

一、前言

骨質疏鬆症是一種低骨量及骨組織之顯微構造惡化的疾病，是普遍存在老年人的臨床問題，可能引起各種部位的骨折。

骨頭是一種經歷不斷重新塑造藉由兩種細胞對抗的過程，分別是破骨細胞(osteoclast)和成骨細胞(osteoblast)，在正常的情況下會進行骨的再吸收作用及骨的合成作用(圖一)，這兩種作用會達到平衡，但過四十歲以後，因老化或其他因素，使得骨質代謝速率加快，此時破骨作用速率大於造骨作用速率，這兩種作用的不平衡造成骨質的破壞加速進行，使得骨質的含量每年以 0.5% 至 1.5% 的速度下降^[1]。骨頭內部因此形成許多疏鬆的空隙，因此非常容易造成骨折，這就是骨質疏鬆症的成因。目前已有許多骨質代謝的生化指標被作為監測骨質代謝的依據，可分為骨質生成指標及骨質再吸收指標^[2]。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跟末端胜肽，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。

膠原蛋白是體內含量最多的一種細胞外基質蛋白質，其主要功能在維持各種脊椎動物的結締組織正常的結構與功能，其中第一型膠

原蛋白是骨骼細胞合成的主要膠原類型，在骨骼的組成物質中占 90% 以上^{[3][4]}。在骨質再吸收過程中，第一型膠原蛋白裂解所產生的代謝指標，在經過人體代謝後，在血清中約有 80% 與胜肽鍵結的型式存在，包括與 pyridinoline (PYD) 交錯聯結之 NTx 跟 CTx。另外大約 20% 以游離型態之 pyridinoline 存在。因此 NTx 跟 CTx 是骨骼中的第一型膠原蛋白被降解後所產生的代謝物，在人體中不會被進一步代謝^[5](圖二)。

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^[2]，其中一種利用酵素連結免疫吸附分析方法 (ELISA) 進行檢測 NTx 的套組 (Osteomark[®]) 是由 Dr. Hanson 於 1992 年所研發^[6]，已通過美國國家食品藥物管制局 (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。此外，此項檢查無法重複使用，無法達到優良篩檢試劑的簡單方便和經濟實惠之要求。所以此項檢測法因為

儀器與材料的限制仍有研發改善的空間。

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，設計 10 段線狀且具有 6 個胺基酸重複序列的 NTx 胜肽片段，分別定名為 peptide 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)^[46]中 Fmoc chemistry^[44] 之合成方法，合成這些胜肽片段。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 管柱以純化出粗產物混合物中的每一個胜肽溶液，冷凍乾燥後得到每一胜肽的最終純產物。胜肽的最終純產物均經由質譜儀(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 peptide 1、peptide 2 與 peptide 3 與 Anti-NTx 抗體間有較高的親合力^[7]。

基於 SPR 探討胜肽與 Anti-NTx 抗體間之交互作用的結果^[7]，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)及單株抗體(human monoclonal anti-P2

antibody)。在本研究中，應用兔子多株抗體製備之免疫親合性管柱分離出臨床之檢測對象(一般婦女及罹患骨質疏鬆症病患)的尿液具有親合性胜肽，再應用 MALDI-TOF MS 的技術來偵測出最顯著之的訊號的分子量，並推論出其胺基酸序列後，製作胜肽標準品之檢量線，以便定量病患尿液中胜肽片段之濃度。本研究有助於未來開發檢測骨質流失之情形之方法，對於骨質疏鬆症的診斷，預防及治療有所助益。

二、文獻探討

2.1 骨質疏鬆症

骨質疏鬆症英文名字是 osteoporosis，意思為佈滿了孔隙的骨骼。孔隙多的骨骼和正常骨骼相比較，外型是一樣的，但質量卻減少了，其原因為骨頭的鈣質流失，使得內部骨頭變為單薄，造成許多孔隙，呈現中空疏鬆的現象，已經疏鬆的骨頭，不再有能力承受日常生活所必須造成的身體負荷，久而久之，骨折就成為不可避免的結果。

骨質疏鬆症主要發生在海綿骨。年輕時骨骼非常緻密，骨小樑很多，其間孔隙很小；但隨著年齡的增長，骨小樑消失，間隙會變大，慢慢形成「骨質疏鬆症」，即骨骼內的孔隙變大變多，骨小樑變少，骨皮質更薄；換句話說，即是骨骼密度變小，單位體積內骨骼所含的礦物質質量減少，骨骼的支撐力相對減低，於是非常容易發生骨折，而最常發生骨折的髖部骨折又約有因骨折引起的併發症造成 5%~20% 的致死率。

骨質疏鬆症可能造成的後果包括體型的改變（駝背）、不良於行、疼痛，甚至增加死亡的危險性。骨折和其併發症是骨質疏鬆症的臨床現象，大部分發生於髖部(股骨)、脊椎及手腕部，而髖部骨折是很嚴重的疾病，約有 5%~20% 的髖部骨折的病人會在 1 年內死亡，約有 50% 存活的病人將可能不良於行，有些人更因此造成永久的行動不便。脊椎骨的骨折則會造成明顯的疼痛、畸形及長期的衰弱。

2.2 骨質疏鬆症之評估

2.2.1 測量骨質密度之方法及儀器設備

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

最常被用來測量跟骨的周圍骨骼，其能源通常用放射性同位素(I-125)提供。在臨床上，由於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或類似的物質中，以計算軟組織或骨骼對光子不同的吸收程度。其骨密度是以公克或 g/cm^2 ^[48]。

2.2.1.2 雙光子吸收測量(Dual-energy photon absorptiometry ; DPA)

使用放射性同位素，經由兩個不同的能量，對具有不同量軟組織的部位進行測量，因此可用來測量腰椎、髖部、前臂以及全身的鈣含量。結果通常以單位面積的骨鈣質量(g/cm^2)表示(BMD)^[48]。

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

使用放射性X-光為能源，其光子流量強一千倍，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(BMD)^[48]。

2.2.1.4 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^[48]。

2.2.1.5 定量化電腦斷層測量(Quantitative computed tomography, QCT)

主要是用來檢查脊椎的海綿骨，因此部位的海綿骨(cancellous bone)再塑作用(bone remodeling)快且面積較大，對治療的反應也較大，因此可被較快檢查出來。其檢量主要用單能量X-光來與標準的參考物質(K_2HPO_4)做比較，其結果乃是以每立方公分的 K_2HPO_4 公克數表示^[48]。

2.2.2 骨代謝之生化指標之測定

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，即所謂的血清或尿液中的骨代謝指標(bone markers,或 bone turnover markers)在臨床上之應用日漸廣泛^[2]。骨骼代謝指標之種類可分為骨質生成生化指標與骨質再吸收生化指標兩種(圖三)。

人體中骨質生成的生化指標 (bone formation markers) 包括下列各項(表一)：(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，故測量血清鹼性磷酸酶來評估骨質之代謝情形較不理想，BSAP 為造骨細胞所含有並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，亦稱 (bone gla protein, BGP)。由造骨細胞所合成，因在進入基質時部分片段被釋放入血液中，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) 骨骼的有機基質中，約有 90% 為膠原蛋白，而膠原蛋白有 97% 為第一型膠原蛋白，在第一型前膠原蛋白(procollogen)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。

人體中骨質再吸收生化指標 (bone resorption markers) 包括下列各項(表二)：(1) 空腹時尿液中的鈣量和羥基脯胺酸 (fasting urinary calcium and hydroxyproline)，(2) 尿液中的羥基離胺酸配醣 (urinary hydroxylysine glycoside)，(3) 尿液中所排泄的膠原 pyridinium 交叉連結物 (urinary excretion of the collagen pyridinium crosslink)。膠原 pyridium 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 lysine 及 hydrolysine 之共價鍵結之環狀結構。當這些組織被代謝時，Pyd 和 Dpd 均為最終產物釋放入血液中經腎臟清除，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，分解後的最終產物，故 NTx 及 CTx 可作為骨質分解的指標。這項骨質生成指標也是目前較具有特異性的生化指標之一，由於第一型膠原蛋白是骨骼細胞合成的主要膠原蛋白類型，在骨骼的組成物質中

佔 90%以上。NTx 是骨骼中第一型膠原質被降解後所產生的最終代謝物，在人體中不會被進一步代謝，因此血液及尿液中 NTx 的含量應用在監控骨質吸收的情形上，為具有高特異性的生化指標。

表一、骨質生成的生化指標、樣品來源及分析方法

Markers	樣品	分析方法
Bone-specific alkaline phosphatase (BAP, bone ALP) 血清鹼性磷酸酵素	Serum	IRMA ^{[23][24]} EIA ^[25]
Osteocalcin 骨鈣素 (OC)	Serum	RIA ^{[26][27]} IRMA ^[28] ELISA ^{[29][32]}
C-terminal propeptide of type I procollagen (PICP) 前膠原羧基端胜肽	Serum	RIA ^[33] ELISA ^[34]
N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) 前膠原胺基端胜肽	Serum	RIA ^[33] ELISA ^[34]

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)

表二、骨質再吸收的生化指標、樣品來源及分析方法

Markers	樣品	分析方法
hydroxyproline 羥基脯氨酸	Urine	HPLC ^[9]
Carboxyterminal crosslinked telopeptide of type I collagen (ICTP, CTX-MMP)	Serum	RIA ^[31]
Pyridinoline (PYD) 游離比林二酚胺	Urine Serum	HPLC ^{[10][11][12]} ELISA ^{[13][14]}
Deoxypyridinoline (DPD) 去氧游離比林二酚胺	Urine Serum	ELISA ^[15]
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 ^{[16][17][18][19][30]} RIA ^[20]
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 ^[6] CLIA ^[21] RIA ^[22]

HPLC(高壓液體層析技術法)、ELISA(酵素連結免疫吸附測量法)、RIA(放射免疫分析測量法)、CLIA(化學發光免疫測定法)

2.3 研究動機及實驗設計

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(圖四)與市售(Osteomark[®])抗體間交互作用之分析。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(表三)，分別定名為 peptide 1~10，並成功地建立胜肽合成之實驗步驟及流程。

表三、依據epitope mapping 原則設計的胜肽之胺基酸序列

No	Sequence	Mass (Da)
1	Gln-Tyr-Asp-Gly-Lys-Gly-Val-Gly-Leu-Gly-Pro-Gly-Pro-Met-Gly-Leu	1545
2	Pro-Gly-Pro-Met-Gly-Leu-Met-Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Pro-Gly-Ala-Ala	1462
3	Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Gln-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala	1365
4	Pro-Gln-Gly-Phe-Gln-Gly-Pro-Ala-Gly-Glu-Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Gln	1551
5	Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Gln-Thr-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala	1417
6	Gly-Ala-Arg-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Pro-Gly-Lys-Ala-Gly-Glu-Asp-Gly	1393
7	Lys-Ala-Gly-Glu-Asp-Gly-His-Pro-Gly-Lys-Pro-Gly-Arg-Pro-Gly-Glu	1588
8	Pro-Gly-Arg-Pro-Gly-Glu-Arg-Gly-Val-Val-Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Arg	1588
9	Gly-Pro-Gln-Gly-Ala-Arg-Gly-Phe-Pro-Gly-Thr-Pro-Gly-Leu-Pro-Gly	1465
10	Thr-Pro-Gly-Leu-Pro-Gly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-His-Asn-Gly-Leu	1620

運用固相胜肽合成的技術(solid phase peptide synthesis)^[46]中 Fmoc chemistry^[44]之合成方法，合成這些胜肽片段。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 管柱以純化出粗產物混合物中的每一個胜肽溶液，冷凍乾燥後得到每一胜肽的最終純產物。胜肽的最終純產物均經由質譜儀(MALDI-TOF MS)鑑定其正確的分子量後，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)分析純化之胜肽與 Anti-NTx 抗體間的交互作用，結果發現 peptide 1、peptide 2 與 peptide 3 與 Anti-NTx 抗體間有較高的親和力(表四)、(表五)^[7]。

基於 SPR 探討胜肽與 Anti-NTx 抗體間之交互作用的結果^[7]，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)及單株抗體(human monoclonal anti-P2 antibody)。在本研究中，應用兔子多株抗體製備之免疫親合性管柱分離出臨床之檢測對象(一般婦女及罹患骨質疏鬆症病患)的尿液中具親合性胜肽，再應用 MALDI-TOF MS 的技術來偵測出最顯著之胜肽

片段的訊號分子量並推論出其胺基酸序列後，製作胜肽標準品之檢量線，以便定量病患尿液中胜肽片段之濃度。本研究有助於未來開發檢測骨質流失之情形之方法，對於骨質疏鬆症的診斷，預防及治療有所助益。

表四、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^[7]

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.

表五、應用 SPR 探討 10 段線狀之 NTx 胜肽片段與 Anti-NTx 抗體間之交互作用^[7]

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.

三、基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法的簡介

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法（Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS）在1985年由德國科學家凱洛斯（Michael Karas）和海倫坎普（Franz Hillenkamp）共同提出，其基質輔助雷射脫附游離法是藉由基質吸收雷射光的能量後，再傳遞給分析物，使得分析物進行脫附游離的一種游離方式；可以用以輔助分析高極性的胺基酸分子。在1988年將可偵測質量上限擴展至上萬質量單位的蛋白質，MALDI通常搭配著TOF MS，因此通常稱為MALDI-TOF MS。而基質的功能在於吸收雷射能量，而分析物本身則不一定吸收雷射能量，因此基質輔助分析物脫附與游離，使分析物能由凝相脫附成氣體分子，並游離成為氣體離子，在游離源經外加電壓作用而得到一加速動能而進入無場飛行管中，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。由於基質扮演著能量緩衝的角色，使得一些熱不穩定的樣品，可以避免直接得到大量能量的輸入而產生熱裂解的現象，此屬於軟性離子化法，現今常被應用於生化樣品的分析。

3.1 MALDI-TOF MS 樣品製備方式

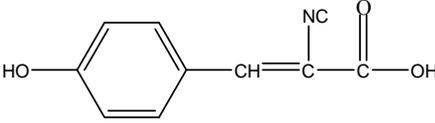
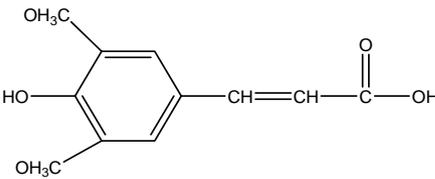
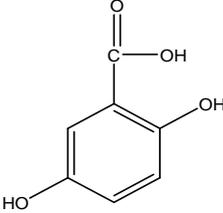
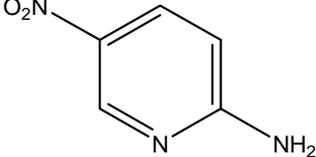
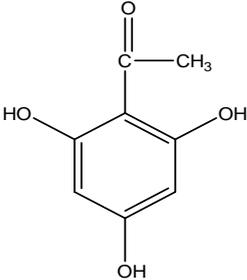
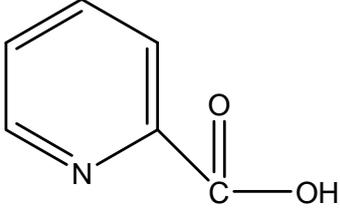
一般傳統的製備方式，是將有吸光性質之有機酸溶於適合的有機溶劑中當做基質溶液，基質溶液通常濃度皆趨於飽和狀態，接著將基質溶液以適當比例跟分析物溶液均勻混合，最後取1 μL ~2 μL 混合液置於樣品盤上在空氣中自然風乾(air-dried)。由於混合液中含有大量的小分子有機酸與少量的分析物，因此等溶液中的水與有機溶劑揮發後，在樣品盤上會形成共結晶(co-crystallization)，此時即可將樣品盤置入質譜儀中進行分析。然而在分析時是否可以得到分析物的訊號，基質與樣品溶液的配製是重要的因素，基質與分析物的莫耳比、溶劑之極性等均會影響共結晶的形成而造成結果的差異，一般來說，基質與分析物的莫耳濃度比大約都在1000：1以上，但對於一些生物巨分子而言，會因為其分子愈大，而基質的莫耳濃度也需要調整至較高的濃度^[35]。將含有樣品的樣品盤送入離子源後，以脈衝式雷射光照射並於真空的環境下進行脫附游離，產生氣相分析物離子後，以質量分析器進行偵測。由於在共結晶中基質的含量遠多於分析物，因此當雷射照射時，雷射能量會由基質吸收且在極短的時間內將能量傳遞給所環繞的分析物分子^[36]，此區域內的分子會在真空的狀態下，在極短的時間內被迅速加熱，而由固相轉變為氣相，此時當相轉移的速率大於分析物受熱分解的速度時，分析物即不會分解，即可保持分析物結構之完整性並脫附至氣態，此過程即為脫附(desorption)，而在過程中，電荷轉移反應也會同時進行，產生一連串離子-分子反應，分子因而被游離化而產生電荷，乃游離化之過程(ionization)。

3.2 基質的特性與功用

MALDI-TOF MS 進行分析時，添加了基質來幫助分析物分子進行脫附游離。正因如此 MALDI-TOF MS 可以藉由基質分子先吸收雷射能量後，再傳遞給分析物使之脫附游離，得到完整的分子離子訊號。早期被研究發展出來的基質多屬於具芳香環的有機酸(如 sinapinic acid 及 2,5-dihydroxybenzoic acid) 會在 UV 範圍內吸收雷射能量，迄今已有八十餘種此類基質被發展出來。常用的 MALDI 基質包括有 Sinapinic Acid、 α -CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)、2,5-DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid)、2,4,6-trihydroxyacetophenon、HABA (2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid)等，多達數十種以上(表六)。根據研究顯示，對不同種類的分析物而言，選擇了適合的基質與分析物形成良好的共結晶之後，就可以得到較好的分析結果。

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的周圍扮演好基質的功用，這樣會造成分析上和圖譜判斷上的困擾，因此一般而言，基質需要具備以下三種必要的功用：

表六、常用的 MALDI 基質之結構^[47]

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
2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,4,6-THAP)		胜肽 核苷酸
2-pyridine carboxylic acid (picolinic acid)		胜肽 蛋白質 核糖核酸

(1)有效吸收雷射能量並轉移給分析物

基質分子應具有吸收雷射能量的能力，並且能夠有效率的將能量傳遞給相鄰的分析物分子，使得分析物分子能夠獲得足夠的能量進行脫附游離。

(2) 有效地防止分析物聚集

如果在共結晶的過程中，分析物太過於集中將會影響能量傳遞的效率以及脫附游離的過程。因此基質分子的含量通常高於分析物，以便於有效地將分析物分子隔開而形成較佳的共結晶，這樣才能更有效率的進行分析的工作。

(3) 提供氫離子，幫助分析物游離化

基質大多數為具酸性官能基的芳香族有機物，可有效地提供氫離子給分析物，使分析物帶上電荷，而獲取質子的方式主要是由於分析物分子與基質離子在氣相中進行一連串離子-分子反應，使分析物形成分子離子。基質在此所扮演的角色為氫離子供應者，可幫助分析物游離化。

3.3 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 analyzer）為質量分析器的基質輔助雷射脫附游離-時間飛行管質譜儀^[43-44]；在真空狀態下，以脈衝式雷射（氮氣雷射或是Nd-YAG 雷射）

照射樣品進行脫附游離的動作。共結晶固體（包含分析物與基質）被照射之後，大部分的能量會直接被基質吸收，然後傳遞給分析物分子，使得分析物分子得以在極短的時間內（pico sec~nano sec）由固態昇華至氣態而脫附（desorption）；脫附過程中會同時進行電荷轉移的反應和一連串的離子-分子反應，分析物分子因而被游離化並帶電荷。但由於MALDI 是以雷射光作為游離化能量來源，所以除了傳統脫附游離法中常見的離子-分子反應之外，尚包含光游離及光化學反應。

飛行時間質量分析器是由離子加速電場與無場區域所組成。當分析物氣態離子產生後，在進入飛行管之前會有一電壓使所有離子集中在同一起始位置後（此過程稱為：延遲萃取delay extraction, DE，再經電場加速送入飛行管，不同質荷比（ m/z ）的分析物離子將會在不同時間到達偵測器(圖五)、(圖六)、(圖七)。

一開始，加速電位提供的能量會讓所有氣態離子具有相同的動能，進入無場區域飛行後，不同的離子會因質荷比不同而有不同速度；質量大的離子具有較小的速度，所以會比質量小的離子慢到達偵測器，而我們便可藉由到達偵測器的時間長短求得質荷比並分別不同質荷比的離子。但分析物分子在被雷射激發形成氣態離子之後，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，在飛行管之前設置延遲萃取的原因便在此。

目前時間飛行管的形式共有四種，包括直線式（linear）、反射式（reflective）、W 型及多次折返式，後兩種時間飛行管是近幾年研發出的高解析TOF 儀器，普及率尚不及直線式與反射式。標準直線式時間飛行管長度約為1 公尺，加速電位為30kV，解析度較低。反射式與直線式不同在於反射式時間飛行管會在直線飛行管末端施加正電場，使分析物正離子在這個區域因為電性相斥的關係減速，最後由於正電場的持續影響而轉向、加速，並由另一端的偵測器所偵測。反射式時間飛行管的解析度大約比直線式的提高10 倍。反射式時間飛行管的另一特點就是擁有類似二次質譜的離子源裂解技術（post source decay, PSD），利用反射式TOF 設計，發展出一種稱為游離源後碎裂的功能（post source decay, PSD），因為有些介穩離子（metastable ions）在飛行經TOF管至偵測器的過程當中分析，會因為本身內能過高導致碎裂，由於碎裂離子和其母離子只是動能不同但仍具有相同的飛行速度，若以線型式飛行時間管終端的偵測器偵測，則因其到達偵測器的時間相同而無法分辨，但反射式飛行時間質譜儀則可根據離子動能的不同加以區分。因為具有較小動能的碎裂離子會較

快被反向電場減速轉彎，而較早到達另一端偵測器；具有較大動能的離子則反之，如此就可以區分碎裂離子和其母離子，並可應用於分析物結構的判定。能夠得到特定母離子的碎片離子圖譜，亦可運用於結構分析；雖然此法之準確度與靈敏度皆不及串聯式質譜（tandem mass spectrometry, MS/MS），但因為基質輔助雷射脫附游離-時間飛行管質譜儀有著操作簡單、偵測時間短、靈敏度高、偵測範圍廣以及準確度高、又容許少量鹽類干擾等優點，現今商業化的產品相當普遍且被大量運用在蛋白質體學的研究上。

3.4 MALDI-TOF MS 中抑制現象之解決方法

MALDI-TOF MS 現今雖然已經成為分析生化分子不可缺少的技術，但還是有其無法避免之問題要克服，例如：基質與分析物的共結晶不均勻而導致某些結晶點的訊號特別高、雷射能量調太高或太低導致無訊號或基線過高、來自於樣品中的鹽類物質和界面活性劑會抑制離子訊號，常常會影響到分析物信號，進而影響分析物在 MALDI-TOF MS 中之判斷，所以決定是否能得到最佳的結果是和基質的選擇及樣品製備有很大的關係，因此根據上述問題有幾個比較常見之解決方法如下：

