

2019 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030014

參展科別 化學

作品名稱 合成抗體徵召分子以提升免疫細胞對細菌
辨識力之研究

得獎獎項 大會獎：二等獎
出國正選代表

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 許名智、王宗興

作者姓名 李佳晏、黎芷嘉

關鍵詞 萬古黴素、連接單元、抗體徵召分子

作者簡介



我們是北一女中數理資優班的黎芷嘉與李佳晏。高二的我們對科學充滿嚮往，因此我們到臺大化學的實驗室學習實驗技巧。我們對人體和生物間的交互作用感到迷惘卻雀躍，因此想更深入探討這個領域。

感謝臺大化學王宗興教授，除了讓我們在他的實驗室做研究外，也時常給我們實驗上的建議。還有一直陪伴我們進行實驗、教導我們技術的黃智儀學姐和陳柏勳學長。最後是專研老師許名智老師，在專研這兩年對我們的照顧和幫助，因為有他們我們才能站上國際科展的舞台！

摘要

自古以來，致病細菌便是人類免疫系統的強敵，加上近年來抗生素的濫用使細菌在具有抗藥性後更加棘手，相對的人體免疫系統愈顯衰弱。本研究成功合成了一個可以連結細菌和免疫細胞的複合分子，此複合分子是由萬古黴素、連接單元和生物素組成，稱之為複合分子 **VLB** (Vancomycin-Linker-Biotin)。其中萬古黴素用來辨識並結合細菌細胞壁上的肽聚糖，生物素則可以與抗體結合並徵召免疫細胞。

我們以螢光基團及抗體等，實際測試複合分子 **VLB** 對細菌的辨識力，確認其能在萬古黴素端與革蘭氏陽性菌連結，並在生物素端與抗體結合。我們藉由複合分子 **VLB** 增加細菌及免疫系統之間的親和力，以提升免疫細胞辨識細菌的能力，使其更快更有效地對抗細菌，解決多重抗藥性細菌難以擊敗的問題。利用本研究合成抗體徵召分子的方法，大幅提升免疫細胞對致病細菌的辨識力，將來可望有效地應用在臨床醫學上。

Abstract

Coping with pathogenic bacteria has long been a struggle for human beings. For the past few decades, the overuse of antibiotics has worsened the problem, and nowadays fighting against antibiotic-resistant bacteria has become a major medical issue.

Generally, there are two approaches toward this issue, which are developing new antibiotics and designing immunotherapeutic molecules. Thus, we designed and synthesized an antibody-recruiting molecule, **VLB**, which can both bind to Gram-positive bacteria and recruit immunocytes.

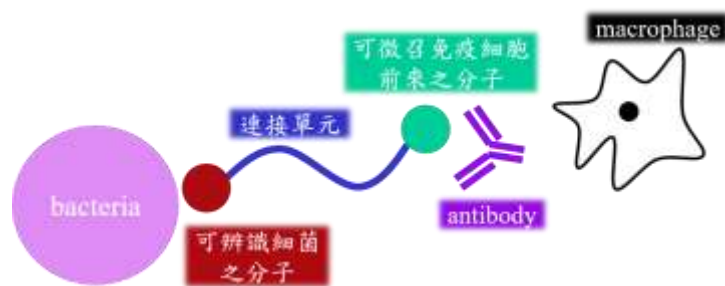
This molecule we designed is comprised of a vancomycin and a biotin moiety. They are linked by a bifunctional **Linker** in between. Vancomycin is an antibiotic that can target Gram-positive bacteria, so it is used as a bacteria-targeting group. On the other hand, biotin recruits anti-biotin antibodies.

Our concept of using antibody-recruiting molecules, such as **VLB**, to enhance immune response towards pathogenic bacteria, can be potentially used against antimicrobial resistance, and perhaps, even cancer.

壹、前言

一、研究動機

在自然界中，細菌無所不在而且扮演著極其重要的角色，其中部分致病細菌一旦入侵人體，數量便會呈指數上升，若沒有及時消滅或對抗，便可使人類染上疾病，甚至死亡。抗生素的發明可說是人類歷史上的一大突破，它能快速而且有效地破壞細菌的結構，但是近年來，抗生素的濫用導致抗藥性細菌日益遽增，因此抗生素對抗細菌的能力大幅降低。若要真正有效地對抗這些具抗藥性的致病細菌，最終還是必須依靠人體自身免疫系統的反應，所以本研究旨在合成一個一端能夠辨識細菌，而另一端能夠徵召免疫細胞前來的複合分子。如何更快徵召人體免疫系統來消滅細菌，是我們想深入探討的議題，也才是治本的方法。



概念圖 1：研究發想

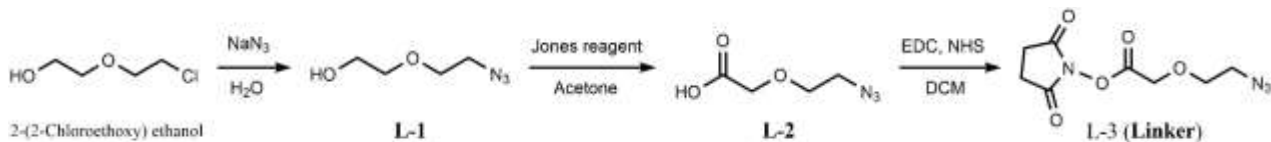
二、研究目的

- (一) 利用有機合成方法來製備連接單元以及複合分子 **VLB** (Vancomycin-Linker-Biotin)
- (二) 確認複合分子 **VLB** 能夠辨識細菌並與之結合
- (三) 分析複合分子 **VLB** 同時結合細菌及抗體的能力
- (四) 測試 **VLB** 結合細菌和免疫細胞（巨噬細胞）後的殺菌效果

三、研究原理及架構



(一) 合成連接單元 Linker



Scheme 1：連接單元合成反應式

首先要合成連接單元（Linker），在第一步中氯原子被疊氮取代，第二步中羥基被氧化成羧基，最後一步羧基被 NHS（N-hydroxysuccinimide）取代。

(二) 合成複合分子 VLB

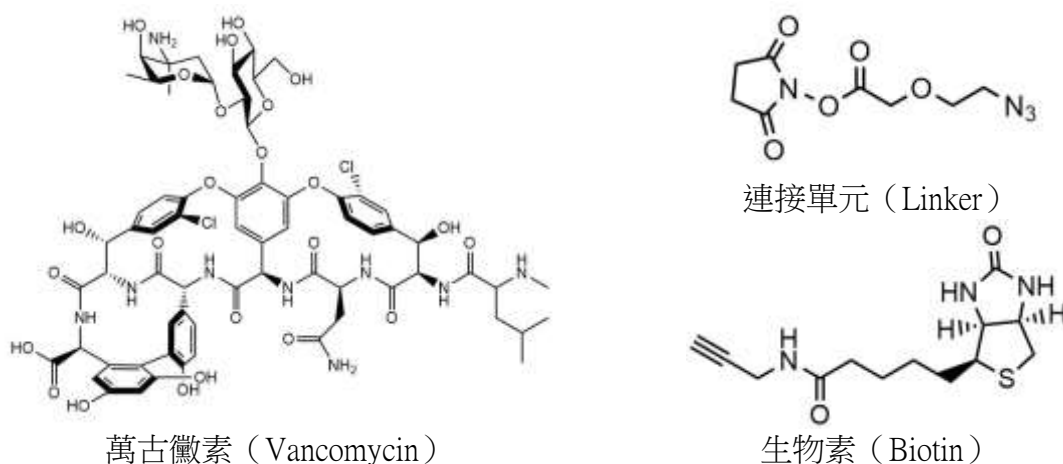


圖 1：萬古黴素、連接單元以及生物素化學結構

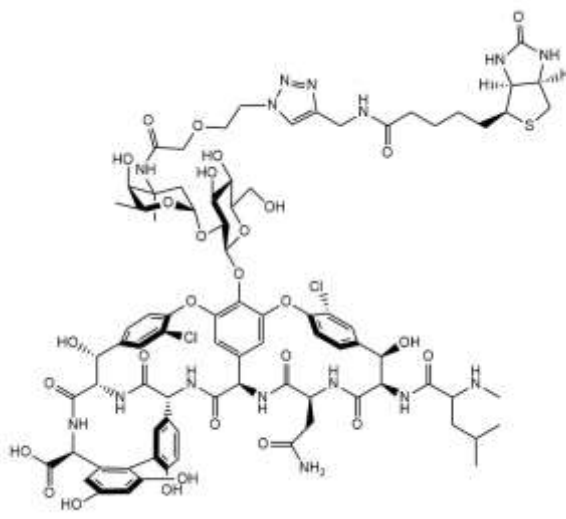


圖 2：複合分子 VLB（Vancomycin-Linker-Biotin）化學結構

上圖 2 中的複合分子 VLB 即為本研究所合成的複合分子，它是一種抗體徵召分子（Antibody-Recruiting Molecules，ARMs），顧名思義為能吸引抗體結合的分子，也就是利用

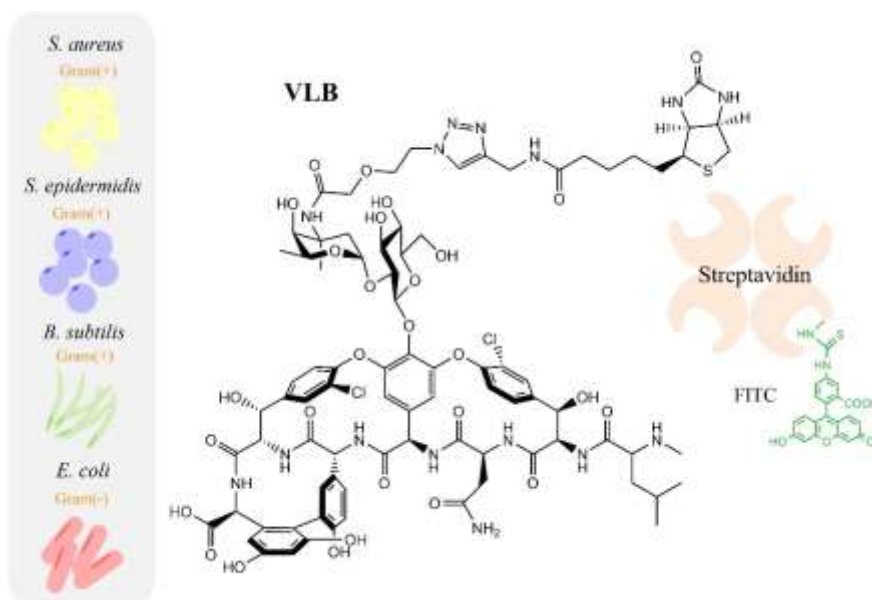
某個單元來連接兩個分子，其中一端接上抗體，另一端則可以辨識癌細胞、細菌、病毒等。我們所合成的這個複合分子是由萬古黴素（Vancomycin）、連接單元（**Linker**）和生物素（Biotin）以共價鍵結組成。

（三）培養細菌

本研究所培養的細菌共有三種革蘭氏陽性菌（Gram-positive bacteria）以及一種革蘭氏陰性菌（Gram-negative bacteria）。陽性菌包括金黃色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）和枯草桿菌（*Bacillus subtilis*），而陰性菌則選擇了大腸桿菌（*Escherichia coli*）。

比起革蘭氏陰性菌，陽性菌的細胞壁不含能抵抗宿主免疫系統的脂多醣（Lipopolysaccharide, LPS），即更容易被抗生素辨識，因此本研究以革蘭氏陽性菌作為實驗組，革蘭氏陰性菌作為對照組，來測試所合成的複合分子 VLB 是否能達成本研究之目的。

