行政院國家科學委員會專題研究計畫　成果報告

磁性免疫親和管柱結合毛細管電泳-質譜法以建立線上免疫分析系統

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC94-2113-M-041-004-
執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日
執行單位：嘉南藥理科技大學職業安全衛生系

計畫主持人：鄭淨月

計畫參與人員：葉慧容

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中　華　民　國 95 年 10 月 31 日

中文摘要

本計劃擬發展出一套可自動化的磁性免疫親和管柱(Magnetic Immunoaffinity Column, MIAC)結合毛細管電泳-質譜法以建立一套免疫分 析系統，可以直接偵測含複雜成份的生物檢體中微量之蛋白質。磁性免疫親和管柱主要是由磁性粒子所組成，磁性奈米粒子(Magnetic Nanoparticles, MNPs)直徑約為6 nm，MNPs 核心是氧化鐵，表面以共價鍵鍵結抗體，將已修飾上抗體的MNPs 以流動注入法填充至鐵弗龍管柱中，以磁鐵在磁性免疫親和管柱的兩邊建立一個外加磁場，吸住MNPs，以做為分析系統中的固定相，抓取特定的蛋白質後，再加入修飾胰蛋白酶的奈米金粒子(Gold Nanoparticles，GNPs)將被抓取的特定蛋白質消化，以毛細管電泳-質譜法分離偵測所產生的蛋白質胜肽碎片，進行資料庫搜尋比對。因為已被修飾的MNPs 只與特定的蛋白質鍵結，所以在此免疫分析系統中，可以注入”dirty”的樣品進行分析，而不會發生管柱阻塞情況，MNPs 又可回收重覆使用，經濟效益佳；又因為是流動系統，可注入較大量的樣品體積，進行特定的蛋白質的線上濃縮，可增加本系統的靈敏度，同時也節省免疫分析及蛋白質消化反應所需的時間，進而對這些生化樣品中微量的蛋白質建立一套快速而可靠的分析方法。

關鍵詞：磁性免疫分析、蛋白質消化、毛細管電泳、電噴灑質譜法、基質輔助雷射脫附游離法

英文摘要

A magnetic immunoaffinity column (MIAC) coupling capillary electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS) has been developed for on-line biological samples monitoring assays using two protein-coated nanoparticles. Paramagnetic nanoparticles can be used as a mobile solid phase on which an immunoaffinity assay is assembled and can easily be used in small volumes to miniaturize an analytical system. When microbeads are dispersed throughout a solution, the distance that reagents must diffuse is minimized. With these characteristics, microbeads are good candidates for use in a fluidic system, as has been demonstrated for CE-MS assay. The particles showed a high magnetic responsiveness in magnetic field, and no aggregation of the particles was observed after the particles had been treated in the magnetic field. Antibody (ex. immunoglobulin G, IgG) was coupled to the particles to prepare a magnetic affinity support for protein adsorption. A complex mixture containing a trace amount of potential protein candidates were directly injected onto MIAC operated under a flow rate sufficiently low. After target protein adsorption was completed, MNPs with target protein were directly injected to the mixer mixing with Trypsin-Gold Nanoparticles (Trypsin-GNPs) when liberating the magnetic field. The digested analysts were then eluted into CE-MS. Finally, the MNPs was recycled and reused. Meanwhile, the results of this work, supported by experimental validation, can aid in the understanding of trace level compounds of biological interest. Our results can potentially be applied to assessing the feasibility of biological monitoring.

Keywords：Magnetic immunoaffinity, Capillary electrophoresis, Electrospray-Mass Spectrometry, Protein digestion