(1) 去除鹽類

樣品中如含有大量鹽類時對MALDI-TOF MS 來說是很大的致

命傷，會造成定量上之困難，含量過高時甚至無分析物訊號產生，因此可購買已有商品化之 Zip-Tip 或是將樣品過固相萃取管柱 (Solid-Phase Extraction) 之前處理 來去除樣品中之鹽類物質。

(2) 選擇適當的基質

由於需考慮到樣品和基質的互溶性，因此基質的選擇是在實驗過程中考量的因素之一，所以針對不同極性的樣品需使用不同極性大小的基質才能有較好的共同結晶化並進而得到較好的脫附游離效率，並且可以避免訊號集中點 (sweet spots) 的產生，避免質譜圖中訊號再現性降低而增加了分析上的困難。另一個與基質相關的考量因素即是基質與分析物之間的比例，通常分子尺寸愈大的分析物，在樣品製備中基質所佔的比例也需相對提高，因此在測量分析物時，先了解分析物的各種物理性質是必要的，以便於找尋適當的基質和基質比例。

3.5 MALDI-TOF MS 的應用

MALDI-TOF MS 很適合用於各種類型分子的分析，因此發展至今，除了被應用於一般的合成有機高分子的分析外，更是被廣泛地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 進行分子量的確認。另外，此質譜技術不僅在新藥研發上掀起革命，還

可應用於癌症的早期診斷、運動禁藥監測、環境污染分析，未來更有可能協助醫藥界找到致癌藥物。隨著人類基因序列的解碼，想了解某些基因的改變對人體的影響，以及與蛋白質之間的相互作用，都將有賴於此質譜技術。以下將介紹一些有關MALDI-TOF MS 應用分析：

(1) 胜肽與蛋白質的應用分析

以MALDI-TOF MS 分析樣品時，若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，而造成訊號集中點 (sweet spots) 的現象，造成低再現性的問題；另外，鹼金族鹽類也會使得分析物在脫附游離時容易形成其加成物 (MK^+ 、 MNa^+)，導致圖譜判定的困擾，並會降低再偵測時的靈敏度。Mock 等人就提出樣品在濃度超過20 mM 的磷酸鹽緩衝溶液下，進行MALDI-TOF MS 分析時將無法得到分析物的訊號，報告顯示高濃度緩衝溶液、鹽類、界面活性劑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；另外，現今蛋白質的分離多採用聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel

electrophoresis, PAGE) 的方式，在此系統中會加入大量的界面活性劑 SDS (sodium dodecyl sulfate)，可以把非極性的長鏈端鑲入蛋白質三級結構的內部，而其極性的部分與外界的水分子結合，因而使得蛋白質產生變性 (denature)。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，而且在過程中易損失樣品。

利用 MALDI-TOF MS 分析胜肽及蛋白質時，如需進一步瞭解其胺基酸序列，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。而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^[43]，進一步連結至網路上的蛋白質資料庫進行比對。

(2) DNA 的應用分析

核酸變異之研究有助於人類對於疾病機制的進一步瞭解，而為了更進一步瞭解基因變異對於疾病產生的影響，有必要發展高靈敏度、快速以及經濟的分析技術。和傳統方法相較之下，MALDI-TOF MS 所具有的精密度、高靈敏度和分析速度，目前已成為單核苷酸多型性變異 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分析的重要工具之一。

目前在以MALDI 進行聚核苷酸分析時仍有偵測質量上限的困擾，主要歸因於鹽類加成物離子形成而抑制分析物的訊號，及較大的DNA 分子在MALDI 脫附游離的過程中容易產生碎片離子，因此在MALDI 樣品製備中直接在基質中添加銨鹽或胺類化合物如diammonium hydrogen ditrate、spermine 以做為共基質 (co-matrix)，可抑制鹽類加成物離子的生成，主要作用的原理是利用胺鹽上的胺離子與DNA 磷酸雙酯骨幹的部分結合競爭鹼金屬陽離子的鍵結位置，在脫附游離的過程中提供質子給磷酸根，進而抑制鹽類加成物離子的生成^[42]。目前已有不少方法提出可降低許多鹽類加成物的問題，而MALDI 主要集中在DNA 分析時最大分子約為長度100個核苷酸左右的研究，因此在此分子大小以下可獲得較佳的解析度及質量精確度的質譜圖。

3.6 MALDI-TOF MS 的優勢

MALDI-TOF MS 在目前的使用已愈來愈普遍，已經成為偵測生化分子與有機高分子必備的儀器之一，這都該歸功於它本身具有一些其他質譜儀所沒有的特點，其主要的特點如下：

- (1) 高的靈敏度，可偵測到 femtomole 甚至 attomole 的分析物。
- (2) 極高的偵測質量範圍。
- (3) 其操作簡單而且分析快速。
- (4) 極少的分析樣品需求量。
- (5) 較高的鹽類承受能力。

因此 MALDI-TOF/MS 成為蛋白質快速鑑定及特性分析的主軸。本研究就是利用基質輔助雷射脫附游離 / 飛行時間質譜技術加上樣品前處理技術，來偵測罹患骨質疏鬆症病人的尿液檢體尋找其生物指標 (biomarker)。

四、實驗原理

4.1 抗體和抗原的結合的原理

4.1.1 抗體結構

抗體也稱免疫球蛋白(immunoglobulin；簡寫為Ig)，每一抗體蛋白質包括四條多肽鏈，以雙硫鍵(S-S)連結，中央較長為可變動者，而可於樞紐處彎曲的部分；其他部位之結構則是固定的，結構如(圖八)不同抗體有不同抗原連結位置，因此可見抗體與抗原的結合具有特異性(specificity)的關係。

4.1.2 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合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(圖九)。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合力結合外，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：蛋白質通常在溫度超過70°C時會產生變性，抗體若是在高於此溫度的環境底下，通常抗原和抗體的親合力就會消失。

(二) 酸鹼值(pH)：抗體和抗原要有效的進行結合反應，反應溶液必須控制在中性的條件底下。如果抗體和抗原之間的親和力屬於氫鍵，則太酸(pH<3)或太鹼(pH>10)的狀況下都會使兩者分開。大部分分離抗體和抗原都會調控在較低的酸鹼值，如pH2。

(三) 溶液中的離子溶度：抗體和抗原若在溶液中結合形成複合體時，我們可以調控溶液中的離子溶度來做分離。假如抗體和抗原的作用是屬於靜電力時，則調高離子濃度將會改變蛋白質的表面電荷，此時抗原和抗體的結合便會被干擾。

4.2 親和性管柱製備原理

親和性純化在分離蛋白質上是一種非常有力的技術，通常可以藉由一步的過程，將蛋白質純度提高並分離出來。親和性管柱通常利用抗體、抗原經由共價性修飾至固相基質上(圖十一)、(圖十二)，之後將基質填充進入管柱，利用事先調配好的磷酸鹽緩衝溶液來平衡親合性管柱，將管柱控制到適合反應的條件，以用來吸附我們要純化的蛋白。通常在理想的情況，管柱都能有效從細胞萃取液或均質的組織萃取液裡，分離出我們所要的水溶性蛋白或脂溶性膜蛋白。當我們所要的蛋白質和管柱靜相上的抗體緊密結合後，運用洗滌溶液把未跟靜相

結合的非特異性蛋白從管柱裡沖出，藉此除去其他我們不需要的蛋白。之後我們所要的蛋白，可以用適當條件的溶液來沖提，將它從管柱靜相帶出管柱外，而完成蛋白質純化的步驟(圖十)。最後所純化出蛋白質的量取決於抗體或抗原的量，以及它們的親和性。

4.3 Bradford protein-binding assay 的原理及應用

以 Bradford protein-binding assay 的方法進行蛋白質偵測^[39-41]，此方法利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 會與蛋白質結合的特性，Coomassie Brilliant Blue G-250(在此簡稱 CBG)在酸性環境下為茶色，當蛋白質加入後，蛋白質會與 CBG 結合，使 CBG 轉變為藍色，當愈多蛋白質和 CBG 染劑結合則表現的藍色就愈深，所以蛋白質的量和的顏色深淺呈現正比的關係。此時在 595 nm 波長下，會有較高的吸收，以便偵測。這個方法的優點為 G-250 與蛋白質結合所需的時間很短(大約 2 分鐘左右)，且結合的 G-250-蛋白質複合物(complex)可在溶液中維持較長的時間(大約 1 小時)。此法方便而靈敏及較不受基質干擾，且可使用微量滴定盤進行分析，可減低試劑用量及樣品的損失，方便大量樣本的操作。

4.4 固相萃取法(Solid-Phase Extraction)的原理及應用

固相萃取法是利用靜相上所鍵結的官能基與分析物相互作用，以達到滯留分析物的目的，之後再利用極性與分析物相近的溶劑，將分析物從靜相上沖提下來。

一般而言，靜相官能基的種類包括下列三種，分別為極性(例如octyl (C₈)、octadecyl (C₁₈)等)、非極性(例如cyanopropyl (CN)、silica (Si)等)以及離子性(例如carboxymethyl (CM)、trimethylaminopropyl (SAX)等)，而此三種靜相官能基與分析物之間的作用力則分別為偶極-偶極(dipole-dipole)作用力或氫鍵作用力、凡得瓦(Van Der Waals)作用力以及正負電荷的靜電吸引力，因此在選用靜相時則必須依照分析物本身的特性來決定，由於參考文獻中大多使用C₁₈固相萃取吸附劑^{[38][6]}，將一些導致干擾分析的雜質從純化後的尿液檢體中分離出來，然後進一步來濃縮、萃取出真正的待測物，增加儀器偵測感度。

一般固相萃取法的操作步驟：

1. 管柱適化 (column condition)

管柱所填充的吸附劑在乾燥的情況下難以發揮其吸附的功效，為使填充劑能夠充分活化，必須使用有機溶劑沖洗，且由於吸附劑中可能殘留一些雜質，此一步驟亦可去除雜質，避免雜質干擾。同時以溶劑清洗管柱後，以去離子水沖洗管柱，一方面調適管柱以適合水溶

液樣品的分析，另一面可清除其中雜質，而在通過溶劑時，溶劑必須完全充滿管柱把空氣減到最低，方可使固相萃取法達到最大之萃取功效。

2. 加入樣品 (sample loading)

將水樣透過重力或是真空減壓之方式注入管柱中，當樣品進入管柱中，分析物會利用與填充物間之凡得瓦力、氫鍵或是偶極矩等力，使分析物吸附於填充物中，達到濃縮之效果。而在樣品中之基質干擾物部分會同時吸附於填充物中，達到初步純化之效果。

3. 清洗(wash)

透過去離子水清洗，主要是為了去除固相萃取管柱孔洞中的樣品基質干擾物，最後為避免後續沖提時之有機溶劑中與水之互溶，因此通常會透過真空抽氣乾燥除水。

4. 沖提(elute)

沖提為固相萃取最後一步驟，主要是用一種適當之有機溶劑通過管柱，利用溶劑破壞分析物與管柱填充物之作用力，分析物再隨溶劑沖提下來，而我們就可以利用尖底瓶收集萃取物，以作為後續之儀器分析。

4.5 固相胜肽合成法 (solid-phase peptide synthesis ; SPPS)

美國紐約洛克斐勒大學的梅里菲爾德 (Robert B. Merrifield) 在 1959 年提出新構想^[46]：假若利用共價鍵結合的方式，將所要合成的胜肽連接在固體小珠粒上，這樣就可以只用簡單的過濾方式來沖洗去除過剩的反應物及副產物，而不需要額外進行分離純化的操作，而且合成出來連接在固體小珠粒上的胜肽在清洗純化的過程中不會有所損失，如此更可以達到自動化合成的目標，稱為固相胜肽合成法。至於反應所需的固體小珠粒材料，則由聚苯乙烯(polystyrene)加以化學修飾，使其末端帶有氯甲基，以便和第一個胺基酸的羧基發生反應而形成共價鍵結，藉此固著在小珠粒上。一旦胜肽的合成反應結束，可以藉氫氟酸將整段合成的胜肽從聚苯乙烯的小珠粒直接切下而獲得產物。

4.5.1 SPPS合成原理

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^[44]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。

4.5.2 SPPS 反應試劑說明與作用

(1) 耦合試劑 (coupling reagent)

胺基酸之 C_{α} 上 (amino acid C_{α}) 的 COOH 官能基需要被 HBTU 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate、HOBt (1-hydroxybenzotriazole, anhydrous) 與 DIEA (N,N-Diisopropylethylamine) 等類之化學反應試劑，活化而呈現強烈拉電子力量。再與 C_{α} 的 NH 形成胜肽鍵 (peptide bond)

HBTU 與 HOBt 常廣泛被應用於固相胜肽合成，做為胜肽合成的耦合試劑，可提高反應產率與縮短反應時間，並抑制外消旋化 (racemization) 的發生。

(2) 去保護基試劑 (deprotecting reagent)

Rink amide AM resin 及胺基酸之 N_{α} 都有 Fmoc 保護基團，而加入 20% (v/v) piperidine in DMF 的作用是為把 Fmoc 從 Rink amide AM resin 與胺基酸的 N 端上切下以形成 NH_2 官能基。

(3) 裂解試劑 (cleavage reagent)

當直鏈胜肽依序合成接好後，需要使用裂解試劑把胜肽從 Rink amide AM resin 上切下，並同時切下胺基酸上的支鏈 (side chain) 保護基，以得到胜肽粗產物。

4.6 高效能液相層析法

4.6.1 HPLC 的原理與應用

高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, 簡稱 HPLC) 適用於半揮發性和非揮發性化合物或遇熱易被裂解的待測物，應用此方法進行分析的先決條件是標的待測物 (欲分離之合成胜肽) 必須溶於作為移動相的溶劑中；由於移動相的溶劑是在加壓狀況下輸送，所以最初是被稱為高壓液相層析 (high pressure liquid chromatography)。高效能液相層析分析的原理係藉移動相通過固定相達到分離的效果；混合物中的各成份在固定相和移動相之間的分配係數 (partition coefficient) 不相同 (即親和力不同)，使其在管柱中的滯留時間不相同而得以分離出來。若化合物與固定相親和力較強，則沖提較慢 (即滯留時間長)，而化合物與移動相的親和力較強，則沖提較快 (即滯留時間短)，依此原理將樣品中的標的待測物與共萃取出來的干擾物分離的方法。

4.6.2 RP-HPLC 的原理與應用

逆相高效液相色譜層析法 (RP-HPLC)，是一種能將蛋白質和 peptides 依其極性大小加以分離的方法。原理是利用蛋白質樣本各個成份，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（氰甲烷）、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(hydrophobic interaction)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，故越晚被沖提出。

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、有機溶劑之極性等，可大大提高分離效率，獲得較高之解析能力(resolution)。(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令人滿意的特性，如低紫外光密度(lowultraviolet

strength)、低溶氧度(low oxygen solubility)和沖提强度高(elution strength)等，使RP-HPLC 分離純化蛋白質中具有很高分辨與解析能力；再者，RP-HPLC 在蛋白質與peptides 的分離上，相對於其他的層析分離方法，為一具有快速和高回收率之蛋白質分離方法。

因此RP-HPLC 常被選用為蛋白質或peptides 和諸多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，包括可應用於生化、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。

五、材料與方法

5.1 實驗設計與流程

應用兔子多株抗體製備免疫親合性管柱分離尿液中與抗體具有親合性之胜肽片段，其實驗設計與流程位於(圖十三)。

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

5.2.1 材料與設備

製備免疫親和性管柱所需之試劑耗材及儀器設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表七。

表七、多株及單株抗體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
NaCl	USB
KH ₂ PO ₄	SIGMA
NaN ₃	SIGMA
HCl	SHOWA
NaHCO ₃	SIGMA
CNBr-activated Sepharose 4B	GE Healthcare
P2-Polyantibody	美國 Biocheck 公司提供
P2-Monoantibody	美國 Biocheck 公司提供
Ethanolamine	ACROS,ORGANICS
Tris-HCl	TEDIA
Glycine	Advanced Chemistry Inc.
Commasie Brilliant G-250	BioRad(California,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
ELISA Reader 酵素免疫分析儀	Molecular Devices
96 孔樣品盤	Costar

緩衝溶液配製

磷酸鹽緩衝溶劑之配製

10 mM 磷酸鹽緩衝溶劑(KH_2PO_4 1.36 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。

Coupling Buffer 之配製

取 8.4 g NaHCO_3 和 29.22 g NaCl 用去離子水加至 1000 mL，並利用 HCl 調整 pH 值至 8.3。

Blocking Buffer 之配製

配製 1 M ethanolamine，並利用 HCl 調整 pH 值至 8.0。

Elute Buffer 之配製

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

5.2.2 製備多株抗體親和及單株抗體製備親合性管柱

應用兔子多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)及人類單株抗體(human monoclonal anti-P2 antibody) 製備親合性管柱之實驗步驟如下：

1. 取出 1 g 乾燥的 CNBr -activated Sepharose 4B 緩緩倒入 100 mL 的 1 mM HCl (pH 3.0) 中，緩慢攪拌約 30 分鐘使膠體顆粒展開。
2. 將混合液倒入漏斗內，之後用抽氣過濾裝置，將液體移除。
3. 在漏斗裡，再加入 25 mL 的 1 mM HCl (pH 3.0) 於膠體上，混合攪

拌 2 分鐘，之後再用抽氣過濾裝置，將液體移除，重覆三次，以上步驟的目的是為了活化膠體上的反應基團。

4. 清洗完膠體後，再加入 coupling buffer 來沖洗活化後的膠體，時其處於鹼性環境中。
5. 在 50 mL 容量的塑膠瓶，加入 100 μ L 之多株抗體(濃度為 3.4 mg/mL)或單株抗體(濃度為 2.1 mg/mL)，並稀釋 100 倍於 10 mL coupling buffer 內，之後應用 UV detector 偵測波長 280 nm 訊號確認有抗體之訊號。之後再加入活化後之膠體並在 4°C 冷房裡的旋轉機反應 16 個小時。
6. 將反應完的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 中波長 280 nm 訊號來確認抗體是否有跟膠體結合。
7. 將膠體置換到 10 mL blocking buffer 中，4 °C 冷房下反應 16 個小時，此步驟目的是為了遮蔽尚未與抗體結合之膠體上的反應基團。
8. 將膠體倒入空的層析玻璃管柱中，利用不同的 pH 值溶液沖洗六個循環，每次每種溶液至少使用 5 倍膠體體積。每次循環各用內含 1M NaCl 的 0.05M 的 Glycine 緩衝溶液(pH 3.5)及內含 1M NaCl 的 0.05M 的 Tris-HCl (pH 8)緩衝溶液沖洗一次。
9. 之後利用 pH 7.4 的磷酸鹽緩衝溶劑沖洗 200 mL 來平衡親和性管柱，並存放於 4°C 冷房備用。

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肽

應用多株抗體製備之免疫親合性管柱來篩選出對抗體具有親合力之胜肽並以基質輔助雷射脫附游離時間質譜法鑑定胜肽之分子量之實驗步驟如下：

1. 配製 1 mL 濃度為 5×10^{-7} M 的線性胜肽 P-2、1 mL 濃度為 5×10^{-7} M 的環狀胜肽 CP-2 及 1 mL 濃度為 2×10^{-7} M 的 Angiotensin I 胜肽標準品並混合一起，通過多株抗體 (rabbit polyclonal anti-P2 antibody) 製備之免疫親合性管柱。
2. 當 P-2、CP-2 及胜肽標準品 Angiotensin I 之混合液通過多株抗體 (rabbit polyclonal anti-P2 antibody) 製備之免疫親合性管柱並吸附對抗體具有親合性之胜肽，再使用 100 mL 的 10 mM 磷酸鹽緩衝溶劑 (pH 7.4) 清洗管柱，來將非親合性之胜肽沖洗出來。
3. 當清洗步驟完成後，加入 100 mL 的沖提液 (50 mM 磷酸鹽緩衝溶劑, pH 7.4)，來沖提出吸附在多株抗體 (rabbit polyclonal anti-P2 antibody) 製備之免疫親合性管柱內的胜肽 (P-2, CP-2 或 Ang I)。
4. 將沖提下來的樣品溶液通過 C_{18} 的固相萃取管柱去除鹽類並濃縮樣品。
5. 將分析物樣品和基質溶液以比例 1:1 混合均勻後，點樣品於樣品盤上 (sample target)，以自然乾燥的方式使分析物和基質形成共結晶後，即可送入 MALDI-TOF MS 中進行質譜分析。

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肽片段

應用多株抗體製備之免疫親合性管柱分離出尿液中與抗體具有親合性之胜肽片段並以基質輔助雷射脫附游離時間質譜法鑑定尿液中分離出胜肽片段之分子量之實驗步驟如下：

1. 收集20歲、40歲婦女及骨質疏鬆症患者的尿液進行研究，而其中骨鬆病患的臨床尿液樣品是由臺中榮總醫院潘建州醫師提供，樣品均在四小時內保存在-20°C的冰箱中直至分析，實驗前將尿液樣品在室溫下回溫，並以轉速4000 rpm 離心去除雜質，之後收集尿液上清液。
2. 取尿液檢體10 mL稀釋5倍於10 mM磷酸鹽緩衝溶劑(pH 7.4)中，並過0.22 μm 的過濾膜。
3. 多株抗體製備之製備免疫親和性管柱使用前先通過100 mL的磷酸鹽緩衝溶劑(pH 7.4)清洗管柱。
4. 將已稀釋過濾的尿液檢體加至多株抗體製備之免疫親和性管柱中。
5. 清洗：當稀釋尿液完全通入管柱後，使用100 mL的10 mM 磷酸鹽緩衝溶劑(pH 7.4)清洗管柱，來將非專一性的蛋白質沖洗出來。
6. 沖提:當清洗步驟完成後，加入50 mM 磷酸鹽緩衝溶劑(pH 7.4)，來沖提管柱內對抗體具有親合性之胜肽，每1 mL收集一管。

7. Bradford的方法偵測訊號：在96孔樣品槽中逐一加入從收集管中取10 μ L 待測樣品後，再加入200 μ L稀釋5倍的Coomassie Brilliant Blue G-250試劑，來偵測由管柱沖提下來的對抗體具有親合性之胜肽(用ELISA Reader酵素免疫分析儀測 595 nm的光譜吸收值，測量其蛋白質吸收值)。
8. 最後再以10 mM磷酸鹽緩衝溶劑(pH 7.4)清洗平衡管柱，即可將管柱置於4°C冷房中保存。
9. 將有訊號的部份，通過C₁₈的固相萃接管柱來去除鹽類並濃縮樣品。
10. 將去鹽濃縮的檢體樣品冷凍乾燥。
11. 經由冷凍乾燥後的樣品加入去離子水回溶至1 mL。
12. 將分析物樣品和基質溶液以比例1:1混合均勻後，點樣於樣品盤(sample target)上，以自然乾燥的方式使分析物和基質形成共結晶後，即可送入MALDI-TOF MS中進行質譜分析。