（四）確認複合分子 VLB 能辨識細菌



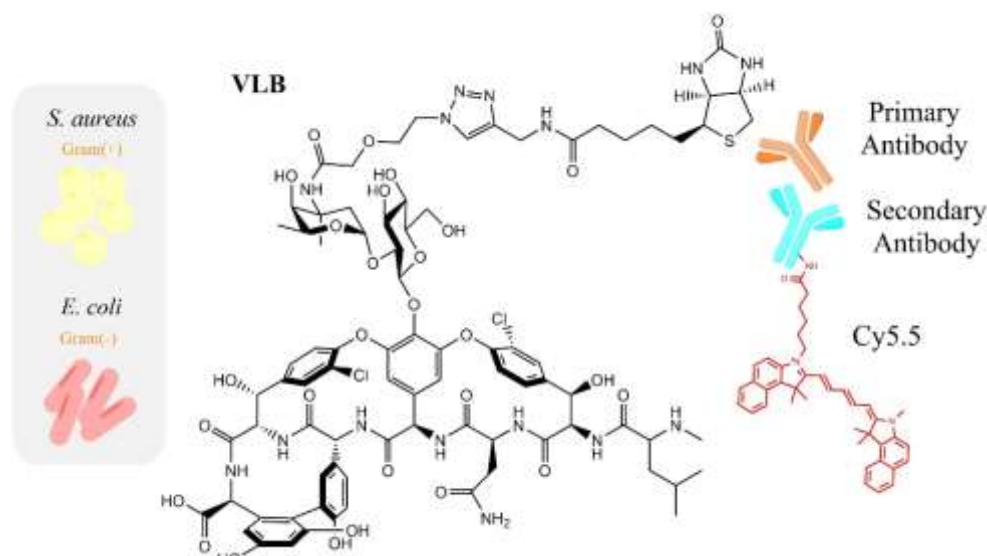
概念圖 2：以具螢光基團之鏈親合素（Streptavidin）確認 VLB 具有辨識細菌的能力

在合成完複合分子 VLB 後，我們先以具螢光基團 FITC（Fluorescein isothiocyanate）之鏈親合素（Streptavidin）確認連接在 VLB 上的萬古黴素仍具有辨識細菌的能力。其中萬古黴素端用來辨識細菌，而生物素端則與鏈親合素結合。

鏈親合素與生物素具有極高的親和力，兩者的結合是自然界中最強的非共價相互作用之一，且鏈親合素-生物素複合體對於蛋白水解酶、有機溶劑、極端溫度和 pH 值皆有良好的耐受力，因此被廣泛用於分子生物學與生物奈米技術中。

我們利用流式細胞儀來分析細菌表面帶有螢光基團的數值，藉此方法確認萬古黴素仍能辨識細菌細胞壁上的肽聚醣（Peptidoglycan）並與其結合。

（五）分析複合分子 VLB 的徵召能力

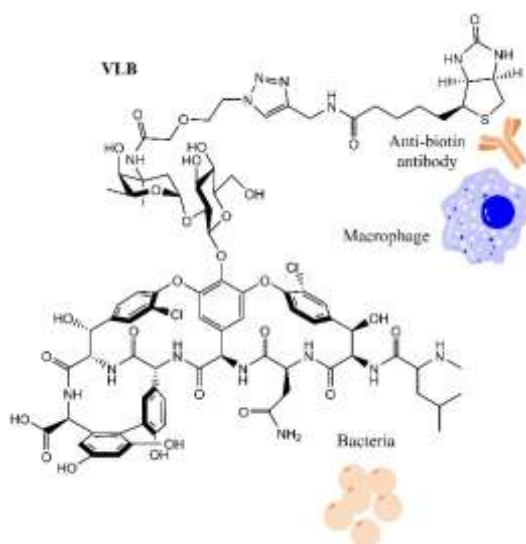


概念圖 3：以具螢光基團之抗體（Antibody）分析複合分子 VLB 結合細菌以及抗體的能力

確認 VLB 能辨識細菌後，我們分析了複合分子 VLB 結合細菌以及徵召抗體的能力。本步驟以兩種抗體進行，Primary Antibody 是宿主為小鼠的抗生物素抗體，而 Secondary Antibody 是宿主為山羊的抗小鼠的抗體。

Primary Antibody 能與 VLB 之生物素端結合，而 Secondary Antibody 上具有螢光基團 Cy-5.5 (Cyanine)，且其能與 Primary Antibody 結合。藉由分析細菌表面帶有螢光基團的數值以及發螢光細菌的百分比，來間接判斷 VLB 是否有順利連結細菌以及抗體，且結合的效率為何。

（六）測試複合分子 VLB 的殺菌效果



概念圖 4：測試 VLB 的存在對巨噬細胞殺菌效果的影響

確認 VLB 能有效結合細菌以及抗體後，我們進一步測試 VLB 的存在對巨噬細胞殺菌效果的影響。本研究最終的目標是希望所合成的複合分子 VLB 能大幅提升免疫細胞（巨噬細胞）對各種致病細菌的辨識力，進而更有效率地對抗細菌。

貳、研究方法或過程

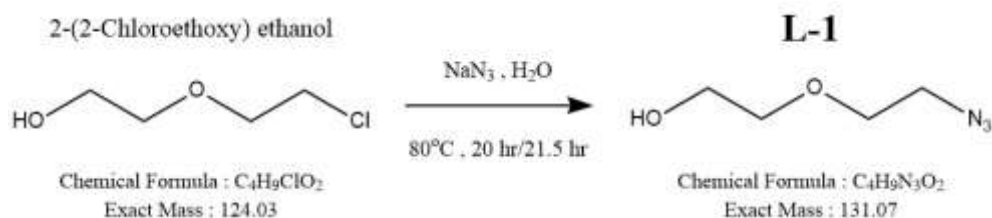
一、研究設備及器材

- (一) 電磁加熱攪拌儀
- (二) 薄層層析 (Thin Layer Chromatography, TLC) 片
- (三) 減壓迴旋濃縮儀 (Rotary Evaporator, Rota)
- (四) 質譜儀 (Mass Spectrometry, Mass)
- (五) 核磁共振光譜儀 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)
- (六) 高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
- (七) 冷凍乾燥機 (Lyophilizer, 凍乾機)
- (八) 流式細胞儀 (Flow Cytometer)
- (九) 冷凍離心機
- (十) 顯微分光光度計 (Microspectrophotometer)
- (十一) 紫外光-可見光光譜儀 (Ultraviolet/Visible Spectrophotometer, UV-Vis)

二、研究過程

(一) 連接單元 (Linker) 的合成

1. L-1 反應：以疊氮 (N_3) 取代氯原子 (Cl)



2-(2-chloroethoxy) ethanol : 2- (2-氯乙氧基) 乙醇

L-1 反應所需的藥品包括疊氮化鈉 (NaN_3)、水以及起始物 2- (2-氯乙氧基) 乙醇，參考劑量如下：

表 (一) : L-1 反應各反應物之劑量

反應物	NaN_3	H_2O	2- (2-氯乙氧基) 乙醇
劑量	15 g	60 mL	10 mL
莫耳數	0.23 mol		95.1 mmol

- (1) 準備藥品 (如上) 於圓底瓶
- (2) 將其放上電磁加熱版，設定 100°C (實際反應溫度為 80°C)，預計反應 20 小時，但此反應時間超過 20 小時並不影響反應結果
- (3) 收產物 L-1，點 TLC 片 (展開液為乙酸乙酯：甲醇 = 9：1) 以確認瓶內有產物

(4) 加 NaOH 終止反應

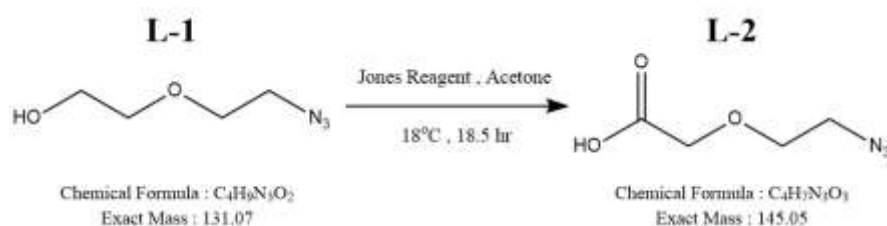
(5) 用二氯甲烷 (DCM) 萃取產物：50 mL × 9 次

(6) 收集有機層，加無水硫酸鎂 (MgSO₄) 吸水

(7) 過濾掉 MgSO₄ 後，用 Rota 以及高真空系統抽掉 DCM，留下產物

〔註〕由於在利用質譜儀及 NMR 確認反應結果後，發現反應並沒有完全讓 2-(2-氯乙氧基)乙醇反應為 L-1，而且有不少萃取液二氯甲烷殘留，因此我們增加了疊氮化鈉的當量數和反應時間，再次進行 L-1 反應，以收集更多的產物。

2. L-2 反應：瓊斯氧化羥基為羧基



Scheme 3 : L-2 反應式

首先準備瓊斯試劑 (Jones reagent)，需要的藥品包括三氧化鉻 (CrO₃)、硫酸 (H₂SO₄) 以及水，參考劑量如下：

表 (二)：Jones reagent 各反應物之劑量

反應物	CrO ₃	H ₂ SO ₄	H ₂ O
劑量	1.78 g	1.53 mL	6.6 mL
莫耳數	17.8 mmol	28.7 mmol	

L-2 反應所需的藥品包括丙酮 (Acetone)、瓊斯試劑 (Jones Reagent) 以及 L-1，以下為參考劑量：

表 (三)：L-2 反應各反應物之劑量

反應物	Acetone	Jones Reagent	L-1
劑量	26.6 mL	5 mL	1.8 g (13.73 mmol)

(1) 準備瓊斯試劑所需藥品 (如上表二)

(2) 將 H₂SO₄ 緩緩加入裝有 CrO₃、置於冰浴中的燒杯 (瓊斯反應用系統開放的燒杯進行較安全) 並進行攪拌，顏色由 CrO₃ 的深紫色變為混濁的血紅色

(3) 將水緩緩加入上一步驟的燒杯 (應為酸加入水中，但由於 H₂SO₄ 的量不足溶掉所有 CrO₃ 所以改為水加入酸中)，攪拌均勻後顏色變為清澈的酒紅色，完成瓊斯試劑的製備

(4) 將 L-1 和丙酮滴入梨形瓶 (劑量如上表三)，置於冰浴中並進行攪拌

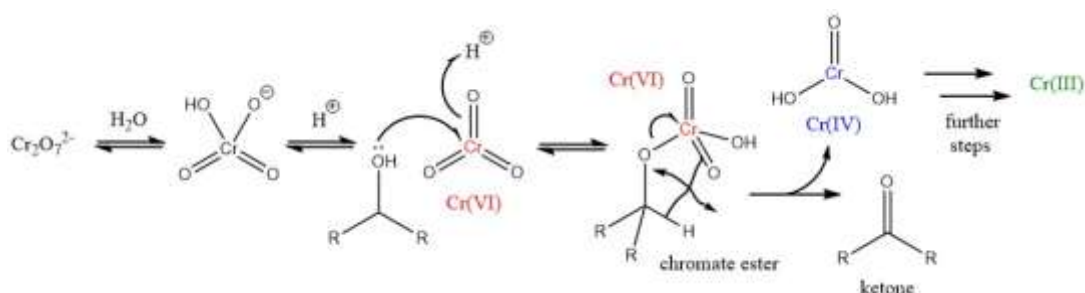
(5) 在該梨形瓶中加入瓊斯試劑 (劑量如上表三)，顏色漸漸由酒紅色變為碘色、墨綠

