

一. 緒論

1-1 前言

骨質疏鬆症是現代人年齡老化後，無聲無息的流行症。其發生的原因與年齡、性別、人種、體重、家族性、飲食及內分泌生理代謝等有關。根據中華民國老年醫學會的調查，台灣地區65歲以上人口中，每9個人即有1位罹患骨質疏鬆症；而65歲以上女性中每4個人就有1位患者，表示停經後婦女約有25%會發生骨質疏鬆症。隨著人口的老化，可想而知全民罹患骨質疏鬆症的比率還不斷的增加，我們不得不正視此一現象，骨質疏鬆症所造成的骨折及嚴重的併發症，正如隱形殺手般地嚴重威脅我們的健康，同時也造成社會沉重負擔^{1、2}。

骨質會在人體中不斷的進行重整，在孩童與青春期，骨質重整會形成骨骼成長。骨質的代謝包含兩種相反的作用：骨母細胞的骨質造骨作用與破骨細胞的骨質破骨作用³。人體的骨骼先以破骨，後以造骨之形式，平均每三年全面更新一次的速度進行代謝⁴。人類骨骼的骨質含量自出生後即隨年齡而增加，一直到35歲左右達到高峰，稱之為尖峰骨質含量。從40歲以後，因老化或其他因素，使得骨質代謝速率加快，此時由於破骨作用大於造骨作用會加速骨質的破壞，骨質就逐漸流失；身體的骨質含量不分性別地，每年以0.5%至1.5%的速度下降。骨質疏鬆症就因這兩種作用不平衡而造成的，骨頭內部會形成很多疏鬆的空隙，因此很容易造成骨折^{5、6}。

一般檢測骨質流失的方法包括骨質密度測定與骨代謝生化檢查，其中骨質密度測定是屬於一種靜態的檢查，通常要經過大約一、二年長期的骨質流失，骨質疏鬆症達到某一個程度時，骨質密度才有明顯變化⁸。所以這種檢測法不能用於骨質疏鬆症的預估及短時間內療效的評估。因此需要良好的診斷和監視工具，監控骨質代謝檢驗因而產生，骨質代謝生化指標是測定血液和尿液中骨質生成和耗損的代謝產物，用於評估骨質流失情況，而骨質代謝生化指標比骨密度測量更能預測骨折發生，主要的原因是骨質生化偵測指標屬於一種動態的檢查，可提供骨質疾病的變化和骨質代謝速率資料，此時骨質密度的測量就可能無法反映真實骨質流失的狀況。而骨代謝生化指標可用於療效的偵測，可以重覆測定，故可及早得知骨質生成和耗損的消長，讓受檢者及早警覺骨質流失的威脅與及早測知骨質流失情形^{9、10}。

目前已有許多生化指標被作為監測骨質代謝（bone remodeling）的依據，骨質代謝的生化指標可分為骨質生成指標（bone formation marker）及骨質再吸收指標（bone resorption marker）^{11、12}。骨質吸收的生化指標當中第一類型膠原質交聯鍵結的N端胜肽片段（Type I collagen cross-linked N-telopeptide；NTx）是目前較具有特異性的生化指標之一¹³。膠原質（collagen）是體內含量最大的一種細胞外基質蛋白質，其主要功能在維持各種脊椎動物的結締組織正常的結構與功能。至目前為止，至少有14種不同類型

的膠原質分子被鑑定出來，其中第一型膠原質（type I collagen）是骨骼細胞合成的主要膠原質類型，在骨骼的組成物質中佔 90% 以上¹⁴。在骨質再吸收(bone resorption)過程中，第一型膠原質（type I collagen）裂解所產生的代謝指標，在經過人體代謝後，在血清中約有80%與胜肽鍵結（peptide bound）的型式存在，包括與pyridinoline交錯聯結之N端胜肽（NTx）和C端的胜肽（CTx）。另外大約20%以游離型態之pyridinoline存在。血清中的NTx或CTx會經由腎臟進一步地降解後（degradation）變成游離型態pyridinoline。第一型膠原質的代謝物經由尿液排出人體外後，在尿液中約有60% 是以NTx或CTx的型式被排出，約有 40% 是以游離型態之pyridinoline被排出。因此，NTx是骨骼中第一型膠原質被降解後所產生的代謝物，在人體中不會被進一步代謝¹³，NTx 的含量應用在監控骨質吸收的情形上為具有高特異性的生化指標，此外在抑制骨質吸收療效的評估上亦為具有高靈敏度的指標。

本論文指導教授 龍鳳娣老師實驗室多年來一直致力於 type I collagen cross-linked N-telopeptide 的 NTx 胜肽與Anti-NTx 抗體間交互作用之分析，並依據 epitope（抗原決定基） mapping 原則設計10段線狀且具有6個胺基酸重複序列的 NTx 胜肽，成功地建立實驗步驟及合成流程^{16、17}。並運用固相胜肽合成的技術(Solid phase peptide synthesis)中Fmoc chemistry 之合成方法²⁶，合成這些胜肽片斷。合成出之胜肽粗產物分別定名為 peptide

1~10，粗產物可利用逆相高效能液相層析法(reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC)分析其層析圖譜。並應用半製備(semi-preparative) C-18 管柱以純化粗產物，冷凍乾燥後得到每一胜肽的最終純產物。胜肽的最終純產物均經由質譜儀(mass spectrometry)鑑定其分子量。最後，利用酵素連結免疫吸附分析方法(enzyme linked-immunosorbent assay, ELISA)和表面膜漿共振技術(surface plasmon resonance; SPR)分別進行分析，測試胜肽樣品與Anti-NTx抗體間的交互作用，其結果均發現線狀胜肽peptide 1、peptide 2與peptide 3與Anti-NTx抗體間有較高的親和力^{16、17}。根據這個結果，我們利用胜肽在構形上的多變性，以線狀胜肽的胺基酸結構為藍本，來設計一系列的環狀胜肽，並探討胜肽構形的改變與抗體間交互作用的情況，有何變化。

1-2 研究動機與目的

目前骨代謝的生化指標檢測方法中，利用免疫分析方法來檢測骨質流失的NTx為目前較簡單與快速的方法之一¹⁴。利用酵素連結免疫吸附分析方法(enzyme linked-immunosorbent assay, ELISA)進行檢測NTx的套組(Osteomark[®])是由Dr. Hanson於1992年所研發，已通過美國國家食品藥物管理局(Food and Drug Administration; FDA)之核准，由Johnson & Johnson公司負責製造上市，對NTx號稱具有特異性及敏感性^{20、21}。套組中的單株抗

體能辨識人體第一類型膠原質中的NTx，因此可應用於酵素連結免疫吸附分析方法來檢測人體所代謝出的NTx，但檢查一次的費用需自付600元到800元不等。此外，此項檢查必須在有ELISA reader 的實驗室完成，而且無法重複使用，無法達到優良篩檢試劑的簡單方便和經濟實惠之要求。所以此項檢測法因為儀器與材料的限制仍有研發改善的空間。

本論文研究之目的是根據過去研究結果為基礎，目標放在與Anti-NTx 抗體結合具效力之peptide 1、peptide 2 與peptide 3 線狀胜肽，以這些胜肽樣品的胺基酸結構為藍本¹⁶，設計合成出 NTx 環狀胜肽，分別定名為Cyclic-P1，Cyclic-P2 與Cyclic-P3，希望能深入探討NTx 胜肽的構形變化與Anti-NTx 抗體間交互作用的情況，並利用紫外光-可見光光譜儀（UV-Vis Spectrophotometer，HP 8453）進行偵測，比較其線狀和環狀胜肽與抗體之間的交互作用情形，並以動力學的角度來探討兩者與抗體間進行結合反應的速率快慢，並根據反應吸收值對時間的變化圖中所得之數據，利用Lineweaver-Burk Equation 推導求得其Vmax與Km值，討論其結果所代表之意義，比較線狀和環狀胜肽與抗體間親和力的大小差異。接著，並利用表面膜漿共振技術進行胜肽樣品與anti-NTx抗體間交互作用的親和性檢測，將實驗結果與論文主題相對照，做為結論之佐證。本篇論文之結果有利於未來研發具有特異性，敏感性，簡易性及安定性，且經濟性高的骨質疏鬆症篩檢試劑。

二. 文 獻 探 討

2-1 骨質疏鬆症

2-1-1 骨質疏鬆症介紹

骨質疏鬆症被稱為廿一世紀「無聲無息的流行病」，英文名字是 osteoporosis，意思就是佈滿了孔隙的骨骼。孔隙多的骨骼和正常骨骼相比較，外型是一樣的（可參照圖 1 來做說明），但質量卻減少了，其原因為骨頭的鈣質流失，使得內部骨頭變為單薄，造成許多孔隙，呈現中空疏鬆的現象，已經疏鬆的骨頭，不再有能力承受日常生活所必須造成的身體負荷，久而久之，骨折就成為不可避免的結果。

骨質疏鬆症主要發生在海綿骨。年輕時骨骼非常緻密，骨小樑很多，其間孔隙很小；但在年紀增大以後，骨小樑消失，間隙會變大，慢慢形成「骨質疏鬆症」，即骨骼內的孔隙變大變多，骨小樑變少，骨皮質更薄；換句話說，即是骨骼密度變小，單位體積內骨骼所含的礦物質量減少。骨骼的支撐力相對減低，於是非常容易發生骨折，而最常發生骨折的臀部骨折又約有 50% 的致死率。

骨質疏鬆症可能造成的後果包括體型的改變（駝背）、不良於行、疼痛，甚至增加死亡的危險性。骨折和其併發症是骨質疏鬆症的臨床現象，大部分發生於髖部（股骨）、脊椎及手腕部，而髖部骨折是很嚴重的疾病，約有 5%~20% 的髖部骨折的病人會在 1 年內死亡，約有 50% 存活的病

人將可能不良於行，有些人更因此造成永久的行動不便。脊椎骨的骨折則會造成明顯的疼痛、畸形及長期的衰弱。

而骨質疏鬆症的一般分類方法，可分為原發性與次發性骨質疏鬆症兩類。在這分類法中，又將原發性骨質疏鬆症更細分為自發性骨質疏鬆症（包括自發性幼年型與自發性青年成人型之罕見骨質疏鬆症）和退化性骨質疏鬆症。其中，大部份屬退化性骨質疏鬆症，主要因年齡增加導致。次發性骨質疏鬆症的部份成因包括：生殖腺官能不足、甲狀腺、副甲狀腺機能亢進症、吸收不良症後群、類風濕性關節炎、結締組織疾病、癌症等發生成因²²。

其中骨質疏鬆症的高危險群可歸類於下列幾項，(1) 東方人及白種人、老年人，(2) 更年期後婦女、或是切除卵巢的婦女，(3) 骨架瘦薄、細小者，(4) 吸煙、飲酒過量、咖啡或茶過量者，(5) 月經來得早、飲食偏高蛋白者，(6) 功能喪失，提早停經的婦女，(7) 鈣質、維生素 D 攝取不足者，(8) 長期臥床、缺乏運動者，(9) 長期服用某些藥物，如類固醇、利尿劑、抗凝血劑、抗癲癇藥物等，(10) 患有肝病、腎病、糖尿病、腎結石、高血鈣、甲狀腺機能亢進、副甲狀腺機能過盛、風濕性關節炎、僵直性脊椎炎者。



圖 1. 正常脊椎與骨質疏鬆脊椎圖

2-1-2 測量骨質密度的方式

骨質疏鬆症的檢測方法，傳統上我們是以測量骨質密度(BMD)為主，而測量骨質密度的方法所使用的儀器設備可分為游離輻射性及非游離輻射設備兩大類²³。屬於游離輻射的方法有：單光子的核子吸收儀(SPA；Single Photon Absorptiometry)、雙光子的核子吸收儀(DPA；Dual Photon Absorptiometry)、放射線骨密度量測法(RA；Radiographic Absorptiometry 或稱Radiographic Densitometry)、單能量的X光吸收儀(SXA；single Energy X-ray Absorptiometry)、雙能量X光吸收儀(DXA 或DEXA；Dual Energy X-ray Absorptiometry)與週邊組織量測式雙能量的X光吸收儀(pDXA；Peripheral Dual Energy X-ray Absorptiometry)。

而屬於非游離輻射的方法有：定量電腦斷層骨質測定儀(QCT；Quantitative Computed Tomography)及末梢骨定量CT(pQCT；Peripheral Quantitative Computed Tomography)、定量的骨質超音波測定儀(QUS；

Quantitative Ultrasound)、骨活檢：是通過手術方法切取骨骼，在顯微鏡下觀察並進行定量分析與檢查血液和尿液的鈣與磷濃度。但其缺點為只能測定身體中固定的一、兩處部位，一般要經過長期的骨質流失，骨質密度才有明顯變化，約經一、二年的流失才可測出。此時的量測就可能無法反映真實狀。這種傳統方法不能用於骨質疏鬆症的預估及短時間內療效的多次評估。

2-1-3 骨代謝生化指標之測定

骨骼代謝異常是骨質疏鬆症、軟骨症等常見骨病的基本致病機轉。骨骼代謝的參數，即所謂的血清或尿液中的骨代謝指標(bone markers, 或 bone turnover markers)在臨床上之應用日漸廣泛。骨骼代謝指標之種類可分為骨質生成生化指標與骨質再吸收生化指標兩種^{12、24}。

人體中骨質生成的生化指標 (bone formation marker) 包括下列各項：

(1) 血清中鹼性磷酸酶 (serum total and bone specific alkaline phosphase, BSAP)：血液中的 Alk-P 可來自造骨、肝臟、腸道、腎臟、和胎盤等細胞，故測量血清鹼性磷酸酶來評估骨質之代謝情形較不理想，BSAP 為造骨細胞所含有並大量存在於造骨細胞表面，是一種對骨骼具有專一性之醣蛋白，正常情況下，血清中 BSPA 佔血清總 Alk-P 濃度之 30%~60%，其功能可能與骨骼的礦化有關，故可作為較準確的骨質生成指標。(2) 血清中的骨鈣素 (serum osteocalcin)：骨鈣素是骨骼內非膠原蛋白中含量最多的一種，

亦稱 (bone gla protein, BGP)。由造骨細胞所合成，因在進入基質時部分片段被釋放入血液中，故可作為一種骨質生成的指標。(3) 血清中第一型前膠原延長胜肽 (procollagen I extension peptides)：第一型前膠原蛋白之碳及氮端原胜肽 (procollagen carboxy-terminal propeptide, PICP, procollagen amino-terminal carboxy propeptide, PINP) 骨骼的有機基質中，約有 90% 為膠原蛋白(collagen)，而膠原蛋白有 97% 為第一型膠原蛋白，在第一型前膠原帶白 (procollogen) 合成後埋入基質前 C 和 N 端 propeptide (原胜肽) 會被切掉，故測量骨骼中第一型前膠原蛋白被分解時的最終產物 PICP, PINP 可作為骨質生成之指標。(4) 氮及碳末端胜肽 (N-telopeptide, NTx; C-telopeptide, CTx)：NTx 和 CTx 是骨骼中第一型膠原蛋白之 α 多胜肽氮末端及碳末端結構，分解後的最終產物，故 NTx 及 CTx 可作為骨質分解指標。這項骨質生成指標也是目前較具有特異性的生化指標之一，由於第一型膠原質 (type I collagen) 是骨骼細胞合成的主要膠原質類型，在骨骼的組成物質中佔 90% 以上。NTx 是骨骼中第一型膠原質被降解後所產生的代謝物，在人體中不會被進一步代謝，因此 NTx 的含量應用在監控骨質吸收的情形上為具有高特異性的生化指標。

人體中骨質再吸收生化指標 (bone resorption markers) 包括下列各項：

(1) 空腹時尿液中的鈣量和羥基脯胺酸 (fasting urinary calcium and hydroxyproline)，(2) 尿液中的羥基離胺酸配糖 (urinary hydroxylysine)

glycoside)。(3) 血漿中的耐酒石酸之酸性磷酸酵素 (plasma tart rate-resistant acid phosphatase, TRAP)：TRAP 是一種溶小體的酵素，主要存在於骨骼、前列腺、血小板、紅血球、及脾臟內，故欠專一性，需待特異性 TRAP 測量法以作為骨骼的專一代謝指標。(4) 尿液中所排泄的膠原 pyridinium 交叉連結物 (urinary excretion of the collagen pyridinium crosslink)。膠原 pyridium 交叉連結物：比林二酚胺(pyridinoline, Pyd)和去氧比林二酚胺 (deoxypyridinoline, Dpd) 為膠原蛋白的三股 α 多勝肽鏈上的 lysine 及 hydrolysine 之共價鍵結之環狀結構。當這些組織被代謝時，Pyd 和 Dpd 均為最終產物釋放入血液中經腎臟清除，故可作為骨質分解指標。

2-2 固相勝肽合成法 (solid-phase peptide synthesis ; SPPS)

2-2-1 SPPS 技術起源

1959 年，美國紐約洛克斐勒大學的梅里菲爾德 (Robert B. Merrifield) 提出了新的構想：若利用共價鍵結合的方式，將所要合成的勝肽連接在固體小珠粒上，這樣就可以只用簡單的過濾方式來沖洗去除過剩的反應物及副產物，而不需要額外進行分離純化的操作，而且合成出來連接在固體小珠粒上的勝肽在清洗純化的過程中不會有所損失，如此更可以達到自動化合成的目標，稱為「固相勝肽合成法」。至於反應所需的固體小珠粒材料，則由聚苯乙烯(polystyrene)加以化學修飾，使其末端帶有氯甲基，以便和第

一個胺基酸的羧基發生反應而形成共價鍵結，藉此固著在小珠粒上。一旦勝肽的合成反應結束，可以藉氫氟酸將整段合成的勝肽從聚苯乙烯的小珠粒直接切下而獲得產物²⁵。

2-2-2 SPPS合成原理

本實驗所利用的合成法為固相勝肽合成技術，並應用 Fmoc Chemistry 進行固相勝肽合成²⁶。利用樹脂 (resin) 做為固相支撐物，本實驗做為固相支撐物是採用 PAL-resin [5-(4'-Fmoc-aminomethyl-3',5'-dimethoxyphenoxy)-valeric acid-MBHA (methylbenzhydrylamine) resin]，當做起始胺基酸之固著物。首先將PAL-resin上之含有鹼性不穩定的保護基 (9-fluorenylmethyl oxycarbonyl, Fmoc-protecting group)，去保護基後活化 (activation)，樹脂的N端與活化後胺基酸的C端形成勝肽鍵 (peptide bond) 而固著於樹脂上，便完成了羧酸端 (-COOH) 第一個胺基酸。Fmoc-protecting group 所扮演的角色是胺基酸的 N^α-保護基 (N^α-protection)。在移除第一個胺基酸的N端保護基後，使用偶合試劑 (coupling reagents)，下一個被保護的胺基酸才被加入。重覆上述步驟便產生勝肽鍵，依序接上所有組成之胺基酸，其胺基酸之C端被固著在此樹脂上。最後並利用化學裂解方法 (chemical cleavage) 將勝肽從樹脂上分離，裂解的程序說明可參照圖2。在切除掉所有胺基酸上支鏈的保護基團後，即可完成勝肽粗產物²⁷。而合成不同序列之勝肽鍵，所選用之裂解試劑也不儘相同²⁸。其裂解試劑的組成整理於表1。

表 1. Cleavage mixtures (for 0.1 ~0.5 g peptide resin)

Mixture A	Mixture B	Mixture C
0.5 mL D.D. water 9.5 mL TFA ^a	0.25 mL EDT ^b 0.5 mL thioanosole 0.5 mL D.D. water 10 mL TFA ^a	0.25 mL EDT ^b 0.25 mL D.D. water 9.5 mL TFA ^a

a. TFA (trifluoroethanoic acid , CF₃COOH)

b. EDT (ethanedithiol)

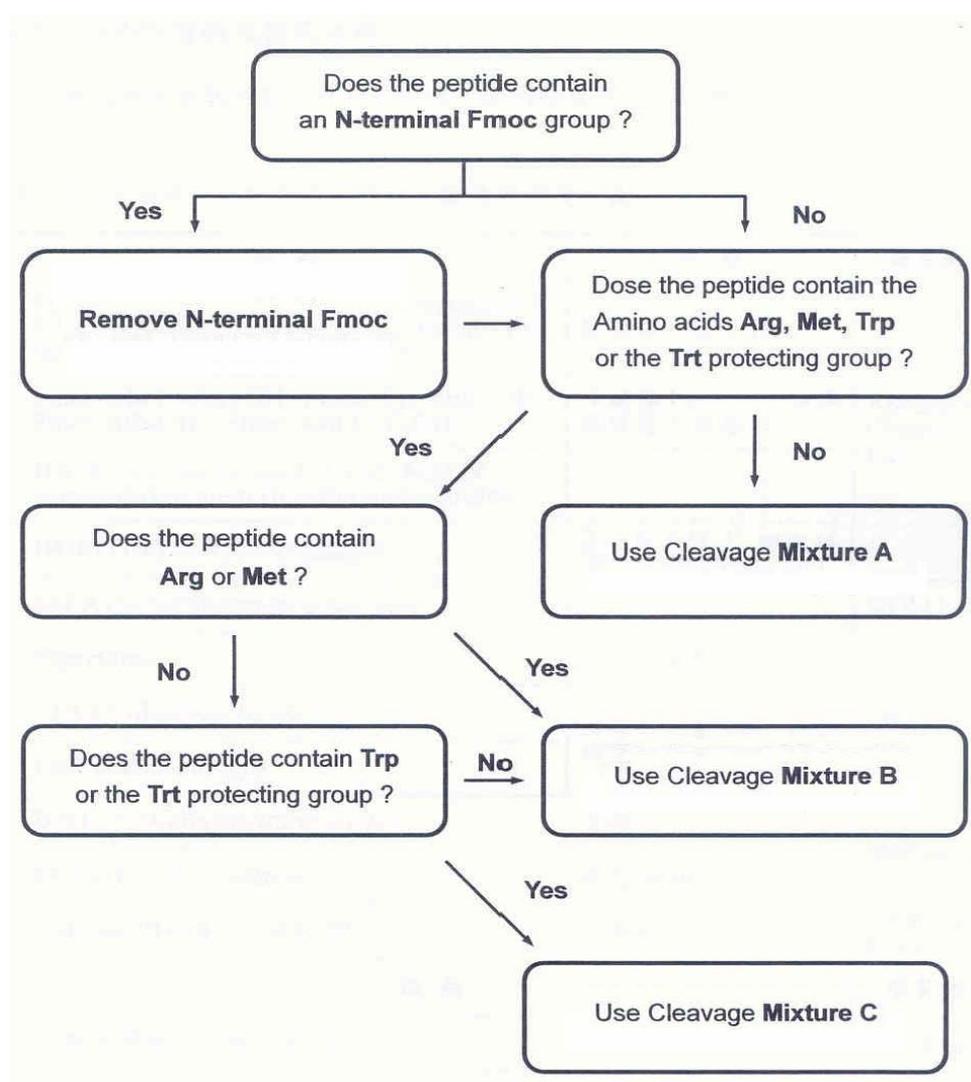


圖 2. Fmoc Cleavage Flow Chart。

2-2-3 SPPS 反應試劑說明與作用

I. 耦合試劑 (coupling reagent)

胺基酸之 C^α 上 (amino acid C^α) 的COOH官能基需要被HBTU

(O-benzo-triazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate ; 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)、HOBt (1-hydroxybenzotriazole , anhydrous) 與 DIEA (N,N-Diisopropylethylamine) 等類之化學反應試劑，激發活化而呈現強烈拉電子力量，再與 C^α 的NH形成胜肽鍵 (peptide bond)。HBTU與HOBt常廣泛被應用於固相胜肽合成，做為胜肽合成的耦合試劑，可提高反應產率與縮短反應時間，並抑制外消旋化 (racemization) 的發生。

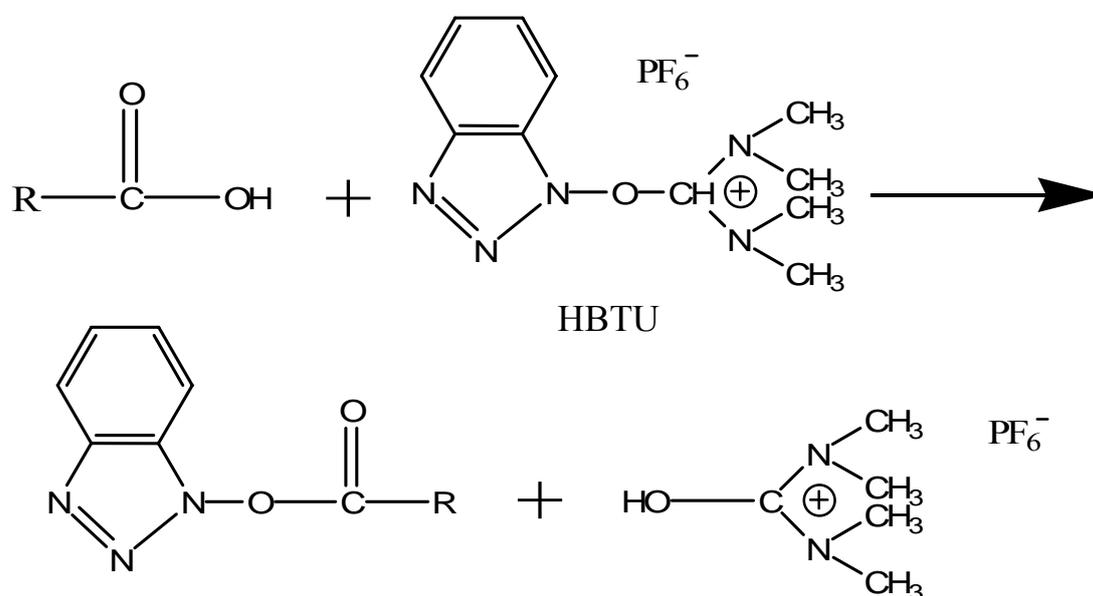


圖 3. COOH 基團被 HBTU 激發活化，形成強烈缺電子基團。

II. 去保護基試劑 (deprotecting reagent)

PAL-resin 的NH₂端及胺基酸之C上的NH₂都有Fmoc保護基團，而加入 20% (v/v) piperidine in DMF的作用是為了在適當時機把Fmoc從PAL-resin與胺基酸的N端上切下以形成free的NH₂官能基以進行接續步驟肽鍵的形成。圖 4. Fmoc- glycine 的C^α-N端上的Fmoc與piperidine反應流程圖。

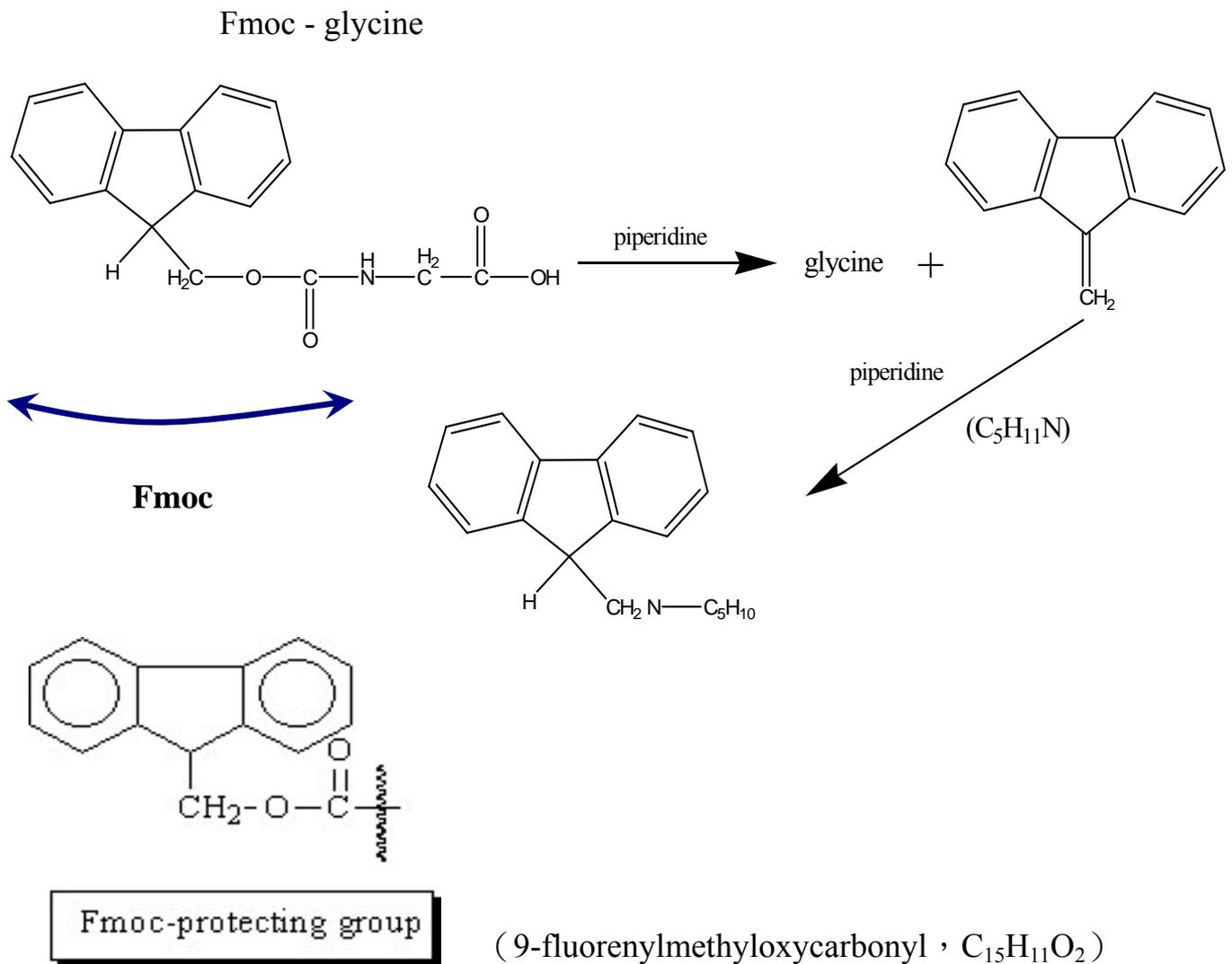


圖 4. Fmoc- glycine 的C^α-N端上的Fmoc與piperidine反應流程圖。

III. 裂解試劑 (cleavage reagent)

當直鏈胜肽依序合成接好後，需要使用裂解試劑把胜肽從 PAL-resin 上切下，並同時切下胺基酸上的支鏈（side chain）保護基團，以得到胜肽粗產物⁴⁶。

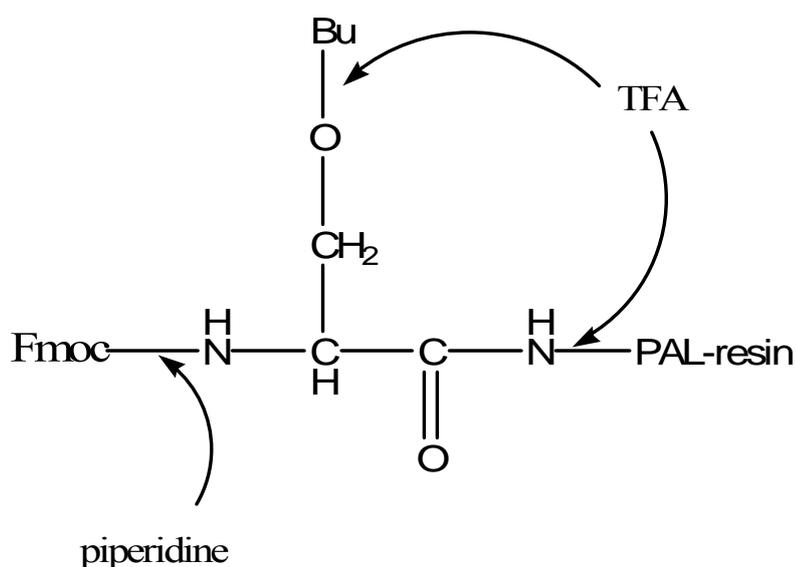


圖 5. Chemical cleavage reagent 對 PAL-resin 及保護基團的作用處。

2-2-4 設計概念

首先以NTx(N-telopeptide)為標的物，我們根據 NTx 之胺基酸序列設計10段包含有16個胺基酸序列的線狀胜肽，其中第一段設計的胜肽序列與次一段胜肽序列會有6個胺基酸重疊（overlap），因此所設計的每一條線狀胜肽的前6個與後6個胺基酸都分別與前一條和後一條線狀胜肽具有6個胺基酸重複序列。N-telopeptide 的胺基酸序列如圖6所示。

NH₂-Gln-Tyr-Asp-Gly-Lys-Gly-Val-Gly-Leu-Gly-Pro-Gly-Pro-Met-Gly-Leu-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-

Pro-Pro-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Gln-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Lys-Ala-Gly-Glu-Asp-Gly-His-Pro-Gly-Lys-Pro-Gly-Arg-Pro-Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Arg-Gly-Phe-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Leu-Pro-Gly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-His-Asn-Gly-Leu-COOH

圖6. N-telopeptide 的胺基酸序列。

此設計乃依據epitope (抗原決定基) mapping 之原則，避免在尋找抗原決定基時可能遺漏掉特定且重要的序列，因此我們設計一系列彼此具有重複性胺基酸序列的線狀胜肽以結構影響其與抗體之作用。10段經由設計的胜肽其胺基酸序列整理於表2。

表2. 依據epitope mapping 原則設計的胜肽之胺基酸序列

N-telopeptide Amino acid sequence (epitope mapping)																
Peptide number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	Gln-(Q)	Tyr-(Y)	Asp-(D)	Gly-(G)	Lys-(K)	Gly-(G)	Val-(V)	Gly-(G)	Leu-(L)	Gly-(G)	Pro-(P)	Gly-(G)	Pro-(P)	Met-(M)	Gly-(G)	Leu-(L)
2	Pro-(P)	Gly-(G)	Pro-(P)	Met-(M)	Gly-(G)	Leu-(L)	Met-(M)	Gly-(G)	Pro-(P)	Arg-(R)	Gly-(G)	Pro-(P)	Pro-(P)	Gly-(G)	Ala-(A)	Ala-(A)
3	Gly-(G)	Pro-(P)	Pro-(P)	Gly-(G)	Ala-(A)	Ala-(A)	Gly-(G)	Ala-(A)	Pro-(P)	Gly-(G)	Pro-(P)	Gln-(Q)	Gly-(G)	Phe-(F)	Gln-(Q)	Gly-(G)
4	Pro-(P)	Gln-(Q)	Gly-(G)	Phe-(F)	Gln-(Q)	Gly-(G)	Pro-(P)	Ala-(A)	Gly-(G)	Glu-(E)	Pro-(P)	Gly-(G)	Glu-(E)	Pro-(P)	Gly-(G)	Gln-(Q)
5	Pro-(P)	Gly-(G)	Glu-(E)	Pro-(P)	Gly-(G)	Gln-(Q)	Thr-(T)	Gly-(G)	Pro-(P)	Ala-(A)	Gly-(G)	Ala-(A)	Arg-(R)	Gly-(G)	Pro-(P)	Ala-(A)
6	Gly-(G)	Ala-(A)	Arg-(R)	Gly-(G)	Pro-(P)	Ala-(A)	Gly-(G)	Pro-(P)	Pro-(P)	Gly-(G)	Lys-(K)	Ala-(A)	Gly-(G)	Glu-(E)	Asp-(D)	Gly-(G)
7	Lys-(K)	Ala-(A)	Gly-(G)	Glu-(E)	Asp-(D)	Gly-(G)	His-(H)	Pro-(P)	Gly-(G)	Lys-(K)	Pro-(P)	Gly-(G)	Arg-(R)	Pro-(P)	Gly-(G)	Glu-(E)
8	Pro-(P)	Gly-(G)	Arg-(R)	Pro-(P)	Gly-(G)	Glu-(E)	Arg-(R)	Gly-(G)	Val-(V)	Val-(V)	Gly-(G)	Pro-(P)	Gln-(Q)	Gly-(G)	Ala-(A)	Arg-(R)
9	Gly-(G)	Pro-(P)	Gln-(Q)	Gly-(G)	Ala-(A)	Arg-(R)	Gly-(G)	Phe-(F)	Pro-(P)	Gly-(G)	Thr-(T)	Pro-(P)	Gly-(G)	Leu-(L)	Pro-(P)	Gly-(G)
10	Thr-(T)	Pro-(P)	Gly-(G)	Leu-(L)	Pro-(P)	Gly-(G)	Phe-(F)	Lys-(K)	Gly-(G)	Ile-(I)	Arg-(R)	Gly-(G)	His-(H)	Asn-(N)	Gly-(G)	Leu-(L)

2-2-5 環狀胜肽 (cyclic peptide) 類似物之設計

環狀胜肽類似物的設計是以本實驗室在骨質疏鬆症相關研究方面上，我們成功地應用表面膜漿共振技術與酵素連結免疫吸附分析方法所建立之實驗流程，探討特定抗體(anti-NTx)與抗原(NTx 及NTx peptide fragments)間之交互作用情形，其中所設計的 10 段線性胜肽片斷中，peptide 1、2 和 3 線狀胜肽是被檢測分析出與抗體(anti-NTx)較具有親和效力^{16、17}。我們以這些線狀胜肽胺基酸之序列為藍本，設計一系列之環狀胜肽類似物，以檢測胜肽構形的變化與Anti-NTx抗體間交互作用的情況，並探討線狀與環狀胜肽在動力學上的特性，比較線狀及環狀胜肽與抗體間親和力的大小。

由於雙硫鍵的環狀結構可能會因為生物活性測試時，buffer中之某些還原劑如DTT的還原作用而轉變成線狀結構，失去其具有的結合效力之結構²⁹，導致與抗體間失去其親和效力。因此，環狀胜肽類似物的設計原理為去除胜肽N端之Fmoc，並在C端加入具有-SH支鏈之胺基酸Cys，以進行分子內環化之反應，形成環狀胜肽。

2-3 高效能液相層析

高效能液相層析法(high performance liquid chromatography，簡稱HPLC)適用於半揮發性和非揮發性化合物或遇熱易被裂解的待測物，應用此方法進行分析的先決條件是標的待測物(欲分離之合成胜肽)必須溶於作為移動相的溶劑中；由於移動相的溶劑是在加壓狀況下輸送，所以最初

是被稱為高壓液相層析(high pressure liquid chromatography)。高效能液相層析分析的原理係藉移動相通過固定相達到分離的效果；混合物中的各成份在固定相和移動相之間的分配係數 (partition coefficient) 不相同(即親和力不同)，使其在管柱中的滯留時間不相同而得以分離出來。若化合物與固定相親和力較強，則沖提較慢(即滯留時間長)，而化合物與移動相的親和力較強，則沖提較快(即滯留時間短)，依此原理將樣品中的標的待測物與共萃取出來的干擾物分離的方法。