一、前言

自然界有許多專一性的配對分子，例如：兩股DNA 分子間的鹼基配對、酵素與其基質間的結合與催化、各種荷爾蒙與其受體、抗原與其抗體的結合等。其中，抗原與抗體的專一性配對，可用人為的設計與免疫操作，在實驗室中取得專一性的抗體；這是目前極少數可用人工產生專一性分子探針的方法之一。抗體與抗原之間的高度專一性，一直吸引著研究學者的注意力；對於抗原抗體間的專一結合關係，免疫學家自百年前已從免疫沈澱法清楚觀察，後來又發展出雙向免疫擴散(double diffusion)，以及酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）或免疫螢光分析法(Immunofluorescence assay, IFA)等，而成為免疫化學的標準工具。當使用固定相進行免疫分析時，其非專一性結合非常低，過去使用的非專一性分離試劑例如聚乙二醇(PEG)，能沈澱抗原抗體複合態，但同時也沉澱頗多游離態下來，而固定相由於材質皆具非穿透性及不活化性質，只有專一性結合可發生於表面，相對提高整個分析方法的靈敏度。這些免疫工具與方法具有靈敏度，專一性和準確性極高的特質，可廣泛的應用在體內各種微量生物活性物質測定，如激素、蛋白質、抗體、免疫球蛋白、微生素和藥物。

而毛細管電泳在微量分析上是不可或缺的工具，此分析技術可分離離子，胺基酸及生化分子（如胜肽、蛋白質），而且具有樣品需求量少，分析時間快速，以及不需幫浦等優點，使得此分析技術在蛋白質體學的應用上更加受到注重。毛細管電泳的分離模式多樣，彼此之間的分離機制不同，一般最常用的是 CZE (Capillary Zone Electrophoresis)，可在分析的緩衝液中加入界面活性劑，若在臨界微胞濃度(CMC)之下，可作為疏水性溶質的增溶劑，還可形成離子對或毛細管內壁的改性劑，若界面活性劑超過微胞濃度以上，將改變分離機制，形成微胞電層析(MEKC)，其優勢是可分離中性溶質又可分離帶電分子的電泳技術，此分離機制為，達到微胞濃度以上的介面活性劑，會從單一的分子聚集成微胞，微胞的疏水性部分會與樣品的疏水性部分作用，此時的微胞可稱為偽固定相，增加樣品的滯留時間，而達到分離的效果。毛細管電泳在偵測生化樣品上，除了可以 UV 或螢光偵測外，也可搭配質譜儀進行偵測，其中與電噴灑游離源(Electrospray ionization；ESI)結合的佔大多數。

