

東海大學化學研究所

碩士論文

Master Thesis, Department of Chemistry

Tung-Hai University

指導教授：龍鳳娣 博士

製備抗體與免疫親和性奈米粒子研發檢測骨質流失方法

Preparation of antibodies and Immunoaffinity nanoparticle

development of methods for monitoring bone loss

研究生：張銘軒

中華民國一百年七月

私立東海大學碩士班研究生
論文口試委員審定書

化學系碩士班 張銘軒 君所提之論文

製備抗體與免疫親和性奈米粒子研發檢測骨質流失方法

Preparation of antibodies and Immunoaffinity nanoparticle
development of methods for monitoring bone loss

論文口試委員會 召集人 劉建忠 (簽章)

委員

張玉珍
賴建成
張玉珍
鄭以清

中華民國 100 年 06 月 28 日

私立東海大學碩士班研究生

論文指導教授推薦書

化學系碩士班 張銘軒 君所提之論文

製備抗體與免疫親和性奈米粒子研發檢測骨質
流失方法

Preparation of antibodies and Immunoaffinity
nanoparticle development of methods for
monitoring bone loss

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 龍成祥 (簽章)

100 年 6 月 28 日

謝誌

經歷兩年的研究所生涯，馬上就要進入人生另一個旅程，回顧東海兩年的生活點滴，都是我人生中的珍貴回憶，將伴隨我往後的人生。

本碩士論文得以順利完成，首先要感謝我的恩師龍鳳娣老師，在我的研究所生涯給我適當的協助，不論是在課業上或生活上不時地討論並指點我方向，都使我受益匪淺，其諄諄教誨，永銘於心。

感謝口試期間，劉建忠老師、張玉珍老師、賴建成老師、鄭啟清老師於百忙之中撥冗時間詳閱並於口試時提供寶貴的建議，使本論文能因此更臻完善，在此至上無限謝忱

研究所期間感謝陳丘泓博士，還有陪伴我兩年的同學凱宣、惠玲，在我實驗上卡關的時候提供給我許多意見；以及感謝實驗室的夥伴們，又誠學長，及即將升碩二笠歲、新進碩一柏宗，及陪伴我研究所生涯專題生明月、薇真、聖凱、昀昇、本原、憲夫，還有新進的專題生，由衷的感謝大家的照顧與愛護，因為你們的存在，使得我的世界變得更美好。

最後要感謝我的父母親以及在天上的乾媽，謝謝你們的栽培，在我繁忙的研究所生涯支持著我，給我溫暖與勇氣，謝謝你們無微不至的愛。

摘要

骨質疏鬆症對於停經後之婦女和老年人口是一個嚴重的問題。在目前所有骨骼再吸收作用的生物標記中，第一型膠原蛋白質交聯 N 端胜肽(NTx)是從骨骼膠原蛋白質分解過程中專一性衍生出的最終代謝物質。因此，由尿液排泄出交聯 N 端胜肽(NTx)的速率被認定為象徵骨質再吸收作用非常專一性的指標。本實驗室之前發表的報告，除了應用 ELISA 定量受試者尿液中 NTx 的濃度，以評估受試者骨質流失的情形，也應用表面膜漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 技術定量受試者尿液中 NTx 的濃度，得到與 ELISA 一致的結果。此外，我們依據 epitope-mapping 之原則，設計並合成 10 個 NTx 之胜肽片段(peptides 1 ~ 10)，再應用 SPR 技術分析胜肽和 anti-NTx 抗體間的交互作用，結果顯示抗原決定基是位於 peptide 2 (P2)。因此，本實驗以 P2 胜肽為抗原，製備 P2 之老鼠多株抗體，並與合作之 Biocheck 公司製備 P2 之兔子多株抗體，再應用老鼠與兔子之多株抗體製備免疫親和性奈米粒子，以分離出尿液中的與抗體吸附的胜肽，然後以 MALDI-TOF 質譜法分析定量分離出之胜肽，以期研發檢測骨質流失之生化方法。本實驗中，首先將多株抗體鍵結在奈米粒子之表面，再分離出受試者尿液中的與抗體吸附的胜肽，接著應用質譜法定量其濃度並建立胜肽之濃度與骨質流失情形之相關性。本實驗研發出之方法可以簡化繁瑣的樣品前處理工作，快速地分離出尿液中與抗體吸附的胜肽，所需要的檢體量也較少。此生化方法可以應用於骨質疏鬆症的臨床診斷、治療及預防，對保健食品療效之評估也將有所助益。

關鍵字：骨質疏鬆症、抗體製備、胜肽、多株抗體、奈米粒子、質譜法

Abstract

Osteoporosis is a serious problem of the postmenopausal women and the aged population. Among the biomarkers of bone resorption, type I collagen crosslinked N-telopeptides (NTx) are terminal metabolites specifically derived from bone collagen degradation. Thus, the rate of cross-linked N-telopeptides (NTx) excretion in urine is regarded as a highly specific index for bone resorption. In our previous studies, we quantified the NTx in patient's urine by using commercial ELISA and the surface plasmon resonance (SPR) technology, results obtained from both methods are in good correlation. We applied the principle of epitope-mapping to the design of ten peptide fragments of NTx (peptides 1-10). The interactions between each peptide and anti-NTx antibodies were analyzed by using SPR technology, and results indicated that the epitope for anti-NTx antibodies lies within the peptide 2 (P2). Therefore, the objective of this project was to prepare the mouse polyclonal anti-P2 antibody and rabbit polyclonal anti-P2 antibody (collaborated with Biocheck Inc.,CA, U.S.A), followed by the preparation of immunoaffinity-nanoparticles for isolation of antibody-bound peptides from urines of research subjects. The isolated peptides will be quantified the MALDI-TOF MS for the development of bioanalytical method for monitoring the bone loss. The experimental procedures were as followed: Firstly, the anti-P2 antibodies were conjugated to the surface of nanoparticle to produce the immunoaffinity nanoparticles. Secondly, using the immunoaffinity nanoparticles, the antibody-bound peptides were selectively isolated from urines of the studied subjects. Finally, the isolated antibody-bound peptides were quantified by mass spectrometry and the correlation between the concentration of peptides and the bone loss was determined. The results showed that the method developed in this project did not require the sample pretreatment and could isolate the antibody-bound peptides from urine efficiently, and the amount of urine for measurement was small. Therefore, this bioanalytical method could be useful for applying in the clinical diagnosis, treatment, and prevention of osteoporosis, as well as for the evaluation of functional foods for osteoporosis.

Keywords : Osteoporosis ; Antibody Preparation ; N-telopeptides ; peptide ; nanoparticles ; MALDI-TOF MS

目錄	頁數
中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	XI
第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	4
2-1 骨質疏鬆症簡介.....	4
2-1-1 骨質疏鬆症的分類.....	6
2-1-2 骨質密度檢查法.....	7
2-1-3 骨骼代謝生化指標之測定.....	10
2-2 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法簡介.....	15
2-2-1 MALDI-TOF MS 樣品製備方式與基質功用.....	16
2-2-2 飛行時間質量分析器的原理.....	18
2-2-3 MALDI-TOF MS 的應用.....	22
2-2-4 MALDI-TOF MS 的優勢.....	24
2-3 磁性奈米粒子的簡介.....	25

2-3-1 磁性奈米粒子的性質.....	26
2-3-2 磁性奈米粒子的製備.....	26
2-3-3 磁性奈米粒子的表面修飾.....	27
2-3-4 磁性奈米粒子的應用.....	28
2-4 多株抗體.....	29
2-4-1 多株抗體製備與特性.....	29
2-4-2 抗體與抗原的作用力.....	30
2-5 研究動機及實驗設計.....	31
第三章 材料與方法.....	35
3-1 實驗設計與流程.....	35
3-2 應用固相胜肽合成方法合成胜肽.....	36
3-2-1 固相胜肽合成之實驗材料與設備.....	36
3-2-2 固相胜肽合成之原理.....	36
3-2-3 固相胜肽合成之實驗方法.....	37
3-3 應用逆相高效能液相層析法分離純化胜肽粗產物.....	40
3-3-1 逆相高效能液相層析儀實驗材料與設備.....	40
3-3-2 逆相高效能液相層析儀之原理.....	40
3-3-3 逆相高效能液相層析儀純化粗產物之實驗方法.....	42
3-4 多株抗體之製備.....	44

3-4-1	多株抗體製備之實驗材料與設備.....	44
3-4-2	多株抗體產生之實驗方法.....	45
3-4-3	應用酵素免疫吸附法(ELISA)測試抗體效價.....	46
3-5	應用 P2 胜肽製備親和性管柱老鼠多株抗體純化.....	47
3-5-1	製備親和性管柱之材料與設備.....	47
3-5-2	親和性管柱製備之原理.....	48
3-5-3	製備 P2 胜肽親和性管柱之實驗方法.....	49
3-5-4	應用 P2 胜肽親和性管柱純化老鼠多株抗體之實驗方法	51
3-6	氧化鐵磁性奈米粒子之表面修飾.....	53
3-6-1	氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾之材料方法與設備.....	53
3-6-2	氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾之原理.....	55
3-6-3	氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾檢測之原理.....	56
3-6-3.1	穿透式電子顯微鏡的原理及樣品製備的步驟.....	56
3-6-3.2	FT-IR 的原理及樣品製備的步驟.....	57
3-6-3.3	Ninhydrin reaction 實驗方法.....	58
3-6-3.4	Coomassie Brilliant Blue protein assay 的原理.....	58
3-6-4	氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾之實驗方法.....	59
3-6-4.1	氧化鐵(Fe_3O_4)表面矽化處理.....	59

3-6-4.2	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ MNPs 修飾表面官能基(NH ₂).....	60
3-6-4.3	Fe ₃ O ₄ @NH ₂ MNPs 接上多株抗體的表面修飾.....	60
3-6-5	應用多株抗體親和性奈米粒子萃取尿液檢體.....	61
3-6-5.1	應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取分析骨質 疏鬆症患者之尿液檢體.....	61
3-6-5.2	應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取分析自願 者之尿液檢體.....	62
3-6-5.3	應用老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取分析自願 者之尿液檢體.....	63
3-7	質譜儀操作條件及實驗材料與基質溶液配製.....	64
3-8	研究對象之尿液檢體的來源.....	66
3-8-1	臨床上評估出骨質疏鬆症病患之尿液檢體.....	66
3-8-2	自願者之尿液檢體.....	66
3-9	以磁性奈米粒子萃取尿液序列之檢量線製作.....	67
第四章	結果與討論.....	68
4-1	P2 胜肽之合成、純化與鑑定分子量實驗結果.....	68
4-2	Mouse anti-P2 多株抗體效價之確認.....	71
4-3	製作 P2 胜肽之親和性管柱.....	75
4-4	應用 P2 胜肽製備之親和性管柱純化老鼠血清.....	76

4-5 氧化鐵磁性奈米粒子 (Magnetic nanoparticle, MNPs)表面修飾	79
4-6 氧化鐵($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{NH}_2$)奈米粒子與兔子和老鼠 anti-P2 多株抗體結合	86
4-7 應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取尿液檢體	87
4-8 應用老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取尿液檢體	110
4-9 應用兔子和老鼠之親和性奈米粒子萃取尿液檢體後訊號強度之檢量線製作	125
第五章 結論與未來展望	128
參考文獻	129

圖目錄

圖(一) 骨頭重新塑造之循環圖.....	5
圖(二) 直線型飛行管柱.....	21
圖(三) 反射型飛行管柱.....	21
圖(四) N-telopeptide (NTx)的胺基酸序列.....	33
圖(五) 實驗設計與流程圖.....	35
圖(六) 固相胜肽合成之實驗流程圖.....	39
圖(七) 親和性層析法的作用流程圖.....	49
圖(八) 合成胜肽 P2 粗產物之質譜圖.....	69
圖(九) P2 胜肽粗產物之 RP-HPLC 層析圖.....	70
圖(十) P2 胜肽純化後之 RP-HPLC 層析圖.....	70
圖(十一) 純化後合成胜肽 P2 之質譜圖.....	71
圖(十二) 競爭型酵素免疫分析方法偵測抗體之流程圖.....	73
圖(十三) 競爭型酵素免疫分析方法測得抗體之直線長條圖.....	74
圖(十四) P2 胜肽經由共價性修飾至固相基質上之簡圖.....	75
圖(十五) P2 胜肽之 UV 吸收光譜圖.....	75
圖(十六) P2 胜肽與基質結合後之 UV 吸收光譜圖.....	76
圖(十七) 老鼠血清通過 P2 胜肽製備親和性管柱之流程圖.....	77
圖(十八) 氧化鐵磁性奈米粒子之表面修飾流程及結構.....	80

圖(十九) 氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾前後之 TEM 影像圖.....	81
圖(二十) 市售氧化鐵磁性奈米粒子之 FT-IR 圖譜.....	82
圖(二十一) 氧化鐵 (Fe_3O_4)奈米粒子表面經過矽化處理後，以 FT-IR 檢測結果.....	83
圖(二十二) 氧化鐵($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$)奈米粒子表面修飾官能基(NH_2)後， 以 FT-IR 檢測結果.....	84
圖(二十三) 應用 Ninhydrin test 檢測 NH_2 官能基存在與否.....	85
圖(二十四) 兔子多株抗體親和性奈米粒子直接以 MALDI-TOF MS 偵 測之質譜訊號.....	88
圖(二十五)研究對象之尿液檢體以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號	89
圖(二十六) 研究對象之尿液檢體 125 μL 經由免疫親和性萃取法萃取 後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號.....	90
圖(二十七)~圖(二十九)編號 TCVGH-008~TCVGH-010 受試者尿液檢 體分別以 125、100、75、50、25 μL 以兔子多株抗體親和性 奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號.....	91
圖(三十) 自願者之尿液檢體以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號	96
圖(三十一) 自願者之尿液檢體 125 μL 經由兔子抗體免疫親和性萃取 法萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號.....	97

圖(三十二)~圖(三十八)所有自願者尿液檢體分別以 125、100、75、50、 25 μ L 以兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI- TOF MS 偵測之質譜訊號.....	98
圖(三十九) 老鼠多株抗體親和性奈米粒子直接以 MALDI-TOF MS 偵 測之質譜訊號.....	111
圖(四十) 自願者之尿液檢體 125 μ L 經由老鼠抗體免疫親和性萃取法 萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號.....	112
圖(四十一)~圖(四十七)所有自願者尿液檢體分別以 125、100、75、50 μ L 以老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI- TOF MS 偵測之質譜訊號.....	113
圖(四十八)所有受試者尿液檢體以兔子多株抗體親和性萃取之訊號 強度與尿液量作圖.....	127
圖(四十九)自願者尿液檢體以老鼠多株抗體親和性萃取之訊號強度 與尿液量作圖.....	127

表目錄

表(一) 世界衛生組織根據骨質密度水平對於骨質疏鬆症的分級方式.....	9
表(二) 骨質生成的生化指標、樣品來源及分析方法.....	12
表(三) 骨質再吸收的生化指標、樣品來源及分析方法.....	13
表(四) 常用的 MALDI 基質之結構及適用之分析物.....	18
表(五) 依據 epitope mapping 原則設計的胜肽之胺基酸序列.....	33
表(六) 應用 ELISA 與 SPR 來探討 anti-NTx 抗體與 10 段線狀之 NTx 胜肽片段之結合能力.....	34
表(七) 應用 SPR 探討 10 段線狀之 NTx 片段與 anti-NTx 抗體間之交互作用.....	34
表(八) 固相胜肽合成(SPPS)所需之試劑耗材及儀器設備.....	36
表(九) RP-HPLC 實驗過程中，所需之試劑、設備與購買廠商.....	40
表(十) 免疫老鼠實驗過程中，所需之實驗材料及設備.....	44
表(十一) 製備親和性管柱所需之試劑、耗材及設備.....	47
表(十二) 氧化鐵磁性奈米粒子(Fe_3O_4 MNPs)表面修飾所需之試劑耗材及儀器設備.....	53
表(十三) MALDI-TOF MS 操作參數設定一，用於鑑定胜肽分子量..	64
表(十四) MALDI-TOF MS 操作參數設定二，用於磁性奈米粒子萃取	

蛋白質.....	65
表(十五) 台中榮民總醫院潘建州醫師提供之尿液檢體受試者資料.....	66
表(十六) 東海大學化學系提供自願者之尿液檢體受試者資料.....	66
表(十七) 利用競爭型酵素免疫分析方法檢測老鼠血清效價之結果.....	74
表(十八) 使用 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit 競爭 型酵素免疫方法，P2 標準品在 OD 450 nm 吸收值.....	78
表(十九) 利用競爭型酵素免疫分析檢測老鼠血清經過純化步驟後之 結果.....	78
表(二十) 測定兔子和老鼠 Anti-P2 多株抗體與奈米粒子結合前後，以 微量盤分光光譜儀(ELISA)檢測樣品在 595 nm 時分析物的吸 收值.....	86
表(二十一) 骨質疏鬆症病患尿液檢體經由兔子多株抗體奈米粒子萃 取後，MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強 度，經一天三次取其平均值.....	94
表(二十二) 自願者尿液檢體(125 μ L)經由兔子多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均 後之平均值.....	105
表(二十三) 自願者尿液檢體(100 μ L)經由兔子多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均	

後之平均值.....	106
表(二十四) 自願者尿液檢體(75 μ L)經由兔子多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均 後之平均值.....	107
表(二十五) 自願者尿液檢體(50 μ L)經由兔子多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均 後之平均值.....	108
表(二十六) 自願者尿液檢體經由兔子多株抗體奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號度，經 一天三次取其平均值.....	109
表(二十七) 自願者尿液檢體(125 μ L)經由老鼠多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均 後之平均值.....	120
表(二十八) 自願者尿液檢體(100 μ L)經由老鼠多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均 後之平均值.....	121
表(二十九) 自願者尿液檢體(75 μ L)經由老鼠多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均 後之平均值.....	122

表(三十) 自願者尿液檢體(50 μ L)經由老鼠多株抗體親和性奈米 粒子萃取後，檢測之訊號強度經一天三次平均及三天平均 後之平均值.....	123
表(三十一) 自願者尿液檢體經由老鼠多株抗體奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度， 經一天三次取其平均值.....	124

第一章 前言

骨質疏鬆症是一種骨骼強度減弱而導致骨折危險性提高的疾病，是普遍存在停經後婦女及老年人的臨床問題，導致骨折發生率隨著年紀而明顯增高，且在停經後持續攀升。

骨骼是藉由兩種對抗過程讓骨頭不斷的重新塑造，即骨的生成和骨的再吸收，這些程序是依靠破骨細胞 (osteoclasts)，造骨細胞 (osteoblasts)和成骨細胞 (osteocytes)的活動，正常情況下會進行骨的溶蝕作用，骨的生成作用及骨的維護作用，在正常情況下，這些作用會達到平衡。但過了四十歲以後，因老化或其它因素，骨質代謝速率會提高，溶蝕作用大於生成作用速率，兩種作用無法達到平衡而導致骨質疏鬆症增加，隨著人類壽命的延長，骨質疏鬆症已是全球第二大的重要流行病，僅次於心血管疾病。其後果是發生各部位之骨折，而其中以脊椎體及髖部骨折最為嚴重。台灣地區流行病統計調查結果發現：65 歲以上之台灣城市婦女，19.8 %已有脊椎體壓迫性骨折；男性則為 12.5 %。以骨質密度狀況，停經後婦女骨質疏鬆症的發生率約為 30 %，從健保局資料顯示台灣地區 50 歲以上成人骨質疏鬆症診斷比率約為男性 1.63 %，女性 11.35 %¹。但是 1996-2000 年的健保資料發現國人髖骨骨折 (hip fracture)比率卻為亞洲地區之冠。可見骨質疏鬆症對國人健康影響之重要性。

依全民健保資料，2001 年 65 歲以上男性每年髖部骨折約為 5000 例，女性則約為 7000 例。若依 2006 年台灣平均壽命女性為 80.8 歲及男性 74.6 歲推估而言，大約三分之一的台灣婦女在一生中會發生一次脊椎體、髖部或腕部之骨折；男性也約有五分之一的風險，即使因年齡分佈之差別，這樣的流行率，已經屬於高流行率地區。

本實驗室多年研究並探討 NTx 胜肽片段與其抗體間交互作用。依據 epitope mapping 之原則，設計 10 段線狀且具有 6 個胺基酸重複序列的 NTx 胜肽片段，分別命名為 peptides 1 ~ 10，並成功地建立胜肽合成之實驗步驟及流程。運用固相胜肽合成的技術 (solid phase peptide synthesis) 中 Fmoc chemistry 之合成方法，合成胜肽片段。合成出之胜肽粗產物混合物，利用逆相高效能液相層析法 (reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 分析其層析圖譜。並應用半製備 (semi-preparative) C₁₈ 管柱純化出粗產物混合物中的每一個胜肽溶液，經過冷凍乾燥後得到每一胜肽的最終純產物。胜肽的最終純產物經由質譜儀 (MALDI-TOF MS) 鑑定其正確的分子量後，利用表面膜漿共振技術 (surface plasmon resonance; SPR) 分析純化之胜肽與 anti-NTx 抗體間的交互作用，結果發現 peptides 1、2 和 3 與 anti-NTx 抗體間有較高的親合力。基於 SPR 探討胜肽與 anti-NTx 抗體間之交互作用的結果，我們推測抗體之抗原決定基 (epitope) 位於

peptide 2。因此，本實驗室與美國 Biocheck 公司合作，委託製備 peptide 2 (P2)之多株抗體 (rabbit polyclonal anti-P2 antibody)。因此，在本研究中，應用兔子多株抗體及自行製備老鼠多株抗體與表面經過修飾的磁性奈米粒子結合，用來純化病患尿液檢體及正常人尿液檢體中的胜肽及蛋白質，藉由抗體與抗原具專一性結合作用，捕捉尿液中具有親和性之蛋白質，應用 MALDI-TOF MS 的技術偵測出最顯著的訊號分子量，以此訊號之相對強度，製作出檢量線，以便區別病患尿液中及正常人生化指標，本研究有助於未來開發檢測骨質流失情形，對於骨質疏鬆症的預防治療及診斷有所助益。

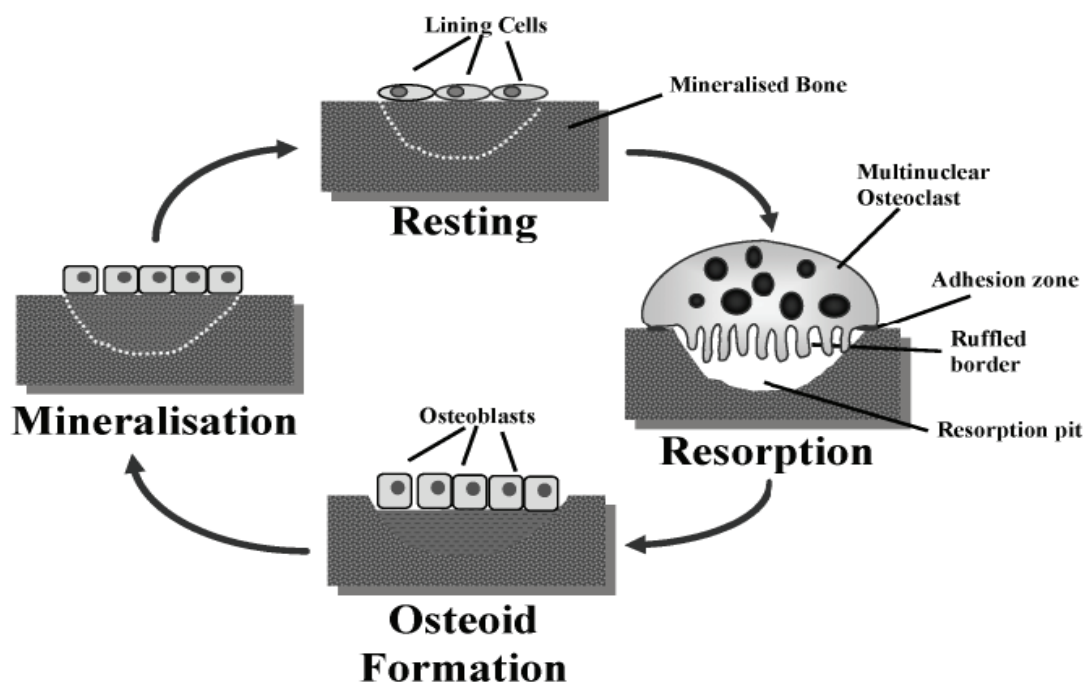
第二章 文獻探討

2-1 骨質疏鬆症簡介

骨質疏鬆症是一種「骨質減少之症候群」，除了骨質異常減少外，骨骼中佈滿了孔隙，導致骨骼逐漸變得脆弱，增加髖部、脊椎和腕部等骨折危險性。骨頭的密度下降，致使骨頭內部形成許多空隙，無論男性或女性，骨骼的新陳代謝在各年齡時期會呈現不同的狀態，因此的骨骼生成與再吸收的速度也會有所變化，一般在 30~35 歲左右達到一生中的最高骨量，稱為尖峰骨質含量。骨量達最高峰後，成年人每年骨質流失率約為 1%，但停經後早期婦女每年流失骨質流失率為 2%~3%，在停經後經過大約五年，婦女骨質流失速率減低為每年約流失 1%，在 55 歲到 75 歲期間，約有總骨量的 20% 會流失²。這種快速的骨質流失，會導致日後的骨質疏鬆症，所以世界各地都密切注意骨質疏鬆症的防治工作。骨質疏鬆症是可以預防、可以治療的疾病，最重要的把可能發生的高危險群找出來，先做預防。

人體骨骼中存在著兩種重要的細胞，造骨細胞 (osteoblast)及破骨細胞 (osteoclast)，其中造骨細胞負責形成新骨質，增加骨骼密度，而破骨細胞則專門用來破壞骨骼，使骨內鈣質流出，增加血鈣濃度，這兩種細胞交互作用的過程，稱之為骨頭重新塑造³(圖一)。一般而言，四十歲以前，兩種細胞的作用一般會維持平衡消長狀態，但是如

果新骨骼的堆積形成太多，骨骼會變得過於厚重，容易導致骨刺的產生；反之四十歲之後兩種細胞的功用均會衰退，其中造骨細胞的衰退速度遠大於破骨細胞，於是骨質開始流失，此時骨頭內部形成許多疏鬆的空隙，容易產生骨折，進而使骨質發生疏鬆的狀況。



圖(一)、骨頭重新塑造之循環圖。

2-1-1 骨質疏鬆症的分類

常見的骨質疏鬆症主要分為二大類，第一類為原發性骨質疏鬆症，它是隨著年齡的增長必然發生的一種生理性退化病變(老化、停經等引起)。第二類為繼發性骨質疏鬆症，它是由其他疾病或藥物等一些因素所誘發的骨質疏鬆症⁴。

第一類原發性骨質疏鬆症又可分為第一型骨質疏鬆症及第二型骨質疏鬆症兩種：

第一型骨質疏鬆症，是停經後骨質疏鬆症 (postmenopausal osteoporosis)，約在停經後 15 至 20 年達到最高峰，主要發生原因是缺乏女性荷爾蒙而使得骨骼對副甲狀腺荷爾蒙的感受度增加，加速鈣由骨中溶解出來。

第二型骨質疏鬆症，是老年性骨質疏鬆症 (senile osteoporosis)。主要發生在 70 歲以上的老年人，因腎臟無法合成足夠的維生素 D 而減少骨質的形成。也因維生素 D 減少，使得鈣質的吸收下降、副甲狀腺荷爾蒙上升，加速鈣由骨中溶解出來，導致骨質疏鬆更嚴重。

第二類繼發性骨質疏鬆症成因很多，主要為體內性激素濃度降低、鈣的攝取量低、維他命 D 不足、身體運動量減少、酗酒與飲食習慣不良、長期臥床沒運動、吸收不良症候群等，這些原因都會造成骨骼分解速度大於生成速度，因而加速了骨質疏鬆的發展。

2-1-2 骨質密度檢查方法

骨質密度 (bone mineral density ; BMD)檢查是評估骨質健康狀況的最佳指標，該檢查可以用來發現骨質疏鬆症，判斷您未來發生骨折的風險，以及評估骨質疏鬆症治療的效果。目前常用來測量骨質密度的方法包括：

(1) 單光子吸收測量 (single-photon absorptiometry ; SPA)⁴

單光子吸收測量早在三十年前就開始使用，最常被用來測量如橈骨及跟骨之類的周邊骨骼，其能源通常用放射性同位素(如 I-125)提供。近年來則常用 X 光來取代 SPA，因為光子能量可被軟組織吸收，因此測量時會將前臂或腳跟浸泡在水中，計算骨骼對光子不同的吸收程度。其骨密度是以公克或 g/cm^2 表示。

(2) 雙光子吸收測量 (dual-energy photon absorptiometry ; DPA)⁴

使用放射性同位素(如 Gadolinium 153)，由兩個不同的能量，針對有軟組織的部位進行測量，因此用來測量腰椎、髖部、前臂及全身鈣含量。其骨質密度是以單位面積的骨鈣質量(g/cm^2)表示。

(3) 雙能量X射線吸收測量 (dual-energy X-ray absorptiometry ; DXA)

DXA的光子能源使用放射性X光為能源，其光子流量比DPA，因此對物件的邊緣有較準確的測量。此測量方法較快且準確，結果通常以單位面積的骨鈣質量 (g/cm^2)表示骨質密度 (BMD)。

(4) 放射線骨密度測量 (radiographic densitometry)

X-光檢查可以用來準確地測量掌骨的密度，其結果與測量其他部位的骨密度有良好的相關性，因此也可用來評估骨折的危險性，但必須先取得整個族群的預測值。

雙光子吸收測量 (DPA)或雙能量 X 光吸收測量 (DXA)檢查是目前受到最廣泛認可的骨質密度檢查，其中 DXA 檢查可測定病患的骨質密度。將病患的骨質密度與已經確立的骨質密度平均值或標準值進行比較，可以計算出一個比較值。任何骨質密度檢查都不會百分之百準確；但如果醫生要預測病患未來發生骨折的風險高低，DXA 檢查是最重要的判斷依據，世界衛生組織 (WHO)對骨質疏鬆症的分級方式如表(一)。

表(一) 世界衛生組織根據骨質密度水平對於骨質疏鬆症的分級方式

正常	骨質密度與健康年輕人的平均骨質密度相比較，差異小於 1 個標準差 ($BMD \geq -1 SD$)
骨質不足	骨質密度低於健康年輕人的平均骨質密度，介於 1 至 2.5 個標準差之間 ($-2.5 SD \leq BMD \leq -1 SD$)
骨質疏鬆	骨質密度低於健康年輕人的平均骨質密度，差值達到或超過 2.5 個標準差 ($BMD \leq -2.5 SD$)
嚴重骨質疏鬆	骨質密度低於健康年輕人的平均骨質密度，差值超過 2.5 個標準差，並且發生一個以上的骨質性骨折 ($BMD < -2.5 SD$)

附註：SD：Standard deviation，標準偏差。

BMD：bone mineral density，骨質密度。

DXA 的臨床測量上常見之兩個統計值：

T-Score：骨質密度與健康年輕人的平均骨質密度相比較之標準差，

T 評分低於 0，用負數表示，而負數的值越大，表示骨質密度越低，骨折風險也越高。

Z-Score：骨質密度與同年齡人的平均骨質密度相比較之標準差，但

年齡較大的成年人骨質密度較低；所以，將骨質密度與同年齡人的平均骨質密度進行比較，比較的結果可能會有所誤導，主要還是會有續發性骨質疏鬆所影響。

2-1-3 骨骼代謝生化指標之測定

骨骼代謝異常是骨質疏鬆症、軟骨症等常見骨病的基本致病機轉。骨骼代謝的參數，即血清或尿液中的骨骼代謝指標 (bone markers) 在臨床上之應用日漸廣泛³。骨骼代謝指標之種類可分為骨質生成生化指標 (bone formation markers) 與骨質再吸收生化指標 (bone resorption markers) 兩種。

人體中骨質生成生化指標包括下列各項如表(二)：

- (1) 血清中鹼性磷酸酶 (serum total and bone specific alkaline phosphase, BSAP)：血液中的 Alk-P 可來自造骨、肝臟、腸道、腎臟、和胎盤等細胞，因此測量血清鹼性磷酸酶來評估骨質代謝情形較不理想，BSAP 大量存在於造骨細胞表面，是一種對骨骼具有專一性之醣蛋白，正常情況下，血清中 BSAP 佔血清總 Alk-P 濃度之 30 %~60 %，其功能可能與骨骼的礦化有關，故可作為較準確的骨質生成指標。
- (2) 血清中的骨鈣素 (serum osteocalcin)：骨鈣素是骨骼內非膠原蛋白中含量最多的一種，又稱 (bone gla protein, BGP)。由造骨細胞所合成，在進入骨骼基質內時部分片段進入血液中，故可作為一種骨質生成的指標。
- (3) 血清中第一型前膠原延長胜肽 (procollagen I extension peptides)：第

一型前膠原蛋白之碳及氮端原胜肽 (procollagen carboxy-terminal propeptide, PICP ; procollagen amino-terminal propeptide, PINP) 骨骼基質中，約有 90 % 為膠原蛋白⁵，而膠原蛋白中有 97 % 為第一型膠原蛋白，在第一型前膠原蛋白 (procollagen) 合成後埋入基質前 C 和 N 端 propeptide (原胜肽) 會被切掉，故測量骨骼中第一型前膠原蛋白被分解時的最終產物 PICP、PINP 可作為骨質生成之指標^{3,6}。

人體中骨質再吸收的生化指標包括下列各項如表(三)：

- (1) 空腹時尿液中的鈣量和羥基脯氨酸 (fasting urinary calcium and hydroxyproline)。
- (2) 尿液中的羥基離胺酸配糖 (urinary hydroxylysine glycoside)。
- (3) 尿液中所排泄的膠原交叉連結物 (urinary excretion of the collagen pyridinium crosslink)。膠原交叉連結物：比林二酚胺 (pyridinoline, Pyd) 和去氧比林二酚胺 (deoxypyridinoline, Dpd) 為膠原蛋白的三股 α 多胜肽鏈上的離胺酸及羥基離胺酸之共價鍵結環狀結構。經由人體代謝，Pyd 和 Dpd 最終產物進入血液中，故可作為骨質分解指標。
- (4) 氮及碳末端胜肽 (N-telopeptide, NTx ; C-telopeptide, CTx) : NTx 和 CTx 是骨骼中第一型膠原蛋白之 α 多胜肽氮末端及碳末端結構，經過人體代謝後，在尿液中約有 60 % 與胜肽鍵結的型式存在，包括與 Pyd 交錯聯結之 NTx 及 CTx，故可作為骨質分解的指標^{3,7}。

表(二)骨質生成的生化指標、樣品來源及分析方法⁸⁻¹¹

生化指標	樣品	分析方法
Bone-specific alkaline phosphatase (BAP, bone ALP) 血清鹼性磷酸酵素	Serum	IRMA EIA
Osteocalcin (OC) 骨鈣素	Serum	RIA IRMA ELISA
C-terminal propeptide of type I procollagen (PICP) 前膠原羧基端胜肽	Serum	RIA ELISA
N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) 前膠原胺基端胜肽	Serum	RIA ELISA

ELISA：酵素連結免疫吸附測量法；RIA：放射免疫分析測量法

EIA：酵素免疫測定法；IRMA：免疫放射分析測量法

表(三)骨質再吸收的生化指標、樣品來源及分析方法^{12, 13}

生化指標	樣品	分析方法
Hydroxyproline 羥基脯氨酸	Urine	HPLC
Carboxyterminal crosslinked telopeptide of type I collagen (ICTP, CTx-MMP)	Serum	RIA
Pyridinoline (PYD) 游離比琳二酚胺	Urine Serum	HPLC ELISA
Deoxypyridinoline (DPD) 去氧游離比林二酚胺	Urine Serum	ELISA
Carboxy terminal crosslinked telopeptide of type I collagen (CTX-I) 第一類型膠原聯鍵結的C端胜肽片段	Urine Serum	ELISA RIA
Amino terminal crosslinked telopeptide of type I collagen (NTX-I) 第一類型膠原聯鍵結的N端胜肽片段	Urine Serum	ELISA CLIA RIA

HPLC : High performance liquid chromatography

(高效能液相層析技術法)

CLIA : Chemiluminescent immunoassay (化學發光免疫測定法)

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

(酵素連結免疫吸附測量法)

RIA : Radioimmunoassay (放射免疫分析測量法)

目前已有許多骨質代謝的生化指標被作為檢測骨質代謝的依據，可分為骨質生成指標及骨質再吸收指標。而骨質再吸收的生化指標當中較重要的為膠原蛋白降解的產物，就像是羧脯胺酸或其他不同的膠原交互連接末端胜肽，當中的第一類型膠原蛋白交聯鍵結的 N 端胜肽片段 (type I collagen cross-linked N-telopeptides ; NTx)和 C 端胜肽片段 (type I collagen cross-linked C-telopeptides ; CTx)是目前較具有特異性的生化指標之一。而目前骨質代謝的生化指標檢測方法中主要還是以酵素連結免疫吸附分析方法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)居多，將 NTx 跟 CTx 製作成抗體來跟血液或尿液中的 NTx 跟 CTx 抗原結合後，再根據偵測到結合的濃度來監測病患的骨質流失的嚴重程度³，其中一種利用酵素連結免疫吸附分析方法進行檢測 NTx 的套組 (Osteomark®)是由 Dr. Hanson 於 1992 年所研發¹⁴，已通過美國國家食品藥物管理局 (Food and Drug Administration ; FDA) 之核准，由 Johnson & Johnson 公司負責製造上市，對 NTx 宣稱具有特異性及敏感性。套組中的單株抗體能辨識人體第一型膠原蛋白中的 NTx，因此可應用於酵素連結免疫吸附分析方法來檢測人體所代謝出的 NTx，但檢查費用需自付。目前仍無法達到優良篩檢試劑的簡單方便和經濟實惠之要求，因此許多學者致力於開發更優良且快速的骨質疏鬆症檢測方法。