2-3-1 RP-HPLC 的原理與應用

逆(反)相高效液相色譜層析法 (RP-HPLC)，是一種能將蛋白質和 peptides 依其極性大小加以分離的方法。原理是利用蛋白質樣本各個成份，藉由移動相(mobile phase)攜帶通過帶有非極性官能基之固定相(stationary phase)，透過蛋白質在非極性固定相之間不同的疏水性之交互作用，而達到分離的效果。其固定相管柱表面的填充材質為低至中極性的物質，通常是鍵結很強的非極性官能基團，如由C4、C8、C18 所組成的長烷鏈、苯環與近來常用的填充物質silica gel。其所適用之pH 值範圍為2~8。而移動相沖提液則是極性強度偏中等的溶劑，如乙腈(氫甲烷)、甲醇等與水所組成的混合物。RP-HPLC之分離機制係利用蛋白質與固定相之間相互疏水作用力(hydrophobic interaction)不同，使樣本於層析管柱之滯留時間不同而分離出來的，極性最大的物質與管柱填充物表面間作用力最小，故最

早被沖提出；反之，極性越小的物質與管柱填充物表面間作用力越強，故越晚被沖提出。

RP-HPLC 分析法之優點有：(1) 分離效率高：RP-HPLC 藉由改變沖提液參數，包括沖提液之pH、有機溶劑之極性等，可大大提高分離效率，獲得較高之解析能力(resolution)。(2) 應用範圍廣：由於乙腈-水系統為RP-HPLC 常用緩衝移動相，而且乙腈相較於其他有機溶劑具有令人滿意的特性，如低紫外光密度(low ultraviolet strength)、低溶氧度(low oxygen solubility)和沖提强度高(elution strength)等，使RP-HPLC 分離純化蛋白質中具有很高分辨與解析能力；再者，RP-HPLC 在蛋白質與peptides 的分離上，相對於其他的層析分離方法，為一具有快速和高回收率之蛋白質分離方法。

因此RP-HPLC 常被選用為蛋白質或peptides 和諸多生物物質的分離或純化步驟中的最後一階段。其應用範圍廣泛，包括可應用於生化、製藥、食品、工業化學品、環境污染物及臨床醫學等。另一方面，Analytical RP-HPLC 的分析結果也提供了製備級(preparative)的RP-HPLC 相當多有用的結果與資訊，使製備級的RP-HPLC 在下游生化工業之蛋白質分離純化技術中，成為相當重要的工具。RP-HPLC 也由於具有高解析與分辨能力的優點，常是純化製程中重要的核心步驟。

2-4 質譜儀 (Mass)

質譜儀具有樣品少、操作時間短、靈敏度高、精確性佳的特性，是現代分析技術中不可或缺的工具；由於分子在游離過程中有斷裂產生，這些斷裂碎片在未知物的鑑定上，扮演很重要的角色。

質譜儀的主要原理是將化合物變成帶電荷的離子後，將其導入質量分析器，在磁場和電場中，不同荷質比 (mass to charge ratio; m/z) 的粒子具有不同之運動軌跡來區分離子質量，而得到該分析物的圖譜。質譜儀的基本流程：樣品從入口系統 (inlet) 注入後，直接抵達離子化室 (ion source) 而被游離化，離子化後的分子離子被加速通入質量分析器 (mass analyzer) 由於其荷質比 (m/z) 的不同而得以分離，再以偵測器偵測得之。

以下就本實驗所用的質譜儀類型，離子化方式及研究方法作一簡單介紹⁴⁵：

2-4-1 電灑游離法 (Electrospray Ionization, ESI)

利用毛細管尖端施以一高壓電使溶劑分裂成小液滴，稱之為電灑現象。電灑游離介面的基本元件，主要包含接高壓電的電灑毛細管、逆電極、網杓電極 (或杓漏電極) 以及質量分析器，電灑毛細管到質量分析器間產生不同的真空度與電壓梯度，當液體表面累積過多的正電荷後，表面被拉出往低電場方向，形成液體錐 (liquid cone)，使得霧化帶電液滴朝高真空、負電極區移動，最終到達質量分析器。

電灑游離法具有高靈敏度、低偵測極限、樣品量少、易製備以及快速

分析等優點，可以與液相層析儀（liquid chromatography）或毛細管電泳（capillary electrophoresis）相連接，尤其可串聯四極矩（quadropole）、時間飛行式（time of flight）、離子阱（ion trap）、傅立葉轉換式（fourier transform）及磁場式（magnetic sector）質譜，更大大的擴展其應用性，提高分析的效能^{42、43、44}。

2-4-2 四極質譜儀原理

四極質譜儀是使用四支平行的金屬棒，相對兩根金屬棒連接起來，其中一對接到直流電源正端，另一對接到負端，而且以一相位差 180° 之無線電頻率（radio frequency voltage）之交流電壓加到這兩對金屬棒上，改變直流及交流電壓，使得在某一電壓下只允許一種荷質比的離子通過，達到質量分離的效果。不同質量的離子依序通過而被偵測。

2-5 紫外光-可見光光譜

2-5-1 Beer's law

介紹之前，我們先說明溶液對幅射之吸收現象。任一種特定電磁幅射穿過一溶液時，溶液中若有對此特定電磁幅射吸收的溶質，則其電磁幅射的強度必將有衰退的現象發生。圖 7 為一電磁幅射為 P_0 ，穿越一路徑為 b 而濃度為 C 的溶液後，其幅射能量強度衰減為 P 之假想情況。

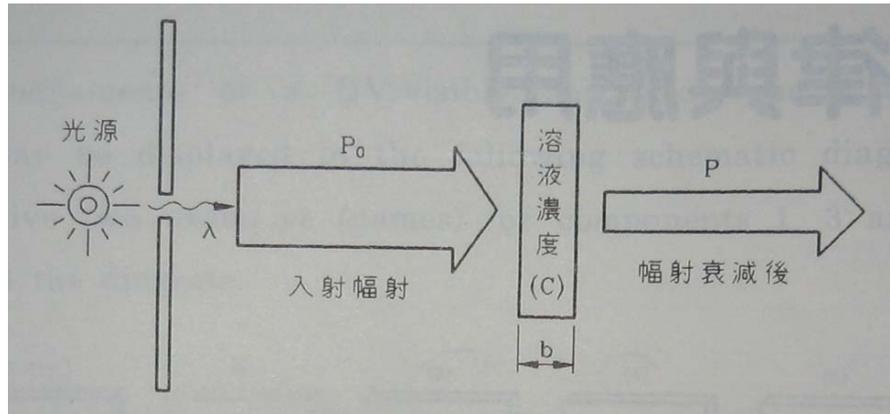


圖 7. 一幅射能量經過吸收溶液後的衰退現象

由圖 7 溶液對電磁輻射的吸收現象，定義透光度 T (transmittance) 為輻射起始功率 P_0 和穿透溶液後 P 的比值，亦即 $T = P/P_0$ ， T 的單位常以百分比 (%) 表示。吸收度 A (Absorbance) 乃表示輻射能量被溶質的吸收程度，和透光度 T 的關係則以負對數表示 ($A = \log T$)，吸收度和電磁輻射能量的關係，則可以 $A = -\log P/P_0 = \log P_0/P$ 表示，並可知吸收度與穿透率相反，溶液的吸收度隨對光束的衰弱力而增加。而 Beer 根據這些原理導出對特定物質的關係式，亦即 $A = \epsilon bc$ ，稱為 Beer's law。 A 為溶液對輻射線的吸收度，與溶液的路徑寬度 b 以及濃度 c 成正比；其中 ϵ 為莫耳吸光係數 (molar absorptivity) 與物種的結構和特性有很密切的關係⁴⁷。

2-5-2 紫外光-可見光吸收光譜

紫外與可見光譜 (ultraviolet and visible spectroscopy) 是利用紫外與可見光和分子作用所產生的電子躍遷 (electronic transition) 的原理，來偵測分子的電子躍遷能量 (或頻率) 的技術。即分子處於基態時受電磁波擾動 (被激發)，

使得電子自能量較低(基態)的分子軌域躍遷到另一個能量較高(激發態)的分子軌域，而紫外光或可見光的吸收通常產生鍵結電子的激發作用；因此，吸收峰的波長與分析的物種有相關連，所以紫外與可見光吸收光譜可用於分子中官能基的鑑定與含有吸收官能基之化合物的定量測量。對紫外與可見光能夠產生吸收現象的物種，可分成下列三大類別 (1) 分子中含有 α 、 π 或 n 電子，(2) 原子或分子具有 d 或 f 電子軌域之過渡金屬，(3) 能產生分子內電荷轉移現象。在此，我們僅討論第一種電子躍遷類型。其中包含有四種躍遷型式： $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ， $n \rightarrow \sigma^*$ ， $n \rightarrow \pi^*$ ， $\pi \rightarrow \pi^*$ 。圖 8 即為分子的電子能階圖。本論文主要探討的胜肽物種因具有可提供 π 軌域之不飽和官能基 (peptide bond，醯胺鍵)，故屬於 $n \rightarrow \pi^*$ 的電子躍遷模式⁴⁸。

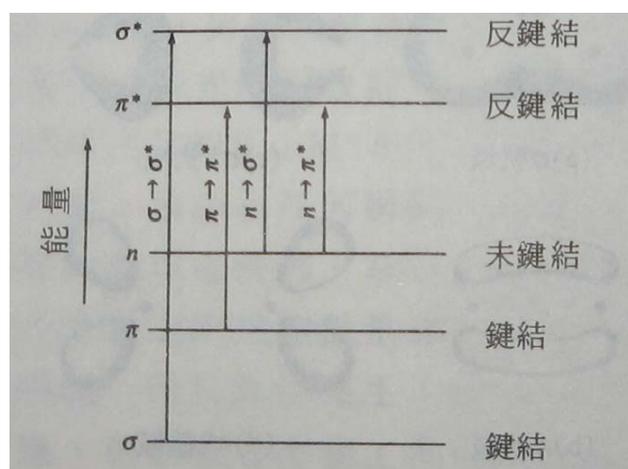


圖 8. 分子的電子能階圖

一般說來，紫外光-可見光譜儀的波長範圍指的是 $\lambda = 190 \sim 800 \text{ nm}$ ，而本論文所使用的紫外光-可見光譜儀 (HP 8453) 屬於多管道二極體列陣型光譜儀，其儀器組成元件如圖 9，波長範圍可達 $190 \sim 1100 \text{ nm}$ 。

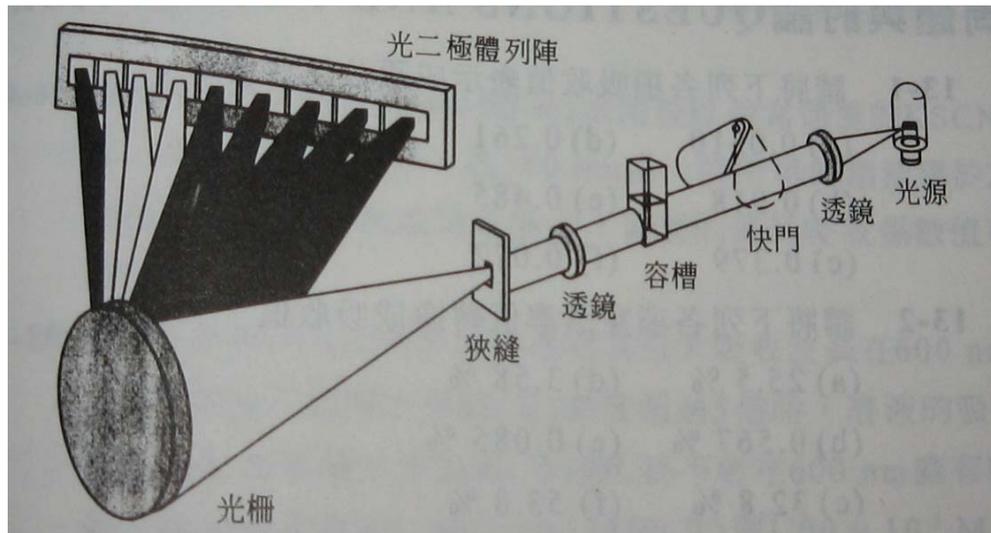


圖 9. 多管道二極體列陣型光譜儀之組成元件圖

2-5-3 動力學探討

酵素是生物體內催化各種生化反應、維持正常生理功能的重要物質。除了少部分RNA 具有酵素的功能外，酵素通常是蛋白質或蛋白質與金屬離子、蛋白質與輔酶(coenzyme)的複合體。能經由與酵素專一性結合進而催化各類反應的物質稱為受質(substrate)，受質與酵素接合後在酵素上發生反應的區域(domain)稱為活性位置(active site)。酵素的功​​能與其構型(conformation)有關，亦與其活性位置上的胺基酸殘基(residue)有關，其反應速率和親和力大小則可由動力學的理论得知⁴⁹。本論文在此討論NTx線狀與環狀胜肽與Anti-NTx抗體進行結合時，構形與親和性的關係。最後將由動力學的觀點探討線狀與環狀胜肽跟抗體間的結合速率和親和力。



這是酵素跟受質行結合反應生成產物的反應式：E 是enzyme 酵素，S 是 substrate 受質，ES 是酵素受質複合體，P 是產物product。

受質濃度的高低變化時，會影響酵素反應速率的表現行為：當[S]低於某值時，Vo會隨著[S]增大而增大，當[S]高於某值時，Vo卻不會隨著[S]的增減而變化，這是因為當[S]低於某值時，酵素依然有足夠的數目可以跟受質結合，一但有了ES就可以讓反應發生；而當[S]使得E不足以和S結合時，反應就不會發生，速率就保持一定；在所有的E都結合成ES狀態時，此時是一定量的酵素所能催化的最高反應速率。

影響酵素反應速率的關鍵因子是基質的濃度[S]⁴⁰。我們利用 Lineweaver-Burk equation 又稱為double-reciprocal plot，可用來定性及確認受質與酵素間親和力大小。此時曲線為直線關係，與y軸相交可得1/Vmax，與x軸相交可得-1/Km。

$$\frac{1}{V} = \left\{ \frac{K_m}{V_{\max}} \right\} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \begin{array}{l} \text{Lineweaver-Burk equation 或} \\ \text{double-reciprocal 作圖法} \end{array}$$

Km 是酵素與基質間親和力的指標，Km 越大親和力越小。若酵素的 Km 越低，則表示它要接近 Vmax 所需的基質濃度越低。若某一酵素有數種基質，各有不同的 Km，則 Km 越低的基質，表示它與酵素的親和力越

大，催化反應愈容易進行。 K_m 與 $[S]$ 之單位一樣是濃度(mM 或 μM)。在足夠的基質濃度下，一定量的酵素所能催化的最高反應速率，即為其 V_{max} ；要讓一個酵素達致其 V_{max} ，就要把基質量調至飽和濃度^{38、39、40}。當一化合物和受質競爭游離的酵素之活化位置時，酵素會和ES複合物活化位置以外之位置接合，而發生抑制作用，或者和游離的酵素之活化位置以外的位置接合。抑制作用可分為三大類型，包括競爭型、不競爭型與非競爭型。本篇論文探討的anti-NTx與設計之胜肽所進行結合的類型，屬於不競爭型抑制反應，當加入更多的胜肽樣品到結合反應中，結果增加反應之速率，但是無法到達無抑制反應觀察到的程度⁴⁹。圖10為不競爭型抑制反應，在 $1/V$ 對 $1/[S]$ 的圖中，存在不同濃度的抑制劑，在垂直軸及水平軸皆無交於相同點上。

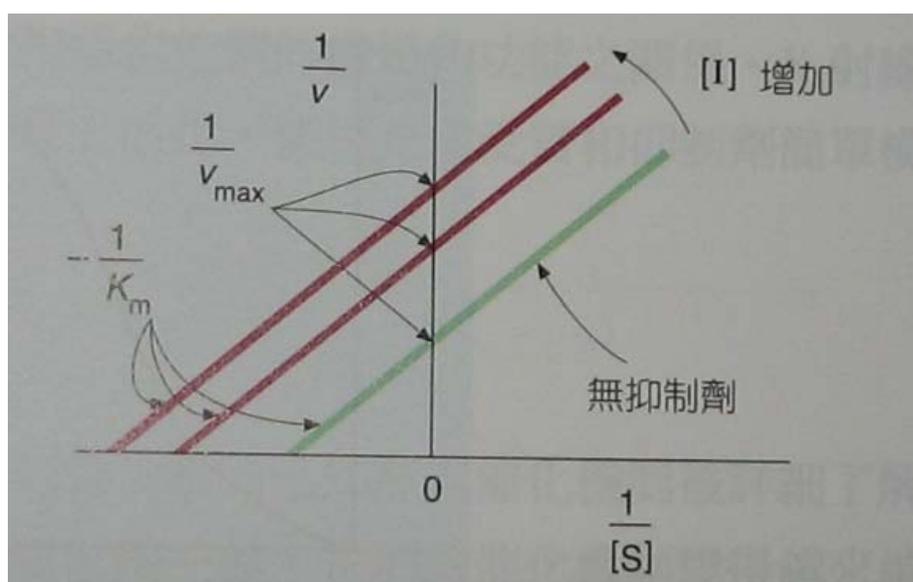


圖10. 酵素之動力分析：不競爭型抑制反應

2-6 生物感測器(Biosensor)

2-6-1 生物感測器之簡介

所謂生物感測器為使用固定化的生物分子(immobilized biomolecules)結合換能器(transducer)，用來偵測生物體內或體外的環境化學物質或與之特異性交互作用後產生回應的一種裝置，構成生物感測器關鍵技術得兩個主要元件為生物辨認分子與物理換能器二者所組成⁵⁰：

(1) Biologically-sensitive materials (負責辨識結合或進行反應的生物分子辨識元件)：生物感測器利用此部份和待測物(analyte)直接接觸而產生反應，為信號接收與產生的部份，因此，在選擇生物分子時可針對與待測物的專一性(specificity)來增加感測器的選擇性(selectivity)及靈敏度(sensitivity)。一般的生物分子大多利用生體組織、細胞受體、微生物、酵素、抗原、抗體等與待測物反應，以達到偵測的目的。例如：免疫感測器(immunobiosensor)是以抗體或抗原作為固定化的生物分子，再選擇適當的方法將其固定於感測器表面。(2) Physical-chemical transducer (負責將生物分子反應後產生的訊號，透過換能器作用轉變成電子、光、熱或頻率訊號)：此屬硬體儀器元件部份，主要為物理信號轉換元件，可將固定化的生物分子和待測物反應後之物理量或化學量的改變，轉換成電子訊號。因此，只要以生化方法分離、純化並設計合成特定的生物活性分子，再結合精確且回應快速的物理換能器，就可組合成生物感測器反應系統。如圖11所示。

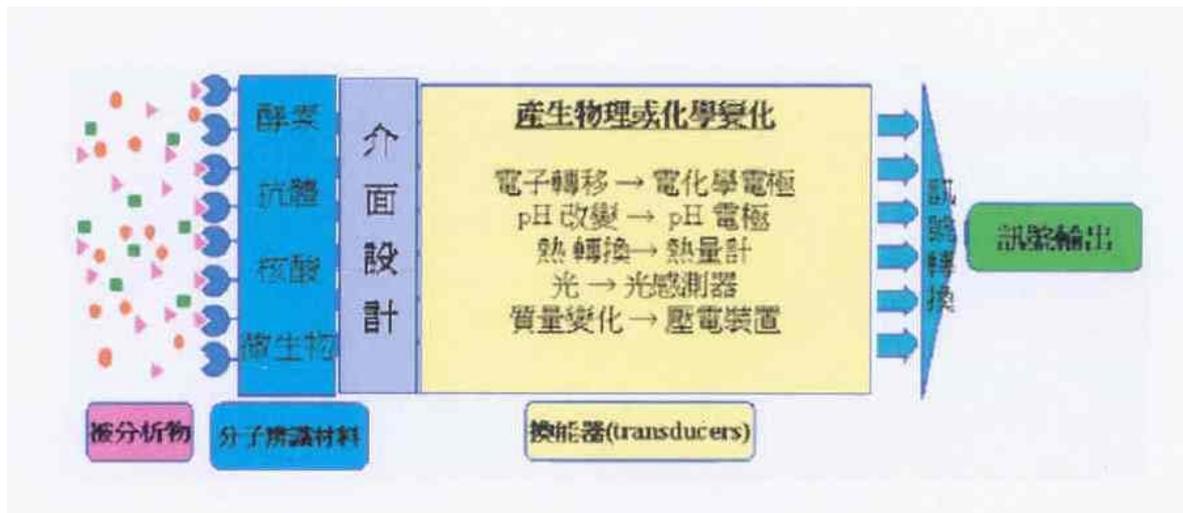


圖 11. 生物感測器組成之基本元件

此外，在欲發展一特定功能的生物感測器前，首先必須根據選用生物分子的特性、作用機制、信號產生/輸出模式、待測物濃度範圍、操作環境等參數做通盤性的考慮，再慎選適當的信號轉換器，亦即換能器。由於選用換能器的不同，生物感測器可依換能器之不同再細分成下列數項主要技術：電化學生物感器(electrochemical biosensor)技術、半導體離子感測器-離子選擇性場效型電晶體(ion selective field effect transistor；ISFET)、光學式生物感測器(optical biosensor)及壓電晶體生物感測器(piezoelectric quartz crystal biosensor)。本篇論文實驗中所使用之BIAcore-3000 生物感測器，即是屬於光學式生物感測器⁵²。

2-6-2 表面薄膜共振技術 (surface plasma resonance technology；SPR)

近年來，在光學生物感測器發展上有兩項極為熱門的關鍵技術，分別為漸逝波(Evanescent wave technology；EW)與表面薄膜共振(surface plasma

resonance technology ; SPR)技術。1991年瑞典商Pharmacia公司於研推出 BIAcore biosensor即是根據SPR所研發出的。BIA是英語 ”Biomolecular Interaction Analysis” 的縮寫，顧名思意此感測器可用於分析生物分子之間的相互作用的技術⁵¹。

2-6-3 BIAcore 儀器之架構

BIAcore生物分子相互作用分析系統是用在探測分子間相互作用的生物感測器，是一種以親和性(affinity)為主體的生物感應器，利用固定化的方式，選擇具有生物特異性的鍵合物(ligand)以共價結合的方式結合在感應晶片聚葡萄糖基質(dextran)的表面上，靠著系統緩衝流體的循環下，以控制流速將待測物注射到感應表面⁵⁵。當分析物與鍵合物有相互作用發生時，形成表面質量濃度的改變，進而影響入射光線折射率的變化，而SPR的光學反應也即時感應，並且表現於感應圖(sensorgram)上，上述這些反應必須依賴著三大主要的基本系統之運作：SPR之光學系統(surface plasmon resonance detection system)、感應晶片表面系統(sensor chip)及液體傳送之微射流系統(Microfluidic system: Intergrated Fluidic Cartridge; IFC)組成(如圖 12)。

(1) SPR 光學系統

光源由一兩極真空管發射出近紅外光，先通過玻璃稜鏡(glass prism)後才入射至金屬薄層。此玻璃稜鏡為具一特殊楔形(wedge-shaped)之耦合器

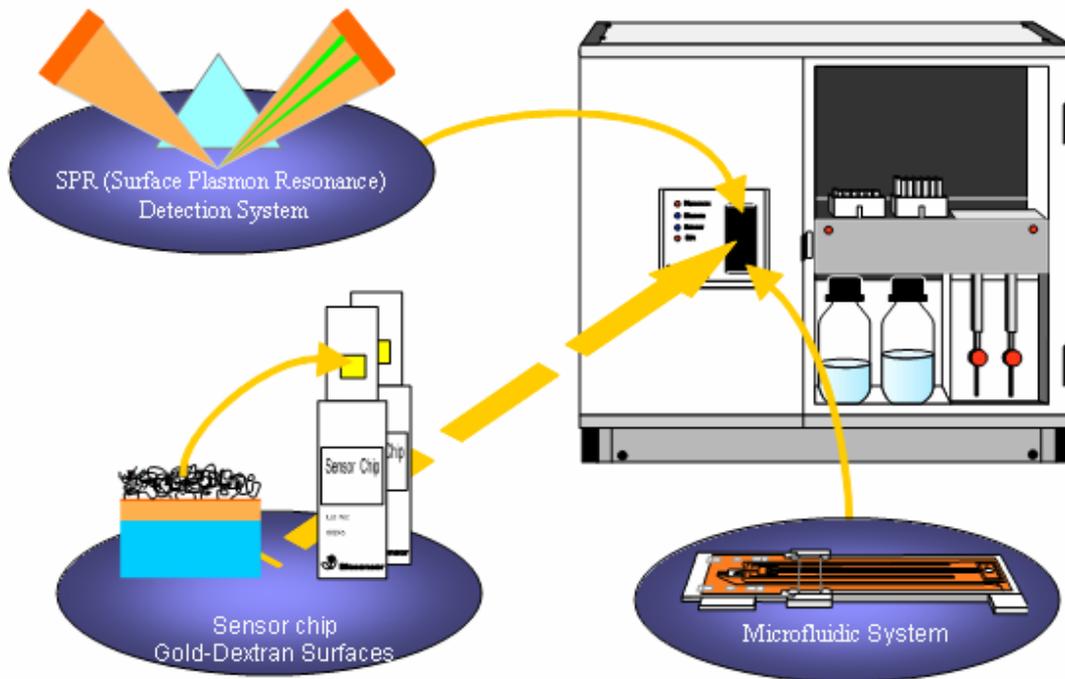


圖 12. The Corner Stones of Biacore Technology

(coupler)，可提供一定的入射角度，以便將光聚焦於金屬的表面膜漿，進而激發共振現象。此部份為訊號轉換元件，可將生物分子與待測物反應後，偵測到的折射係數變化轉換成共振角度的變化量。

(2) 感應晶片表面系統

感應晶片是 BIACore sensor 即時訊號的傳遞者，主要構造可分為四大部分：(如圖 13)。玻璃稜鏡層：為光之耦合器，可提供一定的入射角度，以便將光聚焦於金屬的表面膜漿，進而激發共振現象；金屬薄層：穩定性高且可產生最佳的 SPR 現象；連接層：經硫醇基之分子自我形成單層膜 (thiol-self assembled monolayer；thiol-SAMs)處理，方便固定不同官能基之

化合物至金屬薄層上；專一反應層：由羧甲基化葡聚糖(carboxymethyl dextran)所組成，提供生物分子固定基地及為生物反應提供親水環境。

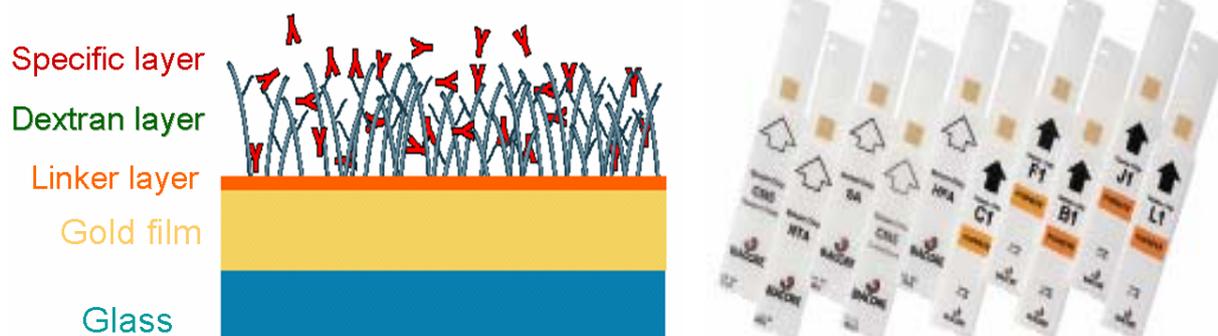


圖 13. BIAcore sensor 之感應晶片外觀與主要構造

(3) 液體傳送系統

液體傳送系統由幫浦(pump)及微射流卡夾(integrated fluidic cartridge；IFC)所組成。IFC 的表面具有精密且正確的凹槽及可活動的瓣膜，當其覆蓋於感應晶片表面時可形成微流道(Flow cell；Fc)，為緩衝溶液及待測溶液流經感測晶片表面之迴路。

2-6-4 BIAcore 儀器之原理

生物分子交互作用分析系統 (biomolecular interaction analysis, BIACORE) 其核心技術為表面膜漿共振技術 (surface plasmon resonance, SPR)，它是屬於光學生物感應器的一種技術。表面膜漿共振技術是一種光學現象。當一道偏極光進入感應片的玻璃稜鏡內，由光疏介質進入光密

介質，且入射角又大於臨界角時，入射光線會在密介質界面處全部反射回來，而無法穿越界面，此種現象即稱之為全反射(total internal reflection)。在折點處，會有部份光波穿出密介質，此穿出的光波即稱之為漸逝波(Evanescent wave)。BIAcore biosensor即是利用此光學特性，於感測晶片表面之金屬薄層上提供一道光束，當光束經由稜鏡耦合到達金屬薄層界面時，即會產生全反射及漸逝波。此時，金屬薄層內的金屬原子會受到漸逝波的激發，由原本高密度均勻分佈的狀態，形成不均勻的密度分佈，進而產生共振現象⁵³，此種因光能傳遞至金屬的過程所產生的共振現象即稱之為表面膜漿共振(SPR)。當光反射之後，在特定之反射角度會引起反射角度的急劇變化並被偵測器鎖定，而所得到的角度即為反射角，又稱為共振角度(resonance angle)。共振角會隨著金屬薄層鄰近的介質(非光束照射面，即反應層介質)之折射率(refractive index)不同而有所變化。當鄰近介質因組成、濃度或成份改變時，會使光的折射率發生變化，共振角度也會跟著改變(如圖14)。BIAcore biosensor主要便是藉由測量感測晶片表面的折射係數變化，來偵測生物分子間的反應⁵⁴。

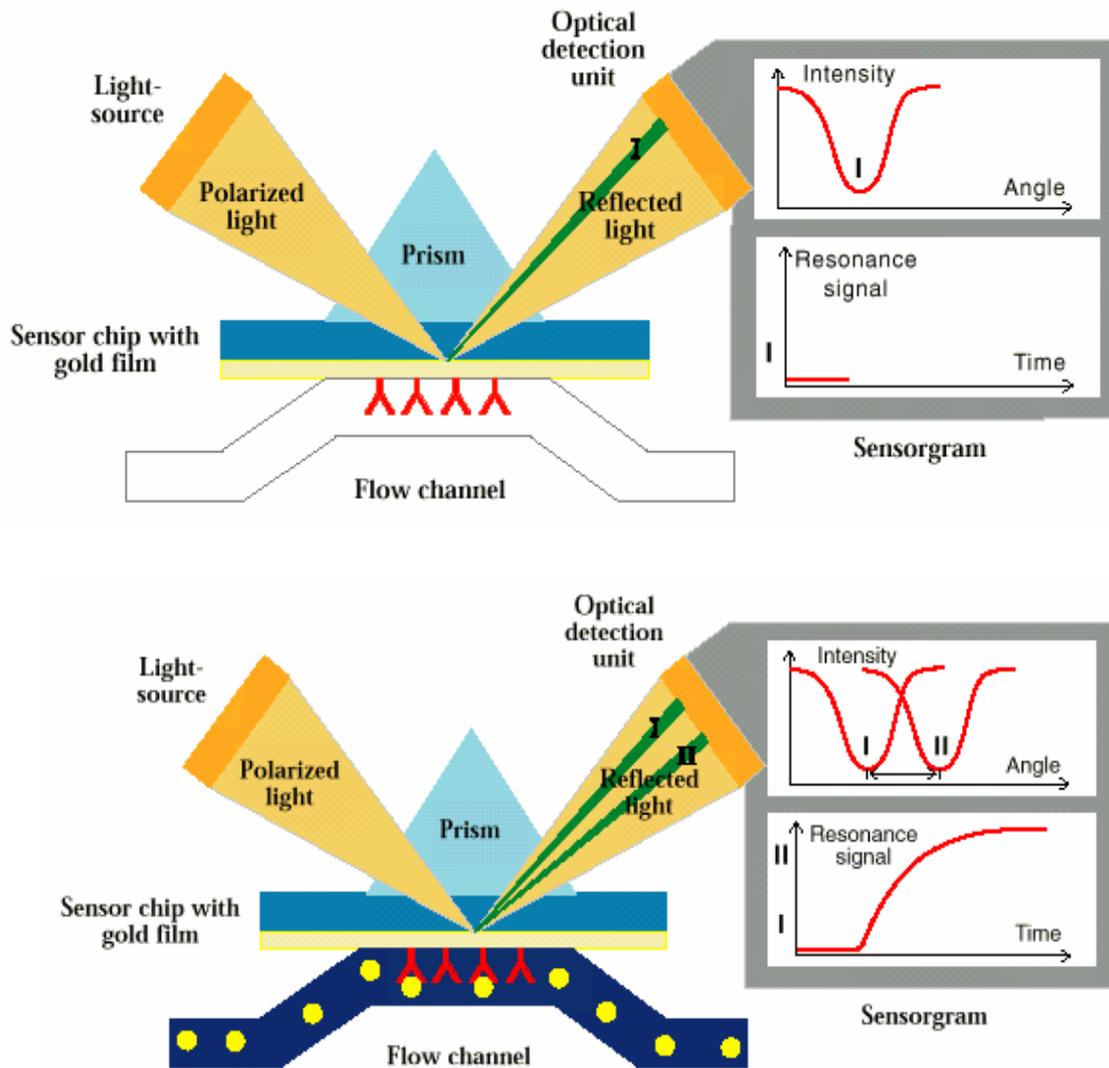


圖 14. BIAcore 感測原理示意圖。

共振角的變化所獲的任意單位(arbitrary units)稱之為共振單位(resonance unit ; RU)。當感測晶片表面(反應層介質)之生物元件與待測物反應時，質量濃度之變化會影響共振角的變化，此時，所反應出的共振單位也不同。利用不同時間點的 RU 值與時間作圖，即可得到感應分析圖(如圖 15)。

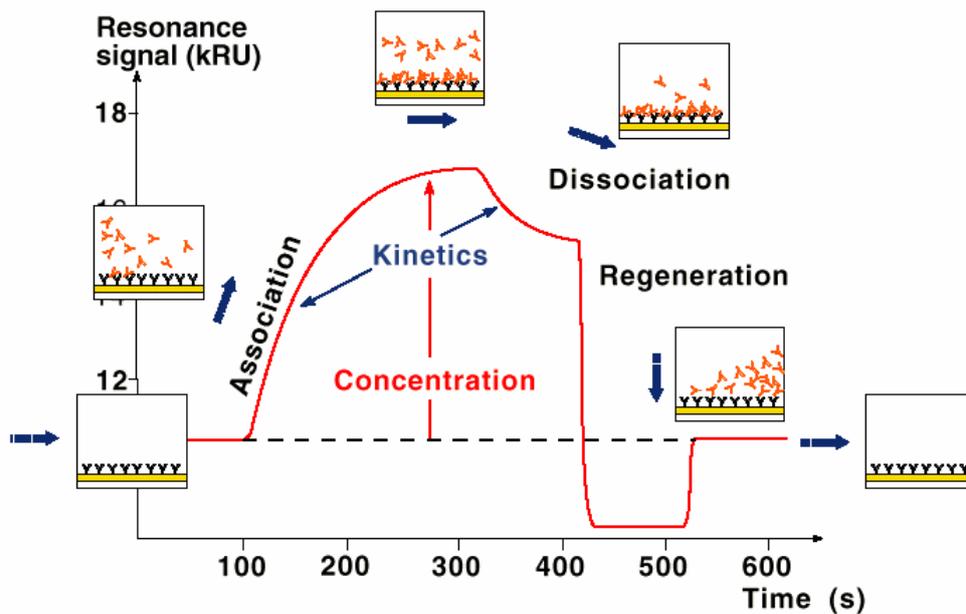


圖 15. BIAcore 之感應曲線圖。縱軸為共振單位(resonance unit ; RU)；橫軸為時間，以秒為單位。

共振角度的變化，與完全反應後固定於金屬表面的生物分子濃度成正相關，最小可偵測到 $1\text{ng}/\text{mm}^2$ 的濃度變化，1000 RU 的變化量大約等於 $1\text{ng}/\text{mm}^2$ (10RU about $10\text{pg}/\text{mm}^2$) 的表面質量濃度的改變，因此可以測得分子之間結合的動力機制，達到所謂的即時偵測。當結合的情形時間發生的越快時，且RU值變化越高時，則表示待測物和晶片表面之生物元件有較好的親和力 (higher affinity)；反之，若結合情形發生的時間慢且RU值變化較不明顯時，表示受測物和感應晶片上表面之鍵合物間親和力不佳。當待測物和感應晶片上的生物元件正進行解離(dissociation)作用時，會出現一段下降曲線。當解離的時間越長，表示受測物和感應晶片上的鍵結物有較好的特異性(specific)，因此不容易發生解離；反之若解離情形的時間越快，表示受測物和感應晶片上的鍵結物特異性不佳。

三. 材料與方法

3-1 線狀與環狀胜肽之合成

3-1-1 SPPS 實驗設備與材料

固相胜肽合成 (SPPS) 所需之試劑耗材及儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 3。

表 3. 合成胜肽所需之試劑耗材、儀器設備與購買廠商

藥品試劑	購買廠商	備註說明
Fmoc-PAL-resin 【5-(4'-Fmoc-aminomethyl-3',5'-dimethoxyphenoxy)-valeric acid-MBHA (methylbenzhydrylamine) resin】	NOVAbiochem	胺基酸之固著物
DCM (Dichloromethane)	TEDIA	膨大 resin
DMF (N,N-dimethylformamide)	Malinckrodt	濕潤 resin
Piperidine	TEDIA	去除胺基酸 N 端 Fmoc 保護基
HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)	ANASPEC	活化胺基酸 C 端之試劑 (Coupling reagents)
HOBt (1-Hydroxybenzotriazole anhydrous)	ANASPEC	
DIEA (N,N-Diisopropylethylamine)	SIGMA-ALDRICH	
EDT (Ethanedithiol)	SIGMA	將合成好之胜肽從樹脂固著物上切下
Thioanisole	SIGMA	
TFA (Trifluoroethanoic acid)	Lancaster	
合成胜肽所需之胺基酸	購買廠商	備註說明
A (Fmoc-Ala-OH)、C (Fmoc-Cys(Trt)-OH)、D (Fmoc-Asp(OtBu)-OH)、E (Fmoc-Glu(OtBu)-OH)、F (Fmoc-Phe-OH)、G (Fmoc-Gly-OH)、H (Fmoc-His(Trt)-OH)、I (Fmoc-Ile-OH)、K	ANASPEC	N 端具有 Fmoc、側鏈具保護基之胺基酸

