

質譜儀於蛋白質體的應用

Mass Spectrometry in Proteome Application

吳晉任、梁世欣、陳淑慧

Chin-Jen Wu, Shih-Shin Liang, Shu-Hui Chen

由於電噴灑游離法和基質輔助雷射脫附游離法兩種軟性離子源的發明，使得質譜儀成為蛋白質體研究中相當重要且不可或缺的工具。近年來先進質譜儀及相關技術的發展也使其分析能力漸趨成熟。在本文中將介紹現行各種質譜儀的基本原理及其在蛋白質體分析的應用，其應用範圍包含蛋白質的鑑定和搜尋、蛋白質轉譯後修飾的分析，以及蛋白質的定量等領域。

Since the discovery of electrospray ionization (ESI) and matrix assisted laser desorption and ionization (MALDI), mass spectrometry (MS) has become the major player in proteomics analysis. In recent years, the advances in MS instrumentation and related techniques have greatly enhanced the capability and robustness of MS-based platform for proteomics. In this article, we will introduce the principles of MS and related methodologies for applications in proteomics analysis. The application fields in proteomics will include database assisted protein identification, protein post translational modifications and protein quantifications.

一、前言

在過去的研究中，針對複雜的蛋白質樣品通常是以一維及二維膠電泳來進行分離，在一片 20 公分 × 20 公分的膠片上，透過染色的深淺與掃描機器的協助，蛋白質相對含量的多寡得以確定。用此技術在數小時至一天的時間內，可以快速分離數千個蛋白質，但是卻無法鑑定膠片上的蛋白質身分。配合免疫分析的方式，藉由抗體或許可確認特定蛋白質的存在，但無法鑑定未知或無抗體蛋白質的身分。Edman 定序法曠日費時，且較難應用在線上自動化分析。直到 1990 年美國學者 John Fenn 與日本學者 Tanaka 發展出電噴灑游離法 (electrospray ionization, ESI)⁽¹⁾ 與基質輔助雷射脫附游離法

(matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)⁽²⁾ 的軟性游離化技術，才讓質譜儀在蛋白質的分析領域上跨出一大步。從 1995 年發展至今的蛋白質體學 (proteomics)，其淵源來自於澳洲學者 Wasinger 最早在會議中提出「蛋白質體學」這個名詞，而蛋白質體學卻是在基因體定序完成後，利用生物資訊的手段建立起資料庫，再搭配軟性游離化方法與質譜儀器的使用下才有飛快的進展。它所研究的範疇不再是針對單一或少數的蛋白質，而是研究一群蛋白質的特性，其中包含蛋白質的種類、數量、轉譯後修飾 (post-translational modification)、蛋白質的過度表現或抑制，進而尋找生物標記 (biomarker) 分子，或是研究蛋白質之間的交互作用 (protein-protein interaction) 等。

二、質譜儀用於蛋白質體分析的原理

1. 質譜儀的結構

一般用於蛋白質體分析的質譜儀，最主要由四個部分所構成(如圖 1 所示)。離子源讓蛋白質或胜肽氣化並離子化形成帶電荷的離子。經離子源離子化，利用電壓差可將分子離子導入質量分析器，質量分析器則會根據不同分子離子所帶質荷比 (mass-to-charge ration, m/z) 的不同，將不同質荷比的分子離子分離。當離子撞擊到離子偵檢器時，便會產生放大電流，此電流經由訊號讀出裝置(電腦及軟體)的轉換，即生成所見到的質譜圖，電流的大小將間接反應出訊號的強弱。除了上述所提到的四個部分外，質量分析器及離子偵檢器(有時也包含離子源)通常都維持在真空的環境下操作與外界隔絕。離子源及質量分析器的種類非常多，下面的內容只針對一般常用於蛋白質體分析的離子源和質量分析器作簡單的介紹。

(1) 離子源

離子源 (ion source) 主要的功用在於將固態或液態的蛋白質或胜肽樣品游離，產生氣態的分子離

子，而會用在蛋白質體分析的質譜儀之離子源就如前言所談到的有「電噴灑游離法」與「基質輔助雷射脫附游離法」兩種。

① 電噴灑游離法

1984 年美國學者 John Fenn 所發展的電噴灑游離法，是先在拉尖的毛細管上鍍薄層金屬，並在毛細管與進入質譜儀的入口間加一相對電極(二者距離約 1-2 公分，電場約 2000-3000V)。事先酸化的樣品經分離後，由拉尖的毛細管噴向質譜儀的入口，因為液體的表面張力，一開始會在毛細管尖端形成液珠，相對電極的負電會使液珠表面生成正電，一旦靜電吸引力大於表面張力，電噴灑便開始形成，這時候噴灑會形成圓錐狀，稱為泰勒錐 (Taylor cone)。John Fenn 本人戲稱是幫巨大的生物分子裝上了翅膀。樣品經高電場而形成帶有多價正電荷的液珠，液珠經氣體去除溶劑，最後產生氣態的分子離子進入質譜儀內分析(如圖 2 所示)。

