

國立清華大學化學系

碩士論文

利用金屬誘發膠原蛋白模擬胜肽折疊之探討

Metal-Induced Folding of Collagen Mimetic Peptides

指導教授：洪嘉呈 博士 (Dr. Jia-Cherng Horng)

研究生：陳怡倫 (Yi-Lun Chen)

學號：9623520

中華民國九十八年七月

國立清華大學碩士學位論文  
指導教授推薦書

學系  
化學 研究所 陳怡倫 君所提之論文

利用金屬誘發膠原蛋白模擬胜肽折疊之探討

經由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 洪嘉弘 (簽章)

中華民國 98 年 07 月 06 日

# 國立清華大學碩士學位論文

## 考試委員審定書

化學 學系 研究所 陳怡倫 君所提之論文

利用金屬誘發膠原蛋白模擬胜肽折疊之探討

經本委員會審查，符合碩士資格標準。

學位考試委員會 主持人 何佳安 (簽章)

委員 吳淑祿

洪嘉弘

中華民國 98 年 07 月 06 日

## 謝誌

在碩班的兩年研究生活中，感謝我的指導老師 洪嘉呈老師，在老師的教導下，使我學會如何自律，並且在課業之外遇到難題時，總能提供想法和我分享，能夠當老師的學生很開心。

同時，感謝 何佳安老師和 吳淑祿老師在百忙之中抽空擔任我的口試委員，並對本論文提供寶貴意見，使得本論文能夠更加完整，由衷的感謝兩位老師。

接著感謝實驗室裡的成員，謝謝當了四年大學同學，研究所在同一間實驗室裡的姜君和頤珊，使我能夠很容易的適應研究所不同於大學的生活，姜君還提供城市裡的鄉村，邀請 07 級同學到她家控窯作客，非常好玩；謝謝統元扮演我實驗中的救星；謝謝育如雖然很吵卻總是帶給實驗室很多歡樂；謝謝時雨逆來順受的擔任實驗室的開心果；謝謝佳青保持著實驗室裡的不興風作浪的清流；謝謝專題生徐維、維麟、中則、睿言及老江，雖然把實驗室塞的很擁擠，但是也帶給實驗室許多歡樂，讓碩二的生活變的非常有趣。

另外，謝謝室友阿廖總是在我很低潮的時候陪伴並鼓勵著我；謝謝蘇打綠做出的好聽音樂，總是能使煩躁的心情變平靜；謝謝高中同學怡君到新竹工作陪伴我，也謝謝不同求學時期的同學們總是不時的關心我；以及謝謝我最愛的清華化學系女籃大家庭，05 小可、06 貼玻西西埃、07 小馬瑋莉莉哈哈小猛、08 饅頭書華、09 中則多芬、10 小羊金魚、12 一打映竹，還有天外飛來很厲害的阿虎小愛，和系女籃在一起永遠都很開心，可以抒發課業上的壓力也可以運動之外，一起走過的點滴是在清華最捨不得的回憶。

最後要感謝我的家人，爸爸媽媽姐姐姐夫妹妹弟弟、以及小公主恩恩晴晴，除了讓我沒有後顧之憂的專心攻讀碩士學位，每次回家都能充滿滿的電，繼續回到新竹努力。

能夠完成這本論文，是藉由許多人的幫助以及鼓勵，真心的感謝這些幫助過我的人，謝謝你們。

## 中文摘要

膠原蛋白 (Collagen) 是哺乳類動物體內含量最多的蛋白質，具有獨特右手螺旋結構，由三條序列為  $(\text{Xaa-Yaa-Gly})_n$  的左旋胜肽，藉由彼此間形成氫鍵，產生螺旋結構。在此研究中，我們試圖尋找一簡單而有效的方法來誘發和幫助膠原蛋白三股螺旋結構的形成。在二十個天然的胺基酸當中，組氨酸 (Histidine) 和金屬有好的配位能力，因此，我們設計並合成一系列在碳端 (C terminus) 和氮端 (N terminus) 含有組氨酸 (Histidine) 嵌入的模擬膠原蛋白胜肽， $\text{GHP(PPG)}_7$ 、 $(\text{PPG})_7\text{PHG}$ 、 $\text{HG(PPG)}_7$ 、 $\text{HG(PPG)}_7\text{GH}$  和  $(\text{PPG})_7\text{GH}$ ，希望藉由組氨酸 (Histidine) 和金屬離子之間所形成的配位作用力，幫助模擬胜肽形成穩定的三螺旋結構。

從圓二分光儀 (circular dichroism, CD) 和 NMR 測量中，顯示出在無金屬離子狀況下，這些胜肽除了  $(\text{PPG})_7\text{PHG}$  之外並無法形成三股螺旋結構，但當加入金屬離子後，其中兩模擬胜肽  $(\text{PPG})_7\text{GH}$  和  $\text{HG(PPG)}_7\text{GH}$  可以形成較穩定的三螺旋結構，熔點 (melting temperature,  $T_m$ ) 大約為  $20^\circ\text{C}$ ，金屬離子和組氨酸 (Histidine) 之間的配位能力不同，使  $(\text{PPG})_7\text{GH}$  和  $\text{HG(PPG)}_7\text{GH}$  胜肽在形成三股螺旋結構的過程產生對金屬之選擇性，我們的結果顯示，銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 和鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )，可誘發此二模擬胜肽形成三股螺旋結構。而鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ ) 和鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 等離子則無法誘使三股螺旋結構的形成。

另外，動力學之量測顯示，銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 和亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 所誘發三股螺旋結構之折疊之速率比鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 來的快，且在同一金屬離子的條件下， $(\text{PPG})_7\text{GH}$  形成三股螺旋結構的速率比  $\text{HG(PPG)}_7\text{GH}$  快。

## Abstract

Collagen is the most abundant protein in mammalian tissues with a unique right-handed triple helix structure which is composed of three left-handed PP II peptide chains. Each peptide chain is rich in (Xaa-Yaa-Gly) sequence repeats, the triple helix is formed by hydrogen bonding between the chains. Among the nature amino acids, histidine is known for having high binding affinity with metal ions and is often found in the metal binding sites in proteins. In this work, we try to find a simple way to induce the folding of a collagen triple helix. Thus, we have designed and synthesized a series of His-containing collagen mimics, including GHP(PPG)<sub>7</sub>, (PPG)<sub>7</sub>PHG, HG(PPG)<sub>7</sub>, HG(PPG)<sub>7</sub>GH and (PPG)<sub>7</sub>GH, for the metal binding study.

Circular dichroism (CD) and NMR measurements showed that (PPG)<sub>7</sub>PHG could form slightly stable triple helices in the presence of metal ions, while HG(PPG)<sub>7</sub>GH and (PPG)<sub>7</sub>GH could be induced to fold into the triple helical conformation by metal ions. The increase in melting temperatures ( $T_m$ ) can be up to about 20 °C, HG(PPG)<sub>7</sub> fail to fold into a triple helix upon adding metal ions, indicating that the C-terminal metal-histidine coordination is the driving force to assist the folding. The results are also consistent with the folding mechanism of collagen that initiates at C-terminus and propagates to the N-terminus. There is metal selectivity for the peptide mimics to form triple helices, due to the difference in the binding affinity between metal ions and histidine. The metal dependent measurements have further shown that  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  could induce the folding of HG(PPG)<sub>7</sub>GH and (PPG)<sub>7</sub>GH while  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  could not. Besides, the kinetic measurement also showed that the folding rate of triple helices induced by  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{+}$  were faster than by  $\text{Ni}^{2+}$ . In the presence of the same metal ion, (PPG)<sub>7</sub>GH formed triple helices faster than HG(PPG)<sub>7</sub>GH because the additional metal-histidine coordination on the N-terminus might perturb

the inter-strand alignment and impede the folding process. In conclusion, the His-containing collagen mimetic peptides can fold into a stable triple helix with the assistance of metal ions, and their metal selectivity could provide a potential application in biosensor.



# 目錄

中文摘要.....	i
Abstract.....	ii
目錄.....	iv
圖目錄.....	vi
表目錄.....	x
第一章 緒論.....	1
1-1 膠原蛋白 (collagen) .....	1
1-2 不同方法的設計和三股螺旋結構之穩定.....	7
1-3 模擬胜肽的設計.....	10
1-4 固相胜肽合成 (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) 介紹.....	12
1-5 圓二色光譜 (Circular Dichroism, CD).....	16
第二章 實驗部份.....	21
2-1 儀器.....	21
2-2 藥品.....	22
2-3 化合物合成及鑑定.....	24
2-3-1 Fmoc-Pro-Pro-Gly-OH 之合成.....	24
2-3-2 模擬胜肽之合成.....	26
2-4 金屬和模擬胜肽作用及鑑定.....	28
2-4-1 緩衝液之製備.....	28
2-4-2 模擬胜肽溶液之配製.....	28
2-4-3 金屬離子溶液之配製.....	29
2-4-4 金屬和模擬胜肽混合液之配製.....	29
2-4-5 光譜鑑定.....	30
2-4-5-1 CD (circular dichroism) 光譜.....	30



2-4-5-2 NMR 光譜.....	31
第三章 結果與討論.....	32
3-1 圓二色光譜 (CD) .....	32
3-1-1 Far-UV CD 及 熔化實驗之量測.....	32
I . Ac-Gly-His-Pro-(PPG) <sub>7</sub> -NH <sub>2</sub> .....	34
II . Ac-(PPG) <sub>7</sub> - Pro-His-Gly-NH <sub>2</sub> .....	36
III . Ac-(PPG) <sub>7</sub> -Gly-His-NH <sub>2</sub> .....	43
IV . Ac-His-Gly-(PPG) <sub>7</sub> -Gly-His-NH <sub>2</sub> .....	49
V . Ac- His-Gly-(PPG) <sub>7</sub> -NH <sub>2</sub> .....	51
3-1-2 金屬離子滴定.....	53
I . (PPG) <sub>7</sub> GH.....	53
II . HG(PPG) <sub>7</sub> GH.....	55
3-1-3 折疊速率.....	56
3-2 NMR光譜.....	59
I . (PPG) <sub>7</sub> GH.....	59
II . HG(PPG) <sub>7</sub> GH.....	62
III . HG(PPG) <sub>7</sub> .....	66
第四章 結論.....	70
參考文獻.....	71
附錄.....	74

## 圖目錄

圖 1-1 三股胜肽鏈互相纏繞形成三股螺旋結構的膠原蛋白分子.....	2
圖 1-2 $\alpha$ -helix 結構.....	3
圖 1-3 $\beta$ -sheet 結構.....	4
圖 1-4 三條胜肽股之間以 $\text{CO}_{(\text{X})}\text{-NH}_{(\text{Gly})}$ 使得膠原蛋白的三股螺旋結構穩定....	4
圖 1-5 利用亞鐵離子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 和 bpy 之間好的親和力幫助模擬胜肽形成膠原蛋白的三股螺旋結構.....	7
圖 1-6 短模擬胜肽利用兩端的修飾基，和金屬形成配位後可形成膠原蛋白纖維.....	8
圖 1-7 (a) H-byp 的胺基酸序列；(b) 形成三股螺旋的 H-byp；(c)利用 bpy 和亞鐵離子作用形成膠原蛋白纖維.....	9
圖 1-8 Histidine.....	10
圖 1-9 胜肽和金屬產生配位鍵結後，形成膠原蛋白的三股螺旋結構.....	12
圖 1-10 圓二色光譜儀原理.....	16
圖 1-11 經偏振片後，產生和電場波同方向的平面偏極光.....	17
圖 1-12 圓偏極光.....	17
圖 1-13 不同蛋白質二級結構的圓二色 (CD) 光譜圖.....	20
圖 3-1 膠原蛋白三股螺旋結構在不同溫度時的 CD 訊號變化特徵曲線.....	33
圖 3-2 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 $\text{GHP}(\text{PPG})_7$ 和加入銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的 far-UV CD 光譜.....	35
圖 3-3 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 $\text{GHP}(\text{PPG})_7$ 和加入銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的熔化曲線.....	35
圖 3-4 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 $(\text{PPG})_7\text{PHG}$ 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 及銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的 far-UV CD 光譜.....	37
圖 3-5 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 $(\text{PPG})_7\text{PHG}$ 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ )	

及銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的熔化曲線.....	37
圖 3-6 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 和加入銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜.....	39
圖 3-7 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 和加入銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後經過加熱過程的熔化曲線.....	39
圖 3-8 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 和加入銅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜.....	40
圖 3-9 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 和加入銅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後經過加熱過程的熔化曲線.....	40
圖 3-10 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 2.9 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 和加入鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 及銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的 far-UV CD 光譜.....	42
圖 3-11 在 pH 2.9 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 和加入鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 及銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的熔化曲線.....	42
圖 3-12 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 8.0 時，模擬胜肽(PPG) <sub>7</sub> GH 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^{+}$ ) 及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後的 far-UV CD 光譜.....	44
圖 3-13 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^{+}$ ) 及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後的熔化曲線.....	44
圖 3-14 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 和加入銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜.....	46
圖 3-15 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 和加入銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後經過加熱過程的熔化曲線.....	46
圖 3-16 在 $2^{\circ}\text{C}$ 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 和加入鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜.....	47
圖 3-17 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 和加入鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後經過加熱	

過程的熔化曲線.....	47
圖 3-18 在 pH 7.0 時，模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 和銅離子 (Cu <sup>2+</sup> ) 混合溶液的熔化曲線.....	49
圖 3-19 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG) <sub>7</sub> GH 和加入鐵離子(Fe <sup>3+</sup> )、鈷離子(Co <sup>2+</sup> )、鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> )、銅離子 (Cu <sup>2+</sup> )、亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 及鋅離子 (Zn <sup>2+</sup> ) 後的 far-UV CD 光譜.....	50
圖 3-20 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG) <sub>7</sub> GH 和加入鐵離子 (Fe <sup>3+</sup> )、鈷離子 (Co <sup>2+</sup> )、鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> )、銅離子 (Cu <sup>2+</sup> )、亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 及鋅離子 (Zn <sup>2+</sup> ) 後的熔化曲線.....	50
圖 3-21 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG) <sub>7</sub> 和加入鐵離子 (Fe <sup>3+</sup> )、鈷離子 (Co <sup>2+</sup> )、鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> )、銅離子 (Cu <sup>2+</sup> )、亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 及鋅離子 (Zn <sup>2+</sup> ) 後的 far-UV CD 光譜.....	52
圖 3-22 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG) <sub>7</sub> 和加入鐵離子 (Fe <sup>3+</sup> )、鈷離子 (Co <sup>2+</sup> )、鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> )、銅離子 (Cu <sup>2+</sup> )、亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 及鋅離子 (Zn <sup>2+</sup> ) 後的熔化曲線.....	52
圖 3-23 1 mg/mL (PPG) <sub>7</sub> GH 和不同濃度的銅離子 (Cu <sup>2+</sup> ) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號.....	54
圖 3-24 1 mg/mL (PPG) <sub>7</sub> GH 和不同濃度的亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號.....	54
圖 3-25 0.5 mg/mL HG(PPG) <sub>7</sub> GH 和不同濃度的銅離子 (Cu <sup>2+</sup> ) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號.....	55
圖 3-26 0.5 mg/mL HG(PPG) <sub>7</sub> GH 和不同濃度的亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號.....	56
圖 3-27 (PPG) <sub>7</sub> GH 和銅離子(Cu <sup>+</sup> )、亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 及鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> ) 作用的疊速率量測圖.....	58
圖 3-28 HG(PPG) <sub>7</sub> GH 和銅離子(Cu <sup>+</sup> )、亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 及鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> ) 作用的	

折疊速率量測圖.....	58
圖 3-29 (PPG) <sub>7</sub> GH 加入銅離子 (Cu <sup>2+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較 (a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	60
圖 3-30 (PPG) <sub>7</sub> GH 加入亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較 (a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	61
圖 3-31 (PPG) <sub>7</sub> GH 加入鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較 (a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	63
圖 3-32 HG(PPG) <sub>7</sub> GH 加入銅離子 (Cu <sup>2+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較(a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	64
圖 3-33 HG(PPG) <sub>7</sub> GH 加入亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較 (a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	65
圖 3-34 HG(PPG) <sub>7</sub> GH 加入鎳離子 (Ni <sup>2+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較 (a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	66
圖 3-35 HG(PPG) <sub>7</sub> 加入銅離子 (Cu <sup>2+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較(a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	67
圖 3-36 HG(PPG) <sub>7</sub> 加入亞銅離子 (Cu <sup>+</sup> ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup> H-NMR 圖譜的比較(a) 3 – 4.1 ppm (b) 7 - 9 ppm.....	69
附錄圖 1. (PPG) <sub>7</sub> GH 和 Cu <sup>2+</sup> 配位後的 EPR 光譜圖.....	75
附錄圖 2. (PPG) <sub>7</sub> GH 和 Ni <sup>2+</sup> 配位後的 EPR 光譜圖.....	75
附錄圖 3. (PPG) <sub>7</sub> GH 和 Cu <sup>2+</sup> 配位後的 EPR 光譜圖.....	76
附錄圖 4. (PPG) <sub>7</sub> GH 和 Ni <sup>2+</sup> 配位後的 EPR 光譜圖.....	76

## 表目錄

表 1-1 含 Histidine 的模擬胜肽序列.....	11
表 1-2 不同合成方法的活化因子及保護基.....	14
表1-3 常見的二級結構的 CD 吸收光譜範圍.....	20
表 3-1 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 GHP(PPG) <sub>7</sub> 在加入銅離子 (Cu <sup>2+</sup> ) 前後的 CD 光譜相關參數.....	36
表 3-2 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數.....	38
表 3-3 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 在加入金屬離子後經過加熱過程前後的 CD 光譜相關參數.....	41
表 3-4 在 2 °C 及 pH 2.91 時, 模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> PHG 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數.....	43
表 3-5 pH 8.0 時, 模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數.....	45
表 3-6 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 (PPG) <sub>7</sub> GH 在加入金屬離子後經加熱過程前後的 CD 光譜相關參數.....	48
表 3-7 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 HG(PPG) <sub>7</sub> GH 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數.....	51
表 3-8 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 HG(PPG) <sub>7</sub> 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數.....	53
表 3-9 模擬胜肽和金屬折疊速率比較.....	59

# 第一章 緒論

## 1-1 膠原蛋白 (collagen)

細胞是構成人體最基本的結構和功能的單位，存在於細胞與細胞之間的就是細胞外間質。細胞外間質是由細胞本身所產生的，是一種不具有任何細胞形態和結構的物質，它包括：(1) 結構性成分：如蛋白質纖維、結晶性的無機礦物等。(2) 細胞附著因子：其組成以醣蛋白類為主。(3) 纖維間基質：為填充於纖維之間的「果凍狀」物質。因此細胞外間質就對細胞提供了保護、固定、連結和營養的作用，並且逐一地構成細胞能賴以生存的環境。<sup>1</sup>

眾多形態相似及功能相近的細胞，經由細胞外間質組合成的群體就叫做組織。依照其中細胞種類的不同而分為不同的組織，一般來說大致上將之歸納為四類基本組織，即上皮組織、結締組織、肌組織和神經組織。首先簡單介紹不同組織的特色：

(1) 上皮組織：由密集的上皮細胞及少量細胞外間質所構成，其最大的特色就是在上皮組織內無血管分布，所以其營養物是藉由深層的結締組織裡的血管所供應，上皮組織在人體之中具有保護、吸收、分泌和排泄等在物質傳遞上的功能。(2) 結締組織：恰與上皮組織構成的機構相反，結締組織是由大量的細胞外間質與散落在其中的細胞所組成，細胞外間質包含基質、纖維和組織液等，而膠原蛋白 (collagen) 正是動物結締組織中最主要的蛋白質，同時亦為細胞外間質裡最重要的成分，在動物的結締組織中，一般除了含有大約 60~70 % 的水分之外，還包含了約 20~30 % 的膠原蛋白，也因此膠原蛋白是廣泛存在於動物細胞內的一種蛋白質。結締組織在人體內的分布廣泛，幾乎遍佈所有器官。(3) 肌組織：由肌細胞或稱肌纖維所組成，



按照其存在部位、結構和功能的不同，可分為橫紋骨骼肌、平滑肌和心肌三種。(4)

神經組織：由神經細胞（神經元）和神經膠質所組成，也是人體內起主導作用的系統。內、外環境的各種資訊，經由感受器接受後，通過周圍神經傳遞到腦和脊髓的各級中樞進行整合，再經周圍神經控制和調節各系統器官的活動，以維持與內、外界環境的相對平衡。

蛋白質在生物體中是一種很重要的物質，扮演著關鍵性的角色，諸如細胞架構、酵素催化、訊息傳遞、物質傳輸、能量儲存等，皆須仰賴蛋白質，而高含量的膠原蛋白正是動物體內重要的蛋白質之一。膠原蛋白在人體內蛋白質中約占 25 ~ 35 %，在筋腱和骨頭的有機質中占 90 % 以上，亦是組成皮膚的主要結構性蛋白質，占 50 % 以上，主要存在於真皮層中，提供支持、保護、及各種機械性質，並賦予皮膚彈性與強度。

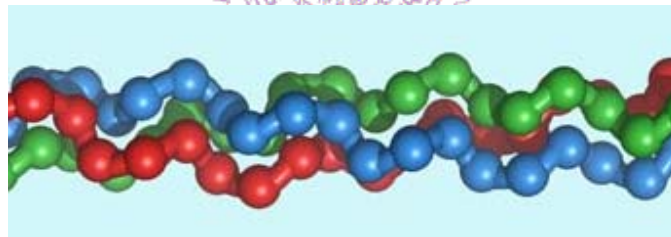


圖 1-1. 三股胜肽鏈互相纏繞形成三股螺旋結構的膠原蛋白分子。<sup>2</sup>

膠原蛋白又稱為膠原質，主要是以不溶纖維形式存在於動物體內，為脊椎動物體內含量最豐富的蛋白質，約占了體內總蛋白質的 25 %。換言之，膠原蛋白就占了蛋白質的四分之一，主要皆分布在人體內的結締組織中，是結締組織中非常重要的一種結構性蛋白質。它扮演著有如「床墊」及「水泥」的角色，能保護並連結各種組織，以支持人體的結構。從生物化學的觀點來看，它的基本結構由大約一千個



胺基酸組成，是由三股分子量約為九萬五千道爾頓 (Daltons) 的胜肽鏈，以三重螺旋方式互相纏繞而形成分子量達三十萬道爾頓，直徑約 15 毫米 (mm) 的巨大蛋白質分子 (圖 1-1)<sup>2</sup>。

膠原蛋白分子中環繞的三股螺旋線圈，每一股為左旋、延伸的聚脯胺酸第二型 (polyproline type II, PP II) 螺旋結構，這三股延著右手螺旋軸纏繞在一起，以 Rich & Crick (1961) 膠原蛋白鏈間氫鍵的型態，有一個殘基交錯在相鄰的鏈之間。而在胜肽鏈上每三個胺基酸就需要一個甘胺酸 (glycine) 的存在，以形成延伸、緊密的自然三股螺旋，因此有重複的 (Gly-Xaa-Yaa) 序列，Xaa 和 Yaa 的位置經常是脯酸 (proline) 或羥脯胺酸 (hydroxyproline)，羥脯胺酸是將羥基放在脯胺酸的四號位置上。雖然羥脯胺酸是很罕見的胺基酸，但在膠原蛋白和包含類膠原蛋白區域蛋白質內是很普遍的。因為含有大量上述含氨基的胺基酸，這些胜肽鏈無法形成典型蛋白質二級結構如  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ -helix 圖 1-2)<sup>3</sup> 和  $\beta$ -板片 ( $\beta$ -sheet 圖 1-3)<sup>3</sup>，反而是這些個別胜肽鏈形成 PP II 後，再相互耦合形成三股螺旋結構，相對於  $\alpha$ -螺旋，膠原

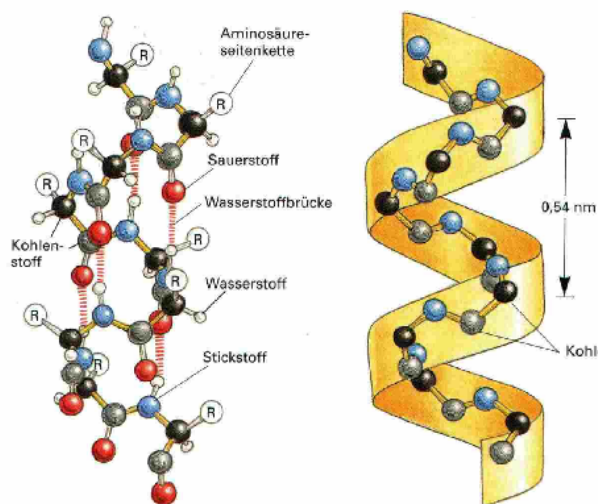


圖 1-2.  $\alpha$ -helix 結構。<sup>3</sup>

蛋白三股螺旋較細而長，每轉一圈只有 3.3 個胺基酸；而  $\alpha$ -螺旋卻有 3.6 個胺基酸。因為三股螺旋結構的中心空間很小，只有甘胺酸適合塞入這個位置，所以膠原蛋白纖維每三個胺基酸循環一個甘胺酸 (glycine)，而且甘胺酸氨基上的氫 (amide proton) 提供當氫鍵的供

給者 (donor) 和其他股胜肽鏈

形成氫鍵  $\text{CO}_{(X)}\text{-NH}_{(\text{Gly})}$  (圖

1-4)<sup>4</sup>，這些股間的氫鍵是維繫

三股螺旋結構穩定的主要作用

力；另外，Pro 特有的夾角也

提供了三股螺旋結構的形成因

素<sup>5</sup>。所謂三股螺旋結構是指結

構中有三股胜肽鏈，彼此各自

以 left-handed 螺旋成 polyproline

結構再以 right-handed 形成三股螺旋。

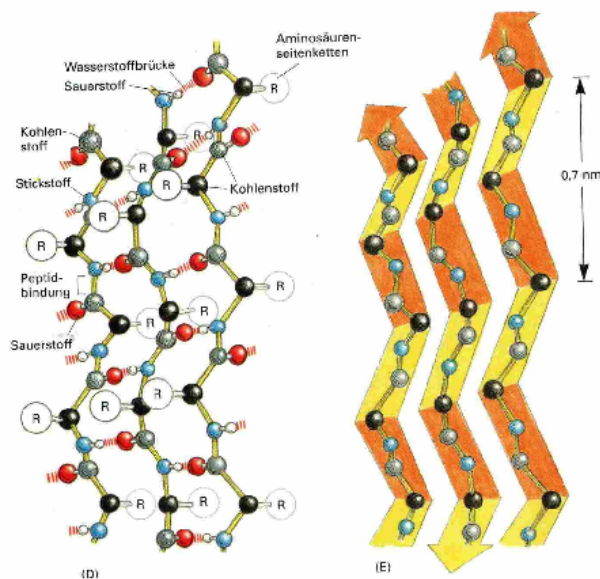


圖 1-3.  $\beta$ -sheet 結構。<sup>3</sup>

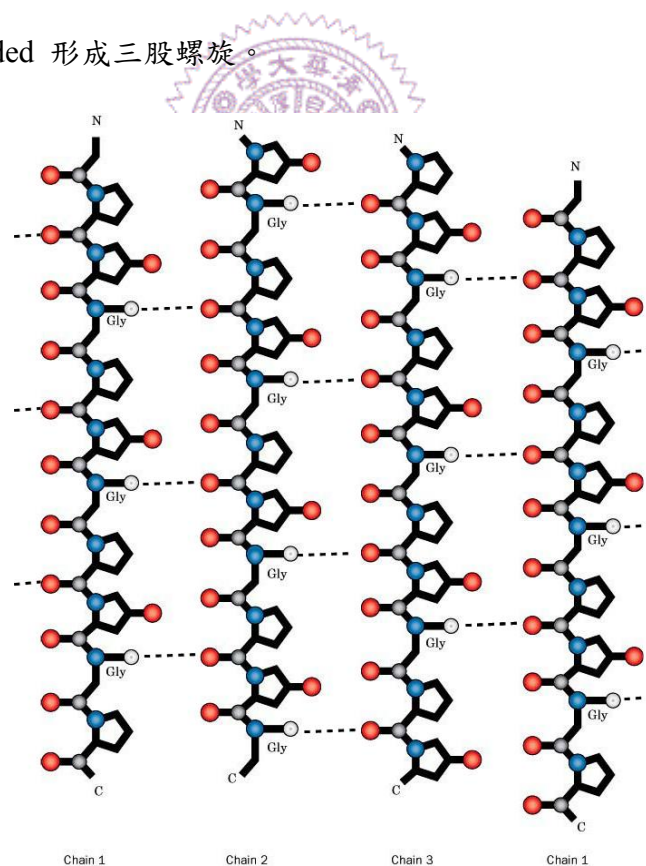


圖 1-4. 三條胜肽股之間以  $\text{CO}_{(X)}\text{-NH}_{(\text{Gly})}$  使得膠原蛋白的三股螺旋結構穩定。<sup>4</sup>