2-2 基質輔助雷射脫附游離-飛行時間式質譜法(MALDI-TOF MS)

雷射脫附法起源於 1960 年代，利用高能量的雷射光束 (UV 和 IR)直接照射於分析物表面上，使得分析物分子表面脫附出完整的氣相離子，因而用質譜儀加以分析。1978 年科學家 M. A. Posthumus 等人利用雷射脫附質譜法 (LD-MS)成功的分析核苷酸、胺基酸、胜肽、糖類等較小的生化分子之研究，其方法是將高能量的雷射光束照射在固體表面上，可從表面脫附出完整的離子，由於雷射的能量很高，而產生許多片段離子，進而造成圖譜出現雜訊使得辨別上的困難，直到 1985 年時，德國科學家 Michael Karas 和 Franz Hillenkamp 引進以基質來輔助分析物脫附游離的理念，以色胺酸 (Tryptophan) 和尼古丁酸 (Nicotinic acid)作為基質，在混合分析樣品後以 Nd:YAG (266 nm)雷射光照射後，得到胜肽分子的訊號，不過此方法卻無法脫附游離較大分子量的分析物，偵測質量的範圍仍侷限於 2000 Da 以下^{15, 16}，在 1987 年的一場學術會議中，日本科學家 Koichi Tanaka 等人利用細微的鈷金屬的奈米粉末 (~300 Å)與甘油混合作為分析蛋白質之基質，利用波長 337 nm 氮氣雷射進行脫附游離，此方法成功脫附了分子量近 14 kDa 溶菌酶 (lysozyme)蛋白質分子¹⁷，並在次年發表了可偵測分子量為 34 kDa 的 carboxypeptidase A 之訊號¹⁸。1988 年德國科學家 Hillenkamp 等人以有機酸做為基質¹⁹，利

用 Nd-YAG (266 nm)雷射，偵測出白蛋白和 albumin cluster 之訊號，將偵測質量範圍提高到 100 kDa。上述日本科學家 Koichi Tanaka 之方法，由於鈷粉末取得不易、價格昂貴且有吸入性傷害，相對德國科學家 Hillenkamp 使用有機酸做為基質，樣品製備簡單又迅速，之後所發展的基質多以有機酸為主，目前已開發的基質有數十種之多。

基質功能是吸收雷射能量，將大多無法吸收雷射光之分析物，利用基質的功能將雷射光能量傳遞給分析物，讓分析物脫附為氣相離子，進入質量分析器，而這些氣相離子經由外加電壓得到了相同的動能，進入無場區域飛行管中，依據分析物離子到達偵測器的時間不同而達到質量分析的目的。

2-2-1 MALDI-TOF MS 樣品製備方式與基質功用

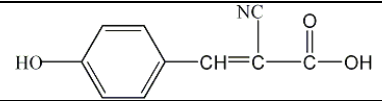
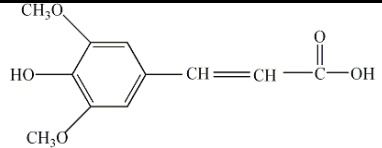
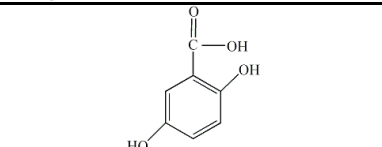
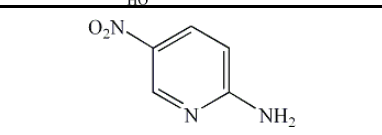
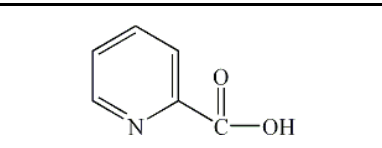
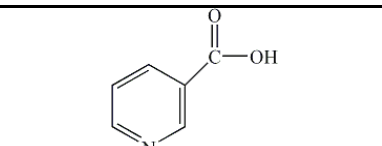
MALDI的樣品製備，一般傳統的作法是將等體積具有吸光特性之高濃度基質溶液與稀釋之樣品溶液混合於樣品盤上，在空氣中自然風乾 (air-dried)，待其乾燥形成固體結晶。由於混合液中含有大量的小分子有機酸與少量的分析物，因此等溶液中的水與有機溶劑揮發後，待測物與基質在樣品盤上會形成共結晶 (co-crystallization)，此時可將金屬樣品盤送入質譜儀之游離源在真空下進行脫附游離。然而在分析時是否可以得到分析物的訊號，選擇適當的基質是重要的因素，

基質與分析物的莫耳比、分析物與基質溶液間的互溶性及揮發速度均會影響共結晶的形成而造成結果的差異，一般來說，基質與分析物的莫耳濃度比大約都在1000：1以上，但對於一些生物巨分子而言，會因為其分子量愈大，而基質的莫耳濃度也需要調整至較高的濃度²⁰。

MALDI-TOF MS進行分析時，加入了基質來輔助分析物脫附游離，所以可藉由基質吸收雷射光後，在傳遞給分析物使之脫附游離，來得到分子離子訊號，而早期被研究發展出來的基質屬於具芳香環的有機酸，加入具有吸收特定波長雷射光能量能力的基質，當做雷射能量傳遞的媒介，基質的選擇需搭配可吸收雷射能量的波長而有所變化，例如：氮氣雷射 (337 nm)、二氧化碳雷射 (10.6 μm)等。而目前的MALDI-TOF MS通常都是波長337 nm的氮氣雷射。到目前為止已有許多基質被發展出來，表(四)為常用的基質結構²¹⁻²³。

基質通常都具低揮發性，因為質譜在真空狀態下操作，若是基質容易揮發則無法穩定覆蓋於分析物周圍扮演好基質的功用，這樣會造成分析上和質譜判斷上的困擾，一般而言，基質需要具備下列三種必要的功用(1)有效吸收雷射能量並轉移能量給分析物；(2)將分析物隔絕，有效地防止分析物聚集，而影響到能量傳的效率以及脫附游離的進行；(3)提供氫離子，幫助分析物游離化。

表(四)、常用的MALDI基質及適用之分析物^{24, 25}

基質名稱	結構式	主要適用的分析物
α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)		胜肽 蛋白質
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (Sinapinic acid, SA)		胜肽 蛋白質
2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)		胜肽 蛋白質 碳水化合物
2-amino-5-nitropyridine		核苷酸
2-pyridine carboxylic acid (picolinic acid)		胜肽 蛋白質 核醣核酸
3-pyridine carboxylic acid (nicotinic acid)		胜肽 蛋白質 核醣核酸

2-2-2 飛行時間質量分析器的原理

飛行時間質量分析器 (Time of Flight mass analyzer, TOF)，是由一個離子加速電場與無場區域 (field-free region) 所組成，當分析物藉由基質在極短時間內脫附離子化，透過高電壓作用使分析物游離為氣相離子，當分析物離子產生後，利用一段電壓使所有的離子集中在同一起始位置，此過程稱為延遲萃取(delay extraction, DE)，再經過電場加速將這些離子送入飛行管中，所有的離子會得到相同的動能，而因不同離子有不同的質荷比，質荷比大的離子者，飛行速率較低，質荷

比小的離子者，飛行速率較高，可經由下列公式計算出分析物的質量：

$$KE = \frac{1}{2} (mv)^2 = zeV \rightarrow v = \left(\frac{2zeV}{m} \right)^{\frac{1}{2}}$$

KE為動能；m為質量；v為速度；

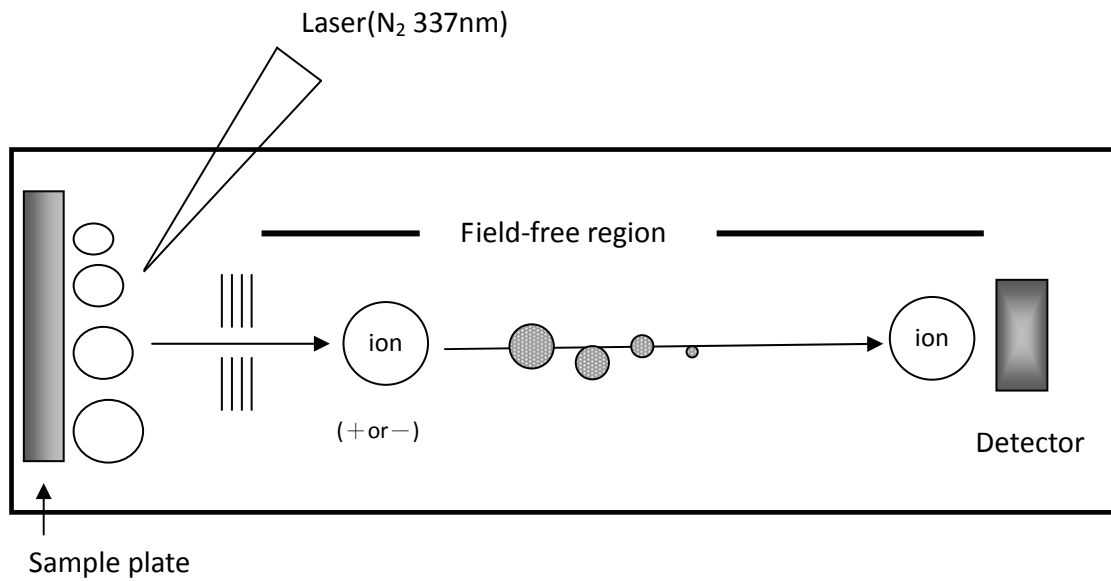
z為離子帶電荷數；e為電荷之電量；V為電場的加速度電位

分析物分子經過雷射光激發形成氣態離子後，同質荷比的分析物離子可能得到不同大小的能量而有不同的速度，或是在游離源中不同位置下形成離子造成進入飛行管的時間不一，這些因素都會造成相同分析物離子被偵測為不同質荷比而誤判的現象，這是目前採用延遲萃取的原因。

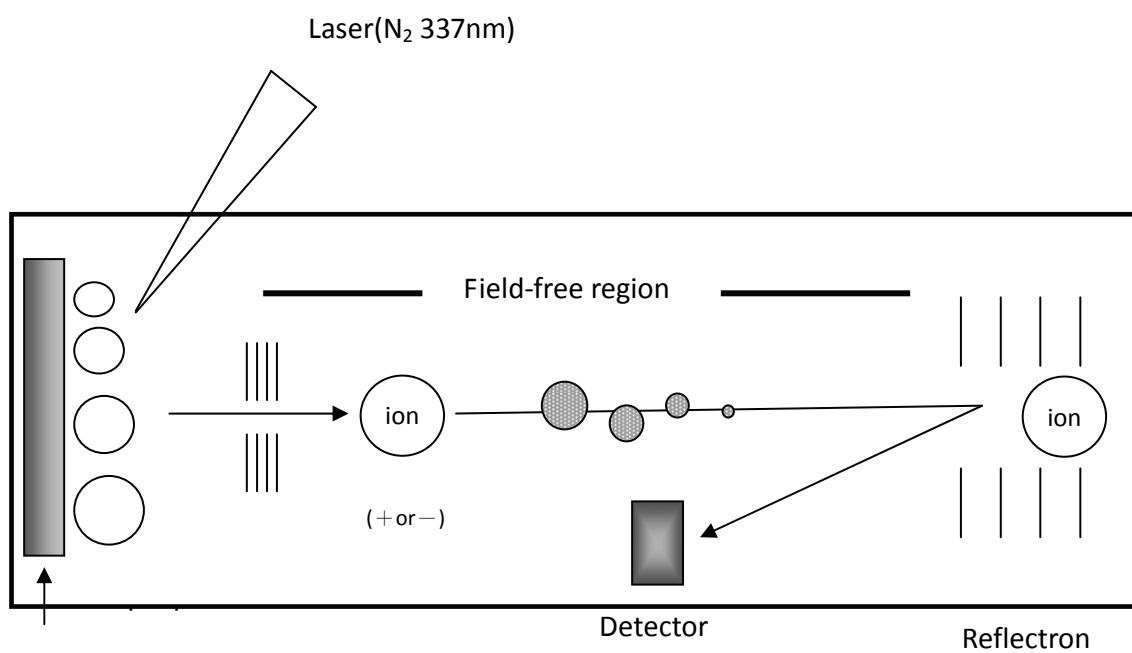
目前飛行時間質量分析器有四種型式，包括直線型 (Linear)、反射型 (Reflective)、W型，以及多次折返等，其中W型與多次折返型²⁶是近幾年研發出高解析度能力的TOF 儀器，不過其價格較高，普及率不及直線型、反射型，所以直線型、反射型還是目前較常用的兩種型式(圖二)、(圖三)。

典型直線型 (Linear) TOF長度通常為1公尺，加速電位為30,000 V，直線型飛行時間質量分析器之解析度較差，主要是所有離子在游離過程中，相同質荷比離子被游離化的時間，可能會因為時間、空間和動能的分佈而導致些微的差距，導致無法同時到達偵檢器，因而使

解析度下降，一般來說，直線型TOF的解析度約為300，屬於較低解析度。另一為反射型^{27, 28} (Reflective) TOF，在直線型飛行管末端以多組電極存在，一個施加強度遞減的正電場，正離子進入此區域後，會因電性相斥關係而速度變慢，接著再受此正電場的作用而轉向、加速，最後由另一端偵測器所偵測。反射式質譜儀因此可以有效地聚集相同質荷比中動能不同的離子，提高解析度10 倍左右。反射型 TOF 也可進行和MS/MS功能類似二次質譜的游離源裂解技術^{29, 30} (post source decay, PSD)分析，PSD是因為有些介穩離子 (metastable ions) 在飛行過程中，由於碎裂離子與其母離子具有相同的飛行速度，但有不同的動能，所以此類離子若是以直線型飛行時間偵測時，到達偵測器的時間相同而無法分辨不同質量的子離子和母離子，反觀反射型飛行時間則可以依據離子動能不同加以區分，具有較小動能的碎裂離子會較快被反向電場減速轉彎，而較早抵達另一端偵測器，具有較大動能的碎裂離子會較慢到達偵測器，如此可以區分碎裂離子和母離子，而得到所選定的母離子之子離子圖譜，此方法可應用於生化分子之結構鑑定。



圖(二)、直線型飛行管柱



圖(三)、反射型飛行管柱

2-2-3 MALDI-TOF MS的應用

MALDI-TOF MS 適用於各類型分子的分析，發展至今，廣泛的使用於生物醫學的相關研究上，例如一般的胺基酸、胜肽、蛋白質、DNA、RNA、高分子材料及碳水化合物等常利用 MALDI-TOF MS 進行分子量之確認。另外，質譜技術不僅應用在新藥研發上，還應用於癌症的早期診斷、環境污染分析，未來可能協助醫藥界找到抗癌藥物。蛋白質之間的相互作用，都將有賴於此質譜技術。

以 MALDI-TOF MS 分析樣品時，樣品溶液中含有一些鹽類、界面活性劑等物質，會干擾分析物與基質的共結晶化，因而抑制分析物的訊號，並造成分析物在基質中分佈不均勻，而造成訊號甜點 (sweet spots)或熱點 (hot spot)的現象，造成低再現性的問題；另外，樣品分子 (M)在正離子的偵測模式下，主要訊號為帶上一氫離子的分子離子 ($[M+H]^+$)。如有鹼金屬族鹽類存在時，在脫附游離時容易形成其加成物 ($[M+K]^+$ 、 $[M+Na]^+$)，導致圖譜判定的困擾，並會降低偵測時的靈敏度。Mock 等人就提出在濃度超過 20 mM 的磷酸鹽緩衝溶液下，進行 MALDI-TOF MS 分析時將無法產生分析物的訊號，數據顯示高濃度緩衝溶液、高鹽類存在於樣品中會使得樣品在進行 MALDI 的分析時，造成一定程度的干擾。不過，在處理蛋白質或胜肽的樣品時，加入鹽類或界面活性劑有時是無法避免的程序，例如：從細胞或組織中

抽取蛋白質時，經常在緩衝溶液中加入界面活性劑，以溶出嵌在細胞膜中的蛋白質，常用的有 sodium deoxycholate 或 Triton X-100。一般來說，為了避免樣品中的鹽類與其他雜質干擾質譜訊號，樣品需經由高效能液相層析或管柱層析的技術將鹽類等雜質去除，進而純化樣品經常是耗時的，而且在過程中容易損失樣品。

利用 MALDI-TOF MS 分析胜肽及蛋白質時，需進一步瞭解胺基酸序列，則可以配合酵素的消化反應進行序列分析，或者是配合 PSD 或串聯質譜 TOF-TOF 的功能可以得到更詳細的樣品序列資料。對於直接從生物細胞或組織中取得的樣品，由於其組織相當複雜，且目標蛋白質的含量很少，因此在進行此類蛋白質的 MALDI-TOF MS 分析時，通常會先經由膠體電泳分離後，直接在膠體上進行酵素消化反應，消化後的產物再由 MALDI-TOF MS 進行分析³¹，進一步連結至網路上蛋白質資料庫進行比對。

2-2-4 MALDI-TOF MS 的優勢

MALDI-TOF MS 已成為偵測生化分子與有機高分子的儀器之一，它本身具有一些其他質譜儀所沒有的優點，其主要的優點如下：

(1) 所需樣品量少

傳統的樣品製備，通常只需將等量基質溶液和分析物均勻混合，最後取 1 μL 混合液置於樣品盤上，在空氣中自然風乾即可進入 MALDI-TOF MS 進行分析。

(2) 操作簡單且分析快速

主要操作流程為將樣品盤放入 MALDI-TOF MS 中，等待真空抽至所設定之值(通常為 5×10^{-6} torr)後即可操作，從雷射轟擊樣品獲得一張圖譜的時間僅需數秒鐘，因此適合用來鑑定各種生化分子。

(3) 靈敏度高

MALDI 是一個高靈敏度的分析方法，一般的生化分子其偵測極限可低至 fmole 左右，適合用來偵測真實樣品中含量較低的分析物。

(4) 分子量偵測範圍廣

MALDI 搭配 TOF 質量分析器，導入以基質來輔助分析物脫附游離之觀念，因此選擇適當之基質，便可偵測高分子量範圍之生化分子。

(5) 同時偵測多種分析物

不需經過純化，同時偵測混合樣品中不同分子量的多種分析物。

2-3 磁性奈米粒子的簡介

“奈米”是一個尺度的度量，顆粒尺寸為奈米量階的超細微粒，奈米粒子一般尺度大小在 1~100 奈米 (nm)之間的微小物質³²，當小粒子尺寸進入到奈米量階 (1~100 nm)時，由於奈米粒子其性質隨粒徑大小不同而產生變化。因此使表面能量增加，讓奈米粒子具有很高的活性，再加上量子效應、小尺寸效應以及表面效應，使得奈米粒子具有許多不同於其本身整體材料 (bulk material)的物理化學性質，除了比表面積遽增外，如光學性質、電學性質、磁學性質、動力學性質、擴散、材料強度、表面活性、光催化能力及磁性等性質，故奈米材料的相關研究相當受到重視³³，且應用範圍也更為廣泛。

磁性材料長期受到廣泛應用，因磁性粒子其獨特之磁性質，自 1970 年代中期，廣泛應用於生物科學與醫療技術³⁴。磁性粒子可由外加磁場吸引而移動之特性，可作為藥物導向、生化分離等工作。目前以 γ - Fe_2O_3 與 Fe_3O_4 較為常見；此外也有複合型之奈米粒子，例如 FePt 、 CoFe_2O_4 與 MgFe_2O_4 等。但是在生醫方面應用較廣泛則為氧化鐵奈米粒子，在氧化鐵奈米粒子研究上，大多將特定分子修飾在奈米粒子表面上，如抗體等，再利用目標分析物與特定分子間具有的特殊親和力來交互作用，進而扮演載體的角色，因為以磁性奈米粒子為載體，可以利用磁場控制來解決生物巨分子在分離純化上的困難。

2-3-1 磁性奈米粒子的性質

金屬奈米粒子種類相當眾多，性質也不同，而磁性奈米粒子最重要的性質就是具有磁性，當化合物具有鐵、鈷、鎳這三種元素時，通常都具有磁性特性，磁性可分為：反磁性、順磁性、鐵磁性，大於 50 nm 時四氧化三鐵粒子屬於鐵磁性 (ferromagnetic) 物質³²，鐵磁性的性質是在無外加磁場時即擁有磁性，當此粒子在移除磁場的影響下，其磁性並不會馬上消失，而是會隨時間漸漸消失至沒有磁性；當粒子小於 50 nm 時，這材料表現的是超順磁性：當磁場一移除，磁性馬上消失，所以磁性是由外加磁場所導致的，因此當外加磁場移除時，超順磁性的粒子並不會相互有磁性而導致聚集。奈米級的四氧化三鐵粒子不只是有上述性質，其優點還包括：高表面積(因此很容易修飾上官能基)、低沈澱速率(穩定性高)、低毒性、生物相容性好等³⁵。

2-3-2 磁性奈米粒子的製備

由於無機材料裡，具有磁性的四氧化三鐵 (Fe_3O_4) 是無毒性，對人體也不具傷害性，所以廣泛應用於生物及醫學方面，但粒徑大小與尺寸會是一個關鍵的問題，目前的磁性奈米粒子有許多不同的製備方法³⁶，包括三大類：氣相凝結法 (氣相法)、機械合金法 (固相法) 及化學溶液合成法 (液相法)，其中，由於氣相法設備成本高，機械合

金法容易產生粒子粒徑分佈不均。因此最能提供製備磁性奈米粒子是化學溶液合成法³²，其中包含有共沈澱法 (coprecipitation)、微乳化法 (microemulsions)、溶膠-凝膠法 (sol-gel)³⁷ 等，可以依照不同的實驗條件來合成含不同成分、大小、磁性反應以及不同官能基的磁性粒子，而磁性奈米粒子大部份是由二部份組成，一是帶有磁性的磁性材料，另一是能結合生物活性物質之配位體。其磁性粒子的製備方法以共沈澱法居多，因為可以得到較大數量，且可直接加入各種修飾劑與表面形成各種官能基，有助於各種生物巨分子形成固定化載體，比起一般載體的固定化程序簡便且成本低廉，使得此方面的研究增加。

2-3-3 磁性奈米粒子的表面修飾

為了能進一步的應用磁性奈米粒子，可在磁性奈米粒子表面修飾官能基，如：油酸鈉鹽、澱粉或乙烯甘油等，使其具有選擇性或非選擇性可與巨分子、生物分子、細胞、膠體粒子等等結合。磁性材料表面的官能基，利用粒子表面的官能基之化學性質來改變粒子本身分散及凝結等特性，而在本實驗中主要是將氧化鐵奈米粒子的表面修飾成帶有 P2 多株抗體，使其成為具有親和性的奈米探針，用來捕捉尿液中具有專一性的蛋白質或胜肽。

2-3-4 磁性奈米粒子的應用

運用奈米技術所製備出的磁性奈米粒子，主要用於兩個方面：*in vivo* (體內)和 *in vitro* (體外)。*in vivo* 是指將磁性粒子應用於生物體內，例如：(一) 核磁影像檢測：對醫學領域是重大的突破，貢獻在於能在不同的組織和不同的環境下，呈現出有差異的顯影效果，因此被用來診斷組織的病變與否。(二) 藥物引導治療：將 Fe_3O_4 磁性奈米粒子連接上抗癌藥物，並以磁場控制奈米粒子集中在腫瘤區域進行治療。(三) 腫瘤熱療法：利用 Fe_3O_4 磁性奈米粒子進行熱療法，優點在於尺寸只有數個奈米、無毒性、生物相容性、及穩定性，再配合固定化技術與藥物導引技術，使得磁性奈米粒子分佈在腫瘤的區域。而在 *in vitro* 方面，最主要的是用於分離和選擇目標物。

磁性奈米粒子廣泛應用於各個領域，配合表面功能化的修飾，功能化磁性奈米粒子成為一個靈敏且快速檢測目標分析物。根據文獻指出，已成功將奈米粒子和質譜儀的結合應用於免疫分析上，利用表面修飾抗體的磁性奈米粒子設計為有效的免疫親和性探針，用來分離人類血清中數種和疾病相關的抗原，省略了傳統層析法中繁複的沖提步驟，而直接以基質輔助雷射脫附游離法質譜分析技術快速地定量分離出之蛋白質，並比較胃癌病患與健康受試者血清中目標蛋白質的不同含量，並有效篩選出多樣性的抗原及探討抗原間的差異性³⁸。

2-4 多株抗體

2-4-1 多株抗體製備與特性

抗原上可誘生抗體之部位稱為抗原決定基 (epitope)，一個抗原通常具有多處決定基。傳統抗血清中含有多株抗體，分別對此抗原不同之決定基，因此稱為多株抗體，而體內抗體的產生需有抗原的誘發才會生成。進行免疫動物之前，首先須了解免疫系統的基本特性：當外來物進入生物體內時會引起體內一連串的防禦機制，而免疫反應具有四種特性：專一性、多樣性、記憶性及自我及非自我的辨識能力。專一性方面在免疫系統對每一個抗原均能使體內淋巴球活化，並產生特殊蛋白質，稱為抗體，抗體也稱免疫球蛋白 (Immunoglobulin ; Ig)，每一抗體蛋白質包括四條多肽鏈，以雙硫鍵 (S-S) 連結構成一 Y 型分子，中央較長為可變動者，而可於樞紐處彎曲的部分，功能上擔任抗原結合位置；其他部位之結構則是固定的，因此可見抗體與抗原的結合具有特異性 (specificity) 的關係³⁹。

多株抗體是利用免疫一些動物，可以得到能辨識特定蛋白質的抗體，從具免疫力的動物身上抽血加以離心。結果的血清，稱為抗血清，通常就會含有想要的抗體，對抗原具專一性的抗體分子可用親和性層析法加以純化，用此種方式產生的抗體就是多株抗體⁴⁰。

2-4-2 抗體與抗原的作用力

抗體的形成無法對抗整個抗原，但可以對抗抗原的某些部分，二者特異性對抗關係的主要部分為抗原結構中的決定因子(antigenic determinant)。而抗體和抗原之間的特異性結合是來自於抗體和抗原之間的親合力，抗體和抗原之間的親和力大致可分成以下幾類：(一)氫鍵(Hydrogen bonding)、(二)凡得瓦爾力(van der waal)、(三)靜電力(electrostatic)及疏水性(hydrophobic)等非共價性鍵結。由於是非共價性鍵結的作用力，故抗體和抗原之間除了可以因為親和力結合外，也可以藉由調控外在環境的因素來將兩者分開。通常改變這些因素會間接的影響到蛋白質的結構，致使抗體和抗原兩者無法結合。而改變的因素有下列三種：(一)溫度、(二)酸鹼值、(三)溶液中的離子濃度。

2-5 研究動機與實驗設計

本論文指導教授龍鳳娣博士實驗室多年來致力於 NTx 胜肽片段與市售 (Osteomark[®]) 抗體間交互作用之分析。依據 epitope mapping 之原則，以 NTx 胜肽片段為模板，如圖(四)，設計 10 段線狀且具有 6 個胺基酸重複序列的 NTx 胜肽片段表(五)，分別定名為 peptide 1 ~ 10。並利用固相胜肽合成 (solid phase peptide synthesis) 的技術，合成這十條胜肽片段，再以逆相高效能液相層析法 (reverse phase-high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 搭配半製備 (semi-preparative) C₁₈ 管柱，純化這十條胜肽，將胜肽的最終純產物經由質譜儀 (MALDI-TOF MS) 鑑定其正確分子量後，利用酵素連結免疫吸附分析方法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和表面膜漿共振技術 (surface plasmon resonance, SPR) 分析這十條胜肽與 anti-NTx 抗體間的交互作用，結果發現 peptide 1、peptide 2 和 peptide 3 與 anti-NTx 抗體間有較大的親和力，其中又以 peptide 2 與 anti-NTx 抗體間之親和力最大，如表(六)、表(七)所示⁴¹。

基於以上結果，我們推測抗體之抗原決定基 (epitope) 應位於 peptide 2。因此，本實驗室與美國 Biocheck 公司合作，委託製備 peptide 2 (P2) 之兔子的多株抗體 (Rabbit polyclonal anti-P2 antibody)，以開發評估骨質流失之方法。

本實驗室之前曾利用抗體製備免疫親和性管柱⁴²，以分離臨床檢測對象(一般婦女及骨質疏鬆症病患)尿液中具有專一性之胜肽或蛋白質，並以 MALDI-TOF MS 偵測分析胜肽及蛋白質訊號，由於此方法需經長時間的沖提，且沖提液中含有大量的鹽類，會干擾質譜分析時分析物的訊號，所以需使用 C₁₈ 固相萃取去除鹽類後才能進行分析，其過程非常耗時間而且也無法檢測多個樣品，此外在固相萃取過程中，易造成樣品損失，回收率降低。也應用過親和性的奈米碳針，使用為 Anti-P2 的人類單株抗體與表面經過修飾的磁性奈米粒子結合，雖然可以有效且快速偵測尿液中的生化指標，由於此方法是利用單株抗體，範圍改變不大，而無法明顯區別出骨質疏鬆症病患與正常人之差別。

因此，在本研究中，應用兔子多株抗體及自行製備老鼠多株抗體與表面經過修飾的磁性奈米粒子結合，用來純化病患尿液檢體及正常人尿液檢體中的胜肽及蛋白質，藉由抗體與抗原具專一性結合作用，捕捉尿液中具有親和性之蛋白質，應用 MALDI-TOF MS 的技術偵測出最顯著的訊號分子量，以此訊號之相對強度，製作出檢量線，以便區別病患尿液中及正常人生化指標，本研究有助於未來開發檢測骨質流失情形，對於骨質疏鬆症的預防治療及診斷有所助益。

NH₂-Gln-Tyr-Asp-Gly-Lys-Gly-Val-Gly-Leu-Gly-Pro-Gly-Pro-Met-Gly-Leu-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Gln-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Lys-Ala-Gly-Glu-Asp-Gly-His-Pro-Gly-Lys-Pro-Gly-Arg-Pro-Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Arg-Gly-Phe-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Leu-Pro-Gly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-His-Asn-Gly-Leu-COOH

圖(四) N-telopeptide (NTx)的胺基酸序列，分子量為 9902.0 Da⁴¹

表(五) 依據 epitope mapping 原則設計的胜肽之胺基酸序列⁴¹

No	Amino acid sequence	[M+H] ⁺
1	Gln-Tyr-Asp-Gly-Lys-Gly-Val-Gly-Leu-Gly-Pro-Gly-Pro-Met-Gly-Leu	1544.8
2	Pro-Gly-Pro-Met-Gly-Leu-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Ala	1461.7
3	Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Ala-Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly	1364.7
4	Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Gln	1551.7
5	Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Gln-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala	1418.7
6	Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Lys-Ala-Gly-Glu-Asp-Gly	1392.7
7	Lys-Ala-Gly-Glu-Asp-Gly-His-Pro-Gly-Lys-Pro-Gly-Arg-Pro-Gly-Glu	1587.8
8	Pro-Gly-Arg-Pro-Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Arg	1588.9
9	Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Arg-Gly-Phe-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Leu-Pro-Gly	1464.8
10	Thr-Pro-Gly-Leu-Pro-Gly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-His-Asn-Gly-Leu	1619.9

表(六) 應用 ELISA 與 SPR 來探討 anti-NTx 抗體與 10 段線狀之 NTx 胜肽片段之結合能力⁴³。

Table 1. Relative binding potency of peptides 1–10 to anti-NTX antibody detected by ELISA and SPR assay

Peptide	ELISA ^a (nM BCE)	SPR assay ^b (pM BCE)
1	70.0 ± 0.9	1254 ± 16
2	165.0 ± 0.4	1305 ± 21
3	69.4 ± 1.0	1341 ± 6
4	< 1	< 1000
5	< 1	< 1000
6	< 1	< 1000
7	< 1	< 1000
8	< 1	< 1000
9	< 1	< 1000
10	1	< 1000

a. Bone collagen equivalents (BCE) of each peptide at 50 μM concentration detected by ELISA were reported recently in Ref. (14).

b. BCE of each peptide at 1 μM concentration were determined by using data collected from the sensorgrams.

表(七) 應用 SPR 探討 10 段線狀之 NTx 片段與 anti-NTx 抗體間之交互作用⁴³。

Table 2. The kinetics data of each peptide fragment

Peptides	K_a	K_d
1	3.62×10^5	2.76×10^{-6}
2	1.97×10^6	5.07×10^{-7}
3	1.19×10^5	8.41×10^{-6}
4	2.46×10^4	4.06×10^{-5}
5	2.17×10^4	4.89×10^{-5}
6	1.36×10^4	5.46×10^{-5}
7	1.97×10^4	5.06×10^{-5}
8	1.65×10^4	5.31×10^{-5}
9	2.06×10^4	5.11×10^{-5}
10	1.79×10^4	5.24×10^{-5}

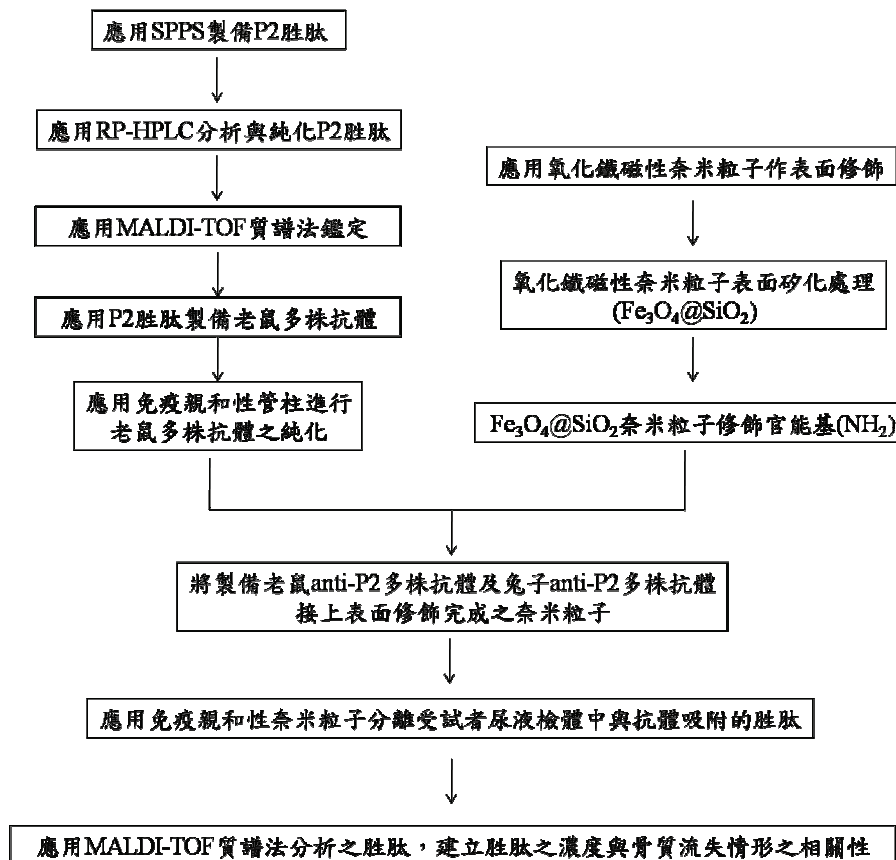
Using data collected from sensorgrams, K_a and K_d values were calculated by BIAcore software.

