行政院國家科學委員會專題研究計畫　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

(3/3)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC92-2113-M-002-051-
執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 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：完整報告
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 93 年 8 月 16 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 （3/3）

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：■個別行計畫　□整合型計畫

計畫編號： NSC 92-2113-M-002-051

執行期間： 92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人： 張煥宗

一、中文摘要：

我們利用分段注入的方式在樣品進入毛細管之前先行引入一段含有 0.1%SDS 的溶液塞，在電滲流及 NaCl 的存在下，利用 0.6%的 PEO 可注入大量的樣品(達 1/3 的有效毛細管長度)，此樣品堆積效應則明顯地反映在牛血清白蛋白及酪蛋白偵測極限的降低（0.35 nM 及 0.10 nM），其線性範圍則從 10 nM 到 5 μM。我們亦將此法應用於偵測牛奶中之酪蛋白，其含量為 0.45 ± 0.03 mM（n = 5）。另外，我們亦提出在非連續性條件下，用毛細管電泳雷射誘導螢光（Nd:YAG laser at 266 nm）方法同時分析生物胺及其代謝物（酸）。在注入大體積樣品後（15 kV for 360 s），由於 pH、黏度和電場的變化，酸和胺會分別在樣品之陽極及陰極端作堆積。此方法可達到偵測極限約為 0.27 nM (5-hydroxytryptamine)和 0.31 nM (5-hydroxyindole-3-acetic acid)，其堆積效率分別約為 400- and 800 倍（和樣品於 1 kV 注射 10 秒之結果相比）。

二、英文摘要：

This paper describes a segmental filling method for the analysis of SYPRO Red labeled SDS-proteins (SRSP) by CE-LIF with electroosmotic counterflow of poly(ethylene oxide) (PEO). It is shown that SDS and salt play a crucial role in determining the fluorescence intensity of the SRSP. When using a background electrolyte of 0.6% PEO in TB buffer containing NaCl, electroosmotic counterflow of the analytes allows one to concentrate large sample volumes (up to 1/3 of effective capillary length) in 21 min, with detection of 0.35 and 0.10 nM for bovine serum albumin and casein, respectively. With a linear dynamic range from 10 nM to 5 μM, this method provides capability of determining the concentration of casein in cow's milk as 0.45 ± 0.03 mM (n = 5). We also present on-line concentration and separation of amines and acids by capillary electrophoresis (CE) in conjunction with laser-induced fluorescence using a Nd:YAG laser at 266 nm under discontinuous conditions. After injecting a large-volume sample, amines and acids were separately stacked at the front (cathodic side) and back (anodic side) of the acidic sample zone, mainly because of the changes in their electrophoretic mobilities as a result of changes in pH, viscosity, and electric field when high voltage was applied. With sample injection at 15 kV for 360 s, the limits of detection (LODs) for 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) were 0.27 and 0.31 nM, respectively, which were about 400- and 800-fold sensitivity improvements when compared to those injected at 1 kV for 10 s.