色到最後的皮蛋色。預計反應 12 小時，但此反應時間超過 12 小時並不影響反應結果，實際反應時間為 18.5 小時

- (6) 12 小時後顏色變為澄清的淡綠色，下方有墨綠色的鉻酸鹽沉澱，點 TLC 片以確認反應是否完全
- (7) 以抽氣過濾去除反應生成的鉻酸鹽，收集初產物
- (5) 用乙酸乙酯 (EA) 萃取產物：25 mL × 9 次
- (6) 用水以及食鹽水 (brine) 萃取有機層以帶走殘留的水層：H₂O 25 mL × 2 次；brine 50 mL × 1 次
- (7) 收集有機層，加 MgSO₄ 吸水
- (8) 過濾掉 MgSO₄ 後，用 Rota 以及高真空系統抽掉 EA，留下產物
- (9) 進行管柱層析以去除起始物 L-1，留下產物 L-2

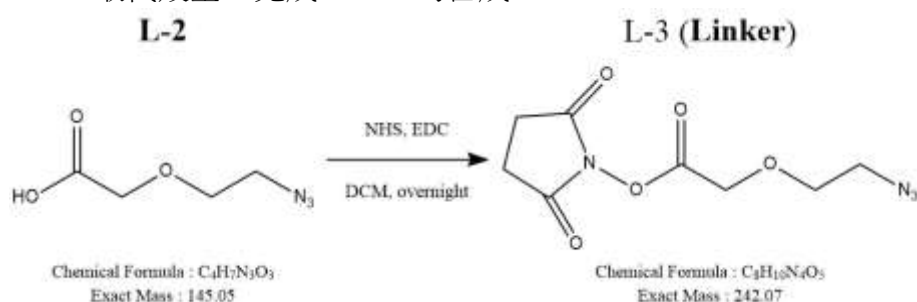
我們以乙酸乙酯 (EA) 以及己烷 (Hexane) 之混和溶液作為管柱層析的沖提液。以 TLC 片確認有純的產物後，將溶液抽乾後即留下 L-2。

※原理



原理圖 1：L-2 反應之機構

3. L-3 反應：NHS 取代羧基，完成 Linker 的合成



Scheme 4：L-3 反應式

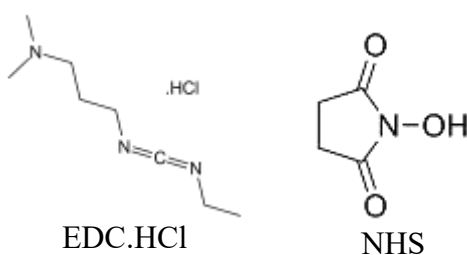


圖 3：EDC.HCl 和 NHS 的化學結構

EDC.HCl：1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳酰二亞胺；NHS：N-羥基琥珀酰亞胺

L-3 反應所需的藥品包括 EDC.HCl、NHS、L-2 以及二氯甲烷 (DCM)，以下為參考劑量：

表 (四)：L-3 反應各反應物之劑量

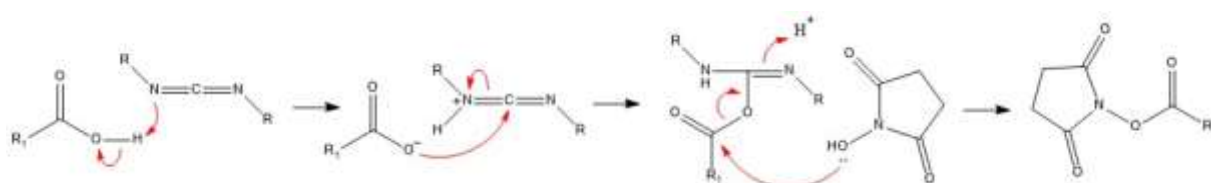
反應物	EDC.HCl	NHS	L-2	DCM
劑量	118.54 mg	99.97 mg	100 mg	4.7 mL
莫耳數	618 μ mol	869 μ mol	689 μ mol	

(1) 在 10 mL 心形瓶中加入各反應物 (劑量如上表)，反應過夜，時間約為 17 至 20 小時，反應溫度為室溫

(2) 點 TLC 片追蹤反應

(3) 立刻進行管柱層析，以收集純的產物 **Linker**

※原理

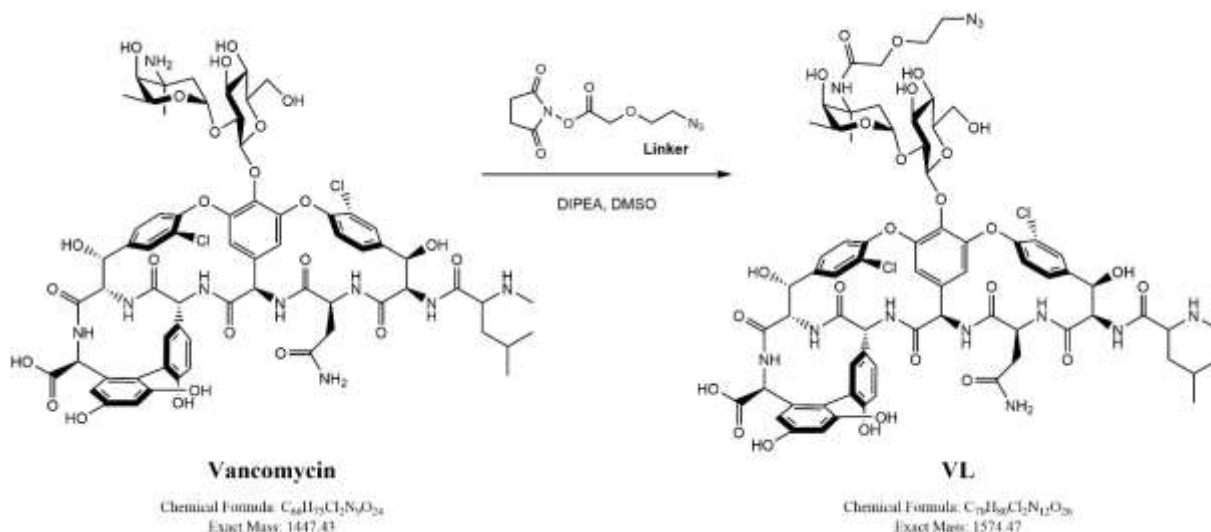


原理圖 2：L-3 反應之機構

其中 EDC.HCl 的 N=C=N 官能基能夠活化羧基，促使 NHS 接在 L-2 的羧基碳上。由於接在產物上的 NHS 是一個很強的離去基，因此產物活性極大，反應完必須立刻進行管柱層析，並且要在 30 分鐘以內結束純化，產物的 1 號碳才不至於被 silica gel 攻擊而斷鍵。管柱層析完要將產物以高真空去除溶劑後，保存於 -20°C 的環境下。

(二) 合成複合分子 VLB

1. 合成 VL：Vancomycin + Linker 之 NHS 端



Scheme 5：VL 反應式

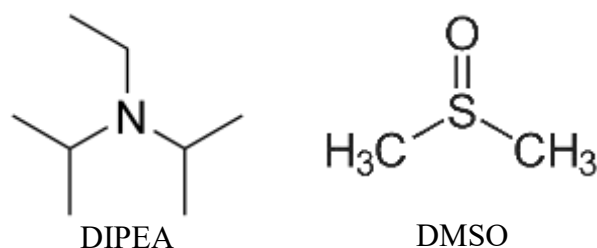


圖 4：DIPEA 和 DMSO 的化學結構
DIPEA：N, N-二異丙基乙基胺；DMSO：二甲基亞砜

合成 **VL** 所需的藥品包括用 DMSO 為溶劑所配出的 0.2 M 之萬古黴素 (Vancomycin)、10 mM 的 **Linker**、DIPEA 以及 DMSO，參考劑量如下：

表 (五)：合成 **VL** 各反應物之劑量

反應物	Vancomycin	Linker	DIPEA	DMSO	total
濃度	0.2 M (DMSO)	10 mM (DMSO)			
劑量	25 μ L	125 μ L	5 μ L	345 μ L	500 μ L
莫耳數	10 μ mol	2.5 μ mol	57.5 μ mol		

※原理

DIPEA 在有機化學中常做為鹼，在此用以活化萬古黴素的一級胺，讓 **Linker** 更容易在該處接上。而 DMSO 為一種極性溶劑，可與許多有機溶劑及水互溶，在此用以溶 **Linker** 和萬古黴素，以利反應進行。反應時間為 24 小時，反應溫度為室溫。因為 **Linker** 除了會接在萬古黴素的一級胺上，亦有可能會接在其二級胺上，所以需要使用 HPLC 分離過量的萬古黴素、需收集的 **VL** 和其他雜質。為了得到更純的產物，第一次分離完後尚須將收集到的產物凍乾，並再次以 HPLC 分離。

下表 (六)、(七) 和 (八) 分別為第一次、第二次以及優化後的 HPLC 分離產物條件。優化後的 HPLC 分離產物條件中，我們將甲酸 (FA) 換成三氟乙酸 (TFA)，以增加產物的離子性。

表 (六)：VL 第一次 HPLC 分離條件

dH₂O：去離子水；ACN：乙腈 (Acetonitrile)；FA：甲酸 (Formic acid)

時間 (分)	0	2	5	17	20
dH ₂ O + 0.1% FA (%)	100	100	80	72	0
ACN + 0.1% FA (%)	0	0	20	28	100

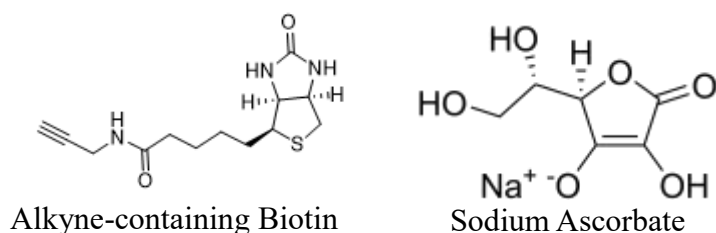
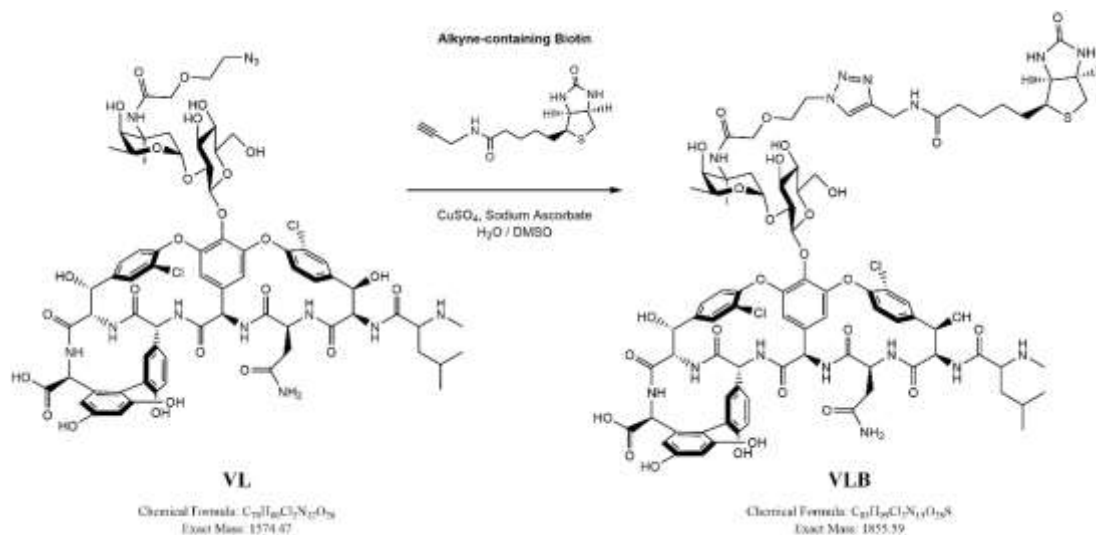
表 (七)：VL 第二次 HPLC 分離條件