第三章 材料與方法

3-1 實驗設計與流程

本研究目的為研發檢測骨質流失之生化方法，規劃之實驗流程為：

1. 自行製備老鼠多株抗體並與 Biocheck 公司合作製備兔子多株抗體；
2. 應用多株抗體製備免疫親和性奈米粒子；
3. 應用免疫親和性奈米粒子分離受試者尿液檢體中與抗體吸附的胜肽；
4. 應用 MALDI-TOF 質譜法定量分離出之胜肽，並建立胜肽之濃度與骨質流失情形之相關性，以研發檢測骨質流失之生化方法，其實驗設計與流程於圖(五)。



圖(五)、實驗設計與流程圖

3-2 應用固相胜肽合成方法合成胜肽

3-2-1 固相胜肽合成之實驗材料與設備

固相胜肽合成 (solid phase peptide synthesis, SPPS)所需之試劑耗材及儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表八。

表(八)、固相胜肽合成 (SPPS)所需之試劑耗材及儀器設備

材料	購買廠商
Rink amide AM resin	Merck, Whitehouse Station, NJ, USA (NOVA Biochem)
具 α -Fmoc 保護基的胺基酸	Ana Spec
HBTU	
HOBt	
DIEA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Piperidine	ECHO Chemicals Co., Ltd
Trifluoroacetic acid (TFA)	Alfa Aesar Lancaster, MA, USA
<i>N,N</i> -Dimethylformamide (DMF)	ECHO Chemicals Co., Ltd
Dichloromethane (DCM)	
PD-10	Amersham Biosciences Ltd., Piscataway, NJ, USA

3-2-2 固相胜肽合成之原理

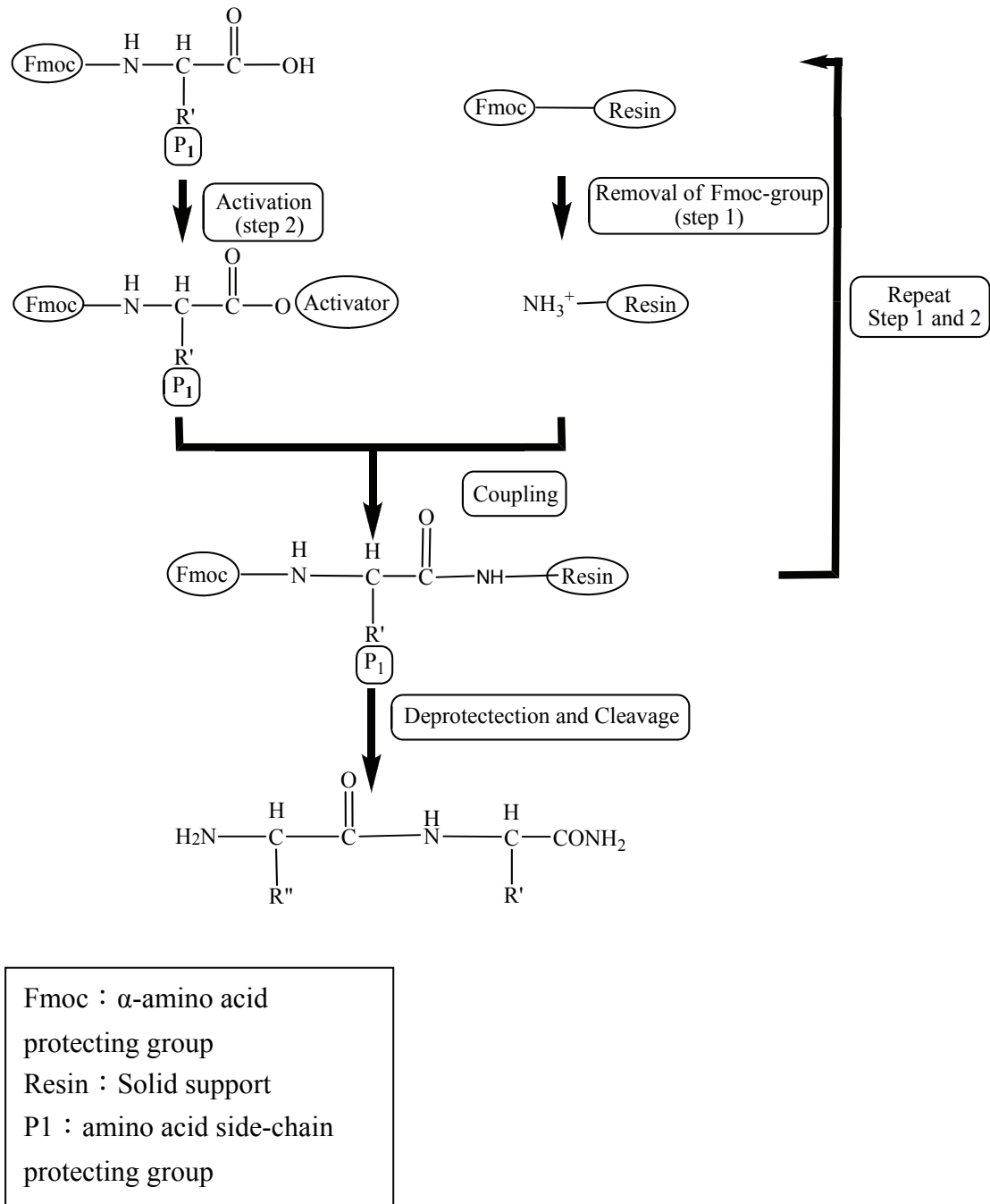
本實驗所利用的合成法即為固相胜肽合成技術，並應用 Fmoc Chemistry進行固相胜肽合成。利用樹脂 (resin)做為固相支撐物，本實驗採Rink amide AM resin當做起始胺基酸之固著物。首先將Rink amide AM resin上之含有鹼性不穩定的保護基 (9-fluorenylmethyl

oxycarbonyl, Fmoc-protecting group), 去保護基後與活化後胺基酸的 C 端形成胜肽鍵 (peptide bond) 而固著於樹脂上。Fmoc-protecting group 所扮演的角色是胺基酸的 N_{α} -保護基 (N_{α} -protection)。在移除第一個胺基酸的 N 端保護基後，使用耦合試劑 (coupling reagents)，下一個被保護的胺基酸才被加入。重覆上述步驟便產生胜肽鍵，依序接上所有組成之胺基酸，其胺基酸之 C 端被固著在此樹脂上。最後並利用化學裂解方法 (chemical cleavage) 將胜肽從樹脂上分離。在切除掉所有胺基酸上支鏈的保護基團後，即可完成胜肽粗產物。

3-2-3 固相胜肽合成之實驗方法

固相胜肽合成之實驗流程圖(六)，首先將含有 Rink amide AM resin (0.125 mmole、0.169 mg) 的反應管內，加入 5 mL DCM 使樹脂膨大，反應 5 分鐘重複兩次，之後加入 5 mL DMF 使樹脂濕潤，反應 5 分鐘重複兩次；之後加入 5 mL 的 30 % Piperidine/DMF 混合反應 15 分鐘，重複兩次，可將 Rink amide AM resin [4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-Fmoc-aminomethyl-phenoxy-acetamido-norleucyl aminomethyl resin] 上的 N^{α} -Fmoc 保護基去除；再加入 5 mL DMF 混合反應 5 分鐘，重複三次。取胺基酸 0.25 mmole 並且與 coupling reagent (HOBT: 0.25 mmole, 33.775 mg; HBTU: 0.25 mmole, 82.325 mg; DIEA: 87 μ L) 反應 5 分鐘後，與反應管內的 Rink amide AM

resin 混合反應 2 小時。待反應結束後，加入 5 mL DMF 反應 5 分鐘，重複兩次，每次的耦合反應結束後以 Ninhydrin test 鑑定是否耦合成功；持續重複上述去保護基 (de-protection) 反應及耦合 (coupling) 反應，直到所設計序列之胺基酸都接上樹脂。最後加入 20 % piperidine/DMF 5 mL 反應 15 分鐘，重複兩次後再加入 DMF 5 mL 反應 5 分鐘，重複兩次，將序列最後一個胺基酸上 N 端的 Fmoc 保護基去除掉，最後以化學裂解法將胜肽從樹脂上切下，利用裂解試劑 (95 % TFA in H₂O) 將胜肽與 Rink AM resin 裂解並將胜肽側鏈保護基切掉，之後皆由減壓過濾後，取得濾液，以氮氣吹除 TFA，待殘留溶液剩餘 1.5 mL，加入冰乙醚 3~5 mL，使胜肽沉澱並使用離心機離心，將上清液倒掉，此白色固體即為線性胜肽粗產物，之後再經由逆相高效能液相層析儀進行胜肽粗產物之純化，並且在純化之前先經由 MALDI-TOF MS 測定其胜肽粗產物之分子量，確認分子量正確後再進行純化。



圖(六)、固相胜肽合成之實驗流程圖

3-3 應用逆向高效能液相層析法分離純化胜肽粗產物

3-3-1 RP-HPLC 實驗材料與設備

逆向高效能液相層析儀所需之藥品試劑及儀器設備，分別購自於不同的廠商，資料整理於表九。

表(九) RP-HPLC 實驗過程中，所需之試劑、設備與購買廠商

藥品試劑	購買廠商
Acetonitrile (ACN)	ECHO Chemicals Co., Ltd
Trifluoroacetic acid (TFA)	Alfa Aesar-Lancaster, MA, USA
0.22 μ m Filter	Millipore Corporation. Billerica, MA, USA
儀器設備	購買廠商
逆相高效能液相層析儀 (RP-HPLC)	HITACHI
C ₁₈ column (10×250 mm, particle size 10-15 μ m)	VADAC
微量注射針 (750 RN, 500 μ L)	HAMILTON
玻璃過濾裝置 (AK95375-00000)	KONTES

3-3-2 逆相高效能液相層析法之原理

逆相高效能液相層析法 (RP-HPLC)，是一種能將蛋白質和胜肽依極性大小加以分離的方法。原理是利用蛋白質樣本的各個成份，藉由移動相 (mobile phase) 攜帶通過帶有非極性官能基之固定相

(stationary phase), 透過蛋白質在非極性固定相之間不同的疏水性之交互作用, 而達到分離的效果。其固定相管柱表面的填充材質為低至中極性的物質, 通常是鍵結很強的非極性官能基團, 如由C₄、C₈、C₁₈ 所組成的長烷鏈。其所適用之pH 值範圍為2 ~ 10。而移動相沖提液則是極性強度偏中等的溶劑, 如乙腈、甲醇等與水所組成的混合物。RP-HPLC之分離機制係利用蛋白質與固定相之間相互疏水作用力不同, 使樣本於移動相沖提之下所形成之滯留時間不同而分離出來, 極性最大的物質與管柱填充物表面間作用力最小, 故最早被沖提出; 反之, 極性越小的物質與管柱填充物表面間作用力越強, 越晚被沖提出。

RP-HPLC分析法之優點有：(1) 分離效率高：RP-HPLC藉由改變沖提液參數, 包括沖提液之pH值、有機溶劑之極性等, 可提高分離效率, 獲得較高之解析能力。(2) 應用範圍廣：由於乙腈-水系統為RP-HPLC常用緩衝移動相, 而且乙腈相較於其他有機溶劑具有一些的特性, 如低紫外光密度、低溶氧度和沖提強度高, 使RP-HPLC分離純化蛋白質中具有很高分辨與解析能力。

因此 RP-HPLC 常被選用為蛋白質或胜肽和生物物質的分離或純化步驟中的最後一階段。其應用範圍廣泛, 可應用於生化、製藥、食品、工業化學品、環境污染物及臨床醫學等。另一方面, RP-HPLC 也由於具有高解析與分辨能力的優點, 常是純化製程中重要的步驟。

3-3-3 逆相高效能液相層析純化胜肽粗產物之實驗方法

將欲分離之胜肽粗產物溶解於適當溶劑中，注入 C₁₈ 管柱中，以一個高壓輸入移動相，由於移動相與固定相中各成分停留時間不同，所以可達到分離效果，純化之樣品中的成分經 UV 光源偵測後，數據(滯留時間，retention time，Rt)經由電腦數據處理以積分圖形呈現，分離之最佳狀態可由進速度、孔徑及離析率調配而求得。本實驗將 HPLC 做下列之參數設定可得最佳的分離及分析效果。我們選用管柱種類為 C₁₈ 管柱來制定最適當之離析率，將逆相高效能液相層析儀之偵測波長設定為 225 nm，固定流速為 4 mL/min，而 RP-HPLC 移動相溶劑組成為 solution A：D.D.water + 0.05 % TFA，而 solution B：Acetonitrile + 0.05 % TFA，其中加入 0.05 % TFA，主要是利用共同離子效應來防止胜肽解離，分析的方法利用線性梯度沖提，在 30 分鐘內以 solvent A / solvent B 含量比例由 90：10 至 10：90 方式沖提，接著 7 分鐘內維持在 10：90 的比例，將殘留於管柱內之干擾物沖提出來，再轉換成 90：10 的比例維持 10 分鐘，讓管柱達到一個平衡狀態。

欲分析或純化的樣品需於分析或純化前，先以孔徑 0.22 μm 針筒過濾器 (filter) 過濾。過濾後之樣品注射至儀器前，須先去除儀器微流管柱內及移動相氣泡 (Purge)，在不注射樣品的條件下讓儀器依所設

定之梯度沖洗管柱，並確認管柱內沒有殘留的干擾物。若有雜訊出現，應設定適當條件(流速、溶劑配比係數)將管柱清洗乾淨後，再進行樣品分析。將過濾過的胜肽粗產物注入注射閥中，此時樣品會停留於閥內，注射閥箭頭停留在 load 位置；等待逆相高效能液相層析儀與積分儀的同步化操作，將閥門往下推至 inject，樣品就會隨移動相進入 C₁₈ 層析管柱進行分析。積分儀會隨著樣品成分於不同時間出現面積大小不一的波峰 (peak)，進行純化時，可以依這些出線的波峰個別收集，而這些收集的液體經由冷凍乾燥，便可得到純化的白色乾燥粉末。

3-4 多株抗體之製備

3-4-1 抗體製備之實驗材料與設備

製備抗體所需之試劑耗材及儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表十。

表(十) 免疫老鼠實驗過程中，所需之實驗材料及設備。

材料	購買廠商
Balb/c 小鼠	BioLASCO Taiwan Co., Ltd
P2 胜肽	實驗室自行合成
注射針頭	TOP SURGICAL Taiwan Co., Ltd
完全佐劑	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
不完全佐劑	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH) 純度 95 %	ECHO Chemicals Co., Ltd
16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit	BioCheck, Inc., Foster City, CA, U.S.A.
儀器	購買廠商
微量分光光譜儀	Molecular Devices 型號：VersaMax™
桌上型微量管高速離心機	Eppendorf

3-4-2 抗體產生之實驗方法

免疫之方法是根據 Institutional Animal Care and Use committee (IACUC)之規範。第一次免疫反應是抗原需加入完全佐劑 (complete Freund adjuvant, CFA)，佐劑之作用是可保護抗原快速崩解，另外可延長抗原暴露在免疫系統中的活性，進一步產生大量之抗體。首先取 3 週齡的 Balb/c 小鼠三隻(一隻為對照組)，利用皮下注射使其產生免疫反應，我們將純化好的 P2 胜肽來當作抗原，第一次注射使用 100 μ L 之 150 μ g 抗原與 100 μ L 完全佐劑 (Freund's complete adjuvant)以 1 : 1 的比例混合，此時會呈現乳化狀態，將這混合液注射入老鼠體內，7 天後，第二次注射 100 μ L 之 150 μ g 抗原與 100 μ L 不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant)之混合液，免疫一段時間後，注射後 7 天進行採血，進行老鼠的尾巴採血，首先將老鼠尾巴先噴上酒精消毒，以手術刀斜切 45 度尾巴血管位置，並以順推的方式將血液擠出，採血後得到的血液至於離心小管中，以桌上型離心機離心，轉速為 2~2.5 rpm 離心 2 分鐘，取上清液至離心小管，於-20 $^{\circ}$ C 下儲存。此血清為純化前之多株抗體，再進行純化前將老鼠的血清以競爭型酵素免疫吸附法確認是否以產生抗體。

3-4-3 應用酵素免疫吸附法 (ELISA)測試效價

我們使用美國 BioCheck 公司所提供 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit，將老鼠血清，利用競爭型免疫吸附法，分析老鼠血清是否產生 P2 多株抗體。根據 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit 標準程序，首先，將 P2 peptide –BSA 固定於 96 孔槽的測試盤上 (Costar, Corning, NY, U.S.A.)，加入老鼠血清(100 μ L) 至每一個孔槽內，並加入 Rabbit Anti-P2 antibody HRP Conjugate Reagent 至每一個孔槽 (BioCheck, Inc., Foster City, CA, U.S.A.)，均勻混合 20 秒，培養在室溫並利用機器振動 (100 rpm) 60 分鐘。將培養的混合液移開並在每一孔槽使用 1X 的 Working Wash buffer 清洗 5 次 (BioCheck, Inc., Foster City, CA, U.S.A.)。將 TMB 呈色試劑(100 μ L) 加入到每一個 Well 並均勻混合 10 秒(需避光)，此時加入呈色試劑後會產生淺藍色，將孔盤培養在室溫並利用機器振動 (100 rpm) 20 分鐘，停止酵素反應，加入中止反應試劑 (每一個 well 100 μ L hydrochloric acid, 1N)，均勻混合 30 秒。酵素免疫連結吸附法 (ELISA) 在波長 450 nm 下偵測吸光值，OD 值再與標準曲線換算濃度。

3-5 應用 P2 胜肽製備親和性管柱進行老鼠多株抗體純化

3-5-1 製備親和性管柱之材料與設備

製備 P2 胜肽免疫親和性管柱所需之試劑耗材及儀器設備，分別購自不同的廠商，相關資料整理於表十一。

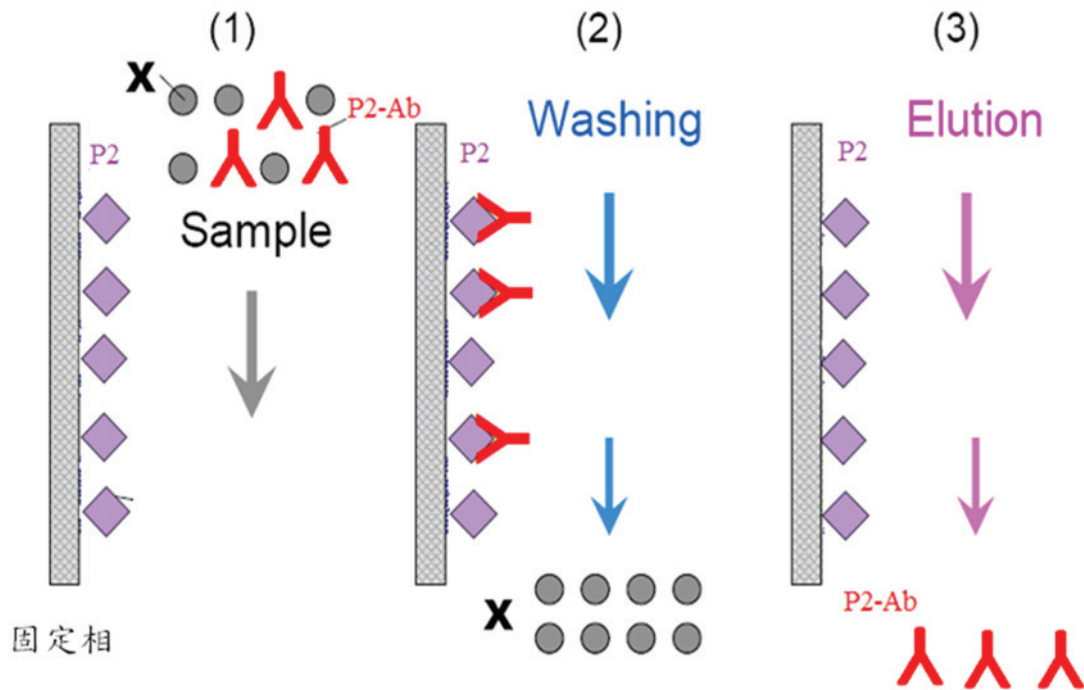
表(十一) 製備親和性管柱所需之試劑、耗材及儀器設備。

藥品試劑	購買廠商
Sodium chloride (NaCl)	USB corporation Cleveland, OH USA
Potassium phosphate monobasic (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodium acetate (NaAc)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hydrochloric acid (HCl)	ECHO Chemicals Co., Ltd
Sodium Hydrogen carbonate (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CNBr-activated Sepharose 4B	GE Healthcare Bio-Sciences, USA
P2 胜肽	實驗室自製
Ethanolamine (C ₂ H ₇ NO)	ACROS, ORGANICS
Tris(hydroxymethyl aminomethane (Tris-HCl)	ECHO Chemicals Co., Ltd
Glycine	Alfa Aesar-Lancaster, MA, USA
儀器設備	購買廠商
酸鹼度計	Suntex 公司
C ₁₈ 固相萃取管柱	Waters 公司

3-5-2 親和性管柱製備之原理

所收集之抗血清，包括許多不同種之抗體，因此會影響目標的抗原與抗體的反應作用力，因此，需要利用親和性管柱純化出抗 P2 之多株抗體，移除對 P2 不具有專一性或特異性之抗體。

在文獻中抗體純化方法大部分都是利用親和性管柱層析法⁴⁴，利用抗體對抗原的專一性與親和性，將欲檢測之目標物的抗體固定於固態表面，並以這個修飾過之固態物填充於管柱內，作為一個層析管柱，通常可以藉由一步的過程，將目標物純度提高並分離出來。其原理是利用抗體、抗原經由共價性修飾至固定基質上，固定相為一個具有專一性親和基團配體，移動相為緩衝溶液。當欲純化之樣品通過管柱時，與固定相有專一性作用的物質會緊密結合到固定相上，而非特異性物質回隨著流動相從管柱沖出，之後，滯留在固定相上的分子，可以用適當條件的溶液來沖提，將這些分子隨著沖提溶液帶出管柱外，來完成純化，其親和性管柱作用流程圖為圖(七)。



圖七、親和性層析法的作用流程圖。Mouse Anti-P2 多株抗體經過親和性管柱之吸附；清洗；沖提，將多株抗體純化出來。

3-5-3 製備 P2 胜肽親和性管柱之實驗方法

所收集之老鼠血清需進一步進行純化，利用親和性管柱的層析方法來純化抗體，利用製備一種可和抗原成共價結合之支持物。將血清加入於管柱內中，並使抗體混合物通過該管柱，抗原的抗體會留在管柱，而未結合的抗體就會被洗去，首先我們事先配製好所需緩衝溶液。

磷酸鹽緩衝溶劑之配製：

1. 15 mM 磷酸鹽緩衝溶劑 (KH_2PO_4 1.02 g 和 NaCl 4.25 g 及 NaN_3 0.5 g 用去離子水加至 500 mL)，並利用 NaOH 調整 pH 值至 7.4。

2. Coupling Buffer 之配製

取 NaHCO_3 8.3 g 和 NaCl 29.22 g 用去離子水加至 1000 mL，並利用 HCl 調整 pH 值 8.3

3. Blocking Buffer 之配製

1 M Ethanolamine，並利用 HCl 調整至 pH 值至 8.0。

4. Elute Buffer 之配製

50 mM 磷酸鹽緩衝溶劑 (KH_2PO_4 6.4 g 和 NaCl 8 g 及 NaN_3 1 g 用去離子水加至 1000 mL)，並利用 NaOH 調整 pH 值至 7.4。

5. Wash Buffer 之配製

0.05 M Glycine Buffer (Glycine 375.35 mg 加 1 M NaCl 5.84 g) 將 pH 值調至 3.5

0.05 M Tris-HCl (Tris-HCl 620.7 mg 加 1 M NaCl 5.84 g) 將 pH 值調至 8.0

首先取出 1 g 的 CNBr -activated Sepharose 4B 加入 100 mL 的 1 mM HCl (pH 3.04) 中，攪拌約 30 分鐘使膠體顆粒展開，此步驟是將 CNBr 活化。將混合液倒入漏斗內，之後用抽氣過濾裝置，將液體移除。在漏斗裡，再加入 25 mL 的 1 mM HCl (pH 3.04) 於膠體上，混合攪拌 2 分鐘，再用抽氣過濾裝置，將液體移除，重複三次，目的為活化膠體上的反應基團。清洗完膠體後，再加入 coupling buffer 來沖洗

活化後的膠體，此時膠體處於鹼性環境中。在 15 mL 的離心管，加入 200 μ L 之 P2 胜肽 (濃度為 100 μ M)，並加入 5 mL coupling buffer。之後加入活化後之膠體在 4 $^{\circ}$ C 冷房裡的旋轉機反應 16 個小時。將反應完膠體移至抽氣過濾裝置，將 coupling buffer 移除至燒杯中。並應用 UV detector 偵測 coupling buffer 中 220 nm 訊號來確認抗體是否有跟膠體結合。確認抗體有跟膠體結合，將膠體置換到 10 mL blocking buffer 中，4 $^{\circ}$ C 冷房下反應 16 個小時，此目的為遮蔽尚未與抗體結合之膠體上的反應基團。將膠體倒入空的層析管柱中，利用不同的 pH 值 buffer 沖洗六次循環，每次每種溶液至少使用 5 倍膠體體積。每次循環 buffer 包含 1 M NaCl 的 0.05 M 的 Glycine 緩衝溶液 (pH 3.5) 及內含 1 M NaCl 的 0.05 M Tris-HCl (pH 8) 緩衝溶液沖洗一次。之後利用 pH 7.4 的磷酸鹽緩衝溶劑沖洗 200 mL 來平衡親合性管柱，並存放於 4 $^{\circ}$ C 冷房備用。

3-5-4 應用 P2 胜肽親和性管柱純化老鼠多株抗體之實驗方法

在純化老鼠多株抗體，先將緩衝溶液配製完成

1. 15 mM 磷酸鹽緩衝溶劑 (KH_2PO_4 1.02 g 和 NaCl 4.25 g 及 NaN_3 0.5 g 用去離子水加至 500 mL)，並利用 NaOH 調整 pH 值至 7.4。

2. 1 M 磷酸鹽緩衝溶劑 (KH_2PO_4 68.05 g 和 NaN_3 0.5 g 用去離子水加至 500 mL)，並利用 NaOH 調整 pH 值至 8.5。

3. Elute Buffer 之配製

0.1M Glycine buffer (Glycine 750.7 mg 和 NaCl 850 mg 及 NaN_3 100 mg 用去離子水加至 100 mL)，並利用 HCl 調整 pH 值至 2.8。

首先利用 Elute buffer 沖洗製備好的 P2 胜肽免疫親和性管柱，沖洗三次循環。再利用 15 mM 磷酸鹽緩衝溶劑沖洗免疫親和性管柱，沖洗六次循環。此目的為平衡管柱。加入老鼠血清並循環管柱六次以上。循環抗體結束並收集，再用 9 mL 15 mM 磷酸鹽緩衝溶劑沖洗管柱，(一併收集成並命名為 1st Batch ,1st Run)。持續使用 15 mM 磷酸鹽緩衝溶劑沖洗免疫親和性管柱，沖洗三次循環。此目的為將未鍵結上之抗體從管柱沖洗出來。當清洗步驟完成後，加入 8.7 mL 0.1 M Elute buffer 來沖提管柱內對抗體具有親和性之多株抗體，並收集在含有 2.6 mL 1 M 磷酸鹽緩衝溶劑(並命名為 1st Run , 1st Collect)。再使用 10.5 mL 15 mM 磷酸鹽緩衝溶劑沖洗並收集到兩管含有 3.1 mL 1 M 磷酸鹽緩衝溶劑(並命名為 1st Run ; 2st Collect、3rd Collect)，之後持續使用 15 mM 磷酸鹽緩衝溶劑沖洗免疫親和性管柱，此目的使免疫親和性管柱達到平衡。收集起來的溶液利用透析膜，這裡使用透析膜之目的為趕出水分或一些小分子以及脫鹽效果。

3-6 氧化鐵磁性奈米粒子之表面修飾

3-6-1 氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾之材料方法與設備

氧化鐵磁性奈米粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNPs}$)表面修飾所需之試劑耗材及儀器設備，分別購自不同的廠商，相關資料整理於表十二。

表(十二) 氧化鐵磁性奈米粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{MNPs}$)表面修飾所需之試劑耗材及儀器設備

藥品試劑	購買廠商
Iron (I,II) oxide (Fe_3O_4)	Alfa Aesar-Lancaster, MA, USA
Tetraethyl orthosilicate (TEOS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
3-Aminopropyl-trimethoxysilane (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Disuccinimidyl suberate (DSS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)純度 95 %	ECHO Chemicals Co., Ltd
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Whitehouse Station, NJ, USA
Ammonium hydroxide solution (NH_4OH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanolamine ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$)	Acros organics
Sodium chloride (NaCl)	USB
Disodium hydrogen phosphate heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Potassium chloride (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Sodium hydroxide (NaOH)	ECHO Chemicals Co., Ltd
Hydrochloric acid (HCl)	ECHO Chemicals Co., Ltd

Trifluoroacetic acid (TFA)	Alfa Aesar-Lancaster, MA, USA
Acetonitrile (ACN)	ECHO Chemicals Co., Ltd
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (Sinapinic acid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rabbit P2-polyclonal antibody	BioCheck, Inc., Foster City, CA, U.S.A.
Mouse P2-polyclonal antibody	自行製備
儀器設備	購買廠商
基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀	Bruker Daltonics , Bremen, Germany
超音波洗淨機	廣華電子
超純水機 (deionization ultrapure system)	Barnstead
酸鹼度計	Suntex 公司
震盪器	Scientific Industries
傅利葉轉換紅外光譜儀 (FT-IR)	PerkinElmer
加熱攪拌器	Pantech
微量盤分光光譜儀	Molecular Devices 型號：VersaMax™
穿透式電子顯微鏡	日本 JEOL 公司

3-6-2 氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾之原理

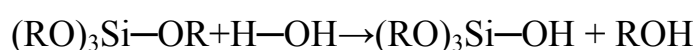
主要分為奈米粒子表面修飾及免疫親和性萃取兩部分，在奈米粒子表面修飾部份，首先利用溶膠 (sol-gel)合成方式³⁷，在氧化鐵奈米粒子表面修飾成具胺基的官能基，進一步活化粒子表面形成高活化基團，再將 anti-P2 的兔子多株抗體和 anti-P2 的老鼠多株抗體與表面經過修飾的磁性奈米粒子結合。

磁性奈米粒子的合成法有很多種，例如：氧化還原法、沉澱法、雷射合成法、溶膠-凝膠法，而本研究實驗採用溶膠-凝膠法合成，溶膠-凝膠法主要機制是以金屬無機鹽作為前導物，而本實驗是使用 TEOS 為前導物，經由水解、縮合聚合，生成聚集的溶膠，再經過乾燥處理，溶膠會轉化為凝膠。將凝膠經乾燥、烘箱烘乾除去其水分即可得到奈米粒子。

Sol-Gel 法的基本過程是：將酯類化合物或金屬醇鹽溶於有機溶劑中，形成均勻的溶液，然後加入其他成份，在一定溫度下經過水解和縮聚反應而逐漸凝膠化，再經乾燥或燒結等處理製成所需材料。

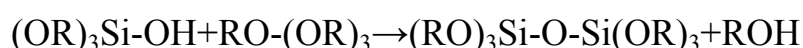
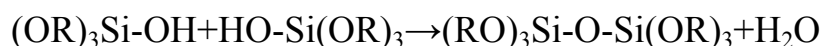
一、水解反應 (hydrolysis reaction)

Tetraethyl orthosilicate (TEOS)四乙氧基矽烷的水解反應為水中的 O 原子和 Si 原子進行親核結合:



上式中R代表的是質子 (proton)或為烷基 (alkyl)，此反應需要足夠的水及催化劑， Si(OR)_4 才能夠完全的水解，所有的OR基團將完全的反應為OH基。

二、縮合聚合反應 (凝聚反應)



此凝聚反應將分子與分子相互聚合，最後形成較大的分子結構，而形成聚合作用。

3-6-3 氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾檢測之原理

3-6-3.1 穿透式電子顯微鏡的原理及樣品製備的步驟：

穿透式電子顯微鏡之成像原理是利用具有5~30 KV電子束掃描薄試片的表面，並將表面產生之訊號加以收集經放大處理後，輸入到同步掃描之陰極射線管 (CRT)，以顯現薄試片圖形之影像。

TEM之樣品製備的步驟如下：首先秤取1 mg之磁性奈米粒子，分散於PBS緩衝溶液 (pH=7.4)中，利用微量滴管吸取適量待測液體，在準備好已鍍碳的銅網上滴1滴 (此時需注意避免把銅網刺破)，接著進行抽真空或放置於室溫下進行乾燥的動作，等完全乾燥之後即可放至TEM中進行量測。

3-6-3.2 FT-IR 的原理及樣品製備的步驟:

紅外線光譜儀是利用樣品分子中的原子產生振動和轉動模式，使得分子由基態躍遷至激發態，造成分子的淨偶極矩發生改變，因此伴隨著分子振動及轉動的改變，FT-IR 通常鑑定有機物官能基，特定官能基有特定吸收譜帶，一般分子振動所吸收的能量較小，大致是紅外光區的範圍，依波數大小不同可分為三個部分： $12800 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 為遠紅外光區， $4000 \sim 200 \text{ cm}^{-1}$ 為中紅外光區， $200 \sim 10 \text{ cm}^{-1}$ 為近紅外光區，一般最常用的範圍中紅外光區的部分，專門提供有關分子振動的訊息，而有機物的重要吸收區均位於此區。分子的每一個振動皆會吸收某一定波長的紅外光，因此，同一個分子的 IR 吸收光譜具有多個波長吸收峰，而分子振動的方式大致可分為分子伸展 (stretching) 和彎曲 (bending) 兩種，當原子和原子沿其軸向做伸縮運動，有對稱性及非對稱性振動，而 bending 則是原子依兩鍵結的夾角做運動，藉由不同官能基及不同原子所產生的特定吸收峰，可作為鑑定有機分子之重要依據。而 FT-IR 樣品製備步驟如下所示。

首先秤取 1-3 mg 的氧化鐵奈米粒子與 50 -100 mg 的光譜級溴化鉀 (KBr) 粉末，放置研鉢中，用杵研磨 2-3 min，兩者均勻混合為止，利用油壓機將混合的粉末，壓成薄片，取出薄片，放入 13 mm KBr 樣品盤中，把 13 mm 樣品盤放入儀器的樣品槽中，即可開始檢測樣品。

3-6-3.3 Ninhydrin reaction 的實驗方法：

Ninhydrin reaction 是在 1910 年由 Siegfried Ruhemann 所發現，是一種會與一級胺基反應而形成藍紫色的試劑，而本實驗則利用此現象，來判斷氧化鐵磁性奈米粒子是否正確接上 NH_2 。

分別秤取 1 mg 商品化的 Fe_3O_4 MNPs 及已修飾 NH_2 官能基的奈米粒子 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{NH}_2$ MNPs，放進離心小管內，加入 Kaiser test kit 中的三種試劑 (a) Ninhydrin solution 6% in ethanol (b) phenol solution 80% in ethanol (c) potassium cyanide solution in pyridine 各 10 μL ，再將離心小管放入加熱器中加熱，使溫度維持在 95 $^\circ\text{C}$ 下加熱 5 mins 後取出，可觀察其顏色變化以判斷表面修飾是否成功。

3-6-3.4 Coomassie Brilliant Blue protein assay 的原理

本篇以 Bradford protein-binding assay 的方法⁴⁵ 進行奈米粒子接上抗體前後之差異，此方法利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 與蛋白質結合的特性，是一種以光譜分析方式測量溶液中蛋白質的濃度的方法，又稱為 "Bradford protein assay"。在波長 465 nm 至 595 nm 之間有吸收值，CBG 染劑未與蛋白質結合時在酸性下呈現顏色為褐色，蛋白質加入後，蛋白質與 CBG 結合時會轉變為藍色，若蛋白質的濃度愈高，則蛋白質和 CBG 染劑結合的數量愈多，呈現的藍色就

愈深，所以蛋白質的濃度和的顏色深淺呈現正比的關係，而此時在 595 nm 波長下，會有較高的吸收值。

Bradford 蛋白質檢測的優點為 CBG 與蛋白質結合所需的時間很短，且結合的 G-250 與蛋白質結合的產物很穩定，可以在溶液中可維持約 1 小時，可降低試劑用量及樣品的損失，方便大量樣本的操作。

3-6-4 氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾之實驗方法

3-6-4.1 氧化鐵 (Fe_3O_4) 表面矽化處理

本研究中所使用磁性奈米粒子是為市售商品化的氧化鐵磁性奈米粒子 (Fe_3O_4 MNPs)，實驗一開始先秤取 200 mg 商品化的奈米粒子，先加入 40 mL 95 % 乙醇混合，以超音波震盪器震盪 30 分鐘，此時，先將配製好總體積 15 mL 之 300 μL 的 Tetraethyl orthosilicate (TEOS) 與 14.7 mL 的 95 % 乙醇，加入以震盪完成之 Fe_3O_4 MNPs，混合完成之後，將這混合液慢慢滴入 6 mL 25 % 氨水，氨水在此目的為催化劑，將氨水滴入完成於在 50 $^\circ\text{C}$ 以磁石強力地攪拌混合使其反應 5 hrs；反應完成後以強力磁鐵吸附磁性奈米粒子，並移除上清液，以 95 % 乙醇沖洗磁性奈米粒子 3 次，並放置於烘箱中以 110 $^\circ\text{C}$ 烘乾，儲存在乾燥箱於實驗時拿出使用，此磁性奈米粒子即為 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ MNPs，可利用 FT-IR 光譜鑑定其結構是否完成 Fe_3O_4 之表面矽化。

3-6-4.2 Fe₃O₄@SiO₂ MNPs 修飾表面官能基 (NH₂)

秤取 Fe₃O₄@SiO₂ MNPs 100 mg，加入 20 mL 2 % 3-Aminopropyl-Trimethoxysilane (APS)並在 70 °C 以磁石強力地攪拌混合使其反應 24 hrs，反應 24 hrs 後，以強力磁鐵吸附磁性奈米粒子，並移除上清液，以 95 % 乙醇沖洗磁性奈米粒子 3 次，再以去離子水清洗磁性奈米粒子 3 次，應放置於烘箱中以 110 °C 烘乾，儲存在乾燥箱於實驗時拿出使用，此磁性奈米粒子即為 Fe₃O₄@NH₂ MNPs，可利用 FT-IR 光譜鑑定其結構是否完成 Fe₃O₄@SiO₂ MNPs 修飾表面官能基 (NH₂)。

3-6-4.3 Fe₃O₄@NH₂ MNPs 接上多株抗體的表面修飾

此步驟主要將兔子 anti-P2 多株抗體與老鼠 anti-P2 多株抗體修飾到磁性奈米粒子之表面，首先秤取 1 mg 修飾上胺基的奈米粒子 Fe₃O₄@NH₂ MNPs 與 40 μL DMSO 混合，以超音波震盪 30 分鐘，使磁性奈米粒子均勻分佈後，先將 5 mg disuccinimidyl suberate (DSS)溶於 80 μL 中，而 DSS 在此目的為當作一個交聯劑，將此 DSS 溶液加入 Fe₃O₄@NH₂ MNPs 與 DMSO 的混合液中，在室溫下反應 2 hrs，來活化 Fe₃O₄@NH₂ MNPs 之 N 端，反應結束後，以強力磁鐵吸附磁性奈米粒子移除上清液，以 DMSO 沖洗磁性奈米粒子 3 次，再以 PBS (pH 7.4)之緩衝溶液清洗磁性奈米粒子 3 次後，加入 anti-P2 多株抗

體；兔子 anti-P2 多株抗體 10 μL 、老鼠 anti-P2 多株抗體 20 μL ，之後分別各加入 PBS 10 μL ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 24 hrs 後，以強力磁鐵吸附磁性奈米粒子並移除上清液，然後加入 100 μL 1 M Ethanolamine 於常溫下混合反應 1 hrs，反應結束後以強力磁鐵吸附磁性奈米粒子並移除上清液，以 PBS 清洗 3 次移除未鍵結的化合物，產物儲存在 100 μL 的 PBS 中，放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的環境下備用，並以微量盤分光光譜儀鑑定抗體是否接到磁性奈米粒子之表面。