至目前為止已被發現並歸類的膠原蛋白分子有二十一種形式，其分布於體內不同的組織中。就不同形式的膠原蛋白分子的組成份而言，有些是由兩條相同，及一條不同的胜肽所組成，如 Type I、V 及 IV；有些是由三條相同的胜肽所組成，如 Type II、III、V、XII、X 及 VII；而有些則由三條不相同的胜肽所組成，如 Type VI、IX 及 XI。其中以 Type I 膠原蛋白的含量最多，約占全部膠原蛋白含量的 90 %，也是用途最廣的膠原蛋白<sup>6</sup>。

膠原蛋白具有許多優異的特性，使其在醫學上可做廣泛的應用，且效果非常良好，其中最主要的應用領域是生醫材料。所謂生醫材料是將材料科學與生物醫學結合，研究並製造出用以取代人體器官或組織功能的器材，如人工血管、氣管、皮膚等。由於膠原蛋白是人體組織的主要成分，因此在人體器官組織的修復及再生上扮演著重要的角色，使得膠原蛋白成為一種理想的高分子生醫材料。

人體膠原蛋白和動物膠原蛋白結構類似，因此藉由生化科技處理，就可從多種動物中取得高純度、高生物相容性及低免疫排斥性的膠原蛋白<sup>6</sup>。而膠原蛋白依其溶解性可分為：(1) 原生態膠原蛋白，例如纖維狀膠原蛋白；(2) 酸溶性膠原蛋白；(3) 水溶性膠原蛋白（又叫可溶性膠原蛋白）及 (4) 水解性膠原蛋白（亦稱明膠）。前者之膠原蛋白的製造較為複雜，主要應用在醫療用生醫材料方面，如人工皮膚、止血劑、人工血管、以及護膚化妝品等，因此價位較高。後者之膠原蛋白不具三股螺旋結構，製造較為簡易，是由真皮或其他組織以酸、鹼、熱或酵素水解後的小分子量產物。

膠原蛋白的應用領域有<sup>7</sup>：

- (1) 化妝品—護膚霜、潤髮劑等。
- (2) 食品工業—健康食品、飲料、食品添加物等。
- (3) 生醫材料—創傷敷料、止血棉、組織修復產品等。
- (4) 醫藥品及其他醫學用途—藥物傳輸系統、風濕性關節炎用藥、降血壓劑、膀胱失禁用藥及癌症、肝病診斷用藥等。
- (4) 化工原料—塗料、塑膠、油墨等。
- (5) 研究用途—細胞培養、生物感應器、生物反應器擔體膜及血小板凝集用藥。
- (6) 其他—膠原蛋白與樹脂結合成香煙濾嘴與過濾劑之材料。

膠原蛋白作為生醫材料之優點可歸納如下：

- a. 含量豐富—來源為動物組織 (脊椎動物體內蛋白質約 30 % 為膠原蛋白)，並且容易取得。
- b. 低抗原性—膠原蛋白分子去除免疫端非螺旋結構部份 (telopeptide) 後，即成低抗原性之材料。
- c. 直接由體內分解、吸收—因具有生物可分解性、相容性，因此治療後可直接由體內分解、吸收，不需後續的移除工作，。
- d. 無毒性—不會引起發燒、溶血、過敏、致癌等生體不良作用。
- e. 可消毒性—可利用加熱法 (直接加熱、蒸氣加熱、煮沸法)、氣體消毒 (環氧乙烯、甲醛)、放射性消毒法及無菌過濾法等方法消毒，以減少病菌感染之機率。
- f. 增加傷口癒合速度—有促進細胞附著生長之功能，可增加傷口癒合速度。
- g. 止血性—促進血小板凝集，具有止血性。

- h. 生物塑膠性質—高抗拉性及低延伸性，具有生物塑膠性質。
- i. 調和的力學性質—具備適當的機械強度。
- j. 經加工處理可控制其分解速度—不同的體內分解速度，以適用不同需求與目的。
- k. 可利用不同官能基修飾膠原蛋白分子改變其物化性質，並與合成高分子作成複合材料，使得其應用範圍更為廣泛。

## 1-2 不同方法的設計和三股螺旋結構之穩定

三股螺旋是膠原蛋白的主要結構，此結構在許多蛋白質內扮演重要角色，例如血清蛋白 C1q 和巨噬細胞接受器，這兩種蛋白質中，三股螺旋結構區域即為負責鍵結反應的位置<sup>8,9,10</sup>。目前了解三股螺旋的結構是真實膠原蛋白和類膠原蛋白胜肽纖維繞射研究的結果，合成的模擬胜肽在纖維繞射型態方面和自然界的膠原蛋白相似，證實了合成的模擬胜肽可用來當成膠原蛋白的模型，增加其在生物學上的角色<sup>11,12</sup>。

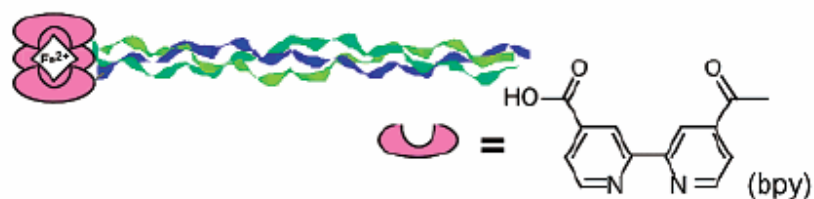


圖 1-5. 利用亞鐵離子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 和 bpy 之間好的親和力幫助模擬胜肽形成膠原蛋白的三股螺旋結構<sup>17</sup>。

為了穩定較短模擬胜肽所組成的三股螺旋結構，可利用共價鍵將三條模擬胜肽股綁在一起的<sup>13</sup>，形成一個模版 (template)。例如將三股模擬胜肽鏈鍵結到 Kemp's



triacid (*cis,cis*-1,3,5-trimethylcyclohexane-1,3,5-tricarboxylic acid) 上，幫助此三股模擬胜肽彼此纏繞形成三股螺旋結構<sup>14</sup>。或是將經修飾過後模擬胜肽鍵結到 TRIS (tris(carboxyethoxymethyl)aminomethane) 後，再利用鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 幫助模擬胜肽形成三股螺旋結構<sup>15,16</sup>。但這些方法在合成模板的過程牽涉到許多複雜的反應步驟，因此可在合成的模擬胜肽上做修飾，例如將聯吡啶 (bipyridine, bpy) 基接在模擬胜肽的 N 端<sup>17</sup>，bpy 和金屬有很好的配位，利用碳耦合 (carbodiimide coupling) 和亞鐵離子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 作用，使模擬胜肽產生三股螺旋結構 (圖 1-5)。

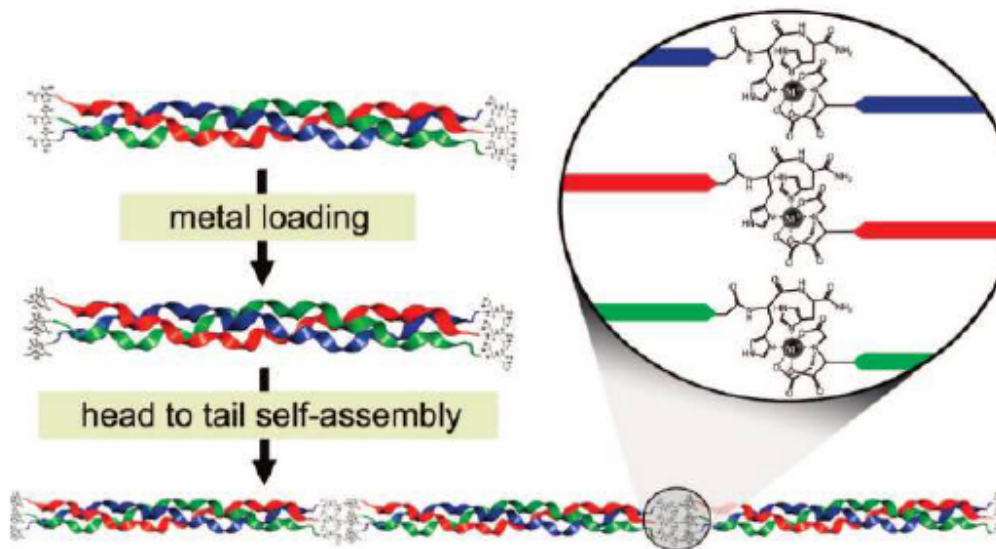


圖 1-6. 短模擬胜肽利用兩端的修飾基，和金屬形成配位後可形成膠原蛋白纖維<sup>18</sup>。

金屬除了可以幫助模擬胜肽形成三股螺旋結構之外，還可使具三股螺旋結構的膠原蛋白胜肽彼此聚集成纖維，使胜肽的規模可以從奈米到微米，在尺寸上有顯著的增加，在形狀也可有更明顯的外型<sup>18</sup>。將確定會形成膠原蛋白三股螺旋結構的 (Pro-Hyp-Gly)<sub>9</sub> 在 N 端用三甘胺酸 (nitrilotriacetic acid, NTA) 修飾，在 C 端則用

histidine 修飾。從圖 1-6 中可看出，三股螺旋結構的一端為六個 histidine，另一端為三個 NTA，和金屬配位後形成類似 NTA/His 的化合物，使短的模擬胜肽藉由此形式堆積成較大的膠原蛋白纖維 (collagen fibers)<sup>18</sup>。

另外，除了在長鏈的 N 端或 C 端以易和金屬反應的化合物修飾之外，也可將化合物修飾到長鏈的其他部分，將具有 bipyridyl 修飾的賴胺酸 (lysine) 取代重複的三股螺旋胜肽 (POG)<sub>9</sub> 長鏈中央的羧脯胺酸 (圖 1-7a, H-byp)，使得三股螺旋的維度在半徑上增加 (圖 1-7b)，使胜肽的自身堆積結構擴展為三維空間，成為膠原蛋白胜肽纖維聚分子 (圖 1-7c)<sup>19</sup>。

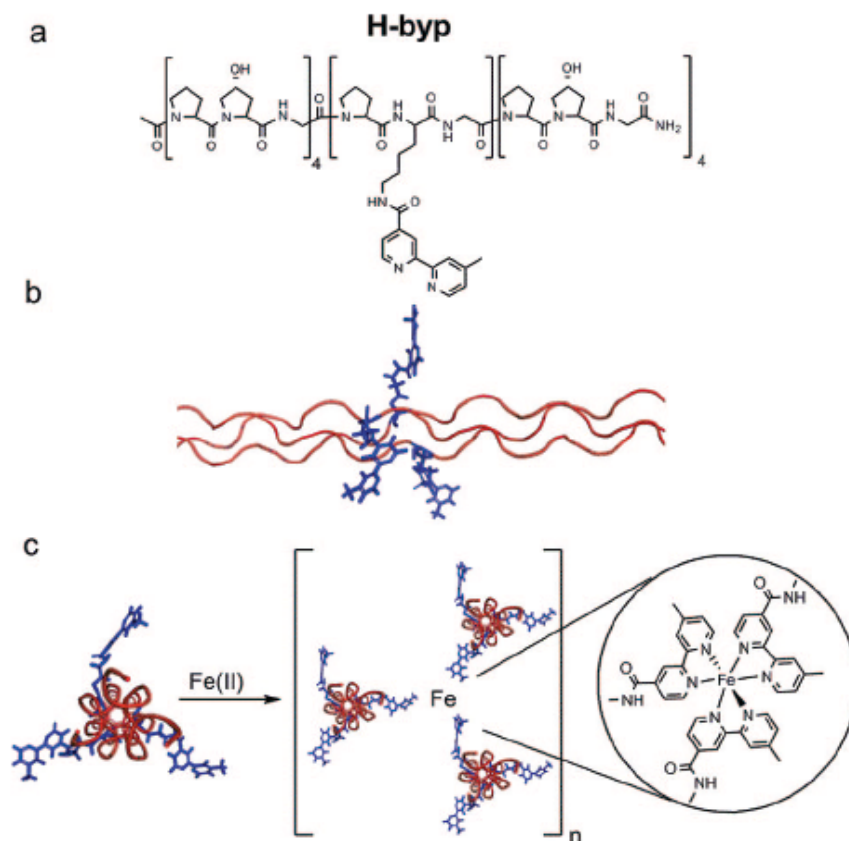


圖 1-7. (a) H-byp 的胺基酸序列；(b) 形成三股螺旋的 H-byp；(c)利用 byp 和亞鐵離子作用形成膠原蛋白纖維<sup>19</sup>。

此外，靜電作用力<sup>20</sup>、 $\pi$ - $\pi$  作用力<sup>21,22</sup>、經修飾過的半胱氨酸 (cystein)<sup>23</sup> 等作用力已被應用在幫助胜肽形成膠原蛋白的三股螺旋結構，或是更進一步形成膠原蛋白胜肽纖維。這些研究結果提供了許多穩定膠原蛋白及形成大型膠原蛋白纖維的方法，使得膠原蛋白可以提高在組織重組或藥物傳遞領域上應用的可能性。

### 1-3 模擬胜肽的設計

膠原蛋白重複的 (Xaa-Yaa-Gly) 序列，對纖維繞射、胜肽模型和理論研究提供了很好的機會，在過去的研究中，以 (Pro-Pro-Gly)<sub>n</sub> 為主的膠原蛋白模型，廣泛的被當成描述膠原蛋白三股螺旋結構最簡單的模型。它的纖維繞射型態和發現的膠原蛋白幾乎相似，對於改善結構有很顯著的定義，此模型展現了 Rich & Crick (1961) 所提的膠原蛋白所具備的基本特性，被認為是可以獲得的最佳膠原蛋白三股螺旋構形<sup>8</sup>。

想像金屬配位對模擬胜肽的設計及結構建造有影響，因此更進一步假設令人信服的幾何結構需要有強的金屬和配位基之間的反應，對於控制聚合物狀態和模擬胜肽參與反應的方位都有高度的影響。根據假設，金屬離子幫助自身堆積的過程需遵守以下設計原則：(1) 參與自身堆積的每一個模擬胜肽至少須提供一鍵結位置給金屬離子；(2) 模擬胜肽只有在呈現對的相關方位時，配位基和金屬之間的空間才會夠靠近而產生配位，換句話說，鍵結金屬的位置需為排除或不傾向其他四級結構的排列；

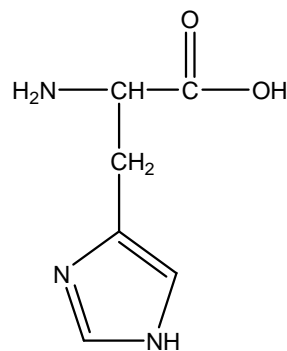


圖 1-8. Histidine。

(3) 和金屬配位後的金屬複合物有足夠的形成常數使對熱穩定性有顯著的貢獻<sup>24</sup>。



在和金屬鍵結配位基的選擇上，從許多文獻中可發現，因組胺酸 (histidine，圖 1-8) 和金屬之間有良好的親和力，例如人體中的幽門桿菌細胞即為富含組氨酸的細胞質蛋白，組胺酸和金屬之間的親和力使得幽門桿菌細胞在儲存鎳金屬上扮演重要的角色<sup>25,26,27</sup>，此結果產生大量含雙核鎳的金屬酵素，進而催化尿素的分解，產生氨水 (ammonia) 和氨基甲酸鹽 (carbamate) 中和胃酸<sup>28</sup>。

表 1-1 含 Histidine 的模擬胜肽序列

Peptide	Sequence <sup>a</sup>
GHP(PPG) <sub>7</sub>	Ac-Gly-His-Pro-(Pro-Pro-Gly) <sub>7</sub> -NH <sub>2</sub>
(PPG) <sub>7</sub> PHG	Ac-(Pro-Pro-Gly) <sub>7</sub> -Pro-His-Gly-NH <sub>2</sub>
(PPG) <sub>7</sub> GH	Ac-(Pro-Pro-Gly) <sub>7</sub> -Gly-His-NH <sub>2</sub>
HG(PPG) <sub>7</sub> GH	Ac-His-Gly-(Pro-Pro-Gly) <sub>7</sub> -Gly-His-NH <sub>2</sub>
HG(PPG) <sub>7</sub>	Ac-His-Gly-(Pro-Pro-Gly) <sub>7</sub> -NH <sub>2</sub>

<sup>a</sup>Ac indicates an acetylated N-terminus and NH<sub>2</sub> indicates an amidated C-terminus.

在此論文研究中，我們想藉由金屬-組胺酸間之配位，來誘發短的膠原蛋白胜肽形成穩定的三股螺旋結構，於是我們合成一系列在 N 端和 C 端分別含 histidine 的模擬胜肽，GHP(PPG)<sub>7</sub>、(PPG)<sub>7</sub>PHG、(PPG)<sub>7</sub>GH、HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和 HG(PPG)<sub>7</sub>，其序列如表 1-1，分別和不同金屬作用。根據文獻，含有七段重複序列的 (Pro-Pro-Gly) 所形成的胜肽在低濃度時並不會形成穩定的三股螺旋結構，希望藉由 histidine 和金屬之間的親和力，可讓三股模擬胜肽彼此靠近產生氫鍵，形成三股螺旋結構 (圖 1-9)<sup>24</sup>。另外，在 histidine 與主要的 (PPG) 序列間插入甘胺酸 (glycine)，主要是調整金屬和三股螺旋結構之間的空間 (spacer)，使 histidine 與金

屬配位時具有較大之彈性。

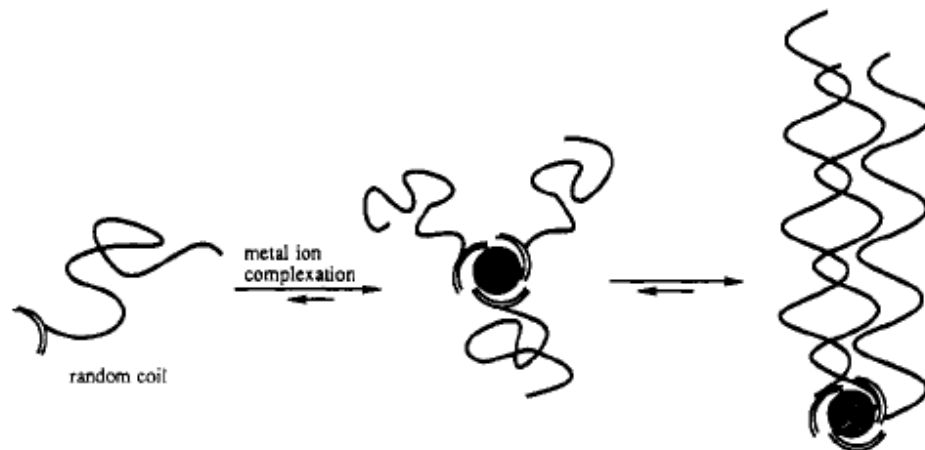


圖 1-9. 胜肽和金屬產生配位鍵結後，形成膠原蛋白的三股螺旋結構<sup>24</sup>。

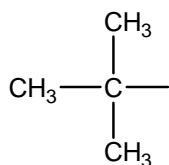
為了避免模擬胜肽本身即有折疊的情形，透過預熱的方式使得模擬胜肽以單鏈形式存在，在緩慢冷卻的過程中，金屬離子和 His 可有良好的配位，幫助模擬胜肽形成穩定的三股螺旋結構<sup>29</sup>。

#### 1-4 固相胜肽合成 (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) 介紹

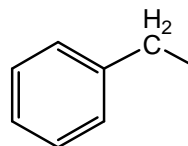
固相胜肽合成方法是將胺基酸的 C 端連接到環境反應溶劑不會溶解的聚苯乙烯支持物上，裸露出的胺基酸 N 端與另一胺基酸殘基的碳端耦合形成胜肽鍵 (peptide bond)，此反應程序可以經由聚苯乙烯支持物的過濾與溶劑清洗，簡化反應的分離與純化。胜肽鍵的合成為了減少外消旋化，從 C 端開始合成至 N 端，所以  $\alpha$ -胺基的保護顯得重要，而且  $\alpha$ -胺基因為在溶液中有反應性，如果不加以保護起來，會使得某些反應發生錯誤而得到錯的產物。

目前合成胜肽常用的方發有 FastMoc、Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) 與 Boc (t-Butyloxycarbonyl) 等三種方式。這三種方法簡單區分，依使用的活化因子與胺基酸的 N 端保護基而分類 (如表 1-2)，在 FastMoc 化學方法所使用的活化因子為 HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)，胺基酸 N 端的保護基為 Fmoc，Fmoc 化學方法與 Boc 化學方法使用的活化因子皆為 HOBt (1-Hydroxybenzotriazole) / DCC (Dicyclohexylcarbodiimide)，至於胺基酸 N 端保護基方面，Fmoc 方法與 Boc 方法不同，Fmoc 方法為以 Fmoc 為胺基之保護，而 Boc 方法則以 Boc 來保護胺基。

側鏈保護基在去掉  $\alpha$ -胺基的保護基時需要穩定存在，但是在最後去除保護時又要可移除，所以通常側鏈保護基的性質和  $\alpha$ -胺基的保護基性質相反，Fmoc 系列用 *tert*-butyl，Boc 系列常用 benzyl，另外隨著側鏈的不同，適當的側鏈保護基也會跟著改變。



*tert*-butyl

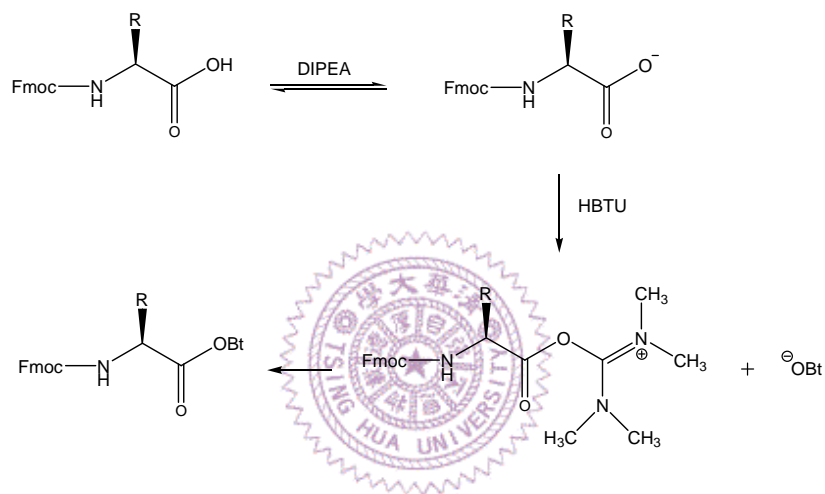


benzyl

在最後移除側鏈保護基時，benzyl 使用 HF (氫氟酸) 或是 TFMSA (trifluoromethanesulfonic acid) 移除，*tert*-butyl 使用 TFA (trifluoroacetic acid) 移除，Boc 保護基在酸性條件下移除，穩定於鹼性和氫化催化反應，酸性條件通常用 TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、HCl、HBr 或是其他酸。Fmoc 保護基在溫和鹼性環境下移除：通常利用 diluted liquid ammonia、ethanolamine、morpholine 或是 piperidine。

Fmoc-胺基酸 C 端先加入 DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine) 使溶液呈鹼性而脫掉氫後，用 HBTU 活化成 Fmoc-amino acid HOBt ester (Scheme 1)，通常在反應器中用 piperidine 將 Fmoc-peptide-resin 上的 Fmoc 官能基去除，接著將 Fmoc-amino acid HOBt ester 與已經去除 Fmoc 官能基之胜肽樹酯進行耦合反應 (Scheme 2)。

**Scheme 1 :**



**Scheme 2 :**

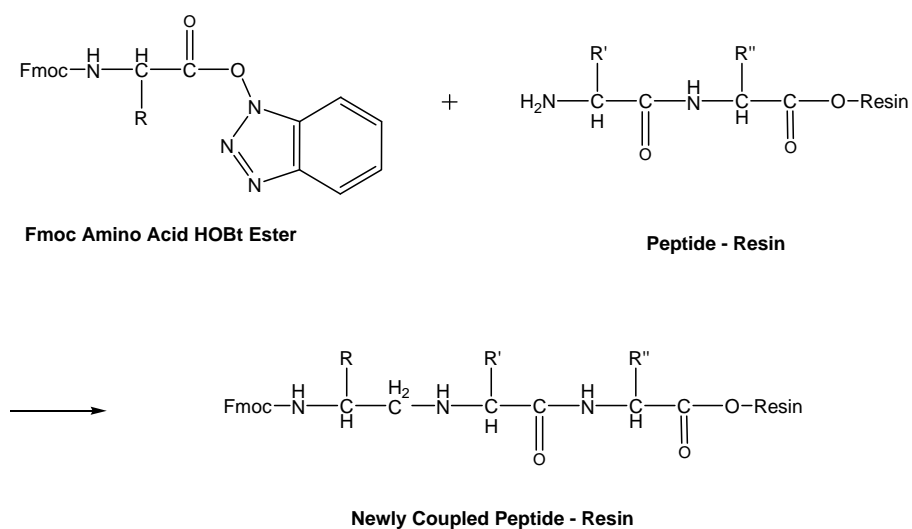
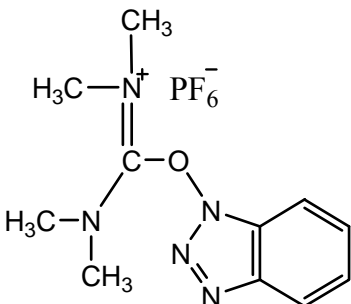
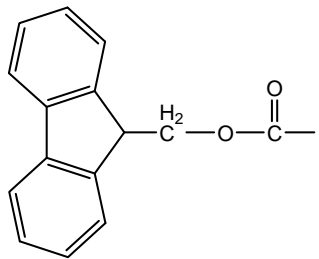
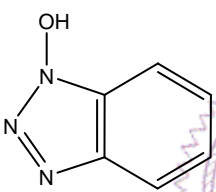
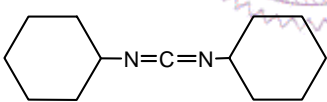
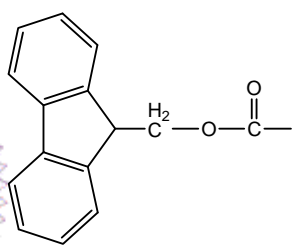
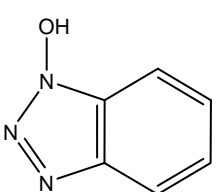
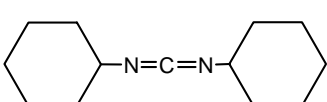
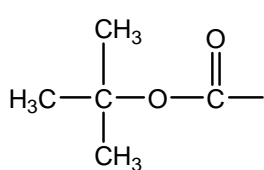


