

# 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜於單核苷酸多樣性分析之應用

## Application of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry on Single Nucleotide Polymorphism Genotyping

陳逸然、廖信凱、陳玉如

Yet-Ran Chen, Hsin-Kai Liao, Yu-Ju Chen

後基因體紀元，核酸變異之研究有助於人類對於疾病機制的瞭解，為了更進一步瞭解基因體，大量的基因分析刺激了對高靈敏度、快速以及經濟的分析技術需求。和傳統方法相較，基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜技術 (MALDI-TOF MS) 所具有的精確度、高靈敏度和分析速度，目前已成為單核苷酸多樣性 (SNP) 分析的重要工具。本文將介紹近年來幾種以 MALDI-TOF-MS 分析核酸變異之方法。

In postgenome era, DNA variation analysis is of great interest for providing insight into disease mechanism. Vast numbers of analysis to fully explore the genomic information have enabled the growing demand of high sensitivity, high throughput, and low cost platforms. By the intrinsic nature of accuracy, sensitivity and speed, matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has emerged an important tool for genotyping. This review will focus on the latest methods for SNP genotyping using MALDI-TOF MS.

### 一、SNP 之介紹

人類基因體的藍圖已於近年大致完成，人類基因體學為結合生物、醫學、物理、化學、電子、資訊等跨領域的新興科學，基因體研究的發展創造了分子醫學的紀元，人類基因序列變異分析已成為尋找致病基因的一大利器。

在基因序列的變異中以單核苷酸多樣性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 最為常見，其約佔人類 DNA 變異的 90%<sup>(1)</sup>，所謂的 SNP 是指 DNA 序列中一個核苷酸鹼基的變異，其狹義的定義是單指於基因體某特定位置的單一鹼基的改變，而廣義的定義則包含單一鹼基的插入 (insertion) 及刪除 (deletion)，在 SNP 研究中則通常以廣義的定義來

稱之。一般而言，每千個核苷酸估計約含有一個 SNP，因此其發生的頻率是相當高的。而這些 SNPs 是否會對個體有其影響則需視其發生變異的位置而定，如果 SNPs 是發生在蛋白質編譯的位置上 (coding regions) (其稱為 cSNPs)，只有一少數的比例會造成所表達的胺基酸改變，然而一些非編譯區的改變仍有可能會造成基因調控上的變化<sup>(2)</sup>。科學家對於 SNPs 較為重視的原因在於其可以作為遺傳診斷上的標定物 (genetic markers)，例如一些遺傳的家族性疾病，現在已可以藉由一些特定位置的 SNP 檢測來達到快速篩選的效果，而許多癌症的成因亦已發現與多個 SNPs 累積變異有其關連性<sup>(3)</sup>。SNPs 的研究除了可作為遺傳疾病的檢定之外，遺傳藥物學家更進一步提出個體藥物治療的構想，隨著對 SNPs 的瞭解的增加，醫師可以針對每個人體質的不同擬定個別病人的藥物治療程序，達到基因藥理學 (pharmacogenomics) 的功效。為了此一目的，大量且廣泛的檢測每個個體的 SNP 之差異變得極為重要。而過去基本的電泳膠片分析法由於分析速度太慢，不足以符合藥廠或醫院大量的檢體需求。由於近年來質譜技術的日新月異，使用質譜儀來進行 SNP 的檢測工作已有顯著的發展。以下將針對幾種新開發出的 SNP-質譜儀檢測法來作討論。

## 二、基質輔助雷射脫附游離飛行時間式質譜儀 (MALDI-TOF MS) 之介紹

質譜能廣泛應用於生物技術領域中，最重大的突破在於軟性離子化方法的出現。由於質譜必須要

先將樣品離子化後才能測得樣品的分子量，軟性離子化法可避免生化樣品如 DNA 及蛋白質在離子化的過程中產生裂解。目前兩個最常用來偵測生物分子的軟性離子化法為電灑游離法 (electrospray ionization, ESI)<sup>(4)</sup> 以及基質輔助雷射脫附游離法 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)<sup>(5)</sup>。對 DNA 的 SNP 分析而言，電灑法對樣品純度需求較高，多重電荷產生出的質譜圖複雜不易判讀，此游離法未成為主流方法的原因為分析速度限制的問題，因此絕大多數高效率 SNP 分析技術均是以 MALDI-TOF MS 為主。