時間 (分)	0	5	25	30
dH ₂ O + 0.1% FA (%)	100	100	0	0
ACN + 0.1% FA (%)	0	0	100	100

表（八）：**VL** 優化後的 HPLC 分離條件
TFA：三氟乙酸（Trifluoroacetic acid）

時間（分）	0	5	10	20	25
dH ₂ O + 0.05% TFA（%）	95	80	78	74	0
ACN + 0.05% TFA（%）	5	20	22	26	100

2. 合成 **VLB**：Biotin + **VL** 之 N₃端



Alkyne-containing Biotin：加上炔基後的生物素；Sodium Ascorbate：L-抗壞血酸鈉，維生素 C

合成 **VLB** 所需的藥品包括用 DMSO 為溶劑所配出皆為 2 mM 的 Alkyne-containing Biotin 和 **VL**，以及用水為溶劑所配出皆為 0.2 M 的硫酸銅（CuSO₄）和 L-抗壞血酸鈉（Vitamin C），參考劑量如下：

表（九）：合成 **VLB** 各反應物之劑量

反應物	Alkyne-containing Biotin	VL	CuSO ₄	Vitamin C
濃度	2 mM (DMSO)	2 mM (DMSO)	0.2 M (H ₂ O)	0.2 M (H ₂ O)
劑量	84 μL	80 μL	8 μL	8 μL
莫耳數	0.168 μmol	0.16 μmol	1.6 μmol	1.6 μmol

※原理

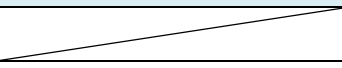
VLB 反應為點擊化學反應 (click reaction)，以含炔基生物素之末端炔基與 **VL** 上之 N_3 進行反應。本反應中須以亞銅離子 (Cu^+) 作為催化劑，因此以 L-抗壞血酸鈉作為還原劑，使 $CuSO_4$ 中之 Cu^{2+} 還原為 Cu^+ 。

(三) Streptavidin-FITC recruitment assay：確認複合分子 **VLB** 能辨識細菌

1. 合成 streptavidin-FITC

合成 streptavidin-FITC 所需的藥品包括 FITC (Fluorescein isothiocyanate，螢光異硫氰酸鹽)，其為一種綠色螢光鹽類。還包括鏈親合素 (Streptavidin) 以及用水為溶劑所配出的 0.1 M 碳酸鈉 (Na_2CO_3)，參考劑量如下：

表 (十)：Streptavidin 接上 FITC 反應各反應物之劑量

反應物	FITC	streptavidin	Na_2CO_3
濃度		16.7 mg/ μ L	0.1 M (H_2O)
劑量		6 μ L	50 μ L

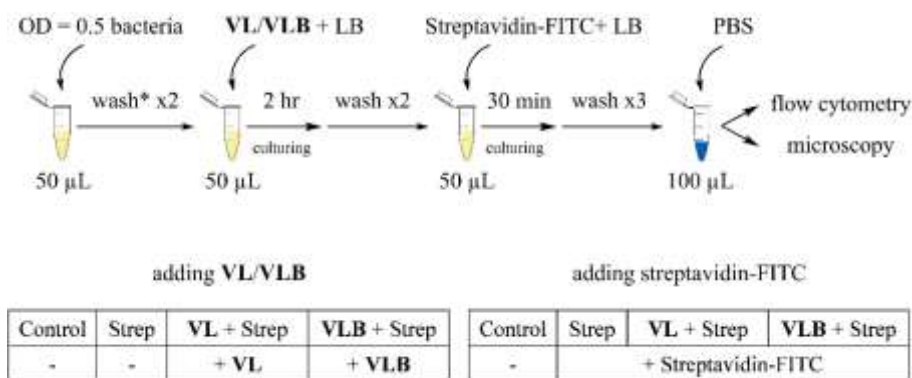
- (1) 在微量離心管 (eppendorf) 中加入各反應物 (劑量如上表)，反應時間為 4 小時
- (2) 將上述步驟中反應完之溶液放入 G-10 column，利用膠體過濾法純化出有成功接上 FITC 之 streptavidin
- (3) 將上一步驟中收集到的溶液放入蛋白質濃縮管 (protein concentrator)，並反覆利用冷凍離心機濃縮接上 FITC 之 streptavidin
- (4) 檢測 streptavidin-FITC 的吸光度以定量產物

2. 以 UV 吸收光譜分析儀定量 **VLB**

- (1) 將 Vancomycin 序列稀釋做出檢量線及其方程式
- (2) 稀釋 **VLB**，以波長 280 nm 測出吸光度後將數值帶入檢量線之方程式得出濃度

3. 培養金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、枯草桿菌以及大腸桿菌，並測其 OD 值 (Optical density，細菌細胞密度) 以定量

4. Streptavidin-FITC recruitment assay



步驟圖 1：Streptavidin-FITC recruitment assay procedure

*wash: centrifugation → remove supernatant → add PBS → centrifugation

OD：optical density；PBS：phosphate-buffered saline；LB：Luria-Bertani medium

依照上步驟圖 1 進行實驗，各細菌、VL、VLB 以及 streptavidin-FITC 之參考劑量如下表（十一）及表（十二）：

表（十一）：細菌、VLB、streptavidin-FITC 之劑量

細菌	SA	E. coli	SE	BS
原 OD 值	8.7	5.3	6.1	4.8
反應 OD 值	0.5			
劑量	2.87 μ L	4.72 μ L	4.10 μ L	5.21 μ L

其中金黃色葡萄球菌我們選擇 SA113 之菌種，而大腸桿菌則是 CFT073。

表（十二）：VL、VLB、streptavidin-FITC 之劑量

反應物	VL	VLB	Streptavidin-FITC
原濃度	8.68 μ M	8.68 μ M (DMSO/H ₂ O)	12.87 μ M
反應濃度	0.5 μ M	0.5 μ M	0.5 μ M
劑量	3 μ L	3 μ L	2 μ L

下表（十三）為本實驗之各組預期結果：

表（十三）：Streptavidin-FITC recruitment assay 各組別以及預期結果

—：代表細菌表面不會帶螢光；+：代表細菌表面會帶螢光

	Negative Control	Strep	VL + Strep	VLB + Strep
SA	—	—	—	+
E. coli	—	—	—	—
SE	—	—	—	+
BS	—	—	—	+

其中 Negative Control 為不加任何試劑的細菌，Strep 為只加 streptavidin-FITC 的細菌，VL + Strep 為只加 VL 和 streptavidin-FITC 的細菌，最後 VLB + Strep 為加 VLB 和

streptavidin-FITC 的細菌。前三組是本實驗之對照組，預期只有 **VLB** + Strep 的陽性菌組別（金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、枯草桿菌均為陽性菌）才會觀察到顯著螢光。

5. 以流式細胞儀分析細菌表面之螢光含量

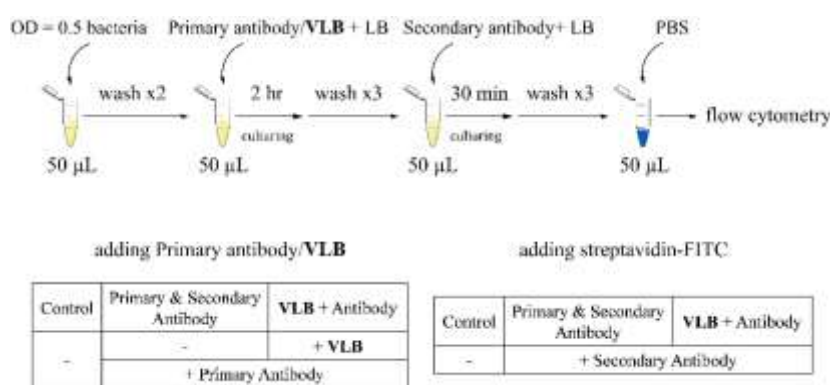
※原理

鏈親合素與 **VLB** 一端之生物素的結合是已知自然界中最強的非共價相互作用之一，而 **VLB** 之萬古黴素端會辨識並結合細菌，因此以流式細胞儀分析時，若細菌帶有極高之螢光值，可說明 **VLB** 分子的辨識能力。

（四）Antibody recruitment assay：分析複合分子 **VLB** 的徵召能力

1. 培養金黃色葡萄球菌及大腸桿菌，並測其 OD 值

2. Antibody recruitment assay



步驟圖 2：Antibody recruitment assay procedure

依照上步驟圖 2 進行實驗，各細菌、**VLB**、Primary Antibody 以及 Secondary Antibody 之參考劑量如下表（十四）：

表（十四）：各細菌、**VLB**、Primary Antibody、Secondary Antibody 之劑量

反應物	SA	E. coli	VLB	Primary Antibody	Secondary Antibody
原濃度	OD = 7.6	OD = 5.8	8.68 μ M (DMSO/H ₂ O)	3.3 μ M	4 μ M
反應濃度	OD = 0.5	OD = 0.5	0.5 μ M	0.05 μ M	0.05 μ M
劑量	3.3 μ L	4.3 μ L	3 μ L	0.375 / 0.75 μ L	0.625 / 1.25 μ L

其中 Primary Antibody 為與 **VLB** 生物素端結合之抗體，而 Secondary Antibody 能與 Primary Antibody 結合且帶有螢光基團。實驗中，我們以兩種不同當量的抗體進行反應以找出較佳之反應條件。

下表（十五）為此實驗之各組預期結果：

表（十五）：Antibody recruitment assay 各組別以及預期結果
 —：代表細菌表面不會帶螢光；+：代表細菌表面會帶螢光

	Negative Control	Primary & Secondary Antibody 0.05 eq.	VLB + Antibody 0.1 eq.	VLB + Antibody 0.05 eq.
SA	—	—	+	+
E. coli	—	—	—	—

其中 Negative Control 為不加任何試劑的細菌，Primary & Secondary Antibody 為只加兩種抗體的細菌，VLB + Antibody 則是有加 VLB 和兩種抗體的細菌。前者是對照組，預期只有 VLB + Antibody 的陽性菌組別（金黃色葡萄球菌）才會觀察到顯著螢光。

3. 以流式細胞儀分析細菌表面之螢光含量

※原理

Primary Antibody 為宿主是小鼠（mouse）的抗生物素抗體，因此能與 VLB 之生物素結合。而帶有紅色螢光基團 Cy-5.5（Cyanine）的 Secondary Antibody 宿主是山羊（goat）且其能抗小鼠，因此能與 Primary Antibody 結合。

利用流式細胞儀來分析各細菌螢光數值是否顯著，如果金黃色葡萄球菌螢光數值顯著，代表 VLB 有同時辨識細菌且與抗體結合，即 VLB 成功達成結合兩者的目的。利用具螢光基團的抗體和細菌，間接分析 VLB 結合細菌以及徵召抗體的能力。