② 基質輔助雷射脫附游離法

基質輔助雷射脫附游離法則是日本學者田中耕一 (Koichi Tanaka) 所發展。在 1960 年代就有人使

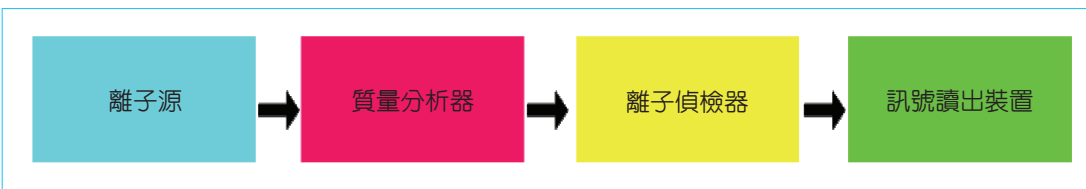


圖 1. 質譜儀的結構圖。

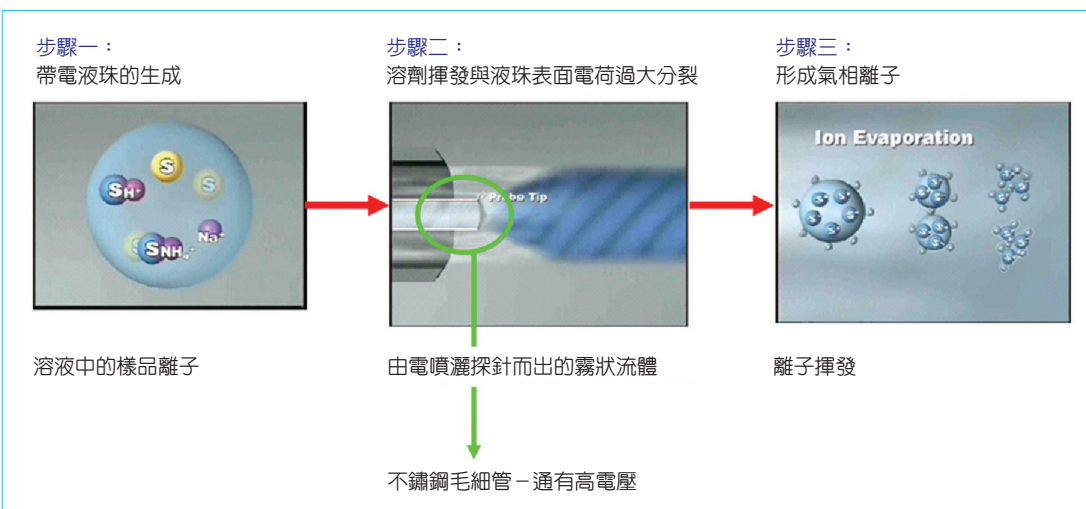


圖 2. 電噴灑法示意圖 (本圖由美商沃特斯國際股份有限公司台灣分公司提供)。

表 1.
各型質量分析器可以分析的質荷比範圍及其解析度。

質量分析器	四極柱質量分析器	具有離子阱功能的四極柱質量分析器	飛行時間質量分析器	離子阱質量分析器	具有傅利葉轉換功能的離子阱質量分析器
質荷比範圍	50—2800	50—2800	無質量限制	50—4000	50—4000
解析度	3000—4000	8000—9000	14000—20000	8000—10000	約 100000

用單獨的雷射光進行游離化，但是生物分子接觸到高能雷射，往往會斷裂成小分子而造成分析的困擾，所以田中使用大約 300 埃的鈷金屬粉末與甘油當作吸收雷射光的基質，基質將光能轉變為自身的動能，與分析物一同飛入質譜儀中，並進一步將分子給離子化 (如圖 3 所示)。田中所使用的鈷金屬粉末有毒，德國的 Hillenkamp 則改良使用無毒的小分子有機酸，如 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid 當基質，目前都是以 Hillenkamp 所發展的方法為主流技術。

