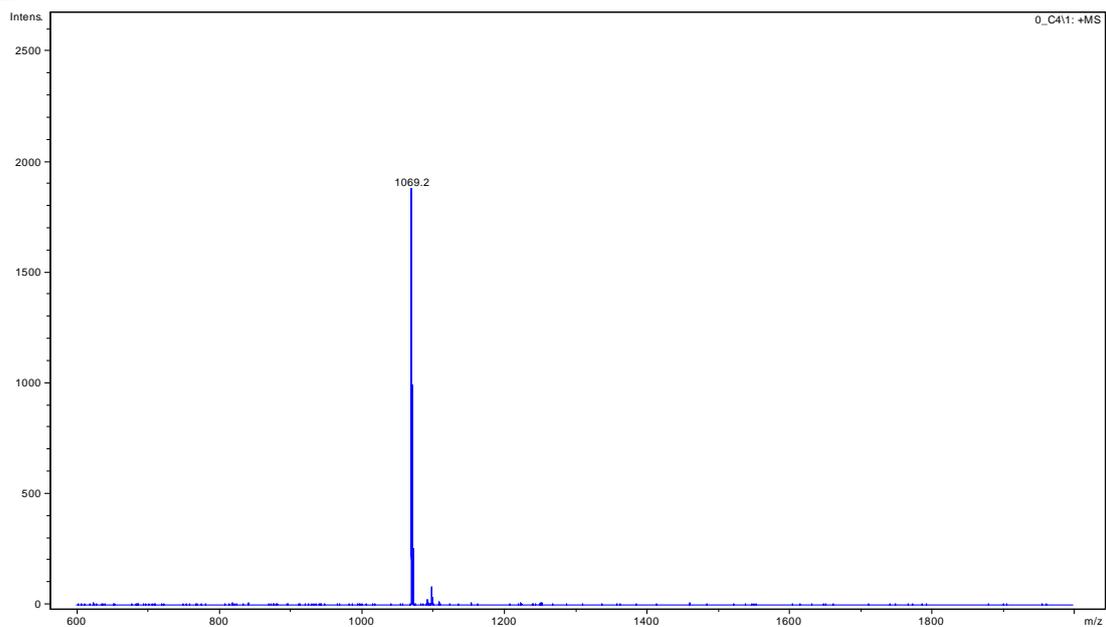
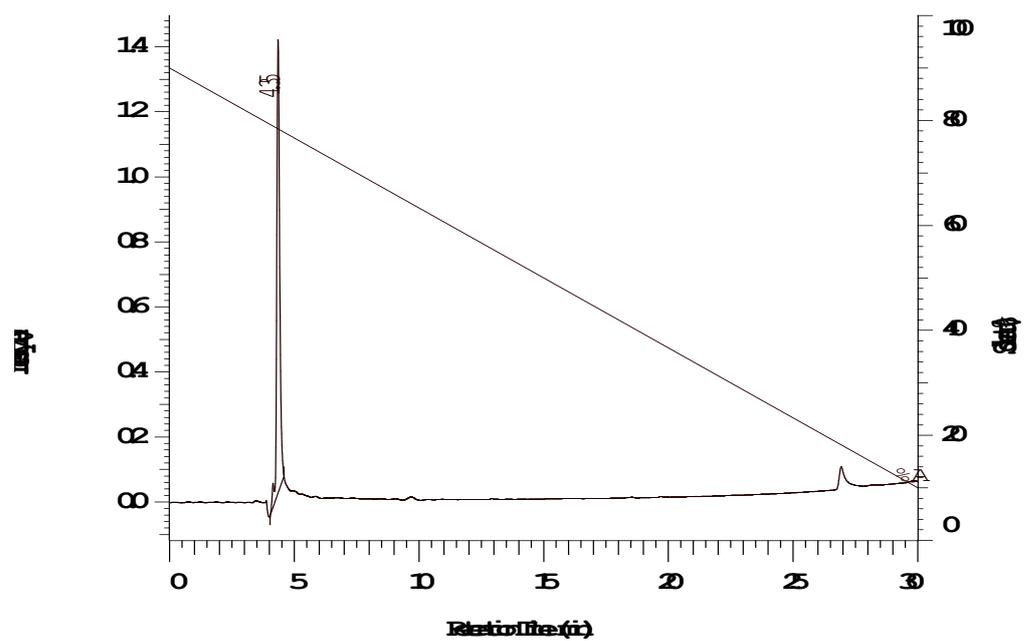