3-6-5 應用多株抗體親和性奈米粒子萃取尿液檢體

3-6-5.1 應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取分析骨質疏鬆症患者之尿液檢體

將已修飾上抗體的磁性奈米粒子 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{rabbit polyclonal anti-P2}$ MNPs 之上清液移除，分別加入 125、100、75、50、25 μL 骨質疏鬆症研究對象之尿液檢體，在室溫下震盪攪拌反應 2 hr，以強力磁鐵吸附奈米粒子 (已捕捉到抗原) 移除上清液，用 PBS (pH 7.4) 清洗 3 次移除未鍵結的化合物，將粒子溶於 20 μL 的 PBS (pH 7.4) 中，均勻混合後，取樣品液體與基質 SA 以 1:4 混合，點上 MALDI 盤，並搭配使用 seed-layer 方法，先鋪一層基質 (2 mg SA 溶解於 1 mL $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{TFA} = 80/20/0.1$)，再鋪上一層基質 (15 mg SA 溶解於 1

mL CH₃CN / H₂O/ TFA= 50/50 /0.1)與樣品的混合液，待其乾燥後以 MALDI-TOF MS 進行分析。

3-6-5.2 應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取分析自願者尿液檢體

將已修飾上抗體的 1 mg 磁性奈米粒子 Fe₃O₄@rabbit polyclonal anti-P2 MNPs 之上清液移除，分別加入 125、100、75、50、25 μL 自願者之尿液檢體，在室溫下震盪攪拌反應 2 hr，以強力磁鐵吸附奈米粒子 (已捕捉到抗原) 移除上清液，用 PBS (pH 7.4) 清洗 3 次移除未鍵結的化合物，將粒子溶於 20 μL 的 PBS (pH 7.4) 中，均勻混合後，取樣品液體與基質 SA 以 1:4 混合，點上 MALDI 盤，並搭配使用 seed-layer 方法，先鋪一層基質 (2 mg SA 溶解於 1 mL CH₃CN / H₂O + 0.1 % TFA = 80 / 20 / 0.1)，再鋪上一層基質 (15 mg SA 溶解於 1 mL CH₃CN / H₂O / TFA = 50 / 50 / 0.1) 與樣品的混合液，待其乾燥後以 MALDI-TOF MS 進行分析。

3-6-5.3 應用老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取分析自願者尿液檢體

將已修飾上抗體的 1 mg 磁性奈米粒子 Fe_3O_4 @mouse polyclonal anti-P2 MNPs 之上清液移除，分別加入 125、100、75、50、25 μL 自願者之尿液檢體，在室溫下震盪攪拌反應 2 hr，以強力磁鐵吸附奈米粒子 (已捕捉到抗原) 移除上清液，用 PBS (pH 7.4) 清洗 3 次移除未鍵結的化合物，將粒子溶於 20 μL 的 PBS (pH 7.4) 中，均勻混合後，取樣品液體與基質 SA 以 1:4 混合，點上 MALDI 盤，並搭配使用 seed-layer 方法，先鋪一層基質 (2 mg SA 溶解於 1 mL $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{ TFA} = 80 / 20 / 0.1$)，再鋪上一層基質 (15 mg SA 溶解於 1 mL $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O} / \text{TFA} = 50 / 50 / 0.1$) 與樣品的混合液，待其乾燥後以 MALDI-TOF MS 進行分析。

3-7 MALDI-TOF MS 儀器操作條件及實驗材料與基質溶液配製

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)，購置於 Bruker Daltonics 公司 (Germany) 產品，本實驗之 MALDI-TOF MS 為 MicroFlex，具備波長為 337 nm 的氮氣脈衝式雷射，其飛行模式可分為直線型和反射型，飛行管長度分別為 1.05 m 和 1.96 m，各自有一偵測器進行偵測，而本實驗在進行胜肽鑑定是使用反射型模式操作，而磁性奈米粒子萃取蛋白質是使用直線型模式操作，其操作參數設定如表十三、表十四所示：

表(十三) MALDI-TOF MS 操作參數設定一，用於鑑定胜肽分子量：

操作參數設定	Reflector mode
Laser Frequency (Hz)	20
Ion Source 1 (kV)	19
Ion Source 2 (kV)	17.75
Lens (kV)	9.05
Pulsed Ion Extraction (ns)	270
Laser shot	100
Laser energy (μ J/ pulse)	12-17

表(十四) MALDI-TOF MS 操作參數設定二，用於奈米粒子萃取蛋白質：

質：

操作參數設定	Linear mode
Laser Frequency (Hz)	20
Ion Source 1 (kV)	20
Ion Source 2 (kV)	18.45
Lens (kV)	9.20
Pulsed Ion Extraction (ns)	600
Laser shot	100
Laser energy (μ J/ pulse)	36-40

MALDI-TOF MS 基質溶液之配製

(1) 飽和 α -CHCA 溶液：秤取 10 mg 的 α -CHCA 溶於 1 mL 的 0.1 %

TFA 之溶劑中，其溶劑包含 50 % 的 CH_3CN 及 50 % 去離子水

(2) 飽和 SA 溶液：秤取 15 mg 的 SA 溶於 1 mL 的 0.1 % TFA 之溶

劑中，其溶劑包含 50 % 的 CH_3CN 及 50% 去離子水

(3) Seed-layer 溶液：秤取 2 mg 的 SA 溶於 1 mL 溶於 1 mL 的 0.1 %

TFA 之溶劑中，其溶劑包含 80 % 的 CH_3CN 及 20 % 去離子水

3-8 研究對象之尿液檢體的來源

3-8-1 臨床上評估出骨質疏鬆症病患之尿液檢體：

骨質疏鬆症病患的臨床尿液檢體是由台中榮民總醫院骨科部潘建州醫師之病患所提供。病患資料及編號如表十五所示。

表(十五) 台中榮民總醫院潘建州醫師提供之尿液檢體受試者資料

受試者編號	年齡 (出生年次民國)	性別	DXA T-score (g/cm ²)
TCVGH-008	84 歲 (16)	女	-5.2
TCVGH-009	N/A	男	N/A
TCVGH-010	90 歲 (10)	女	-3.3

註: DXA : 雙能量 X 光吸收測量檢查

3-8-2 自願者之尿液檢體：

自願者之尿液檢體是由東海大學化學系徵求自願者所提供。自願者的資料及編號如表十六所示

表(十六) 東海大學化學系提供之尿液檢體受試者資料

受試者編號	年齡 (出生年次民國)	性別
Volunteer-001	22 歲 (78)	女
Volunteer-002	23 歲 (77)	女
Volunteer-003	26 歲 (74)	女
Volunteer-004	21 歲 (79)	女
Volunteer-005	54 歲 (46)	男
Volunteer-006	52 歲 (48)	女
Volunteer-007	24 歲 (76)	女

3-9 以磁性奈米粒子萃取尿液序列之檢量線製作

檢量線的製作是以訊號強度對尿液序列稀釋作圖求得，而檢量線尿液量範圍設定在 0~140 μL 之間。由於在不同尿液量經由兔子和老鼠 anti-P2 多株抗體親和性奈米粒子萃取後其偵測出來之訊號強度也會不同，首先取不同尿液量的磁性奈米粒子 1 μL 與 4 μL SA 基質溶液均勻混合，在從混合液中各取 1 μL 點至金屬樣品盤中，帶其自然乾燥後進入質譜分析，每一個不同尿液量的 well，任意找十個點打，並算出其平均訊號強度及標準偏差 (SD) 作圖，以訊號強度與不同尿液量作圖。

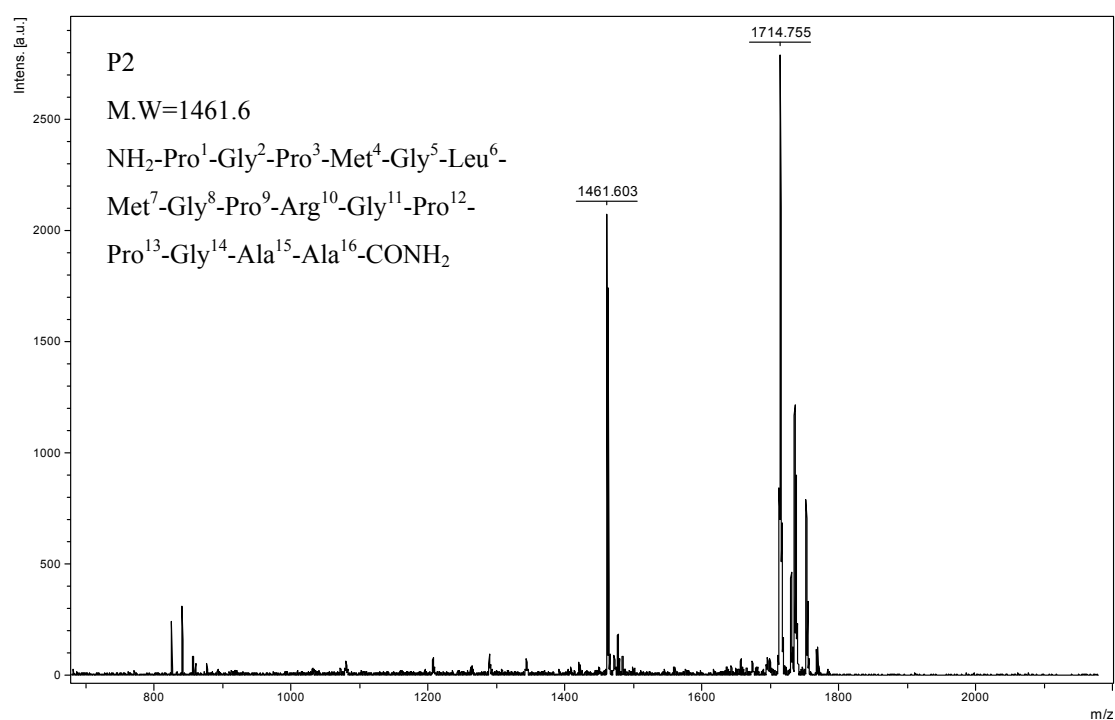
第四章 結果與討論

4-1 P2 胜肽之合成、純化與鑑定分子量實驗結果

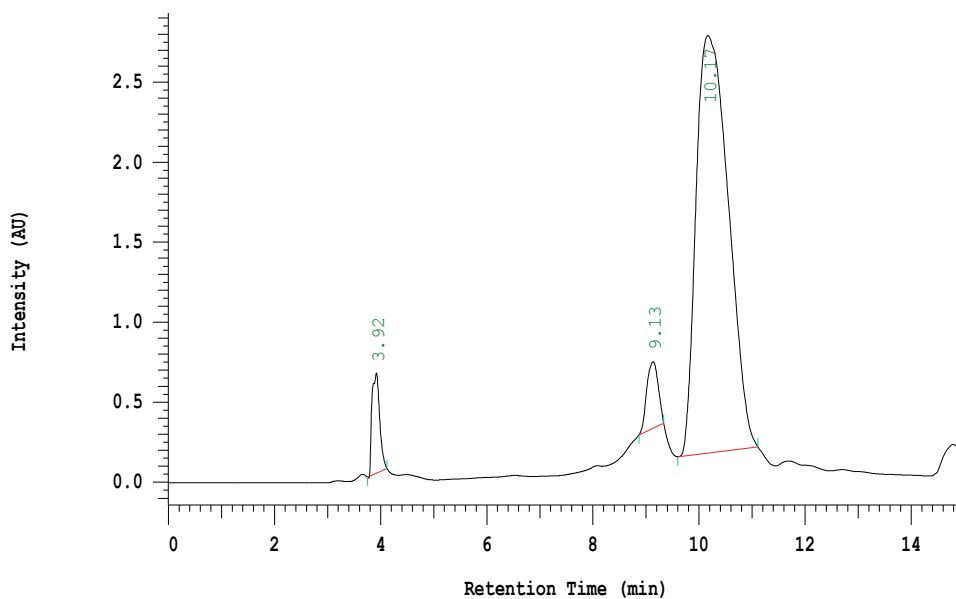
應用固相胜肽合成技術中 Fmoc Chemistry 合成法⁴⁶將 P2 胜肽片段合成於樹脂 (resin)後，利用三氟醋酸以化學裂解的方式將合成的胜肽之胺基酸保護基去除並將胜肽從樹脂 (resin)固著物切下，所得到之粗產物應用質譜儀 (MALDI-TOF MS)進行胜肽之分子量的鑑定。確定有目標胜肽產物後再以逆相高效能液相層析儀 (RP-HPLC)進行胜肽混合物之分析並純化出最終的胜肽主產物，最後再使用質譜儀進行胜肽主產物之分子量鑑定。

P2 胜肽粗產物合成完畢後，利用質譜儀 (MALDI-TOF MS)進行胜肽粗產物之鑑定，P2 胜肽的分子量經由理論計算後，得知為 1461.6，從(圖八)中質譜儀偵測到分子量為 1462.64 Da 之訊號，由此可知，P2 胜肽被成功合成出來。因此，進一步以 RP-HPLC 分離並純化出 P2 胜肽，一開始分析之樣品為粗產物，因此目標產物 (P2)及副產物皆會被逆相高效能液相層析儀偵測器所偵測到，將每個訊號的層析產物收集起來，利用質譜儀鑑定其分子量。(圖九)為 P2 粗產物經過分離純化之 RP-HPLC 圖譜分析結果圖，從圖譜中發現 P2 之滯留時間 (retention time)為 10.17 分鐘且為主產物，所以我們必須收集此吸收峰之主產物，收集的胜肽溶液經過冷凍乾燥處理後，再次

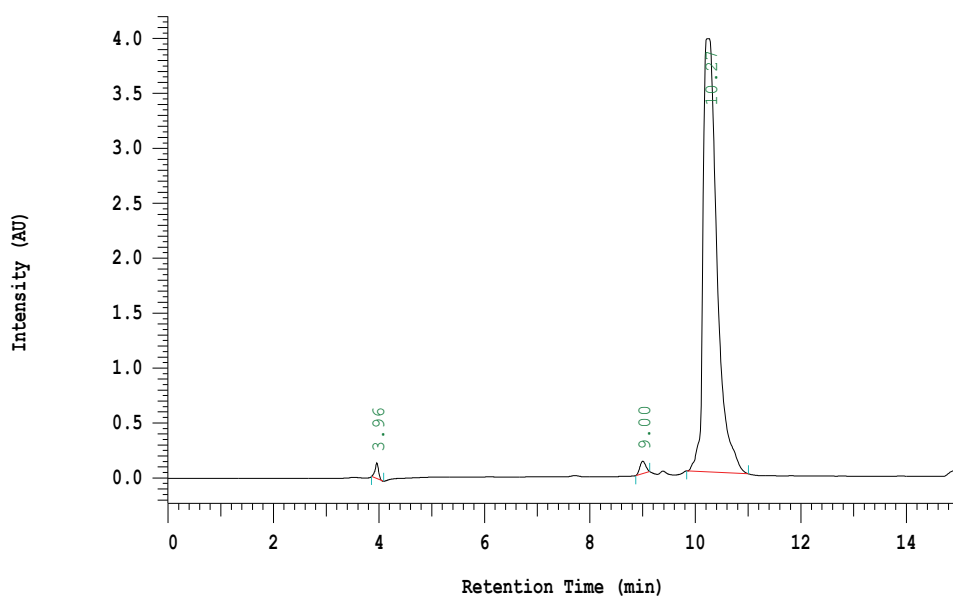
MALDI-TOF MS 鑑定其胜肽分子量。(圖十)為純化後 P2 胜肽樣品之 RP-HPLC 圖，圖中只有滯留時間為 10.27 分鐘之單一吸收峰圖，顯示 P2 胜肽經 RP-HPLC 純化過後，除了主要產物 P2 外已沒有任何副產物；而(圖十一)為純化後 P2 胜肽之質譜圖。



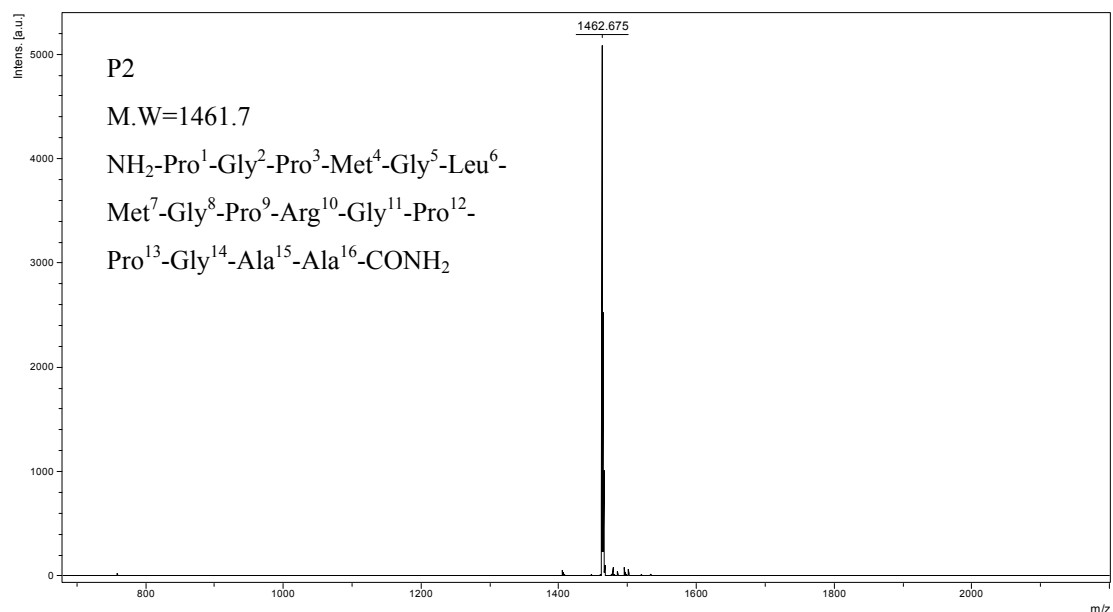
圖(八)、合成胜肽 P2 粗產物之質譜圖。圖譜中可發現有偵測到 P2 胜肽之分子量訊號 (1461.6 Da)，由此可知，P2 胜肽被成功合成出來。而分子量 1714.75Da 為胺基酸 Arg 之側鏈保護基 (Pbf) 未切除乾淨。



圖(九)、P2 胜肽粗產物之 RP-HPLC 層析圖。合成胜肽之粗產混合物之 RP-HPLC 層析圖，分析主產物之滯留時間為 10.17 分鐘。實驗梯度由 10 % 的 ACN (含 0.05 % TFA) 沖提到 90 %，時間由 0 到 15 分鐘。



圖(十)、P2 胜肽純化後之 RP-HPLC 層析圖。收集純化後之 RP-HPLC 層析圖中滯留時間為 10.27 分鐘為主產物。實驗梯度由 10 % 的 ACN (含 0.05 % TFA) 沖提到 90 %，時間由 0 到 15 分鐘。



圖(十一)、純化後合成胜肽 P2 之質譜圖。P2 胜肽經 RP-HPLC 純化過後，除了主要產物 (1462.6 Da)外已沒有任何副產物。

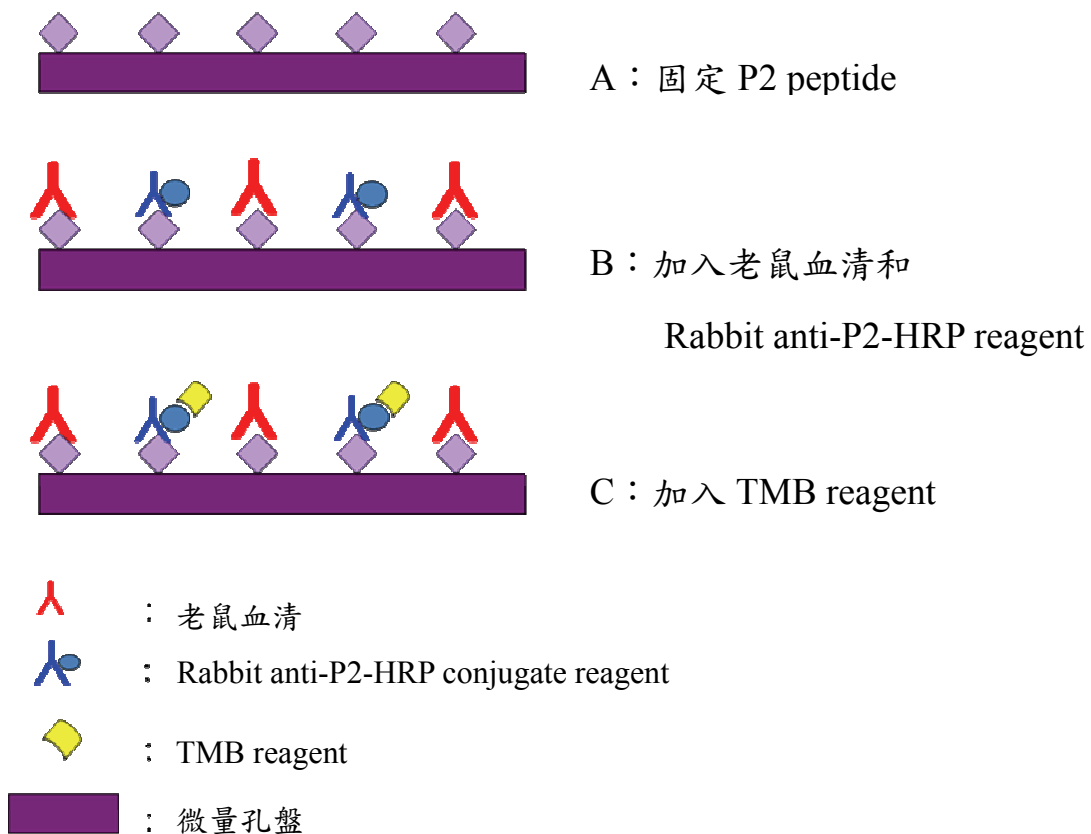
4-2 Mouse anti-P2 多株抗體效價之確認

本實驗利用純化好的 P2 胜肽當作抗原，將抗原與完全佐劑(第一劑)及不完全佐劑(第二劑)混合後，分別於第一週施打及第二週施打利用皮下注射於老鼠體內使其產生免疫反應，免疫一段時間後，以競爭型酵素免疫吸附法確認老鼠血清中是否已產生抗體。

利用競爭型免疫分析方法來偵測老鼠血清是否產生 anti-P2 抗體，以美國 BioCheck 公司所提供 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit，測定 anti-P2 之 ELISA 抗體效價，將 P2 peptide-BSA 固著於 ELISA 微量孔盤中，分別加入 A 鼠血清、B 鼠血清、C 鼠血清(對照組)與有酵素標示的 Rabbit anti-P2-HRP conjugate

reagent 預混一個小時後，再加入 TMB 試劑來進行呈色反應後，反應後以 1 N HCl 中止其呈色反應，以吸光度 450 nm 偵測之 OD 值，將偵測出 OD 值整理於表(十七)。並根據表(十七)繪製出直線長條圖圖(十三)。

根據美國 BioCheck 公司所提供 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit 競爭型酵素免疫方法，其反應過程如(圖十二)，當 anti-P2 多株抗體濃度越高時，其和 P2 peptide 的結合數目相對增加，因此會剩餘較少的 Rabbit anti-P2-HRP reagent 與 P2 peptide 結合，所以當抗體濃度越高，所測得之 OD 值越低，根據表(十七)A、B 鼠血清所測得之 OD 值與未經過免疫 C 鼠血清所測得之 OD 值相互比較，可發現 A、B 鼠所測得 OD 值比未經過免疫 C 鼠所測得 OD 值來的低，證實 A、B 鼠經過免疫反應後已產生 anti-P2 抗體。

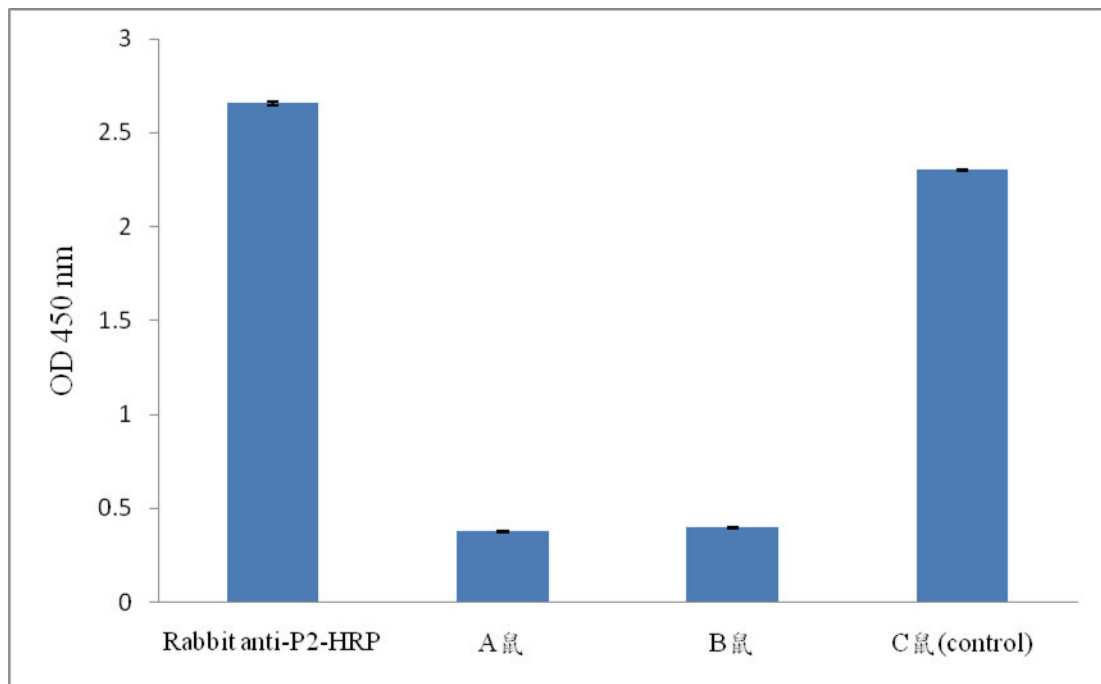


圖(十二)、利用競爭型免疫分析方法來偵測老鼠血清中是否產生 anti-P2 抗體。先將 P2 peptide 固定於微量孔盤表面上，當加入血清(或樣品)及有酵素標示的 rabbit anti-P2-HRP reagent 一起反應，再加入可以被 HRP 催化的 TMB 顯色劑，以吸光度 450 nm 偵測其 OD 值。因此，當樣品中的 anti-P2 多株抗體濃度越高時，與孔盤上的 P2 結合的量就越多，有酵素標示的 rabbit anti-P2-HRP reagent 結合的量就越少，因此所測得的吸光值就越低。

表(十七) 利用競爭型酵素免疫分析方法檢測老鼠血清之效價

	OD 450 nm \pm 標準偏差 ^a
Rabbit anti-P2-HRP reagent	2.659 \pm 0.004
A 鼠血清	0.375 \pm 0.001
B 鼠血清	0.397 \pm 0.003
C 鼠血清(control 組)	2.300 \pm 0.003

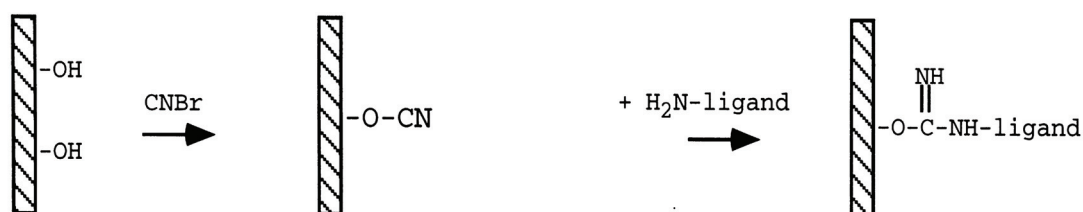
^a OD 值是以 mean OD \pm SD 來表示



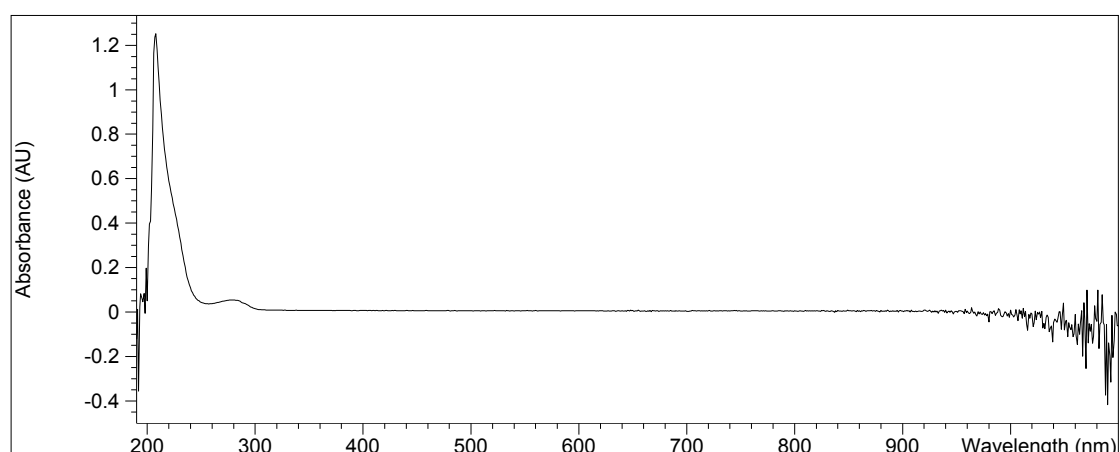
圖(十三)、以競爭型酵素免疫分析法 OD 450 nm 測得血清效價之直線長條圖。

4-3 製作 P2 胜肽之親和性管柱

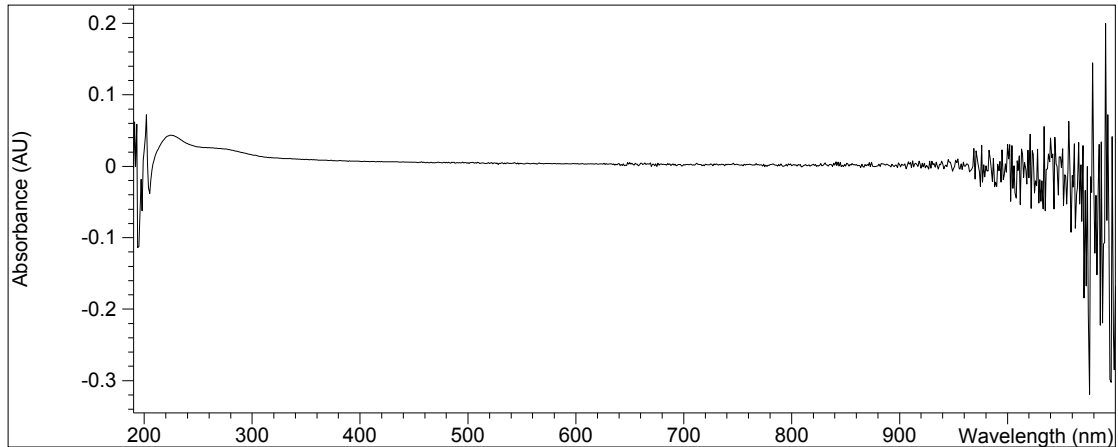
在純化抗體實驗前，首先製作 P2 胜肽親和性管柱，親和性管柱通常利用抗體、抗原經由共價性修飾之固相基質上(圖十四)，我們利用 UV detector 確認 P2 胜肽是否與 CNBr-activated Sepharose 4B 基質接合在一起，圖(十五)為 P2 胜肽之 UV 吸收光譜圖，在波長 220 nm 之吸收值為 1.20250，而圖(十六)為 P2 胜肽與 CNBr-activated Sepharose 4B 基質反應後，將反應後之液體抽氣過濾，剩下未與基質結合的胜肽溶液之 UV 吸收光譜圖，在波長 220 nm 之吸收值為 4.0533×10^{-2} ，由吸收值來證明 P2 胜肽經由共價性修飾至固相基質上。



圖(十四)、P2 胜肽經由共價性修飾至固相基質上之簡圖



圖(十五)、P2 胜肽之 UV 吸收光譜圖，在波長 220 nm 之吸收值為 1.20250。

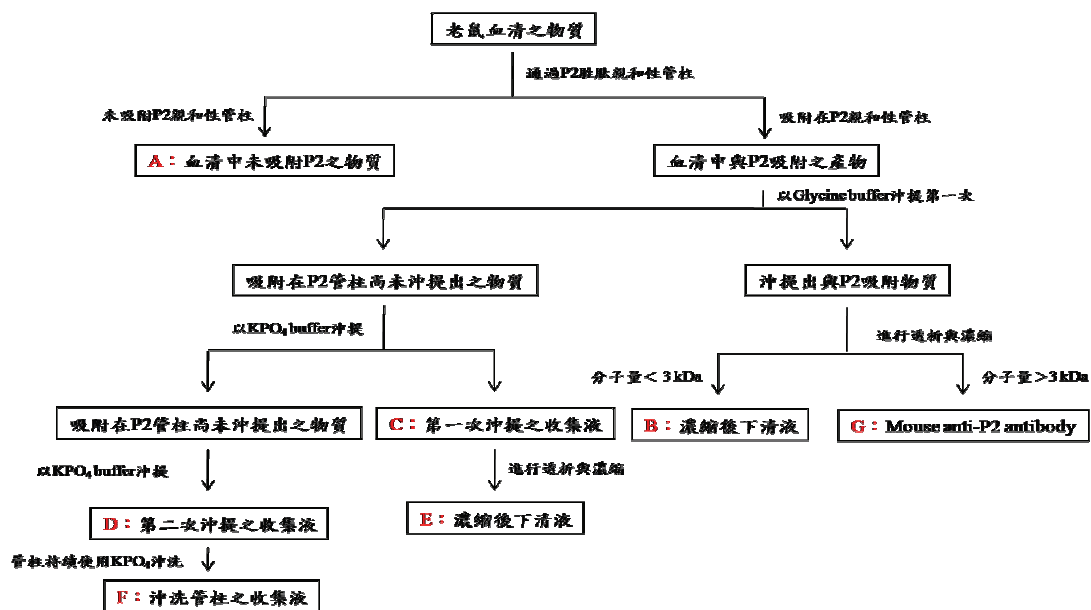


圖(十六)、P2 胜肽與 CNBr-activated Sepharose 4B 基質結合後，剩下未與基質結合的胜肽溶液之 UV 吸收光譜圖，在波長 220 nm 之吸收值為 4.0533×10^{-2} 。

4-4 應用 P2 胜肽製備之親和性管柱純化老鼠血清

將確定有效價的老鼠血清通過 P2 胜肽製備之親和性管柱，流程圖為圖(十七)。利用 anti-P2 老鼠血清與親和性管柱內的 P2 胜肽之間的特異性結合的親和力，可以用 15 mM 磷酸鹽緩衝溶液沖洗管柱內的膠體，使得和親和性管柱中 P2 親和力較弱的非專一性物質被沖洗出，收集液為 A：未吸附 P2 血清物質，再經由 8.7 mL 0.1 M Glycine 沖提液 (elute buffer) 沖提出吸附在 P2 胜肽親和性管柱之 anti-P2 多株抗體沖出後，將此收集液收集於含有 2.6 mL 1 M 磷酸鹽緩衝溶液之離心管，將此溶液進行透析與濃縮，濃縮後上清液則為 G：Mouse anti-P2 antibody；下清液則為小分子量物質 B：濃縮後下清液，此時

管柱用 10.5 mL 15 mM 磷酸鹽緩衝溶液沖洗管柱，將收集液收集於含有 3.2 mL 1 M 磷酸鹽緩衝溶液之離心管，此溶液分別為 C：沖提第一次之收集液；D：沖提第二次之收集液，將 C 溶液也進行透析與濃縮，將 E：下清液進行檢測，之後管柱持續用 15 mM 磷酸鹽緩衝溶液沖洗管柱，則為 F：沖洗管柱之收集液，將這些收集好的液體。我們以美國 BioCheck 公司所提供 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit 來測試在各純化步驟中，所含有的 anti-P2 抗體濃度，表(十八) 為 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit 競爭型酵素免疫方法，0、37.5、75、150、300、600 $\mu\text{g/mL}$ P2 標準品在 OD 450 nm 吸收值，並利用表(十八)回推在各步驟收集液之 P2 濃度，表(十九) 為經過純化在各步驟所含有的 P2 濃度，而最後 Mouse anti-P2 polyclonal antibody 為 7 $\mu\text{g/mL}$ 。



圖(十七)、老鼠血清通過 P2 胜肽製備之親和性管柱之流程圖

表(十八) 使用 16 amino acids collagen (P2) immunoassay test kit 競爭

型酵素免疫方法，P2 標準品在 OD 450 nm 吸收值

P2 標準品	OD 450 nm
0 $\mu\text{g/mL}$	2.664
37.5 $\mu\text{g/mL}$	2.132
75 $\mu\text{g/mL}$	1.732
150 $\mu\text{g/mL}$	1.421
300 $\mu\text{g/mL}$	0.83
600 $\mu\text{g/mL}$	0.318

表(十九) 利用競爭型酵素免疫分析檢測老鼠血清經過純化後之結果

樣品	OD 450 nm	總濃度
老鼠血清之物質	0.375 \pm 0.004	592.33 $\mu\text{g/mL}$
A：血清中未吸附 P2 之物質	1.337 \pm 0.115	171.31 $\mu\text{g/mL}$
B：第一次濃縮後下清液	1.963 \pm 0.160	37.63 $\mu\text{g/mL}$
C：第一次沖提收集液	1.729 \pm 0.051	74.27 $\mu\text{g/mL}$
D：第二次沖提收集液	1.763 \pm 0.133	98.91 $\mu\text{g/mL}$
E：濃縮後下清液	1.895 \pm 0.037	48.53 $\mu\text{g/mL}$
F：沖洗管柱之收集液	1.708 \pm 0.020	80.78 $\mu\text{g/mL}$
G：Mouse anti-P2 antibody	2.502	7 $\mu\text{g/mL}$