5.3 應用 SPPS 方法合成胜肽標準品

5.3.1 固相胜肽合成之實驗材料與設備

固相胜肽合成 (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	備註	購買廠商
Rink amide AM resin	胺基酸之固著物	Ana Spec
具 N _α -Fmoc 保護基的氨基酸	N 端具 Fmoc，側鏈具保護基之胺基酸	
HBTU	活化胺基酸 C 端之試劑(coupling reagents)	
HOBt		
DIEA		Sigma
Piperidine	去除胺基酸 N 端的保護基	Fisher
TFA	將合成好之胜肽由樹脂上切下	scientific
DMF	潤濕樹脂	Fisher
DCM	膨大樹脂	scientific

5.3.2 固相胜肽合成之實驗方法

固相胜肽合成之實驗流程(圖十四)將於含有 Rink amide AM resin (0.25 mmole、0.338 g) 的反應針筒內，加 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；爾後加入 5 mL 的30% Piperidine/DMF 混合反應15分鐘，重複兩次；再加入 5 mL DMF，混合反應5分鐘，重複三次。取胺基酸 0.75 mmole 並且與coupling reagent (HOBt: 0.75 mmole，101.3 mg；HBTU: 0.75 mmole，284.4 mg；DIEA: 1.0 mmole, 261 μL) 反應5分鐘後，與反應針筒內的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，在每次的耦合反應結束後以Ninhydrin test 鑑定是否耦合成功。取市售 Ninhydrin 試劑 10 μ L 於試管中，並取少量的 resin 置於上述試管中於95 $^{\circ}$ C 油浴中加熱5分鐘，若 resin 呈現透明或黃色表示耦合成功則可使用 DMF 洗滌4次之後再重複步驟（去保護至Ninhydrin test）接下一個胺基酸，倘若呈現顏色呈現深藍色則表示耦合可能失敗需重新耦合1次；持續重複上述去保護基(de-protection)反應及耦合(coupling)反應，直到所有的組成胺基酸被接在樹脂上。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，將胺基酸上N端的Fmoc保護基去除掉，最後以化學裂解法將peptide自樹脂上切下，經由減壓過濾後，取得濾液，以氮氣吹除TFA，待殘留溶液約剩1.5 mL時，加入乙醚3 mL，得到線狀胜肽粗產物。胜肽粗產物的純化是經由逆相高效能液相層析儀(reversed phase HPLC)進行，但在純化之前需先經由MALDI TOF Mass 測定其粗產物之分子量。確認分子量無誤之後才進行純化。

5.4 應用逆相高效能液相層析法分離純化胜肽標準品

5.4.1 RP-HPLC 實驗材料與設備

逆相高效能液相層析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	ECHO
TFA (Trifluoroacetic acid)	Lancaster
儀器設備	購買廠商
0.22 μm filter	Millipore
玻璃過濾裝置 (AK95375-00000)	KONTES
translucent Buchner flasks	KIMBLE
微量注射針 (80830 750RN、500 μl)	HAMILTON
C18 monomeric column 【10 × 250 mm】 (cat. 238TP101510、particle size 10–15 micron)	VYDAC
RP-HPLC (Pump L-2130、UV detector L-2400)	HITACHI

5.4.2 RP-HPLC 純化胜肽粗產物

樣品中之成份經 UV 光源 225 nm 偵測後，數據（滯留時間，retention time，Rt）經由電腦處理以積分圖形呈現。分離之最佳狀態可由進速度、孔徑與離析率調校而求得。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。

我們所使用的管柱種類：粒子尺寸 10 μm 的 C₁₈ 層析管柱，利用 UV detector 所檢測的波長為 225 nm，固定移動相流速在 4 mL / min，移動相溶劑的組成分別為 solvent A：D.D.water 4L + 0.05%

TFA，solvent B：Acetonitrile 4L + 0.05% TFA。其加 0.05% TFA，主要是利用共同離子效應，以防止胜肽解離，分析的方法利用線性梯度沖提（在 30 分鐘內 solvent A/solvent B 含量比例由 90:10 到 10:90，接著 7 分鐘內維持在 10:90 的比例，將還殘留於管柱內的剩餘干擾物沖提出來，立刻再轉換成 90:10 的比例維持 10 分鐘，讓管柱達到最初時的平衡狀態。而冷凍乾燥完成之胜肽樣品，自冰箱取出於室溫下回溫，並將殘留於 tube 管壁底層之黏稠液體，利用去離子水（D.D. water）與乙腈（acetonitrile）混合比例 1mL:1mL 來溶解。

欲分析或純化的胜肽樣品需於分析或純化前，先以孔徑 0.22 μm 針筒過濾器（filter）過濾去除雜質。過濾後之樣品注射至儀器前，須先去除儀器中微流管柱或鐵氟龍管內及移動相氣泡（Purge），並確認管柱內沒有殘留的干擾物。若有雜訊出現（即圖譜還有若干大小不一的 peak 出現，表示管柱未達平衡狀態），應設定適當條件（流速、溶劑分配比係數）將管柱清洗乾淨後，再進行樣品分析。

當按下操作軟體於螢幕上“Start Run”後，螢幕會出現“Waiting for injection”並將胜肽樣品注入樣品注射閥，此時注射閥箭頭應停留在 load 位置，如此樣品才仍裝載於閥內；待 RP-HPLC 儀與電腦的同步化操作完成，將注射閥往下推至 inject 位置，樣品就會隨移動相進入 C_{18} 層析管柱進行分析。電腦中的積分軟體會隨樣品內成份於

不同時間出現面積大小不一的波峰 (peak)，並依其圖譜來確認純度與滯留時間 (retention time, Rt)。此時若要進行純化樣品的流程，可依積分後圖譜所出現的波峰，並判別樣品中主要成份可能所出現滯留時間之區間，個別收集每個波峰出現時 RP-HPLC 儀所層析流出的溶液，並標示分類完成，經冷凍乾燥，便能得到純化後的白色乾燥粉末，待分析製備之用。

5.5 應用 MALDI-TOF MS 來定量前處理後尿液檢體

應用 MALDI-TOF MS 來定量尿液檢體通過多株抗體製備免疫親合性管柱分離出與抗體具有親合性之胜肽片段。

5.5.1 MALDI-TOF MS 設備、實驗材料、及基質溶液配製

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)裝置購置於Bruker Daltonics 公司(Germany)產品，型號：MicroFlex，本實驗之MALDI-TOF MS 為MicroFlex，具備一波長為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，各自有一偵檢器進行偵測，而本研究皆使用反射型模式進行操作，其質譜儀操作參數設定如表十所示：

表十、MALDI-TOF MS 操作參數設定

操作參數設定	Reflector mode
Laser Frequency (Hz)	20
Ion Source 1 (kV)	19.00
Ion Source 2 (kV)	16.25
Lens (kV)	9.55
Reflector (kV)	20.00
Pulsed Ion Extraction (ns)	60
Laser shot	50
Laser energy (μ J/ pulse)	12~15

MALDI-TOF MS 基質溶液配製所需之試劑，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表十一。

表十一、MALDI-TOF MS 實驗過程中，所需之試劑

藥品試劑	購買廠商
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	ALDRICH
Acetonitrile	ECHO
質譜儀校正用標準品	
Substance P	SIGMA
Angiotensin I	SIGMA
Angiotensin II	SIGMA
Bradykinin	SIGMA

1.MALDI-TOF MS 基質溶液的配製

- (1) 飽和 α -CHCA 溶液：稱取10 mg 的 α -CHCA 溶於1 mL的 0.1% TFA溶劑中，其溶劑含50%的ACN 及50%的純水。
- (2) seed-layer 溶液：稱取 2 mg 的 α -CHCA 溶於1 mL的 0.1%TFA 溶劑中，其溶劑含100%的ACN。
- (3) 校正的標準溶液：取 1 mg 標準品，以去離子水配製成濃度為 1.0×10^{-6} M 的水溶液作為校正的標準溶液。

5.5.2 胜肽標準品之檢量線製作

檢量線的製作是以訊號強度對胜肽標準品之濃度作圖求得，而檢量線濃度範圍設定在 $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ~ $6.125 \times 10^{-7} \text{ M}$ 之間，檢體樣品定量主要是使用以訊號強度對標準品序列稀釋後之濃度作圖求得。由於不同的濃度下其訊號的偵測強度也會不同，固MALDI-TOF的訊號強度取決於雷射強度與基質的結晶狀態及標準品之濃度配製。定量使用的標準品為P2-7mer (P2-7mer；分子量650.4 Da)，以去離子水含0.1% TFA配成1 mM，再依序稀釋為10 μM 、5 μM 、2.5 μM 、1.25 μM 及0.6125 μM 。分別取不同濃度的標準品溶液取1.0 μL 與1.0 μL CHCA基質溶液均勻混合，再從每個濃度的混合液中各取1.0 μL 點在不銹鋼製的樣品盤上，待其自然乾燥後進入質譜分析，每一個濃度的well，任意找七個點打，並算出其平均訊號強度及標準偏差(SD)作圖，以訊號強度與濃度作圖。此外，在檢量線的製作上其再現性的探討是必要的，如果在檢量線製作的過程中發現再現性不佳，則會導致實驗中定量上的困難性，因此本實驗首先針對再現性的問題進行探討。

5.5.3 探討胜肽標準品檢量線之再現性

本實驗首先以再現性的探討，而過去文獻中對於^[37]MALDI-TOF MS 定量上最主要的問題，利用樣品製備的方法著重在「種子層」(seed-layer)^[45]來增加樣品的均勻程度則可改善並提高訊號再現性，本實驗比較seed-layer method處理後與未經seed-layer method處理的基質在 P2-7mer 胜肽定量的表現，seed-layer method跟一般方法不同的地方，只差在須在不銹鋼製的樣品盤先上一層 seed-layer 溶液在樣品盤上後再上標準品與基質混合液，待其自然乾燥後進入質譜分析，而定量的檢量線濃度範圍設定在 $1.0 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 6.125 \times 10^{-7} \text{ M}$ 之間。

5.5.4 偵測前處理後尿液檢體之訊號強度

經由前處理後之尿液檢體取1.0 μL 與1.0 μL 基質CHCA均勻混合，最後取1.0 μL 混合液置於樣品盤，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任意找七個點打，雷射次數為50個shot，將平均訊號強度代入檢量線換算濃度。

六、結果與討論

6.1 製作多株抗體免疫親合性管柱及單株抗體免疫親合性管柱

在本實驗中，首先製作多株抗體免疫親合性管柱，在(圖十五)說明了製作時，經由UV detector確認抗體是否有跟CNBr-activated Sepharose 4B 基質接合在一起，圖中(A)為多株抗體尚未與基質結合在一起的之UV吸收光譜，圖中(B)為多株抗體與基質結合後，剩下尚未與基質結合的吸收光譜，而(圖十六)則是單株抗體與基質結合之吸收光譜圖，來證明抗體經由共價性修飾至固相基質上。

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肽

配製1 mL濃度為 5×10^{-7} M的線性胜肽P-2、1 mL濃度為 5×10^{-7} M的環狀胜肽CP-2 及1 mL濃度為 2×10^{-7} M的Angiotensin I (Ang I)胜肽標準品並混合在一起後通過多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody) 製備之免疫親合性管柱，來確認製備免疫多株親合性管柱具有抗體和抗原之間的特異性結合的親合力，(圖十七)為P-2、CP-2及胜肽標準品Ang I 之混合樣品質譜圖，之後混合樣品過多株免疫親合性管柱後，在(圖十八)中只發現Ang I 胜肽標準品的質譜訊號，確認Ang I不會吸附在親合性管柱內。根據(圖十九)得知通過多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱之混合液，

所流下未經吸附的收集液，再通過C₁₈固相萃取管柱達到去鹽及濃縮的目的之後，再次確認只有Ang I 胜肽標準品的質譜訊號，證實Ang I 不會吸附在親合性管柱內，也沒有偵測到線性胜肽P2及環狀胜肽CP-2的顯著訊號。根據(圖二十)得知經由沖提液(elute buffer)沖提出吸附在多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody) 製備之免疫親合性管柱的胜肽 (P2, CP2或Ang I)之收集液後，經與基質CHCA混合後所偵測到之MALDI-TOF-MS 質譜，(圖二十)中並沒有發現線性胜肽 P-2、環狀胜肽CP-2及胜肽標準品Angiotensin I的訊號。推論其原因為:沖提液為磷酸鹽之緩衝溶液，含有大量的鹽類，所以造成胜肽分析物的訊號無法產生，因此必須要進一步的去鹽以利訊號之產生。根據(圖二十一)得知在過完C₁₈固相萃取管柱去鹽濃縮後，其發現了線性胜肽P-2及環狀胜肽CP-2的訊號，但並沒有胜肽標準品Angiotensin I質譜訊號，證明多株抗體製備之親合性管柱可篩選出對抗體具有親合性之胜肽(P2及CP2)，也因此推論胜肽P2不會因其結構的修飾而失去對抗體之親合性，但經由MALDI-TOF MS質譜分析訊號時則必須先將胜肽經過去鹽之前處理，因為鹽類是影響訊號產生的主要因素之一，所以會影響分析物在MALDI-TOF MS 中的訊號，因此會降低分析物進行質譜分析時的靈敏度，所以樣品製備的前處理會影響到質譜偵測是否能得到訊號。

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肽

配製 1 mL 濃度為 5×10^{-7} M 的線性胜肽 P-2、1 mL 濃度為 5×10^{-7} M 的環狀胜肽 CP-2 及 1 mL 濃度為 2×10^{-7} M 的 Angiotensin I 胜肽標準品並混合在一起通過單株免疫親合性管柱，來確認單株親合性管柱具有抗體和抗原之間的特異性結合的親合力，(圖二十二)為 P-2、CP-2 及胜肽標準品 Ang I 之混合樣品質譜圖，之後混合樣品過單株免疫親合性管柱後，(圖二十三)為混合樣品過單株免疫親合性管柱之質譜圖，在(圖二十三)中只發現 Ang I 胜肽標準品的質譜訊號，確認 Ang I 不會吸附在親合性管柱內，確認了親合性管柱不會吸附 Ang I。由(圖二十四)得知經由沖提液(elute buffer)沖提出吸附在單株抗體(human monoclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱的胜肽 (P2, CP2 或 Ang I)之收集液後，經與基質 CHCA 混合後所偵測到之 MALDI-TOF-MS 質譜，(圖二十四)中並沒有發現線性胜肽 P-2、環狀胜肽 CP-2 及胜肽標準品 Angiotensin I 的訊號。推論其原因為:沖提液為磷酸鹽之緩衝溶液，含有大量的鹽類，所以造成胜肽分析物的訊號無法產生，因此必須要進一步的去鹽以利訊號之產生，(圖二十五)發現了線性胜肽 P-2 的訊號及環狀胜肽 CP-2 的訊號，證明單株抗體製備之親合性管柱可篩選出對抗體具有親合性之胜肽

(P2 及 CP2)，因此推論胜肽 P2 不會因其結構的修飾而失去對抗體之親合性，但經由 MALDI-TOF MS 質譜分析訊號時則必須先將胜肽經過去鹽之處理，因為鹽類是影響訊號的產生的主要因素之一，所以會影響分析物在 MALDI-TOF MS 中的訊號，因此會降低分析物進行質譜分析時的靈敏度，所以樣品製備的前處理會影響到質譜偵測是否能得到訊號。根據以上的實驗結果，說明了多株與單株抗體之製備親合性管柱都具有吸附線性胜肽 P-2 及環狀胜肽 CP-2 的能力。

6.4 研究對象之尿液樣品來源

本研究所選用的真實樣品為尿液樣品，主要是為了評估 MALDI-TOF-MS 方法在臨床和生物分析方法上的適用性。而尿液來源為 40 歲(TCVGH-001)、20 歲(TCVGH-002)婦女及骨質疏鬆症患者(TCVGH-003)的尿液，而其中骨鬆病患的臨床尿液樣品是由臺中榮民總醫院骨科部潘建州醫師之病患所提供，樣品均在四小時內保存在 -20°C 的冰箱中直至分析，實驗前將尿液樣品在室溫下回溫(30分鐘至1小時至完全溶化)後，再以離心機轉速4000 rpm (控溫設定在 4°C , 20分鐘)離心去除雜質，之後以塑膠吸管吸取尿液上清液。收集到尿液檢體之上清液可立刻進行實驗，或者保存 4°C 冰箱(但如果放置時間較長，須放置 -20°C 的冰箱)。

6.5 應用多株抗體製備之免疫親合性管柱分離出骨質疏鬆症病患尿液中與抗體具有親合性之胜肽片段

一開始先將未經過前處理之骨質疏鬆症病患尿液檢體, TVGH-003c (crude, 未經純化尿液), 與基質 CHCA 混合後, 應用 MALDI-TOF MS 偵測到之質譜圖(圖二十六), 圖中得知未經過任何前處理的尿液檢體所偵測到之質譜圖中並沒有產生任何較強的訊號, 由此結果推論未經過前處理而直接分析尿液檢體的方法是不可行的, 所以決定要針對尿液檢體之前處理做進一步之探討。為了探討經由 MALDI-TOF MS 偵測尿液檢體中與抗體具有親合性之胜肽片段的訊號可以與沖提液產生訊號做比較。首先須應用 MALDI-TOF MS 來偵測沖提液(50 mM 的磷酸鹽緩衝溶液)之質譜訊號(圖二十七)當做背景訊號。根據偵測沖提液之質譜訊號中發現較強之背景訊號(656 Da、672 Da、688 Da、704 Da)。確認其沖提液之背景訊號後, 開始將骨質疏鬆症病患(TVGH-003)所提供的 10mL 尿液檢體稀釋於 5 倍之 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液中後, 通過多株抗體製備之免疫親合性管柱, 之後用 100 mL 的 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液沖洗管柱內的膠體, 使得和親合性管柱親合力較弱的其他雜質洗出後棄置, 再用 200 mL 之沖提液(50mM 的磷酸鹽緩衝溶液)將與抗體具有親合性之胜肽片段沖出後, 每 1 mL 收集於 1.5 mL 的離心管(共收集 100 管)之後, 經由應用 ELISA

Reader 儀器以 Bradford 定量蛋白質的方法檢測每一管所得到的吸收光譜圖(圖二十八)，將有訊號的收集管(41、42、43、44、47、55、56)全部收集在一起後，經與基質 CHCA 混合後，應用 MALDI-TOF MS 得到之質譜圖(圖二十九)。由於(圖二十九)中只偵測到沖提液之磷酸鹽緩衝溶液的訊號，推論其原因為：沖提液是磷酸鹽緩衝溶液，含有大量的鹽類，所以造成沖提下來與抗體具有親合性之胜肽片段的訊號無法產生，因此決定進一步以 C₁₈ 的固相萃取管柱去鹽後，以利胜肽片段訊號之產生。

為了胜肽片段收集液過 C₁₈ 固相萃取管柱去鹽後，經由 MALDI-TOF MS 偵測到的訊號可以與沖提液(50 mM 的磷酸鹽緩衝溶液)之背景訊號有所比較，首先須讓沖提液過 C₁₈ 固相萃取管柱並收集其沖提下來的收集液，應用 MALDI-TOF MS 得到去鹽後沖提液之質譜圖(圖三十)當做背景訊號，根據偵測去鹽後之沖提液的質譜訊號中發現沖提液之強訊號(圖三十)都減弱或消失，之後將具有親合性之胜肽片段收集液經由 C₁₈ 固相萃取管柱處理過後之收集液，應用 MALDI-TOF MS 得到之質譜圖(圖三十一)，其發現較多的訊號，而其原本為沖提液之強訊號(圖二十七)都減弱或消失。且在(圖三十一)中並沒有發現 P2 的訊號(1462 Da)，不過其中訊號 606 Da、630 Da、650 Da 推測為 P2 胜肽的片段訊號(圖三十二)(表十二)，由此無法推論尿

液檢體通過多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱後，是否分離出完整的 P2 胜肽。由於得到的訊號中並未發現 P2 的分子量，所以在這幾個訊號中，選擇其中較明顯之訊號 (分子量 650 Da)，其訊號經過多次推算出其胜肽片段為 PRGPPGA 所組成之胺基酸序列，我們選擇此片段當作鑑定骨鬆的生化指標。

根據推論其胜肽片段之序列後，合成純化並鑑定其分子量後製備成胜肽標準品。

表十二、線性胜肽 P2 的胜肽片段之分子量及推論出之胺基酸序列

質譜中顯示的分子量 ¹ [M+H] ⁺	質譜軟體推算出胺基酸之序列 ² (MW)
606Da	GPMGLM (605 Da)
630Da	LMGPRG (630 Da)
650Da	PRGPPGA (649 Da)
682Da	RGPPGAAG (681 Da)

¹經由 MALDI-TOF MS 偵測到樣品之訊號

²質譜軟體(Bruker Daltonics BioTools 3.1)推算符合偵測樣品訊號分子量之胺基酸之序列

6.6 P2-7mer 胜肽標準品之合成、純化與鑑定分子量

應用固相胜肽合成技術中 Fmoc Chemistry^[44]合成法來合成 P2-7mer 胜肽片段後，應用質譜儀(MALDI-TOF MS)進行胜肽粗產混合物之分子量的鑑定，確認其中標的胜肽分子量(650 Da)後，以高效能液相層析儀(HPLC)進行胜肽混合物之分析與純化，最後再使用質譜儀進行純化胜肽後之分子量鑑定。

合成胜肽粗產混合物完畢後，應用質譜儀(MALDI-TOF MS)進行胜肽粗產混合物之鑑定，從(圖三十三)中有質譜偵測到P2-7mer之分子量訊號(650 Da)，由此可知，P2-7mer胜肽被成功地合成出來。

因此，進一步以HPLC分離與純化出P2-7mer胜肽標準品，根據P2-7mer粗產混合物之HPLC 圖譜(圖三十四)，分析 HPLC 圖譜中發現胜肽混合物之主產物之滯留時間(retention time)在 6.87 分鐘之吸收峰，所以我們必須藉由收集單一吸收峰來收集純化 P2-7mer 胜肽標準品溶液，之後經由HPLC 收集滯留時間(retention time)在 6.87 分鐘之吸收峰的胜肽溶液經過冷凍乾燥處理後，再次利用MALDI-TOF Mass 鑑定其胜肽分子量。(圖三十五)為純化後P2-7mer胜肽標準樣品之HPLC 圖，圖中只有滯留時間 6.69 分鐘之單一吸收峰圖；(圖三十六)為純化後P2-7mer胜肽標準品之質圖譜。

6.7 探討應用MALDI-TOF MS製作檢量線之再現性

胜肽標準品之檢量線的製作是以MALDI-TOF MS偵測出之訊號強度對P2-7mer胜肽標準品之濃度作圖求得，而檢量線濃度範圍設定在 $1.0 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 6.125 \times 10^{-7} \text{ M}$ 之間，此外，在檢量線的製作上其再現性的探討是必要的，因MALDI-TOF MS的訊號強度取決於雷射強度與基質的結晶狀態及標準品之濃度配製，如果在檢量線製作的過程中發現再現性不佳，則會導致實驗中定量上的困難性，因此本實驗首先針對再現性的問題進行探討。