圖 6-3.TSG-3

A. TSG-3之HPLC圖，滯留時間為5.75 min。B. TSG-3之MALDI圖，分子量為1069.2。

A



B

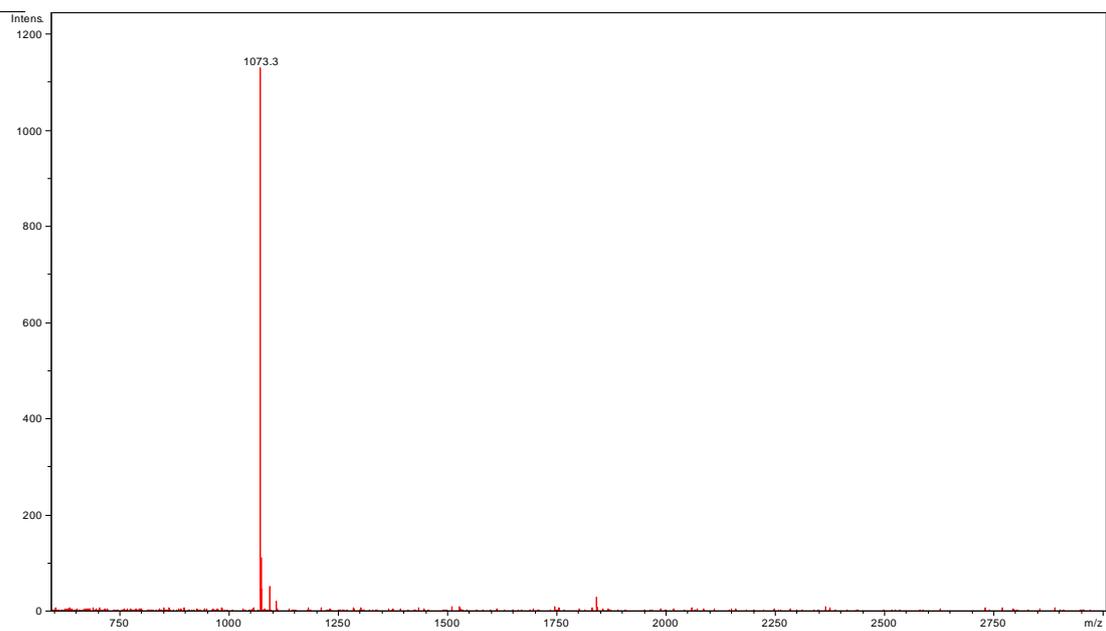
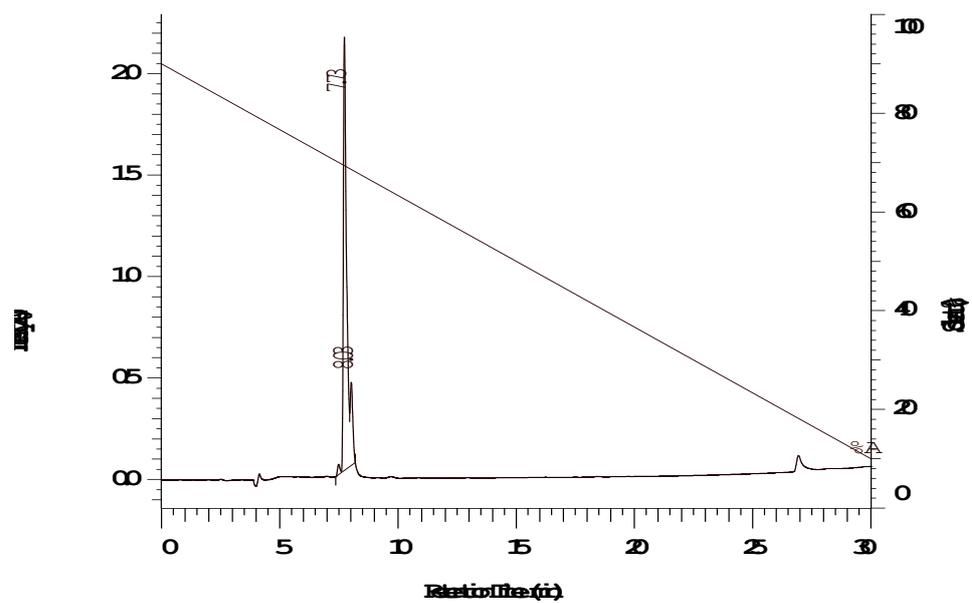


