

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNPH94-05

計畫名稱：探討線上濃縮 C18 管柱對 LC/MS 之蛋白質胺基酸定序
偵測方法之靈敏度的影響效應

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：方嘉德副教授

子計畫主持人：

已發表於：93 年中國化學會年會, 2004/11/19-21, 分析類第 90 號

中華民國 95 年 2 月 28 日

探討線上濃縮 C18 管柱對 LC/MS 之蛋白質胺基酸定序偵測方法之靈敏度的影響效應

The influence effect of on-line concentrated C18 column on the sensitivity of the protein sequence analysis of LC/ESI-MS

第一章 摘要

在本研究工作中探討了，如何藉由線上濃縮管柱的高濃縮比率處理方式，來提昇未配備有 nanospray 之 LC/ESI-MS 儀器的靈敏度。在實驗工作中，使用 BSA 作為標的蛋白質，而將含有 BSA 的電泳膠片斑點先行 in-gel 消化處理之後，再將消化後的胜肽產物，以線上方式全部濃縮在較大內徑的濃縮管柱，接著就可以進行 LC/ESI-MS 的蛋白質胺基酸定序偵測操作。在此同時，也可以藉由在前濃縮過程中，先行將電解質予以去除，以降低 ESI-MS 偵測操作時的背景雜訊。由研究結果觀察到，當使用廉價的線上濃縮管柱之後，對於未配備有 nanospray 之 LC/ESI-MS 儀器而言，不僅背景雜訊有明顯減少現象，同時在相同的 BSA 濃度值的條件下，瞬間總離子電流值也呈現出高倍率增加現象。而總體的改善結果，也已經可以讓未配備有 nanospray 之 LC/ESI-MS，能對蛋白質濃度範圍低至奈克等級的電泳膠片斑點，進行直接的偵測工作。

第二章 緒論

人類基因體計劃（**Human Genome Project**）因大規模、自動化基因定序技術的產生，而比原先預期的時間一再提前的完成，後基因體時代（**Post-Genome Era**）的大門也隨之開啓。在對 DNA 有了較完整的瞭解之後，接下來即是對生物體內各種組織或細胞中整體的蛋白質表現進行探討。一切的遺傳訊息皆隱藏在基因中。但是真正執行所有生理功能的卻是蛋白質。蛋白質體學——這由基因體學（**Genomics**）所延續而來的學問，也隨之發展起來。

蛋白質體學是一門研究蛋白質的科學。主要是在討論蛋白質的胺基酸排列順序，與蛋白質的立體結構；由於蛋白質的胺基酸排列是被基因所決定，目前科學家對蛋白質的瞭解尚未足夠，利用已知或是已有理論基礎的蛋白質結構資料，進一步去分析和推測未知的蛋白質結構，這就是蛋白質體學興起的主要原因。蛋白質體學的研究囊括了各種學科，例如：結構生物學（**Structure Biology**）、蛋白質表現（**Protein Expression**）、蛋白質交互作用（**Protein Interactions**）、高速蛋白質體定位法（**High-Throughput Proteomic Mapping**）、蛋白質修飾（**Post-translation Modification**）和膜蛋白質（**Membrane Proteins**）等的學科。日後即可藉由蛋白質體學的研究結果，試著推敲出標的蛋白質的作用方法及目的；也就是檢查某一生物體內的所

有蛋白質，進而拼湊出它在細胞中的代謝途徑與它在生物體中的主要功能；以及可利用此法對某些因蛋白質所引起的疾病進行檢測及預防[1-2]。

近年來由於分析蛋白質的方法愈來愈多，速度也越來越快，使得蛋白質體學研究的腳步也一日千里，其中的一樣分析工具是質譜儀（Mass Spectrometer）的使用。質譜儀可以快速的將由膠體電泳方法中分離得到的蛋白質，將其序列排列出來，並且與由生物資訊所整合而成的資料庫進行比對分析，以發現新的或突變的蛋白質，而利於對疾病診治或其它生物學的發展。