（五）Macrophage assay：測試複合分子 VLB 的殺菌效果

確認 VLB 有能力同時結合細菌及抗體後，我們便會再次利用金黃色葡萄球菌，測試 VLB 的存在對巨噬細胞殺菌效果的影響。

參、研究結果與討論

一、L-1 反應：2-（2-氯乙氧基）乙醇反應成 L-1

※結果

1. 產物 L-1 呈透明油狀，總重約 10.8993 g，產率約為 87.5%



圖 6：L-1，呈透明油狀

2. 以 TLC 片確認水層已無殘留我們所需要的產物（顯色劑：茴香醛）

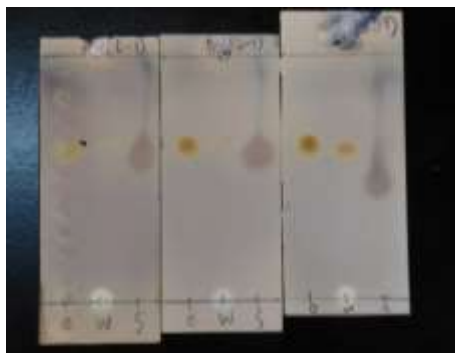


圖 7：L-1 反應萃取之追蹤 TLC 片

O：有機層（DCM）；W：水層；S：起始物（ $C_4H_9ClO_2$ ）

3. L-1 的鑑定

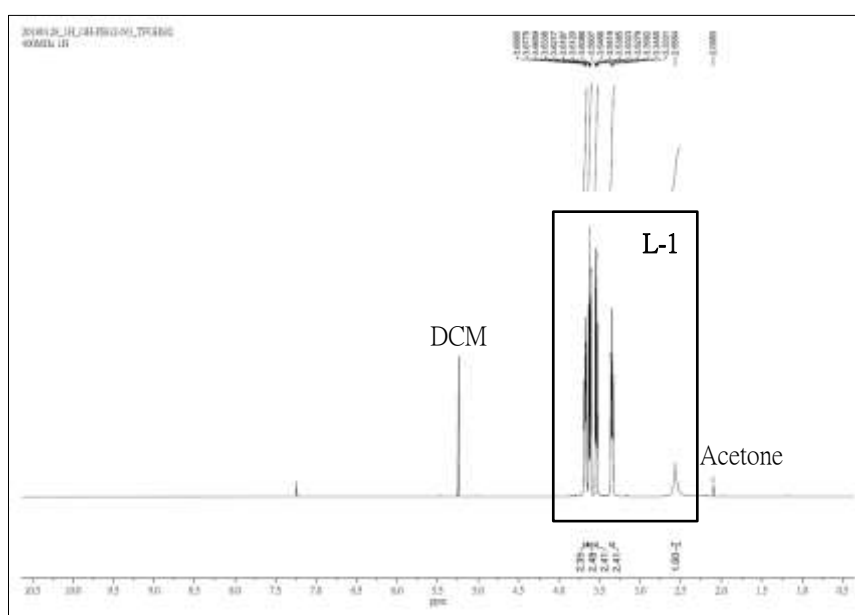


圖 8：首次進行 L-1 反應產物的 NMR 光譜圖

DCM：萃取液二氯甲烷；Acetone：丙酮

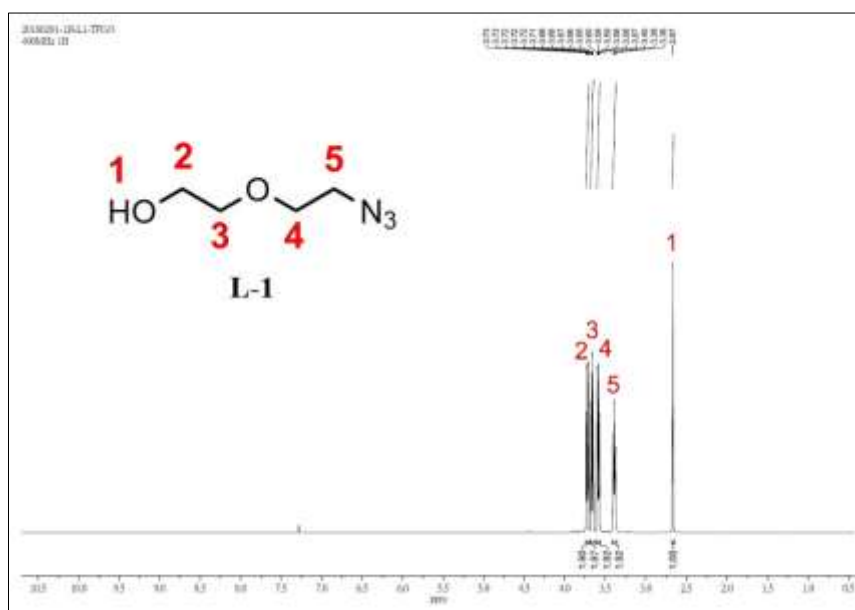


圖 9：L-1 NMR 光譜圖

※討論

1. 本步驟產物 **L-1** 呈透明油狀，總重約 10.8993 g。產率高達 87.5%，計算如下：

$$\text{產率} = \frac{\text{實際產量}}{\text{理論產量}} \times 100\% = \frac{0.0832}{0.0951} \times 100\% \approx 87.5\%$$

2. 上圖 7 的 TLC 片以茴香醛為顯色劑，其中由右到左可看出水層中的殘餘產物漸漸減少，直到最左側的 TLC 片中，水層已無 **L-1**，即可利用 Rota 抽去萃取液二氯甲烷。
3. 圖 8 為首次進行 **L-1** 反應產物的 NMR 光譜圖，其中中間框起處為 **L-1** 的訊號，而左右兩個訊號分別為殘留的萃取液二氯甲烷，以及用來清洗器具的丙酮。而圖 9 為優化反應條件後第二次進行 **L-1** 反應的產物光譜圖，圖中各峰值對應到 **L-1** 的各個氫，並無其他雜質，可見我們合成的 **L-1** 純度相當高。

二、**L-2** 反應：**L-1** 氧化為 **L-2**

※結果

1. 產物 **L-2** 呈黃色油狀，總重約 1.4242 g，產率約為 71.5%



圖 10：**L-2**，呈黃色油狀

2. 以 TLC 片確認水層已無殘留我們所需要的產物（顯色劑：茴香醛、磷鉬酸）



圖 11：**L-2** 反應萃取之追蹤 TLC 片

O：有機層（EA）；W：水層；S：起始物（ $C_4H_9N_3O_2$ ）

3. 初產物的鑑定

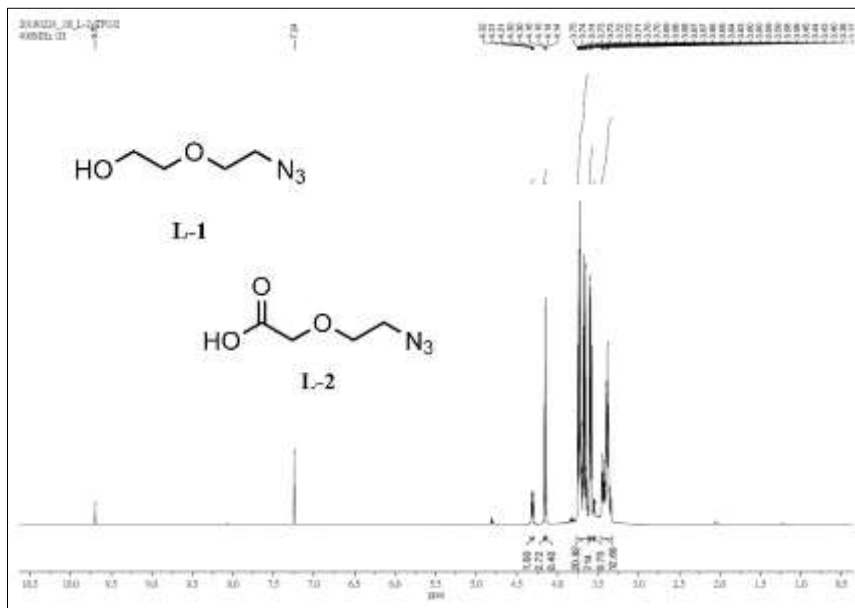


圖 12：L-2 反應初產物的 NMR 光譜圖

4. 以 TLC 片追蹤管柱層析過程（顯色劑：鉬酸銨銻溶液）

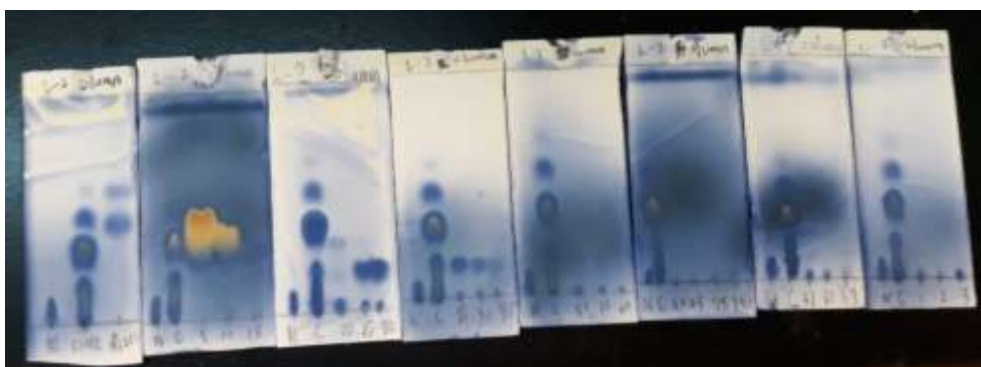


圖 13：L-2 管柱層析過程追蹤

N：產物 ($C_4H_7N_3O_3$) 純品；C：未管柱層析的初產物；數字：第幾管試管

5. L-2 的鑑定

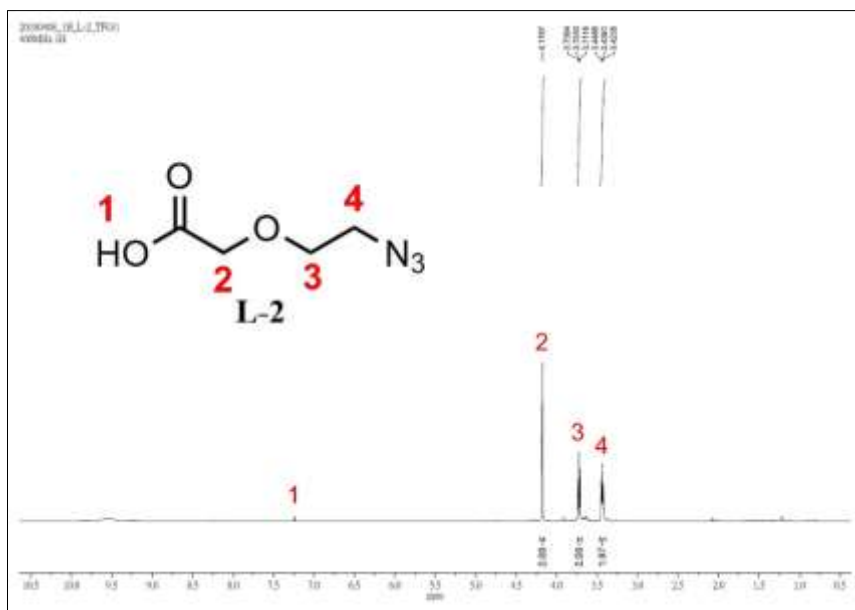


圖 14：L-2 NMR 光譜圖

※討論

1. 本步驟產物 **L-2** 呈黃色油狀，總重約 1.4242 g。產率達 71.5%，計算如下：

$$\text{產率} = \frac{\text{實際產量}}{\text{理論產量}} \times 100\% = \frac{9.819}{13.73} \times 100\% \approx 71.5\%$$

2. 上圖 11 的 TLC 片以茴香醛及磷鉬酸（Phosphomolybdic acid, PMA）為顯色劑。圖中可見右邊的 TLC 片中，水層仍有殘留 **L-2**，而左邊則無，即可利用 Rota 抽去萃取液乙酸乙酯。
3. 圖 12 為 **L-2** 初產物的 NMR 光譜圖，圖中的峰值有我們所要的 **L-2**，但是也有不少此反應的起始物（**L-1**），因為兩者皆為有機物質，所以無法以萃取的方式將其分離，因此必須進行管柱層析。
4. 圖 13 為管柱層析過程中，為了得知哪些試管中有我們所要的 **L-2** 而點的 TLC 片，顯色劑為鉬酸銨鉍溶液（Ceric Ammonium Molybdate, CAM）。其中從第 62 管之後皆只剩下 **L-2** 的點，因此將其收集利用 Rota 抽乾溶液，即得純的 **L-2**。
5. 圖 14 即為管柱層析後的 **L-2** NMR 光譜圖，可以看出峰值比起圖 12 單純許多，且每個峰值都可以對應到 **L-2** 的各個氫，表示 **L-2** 相當純。
6. 我們曾試著將作為氧化劑的 CrO_3 由 1 當量改為 1.5 當量進行反應，目的是增加瓊斯試劑的氧化力，以提高 **L-2** 的產率，但連續兩次實驗結果都未如預期。