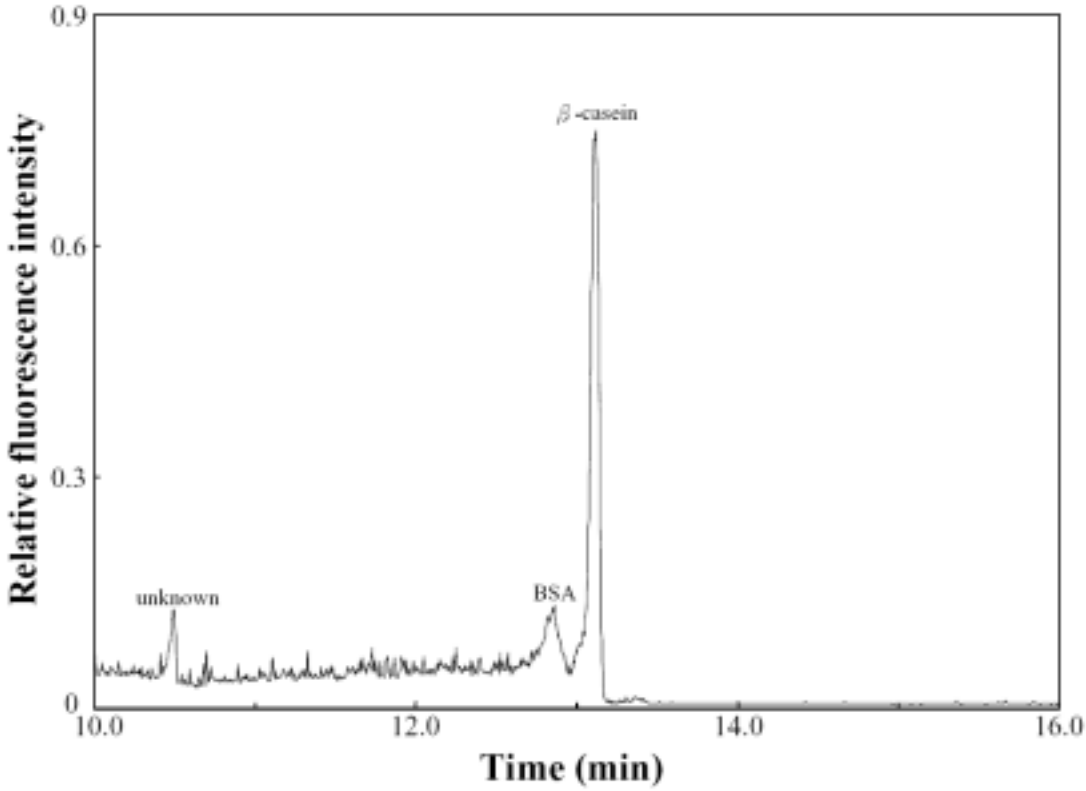
三、計畫緣由與目的：

由於近年來蛋白質體學（proteomics）的研究進展快速，諸多關於蛋白質體學的學門更是日漸受到各領域之重視，蛋白質體學大致上可分類為比較不同樣品間圖譜表現的 profiling proteomics、研究蛋白質在生物體內如訊號傳導、生理調節等特殊功能的 functional proteomics、專門於蛋白質立體結構之探索的 structural proteomics [1]，縱觀上述廣闊的學門範圍，若沒有適當的分析工具可用則無論何種類型的蛋白質體研究勢必是繁重且困難的。有鑑於此，我們期望仰賴過去分析 DNA 及蛋白質所累積下來的成功經驗[2-4]，開發一個簡易、快速且靈敏的蛋白質分析工具，期許對蛋白質體學的進展上貢獻棉薄之力。

根據文獻的記載，腦脊髓液中的某些胺基酸在神經傳導方面著實扮演著舉足輕重的角色[5-10]。回顧前人針對分離、偵測胺基酸所做的研究中，絕大部份需要先對樣品進行透析的工作藉此去除蛋白質及鹽類，避免其對衍生化及分離的干擾。因此本實驗的目的之一即期望能夠在不經任何處理的情況之下，直接以毛細管電泳雷射誘導螢光方法分析尿液樣品或衍生化後腦脊髓液。另外，我們也比較不同病人間腦脊髓液的胺基酸圖譜，希望能夠將此技術應用於輔助診斷及病情監控上。