期刊文獻報導^[37] MALDI-TOF MS定量上最主要的問題，在於其分析物與基質的非均質性導致其共結晶不佳，如此會造成即使在完全相同的環境下製備同濃度的樣品，在樣品盤上同一點中的相鄰區域 (intra-sample) 和同環境下點與點之間 (inter-sample) 所偵測出的質譜圖，其訊號強度皆會有所差異，進行定量分析時遭受到許多先天的限制：基質與分析物混合在揮發性的有機溶劑，當溶劑揮發後形成共結晶 (cocrystal) 時往往由於結晶程度不一而導致訊號品質的不穩定；少數訊號品質良好的結晶稱為「甜點」(sweet spot) 或「熱點」(hot spot) 意謂雷射打在該處能激發出好的分析物訊號，其餘的結晶不是訊號太弱就是分析物被大量的基質訊號抑制，然而若在樣品製備的過程中經過縝密的設計，例如利用樣品製備的方法著重在「種子層」(seed-layer)^[45] 來增加樣品的均勻程度則可改善並提高訊號再現性，seed-layer

method 的製備方法，主要就是在樣品盤上塗上一層seed-layer 溶液，再將我們的樣品跟基質混合均勻點上樣品盤上。因此，本實驗應用seed-layer method 來探討檢量線之再現性。根據此目的，首先探討其有經seed-layer method 處理過後胜肽標準品與基質CHCA均勻混合之共結晶圖(圖三十七-B)與沒有經過seed-layer method處理過胜肽標準品與基質CHCA均勻混合之共結晶圖(圖三十七-A)，來觀察在不銹鋼樣品盤上的共結晶狀態之間的差別，經由MALDI-TOF MS 的顯微鏡下觀察下，可發現未經過seed-layer method處理過的CHCA所形成的共結晶有其不均勻性(圖三十七-A)，反觀其經過seed-layer method處理過後(圖三十七-B)，其均勻性明顯較佳，為了比較seed-layer method處理過後與尚未處理之一般基質在 P2-7mer胜肽標準品定量的表現，其定量的檢量線濃度範圍設定在 1.0×10^{-5} M至 6.125×10^{-7} M之間，其濃度分別為10 μ M、5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M及0.6125 Mm。根據製作檢量線之結果，其未經seed-layer method處理過的CHCA之訊號強度與濃度作圖(圖三十八)， $R^2 = 0.9814$ ，斜率 = 757.73，而經由 seed-layer method 後訊號強度與濃度作圖(圖三十九)， $R^2 = 0.9989$ ，斜率 = 871.45，根據製作出檢量線的結果發現未經seed-layer method處理的訊號的相對誤差(SD)值明顯較大，其主要的原由雷射打到訊號品質良好的結晶跟沒有結晶很好的點，但經由seed-layer method處理後，雖然 R^2 值只大於一般沒處理基質的 R^2 值一些，但相對誤差(SD)值卻減小很

多，證明了訊號的再現性相當好，這樣進行樣品的定量分析時才具有準確性。

6.8 應用7-mer胜肽標準品製作檢量線來定量尿液樣品中7-mer的濃度

6.8.1 胜肽標準品(P2-7 mer) 檢量線之製作

檢量線之製作，主要是使用以MALDI-TOF MS 偵測之訊號強度對胜肽標準品序列稀釋後之濃度作圖求得，並應用seed-layer method來增加訊號再現性，重新製作新的檢量線，由於不同的胜肽標準品濃度下其訊號的偵測強度也會不同。定量使用的胜肽標準品為P2-7mer (P2-7mer；分子量650 Da)，以去離子水含0.1% TFA配成1 mM，再依序稀釋為10 μ M、5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M及0.6125 μ M。分別取不同濃度的標準品溶液1.0 μ L與1.0 μ L CHCA基質溶液均勻混合，之後先在樣品盤先做seed-layer method 處理，再從每個濃度的混合液中各取1.0 μ L點在不銹鋼製的樣品盤 (polished stainless steel target) 上，待其自然乾燥後進入質譜分析，每一個濃度的well，任意找七個點打，並算出其平均訊號強度及標準偏差(SD)作圖(圖四十二)。

6.8.2 研究對象之尿液樣品的前處理

將兩位婦女(TVGH-001, TVGH-002)及一位骨質疏鬆症病患(TVGH-003)所提供的 10mL 尿液檢體分別稀釋 5 倍於 10 mM 磷酸鹽

緩衝溶液中後通過多株抗體製備之免疫親合性管柱，之後用 100 mL 的 10 mM 磷酸鹽緩衝溶液沖洗管柱內的膠體，使得和親合性管柱親合力較弱的非專一性雜質洗出，再用 200mL 之沖提液(50 mM 的磷酸鹽緩衝溶液)將與抗體具有親合性之胜肽片段沖出後，每 1 mL 收集於 1.5 mL 的離心管。兩位婦女(TVGH-001, TVGH-002)及一位骨質疏鬆病患(TVGH-003)依序分離並收集於離心管中(各 100 管)，之後應用 Bradford 的方法檢測每一管所得到的吸收光譜圖(圖四十)，將有訊號的收集管中之尿液全部倒入 C₁₈ 的固相萃尿管柱以便去除鹽類並濃縮樣品，之後冷凍乾燥成粉末狀，當冷凍乾燥成粉末狀後回溶至 1 mL 的去離水，並應用 MALDI-TOF-MS 鑑定其出現質譜訊號(圖四十一)。

6.8.3 偵測前處理後尿液檢體之訊號強度

根據以上前處理後尿液檢體出現的質譜訊號強度，推測其訊號強度約在 1.0×10^{-6} M 至 6.0×10^{-6} M 之間，所以本實驗檢量線濃度範圍設定在 1.0×10^{-5} M 至 6.125×10^{-7} M 之間，其濃度分別為 10 μ M、5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M 及 0.6125 μ M，之後將前處理後尿液檢體取 1 μ L 混合液與 1 μ L 基質 CHCA 均勻混合，最後取 1 μ L 混合液置於樣品盤，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 任意找七個點打，雷射次數為 50 個 shot，將平均訊號強度代入檢量線換算濃度(表十二)並與臺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(dual-energy X-ray absorptiometry, DXA)之數據(表十三)相互比較。根據經由 MALDI-TOF MS 質譜偵測尿液檢體之訊號強度結果，並不是骨質疏鬆症患者最高，而是 45 歲未罹患骨質疏鬆症的婦女最高(表十二)，與骨科部潘建州醫師所提供病患之(DXA)之數據資料沒有一致性，推測可能的原因為多株抗體製備之親和性管柱吸附尿液中能對抗體具有親合性之胜肽片段後，經由 MALDI-TOF MS 偵測訊號時，並不只是單一訊號，但我們只選單一較明顯的訊號當作鑑定骨鬆的生化指標，但未來若以單株抗體製備之親和性管柱來分離尿液中能對抗體具有親合性之胜肽片段後，再經由 MALDI-TOF MS 偵測訊號時，訊號可能會是單一訊號，之後當作鑑定骨鬆的生化指標，以期能進一步應用在臨床上應用在診斷具有骨質疏鬆症的病人。

6.8.4 骨鬆病患檢體在 MALDI-TOF MS 之檢測訊號強度

主要是為了評估此方法在臨床和生物分析方法上的適用性並。其偵測尿液檢體來源為臺中榮民總醫院潘建州醫師所提供兩位具有骨質疏鬆症之臨床尿液樣品，並同時製備兩支多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之親和性管柱，來減少誤差的可能性，實驗流程與檢測訊號強度其實驗步驟同上，並三重覆算出其平均訊號強度、標準偏差(SD)，根據三重覆所得到的數據(表十四)。

表十二、病患之尿液經處理後由質譜儀偵測到其尿液中 P2-7mer 之濃度

受試者編號	P2-7mer濃度 ⁴ (ng/mL)
TCVGH-001 ¹	282.3±34.1
TCVGH-002 ²	144±11.6
TCVGH-003 ³	173±9.9

¹TCVGH-001, 台中榮民總醫院潘建州醫生所提供之四十七歲婦女之尿液檢體-研究對象之編號:001

²TCVGH-002, 台中榮民總醫院潘建州醫生所提供之二十歲婦女之尿液檢體-研究對象之編號:002

³TCVGH-003, 台中榮民總醫院潘建州醫生所提供之罹患骨質疏鬆症之婦女尿液檢體-研究對象之編號:003

⁴P2-7mer 之濃度表示為 Mean±SD

表十三、病患經由雙能量X光吸收儀(DXA)檢測之數據

受試者編號	T-score
TCVGH-001	-0.1
TCVGH-002	-0.3
TCVGH-003	-3.5

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

受試者編號	P2-7mer 濃度 ³ (ng/mL)
TCVGH-004 ¹	237.83±5.1
TCVGH-005 ²	338.51±51.1

¹TCVGH-004, 台中榮民總醫院潘建州醫生所提供之骨質疏鬆症病患之尿液檢體-研究對象之編號:004

²TCVGH-005, 台中榮民總醫院潘建州醫生所提供之骨質疏鬆症病患之尿液檢體-研究對象之編號:005

³P2-7mer 之濃度表示為 Mean±SD

結論

本篇論文之研究結果証實我們成功地製備兔子多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)之免疫親合性管柱。經由質譜儀偵測到之結果證明：尿液檢體通過多株抗體製備之親合性管柱及C₁₈固相萃尿管柱後，可篩選出尿液中對抗體具有親合性之胜肽片段。由於得到的訊號中並未發現P2之分子量，所以在這幾個訊號中，選擇其中較明顯的訊號(即分子量650 Da)，並應用質譜軟體推論出其胺基酸序列為PRGPPGA之P2-7mer胜肽。進行P2-7mer胜肽之合成、純化、並鑑定其分子量後，製備成胜肽標準品，以製作檢量線，並定量病患個體尿液中P2-7mer之濃度。

MALDI-TOF MS 之技術具有快速和大量分析的特點，加上樣品盤經由 seed-layer method 處理後，改善了再現性不佳的問題，但應用MALDI-TOF MS 定量病患尿液檢體中 P2-7mer 之濃度結果，與 DXA 檢測之數據並不具有一致性，說明了本實驗所發現之生化指標(P2-7mer)，並不足以代表尿液中所有骨質流失之情形，但是實驗所建立之方法與流程有助於未來篩選骨質流失之生化指標，以期研究檢測骨質流失之方法，將對骨質疏鬆症的診斷，預防及治療會有所助益。

參考文獻

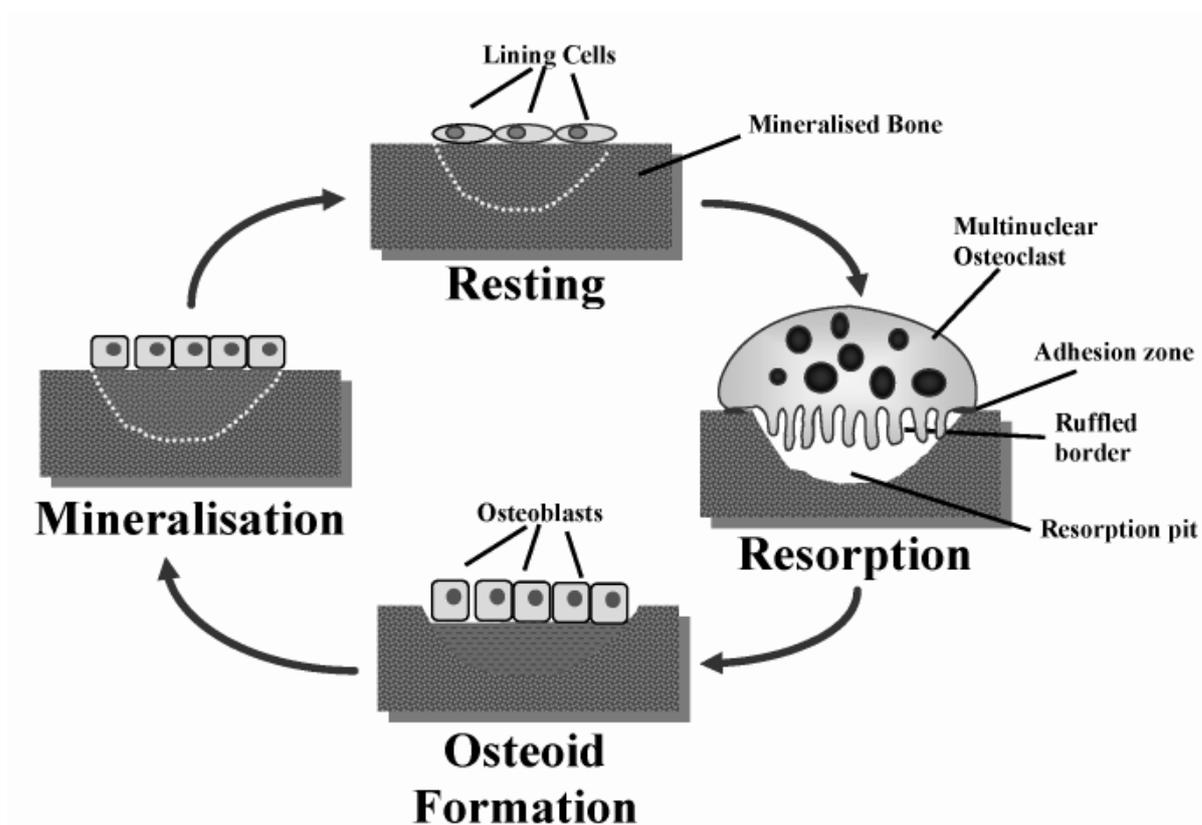
1. Mosekilde, L., Sex differences in age-related loss of vertebral trabecular bone mass and structure--biomechanical consequences. *Bone* **1989**, 10, (6), 425-32.
2. Seibel, M. J., Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* **2005**, 26, (4), 97-122.
3. 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.
4. Scariano, J. K.; Vanderjagt, D. J.; Thacher, T.; Isichei, C. O.; Hollis, B. W.; Glew, R. H., Calcium supplements increase the serum levels of crosslinked N-telopeptides of bone collagen and parathyroid hormone in rachitic Nigerian children. *Clin Biochem* **1998**, 31, (5), 421-7.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Marvin, L. F.; Roberts, M. A.; Fay, L. B., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta* **2003**, 337, (1-2), 11-21.
9. Lowry, M.; Hall, D. E.; Brosnan, J. T., Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism* **1985**, 34, (10), 955-61.
10. Black, D.; Duncan, A.; Robins, S. P., Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **1988**, 169, (1), 197-203.
11. Pratt, D. A.; Daniloff, Y.; Duncan, A.; Robins, S. P., Automated analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in tissue and urine using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **1992**, 207, (1), 168-75.

12. James, I. T.; Perrett, D., Automated on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic analysis of total and free pyridinium crosslinks in serum. *J Chromatogr A* **1998**, 798, (1-2), 159-66.
13. Seyedin, S. M.; Kung, V. T.; Daniloff, Y. N.; Hesley, R. P.; Gomez, B.; Nielsen, L. A.; Rosen, H. N.; Zuk, R. F., Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* **1993**, 8, (5), 635-41.
14. Delmas, P. D.; Gineyts, E.; Bertholin, A.; Garnero, P.; Marchand, F., Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. *J Bone Miner Res* **1993**, 8, (5), 643-8.
15. Robins, S. P.; Woitge, H.; Hesley, R.; Ju, J.; Seyedin, S.; Seibel, M. J., Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res* **1994**, 9, (10), 1643-9.
16. Bonde, M.; Qvist, P.; Fledelius, C.; Riis, B. J.; Christiansen, C., Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* **1994**, 40, (11 Pt 1), 2022-5.
17. Fledelius, C.; Johnsen, A. H.; Cloos, P. A.; Bonde, M.; Qvist, P., Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem* **1997**, 272, (15), 9755-63.
18. Garnero, P.; Fledelius, C.; Gineyts, E.; Serre, C. M.; Vignot, E.; Delmas, P. D., Decreased beta-isomerization of the C-terminal telopeptide of type I collagen alpha 1 chain in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* **1997**, 12, (9), 1407-15.
19. Bonde, M.; Garnero, P.; Fledelius, C.; Qvist, P.; Delmas, P. D.; Christiansen, C., Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomerized form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen. *J Bone Miner Res* **1997**, 12, (7), 1028-34.
20. 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.
21. Woitge, H. W.; Pecherstorfer, M.; Li, Y.; Keck, A. V.; Horn, E.; Ziegler, R.; Seibel, M. J., Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res* **1999**, 14, (5), 792-801.
22. Robins, S. P., Collagen crosslinks in metabolic bone disease. *Acta Orthop Scand Suppl* **1995**, 266, 171-5.
23. 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.

24. Gorman, L.; Statland, B. E., Clinical usefulness of alkaline phosphatase isoenzyme determinations. *Clin Biochem* **1977**, 10, (5), 171-4.
25. 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.
26. Bouillon, R.; Vanderschueren, D.; Van Herck, E.; Nielsen, H. K.; Bex, M.; Heyns, W.; Van Baelen, H., Homologous radioimmunoassay of human osteocalcin. *Clin Chem* **1992**, 38, (10), 2055-60.
27. Taylor, A. K.; Linkhart, S.; Mohan, S.; Christenson, R. A.; Singer, F. R.; Baylink, D. J., Multiple osteocalcin fragments in human urine and serum as detected by a midmolecule osteocalcin radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* **1990**, 70, (2), 467-72.
28. Taylor, A. K.; Linkhart, S. G.; Mohan, S.; Baylink, D. J., Development of a new radioimmunoassay for human osteocalcin: evidence for a midmolecule epitope. *Metabolism* **1988**, 37, (9), 872-7.
29. 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.
30. Cloos PAC, F. C., Two New Bone Resorption Assays Measuring Racemized Protein Fragments: Measurement of Age-modified Peptides to Assess Bone Quality. *Bone* **1998**, 23, (Suppl), T 114.
31. Risteli, J.; Melkko, J.; Niemi, S.; Risteli, L., Use of a marker of collagen formation in osteoporosis studies. *Calcif Tissue Int* **1991**, 49 Suppl, S24-5.
32. Parviainen, M.; Kuronen, I.; Kokko, H.; Lakaniemi, M.; Savolainen, K.; Mononen, I., Two-site enzyme immunoassay for measuring intact human osteocalcin in serum. *J Bone Miner Res* **1994**, 9, (3), 347-54.
33. Melkko, J.; Niemi, S.; Risteli, L.; Risteli, J., Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* **1990**, 36, (7), 1328-32.
34. 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.
35. Schriemer, D. C.; Li, L., Combining avidin-biotin chemistry with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **1996**, 68, (19), 3382-7.
36. Hill, J. A.; Annan, R. S.; Biemann, K., Matrix-assisted laser desorption ionization with a magnetic mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1991**, 5, (9), 395-9.

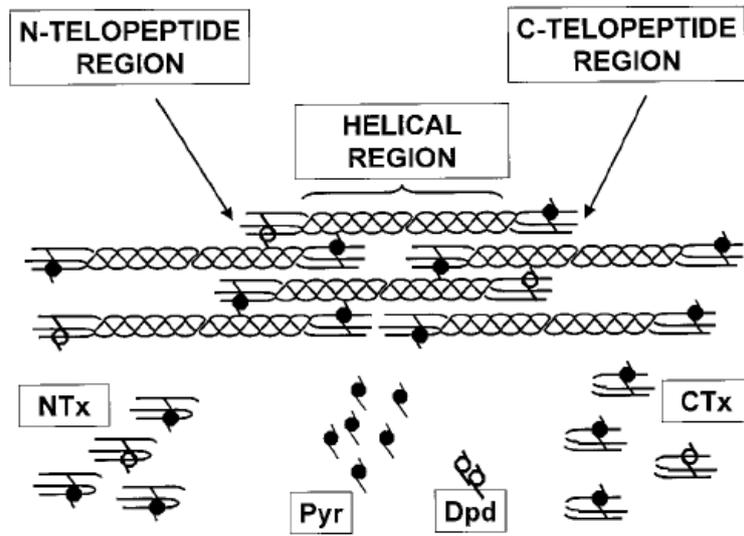
37. Knochenmuss, R., Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, 131, (9), 966-86.
38. Srivastava, A. K.; MacFarlane, G.; Srivastava, V. P.; Mohan, S.; Baylink, D. J., A new monoclonal antibody ELISA for detection and characterization of C-telopeptide fragments of type I collagen in urine. *Calcif Tissue Int* **2001**, 69, (6), 327-36.
39. Zor, T.; Selinger, Z., Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **1996**, 236, (2), 302-8.
40. Zuo, S. S.; Lundahl, P., A micro-Bradford membrane protein assay. *Anal Biochem* **2000**, 284, (1), 162-4.
41. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-54.
42. Pieleles, U.; Zurcher, W.; Schar, M.; Moser, H. E., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **1993**, 21, (14), 3191-6.
43. 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.
44. 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.
45. Onnerfjord, P.; Ekstrom, S.; Bergquist, J.; Nilsson, J.; Laurell, T.; Marko-Varga, G., Homogeneous sample preparation for automated high throughput analysis with matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, 13, (5), 315-22.
46. Merrifield, R.B., Solid Phase Peptide Synthesis I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, Vol. 85, 2149-2154.
47. Carda-Broch, S.; Berthod, A.; Armstrong, D. W., Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, 17, (6), 553-60.
48. 楊榮森, 骨質疏鬆症 (ISBN 0-7817-0275-5), 1997 ; p265-268

附錄



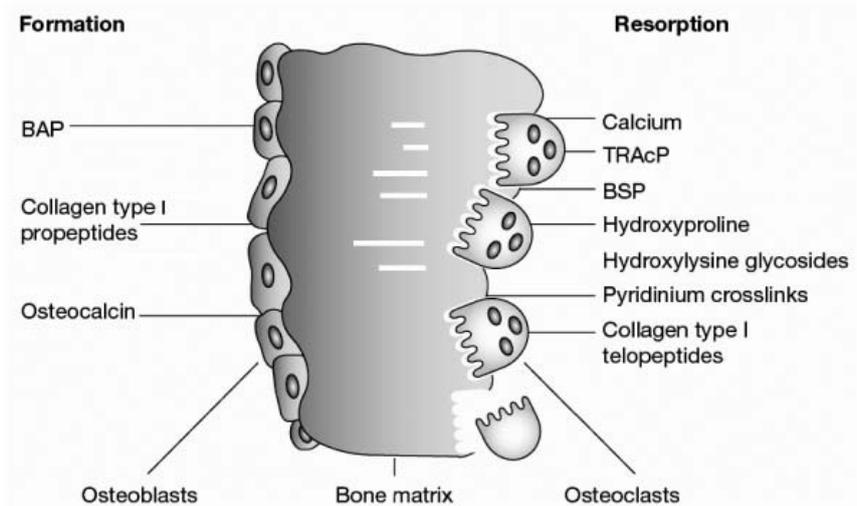
圖一、骨頭重新塑造之循環圖

出處: Seibel, M. J., Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* **2005**, 26, (4), 97-122.



圖二、骨骼中的第一型膠原蛋白被降解後所產生的代謝物

出處: Ridder, C. M.; Delemarre-van de Waal, H. A., Clinical utility of markers of bone turnover in children and adolescents. *Curr Opin Pediatr* **1998**, 10, (4), 441-8.