圖 6-4.TSG-4

A. TSG-4之HPLC圖，滯留時間為4.35 min。B. TSG-4之MALDI圖，分子量為1073.3。

A



B

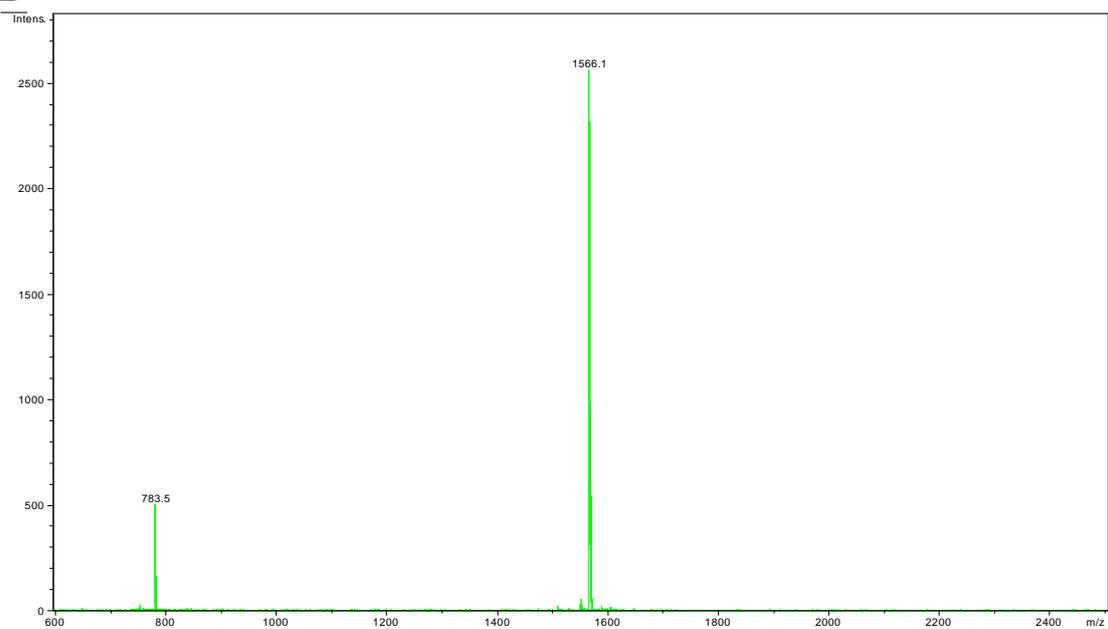


圖 6-5.TSG-5

A. TSG-5之HPLC圖，滯留時間為7.73 min。B. TSG-5之MALDI圖，分子量為1566.1，而分子量為783.5是帶二價電荷。

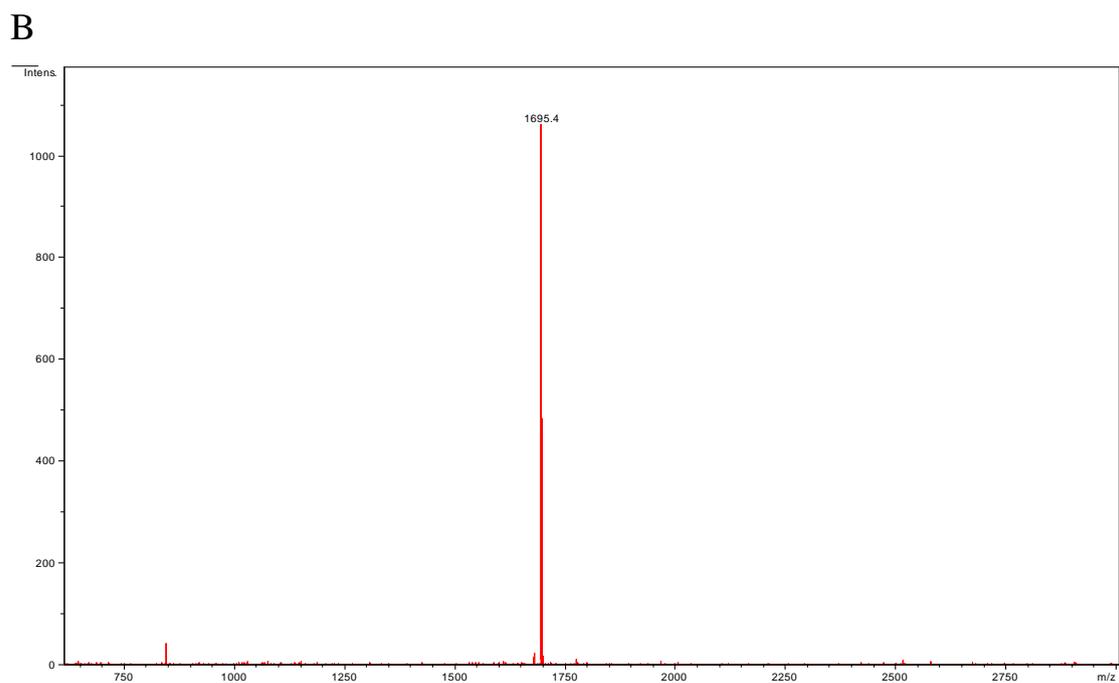
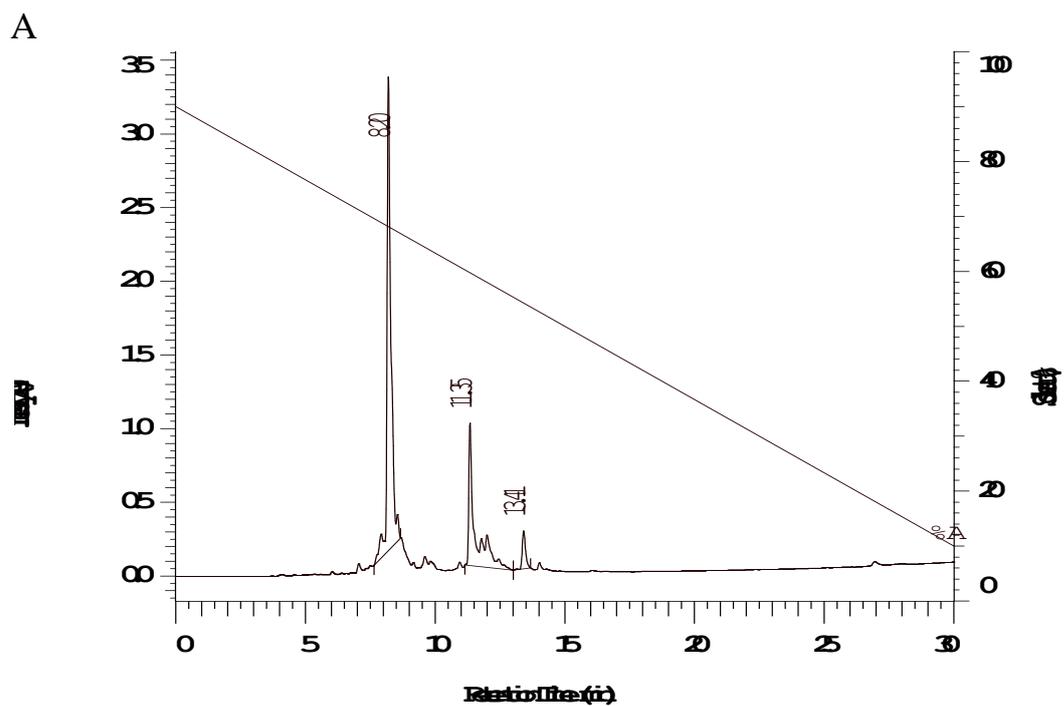
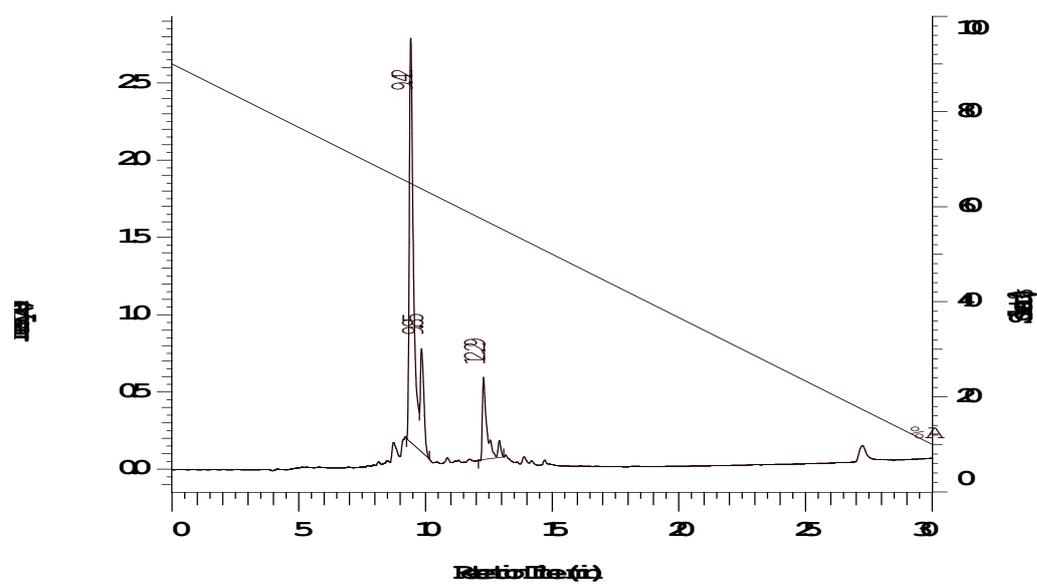