三、**L-3** 反應：**L-2** 接上 NHS ester，反應成 **Linker**

※結果

1. 產物 **Linker** 為白色固體，總重約 90 mg，產率約為 43%



圖 15：**Linker**，為白色固體

2. 以 TLC 片確認反應已結束（顯色劑：磷鉬酸）



圖 16：L-3 確認反應結束之 TLC 片
C：起始物；P：產物

3. **Linker** 之鑑定

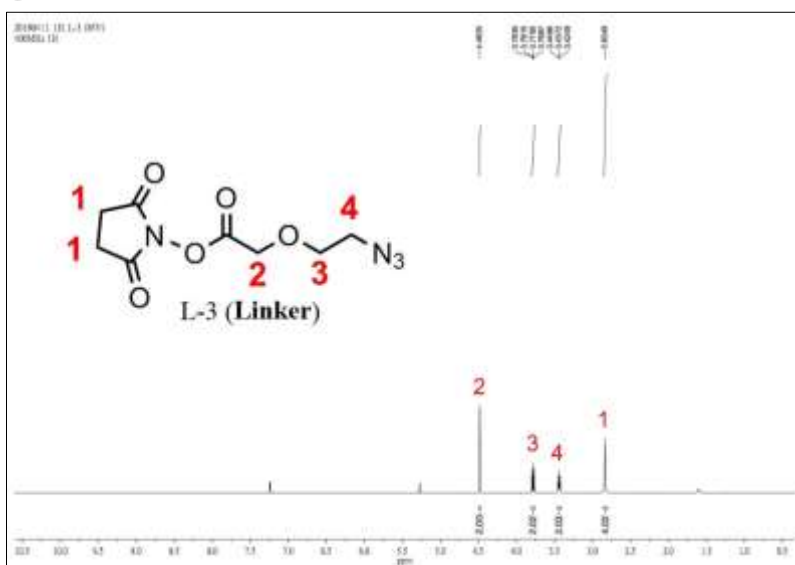


圖 17：Linker NMR 光譜圖

※討論

1. 本步驟產物 **Linker** 為白色固體，總重約 90 mg，產率約為 43%。
2. 圖 16 是為了追蹤 L-3 反應而點的 TLC 片，圖中可以看出產物仍殘留不少 L-2，因此我們必須透過管柱層析來進行分離。
3. 圖 17 為 **Linker** 之 NMR 光譜圖，由圖的各個峰對應到 **Linker** 的氫，顯示 **Linker** 十分純。