基質輔助雷射脫附離子化法的原理如下。將樣品與具有吸收雷射能量的有機分子 (稱作基質) 混合，置備於金屬樣品盤上使其產生結晶，之後再將其導入質譜儀中分析。樣品在質譜儀中離子化的方法是藉由脈衝式的 UV 雷射將能量傳送給基質分子，當基質接受到雷射的能量之後則被脫附出來，在此時樣品也隨著基質揮發至氣相之中。基質除了可以將樣品氣化之外，還可藉由質子傳遞的方式將樣品離子化。對雷射介質脫附離子化法而言，通常我們所觀測到的分子傾向於帶單一電荷的離子，因此較利於複雜混合物的圖譜分析。

基質輔助雷射脫附離子化法最常搭配的質量分析器為飛行時間式質譜儀 (time-of-flight mass spectrometry, TOF-MS) (如圖 1)，除了靈敏度高、分析速度快等因素，最大的優點在於其可分析的質荷比範圍極大，因此可觀測到 DNA 或是蛋白質等單一電荷巨大的分子離子。在硬體搭配上，兩者搭配的另一原因在於基質輔助雷射脫附離子化法與飛行式質譜儀均具非連續式脈衝的特性，因此連接起

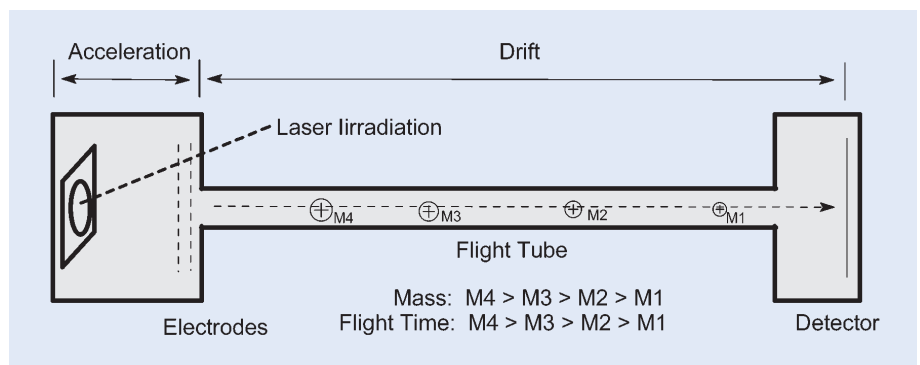


圖 1. 基質輔助雷射脫附飛行式質譜儀 (MALDI-TOF MS) 示意圖。

來也較其他種類的質量分析器來得容易，不會有樣品流失的問題。在基質輔助雷射脫附游離飛行式質譜儀中，當雷射將樣品離子化後，受到加速電場的樣品離子加速至無場區中，由於每個離子所得到的動能相同，由下面的公式可以看出：

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeV \quad (1)$$

其中  $v$  為分析物的飛行速度； $m$  為分析物的質量； $z$  為分析物離子化後所帶的電荷數； $e$  為基本電荷； $V$  為質譜儀的加速電壓。

公式 (1) 可以轉換為：

$$\frac{m}{z} = \frac{2eV}{v^2} \quad (2)$$

其中

$$v = \frac{s}{t} \quad (3)$$

式中  $s$  為質譜儀飛行管的長度； $t$  為樣品的飛行時間。將式 (3) 帶入式 (2) 可得：

$$\frac{m}{z} = \frac{2eVt^2}{s^2}$$

上式之中求得質荷比的唯一未知參數為  $t$ ，因此藉由測量分析物飛行的時間即可量測出分析物的質荷比。

### 三、SNP 分析方法介紹

在早期，MALDI-TOF MS 分析 DNA 序列的速度被認為可以用來取代傳統凝膠電泳定序技術，分離自聚合酶鏈反應 (PCR) 所得到螢光標記 DNA 片段<sup>(6)</sup>，其原理如圖 2 所示，使用 MALDI-TOF MS 所提供的精確度可準確地分析已知位置上的