圖 6-6.TSG-6

A. TSG-6之HPLC圖，滯留時間為8.20 min。B. TSG-6之MALDI圖，分子量為1695.4。

A



B

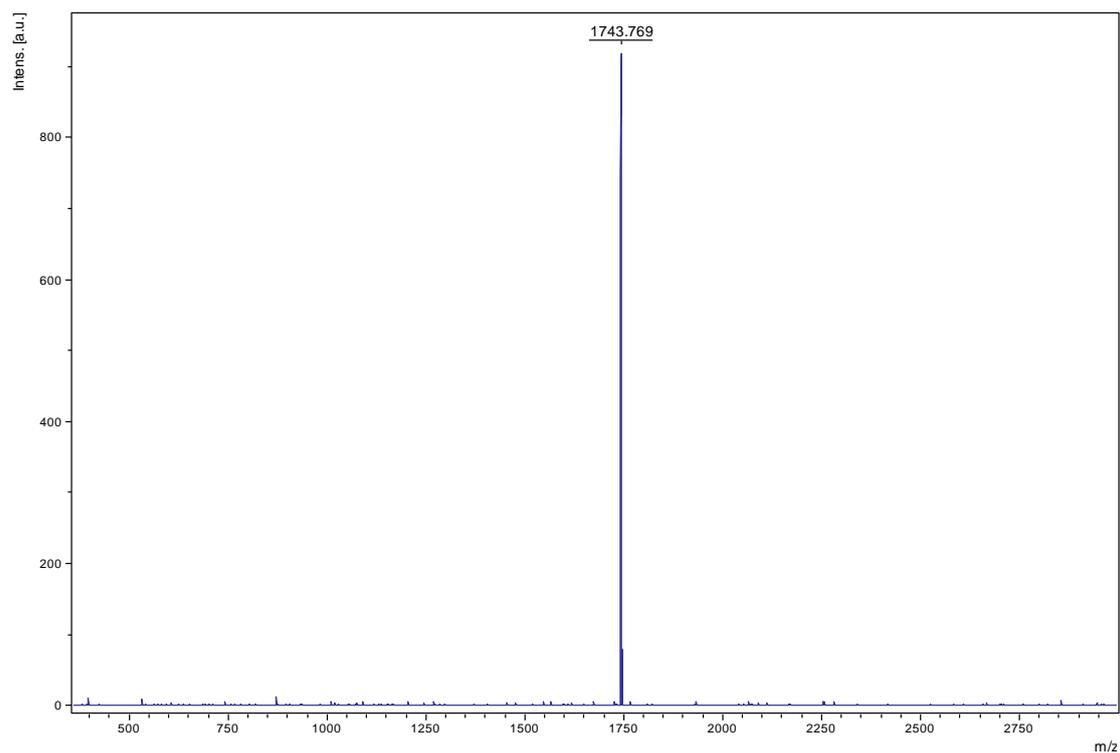
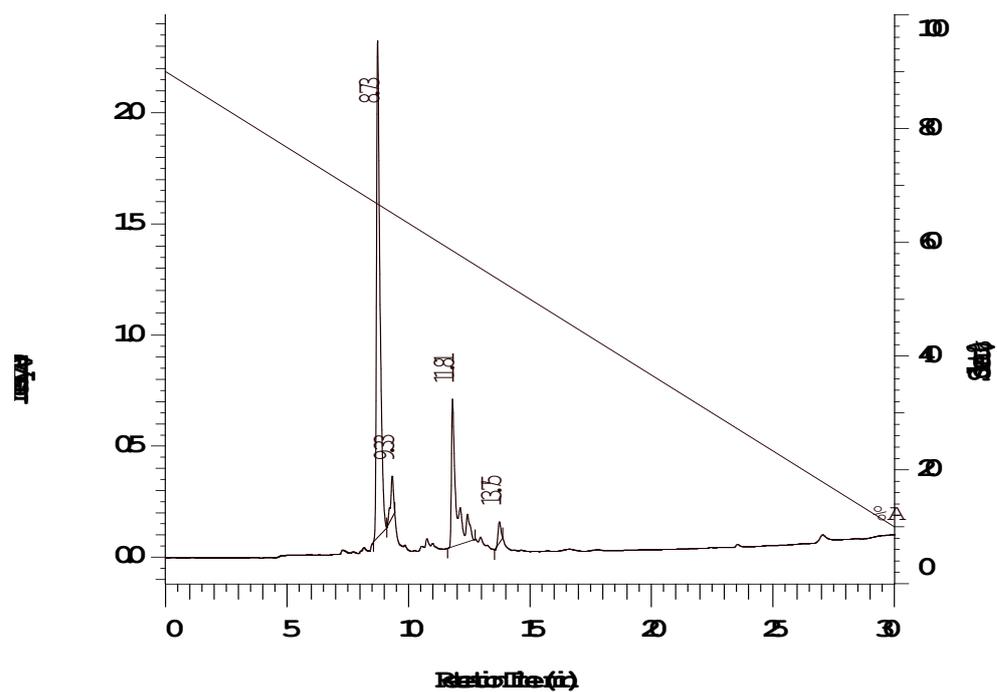