(Fmoc-Lys(Boc)-OH)、L (Fmoc-Leu-OH)、 M (Fmoc-Met-OH)、N (Fmoc-Asn(Trt)-OH)、P (Fmoc-Pro-OH)、Q (Fmoc-Gln(Trt)-OH)、R (Fmoc-Arg(Pdf)-OH)、T (Fmoc-Thr(tBu)-OH)、 V (Fmoc-Val-OH)、Y (Fmoc-Tyr(tBu)-OH)、		
儀器設備	購買廠商	備註說明
反應針筒	Amersham biosciences	Column PD-10 (17-0435-01)
自動旋轉器	Young chenn	(Model. SD-50)
抽氣馬達	GAST mech	(DOA-P704-AA)
真空萃取裝置	Great tide	(SPE Vacuum manifold)
冷凍乾燥機	Kingmech	(FD3-12P)

3-1-2 固相胜肽合成之實驗方法

將於含有PAL-resin(0.25 mmole、0.338 g)的反應針筒內，加 5ml DCM 使樹脂膨大，反應5分鐘重複兩次；之後加入 5ml DMF 使樹脂濕潤，反應5分鐘重複兩次；爾後加入5ml 的20% Piperidine/DMF 混合反應15分鐘，重複兩次；再加入5 ml DMF，混合反應5分鐘，重複三次。取胺基酸 0.75 mmole 並且與coupling reagent (HOBT: 0.75 mmole，101.3 mg；HBTU: 0.75 mmole，284.4 mg；DIEA: 1.0 mmole, 261 μ l) 反應5分鐘後，被激發活化的胺基酸再與反應針筒內的PAL-resin 混合反應2小時。待反應結束後，加入 5 ml DMF 反應5分鐘，重複兩次，再加入5 ml DCM 反應5分鐘，重複兩次；持續重複上述去保護基(de-protection)反應及耦合(coupling)反應，直到所有的組成胺基酸被接在樹脂上。最後加入 20% piperidine/DMF 5ml

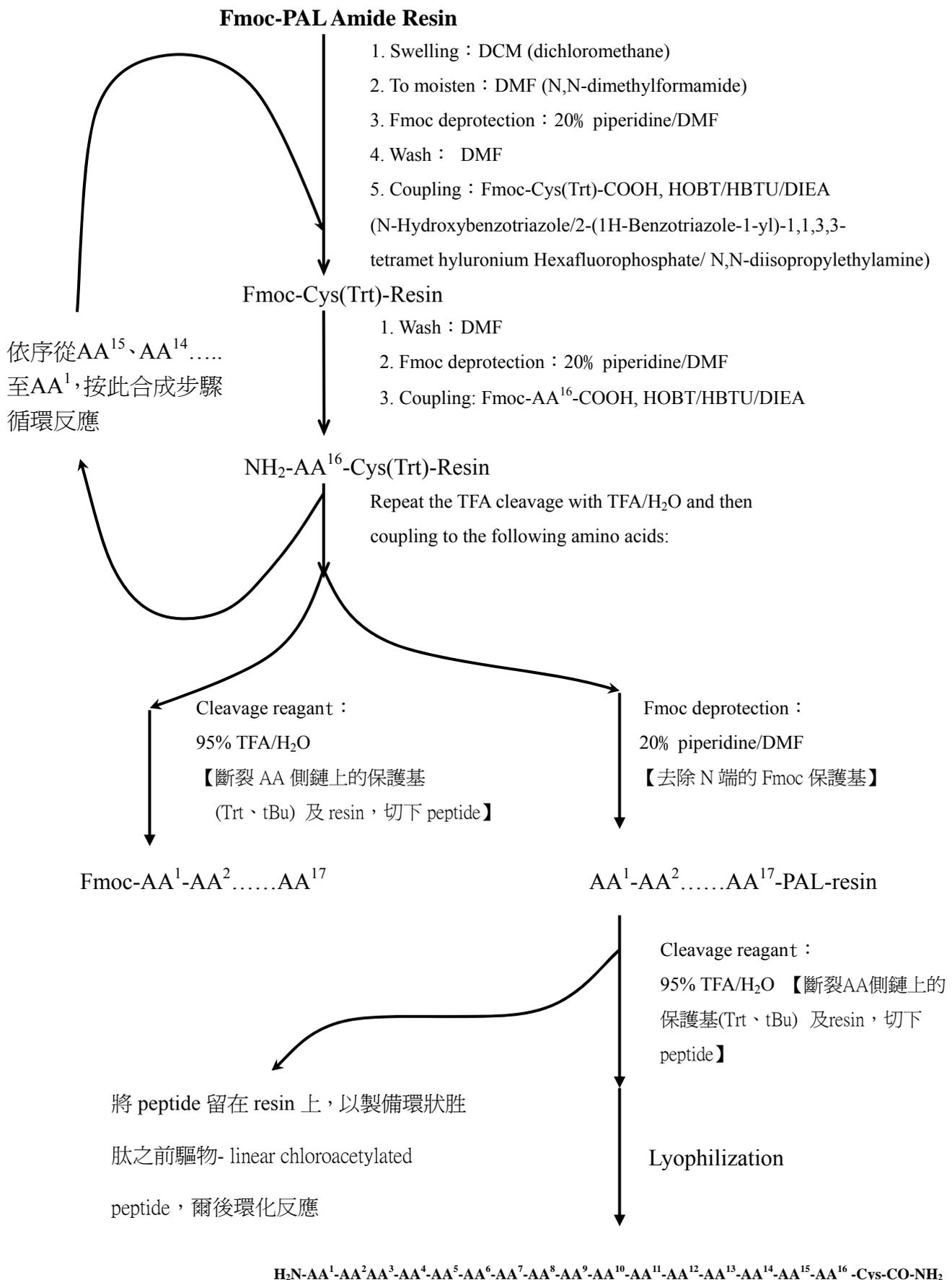


圖 16. SPPS 胜肽合成流程圖與說明。

反應15分鐘，重複兩次後再加入DMF 5ml 反應5分鐘，重複兩次，將胺基酸上N端的Fmoc保護基去除掉。圖16為簡單的合成胜肽流程圖。

3-1-3 環狀胜肽的合成

環狀胜肽的合成步驟，首先須製備 chloroacetic anhydride ，做為環化 peptide 合成之前驅物。混合 chloroacetic acid (10 eq、10mmole)，以 dichloromethane 為溶劑，溶於 600μl 與 dicyclohexylcarbodiimide (DCC，5 eq、5mmole)，以 dichloromethane 為溶劑，溶於 400μl，在冰浴條件下反應 30 分鐘，產生 chloroacetic anhydride 和 dicyclohexylcarbodiimide 之白色沉澱。

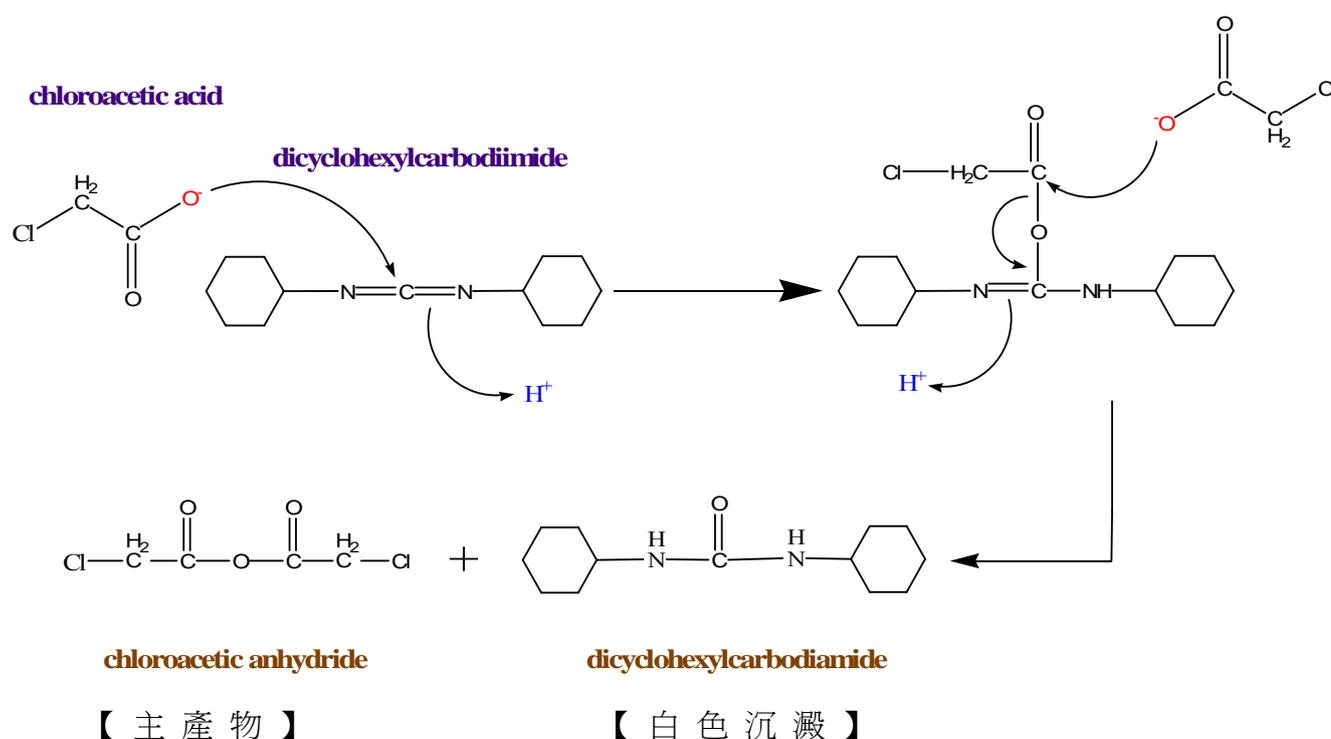


圖 17. 製備 chloroacetic anhydride 反應圖。

環狀胜肽之前驅物- linear chloroacetylated peptide 之合成流程：

並利用真空萃取裝置，將dicyclohexylcarbodiimide之白色沉澱過濾移除後，取出濾液將 dichloromethane之溶劑以氮氣吹乾至溶液呈黏稠狀後，將析出之chloroacetic anhydride溶解於 5 mL 之DMF中，再加入已去除Fmoc保護基，仍然固定有線狀胜肽的樹脂 $\text{NH}_2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{-AA}^3\text{-.....-AA}^{16}$ -Cys(Trt)-Resin，室溫下反應 5 小時後，得到 $\text{Cl-CH}_2\text{-CO-NH-AA}^1\text{-AA}^2\text{-AA}^3\text{-.....-AA}^{16}$ -Cys(Trt)-Resin。最後將peptide自樹脂上切下。圖 18 為製備chloroacetylated peptide 的反應流程圖。

將 peptide 自樹脂上切下：

將氯乙醯化完成後的反應試管，過濾掉濾液，加入 Trifluoroacetic acid (TFA) 5ml 混合搖晃進行 1.5 ~ 2hr 【若氨基酸序列中含有 Met (M)、Arg (R)，則需再加入 0.25ml thioanisole and D.D. water 與 EDT 各 0.125 ml】以化學裂解法將胜肽自樹脂上裂解後，經由真空萃取後，取濾液，並在冰浴中吹氮氣去除 TFA（增快 TFA 揮發速率）待殘留溶液約剩 1.5ml 時，加入 D.D. water 3ml，行冷凍乾燥以得到氯乙醯化線狀胜肽粗產物。

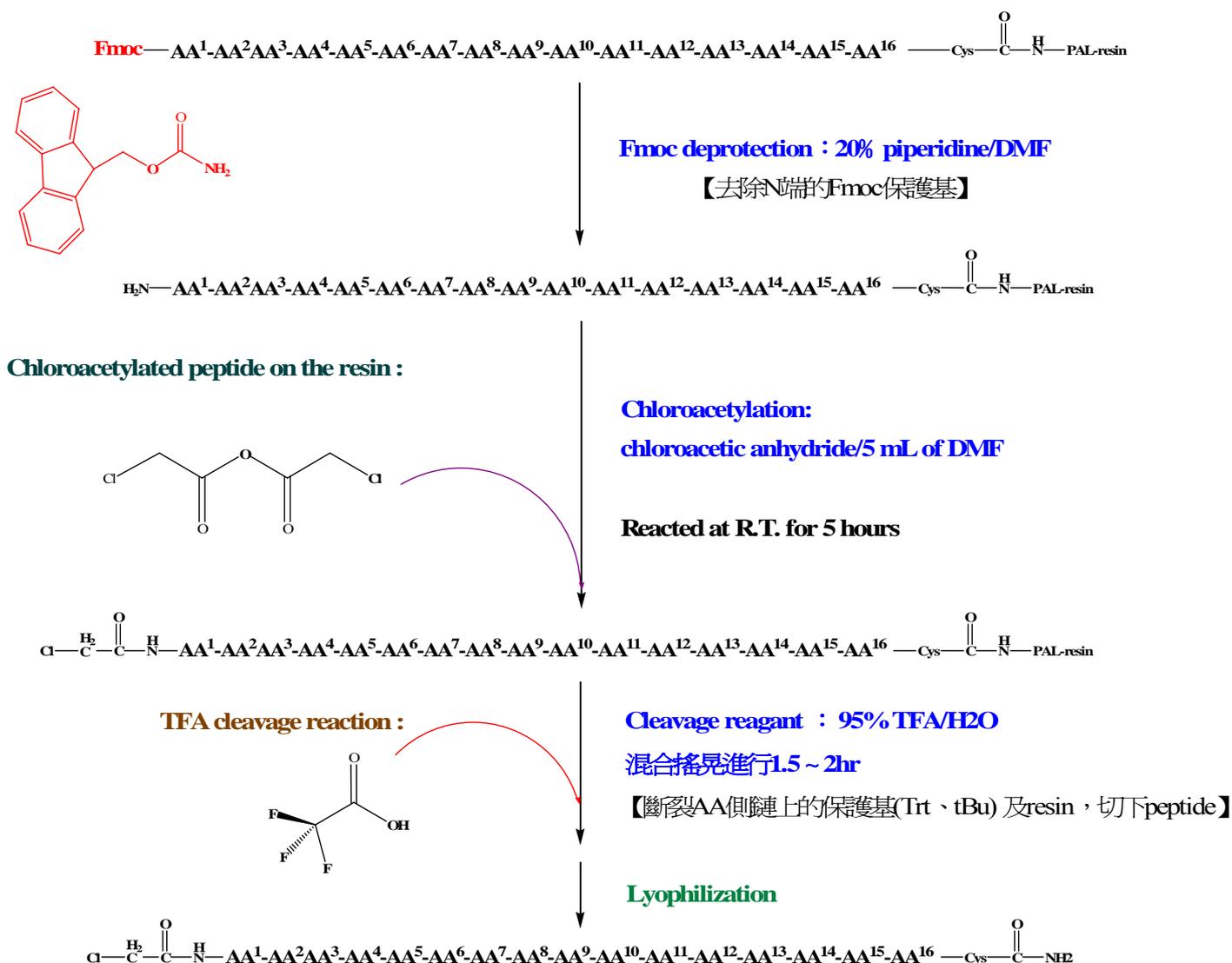
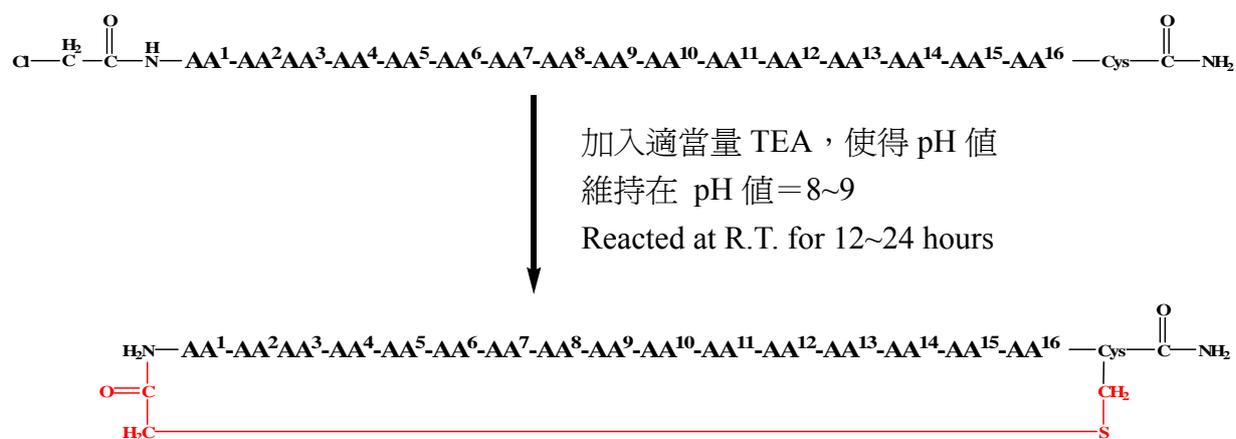


圖 18. 製備 chloroacetylated peptide 反應圖

環化反應

將已氯乙醯化且冷凍乾燥完之胜肽粗產物 $\text{Cl-CO-CH}_2\text{-NH-(AA}^1\text{-AA}^2\text{-AA}^3\text{-AA}^4\text{-AA}^5\text{-AA}^6\text{-AA}^7\text{-AA}^8\text{-AA}^9\text{-AA}^{10}\text{-AA}^{11}\text{-AA}^{12}\text{-AA}^{13}\text{-AA}^{14}\text{-AA}^{15}\text{-AA}^{16}\text{-Cys)-NH}_2$ ，用 10 ml 的去離子水(D.D. water)來溶解【若產物溶於D.D. water 的情況不佳，可加入適當量的Acetonitrile來幫助溶解】，並將此稀釋液置於

針筒注射器中，搭配使用微量注射幫浦，將chloroacetylated線狀胜肽溶液滴入，裝有 50 ml D.D. water之錐形瓶，瓶內溶液事先以TEA (triethylamine) 調整pH值，維持 8.5~9.5 之數值，並加入攪拌磁石幫助瓶內之反應溶液能均勻混合，反應過程中，維持滴入速率與攪拌轉速的固定。在開始反應後，每間隔 1.5~2 小時，就以pH meter量測溶液之pH值，若數值低於 8.0 時，需要再加入適當量之TEA以調整pH值，使pH值回到 8.5~9.5 的範圍。持續攪拌反應達 12~24 小時後，倒出溶液，爾後，進行冷凍乾燥以得到環化粗產物。



Thioether-bridged(AA¹-AA²-AA³-AA⁴-AA⁵-AA⁶-AA⁷-AA⁸-AA⁹-AA¹⁰-AA¹¹-AA¹²-AA¹³-AA¹⁴-AA¹⁵-AA¹⁶-Cys)-NH₂

3-1-4 環化反應實驗設備與材料

環狀胜肽生成反應所需之試劑及儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 4。

表 4. 合成環狀胜肽所需之試劑材料、儀器設備與購買廠商

試劑與設備	購買廠商	備註說明
TEA (Triethylamine)	FisherChemical	在環化反應過程用來調整溶液 pH 值
塑膠注射針 23 G × 1 1/4 R.B.	Taiwan TOP	
塑膠針筒 10 mL (Plastic syringe, 10 mL)		
微量注射幫浦	KdScientific	
酸鹼測定儀 pH meter	SUNTEX	
加熱攪拌器	PANTECH	Magic plate3600

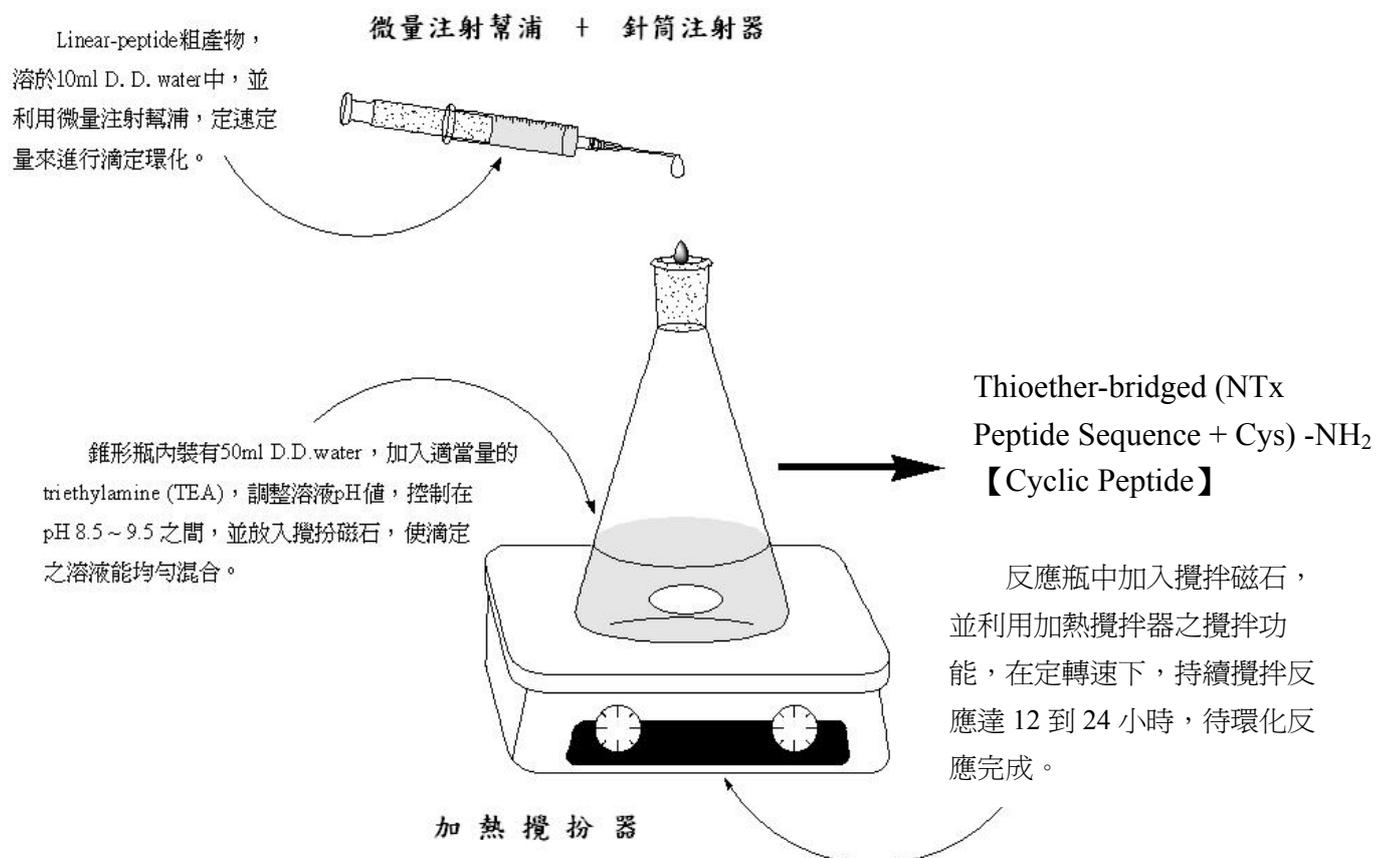


圖 19. 環化裝置圖與說明

3-2 高效能液相層析法 ~ 胜肽之分析及純化

3-2-1 HPLC 實驗材料與設備

高效能液相層析所需之藥品試劑及儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 5。

表 5. HPLC 實驗過程中，所需之試劑、設備與購買廠商

藥品試劑	購買廠商
Acetonitrile	ECHO
TFA (Trifluoroacetic acid)	Lancaster
儀器設備	購買廠商
0.22 μm filter	Millipore
玻璃過濾裝置 (AK95375-00000)	KONTES
translucent Buchner flasks	KIMBLE
微量注射針 (80830 750RN 、 500 μl)	HAMILTON
C18 monomeric column 【 10 \times 250 mm 】 (cat. 238TP101510 、 particle size 10 – 15 micron)	VYDAC
RP-HPLC { Pump L-2130 UV detector L-2400	HITACHI

3-2-2 RP-HPLC 實驗方法

樣品中之成份經UV光源 225 nm 偵測後，數據（滯留時間，retention time，Rt）經由電腦處理以積分圖形呈現。分離之最佳狀態可由進速度、

孔徑與離析率調校而求得。根據文獻的報告本研究將 HPLC 做下列之參數設定可得最佳的分離及分析效果³⁰。

我們所使用的管柱種類：粒子尺寸 10 μ m 的 C-18 monomeric 層析管柱，利用 UV detector 所檢測的波長為 225 nm，固定移動相流速在 4 ml / min，移動相溶劑的組成分別為 solvent A : D.D.water 4L + 0.05% TFA，solvent B : acetonitrile 4L + 0.05% TFA。分析的方法利用線性梯度沖提（在 30 分鐘內 solvent A / solvent B 含量比例由 90 : 10 到 10 : 90，接著 7 分鐘內維持在 10 : 90 的比例，將還殘留於管柱內的剩餘干擾物沖提出來，爾後再轉換成 90 : 10 的比例維持 10 分鐘，讓管柱達到最初時的平衡狀態。移動相的比例變化可參照圖 20)

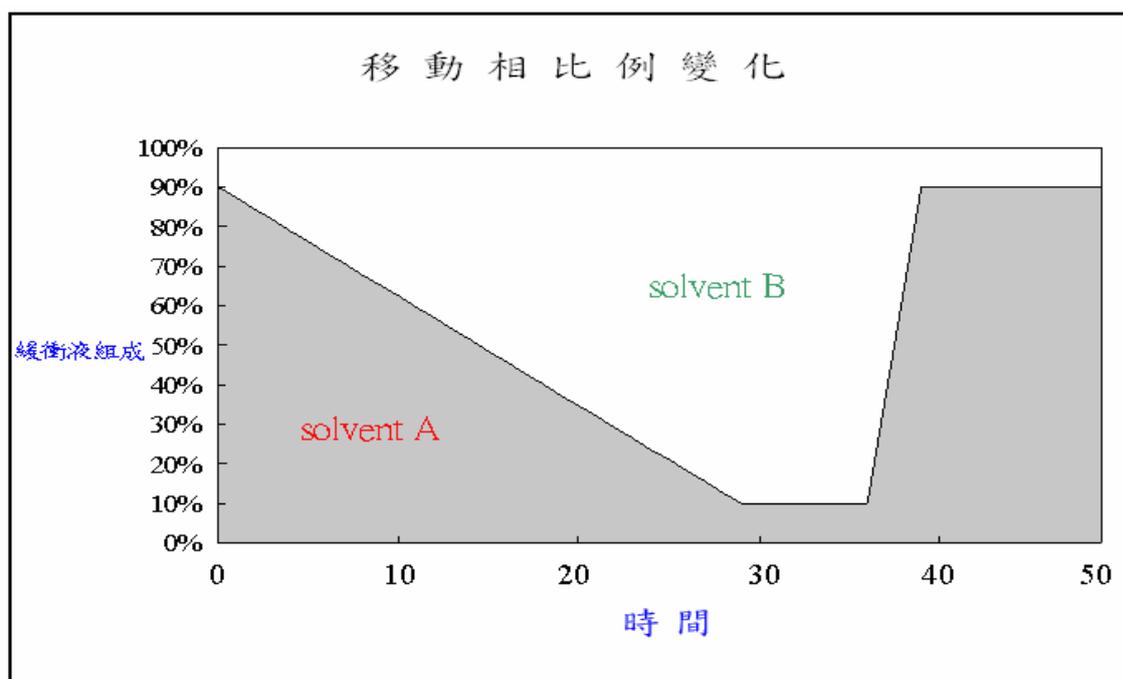


圖 20. 移動相比例變化圖。

冷凍乾燥完成之胜肽樣品，自冰箱取出於室溫下回溫，並將殘留於 tube 管壁底層之黏稠液體，利用去離子水 (D.D. water) 與乙晴 (acetonitrile) 混合比例 1ml : 1ml 來溶解。

欲分析或純化的胜肽樣品需於分析或純化前，先以孔徑 0.22 μm 針筒過濾器 (filter) 過濾。過濾後之樣品注射至儀器前，須先去除儀器中微流管柱或鐵氟龍管內及移動相氣泡 (Purge)，再讓儀器以緩衝液空跑，確認管柱內沒有殘留的干擾物。若還有雜訊出現 (即圖譜還有若干大小不一的 peak 出現，表示管柱未達平衡狀態)，應設定適當條件 (流速、溶劑分配比係數) 將管柱清洗乾淨後，再進行樣品分析。

當按下操作軟體於螢幕上“Start Run”後，螢幕會出現“Waiting for injection”並將胜肽樣品注入樣品注射閥，此時注射閥箭頭應停留在 load 位置，如此樣品才仍裝載於閥內；待 RP-HPLC 儀與電腦的同步化操作完成，將注射閥往下推至 inject 位置，樣品就會隨移動相進入 C18 monomeric 層析管柱進行分析。電腦中的積分軟體會隨樣品內成份於不同時間出現面積大小不一的波峰 (peak)，並依其圖譜來確認純度與滯留時間 (retention time, Rt)。此時若要進行純化樣品的流程，可依積分後圖譜所出現的波峰，並判別樣品中主要成份可能所出現滯留時間之區間，個別收集每個波峰出現時 RP-HPLC 儀所層析流出的溶液，並標示分類完成，經冷凍乾燥，便能得到純化後的白色乾燥粉末，待分析製備之用。

3-3 質譜儀鑑定

電灑游離法 (Electrospray Ionization, ESI) 進行分析及分子量鑑定

質譜儀分析時樣品必須先進行離子化，因樣品其物理、化學性質不同，而有各種不同離子化的方式。易揮發性樣品用電子撞擊游離法(electron impact ionization, EI)，或用化學游離法(chemical ionization, CI)。非揮發性樣品用快速原子撞擊(fast atom bombardment, FAB)，或電灑法(electrospray ionization, ESI)等。本實驗純化後之線狀與環狀胜肽產物由本校 劉建忠 教授 實驗室以ESI-MS (electrospray ionization mass) 質譜儀分析鑑定合成線性與環胜肽之分子量，確定正確組成後，運用紫外光-可見光光譜儀進行胜肽樣品與抗體間結合反應的偵測。

3-3-1 實驗儀器

本實驗所使用的儀器係英國 Fisons 公司生產的 VG-Quattro 機型之三段式四極矩質譜儀，採用的離子化方式為電灑游離法。電灑游離介面加溫至 25°C，Sampling Cone 的電壓範圍由 10 伏特至 50 伏特。樣品溶液由 Rheodyne 注射針幫浦(Rheodyne injector valve)注入質譜儀，sample loop 大小為 20 μ l，流速 0.04 ml/min，控制氮氣進入介面的乾燥氣體流速 (Bath 值) 為 50~100 liter/hour。

3-4 UV-Vis 光譜儀

3-4-1 吸收光譜分析測量

我們以 HP (Hewlett-Packard) 8453 Spectrophotometer 測量合成純化後的線狀與環狀胜肽跟 Anti-NTx 抗體行結合反應後，它們的 UV-Vis 吸收光譜，並觀測其吸收峰波長，以進行接下來的動力學測量。我們使用 1.0 公分的石英材質樣品槽 (cell)，並將所需之藥品、儀器設備整理於表 6。

表 6. UV-Vis 實驗所需藥品試劑、儀器設備與購買廠商

藥品試劑	備註	購買廠商
NTx Reagent Pack	HRP-mouse monoclonal anti-NTx	Johnson & Johnson , Ortho-Clinical Diagnostics
PBS buffer solution (pH 7.2)	140 mM Sodium chloride (NaCl)	Merck
	2.7 mM Potassium chloride (KCl)	Merck
	10 mM Sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Sigma
	1.8mM Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	USBiological
20% ethyl alcohol	Washing solution	SIGMA
儀器設備	備註	購買廠商
Spectrophotometer	8453	HP (Hewlett-Packard)
Lab. Rotator	(DSR 2800V)	Digisystem Laboratory instruments, Inc.
Pipette	(Nichipet EX)	NICHIRYO

3-4-2 UV-Vis 光譜儀實驗方法

開機程序：打開主機電源、電腦電源及螢幕開關，令主機暖機約 15 分鐘。背景校正 (Reference correction)：取一只石英槽 (UV cell，二面為透明，另二面霧面)，需裝入約八分滿之 PBS 溶液以進行背景校正。以手指捏住石英槽上方或非透明區，以拭鏡紙輕拭石英槽光窗 (透明部分)，勿使光窗遺留指紋或油脂。將 UV cell 放入測試座 (Cell holder) 中，令光窗朝向光源，固定石英槽。點取螢幕左下方之 Blank 或按主機上的 Blank，主機上的紅燈會變為綠燈，此時即完成溶劑背景校正。樣品光譜測量：取出石英槽，置入待測樣品。選取螢幕左下方之 Sample 或直接按主機上的 Sample，以進行光譜測量。參數設定與更改：若須更改波長掃瞄範圍，選取螢幕左上角的 Setup 在 Display spectrum 中，鍵入所需波長範圍，再按下 OK 即可改變光譜的波長範圍。

3-4-3 動力學測量

我們首先將取 1 mM 的線狀胜肽 Linear-P1、Linear-P2 和 Linear-P3 25 μ l，加至已稀釋 1/1000 倍 (phosphate buffer solution, PBS 做稀釋) 的 anti-NTx 抗體 1 mL 混合均勻，待反應一小時，將混合液置於石英樣品槽，進行光譜測量，並從其吸收光譜確認吸收峰波長以進行動力學測量。爾後，重複其操作步驟，接著進行環狀胜肽 Cyclic-P1、Cyclic-P2 和 Cyclic-P3 的

光譜測量，並確認吸收峰波長以進行動力學測量。

確認各個胜肽樣品反應的吸收峰波長之後，再以固定波長進行動力學測量。接下來，我們將反應設定在擬一級條件下進行，並將 anti-NTx 抗體的濃度大幅降低，而使胜肽樣品的濃度達到過量以觀測產物的形成，反應的變化會隨時間改變呈現指數曲線，最後讓反應達到飽和。線狀胜肽 Linear-P1~3 與環狀胜肽 Cyclic-P1~3 分別做一系列稀釋，每一樣品分別從濃度 1 mM 做 1/2 倍稀釋，稀釋成濃度 0.5 mM、0.25 mM 和 0.125 mM 共四組稀釋濃度，並與固定稀釋 1/1000 倍濃度的 anti-NTx 抗體做抗體-抗原結合反應，反應時間 15 分鐘，每間隔 20 秒讀取一次吸收值。所得之原始數據，利用 Excel 軟體處理，做成橫軸為時間（單位；秒），縱軸為 UV 吸收值（單位；AU）。從圖中我們可以觀察到不同樣品、不同濃度下，其吸收值對單位時間（Absorbance, AU v.s Time, S）的變化情況。

從反應的吸收值對時間的變化圖可得知其濃度的變化，根據比爾定律 (Beer's law) $A = \epsilon \cdot b \cdot C$ (A : 吸收值, ϵ : 莫耳吸光係數, b : 石英管徑長, C : 濃度(mM))，同一個胜肽樣品其莫耳吸光係數相同，且石英管徑長固定，所以得到的吸收值大小，就相當於濃度的大小差異。我們藉著觀測在固定波長的吸收度變化，將 $\ln(A_i - A_t)$ 對時間做圖可得線性關係圖，再應用線性最小平方差 (linear least-square fit) 得其線性趨勢線的斜率即為反應觀測速率常數 (k_{obs})。最後可從 $\ln(A_i - A_t)$ 對時間做圖的結果可觀測其反應

速率的快慢差異，並利用Lineweaver-Burk 作圖法（雙倒數做圖法），在其反應速率的倒數值對不同反應濃度的倒數值來作圖（ $1/V$ v.s $1/[C]$ ）。此時圖形呈現一線性關係，並應用線性趨勢線所得的直線方程式與Lineweaver-Burk方程式做對照，所得的結果與y軸相交可得 $1/V_{max}$ ，與x軸相交可得 $-1/K_m$ ，其斜率值為 K_m/V_{max} ，並將所得之 V_{max} 與 K_m 值進行討論。比較線狀及環狀胜肽與Anti-Ntx抗體之間，彼此親和力的大小。

3-5 利用表面膜漿共振技術製備感應晶片

3-5-1 實驗材料及設備

應用表面膜漿共振技術(SPR-based technology)製備感應晶片所需之材料及設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 7。

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

材 料	備 註	購 買 廠 商
Sensor chip CM5	Research grande	Biacore AB, Pharmacia Inc., Sweden
Running buffer : HBS-EP buffer	0.01 M HEPES	
	0.15 M NaCl	
	3 mM EDTA	
	0.005% Surfactant P20 , pH 7.4	
Amine coupling kit	115 mg NHS (N-hydroxysuccinimide)	
	750 mg EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride	
	10.5 ml Ethanolamine hydrochloride	
Regeneration buffer	10 mM Glycine-HCl, pH 2.5	ANGUS Buffers & Biochemicals

設備	購買廠商
BIAcore 3000 (Biomolecule Interaction Analysis System)	Biacore AB, Pharmacia Inc., Sweden

3-5-2 感應晶片表面之固定化

本實驗以 HBS-EP buffer 為 Running buffer，流速設定為 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，選取 amine coupling 模式進行專一性感應晶片之製備。製備流程如圖 21，首先為感應晶片表面羧甲基(carboxymethyl group)之活化反應(activation)：利用 0.4 M EDC / 0.1 M NHS 等體積之混合液，將羧甲基活化生成 NHS-esters。首先EDC會與羧甲基反應，形成易與胺基(amines, $-\text{NH}_2$)反應之中間產物(*O*-acylisourea)，由於此中間產物於水溶液中不穩定。因此，以NHS取而代之與羧甲基反應，進而形成NHS-esters，NHS-esters亦易與胺基反應。再來為感應晶片表面鍵合物之固定化反應(immobilization)：注入 anti-NTx Ab (110 μl)，溶於HBS-EP buffer至晶片表面，anti-NTx Ab之胺基(amines, $-\text{NH}_2$)會與晶片表面之NHS-esters反應，形成共價鍵結(covalent links)。最後為感應晶片表面未與鍵合物反應之活化部位之去化反應(deactivation)：注入 0.1 M Ethanolamine hydrochloride (75 μL , pH 8.5)至晶片表面，覆蓋感應晶片上尚未與anti-NTx Ab結合之NHS-esters，以避免任何不當的非專一性吸附 (non-specific binding)。