由於蛋白質是由二十種胺基酸分子以不同數目及排序組合而成，且每種胺基酸所攜帶的電荷不一，因而在特定酸鹼值時，任何兩種蛋白質分子幾乎沒有完全相同的帶電量與分子量。據此一特性，可以利用一維或二維膠體電泳法，將蛋白質混合物分離成單一特性的蛋白質，再將不同分子量及等電點不同的蛋白質經過染色之後，以密度儀器測定蛋白質的含量，將有義意的或全部的蛋白質點分別取出，進行去染，還原及烷基化後，以酵素將其酵解成小分子的胜肽片段，然後送質譜儀進行分析。

自二十世紀初發展出第一套質譜儀以來，剛開始大都在化學界應用，用以測定未知物之組成及結構，如元素之分析，化學結構之決定，分子量之測定或混合物中成份的分析等等，而成爲良好的分析利器。質譜儀是一

種以質荷比 (m/z) 來決定分子質量之技術，MS 的基本原理是將不同型態的樣品如氣、液或固相分析物，送進入儀器中，分析物在氣相離子源內以離子形式存在，再依不同的質荷比將分析物分離出，而被偵檢器偵測。從 1960 年代開始，就有利用 MS 對蛋白質進行分析[5,6]，因為 MS 具有高靈敏性，且可以提供更多的訊息，尤其是對蛋白質的後轉譯修飾如甲基化、磷酸化或醮基化等，都可以提供更明確的訊息。

LC/ESI-MS 是一種軟性離子分析技術，其優點是其所產生的離子是多價離子，可使得大分子量的分析物在適當的 m/z 值被偵測到，這種方法可以偵測 100000 左右分子量的蛋白質，且具有較低的背景雜訊，分析物的濃度可低於 10^{-15} 莫耳以下，但其最大的缺點是不適用於高塩類濃度的沖提液條件，因為塩類會造成偵測結果的背景雜訊增大，因此處理樣本時，就必須儘可能的去除塩類。此外電噴灑游離化的過程中也會受液滴大小、表面電荷、液體之表面張力、溶劑揮發性以及離子溶劑結合強度等各項所影響。所以需要選擇低表面張力，高揮發性，低離子溶劑結合能力等的沖提溶劑，如甲醇 (Methanol)，乙腈 (Acetonitrile, ACN) 等有機溶劑是較為合適的。

在進行 LC/ESI-MS 實驗時，必須先將蛋白質變性，再進行還原及烷基化後，依實驗需求而利用各種的酵素，對蛋白質進行酵解作用，將大分子蛋白質裂解成小分子的胜肽，較常使用的酵素是胰蛋白酶 (Trypsin)，其作用的位置是在精胺酸 (Arginine, R) 和離胺酸 (Lysine, K) 在 C 端的位置，

再將樣品送入 LC / ESI-MS 進行蛋白質的辨識。

質譜儀與液相層析 (Liquid Chromatography, LC) 相連結，同時擁有了二者的好處。質譜的好處如前所介紹的，而層析的好處在於它可以利用沖提的條件將所需檢測物質一一分離出，更加提昇質譜儀的分析能力。

液相層析[14]的運用一直相當的廣泛，其主要原因是因為它適用於非揮發性及熱不安定性物質的分離。比如像胺基酸，蛋白質，核酸，藥物或它有機物、無機物等等。一般根據層析方法的不同可分為四類：包括分離極性之非離子性物質的分配層析法 (partition chromatography)，使用於非極性物質分析的吸附層析法 (adsorption chromatography)，對於低分子量的離子性物質可使用離子交換層析法 (ion exchange chromatography)，而根據分子量大小的分離過程則使用大小排除層析法或稱膠體層析法 (gel chromatography)。

其中分配層析法在此四種液相層析最被常用的。此層析法根據靜相填充在支撐物上的方式，又可分為液相-液相層析法和鍵結相層析法，目前以後者最被常用。鍵結相的管柱之填充物大都以矽膠或剛硬矽膠為基質而得之合成粒子，直徑常用的有 3、5、10 μm ，表面鍵結有矽醇基 (SiOH)。利用動相和靜相的極性又可將分配層析法區分成正相和逆相層析法。正相層析法的靜相是以水或三乙二醇附著在矽膠上，動相則使用一些非極性溶劑如己烷或異丙醚等；而逆相層析法的靜相則是非極性的碳氫化合物，動