SNP<sup>(7)</sup>。然而隨著 DNA 的尺寸漸漸增大，MALDI-TOF MS 偵測靈敏度以及解析度也逐漸下降，這也是目前使用 MALDI-TOF MS 分析 DNA 序列的主要限制。這個現象的主要原因是由於 DNA 的碎裂程度在 MALDI 離子化的過程中會隨著 DNA 大小的增加而越顯得嚴重；此外，大的 DNA 較難離子化且易與鹽類產生加成的訊號、與氣體碰撞截面積較大易形成斷裂碎片、偵測器對大分子靈敏度較差等都是造成質譜訊號隨質量上升而下降的原因。為了解決這些先天上難以克服的問題，目前在分析 SNP 上所搭配的方法不斷推陳出新，以下將簡介幾種常用來分析 SNP 的方法，並對其優缺點作討論。

#### 1. 直接分析 PCR 產物

如前所述，以 MALDI-TOF MS 直接以變異點位的 PCR 產物作 SNP 分析曾被提出，但由於大分子量偵測的靈敏度不佳，使用 MALDI-TOF MS 直接分析 PCR 所得到的產物來鑑定 SNP 的實用性並不高。另外，在 MALDI 離子化的過程中，雙股螺

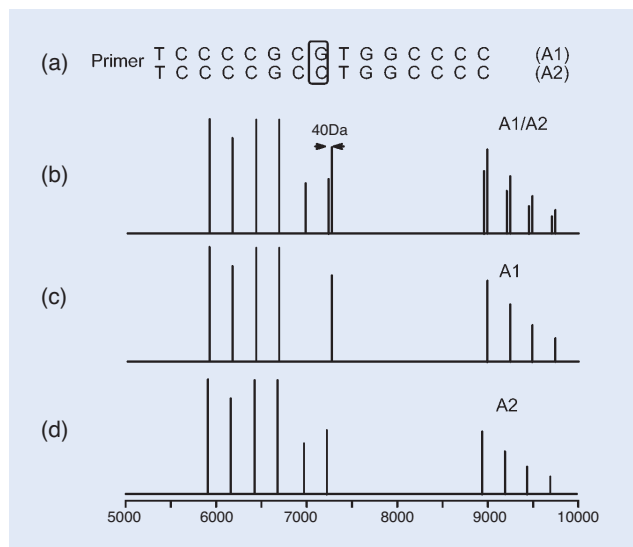


圖 2. 直接使用 MALDI-TOF MS 分析 PCR 產物。  
(a) A1/A2 分別為不同基因型的序列，其中標示的為變異的位置。(b) 含有 A1/A2 所觀察到的圖譜，圖中相差 40 Da 一對的信號為 dGC-3' (A1) 以及 dCC-3' (A2) 的碎片所產生。(c) 只含有 A1 基因型下所觀察到的圖譜。(d) 只含有 A2 基因型下所觀察到的圖譜。

表 1. 單一核糖變異所產生之分子量差異。

| 正常 | 變異 | 質量差異 (Da) | 正常 | 變異 | 質量差異 (Da) |
|----|----|-----------|----|----|-----------|
| A  | T  | -9        | C  | A  | 24        |
| A  | C  | -24       | C  | T  | 15        |
| A  | G  | 16        | C  | G  | 40        |
| T  | A  | 9         | G  | A  | -16       |
| T  | C  | -15       | G  | T  | -25       |
| T  | G  | 25        | G  | C  | -40       |