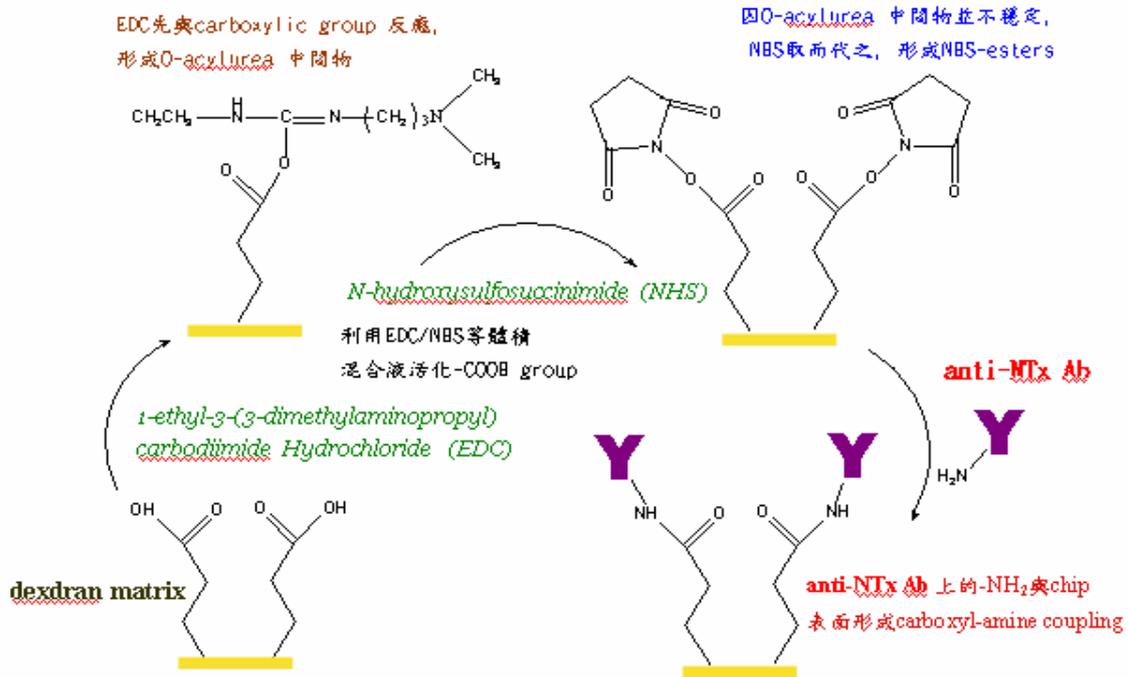


圖 21. anti-NTx antibody 感應晶片之製備流程圖

3-5-3 anti-NTx 抗體與線狀胜肽及環狀胜肽交互作用之分析

具 Anti-NTx antibody 感應晶片製備完畢後，分別將線狀胜肽及環狀胜肽以 HBS-EP buffer 稀釋成不同序列濃度(linear peptide: 5000、2500、1250、625、312.5 nM；cyclic peptide：1250、625、312.5、157、78 nM)，於流速為 20 μ L/min 的條件下，由濃度低至高分別取 150 μ l 注入微射流系統中，與晶片表面之 anti-NTx antibody 反應。反應完成後，系統會延遲 2 分鐘再進行高速清洗感應晶片表面，移除非專一性結合的部分，專一性結合的部分則以 Regeneration buffer (10 mM Glycine-HCl, pH 2.5)進行感應晶片表面之再生作用，使 RU 值回到未注射入樣品前的基礎線，再進行下一分析物之測定。

四. 結果與討論

4-1 線狀胜肽之純化及鑑定

4-1-1 高效能液相層析法(HPLC)進行分析及純化

合成後的線狀胜肽從樹脂固著物切下得到粗產物，所得到的粗產物重，與經 RP-HPLC 分析純化後得到的產物重，其純化產率整理如表 8。

表 8. 純化後的線狀胜肽產物產率與滯留時間。

胜肽編號	粗產物重 (mg)	純化後產物重 (mg)	產率 (%)	滯留時間 (min)
Linear-P1	14.6	7.9	54.2%	11.23
Linear-P2	15.3	6.2	40.5%	9.81
Linear-P3	11.5	8.5	73.9%	11.52
Linear-P4	10.9	8.8	80.7%	6.18
Linear-P5	12.2	7.7	63.1%	6.94
Linear-P6	16.3	6.9	42.3%	13.47
Linear-P7	8.6	3.9	45.3%	19.05
Linear-P8	9.3	3.4	36.6%	11.65
Linear-P9	11.2	8.7	77.7%	9.36
Linear-P10	13.4	9.2	68.7%	9.33

註：滯留時間 (retention time, RT)

RP-HPLC 的分離機制係由線狀胜肽與固定相之間相互疏水作用力 (hydrophobic interaction) 不同，使樣本於層析管柱之滯留時間不同而分離出來的，從分析純化後所得數據可觀察到，所有的線狀胜肽，經由 C18 管柱分離所得的滯留時間大都落在 5~20 分鐘之間，其中以 Linear-P4 的滯留時間最早，也代表構成 Linear-P4 的胺基酸序列，其極性較大與管柱填充物表面間作用力較小，故較早被沖提出；反之，Linear-P7 的胺基酸序列，其極性較小與管柱填充物表面間作用力較強，故較晚被沖提出。而線狀胜肽經純化所得的產率約在 36.6~80.7% 之間。線狀胜肽經由 RP-HPLC 分析並純化收集所得的層析圖譜整理如圖 22~31，均可得到一明顯的主峰，以確認其被沖提出的滯留時間。合成好的線狀胜肽經由 RP-HPLC 分析後，必需藉由 ESI-MS 來鑑定是否為正確分子量，才可大量純化以得到最終純的線狀胜肽產物。

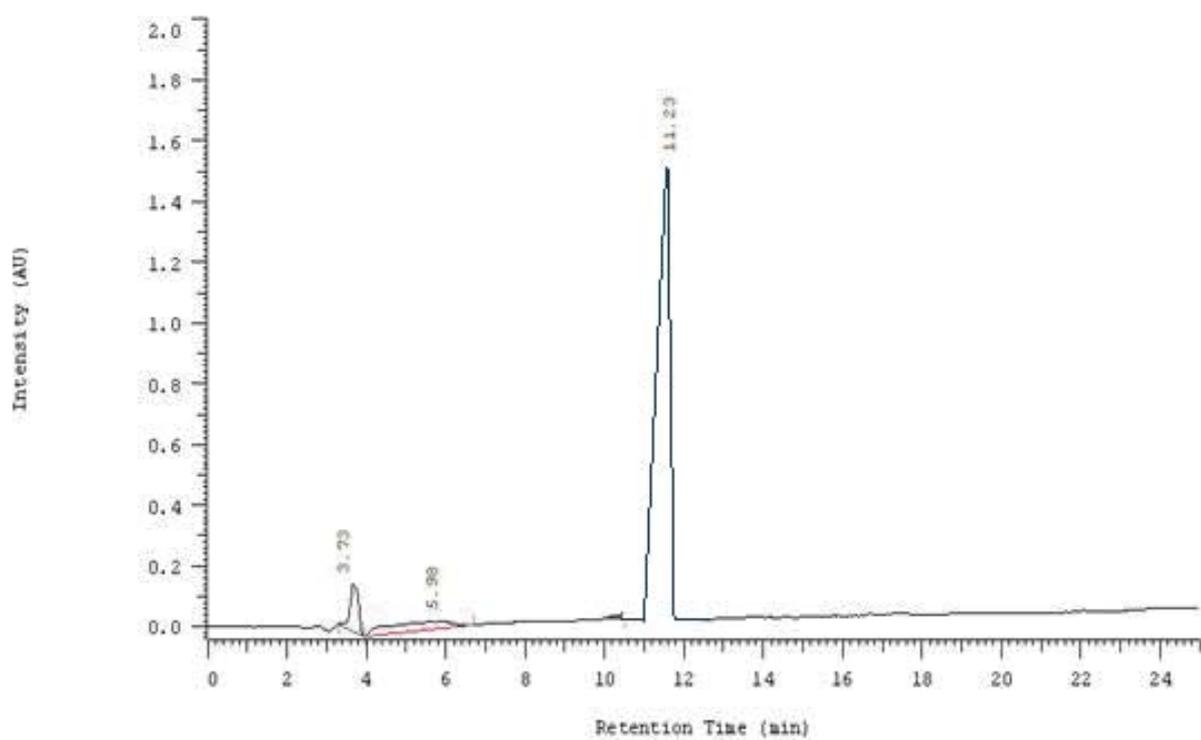


圖 22. 經純化後收集 Linear-P1 之 HPLC 層析圖 (Rt 11.23 min)。

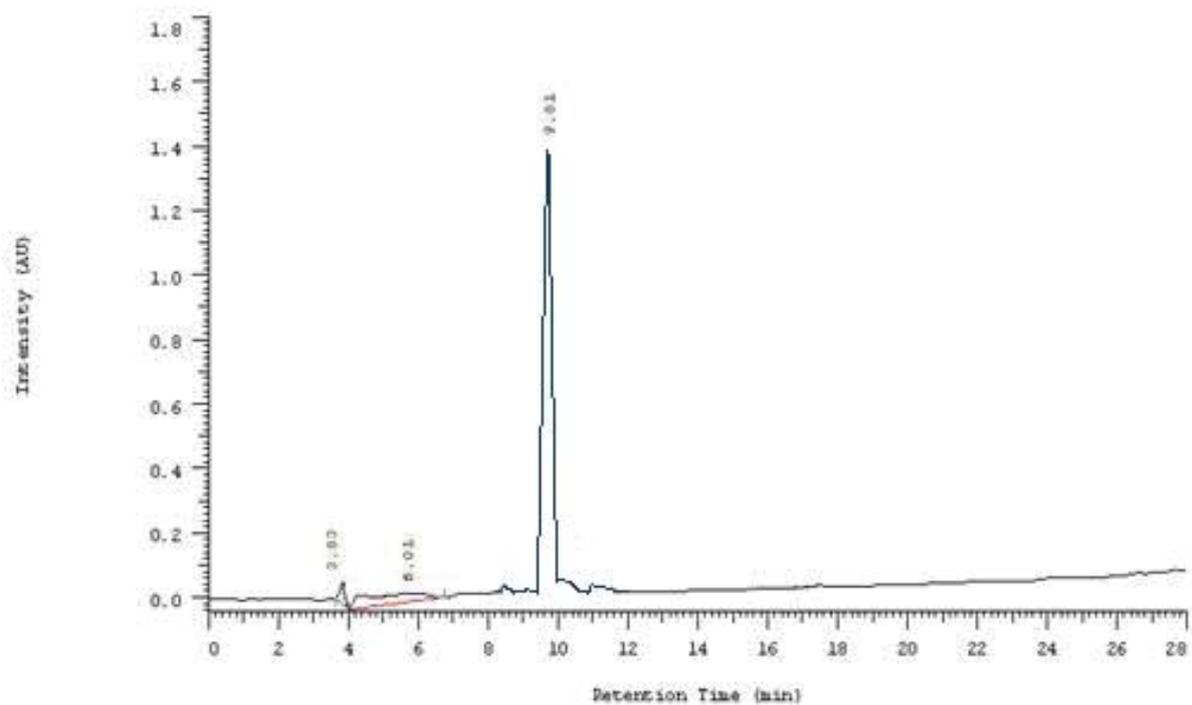


圖 23. 經純化後收集 Linear-P2 之 HPLC 層析圖 (Rt 9.81 min)。

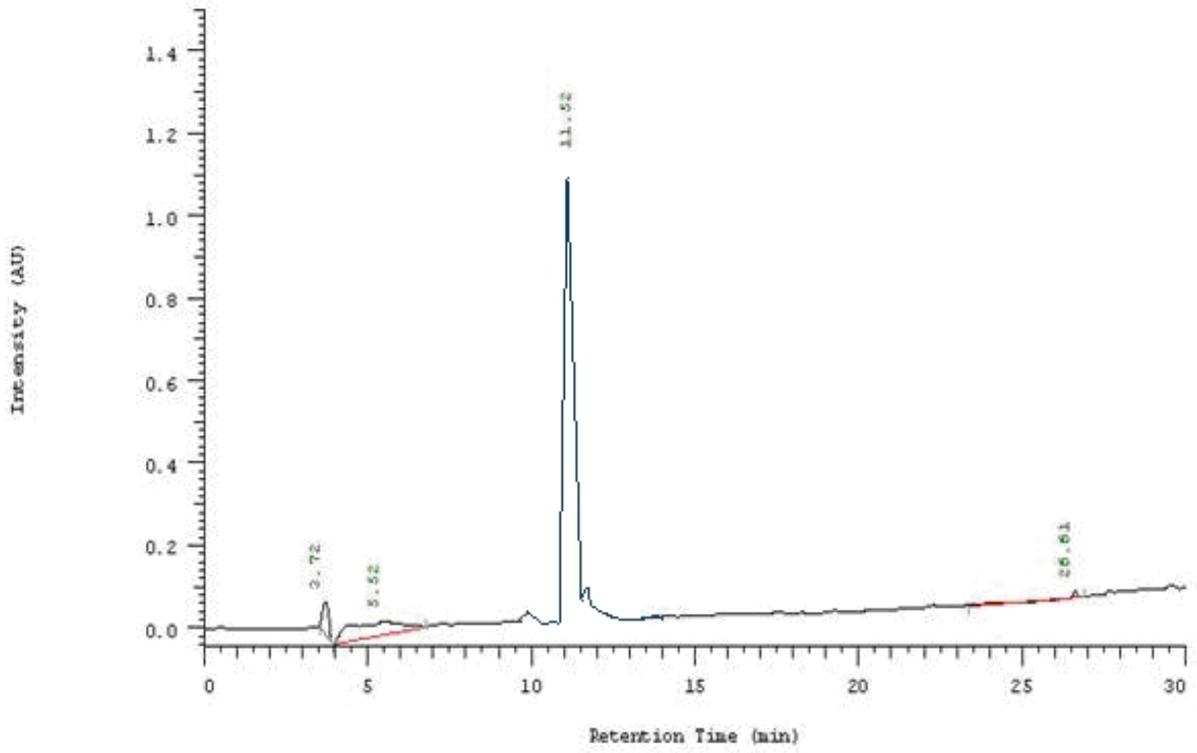


圖 24. 經純化後收集 Linear-P3 之 HPLC 層析圖 (Rt 11.52 min)。

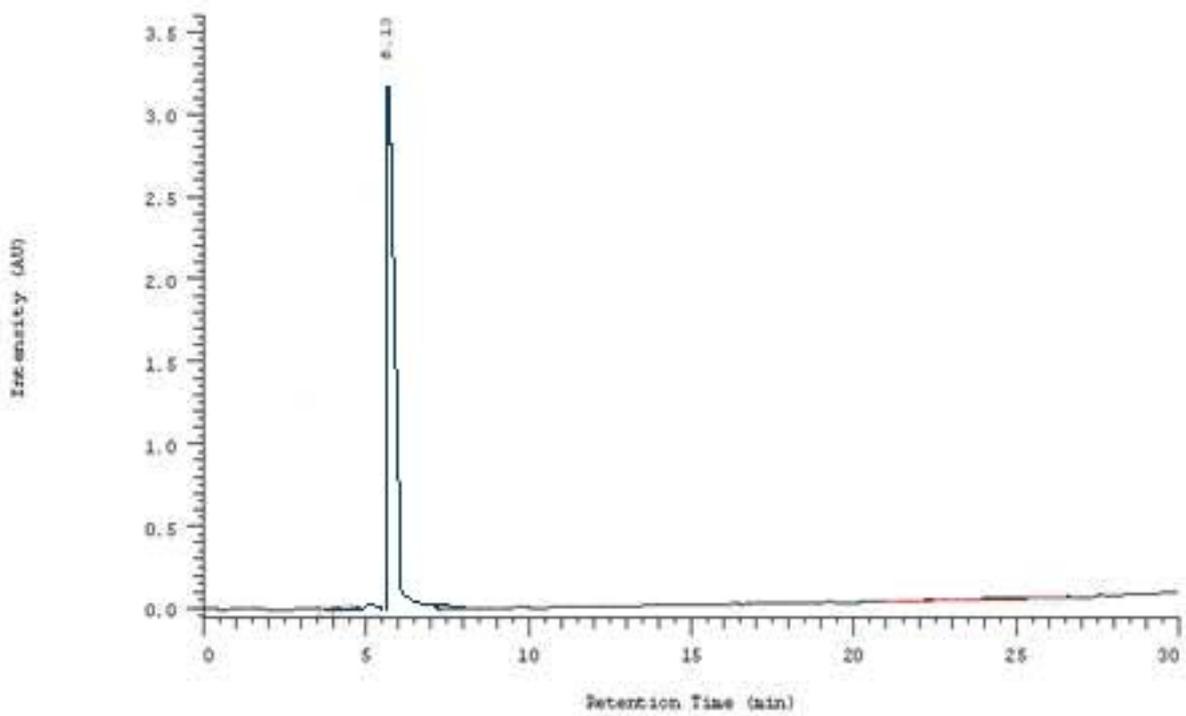


圖 25. 經純化後收集 Linear-P4 之 HPLC 層析圖 (Rt 6.18 min)。

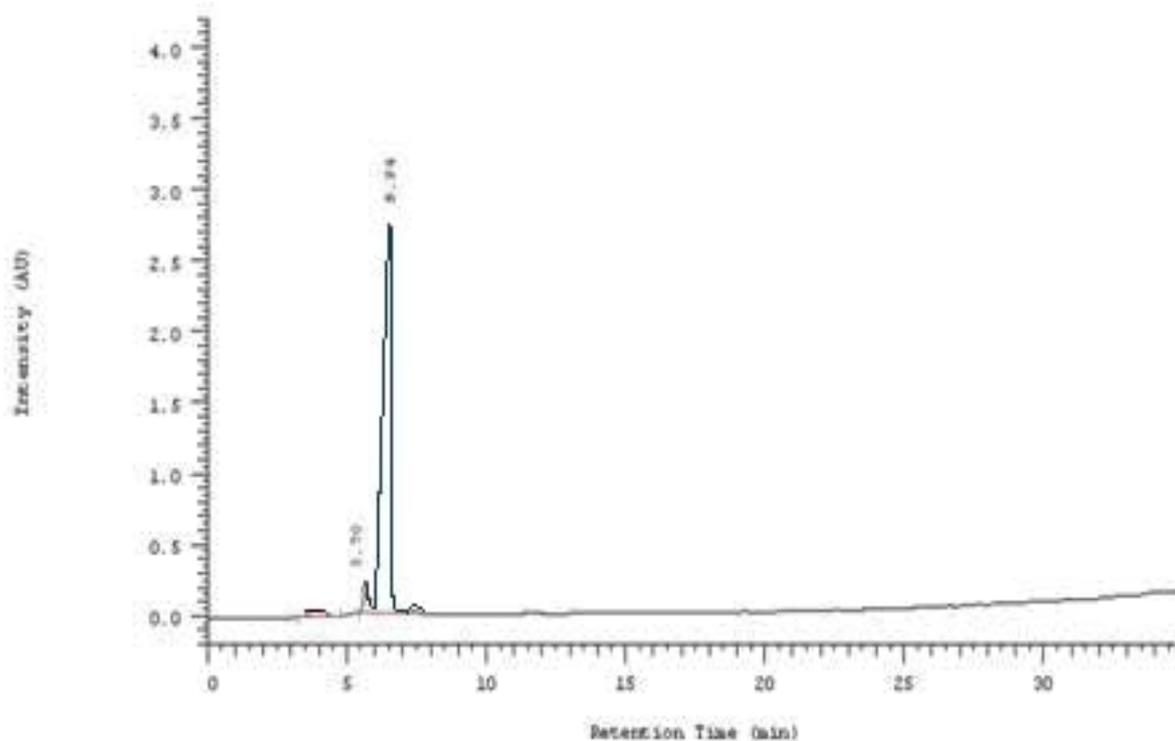


圖 26. 經純化後收集 Linear-P5 之 HPLC 層析圖 (Rt 6.94 min)。

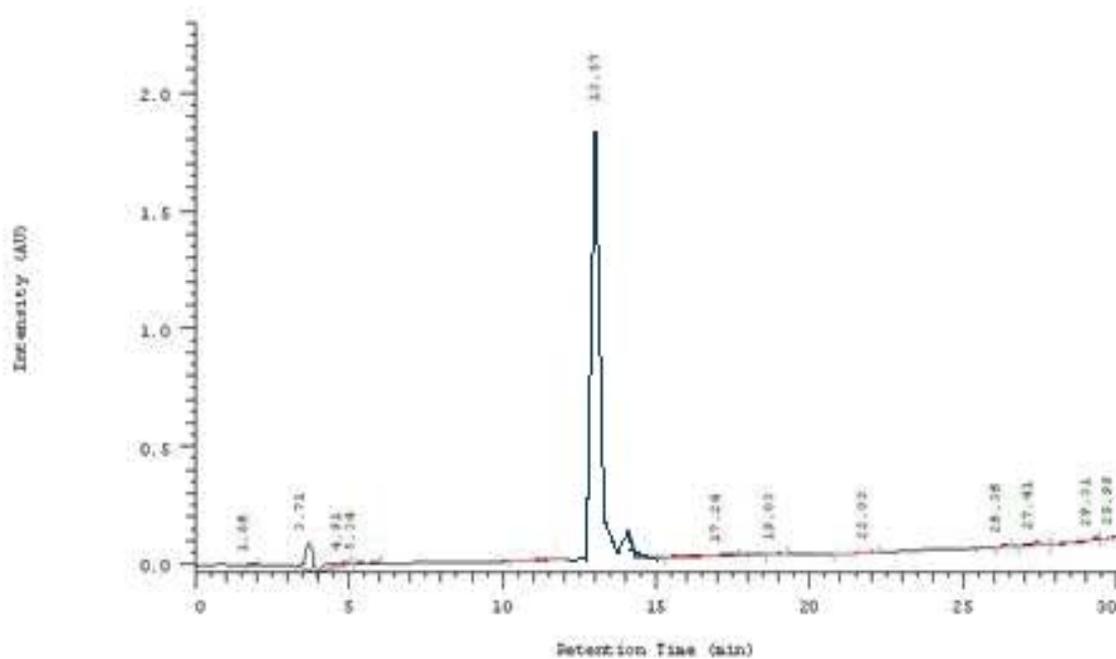


圖 27. 經純化後收集 Linear-P6 之 HPLC 層析圖 (Rt 13.47 min)。

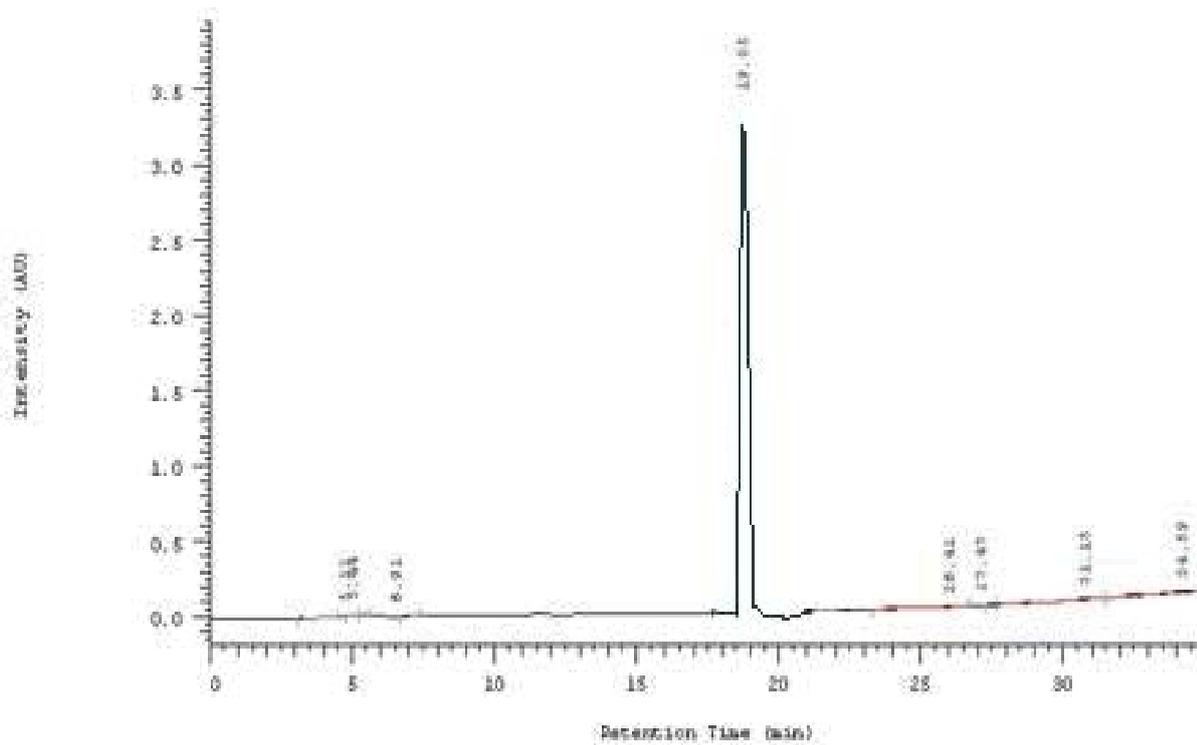


圖 28. 經純化後收集 Linear-P7 之 HPLC 層析圖 (Rt 19.05 min)。

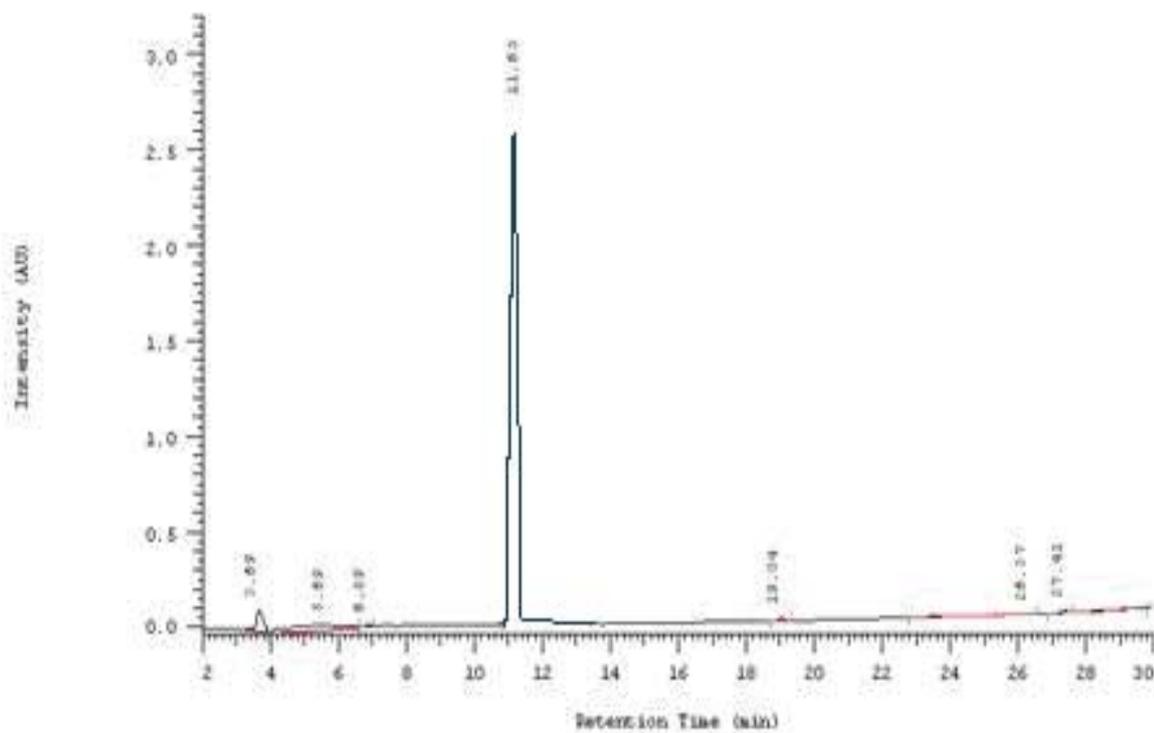


圖 29. 經純化後收集 Linear-P8 之 HPLC 層析圖 (Rt 11.65 min)。

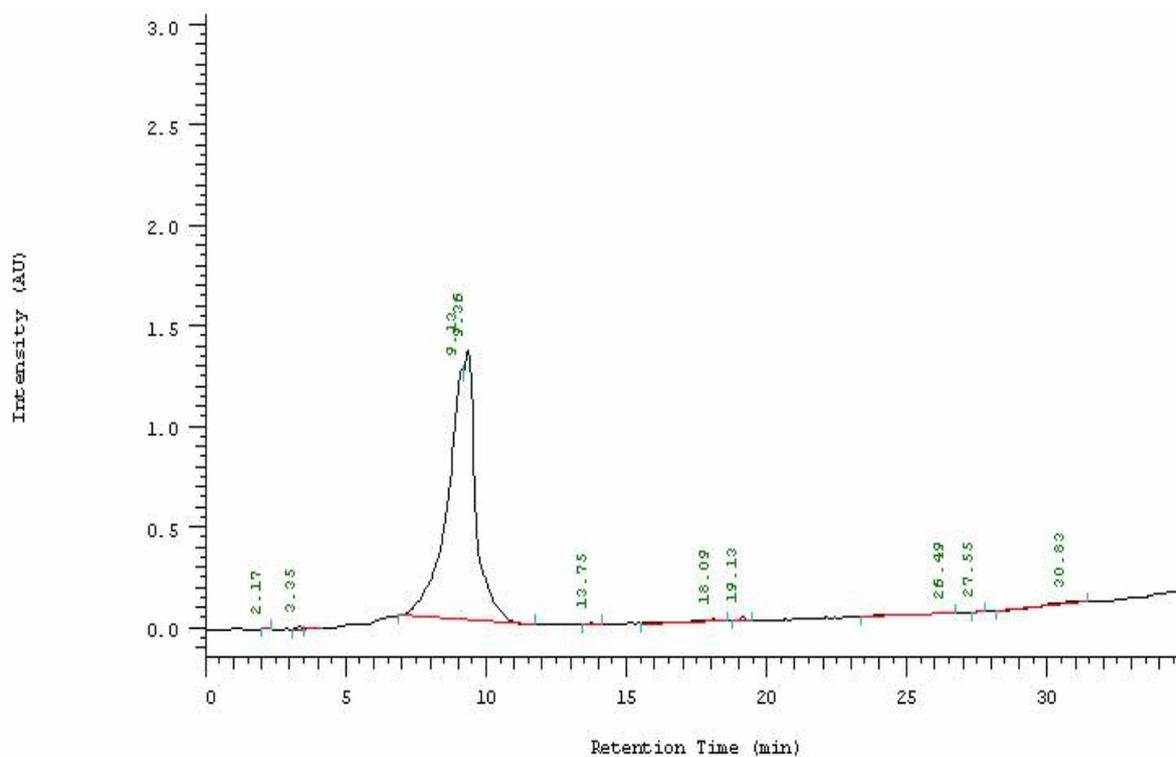


圖 30. 經純化後收集 Linear-P9 之 HPLC 層析圖 (Rt 9.36 min)。

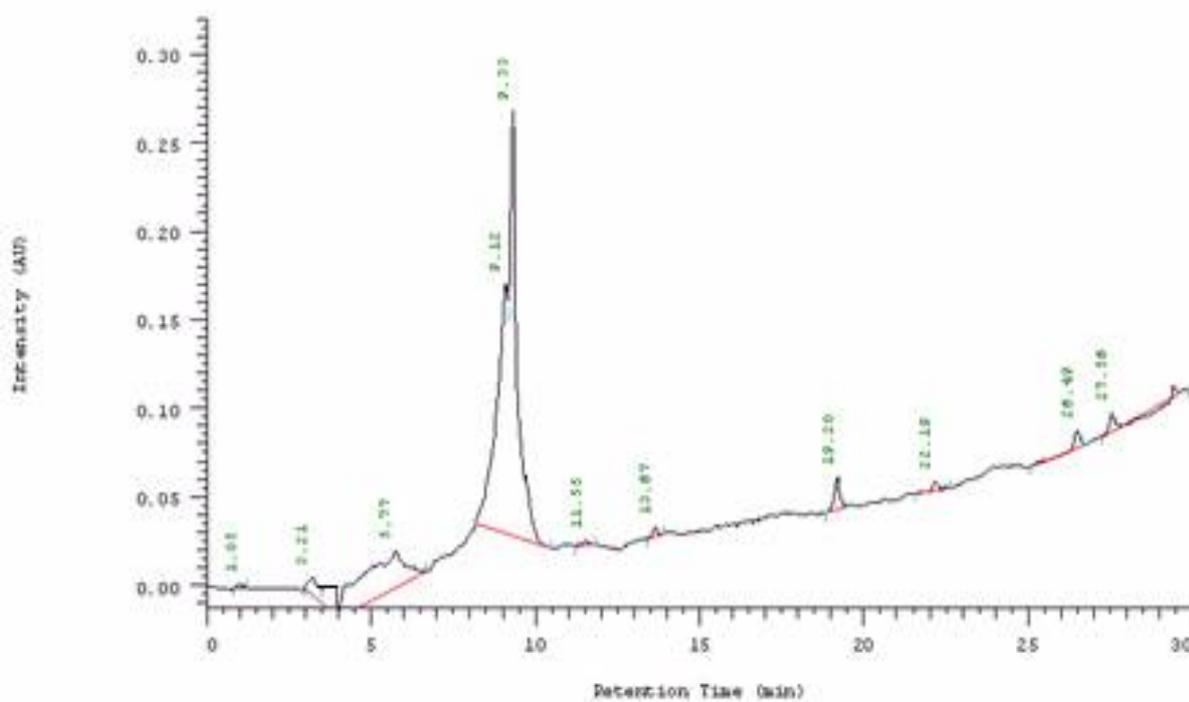


圖 31. 經純化後收集 Linear-P10 之 HPLC 層析圖 (Rt 9.33 min)。

4-1-2 質譜儀鑑定-電灑游離法(ESI-MS)進行分析及鑑定

收集已合成後之線狀胜肽粗產物，其分子量經理論計算與經過 ESI-MS 分析鑑定後，所測得之分子量分別整理如表 9。

表 9. 線狀胜肽之理論分子量與 ESI-MS 分析鑑定後分子量。

胜肽編號	脫水胺基酸 分子量總和	分子量總和計算值	ESI-MS 分子量測量值
Linear-P1	1630.85	1647.85	1647.80
Linear-P2	1547.8	1564.80	1564.80
Linear-P3	1450.52	1467.52	1467.40
Linear-P4	1637.68	1654.68	1654.53
Linear-P5	1504.56	1521.56	1521.60
Linear-P6	1478.52	1495.52	1495.47
Linear-P7	1673.75	1690.75	1690.73
Linear-P8	1674.83	1691.83	1692.06
Linear-P9	1550.69	1567.69	1567.53
Linear-P10	1705.95	1722.95	1722.87

其分析譜圖整理於附件圖 82 ~ 91，証實所測得之分子量分別為質子化胜肽產物。

4-2 環狀胜肽之合成、純化及鑑定

4-2-1 高效能液相層析法(HPLC)進行分析及純化

經環化合成反應所得到的環狀胜肽粗產物，經 RP-HPLC 初步分析後，依據所得之滯留時間(Retention Time, Rt)分別收集並經由 ESI-MS 鑑定後，再次經 RP-HPLC 純化才可得到純物質。每個環狀胜肽的滯留時間與產物產率整理於表 10。

表 10. 環狀胜肽純化後之產物產率與滯留時間。

胜肽編號	產率 (%)	氯乙醯化後，預先純化所得產率 (%)	滯留時間
Cyclic-P1	42.4%	86.6%	10.75
Cyclic-P2	38.5%	83.5%	16.92
Cyclic-P3	45.8%	92.3%	16.45
Cyclic-P4	41.6%	-	14.61
Cyclic-P5	36.9%	-	13.73
Cyclic-P6	46.2%	-	13.55
Cyclic-P7	40.7%	-	10.95
Cyclic-P8	43.5%	-	12.53
Cyclic-P9	39.6%	-	10.67
Cyclic-P10	42.7%	-	10.48

從分析純化後所得數據可觀察到，所有的環狀胜肽，經由 C18 管柱分離所得的滯留時間大都落在 10~17 分鐘之間，其中以 Cyclic-P10 的滯留時間最早，也表示其極性的較大與管柱填充物表面間作用力較小，故較早被沖提出；反之，Cyclic-P2 的極性較小與管柱填充物表面間作用力較強，故較晚被沖提出。而線狀胜肽在氯乙醯化後，得到環化反應前驅物 (linear chloroacetylated peptide)，若未經預純化步驟而進行環化反應所得的環狀胜肽粗產物，經純化所得的產率約在 36.9~46.2% 之間。但我們若利用線狀胜肽在氯乙醯化後，得到環化反應前驅物時，就預先行純化動作確認其為氯乙醯化胜肽之分子量，再進行環化反應，所得環狀胜肽的產物產率較高也較純，純化所得產率可達 83.5~92.3% (在這裡我們將目標鎖定在 Cyclic-P1、Cyclic-P2 和 Cyclic-P3 進行大量的合成製備，以進行接下來的分析實驗)。這是因為我們在合成完氯乙醯化線狀胜肽後所得的生成物，產生的雜物較多，若能預先純化得到環化反應物，在行環化反應時的到的產物也較純淨。環狀胜肽經 RP-HPLC 分析所得的粗產物，必需藉由 ESI-MS 來鑑定是否為正確分子量，才可大量純化以得到最終純的環狀胜肽產物。純化後需再經 RP-HPLC 確認，其層析譜圖整理如圖 32~51，均可得到一明顯的主峰，以確認其被沖提出的滯留時間。