表 1-2 不同合成方法的活化因子及保護基

化學方法	活化因子	胺基酸 N 端保護基
FastMoc	<p>HBTU</p> 	<p>Fmoc-</p> 
Fmoc	<p>HOBt</p>  <p>DCC</p> 	<p>Fmoc-</p> 
Boc	<p>HOBt</p>  <p>DCC</p> 	<p>Boc-</p> 

胜肽合成儀將含有保護基的胺基酸經由活化、耦合、去保護基等過程將接於固相樹脂上，再經由溶劑 DCM (Dichloromethane)、NMP (1-methyl-2-pyrrolidinone) 清洗，將上述過程中未耦合上的 Fmoc-胺基酸 HOBt 活化酯及去除 Fmoc 保護基產生的哌啶氨基甲酸酯鹽 (Piperidine-carbamate salt) 清除去除，可簡化純化分離。

### 1-5 圓二色光譜 (Circular Dichroism, CD)

圓二色光譜提供一個快速且簡易研究具有圓二色性物質之結構變化的重要技術，測量具有具有光學活性 (optically active) 或對掌性 (chiral) 樣品對左旋 (left-) 與右旋圓偏振光 (right-circular polarized light) 吸收度的差異，主要分為紫外光區 (ultraviolet region, 190–330 nm) 的電子躍遷圓二色光譜 (electronic circular dichroism, ECD) 與紅外光區 (infrared region, 400–4000  $\text{cm}^{-1}$ ) 的分子振動圓二色光譜 (vibrational circular dichroism, VCD)<sup>23</sup>。圓二色光譜主要設計原理如圖 1-10。

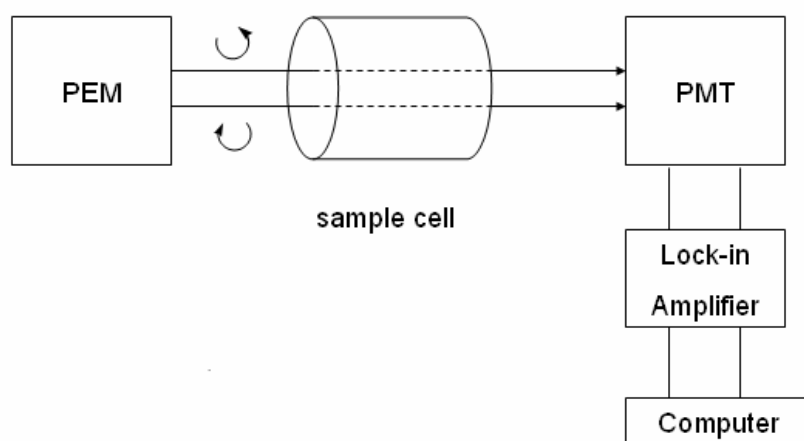


圖 1-10. 圓二色光譜儀原理。PEM (Photoelastic Modulator) 為光學元件，可使單光源的線性光轉變為圓偏極光。

一般的光源放射出相互垂直放射波，包含電場波 (electrical E) 和電磁波 (magnetic vectors M)，經一偏振片後，可產生單一方向的平面偏極光。如圖 1-11，偏振片只允許和電場 E 同方向的光通過。

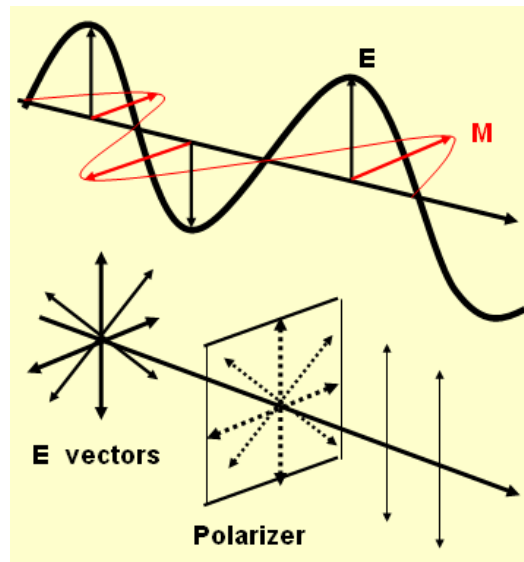


圖 1-11. 經偏振片後，產生和電場波同方向的平面偏極光。

兩相位差  $1/4$  波長的電場波互相垂直，此兩電場波的向量總和沿著螺旋路徑旋轉 (藍色虛線路徑)，產生圓偏極光。

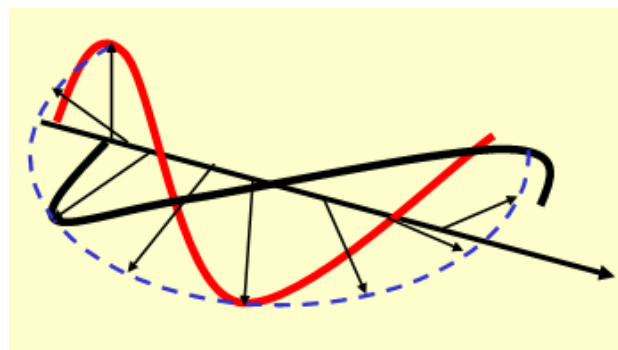


圖 1-12. 圓偏極光。

有機物質的光學構型常常隨環境之溫度、酸鹼值的不同而不同，圓二色光譜的變化可觀察光學構型改變的過程與特性。以蛋白質分子為例，分子中各個氨基酸殘

基 (amino acid residue) 本身的不對稱中心具有光學活性外，蛋白質分子的複雜結構如蛋白質的骨幹胜肽鍵 (peptide bond)、芳香氨基酸殘基 (aromatic amino acid residue) 以及雙硫鍵 (disulfide bond)，也會影響不對稱中心的光學活性，提供不同圓二色的光譜訊號。

化學分子電子躍遷所涵蓋的波長範圍很廣，主要包括近紫外光區 (near ultraviolet region, 250–300 nm)、遠紫外光區 (far ultraviolet region, 190–250 nm)，以及真空紫外光區 (vacuum ultraviolet region, VUV, <190 nm)。蛋白質分子可分為 300 nm 以下的胜肽鍵和側鏈芳香基團之電子躍遷，以及在 300–700 nm 之間由蛋白質輔基等外在發色基團所誘發產生的訊號。其中 250 nm 以下的圓二色光譜包含蛋白質二級結構的詳細資訊，例如  $\alpha$ -螺旋結構約在 222 和 208 nm 處有兩個分別屬於  $n \rightarrow \pi^*$  和  $\pi \rightarrow \pi^*$  電子躍遷的負值譜帶，於 ~192 nm 附近有一個高正值的  $\pi \rightarrow \pi^*$  電子躍遷譜帶，又  $\beta$ -摺板的蛋白質在約 217 nm 有一個小而負值的  $n \rightarrow \pi^*$  電子躍遷譜帶，於約 195 nm 附近有一個正值的  $\pi \rightarrow \pi^*$  電子躍遷譜帶，但強度僅約  $\alpha$ -螺旋結構的一半。也因此利用蛋白質二級結構的特徵光譜 (characteristic spectra)，且具有加成性 (additive) 的特性，可以各種數學演算法解析圓二色光譜得到二級結構的組成。

圓二色光譜是測量具有光學活性或對掌性樣品對左旋與右旋圓偏振吸收度的差異。一般在特定波長的吸收度差異與樣品濃度和光徑的關係，可用 Beer's law 表示如下：

$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R)Cl = \Delta \epsilon Cl$$

$\Delta A$ ：左旋和右旋圓偏振吸收度的差值



$\epsilon_L$ ：左旋圓偏振的莫耳消光係數 (molar extinction coefficient, 單位： $M^{-1} cm^{-1}$ )

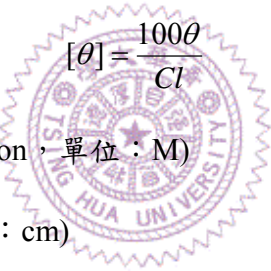
$\epsilon_R$ ：右旋圓偏振的莫耳消光係數 (molar extinction coefficient, 單位： $M^{-1} cm^{-1}$ )

$C$ ：莫耳濃度 (molar concentration, 單位： $M$ )

$l$ ：路徑長度 (pathlength, 單位： $cm$ )

$\Delta\epsilon$ ：左旋和右旋圓偏振莫耳消光係數差值 (molar circular dichroism, 單位： $M^{-1} cm^{-1}$ )

圓二色光譜常以微度 (mdegrees) 或橢圓性 (ellipticity,  $\theta$ ) 表示訊號強度，為了容易進行光譜比對，圓二色光譜常除去濃度和路徑長度的因素，以樣品的莫耳橢圓性 (molar ellipticity  $[\theta]$ , 單位： $deg cm^2 dmol^{-1}$ ) 表示，兩者的關係如下：


$$[\theta] = \frac{100\theta}{Cl}$$

$C$ ：莫耳濃度 (molar concentration, 單位： $M$ )

$l$ ：路徑長度 (pathlength, 單位： $cm$ )

圓二色光譜也常用莫耳消光係數差值表示，其與莫耳橢圓性的關係式如下：

$$[\theta] = 3298.2\Delta\epsilon$$

另外，均單元橢圓性 (mean unit ellipticity, 單位： $deg cm^2 dmol^{-1} res^{-1}$ ) 常用於歸一化高分子圓二色光譜為組成單位，對蛋白質而言，稱為均殘基橢圓性 (mean residue ellipticity, MRE, 單位： $deg cm^2 dmol^{-1}$ )：

$$MRE = \frac{[\theta]}{N}$$

$N$ ：殘基數量。

以下是幾個常見的二級結構的 CD 吸收光譜範圍 (表 1-3)：

表1-3 常見的二級結構的 CD 吸收光譜範圍

	Negative band(nm)	Positive band(nm)
$\alpha$ -helix	222	192
	208	
$\beta$ -sheet	216	195
$\beta$ -turn	220-230(weak)	205
	180-190(strong)	
polyproline II helix	190-200	210-230 weak
Random coil	200	212

以及常見二級結構圖譜的特性 (圖 1-13)：

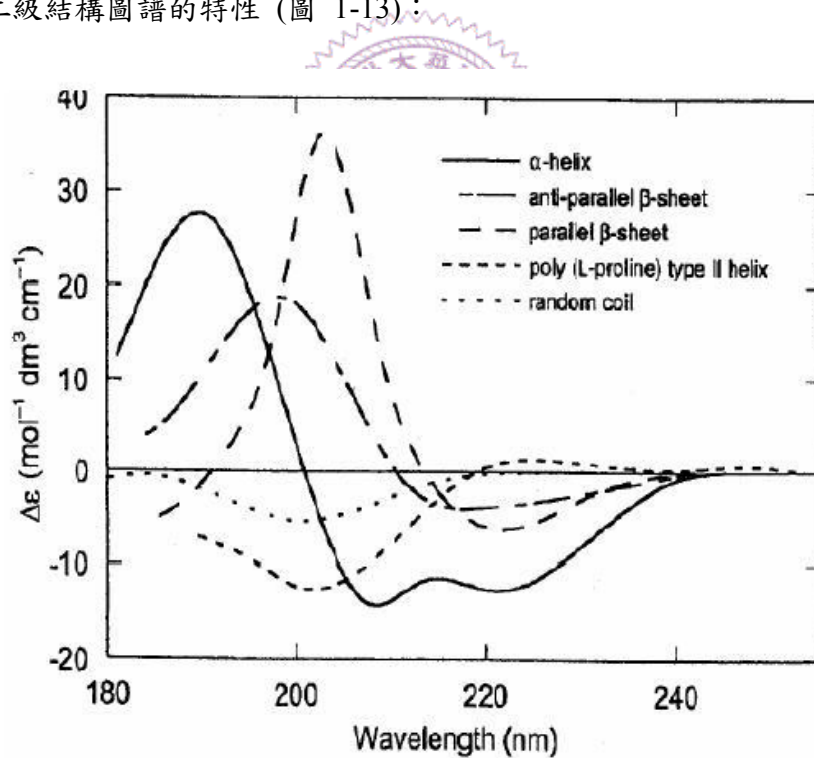


圖 1-13. 不同蛋白質二級結構的圓二色 (CD) 光譜圖。

## 第二章 實驗部份

### 2-1 儀器

核磁共振光譜儀 (NMR)：Varian Unity Inova 500 NMR，此部份之分析工作主要委託國科會清華大學貴重儀器中心譚惠琪小姐代測。

液相層析串聯質譜儀 (MS)：LIQUID CHROMATOGRAPH TANDEM MASS SPECTROMETER，Q-Tof LC/MS/MS，廠牌為 MICROMASS，型號為 Q-Tof，此部份之分析工作主要委託國科會交通大學貴重儀器中心李蘊明小姐代測。

胺基酸序列合成儀：Protein Technologies, Inc PS3<sup>TM</sup> 3 channel serial peptide synthesizer



高效能液相層析儀 (HPLC)：馬達型號為 JASCO PU-2080 Isocratic HPLC Pump，偵測器為 JASCO UV-2077 Multi-wavelength UV/Vis Detector，層析管柱為 Thermo BioBasic-18。

冷凍乾燥機：日本 Eyela，型號為 FDU-1200。

離心機：Hsiangtai，型號為 CN-2060。

圓二色光譜儀 CD (Circular Dichroism Spectrometer)：AVIV Model 410 型

## 2-2 藥品

N,N-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) : Alfa Aesar

1-Hydroxybenzotriazole (HOBt) : Chem-Impex

N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA) : Sigma-Aldrich

N,N-Dimethylformamide (DMF) : Fisher

Acetic acid ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ ) : J. T. Baker

Acetic anhydride ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ ) : Sigma-Aldrich

Pd/C : Aldrich

Methanol (MeOH) : ECHO

2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) :

Advanced Chemtech

Copper( I ) chloride ( $\text{CuCl}$ ) : ACROS

Copper( II ) sulfate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) : Riedel-de Haën

Iron(III) nitrate nonahydrate ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) : Aldich

Nickel(II) chloride hexahydrate ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) : Aldich

Cobalt(II) chloride hexahydrate ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) : Aldich

Zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ ) : Riedel-de Haën

Sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) : Riedel-de Haën

Potassium bisulfate ( $\text{KHSO}_4$ ) : Riedel-de Haën

Sodium Chloride ( $\text{NaCl}$ ) : A.R.grade

Magnesium sulfate anhydrous ( $\text{MgSO}_4$ ) : Showa

4 N HCl/dioxane : Aldrich

L-Glycine benzyl ester p-toluenesulfonate salt (Gly-OBn-TsOH) : Sigma

Chloroform (CDCl<sub>3</sub>) : J. T. Baker

Trifluoroacetic acid (TFA) : Alfa Aesar

Triisopropyl silane (TIS) : Alfa Aesar

Acetonitrile (ACN) : TEDIA

Methyl t-Butyl ether : TEDIA

Formic acid (HCOOH) : J. T. Baker

Fmoc-L-Pro-opfp : Advanced Chemtech

Boc-L-Pro-OH : Fluka

Fmoc-Gly-OH : Fluka

Fmoc-His(Trt)-OH : Advanced Chemtech

Fmoc-Pro-OH : Advanced Chemtech

Deuterium chloride (DCl) : Aldrich

Sodium deuterioxide (NaOD) : Aldrich

Deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) : Aldrich

Sodium chloride (NaCl) : J. T. Baker

Hydrochloric (HCl) : J. T. Baker

Sodium phosphate (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) : Aldrich

Sodium phosphate monohydrate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O) : J. T. Baker

Rink amide MBHA resin : Nova Biochem

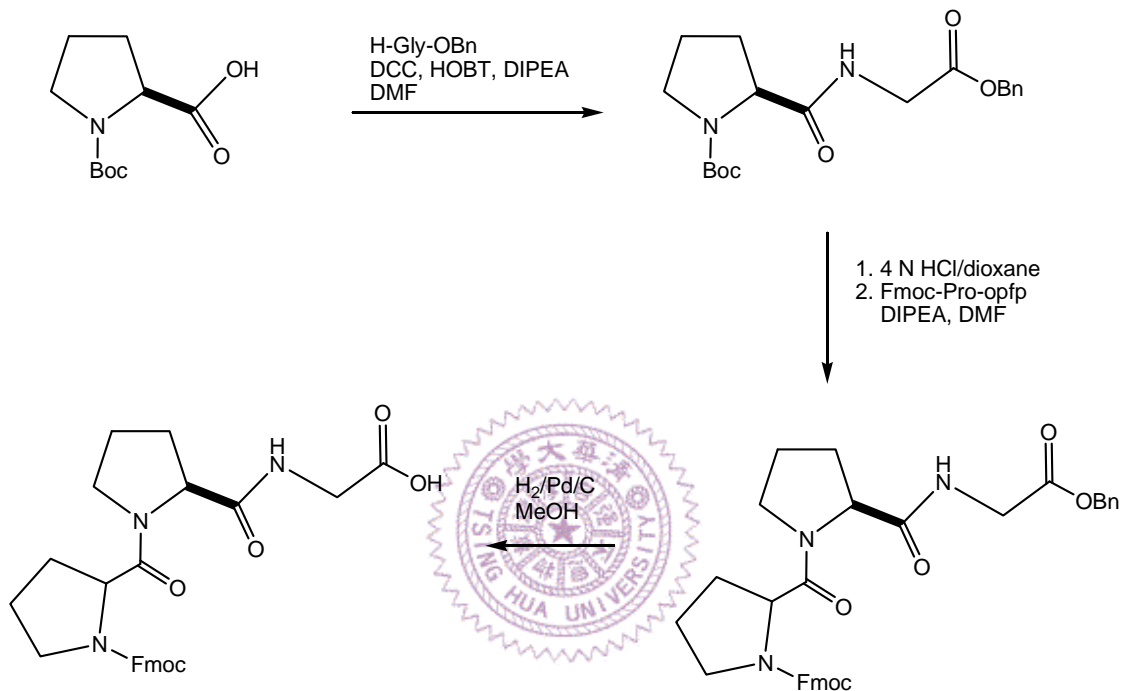


## 2-3 化合物合成及鑑定

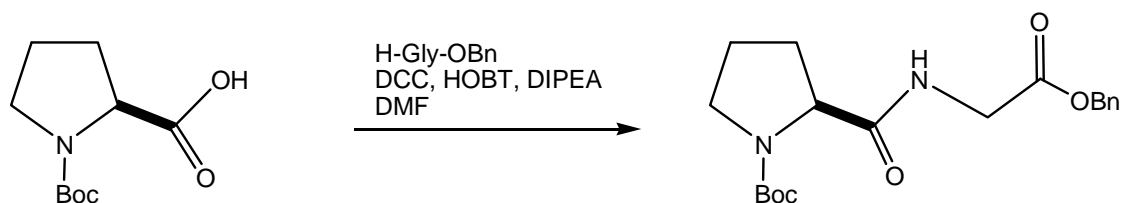
### 2-3-1 Fmoc-Pro-Pro-Gly-OH 之合成

Fmoc-Pro-Pro-Gly-OH 是依照 Scheme 3 的步驟在水溶液中逐步合成。

Scheme 3.



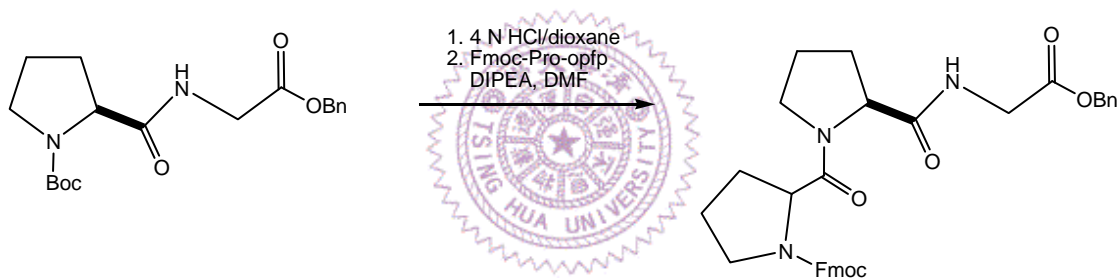
#### I. Fmoc-Pro-Gly-OBn 之合成



秤 2.8 克 Boc-Pro-OH、4.8 克 Gly-OBn · TsOH、2.7 克 DCC、1.8 克 HOBT，放入 250 毫升圓底瓶，加入 100 毫升 DMF 溶解後，加入 15 毫升 DIPEA，在氮氣下反應 8 小時後，濃縮除去 DMF，加入 100 毫升 EtOAc 溶解剩餘的產物，

用 5 %  $\text{NaHCO}_3$  溶液萃取兩次 (25 ml  $\times$  2)，再用 5 %  $\text{KHSO}_4$  溶液萃取兩次 (25 ml  $\times$  2)，用 25 毫升 5 %  $\text{NaCl}$  溶液萃取一次後，收集有機層，用無水  $\text{MgSO}_4$  除水，濃縮除去溶劑，得到濃稠的產物。將得到的產物用 silica gel 管柱層析純化，沖提液為  $\text{EtOAc}:\text{Hexane}=1:1$ ，薄層層析法 (TLC) 得  $R_f\sim 0.5$ ，收集此點的溶液，濃縮除去溶劑，抽真空 3 小時。得到產物為黃色濃稠狀之 Boc-Pro-Gly-OBn。產量：3.46 克 (73%)； $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )： $\delta$  7.4-7.5 (m, 5H)，5.1-5.2 (m, 2H)，3.9-4.4 (m, 2H)，3.3-3.6 (m, 2H)，1.8-2.4 (m, 5H)，1.4-1.6 (m, 9H)。

## II. Fmoc-Pro-Pro-Gly-Obn 之合成



### (1) 去除 Boc 保護基

將 3.6 克 Boc-Pro-Gly-OBn，用 50 毫升的 4 N HCl/dioxane 溶在 100 毫升的圓底瓶內，反應兩小時，濃縮除去溶劑後，加入 100 毫升的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶解，濃縮除去溶劑，抽真空 3 小時。得到中間物 H-Pro-Pro-Gly-OBn。

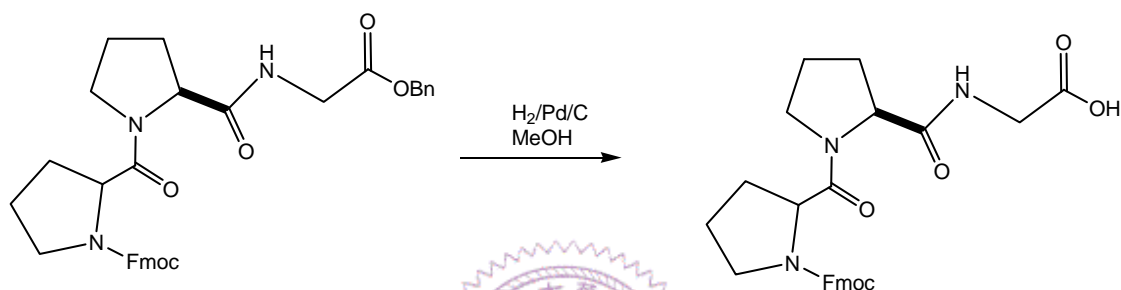
### (2) Fmoc-Pro-Pro-Gly-OBn 之合成

加入 4.78 克的 Fmoc-Pro-opfp，取 60 毫升的 DMF 將固體溶解後，加入 3.3 毫升的 DIPEA，反應 8 小時後，濃縮除去 DMF，將得到的產物用 silica gel 管柱層析純化，沖提液為 EtOAc，薄層層析法 (TLC) 得  $R_f\sim 0.65$ ，收集此點的溶液，

濃縮除去溶劑，於真空下乾燥 3 小時。得到產物為黃色濃稠狀之

Fmoc-Pro-Pro-Gly-OBn。產量：4.32 克 (78 %)； $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.3-7.8 (m, 11H), 7.1-7.3 (m, 1H), 4.9-5.2 (m, 2H), 4.6-4.8 (m, 1H), 4.5-4.6 (m, 1H), 4.1-4.5 (m, 4H), 3.5-4.1 (m, 5H), 1.7-2.3 (m, 7H)。

### III. 氫化 C 端



將抽真空後的產物 (Fmoc-Pro-Pro-Gly-OBn) 溶在 50 毫升 MeOH，通氮氣數分鐘後，加入催化劑 0.4 克 Pd/C，抽真空，通氮氣數次後，於氮氣環境下反應 2 小時。用 celite 過濾，濃縮除去溶劑，架 silica gel 管柱層析純化產物，以沖提液  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH : HCOOH = 90 : 10 : 0.5 (體積比) 測 TLC 得  $R_f \sim 0.43$ ，收集之溶液濃縮後於真空下乾燥 3 小時，得到產物為白色固體之 Fmoc-Pro-Pro-Gly-OH。產量：2.37 克 (67 %)； $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.1-7.8 (m, 9H), 4.3-4.7 (m, 3H), 4.0-4.3 (m, 3H), 3.5-4.0 (m, 4H), 3.3-3.5 (m, 1H), 1.7-2.3 (m, 8H)。送測 ESI-MS 質譜，分子量 M 計算為 491.5，質譜上發現  $(\text{M} + \text{H}^+)$  492.2。

#### 2-3-2. 模擬胜肽之合成

以合成儀合成胜肽，反應瓶 (RV) 內放入 0.1 mmole 樹脂 (Rink amide



MBHA), 利用 DMF 沖洗、浸泡樹脂一小時。反應瓶內放入 0.4 mmol 的 Fmoc-PPG-OH tripeptide、0.4 mmol 的 Fmoc-Gly-OH、0.4 mmol 的 Fmoc-Pro-OH 和 0.4 mmol 的 Fmoc-His-OH, 再放入 0.38 mmol HBTU 和 0.38 mmol HOBt 活化劑, 依 C 端往 N 端胺基酸序列排列在合成儀轉盤上合成, 最後用 2 毫升乙酐將 N 端乙醯化。反應完成後, 加入 95% TFA / 2.5% 去離子水 / 2.5% triisopropyl silane 之混合溶液 5 毫升反應兩小時後濾掉樹脂可除去樹酯和保護基, 將冰甲基第三丁基醚加入濾液會產生沉澱, 離心後濾掉液體, 重複三次以冰甲基第三丁基醚將大部分 TFA 洗淨, 用水幫浦抽乾醚即可得到模擬胜肽之粗產物, 利用去離子水將模擬胜肽配成濃度一毫克一毫升之溶液。

