行政院國家科學委員會專題研究計畫　期中進度報告

適合蛋白質體學研究之高通量微小生物分析系統的開發

(2/3)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC91-2113-M-002-052-
執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日
執行單位：國立臺灣大學化學系暨研究所

計畫主持人：張煥宗

報告類型：精簡報告
報告附件：國外研究心得報告
　　出席國際會議研究心得報告及發表論文
處理方式：本計畫可公開查詢

中　華　民　國 92 年 5 月 19 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

適合蛋白質體學研究之高通量微小生物分析系統的開發（2/3）

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※

計畫類別：X 個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：NSC91－2113－M－002－052－

執行期間：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：張煥宗

一、中文摘要：

我們成功發展毛細管電泳線上濃縮技術和界面活性劑篩結合之技術來增加蛋白質分析之解析度。此技術可應用於唾液水解　之異型體分析和腦脊髓液蛋白質之分析。為降低分析成本，我們亦將類似毛細管電泳線上濃縮技術應用於經染料（**SYPRO Red**）衍生化之蛋白質分析。該低成本、快速、暨高靈敏度技術可應用於牛奶中重要蛋白質（**casein**）之分析。利用蛋白質電淌度受 **pH** 影響之觀念，首次開發利用 **pH** 變化來進行毛細管電泳線上濃縮技術，成功應用於數微升經酵素消化後之蛋白質產物的分析。我們亦發展電溶游離技術來回收經凝膠電泳分析之蛋白質，並用質譜確認該蛋白質。

二、英文摘要：

An on-line concentration technique was developed for separating proteins by

capillary electrophoresis using a plug of detergents (SDS) prior to sample injection. This technique is capable of separating the microheterogeneities of proteins and has been applied to the analyses of a number of samples of saliva and cerebrospinal fluids. A similar technique has also been developed for separating proteins labeled with SYPRO Red, with the advantages of simplicity, low cost, and high sensitivity as shown in the analysis of milk. The third on-line concentration technique was developed is based on the effect of pH on the electrophoretic mobility of proteins, which allows the analysis of several ì L of tryptic peptides of casein. Finally, we also developed a new electro-elution approach for recovering proteins from gel after separation. The obtained proteins were also identified by mass spectrometry.

三、計劃緣由與目的：

人類基因體計畫雖已初步完成人類 DNA 序列的解碼，但這仍無法解答生命體裡的許多疑惑，因為表現生命功能之基本物質為蛋白質。因此蛋白質體(proteome)的研究工作就日益重要，蛋白質體意指細胞、組織、或器官製造之所有蛋白質的總合，蛋白質體的分析研究即稱為蛋白質體學(proteomics) [1, 2]。基因體於不同時期與不同狀態，可能會表現不同的蛋白質體，所以基因體與蛋白質並非簡單的一對一關係[3]，因此更加彰顯蛋白質體研究的複雜度。

一個細胞中常含有數千種以上且濃度差異在五個數量級以上之蛋白質。蛋白

質在轉譯後的過程中會被修飾而產生具有不同生物功能之蛋白質異形體(microheterogeneity)，因此適合蛋白質體的分析技術需要具有高靈敏度、高通量(high-throughput)、高解析度與再現性，並且能夠準確的定性、定量與回收高純度的蛋白質等優點。

目前仍無分析技術符合上述優點，但二維凝膠電泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2-D GE) [4]或二維液相層析[5]結合質譜技術已被視為研究蛋白質體學之兩大利器。另外，毛細管電泳(capillary electrophoresis, CE)結合雷射誘導螢光(laser-induced fluorescence, LIF) [6]或質譜技術亦因具有高靈敏度及效率高等優點而在蛋白質體學研究中亦佔有一席之地。

我們已成功的開發在電滲流存在下，於 PEO 溶液中進行 DNA、蛋白質與小分子的線上濃縮與分離技術[7-9]。藉由極高的電滲流將聚合物溶液引入毛細管中，作為篩分蛋白質的介質。在本研究中，我們根據上述線上濃縮技術，並在進樣後，引進一小段的 SDS 溶液塞，有效的增加蛋白質的解析度與靈敏度。因此可以解析蛋白質的微異質性，並且降低偵測極限至 pM 的範圍。

四、結果與討論

【一】平板凝膠上蛋白質的回收與質譜偵測：利用蛋白質本身帶負電荷，在外加電場下，會往正極遷移。所以使用簡單的裝置即可以在正極端回收經平板凝膠電泳分離的蛋白質，再送入質譜分析。另外，將回收的蛋白質做等電聚焦電泳實驗，可看到蛋白質的異型體，如成果發表文獻一。