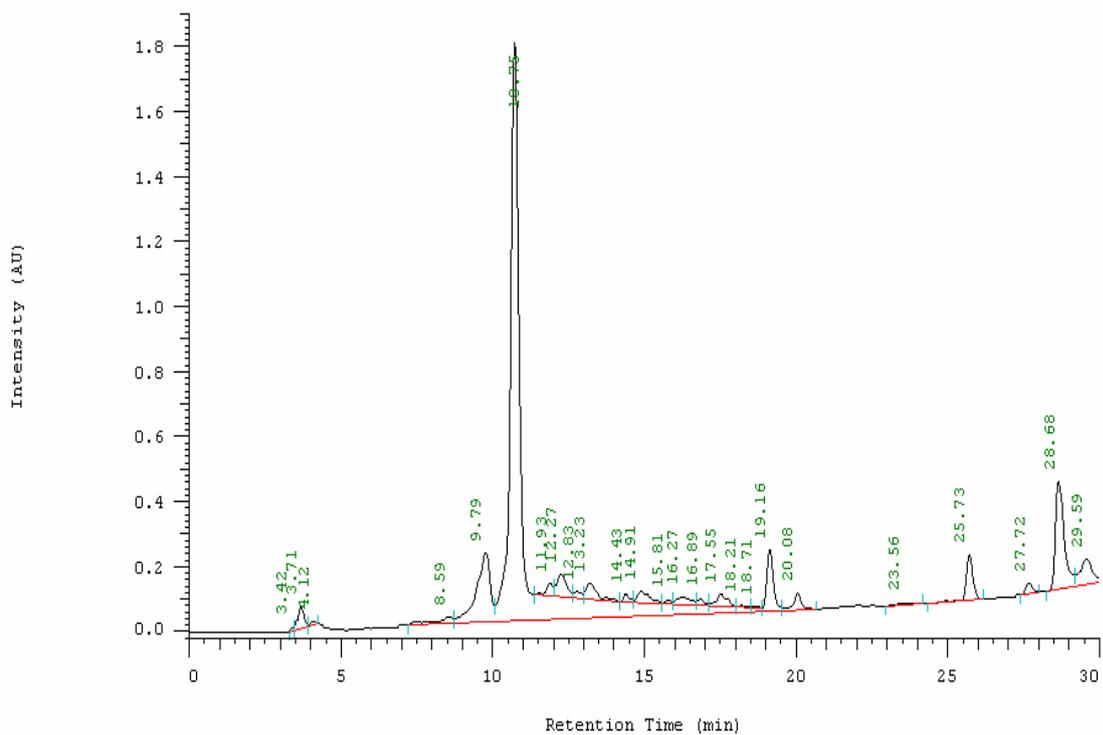


圖 32. 未純化前 Cyclic-P1 之 HPLC 層析圖。

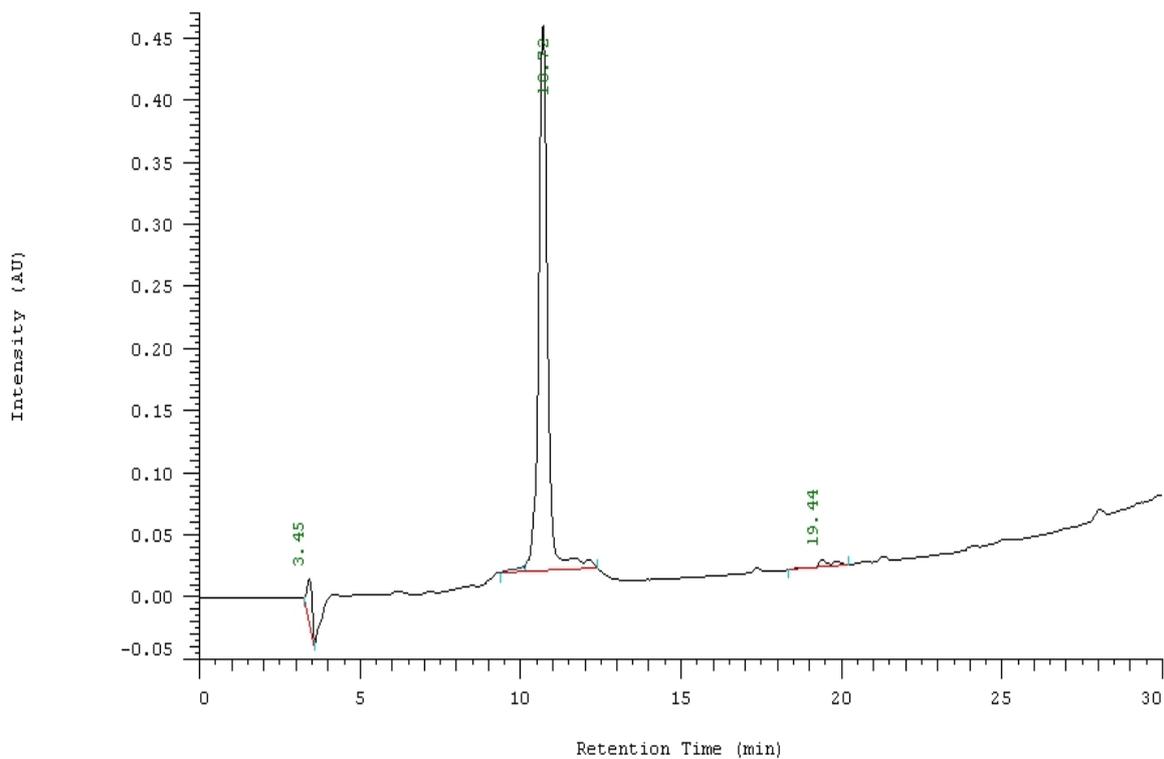


圖 33. 經純化後收集 Cyclic-P1 之 HPLC 層析圖 (Rt 10.75 min)。

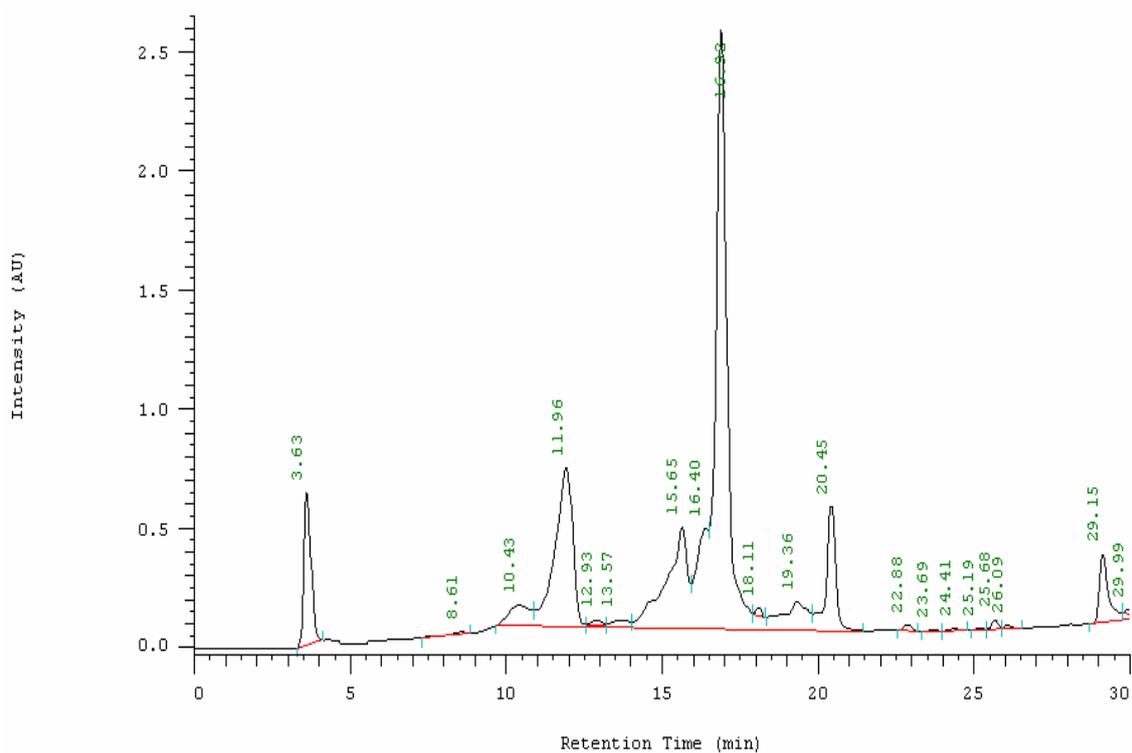


圖 34. 未純化前 Cyclic-P2 之 HPLC 層析圖。

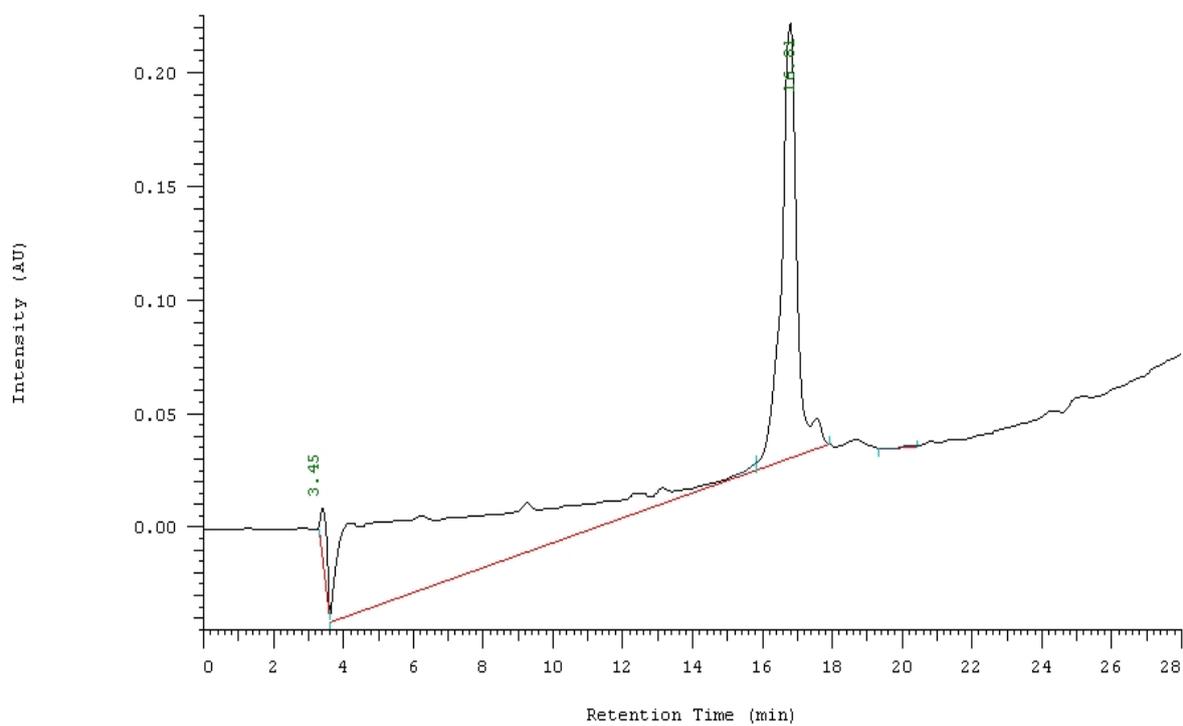


圖 35. 經純化後收集 Cyclic-P2 之 HPLC 層析圖 (Rt 16.92 min)。

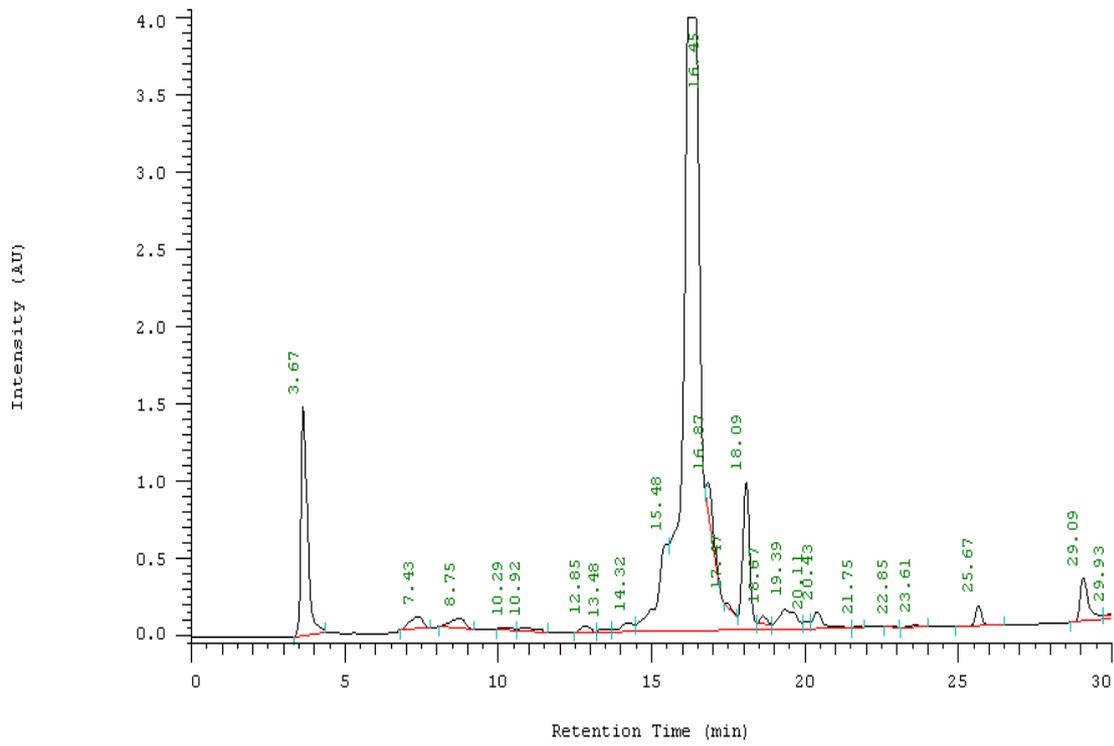


圖 36. 未純化前 Cyclic-P3 之 HPLC 層析圖。

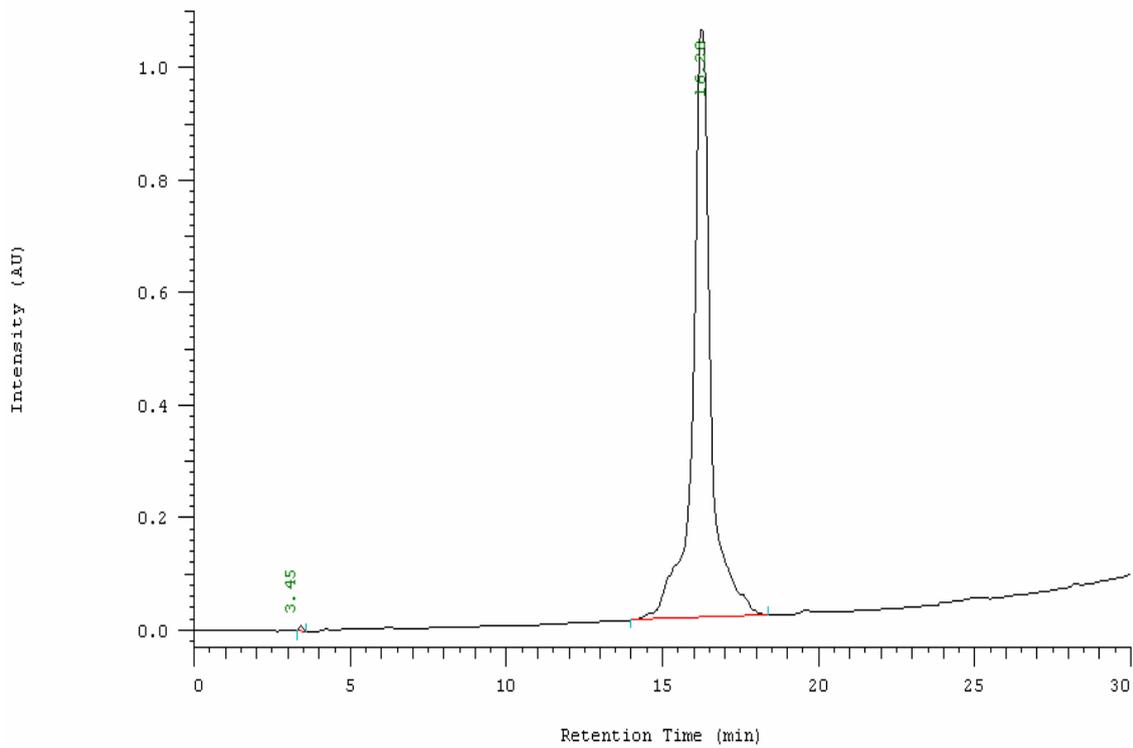


圖 37. 經純化後收集 Cyclic-P3 之 HPLC 層析圖 (Rt 16.45 min)。

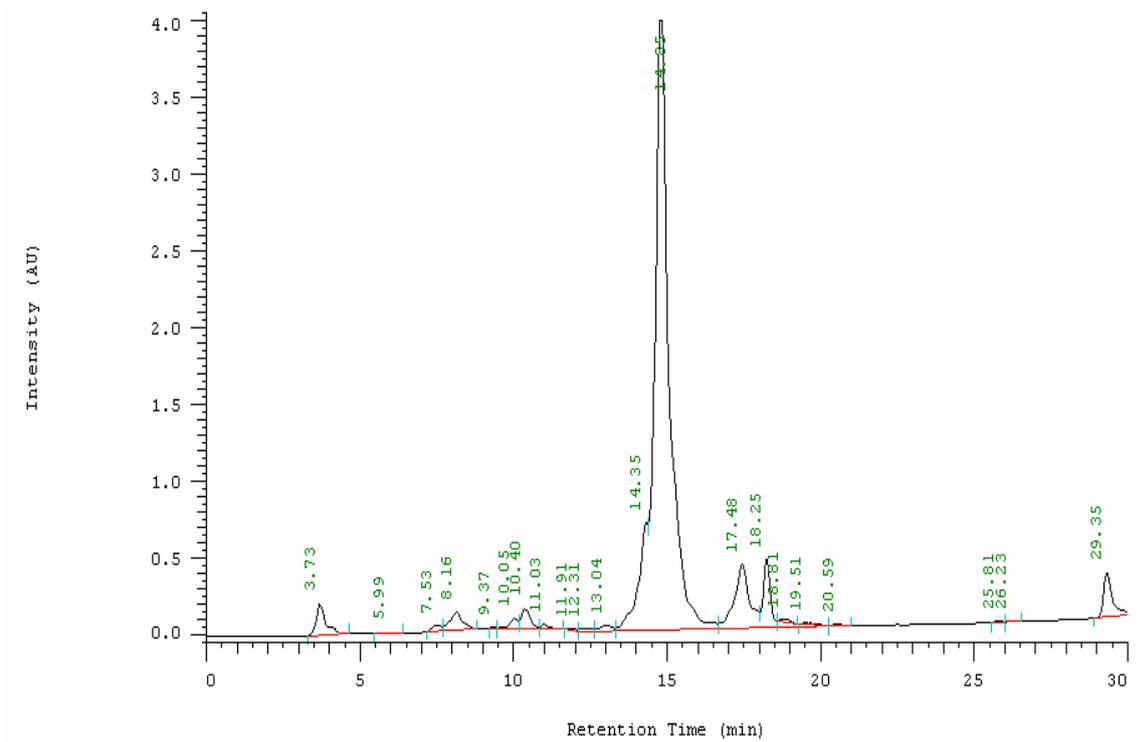


圖 38. 未純化前 Cyclic-P4 之 HPLC 層析圖。

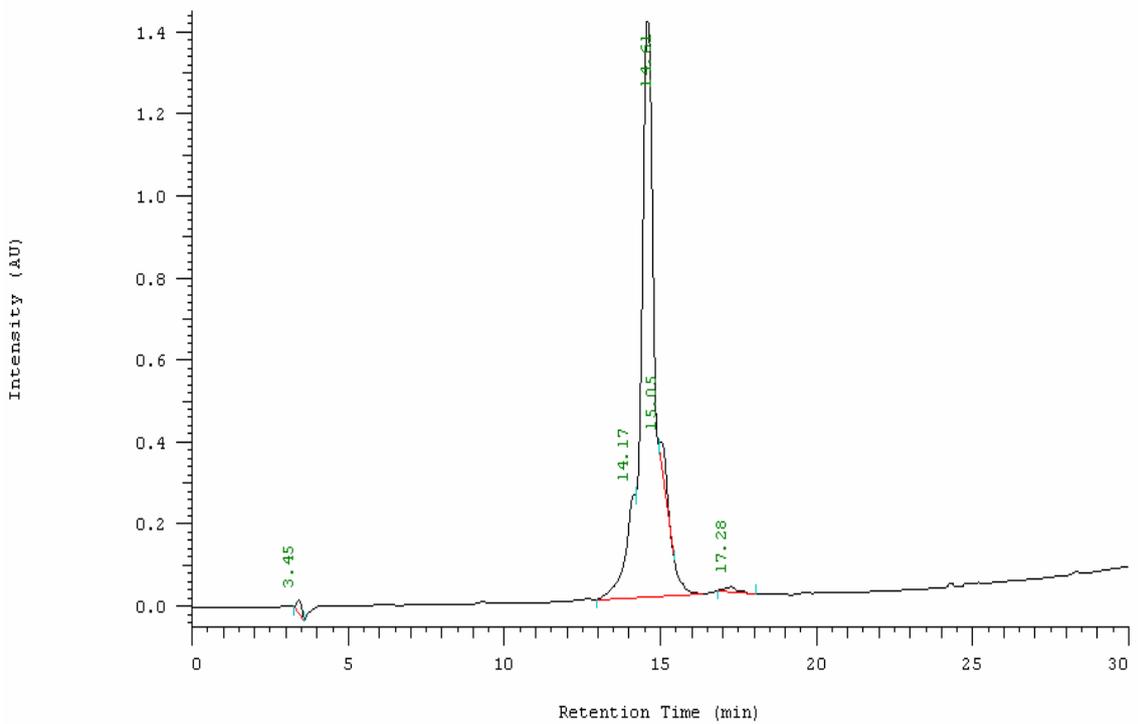


圖 39. 經純化後收集 Cyclic-P4 之 HPLC 層析圖 (Rt 14.61 min)。

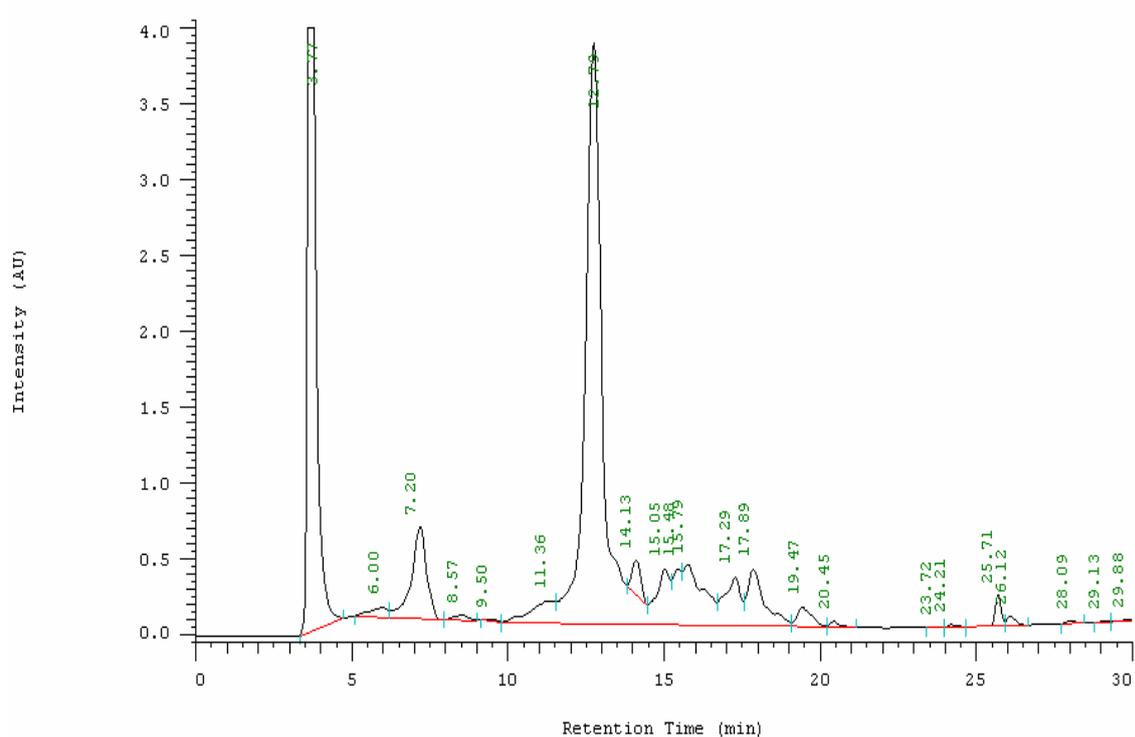


圖 40. 未純化前 Cyclic-P5 之 HPLC 層析圖。

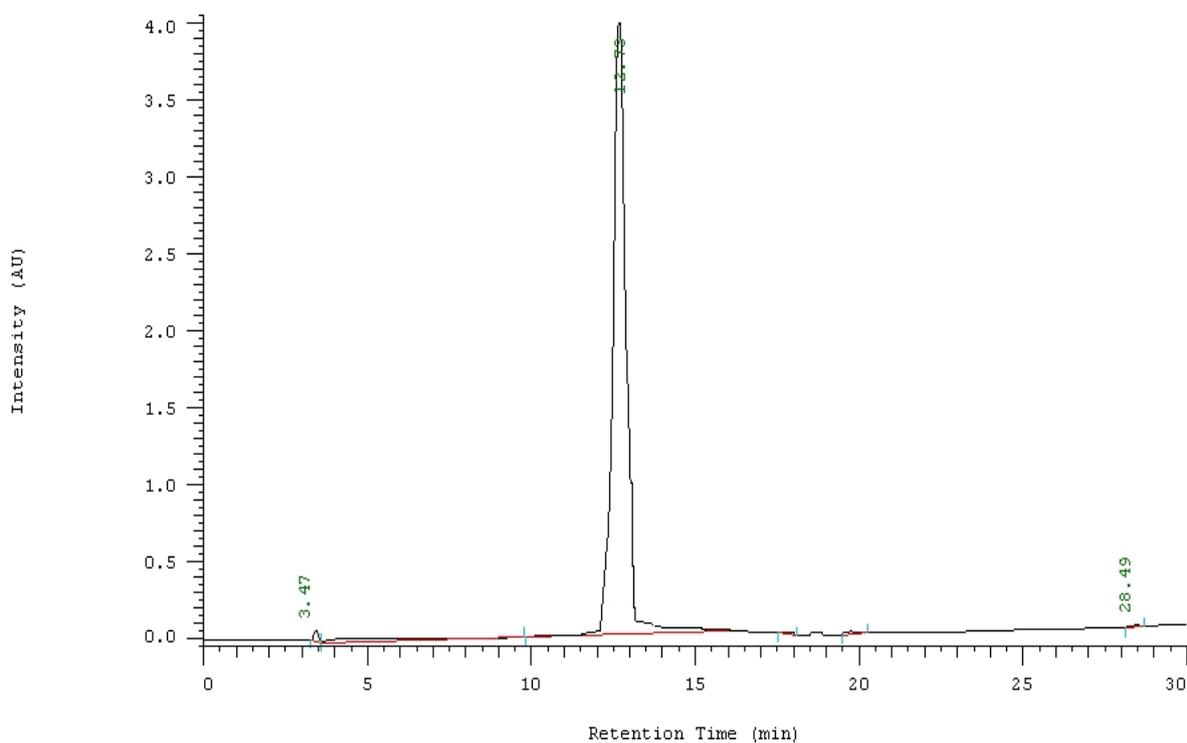


圖 41. 經純化後收集 Cyclic-P5 之 HPLC 層析圖 (Rt 13.73 min)。

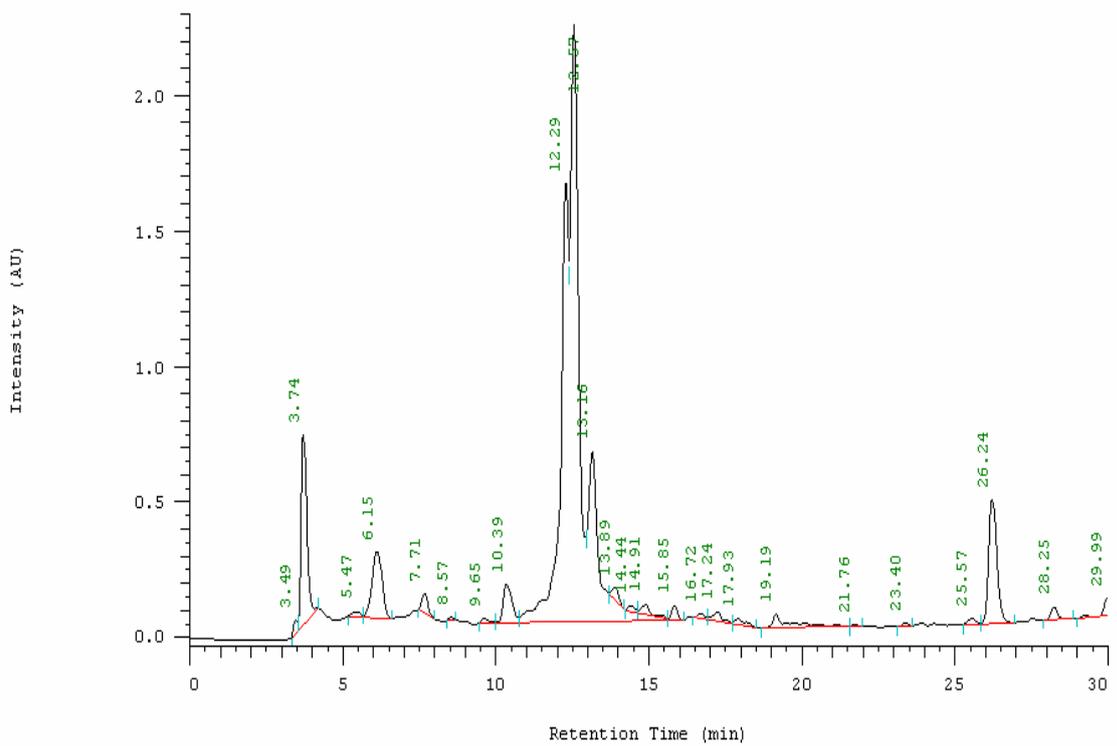


圖 42. 未純化前 Cyclic-P6 之 HPLC 層析圖。

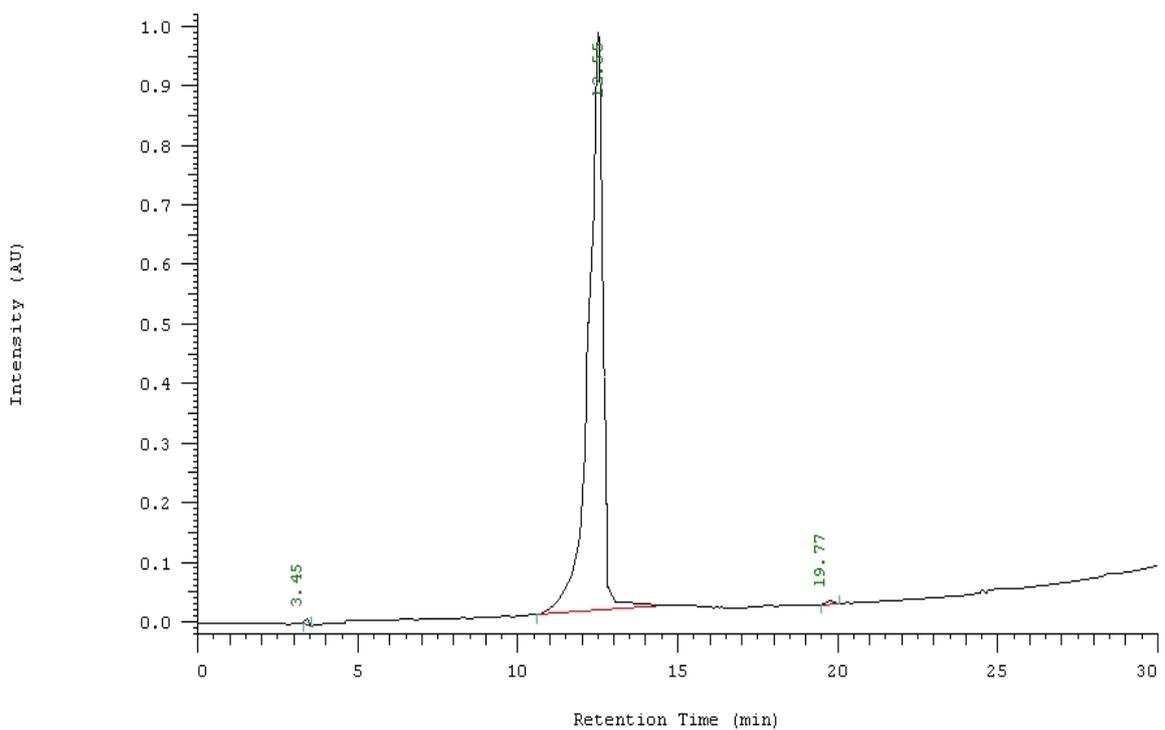


圖 43. 經純化後收集 Cyclic-P6 之 HPLC 層析圖 (Rt 13.55 min)。

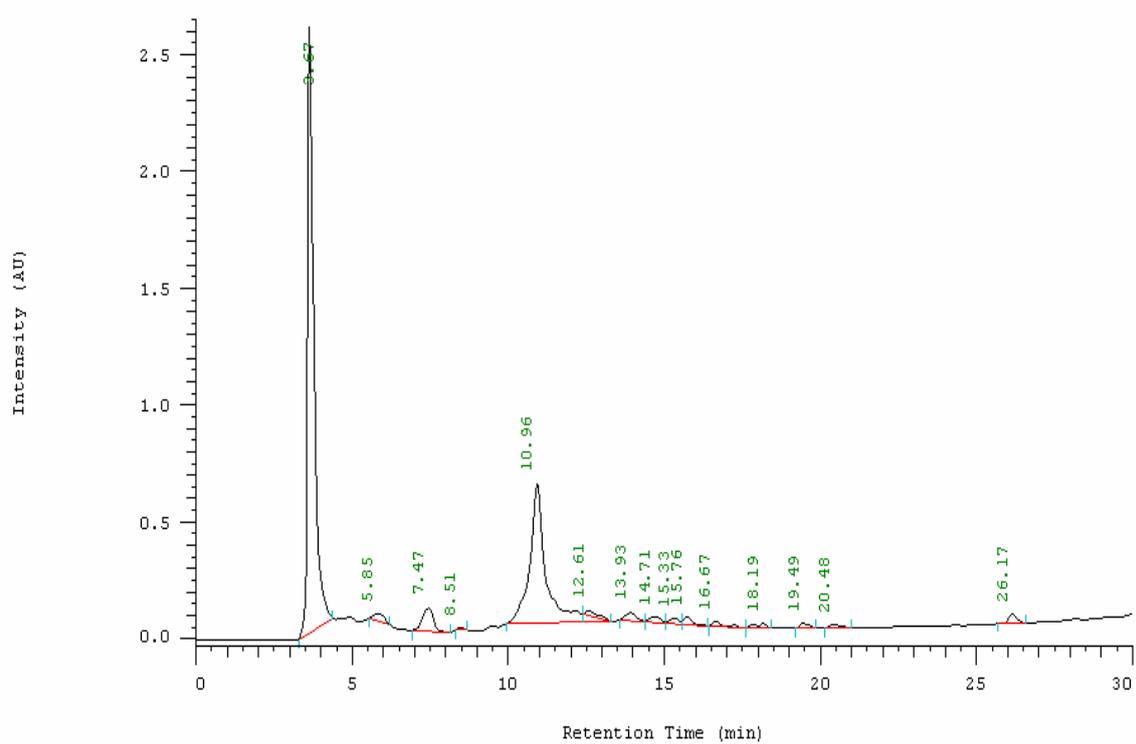


圖 44. 未純化前 Cyclic-P7 之 HPLC 層析圖。

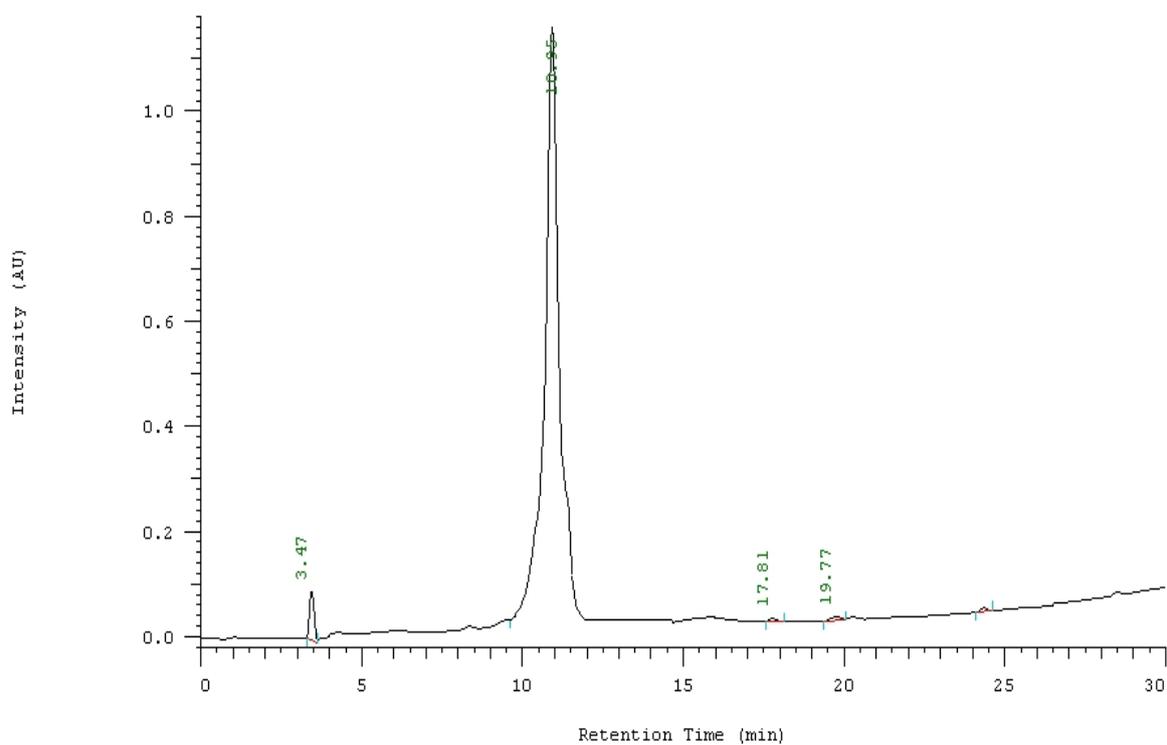


圖 45. 經純化後收集 Cyclic-P7 之 HPLC 層析圖 (Rt 10.95 min)。

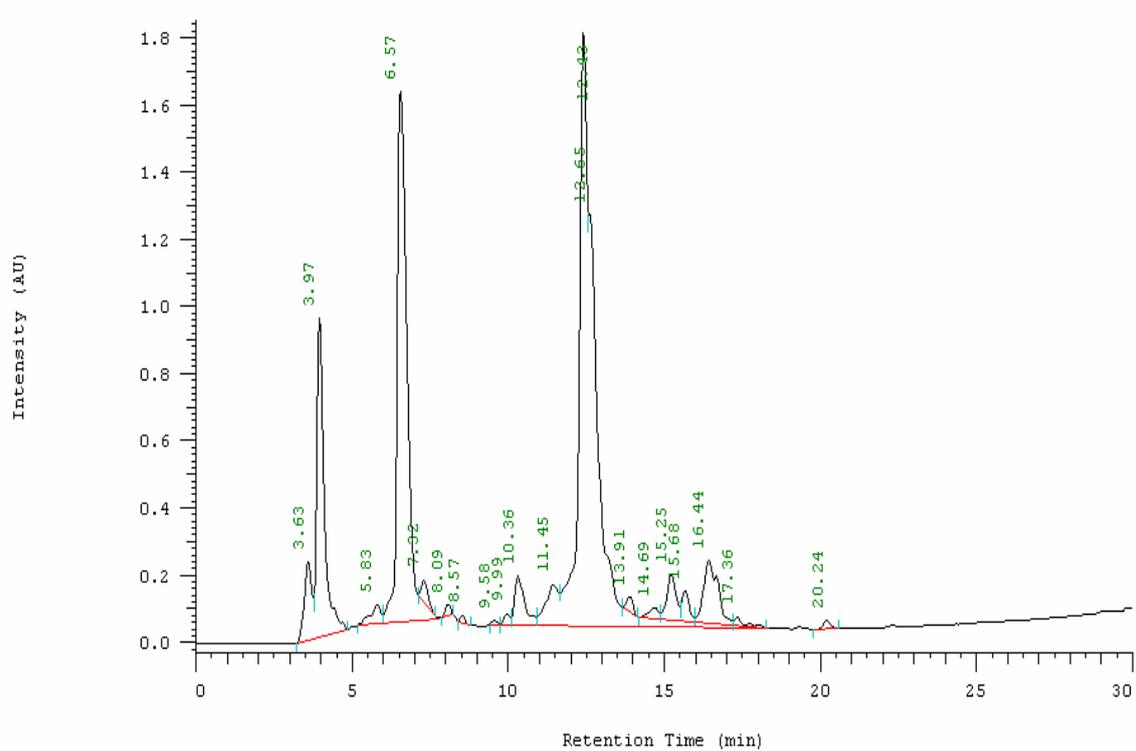


圖 46. 未純化前 Cyclic-P8 之 HPLC 層析圖。

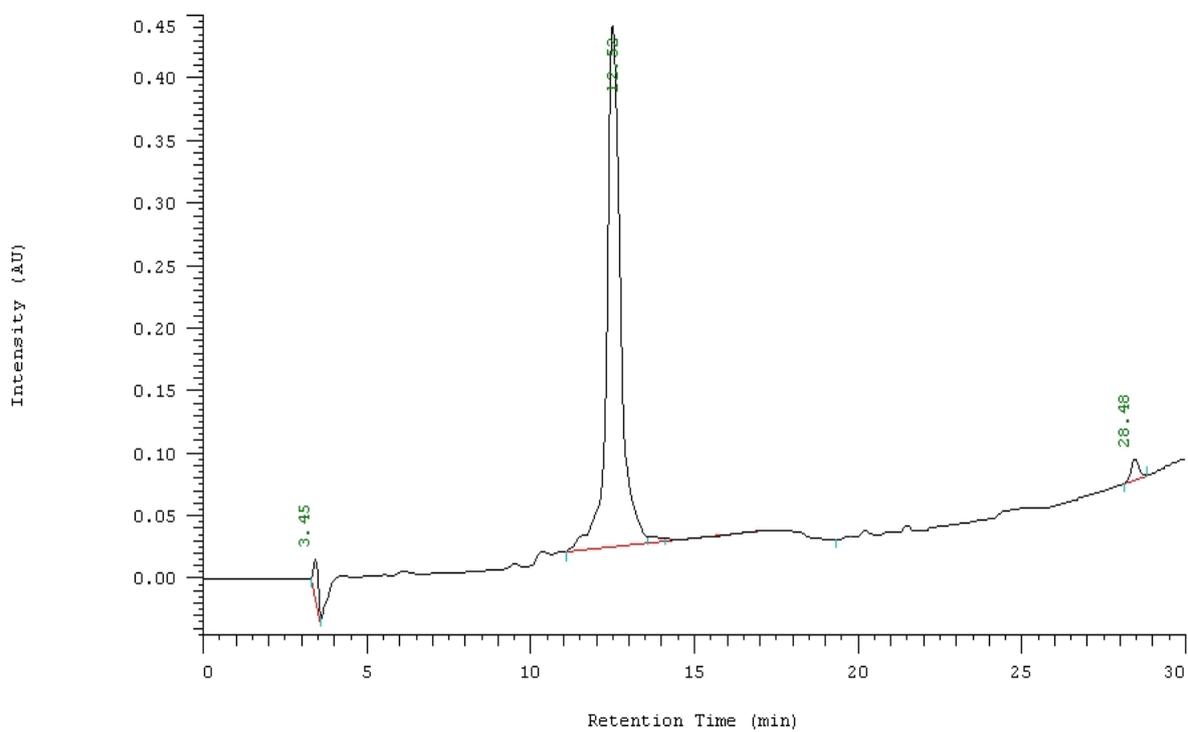


圖 47. 經純化後收集 Cyclic-P8 之 HPLC 層析圖 (Rt 12.53 min)。

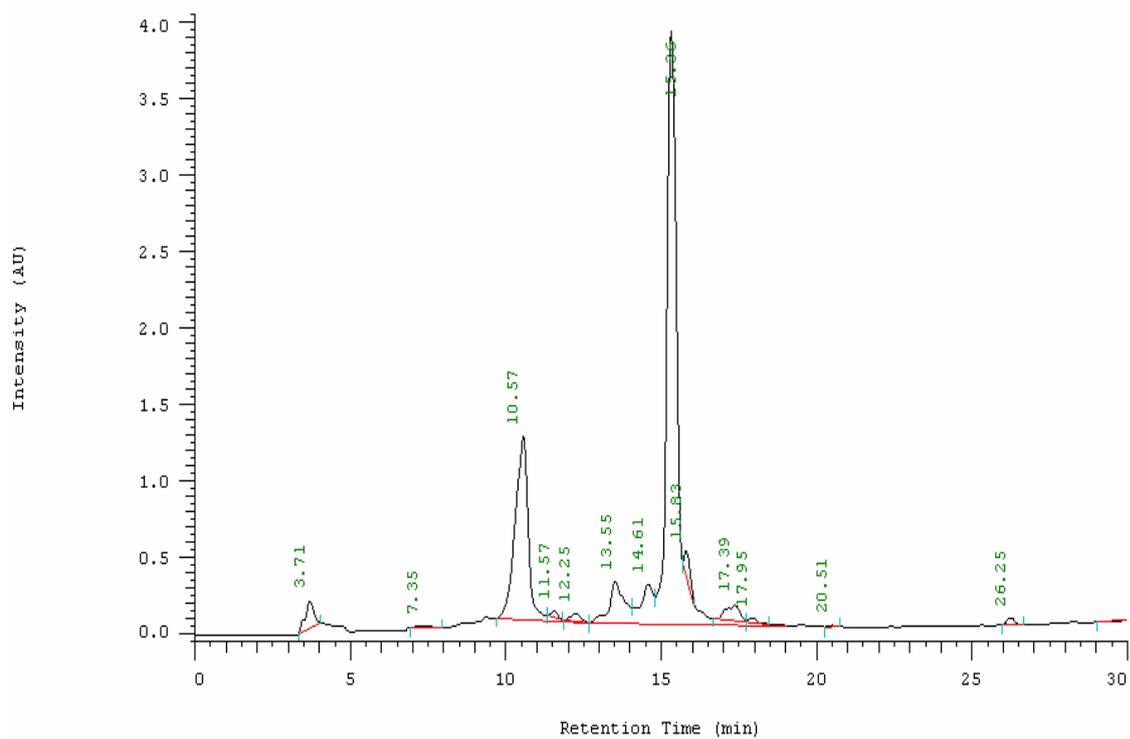


圖 48. 未純化前 Cyclic-P9 之 HPLC 層析圖。

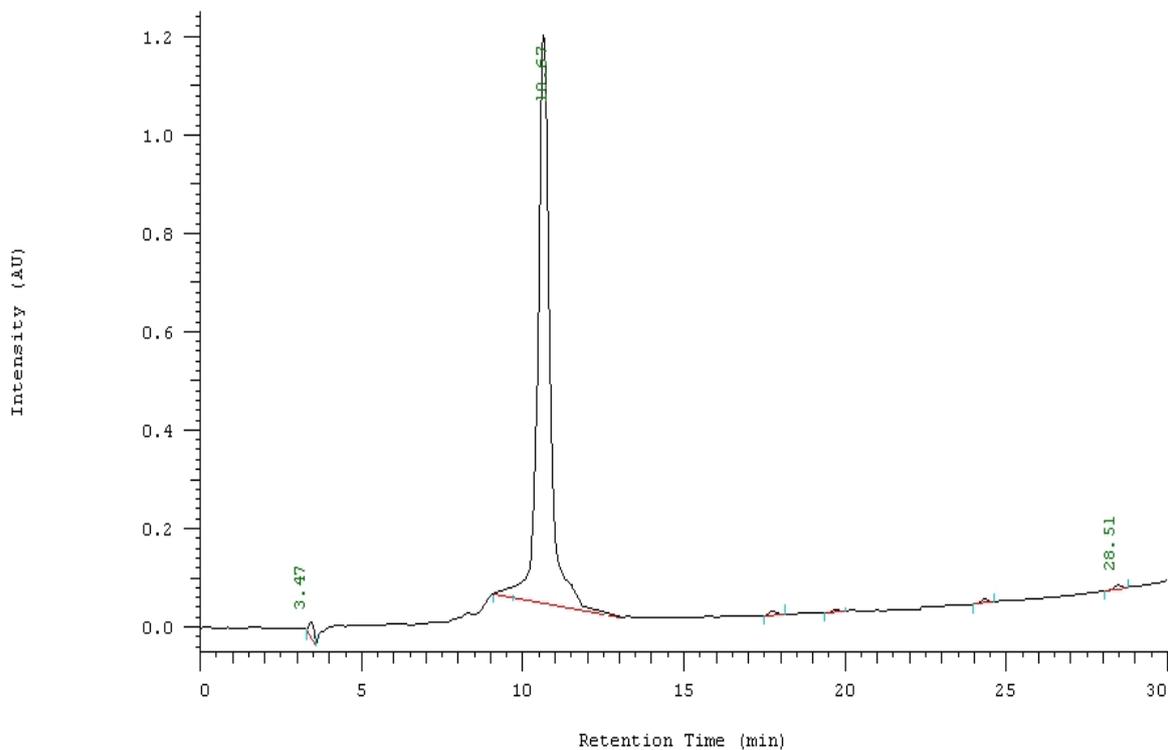


圖 49. 經純化後收集 Cyclic-P9 之 HPLC 層析圖 (Rt 10.67 min)。

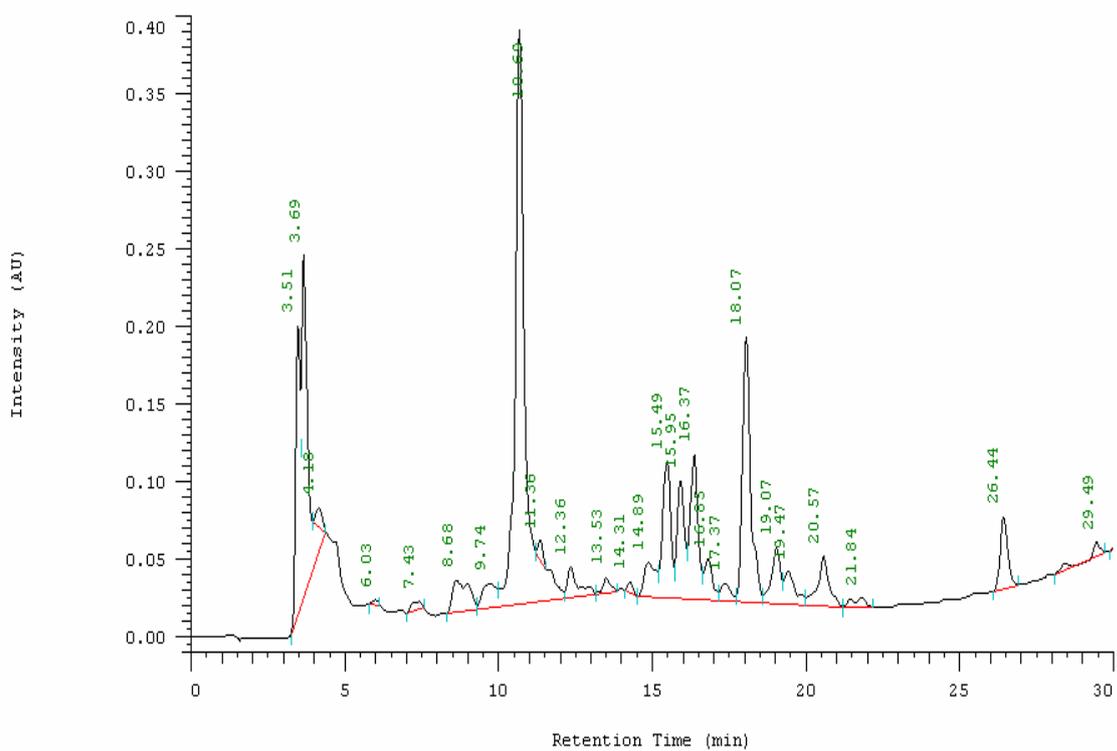


圖 50. 未純化前 Cyclic-P10 之 HPLC 層析圖。

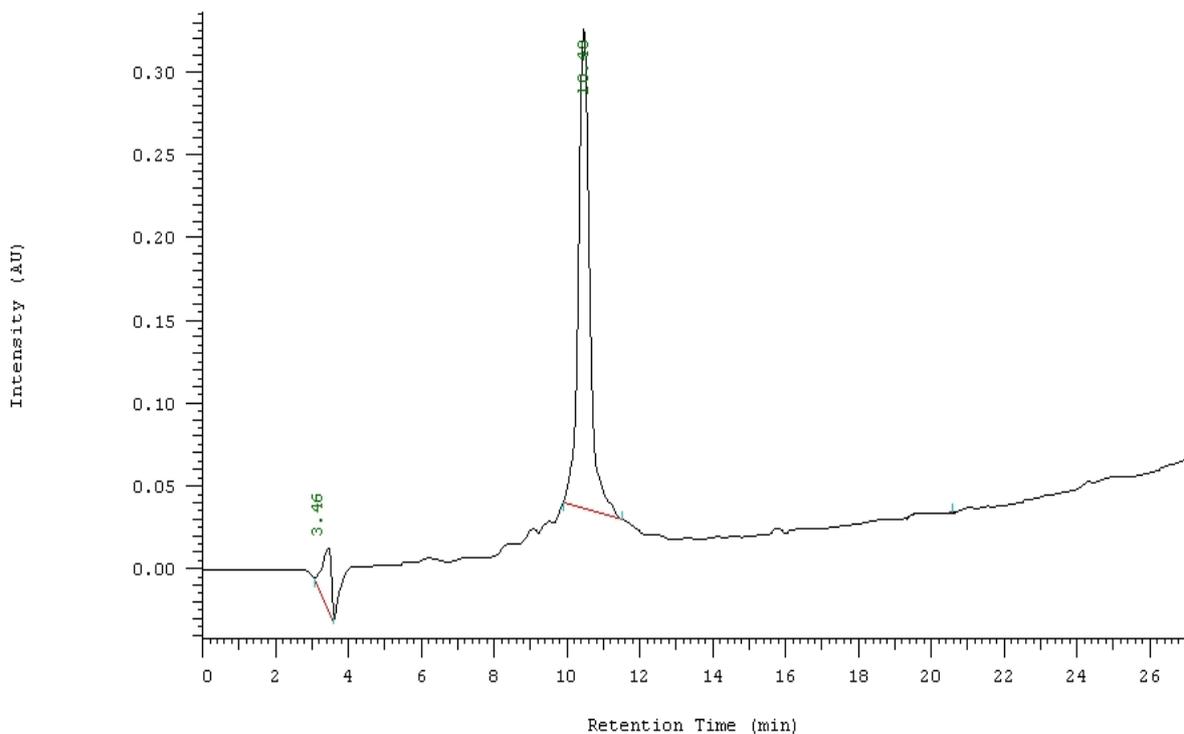


圖 51. 經純化後收集 Cyclic-P10 之 HPLC 層析圖 (Rt 10.48 min)。

4-2-2 質譜儀鑑定-電灑游離法(ESI-MS)進行分析及鑑定

純化收集後之環狀胜肽，其分子量經理論計算與經過 ESI-MS 分析鑑定後，所測得之分子量分別整理如表 11。

表 11. 環狀胜肽之理論計算分子量與 ESI-MS 分析鑑定後分子量的對照表

胜肽編號	脫水胺基酸 分子量總和	分子量總和 計算值	ESI-MS 分子量測量值
Cyclic-P_1	1630.85	1687.85	1688.7
Cyclic-P_2	1547.8	1604.8	1604.9
Cyclic-P_3	1450.52	1507.52	1507.6
Cyclic-P_4	1637.68	1694.68	1694.8
Cyclic-P_5	1504.56	1561.56	1561.1
Cyclic-P_6	1478.52	1535.52	1536.3
Cyclic-P_7	1673.75	1744.5	1745.2
Cyclic-P_8	1674.83	1731.83	1732.5
Cyclic-P_9	1550.69	1607.69	1607.5
Cyclic-P_10	1705.95	1762.95	1763.7

其層析譜圖整理於附件圖 92~101，証實所測得之分子量分別為質子化胜肽產物。

4-3 UV-Vis 光譜儀分析結果

4-3-1 線狀與環狀胜肽之 UV-Vis 吸收光譜

我們取已稀釋 1/1000 倍的 anti-NTx 抗體 1 mL，分別與濃度 1 mM、 $50\ \mu\text{l}$ 的線狀和環狀胜肽做結合反應，利用 UV-Vis 光做光譜測量，可觀察到其吸收峰波長，線狀與環狀胜肽的吸收光譜圖整理如圖 52 與圖 53。