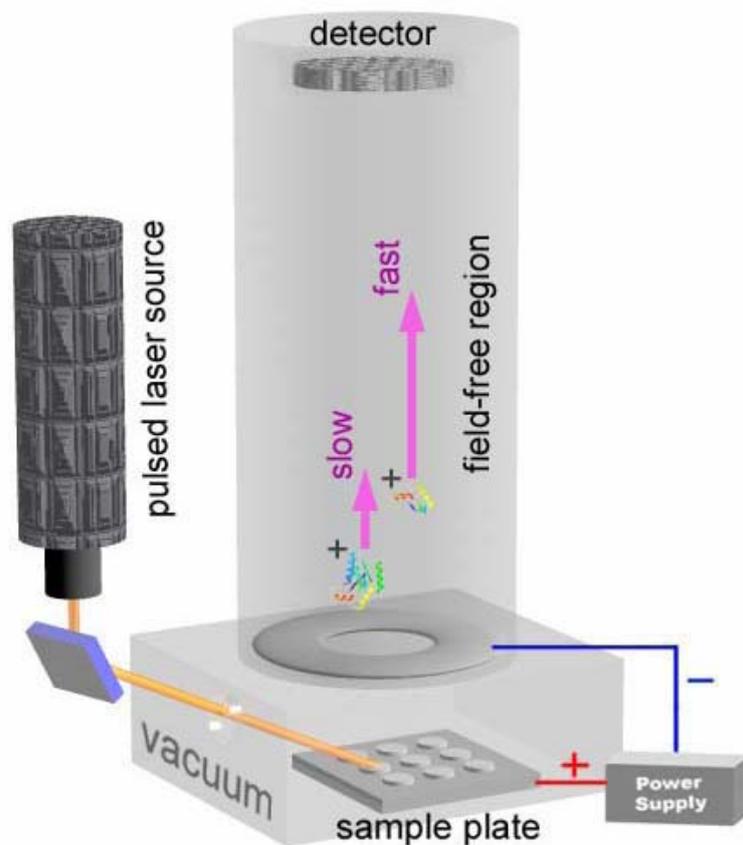


圖三、骨骼代謝的生化指標

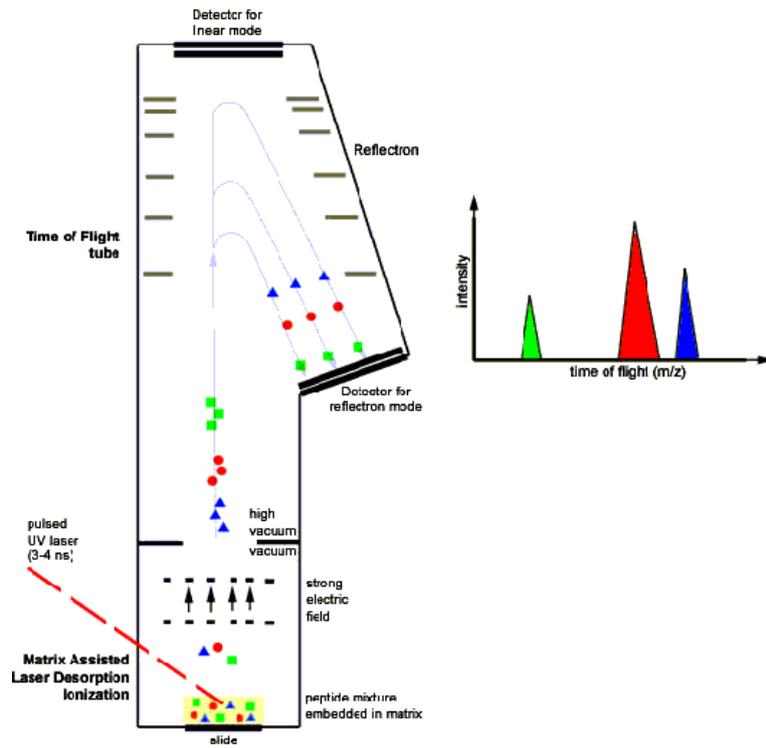
出處: Seibel, M. J., Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* **2005**, 26, (4), 97-122.

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-T
hr-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-G
ly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-His-Asn-Gly-Leu-COOH

圖四、N-telopeptide (NTx)的胺基酸序列。



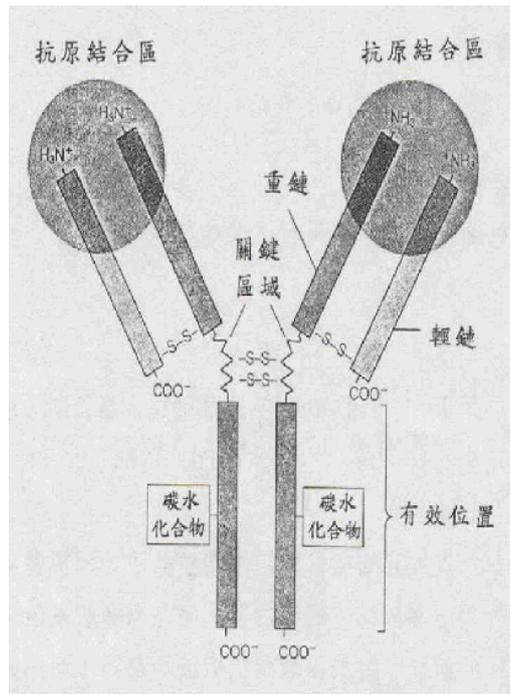
圖五、MALDI-TOF MS 之簡圖(I)



圖六、MALDI-TOF MS 之簡圖(II)



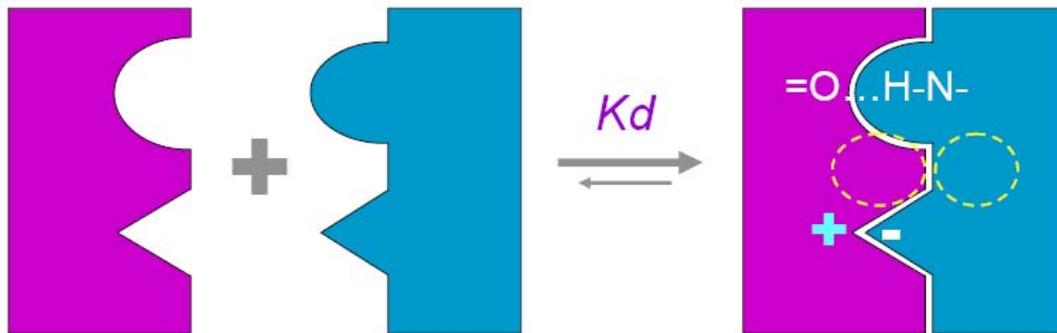
圖七、MALDI-TOF MS 之儀器照片圖



圖八、抗體的結構

出處: <http://203.68.20.65/science/content/1992/00030267/images/180.jpg>

I. Conformational Match: II. Interaction Forces:

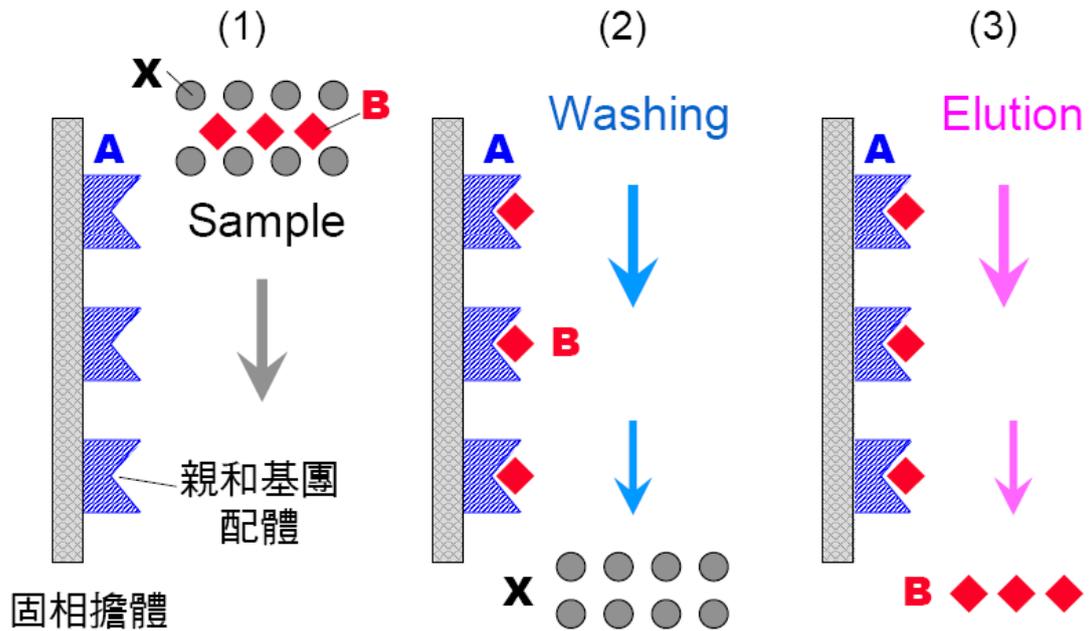


I. 構型互補(Conformational Match)：兩分子間因構形互補所造成的吸引力是由凡得瓦爾力所貢獻。

II 二級鍵(Interaction Forces): 抗體和抗原之間的親合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)。

圖九、 抗體和抗原之間的結合方式

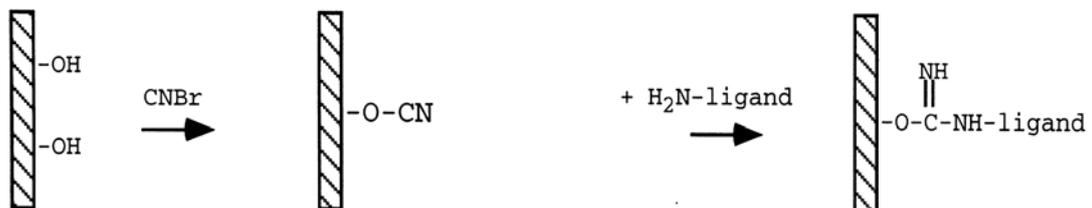
出處: <http://juang.bst.ntu.edu.tw/Protein/Purification/P4.htm#專一性>



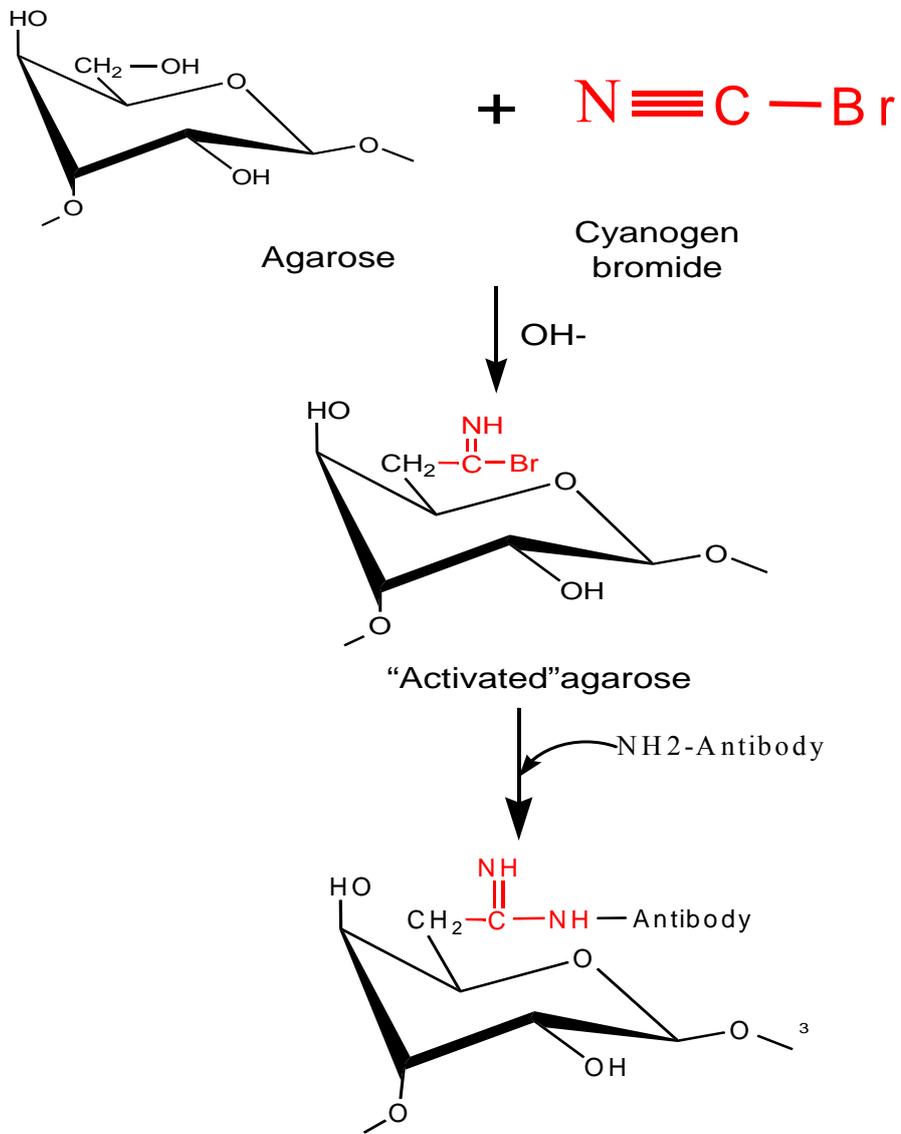
圖十、親合層析法的作用機理

蛋白質樣品通過親合性管柱之吸附；清洗；沖提之簡易流程圖

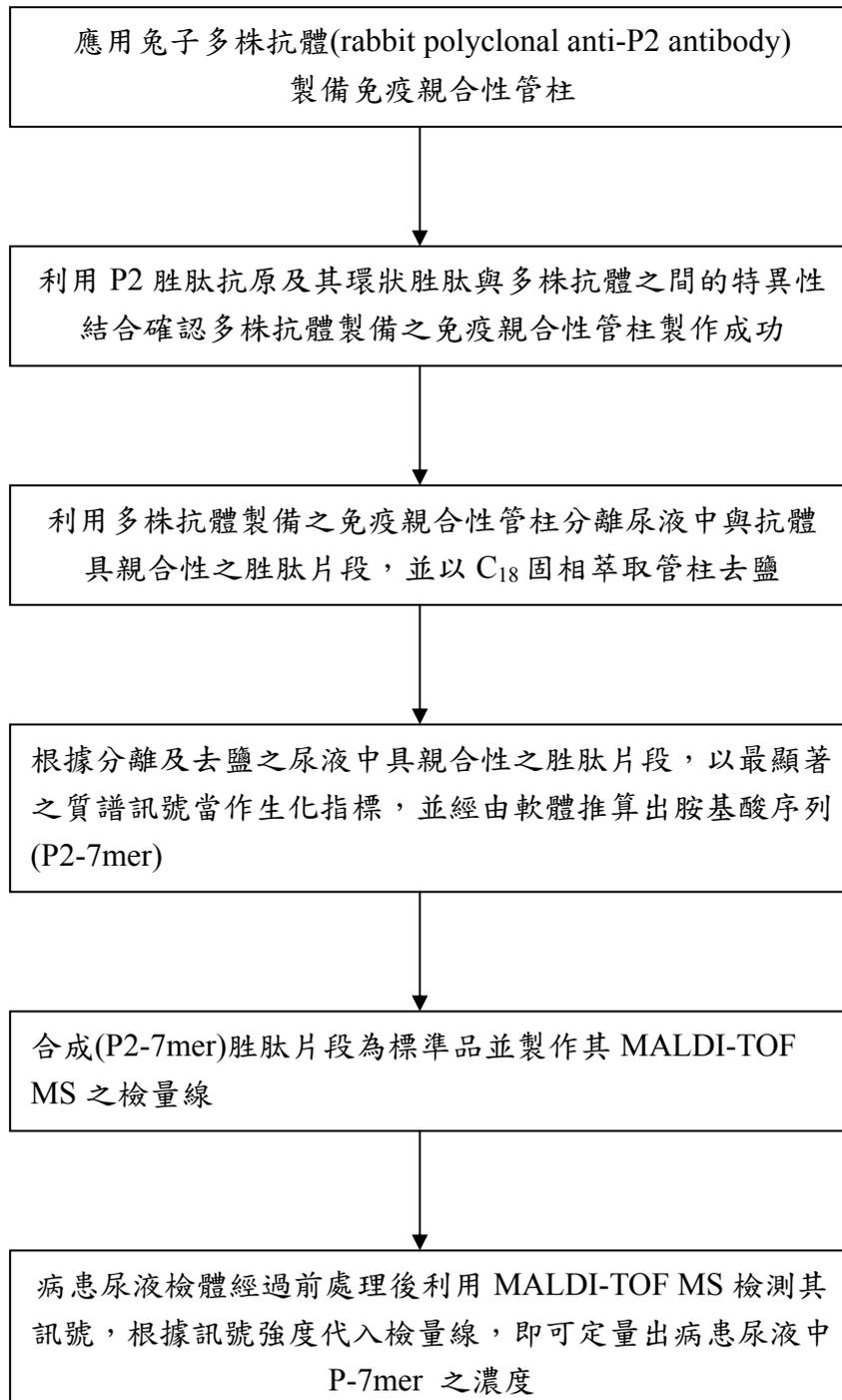
出處：<http://juang.bst.ntu.edu.tw/Protein/Purification/P4.htm#專一性>



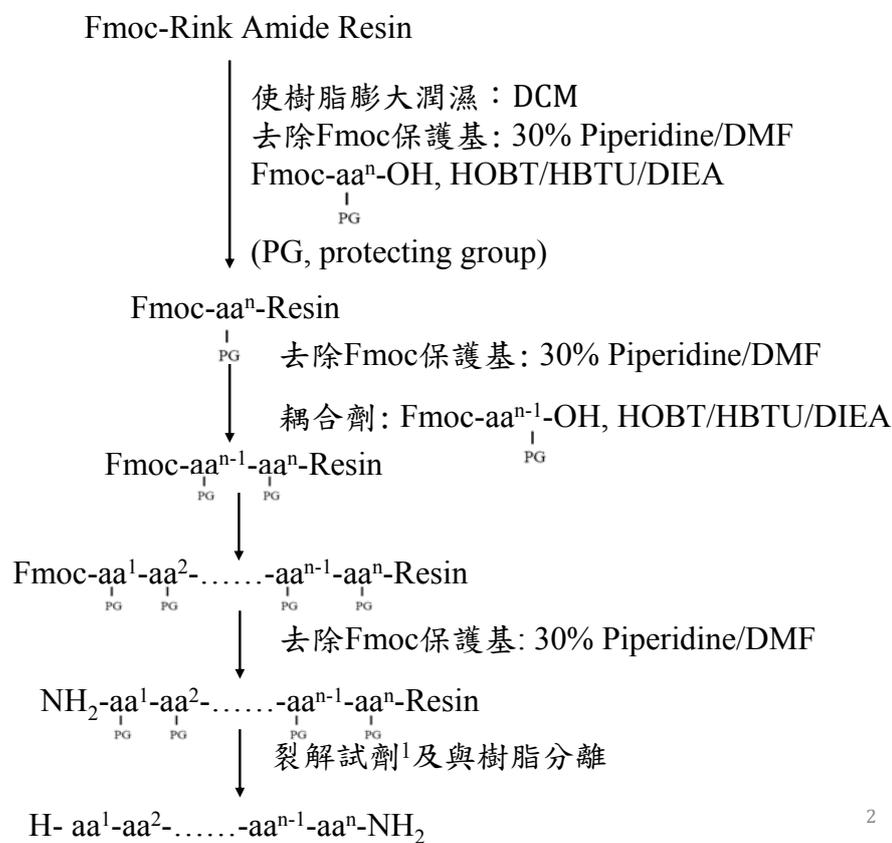
圖十一、抗體經由共價性修飾至固相基質上之簡圖



圖十二、抗體經由共價性修飾至固相基質之反應機制圖



圖十三、實驗設計方法與流程圖



2

¹ 裂解試劑:(A) 95%TFA/H₂O

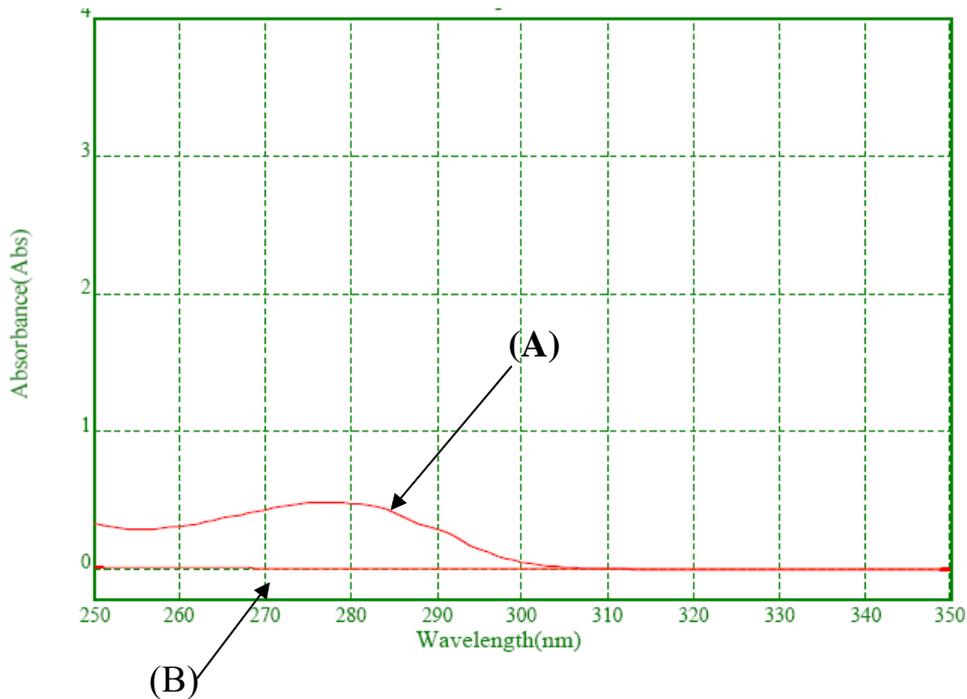
(B) 95%TFA/2.5%H₂O/2.5%EDT

(C) 82.5% TFA/ 5% thioanisole/5% phenol/5% water/2.5% EDT

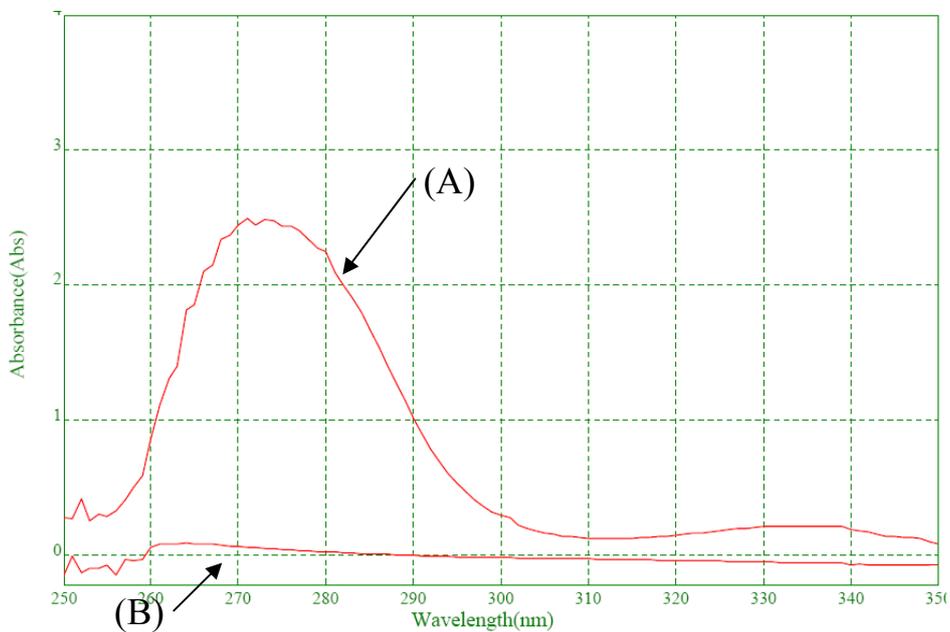
(製 A、B、C 三種選擇，作用是裂解試劑及與樹脂分離)



