

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	5
2.1 骨質疏鬆症.....	5
2.2 骨質疏鬆症之評估.....	6
2.2.1 骨質密度之測定.....	6
2.2.1.1 單光子吸收測量.....	6
2.2.1.2 雙光子吸收測量.....	6
2.2.1.3 雙能量X-射線吸收測量.....	6
2.2.1.4 放射線骨密度測量.....	6
2.2.1.5 定量化電腦斷層測量.....	6
2.2.2 骨代謝生化指標之測定.....	7
2.3 研究動機及實驗設計.....	11
第三章 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法(MALDI-TOF MS)的簡介.....	15
3.1 MALDI-TOF MS 樣品製備方式.....	16
3.2 基質的特性與功用.....	17
3.3 飛行時間質量分析器的原理.....	19
3.4 MALDI 中抑制現象之解決方法.....	22
3.5 MALDI-TOF MS 的應用.....	23
3.6 MALDI-TOF MS 的優勢.....	27
第四章 實驗原理.....	28
4.1 抗體和抗原結合的原理.....	28
4.1.1 抗體結構.....	28
4.1.2 抗體與抗原之間的作用力.....	28
4.2 親合性管柱製備的原理.....	29
4.3 Bradford protein-binding assay 的原理及應用.....	30
4.4 固相萃取法(solid phase extraction) 的原理及應用.....	31
4.5 固相合成法(solid phase peptide synthesis,SPPS).....	33
4.5.1 SPPS的原理.....	33
4.5.2 SPPS 反應試劑說明與作用.....	34
4.6 高效能液相層析法.....	35
4.6.1 HPLC 的原理與應用.....	35
4.6.2 RP-HPLC 的原理與應用.....	36
第五章 材料與方法.....	38
5.1 實驗設計與流程.....	38

5.2 應用兔子多株抗體及人類單株抗體製備免疫親合性管柱.....	38
5.2.1 材料與設備.....	38
5.2.2 製備多株抗體親和及單株抗體製備親合性管柱.....	39
5.2.3 應用免疫親合性管柱來篩選出對抗體具有親合力之胜?	41
5.2.4 應用免疫親合性管柱分離出尿液中與抗體具親合性之胜? 片段	42
5.3 應用 SPPS 方法合成胜? 標準品.....	43
5.3.1 固相胜? 合成之實驗材料與設備.....	43
5.3.2 固相胜? 合成之實驗方法.....	44
5.4 應用逆相高效能液相層析法分離純化胜? 標品.....	46
5.4.1 RP-HPLC 實驗材料與設備.....	46
5.4.2 RP-HPLC 純化胜? 粗產物.....	46
5.5 應用 MALDI-TOF MS 來定量前處理後尿液檢體.....	48
5.5.1 MALDI-TOF MS 設備、實驗材料、及基質溶液配製.....	48
5.5.2 胜? 標準品之檢量線製作.....	50
5.5.3 探討胜? 標準品檢量線之再現性.....	51
5.5.4 偵測前處理後尿液檢體之訊號強度.....	51
第六章 結果與討論.....	52
6.1 製作多株免疫親合性管柱及單株免疫親合性管柱.....	52
6.2 應用抗體製備之多株抗體製備免疫親合性管柱篩選出對抗體具有親合力之胜?	52
6.3 應用抗體製備之單株抗體製備免疫親合性管柱篩選出對抗體具有親合力之胜?	54
6.4 研究對象之尿液樣品來源.....	55
6.5 應用多株抗體製備之免疫親合性管柱分離出骨鬆疏鬆症病患尿液中與抗體具有親合性之胜? 片段.....	56
6.6 P2-7mer 胜? 標準品之合成、純化與鑑定分子量.....	59
6.7 探討應用MALDI-TOF MS製作檢量線之再現性.....	60
6.8 應用7-mer胜? 標準品製作檢量線來定量尿液樣品中7-mer的濃度.....	62
6.8.1 胜? 標準品(P2-7 mer) 檢量線之製作.....	62
6.8.2 研究對象之尿液樣品的前處理.....	62
6.8.3 偵測前處理後尿液檢體之訊號強度.....	63
6.8.4 骨鬆病患檢體在 MALDI-TOF MS 之檢測訊號強度.....	64

表目錄

表一、Markers of bone formation 骨合成的生化指標.....	10
表二、Markers of bone resorption 骨吸收的生化指標.....	10
表三、依據epitope mapping原則設計的胜? 之胺基酸序列.....	11
表四、應用ELISA 與SPR來探討 Anti-NTx 抗體與10段線狀之 NTx 胜? 片段之結合能力.....	14
表五、應用 SPR 探討10段線狀之 NTx 胜? 片段與 Anti-NTx 抗體間之交互作用.....	14
表六、常用的MALDI-TOF MS基質之結構.....	18
表七、多株及單株親和性管柱所需之試劑耗材及儀器設備.....	38
表八、固相胜? 合成 (SPPS) 所需之試劑耗材及儀器設備.....	44
表九、RP-HPLC實驗過程中,所需之試劑 設備與購買廠商.....	46
表十、MALDI-TOF MS 操作參數設定.....	49
表十一、MALDI TOF MS 實驗過程中,所需之試劑.....	49
表十一、線性胜? P2的胜? 片段之分子量及推論出之胺基酸序列.....	58
表十二、病患之尿液經處理後由質譜儀偵測之到其尿液中P2-7mer之濃度.....	65
表十三、病患經由雙能量X光吸收儀(DXA)檢測之數據.....	65
表十四、骨質疏鬆症病患之尿液檢體經處理後由質譜儀偵測其尿液中 P2-7mer之濃度.....	65