將模擬胜肽溶液以逆相高效能液相層析儀 (reverse-phase HPLC), 配合沖提液濃度梯度為 0 - 60 % 含 0.1% TFA 的乙腈 (acetonitrile, ACN), 在半製備 C<sub>18</sub> (semipreparative) 管柱中進行純化分離, 分離純化後所收集的層析液以濃縮儀除去乙腈, 再藉由冷凍乾燥機除去水分, 送測 ESI-MS 質譜鑑定。其分子量鑑定結果如下:

**I. Ac-Gly-His-Pro-(PPG)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub>**: 分子式: C<sub>99</sub>H<sub>141</sub>N<sub>27</sub>O<sub>25</sub>, 計算分子量 (M): 2108.06, 質譜上發現 (M + H<sup>+</sup>) 2108.84。

**II. Ac-(PPG)<sub>7</sub>-Pro-His-Gly-NH<sub>2</sub>**: 分子式: C<sub>99</sub>H<sub>141</sub>N<sub>27</sub>O<sub>25</sub>, 計算分子量 (M): 2108.06, 質譜上發現 (M + H<sup>+</sup>) 2109.28。

**III. Ac-(PPG)<sub>7</sub>-Gly-His-NH<sub>2</sub>**: 分子式: C<sub>94</sub>H<sub>134</sub>N<sub>26</sub>O<sub>24</sub>, 計算分子量 (M): 2011.01, 質譜上發現 (M + H<sub>2</sub><sup>2+</sup>) 1006.48。

**IV. Ac-His-Gly-(PPG)<sub>7</sub>-Gly-His-NH<sub>2</sub>**: 分子式: C<sub>102</sub>H<sub>144</sub>N<sub>30</sub>O<sub>26</sub>, 計算分子量 (M):

2205.09，質譜上發現  $(M + H^+)$  2206.13。

**V. Ac-His-Gly-(PPG)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub>**：分子式： $C_{94}H_{134}N_{26}O_{24}$ ，計算分子量 (M)：2011.01，質譜上發現  $(M + H^+)$  2011.96。

## 2-4 金屬和模擬胜肽作用及鑑定

### 2-4-1 緩衝液之製備

#### I. pH 8.0，20 mM Sodium phosphate buffer

將 0.552 克的  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  溶於離子水中，稀釋成 200 毫升後，利用 HCl、NaOH 調整溶液的 pH 值為 8.0。

#### II. pH 7.0，20 mM Sodium phosphate buffer

將 0.552 克的  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  溶進去離子水中，稀釋成200 毫升後，利用 HCl、NaOH 調整溶液的 pH 值為 7.0。

#### III. pH 2.9 Acetic acid 溶液

取 5 毫升 99% 醋酸 ( $C_2H_5COOH$ )，用去離子水稀釋成 100 毫升，利用 HCl、NaOH 調整溶液的 pH 值為 2.9。

### 2-4-2 模擬胜肽溶液之配製

將 GHP(PPG)<sub>7</sub>、(PPG)<sub>7</sub>PHG、(PPG)<sub>7</sub>GH、HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和 HG(PPG)<sub>7</sub>等模擬胜肽依照下列條件調配。

#### I. pH 8.0 濃度為 1 mg/mL 模擬胜肽溶液

取 1 毫克模擬胜肽溶在 1 毫升 pH 8.0 的緩衝液中。

## **II. pH 7.0 濃度為 1 mg/mL 模擬胜肽溶液**

取 1 毫克模擬胜肽溶在 1 毫升 pH 7.0 的緩衝液中。

## **III. pH 2.9 濃度為 1 mg/mL 模擬胜肽溶液**

取 1 毫克模擬胜肽溶在 1 毫升 pH 2.9 的緩衝液中。

### **2-4-3 金屬離子溶液之配製**

將銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ )、鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ )、鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 和鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ ) 的金屬鹽類依照下列條件調配。

#### **I. pH 8.0 濃度為 2 mM 金屬離子溶液**

取適量金屬鹽類，用 pH 8.0 的 20 mM 磷酸鹽緩衝液稀釋成 2 mM。

#### **II. pH 7.0 濃度為 2 mM 金屬離子溶液**

取適量金屬鹽類，用 pH 7.0 的 20 mM 磷酸鹽緩衝液稀釋成 2 mM。

#### **III. pH 2.9 濃度為 2 mM 金屬離子溶液**

取適量金屬鹽類，用 pH 2.9 的醋酸溶液稀釋成 2 mM。

### **2-4-4 金屬和模擬胜肽混合液之配製**

#### **I. pH 8.0, 0.5 mg/mL 模擬胜肽和 1 mM 金屬離子之混合溶液**

混合等量 1 mg/mL 模擬胜肽溶液 (pH 8.0) 和 2 mM 金屬離子溶液 (pH 8.0)，在 4 °C 下靜置 24 小時。

#### **II. pH 7.0, 0.5 mg/mL 模擬胜肽和 1 mM 金屬離子之混合溶液**

混合等量 1 mg/mL 模擬胜肽溶液 (pH 7.0) 和 2 mM 金屬離子溶液 (pH 7.0)，在 4

°C 下靜置反應 24 小時。

### III. pH 2.9, 0.5 mg/mL 模擬胜肽和 1 mM 金屬離子之混合溶液

混合等量 1 mg/mL 模擬胜肽溶液 (pH 2.9) 和 2 mM 金屬離子溶液 (pH 2.9), 在 4 °C 下靜置反應 24 小時。

#### 2-4-5 光譜鑑定

##### 2-4-5-1 CD (circular dichroism) 光譜

###### (1) Far-UV CD 光譜

在 2 °C 下, 使用路徑長為 1 mm 的 cuvette 作 CD 實驗, 量測 2-4-4 中模擬胜肽和金屬離子作用的溶液之 CD 訊號, 範圍為 200 nm ~ 260 nm, 每點偵測時間為 10 秒。

###### (2) 熔化實驗 (thermal unfolding)

固定波長在訊號最強的波長 (通常是 227 nm), 量測此波長從 2 °C ~ 60 °C 之 CD 訊號強度的變化, 每 2 °C 測一次訊號, 每一溫度平衡時間為 5 分鐘, 每點偵測時間為 30 秒。至於事先加熱處理的實驗, 則是先將 pH 8.0, 0.5 mg/mL 模擬胜肽和 1 mM 金屬離子混合溶液置於 70 °C 下加熱 15 分鐘後, 在 4 °C 下靜置 24 小時後, 再進行上述量測實驗。

###### (3) 金屬離子的滴定

將等量 pH 8.0, 1 mg/mL 或 2 mg/mL 模擬胜肽溶液, 和等量但不同濃度的 pH 8.0 銅離子及不同濃度亞銅離子 (pH = 8) 溶液混合, 在 4 °C 下靜置 24 小時後, 在 2 °C 量測 far-UV CD 光譜 (範圍為 210 nm ~ 240 nm, 每點偵測時間為 20

秒)，比較不同濃度金屬離子存在時，在波長 227 nm 的訊號變化。

#### **(5) 折疊速率之量測**

將 pH 8.0，1 mg/mL 模擬胜肽和 1 mM 金屬離子之混合溶液於 70 °C 下加熱 15 分鐘後 (CD 的溫度需預先控制在 4 °C)，將樣品移到 CD 中，於 4 °C 下量測在 227 nm 之 CD 訊號，每 5 秒測量一次，共量測 100 分鐘。

#### **2-4-5-2 NMR 光譜**

將配製好的模擬胜肽溶液樣品在 10°C 及 45°C 兩種溫度下量測一維的 <sup>1</sup>H-NMR 光譜，TSP (Trimethylsilane propionic acid sodium salt， $\delta = 0$  ppm) 為內標品。

##### **(1) 配置 pD (uncorrected) 7.6，20 mM Sodium phosphate buffer**

取 3.27 毫克 Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 加 D<sub>2</sub>O 到 10 毫升，利用 NaOD 和 DCl 調整溶液的 pD 值為 7.6。

##### **(2) 配置 pD (uncorrected) 7.6，3.3 mg/mL 模擬胜肽溶液**

取 3.3 毫克模擬胜肽溶在 1 毫升 pD (uncorrected) 7.6 的緩衝液中。

##### **(3) pD (uncorrected) 7.6，2 mM 金屬離子溶液**

取適量金屬鹽類 (若含水分需去水烘乾)，用 pD (uncorrected) 7.6 的緩衝液稀釋成 2 mM。

##### **(4) pD (uncorrected) 7.6，1.5 mg/mL 模擬胜肽和 1 mM 金屬離子之混合液**

混合等量的 3.3 mg/mL 模擬胜肽溶液 (pD (uncorrected) 7.6) 和 2 mM 金屬離子溶液 (pD (uncorrected) = 7.6)，並加入 10  $\mu$ L 標準品 TSP，在 4 °C 下靜置 24 小時後送測。

### 第三章 結果與討論

此論文中所研究含 histidine (His) 組氨酸的模擬胜肽分別為 GHP(PPG)<sub>7</sub>、(PPG)<sub>7</sub>PHG、(PPG)<sub>7</sub>GH、HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和 HG(PPG)<sub>7</sub>，和 His 作用的金屬離子為鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^{+}$ )及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ )。

#### 3-1 圓二色光譜 (CD)

##### 3-1-1 Far-UV CD 及 熔化實驗之量測

膠原蛋白形成三股螺旋的過程是與濃度相關的，濃度高時單股的膠原蛋白胜肽易互相作用而形成三股螺旋結構。同樣地，模擬胜肽在濃度較高時，不需要金屬即可形成膠原蛋白三股螺旋結構，因此我們利用較低濃度的模擬胜肽，使其在未加入金屬時是無形成膠原蛋白的三股螺旋結構，而在加入金屬離子溶液後，模擬胜肽上的 His 可和金屬配位，若配位的作用力夠強，將使三股模擬胜肽靠近，並形成股間的氫鍵，進而折疊成三股螺旋結構。

將和金屬混合後的模擬胜肽溶液作 far-UV CD 量測，遠紫外光區域最大 CD 訊號會出現在 220 - 230 nm 之間，而這也是 polyproline type II (PP II) 螺旋的特徵訊號，在具有最大 CD 訊號之波長下作變溫實驗，來量測熔化溫度。若該胜肽有形成膠原蛋白三股螺旋結構，則其隨溫度變化之 CD 訊號會是一具有合作性 (cooperateion) 的曲線 (如圖 3-1)，由這曲線，我們可以定義低溫部分的曲線為折疊狀態 (folded state, F)，高溫部分的曲線為未折疊狀態 (unfolded state, U)，在兩個狀態的切線中

點和變溫曲線可找到一交界點 (midpoint)，此點的狀態為 50% 折疊

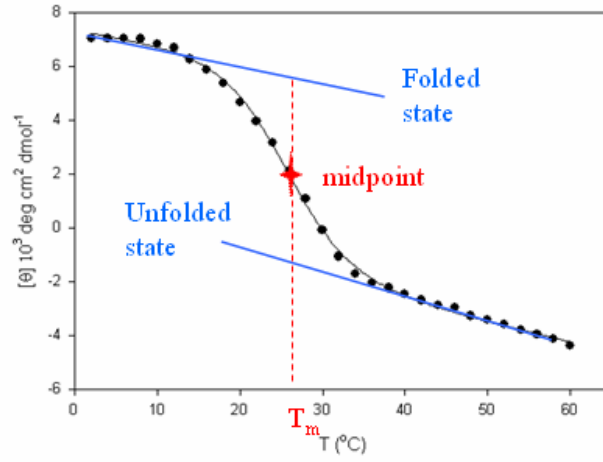


圖 3-1. 膠原蛋白三股螺旋結構在不同溫度時的 CD 訊號變化特徵曲線。

狀態 (F) 和 50% 未折疊狀態 (U)，定義此點的溫度為熔點 (melting temperature,  $T_m$ )。

熔點 (melting temperature,  $T_m$ ) 的值可藉由在最大訊號波長的莫耳橢圓性 (molar ellipticity)，及使用 two-state 模型的方法求得，在本研究中我們使用下列方程式：

$$\theta = \frac{(a_n + b_n T) + (a_d + b_d T) \exp\left(\frac{-\Delta G_U^o(T)}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-\Delta G_U^o(T)}{RT}\right)}$$

不同溫度下的  $\Delta G_U^o$  是由方程式 Gibbs–Helmholtz 所描述的以下關係

$$\Delta G_U^o(T) = \Delta H^o(T_m)(1 - T/T_m) - \Delta C_p^o[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)]$$



$\Delta G_U^o(T)$ ：不同溫度時未折疊自由能 (unfolding free energy)

$T_m$ ：折疊狀態 (F) 轉換到未折疊狀態 (U) 的中點

$\Delta H^o(T_m)$ ：在  $T_m$  時的熱焓變化

$\Delta C_p^o$ ：折疊狀態 (F) 和未折疊狀態 (U) 之間的熱含量變化

$a_n$ 、 $b_n$ 、 $a_d$ 、 $b_d$ ：定義為折疊狀態 (F) 訊號和未折疊狀態 (U) 訊號與絕對溫度的線性關係。

在此我們將  $\Delta C_p^o$  定為 0，而  $T_m$  的值和  $\Delta C_p^o$  的選擇並無相關。不過，利用此方法所得到的  $\Delta G^o$ 、 $\Delta H^o$  並非此折疊過程的真正值，因膠原蛋白之三螺旋折疊與濃度有相關，而 Gibbs-Helmholtz 方程式所描述的過程與濃度無關，在此我們只利用它來決定  $T_m$  值。

### I . Ac-Gly-His-Pro-(PPG)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub>，pH 8.0

從 far-UV CD 光譜的量測中 (圖 3-2)，GHP(PPG)<sub>7</sub> 在未加入 Cu<sup>2+</sup> 的 CD 訊號在 227 nm 有一最大正值，為  $0.15 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  (表 3-1)；加入 Cu<sup>2+</sup> 後最大波長平移到 226 nm，訊號降低為  $0.08 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ 。兩者熔化實驗 (圖 3-3) 的 CD 訊號並非合作性的曲線，顯示其並未形成三股螺旋結構 (表 3-1)，因此可知 Cu<sup>2+</sup> 不能誘發 GHP(PPG)<sub>7</sub> 形成三股螺旋結構。

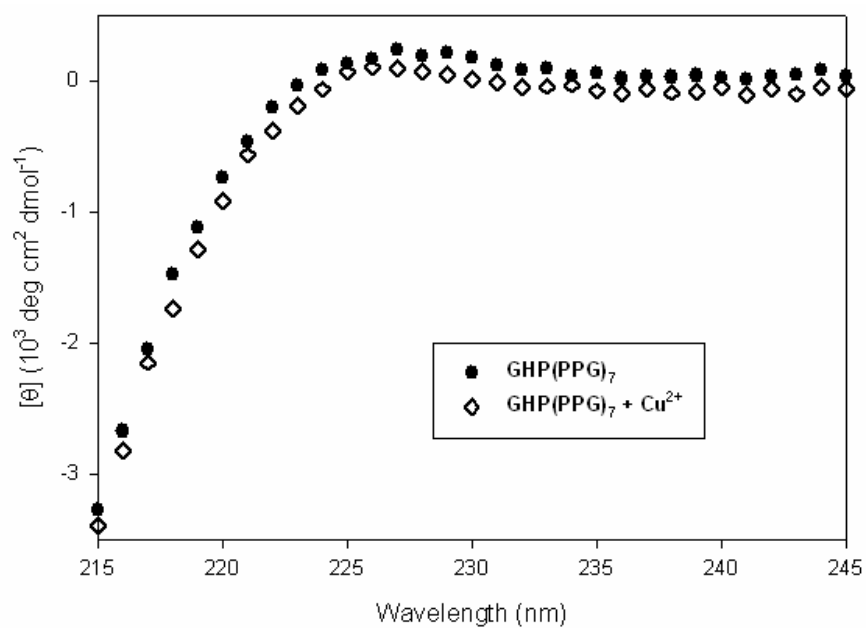


圖 3-2. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 GHP(PPG)<sub>7</sub> 和加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後的 far-UV CD 光譜。

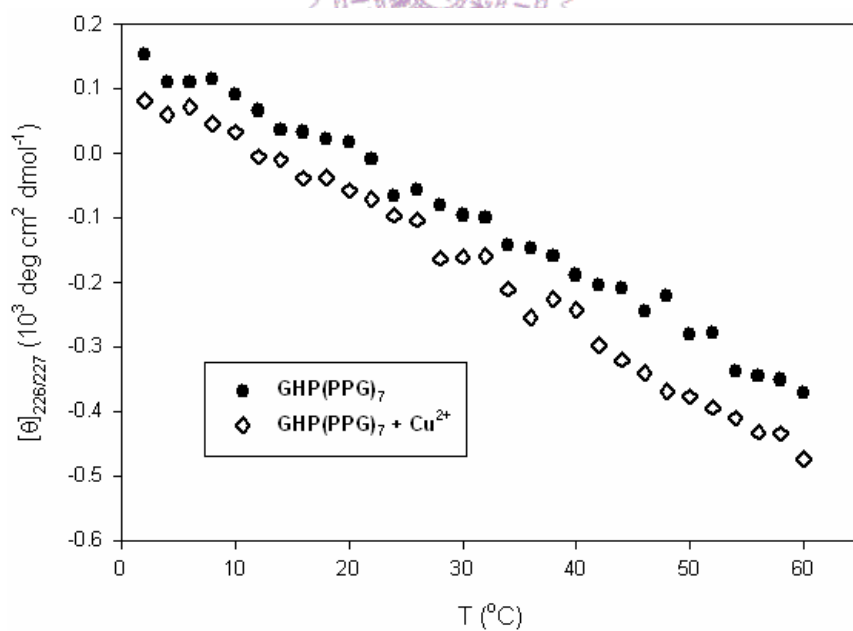


圖 3-3. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 GHP(PPG)<sub>7</sub> 和加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後的熔化曲線。

表 3-1：在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 GHP(PPG)<sub>7</sub> 在加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
No	227	$0.15 \times 10^3$	-
Cu <sup>2+</sup>	226	$0.08 \times 10^3$	-

一般而言，三股螺旋的形成是由胜肽的 C 端到 N 端 (C→N terminus)，雖然 GHP(PPG)<sub>7</sub> 的碳端符合膠原蛋白的基本條件 (Xaa-Yaa-Gly) 序列，但氮端未遵守 (Xaa-Yaa-Gly) 序列，因此加入 Cu<sup>2+</sup> 和 His 產生配位後，並無法幫助 GHP(PPG)<sub>7</sub> 形成三股螺旋結構。

## II. Ac-(PPG)<sub>7</sub>- Pro-His-Gly-NH<sub>2</sub>

### (1) 在 pH 8.0 的條件下

從 far-UV CD 光譜的量測中 (圖 3-4)，(PPG)<sub>7</sub>PHG 在未加入 Fe<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>2+</sup> 的 CD 訊號最大波長在 228 nm，為  $0.64 \times 10^3$  deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup> (表 3-2)；加入 Fe<sup>3+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>2+</sup> 後最大波長移到 227 nm，訊號也均為降低：Fe<sup>3+</sup> 為  $0.08 \times 10^3$  deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>，Cu<sup>2+</sup> 為  $0.31 \times 10^3$  deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>，Zn<sup>2+</sup> 為  $0.02 \times 10^3$  deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>。(PPG)<sub>7</sub>PHG 未加入金屬離子前熔化實驗所得到的 CD 訊號為合作性的曲線 (如圖 3-5)，T<sub>m</sub> 值 (表 3-2) 為 14.9 °C，加入 Cu<sup>2+</sup> 後的 T<sub>m</sub> 值為 17.5 °C，顯示出 Cu<sup>2+</sup> 可穩定三股螺旋結構，而加入 Fe<sup>3+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 後所得到的熔化曲線均非合作性曲線，無法決定 T<sub>m</sub> 值，顯示此二金屬離子不能幫助模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 形成三股螺旋結構，還進而破壞原有的三股螺旋結構。

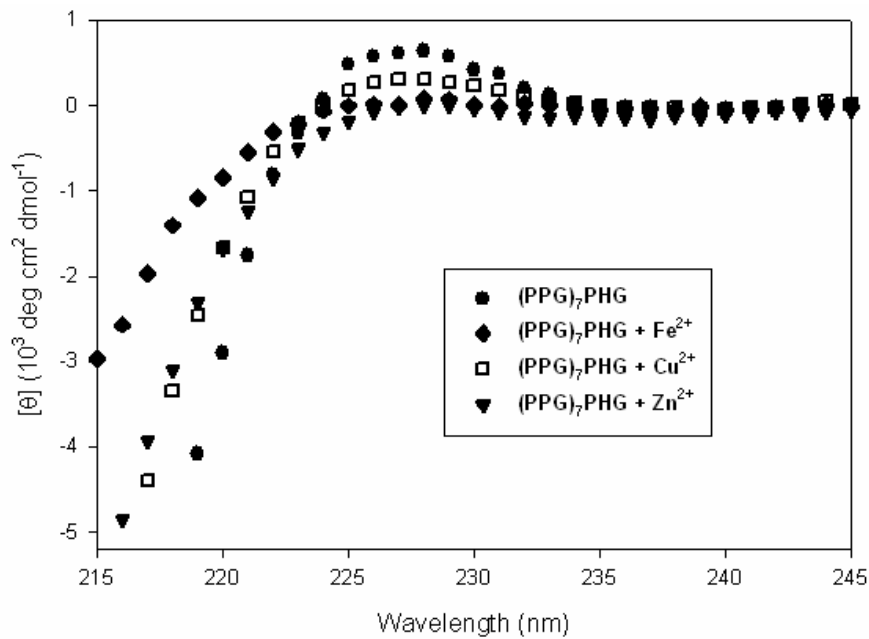


圖 3-4. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 及銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的 far-UV CD 光譜。

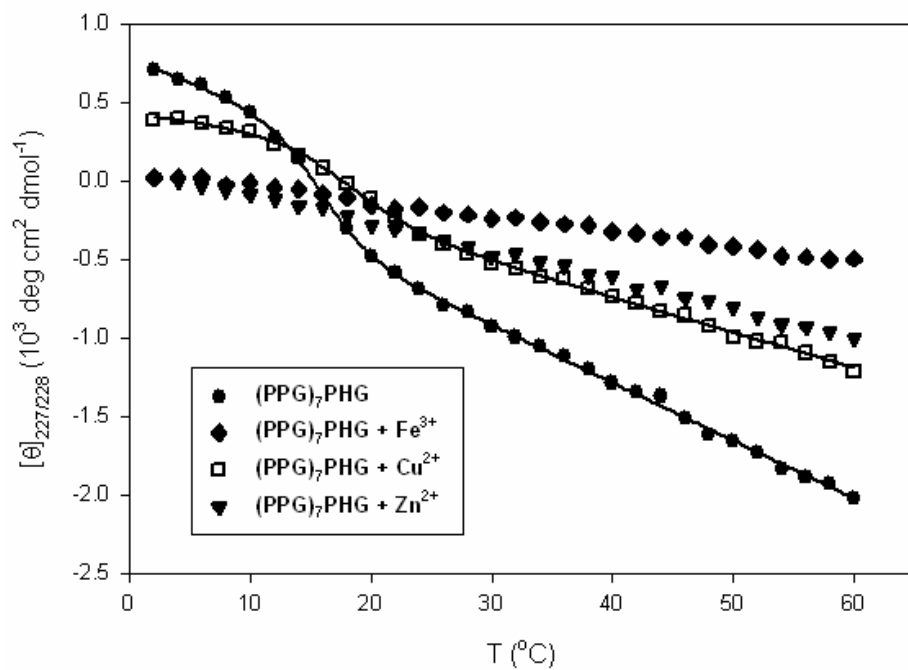


圖 3-5. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 及銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 後的熔化曲線。

表 3-2: 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
no	228	$0.64 \times 10^3$	14.9
Fe <sup>3+</sup>	227	$0.08 \times 10^3$	-
Cu <sup>2+</sup>	227	$0.31 \times 10^3$	17.5
Zn <sup>2+</sup>	227	$0.02 \times 10^3$	-

模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 因有足夠的重複 (Xaa-Yaa-Gly) 序列, 因此在未加入金屬離子之前即可形成三股螺旋結構, 而在加入 Cu<sup>2+</sup> 後, 由於 Cu<sup>2+</sup>-His 配位的關係, 對三股螺旋結構的穩定性有些微的幫助, T<sub>m</sub> 值約可增加 3 °C; 由於此胜肽中, His 並非位於終端, 且旁邊有 Pro, 故推測影響到 His-Cu<sup>2+</sup> 配位的幾何形狀, 使得對三股螺旋結構之穩定性貢獻並不明顯。而在加入 Fe<sup>3+</sup> 及 Zn<sup>2+</sup> 後, 反而觀測不到三股螺旋結構, 說明此二金屬離子和 His 之間的配位能力不佳, 甚至可能擾動了模擬胜肽彼此間的距離, 破壞了 (PPG)<sub>7</sub>PHG 原本的三股螺旋結構。這也說明了 (PPG)<sub>7</sub>PHG 對金屬離子具有選擇性。

## (2) 在 pH 8.0 條件下, 並有預熱過程

從 far-UV CD 光譜的量測中 (圖 3-6、3-8), (PPG)<sub>7</sub>PHG 和 Zn<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>2+</sup> 的混合溶液經過預熱過程再於 4 °C 靜置 24 小時後的 CD 訊號最大波長位置為 228 nm, 和未加入金屬前相同, 訊號差異不大 (表 3-3)。熔化實驗 (圖 3-7、3-9) 的 CD 訊號變化也不大, 在 Cu<sup>2+</sup> 存在下, 並經由預熱過程所得到的 T<sub>m</sub> 值為 17.7 °C, 對三股螺旋結構的穩定性無顯著影響; 而在 Zn<sup>2+</sup> 存在下, 即使經由預熱過程, 熔化曲線仍非合作性曲線, 顯示在 Zn<sup>2+</sup> 存在下, (PPG)<sub>7</sub>PHG 並無法形

成三股螺旋結構。

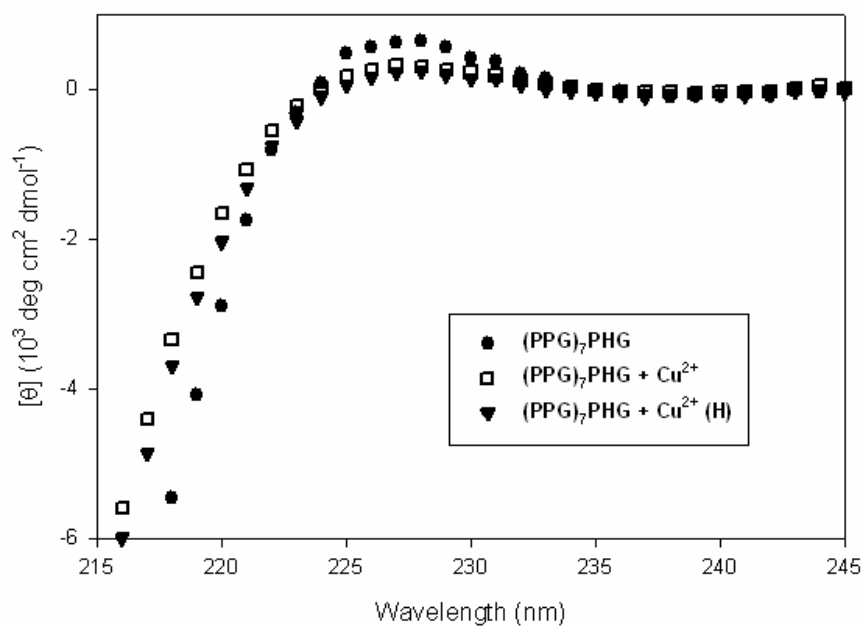


圖 3-6. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜 (“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。