圖 6-7.TSG-7

A. TSG-7之HPLC圖，滯留時間為9.42 min。B. TSG-7之MALDI圖，分子量為1743.769。

A



B

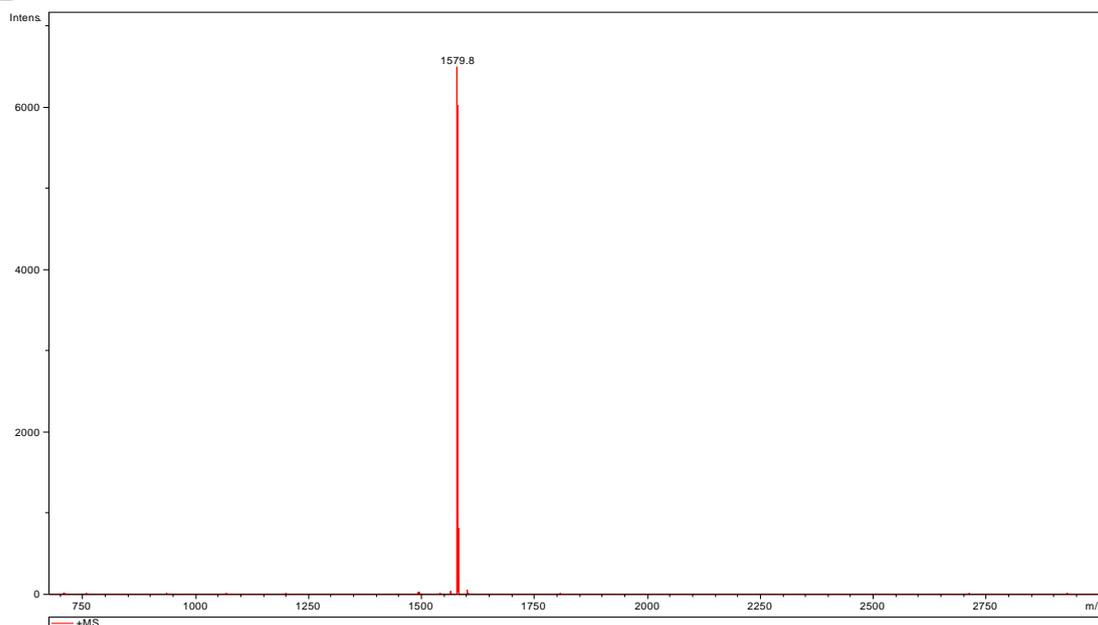


圖 6-8.TSG-8

A. TSG-8之HPLC圖，滯留時間為8.73 min。B. TSG-8之MALDI圖，分子量為1579.8。

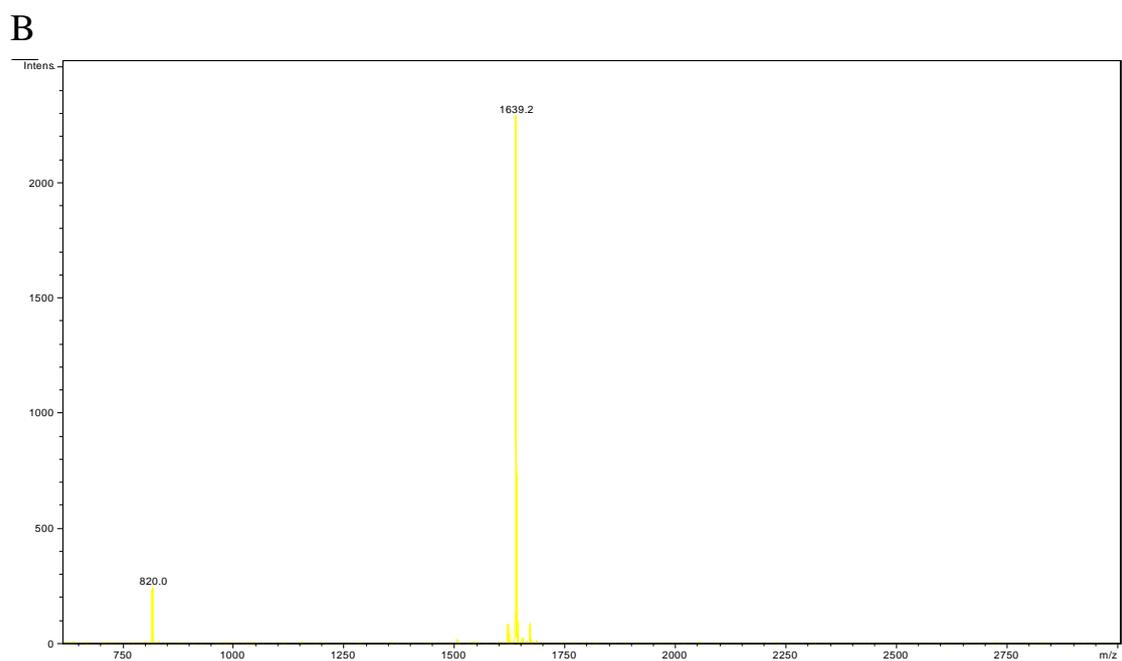
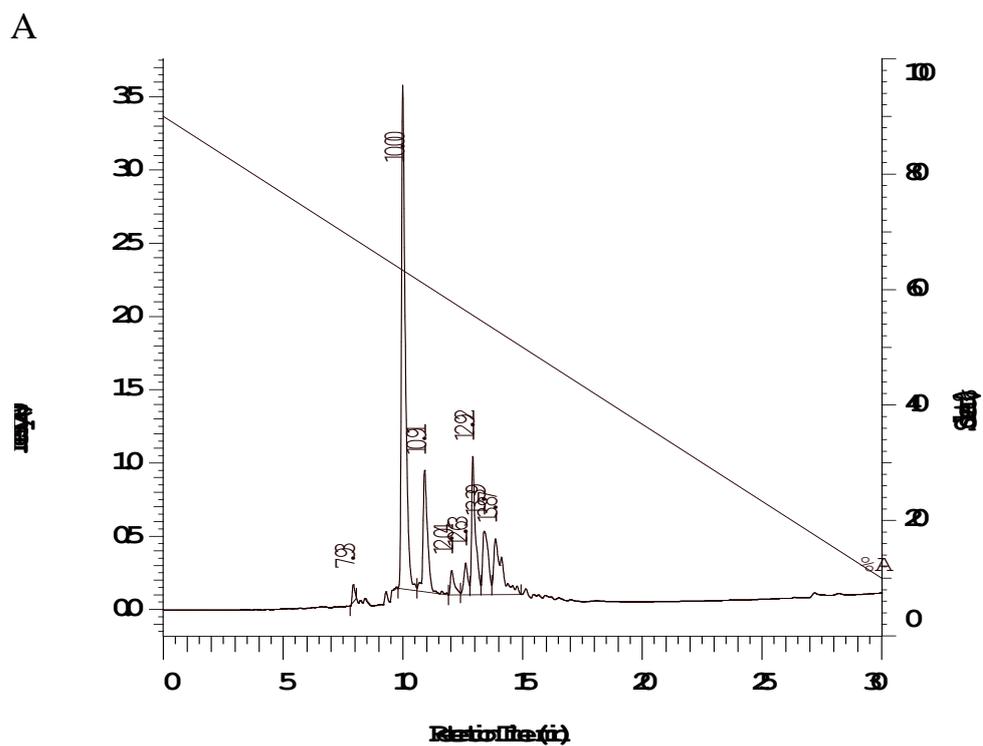