圖目錄

圖一、骨頭重新塑造的循環圖(I).....	71
圖二、骨骼中的第一型膠原蛋白被降解後所產生的代謝物.....	72
圖三、骨骼代謝的生化指標.....	72
圖四、N-telopeptide (NTx)的胺基酸序列.....	73
圖五、MALDI-TOF MS 之簡圖(I).....	73
圖六、MALDI-TOF MS 之簡圖(II).....	74
圖七、MALDI-TOF MS 之儀器照片圖.....	74
圖八、抗體的結構.....	75
圖九、抗體和抗原之間的親合力結合圖.....	75
圖十、蛋白質樣品過親合性管柱之簡易流程圖.....	76
圖十一、抗體經由共價性修飾至固相基質上之簡圖.....	76
圖十二、抗體經由共價性修飾至固相基質之反應機制圖.....	77
圖十三、實驗設計方法與流程圖.....	78
圖十四、固相胜? 合成之實驗流程圖.....	79
圖十五、多株抗體與基質結合之吸收光譜圖.....	80
圖十六、單株抗體與基質結合之吸收光譜圖.....	80
圖十七、P2、CP-2及胜? 標準品Ang I之混合液之MALDI-TOF MS 質譜圖...81	
圖十八、混合液通過過多株免疫親合性管柱後之MALDI-TOF MS 質譜圖...81	
圖十九、混合液通過多株免疫親合性管柱及通過C ₁₈ 固相萃取管柱去鹽後之收集液之MALDI-TOF MS質譜圖.....82	
圖二十、經由沖提液(elute buffer)沖提出吸附在多株免疫親合性管柱的胜? 後之MALDI-TOF MS質譜圖.....82	
圖二十一、經由沖提液沖洗吸附在多株免疫親合性管柱的胜? 再通過C ₁₈ 固相萃取管柱去鹽後之MALDI-TOF MS質譜圖..... 83	
圖二十二、P2、CP-2及胜? 標準品Ang 與基質CHCA混合之MALDI-TOF MS質譜圖.....83	
圖二十三、P2、CP-2及胜? 標準品Ang I之混合液通過過單株免疫親合性管柱後之收集液之MALDI-TOF MS質譜圖.....84	
圖二十四、經由沖提液沖洗吸附在單株免疫親合性管柱的胜? 後之MALDI-TOF MS 質譜圖.....84	
圖二十五、經由沖提液(elute buffer)沖洗吸附在單株免疫親合性管柱的胜? 再通過 C ₁₈ 固相萃取管柱去鹽後之MALDI-TOF MS 質譜圖...85	
圖二十六、尚未經過前處理之尿液檢體之MALDI-TOF MS 質譜圖.....85	
圖二十七、沖提液與基質 CHCA 混合後MALDI-TOF-MS 質譜圖.....86	

圖二十八、經由免疫親和性管柱層析法沖提之收集液之光譜吸收圖86
圖二十九、尿液檢體過多株免疫親合性管柱之 MALDI-TOF MS 質譜圖87
圖三十、沖提液過 C ₁₈ 固相萃取管柱後之 MALDI-TOF MS 質譜圖87
圖三十一、尿液檢體過多株免疫親合性管柱並過 C ₁₈ 固相萃取管柱後之 MALDI-TOF MS 質譜圖88
圖三十二、尿液檢體過多株免疫親合性管柱並過 C ₁₈ 固相萃取管柱後之 MALDI-TOF MS 質譜圖88
圖三十三、P2-7mer 粗產物之分子量鑑定圖89
圖三十四、P2-7mer 粗產物之 RP-HPLC 層析圖89
圖三十五、P2-7mer 純化後之 RP-HPLC 層析圖90
圖三十六、P2-7mer 之分子量鑑定圖90
圖三十七、基質在不銹鋼樣品盤上的結晶狀態91
圖三十八、未經 seed-layer method 處理前 P2-7mer 之訊號強度與濃度作圖91
圖三十九、經由 seed-layer method 處理後 P2-7mer 之訊號強度與濃度作圖92
圖四十、經由沖提液沖洗吸附在多株抗體免疫親合性製備管柱之胜? 片段光譜吸收圖93
圖四十一、應用 MALDI-TOF MS 鑑定檢體前處理後其出現之質譜訊號94
圖四十二、P2-7mer 胜? 標準品製做檢量線之訊號強度與濃度作圖95