旋的 PCR 產物也很容易斷裂，這些碎片產物導致質譜圖的複雜化，因而影響 SNP 的判斷。尤其是當 SNP 所產生的不同產物質量最小差異在 9 Da 時(如表 1 所示)，質譜儀的解析度必須能分辨其差異，此需求對於越大的 PCR 產物困難度越高。最直接的解決方法在於設計一套可辨認 SNP 變異的引子 (primer)，利用加大質量的差異彌補解析度的不足<sup>(8)</sup>。

另外一種分析方法是使用結合酶鏈反應 (ligase chain reaction, LCR)<sup>(9)</sup>，反應中只有其中一種 SNP 的基因型 (allele) 會產生結合產物，經由純化後再以質譜儀分析，另一種 SNP 的基因型則因為無法形成結合的產物而無法被質譜儀偵測到。

## 2. 引子延伸反應

引子延伸反應 (primer extension) 是目前以 MALDI-TOF MS 進行 SNP 分析所廣泛使用的方法，在此方法中，可針對 SNP 的變異點設計一長度適中的引子，引子延伸反應是將一段引子的 3' 端結合到位於 SNP 變異點之前的位置，當加上 ddNTP 或是 ddNTP 與 dNTP 的混合物時，在 PCR 反應中時，則 dNTP 及 ddNTP 則會依據 PCR 模版的序列將引子的 3' 端延長。根據不同的基因型所產生的引子延伸產物也會有所不同，在將引子及其產物純化分離之後，則可藉由 MALDI-TOF MS 偵測延伸產物的分子量，以瞭解 SNP 的變異性。

圖 3 所示為引子延伸反應的其中一種方法 — pin point assay<sup>(10)</sup>，此方法被應用在分析許多重要功能基因的變異上。使用此方法也曾經被證明可以在單一 PCR 反應中一次分析五種 SNP。此方法是藉由在引子的 5' 端加上一段非互補的 dNTP，並在一

個 PCR 反應中同時作五個引子的延伸反應，所得到的產物則可以直接由 MALDI-TOF MS 偵測五個 SNP 的分析<sup>(11)</sup>。此外使用引子延伸反應的方法也被成功整合在自動化的系統中，加上利用微量取樣的技術，可將數 nL 自 PCR 反應之後的樣品點在矽晶片上，並直接使用 MALDI-TOF MS 作分析。此方法曾經被報導可以在六分鐘之內分析 100 個 fmol 濃度範圍內之 SNP 樣品<sup>(12)</sup>。

使用 pin point 的方法最主要的缺點在於此方法所觀測的分子量變異並不是很大，最小的 ddNTP 的質量差異僅有 9 Da (表 1)，因此質譜儀的解析度以及樣品處理的要求對此方法而言顯得十分關鍵。為了改善這一個方法之實用性，也可以使用加上質量標記的 ddNTP 以加大質量的差異<sup>(13)</sup>，如此便可以減少樣品的處理以及質譜解析度的需求。但使用此標記 ddNTP 的方法可能會影響 PCR 反應的產率，而導致靈敏度的下降。