【二】微量蛋白質分析：

於蛋白質樣品注入後，再引入一段高 pH 值，當電淌度受 pH 影響而下降後即可在界面進行堆積。因此利用 pH 接合的技術可分析大量樣段，如成果發表文獻二。

【三】蛋白質微異質性分析：

利用在樣品注入之前，引入一小段的 SDS 溶液塞，可以增加蛋白質分離的解析度，例如可將唾液中具六個異型體的水解　分離出來，如成果發表文獻三所示。

【四】分析大體積蛋白質：

以 SYPRO Red 和 MC 540 為染料，使用 PEO 聚合物溶液分析大體積的蛋白質。在注入大量的蛋白質樣品後，可成功的分析 0.41 «L 體積的蛋白質。並且用於偵測牛奶樣品中的蛋白質，如成果發表文獻五。

五、計劃成果自評

本年度研究計劃中，我們已成功的發展以毛細管電泳進行線上濃縮與分離蛋白質的技術。在樣品注入前，引入一小段的 SDS 溶液塞，成功的分離出水解　的異型體。另外，也成功的分析大體的蛋白質。另外亦成功利用電泳溶離技術從平板凝膠上回收蛋白質，再送入質譜進行分析。部分研究成果已發表於分析化學雜誌：

一. Radko, S. P., Chang, H. -T., Zakharov, S. F., Bezrukov, L., Yergey, A. L., Vieira, N. E. and Chrambach, A. "Electroelution without Gel Sectioning of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Fluorescent Detection, Recovery, Isoelectric Focusing and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionozation-Time of Flight of the Electreluate" ***Electrophoresis*** 2002**, *23*, 985-992.**

二. Wang, S. -J., Tseng, W. -L., Lin Y. -W., and Chang, H. -T. "On-line

Concentration of Trace Proteins by pH Junctions in Capillary Electrophoresis with UV absorption Detection" ***J. Chromatogr. A*** 2002**,** ***979*****, 261-270.**

三**. Tseng, W. -L., Lin, Y. -W., and Chang, H. -T. "Partial-Filling Technique for Separation of Microheterogeneities and Isoforms of Proteins by Capillary Electrophoresis"** ***Anal. Chem.*** 2002**,** ***74*****, 4828-4834.**

4. Chang, H. -T. and Chiu, T. -C. "On-column Concentration Techniques in Capillary Electrophoresis Using Polymer Solutions" ***G.I.T. Lab. J.*** 2003**,** ***8*****, XX.**

五**. Chiu, T. -C., Lin, Y. -W., Huang, C. -C., Chrambach A., and Chang, H. -T., "A Simple and Sensitive Method for Rapid Analysis of SDS-protein Complexes by Capillary Electrophoresis Using Laser-induced Fluorescence of SYPRO Red Dye for Detection"** ***Electrophoresis*** 2003**, 24, (in press).**

6. Lin, Y. -W., Chiu, T. -C., Chang, H. -T. "Laser-Induced Fluorescence Techniques for DNA and Proteins Separated by Capillary Electrophoresis" ***J. Chromatogr. B*** 2003**, in press.**

另外我們亦訓練了五位博士生及八位碩士生，其中有一位完成一篇博士論文和四位完成四篇碩士論文。

六、參考資料

1. Wilkins, M. R., Sancgez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humpery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., Willams, K. L. ***Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*** **1996,** ***13*****, 19.**

2. Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sancgez, J.-C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humpery-Smith, I., Willams, K. L., Hochstrasser, D. F. ***Bio/Technology*** **1996,** ***14*****, 61.**

3. Liang, P., Pardee, A. B. ***Science*** **1992,** ***257*****, 967.**

4. Piubelli, C., Galvani, M., Hamdan, M., Domenici, E., Righetti, P. G. *Electrophoresis* 2002, *23*, 298.

5. Feng, B., McQueney, M. S., Mezzasalma, T. M., Slemmon, J. R. *Anal. Chem.* 2001, *73*, 5691.

6. Manabe, T. *Electrophoresis* 1999, *20*, 3116.
7. Tseng, W. -L., Chang, H. -T. *Anal. Chem.* 2000**, *72*, 4805.**
8.Tseng, W. -L., Hsieh, M. -M., Wang, S. -J., Huang, C. -C., Lin, Y. -C., Chang, P. -L., Chang, H. -T. *J. Chromatogr. A* 2001**, *927*, 179-190.**
9. Hsieh, M. -M., Hsu, C. -E., Tseng, W. -L., Chang, H. -T. *Electrophoresis* 2002**, *23*, 1633-1641.**