相則是使用極性溶液如水、甲醇或乙稀腈等。

在逆相層析法的鍵結相填充物常用矽烷的 R 基，R 基代表著烷基或取代烷基，一般是 C8（正烷基）或 C18（正 18 烷基）。沖提液的 pH 值常介於 2-8 之間，而常用的沖提液極性選用中或高極性，一般會使用兩種溶劑的混合，以便得到所需的極性指數，而有利於層析物質之適用。

使用像甲醇或乙稀腈等有機溶及含有與分析物所帶之電荷相反的離子性化合物所構成的動相層析液稱之為離子對層析，也就是本實驗所用的方法。與分析物相反的離子與分析物形成離子對後，形成電中性物質，因而能被逆相管柱而滯留。離子對層析適用於分離小的無機或有機離子。

在層析中，流速也是影響了分析結果的一項重要因素。當層析流速加快時，由於分析物無法和管柱中的非極性碳鏈完全的結合，因而分離的效果變差，在波峰的表現上，波峰重疊；而流速過慢時，所需的層析時間拉長，波峰底部會被拉寬，在進行定量分析時，無法準確測出且分離的效果也大打折扣。

動相與靜相接觸時間的長短取決於動相的流速，同時也影響管柱的效率。主要是以理論板高來決定動相的速度，當要理論板高的最小值時，必須將流速降到最低才能達到最高的分離效率。理論板高 H（單位是公分），被推導出來的公式是：

$$H=A+B/u+Cu$$

$$=A+B/u+(C_s+C_M)u$$

也就是理論板高 H 與多流動路徑 A ，縱向擴散 B/u ，液體靜相間的質量轉移 $C_s \cdot u$ 以及動相間的質量轉移 $C_m \cdot u$ 有關。對多流動路徑 A 而言，在較快或中等流速時，因為沒有足夠的時間進行平均擴散，造成行走途徑的差異，即可觀察到層帶擴散現象。反之，在慢流速時因為填充物的多重途徑性質，分子也就不會有明顯的擴散現象。縱向擴散 B/u 也會影響層帶變寬，它與流速的關係成反比，當流速快時縱向擴散的行爲並不會被觀察到，而層帶也不會變寬。動靜相對層析的變寬也有影響，當此兩項的質傳速率很快時，就不會有層帶變寬的現象產生[3]。

如果能在樣品分析管柱之前，再串聯上一只 C18 前濃縮管柱，則將會有助樣品的濃縮與去除背景離子干擾等各項的處理步驟之進行。同時也可以省略去一般習用 nanospray 噴頭的使用，而同時也能夠在較為便宜的儀器裝置中，達到幾乎對等的偵測極限值。

在實驗的樣品中，我們選擇了牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin)。此樣品的分子量在 66KDa，胺基酸數約有 607 個，但其中的雙硫鍵卻有 17 個。在實驗的進行中必須進行雙硫鍵的裂解作用，才能被胰蛋白酶進行反應。比起其它沒有雙硫鍵且分子量也小的肌紅蛋白，或是其它分子量大，但雙硫鍵的數目過多或過少的情形下，對實驗結果的比較，BSA 是較理想的選擇。

第三章 實驗方法

本實驗共分成三個部份，修飾劑，管柱含有不同碳鏈及流速對分析結果的影響。在實驗中所有的溶液配製過程都使用去離子水。

一， 實驗藥品與材料：

在本實驗中所使用的試劑皆是分析級試藥。

1. 三氟乙酸 TFA (Trifluoroacetic acid)，Fluka
2. 乙腈 (Acetonitrile)，Merck
3. 甲醇 (Methanol)，Merck。
4. DTT：dithiothreitol，Promaga
5. IAA：2-Iodacetamid，Merck。
6. 絕對酒精 (99.9%)，Merck。
7. 醋酸：Acetic Acid，Merck。
8. 聚丙烯：Acrylamide，Promaga
9. TEMED：N, N, N', N',-tetramethylethylene diamine (四甲基乙基二胺)，Promaga
10. 胰蛋白酶 (Trypsin)：Modified，Promega
11. 染色劑：Instant blue，吉恩馬克
12. 染色劑：Coomassie Brilliant Blue 試劑，Bio-Rad。