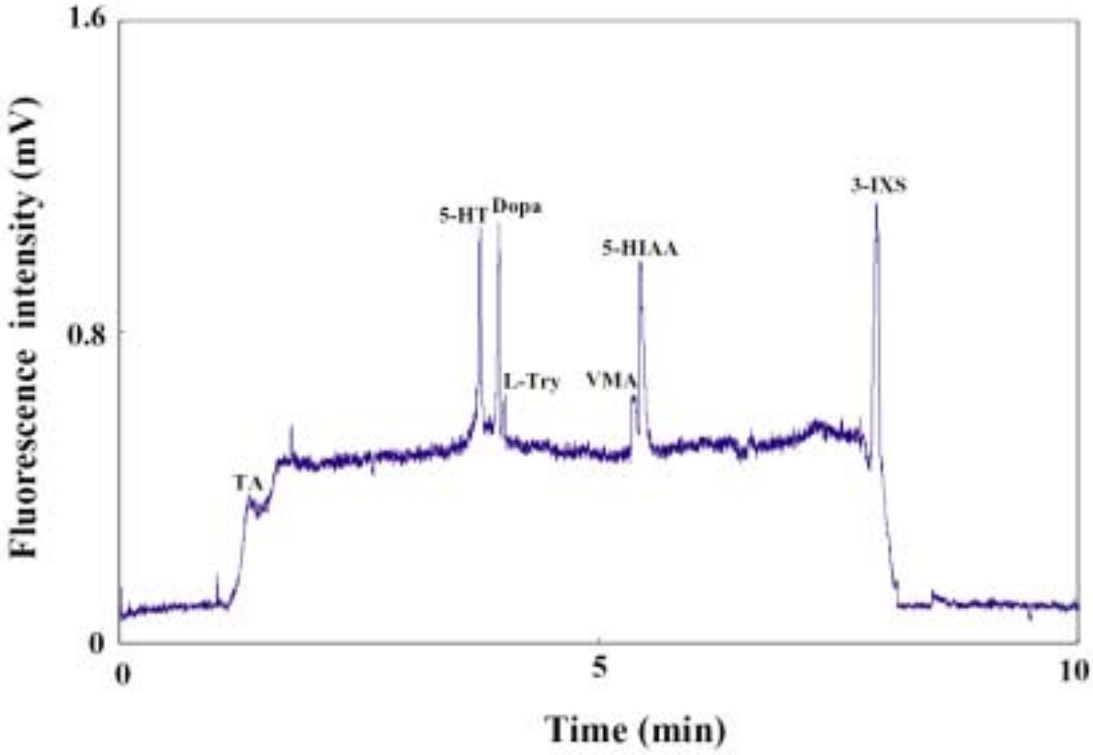
四、結果與討論：

一、 此實驗我們證實在注入樣品之前，先行引入一段 0.1% SDS 確實有助於樣品的堆積，並使牛血清白蛋白的偵測極限達到 0.35 nM，酪蛋白的偵測極限則為 0.10 nM，其線性範圍則從 10 nM 到 5 μM。而我們亦將此法應用於偵測牛奶中酪蛋白，其含量為 0.45 ± 0.03 mM（n = 5），如下圖所示：



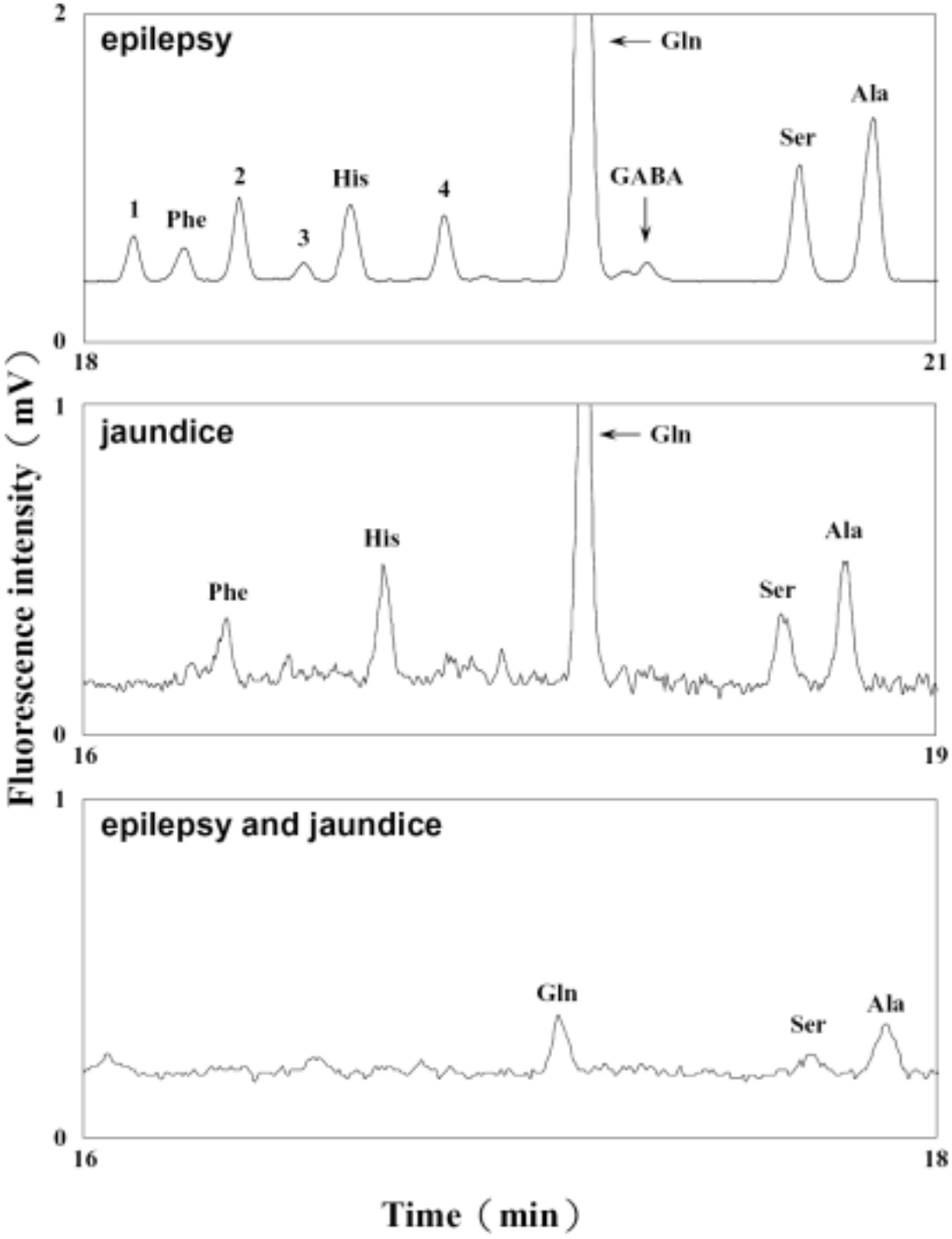
二、 在非連續性條件下，用毛細管電泳雷射誘導螢光（Nd:YAG laser at 266 nm）方法同時分析生物胺及其代謝物（酸）。在將大體積樣品（溶於酸性緩衝溶液中；15 kV for 360 s）注入於填有鹼性緩衝溶液之毛細管後，由於 pH、黏度和電場的變化，酸和胺會