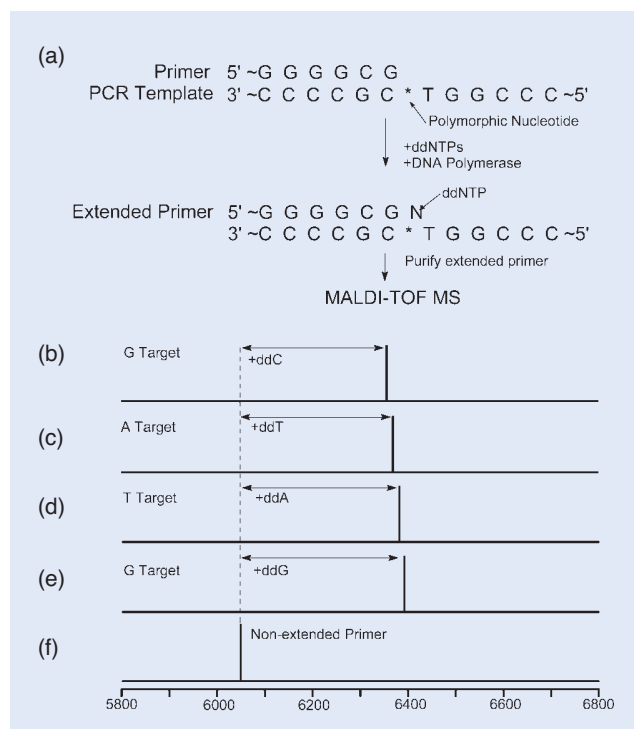


圖 3. (a) Pin point 引子延伸反應的示意圖。(b-e) 變異位置上的核酸分別為 (b) G、(c) A、(d) T、(e) C 所觀測到引子延伸後的質量。(f) 未延伸的引子。

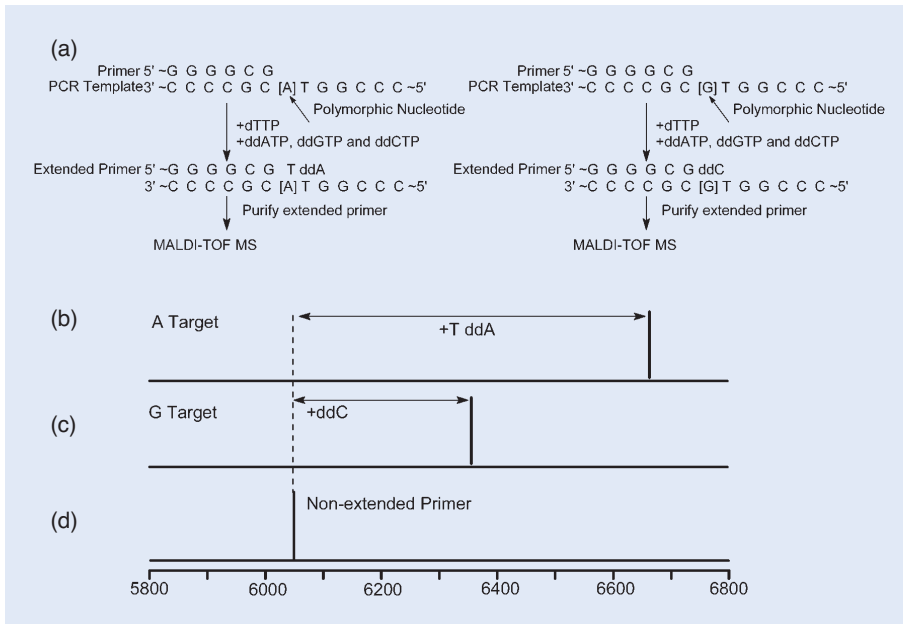


圖 4  
(a) VSET 引子延伸反應的示意圖。變異位置上的核酸分別為 (b) A、(c) G 所觀測到引子延伸後的質量。(f) 未延伸的引子。

另一種常用的引子延伸反應稱為 VSET (very short extension)<sup>(14)</sup>，圖 4 為此方法之示意圖。此策略是在引子延伸反應時先加上一個與變異點互補的 dNTP，和其他不互補的 ddNTP 進行反應，如此便可加大質量間的差異。此方法除了可以降低質譜解析度的需求以及樣品前處理的要求之外，也沒有使用質量標記 ddNTP 導致 PCR 產率降低的問題。然