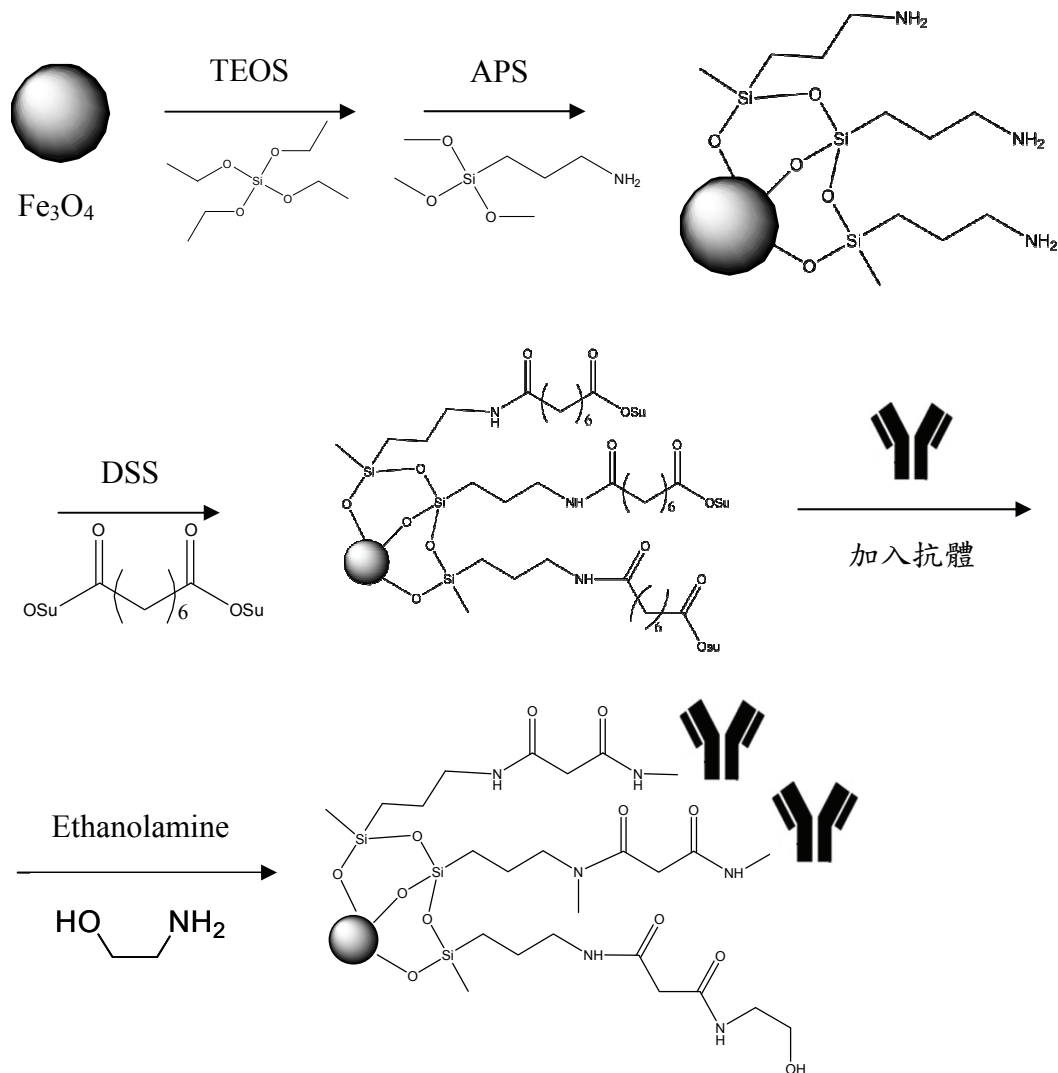
4-5 氧化鐵磁性奈米粒子 (Magnetic nanoparticle, MNPs)表面修飾

本實驗中，我們利用溶膠-凝膠法(sol-gel coating)³⁷，首先將氧化鐵(Fe_3O_4)磁性奈米粒子表面修飾為一層二氧化矽，然後再將氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾為具有胺基的官能基⁴⁷，接著使用雙端活化酯基的交聯劑(DSS)，將奈米粒子表面活化為具有高活性的基團，再加入 anti-P2 多株抗體，使抗體上的胺基與活化之 carboxyl 基團進行親核性反應後，以共價鍵形式將抗體固定在奈米粒子表面，最後加入 ethanolamine 作為阻斷劑，消耗掉已活化但未與抗體反應之 carboxyl 基團，以避免與後續之分析物反應而影響檢測之正確性，氧化鐵磁性奈米粒子之表面修飾流程及結構如圖(十八)所表示。

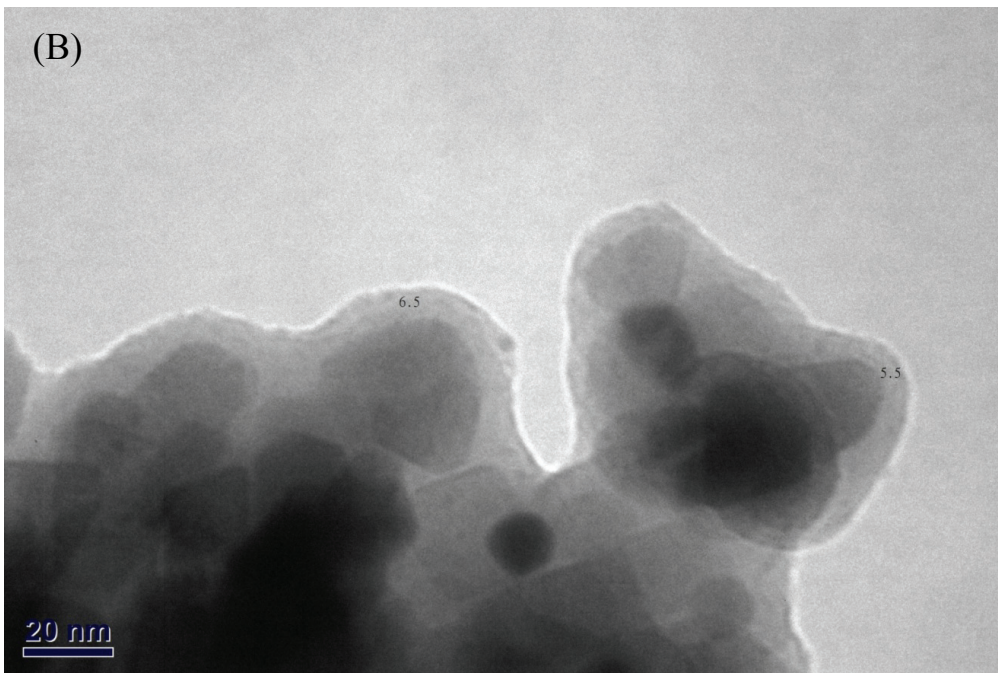
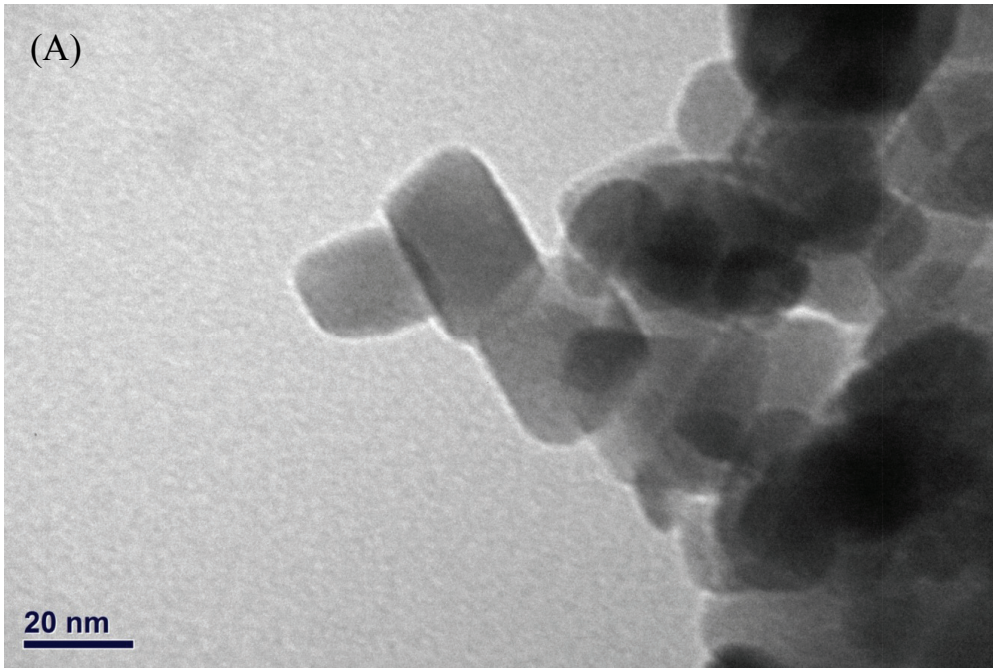
A. 氧化鐵(Fe_3O_4)表面矽化處理【Sol-Gel Coatings】：

本研究中所使用的磁性奈米粒子為市售商品化的氧化鐵奈米粒子，而在其表面修飾上各種官能基，目的是為了使抗體能以共價鍵的形式與氧化鐵奈米粒子結合。文獻中針對粒子的粒徑及訊號結果加以討論，以微米粒子(μm)及奈米粒子(nm)兩者所得訊號相互比較，結果以奈米粒子在萃取的效果較微米粒子高，由此可知粒徑大小會影響萃取的效果，因此，本實驗中選用奈米粒子作為固相支撐物，圖(十九)(A)與(B)為氧化鐵奈米粒子之表面在修飾前後的 TEM 影像圖，由圖中可以發現未經修飾的奈米粒子，其粒徑大小約為 20 nm-25 nm，在經過

表面修飾後，其粒徑大小約為 25 nm - 40 nm，雖然粒子有稍微變大，但未改變為微米粒子，其粒徑大小仍介於 1 - 100 nm 之範圍內，屬於奈米級粒子，因此經過表面修飾的磁性奈米粒子，仍然可以提升在萃取之效果。

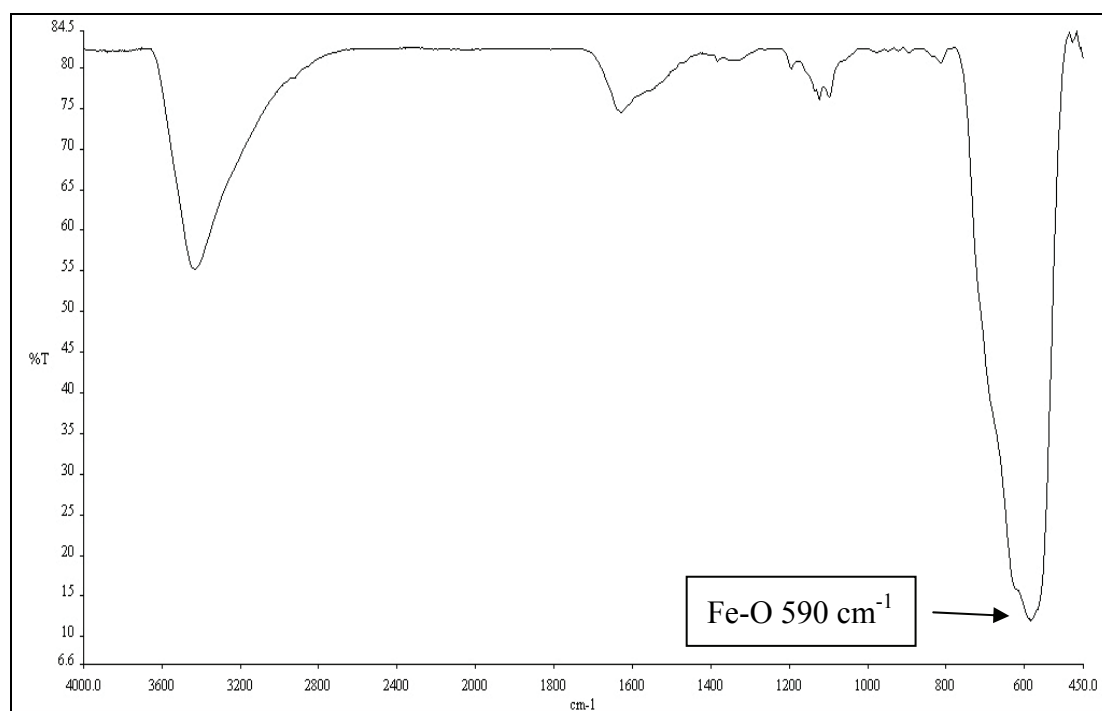


圖(十八)、氧化鐵磁性奈米粒子之表面修飾流程及結構

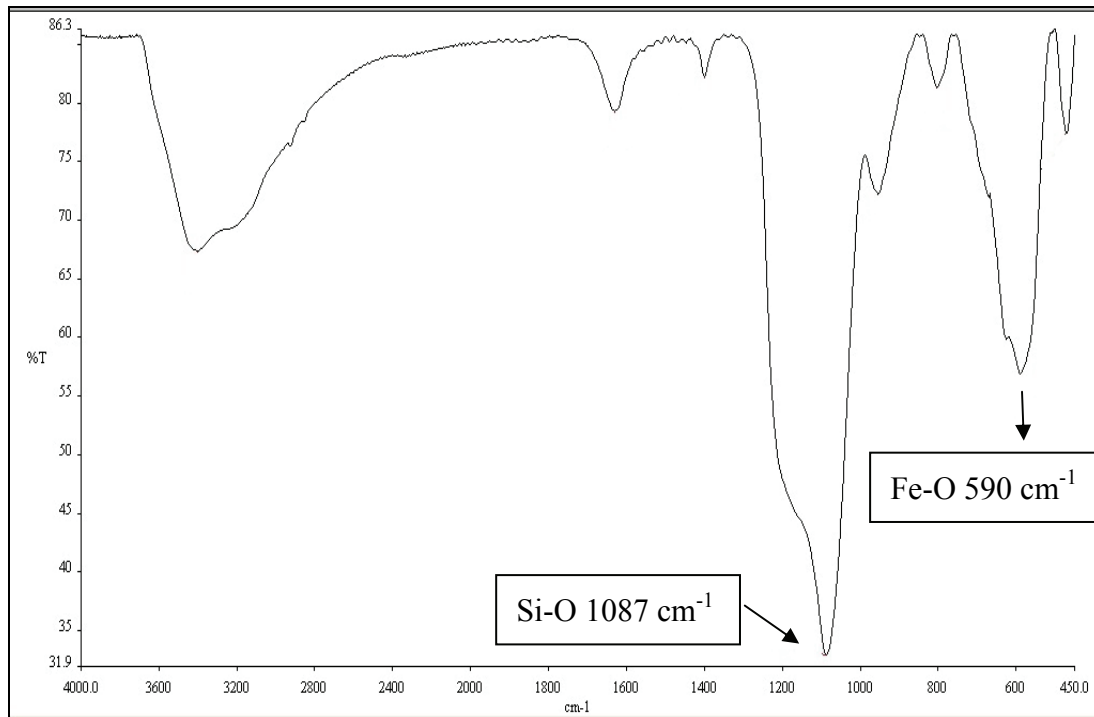


圖(十九)、(A)為氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾前之 TEM 影像圖，(B)為氧化鐵磁性奈米粒子表面修飾後之 TEM 影像圖($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{NH}_2$ MNPs)。

氧化鐵(Fe_3O_4)奈米粒子表面經過矽化處理後，為了證明是否成功在磁性奈米粒子表面修飾上 SiO_2 ，以紅外線光譜儀 FT-IR 檢測結果來判斷。根據文獻資料指出，一般而言 Si-O 的 FT-IR 訊號吸收範圍在 $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ ，文獻中 Si-O 的 FT-IR 吸收大約在 1035 cm^{-1} 處，Fe-O 的 IR 吸收大約在 580 cm^{-1} ，先由圖(二十)結果來看，在市售氧化鐵奈米粒子之 FT-IR 圖譜，只有看到在 590 cm^{-1} 有吸收訊號，而經過表面矽化處理後，圖(二十一)實驗結果發現在 1087 cm^{-1} 處有吸收，可推測為 Si-O 訊號，在 590 cm^{-1} 的吸收，推測為 Fe-O，而在 $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ 處有 O-H 鍵結。綜合以上結果，證明我們已成功將氧化鐵奈米粒子接上 SiO_2 官能基。



圖(二十)、市售氧化鐵磁性奈米粒子之 FT-IR 圖譜。



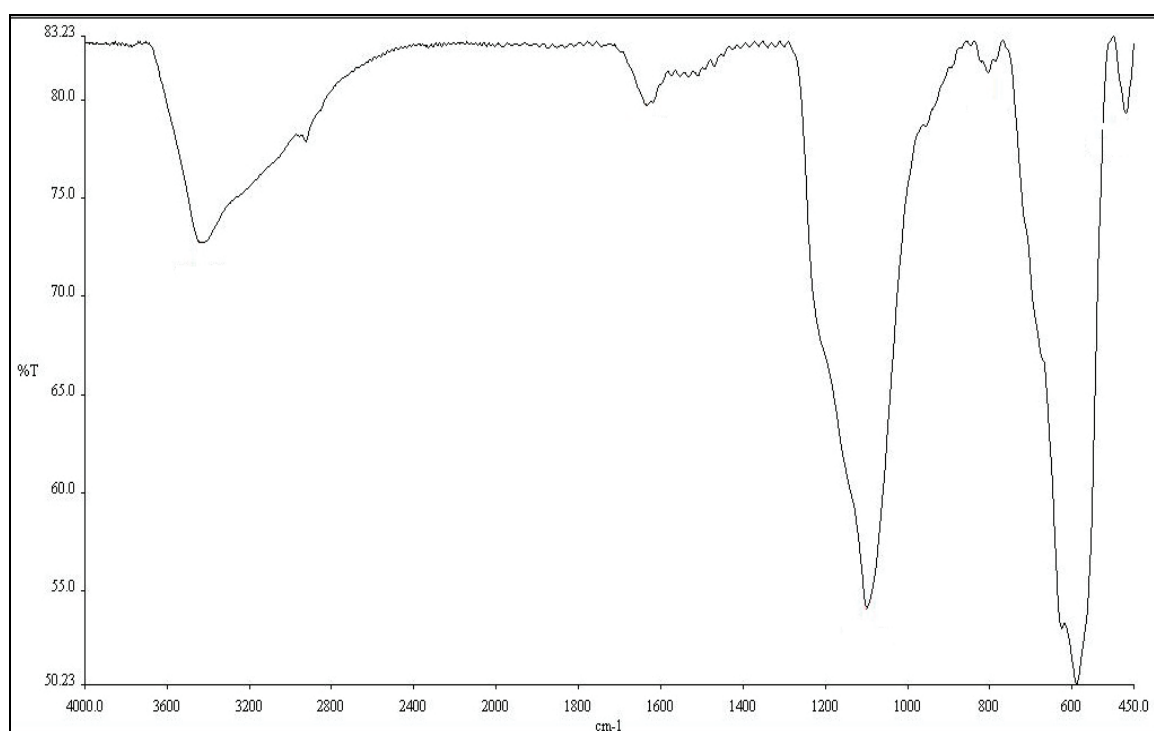
圖(二十一)、氧化鐵 (Fe_3O_4) 奈米粒子表面經過矽化處理 (SiO_2) 後，以紅外線光譜儀 FT-IR 檢測結果，在 1087 cm^{-1} 處有吸收，可推測為 Si-O 訊號，在 590 cm^{-1} 的吸收，則推測為 Fe-O 訊號。

B. 氧化鐵 (Fe_3O_4) 表面修飾官能基 (NH_2):

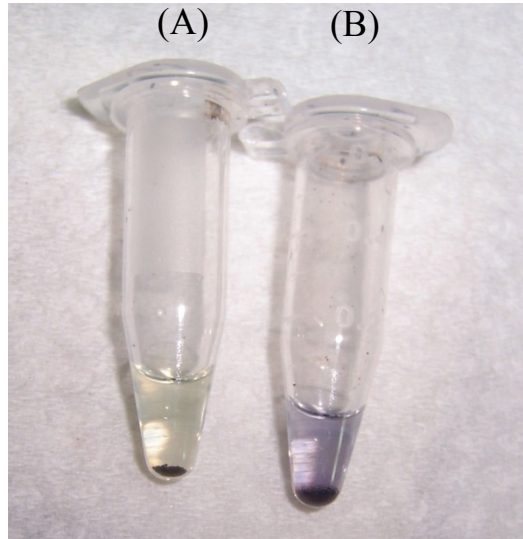
經過矽化處理之氧化鐵磁性奈米粒子，再將氧化鐵 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$) 奈米粒子表面修飾官能基 (NH_2)，再以紅外線光譜儀 FT-IR 檢測結果，如圖(二十二)所示。根據文獻報導，FT-IR 光譜在 790 cm^{-1} 有一個 NH_2 吸收峰，但訊號很弱，而實際測得的 IR 光譜，結果顯示，在 790 cm^{-1} 處沒有明顯的吸收峰，不易判別是否接上 NH_2 。

因此改用 Ninhydrin test 加以判斷奈米粒子表面是否被 NH_2 官能基所修飾，由於 Ninhydrin 與一級胺反應會形成藍紫色現象⁴⁸，可以

用來辨別 NH_2 官能基是否接上；實驗中使用 Ninhydrin test 後結果如圖(二十三)所示，表面未經 NH_2 官能基修飾時，溶液呈褐色，表面經 NH_2 官能基修飾後溶液呈藍紫色，因為 Ninhydrin 與奈米粒子上的一級胺反應形成藍紫色，由此證明氧化鐵 (Fe_3O_4) 奈米粒子表面已成功修飾 NH_2 官能基。



圖(二十二)、氧化鐵 (Fe_3O_4) 奈米粒子表面修飾官能基 (NH_2) 後，以紅外線光譜儀 FT-IR 檢測結果。根據文獻 N-H 在 790 cm^{-1} 會有訊號，但在此 FT-IR 圖譜並沒有明顯的吸收峰，不易判別是否接上 NH_2 。



圖(二十三)、應用 Ninhydrin test 檢測 NH_2 官能基存在與否。(A) 表面修飾官能基 (NH_2)前之氧化鐵奈米粒子。(B) 表面修飾官能基 (NH_2)後之氧化鐵奈米粒子，以 Ninhydrin test 檢測之結果，Ninhydrin 與一級胺反應會形成藍紫色。

4-6 氧化鐵 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{NH}_2$) 奈米粒子與兔子和老鼠 anti-P2 多株抗體結合

將兔子和老鼠 anti-P2 多株抗體與奈米粒子結合，anti-P2 多株抗體與奈米粒子以共價鍵的方式結合，可藉由微量盤分光光譜儀判斷抗體是否接上。我們使用 Bradford 蛋白質含量檢測，測量兔子多株抗體在波長 595 nm 所測得之吸收值 0.657，而老鼠多株抗體所測得吸收值為 0.328，兔子多株抗體和老鼠多株抗體與奈米粒子反應完後，以強力磁鐵吸附奈米粒子，取出兔子抗體與奈米粒子反應後之上清液在波長 595 nm 所測得之吸收值為 0.329，而老鼠抗體與奈米粒子反應後之上清液測得吸收值為 0.303，而水在波長 595 nm 所測得之吸收值為 0.292，根據吸收值明顯的降低，可推論抗體已與奈米粒子結合。

表(二十) 利用 Bradford 蛋白質含量檢測法，測定 Anti-P2 多株抗體與奈米粒子結合前後，以微量盤分光光譜儀(ELISA)檢測樣品在 595nm 時分析物的吸收值

	波長 595 nm 吸收值	蛋白質濃度
去離子水	0.292	
兔子 Anti-P2 多株抗體	0.657	0.873 mg/mL
兔子抗體與奈米粒子反應後之上清液	0.329 ± 0.041	0.075 mg/mL
推估接上濃度		0.798 mg/mL
老鼠 Anti-P2 多株抗體	0.328	0.073 mg/mL
老鼠抗體與奈米粒子反應後之上清液	0.303 ± 0.009	0.012 mg/mL
推估接上濃度		0.061 mg/mL

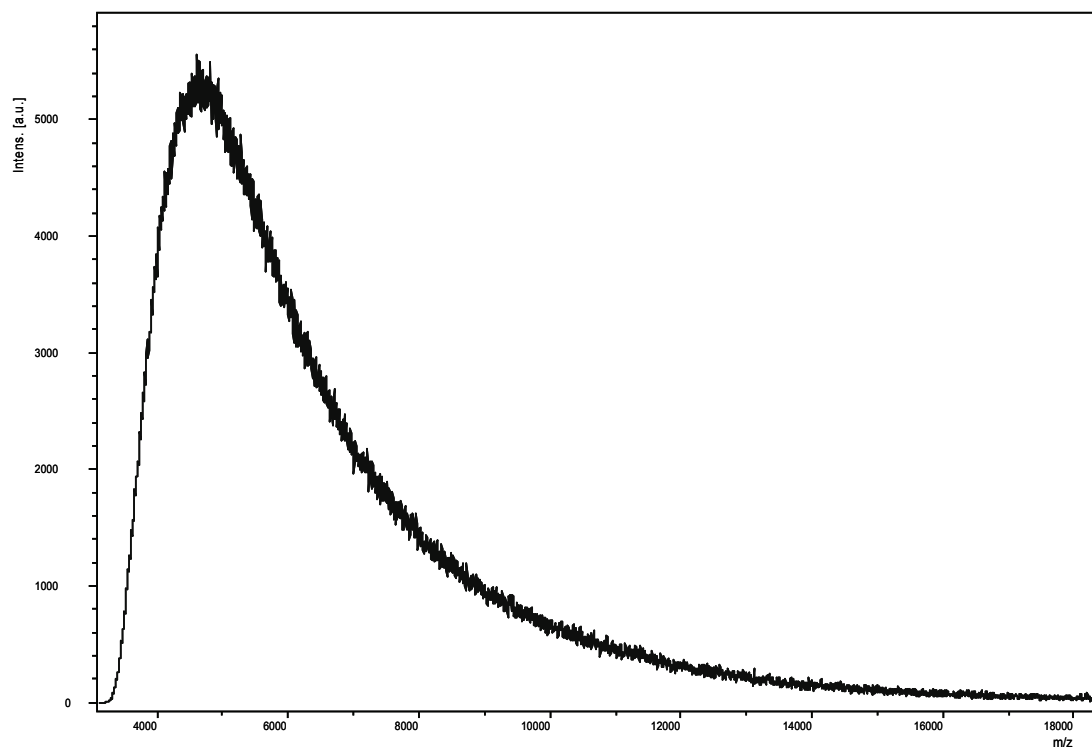
4-7 應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取尿液檢體

A. 應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取分析研究對象之尿液檢體

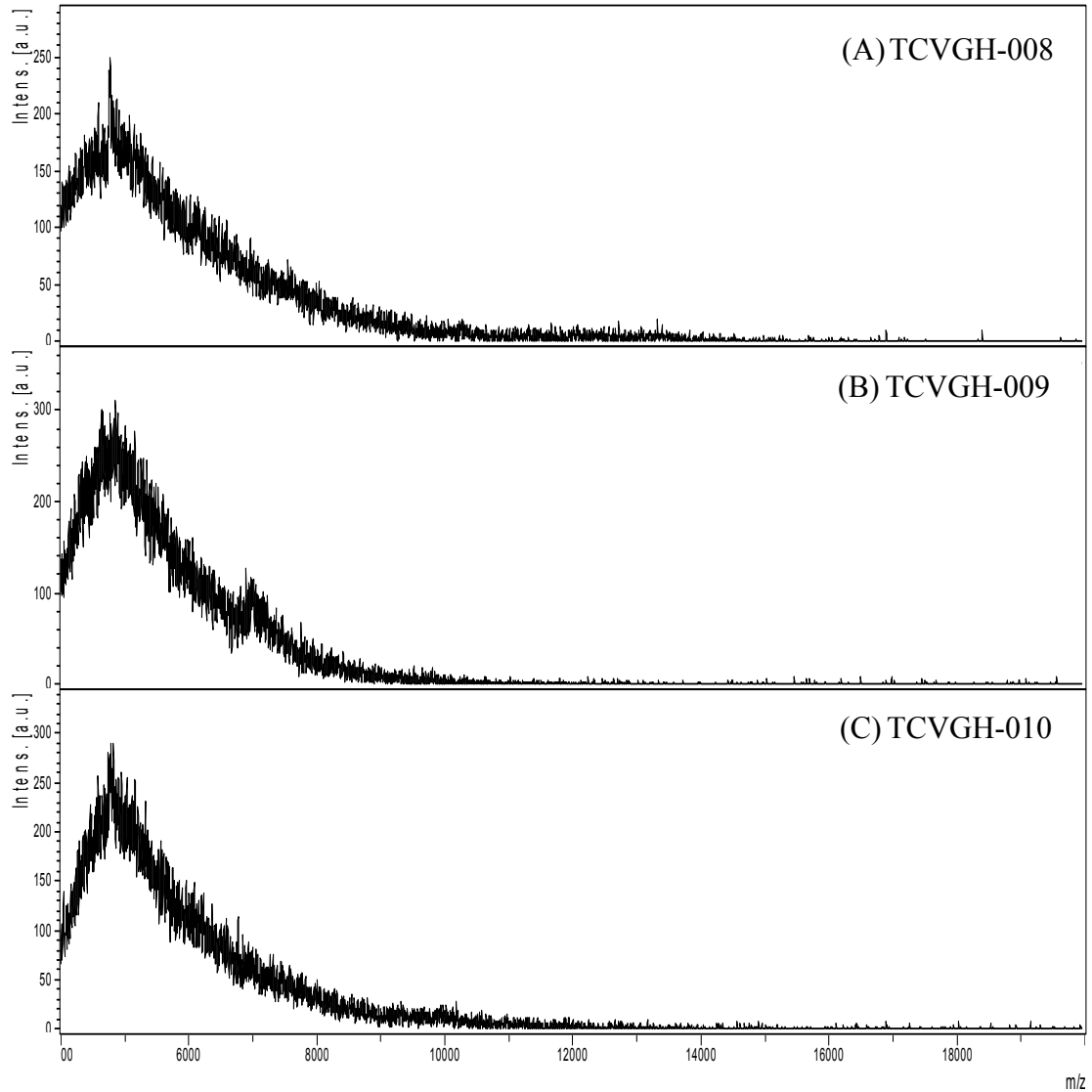
本實驗針對骨質疏鬆症病患，首先將兔子多株抗體親和性奈米粒子與基質 SA 以 1:4 比例混合點至金屬樣品盤中，直接以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號如圖(二十四)所示，圖中是沒有任何質譜訊號。之後我們再將尿液檢體與基質 SA 混合後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號如圖(二十五)所示。尿液中包含許多鹽類，且鹽類與基質共結晶效果不好，會干擾質譜圖分析訊號，因此圖(二十五)無法觀察到 NTx 之訊號。

圖(二十六)利用製備之兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取骨質疏鬆症病患之尿液檢體 125 μ L 後，以 MALDI-TOF MS 分析尿液中與抗體具有親和性的胜肽之質譜訊號，根據圖(二十六)均偵測到與 NTx 分子量 (9902.0 Da)相近之訊號 9765.3 Da，根據文獻資料顯示⁴¹，NTx 之膠原片段在尿液中非常穩定，不會因為其他原因而分解，由於骨質疏鬆症病患皆偵測有接近於此分子量的訊號 9765.3 Da，我們初步推測此訊號可能即為生化指標 NTx 之訊號，將進一步確認此蛋白質生化指標 (Protein biomarker)之胺基酸序列。圖(二十七~二十九)為針對骨質疏鬆症病患 (TCVGH-008~TCVGH-010)分別將尿液檢體以 125、100、75、50、25 (μ L)序列，經過兔子多株抗體親和性奈米粒子

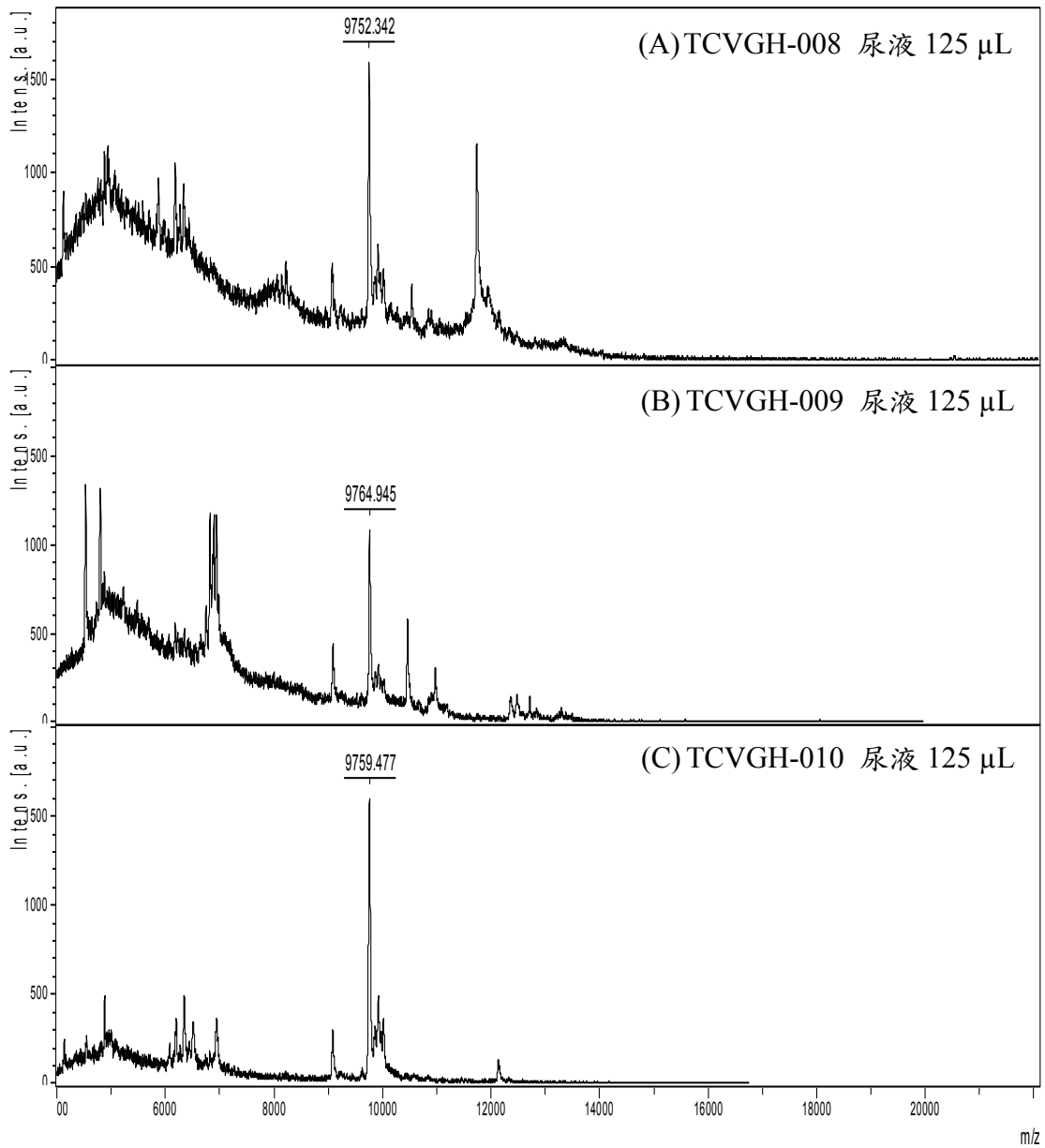
萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測質譜訊號。我們將 MALDI-TOF MS 所偵測到質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，經三次重覆後，取其平均值，如表(二十一)所示。



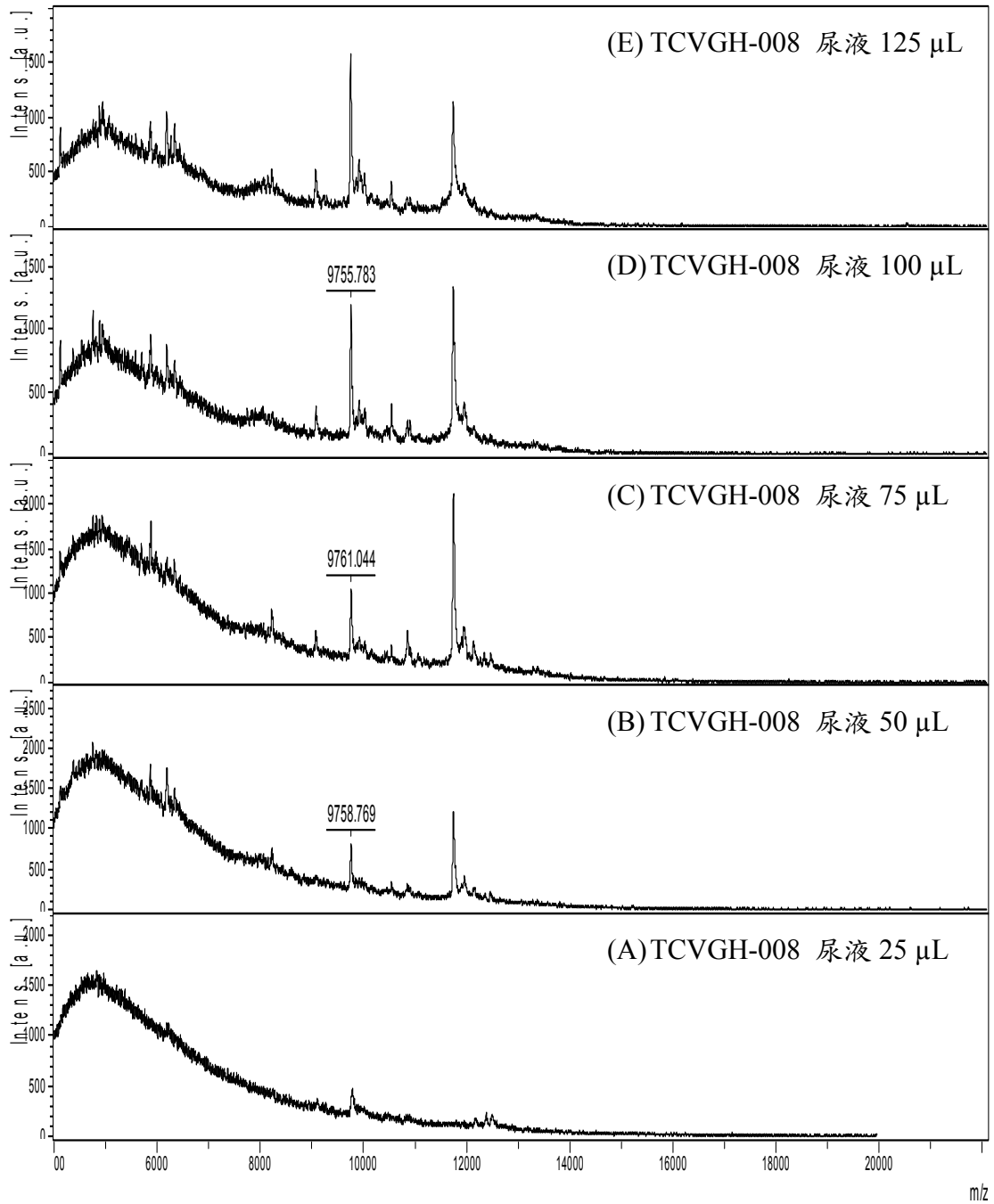
圖(二十四)、兔子多株抗體親和性奈米粒子直接以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。