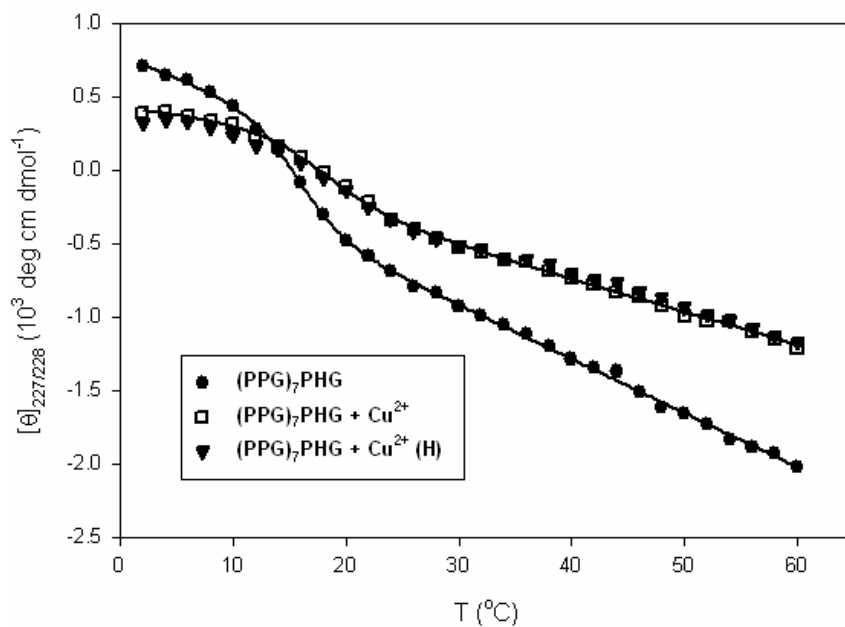


圖 3-7. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的熔化曲線 (“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。

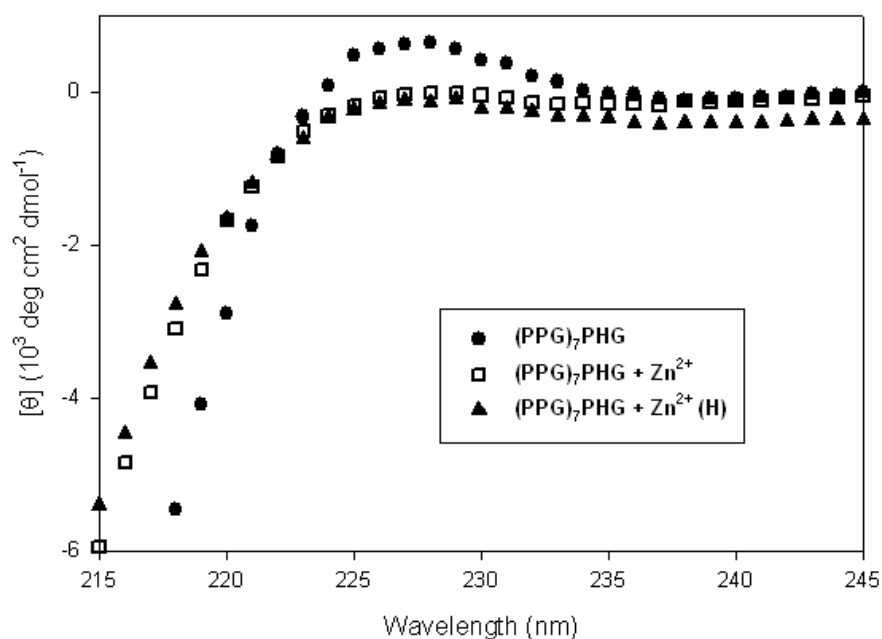


圖 3-8. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入銅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜 (“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。

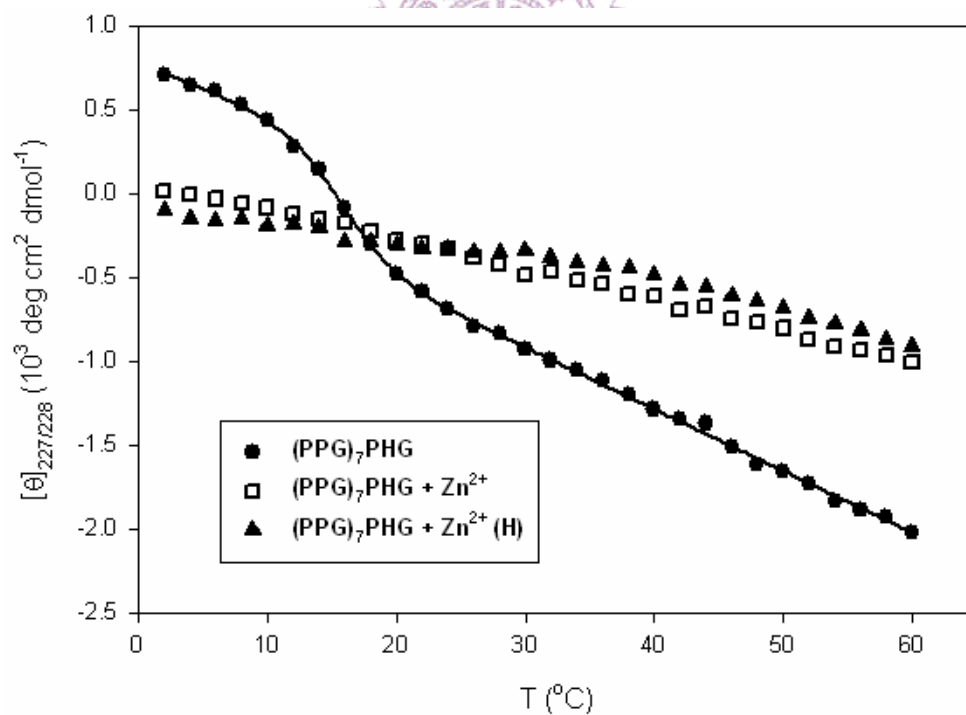


圖 3-9. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入銅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的熔化曲線 (“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。



表 3-3：在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 在加入金屬離子後經過加熱過程前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
no	228	$0.64 \times 10^3$	14.9
Cu <sup>2+</sup>	227	$0.31 \times 10^3$	17.5
Cu <sup>2+</sup> (H)	228	$0.24 \times 10^3$	17.7
Zn <sup>2+</sup>	227	$0.02 \times 10^3$	-
Zn <sup>2+</sup> (H)	228	$0.09 \times 10^3$	-

### (3) 在 pH 2.9 條件下

從 far-UV CD 光譜的量測中 (圖 3-10)，(PPG)<sub>7</sub>PHG 在此條件下，無論有無加入 Zn<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>2+</sup>，其 CD 訊號最大波長均在 226-227 nm 之間，但訊號非常小 (表 3-4)，PP II 螺旋結構非常不明顯。熔化實驗 (圖 3-11) 的 CD 訊號均為非合作性的熔化曲線。此結果顯示，在此 pH 條件下，不論有無金屬離子的加入，(PPG)<sub>7</sub>PHG 均無法形成三股螺旋結構，推測主要是在酸性條件下，His 五圓環上  $\delta$  位置的氮原子 (N <sub>$\delta$</sub> ) 仍鍵結著質子 (H<sup>+</sup>) 造成胜肽鍵之間的靜電排斥力，以至於無法形成三股螺旋結構，而在加入金屬離子後，此位置的氮原子並無法和金屬離子產生配位，因此無法幫助三股螺旋結構之形成。

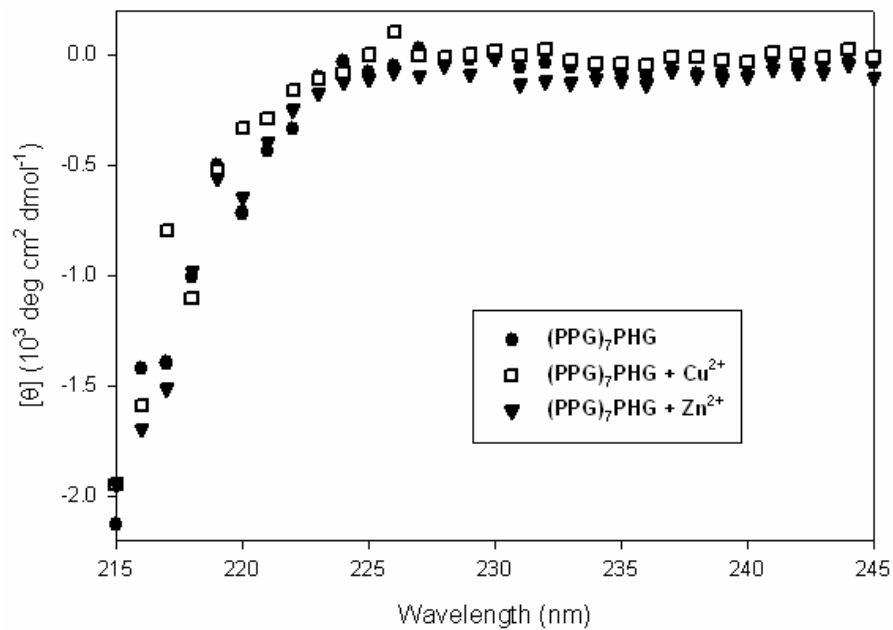


圖 3-10. 在 2 °C 及 pH 2.9 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入鋅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 及銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後的 far-UV CD 光譜。

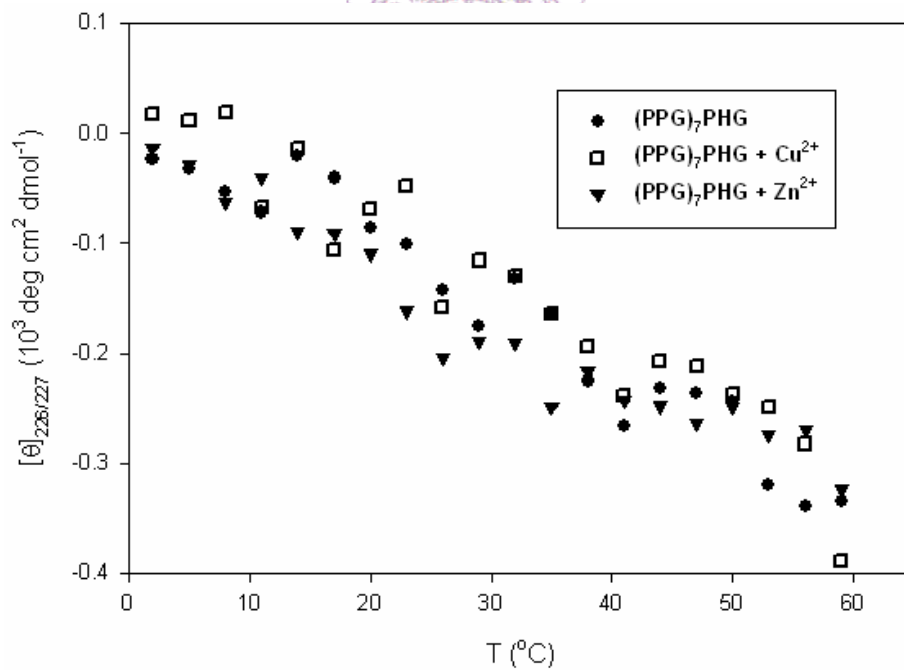


圖 3-11. 在 pH 2.9 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 和加入鋅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 及銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後的熔化曲線。

表 3-4: 在 2 °C 及 pH 2.9 時, 模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>PHG 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
no	227	$-0.03 \times 10^3$	-
Cu <sup>2+</sup>	226	$0.02 \times 10^3$	-
Zn <sup>2+</sup>	227	$-0.01 \times 10^3$	-

### III. Ac-(PPG)<sub>7</sub>Gly-His-NH<sub>2</sub>

#### (1) 在 pH 8.0 條件下

從 far-UV CD 光譜的量測中 (圖 3-12), (PPG)<sub>7</sub>GH 在未加入金屬離子前的 CD 訊號最大波長在 226 nm, 為  $0.18 \times 10^3$  deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup> (表 3-5); 加入 Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Cu<sup>+</sup> 及 Zn<sup>2+</sup> 後最大波長均移到 227-228 nm, 除了 Co<sup>2+</sup> 訊號變小外, 其餘金屬離子的訊號皆變大 (表 3-5), Cu<sup>+</sup> 的訊號更是明顯增加到  $1.11 \times 10^3$  deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>。熔化實驗 (圖 3-13) 的 CD 訊號中, (PPG)<sub>7</sub>GH 在加入 Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>+</sup> 後為合作性的曲線, T<sub>m</sub> 值 (表 3-5) 為 18.0 °C、19.1 °C 及 19.2 °C, 表示這三種離子誘發 (PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋結構; 而在 Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 的存在下則觀測不到 (PPG)<sub>7</sub>GH 的三股螺旋結構。

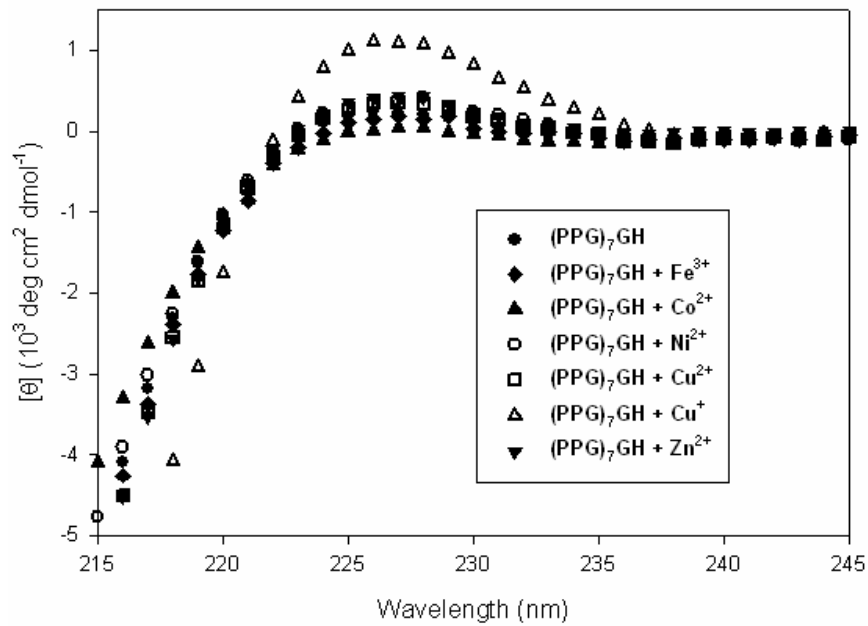


圖 3-12. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽(PPG)<sub>7</sub>GH 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後的 far-UV CD 光譜。

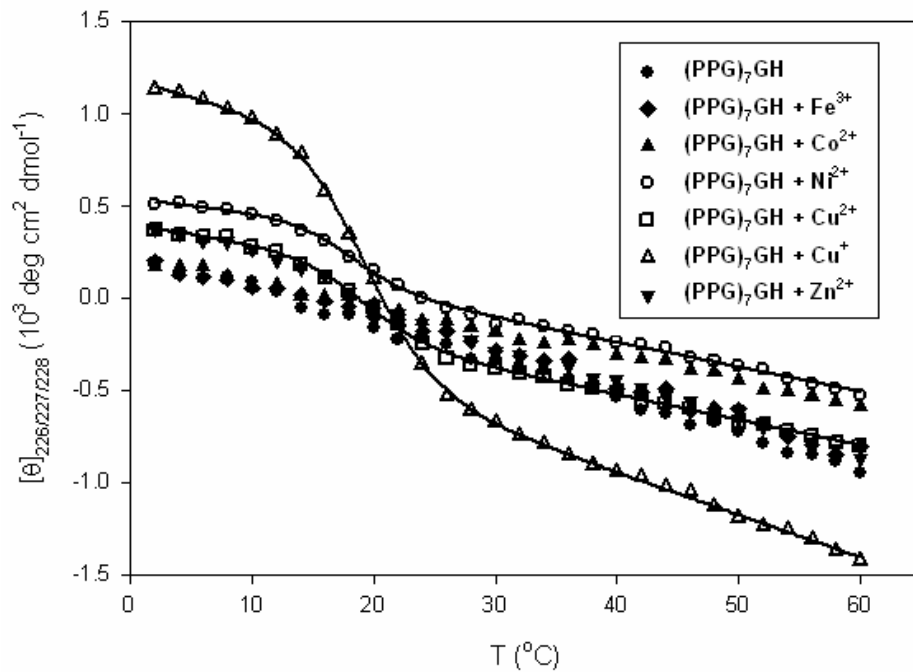


圖 3-13. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後的熔化曲線。

表 3-5：pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
no	226	$0.18 \times 10^3$	-
Fe <sup>3+</sup>	227	$0.20 \times 10^3$	-
Co <sup>2+</sup>	227	$0.17 \times 10^3$	-
Ni <sup>2+</sup>	228	$0.51 \times 10^3$	18.0
Cu <sup>2+</sup>	227	$0.36 \times 10^3$	19.1
Cu <sup>+</sup>	227	$1.11 \times 10^3$	19.2
Zn <sup>2+</sup>	227	$0.37 \times 10^3$	-

在金屬尚未加入之前，(PPG)<sub>7</sub>GH 無法形成三股螺旋結構，而在加入金屬離子後，C 端上的 His 可和金屬產生配位，使 (PPG)<sub>7</sub>GH 彼此之間互相靠近，產生股間的氫鍵進而形成三股螺旋結構。不過，並非所有金屬離子均可誘發 (PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋，本研究發現加入 Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>+</sup> 可幫助模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋結構，Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 則是無法協助三股螺旋形成，如前面所述之 (PPG)<sub>7</sub>PHG，此胜肽形成三螺旋的過程亦對金屬離子有選擇性。

## (2) 在 pH 8.0 條件下，經預熱過程

從 far-UV CD 光譜的量測中發現 (圖 3-14、3-16)，(PPG)<sub>7</sub>GH 和 Zn<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>2+</sup> 的混合溶液經過預熱過程再於 4 °C 靜置 24 小時後的 CD 訊號最大波長位置仍為 227 nm，訊號差異不大 (表 3-6)。熔化實驗 (圖 3-15、3-17) 的 CD 訊號變化也不大，Cu<sup>2+</sup> 和 (PPG)<sub>7</sub>GH 混合溶液經由預熱處理所得到的 T<sub>m</sub> 值為 19.1 °C，與未預熱處理之結果相同，Zn<sup>2+</sup> 和 (PPG)<sub>7</sub>GH 混合溶液經由預熱處理後仍無法使

(PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋結構。

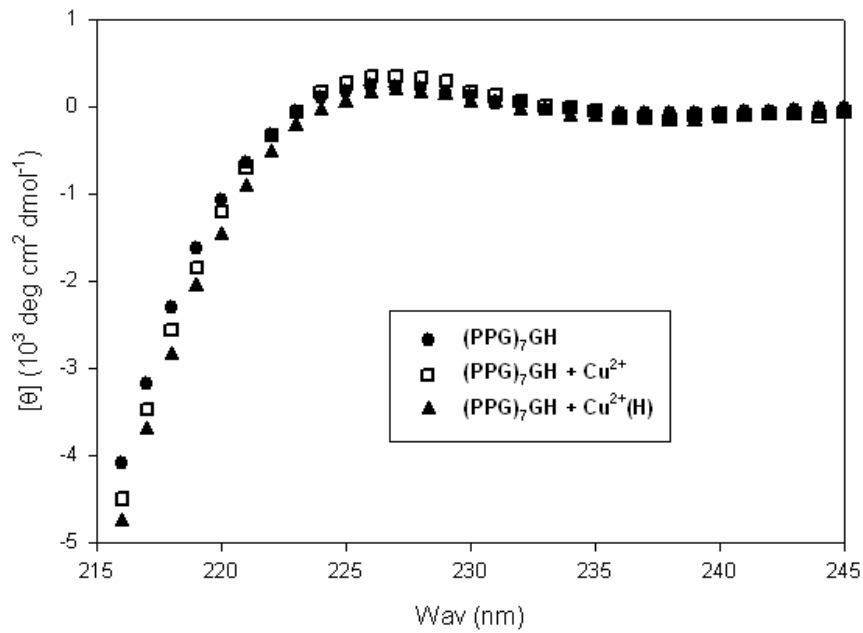


圖 3-14. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 和加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜 (“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。

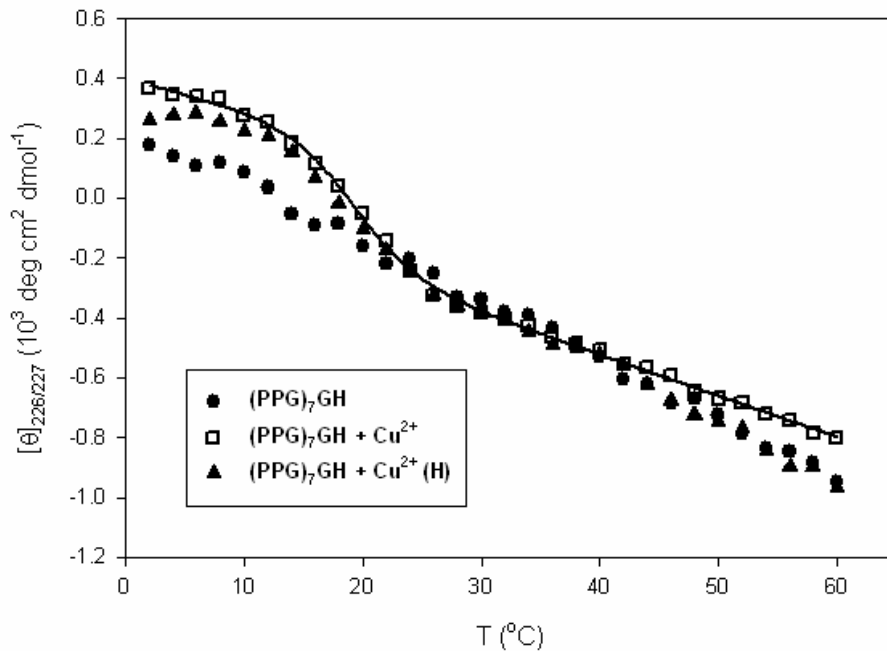


圖 3-15. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 和加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的熔化曲線 (“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。

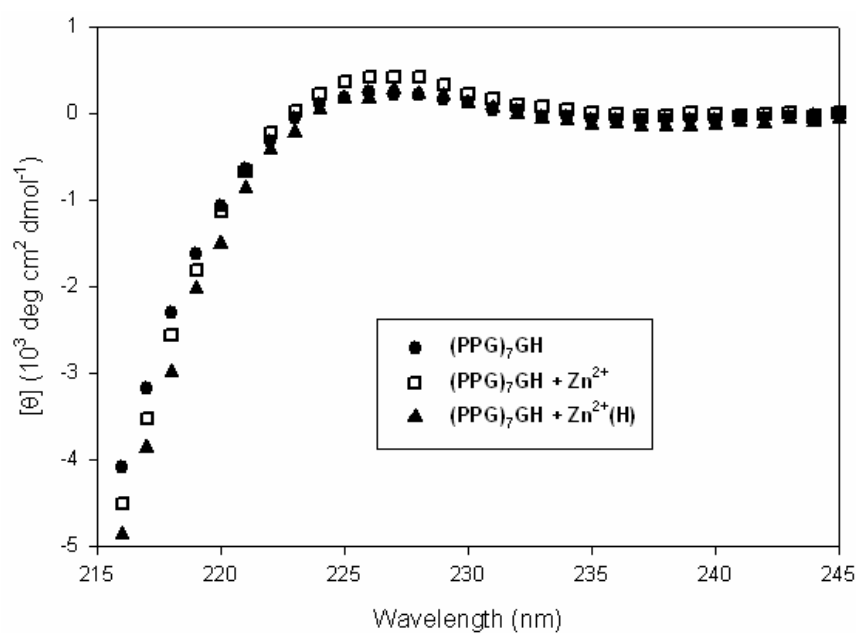


圖 3-16. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 和加入鋅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的 far-UV CD 光譜(“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。

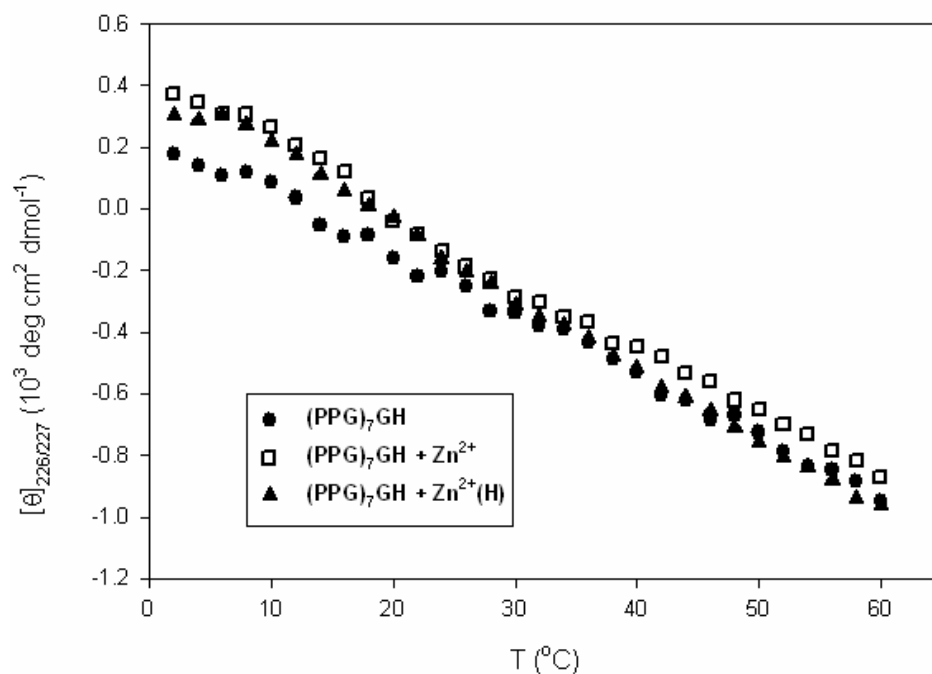


圖 3-17. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 和加入鋅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 後經過加熱過程的熔化曲線 (“(H)”表示該樣品經過預熱處理)。



表 3-6：在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 在加入金屬離子後經加熱過程前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
no	226	$0.18 \times 10^3$	-
Cu <sup>2+</sup>	227	$0.36 \times 10^3$	19.1
Cu <sup>2+</sup> (H)	227	$0.26 \times 10^3$	19.1
Zn <sup>2+</sup>	227	$0.37 \times 10^3$	-
Zn <sup>2+</sup> (H)	227	$0.30 \times 10^3$	-