在本實驗中，我們將結合固相免疫分析及 CE-ESI-MS 的分析技術偵測複雜的生化樣品，可減低樣品前處理的時間和減少化學干擾，以期增加樣品的偵測靈敏度。

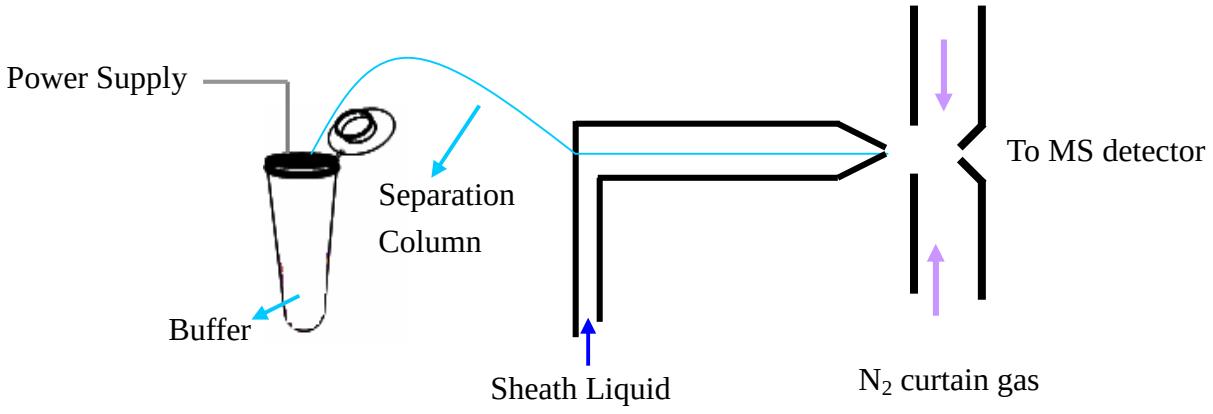
二、實驗：

A. 樣品及溶液製備

1. 將 Cytochrome c 與 Lysozyme 各配置成 1.157 μg/μL 與 1.430 μg/μL 的水溶液
2. 取 Ttrypsin 0.5mg 溶於 1mL 的 NH_4HCO_3 水溶液
3. Trypsin-Magnetic Nanoparticle (T-MNP)製備：取 4mL、0.25mM 的四氧化三鐵奈米粒子與 434μL、10mM 的磷酸鹽緩衝液(pH=8)均勻混合，再加入 60μL、0.5mM 的胰蛋白酶(Trypsin)溶液，均勻混合後接著快速加入 0.1mg 的接合劑(EDC,1-ethyl-3-dimethylaminepropyl) carbodiimide hydrochloride)。在 4℃下反應 4 小時，用磁鐵將奈米粒子吸住，並倒掉上清液，重複清洗奈米粒子兩次後，用去離子水回溶即可得到有酵素接合四氧化三鐵磁性奈米粒子。
4. 消化作用: 取 1μL 蛋白質溶液加入 1μL 1μg/μL 的 trypsin 溶液或在 37℃水浴中反應 10 分鐘
4. Angitension I 與 Bradykinin 配成 12.96 μg/μL 與 10.60 μg/μL 水溶液
5. 取界面活性劑 Brij 72 與 Tween 80 混合配置成 0.15 mM 的水溶液

B. 儀器裝置

1. 質譜儀：質譜是使用 Bruker 公司所生產的 Esquire 3000 plus ion trap，質譜儀游離源為 ESI，及 Autoflex MALDI-TOF System 為一反射型的飛行時間質譜儀。直線型之飛行管長度為 1.7 公尺，而反射型飛行管總長則為 3.0 公尺，所使用的雷射為波長 337nm 的氮氣雷射。
2. 毛細管電泳：內徑為 50 μm，外徑為 360 μm，長 60 cm，緩衝溶液為 30 mM ammonium formate (pH 3.0)，活化步驟為 MeCN、0.1 M HCl、1 M NaOH、H_2O 各清洗 10 分鐘，再以緩衝溶液平衡 20 分鐘
3. 毛細管電泳裝置圖：



三、結果與討論：

第一部份：開發以胰蛋白酶磁性奈米粒子在高溫下對蛋白質進行快速消化反應之技術

在蛋白質體學的分析中，利用奈米磁性粒子(Magnetic Nanoparticles，MNPs)可作為生物分子（蛋白質、酵素、抗體及核酸等）純化分離及精製濃縮之應用；所以本實驗將利用磁性粒子與特定酵素(如胰蛋白酶，Trypsin)結合後，在高溫下對蛋白質進行快速消化反應，反應結束後可利用磁鐵將胰蛋白酶－磁性奈米粒子收回，即可減少因胰蛋白酶自我分解所產生的胜肽訊號對生化質譜分析所造成的訊號干擾。

在本實驗中，我們合成奈米級的氧化鐵磁性粒子，將胰蛋白酶與 MNPs 混合在磷酸鹽緩衝液中，置於 4℃反應 12 小時，胰蛋白酶與 MNPs 會以共價鍵結的方式連接(Trypsin-MNPs)，將其應用於蛋白質分解反應中；實驗結果發現，將 Trypsin 連接在磁性奈米粒子上，仍可保持酵素的活性，進行蛋白質分解(圖一)，利用磁鐵將胰蛋白酶－磁性奈米粒子收回，則在質譜圖中 Trypsin 自我分解所產生的胜肽的訊號干擾較少。