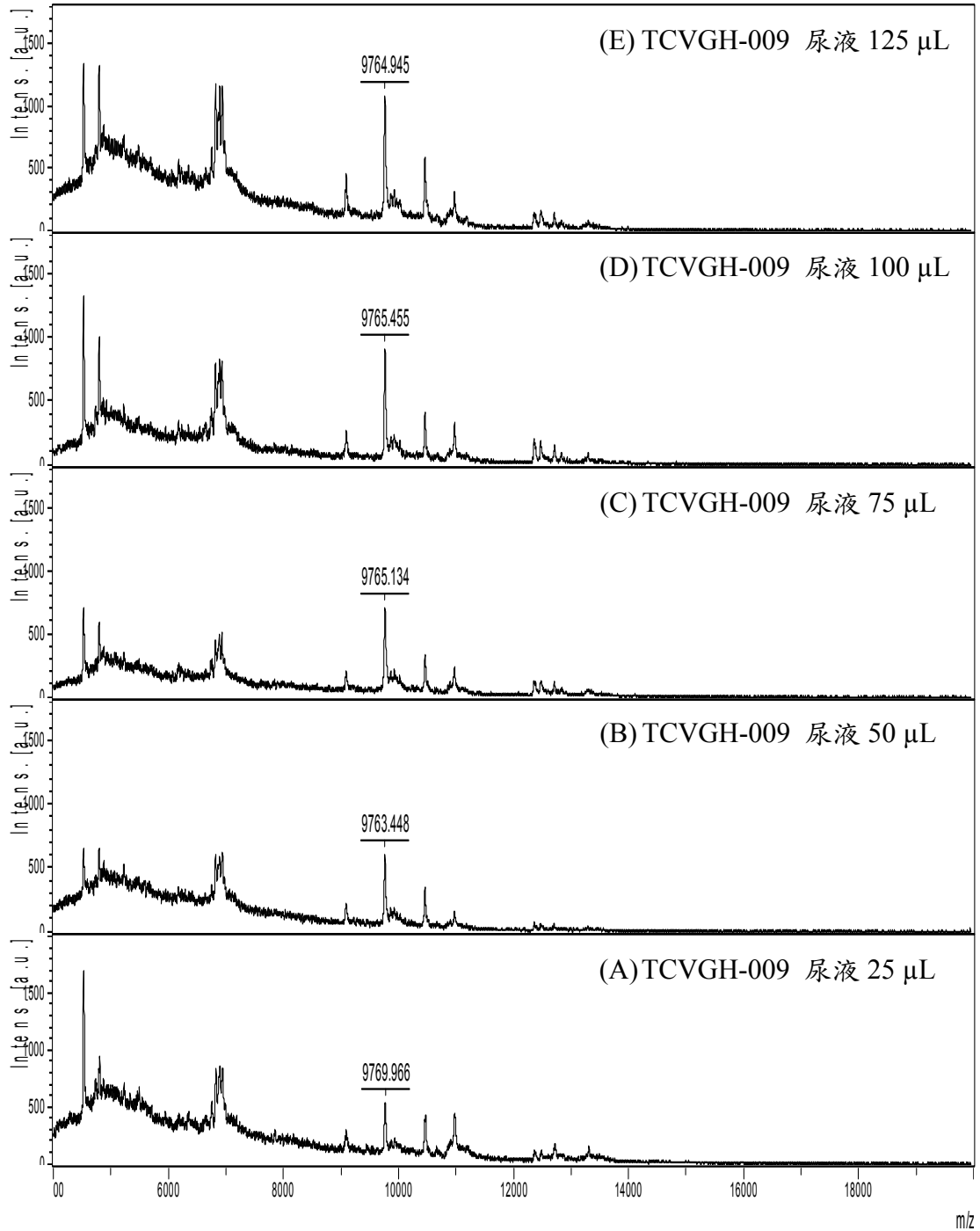
圖(二十五)、研究對象之尿液檢體以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。(A) 骨質疏鬆症病患(TCVGH-008)、(B) 骨質疏鬆症病患(TCVGH-009)、(C) 骨質疏鬆症病患(TCVGH-010)之尿液檢體，直接與基質 SA 混合後，以 MALDI-TOF MS 偵測之結果。



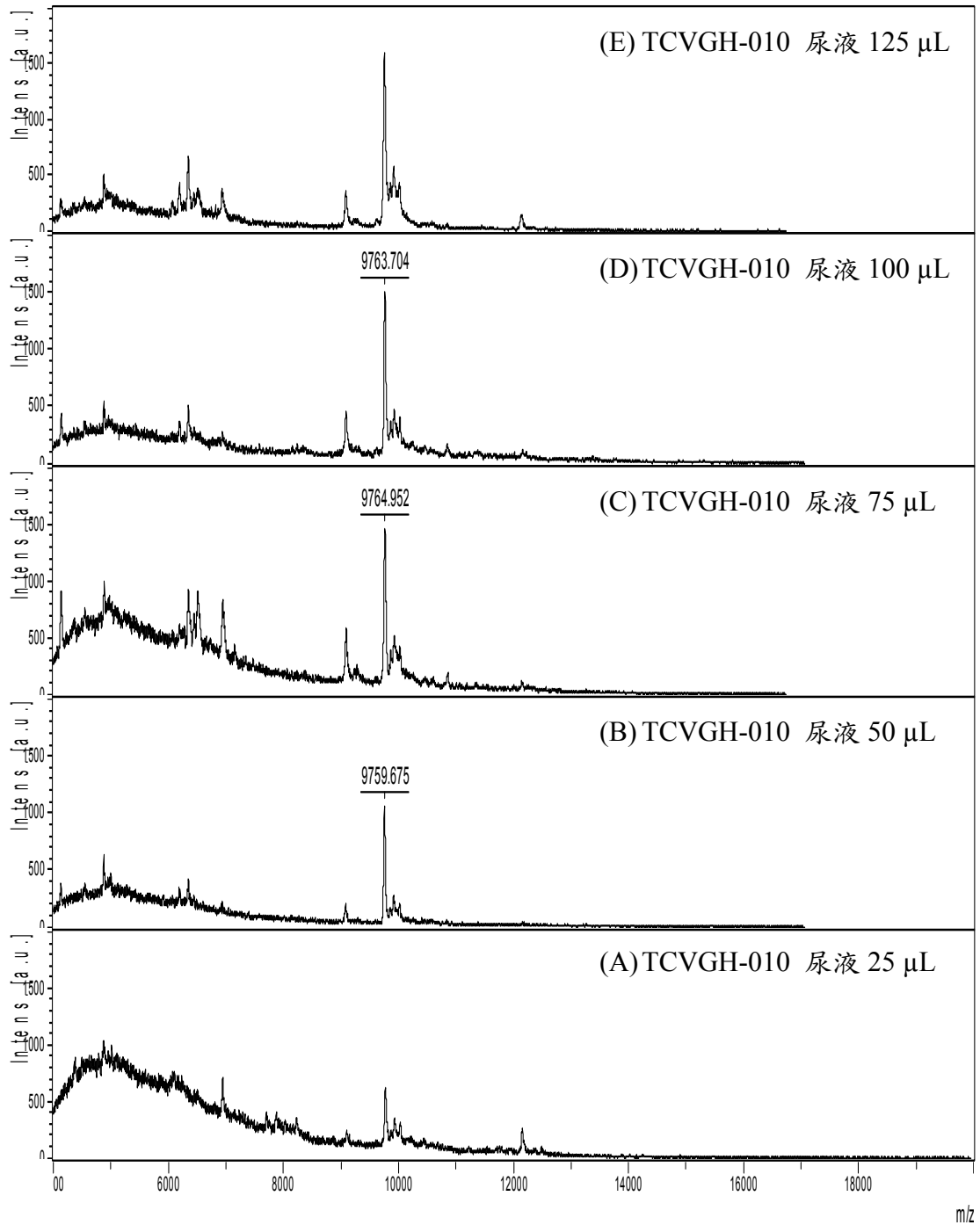
圖(二十六)、研究對象之尿液檢體 125 μ L 經由兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。(A)骨質疏鬆症病患(TCVGH-008)、(B)骨質疏鬆症病患(TCVGH-009)、(C)骨質疏鬆症病患(TCVGH-010)之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之結果。



圖(二十七)、編號 TCVGH-008 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D、E 分別為尿液量 125、100、75、50、25 μ L 進行萃取所得質譜訊號。



圖(二十八)、編號 TCVGH-009 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D、E 分別為尿液量 125、100、75、50、25 μ L 進行萃取所得到質譜訊號。



圖(二十九)、編號 TCVGH-010 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D、E 分別為尿液量 125、100、75、50、25 μ L 進行萃取所得到質譜訊號。

表(二十一) 骨質疏鬆症病患尿液檢體經由兔子多株抗體親和性奈米

粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號

強度，經一天三次取其平均值。

Urine ^a 受試者編號	125 μ L	100 μ L	75 μ L	50 μ L	25 μ L
TCVGH-008 ^b	1608.88 \pm 142.04	1398.50 \pm 42.99	1273.25 \pm 52.70	1041.49 \pm 103.53	432.78 \pm 34.48
TCVGH-009 ^b	1041.66 \pm 42.99	943.05 \pm 51.53	737.42 \pm 38.52	597.00 \pm 92.37	442.27 \pm 17.42
TCVGH-010 ^b	1834.63 \pm 141.85	1756.72 \pm 90.12	1497.07 \pm 38.53	1060.73 \pm 92.37	517.0 \pm 46.73

^a 尿液檢體含量經由免疫親和性奈米粒子萃取

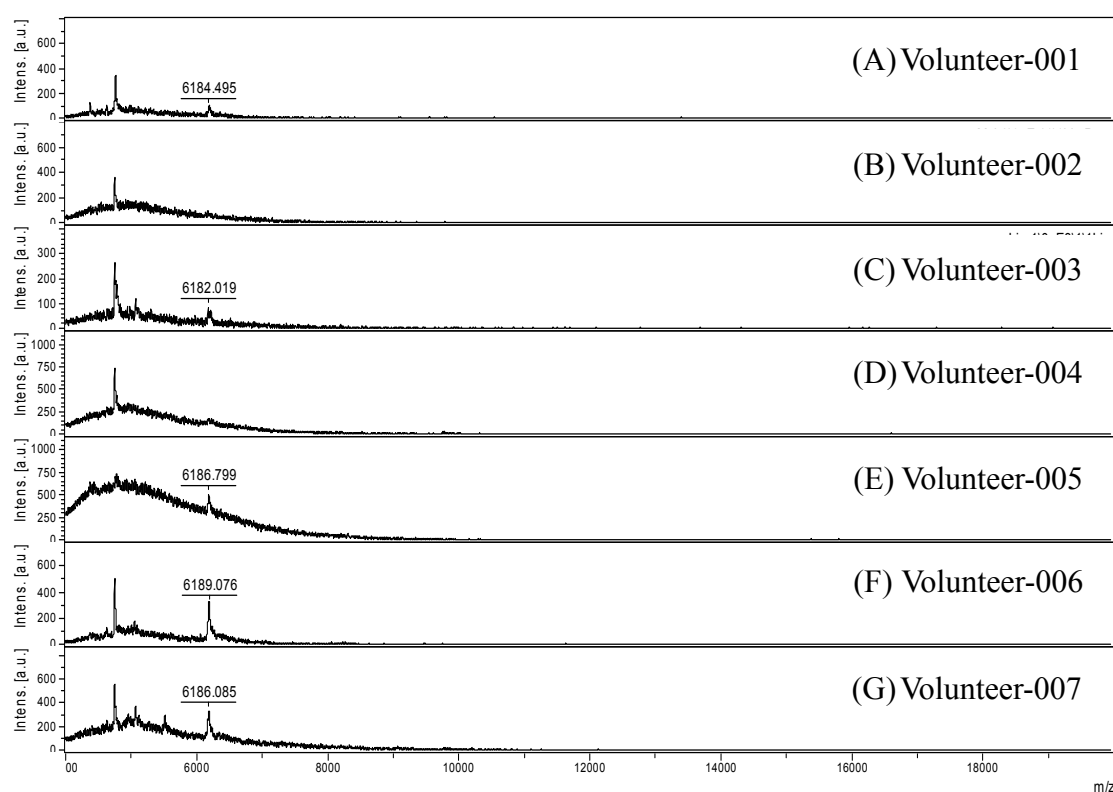
^b 經由 DXA 測量診斷出為骨質疏鬆症

實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

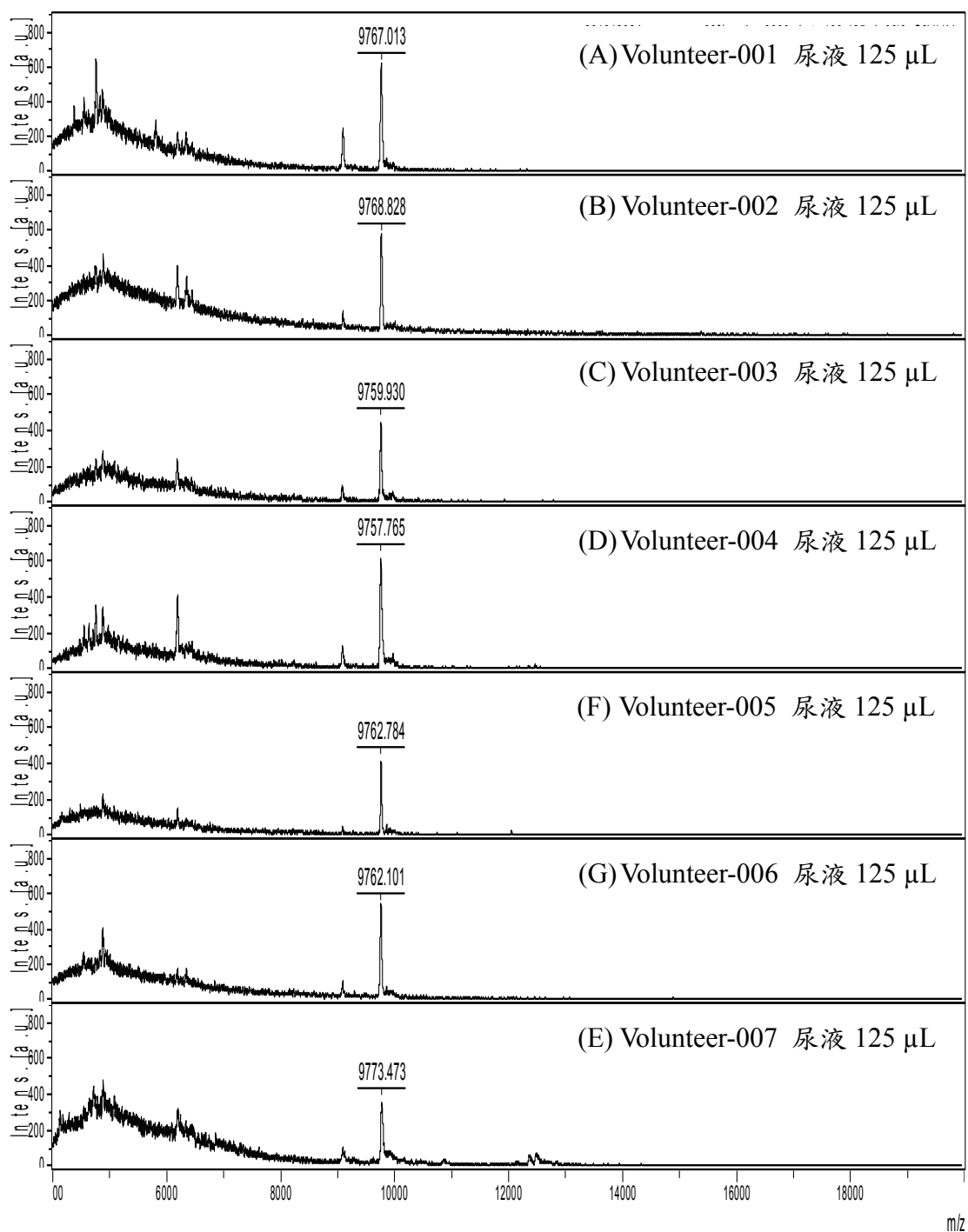
B. 應用兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取分析自願者之尿液檢體

本實驗主要針對東海大學化學系提供之自願者尿液檢體進行分析，首先將尿液檢體直接與基質 SA 混合後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號如圖(三十)所示。尿液中包含許多鹽類，且鹽類與基質共結晶效果不好，會干擾質譜圖分析訊號，因此圖(三十)也無法觀察到 NTx 之訊號。圖(三十一)為七位自願者尿液檢體 125 μL ，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後以 MALDI-TOF MS 偵測其質譜訊號，此七位自願者尿液檢體 125 μL 經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，由 MALDI-TOF MS 皆可偵測到與骨質疏鬆病患相近的分子量大約為 9765.3 Da 之訊號，由於 7 位自願者皆有偵測到接近此分子量的訊號，可知此訊號非常重要，我們推測 9765.3 Da 之訊號為一重要之指標，圖(三十二~三十八)針對自願者分別將尿液檢體以 125、100、75、50、25 (μL) 序列經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度。我們將這些尿液檢體以序列方式分別進行萃取，利用 MALDI-TOF MS 偵測其訊號，以一天三次平均及三天平均所呈現，表(二十二)則顯示以自願者尿液檢體 (125 μL) 經由兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度取其平均值，表(二十三~二十五)則顯示以自願者尿液檢體 (100、75、50 μL) 經由兔子多株抗體親和性奈米粒子

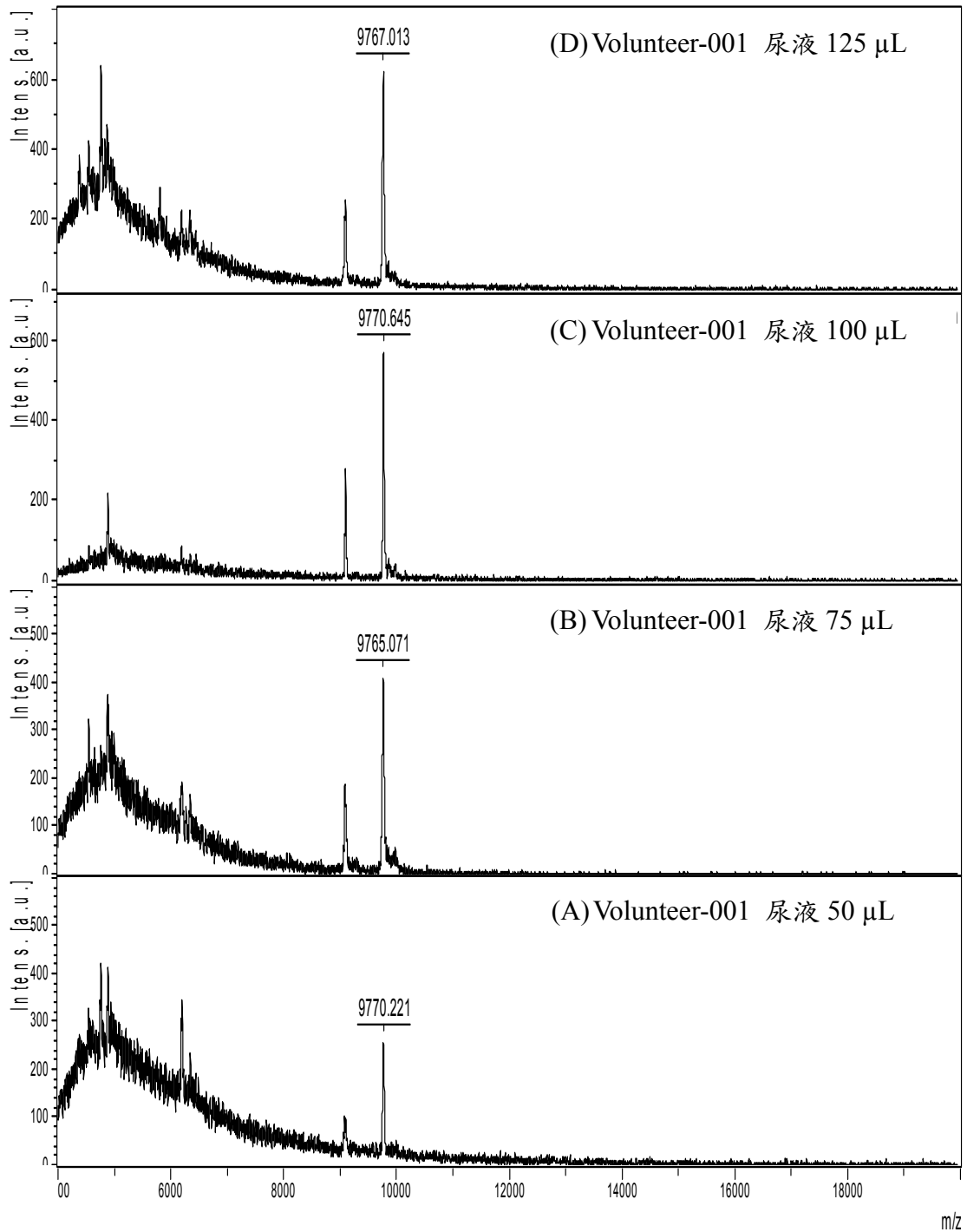
萃取後，質譜訊號為 9765.3 Da 訊號強度之平均值。由表(二十二)發現奈米粒子經過兩天反覆回溫，所偵測到的訊號強度也逐漸產生了偏差，也推測奈米粒子偵測耐受度為兩天，而表(二十六)為尿液檢體 125、100、75、50、25 (μL) 序列經三天平均其平均值。由表(二十六)可觀察到 Volunteer 5、7 是所有自願者訊號強度最低，有趣的是檢測期間兩位受試者都有服用相關補充鈣質之健康食品，我們猜測健康食品是否有效減緩骨質再吸收指標所分解出的產物(NTx)，以致我們發現在萃取後所偵測出來的訊號強度也相對降低。



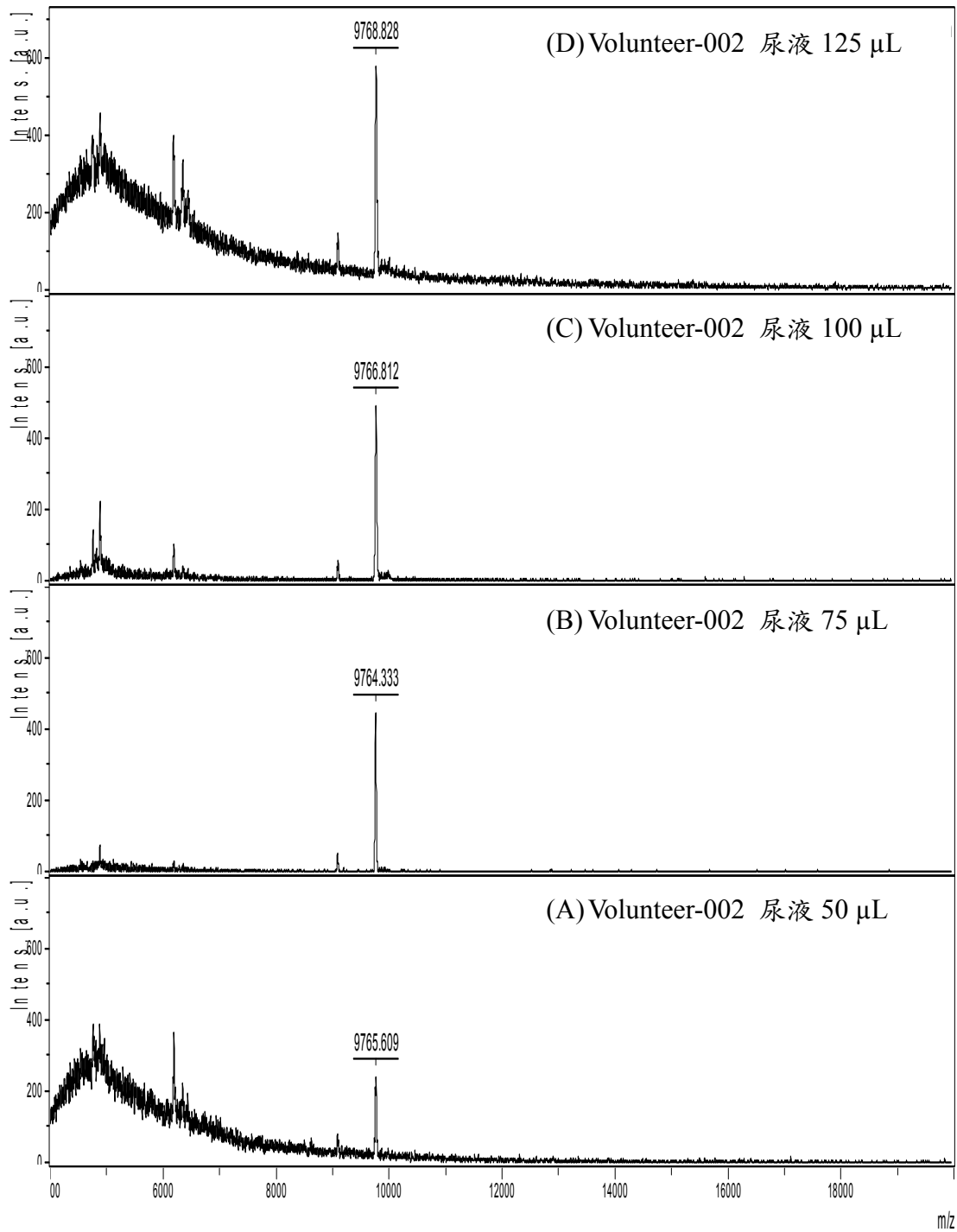
圖(三十)、自願者之尿液檢體以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。自願者 Volunteer 1~Volunteer 7 之尿液檢體，直接與基質 SA 混合後，以 MALDI-TOF MS 偵測之結果。



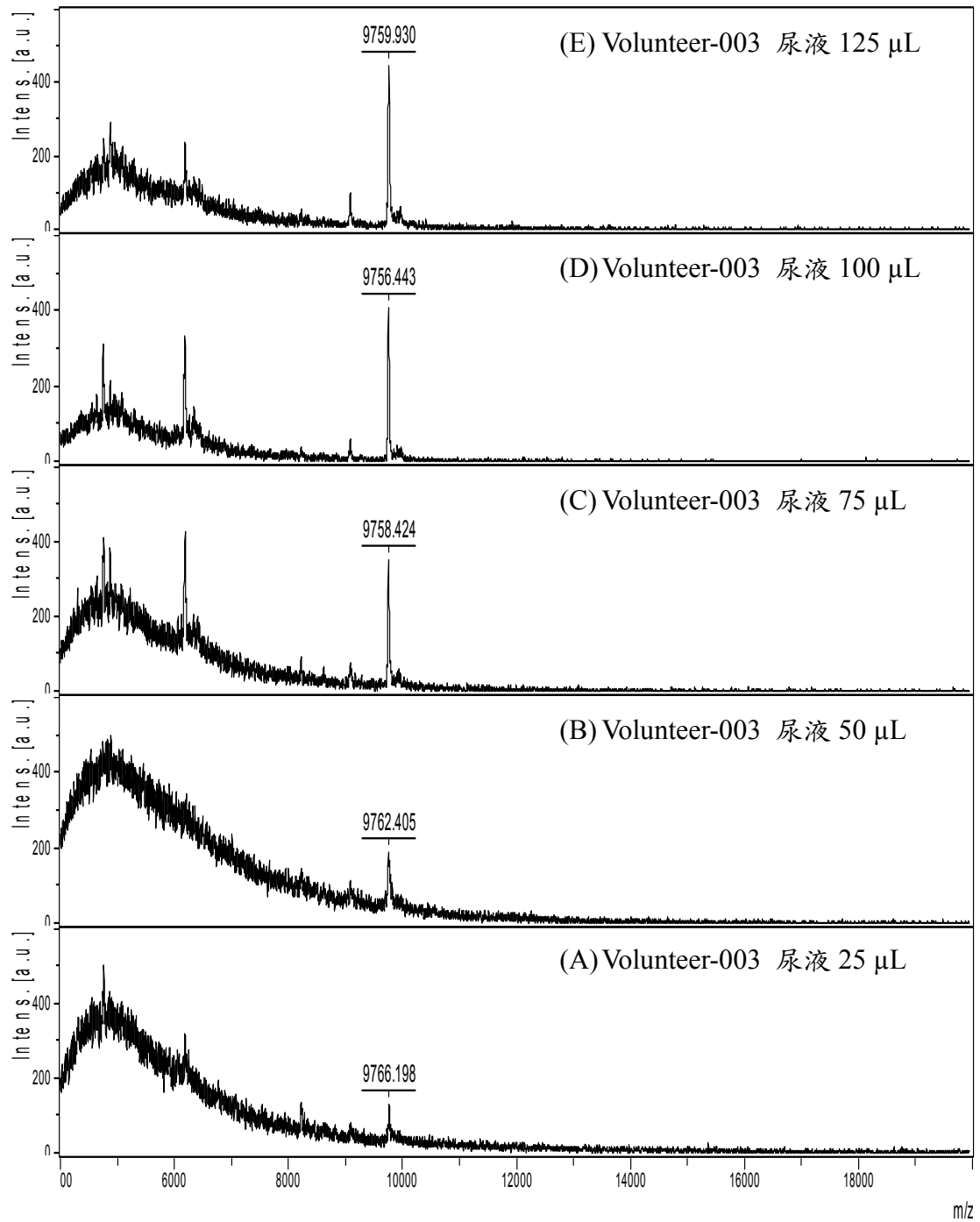
圖(三十一)、自願者之尿液檢體 125 μ L 經由兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。(A)~(G)分別為自願者 Volunteer 1~ Volunteer 7 之尿液檢體，經兔子多株抗體免疫親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之結果。



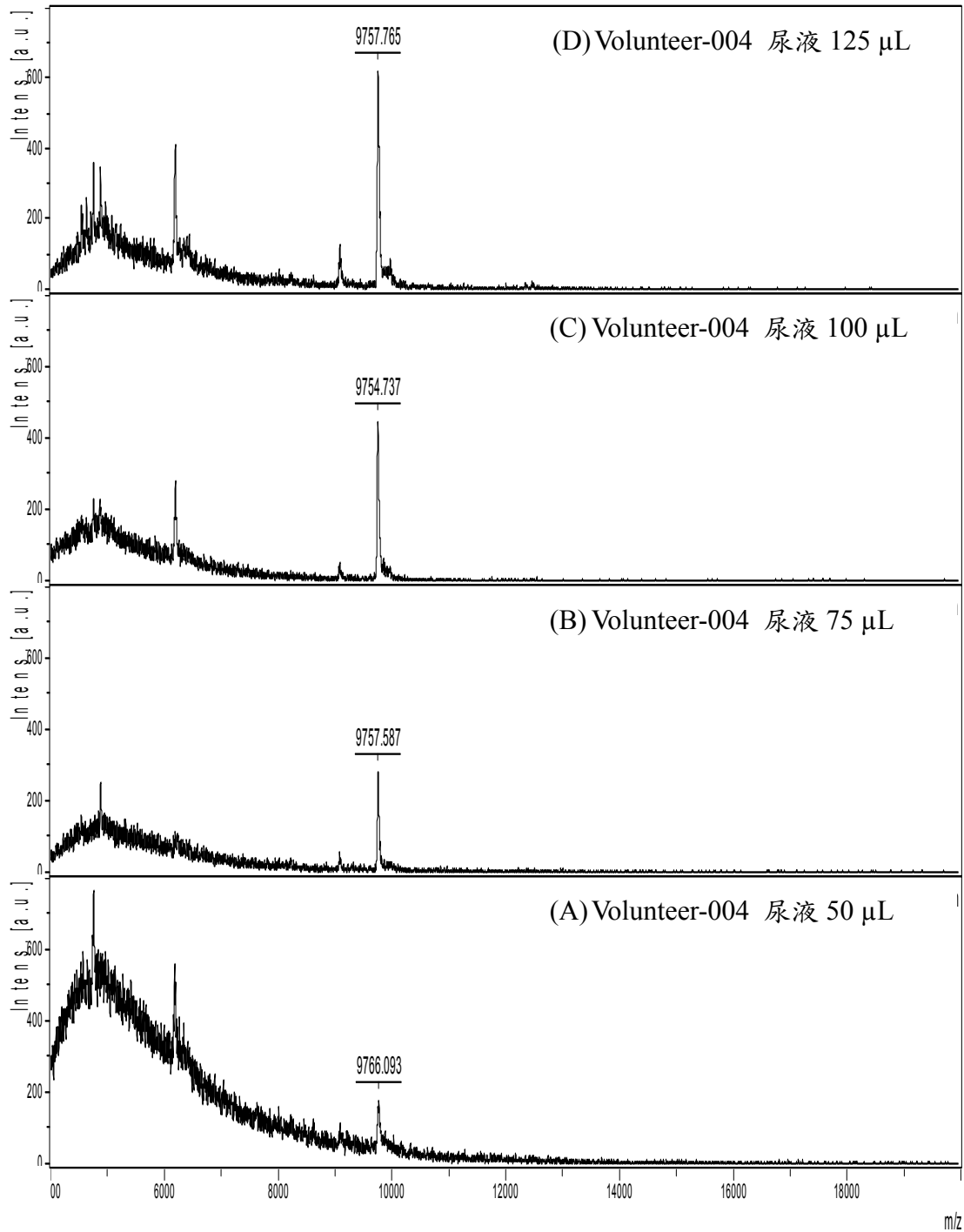
圖(三十二)、編號 Volunteer-001 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



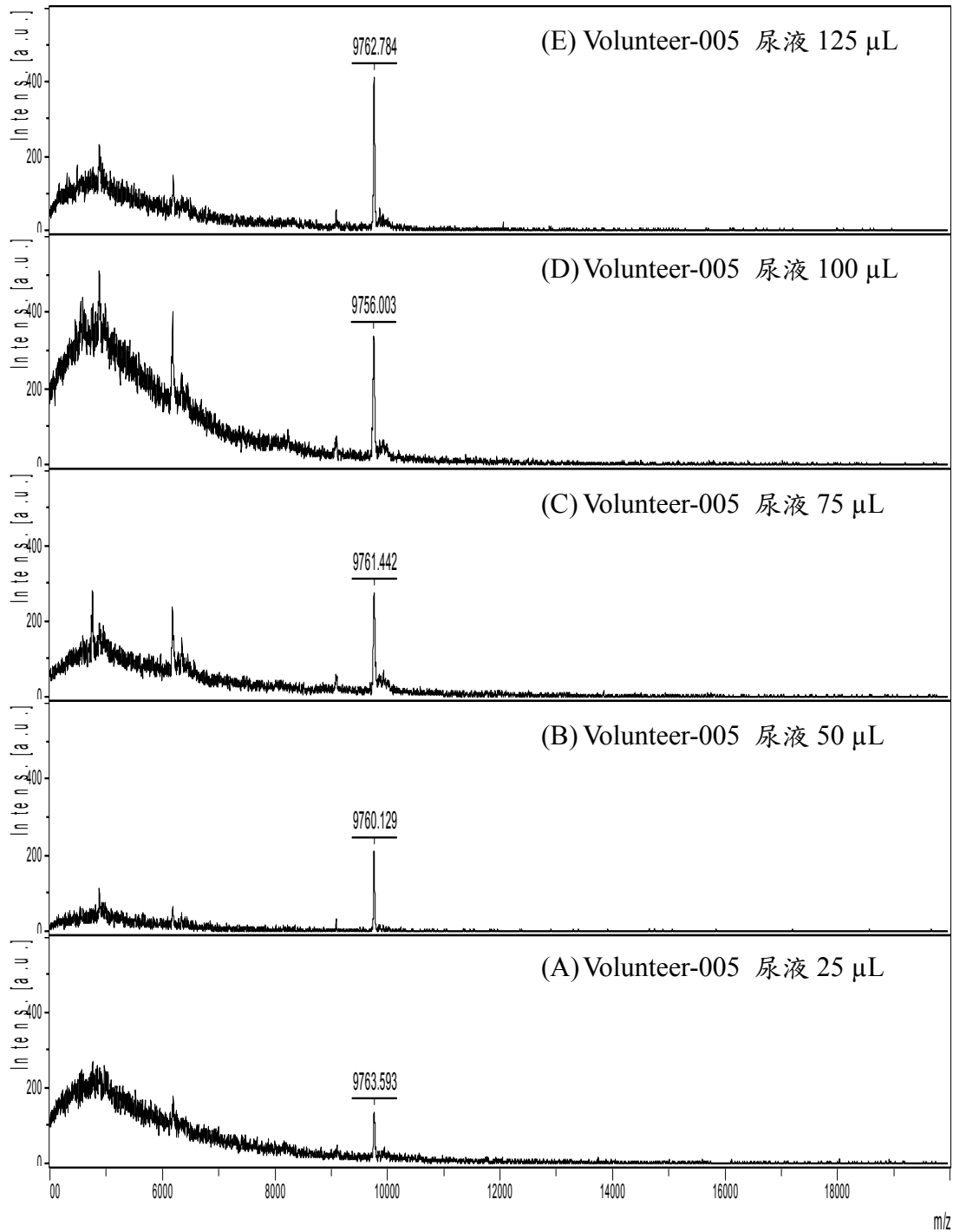
圖(三十三)、編號 Volunteer-002 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



