

目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
目錄	III
圖目錄	VII
表目錄	XI
第一章 緒 論	1
1-1 前 言	1
1-2 研究動機與目的	4
第二章 文獻探討	6
2-1 骨質疏鬆症	6
2-1-1 骨質疏鬆症介紹	6
2-1-2 測量骨質密度的方式	8
2-1-3 骨代謝生化指標之測定	9
2-2 固相胜肽合成法	11
2-2-1 技術起源	11
2-2-2 合成原理	12
2-2-3 反應試劑說明與作用	14
2-2-4 胜肽設計概念	16

2-2-5 環狀胜肽類似物之設計 -----	18
2-3 高效能液相層析 -----	18
2-3-1 RP-HPLC 的原理與應用 -----	19
2-4 質譜儀 (Mass) -----	21
2-4-1 電灑游離法 (ESI) -----	21
2-4-2 四極質譜儀原理 -----	22
2-5 紫外光-可見光 (UV-Vis) 光譜 -----	22
2-5-1 Beer's law -----	22
2-5-2 紫外光-可見光吸收光譜 -----	23
2-5-3 動力學探討 -----	25
2-6 生物感測器 -----	28
2-6-1 生物感測器之簡介 -----	28
2-6-2 表面薄膜共振技術 -----	29
2-6-3 BIAcore 儀器之架構 -----	30
2-6-4 BIAcore 儀器之原理 -----	32
第三章 材料與方法 -----	36
3-1 線狀與環狀胜肽之合成 -----	36
3-1-1 SPPS 實驗設備與材料 -----	36
3-1-2 固相胜肽合成之實驗方法 -----	37

3-1-3 環狀胜肽的合成 -----	39
3-1-4 環化反應實驗設備與材料 -----	42
3-2 高效能液相層析法 ~ 胜肽之分析及純化 -----	44
3-2-1 HPLC 實驗材料與設備 -----	44
3-2-2 RP-HPLC 實驗方法 -----	44
3-3 質譜儀鑑定 進行分析及分子量鑑定 -----	47
3-3-1 實驗儀器 -----	47
3-4 UV-Vis 光譜儀 -----	48
3-4-1 吸收光譜分析測量 -----	48
3-4-2 UV-Vis 光譜儀實驗方法 -----	49
3-4-3 動力學測量 -----	49
3-5 利用表面膜漿共振技術製備感應晶片 -----	51
3-5-1 實驗材料及設備 -----	51
3-5-2 感應晶片表面之固定化 -----	52
3-5-3 anti-NTx 抗體與胜肽樣品交互作用之分析 -----	53
第四章 結果與討論 -----	54
4-1 線狀胜肽之合成、純化及鑑定 -----	54
4-1-1 高效能液相層析法進行分析及純化 -----	54
4-1-2 質譜儀進行分析及鑑定 -----	61

4-2 環狀胜肽之合成、純化及鑑定 -----	62
4-2-1 高效能液相層析法進行分析及純化 -----	62
4-2-2 質譜儀進行分析及鑑定 -----	74
4-3 UV-Vis 光譜儀分析結果 -----	75
4-3-1 線狀與環狀胜肽之UV-Vis吸收光譜 -----	75
4-3-2 動力學量測結果 -----	77
4-4 利用表面漿體共振技術進行交互作用分析 -----	97
4-5 結果討論 -----	102
參考資料與文獻 -----	104
附件 -----	109

圖目錄

圖 1. 正常脊椎與骨質疏鬆脊椎圖 -----	8
圖 2. Fmoc Cleavage Flow Chart -----	13
圖 3. COOH 基團被 HBTU 激發活化,形成強烈缺電子基團 -----	14
圖 4. Fmoc-Glycine的C ^α -N上的Fmoc與Piperidine反應流程圖 -----	15
圖 5. Chemical cleavage reagent 對 PAL-resin 及保護基團的作用處-----	16
圖 6. N-telopeptide 的胺基酸序列 -----	17
圖 7. 一幅射能量經過吸收溶液後的衰退現象 -----	23
圖 8. 分子的電子能階圖 -----	24
圖 9. 多管道二極體列陣型光譜儀之組成元件圖 -----	25
圖 10. 酵素之動力分析:不競爭型抑制反應 -----	27
圖 11. 生物感測器組成之基本元件 -----	29
圖 12. The Corner Stones of Biacore Technology -----	31
圖 13. BIAcore sensor 之感應晶片外觀與主要構造 -----	32
圖 14. BIAcore 感測原理示意圖 -----	34
圖 15. BIAcore 之感應曲線圖 -----	35
圖 16. SPSS 胜肽合成流程圖與說明 -----	38
圖 17. 製備 chloroacetic anhydride 反應圖 -----	39
圖 18. 製備 chloroacetylated peptide 反應圖 -----	41
圖 19. 環化裝置圖與說明 -----	43
圖 20. 移動相比例變化圖 -----	45
圖 21. anti-NTx antibody 感應晶片之製備流程圖 -----	53
圖 22. 經純化後收集 Linear-P_1 之 HPLC 層析圖 -----	56
圖 23. 經純化後收集 Linear-P_2 之 HPLC 層析圖 -----	56
圖 24. 經純化後收集 Linear-P_3 之 HPLC 層析圖 -----	57
圖 25. 經純化後收集 Linear-P_4 之 HPLC 層析圖 -----	57
圖 26. 經純化後收集 Linear-P_5 之 HPLC 層析圖 -----	58
圖 27. 經純化後收集 Linear-P_6 之 HPLC 層析圖 -----	58
圖 28. 經純化後收集 Linear-P_7 之 HPLC 層析圖 -----	59