而此方法必須根據所要觀測的變異來決定所要反應的 dNTP 與 ddNTP 的種類，因此並不適合將不同點位的 SNP 混和同時反應。

### 3. 氨基酸探針 (Peptide Nucleic-Acid Probes)

氨基酸 (peptide nucleic-acid, PNA) 為 DNA 的相似分子<sup>(15,16)</sup>，以中性不帶電的醯胺骨架 (amide

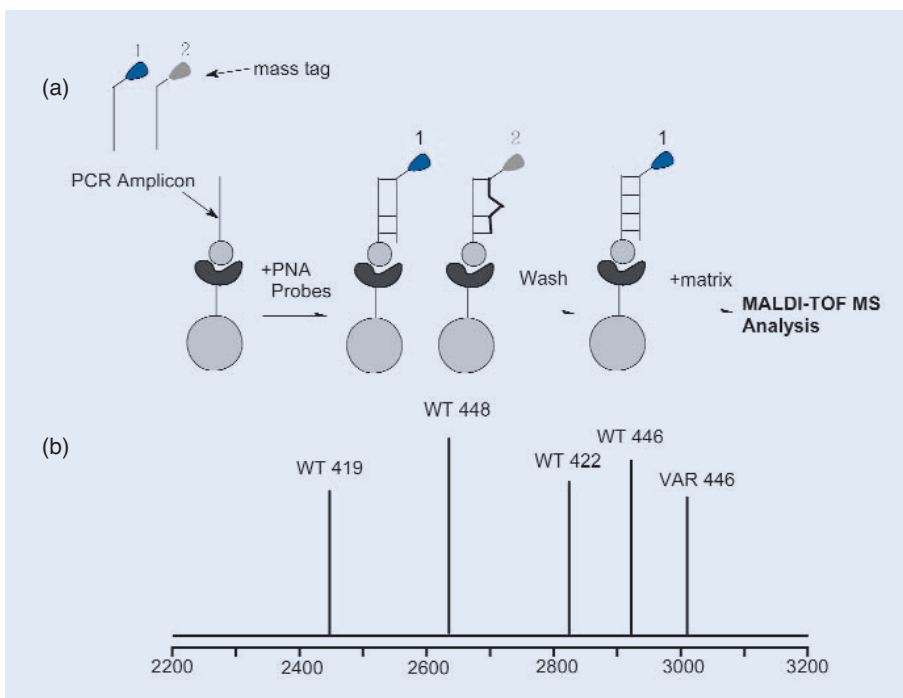


圖 5。  
(a) 氨基酸探針示意圖。(b) MALDI-TOF MS 分析的結果，圖中顯示 446 的位置具有 SNP 的發生，WT446 表示正常，VAR446 表示變異。

backbone) 將四種核酸連結在一起。此類的分子仍然具有辨認 DNA 互補序列的能力。由於骨架不帶電，因此當 PNA 與 DNA 結合的時候便具有一些特性，這些特性包括結合後熱穩定度增加、可以在低離子強度下反應、高選擇性等等。PNA 探針法是先將含有 genomic DNA 含有 SNP 部分之 PCR 產物的一端固定在磁性粒子上，再加入結構與不同變異點的互補 PNA 探針反應，如圖 5 所示<sup>(17,18)</sup>。

如圖 5 所示，兩種分別具有針對突變點位鹼基設計兩種質量標記的 PNA 的探針，分別用來辨認固定於磁性粒子上不同 SNP 的基因型，待結合完畢後，則可將未反應的 PNA 洗掉，只留下已辨認到鹼基的 PNA 在磁性粒子上，剩下的磁性粒子則可以直接以 MALDI-TOF MS 來分析。PNA 在雷射離

子化的過程中則會脫附並離子化，而不同變異 PNA 在質譜中的質量標記則可分析出基因型的變異。

PNA 能很容易的使用 MALDI-TOF MS 作分析，這是因為 PNA 穩定度高，因此在 MALDI 離子化的過程中不易造成斷裂的現象<sup>(19)</sup>。另外 PNA 由於中性的緣故，且不需在高鹽類的反應條件下進行反應，因此可避免與金屬離子產生錯合而干擾質譜訊號。但是使用不同長度及結構的 PNA 探針會具有不同的熱穩定性，不同的樣品可能適合在不同的條件下作反應，因此無法一次做多點 SNP 分析。此方法最主要的限制還是在於使用 PNA 以及純化用的磁性粒子的成本過高，造成無法廣泛的被使用，單是 PNA 的成本便遠高於 DNA 引子十倍以上。