### (3) 在 pH 7.0 條件下

在 pH 7.0 條件下，Cu<sup>2+</sup> 和 (PPG)<sub>7</sub>GH 混合溶液所得到的 CD 融化曲線非合作性曲線 (圖 3-18)，無法決定 T<sub>m</sub> 值，顯示 (PPG)<sub>7</sub>GH 無形成三股螺旋結構。因 His 之 pK<sub>a</sub> 約在 6-7 之間，故中性條件下，(PPG)<sub>7</sub>GH 上 His 五圓環上  $\delta$  位置的氮原子 (N <sub>$\delta$</sub> ) 仍部分鍵結著質子 (H<sup>+</sup>)，所以只有部分的氮原子，可和金屬產生配位，但因配位比例較小，因此對 (PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋結構的幫助不大，仍無法幫助 (PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋結構。而此一實驗結果也說明了，利用 His-metal 配位來誘發三股螺旋結構形成是與溶液的 pH 值有很大的關係。

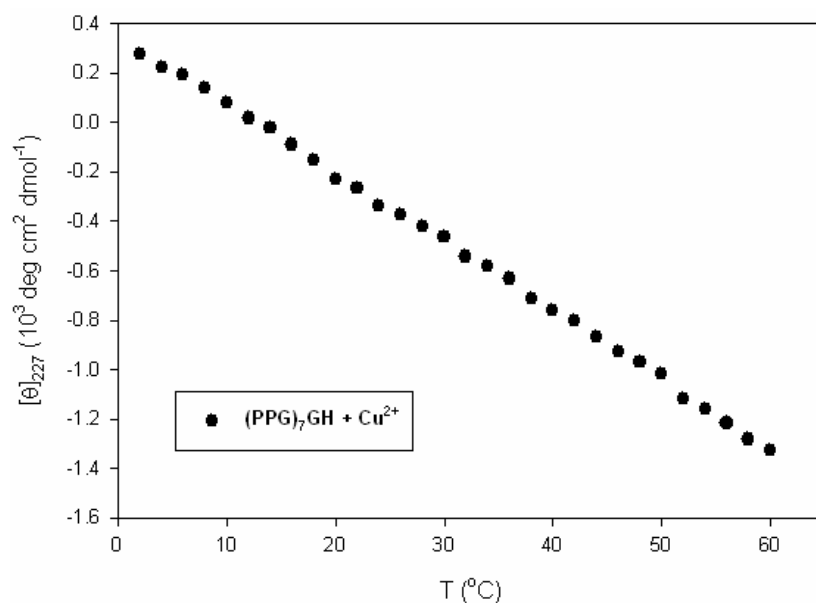


圖 3-18. 在 pH 7.0 時，模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 和銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 混合溶液的熔化曲線。

#### IV. Ac-His-Gly-(PPG)<sub>7</sub>-Gly-His-NH<sub>2</sub>

從 far-UV CD 光譜的量測中 (圖 3-19)，HG(PPG)<sub>7</sub>GH 在未加入金屬離子前的 CD 訊號最大波長在 227 nm，強度為  $0.28 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  (表 3-7)；加入 Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup> 及 Zn<sup>2+</sup> 後最大波長在 226-227 nm，CD 訊號皆變小 (表 3-7)，Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>+</sup> 最大波長在 227-228 nm，訊號皆變大 (表 3-7)。熔化實驗所得到的 CD 訊號變化 (圖 3-20)，HG(PPG)<sub>7</sub>GH 只有在加入 Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>+</sup> 後得到合作性的曲線，T<sub>m</sub> 值分別為 22.0 °C、20.6 °C 及 20.9 °C (表 3-7)，表示在這些離子的存在下 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋結構；而 Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 的加入則無法誘發 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 形成三股螺旋結構。

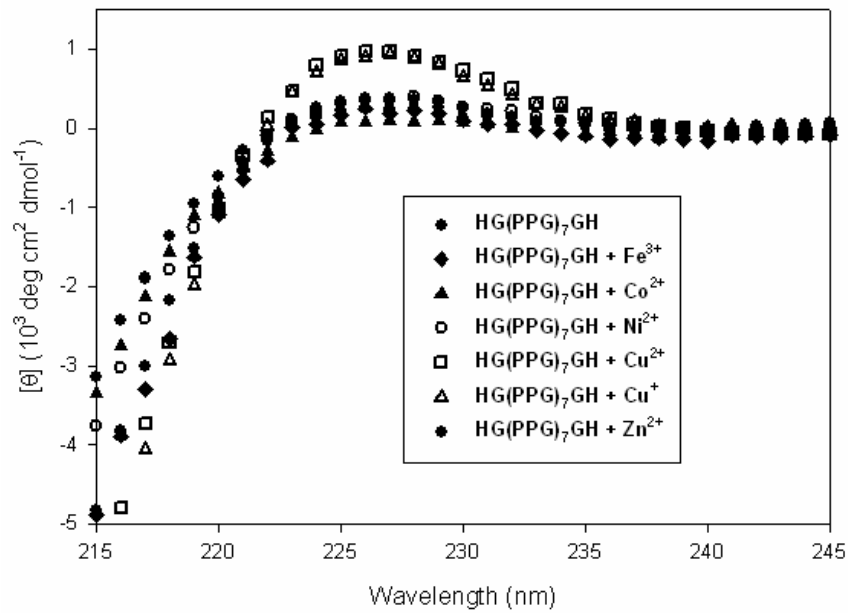


圖 3-19. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和加入鐵離子( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後的 far-UV CD 光譜。

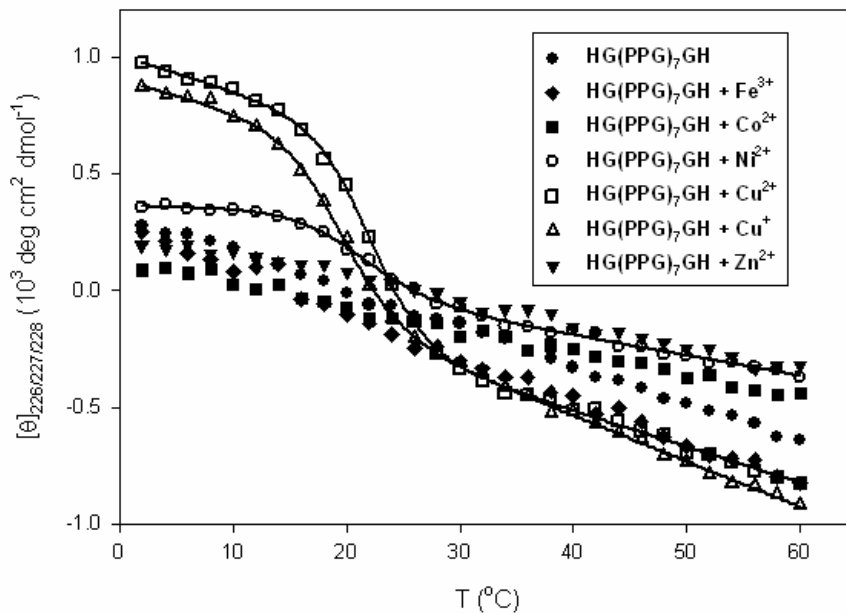


圖 3-20. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和加入鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ )、銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ )、亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 後的熔化曲線。

表 3-7: 在 2 °C 及 pH 8.0 時, 模擬胜肽 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
No	227	$0.37 \times 10^3$	-
Fe <sup>3+</sup>	226	$0.24 \times 10^3$	-
Co <sup>2+</sup>	227	$0.09 \times 10^3$	-
Ni <sup>2+</sup>	228	$0.40 \times 10^3$	22.0
Cu <sup>2+</sup>	227	$0.97 \times 10^3$	20.6
Cu <sup>+</sup>	227	$0.92 \times 10^3$	20.9
Zn <sup>2+</sup>	227	$0.19 \times 10^3$	-

和 (PPG)<sub>7</sub>GH 比較, HG(PPG)<sub>7</sub>GH 的 N 端多了 His, 但和 (PPG)<sub>7</sub>GH 相同, 僅有 Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 及 Cu<sup>+</sup> 可形成三股螺旋結構, 且對三股螺旋結構穩定性沒有顯著的增加, Ni<sup>2+</sup> 存在時的 T<sub>m</sub> 值增加約 4 °C, Cu<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>+</sup> 存在時的 T<sub>m</sub> 值增加約 1.5 °C 左右。至於 Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 對 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和 (PPG)<sub>7</sub>GH 一樣, 不會造成三股螺旋結構之形成, 顯示出金屬離子和 C 端 His 的配位是誘發三股螺旋結構的主因, 金屬離子和 N 端 His 的配位對三股螺旋結構的穩定性影響則不大。

#### V. Ac- His-Gly-(PPG)<sub>7</sub>-NH<sub>2</sub>

從 far-UV CD 光譜的量測中 (圖 3-21), HG(PPG)<sub>7</sub> 在未加入金屬離子前的 CD 訊號最大波長在 227 nm, 為  $0.37 \times 10^3$  deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup> (表 3-8); 加入 Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Cu<sup>+</sup> 及 Zn<sup>2+</sup> 後最大波長在 227-228 nm, CD 訊號均變小 (表 3-8)。熔化實驗所得到的 CD 訊號顯示, 這些金屬離子的加入並無產生合作性的熔化曲線 (圖 3-22), 無法決定 T<sub>m</sub> 值 (表 3-8), 表示在這些條件下 HG(PPG)<sub>7</sub> 無法形成三股螺旋結構。

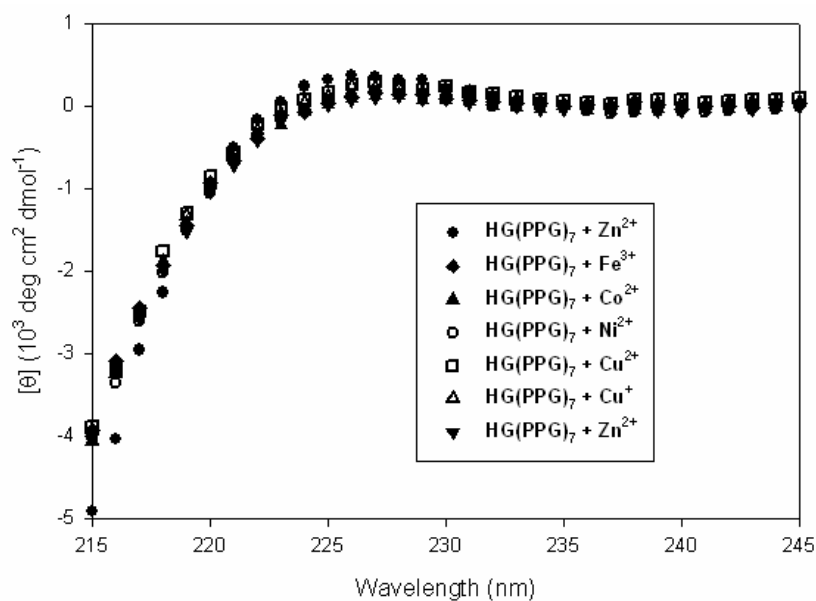


圖 3-21. 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG)<sub>7</sub> 和加入鐵離子 (Fe<sup>3+</sup>)、鈷離子 (Co<sup>2+</sup>)、鎳離子 (Ni<sup>2+</sup>)、銅離子 (Cu<sup>2+</sup>)、亞銅離子 (Cu<sup>+</sup>) 及鋅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 後的 far-UV CD 光譜。

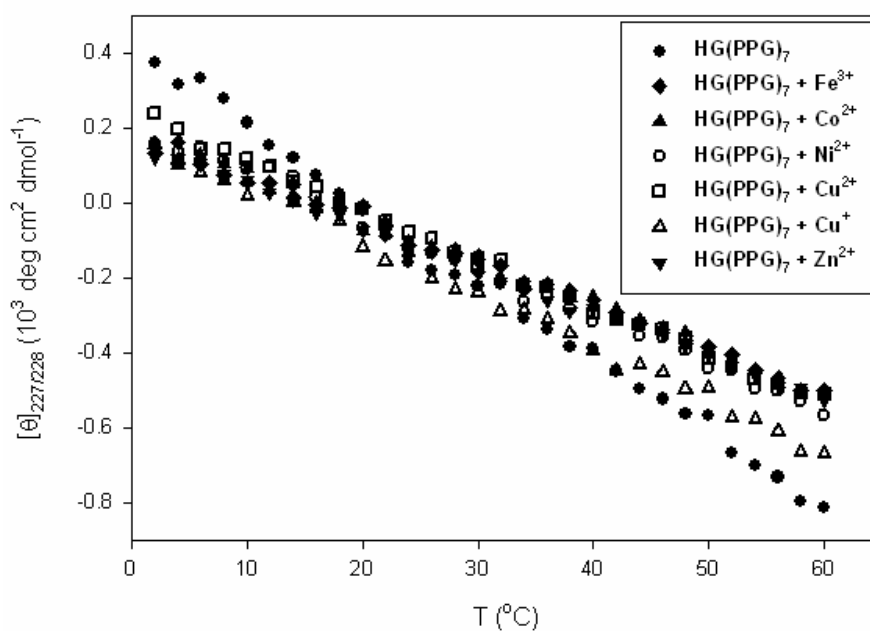


圖 3-22. 在 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG)<sub>7</sub> 和加入鐵離子 (Fe<sup>3+</sup>)、鈷離子 (Co<sup>2+</sup>)、鎳離子 (Ni<sup>2+</sup>)、銅離子 (Cu<sup>2+</sup>)、亞銅離子 (Cu<sup>+</sup>) 及鋅離子 (Zn<sup>2+</sup>) 後的熔化曲線。

表 3-8: 在 2 °C 及 pH 8.0 時，模擬胜肽 HG(PPG)<sub>7</sub> 在加入金屬離子前後的 CD 光譜相關參數 (“-”表示無三股螺旋結構)。

Metal ion	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]_{\max}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	T <sub>m</sub> (°C)
no	227	$0.36 \times 10^3$	-
Fe <sup>3+</sup>	227	$0.13 \times 10^3$	-
Co <sup>2+</sup>	227	$0.15 \times 10^3$	-
Ni <sup>2+</sup>	228	$0.16 \times 10^3$	-
Cu <sup>2+</sup>	227	$0.24 \times 10^3$	-
Cu <sup>+</sup>	227	$0.16 \times 10^3$	-
Zn <sup>2+</sup>	228	$0.12 \times 10^3$	-

從實驗結果發現，加入的金屬離子並無法藉由 His-metal 配位幫助 HG(PPG)<sub>7</sub> 形成三股螺旋結構；而綜合 (PPG)<sub>7</sub>GH、HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和 HG(PPG)<sub>7</sub> 三個胜肽的實驗結果，發現 C 端的 His-metal 配位是誘發三股螺旋結構之主因，也再次印證膠原蛋白的三股螺旋結構是由 C 端開始形成，然後往 N 端延展。

### 3-1-2 金屬離子滴定

假設一個 Cu<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>+</sup> 可以和三個 His 進行配位，幫助三股模擬胜肽彼此靠近形成三股螺旋結構，因此三股模擬胜肽 (PPG)<sub>7</sub>GH 需要一個 Cu<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>+</sup>，三股模擬胜肽 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 則需要兩個銅離子 Cu<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>+</sup>。因此，我們改變金屬離子濃度和模擬胜肽濃度之比例，互相混合後，測量 CD 的訊號變化。

#### I. (PPG)<sub>7</sub>GH

將 1 mg/mL 的 (PPG)<sub>7</sub>GH 分別和 0.04 mM、0.08 mM、0.12 mM、0.16 mM、0.2 mM 及 0.24 mM 的 Cu<sup>2+</sup> (圖 3-23) 和 Cu<sup>+</sup> (圖 3-24) 混合，靜置 24 小時後在

2 °C 下量測波長在 227 nm 的 CD 訊號。

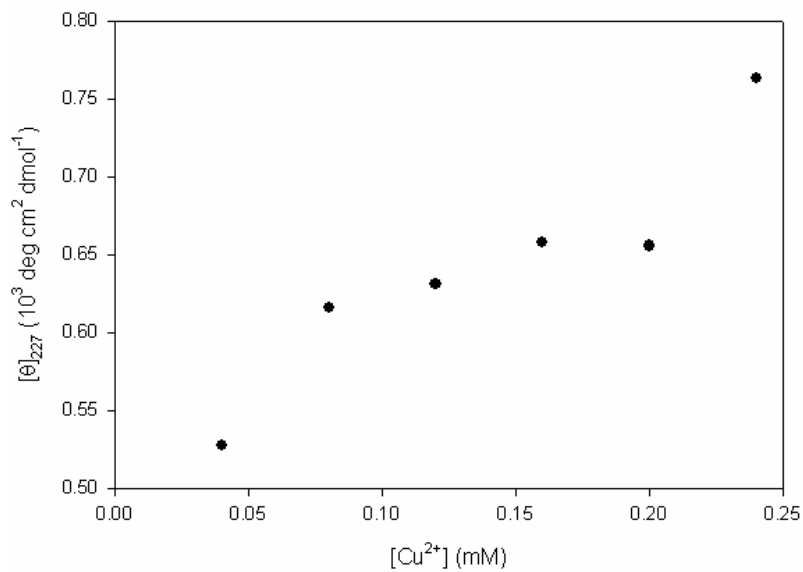


圖 3-23. 1 mg/mL (PPG)<sub>7</sub>GH 和不同濃度的銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號。

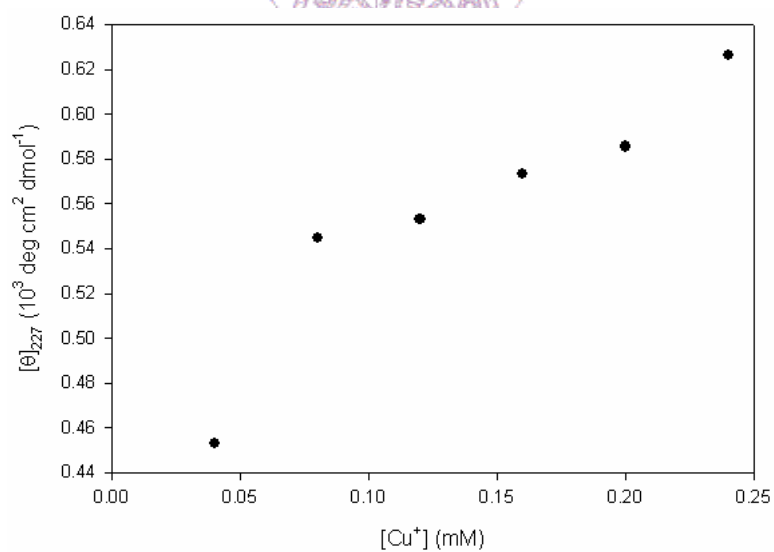


圖 3-24. 1 mg/mL (PPG)<sub>7</sub>GH 和不同濃度的亞銅離子 (Cu<sup>+</sup>) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號。

從滴定曲線中可看出，[Cu<sup>2+</sup>] = 0.16 mM 處的滴定曲線趨於平緩，但在 [Cu<sup>2+</sup>] =



0.24 mM 處的吸收訊號卻增加許多，因此判斷  $\text{Cu}^{2+}$  濃度為 1/3 的模擬胜肽濃度時，模擬胜肽達成第一階段飽和的三股螺旋結構，但當  $\text{Cu}^{2+}$  濃度持續增加後，模擬胜肽會和  $\text{Cu}^{2+}$  似乎形成更複雜的作用力關係。 $\text{Cu}^{+}$  的實驗結果和  $\text{Cu}^{2+}$  相同。

## II. HG(PPG)<sub>7</sub>GH

將 0.5 mg/mL 的 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 分別和 0.1 mM、0.12 mM、0.14 mM、0.16 mM、0.18 mM 及 0.2 mM 的  $\text{Cu}^{2+}$  (圖 3-25) 和  $\text{Cu}^{+}$  (圖 3-26) 混合，靜置 24 小時後量測波長在 227 nm 的 CD 訊號。

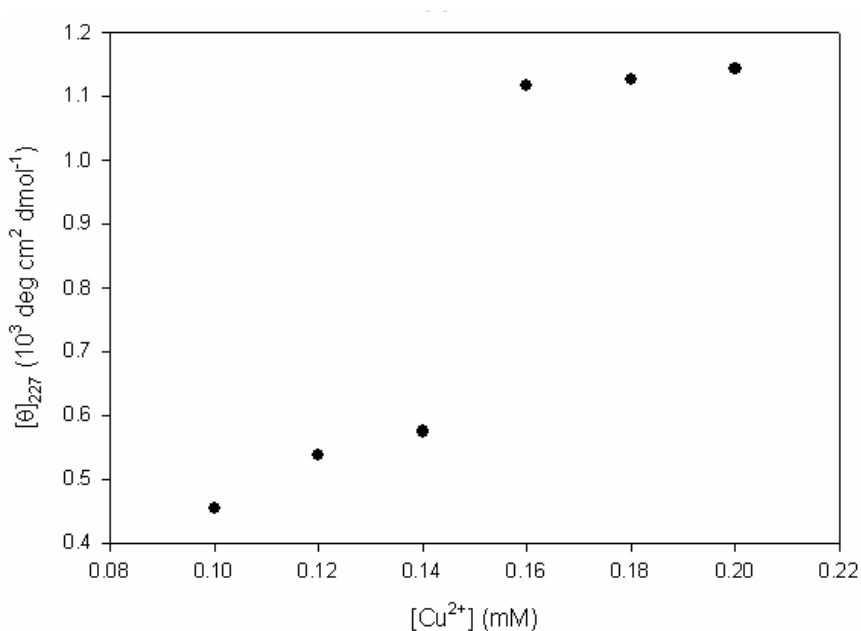


圖 3-25. 0.5 mg/mL HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和不同濃度的銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號。

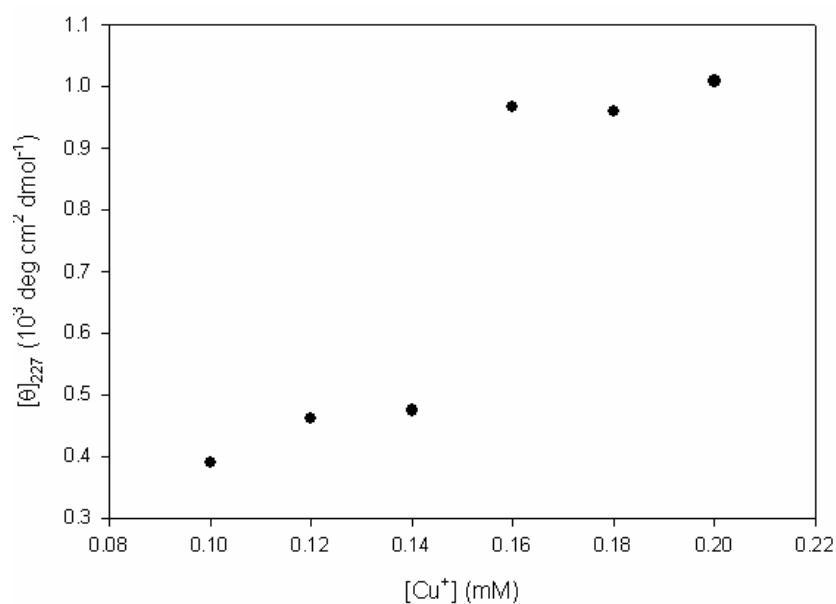


圖 3-26. 0.5 mg/mL HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和不同濃度的亞銅離子 (Cu<sup>+</sup>) 作用後在 227 nm 之 CD 訊號。

從滴定曲線中可看出，[Cu<sup>2+</sup>] = 0.16 mM 處的滴定曲線增加迅速，且之後訊號隨著 [Cu<sup>2+</sup>] 增加並無明顯改變，因此判斷 Cu<sup>2+</sup> 濃度為 2/3 的模擬胜肽濃度時，模擬胜肽形成飽和的三股螺旋結構。Cu<sup>+</sup> 的實驗結果和 Cu<sup>2+</sup> 相同。

### 3-1-3 折疊速率

藉由加熱過程將模擬胜肽保持為未折疊 (unfolded) 的狀態後，在 4 °C 下模擬胜肽會逐漸形成折疊 (folded) 狀態，藉由 CD 的量測，並可利用下列的方程式計算折疊分率：

$$F_T = \frac{[\theta]_T - [\theta]_{\text{unfolded}}}{[\theta]_{\text{folded}} - [\theta]_{\text{unfolded}}}$$

$F_T$ ：在溫度  $T$  時的折疊分率

$[\theta]_T$ ：在溫度  $T$  時的平均殘基橢圓率 (mean residue ellipticity, MRE)

$[\theta]_{\text{folded}}$ 、 $[\theta]_{\text{unfolded}}$ ：在  $4^\circ\text{C}$  及  $70^\circ\text{C}$  時完全折疊及完全未折疊的 MRE 值

當  $F_T = 0.5$  時，相對應的時間為  $t_{1/2}$ ，此點的組成即為 50% 折疊狀態 + 50% 未折疊狀態，利用  $t_{1/2}$ ，我們可以比較不同金屬離子幫助模擬胜肽形成三股螺旋結構的速率。

從實驗結果圖 3-27、圖 3-28 及表 3-9 中可發現， $\text{Ni}^{2+}$  使模擬胜肽折疊成三股螺旋狀態的速率最慢，其  $t_{1/2}$  在  $(\text{PPG})_7\text{GH}$  為 62 分鐘，而在  $\text{HG}(\text{PPG})_7\text{GH}$  中則  $>100$  分鐘；至於  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Cu}^+$  誘發模擬胜肽折疊的速率相似；此速率之差異，可能來自於金屬與 His 配位能力及幾何形狀之不同。此外  $(\text{PPG})_7\text{GH}$  的折疊速度比  $\text{HG}(\text{PPG})_7\text{GH}$  快，推測是因為金屬離子和  $\text{HG}(\text{PPG})_7\text{GH}$  氮端的 His 產生配位後，造成三股螺旋由 C→N 端延展的過程中，股間之胺基酸對位不正確，而延遲了折疊速率，因此時間上會較  $(\text{PPG})_7\text{GH}$  還慢。

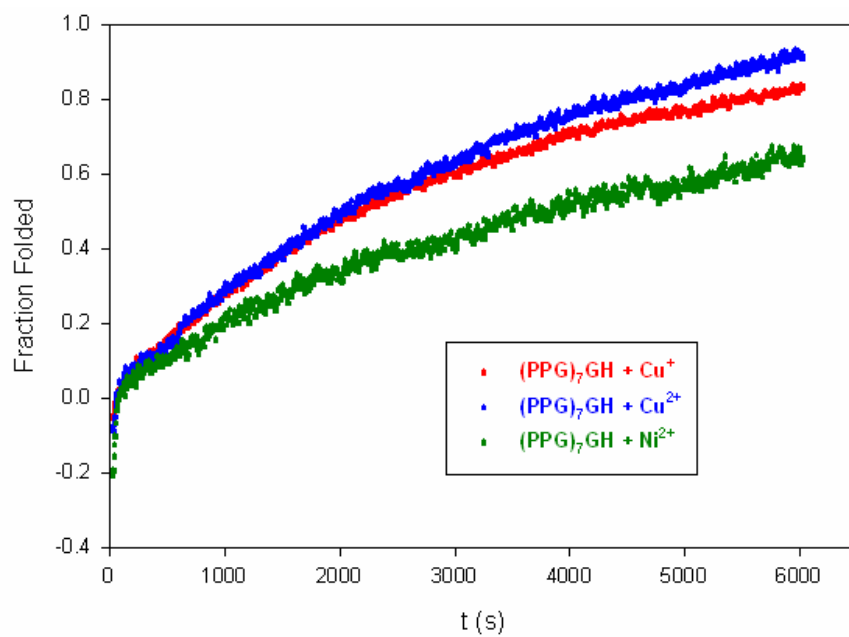


圖 3-27. (PPG)<sub>7</sub>GH 和銅離子(Cu<sup>+</sup>)、亞銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 及鎳離子 (Ni<sup>2+</sup>) 作用的折疊速率量測圖。