13. 染色劑：Sypro® Ruby 試劑，Prove。

14. BSA 樣品：Bovine Serum Albumin，感謝慈濟大學劉朝榮副教授純化濃縮提供。

二，實驗儀器：

1. 液相層析質譜儀：LCQDUO，配有 ESI 離子源介面，Thermo Finning LC/ESI-MS/MS
2. 液相層析幫浦：Hitachi LC pump L-7100
3. 自動取樣機：TSP4000
4. 振盪器：Scientific Industries Vortex-Genine 2
5. 超音波震盪器：Branson，PC620-1
6. 乾燥機：Speed Vacuum，Savant SC110，Refrigerated Vapor Trap RVT400
7. 加熱器：Thermolyne
8. 氮氣產生器：Parker 76-94，頤華
9. 離心機：centrifuge 5415 D，eppendorf。
10. 逆相液相層析管柱（Reverse-Phase Columns）：Vydac
11. 所有種類的 tip 和 1.5mL 的離心管都先用甲醇處理過。

三，實驗方法：

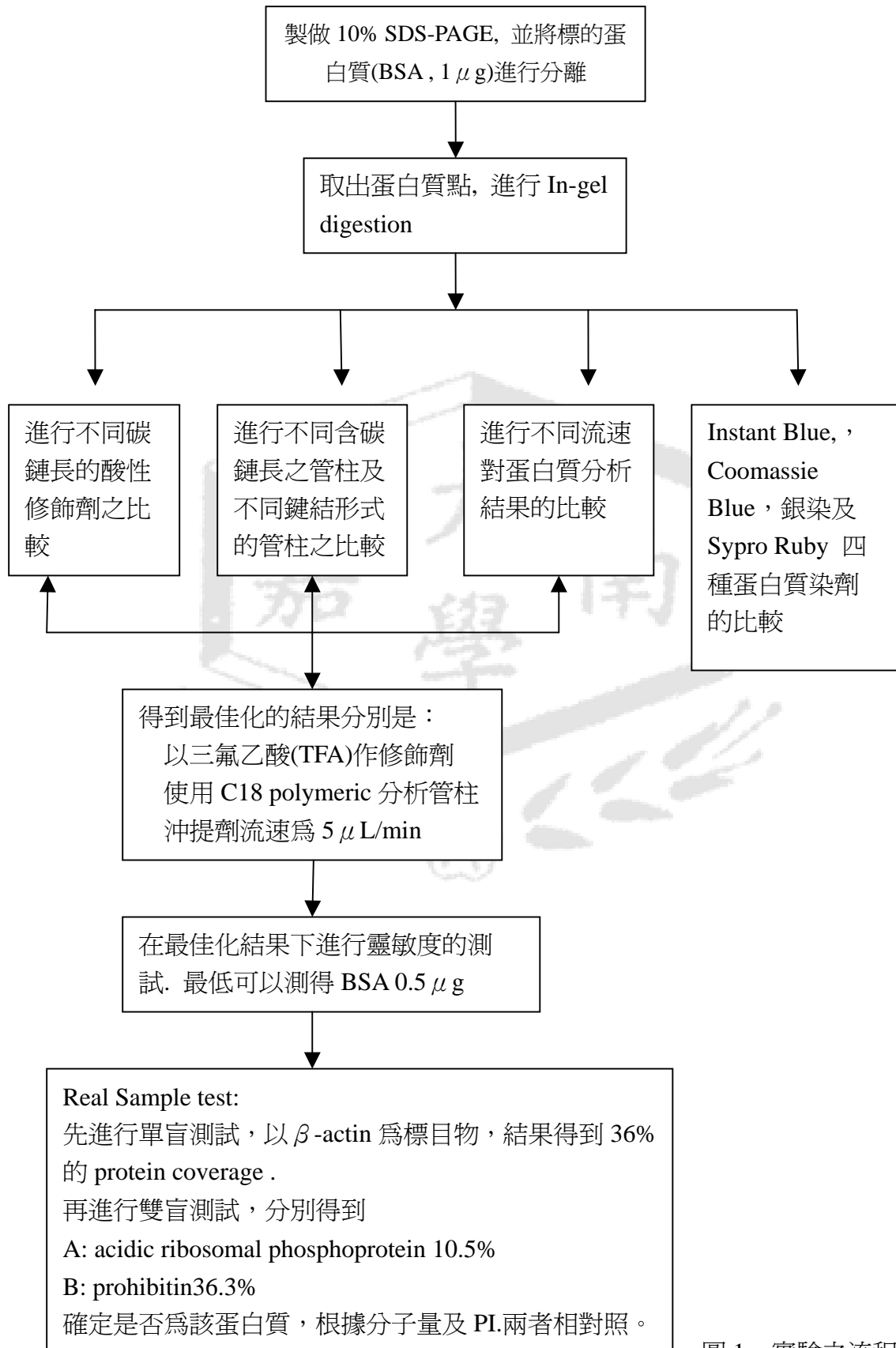


圖 1：實驗之流程圖