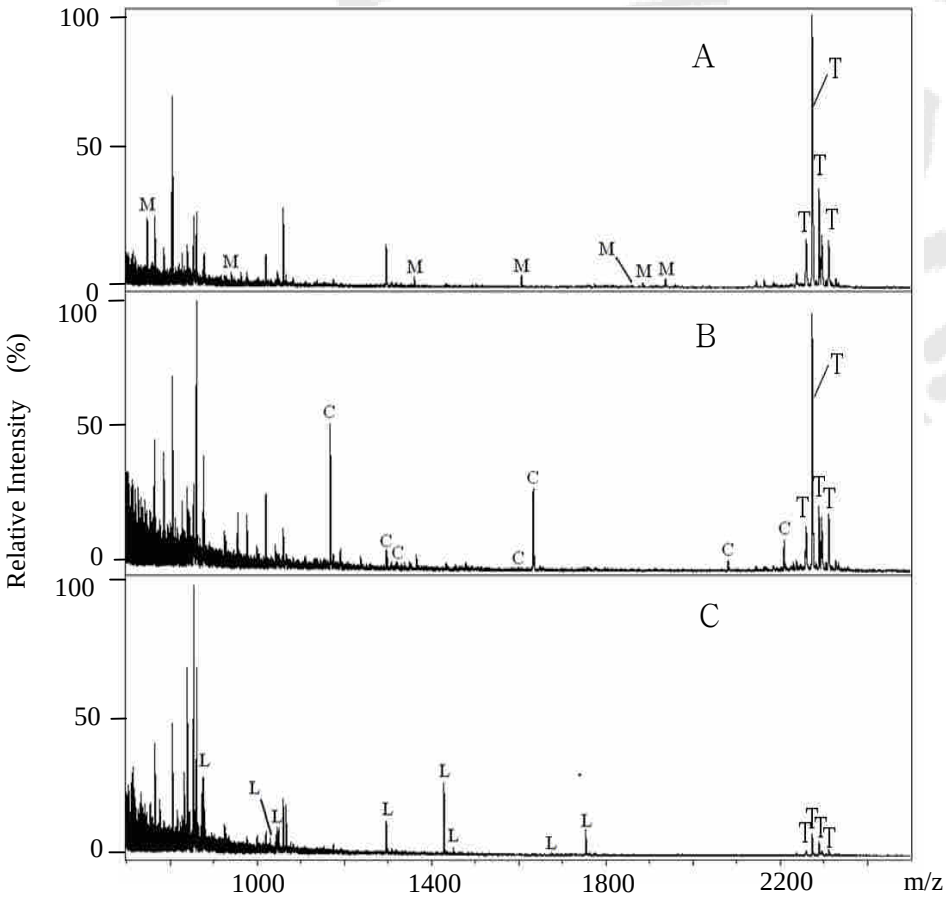


圖1、使用5μg/μL TMNPs與三種不同的protein在37℃水浴下反應10分鐘，進行消化(A)Myoglobin (B)Cytochrome C (C)Lysozme，圖中M代表為Myoglobin消化後所產生的胜肽訊號，C為Cytochrome C消化後所產生的胜肽訊號，L為Lysozme消化後所產生的胜肽訊號。

適當地提高消化溫度，可增加消化反應的速率，且在高溫下蛋白質會變性，可使得消化反應更容易進行，但相對地酵素自我分解的訊號也會增加。實驗中將提高水浴槽的溫度已提高 enzyme 反應速率，進行蛋白質快速消化反應，並且利用磁鐵將磁性奈米粒子收回，簡單的分離高濃度的酵素，即可減少酵素自我分解所產生的訊號干擾。圖 2，使用 5μg/μL T-MNP，對不同種類的蛋白質(Myoglobin、Cytochrome C、Lysozyme)，並將水浴槽溫度提升到 57℃進行消化反應 10 秒及 30 秒。圖 2 在 57℃、10 秒時，得到 Myoglobin 5 根訊號峰，Cytochrome C 5 根訊號峰，Lysozyme 有 11 根訊號峰。而在 57℃、30 秒時，可得到 Myoglobin 7 根訊號峰，Cytochrome C 9 根訊號峰，Lysozyme 11 根訊號峰。本實驗中，提高反應的溫度(57℃)可在 30 秒內快速進行 protein digest，且 Myoglobin sequcence coverage 33%，Cytochrome C sequcence coverage 68%，Lysozyme sequcence coverage 57%。

提高溫度進行消化反應，並利用磁鐵將消化完後的磁性奈米粒子收回，此技術可在小於一分鐘內快速的消化不同種類的蛋白質，且所產生的 peptide 數目以足夠進行資料庫的比對，鑑定蛋白質。