分別在樣品之陽極及陰極端作堆積。此方法可達到偵測極限約為 0.27 nM (5-hydroxytryptamine) 和 0.31 nM (5-hydroxyindole-3-acetic acid)，其堆積效率分別約為 400- and 800 倍（和樣品於 1 kV 注射 10 秒之結果相比)，如下圖所示：



三、 腦脊髓液之胺基酸偵測：在本實驗中我們在引入樣品及低 pH 的溶液塞之後利用電滲流直接將 0.6% PEO（8M）引進毛細管中，由於電滲流和胺基酸遷移的方向相反，因此可藉由聚合物緩衝液達到對胺基酸進行分離的目的。由電泳圖中可以看出不同病症病人之間其腦脊髓液中胺基酸含量都略有差異，其中黃疸病人的胺基酸含量都偏低，而若干癲癇病人的甘胺酸含量則高出正常值範圍。此外，本實驗亦簡化生物樣品繁雜的前處理

步驟，直接以腦脊髓液進行胺基酸的衍生化後立即引入毛細管進行偵測。如下圖所示：



五、計畫成果自評：

本年度的研究計畫，我們以毛細管電泳為基礎，針對分析蛋白質、胺基酸及催化行為的探討，提出新穎的分析觀念，發展數種靈敏的檢測技術。其中部份結果已經發表於化學相關之國外期刊：

1. Chiu, T.-C., Lin, Y.-W., Huang, C.-C. Chrambach, A. and Chang, H.-T. “ A Simple, Rapid, and Sensitive Method for Analysis of SYPRO Red Labeled Sodium Dodecyl Sulfate-Protein Complexes by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence ” *Electrophoresis* **2003**, 24, 1730-1736.
2. Hsieh, M.-M. and Chang, H.-T. “Discontinuous Buffer Systems for Improved Detection of Biological Amines and Acids in Capillary Electrophoresis” *Electrophoresis*, submitted.
3. Lu, M.-J., Chiu, T.-C., and Chang, H.-T. “Determination of amino acids in cerebrospinal fluids by capillary electrophoresis-light emitting diode induced fluorescence” *J. Chromatogr. B*, submitted.

另外我們亦訓練六位博士生及六位碩士生，其中有三位完成三篇碩士論文。

六、參考資料：

1. Figeys, D. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 2891-2905.
2. Tseng, W. -L., Chang, H. -T. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4805-4811.
3. Tseng, W. -L., Lin, Y. -W., Chang, H. -T. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4828-4834.
4. Wang, S. -J., Tseng, W. -L., Lin Y. -W., and Chang, H. -T. *J. Chromatogr. A* **2002**, 979, 261-270.
5. Mally, J., Szalai, G., and Stone, T. W. *J. Neurol. Sci.* **1997**, 151, 159-162.
6. Chan, K. C.; Muschik, G. M.; Issaq, H. J. *J. Chromatogr. A* **1995**, *718*, 203-210.
7. Chang, H.-T.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1079-1083.
8. García, A.; Heinänen, M.; Jiménez, L. M.; Barbas, C. *J. Chromatogr. A* **2000**, *871*, 341-350.
9. Chen, D. -C.; Zhan, D. -Z.; Cheng, C. -W.; Liu, A. -C.; Chen, C. -H. *J. Chromatogr. B* **2001**, *750*, 33-39.
10. Zaugg, S.; Zhang, X.; Sweedler, J.; Thormann, W. *J. Chromatogr. B* **2001**, *752*, 17-31.