四、合成 VL：Vancomycin 接上 Linker

※結果

1. 產物 VL 凍乾後為白色固體，總重約 3.6 mg



圖 17：凍乾後的 VL，為白色固體

2. 以 HPLC 分離時的 UV 吸收峰值

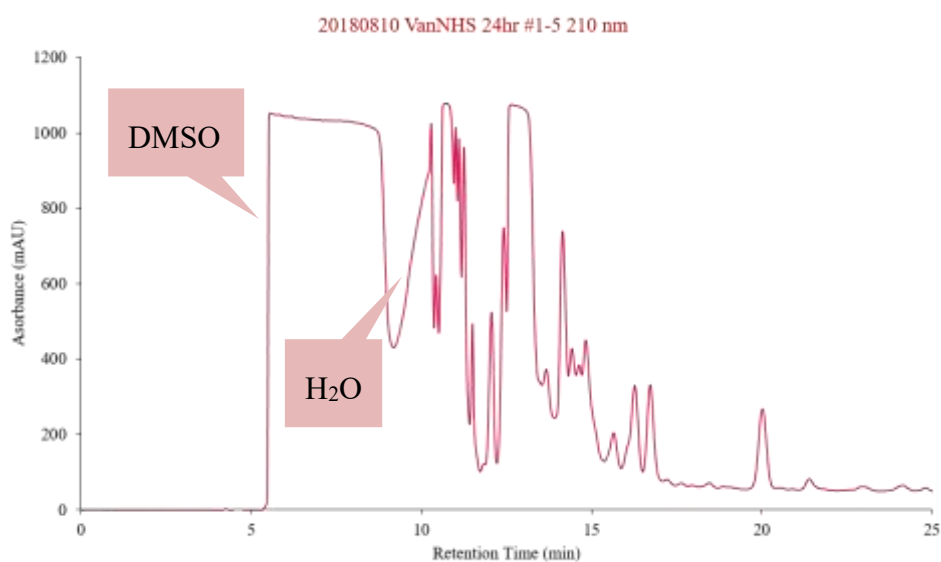


圖 18：以 HPLC 分離時的 UV 吸收峰值（波長：210 nm）

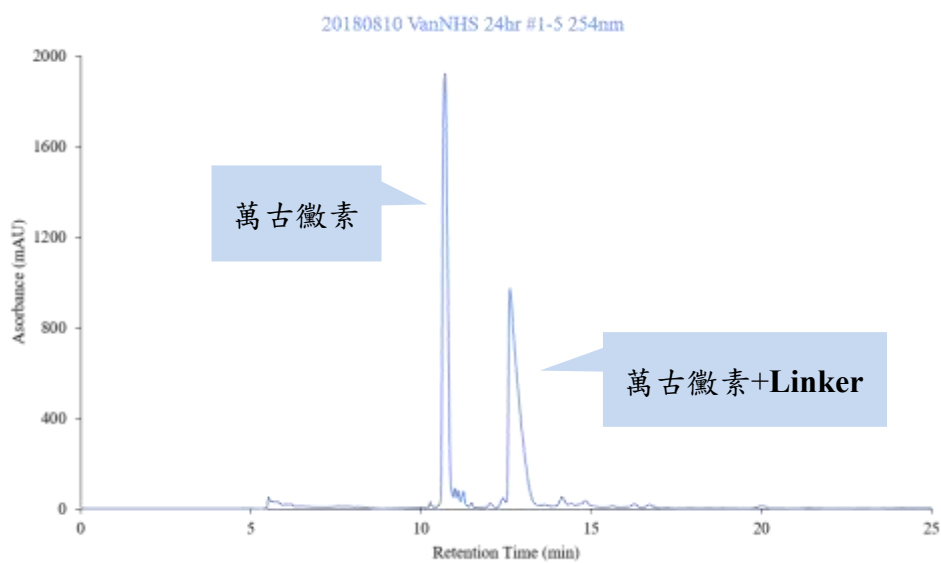


圖 19：以 HPLC 分離時的 UV 吸收峰值（波長：254 nm）

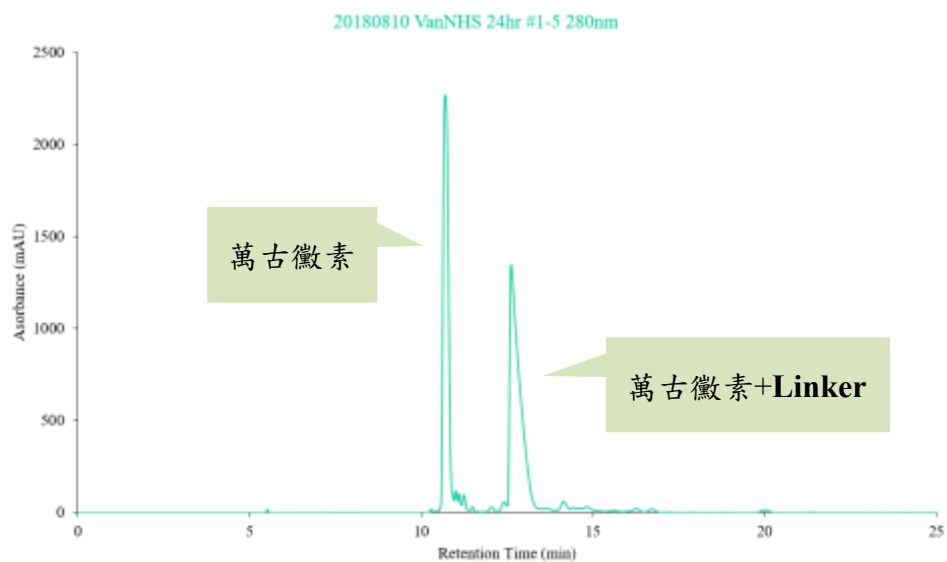


圖 20：以 HPLC 分離時的 UV 吸收峰值（波長：280 nm）

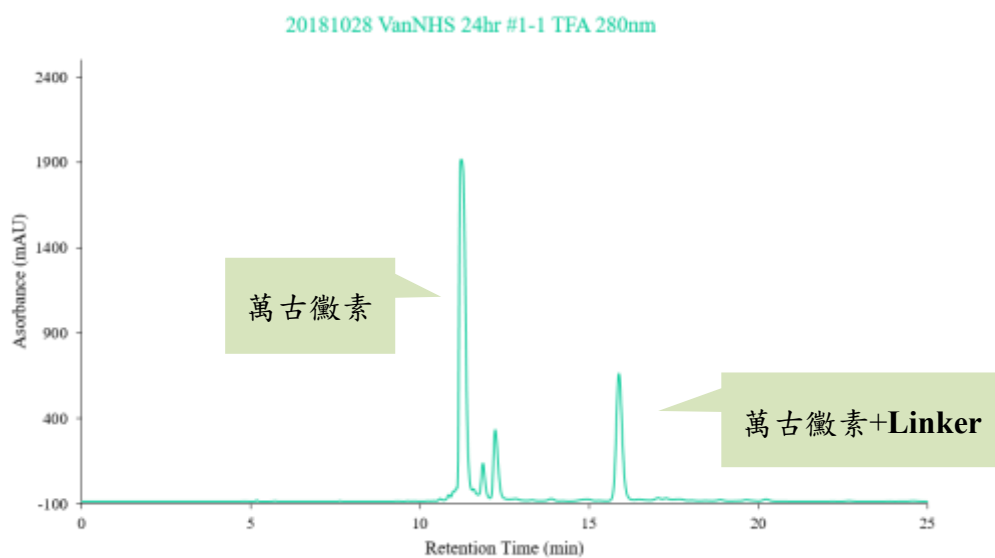


圖 21：以 HPLC 分離時的 UV 吸收峰值（波長：280 nm）優化後

3. VL 的鑑定

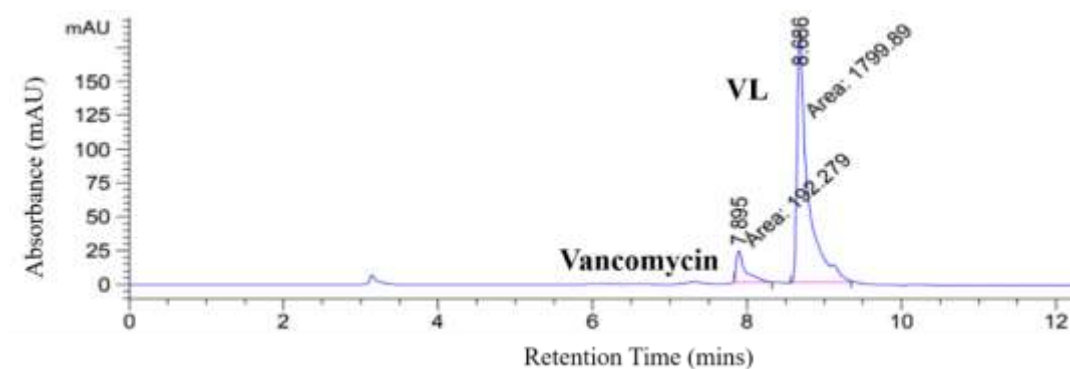


圖 22：VL 兩次 HPLC 分離後之純度鑑定（Purity Check）

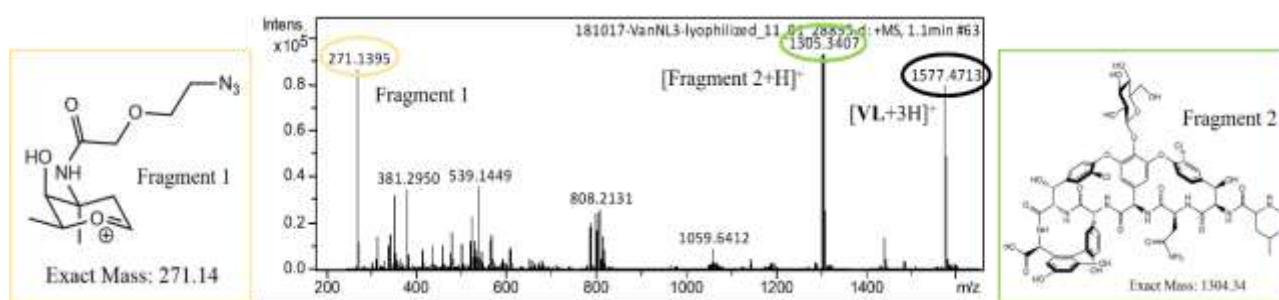


圖 23：VL 的質譜圖（兩次 HPLC 分離後）

※討論

1. 本步驟產物 VL 凍乾後為白色固體，總重約 2.5 mg。
2. 圖 18 為波長 210 奈米的 UV 吸收峰值，此波長為大多有機物質都能吸收的波段，以此波段作為參考值。圖中約五至十分鐘的梯形為 DMSO 的波形，而十分鐘左右的尖三角形則為水的波形。
3. 圖 19、20 為波長 254 以及 280 奈米的 UV 吸收峰值。254 奈米以及 280 奈米是苯環會吸收的波段，而萬古黴素結構中有多個苯環，故選擇此波長做觀察而得的準確度較高。圖 19、20 的第一個峰值，也就是最高的峰值，是未反應的、過量的萬古黴素，此後約兩分鐘收到的第二個峰值，才是我們想要的 VL 的峰值。
4. 由於兩峰的滯留時間相隔僅兩分鐘，因此必須進行兩次 HPLC 分離。另外，我們優化了 HPLC 分離條件，原本以甲酸（FA），後改以三氟乙酸（TFA）進行分離，由於三氟乙酸的酸性較甲酸高許多，因此可以增加管柱內各分子的離子性，使萬古黴素和 VL 的滯留時間（Retention Time）差，由原本圖 20 的兩分鐘，拉長至如圖 21 的五分鐘。
5. 將進行完首次 HPLC 分離、收到試管內的 VL 利用凍乾機凍乾後，再將凍乾完的白色固體回溶於 DMSO 中，進行第二次 HPLC 分離，如此便能得到極高純度的 VL。
6. 由於每次只能下極少量的反應物（受限於萬古黴素及我們所合成的 Linker 的量），而利用 HPLC 分離一次也只能進樣 100 μ L，故要累積到一定量才會達到可以用光譜儀測試的最低容量。因此在此合成 VL 階段需要投入許多時間。
7. 圖 22 為產物進行完兩次 HPLC 分離後的純度鑑定（Purity Check）。計算圖中面積可得出 VL 的純度已高達 90% 以上。
8. 圖 23 為 VL 的質譜鑑定。其中最右邊分子量 1577 的峰值是我們的產物，而分子量 271、1305 是產物結構斷裂後的兩個碎片，此質譜鑑定結果證明我們成功地合成出了 VL。

五、合成 VLB：VL 之 N₃端接上 Biotin

※結果

1. 由 VLB 初產物 UV 吸收峰值及質譜對照，確認有合成出 VLB

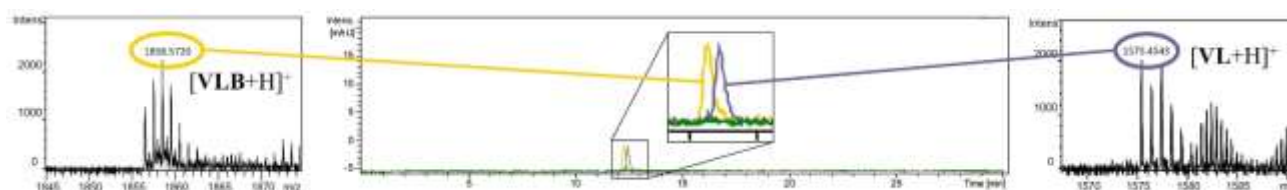


圖 24：VLB 初產物之 UV 吸收峰值與質譜對照圖

※討論

1. 由圖 24 可確認 VL 有和 Biotin 連結，產生 VLB。但因 VL（反應物）以及接上 Biotin 的 VLB（產物）兩者 UV 吸收的滯留時間十分相近，所以必須嘗試多種不同的 HPLC 分離條件，以純化出 VLB。

六、Streptavidin-FITC recruitment assay

※結果

1. 流式細胞儀鑑定結果

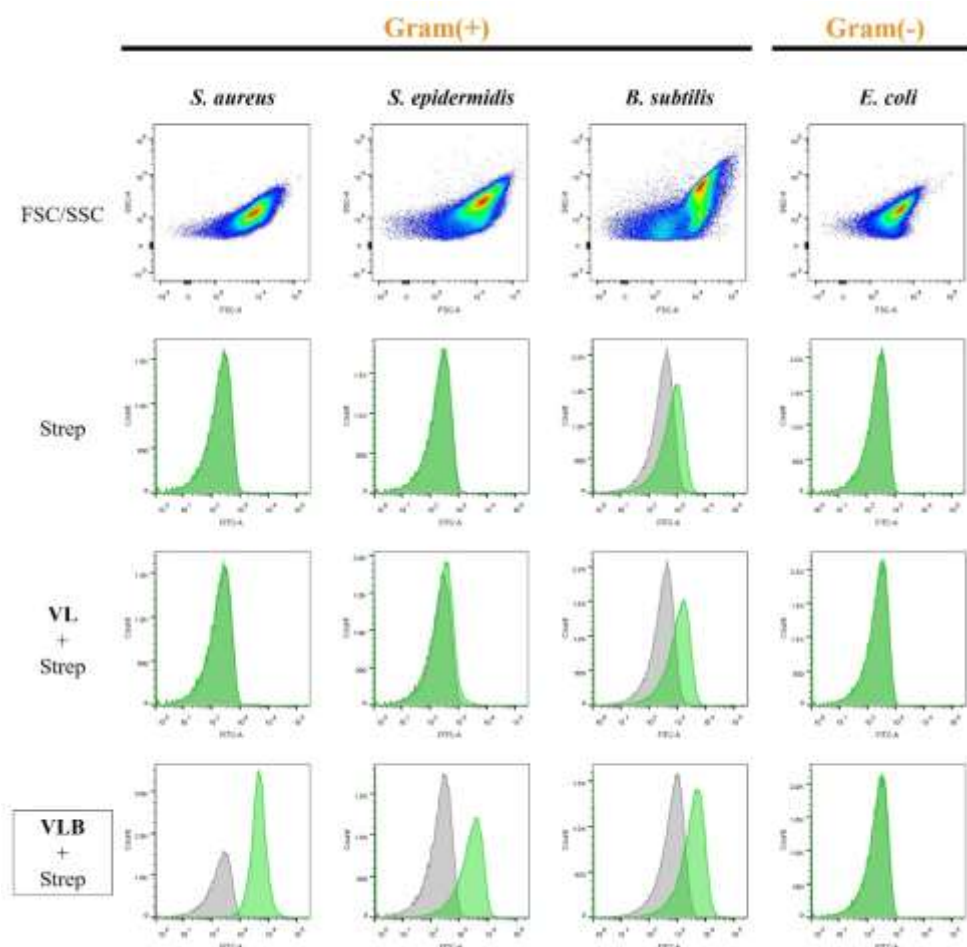


圖 25：以流式細胞儀分析細菌表面螢光值之疊圖結果

FSC/SSC：forward scatter/side scatter

Strep：Streptavidin-FITC；VL + Strep：VL + Streptavidin-FITC；VLB + Strep：VLB + Streptavidin-FITC

2. 螢光顯微鏡鑑定結果

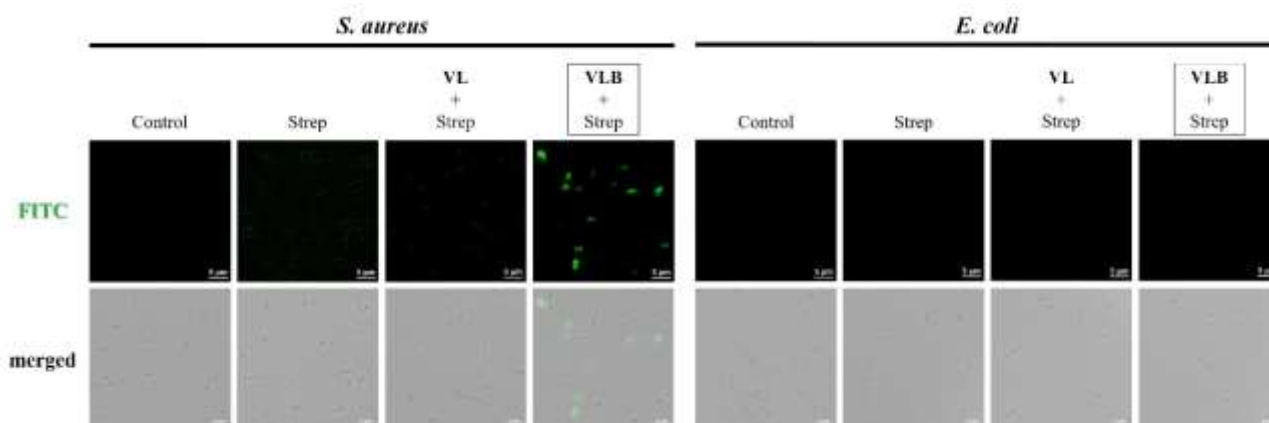


圖 26：以顯微鏡觀察細菌之結果

※討論

1. 圖 25 為利用流式細胞儀分析後，將細菌數量對 FITC 螢光值所作之圖，並利用未加任何試劑之結果圖（灰色部分）與加試劑疊圖之結果圖（綠色部分）疊圖。第一欄至第四欄依序為金黃色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、枯草桿菌和大腸桿菌，以流式細胞儀分析之結果。
2. 大腸桿菌為革蘭氏陰性菌，因此加入試劑後之螢光值和未加任何試劑之螢光值吻合。
3. 金黃色葡萄球菌之 Strep 和 VL + Strep 兩組，其綠色部分和灰色部分吻合，顯示只加入 streptavidin-FITC 和只加入 VL 及 streptavidin-FITC 不會造成其螢光數值增加。而 VLB + Strep 組中則可看出螢光值顯著增加，代表 VLB 能辨識金黃色葡萄球菌。
4. 表皮葡萄球菌之結果與金黃色葡萄球菌相仿，但在 VLB + Strep 組螢光值增加程度不如金黃色葡萄球菌顯著。
5. 枯草桿菌一欄中，Strep 和 VL + Strep 兩組也有增加螢光數值，推測原因為其細胞壁之結構和葡萄球菌不同，其細胞壁會和鏈親合素有 non-specific binding。但在 VLB + Strep 組中仍可看出螢光增加之幅度高於前二組。
6. 圖 26 為利用顯微鏡觀察細菌之照相結果。左標題 FITC 表示將綠色螢光激發後所拍的圖，而 merged 則表示將 FITC 圖與一般光照下所拍之圖疊合。
7. 由圖 26，金黃色葡萄球菌組中，只有 VLB + Strep 的會發出螢光。而大腸桿菌則是全部都不發光，和以流式細胞儀分析之結果相同。