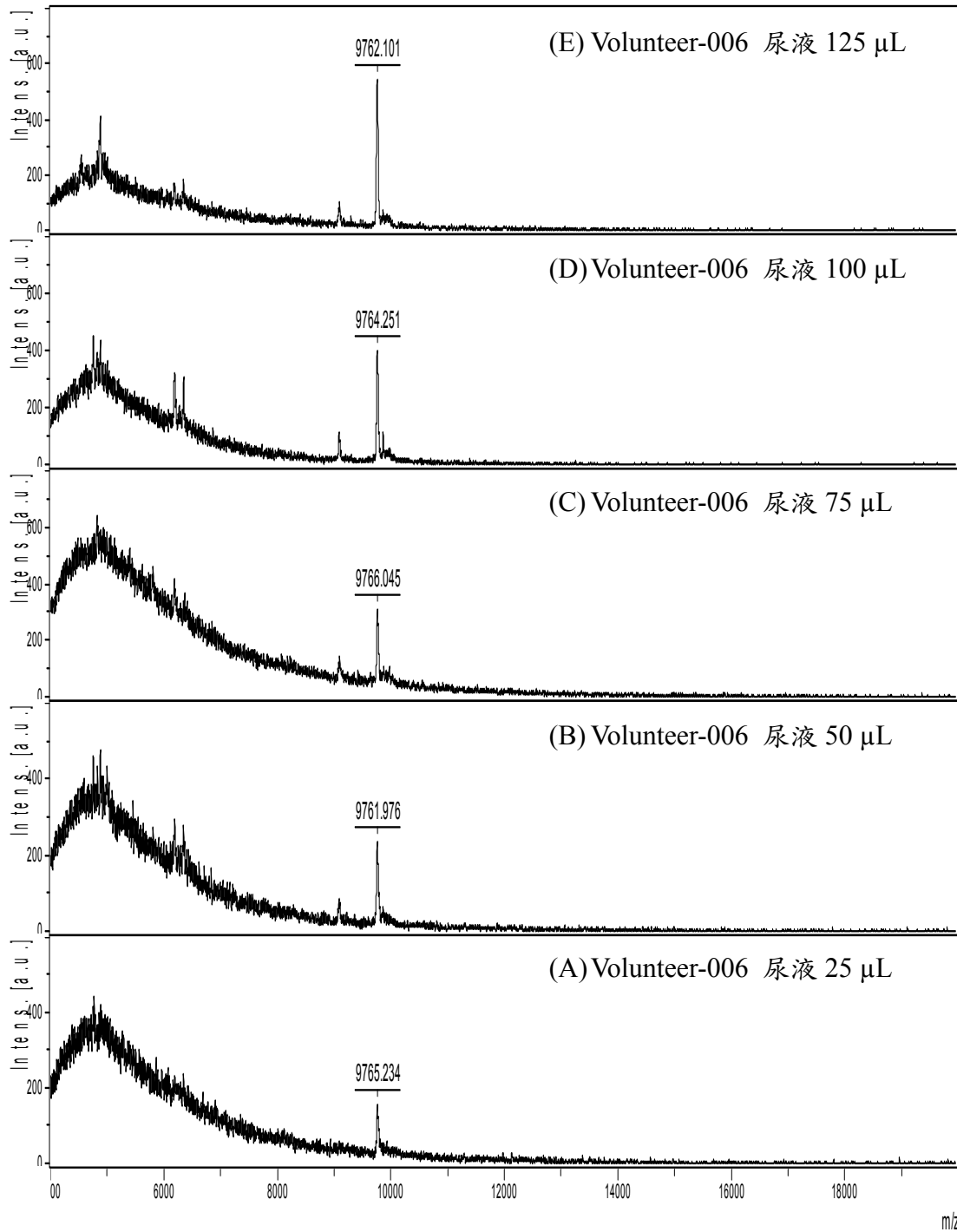
圖(三十四)、編號 Volunteer-003 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D、E 分別為尿液量 125、100、75、50、25 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



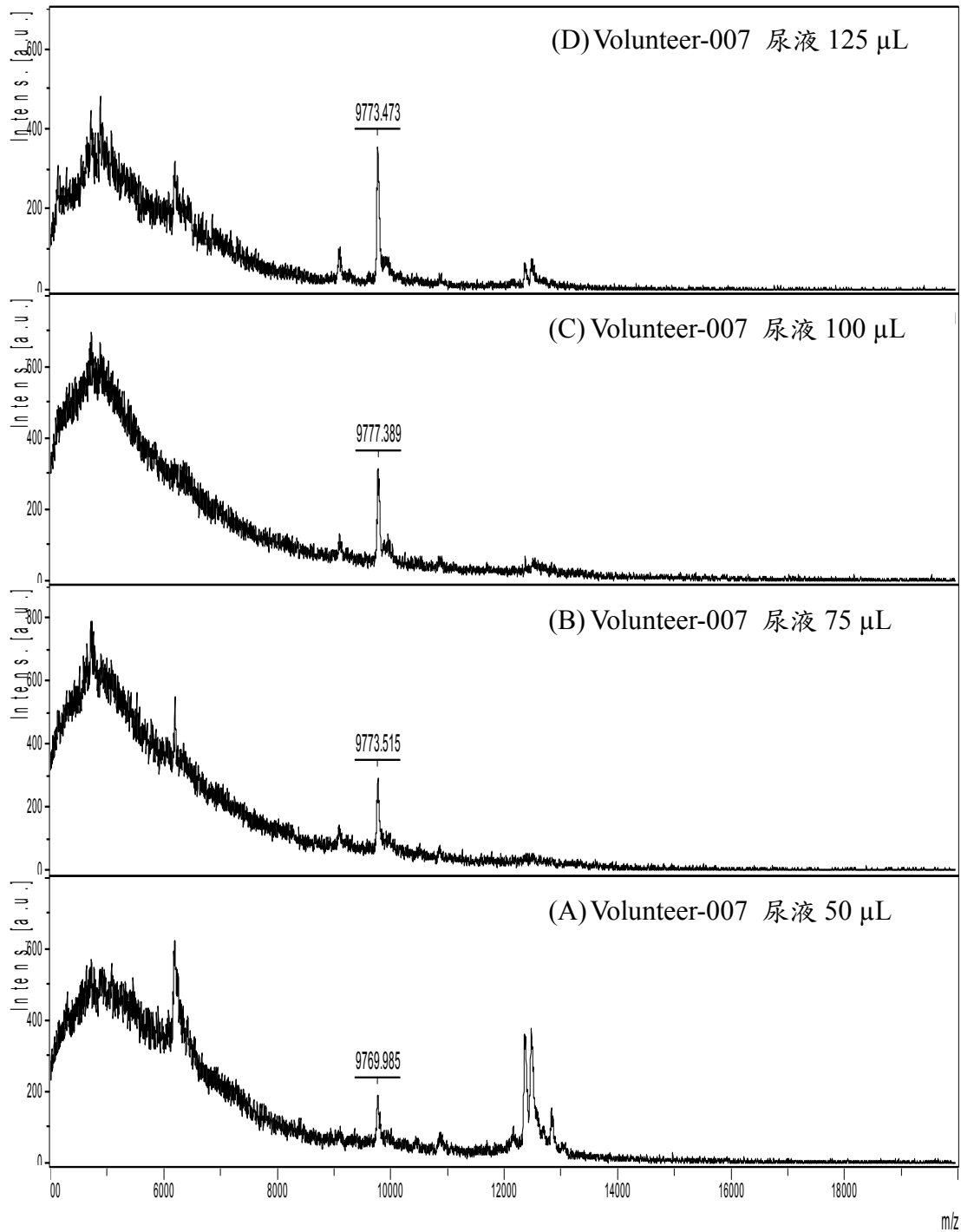
圖(三十五)、編號 Volunteer-004 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



圖(三十六)、編號 Volunteer-005 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D、E 分別為尿液量 125、100、75、50、25 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



圖(三十七)、編號 Volunteer-006 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D、E 分別為尿液量 125、100、75、50、25 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



圖(三十八)、編號 Volunteer-007 受試者之尿液檢體，經兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。

表(二十二) 自願者尿液檢體 (125 μL)經由兔子多株抗體親和性奈米
 粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號
 強度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	125 μL ^a	125 μL ^b
Volunteer 1	① 613.39 \pm 41.64	605.38 \pm 7.36
	② 603.80 \pm 63.24	
	③ 598.93 \pm 80.44	
Volunteer 2	① 574.85 \pm 62.96	600.78 \pm 93.67
	② 522.81 \pm 85.54	
	③ 704.68 \pm 64.70	
Volunteer 3	① 434.80 \pm 34.79	447.66 \pm 13.89
	② 462.39 \pm 8.09	
	③ 445.80 \pm 20.25	
Volunteer 4	① 623.29 \pm 21.31	613.02 \pm 10.09
	② 612.64 \pm 20.91	
	③ 603.12 \pm 61.33	
Volunteer 5	① 416.58 \pm 23.65	398.63 \pm 21.37
	② 404.33 \pm 70.57	
	③ 374.99 \pm 22.43	
Volunteer 6	① 605.56 \pm 33.93	553.96 \pm 56.98
	② 563.53 \pm 22.17	
	③ 492.80 \pm 31.88	
Volunteer 7	① 330.21 \pm 42.05	331.00 \pm 25.35
	② 356.74 \pm 21.86	
	③ 306.05 \pm 43.84	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

- ① 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差
- ② 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差
- ③ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(二十三) 自願者尿液檢體 (100 μL)經由兔子多株抗體親和性奈米
 粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號
 強度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	100 μL ^a	100 μL ^b
Volunteer 1	① 570.09 \pm 49.85	561.54 \pm 28.66
	② 584.96 \pm 68.15	
	③ 529.58 \pm 16.81	
Volunteer 2	① 495.13 \pm 14.13	548.85 \pm 103.13
	② 483.68 \pm 28.69	
	③ 667.75 \pm 58.44	
Volunteer 3	① 404.32 \pm 15.69	406.13 \pm 6.56
	② 413.40 \pm 26.75	
	③ 400.67 \pm 29.50	
Volunteer 4	① 453.10 \pm 3.55	442.32 \pm 9.81
	② 439.95 \pm 16.77	
	③ 433.92 \pm 16.63	
Volunteer 5	① 358.52 \pm 30.14	340.30 \pm 33.10
	② 360.28 \pm 29.24	
	③ 302.09 \pm 26.53	
Volunteer 6	① 419.11 \pm 30.33	401.86 \pm 23.34
	② 411.17 \pm 44.05	
	③ 375.31 \pm 30.72	
Volunteer 7	① 314.17 \pm 20.87	314.42 \pm 9.65
	② 324.20 \pm 25.80	
	③ 304.90 \pm 24.28	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

④ 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差

⑤ 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

⑥ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(二十四)自願者尿液檢體 (75 μ L)經由兔子多株抗體親和性奈米粒
子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強
度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	75 μ L ^a	75 μ L ^b
Volunteer 1	① 409.06 \pm 30.71	413.89 \pm 5.26
	② 413.13 \pm 10.61	
	③ 419.48 \pm 14.43	
Volunteer 2	① 461.88 \pm 21.33	432.98 \pm 30.30
	② 401.46 \pm 28.58	
	③ 435.60 \pm 33.89	
Volunteer 3	① 329.79 \pm 17.07	335.59 \pm 15.30
	② 352.94 \pm 19.73	
	③ 324.04 \pm 44.83	
Volunteer 4	① 330.77 \pm 18.82	343.39 \pm 10.93
	② 349.59 \pm 10.61	
	③ 349.81 \pm 51.69	
Volunteer 5	① 290.87 \pm 11.21	270.36 \pm 26.35
	② 279.56 \pm 24.65	
	③ 240.64 \pm 15.40	
Volunteer 6	① 317.78 \pm 12.90	298.63 \pm 33.83
	② 318.54 \pm 21.46	
	③ 259.56 \pm 21.35	
Volunteer 7	① 276.24 \pm 27.12	289.05 \pm 18.13
	② 309.80 \pm 40.41	
	③ 281.12 \pm 21.09	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

- ① 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差
- ② 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差
- ③ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(二十五)自願者尿液檢體 (50 μ L)經由兔子多株抗體親和性奈米粒
子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強
度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	50 μ L ^a	50 μ L ^b
Volunteer 1	① 259.06 \pm 50.39	270.58 \pm 37.65
	③ 240.04 \pm 72.47	
	④ 312.65 \pm 70.73	
Volunteer 2	① 332.53 \pm 21.00	218.83 \pm 100.12
	② 143.91 \pm 21.05	
	③ 180.03 \pm 25.05	
Volunteer 3	① 220.85 \pm 11.13	187.87 \pm 34.63
	② 190.96 \pm 34.14	
	③ 151.80 \pm 18.59	
Volunteer 4	① 114.61 \pm 20.26	158.22 \pm 66.23
	② 125.63 \pm 18.80	
	③ 234.44 \pm 10.58	
Volunteer 5	① 254.20 \pm 47.94	216.19 \pm 48.76
	② 233.15 \pm 19.68	
	③ 161.22 \pm 24.06	
Volunteer 6	① 250.68 \pm 15.37	223.93 \pm 27.77
	② 225.89 \pm 10.89	
	③ 195.23 \pm 15.70	
Volunteer 7	① 242.45 \pm 33.74	192.13 \pm 44.97
	② 178.07 \pm 25.02	
	③ 155.86 \pm 22.25	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

① 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差

② 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

③ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(二十六) 自願者尿液檢體(不同體積)經由兔子多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，經一天三次取其平均值。

Urine ^c 受試者編號	125 μL	100 μL	75 μL	50 μL	25 μL
Volunteer-001	613.39±41.64	570.09±49.85	409.06±30.71	259.06±50.39	N/D ^d
Volunteer-002	574.85±62.96	495.13±14.13	461.88±21.33	332.53±21.00	N/D ^d
Volunteer-003	434.80±34.79	404.32±15.69	329.79±17.07	220.85±11.13	138.12±11.02
Volunteer-004	623.29±21.31	453.10±3.55	330.77±18.82	114.61±20.26	N/D ^d
Volunteer-005 ^b	416.58±23.65	358.52±33.14	290.87±11.21	254.20±47.94	126.74±1.46
Volunteer-006	605.56±33.93	419.11±30.33	317.78±12.90	250.68±15.37	170.20±19.38
Volunteer-007 ^{a, b}	330.21±42.05	314.17±20.87	276.24±27.12	242.45±33.74	N/D ^d

^a經由 DXA 測量 T-score 為-0.3 (2008 年所測得)

^b檢測期間有服用健康食品

^c尿液檢體量經由免疫親和性奈米粒子萃取

^d代表未偵測到訊號

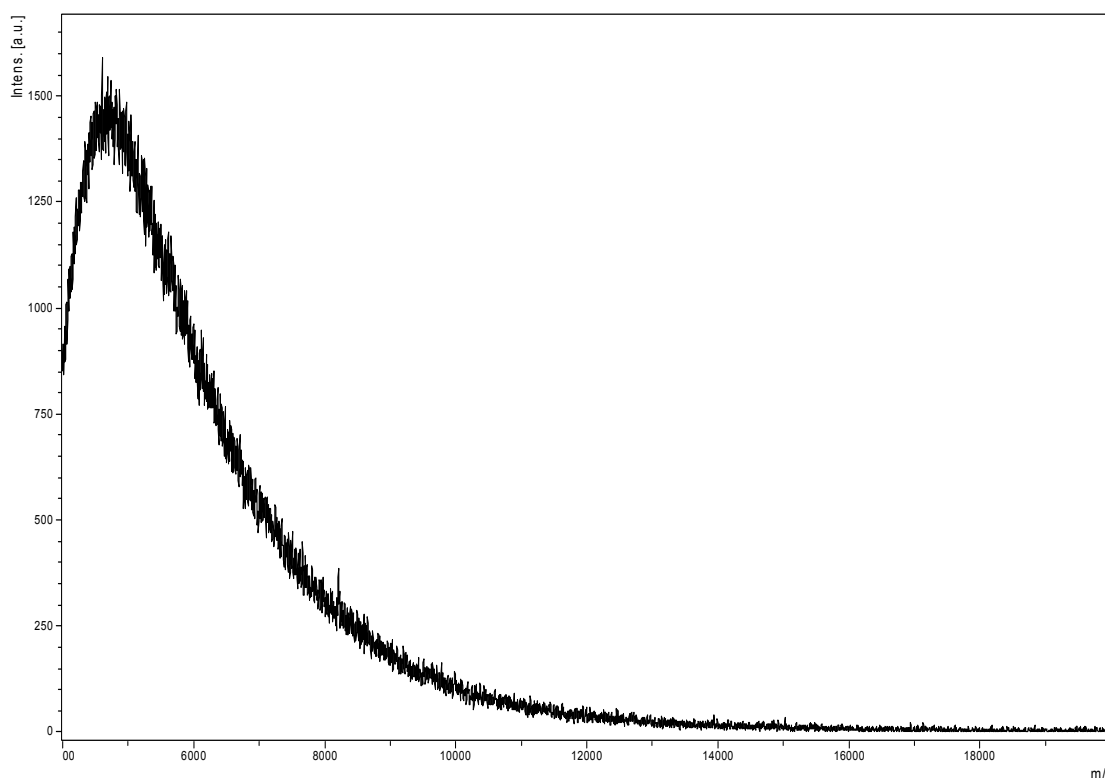
實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 ± 標準偏差的方式呈現

4-8 應用老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取尿液檢體

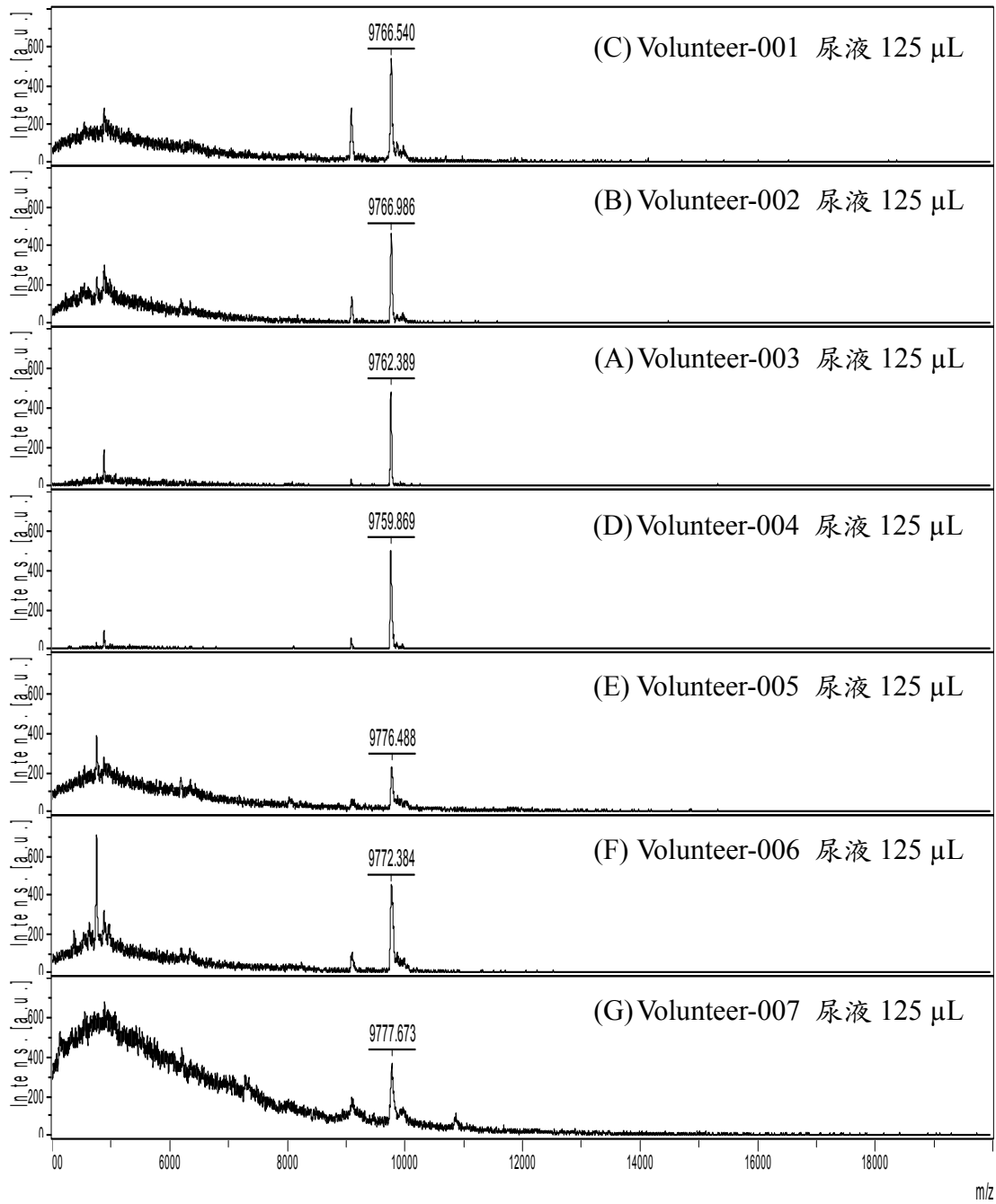
本實驗主要利用自行製備老鼠 anti-P2 多株抗體，使用以表面修飾完成的磁性奈米粒子，接上老鼠 anti-P2 多株抗體，並針對東海大學化學系提供之自願者尿液檢體進行分析，首先將老鼠多株抗體親和性奈米粒子與基質 SA 以 1:4 比例混合點至金屬樣品盤中，直接以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號如(圖三十九)所示，圖中是沒有任何訊號。

圖(四十)為七位自願者尿液檢體，經過老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後 MALDI-TOF MS 質譜訊號，此七位自願者尿液檢體 125 μL 經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，從質譜圖發現可偵測到分子量大約為 9765.3 Da 之訊號，由於這七位自願者皆有偵測到使用兔子多株抗體親和性奈米粒子所偵測的分子量，可知此訊號是非常重要的，圖(四十一~四十七)針對自願者 (Volunteer-001~Volunteer-007) 分別將尿液檢體以 125、100、75、50、25 (μL) 序列經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度。我們將這些尿液檢體以序列方式分別進行萃取，利用 MALDI-TOF MS 偵測其訊號，以一天三次平均及三天平均所呈現，表(二十七)則顯示以自願者尿液檢體 (125 μL) 經由老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da

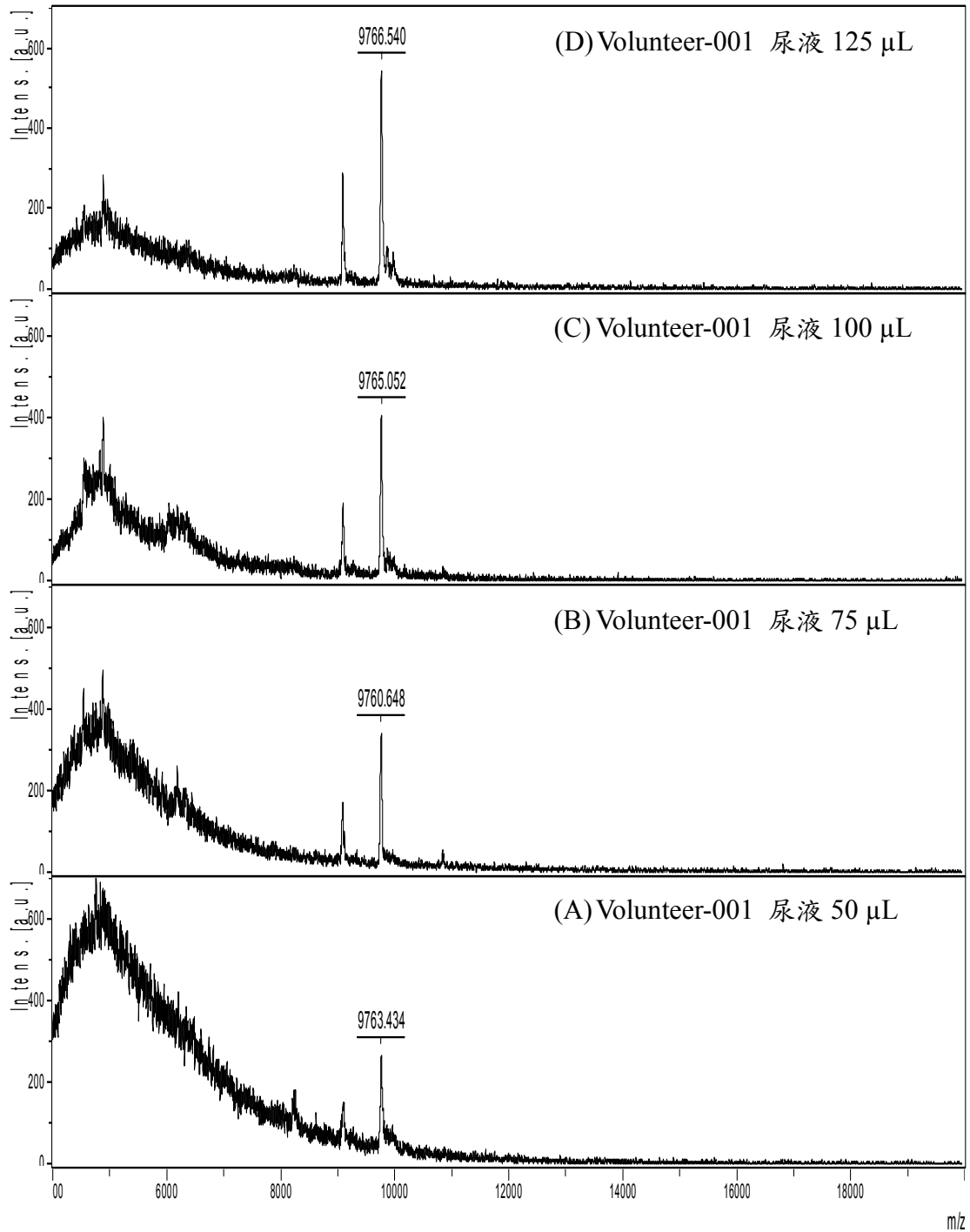
之訊號強度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值，表(二十八~三十)則顯示以自願者尿液檢體 (100、75、50 μL)經由老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 訊號強度之平均值，由表(二十七)發現經過兩天回溫，所偵測到的訊號強度都還有再現性。而表(三十一)為尿液檢體 125、100、75、50、25 (μL)序列經一天三次取其平均值。如表(三十一)所示。根據表(三十一)發現在偵測所有自願者尿液檢體 25 μL 時，已看不到 9765.3 Da 質譜訊號，初步推測在萃取 25 μL 尿液檢體已達到老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取樣品最低容許量。



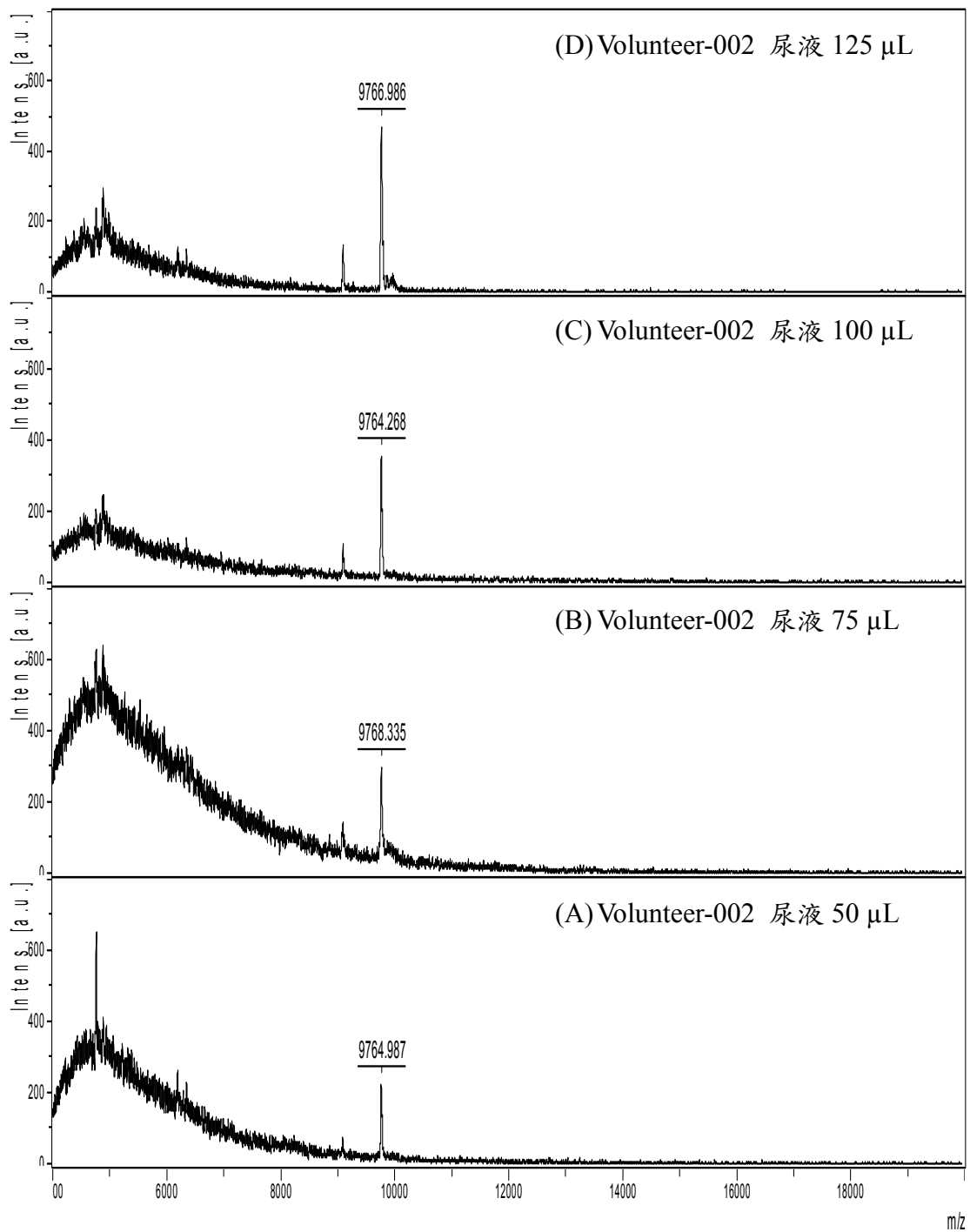
圖(三十九)、老鼠多株抗體親和性奈米粒子直接以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。



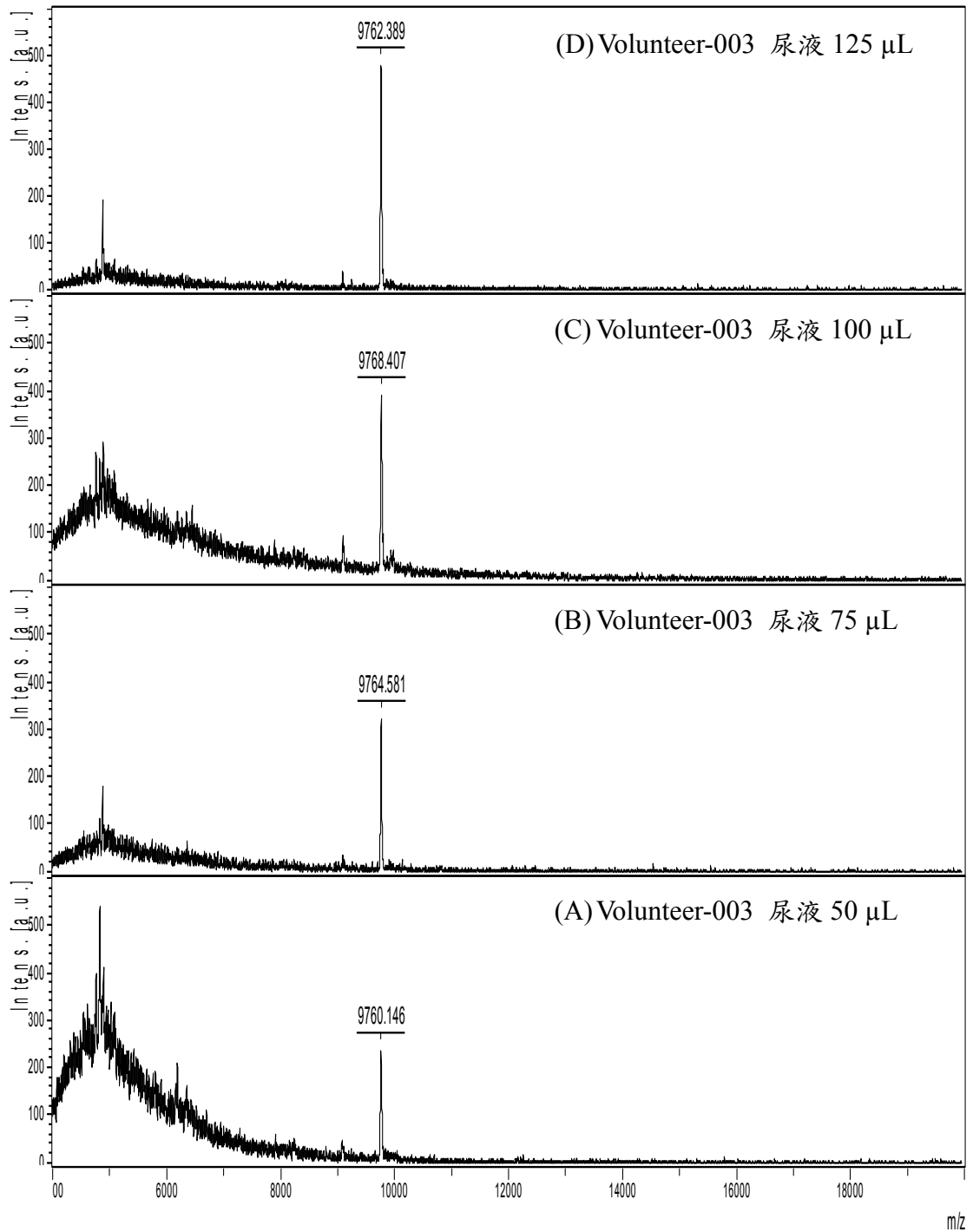
圖(四十)、研究對象之尿液檢體 125 μ L 經由老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。(A)~(G)為自願者 Volunteer-001~ Volunteer-007 之尿液檢體，經老鼠多株抗體免疫親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之結果。



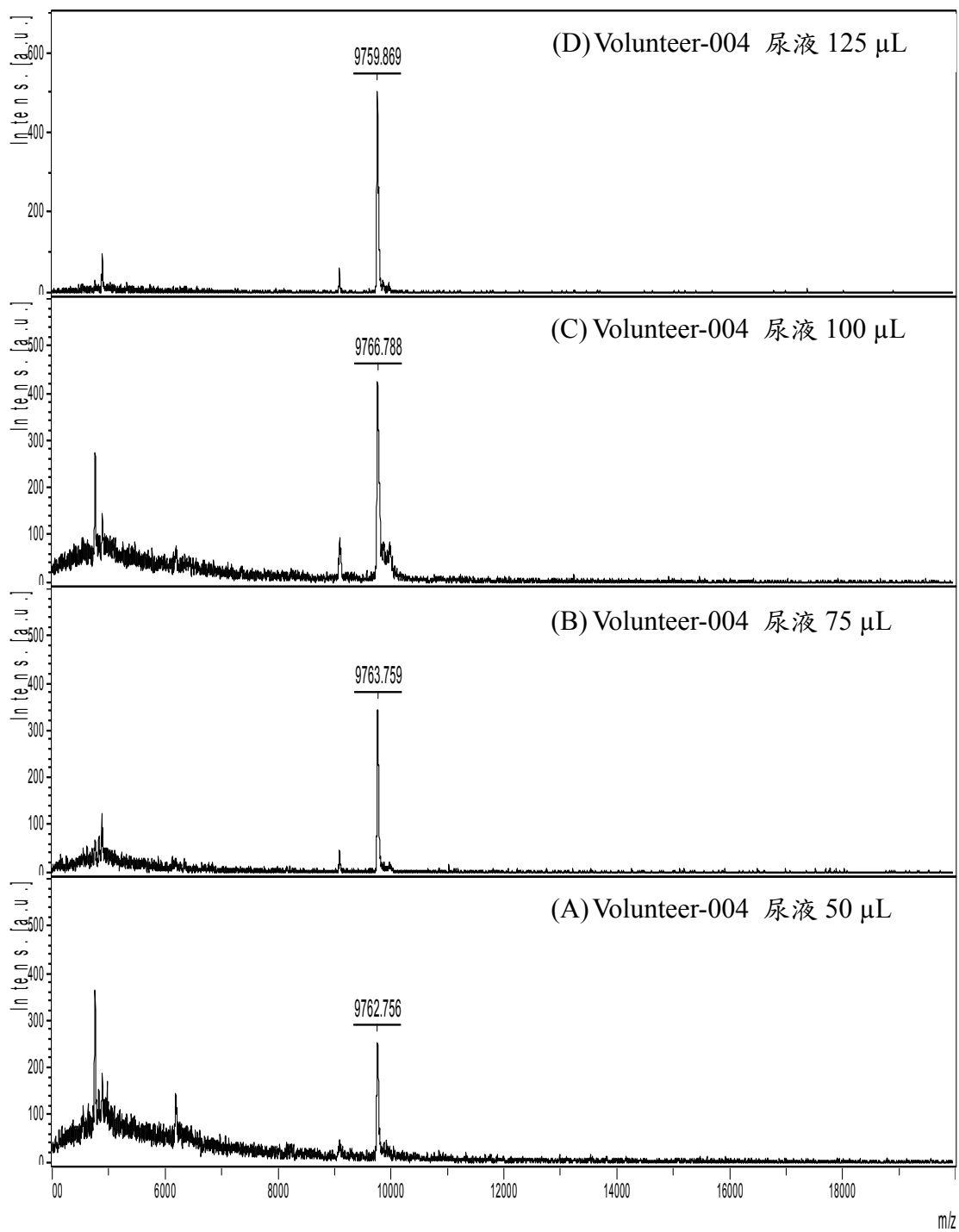
圖(四十一)、編號 Volunteer-001 受試者之尿液檢體，經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