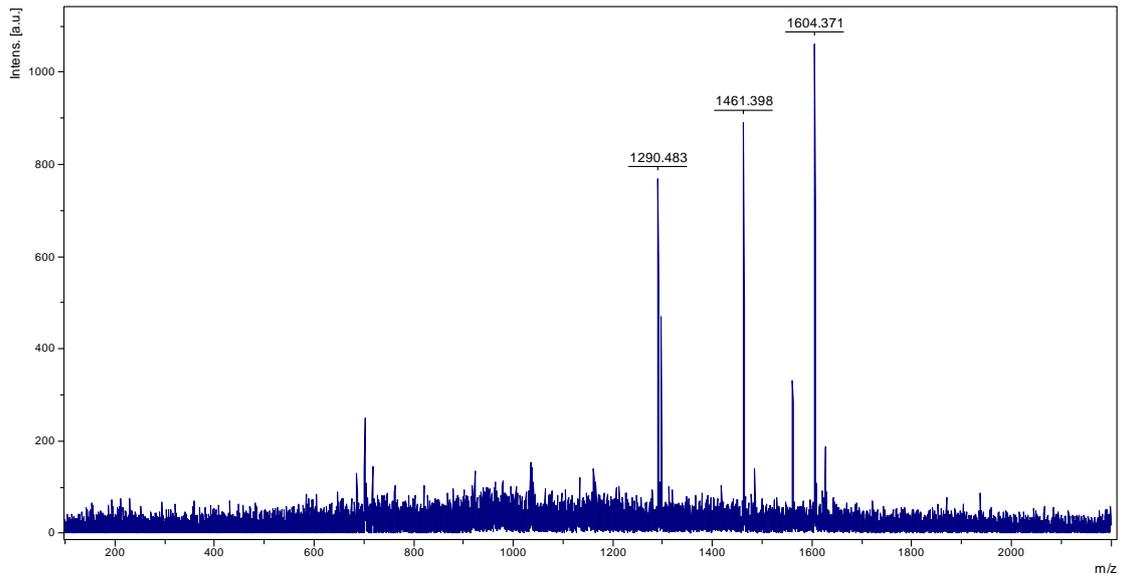
圖十四、固相胜肽合成之實驗流程圖



圖十五、多株抗體與基質結合之吸收光譜圖
 圖中(A)為多株抗體尚未與CNBr-activated Sepharose 4B 基質結合在一起的UV吸收強度光譜，圖中(B)為多株抗體與CNBr-activated Sepharose 4B 基質結合後，剩下尚未與基質結合的吸收強度光譜。

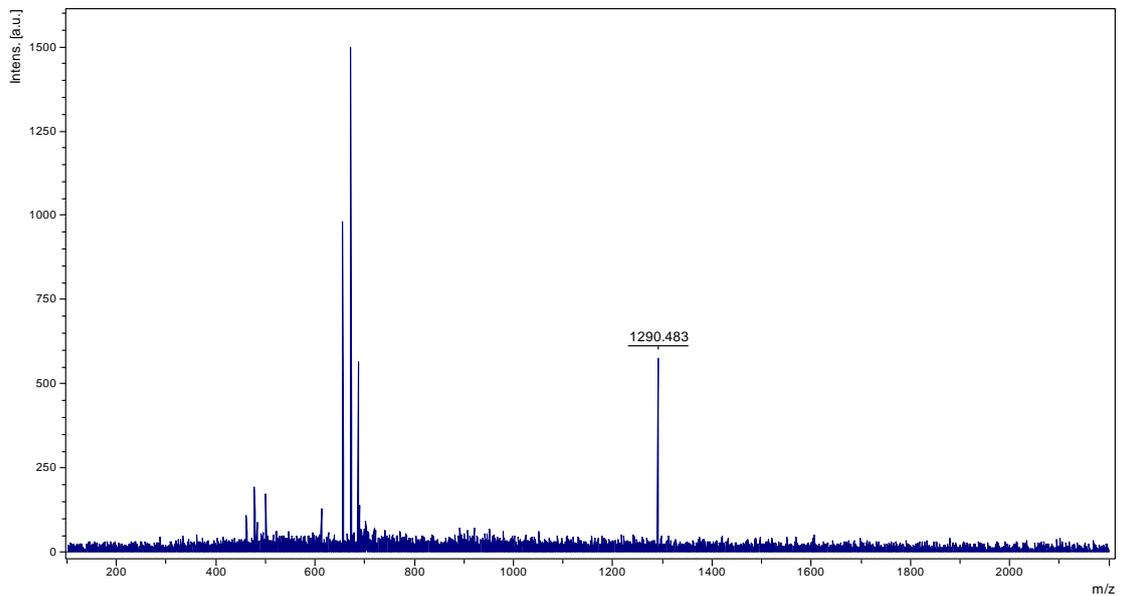


圖十六、單株抗體與基質結合之吸收光譜圖
 圖中(A)為單株抗體尚未與CNBr-activated Sepharose 4B 基質結合在一起的UV吸收強度光譜，圖中(B)為單株抗體與CNBr-activated Sepharose 4B 基質結合後，剩下尚未與基質結合的吸收強度光譜。



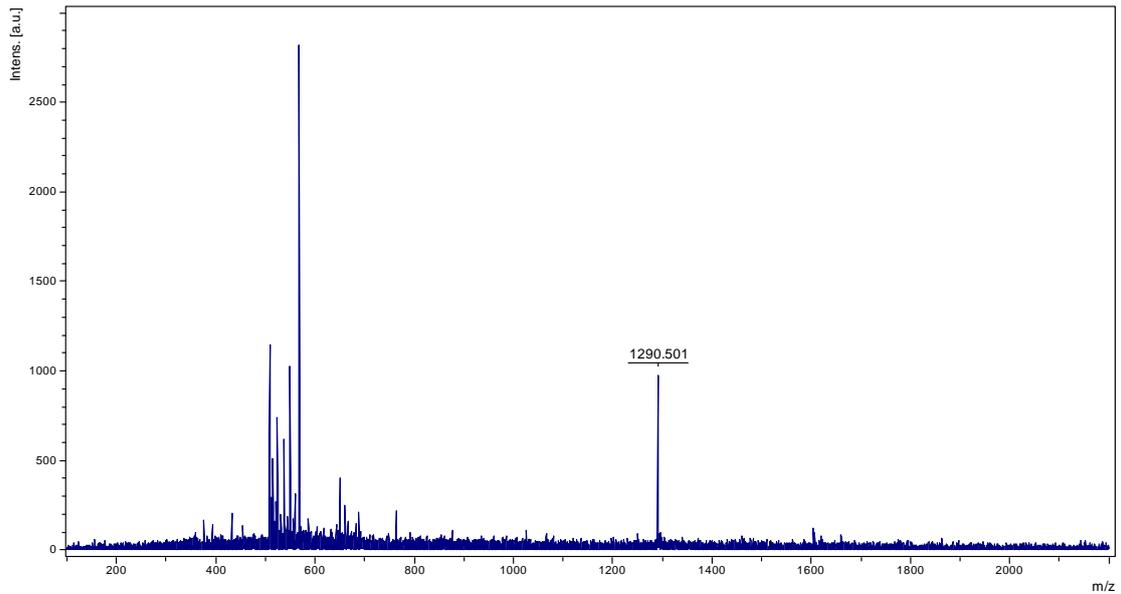
圖十七、P2、CP-2及胜肽標準品Ang I之混合液之MALDI-TOF MS 質譜圖。

P2、CP-2及胜肽標準品Angiotensin I (Ang I) 之混合液與基質CHCA混合後，偵測到之MALDI-TOF MS質譜圖： $[P2+H]^+=1461$ Da； $[CP2+H]^+=1604$ Da； $[Ang I+H]^+=1290$ Da.



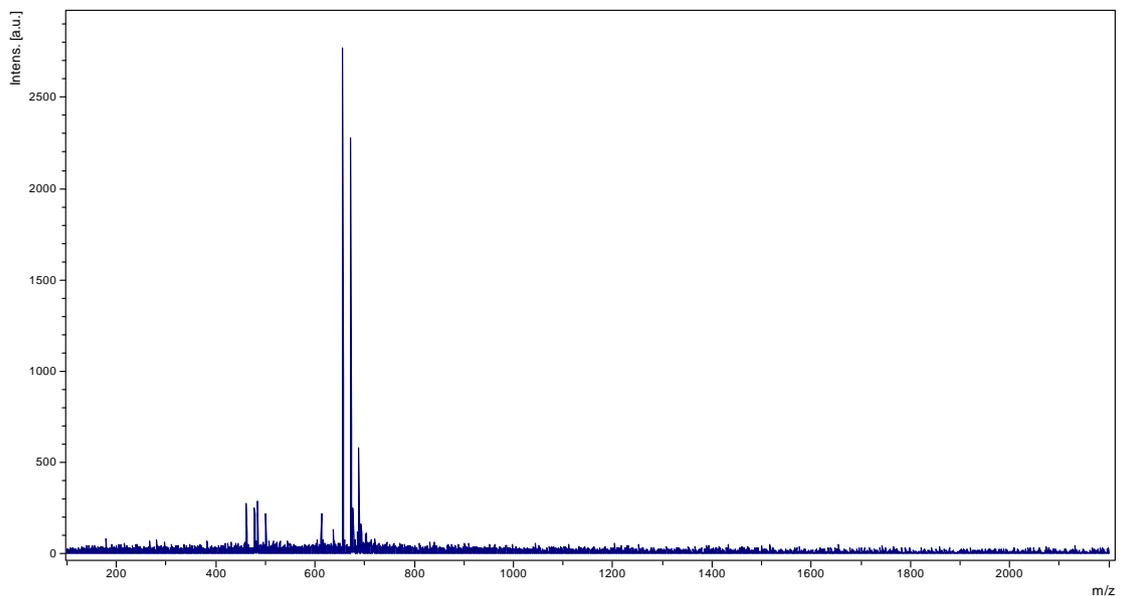
圖十八、混合液通過過多株免疫親合性管柱後之MALDI-TOF MS 質譜圖。

P2、CP-2及胜肽標準品Angiotensin I之混合液通過多株抗體製備之免疫親合性管柱後，流下來未經吸附的收集液與基質CHCA混合後，偵測到之MALDI-TOF MS質譜圖： $[Ang I+H]^+=1290$ Da.

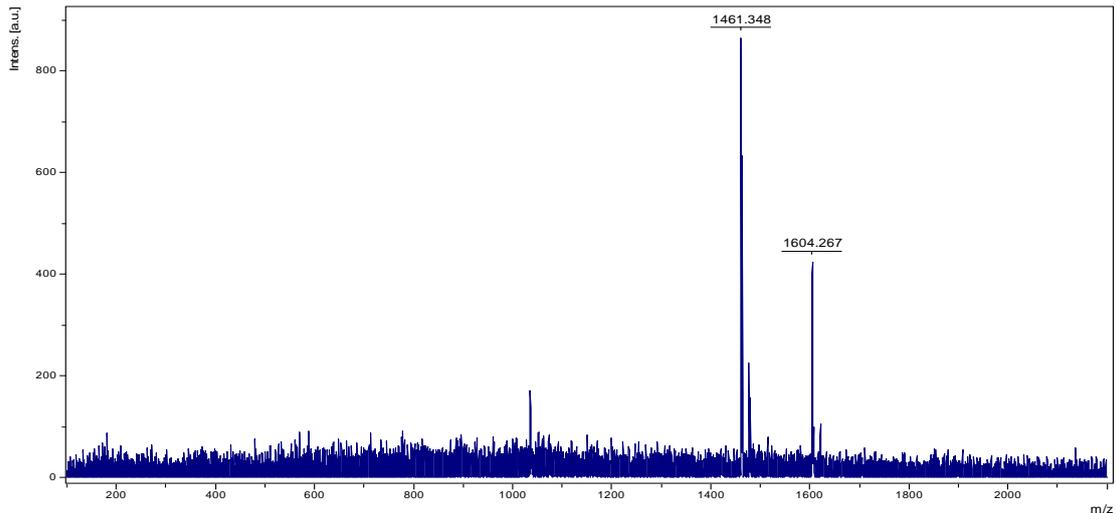


圖十九、混合液通過多株免疫親合性管柱及通過C₁₈固相萃取管柱去鹽後之收集液之MALDI-TOF MS質譜圖。

P2、CP-2 及胜肽標準品 Angiotensin I 之混合液通過多株抗體製備之免疫親合性管柱，所流下未經吸附的收集液，再通過 C₁₈ 固相萃取管柱去鹽後所得之收集液，與基質 CHCA 混合後偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖： $[\text{Ang I}+\text{H}]^+=1290 \text{ Da}$ 。

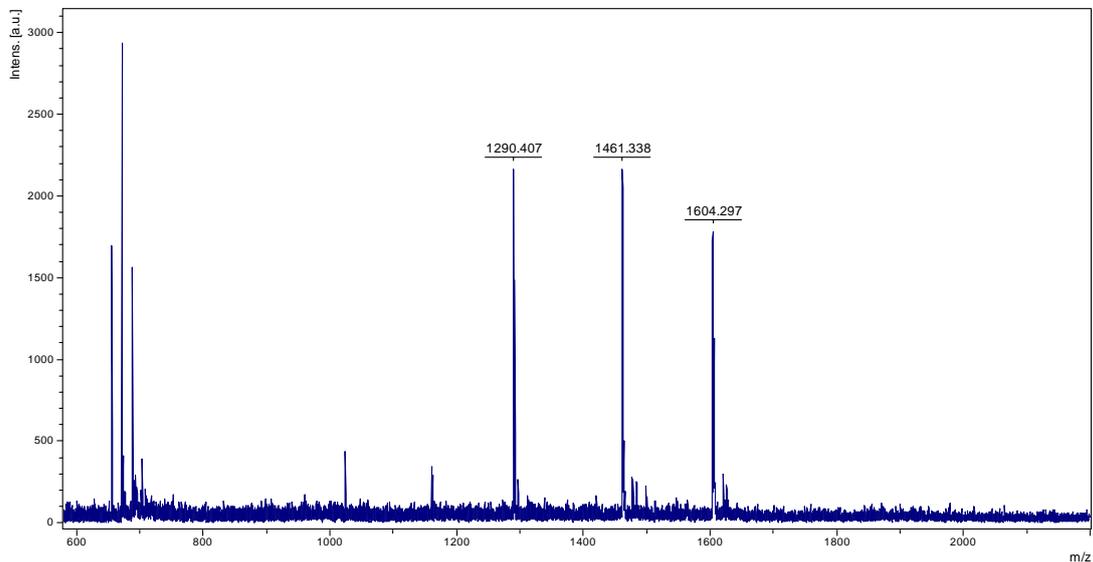


圖二十、經由沖提液沖提出吸附免疫親合性管柱內的胜肽之收集液後，再與基質 CHCA 混合所偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖。



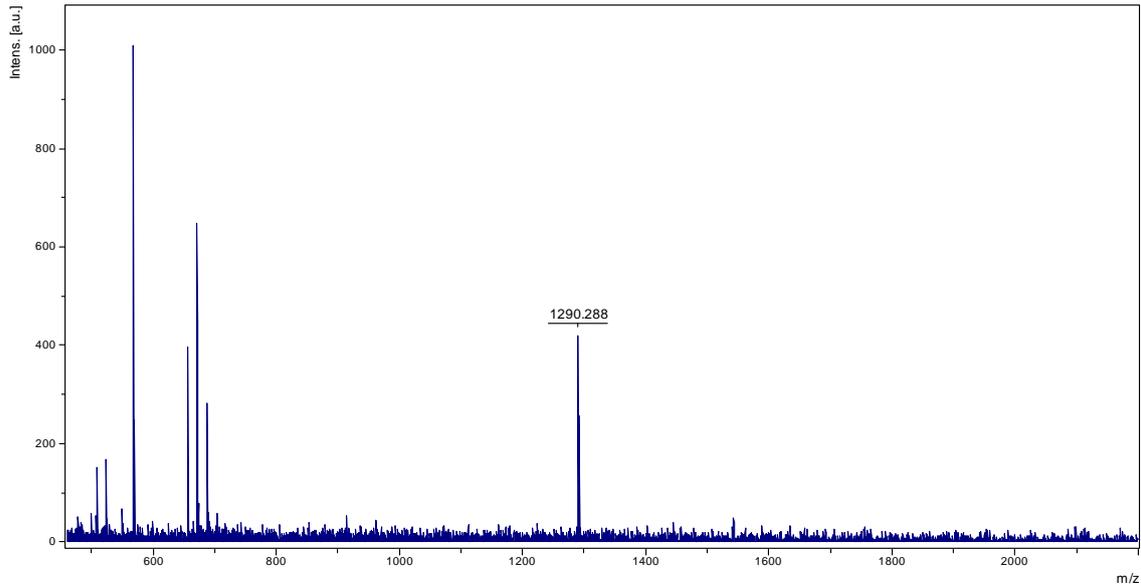
圖二十一、經由沖提液(elute buffer)沖洗吸附在多株免疫親合性管柱的胜肽再通過 C₁₈ 固相萃尿管柱去鹽後之 MALDI-TOF MS 質譜圖。

經由沖提液沖提出吸附在多株抗體製備之免疫親合性管柱的胜肽 (P2, CP2 或 Ang I) 之收集液後，再通過 C₁₈ 固相萃尿管柱去鹽後之收集液，並與基質 CHCA 混合之 MALDI-TOF-MS 質譜圖：
 $[P2+H]^+ = 1461 \text{ Da}$ ； $[CP2+H]^+ = 1604 \text{ Da}$ 。



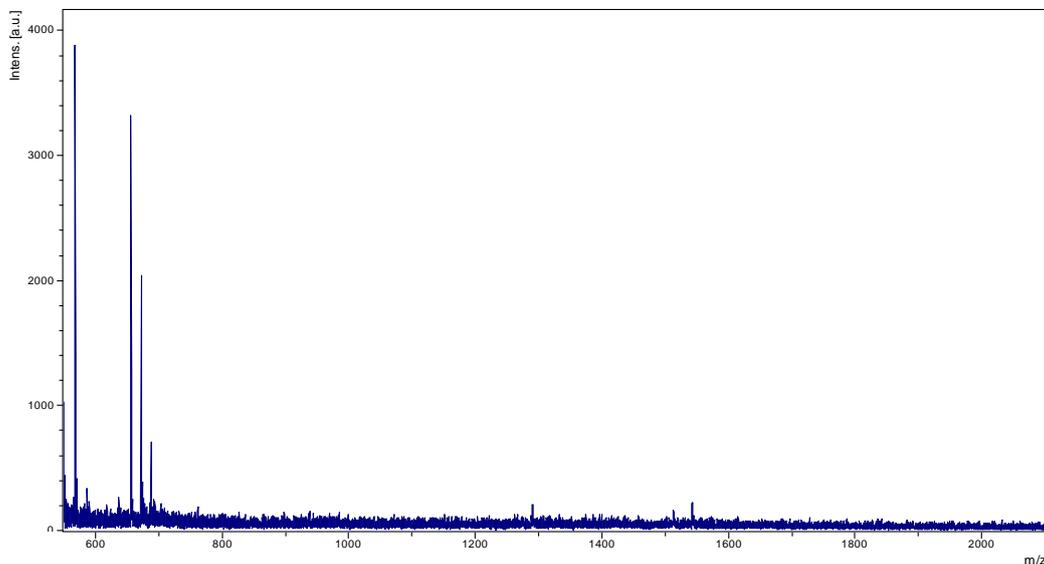
圖二十二、P2、CP-2及胜肽標準品Ang I與基質CHCA混合之 MALDI-TOF MS質圖。

P2、CP-2及胜肽標準品Angiotensin I (Ang I)與基質CHCA混合後之 MALDI-TOF MS 質譜圖： $[P2+H]^+ = 1461 \text{ Da}$ ； $[CP2+H]^+ = 1604 \text{ Da}$ ； $[Ang I+H]^+ = 1290 \text{ Da}$ 。



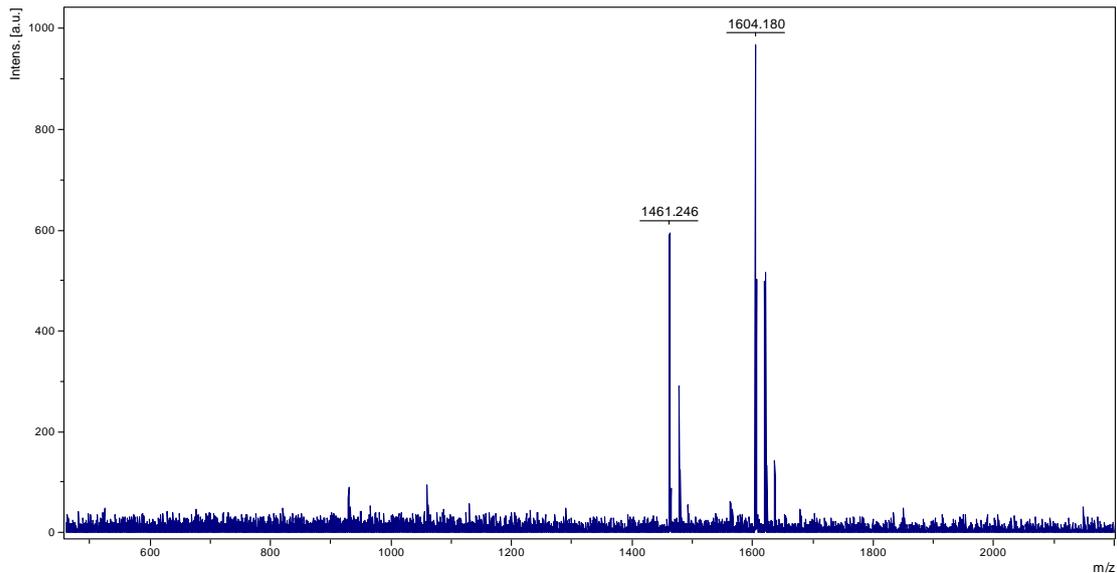
圖二十三、P2、CP-2 及胜肽標準品 Ang I 之混合液通過過單株免疫親合性管柱後之收集液之 MALDI-TOF MS 質譜圖。