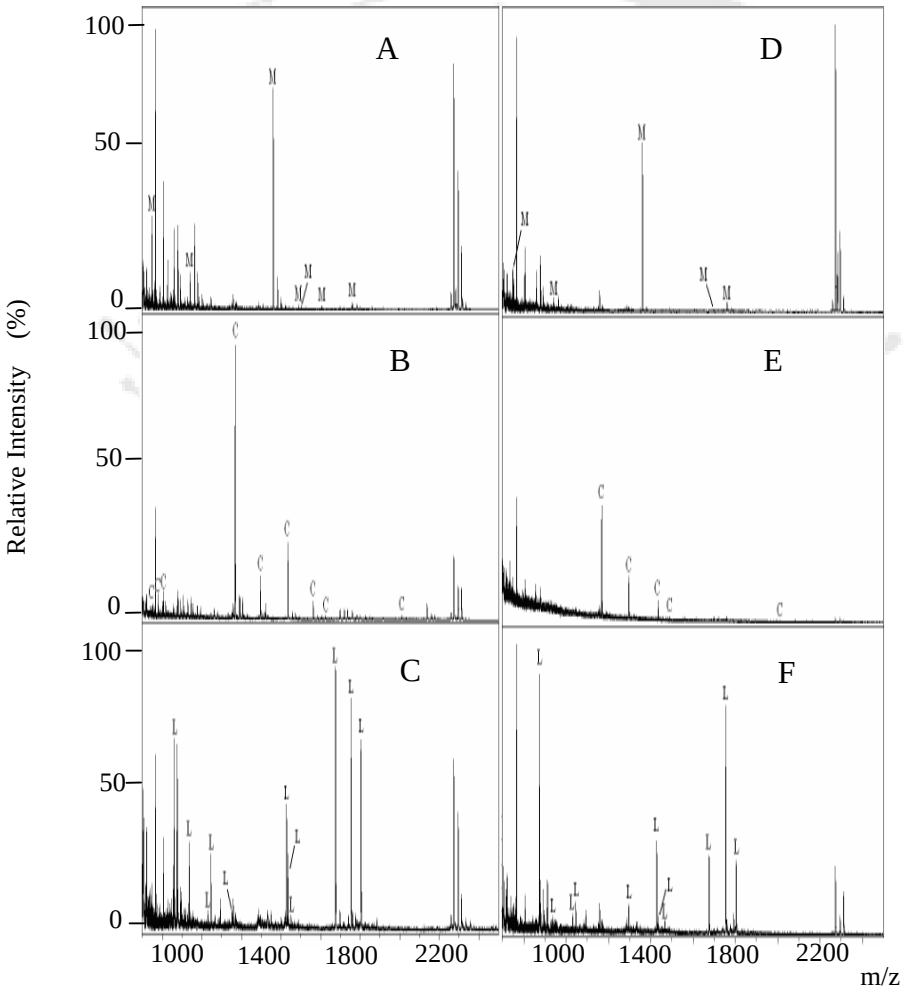


圖 2、使用 5μg/μL T-MNPs 在 57℃下體積比 1:1，對不同蛋白質進行消化(A) Myoglobin 消化 10 秒(B)Cytochrome C 消化 10 秒(C) Lysozme 消化 10 秒(D) Myoglobin 消化 30 秒(E) Cytochrome C 消化 30 秒(F) Lysozme 消化 30 秒。M、C、L 及代表其蛋白質所消化完後產生的 peptide。

第二部份：以奈米粒子結合毛細管電泳(CE)分離系統應用於胜肽分析

圖2A為Cytochrome C 及 Lysozyme經TMNPs消化作用成胜肽混合液，藉由毛細管電泳分離所得到的EIC圖，由於之前曾嘗試使用先以單一界面活性劑在毛細管中形成區帶，再進行分析，但是並沒有得到良好的分離效果，因此在圖2B中先將混合Brij 72與Tween 80的界面活性劑注入，形成一界面活性劑區帶後，再將胜肽混合液注入，從結果中可發現其分離效果較前者好，peak的解析度也有些許的提高，其中大多數為Cytochrome C的胜肽，少數為Lysozyme的胜肽及Trypsin自我分解的胜肽訊號。