圖 29. 經純化後收集 Linear-P_8 之 HPLC 層析圖	-----59
圖 30. 經純化後收集 Linear-P_9 之 HPLC 層析圖	-----60
圖 31. 經純化後收集 Linear-P_10 之 HPLC 層析圖	-----60
圖 32. 未純化前 Cyclic-P_1 之 HPLC 層析圖	-----64
圖 33. 經純化後收集 Cyclic-P_1 之 HPLC 層析圖	-----64
圖 34. 未純化前 Cyclic-P_2 之 HPLC 層析圖	-----65
圖 35. 經純化後收集 Cyclic-P_2 之 HPLC 層析圖	-----65
圖 36. 未純化前 Cyclic-P_3 之 HPLC 層析圖	-----66
圖 37. 經純化後收集 Cyclic-P_3 之 HPLC 層析圖	-----66
圖 38. 未純化前 Cyclic-P_4 之 HPLC 層析圖	-----67
圖 39. 經純化後收集 Cyclic-P_4 之 HPLC 層析圖	-----67
圖 40. 未純化前 Cyclic-P_5 之 HPLC 層析圖	-----68
圖 41. 經純化後收集 Cyclic-P_5 之 HPLC 層析圖	-----68
圖 42. 未純化前 Cyclic-P_6 之 HPLC 層析圖	-----69
圖 43. 經純化後收集 Cyclic-P_6 之 HPLC 層析圖	-----69
圖 44. 未純化前 Cyclic-P_7 之 HPLC 層析圖	-----70
圖 45. 經純化後收集 Cyclic-P_7 之 HPLC 層析圖	-----70
圖 46. 未純化前 Cyclic-P_8 之 HPLC 層析圖	-----71
圖 47. 經純化後收集 Cyclic-P_8 之 HPLC 層析圖	-----71
圖 48. 未純化前 Cyclic-P_9 之 HPLC 層析圖	-----72
圖 49. 經純化後收集 Cyclic-P_9 之 HPLC 層析圖	-----72
圖 50. 未純化前 Cyclic-P_10 之 HPLC 層析圖	-----73
圖 51. 經純化後收集 Cyclic-P_10 之 HPLC 層析圖	-----73
圖 52. 線狀胜肽樣品與抗體結合後的吸收光譜圖	-----76
圖 53. 環狀胜肽樣品與抗體結合後的吸收光譜圖	-----76
圖 54. Linear-P_1 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖	-----78
圖 55. Linear-P_2 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖	-----78
圖 56. Linear-P_3 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖	-----79
圖 57. Cyclic-P_1 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖	-----79
圖 58. Cyclic-P_2 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖	-----80