圖 6-9.TSG-8-1

A. TSG-8-1之HPLC圖，滯留時間為10.00 min。B. TSG-8-1之MALDI圖，分子量為1639.2，而分子量為820.0是帶二價電荷。

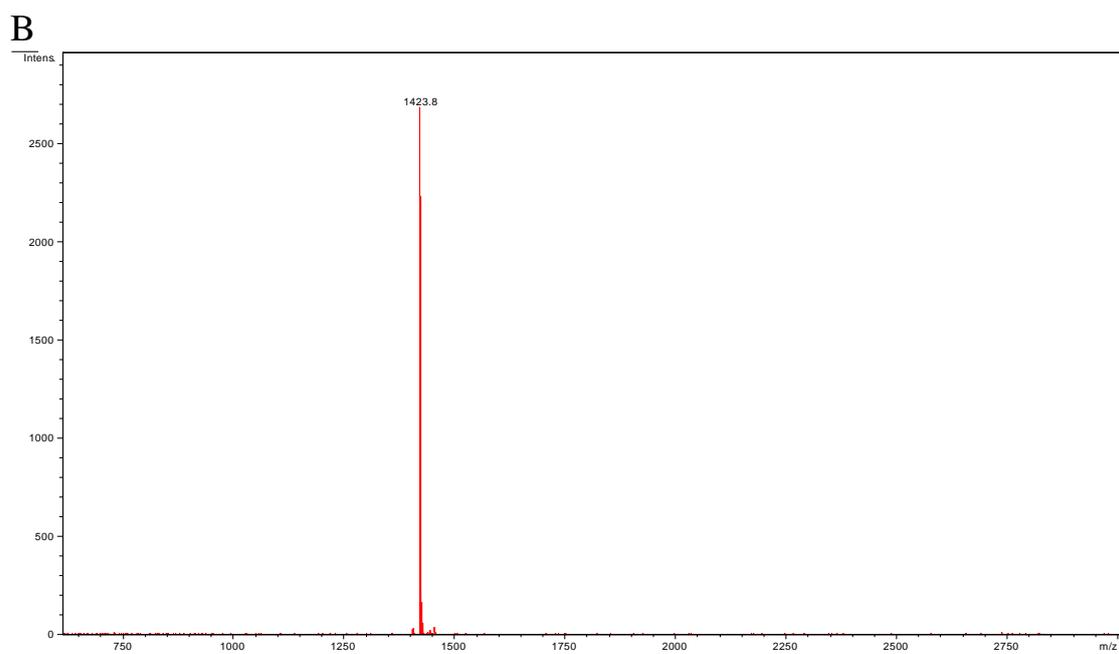
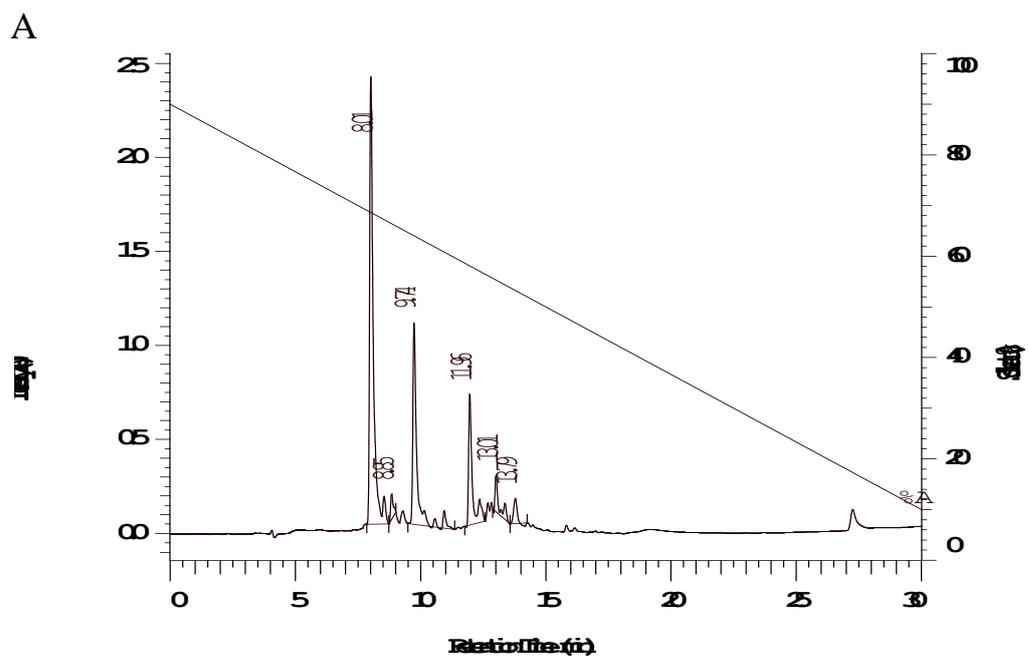
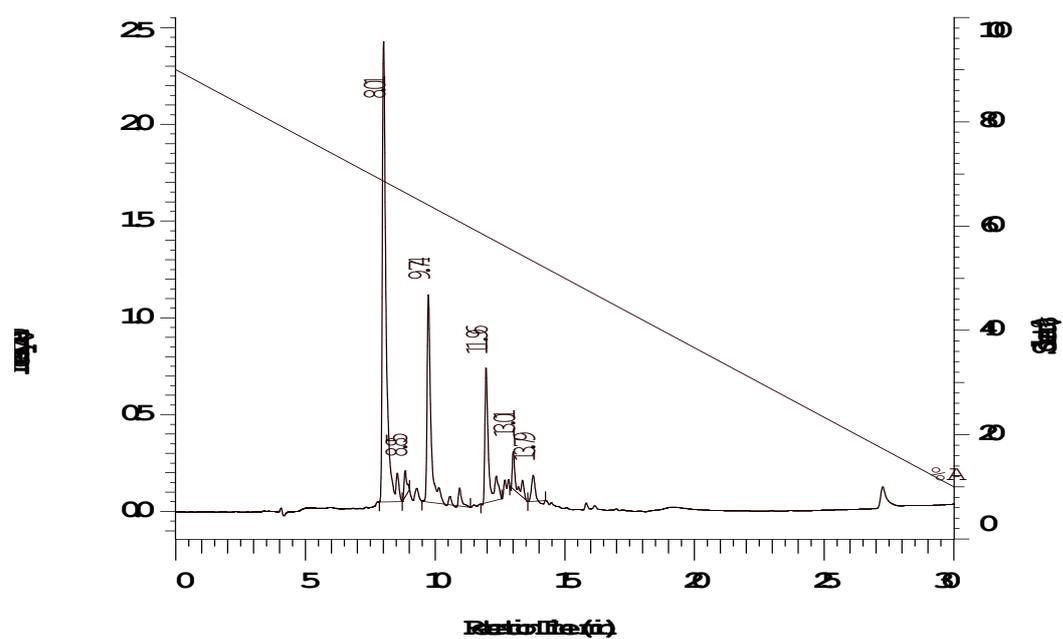