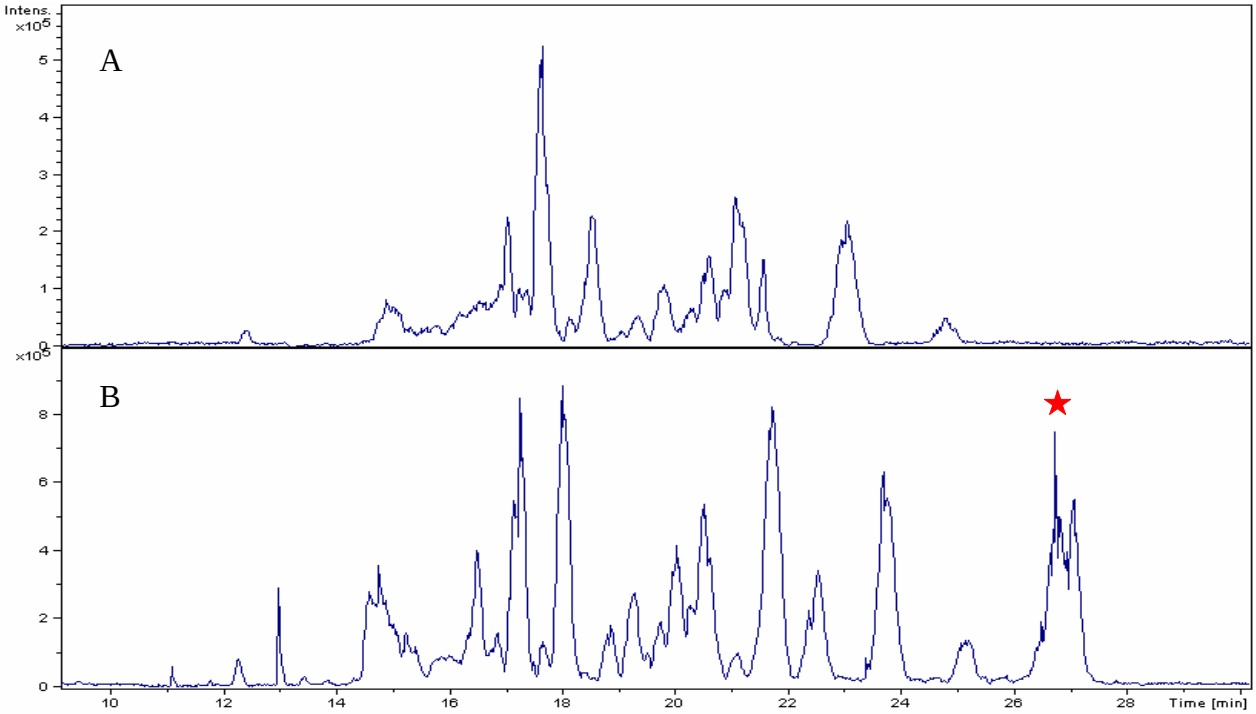


圖 2.(A) Cytochrome C , Lysozyme 經消化作用後，由毛細管電泳分離所得到的 EIC 圖(B)在管柱先充滿一段 0.15 mM Brij72 與 Tween 80 界面活性劑，再注入胜肽混合液 ，經由毛細管電泳分離後所得到的 EIC 圖。★為界面活性劑的訊號

四、結論：

第一部份使用表面鍵結有胰蛋白脢的磁性奈米氧化鐵顆粒(T-MNP)，輔以高溫(57℃)，可在一分鐘內對溶液中極微量的蛋白質分析物進行消化。因 Trypisn 已固定在 nanoparticle 表面，(非 solution、free)，蛋白質經擴散到 nanoparticle 表面，再與 Trypsin 進行消化作用，磁性奈米粒子可以用磁鐵先進行回收，因此可減低來自熱胰蛋白脢自我消化的干擾。實驗中結果證明可對不同種類的蛋白質進行快速消化反應，且其消化蛋白質所產生的胜肽，偵測極限可達 10^{-9} M。有關這部分已寫成英文論文，正在投稿中。

第二部份利用毛細管區帶電泳將蛋白質消化後的胜肽進行分離，但是可能由於胜肽之間的結構性質相似，造成胜肽在毛細管電泳中會有overlap的現象發生，因此加入界面活性劑以提高其分離程度，其中以混合Brij 72與Tween 80的界面活性劑有最好的效果，未來我們會繼續在界面活性劑的溶液配置上進行探討，找尋最佳的分離效果。