(2) 質量分析器

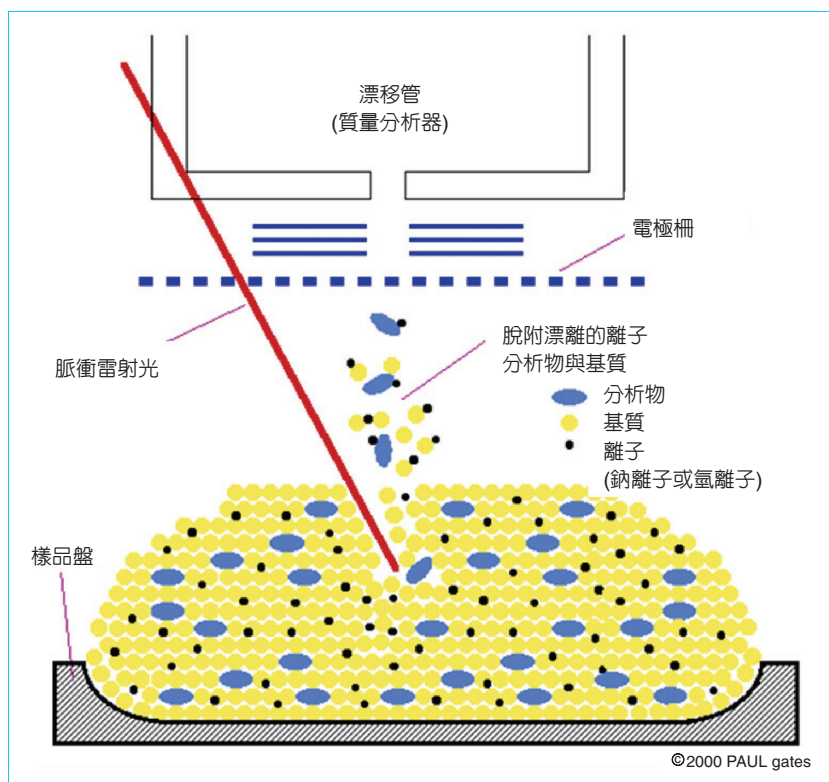
主要的功用在於分離不同質荷比的離子，用在

蛋白質體分析的質量分析器 (mass analyzer) 通常有「四極柱」(quadrupole)、「飛行時間」(time-of-flight) 與「離子阱」(ion trap) 等三種。表 1 列出上述各種質量分析器可分析的質荷比範圍和其解析度。

① 四極柱質量分析器

四極柱主要由四根平行的電極棒所構成 (如圖 4 所示)，每個相對的電極棒都連通直流電，其中一對連接在直流電的正端，另外一對則連接在直流電的負端。除了連接直流電外，每對棒子還施與 180 度相位差的可變無線電交流電。藉由改變直流電及交流電的電壓，可讓每個時間點只有特定質荷比的離子穿越四極柱而到達離子偵檢器。其他不同

圖 3.
基質輔助雷射脫附游離法的示意圖 (本圖由美商沃特斯國際股份有限公司台灣分公司提供)。



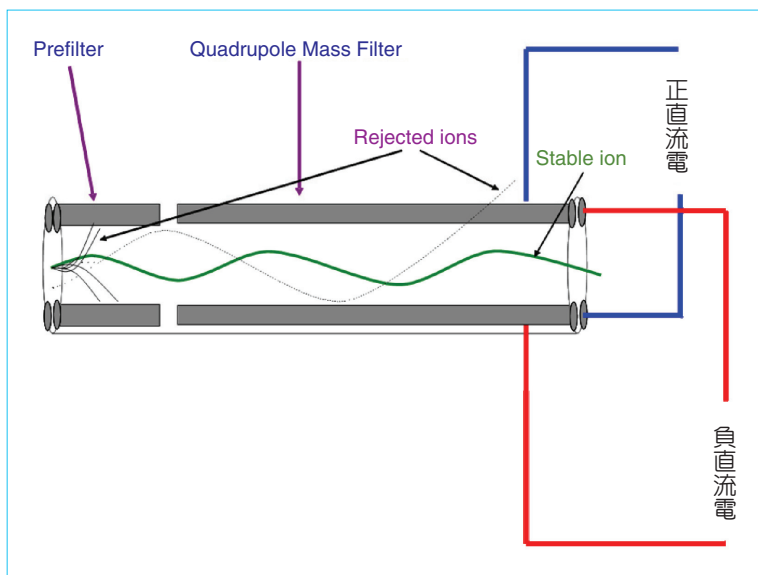


圖 4. 四極柱質量分析器的結構圖(本圖由美商沃特斯國際股份有限公司台灣分公司提供)。

質荷比的離子則會被偏轉撞向四極柱而形成中性的分子。四極柱擁有快速掃描不同質荷比離子的優點，常被用於當作串聯式質譜儀(於後面的章節詳述)前端的質量分析器，但是其解析度較差。

② 飛行時間質量分析器

飛行時間質量分析器的結構如圖 5 所示，蛋白質或胜肽經由離子源產生離子化後，被集中在飛行時間質量分析器的前端，之後以幾千或幾萬伏的電壓差施加於離子，使所有離子帶有相同的動能，且進入漂移管中。因為所有離子都具有相同的動能，所以質量小的離子會以較快的速度在漂移管中移動，質量大的離子則以較緩慢的速度行進，藉此來