P2、CP-2 及胜肽標準品 Angiotensin I 之混合液通過單株抗體(human monoclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱後所流下未經吸附的收集液與基質 CHCA 混合後偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖： $[\text{Ang I}+\text{H}]^+ = 1290 \text{ Da}$ 。

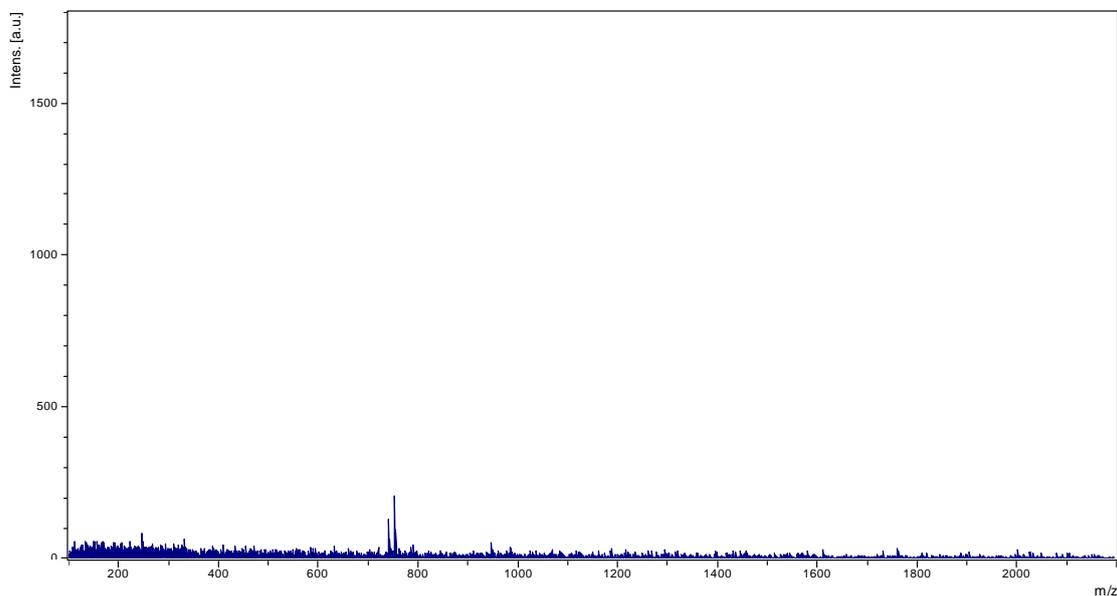


圖二十四、經由沖提液(elute buffer)沖洗吸附在單株免疫親合性管柱的胜肽後之 MALDI-TOF MS 質譜圖。

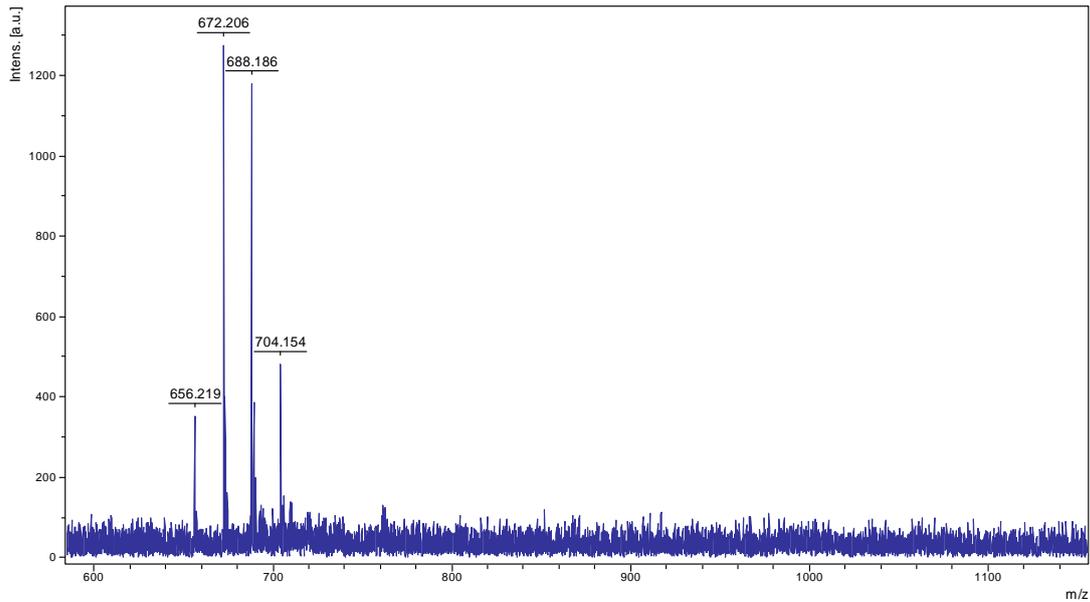
經由沖提液沖提出吸附在單株抗體製備之免疫親合性管柱內的胜肽之收集液後，再與基質 CHCA 混合所偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖。



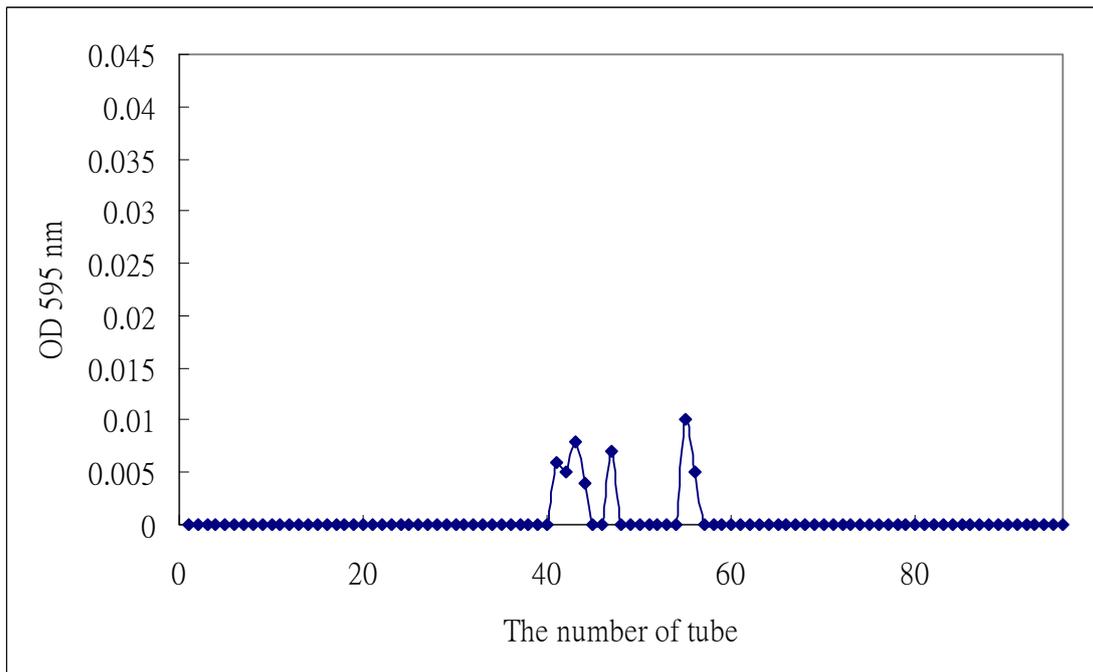
圖二十五、經由沖提液(elute buffer)沖洗吸附在單株免疫親合性管柱的胜肽再通過 C₁₈ 固相萃取管柱去鹽後之 MALDI-TOF MS 質譜圖。經由沖提液沖提出吸附在單株抗體製備之免疫親合性管柱的胜肽之收集液後，再通過 C₁₈ 固相萃取管柱去鹽後之收集液，並與基質 CHCA 混合之 MALDI-TOF-MS 質譜圖： $[P2+H]^+=1461$ Da； $[CP2+H]^+=1604$ Da。



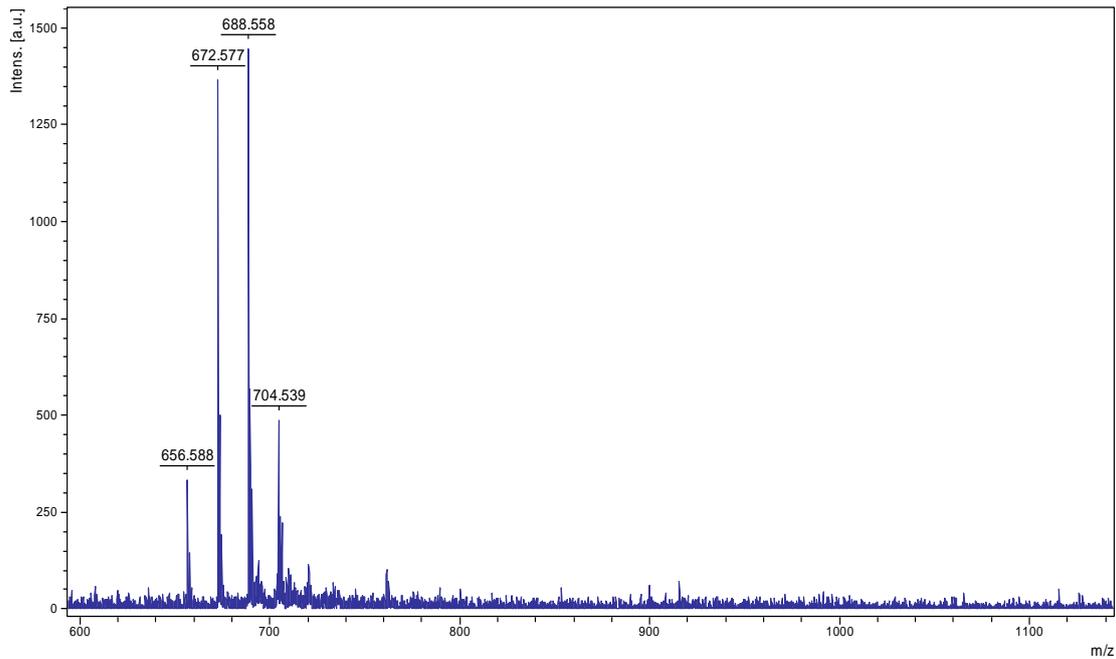
圖二十六、尚未經過前處理之尿液檢體之 MALDI-TOF MS 質譜圖。尚未經過前處理之骨鬆疏松症病患尿液檢體與基質 CHCA 混合後，偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖。



圖二十七、沖提液與基質 CHCA 混合後 MALDI-TOF MS 質譜圖。沖提液(50 mM 的磷酸鹽緩衝溶液)與基質 CHCA 混合後，偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖。

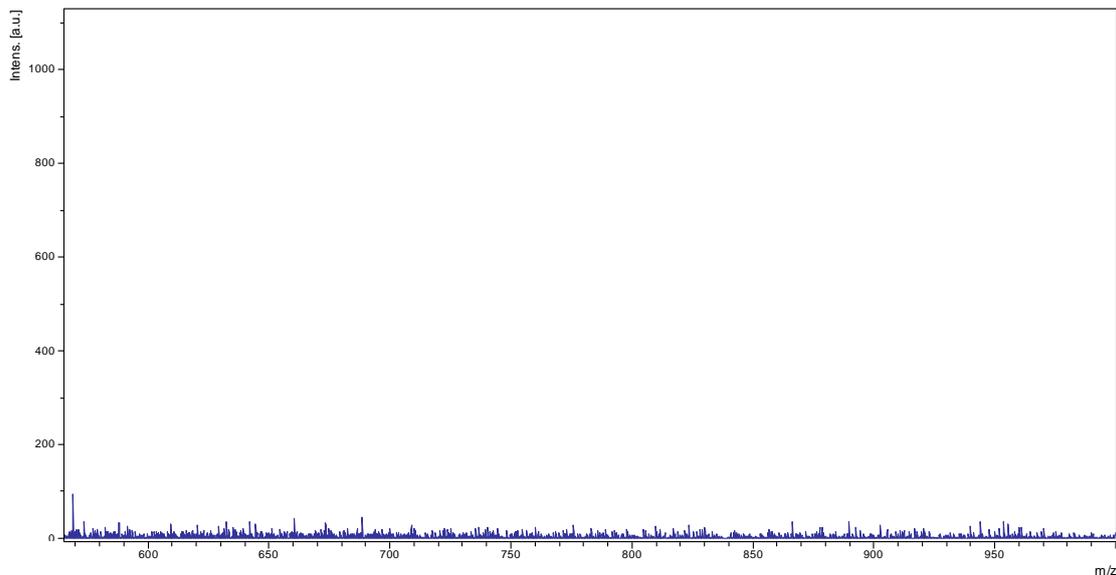


圖二十八、經由免疫親和性管柱層析法沖提之收集液之光譜吸收圖。骨質疏鬆症病患尿液檢體通過免疫親合性管柱後，再用沖提液將與抗體具有親合性之胜肽片段沖出後，之後經由 Bradford 的方法檢測每一管所得之吸收光譜圖。

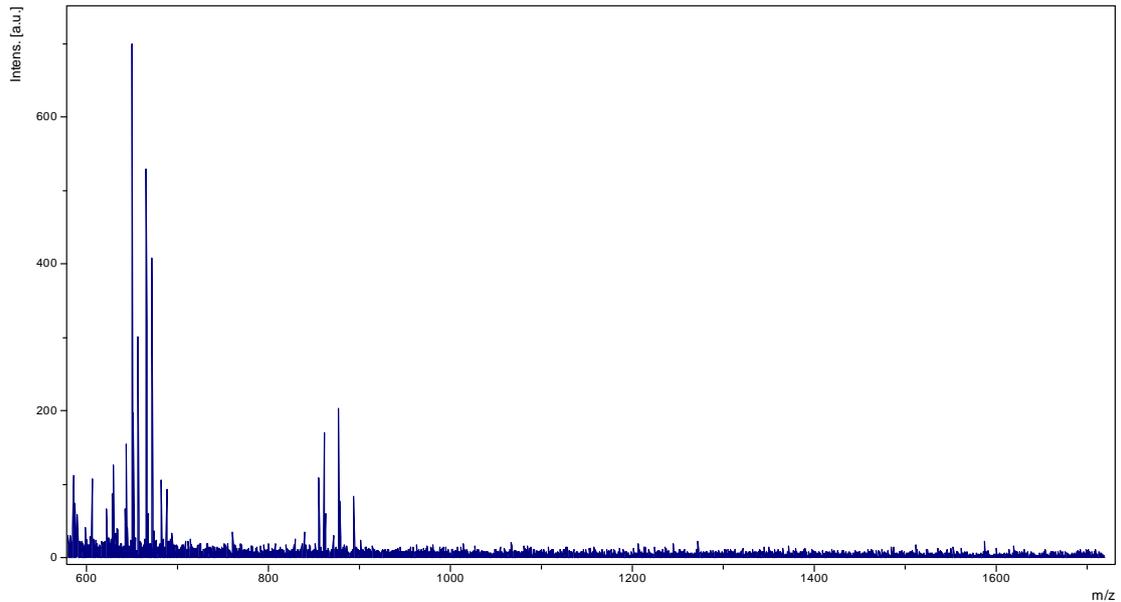


圖二十九、尿液檢體過多株免疫親合性管柱之 MALDI-TOF MS 質譜圖。

骨鬆疏鬆症病患尿液檢體通過多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱之後，再經由沖提液(elute buffer)沖提出吸附在多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱之收集液後，經與基質 CHCA 混合後，偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖。

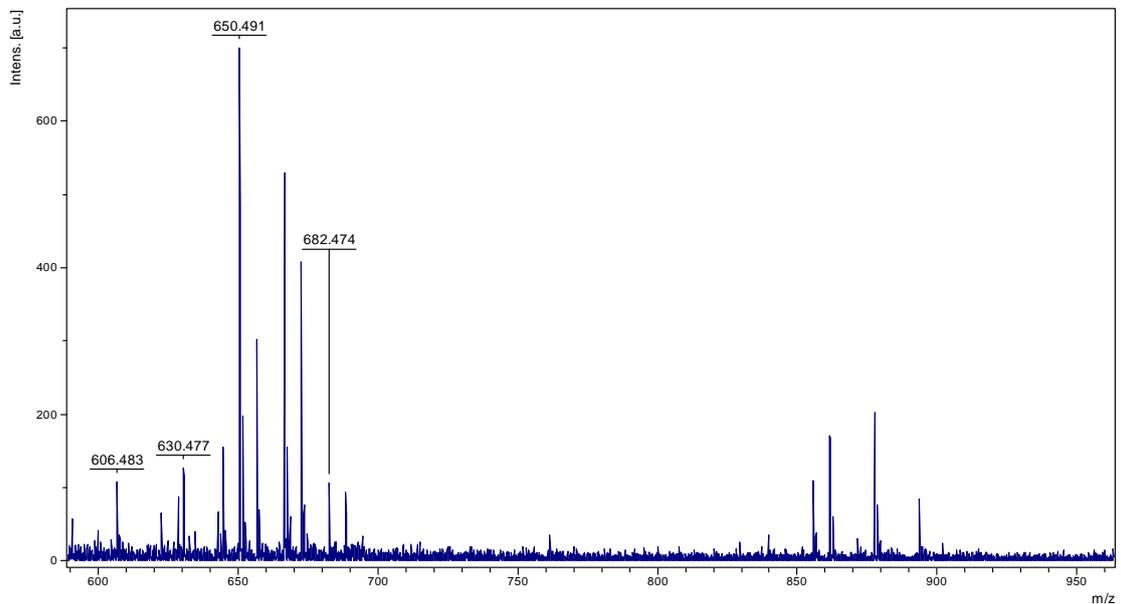


圖三十、沖提液過 C₁₈ 固相萃尿管柱後之 MALDI-TOF MS 質圖譜。

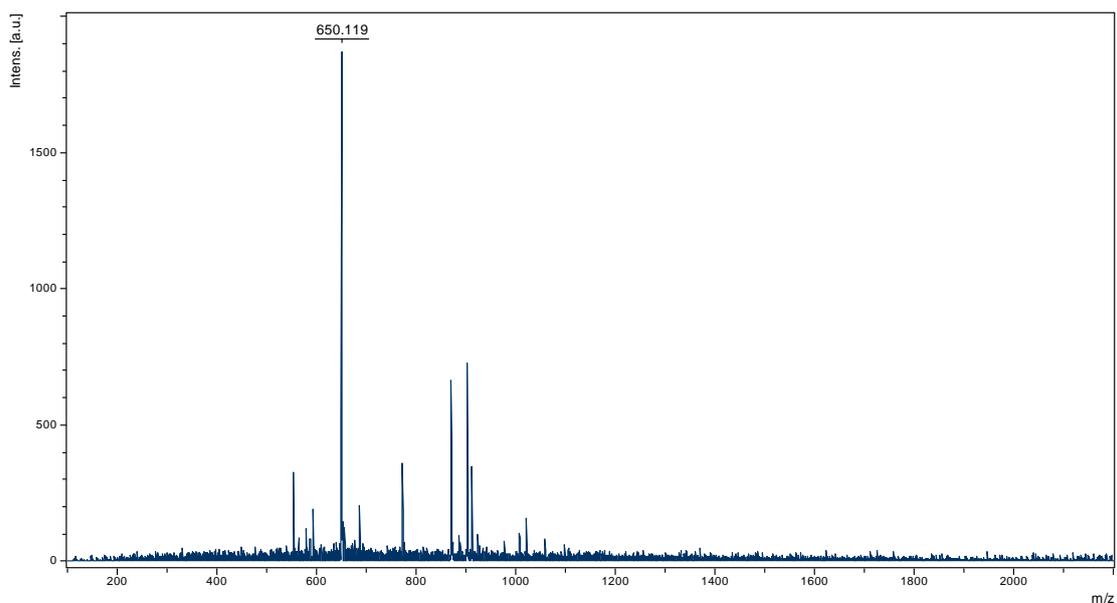


圖三十一、尿液檢體過過多株免疫親合性管柱並過 C₁₈ 固相萃尿管柱後之 MALDI-TOF MS 質圖譜。

骨鬆疏鬆症病患尿液檢體通過多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱後之具有親合性之胜肽片段收集液，再經過 C₁₈ 固相萃尿管柱後之收集液，再與基質 CHCA 混合後，所偵測到之 MALDI-TOF MS 質譜圖。