五、計畫成果自評

本計畫之目的在建立一套可線上直接進行蛋白質消化連接毛細管電泳質譜法以快速分析生化樣品之系統，先期研究中先建立以消化酵素塗覆於奈米磁性粒子(TMNPs)用來消化蛋白質，這部分的研究結果已成功完成，執行率為 100%，此外，英文論文也正在投稿中。另外，在毛細管電泳質譜法分析部分，先將蛋白質以 TMNPs 消化後再注入毛細管中進行分析，這部分也已成功完成，但對於直接線上分析部分，目前採用六相閥當作樣品導入系統，將 TMNPs 置於 sample loop 中，再注入蛋白質進行消化，並以液相層析質譜法成功地偵測生肽的訊號，這部分的研究結果執行率為 95%，因此線上直接消化蛋白質並偵測的計畫是可以被執行，且分析時間可以縮短，減少樣品前處理步驟，降低污染的機會，對蛋白質體學(蛋白質辨識部分)之相關研究亦相當有價值。

六、參考文獻：

1. Weizmann, Y.; Patolsky, F.; Lioubashevski, O.; Willner, I. *J. Am. Chem.Soc.* **2004,** *126*, 1073.

2. Liu, R.H.; Yang, J.; Lenigk, R.; Bonanno, J.; Grodzinski, P. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1824.

3. Yeung, Y. A.;Wittrup, K. D. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 212.

4. Kuhara, M.; Takeyama, H.; Tanaka, T.; Matsunaga, T.; *Anal. Chem. ;* **2004**; *76*; 6207.

5. Peter J.; Unverzagt C.; Krogh T.N.; Vorm O.; Hoesel W.; *Cancer Res.;* **2001**, 61, 957.

6. Thomas, J. H.; Kim, S. K.; Hesketh, P. J.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R. *Anal. Chem. ;* **2004**; *76*; 2700.

7. Wang, T. H.; Lee, W. C. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2003**, *8*, 263.

8. Nam, J.M.; Thaxton, C.S.; Mirkin, C.A. *Science* **2003**, 301, 1884.

9. Havlis, J.; Thomas, H.; Sebela, M.; Shevchenko, A.; *Anal. Chem. ;* **2003**; *75*, 1300.

10.Demers, L.M.; Mirkin, C.A.; Mucic, R.C.; Reynolds III, R. A.; Letsinger, R.L.; Elghanian, R.; Viswanadham, G. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5535.

11.Krogh, T. N.; Berg, T.; Hojrup, P. *Anal. Biochem.* 1999, *274*, 153.

12.Nomura, A.; Shin, S.; Mehdi, O. O.; Kauffmann, J.-M.; *Anal. Chem. ;* **2004**; *76*; 5498.

13.Ho, K.-C.; Tsai, P.-J.; Lin, Y.-S.; Chen, Y.-C.; *Anal. Chem. ;* **2004**; *76*; 7162

14.Kato, M.; Sakai-Kato, K.; Jin, H.-M.; Kubota, K.; Miyano, H.; Toyo'oka, T.; Dulay, M. T.; Zare, R. N.; *Anal. Chem. ;* **2004**; *76;* 1896.

15.Ye, M.; Hu, S.; Schoenherr, R. M.; Dovichi, N. J.; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1319.

16.Sakai-Kato, K.; Kato, M.; Toyo'oka, T.; *Anal. Chem. ;* **2002**; *74*; 2943.

17.Huang, Y.-F.; Huang, C.-C.; Chang, H.-T.; *Langmuir;* **2003**; *19*; 7498.

18.Jimenez, V. L.; Leopold, M. C.; Mazzitelli, C.; Jorgenson, J. W.; Murray, R. W.; *Anal. Chem. ;* **2003**; *75*; 199

19.Tong, X.-D.; Xue, B.; Sun, Y.; *Biotechnol. Prog. ;* **2001**; *17*; 134. 20.Jimenez, V. L.; Leopold, M. C.; Mazzitelli, C.; Jorgenson, J. W.; Murray, R. W.; *Anal. Chem. ;* **2003**; *75*; 199.

21.Huang, Y.-F.; Huang, C.-C.; Chang, H.-T.; *Langmuir;***; 2003**; *19*; 7498.

22.Huang, M.-F.; Kuo, Y.-C.; Huang, C.-C.; Chang, H.-T.; *Anal. Chem. ;* **2004**; *76*; 192.

23.Schnabel, U.; Fischer, C.; Kenndler, E. *J. Microcolumn Sep.* **1997**, *9*, 529.

24.Templeton, A. C.; Cliffel, D. E.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7081.