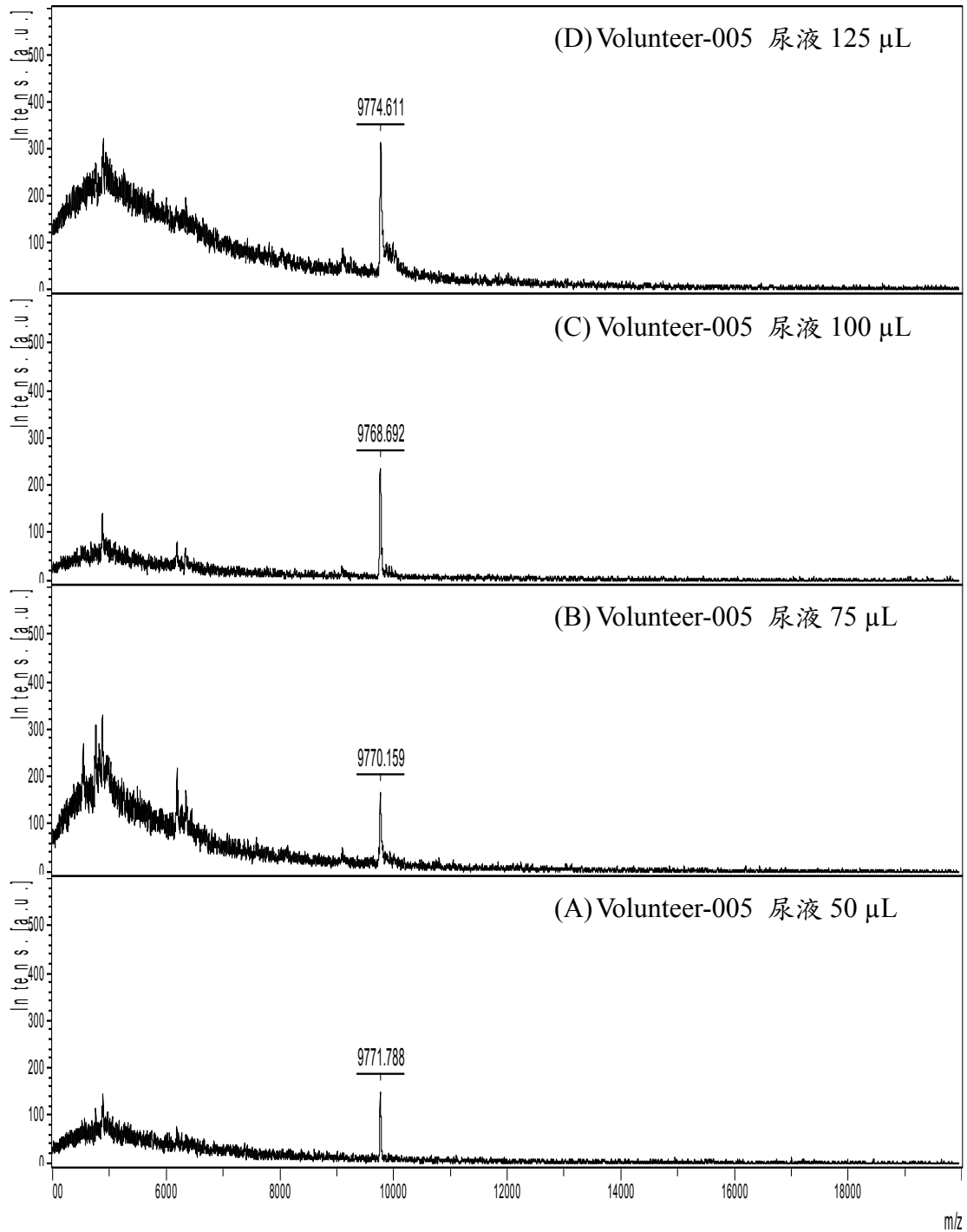
圖(四十二)、編號 Volunteer-002 受試者之尿液檢體，經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



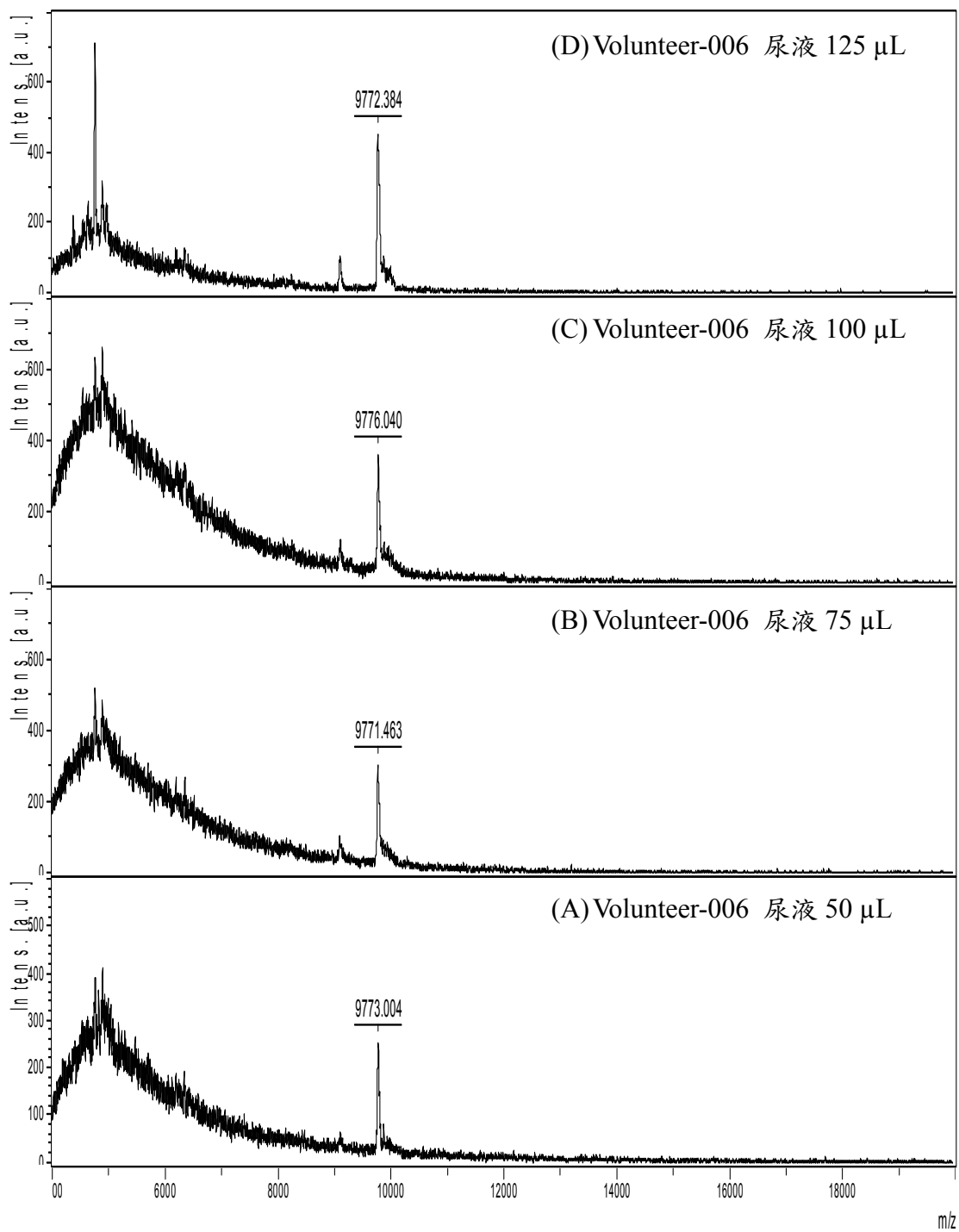
圖(四十三)、編號 Volunteer-003 受試者之尿液檢體，經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μ L 進行萃取所得到質譜訊號。



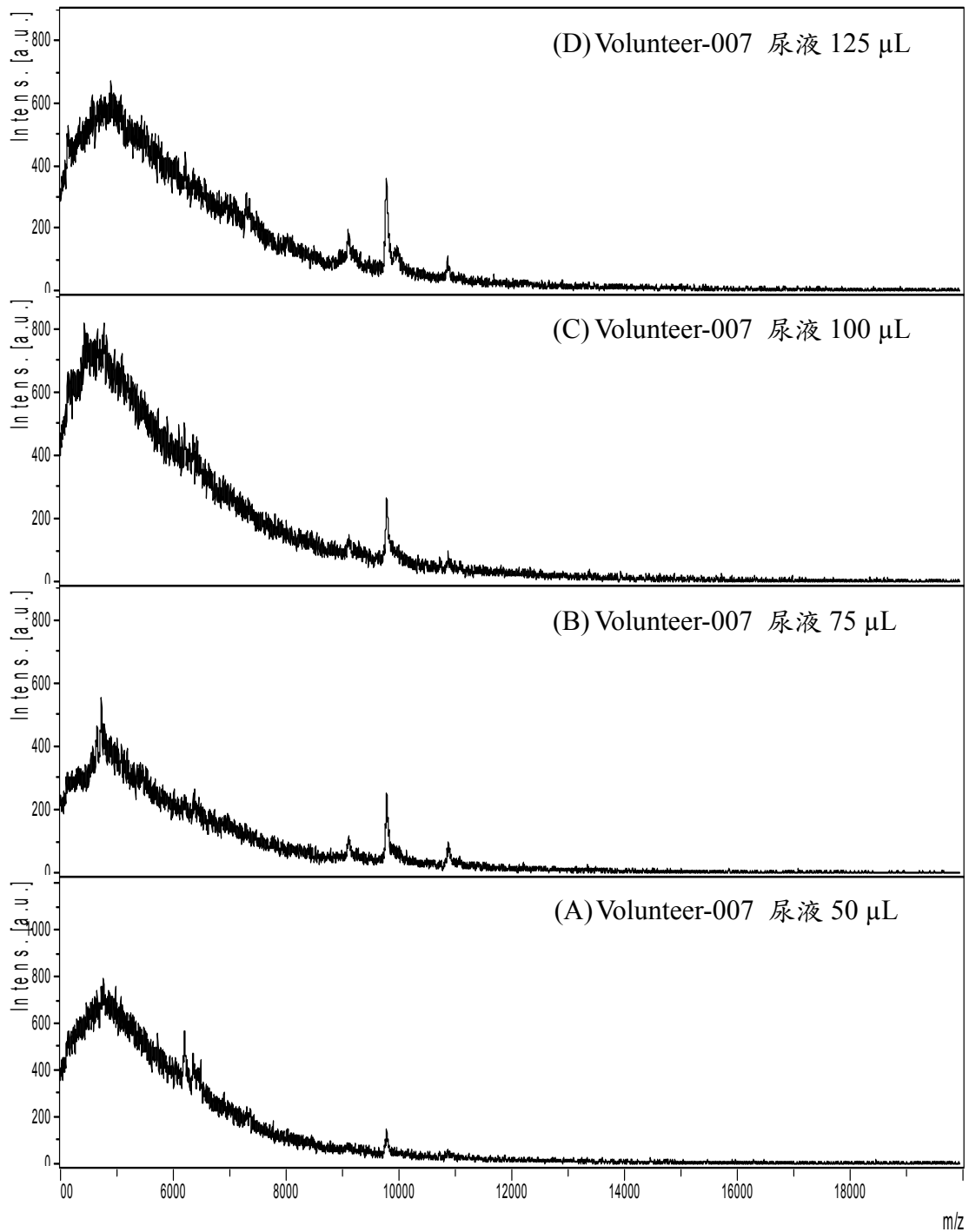
圖(四十四)、編號 Volunteer-004 受試者之尿液檢體，經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



圖(四十五)、編號 Volunteer-005 受試者之尿液檢體，經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μ L 進行萃取所得到質譜訊號。



圖(四十六)、編號 Volunteer-006 受試者之尿液檢體，經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。



圖(四十七)、編號 Volunteer-007 受試者之尿液檢體，經老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 偵測之質譜訊號。A、B、C、D 分別為尿液量 125、100、75、50 μL 進行萃取所得到質譜訊號。

表(二十七) 自願者尿液檢體 (125 μ L)經由老鼠多株抗體親和性奈米
 粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號
 強度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	125 μ L (Intraday) ^a	125 μ L (Interday) ^b
Volunteer 1	① 509.27 \pm 44.67	524.37 \pm 16.39
	② 541.80 \pm 24.33	
	③ 522.06 \pm 68.14	
Volunteer 2	① 434.79 \pm 30.71	455.27 \pm 17.80
	② 463.99 \pm 18.19	
	③ 467.02 \pm 28.82	
Volunteer 3	① 470.04 \pm 27.27	478.48 \pm 8.69
	② 478.00 \pm 27.61	
	③ 487.40 \pm 20.13	
Volunteer 4	① 519.34 \pm 16.89	505.62 \pm 12.53
	② 494.79 \pm 45.97	
	③ 502.72 \pm 43.10	
Volunteer 5	① 269.99 \pm 5.32	280.41 \pm 9.62
	② 282.27 \pm 14.30	
	③ 288.96 \pm 11.63	
Volunteer 6	① 442.48 \pm 34.84	431.59 \pm 49.81
	② 377.23 \pm 31.14	
	③ 475.05 \pm 18.33	
Volunteer 7	① 350.93 \pm 24.79	355.80 \pm 8.85
	② 366.01 \pm 23.91	
	③ 350.46 \pm 26.53	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

- ① 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差
- ② 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差
- ③ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(二十八) 自願者尿液檢體 (100 μL)經由老鼠多株抗體親和性奈米
 粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號
 強度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	100 μL ^a	100 μL ^b
Volunteer 1	① 428.41 \pm 21.77	404.28 \pm 46.88
	② 434.19 \pm 37.41	
	③ 350.25 \pm 33.07	
Volunteer 2	① 360.76 \pm 27.06	357.39 \pm 21.08
	② 376.58 \pm 22.03	
	③ 334.83 \pm 29.53	
Volunteer 3	① 430.41 \pm 58.66	398.71 \pm 33.34
	② 401.78 \pm 54.51	
	③ 363.95 \pm 31.70	
Volunteer 4	① 419.45 \pm 16.06	422.10 \pm 5.28
	② 418.68 \pm 21.09	
	③ 428.18 \pm 20.17	
Volunteer 5	① 223.70 \pm 28.33	241.36 \pm 16.81
	② 243.22 \pm 14.10	
	③ 257.16 \pm 7.37	
Volunteer 6	① 297.88 \pm 41.46	328.21 \pm 28.06
	② 333.51 \pm 22.89	
	③ 353.24 \pm 37.32	
Volunteer 7	① 299.60 \pm 10.54	297.16 \pm 5.29
	② 300.79 \pm 20.46	
	③ 291.09 \pm 30.23	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

- ① 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差
- ② 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差
- ③ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(二十九) 自願者尿液檢體 (75 μL)經由老鼠多株抗體親和性奈米
 粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號
 強度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	75 μL ^a	75 μL ^b
Volunteer 1	① 286.96 \pm 53.76	307.70 \pm 18.73
	② 323.38 \pm 4.21	
	③ 312.76 \pm 11.77	
Volunteer 2	① 310.88 \pm 13.83	306.61 \pm 4.39
	② 306.83 \pm 9.06	
	③ 302.12 \pm 19.55	
Volunteer 3	① 321.00 \pm 24.25	336.16 \pm 13.24
	② 345.42 \pm 25.02	
	③ 342.07 \pm 21.05	
Volunteer 4	① 337.97 \pm 29.70	345.93 \pm 13.70
	② 338.08 \pm 30.99	
	③ 361.75 \pm 40.33	
Volunteer 5	① 145.43 \pm 14.58	169.48 \pm 21.03
	② 178.62 \pm 16.79	
	③ 184.40 \pm 25.37	
Volunteer 6	① 245.38 \pm 14.74	280.54 \pm 30.52
	② 300.20 \pm 18.17	
	③ 296.05 \pm 23.54	
Volunteer 7	① 266.98 \pm 21.30	251.31 \pm 18.02
	② 255.32 \pm 19.59	
	③ 231.61 \pm 23.75	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

- ① 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差
- ② 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差
- ③ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(三十) 自願者尿液檢體 (50 μL)經由老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，經一天三次平均及三天平均後取其平均值。

Intraday 和 Interday 受試者編號	50 μL ^a	50 μL ^b
Volunteer 1	① 159.86 \pm 18.49	167.06 \pm 6.47
	② 168.93 \pm 24.95	
	③ 172.39 \pm 21.47	
Volunteer 2	① 250.81 \pm 7.95	241.11 \pm 24.11
	② 258.86 \pm 16.92	
	③ 213.66 \pm 39.53	
Volunteer 3	① 259.00 \pm 30.16	242.94 \pm 19.97
	② 249.22 \pm 13.64	
	③ 220.58 \pm 8.29	
Volunteer 4	① 247.70 \pm 7.70	253.38 \pm 18.05
	② 273.59 \pm 19.60	
	③ 238.85 \pm 25.90	
Volunteer 5	① 129.22 \pm 16.43	146.35 \pm 18.62
	② 143.66 \pm 11.40	
	③ 166.16 \pm 14.46	
Volunteer 6	① 245.38 \pm 14.74	261.58 \pm 3.44
	② 264.01 \pm 15.76	
	③ 259.14 \pm 26.71	
Volunteer 7	① 135.06 \pm 18.47	144.35 \pm 8.37
	② 146.68 \pm 6.80	
	③ 151.30 \pm 13.99	

^a 實驗重複次數為一天三次平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

^b 實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

- ① 為第一天，所偵測三次平均之訊號強度 \pm 標準偏差
- ② 為第二天經由冷藏一天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差
- ③ 為第三天經由冷藏兩天回溫半小時，所偵測訊號強度之三次平均 \pm 標準偏差

表(三十一) 自願者尿液檢體(不同體積)經由老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取後，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，經一天三次取其平均值。

Urine ^c 受試者編號	125 μ L	100 μ L	75 μ L	50 μ L	25 μ L
Volunteer-001	509.27 \pm 44.67	428.41 \pm 21.77	286.96 \pm 53.76	159.86 \pm 18.49	N/D ^d
Volunteer-002	434.79 \pm 30.71	360.76 \pm 27.06	310.88 \pm 13.83	250.81 \pm 7.95	N/D ^d
Volunteer-003	470.04 \pm 27.27	430.41 \pm 58.66	321.00 \pm 24.25	259.00 \pm 30.16	N/D ^d
Volunteer-004	519.34 \pm 16.89	419.45 \pm 16.06	337.97 \pm 29.70	247.70 \pm 7.70	N/D ^d
Volunteer-005 ^b	269.99 \pm 5.32	223.70 \pm 28.33	145.43 \pm 14.58	129.22 \pm 16.43	N/D ^d
Volunteer-006	442.48 \pm 34.84	297.88 \pm 41.46	261.58 \pm 3.44	245.38 \pm 14.74	N/D ^d
Volunteer-007 ^{a,b}	350.93 \pm 24.79	299.60 \pm 10.54	266.98 \pm 21.30	135.06 \pm 18.47	N/D ^d

^a經由 DXA 測量 T-score 為-0.3 (2008 年所測得)

^b檢測期間有服用健康食品

^c尿液檢體量經由免疫親和性奈米粒子萃取

^d代表未偵測到訊號

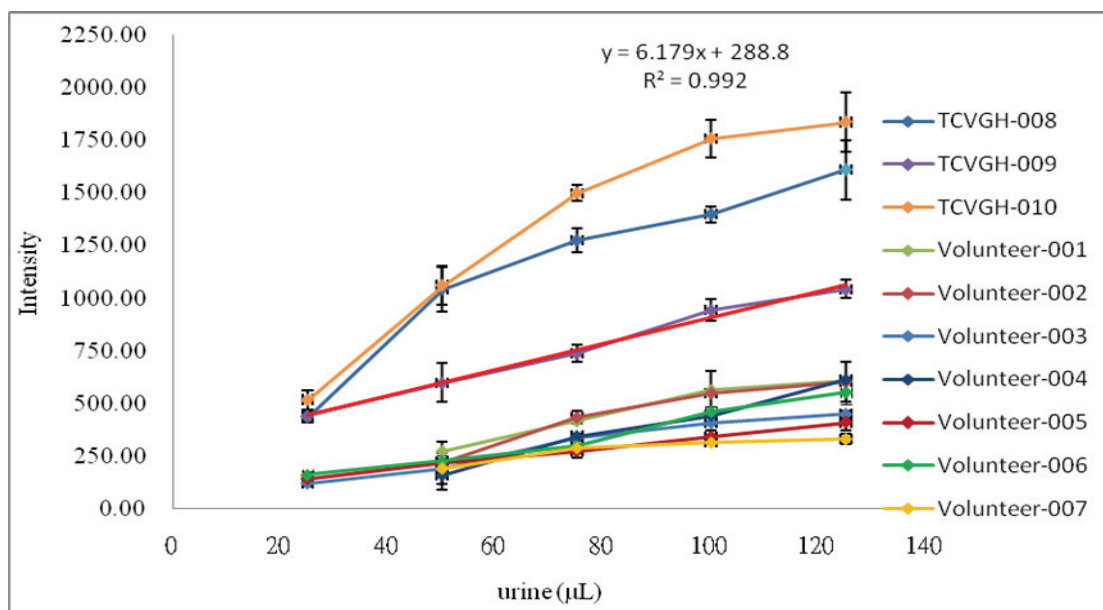
實驗重複次數為三天平均，實驗數據以質譜訊號為 9765.3 Da 左右之訊號強度平均值 \pm 標準偏差的方式呈現

4-9 應用兔子和老鼠之親和性奈米粒子萃取尿液檢體後訊號強度之檢量線製作

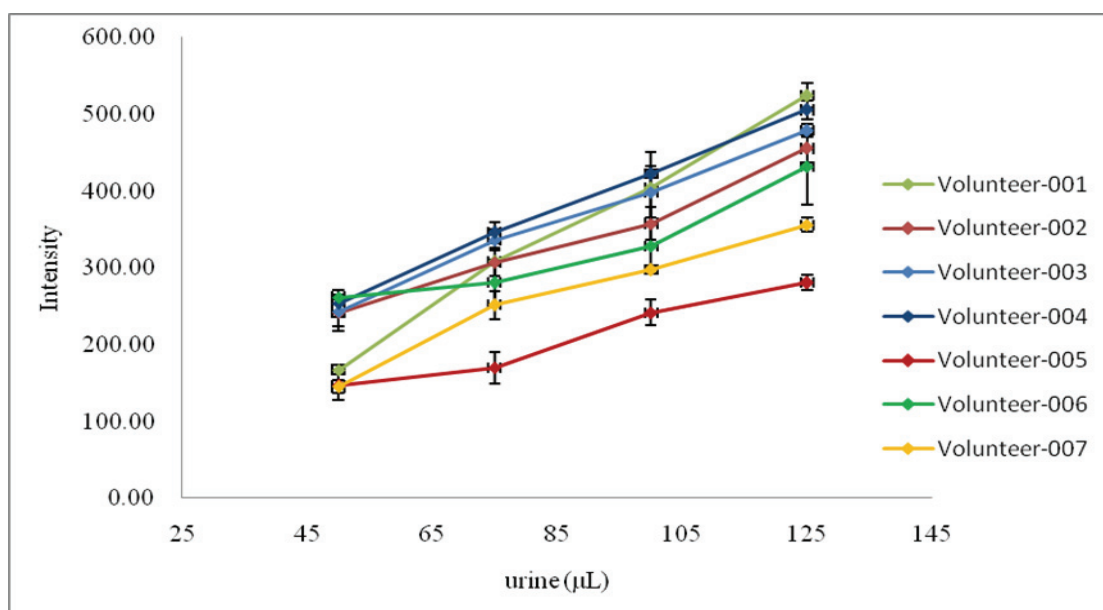
根據以上經過免疫親和性奈米粒子萃取尿液檢體，之後將萃取過尿液檢體之奈米粒子取 1 μ L 混合液與 4 μ L 基質 SA 均勻混合後，最後取 1 μ L 混合液點置於金屬樣品盤，之後將樣品盤置入質譜儀中進行分析，在質譜進行分析時，每個 well 任意找十個點打，雷射次數為 100 shot，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，取其平均值作出各受試者之檢量線。圖(四十八)中為所有受試者經三重覆取其平均值之檢量線，由 TCVGH-008~010 病患檢量線來看確實是比正常人的訊號強度來的高，成功的區分正常人與病患之差別，我們以 TCVGH-009 病患尿液檢體量與訊號強度變化量的關係，可以得到一個線性方程式： $y = 6.179x + 288.8$ $R^2 = 0.992$ 未來可利用此方程式來作為是否得到骨質疏鬆症為一個標準，而從台中榮民總醫院骨科部潘建州醫師所提供病患之雙能量 X 光吸收儀 (DXA) 之數據(表十五)相互比較。TCVGH-010 的訊號強度卻比 TCVGH-008 的訊號強度來的高，是與 DXA 數據資料沒有一致性，推測可能的原因多株抗體在接上磁性奈米粒子，並沒有在有效位置完全接上抗體，而導致在萃取尿液檢體之訊號強度上的差別，根據文獻中有提到可將抗體中 Fc domain 固定化^{49, 50}，將可排除抗原結合位置的空間阻礙，未來可

利用抗體的 Fab domain(可變區域)和 Fc domain(固定區域)上修飾到磁性奈米粒子，可改善磁性奈米粒子完全接上抗體，以提升萃取尿液檢體之訊號強度精準度。

而在實驗室自製老鼠 anti-P2 多株抗體，根據圖(四十)可發現製作出老鼠 anti-P2 多株抗體親和性奈米粒子也成功萃取出所推測的 9765.3 Da 之質譜訊號，我們以老鼠多株抗體親和性奈米粒子萃取自願者尿液檢體，以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，取其平均值作出自願者之檢量線圖(四十九)。由圖(四十八)經兔子多株抗體萃取與圖(四十九)經老鼠多株抗體萃取自願者尿液檢體相比較，經兔子多株抗體萃取訊號強度比老鼠多株抗體萃取訊號強度來的高，在抗體濃度老鼠多株抗體確實是比兔子多株抗體來的低，以致在萃取上會有差距，未來可以將抗原鍵結於大分子蛋白質分子上，打入動物體內，可有較好的免疫效果，改善並提升抗體濃度⁵¹。不過這些數據顯示我們已成功製備出老鼠 anti-P2 多株抗體，在未來鑑定骨鬆的生化指標，以期進一步應用在診斷具有骨質疏鬆症的病人，利用訊號強度研究出臨床上骨質疏鬆症病人以及正常人的差異，來作為判斷是否為骨質疏鬆症患者的依據。



圖(四十八)、所有受試者尿液檢體以兔子多株抗體親和性萃取之訊號強度與尿液量作圖。以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，取其平均值作出各受試者之檢量線。



圖(四十九)、所有受試者尿液檢體以老鼠多株抗體親和性萃取之訊號強度與尿液量作圖。以 MALDI-TOF MS 檢測質譜訊號為 9765.3 Da 之訊號強度，取其平均值作出各受試者之檢量線。

第五章 結論與未來展望

本篇論文之研究結果顯示我們成功製備出老鼠 anti-P2 多株抗體，並結合經過 SiO₂ 及 NH₂ 表面官能基修飾之磁性奈米粒子，將兔子的 anti-P2 多株抗體和老鼠的 anti-P2 多株抗體與氧化鐵奈米粒子結合，利用此親和性奈米粒子搭配質譜分析技術，藉由抗體與抗原的專一性，捕捉到尿液檢體中與抗體具有親和性之胜肽。由於所得到的訊號中並未發現 NTx 全長之分子量，不過在患有骨質疏鬆症及自願者的尿液檢體，皆偵測得到 9765.3 Da 分子量之訊號，因此推論此訊號對於評估骨質流失是一個重要的生化指標。

利用兔子多株抗體將受試者所檢測到 9765.3 Da 之訊號強度作出檢量線，從檢量線區分出病患與正常人的差別，未來可利用此檢量線，研究出臨床上骨質疏鬆症病人以及正常人的差異，作為判斷是否為骨質疏鬆症患者的依據。

本研究結合免疫親和性奈米粒子與 MALDI-TOF MS 之技術研發出檢測骨質流失的方法，雖然未確定尿液中萃取到的胜肽片段之序列，但研究結果顯示，此檢測方法有助於未來研究骨質疏鬆症，對於骨質流失的預防、治療及診斷，有所助益。

參考文獻

1. 中華民國骨質疏鬆協會, 近十年台灣地區流行病統計調查資料. **2008**.
2. Mosekilde, L., Sex differences in age-related loss of vertebral trabecular bone mass and structure--biomechanical consequences. *Bone* **1989**, 10, (6), 425-32.
3. Seibel, M. J., Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* **2005**, 26, (4), 97-122.
4. 楊榮森, 骨質疏鬆症病因、診斷、治療。合記圖書出版社: 1997.
5. Ebeling, P. R.; Peterson, J. M.; Riggs, B. L., Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res* **1992**, 7, (11), 1243-50.
6. Herrmann, M.; Seibel, M. J., The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* **2008**, 393, (2), 57-75.
7. Sone, T.; Miyake, M.; Takeda, N.; Fukunaga, M., Urinary excretion of type I collagen crosslinked N-telopeptides in healthy Japanese adults: age- and sex-related changes and reference limits. *Bone* **1995**, 17, (4), 335-9.
8. Farley, J. R.; Chesnut, C. H., 3rd; Baylink, D. J., Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clin Chem* **1981**, 27, (12), 2002-7.
9. Woitge, H. W.; Seibel, M. J.; Ziegler, R., Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with nonskeletal disorder or metabolic bone diseases. *Clin Chem* **1996**, 42, (11), 1796-804.
10. Monaghan, D. A.; Power, M. J.; Fottrell, P. F., Sandwich enzyme immunoassay of osteocalcin in serum with use of an antibody against human osteocalcin. *Clin Chem* **1993**, 39, (6), 942-7.
11. Jensen, C. H.; Hansen, M.; Brandt, J.; Rasmussen, H. B.; Jensen, P. B.; Teisner, B., Quantification of the N-terminal propeptide of human procollagen type I (PINP): comparison of ELISA and RIA with respect to different molecular forms. *Clin Chim Acta* **1998**, 269, (1), 31-41.
12. Bonde, M.; Fledelius, C.; Qvist, P.; Christiansen, C., Coated-tube radioimmunoassay for C-telopeptides of type I collagen to assess bone resorption. *Clin Chem* **1996**, 42, (10), 1639-44.
13. Robins, S. P., Collagen crosslinks in metabolic bone disease. *Acta Orthop Scand Suppl* **1995**, 266, 171-5.
14. Hanson, D. A.; Weis, M. A.; Bollen, A. M.; Maslan, S. L.; Singer, F. R.; Eyre, D. R., A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* **1992**, 7, (11),

1251-8.

15. Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C.; Brauw, M. C. T. N. d., Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Nonvolatile Bio-Organic Molecules. *Anal. Chem.* **1978**, 50, (7), 985-991.
16. Linder, B.; Seydel, U., Laser desorption Mass Spectrometry of Nonvolatiles under Shock Wave Conditions. *Anal Chem* **1985**, 57, 895-899.
17. Tanaka, K.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Detection of High Mass Molecules by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry, . *Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry* **1987**, 185-188
18. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T., Protein and Polymer Analyses up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151-153.
19. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **1988**, 60, (20), 2299-3301.
20. Schriemer, D. C.; Li, L., Detection of High Molecular Weight Narrow Polydisperse Polymers up to 1.5 Million Daltons by MALDI Mass Spectrometry. *Anal Chem* **1996**, 68, (17), 2721-2725.
21. Fitzgerald, M. C.; Parr, G. R.; Smith, L. M., Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Anal Chem* **1993**, 65, (22), 3204-11.
22. Smirnov, I. P.; Zhu, X.; Taylor, T.; Huang, Y.; Ross, P.; Papayanopoulos, I. A.; Martin, S. A.; Pappin, D. J., Suppression of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix clusters and reduction of chemical noise in MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **2004**, 76, (10), 2958-65.
23. Gobom, J.; Schuerenberg, M.; Mueller, M.; Theiss, D.; Lehrach, H.; Nordhoff, E., Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Anal Chem* **2001**, 73, (3), 434-8.
24. Wu, Y. C.; Hsieh, C. H.; Tam, M. F., Matrix-assisted laser desorption/ionization of peptides on AnchorChip targets with alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid and nitrocellulose as matrix. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, 20, (2), 309-12.
25. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* **1991**, 63, (24), 1193A-1203A.
26. Piyadasa, C. K.; Hakansson, P.; Ariyaratne, T. R., A high resolving power multiple reflection matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, 13, (7), 620-4.
27. Schmida, R. P.; Weickhardt, C., Designing reflectron time-of-flight mass spectrometers with and without grids: a direct comparison *International Journal of*

- Mass Spectrometry* **2001**, 206, (3), 181-190.
28. Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Jaeger, E., Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1992**, 6, (2), 105-8.
29. Pfeifer, T.; Rucknagel, P.; Kuellertz, G.; Schierhorn, A., A strategy for rapid and efficient sequencing of Lys-C peptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry post-source decay. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, 13, (5), 362-9.
30. Behrens, A.; Maie, N.; Knicker, H.; Kogel-Knabner, I., MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. *Phytochemistry* **2003**, 62, (7), 1159-70.
31. Galvani, M.; Hamdan, M.; Righetti, P. G., Two-dimensional gel electrophoresis/matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of a milk powder. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, 14, (20), 1889-97.
32. 張立德; 牟季美; 葉瑞銘, 奈米材料和奈米結構. 滄海書局: 2002.
33. 牟中原; 陳家俊, 奈米材料研究發展. *科學發展月刊* **2000**, 28, (4), 281-288.
34. Haukanes, B. I.; Kvam, C., Application of magnetic beads in bioassays. *Biotechnology (N Y)* **1993**, 11, (1), 60-3.
35. Tartaj, P.; Morales, M. D.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Gonzalez-Carreño, T.; Serna, C. J., The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics* **2003**, 36, (13), R182-R197.
36. Krotz, F.; de Wit, C.; Sohn, H. Y.; Zahler, S.; Gloe, T.; Pohl, U.; Plank, C., Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* **2003**, 7, (5 Pt 1), 700-10.
37. Liu, Q.; Xu, Z.; Finch, J. A.; Egerton, R., A Novel Two-Step Silica-Coating Process for Engineering Magnetic Nanocomposites. *Chem. Mater.* **1998**, 10, (12), pp 3939-3940.
38. Wang, K. Y.; Chuang, S. A.; Lin, P. C.; Huang, L. S.; Chen, S. H.; Ouada, S.; Pan, W. H.; Lee, P. Y.; Lin, C. C.; Chen, Y. J., Multiplexed immunoassay: quantitation and profiling of serum biomarkers using magnetic nanoprobe and MALDI-TOF MS. *Anal Chem* **2008**, 80, (16), 6159-67.
39. Emanuel, P. A.; Dang, J.; Gebhardt, J. S.; Aldrich, J.; Garber, E. A.; Kulaga, H.; Stopa, P.; Valdes, J. J.; Dion-Schultz, A., Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detection. *Biosens Bioelectron* **2000**, 14, (10-11), 751-9.
40. 林穎正、周昆達、陳甫倫、莊文博、楊明杰、藍敏瑛, 生物化學. 合記圖書出版社 **1995**, p60~62.
41. 陳丘泓, 應用固相胺基合成法(SPPS)合成 type I collagen cross-linked N-telopeptide 的片段並應用 ELISA 及 SPR technology 測試其與抗體間之作用

- 國立中興大學生命科學院研究所碩士論文: 2002.
42. 吳俊蔚, 利用抗體製備免疫親和性管柱分離病患尿液中胜肽並應用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法定量尿液中 P2-7mer 胜肽. 私立東海大學化學研究所碩士論文: 2009.
43. Lung, F. D.; Chen, C. H.; Liou, C. C.; Chen, H. Y., Surface plasmon resonance detection of interactions between peptide fragments of N-telopeptide and its monoclonal antibodies. *J Pept Res* **2004**, 63, (4), 365-70.
44. Narhi, L. O.; Caughey, D. J.; Horan, T. P.; Kita, Y.; Chang, D.; Arakawa, T., Fractionation and characterization of polyclonal antibodies using three progressively more chaotropic solvents. *Anal Biochem* **1997**, 253, (2), 246-52.
45. Zor, T.; Selinger, Z., Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **1996**, 236, (2), 302-8.
46. Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E. P.; Lambros, T. J.; Makofske, R. C.; Chang, C. D., Solid phase synthesis without repetitive acidolysis. Preparation of leucyl-alanyl-glycyl-valine using 9-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids. *Int J Pept Protein Res* **1979**, 13, (1), 35-42.
47. Bruce, I. J.; Sen, T., Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir* **2005**, 21, (15), 7029-35.
48. Friedman, M., Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J Agric Food Chem* **2004**, 52, (3), 385-406.
49. Lin, P. C.; Chen, S. H.; Wang, K. Y.; Chen, M. L.; Adak, A. K.; Hwu, J. R.; Chen, Y. J.; Lin, C. C., Fabrication of oriented antibody-conjugated magnetic nanoprobe and their immunoaffinity application. *Anal Chem* **2009**, 81, (21), 8774-82.
50. 陳豪勇、王聖予、陳建和, 免疫學. 藝軒圖書出版社: 2000; p 71-80.
51. 姚富洲, 新編生物技術. 合記圖書出版社: 2007; p 345-349.