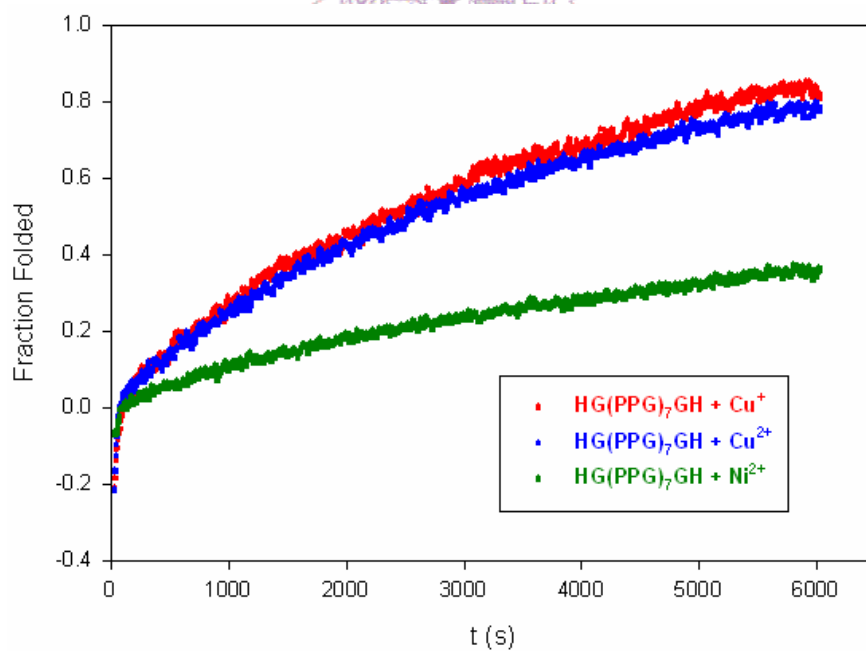


圖 3-28. HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和銅離子(Cu<sup>+</sup>)、亞銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 及鎳離子 (Ni<sup>2+</sup>) 作用的折疊速率量測圖。

表 3-9：模擬胜肽和金屬折疊速率比較。

peptide	metal ions	t <sub>1/2</sub> (min)
(PPG) <sub>7</sub> GH	Cu <sup>+</sup>	36
	Cu <sup>2+</sup>	34
	Ni <sup>2+</sup>	64
HG(PPG) <sub>7</sub> GH	Cu <sup>+</sup>	40
	Cu <sup>2+</sup>	43
	Ni <sup>2+</sup>	>100

### 3-2 NMR光譜

從文獻中可得知<sup>14, 30</sup>，當膠原蛋白形成三股螺旋結構時，3.2 ppm 及 3.5 ppm 處附近會有 proline (Pro) 上 C<sup>δ</sup>H 的共振吸收；在 3.9 ppm 附近，glycine 上 C<sup>α</sup>H 的共振吸收強度會因和其他股產生鍵結而降低。因此我們在本研究中，亦利用一維的 <sup>1</sup>H-NMR 光譜來判定 (PPG)<sub>7</sub>GH、HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和 HG(PPG)<sub>7</sub> 在不同金屬離子是否形成三股螺旋結構。

#### I. (PPG)<sub>7</sub>GH

##### (1). (PPG)<sub>7</sub>GH + Cu<sup>2+</sup>

無 Cu<sup>2+</sup> 時，(PPG)<sub>7</sub>GH 在 10 °C 及 45 °C 有類似的 NMR 光譜，在 3.1-3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處只有來自於 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收 (圖 3-29a)，在 7-9 ppm (圖 3-29b) 有來自於 His C<sup>ε1</sup>H 的共振吸收，且在 3.5 ppm 處沒有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收，這顯示無三股螺旋之形成。加入 Cu<sup>2+</sup> 後，在 10 °C 可發現在 3.1-3.2 ppm 之間和 3.5 ppm 處有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸，且 3.9 ppm 處的 Gly C<sup>α</sup>H 共振吸收強度降低；在 45 °C 時 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收消

失，顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽，這也符合熔化實驗的結果。另外，His 上的  $C^\beta H$  和  $C^\epsilon H$  則因和順磁的  $Cu^{2+}$  配位後，順磁效應 (附錄) 造成其化學位移往低場位移 (downfield shift)，而無法觀測到。

(a)

(b)

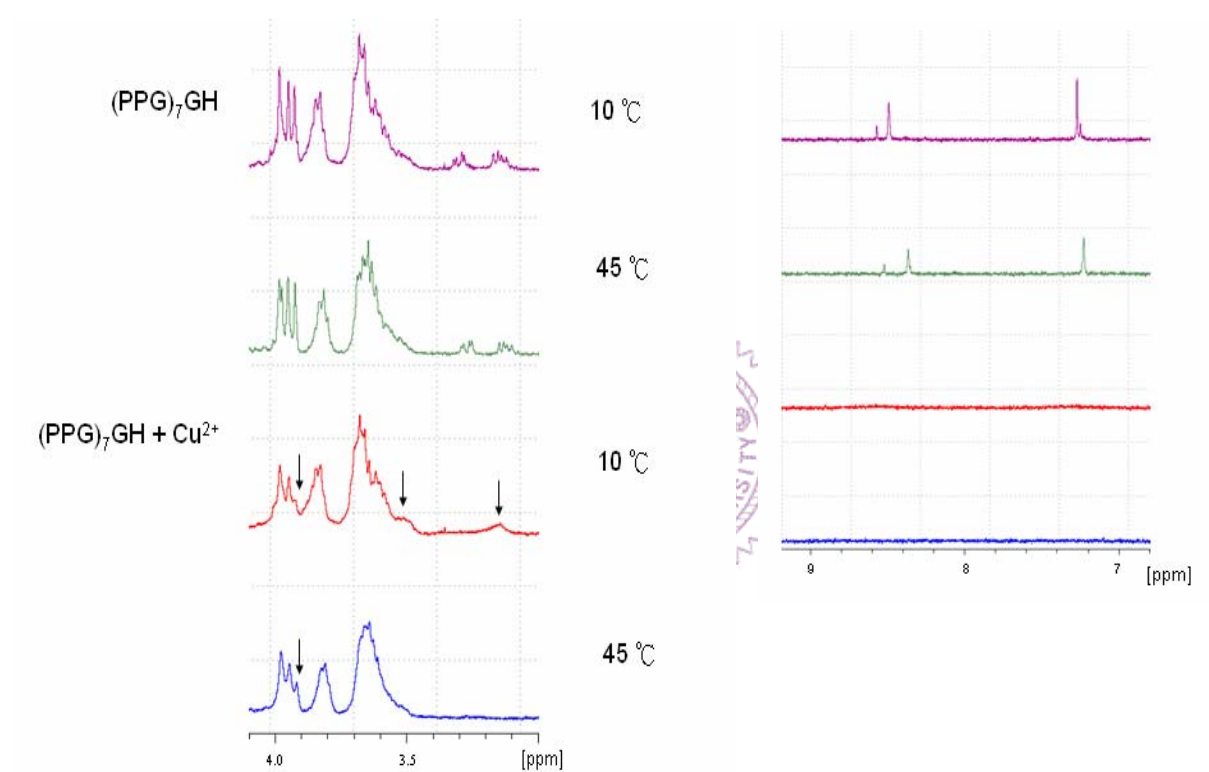


圖 3-29. (PPG)<sub>7</sub>GH 加入銅離子 ( $Cu^{2+}$ ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時  $^1H$ -NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm。

## (2). (PPG)<sub>7</sub>GH + $Cu^+$

無  $Cu^+$  時，(PPG)<sub>7</sub>GH 在 10 °C 及 45 °C 有類似的 NMR 光譜，在 3.1-3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處只有來自於 His  $C^\beta H$  的共振吸收 (圖 3-30a)，在 7-9 ppm (圖 3-30b) 有來自於 His  $C^\epsilon H$  的共振吸收，且在 3.5 ppm 處沒有 Pro  $C^\delta H$  的三股

螺旋結構共振吸收，這顯示無三股螺旋之形成。加入  $\text{Cu}^+$  後，在  $10^\circ\text{C}$  可發現在 3.1-3.2 ppm 之間和 3.5 ppm 處有 Pro  $\text{C}^\delta\text{H}$  的三股螺旋結構共振吸，且 3.9 ppm 處的 Gly  $\text{C}^\alpha\text{H}$  共振吸收強度降低；在  $45^\circ\text{C}$  時 Pro  $\text{C}^\delta\text{H}$  的三股螺旋結構共振吸收消失，顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽，這也符合熔化實驗的結果。另外，His 上的  $\text{C}^\beta\text{H}$  和  $\text{C}^{\epsilon 1}\text{H}$  雖因和逆磁的  $\text{Cu}^+$  配位，但因  $\text{Cu}^+$  很容易氧化為  $\text{Cu}^{2+}$  ( $2\text{Cu}^+_{(\text{aq})} \rightleftharpoons \text{Cu}^0_{(\text{s})} + \text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$   $E^0 = +0.37\text{ V}$ )， $\text{Cu}^{2+}$  的順磁效應造成其化學位移往低場位移 (downfield shift)，而無法觀測到。

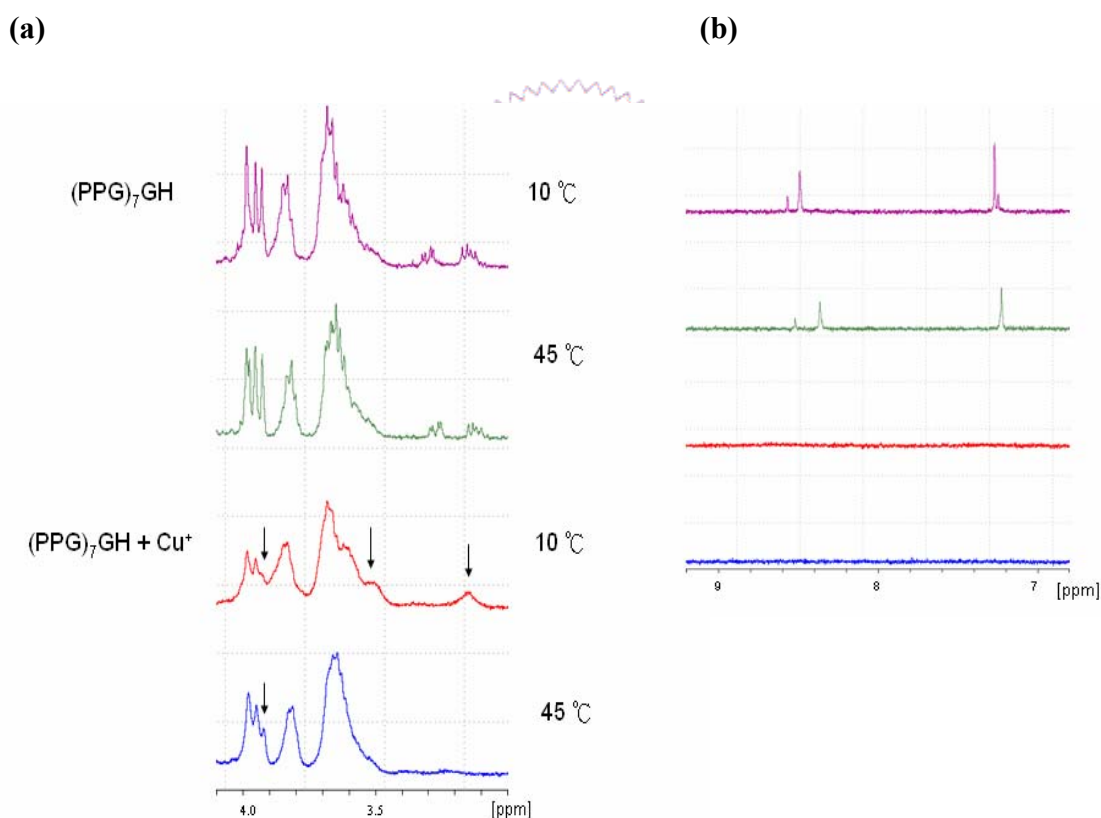


圖 3-30. (PPG)<sub>7</sub>GH 加入亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 前後，在  $10^\circ\text{C}$  (Folded) 及  $45^\circ\text{C}$  (Unfolded) 時  $^1\text{H}$ -NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm。

### (3). (PPG)<sub>7</sub>GH + Ni<sup>2+</sup>

無 Ni<sup>2+</sup> 時, (PPG)<sub>7</sub>GH 在 10 °C 及 45 °C 有類似的 NMR 光譜, 在 3.1 - 3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處只有來自於 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收 (圖 3-31a), 在 7-9 ppm (圖 3-31b) 有來自於 His C<sup>ε1</sup>H 的共振吸收, 且在 3.5 ppm 處沒有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收, 這顯示無三股螺旋之形成。加入 Ni<sup>2+</sup> 後, 在 10 °C 可發現在 3.1-3.2 ppm 之間和 3.5 ppm 處有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸, 且 3.9 ppm 處的 Gly C<sup>α</sup>H 共振吸收強度降低; 在 45 °C 時 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收消失, 顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽, 這也符合熔化實驗的結果。另外, His 上的 C<sup>β</sup>H 和 C<sup>ε1</sup>H 則在 His 與 Ni<sup>2+</sup> 配位後, 化學位移僅有些許的改變, 因此推測在此 d<sup>8</sup> 的 Ni<sup>2+</sup> 與 His 配位後形成平面四邊形的幾何形狀, 使得所有電子均成對, 而無順磁效應 (附錄), 因此仍可觀測到其共振吸收出現在原化學位移附近。

## II. HG(PPG)<sub>7</sub>GH

### (1) HG(PPG)<sub>7</sub>GH + Cu<sup>2+</sup>

無 Cu<sup>2+</sup> 時, HG(PPG)<sub>7</sub>GH 在 10 °C 及 45 °C 有類似的 NMR 光譜, 在 3.1-3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處只有來自於 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收 (圖 3-32a), 在 7-9 ppm (圖 3-32b) 有來自於 His C<sup>ε1</sup>H 的共振吸收, 且在 3.5 ppm 處沒有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收, 這顯示無三股螺旋之形成。加入 Cu<sup>2+</sup> 後, 在 10 °C 可發現在 3.1-3.2 ppm 之間和 3.5 ppm 處有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸, 且 3.9 ppm 處的 Gly C<sup>α</sup>H 共振吸收強度降低; 在 45 °C 時 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振



吸收消失，顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽，這也符合熔化實驗的結果。另外，His 上的  $C^\beta H$  和  $C^\epsilon H$  則因和順磁的  $Cu^{2+}$  配位後，順磁效應（附錄）造成其化學位移往低場位移（downfield shift），而無法觀測到。

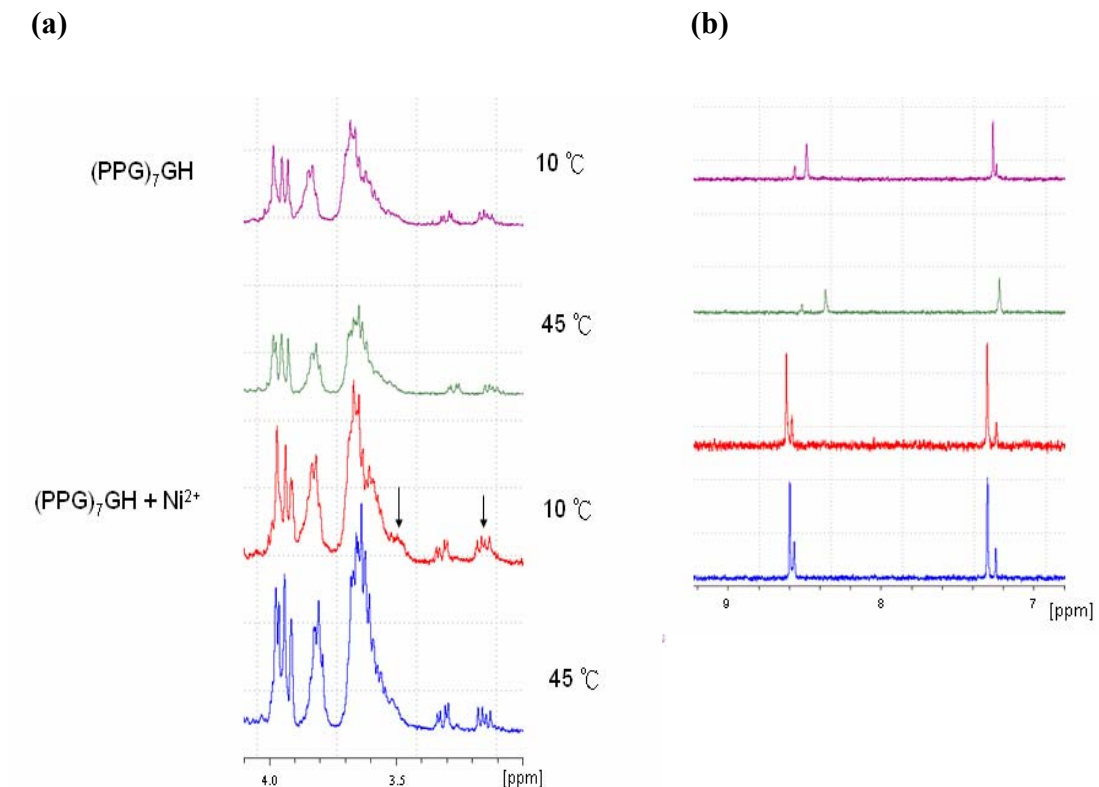


圖 3-31.  $(PPG)_7GH$  加入鎳離子 ( $Ni^{2+}$ ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時  $^1H$ -NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm。

(a)

(b)

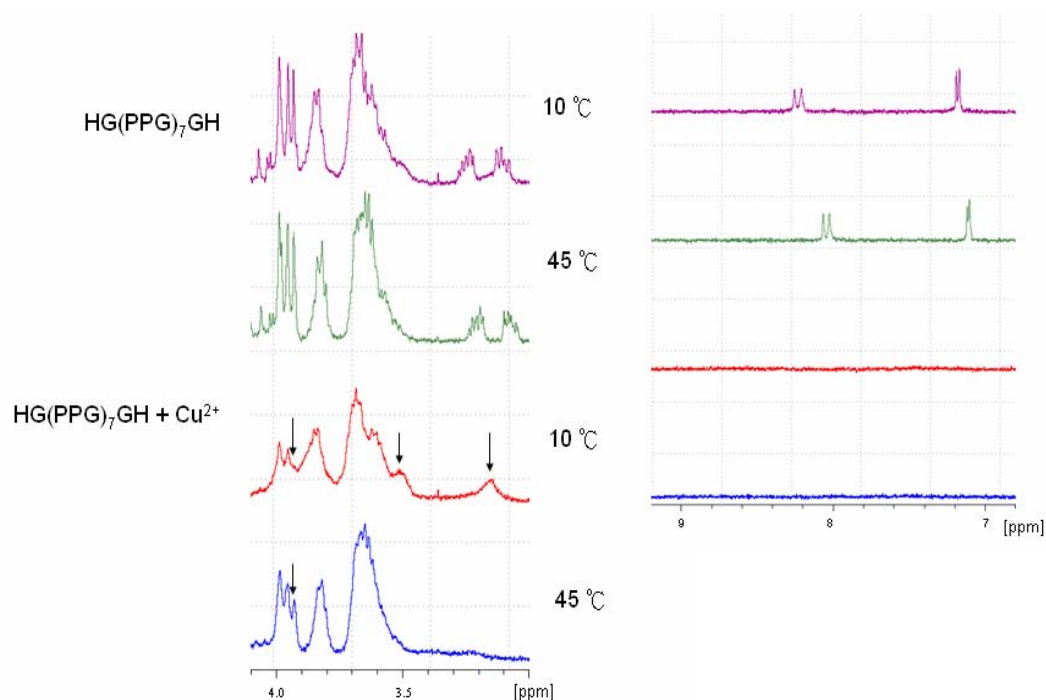


圖 3-32. HG(PPG)<sub>7</sub>GH 加入銅離子 (Cu<sup>2+</sup>) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時 <sup>1</sup>H-NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm。

## (2) HG(PPG)<sub>7</sub>GH + Cu<sup>+</sup>

無 Cu<sup>+</sup> 時，HG(PPG)<sub>7</sub>GH 在 10 °C 及 45 °C 有類似的 NMR 光譜，在 3.1-3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處只有來自於 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收 (圖 3-33a)，在 7-9 ppm (圖 3-33b) 有來自於 His C<sup>ε1</sup>H 的共振吸收，且在 3.5 ppm 處沒有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收，這顯示無三股螺旋之形成。加入 Cu<sup>+</sup> 後，在 10 °C 可發現在 3.1-3.2 ppm 之間和 3.5 ppm 處有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸，且 3.9 ppm 處的 Gly C<sup>α</sup>H 共振吸收強度降低；在 45 °C 時 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收消失，顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽，這也符合熔化實驗的結果。另

外, His 上的  $C^\beta H$  和  $C^\epsilon H$  雖因和逆磁的  $Cu^+$  配位, 但因  $Cu^+$  很容易氧化為  $Cu^{2+}$  ( $2 Cu^+_{(aq)} \rightleftharpoons Cu^0_{(s)} + Cu^{2+}_{(aq)}$   $E^0 = +0.37 V$ ),  $Cu^{2+}$  的順磁效應造成其化學位移往低場位移 (downfield shift), 而無法觀測到。

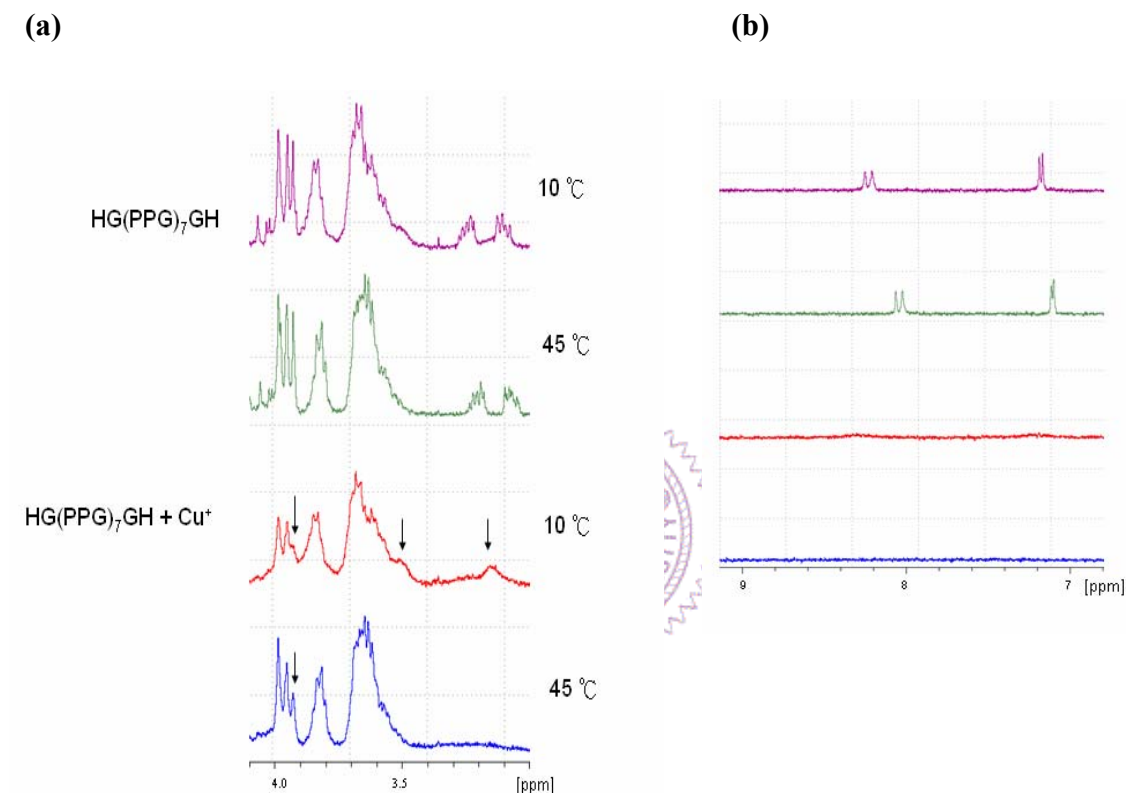


圖 3-33. HG(PPG)<sub>7</sub>GH 加入亞銅離子 ( $Cu^+$ ) 前後, 在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時  $^1H$ -NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm。

### (3) HG(PPG)<sub>7</sub>GH + $Ni^{2+}$

無  $Ni^{2+}$  時, HG(PPG)<sub>7</sub>GH 在 10 °C 及 45 °C 有類似的 NMR 光譜, 在 3.1-3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處只有來自於 His  $C^\beta H$  的共振吸收 (圖 3-34a), 在 7-9 ppm (圖 3-34b) 有來自於 His  $C^\epsilon H$  的共振吸收, 且在 3.5 ppm 處沒有 Pro  $C^\delta H$  的三股

螺旋結構共振吸收，這顯示無三股螺旋之形成。加入  $\text{Ni}^{2+}$  後，在  $10^\circ\text{C}$  可發現在 3.1-3.2 ppm 之間和 3.5 ppm 處有 Pro  $\text{C}^\delta\text{H}$  的三股螺旋結構共振吸，且 3.9 ppm 處的 Gly  $\text{C}^\alpha\text{H}$  共振吸收強度降低；在  $45^\circ\text{C}$  時 Pro  $\text{C}^\delta\text{H}$  的三股螺旋結構共振吸收消失，顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽，這也符合熔化實驗的結果。另外，His 上的  $\text{C}^\beta\text{H}$  和  $\text{C}^\epsilon\text{H}$  則在 His 與  $\text{Ni}^{2+}$  配位後，化學位移僅有些許的改變，因此推測在此  $d^8$  的  $\text{Ni}^{2+}$  與 His 配位後形成平面四邊形的幾何形狀，使得所有電子均成對，而無順磁效應（附錄），因此仍可觀測到其共振吸收出現在原化學位移附近。