七、Antibody recruitment assay

※結果

1. 流式細胞儀鑑定結果

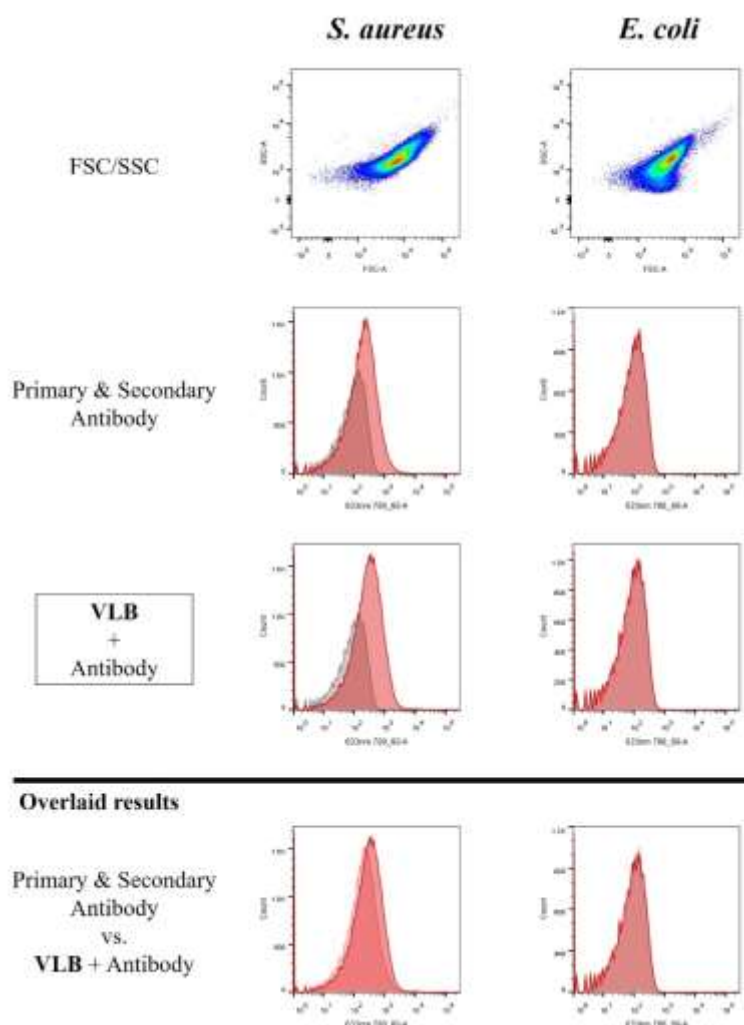


圖 27：以流式細胞儀分析細菌表面螢光值之疊圖結果
Primary & Secondary Antibody：只加兩種抗體

※討論

1. 圖 27 為利用流式細胞儀分析後，將細菌數量對 Cy-5.5 螢光值所作之圖。第一欄為金黃色葡萄球菌，第二欄為大腸桿菌。第二、第三列為利用未加任何試劑之結果圖（灰色部分）與加試劑疊圖之結果圖（紅色部分）疊圖。
2. 圖 27 中之最末列為將 Primary & Secondary Antibody 組和 VLB + Antibody 組的 Cy-5.5 螢光值進行疊圖。這是因為金黃色葡萄球菌的 Primary & Secondary Antibody 組亦有螢光值，所以我們將兩組疊圖以方便分析結果。比較之下，金黃色葡萄球菌兩組的 Cy-5.5 螢光值仍然有所差異，而大腸桿菌則無。
3. 大腸桿菌為革蘭氏陰性菌，因此加入試劑後之螢光值和未加任何試劑之螢光值吻合。
4. 我們在文獻⁵中找到金黃色葡萄球菌的 Primary & Secondary Antibody 組也有螢光值的原

因，其為：金黃色葡萄球菌表面之 Protein A 會和 Secondary Antibody 結合，因此在未加入 **VLB** 的 Primary & Secondary Antibody 組中，由於金黃色葡萄球菌與 Secondary Antibody 結合，導致該組也顯示有螢光。

八、實驗過程之瓶頸與困難

（一）純化過程

反應產生的副產物必須與主產物分離，而純化過程如管柱層析以及 HPLC 都相當繁瑣，須一定時間方能獲得目標分子。

（二）生物實驗

直接利用 **VLB** 分子以及抗體來徵召巨噬細胞，在實驗上除了無法確定 **VLB** 分子是否可以結合細菌以及抗體外，若沒有螢光基團的輔助，就算活菌確實有減少，也無法斷定是由於 **VLB** 分子所造成的。

因此我們必須先將 **VLB** 分子、細菌以及具有螢光基團的抗體混合，再透過流式細胞儀檢視發光情況，會發光之細菌就表示 **VLB** 分子成功地結合了細菌與抗體，利用此方法來確認 **VLB** 分子確實能有效結合兩者。之後再以巨噬細胞進行實驗，才有足夠的根據證明 **VLB** 分子加速殺菌的效果。

肆、結論與應用

一、結論

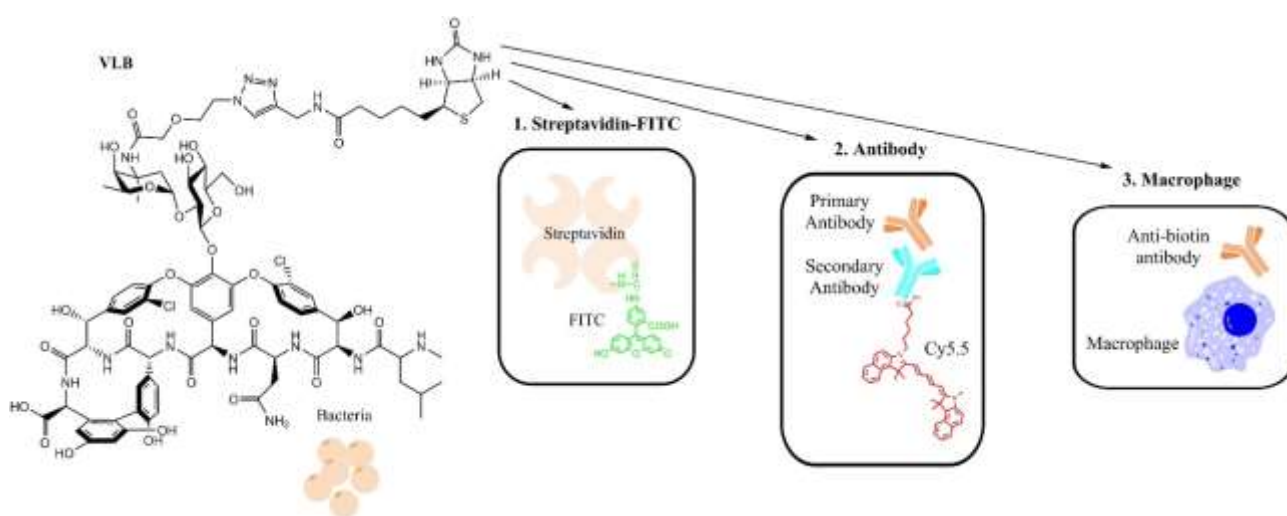
- （一）本研究成功地合成出 **Linker**，並以 NMR 光譜進行鑑定。**L-1** 產率高達 87%，**L-2** 產率達 71.5%，**L-3 (Linker)** 產率則為 43%。合成過程中，我們增加了 **L-1** 反應中疊氮化鈉的當量數以及反應時間，且分別找到了 **L-2** 和 **L-3** 管柱層析的最佳沖提液條件。我們持續優化反應條件以及不斷進行純化，確保 **Linker** 的純度夠高，以利接下來反應的進行。
- （二）本研究成功地合成出複合分子 **VLB**，並以 HPLC 的純度測試以及質譜進行鑑定。**VL** 純化過程耗時，需反覆以 HPLC 分離並凍乾；**VLB** 則是出現反應物與產物較難分離的狀況。
- （三）利用接上 FITC 之鏈親和素（Streptavidin-FITC），成功證明複合分子 **VLB** 能結合多種革蘭氏陽性菌。
- （四）利用抗體證明複合分子 **VLB** 的生物素端可以被抗體辨識，也就是 **VLB** 能同時結合細菌及抗體。
- （五）本研究創新地合成了抗體徵召分子 **VLB**，其為其他研究不曾有過的分子。
- （六）與其他利用萬古黴素為材料的研究相比，其他論文²是利用萬古黴素辨識、標記細菌

或作為其他用途。而我們的研究價值在於，除了標記細菌外，更利用生物素和抗體進一步殺菌，且也用了螢光基團方便觀察，在診斷和治療病情上都有所貢獻。

（七）我們利用 **Linker** 結合萬古黴素及生物素，使免疫細胞對細菌的辨識能力增加，因而更容易對抗細菌。這樣的觀念能被運用於改善抗藥細菌難以消滅的問題，在人類與病菌這場歷史拉鋸戰中，開拓了新的抗菌領域。

（八）我們在已發表的文獻⁶中，找到了連接單元的合成方法，也有研究指出連接單元可以與萬古黴素結合，但我們創新地將連接單元兩端分別連結萬古黴素及生物素作為抗體徵召分子，以提升免疫細胞對細菌的結合效率，是前所未有的研究。

二、進行中的研究



概念圖 5：複合分子 **VLB** 生物測試與應用

我們目前在進行的研究是改變條件以解決 Protein A 會和 Secondary Antibody 結合的問題，以及最後利用巨噬細胞殺菌的實驗。

三、應用

（一）本研究中以合成出的複合分子 VLB 增加免疫細胞消滅金黃色葡萄球菌，而金黃色葡萄球菌是世界衛生組織公布，迫切需要優先研發治療方法的致病菌之一。

（二）利用我們合成抗體徵召分子的方法，只要將萬古黴素改換成其他種抗生素，便可以有效地消滅各種不同的抗藥性細菌，若再進一步接上載體用以辨識癌細胞，更能加以消滅癌細胞。

（三）若能更深入地研究如何提升巨噬細胞的專一性，便能使其只對抗致病細菌，而留下對人體有益的菌種。最後，我們的研究成果可以有效地應用在臨床治療上，以解決無藥可醫治抗藥性細菌的困難。

伍、參考文獻

1. Feigman, M. J. S.; Pires, M. M. *ACS Infect. Dis.* **2018**, *4*, 664-672.
2. Wang, W.; Zhu, Y.; Chen, X. *Biochemistry* **2017**, *56*, 3889-3893.
3. Abellán-Flos, M.; Tanç, M.; Supuran, C. T.; Vincent, S. P. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7445-7451.
4. Jakobsche, C. E.; Parker, C. G.; Tao, R. N.; Kolesnikova, M. D.; Douglass, E. F., Jr.; Spiegel, D. A. *ACS. Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2404 – 2411.
5. Kobayashi, S. D.; DeLeo, F. R. *mBio.* **2013**, *4*, e00764-e007613.
6. McEnaney, P. J.; Parker, C. G.; Zhang, A. X.; Spiegel, D. A. *ACS. Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1139 – 1151.
7. Sinha, J.; Sahoo, R.; Kumar, A. *Macromolecules* **2009**, *42*, 2015 – 2022.

【評語】 030014

本工作出合成生物複合分子 VLB，內含萬古黴素－橋接劑－Biotin，同學之工作主要是發展其中的橋接方法，並證明能與革蘭氏陽性菌有辨認能力，為相當完整之工作。