圖 6-10.TSG-9

A. TSG-9之HPLC圖，滯留時間為9.74 min。B. TSG-9之MALDI圖，分子量為1423.8。

A



B

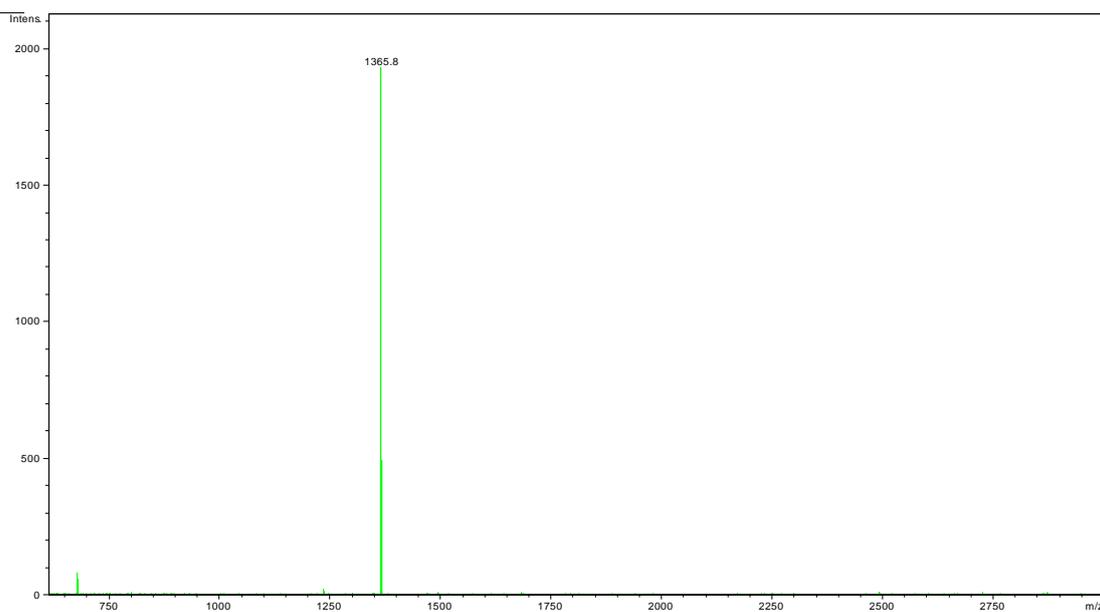
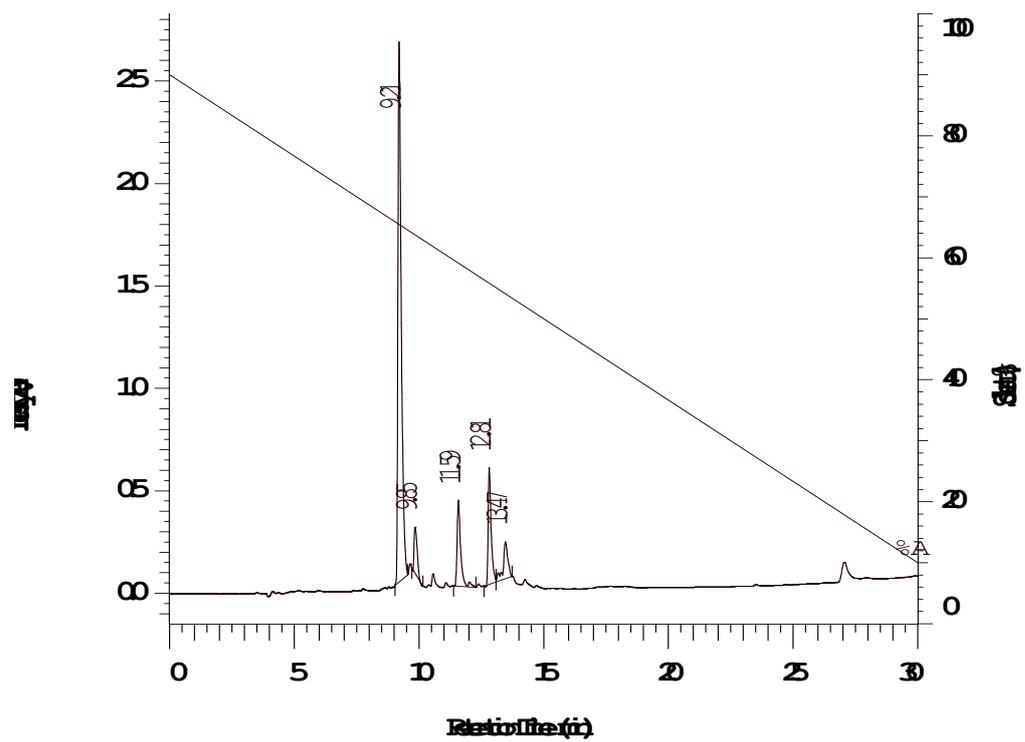