四，樣品的萃取：

1. 將含有 BSA 膠體，取出後，放入 1.5mL 的離心管中，進行去染色。
2. 先加以 DTT (10mM)，加熱至 56℃，45 分鐘後，將 DTT 溶液去除。
3. 加入 IAA (55mM)，在黑暗中靜置 30 分鐘後，將 IAA 溶液去除。
4. 加入適當的 Trypsin 進行酵解作用，置於 37℃ 的水浴中 18 小時。
5. 隔天將已酵解完全的 BSA 萃取出來，進行濃縮。
6. 以 LC/ESI-MS/MS 分析。
7. 進行資料庫比對。

五，儀器的設定：

本實驗使用 TSP 公司的自動取樣儀 4000 型，與 Hitachi 公司所出產的 L-7100 型 液相層析泵連結，一般使用時將流速設定為 40 μ L/min。之後與 ESI / MS 相接。使用 Finnigan Xcalibur 軟體。而比對軟體則採用 TurboSEQUENT 軟體。

流速之比較：

1. 在各沖提溶液中加入 TFA 0.05%
2. 分別以 5、10、20、40 μ L/min 的流速進行層析分離。
3. 使用前濃縮管

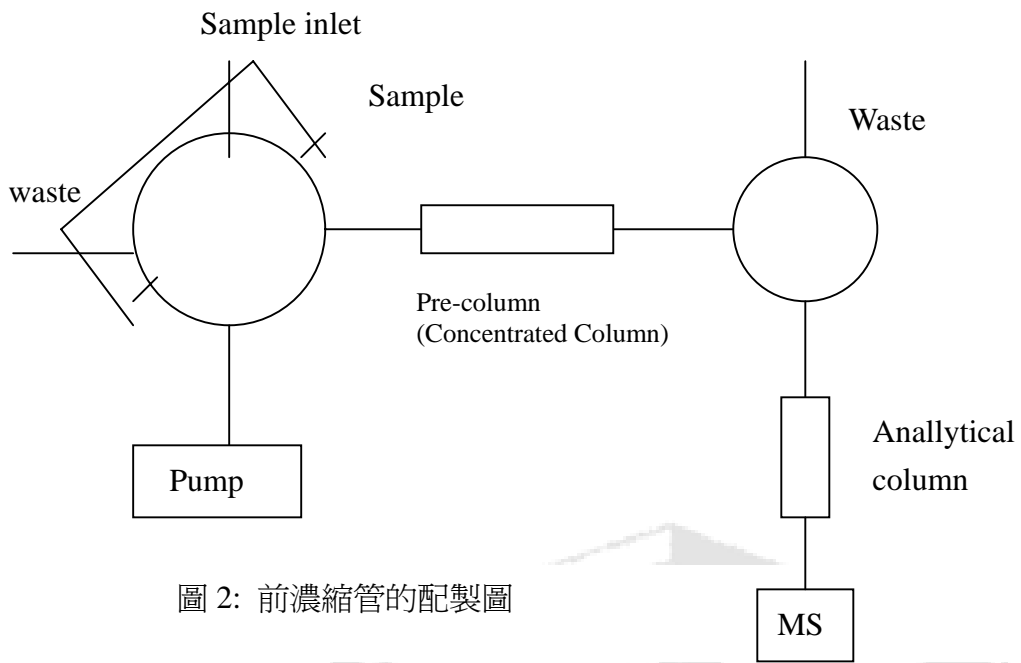
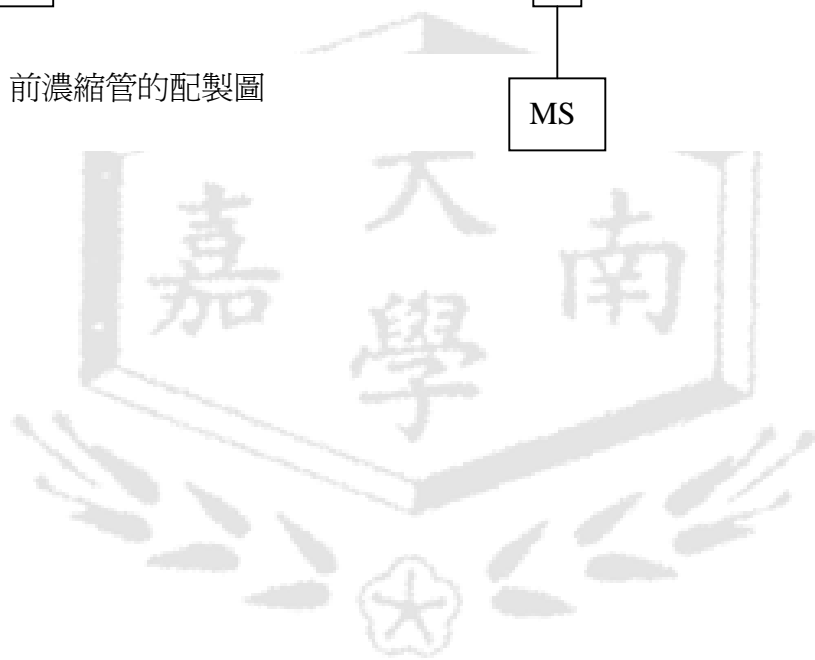