在圖 52 中，可得知抗體與抗原-抗體結合後的吸引峰波長，黑線為 anti-NTx 抗體，吸收峰波長分別在 215 與 280 nm；藍線為 Linear-P1 與抗體結合，吸收峰波長分別在 215 與 280 nm；紅線為 Linear-P2 與抗體結合，吸收峰波長分別在 215 與 275 nm；淺藍線為 Linear-P3 與抗體結合，吸收峰波長分別在 215 與 280 nm。

在圖 53 中，紅色線為 Cyclic-P1；黑色線為 Cyclic-P2，與抗體結合後之吸收峰波長剛好分別在 215 與 270 nm；藍線為 Cyclic-P3，與抗體結合後之吸收峰波長分別在 210 與 280nm。在確認所有胜肽樣品與抗體結合後的吸收峰波長，固定其吸收峰波長來進行動力學之測量。

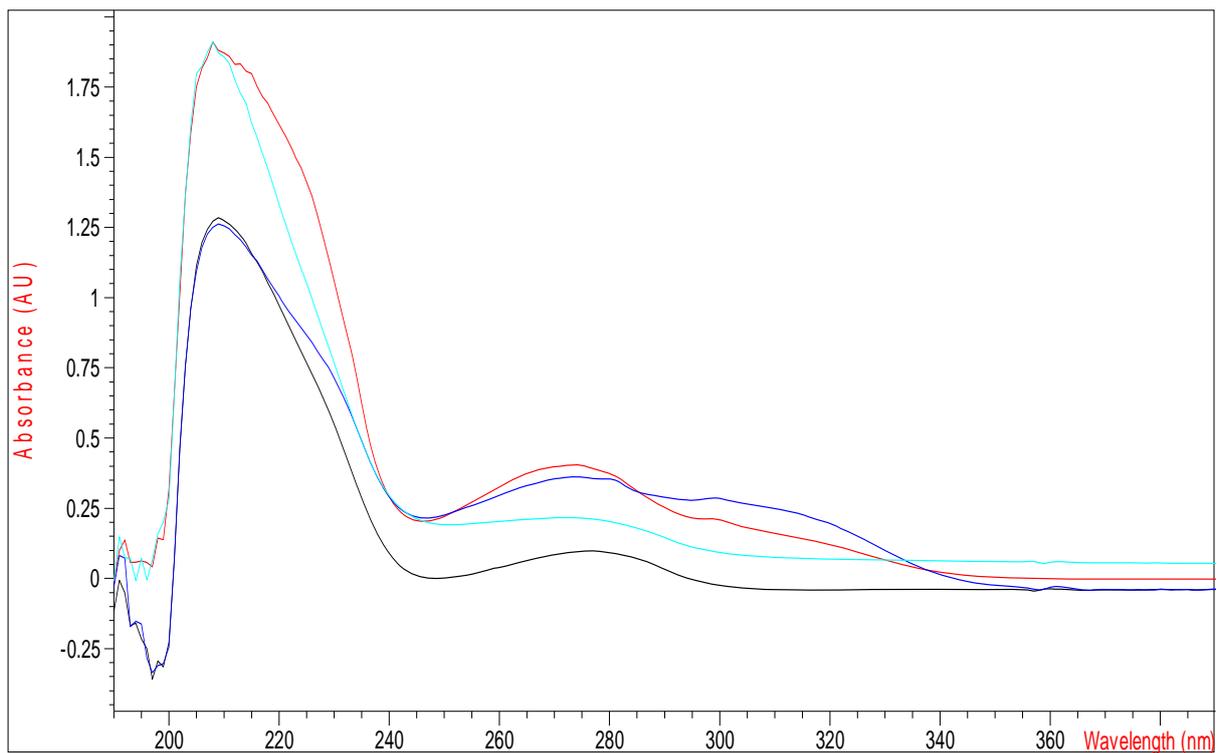


圖 52. 線狀胜肽樣品與抗體結合後的吸收光譜圖。

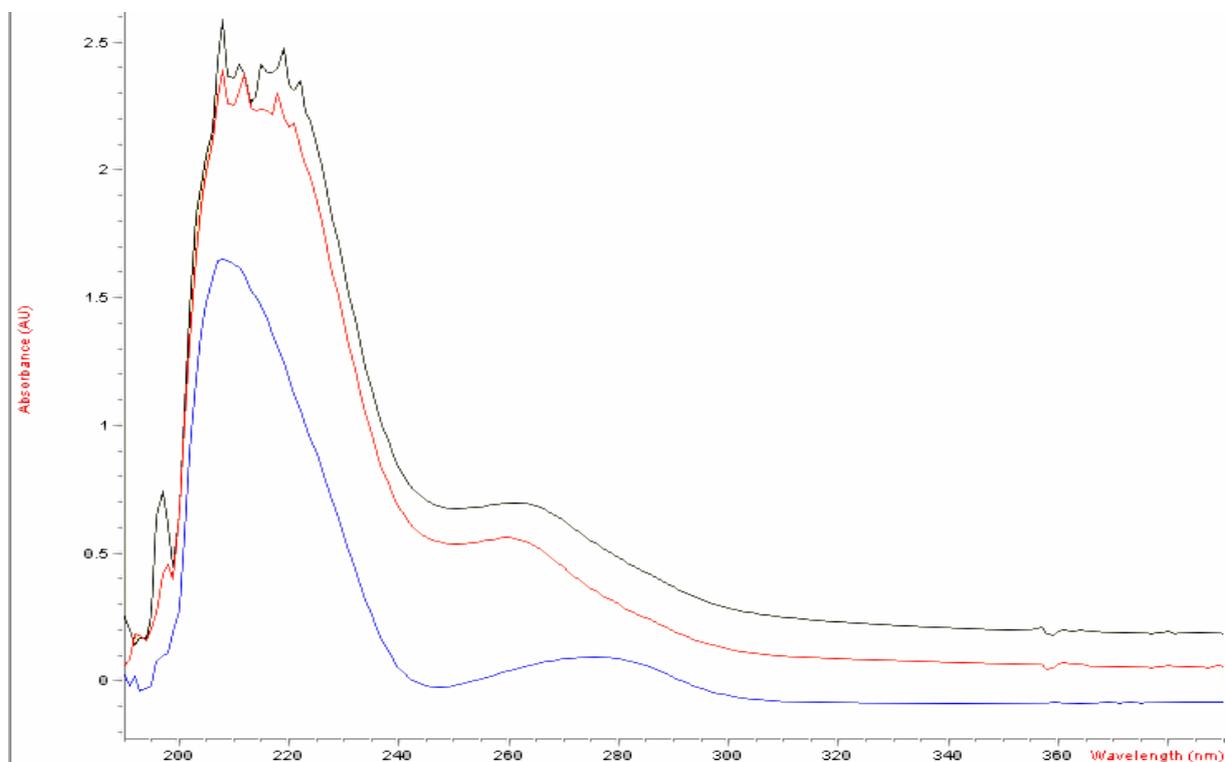


圖 53. 環狀胜肽樣品與抗體結合後的吸收光譜圖。

4-3-2 動力學量測結果

胜肽樣品與抗體進行結合反應時後，固定其吸收峰波長 275 nm 來進行動力學之測量，在動力學探討中，我們將所有的胜肽樣品保持在過量濃度下進行反應，相反的將 anti-NTx 做大量稀釋。使得每個抗體都有分析物與其做結合，讓反應在短時間內達到飽和狀態。設定在擬一級反應條件下進行，取濃度 1 mM、0.5 mM、0.25 mM 及 0.125 mM 的胜肽樣品 50 μ l 與抗體進行反應，我們可觀察到反應的吸收值對時間做圖呈指數曲線的變化。線狀胜肽利用反應吸收值對時間做圖，其結果如圖.54~56，可從偵測結果觀察到反應吸收值對時間做圖，反應達到飽和時的吸收值以 Linear-P2 最高，其次為 Linear-P3，最低為 Linear-P1。而環狀胜肽亦利用反應吸收值對時間做圖，其結果如圖.57~59，反應達到飽和時的吸收值以 Cyclic-P2 最高，其次為 Cyclic-P1，最低為 Cyclic-P3。若將所有胜肽樣品做飽和吸收值大小的比較（以濃度 1 mM 為例），結果為 Cyclic-P2 為 0.4512 (AU)，Cyclic-P1 為 0.3345 (AU)，Cyclic-P3 為 0.2993 (AU)，Linear-P2 為 0.2257 (AU)，Linear-P3 為 0.1656 (AU)，Linear-P1 為 0.1428 (AU)。

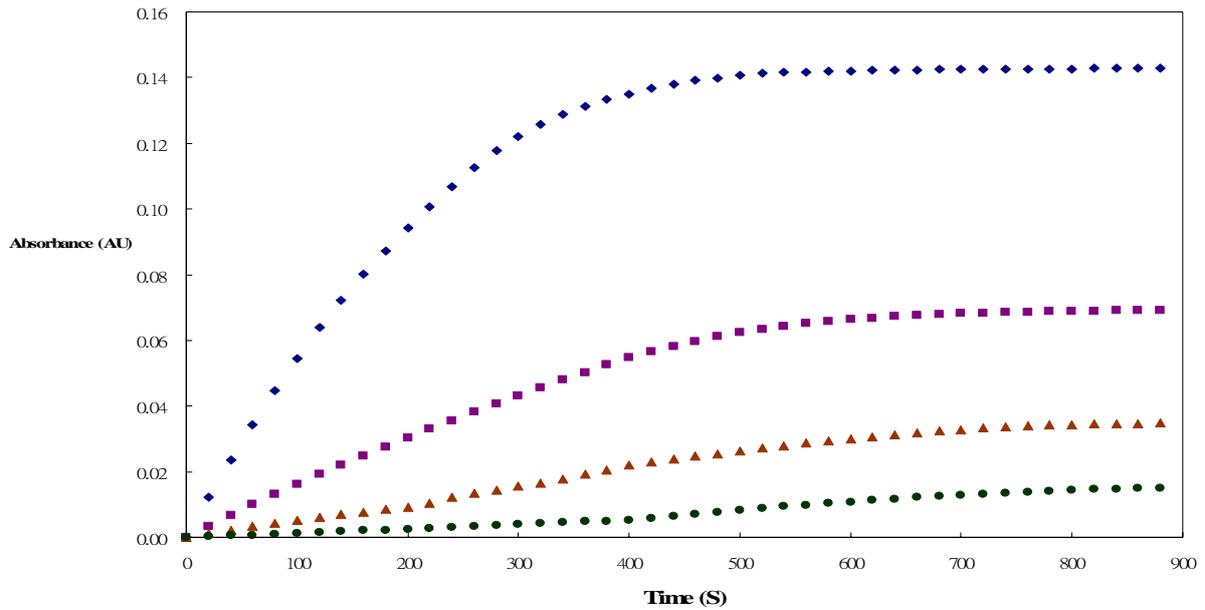


圖 54. Linear-P1 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖。

- ◆ 數列 1：. Linear-P1，1 mM，50 μ L
- 數列 2：. Linear-P1，0.5 mM，50 μ L
- ▲ 數列 3：. Linear-P1，0.25 mM，50 μ L
- 數列 4：. Linear-P1，0.125 mM，50 μ L

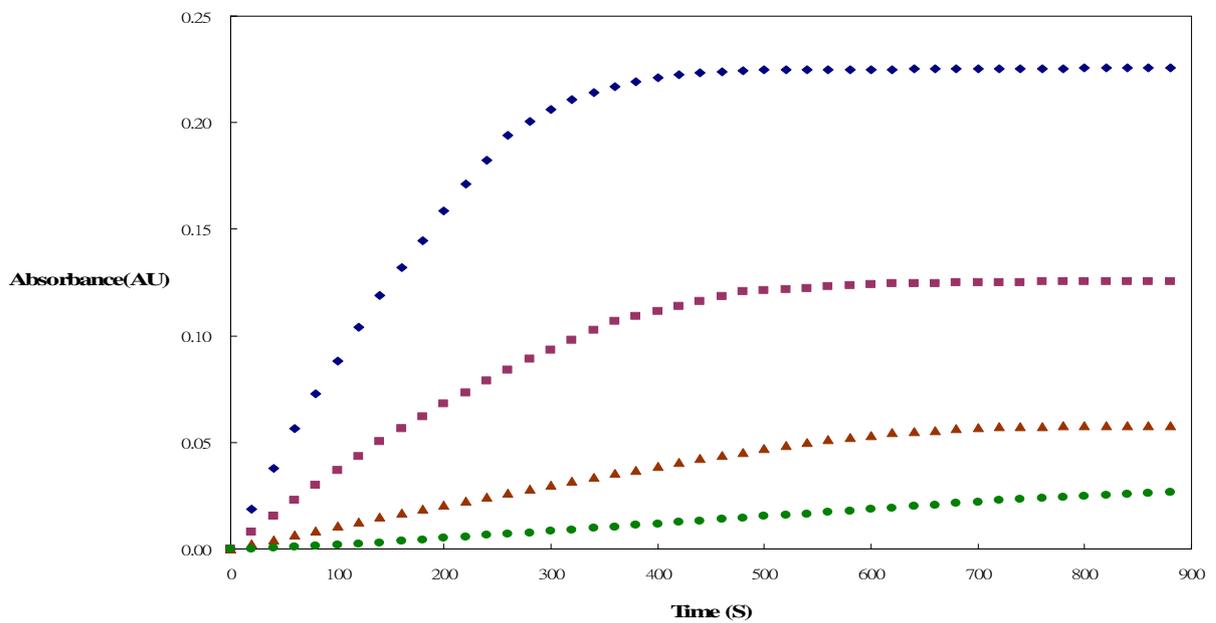


圖 55. Linear-P2 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖。

- ◆ 數列 1：. Linear-P2，1 mM，50 μ L
- 數列 2：. Linear-P2，0.5 mM，50 μ L
- ▲ 數列 3：. Linear-P2，0.25 mM，50 μ L
- 數列 4：. Linear-P2，0.125 mM，50 μ L

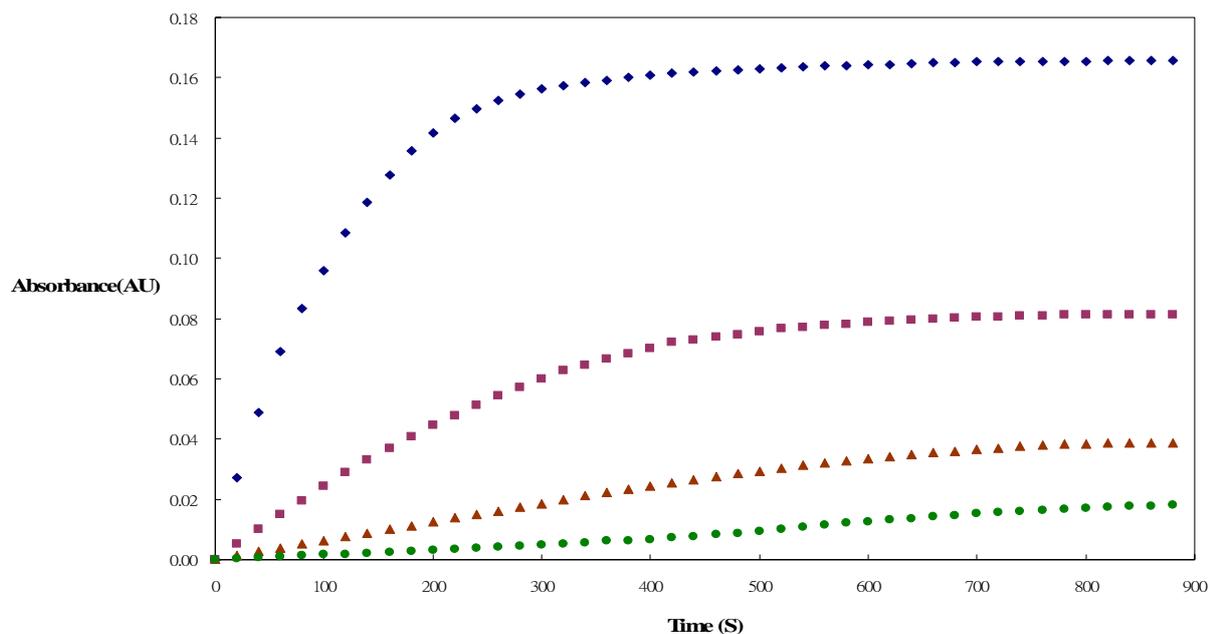


圖 56. Linear-P3 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖。

- ◆ 數列 1：. Linear-P3，1 mM，50 μ L
- 數列 2：. Linear-P3，0.5 mM，50 μ L
- ▲ 數列 3：. Linear-P3，0.25 mM，50 μ L
- 數列 4：. Linear-P3，0.125 mM，50 μ L

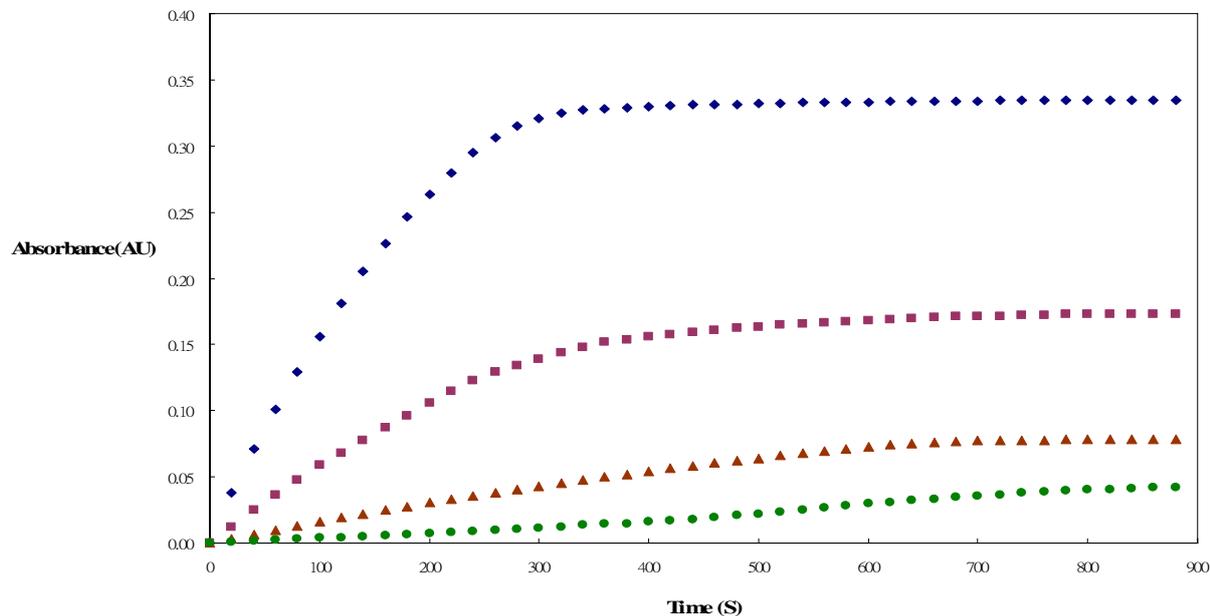


圖 57. Cyclic-P1 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖。

- ◆ 數列 1：. Cyclic-P1，1 mM，50 μ L
- 數列 2：. Cyclic-P1，0.5 mM，50 μ L
- ▲ 數列 3：. Cyclic-P1，0.25 mM，50 μ L
- 數列 4：. Cyclic-P1，0.125 mM，50 μ L

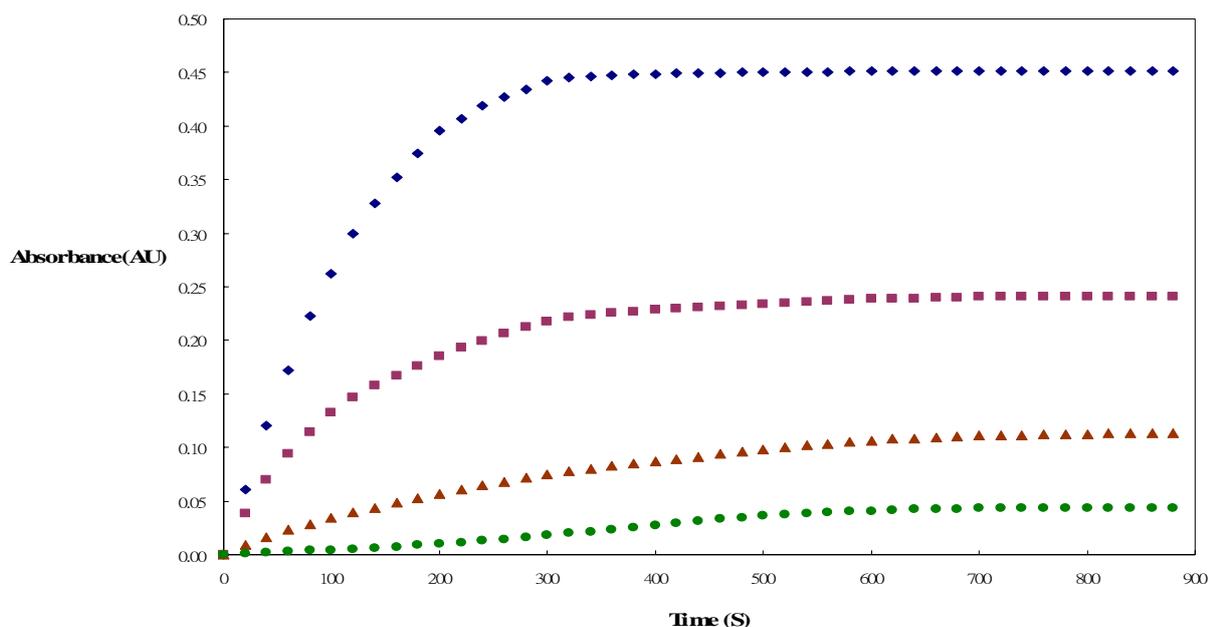


圖 58. Cyclic-P2 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖。

- ◆ 數列 1：. Cyclic-P2，1 mM，50 μ L
- 數列 2：. Cyclic-P2，0.5 mM，50 μ L
- ▲ 數列 3：. Cyclic-P2，0.25 mM，50 μ L
- 數列 4：. Cyclic-P2，0.125 mM，50 μ L