圖 6-11.TSG-9-1

A. TSG-9-1之HPLC圖，滯留時間為8.01 min。B. TSG-9-1之MALDI圖，分子量為1365.8。

A



B

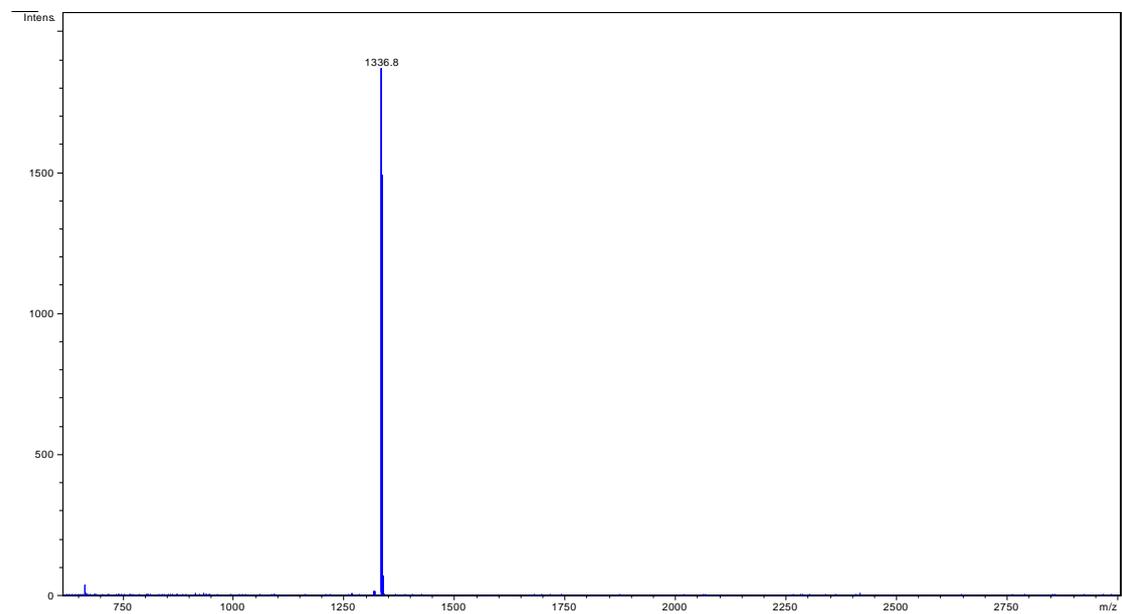
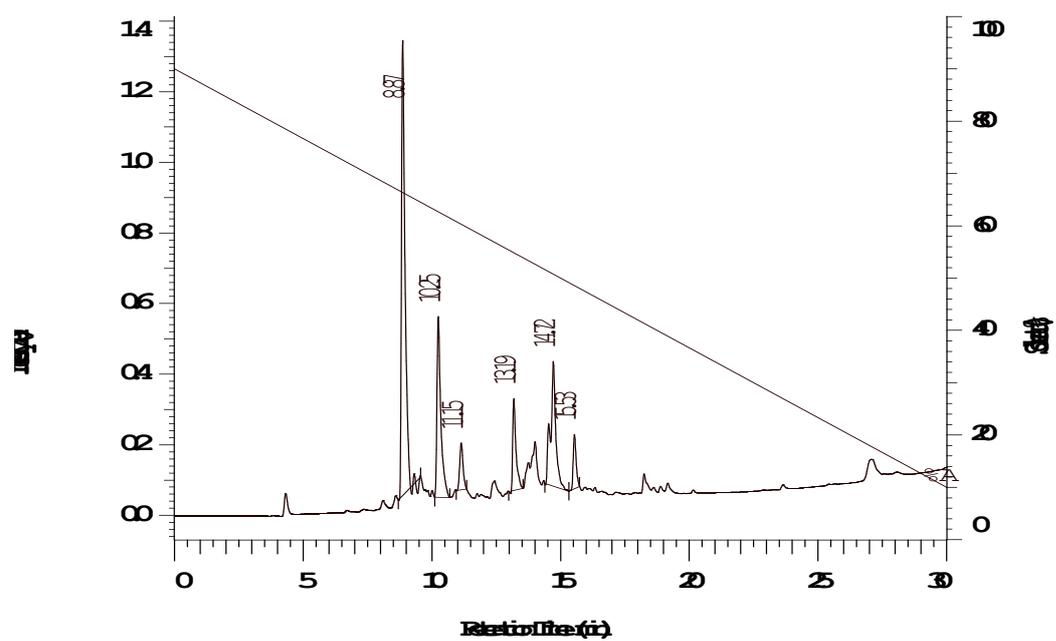


圖 6-12.TSG-10

A. TSG-10之HPLC圖，滯留時間為9.21min。B. TSG-10之MALDI圖，分子量為1336.8。

A



B

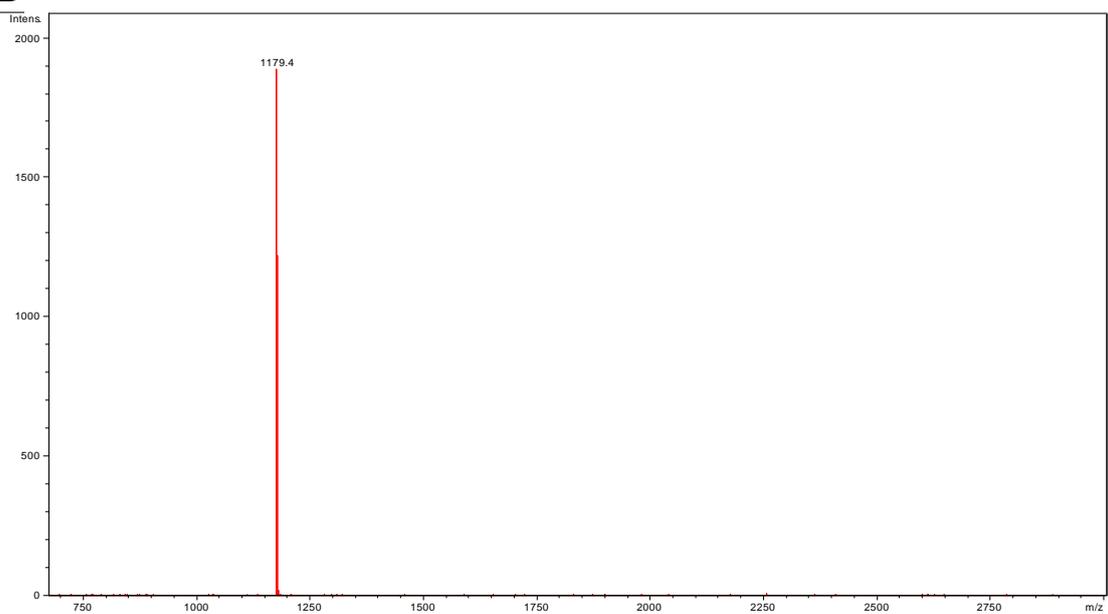


圖 6-13.TSG-11

A. TSG-11之HPLC圖，滯留時間為8.87min。B. TSG-11之MALDI圖，分子量為1179.4。