圖 2: 前濃縮管的配製圖



第四章 結果

將含有 200 ng BSA 的電泳膠片經過 Instant Blue™ Coomassie Brilliant Blue 試劑染色，再進行 in-gel 消化處理。接著先使用前濃縮管柱進行前濃縮處理之後，再進行 LC/MS 之蛋白質胺基酸定序偵測時，所獲得的分析結果。



在經過了修飾劑及管柱的比較之後，選擇了較佳的條件繼續進行流速的比較，分別以 40、20、10、5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 進行。標的蛋白為 BSA，濃度 1 μg 。

每組實驗分別進行四~五次的雙重覆實驗，記錄各自結果。以 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速在 BSA 的辨識率（圖 4）是 $20.3\% \pm 2.3\%$ ；20 $\mu\text{L}/\text{min}$ （圖 5）是 $21.7\% \pm 3.9\%$ ；10 $\mu\text{L}/\text{min}$ （圖 6）是 $14.7\% \pm 3.6\%$ ；5 $\mu\text{L}/\text{min}$ （圖 7）是 $24.9\% \pm 5.4\%$ 。

將所得到的結果製成統計圖。Y 軸代表 protein coverage，X 軸代表不同流速。

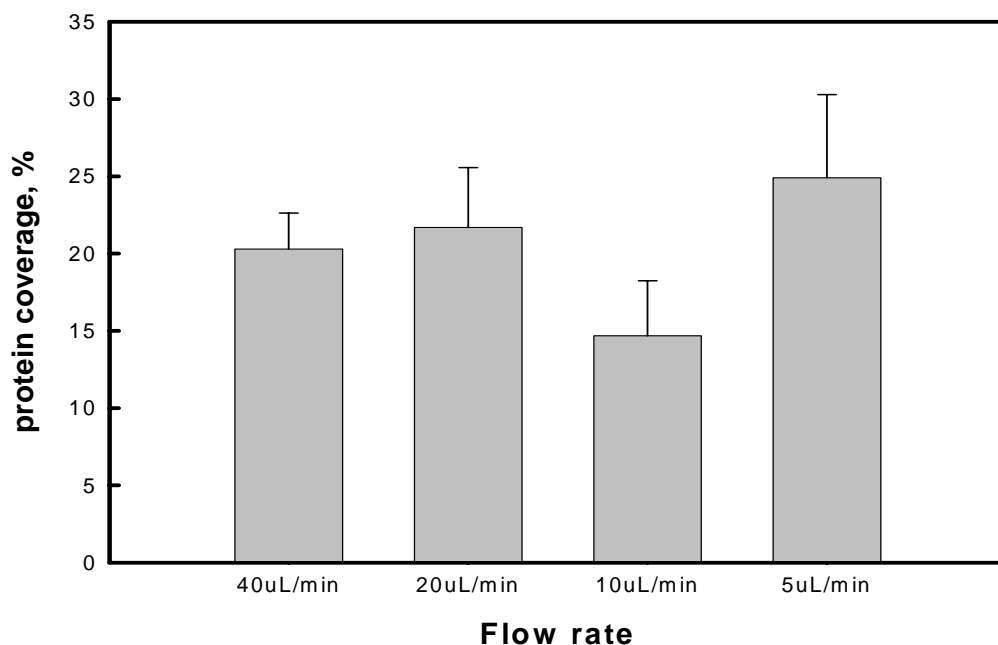


圖 3：不同流速對蛋白質的分析結果

第五章 討論

由分析結果可以知道，當使用廉價的線上濃縮管柱之後，對於未配備有高價位的 nanospray 之 LC/ESI-MS 儀器而言，不僅背景雜訊有明顯減少現象，同時在相同的 BSA 濃度值的條件下，瞬間總離子電流值也呈現出高倍率增加現象。同時若能配合高靈敏度的 Instant Blue™ Coomassie Brilliant Blue 試劑來對蛋白質之分離電泳膠片進行染色，則總體的改善結果，也已經可以讓未配備有 nanospray 之 LC/ESI-MS，能對蛋白質濃度範圍低至奈克等級的電泳膠片斑點，進行簡單而直接的偵測工作。

流速

沖提溶液的速率對層析最重要的影響是在於沖提液有無足夠的時間和分析物混合，以及在管柱中是否能有足夠的時間使管柱中的支撐物去吸附分析物。當有足夠的時間與管柱中的支撐物作用時，當流速愈慢，則每種分析物的分離也會愈清楚，因為理論板高降低，理論板數提高，層析的靈敏度也就會相對提高。可是在流速過慢的時候，原本已被分離的分析物，在管柱中又再重新的擴散，形成混合現象，反而讓分離的效果變差。在層析圖上可見波峰的峰底變寬，波峰面積增加，以致於無法準確的定量，也會造成時間的浪費。因此必須對流速進行最佳化的比較。

本實驗在只進行 protein coverage 的探討，不考慮定量的結果。在此分

別 40、20、10、5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速進行比較，發現隨著流速的下降，每根胜肽的波峰可以分離清楚之外，蛋白質的辨識率也隨之增加。5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 是最佳的選擇。