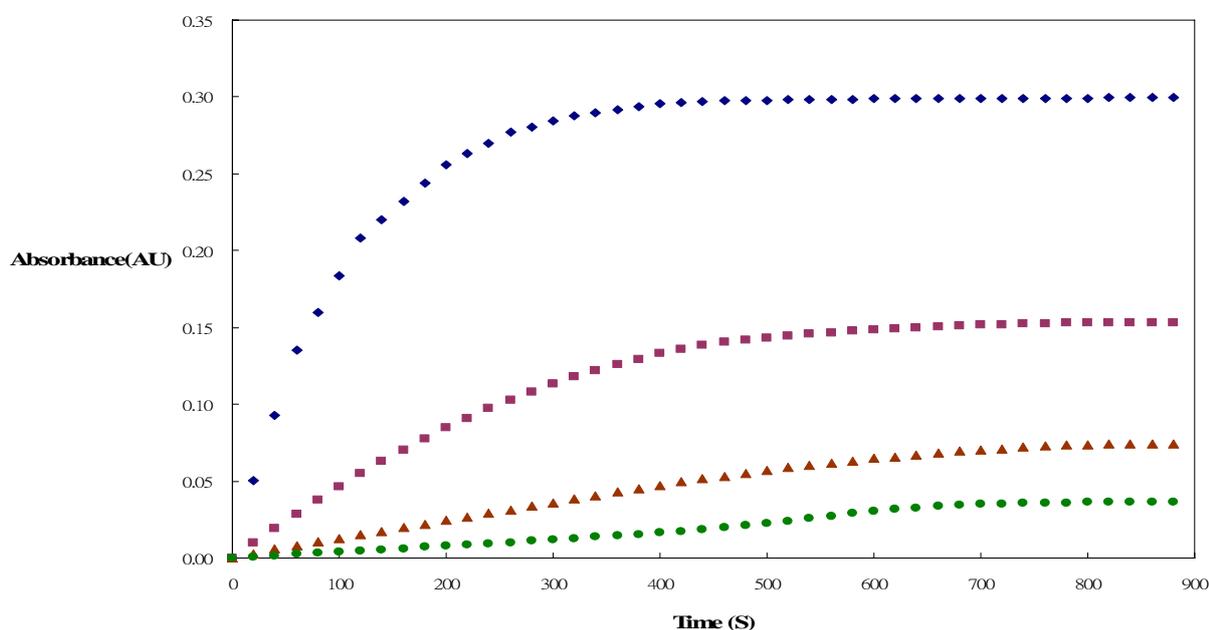


圖 59. Cyclic-P3 與抗體結合反應，單位時間內吸收值變化圖。

- ◆ 數列 1：. Cyclic-P3，1 mM，50 μ L
- 數列 2：. Cyclic-P3，0.5 mM，50 μ L
- ▲ 數列 3：. Cyclic-P3，0.25 mM，50 μ L
- 數列 4：. Cyclic-P3，0.125 mM，50 μ L

從所得到的反應吸收值對時間變化的圖形上可觀察得知，反應的曲線均在短時間內達到飽和，並呈單指數曲線，一般的反應速率公式為 $\text{Rate} = -d[E]/dt = k_1[S][E]$ ，將公式推導處理後，可得到 $\ln(A_i - A_t)$ 對時間的變化，將 $\ln(A_i - A_t)$ 取絕對值對時間來作圖，其結果呈現線性關係。我們以Linear-P1在濃度 0.25 mM與 0.125 mM下，與抗體做反應後所得之吸收值對時間變化圖來說明數據處理，利用 $\ln | A_i - A_t |$ 對時間作圖其結果如圖 60 與圖 61，其結果呈線性關係圖，再應用線性最小平方差 (linear least-square fit) 可得線性趨勢線，其斜率即為反應觀測速率常數 (k_{obs})。Linear-P1 濃度在 0.25 mM下， $\ln | A_i - A_t |$ 對時間作圖，線性趨勢線其斜率值為 $0.0021 (\text{S}^{-1})$ 、 $0.126 (\text{min}^{-1})$ ，濃度在 0.125 mM下， $\ln | A_i - A_t |$ 對時間作圖，線性趨勢線其斜率值為 $0.0011 (\text{S}^{-1})$ 、 $0.066 (\text{min}^{-1})$ 。我們將線狀胜肽樣品在不同濃度下，所得到之反應觀測速率常數 (k_{obs}) 的結果整理於表 12，環狀胜肽在不同濃度下，所得到之反應觀測速率常數 (k_{obs}) 的結果整理於表 13。

然後再利用反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對各個濃度來作圖得到線性關係圖，其結果相當與不同濃度下反應的速率變化，而線性趨勢線的斜率愈大也表示著該樣品在固定的濃度差距下與抗體間的反應速率愈快。線狀胜肽其反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對濃度之線性關係如圖 62~64，環狀胜肽其反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對濃度之線性關係如圖 65~67。我們可以從線性趨勢線的斜率之差異做比較，可觀察得知環狀胜肽其線性趨勢線的斜率

值較線狀胜肽來得大，亦代表著，相對於線狀胜肽，環狀胜肽與抗體進行結合反應的速率變化較快。線狀胜肽 k_{obs} 對時間之線性關係圖，其線性趨勢線的斜率值分別是Linear-P1 斜率值為 0.4683，Linear-P2 斜率值為 0.677，Linear-P3 斜率值為 0.5885；而環狀胜肽 (k_{obs}) 對時間之線性關係圖，其線性趨勢線的斜率值分別是Cyclic-P1 斜率值為 0.7296，Cyclic-P2 斜率值為 0.8298，Cyclic-P3 斜率值為 0.639。在理想的反應情況下， k_{obs} 對時間之線性關係圖其線性趨勢線的方程式應通過原點，因為在沒有反應物濃度的狀態下，反應的速率應當為零。反應觀測速率常數的快慢差異依序為 Cyclic-P2、Cyclic-P1、Linear-P2、Cyclic-P3、Linear-P3 最後為 Linear-P1。

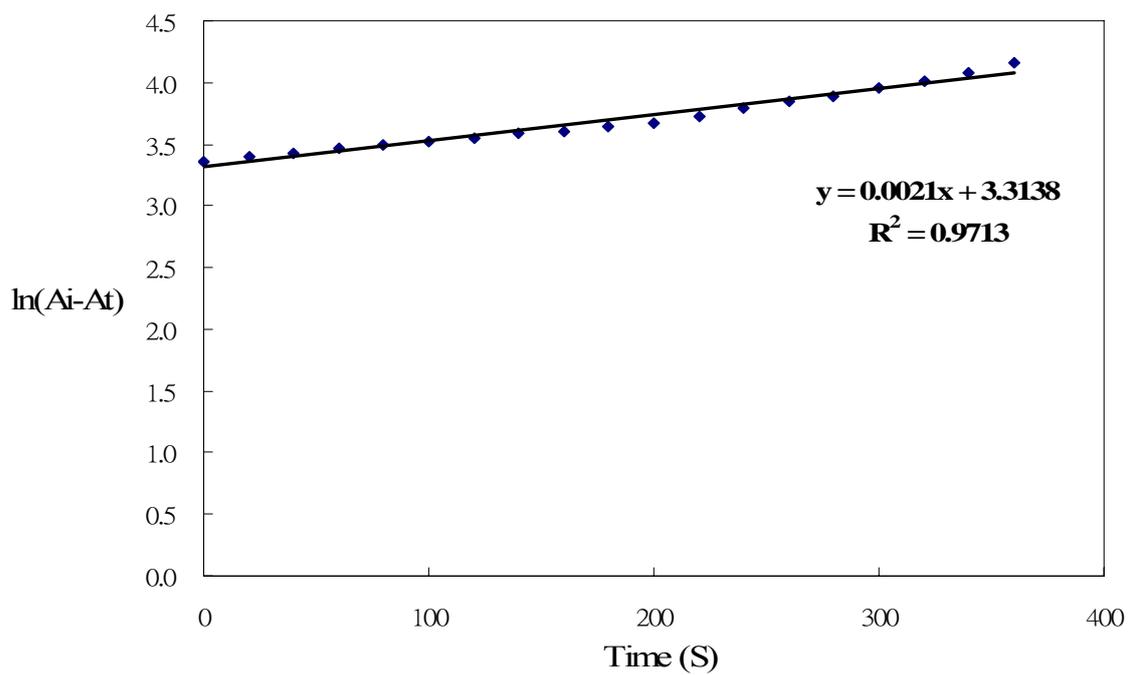


圖 60. Linear-P1 , 0.25 mM $\ln(A_i - A_t)$ 對反應的時間變化做圖。

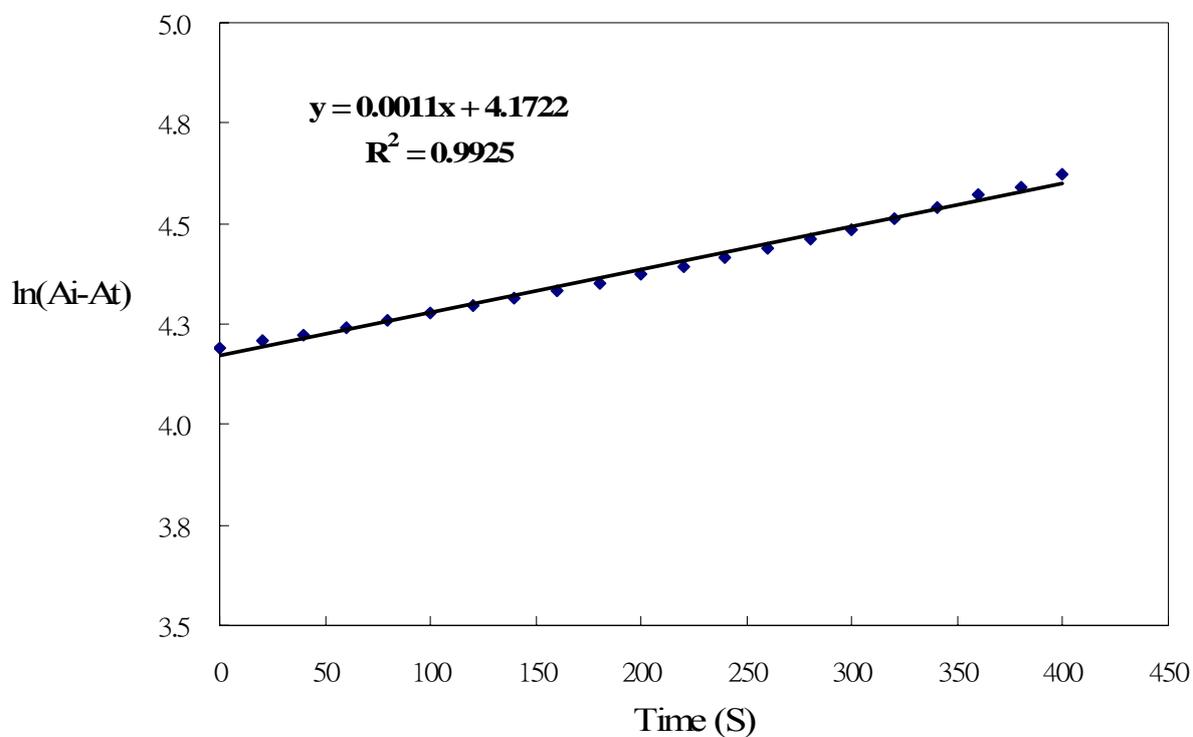


圖 61. Linear-P1 , 0.125 mM $\ln(A_i - A_t)$ 對反應的時間變化做圖。

表 12. 在固定抗體濃度下，一系列線狀胜肽的濃度，其反應觀測速率常數 (k_{obs})

Linear Peptide	[Concentration], mM	$k_{\text{obs}} \times 10^2, \text{s}^{-1}$	$k_{\text{obs}}, \text{min}^{-1}$
Linear-P_1	1.000	0.81 ± 0.025	0.48 ± 0.015
	0.500	0.43 ± 0.026	0.25 ± 0.016
	0.250	0.21 ± 0.015	0.12 ± 0.009
	0.125	0.11 ± 0.006	0.06 ± 0.004
Linear-P_2	1.000	1.13 ± 0.021	0.68 ± 0.012
	0.500	0.56 ± 0.030	0.34 ± 0.018
	0.250	0.28 ± 0.021	0.17 ± 0.013
	0.125	0.15 ± 0.010	0.09 ± 0.006
Linear-P_3	1.000	0.97 ± 0.015	0.58 ± 0.009
	0.500	0.49 ± 0.003	0.29 ± 0.002
	0.250	0.25 ± 0.012	0.15 ± 0.007
	0.125	0.13 ± 0.006	0.07 ± 0.004

k_{obs} : mean \pm S.D.

表 13. 在固定抗體濃度下，一系列環狀胜肽的濃度，其反應觀測速率常數 (k_{obs})

Cyclic Peptide	[Concentration], mM	$k_{\text{obs}} \times 10^2, \text{S}^{-1}$	$k_{\text{obs}}, \text{min}^{-1}$
Cyclic-P_1	1.000	1.20 ± 0.026	0.72 ± 0.016
	0.500	0.62 ± 0.026	0.37 ± 0.016
	0.250	0.31 ± 0.006	0.18 ± 0.004
	0.125	0.16 ± 0.032	0.09 ± 0.019
Cyclic-P_2	1.000	1.40 ± 0.027	0.84 ± 0.016
	0.500	0.75 ± 0.025	0.45 ± 0.015
	0.250	0.38 ± 0.021	0.23 ± 0.013
	0.125	0.19 ± 0.015	0.11 ± 0.009
Cyclic-P_3	1.000	1.04 ± 0.031	0.62 ± 0.018
	0.500	0.51 ± 0.028	0.31 ± 0.017
	0.250	0.27 ± 0.015	0.16 ± 0.009
	0.125	0.14 ± 0.006	0.08 ± 0.004

k_{obs} : mean \pm S.D.

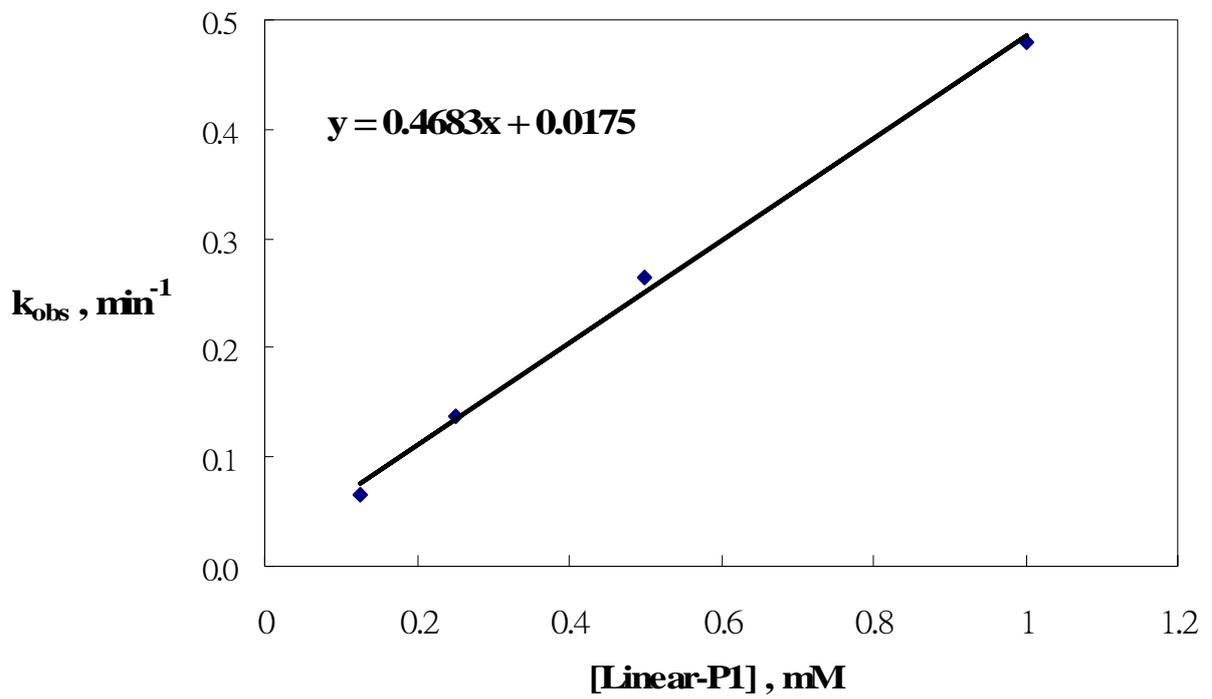


圖 62. 反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對Linear-P1 濃度的線性關係圖。

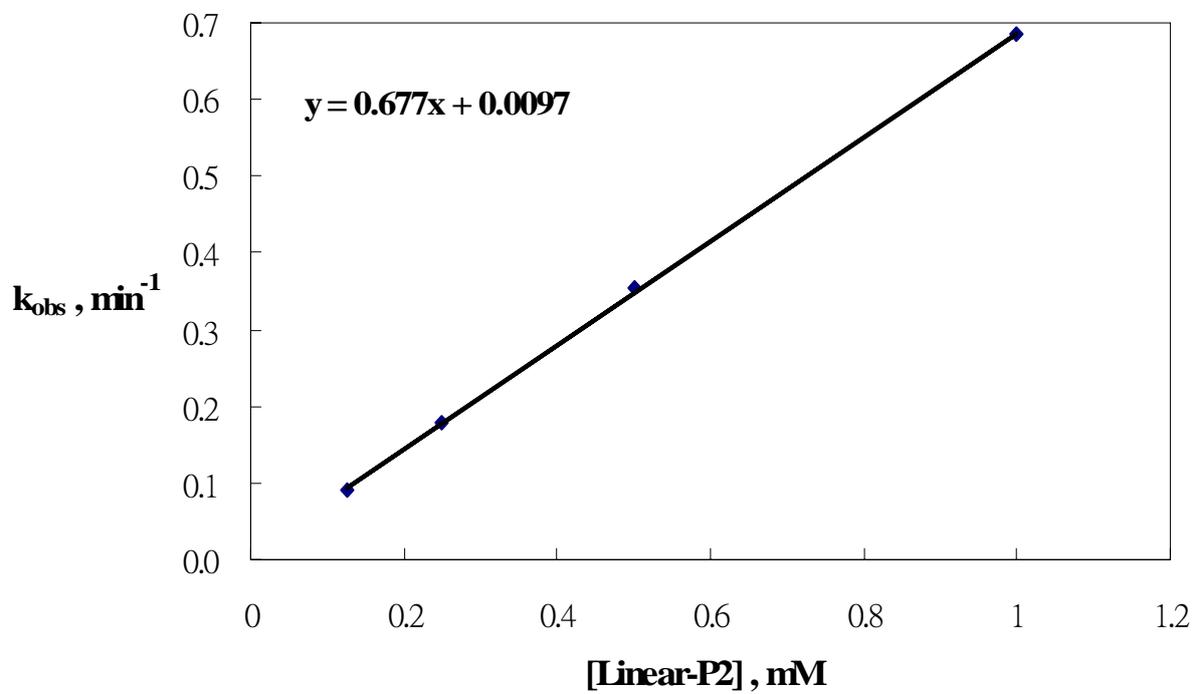


圖 63. 反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對Linear-P2 濃度的線性關係圖。

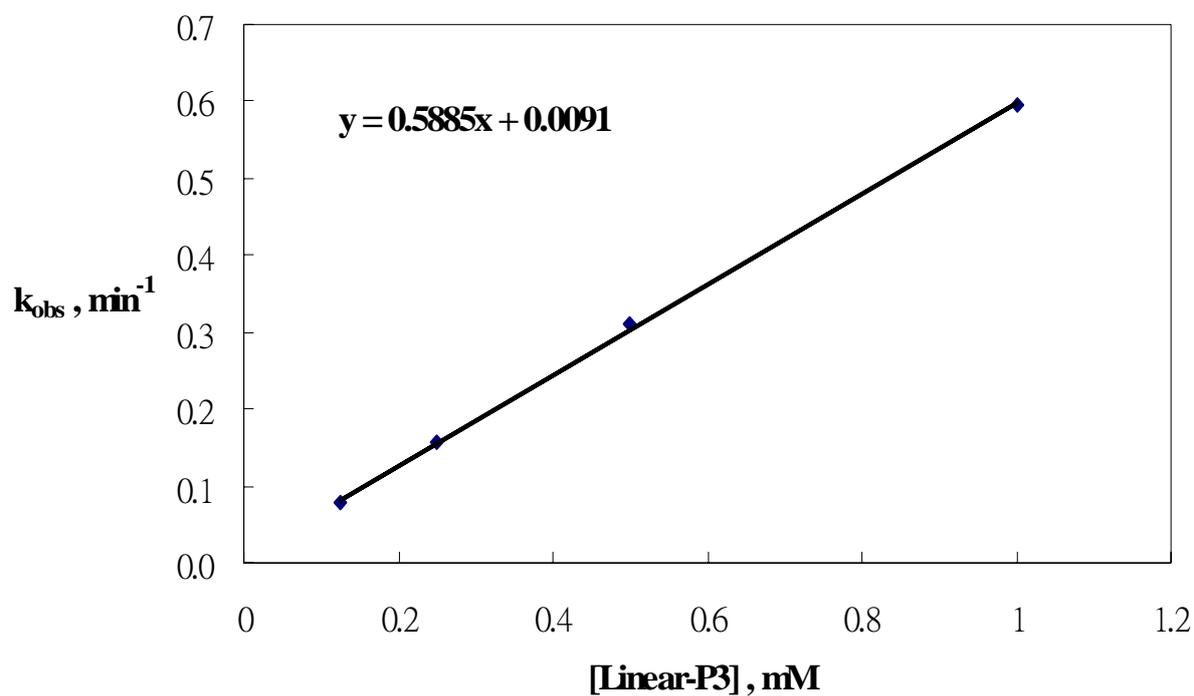


圖 64. 反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對Linear-P3 濃度的線性關係圖。

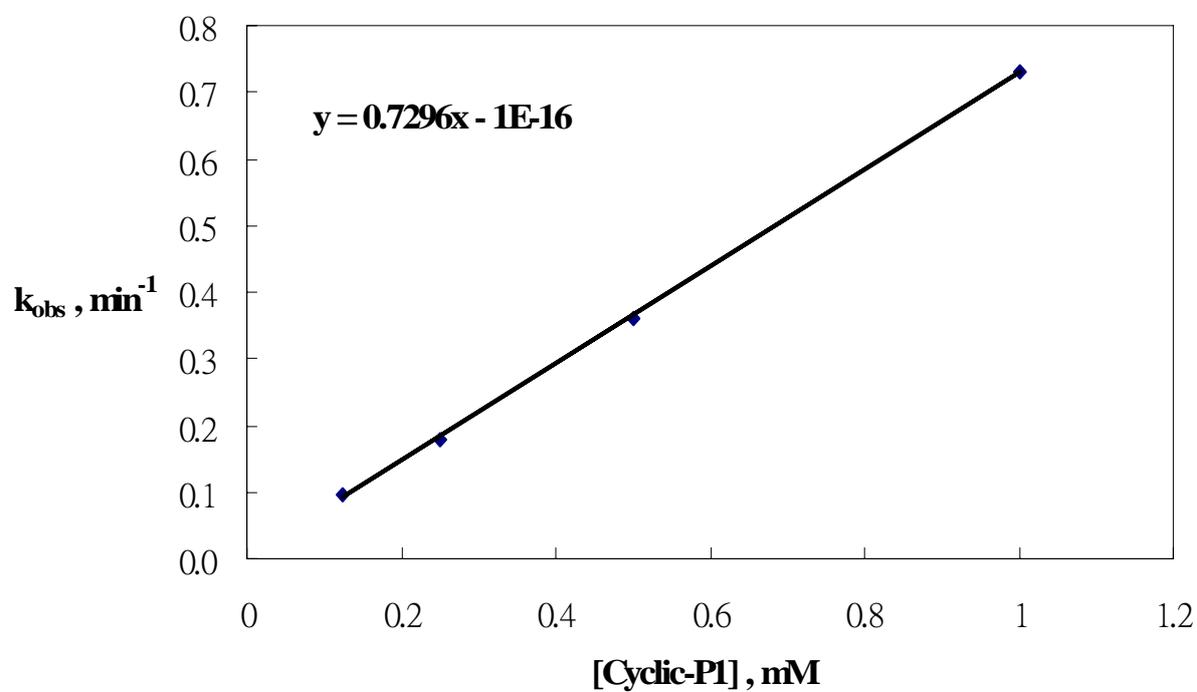


圖 65. 反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對Cyclic-P1 濃度的線性關係圖。

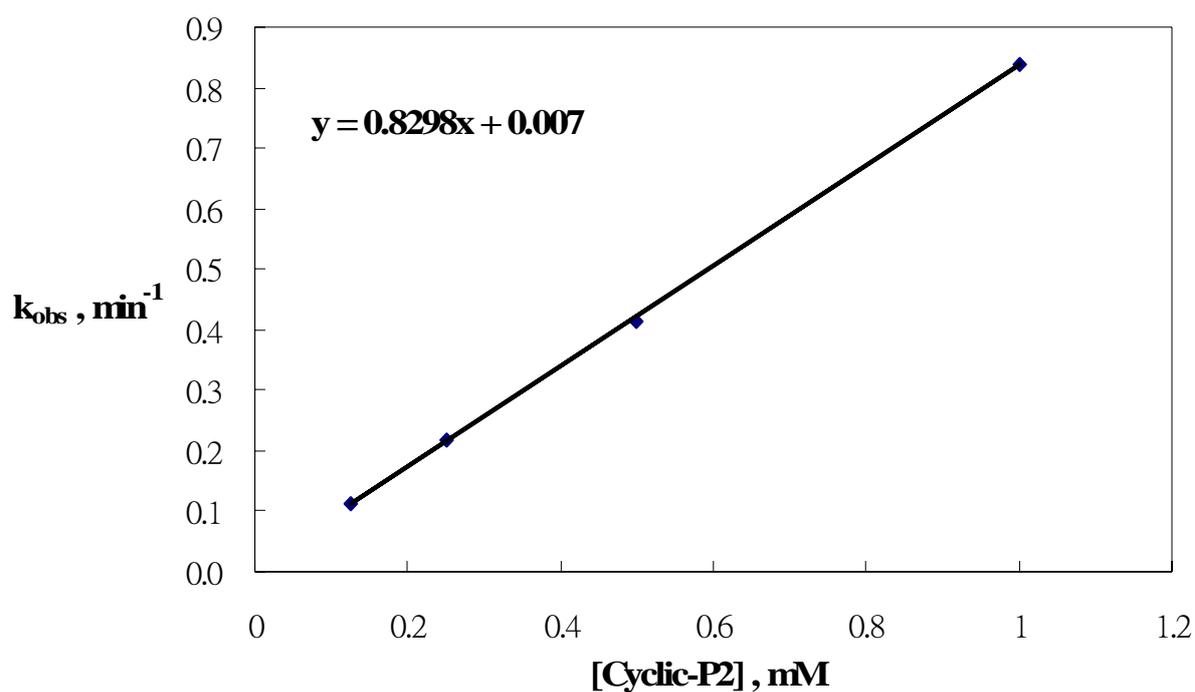


圖 66. 反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對Cyclic-P2 濃度的線性關係圖。

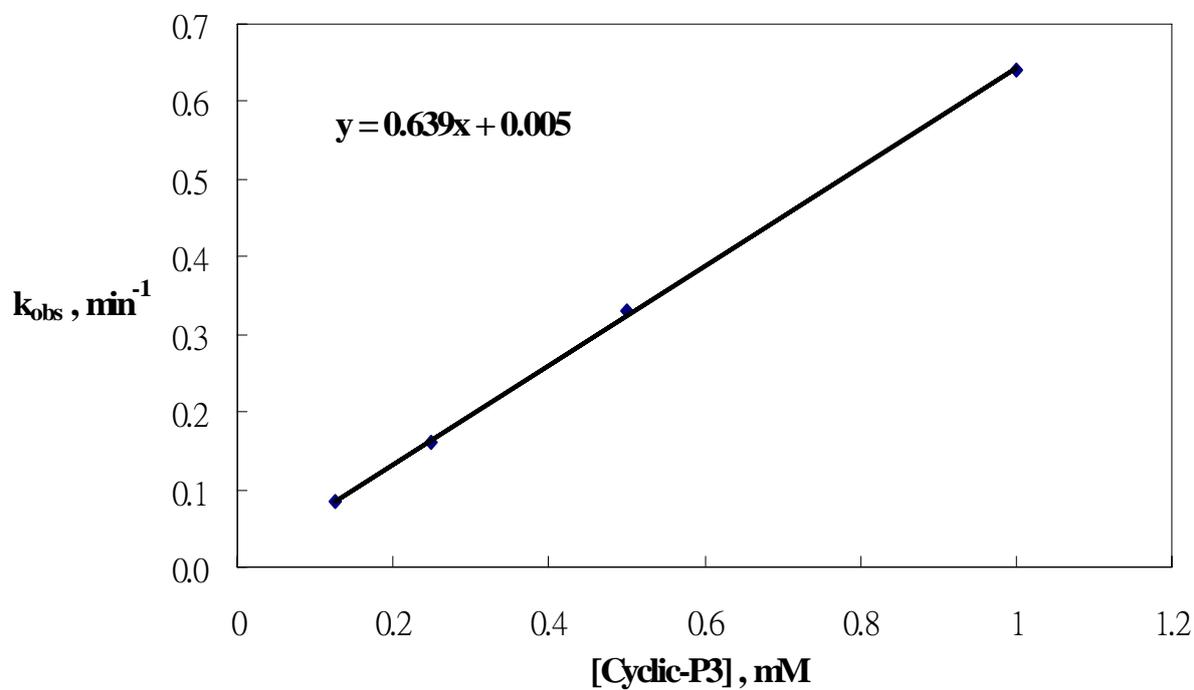


圖 67. 反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對Cyclic-P3 濃度的線性關係圖。

我們將線狀胜肽與環狀胜肽樣品分開來作圖，利用反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對各個濃度來作圖得到線性關係圖，其結果相當與不同濃度下的胜肽樣品反應的速率變化，將線狀胜肽Linear-P1~3 所得的線性關係圖合併於同一張圖上，環狀胜肽Cyclic-P1~3 所得的線性關係圖合併於同一張圖上，方便我們來觀察所有的胜肽樣品 k_{obs} 對濃度作圖，其結果的差異。而線性趨勢線的斜率愈大也表示著該樣品與抗體間的反應速率愈快。線狀與環狀胜肽 k_{obs} 對濃度所作的圖，其結果分別整理於圖 68 與圖 69。

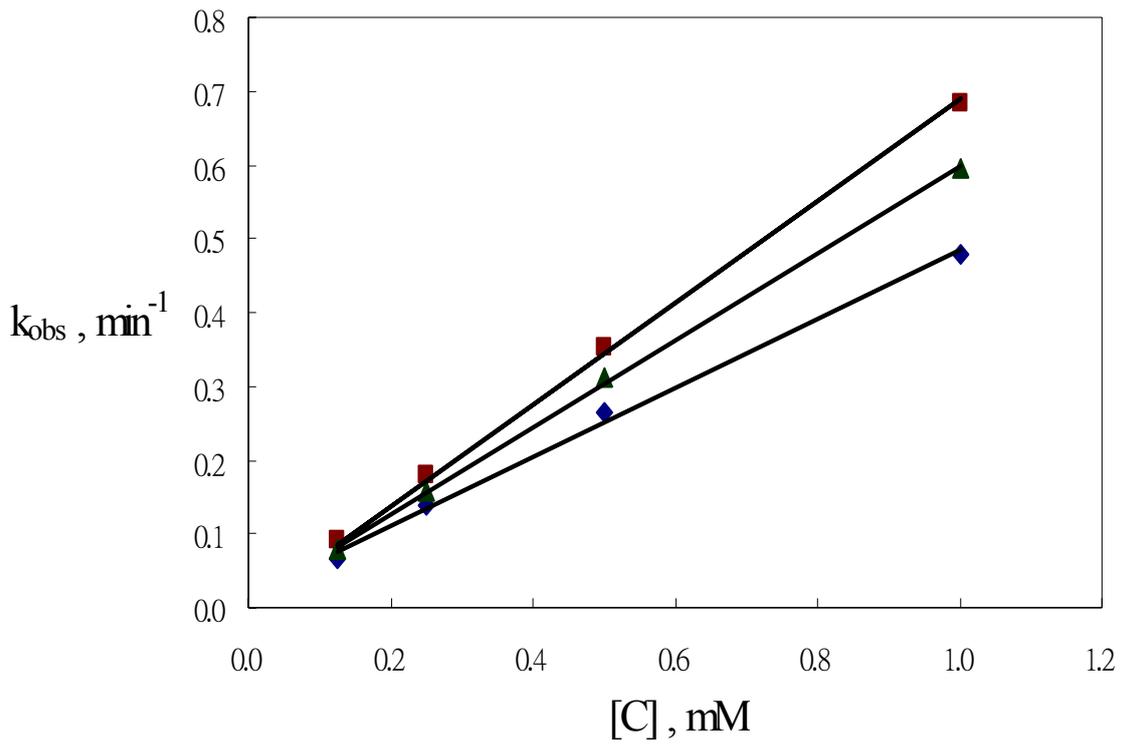


圖 68. 線狀胜肽反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對濃度的線性關係圖。

◆ : Linear-P1 ■ : Linear-P2 ▲ : Linear-P3

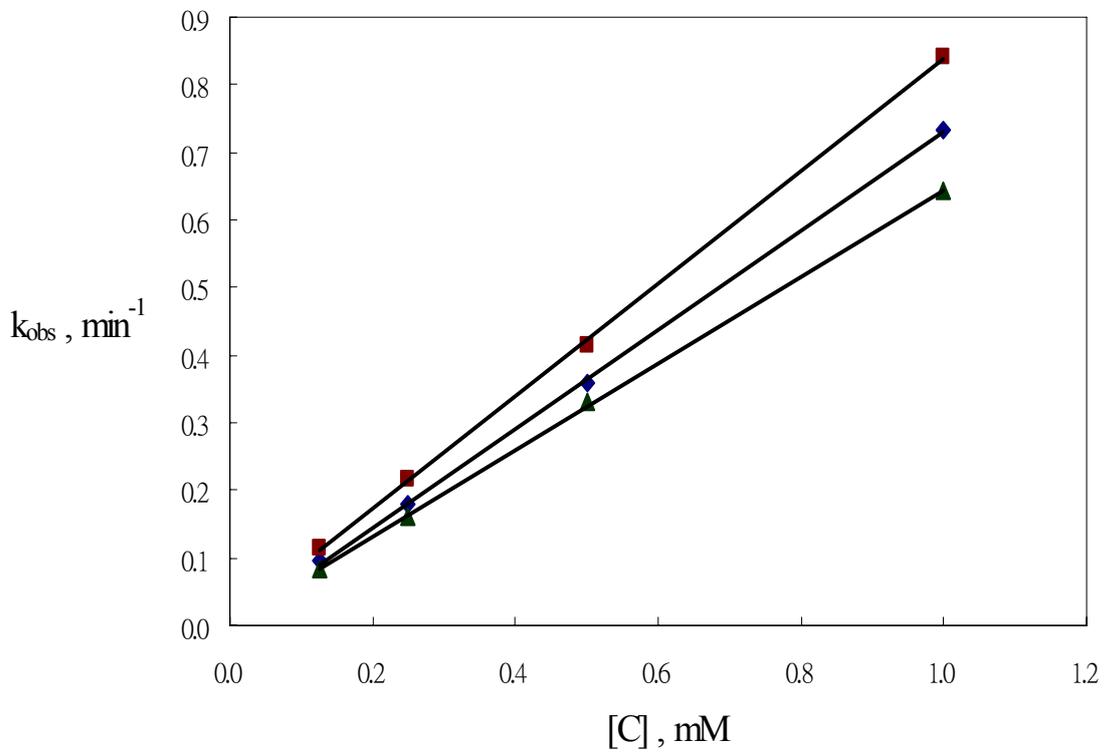


圖 69. 環狀胜肽反應觀測速率常數 (k_{obs}) 對濃度的線性關係圖。

◆ : Cyclic-P1 ■ : Cyclic-P2 ▲ : Cyclic-P3

從先前的推導得知 $\ln(A_i - A_t)$ 對時間變化呈線性關係的結果，利用 $\ln(A_i - A_t)$ 對時間做圖可以觀測到其反應的速率快慢，利用這個結果我們運用 Lineweaver-Burk (雙倒數作圖、double reciprocal plot) 作圖法，將反應的速率取倒數對反應濃度的倒數來作圖，可得到一線性關係圖形，利用線性趨勢線所求得的直線方程式，跟 Lineweaver-Burk Equation 做對照可得知，其截距為 $1/V_{max}$ ，而其斜率值為 K_m/V_{max} ，所以可以各別求得線狀與環狀胜肽的 K_m (Michaelis constant) 值與 V_{max} 值，討論其結果所代表的意義，比較線狀與環狀胜肽與抗體結合之特性與親和力的大小。線狀胜肽應用雙倒數作圖所得的結果如圖 70 ~ 72，環狀胜肽應用雙倒數作圖所得的結果如圖 73 ~ 75。