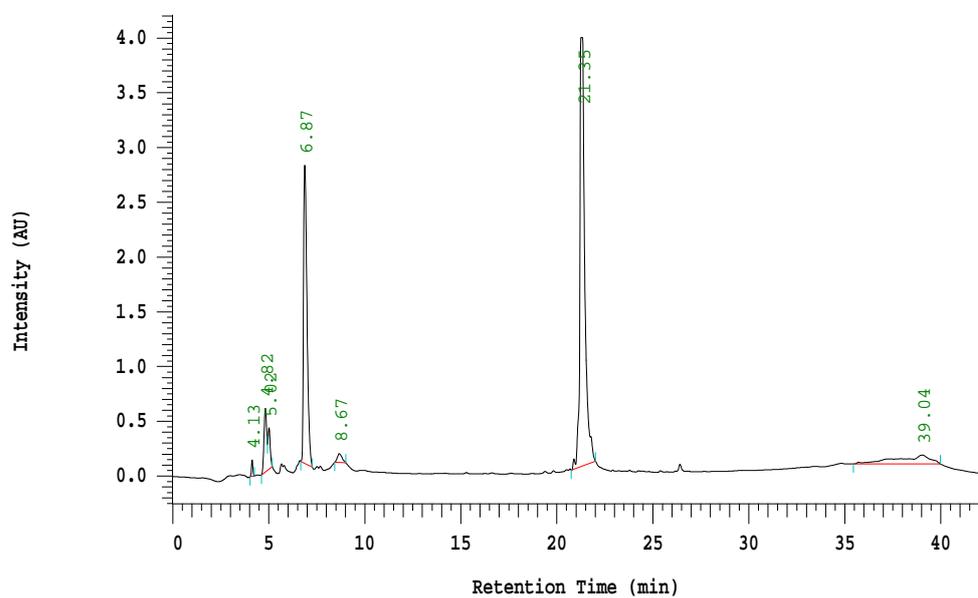


圖三十二、尿液檢體過過多株免疫親合性管柱並過 C₁₈ 固相萃尿管柱後之 MALDI-TOF MS 質圖譜。



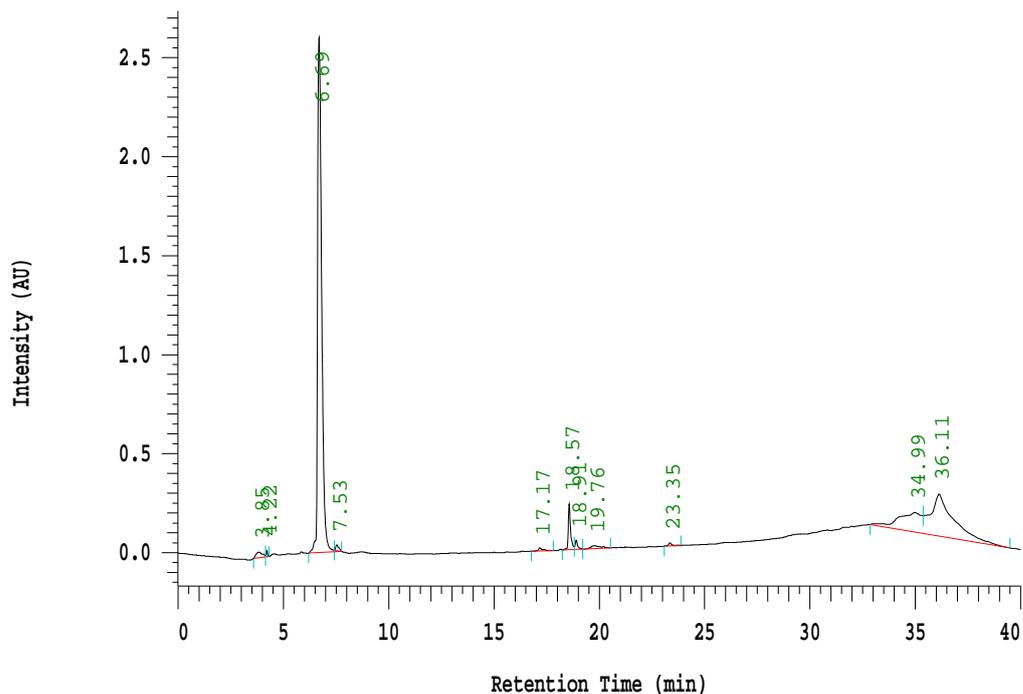
圖三十三、P2-7mer 粗產物之分子量鑑定圖。

合成胜肽之粗產混合物之分子量鑑定圖，証實主要產物 P2-7mer 分子量為 650 Da。

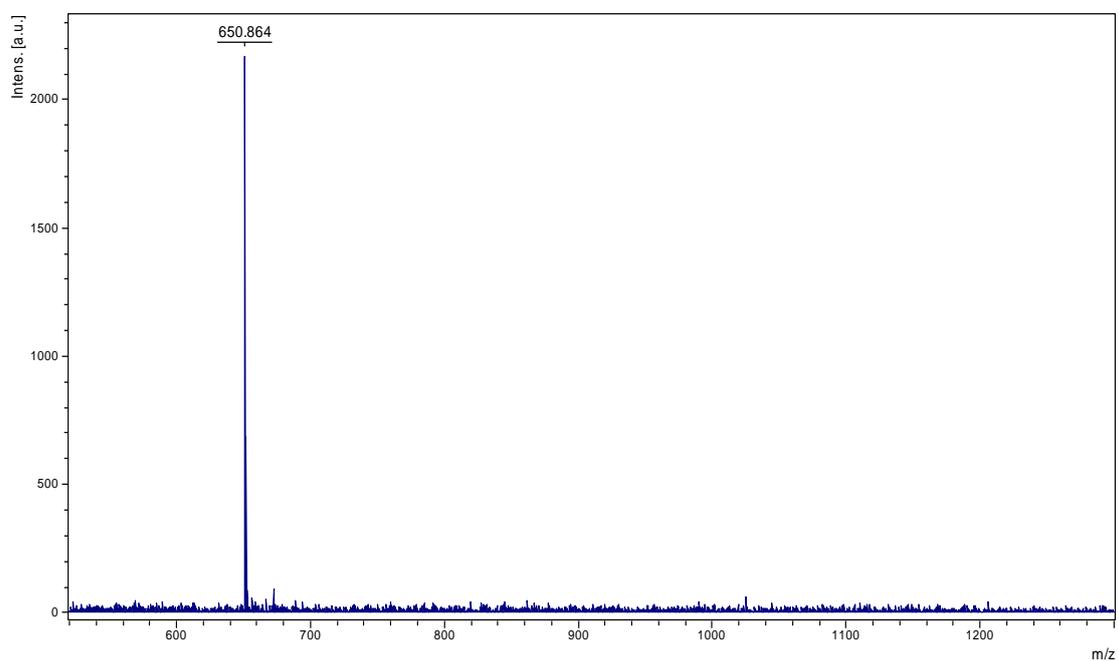


圖三十四、P2-7mer 粗產物之 RP-HPLC 層析圖。

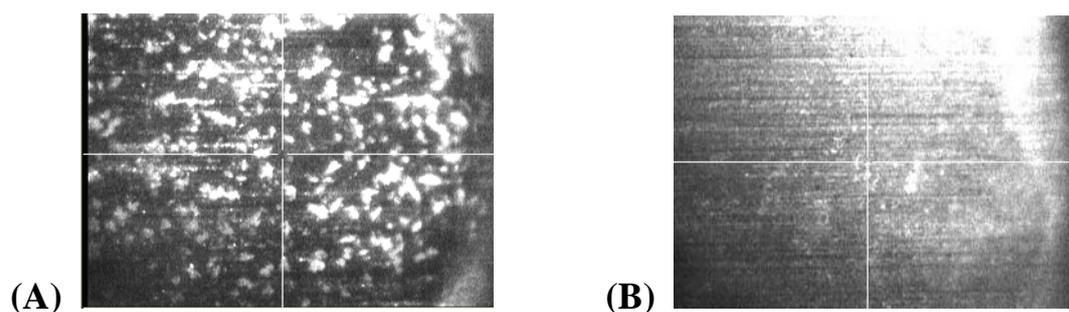
合成胜肽之粗產混合物之 RP-HPLC 層析圖，分析主產物之滯留時間 6.87 分鐘。



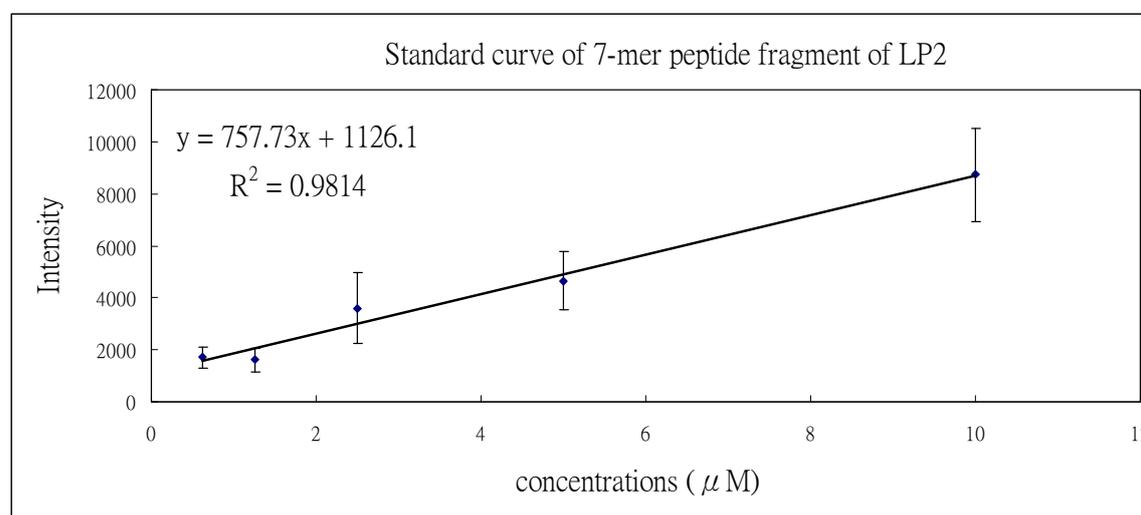
圖三十五、P2-7mer 純化後之 RP-HPLC 層析圖。
 收集純化後之 RP-HPLC 層析圖中滯留時間 6.69 分鐘為主產物。



圖三十六、P2-7mer 之分子量鑑定圖。
 合成胜肽之主產物之質譜圖中，証實主產物之分子量為 650 Da，即為所設計合成之 P2-7mer 胜肽。

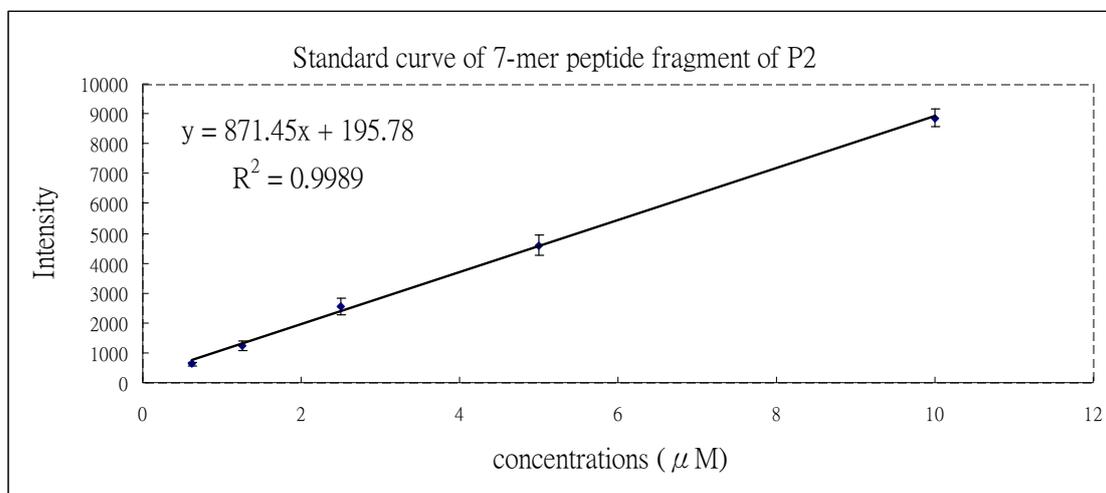


圖三十七、基質在不銹鋼樣品盤上的結晶狀態：(A) α -CHCA；(B) seed-layer method 處理後 α -CHCA 與 P2-7mer 混合而形成的共結晶圖。



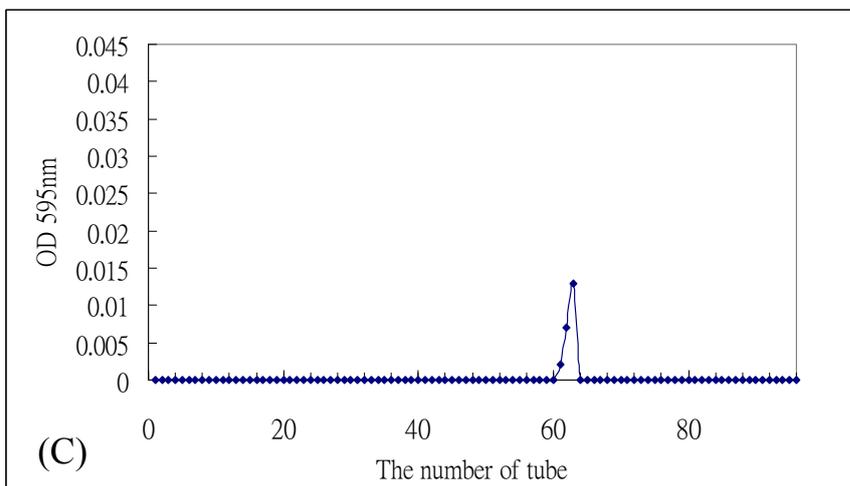
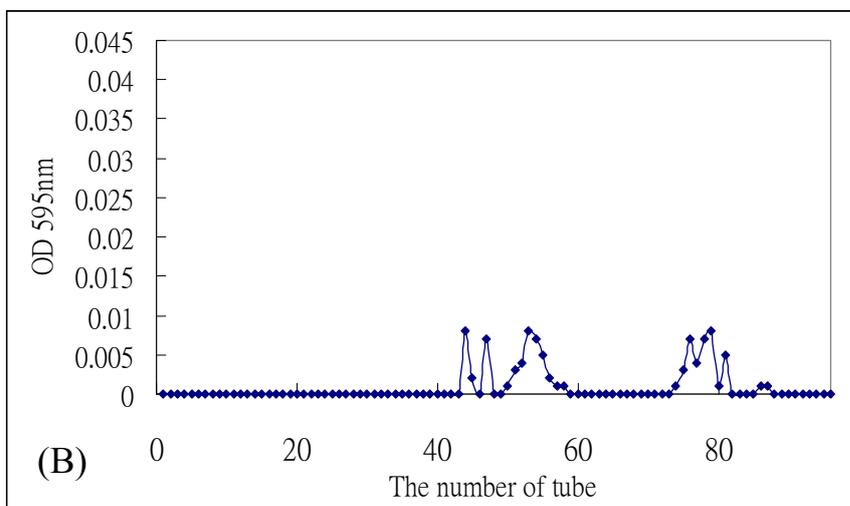
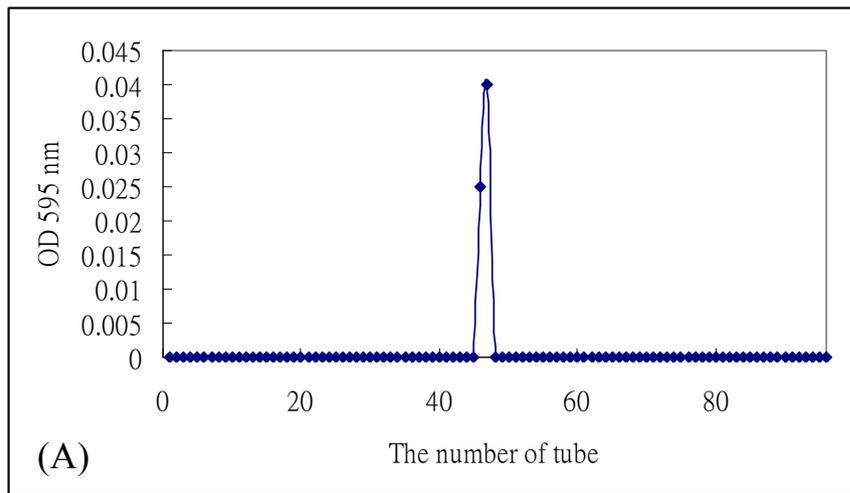
圖三十八、未經 seed-layer method 處理前 P2-7mer 之訊號強度與濃度作圖。

一般基質 CHCA 與 P2-7mer 肽樣品均勻混合，其定量的檢量線濃度範圍設定在 6.125×10^{-7} M 至 1×10^{-5} M 之間，其濃度分別為 10 μ M、5 μ M、2.5 μ M、1.25 μ M 及 0.6125 μ M。將偵測後所得到之訊號強度值結果以坐標圖表示之，Y 軸為 MALDI-TOF 所測得之訊號強度值，X 軸為標準品之濃度以 Excel 軟體作圖，再以 Excel 趨勢線之線性分析類型，得到線性關係公式為 $y=757.73x+1126.1$ ，其 R^2 值=0.9814。



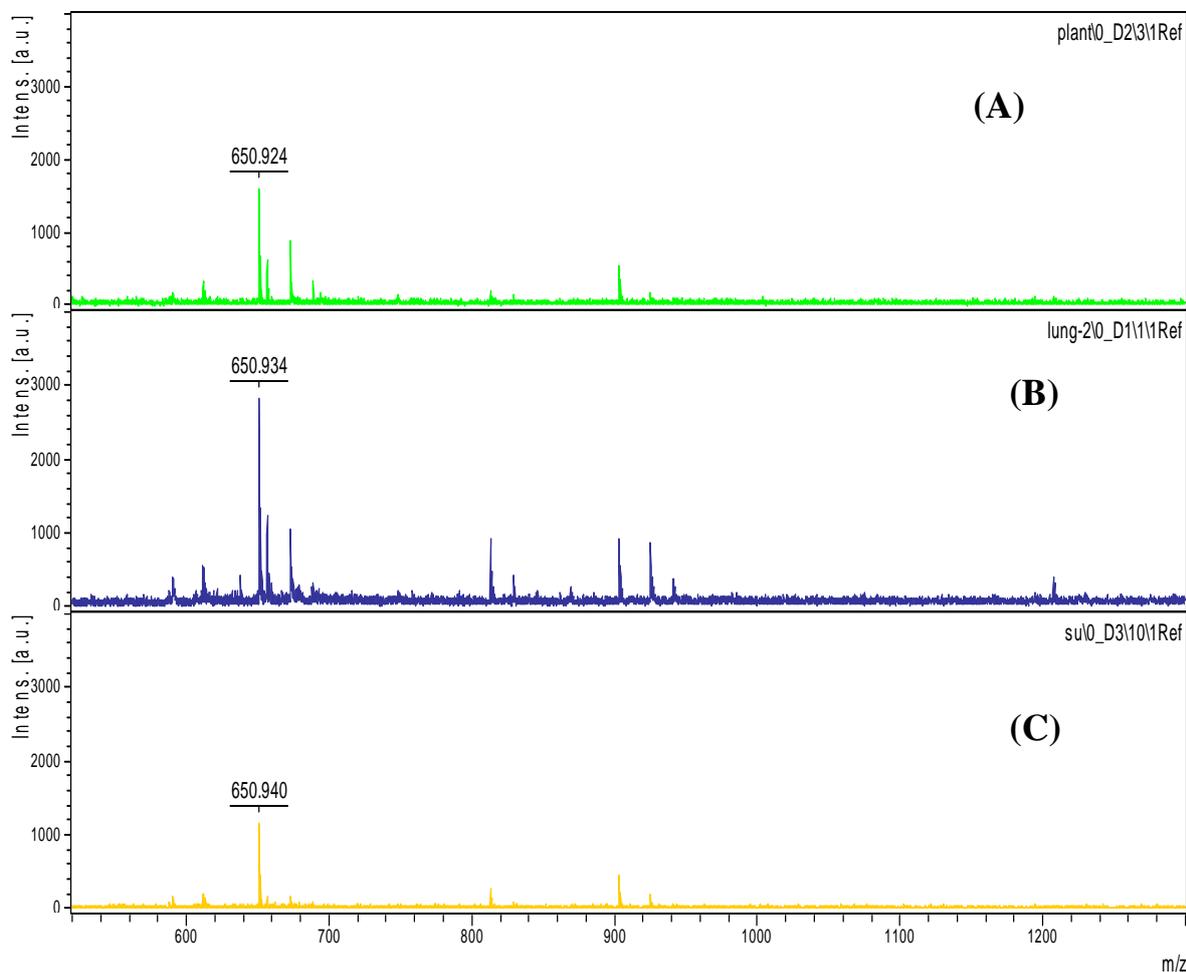
圖三十九、經由 seed-layer method 處理後 P2-7mer 之訊號強度與濃度作圖。

樣品盤的 well 經由 seed-layer method 後一般基質 CHCA 在與 P2-7mer 胜肽樣品均勻混合，其定量的檢量線濃度範圍設定在 1.0×10^{-5} M 至 6.125×10^{-7} M 之間，其濃度分別為 10 μM 、5 μM 、2.5 μM 、1.25 μM 及 0.6125 μM 。將偵測後所得到之訊號強度值結果以坐標圖表示之，Y 軸為 MALDI-TOF 所測得之訊號強度值，X 軸為標準品之濃度以 Excel 軟體作圖，再以 Excel 趨勢線之線性分析類型，得到線性關係公式為 $y = 871.45x + 195.78$ ，其 R^2 值 = 0.9989。



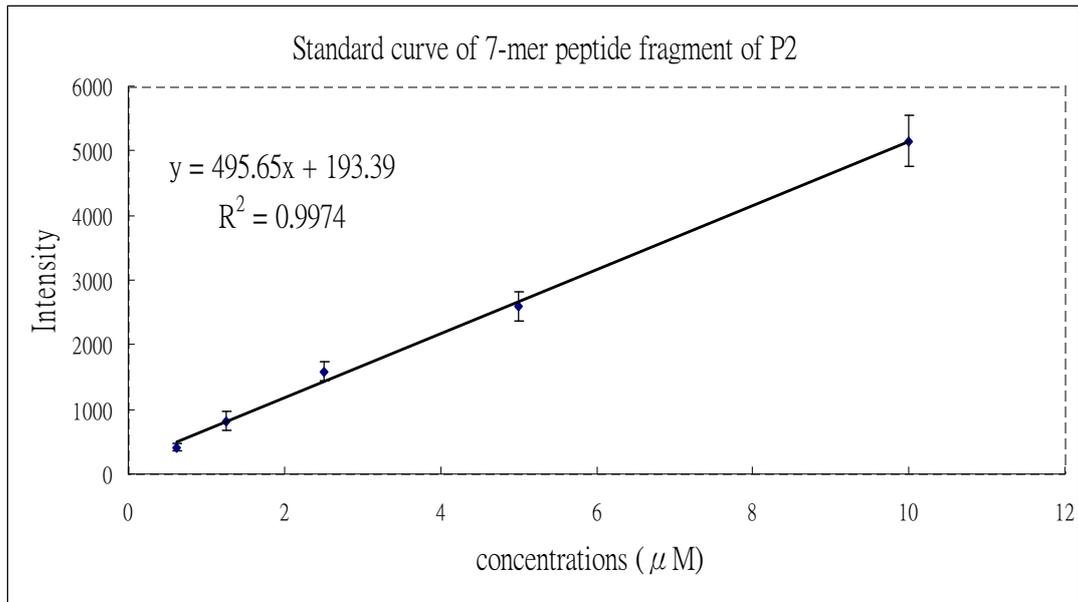
圖四十、經由沖提液沖洗吸附在多株抗體免疫親合性製備管柱之光譜吸收圖。

A、B、C 分別為骨鬆病患，四十歲婦女，二十歲婦女尿液檢體通過免疫親合性管柱所得到的 OD₅₉₅ 光譜吸收圖。



圖四十一、應用 MALDI-TOF MS 鑑定尿液檢體前處理後其出現之質譜訊號。

尿液檢體通過多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱之後，再經由沖提液(elute buffer)沖提出吸附在多株抗體(rabbit polyclonal anti-P2 antibody)製備之免疫親合性管柱之收集液後，經由 C₁₈ 固相萃取管柱來去除鹽類並濃縮樣品，之後冷凍乾燥成粉末狀，當冷凍乾燥成粉末狀後回溶至 1 mL 的去離水。應用 MALDI-TOF-MS 鑑定其出現質譜訊號。A、B、C 分別為骨鬆病患，四十歲婦女，二十歲婦女之 MALDI-TOF-MS 質譜圖。



圖四十二、P2-7mer 胜肽標準品製做檢量線之訊號強度與濃度作圖。

以 L2-7mer 標準品製作之檢量線，其定量的檢量線濃度範圍，設定在 $1.0 \times 10^{-5} M$ 至 $6.125 \times 10^{-7} M$ 之間，其濃度分別為 $10 \mu M$ 、 $5 \mu M$ 、 $2.5 \mu M$ 、 $1.25 \mu M$ 及 $0.6125 \mu M$ 。將偵測後所得到之訊號強度值結果以坐標圖表示之，Y 軸為 MALDI-TOF MS 所測得之訊號強度值，X 軸為標準品之濃度以 Excel 軟體作圖，再以 Excel 趨勢線之線性分析類型，得到線性關係公式為 $y=495.65x+193.39$ ，其 R^2 值=0.9974