靈敏度

在最佳化的結果確定之後，開始進行最低可偵測的濃度，並且搭配濃縮管。分別以流速 20 和 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 進行分析，先以 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 測試，得到 4.1% 的 protein coverage，2 段胜肽(圖 8)；以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 測試，得到 4.9% protein coverage，2 段胜肽(圖 9)。但是在 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 時，曾經測得 0.1 μg 的 BSA，4% 的 protein coverage，2 段胜肽。

第六章 結論

在流速的比較方面，本實驗多加了濃縮管柱，進行比較。流速隨著的 40、20、10、5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的下降，分離的結果也愈來愈佳。但是所花費的時間也相對延長許多。40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速在 BSA 的辨識率是 $20.3\% \pm 2.3\%$ ；20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 是 $21.7\% \pm 3.9\%$ ；10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 是 $14.7\% \pm 3.6\%$ ；5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 是 $24.9\% \pm 5.4\%$ 。

由分析結果可以知道，當使用廉價的線上濃縮管柱之後，對於未配備有高價位的 nanospray 之 LC/ESI-MS 儀器而言，不僅背景雜訊有明顯減少現象，同時在相同的 BSA 濃度值的條件下，瞬間總離子電流值也呈現出高

倍率增加現象。同時若能配合高靈敏度的 Instant Blue™ Coomassie Brilliant Blue 試劑來對蛋白質之分離電泳膠片進行染色，則總體的改善結果，也已經可以讓未配備有 nanospray 之 LC/ESI-MS，能對蛋白質濃度範圍低至奈克等級的電泳膠片斑點，進行簡單而直接的偵測工作。

第七章 參考文獻

1. 小泰生物科技期刊 初探蛋白質體學 責任編輯 2002/02/20
2. Aebersold R, Goodlett DR. Mass Spectrometry in proteomics. 2001; Chem Rev. 101, 269-296.
3. 方嘉德 譯，儀器分析 (譯自 Principles of instrumental analysis)，第五版，台灣台北：滄浪書局，2003。