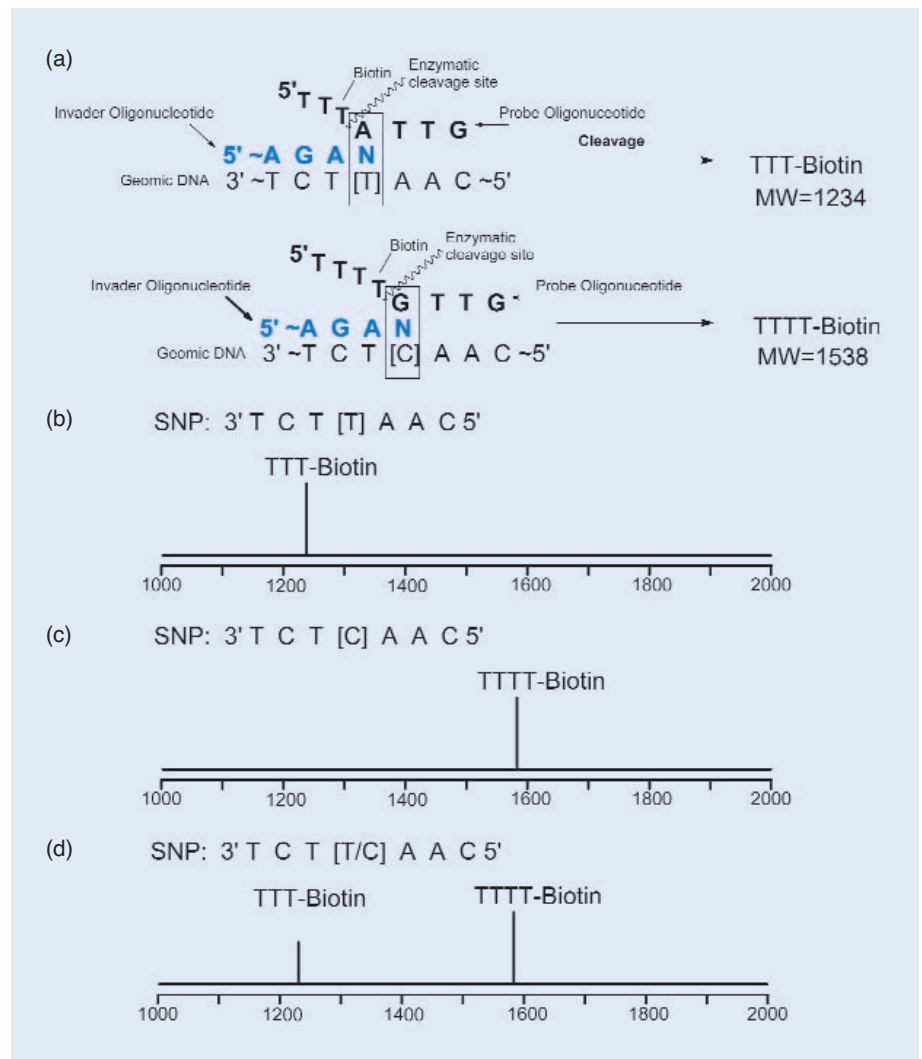


圖 6. (a) Invader assay 示意圖。(b-c) 於 MALDI-TOF MS 上分析單一變異樣品。(d) 於 MALDI-TOF MS 上分析具有兩種變異樣品。

## 4. Invader Assay

Invader 方法<sup>(20)</sup> 使用兩個寡核酸 (oligonucleotide) – invader 以及 probe 寡核酸，將其連接到 DNA 的兩端，當兩個寡核酸連接到 DNA 上時則會產生重疊的現象，而 probe 寡核酸 5' 端由於其長度較長的關係且序列不與變異點互補，所以無法維持單股的狀態而外露，如圖 6 所示。在不同的變異下使用不同長度的 invader 寡核酸連接到 genomic DNA，probe 寡核酸外露程度會有所不同，因此當使用酵素將外露的部分切下來純化後分析質量，即可知道變異的狀況。此方法最大的好處在於不需經過 PCR 反應，可以直接與 DNA 反應，故可節省分析的時間。且送進質譜儀觀測的分子量範圍較低，故沒有質量太高以及解析度與靈敏度下降的問題。使用此方法曾經有報導過可以直接自 DNA 分析十二種 SNP 的變異<sup>(21)</sup>。