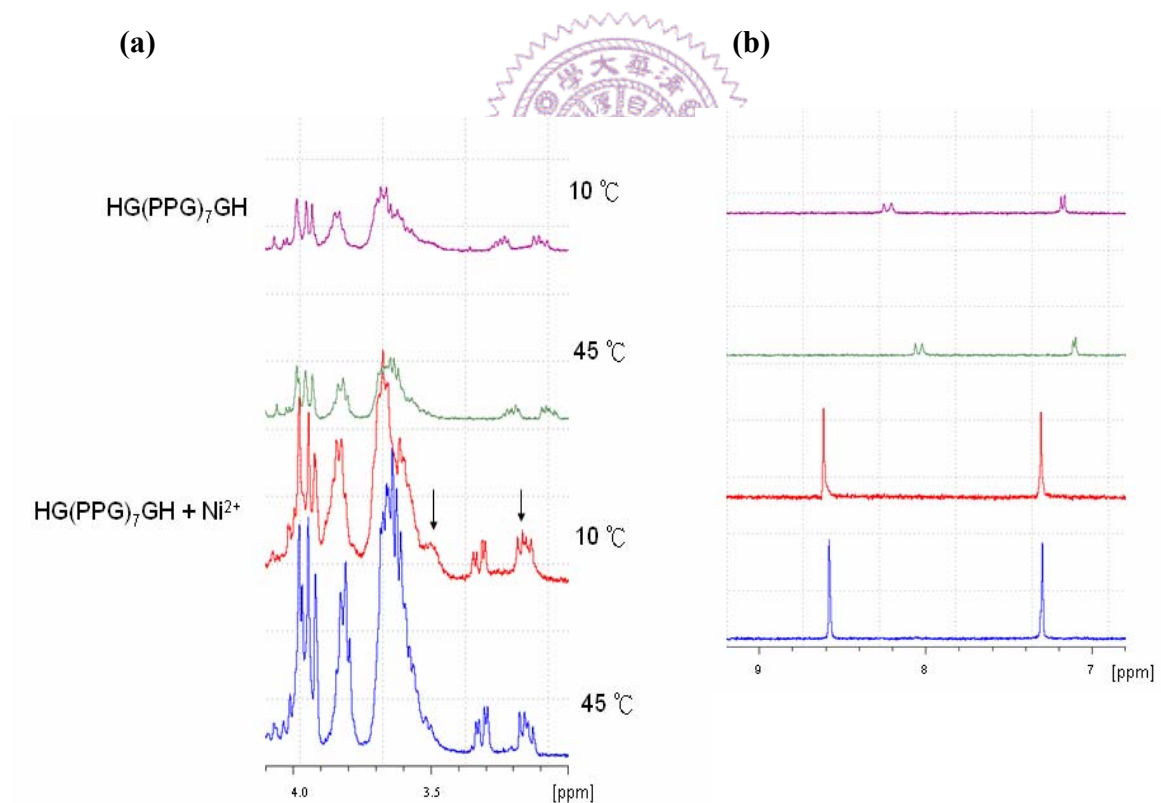


圖 3-34. HG(PPG)<sub>7</sub>GH 加入鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 前後，在  $10^\circ\text{C}$  (Folded) 及  $45^\circ\text{C}$  (Unfolded) 時  $^1\text{H}$ -NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm。

### III. HG(PPG)<sub>7</sub>

#### (1). HG(PPG)<sub>7</sub> + Cu<sup>2+</sup>

無 Cu<sup>2+</sup> 時，HG(PPG)<sub>7</sub> 在 10 °C 的 NMR 光譜，在 3.1-3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處有來自於 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收 (圖 3-35a)，且在 3.5 ppm 處有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收，在 7-9 ppm (圖 3-35b) 有來自於 His C<sup>ε1</sup>H 的共振吸收，這顯示在較高的濃度，HG(PPG)<sub>7</sub> 可形成三股螺旋之形成。加入 Cu<sup>2+</sup> 後，在 10 °C 時和未加入 Cu<sup>2+</sup> 有相似的 NMR 光譜，僅 3.1-3.2 ppm 處 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收消失；45 °C 時，不論有無 Cu<sup>2+</sup>，Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收消失，顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽。另外，His 上的 C<sup>β</sup>H 和 C<sup>ε1</sup>H 則因和順磁的 Cu<sup>2+</sup> 配位後，順磁效應 (附錄) 造成其化學位移往低場位移 (downfield shift)，而無法觀測到。



#### (2) HG(PPG)<sub>7</sub> + Cu<sup>+</sup>

無 Cu<sup>+</sup> 時，HG(PPG)<sub>7</sub> 在 10 °C 的 NMR 光譜，在 3.1-3.2 ppm 及 3.3-3.4 ppm 處有來自於 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收 (圖 3-36a)，且在 3.5 ppm 處有 Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收，在 7-9 ppm (圖 3-36b) 有來自於 His C<sup>ε1</sup>H 的共振吸收，這顯示在較高的濃度，HG(PPG)<sub>7</sub> 可形成三股螺旋之形成。加入 Cu<sup>+</sup> 後，在 10 °C 時和未加入 Cu<sup>2+</sup> 有相似的 NMR 光譜，僅 3.1-3.2 ppm 處 His C<sup>β</sup>H 的共振吸收消失；45 °C 時，不論有無 Cu<sup>2+</sup>，Pro C<sup>δ</sup>H 的三股螺旋結構共振吸收消失，顯示因加熱使得三股螺旋結構變為單股的胜肽。另外，His 上的 C<sup>β</sup>H 和 C<sup>ε1</sup>H 雖因和逆磁的 Cu<sup>+</sup>

配位，但因  $\text{Cu}^+$  很容易氧化為  $\text{Cu}^{2+}$  ( $2\text{Cu}^+_{(\text{aq})} \rightleftharpoons \text{Cu}^0_{(\text{s})} + \text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$   $E^0 = +0.37\text{ V}$ )， $\text{Cu}^{2+}$  的順磁效應造成其化學位移往低場位移 (downfield shift)，而無法觀測到。

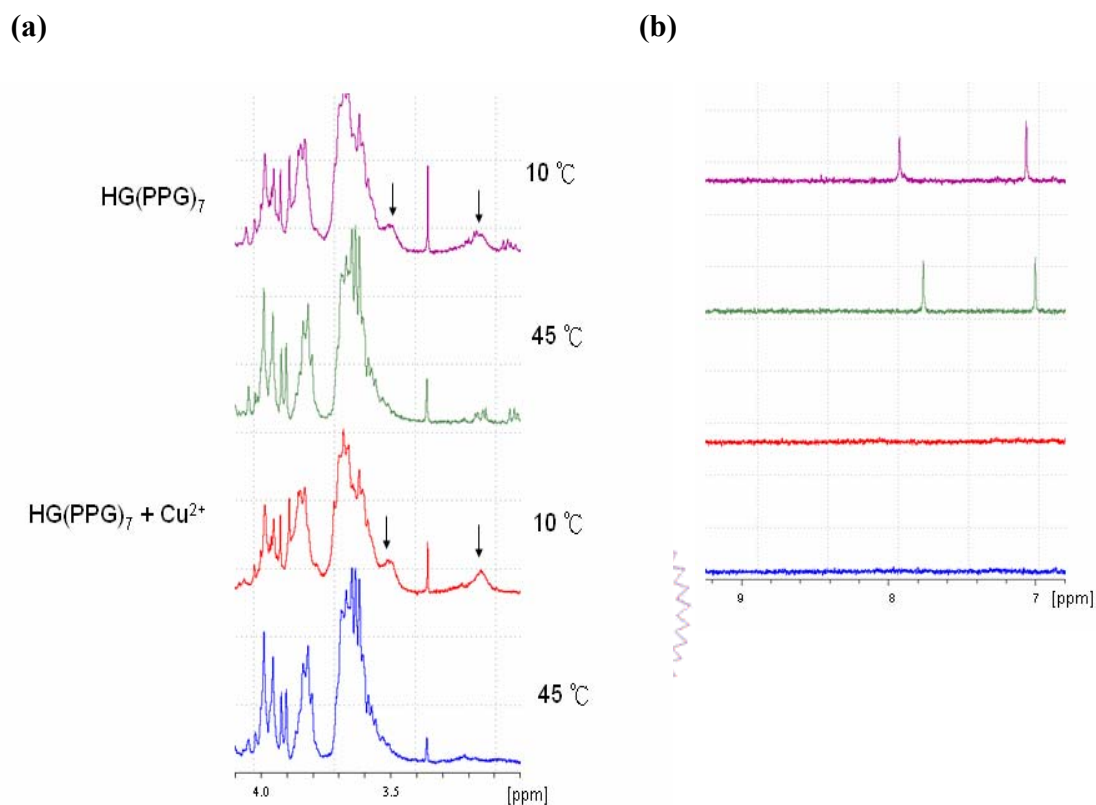


圖 3-35. HG(PPG)<sub>7</sub> 加入銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時  $^1\text{H}$ -NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm，3.35 ppm 處的吸收是甲醇的殘留。

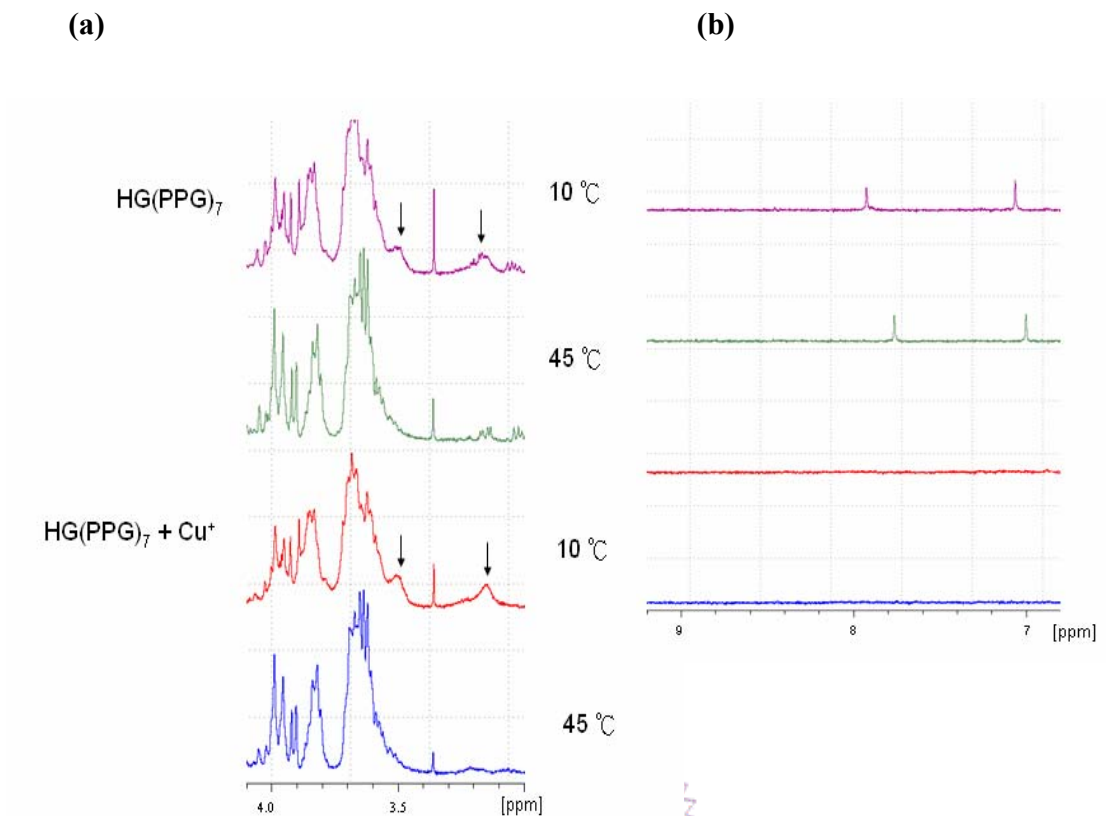


圖 3-36.  $\text{HG(PPG)}_7$  加入亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 前後，在 10 °C (Folded) 及 45 °C (Unfolded) 時  $^1\text{H}$ -NMR 圖譜的比較 (a) 3-4.1 ppm (b) 7-9 ppm，3.35 ppm 處的吸收是甲醇的殘留。



## 第四章 結論

雖然 (PPG)<sub>7</sub>PHG 的序列符合膠原蛋白的條件，本身即可形成三螺旋結構，但組胺酸 (histidine) 和金屬離子配位後，確實可增加三股螺旋結構的穩定性；而 (PPG)<sub>7</sub>GH 及 HG(PPG)<sub>7</sub>GH 在加入金屬離子之後，三股螺旋結構才得以形成，且熔點 (melting temperature,  $T_m$ ) 增加到大約 20 °C，證明這些設計含有組胺酸 (His-containing) 的類膠原蛋白，可經由和金屬的配位而幫助模擬胜肽形成三股螺旋結構及穩定之。在形成三股螺旋結構的過程中，HG(PPG)<sub>7</sub>GH 因股間的對位不正確，形成三股螺旋結構的速率較 (PPG)<sub>7</sub>GH 慢。

HG(PPG)<sub>7</sub>GH 的兩端皆具有組胺酸 (histidine)，但在三股螺旋的穩定性方面和 (PPG)<sub>7</sub>GH 相差不大，而 HG(PPG)<sub>7</sub> 和金屬配位後仍無法形成三股螺旋結構，印證了三股螺旋結構的形成是由碳端開始，氮端和金屬配位對於三股螺旋結構沒有決定性的影響。

不同金屬對於模擬胜肽三股螺旋結構折疊的影響也不同，銅離子 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 和亞銅離子 ( $\text{Cu}^+$ ) 對於模擬胜肽的影響最為顯著，鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 的影響較小，其他金屬如鐵離子 ( $\text{Fe}^{3+}$ )、鈷離子 ( $\text{Co}^{2+}$ )、鎳離子 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) 及鋅離子 ( $\text{Zn}^{2+}$ ) 則觀察不到三股螺旋結構，顯示出模擬胜肽對金屬具有選擇性， $\text{Cu}^+ \approx \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ ，這是由於組胺酸 (histidine) 和不同金屬間的配位能力不同導致的，這也提供了類膠原蛋白胜肽在生物感測器 (biosensor) 的應用上的可能性。



## 參考文獻

1. 《科學發展》 2003 年 2 月，362 期，44~47 頁
2. <http://chemistry.rsc.org/chemistryworld/News/2006/February/14020602.asp>
3. <http://www.bioinformatik-wegweiser.de/Sekundaerstruktur.html>
4. <https://chempolymerproject.wikispaces.com/Collagen-D-apml>
5. Engel, J., Bächinger, H. P. *Top. Curr. Chem.* **2005**, 247, 7-33
6. Rook/Wilkinson/Ebling: Textbook of Dermatology, 5th ed.
7. <http://61.31.198.50/~market02/qme7/index-1.html> 坤林高科技農業股份有限公司  
及 Qme 時空密碼 膠原蛋白知識網
8. Kramer, R. Z., Vitagliano, L., Bella, J., Berisio, R., Mazzarella, L., Brodsky, B., Zagari, A., Berman, H. M. *J. Mol. Biol.* **1998**, 280, 623-638.
9. Acton, S., Resnick, D., Freeman, M., Ekkel, Y., Ashkenas, J., Krieder, M. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 3530-3537.
10. Hoppe, H. J., Reid, K. B. M. *Protein Sci.* **1994**, 3, 1143-1158.
11. Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., Berman, H. M. *Science* **1994**, 266, 75-81.
12. Okuyama, K., Okuyama, K., Arnott, S., Takayanagi, M. Kakudo, M. *J. Mol. Biol.* **1981**, 152, 427-443.
13. Goodman, M., Feng, Y., Melacini, G., Taulane, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5156-5157.
14. Melacini, G., Feng, Y., Goodman, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10359-10364.
15. Cai, W., Kwok, S. W., Taulane, J. P., Goodman, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15030-15031.
16. Kinberger, G. A., Taulane, J. P., Goodman, M. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 961-963.

17. Koide, T., Yuguchi, M., Kawalita, M., Konno, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9388-9389.
18. Pires, M. M., Chmielewski, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2706-2712.
19. Przybyla, D. E., Chmielewski, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12610-12611.
20. Rele, S., Song, Y., Apkarian, R. P., Qu, Z., Conticello, V. P., Chaikof, E. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14780-14787.
21. Cejas, M. A., Kinney, W. A., Chen, C., Leo, G. C., Tounge, B. A., Vinter, J. G., Joshi, P. P., Maryanoff, B. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2202-2203.
22. Cejas, M. A., Kinney, W. A., Chen, C., Vinter, J. G., Almond, H. R., Balss, K. M., Maryanoff, C. A., Schmidt, U., Breslav, M., Mahan, A., Lacy, E., Maryanoff, B. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 8513-8518.
23. Kotch, F. W., Raines, R. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 3028-3033.
24. Ghadiri, M. R., Soares, C., Choi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 825-831
25. Tomb, J. -F., White, Owen., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L. M., Lee, N., Adams, M. D., Hickey, E. K., Berg, D. E., Gocayne, J. D., Utterback, T. R., Peterson, J. D., Kelley, J. M., Cotton, M. D., Weidman, J. M., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W. S., Borodovsky, M., Karpk, P. D., Smith, H. O., Fraser, C. M., Venter, J. C. *Nature* **1997**, *388*, 539-547.
26. Gilbert, J. V., Ramakrishna, J., Sunderman, F. W., Jr., Wright, A., Plaut, A. G. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 2682-2688.

27. Dosanjh, N. S., Michel, S. L. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 123-130.
28. Ge, R., Zhang, Y., Sun, X., Watt, R. M., He, Q. -Y., Huang, J. -D., Wilcox, D. E., Sun, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11330-11331.
29. Gauba, V., Hartgerink, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2683-2690.
30. Brodsky, B., Li, M. -H., Long, C. G., Apigo, J., Baum, J. *Biopolymers* **1992**, *32*, 447-451.



## 附錄

電子順磁共振光譜儀 (EPR) : ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SPECTROMETER, 型號為德國 BRUKER, EMX-10, 此部份委託國科會清華大學貴重儀器中心陳若琪小姐代測。

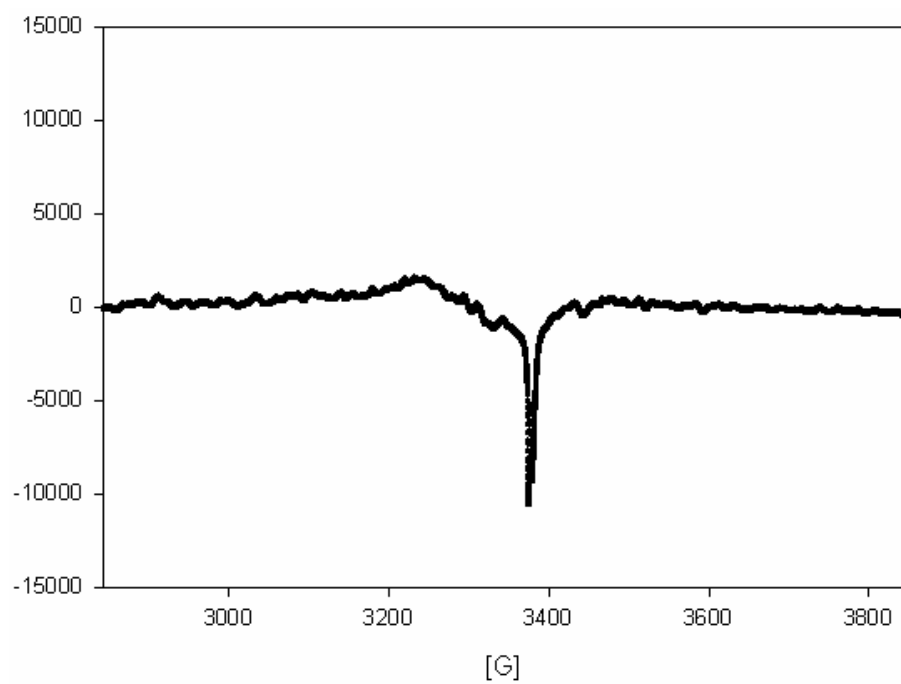
混何等量的 2 mg/mL 模擬胜肽溶液 (pH 8.0) 和 2 mM 金屬離子溶液 (pH 8.0), 在 4°C 下靜置 24 小時後, 在 77K 下量測 EPR 訊號。

### I. Ac-(PPG)<sub>7</sub>-Gly-His-NH<sub>3</sub>, pH 8.0

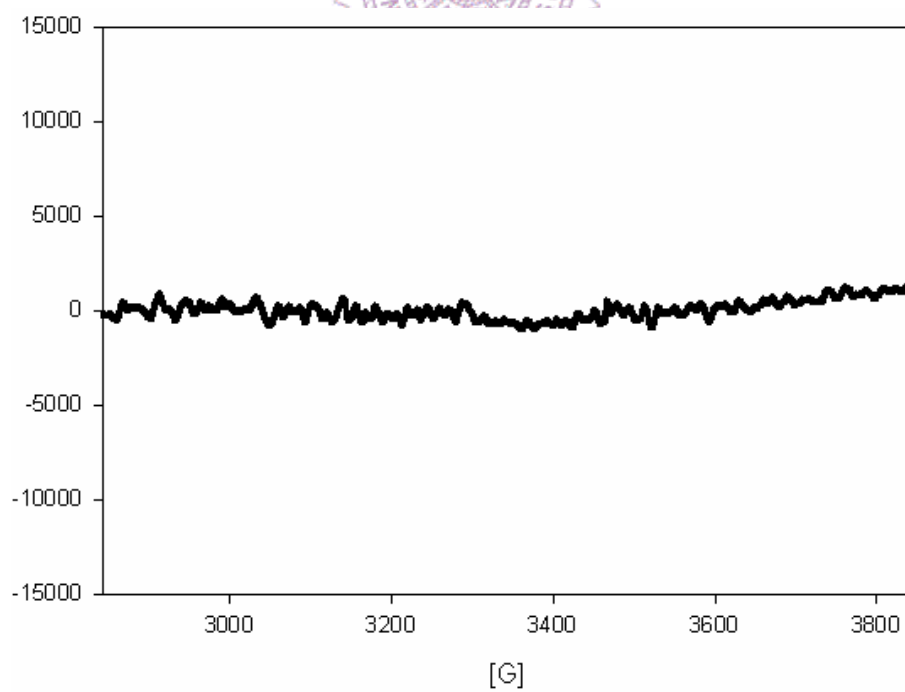
(PPG)<sub>7</sub>GH 和 Cu<sup>2+</sup> 配位後, EPR 光譜圖中可觀測到訊號, 這是因 Cu<sup>2+</sup> 的電子組態為順磁的 d<sup>9</sup>, 具有未成對電子, 因此在可觀測到未成對電子的訊號 (附錄圖 1)。和 Ni<sup>2+</sup> 配位後, EPR 光譜圖中觀測不到訊號, 可以推測雖然 Ni<sup>2+</sup> 的電子組態為 d<sup>8</sup>, 但和 His 配位時的幾何形狀可能為平面四邊形, 因此電子組態為逆磁的形式, 無未成對電子, 因此無法觀測到訊號 (附錄圖 2)。

### II. Ac-His-Gly-(PPG)<sub>7</sub>-Gly-His-NH<sub>3</sub>, pH 8.0

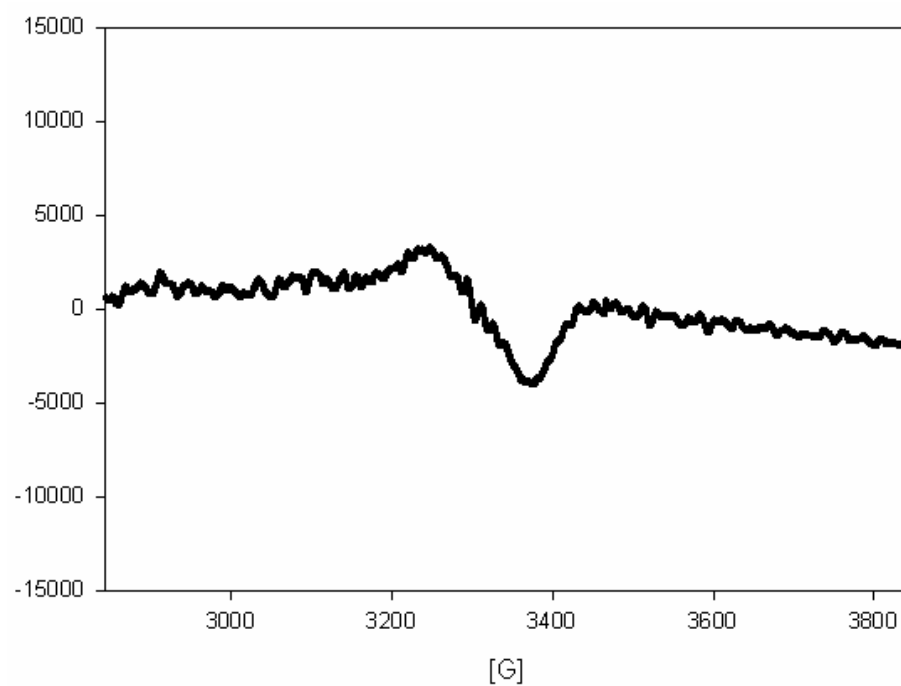
HG(PPG)<sub>7</sub>GH 和 Cu<sup>2+</sup> 配位後, EPR 光譜圖中可觀測到訊號, 這是因 Cu<sup>2+</sup> 的電子組態為順磁的 d<sup>9</sup>, 具有未成對電子, 因此在可觀測到未成對電子的訊號 (附錄圖 3)。和 Ni<sup>2+</sup> 配位後, EPR 光譜圖中觀測不到訊號, 可以推測雖然 Ni<sup>2+</sup> 的電子組態為 d<sup>8</sup>, 但和 His 配位時的幾何形狀可能為平面四邊形, 因此電子組態為逆磁的形式, 無未成對電子, 因此無法觀測到訊號 (附錄圖 4)。



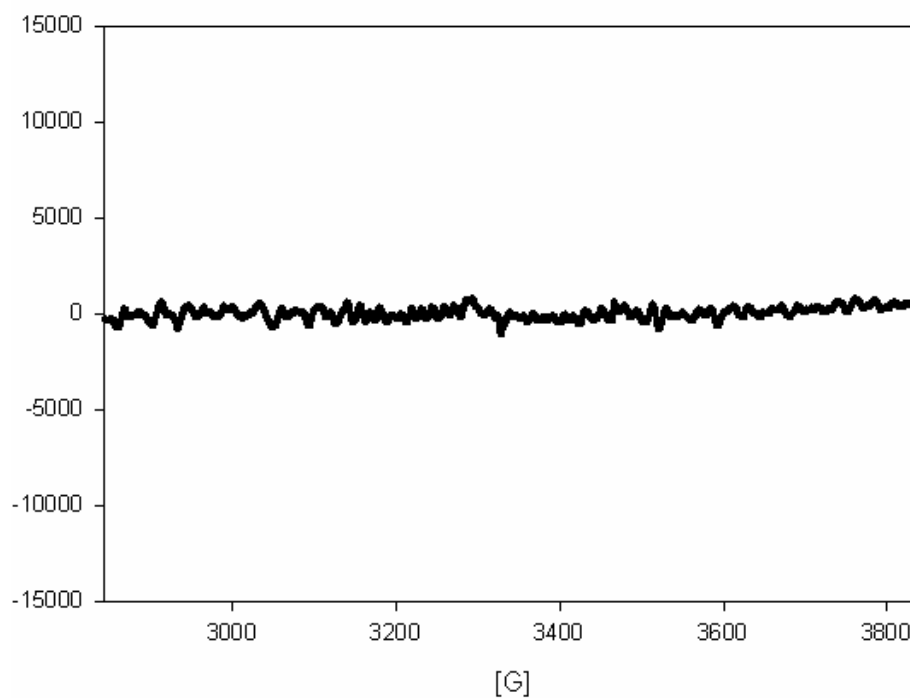
附錄圖 1. (PPG)<sub>7</sub>GH 和 Cu<sup>2+</sup> 配位後的 EPR 光譜圖。



附錄圖 2. (PPG)<sub>7</sub>GH 和 Ni<sup>2+</sup> 配位後的 EPR 光譜圖。



附錄圖 3. (PPG)<sub>7</sub>GH 和  $\text{Cu}^{2+}$  配位後的 EPR 光譜圖。



附錄圖 4. (PPG)<sub>7</sub>GH 和  $\text{Ni}^{2+}$  配位後的 EPR 光譜圖。