圖 59. Cyclic-P_3 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖	-----80
圖 60. Linear-P_1, 0.25 mM ln(Ai-At)對反應的時間變化做圖	-----83
圖 61. Linear-P_1, 0.125 mM ln(Ai-At)對反應的時間變化做圖	-----83
圖 62. 反應觀測速率常數 (kobs) 對 Linear-P_1 濃度的線性關係圖	-----86
圖 63. 反應觀測速率常數 (kobs) 對 Linear-P_2 濃度的線性關係圖	-----86
圖 64. 反應觀測速率常數 (kobs) 對 Linear-P_3 濃度的線性關係圖	-----87
圖 65. 反應觀測速率常數 (kobs) 對 Cyclic-P_1 濃度的線性關係圖	-----87
圖 66. 反應觀測速率常數 (kobs) 對 Cyclic-P_2 濃度的線性關係圖	-----88
圖 67. 反應觀測速率常數 (kobs) 對 Cyclic-P_3 濃度的線性關係圖	-----88
圖 68. 線狀胜肽反應觀測速率常數 (kobs) 對濃度的線性關係圖	-----90
圖 69. 環狀胜肽反應觀測速率常數 (kobs) 對濃度的線性關係圖	-----90
圖 70. Linear-P_1 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)	-----92
圖 71. Linear-P_2 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)	-----92
圖 72. Linear-P_3 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)	-----93
圖 73. Cyclic-P_1 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)	-----93
圖 74. Cyclic-P_2 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)	-----94
圖 75. Cyclic-P_3 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)	-----94
圖 76. Linear-P1 與 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖	-----98
圖 77. Linear-P2 與 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖	-----98
圖 78. Linear-P3 與 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖	-----99
圖 79. Cyclic-P1 與 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖	-----99
圖 80. Cyclic-P2 與 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖	-----100
圖 81. Cyclic-P3 與 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖	-----100
附 件	
圖 82. 線狀胜肽 Linear-P_1 之 ESI-MS 分析圖譜	-----109
圖 83. 線狀胜肽 Linear-P_2 之 ESI-MS 分析圖譜	-----109
圖 84. 線狀胜肽 Linear-P_3 之 ESI-MS 分析圖譜	-----110
圖 85. 線狀胜肽 Linear-P_4 之 ESI-MS 分析圖譜	-----110
圖 86. 線狀胜肽 Linear-P_5 之 ESI-MS 分析圖譜	-----111
圖 87. 線狀胜肽 Linear-P_6 之 ESI-MS 分析圖譜	-----111

圖 88. 線狀胜肽 Linear-P_7 之 ESI-MS 分析圖譜	112
圖 89. 線狀胜肽 Linear-P_8 之 ESI-MS 分析圖譜	112
圖 90. 線狀胜肽 Linear-P_9 之 ESI-MS 分析圖譜	113
圖 91. 線狀胜肽 Linear-P_10 之 ESI-MS 分析圖譜	113
圖 92. 環狀胜肽 Cyclic-P_1 之 ESI-MS 分析圖譜	114
圖 93. 環狀胜肽 Cyclic-P_2 之 ESI-MS 分析圖譜	114
圖 94. 環狀胜肽 Cyclic-P_3 之 ESI-MS 分析圖譜	115
圖 95. 環狀胜肽 Cyclic-P_4 之 ESI-MS 分析圖譜	115
圖 96. 環狀胜肽 Cyclic-P_5 之 ESI-MS 分析圖譜	116
圖 97. 環狀胜肽 Cyclic-P_6 之 ESI-MS 分析圖譜	116
圖 98. 環狀胜肽 Cyclic-P_7 之 ESI-MS 分析圖譜	117
圖 99. 環狀胜肽 Cyclic-P_8 之 ESI-MS 分析圖譜	117
圖 100. 環狀胜肽 Cyclic-P_9 之 ESI-MS 分析圖譜	118
圖 101. 環狀胜肽 Cyclic-P_10 之 ESI-MS 分析圖譜	118

表目錄

表 1. Cleavage mixtures (for 0.1 ~0.5 g peptide resin) -----	13
表 2. 依據 epitope mapping 原則設計的胜肽之胺基酸序列 -----	17
表 3. 合成胜肽所需之試劑材料、儀器設備與購買廠商 -----	36
表 4. 合成環狀胜肽所需之試劑材料、儀器設備與購買廠商 -----	43
表 5. HPLC 實驗過程中，所需之試劑、設備與購買廠商 -----	44
表 6. UV-Vis 實驗所需藥品試劑、儀器設備與購買廠商 -----	48
表 7. 表面漿體共振技術製備感應晶片所需之材料、設備及購買廠商 ---	51
表 8. 線狀胜肽純化後之產物產率與滯留時間 -----	54
表 9. 線狀胜肽之理論分子量與 ESI-MS 鑑定後的分子量 -----	61
表 10. 環狀胜肽純化後之產物產率與滯留時間 -----	62
表 11. 環狀胜肽之計算分子量與 ESI-MS 鑑定後的分子量 -----	74
表 12. 在固定抗體濃度下，線狀胜肽的濃度，其反應觀測速率常數-----	84
表 13. 在固定抗體濃度下，環狀胜肽的濃度，其反應觀測速率常數-----	85
表 14. 胜肽樣品利用雙倒數做圖所得到的 V_{max} 與 K_m 值 -----	96
表 15. 胜肽樣品與 anti-NTx Ab 進行結合反應之結合與解離常數 -----	101