## 四、展望

MALDI-TOF MS 所提供的高靈敏度精確性及快速鑑定，使此技術成為基因突變檢測的重要分析儀器之一。一部 MALDI-TOF MS 在一天內所能分析的突變點可達數千個，比起質譜儀近年在硬體上快速的進展，核酸樣品前處理為整個分析流程中影響分析效率的最大關鍵，聚合酶連鎖反應及其產物純化為最耗時耗財的步驟，從具體可行的觀點來看，MALDI-TOF MS 所需的核酸樣品量只要  $10^{-9}$  mole (pmole) 即可，若能減少聚合酶連鎖反應的用量可有效降低分析成本。此外，多重突變點位的反應及檢測，也可提高分析效率，具備好的檢測靈敏度、快速分析、低分析成本及分析流程全自動化的分析平台仍有相當的突破空間。

在硬體方面，目前商用的 MALDI-TOF MS 所提供的精確度 (mass accuracy) 及解析度 (resolution) 都優於基因突變檢測所需。相對的，價錢居高不下也限制了此技術平台的普遍性。在儀器設計上若能以基因突變檢測為出發點，發展速度更快、容易操作甚或微小化、更經濟的 MALDI-TOF MS，也許這項技術會成為基因研究或臨床檢測的標準程序之一，若能再和微流體裝置 (microfluid device) 結合，隨到隨測的行動檢測平台絕非夢想。

## 參考文獻

1. F. S. Collins *et al.*, *Genome Res.*, **8**, 1229 (1998).
2. J. Tost *et al.*, *Mass Spectrometry Reviews.*, **21**, 388 (2002).
3. Z. Fei *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 950 (2000).
4. J. B. Fenn *et al.*, *Science*, **246** (4926), 64 (1989).
5. M. Karas *et al.*, *Anal. Chem.*, **60** (20), 2299 (1988).
6. L. M. Smith, *Science*, **262**, 530 (1993).
7. E. Nordhoff *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 771 (1992).
8. N. I. Tararenko *et al.*, *Genet. Anal. Biomol. Eng.*, **13**, 87 (1996).
9. C. Jurinke *et al.*, *Anal. Biochem.*, **237**, 174 (1996).
10. A. C. Syvanen *et al.*, *E. Genomics*, **8**, 684 (1990).
11. L. A. Haff *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3749 (1997).
12. D. P. Little *et al.*, *Anal. Chem.*, **69**, 4540 (1997).
13. Z. Fei *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2827 (1998).
14. X. Sun *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **28** (12), e68 (2000).
15. M. Egholm *et al.*, *Nature*, **365**, 566 (1993).
16. D. R. Corey, *Trends Biotechnol.*, **15**, 224 (1997).
17. T. J. Griffin *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **15**, 1368 (1997).
18. P. L. Ross *et al.*, *Anal. Chem.*, **69**, 4197 (1997).
19. J. M. Butler *et al.*, *Anal. Chem.*, **68**, 3283 (1996).
20. V. Lyamichev *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 292 (1999).
21. T. J. Griffin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6301 (1999).

- 
- 陳逸然先生為國立台灣大學分析化學博士，現任中央研究院化學研究所博士後研究員。
  - 廖信凱先生為國立台灣大學生化學所碩士，現任中央研究院化學研究所研究助理。
  - 陳玉如小姐為美國愛荷華州立大學物理化學博士，現任中央研究院化學研究所助研究員。
  - Yet-Ran Chen received his Ph.D. in analytical chemistry from National Taiwan University. He is currently a postdoctoral research associate in the Institute of Chemistry at Academia Sinica.
  - Hsin-Kai Liao received his M.S. in biochemistry from National Taiwan University. He is currently a research assistant in the Institute of Chemistry at Academia Sinica.
  - Yu-Ju Chen received her Ph.D. in physical chemistry from Iowa State University, USA. She is currently assistant research fellow in the Institute of Chemistry at Academia Sinica.