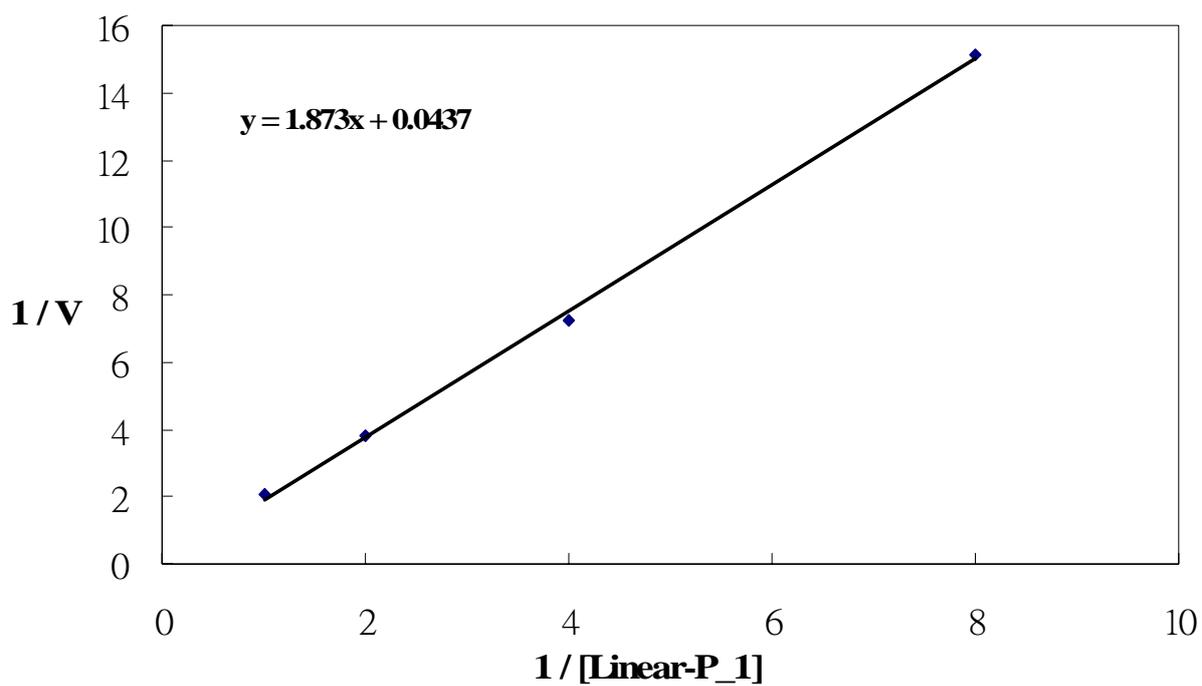


圖 70. Linear-P1 利用 Lineweaver-Burk 作圖（雙倒數做圖法）。

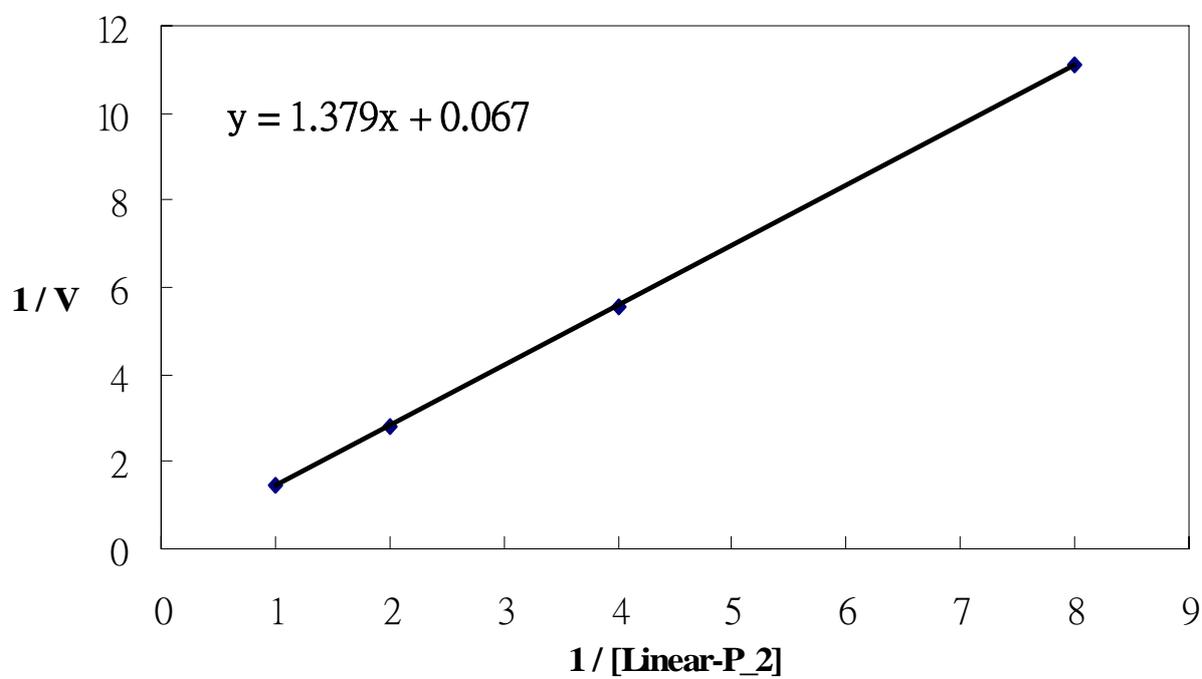


圖 71. Linear-P2 利用 Lineweaver-Burk 作圖（雙倒數做圖法）。

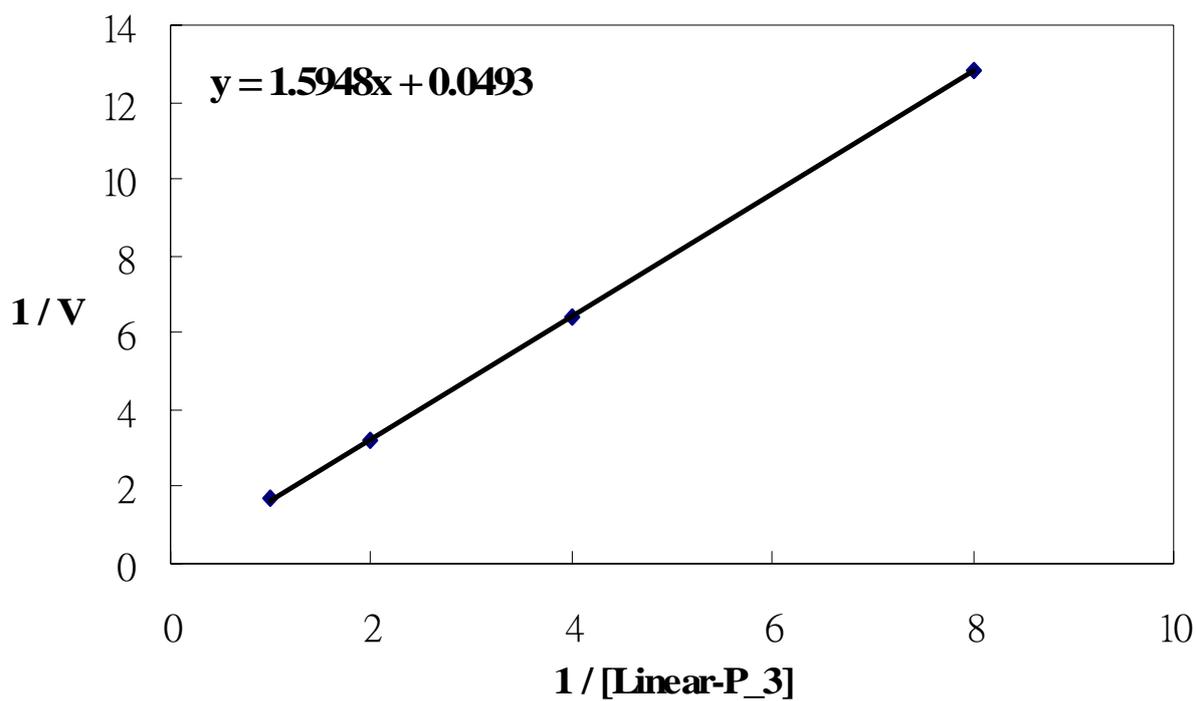


圖 72. Linear-P3 利用 Lineweaver-Burk 作圖（雙倒數做圖法）。

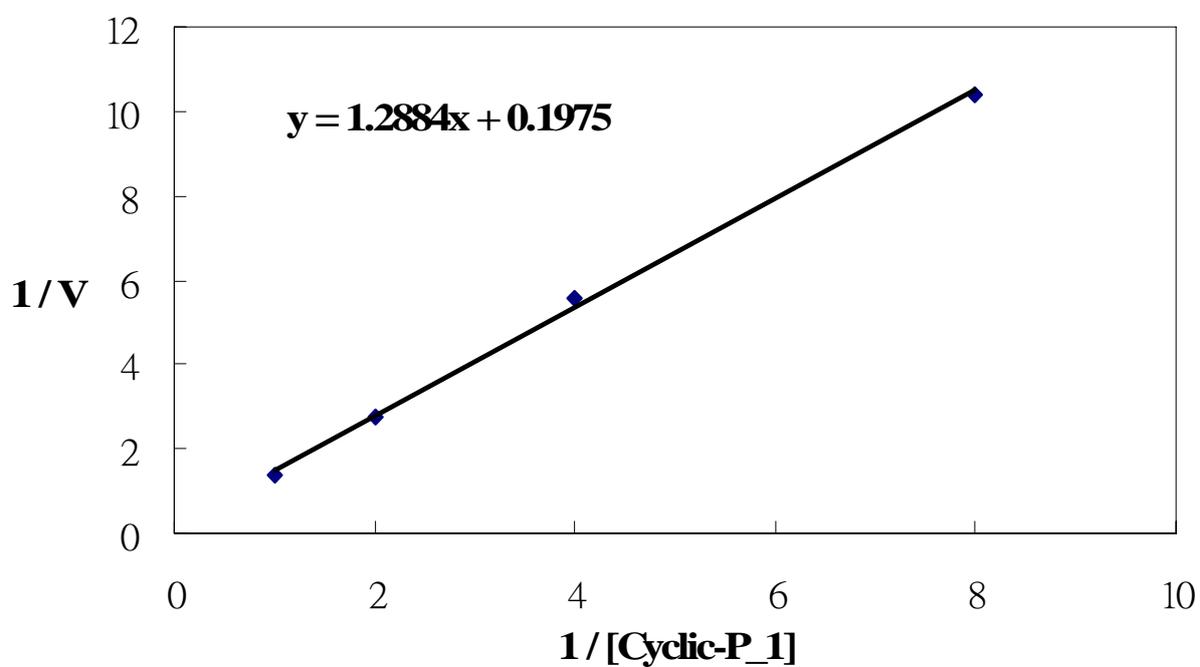


圖 73. Cyclic-P1 利用 Lineweaver-Burk 作圖（雙倒數做圖法）。

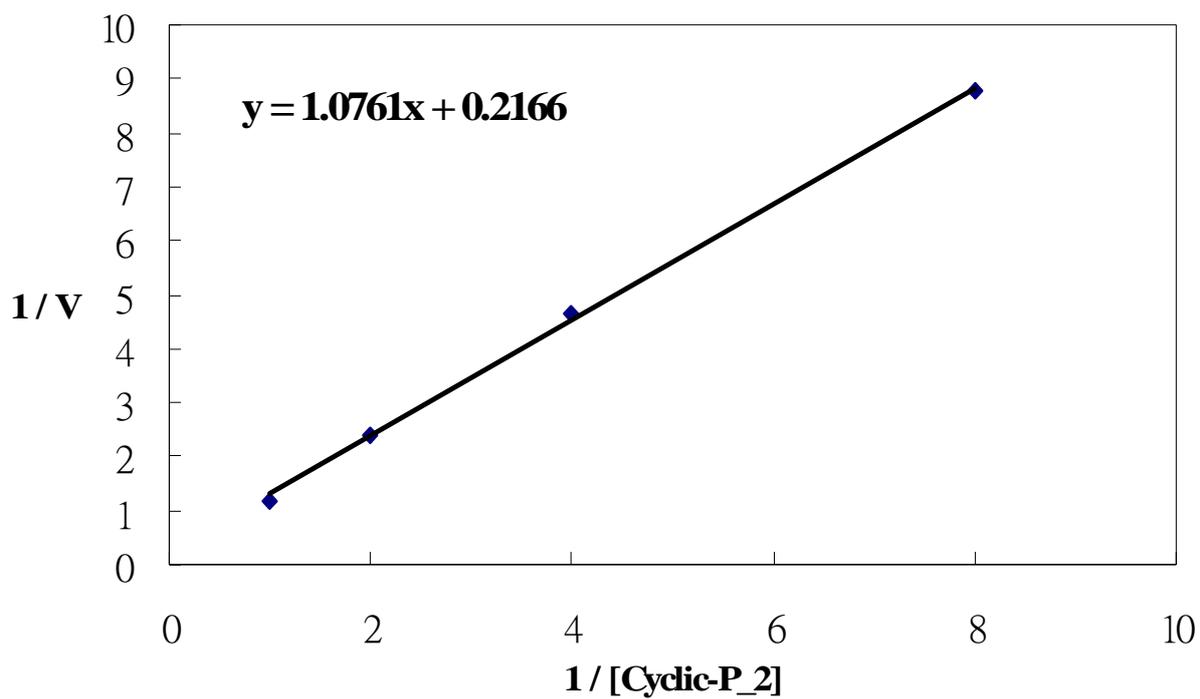


圖 74. Cyclic-P2 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)。

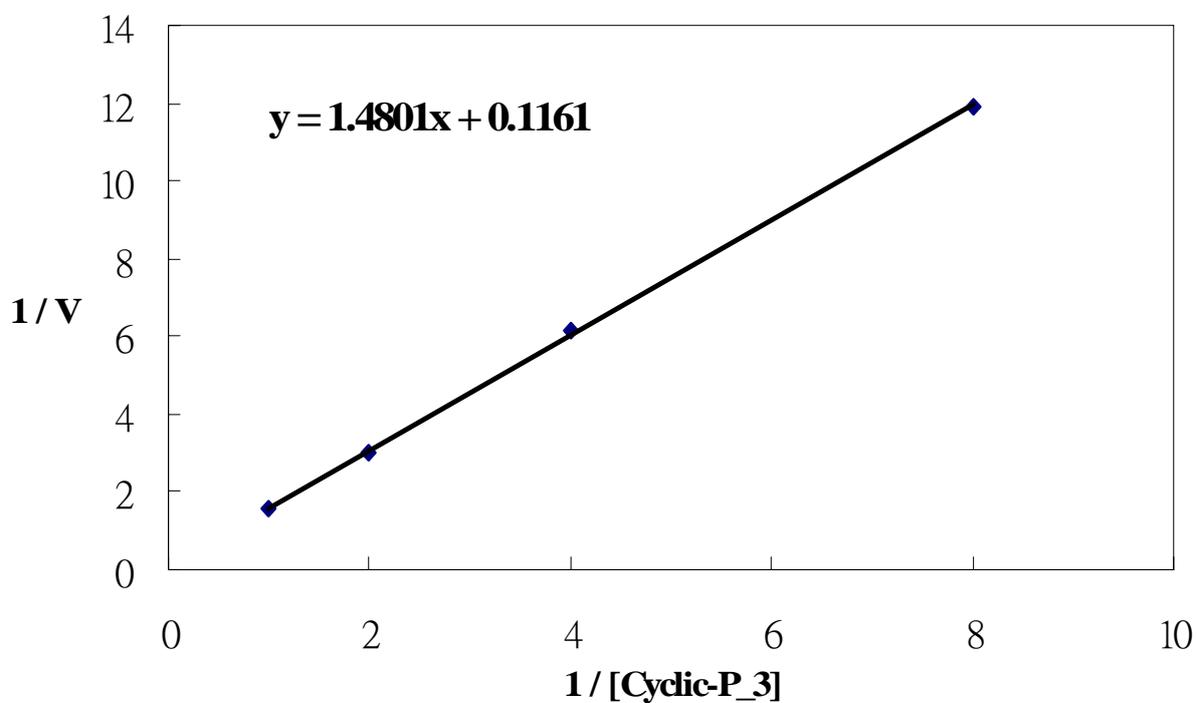


圖 75. Cyclic-P3 利用 Lineweaver-Burk 作圖 (雙倒數做圖法)。

我們將線狀與環狀胜肽運用雙倒數作圖所得的線性關係，其線性趨勢線的直線方程式與 Lineweaver-Burk 方程式做個對照，可以求得 V_{max} 值與 K_m 值並將所有推導的結果，整理於表 14。從結果我們可以得知，環狀胜肽 K_m 值均小於線狀胜肽，而 K_m 值是酵素與受質間親和力的指標， K_m 值愈小代表著與結合物間的親合力愈大，正說明了環狀胜肽的 K_m 值較小於線狀胜肽，表示環狀胜肽與 anti-NTx 抗體間的親和力愈大，結合反應愈容易進行。將線狀與環狀胜肽分別來探討其結果，在線狀胜肽的 K_m 值大小次序，依序是 Linear-P2 為最小，其次為 Linear-P3，最大為 Linear-P1，這結果恰巧能與本實驗室過去的研究成果做相呼應的對照，Linear-P2 的 K_m 值最小表示與 anti-NTx 抗體間的親和力較大且結合較為緊密，其次為 Linear-P3，最後為 Linear-P1 與抗體間親和力較小。在環狀胜肽的 K_m 值大小次序，依序是 Cyclic-P2 為最小，其次為 Cyclic-P1，最大為 Cyclic-P3，Cyclic-P2 的 K_m 值最小表示與 anti-NTx 抗體間的親和力較大且結合較為緊密，其次為 Cyclic-P1，最後為 Cyclic-P3 與抗體間親和力較小。

表 14. 胜肽樣品利用雙倒數做圖所得到的 Vmax 與 Km 值。

Peptide	Vmax (mM/min)	Km (mM)
Linear-P1	22.8833	42.8604
Linear-P2	14.9254	20.5821
Linear-P3	20.2840	32.3489
Cyclic-P1	5.0633	6.5235
Cyclic-P2	4.6169	4.9681
Cyclic-P3	8.6133	12.7485

註. Lineweaver-Burk 方程式 $\frac{1}{V} = \left\{ \frac{Km}{V \max} \right\} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V \max}$

Km : Michaelis constant 。

4-4 利用表面漿體共振技術(SPR)進行交互作用分析

將感應晶片的表面進行 anti-NTx antibody 之固定化後，分別將線狀胜肽及環狀胜肽以 HBS-EP buffer 稀釋成不同序列濃度(linear peptide : 5000、2500、1250、625、312.5 nM ; cyclic peptide : 1250、625、312.5、157、78 nM)，於流速為 20 μ L/min 的條件下，由濃度低至高分別取 150 μ l 注入微射流系統中，與晶片表面之 anti-NTx antibody 進行結合反應。最後將結果整理於感應圖中，其縱軸單位為共振單位(resonance unit ; RU)；橫軸為時間單位(秒 ; s)，並由感應曲線圖可觀察到隨著胜肽樣品濃度的增加，所反應出的共振單位也隨之增加。

反應完成後，系統會延遲 2 分鐘再進行高速清洗感應晶片表面，移除非專一性結合的部分，專一性結合的部分則以 10 mM glycine-HCl buffer (pH 2.5)進行感應晶片表面之再生作用，使 RU 值回到未注射入樣品前的基礎線，再進行下一分析物之測定。線狀胜肽之實驗結果，感測曲線圖整理於圖 76 ~ 78；而環狀胜肽之實驗結果，感測曲線圖整理於圖 79 ~ 81。最後實驗數據以 BIAevaluation 軟體 3.1 版本(Biacore 3000)進行分析，並選取 nonlinear least squares fitting methods (bivalent model)，計算出結合常數 (association rate constant ; K_a)及解離常數(dissociation rate constant ; K_d)，並整理於表 15。

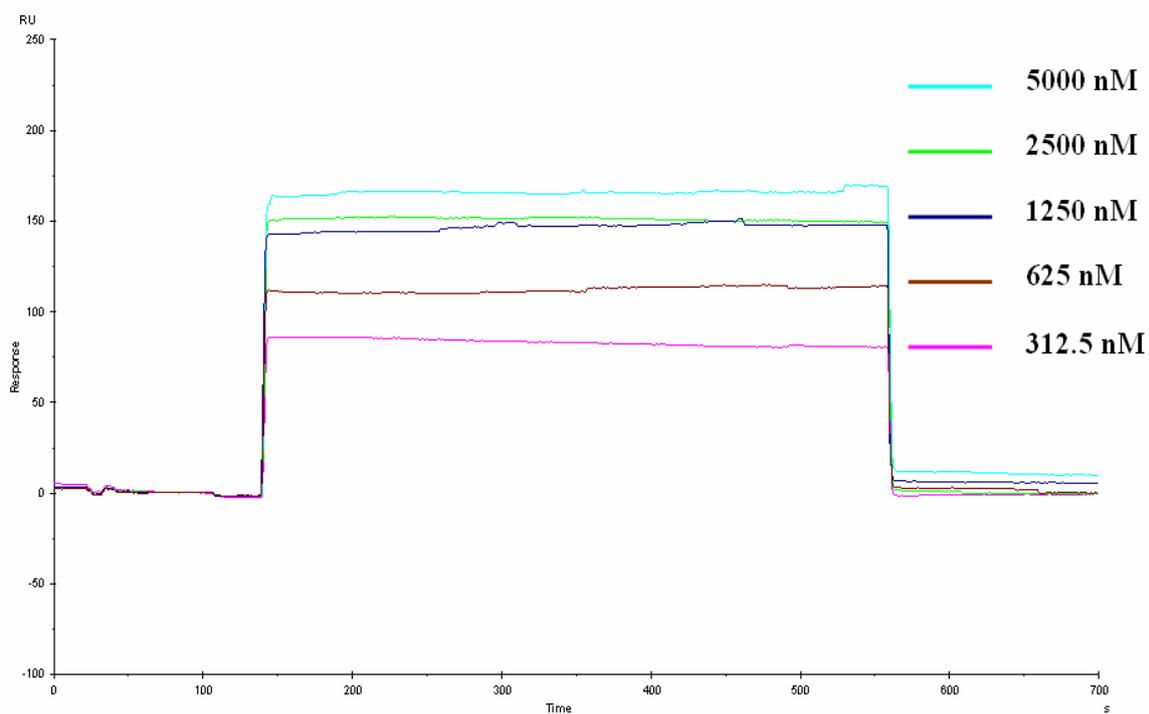


圖 76. Linear-P1 與固定於感應晶片表面 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖。

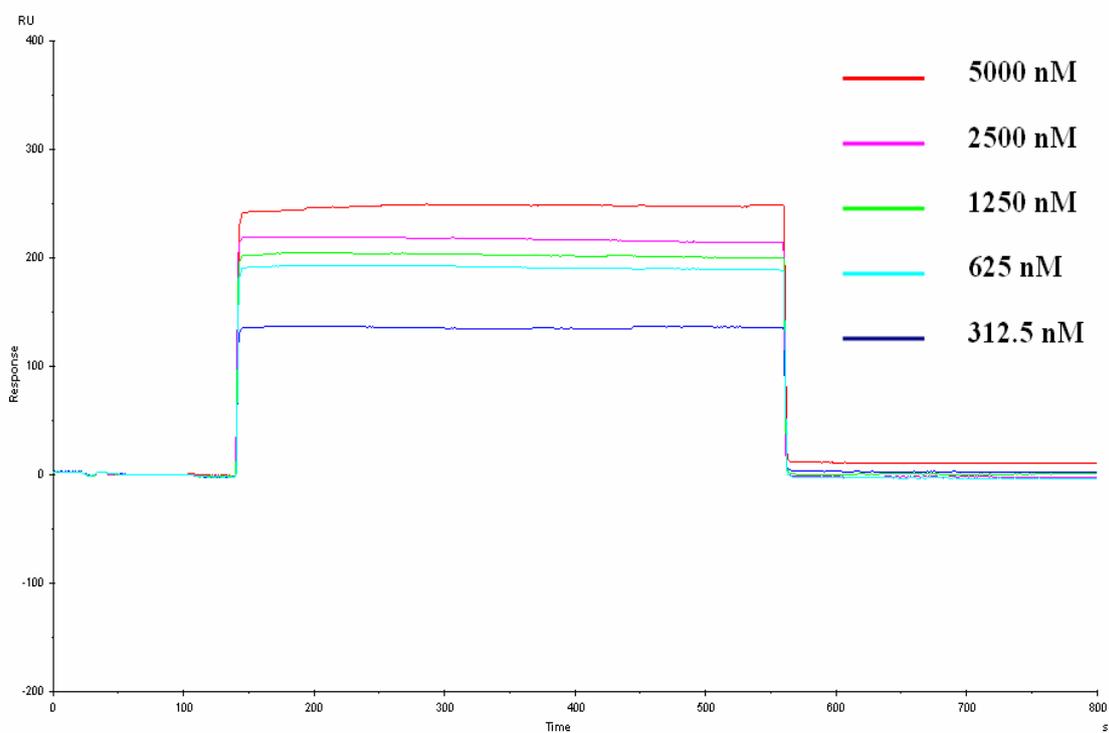


圖 77. Linear-P2 與固定於感應晶片表面 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖。

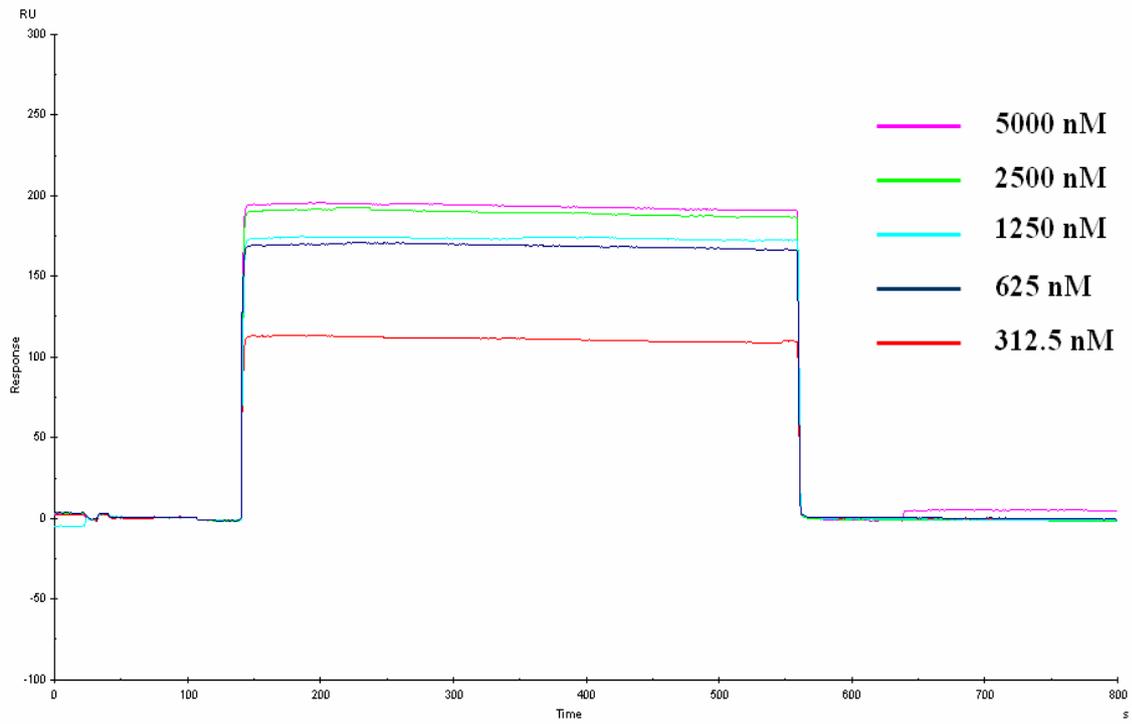


圖 78. Linear-P3 與固定於感應晶片表面 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖。

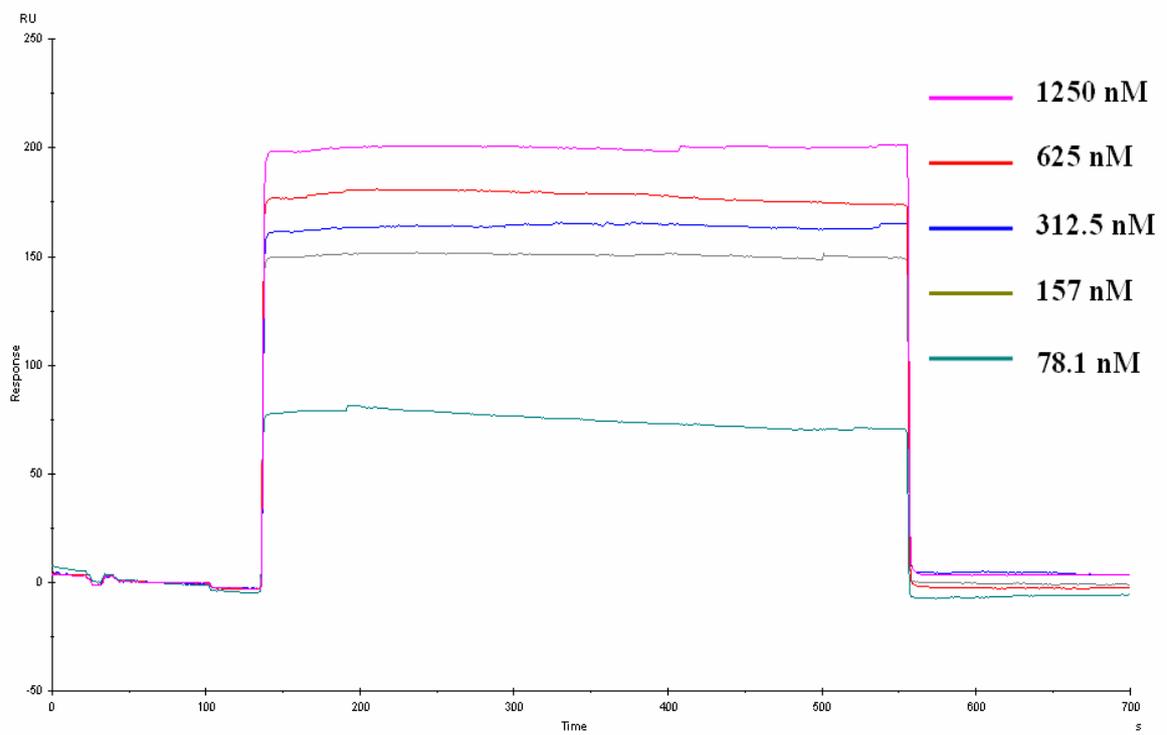


圖 79. Cyclic-P1 與固定於感應晶片表面 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖。

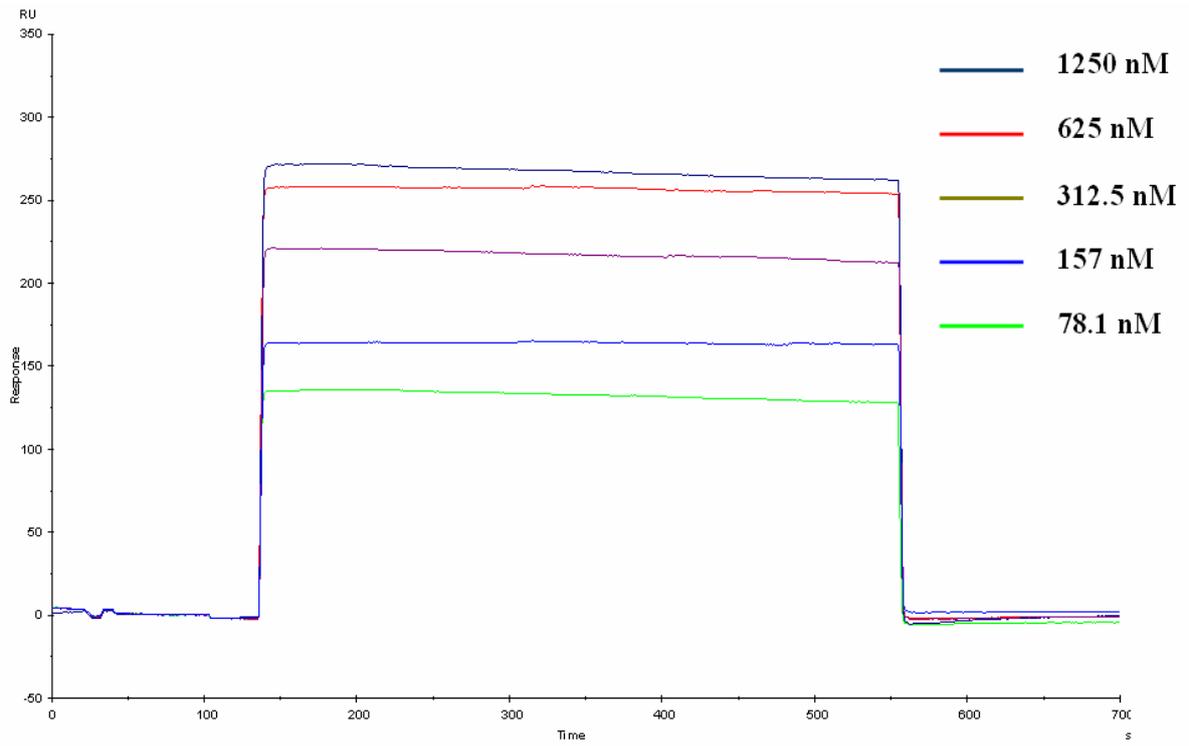


圖 80. Cyclic-P2 與固定於感應晶片表面 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖。

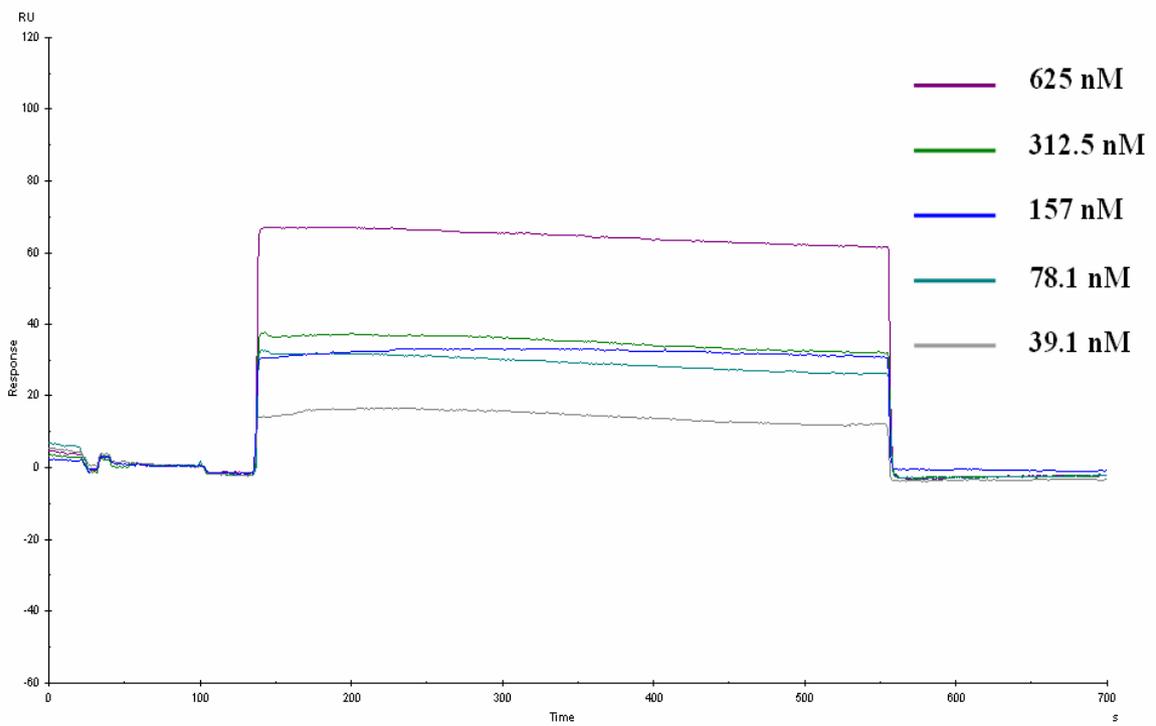


圖 81. Cyclic-P3 與固定於感應晶片表面 Anti-NTx Ab 作用之感應曲線圖。

表 15. 胜肽樣品與 anti-NTx Ab 進行結合反應之結合與解離常數

	$K_A \times 10^4$ (1/M)	$K_D \times 10^{-5}$ (M)
Linear-P1	4.14	2.42
Linear-P2	16.82	0.59
Linear-P3	5.94	1.69
	$K_A \times 10^5$ (1/M)	$K_D \times 10^{-7}$ (M)
Cyclic_P1	150.12	0.68
Cyclic_P2	78.14	1.28
Cyclic_P3	6.85	14.60

從SPR實驗的結果的觀察得知，環狀胜肽之結合平衡常數 (K_A) 比線狀胜肽要來得大，代表著環狀胜肽與anti-NTx 抗體進行結合的速率較快、結合也較容易進行；而在解離平衡常數上，環狀胜肽的 K_D 值也較線狀胜肽來得小，亦表示環狀胜肽與anti-NTx抗體所形成的複合體在結合後，較不容易鬆脫、結合得較為緊密，而形成的複合體與線狀胜肽比較也較為穩定。這些實驗結果與運用紫外光-可見光光譜儀來進行動力學探討的結果也相符合，也顯示環狀胜肽與anti-NTx抗體之間交互作用的親和力較線狀胜肽來得大。

4-5 結論

本論文利用固相胜肽合成法合成胜肽並藉由質譜儀的鑑定，成功的合成出線狀與環狀胜肽，我們將純化後的產物，運用紫外光-可見光光譜儀（UV-Vis Spectrophotometer）來偵測胜肽樣品與anti-NTx抗體間的反應狀況。我們利用過量濃度的胜肽與固定濃度的抗體做結合，在擬一級反應條件下，讓反應達到飽和。得到不同濃度下吸收值的變化。將結果數據整理後，可求得反應觀測速率常數（ k_{obs} ），環狀胜肽的 k_{obs} 值都要比線狀胜肽來得高。將線狀與環狀胜肽分開觀察，可以發現 k_{obs} 值線狀胜肽Linear-P2 > Linear-P3 > Linear-P1，而環狀胜肽的結果則是Cyclic-P2 > Cyclic-P1 > Cyclic-P3。由此可知，peptide2 在構形有所改變時，與抗體的反應都較為迅速。我們並應用雙倒數做圖法（ $1/V$ v.s $1/[C]$ ）來推算各個胜肽樣品的 V_{max} 值與 K_m 值，結果也顯現環狀胜肽的 K_m 值較線狀胜肽來得小，亦表示，環狀胜肽與anti-NTx抗體之間的親和力（binding affinity）較佳。環狀胜肽與anti-NTx抗體間的結合反應也較線狀胜肽容易來進行，也表示說，環狀胜肽與anti-NTx抗體所生成的複合物結果較為緊密、較為安定，不容易解離鬆脫。

接著，我們再使用 Biacore 3000 並應用表面膜漿共振技術進行胜肽樣品與 anti-NTx 抗體間交互作用的親和性檢測，實驗結果也顯示著環狀胜肽與 anti-NTx 抗體較容易進行結合，而且結合後所形成的複合體也較為緊密

不容易鬆脫，所以從結果上我們也可以判定環狀胜肽與 anti-NTx 有較佳的親和性，並佐證應用紫外光-可見光光譜儀來進行動力學的探討結果。

從以上結果我們可以推測 NTx 的片段中，其立體構形有一處為與 anti-NTx 抗體結合或作用較佳的地方，也說明了，線狀胜肽的活性較為活潑、構型變化較為多元，與 anti-NTx 抗體的 binding site 較不固定，相對結合親和力較為薄弱；相對地，環狀胜肽因其結構被限制缺乏變化，在與 anti-NTx 抗體結合時，binding site 固定較不易脫落，環狀胜肽也因 peptide bond 的摺疊可使胺基酸殘基能更伸入的與抗體做結合，就像鎖與鑰匙的關係，也顯示了環狀胜肽與 anti-NTx 抗體較具有立體構形關係。而且在熱力學上的亂度（熵）表現線狀胜肽也較環狀胜肽來得大且不穩定。所以環狀胜肽與 anti-NTx 抗體間交互作用較線狀胜肽的親和力表現較為佳。

未來希望能更進一步應用生物感測器來探討其結果，因為生物感測器具有高選擇性、高靈敏度、操作簡單、可即時監測分析反應，且不需做任何標定的特性，可利用來評估所測的數據的再現性與結果的一致性，以建立相關的實驗參數。另外，本實驗的結果也顯示，環狀胜肽對於線狀胜肽來說，與抗體有更較高的親和力，未來可以 Cyclic-P1、Cyclic-P2 與 Cyclic-P3 為目標來製備單株抗體，以進行研發新的檢測分析方法。