分離不同質荷比的離子。此型的質量分析器在分析分子離子方面，具有無質量限制的優點。現行用於蛋白質體分析的飛行時間質譜儀，為了增加圖譜的解析度，通常會加裝反射器(refelctron)來增加離子的解析度，反射器亦可幫助偵測後離子源衰減(於後面的內容詳述)所產生的碎片。

③ 離子阱質量分析器

離子阱質量分析器主要是由一個環狀電極(ring electrode)與上下兩個半橢圓形的電極(end cap electrode)所構成(如圖 6 所示)。離子阱與四極柱都是利用控制交流電電場的頻率來進行掃描，讓欲分析的帶電離子在空腔中運動，只不過離子在四極

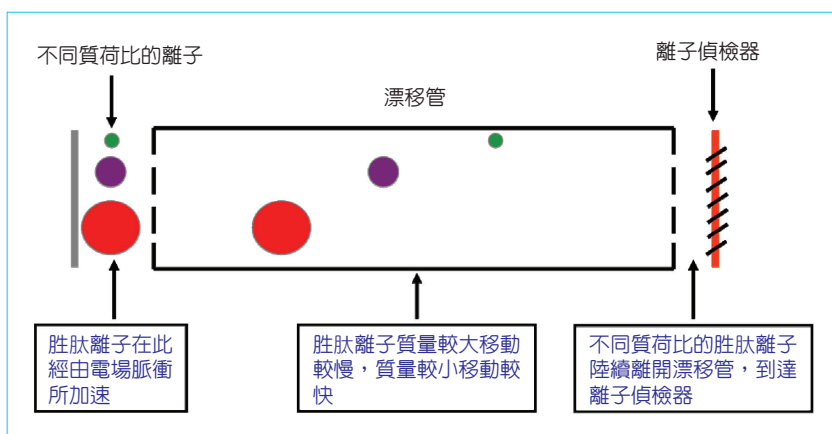


圖 5. 飛行時間質量分析器的結構圖。

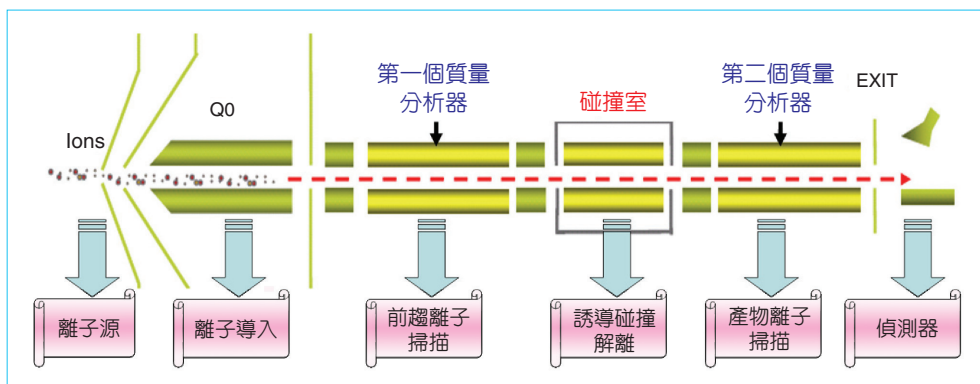


圖 8. 串聯式質譜儀對胜肽進行碰撞誘發鍵解反應的示意圖 (本圖由美商應用生命系統股份有限公司台灣分公司提供)。

程稱為子離子掃描。如果再選擇一產物離子，回到碰撞室，再進行第二次碰撞，並量測其斷片訊號與質荷比，即成為三段式質譜 (MS/MS/MS)。若使用離子阱當作質量分析器，該行為是可以一直重複不斷的進行，即產生所謂的 MSⁿ。碰撞後胜肽鍵最易產生斷裂，而在 N 端形成的帶電的離子稱為 b 離子，C 端形成的帶電離子稱為 y 離子。在 MS/MS 圖譜中，b 離子和 y 離子的右下方都會標有數字，這個數字即是此碎片離子所含胺基酸的數目。

圖 9 為胜肽以串聯式質譜儀的子離子掃描所測得的 MS/MS 圖譜。另一種碎裂模式則是利用電子轉移 (electron transfer dissociation, ETD) 的方式進行碎裂，這是一種化學游離法，利用外加陰離子將電子轉移給待分析的離子而進行碎裂，由於碎裂較完整，除胜肽鍵外，易產生其他主鏈化學鍵之斷裂，

產生 c 與 z 離子，且易保留磷酸鍵，因而對胜肽定序及化學修釋之鑑定非常有助益。

現行商業化的串聯式質譜儀種類相當繁多，應用的範圍廣泛且各有優缺點，以下針對幾種目前蛋白質體分析最常用的串聯式質譜儀作介紹。

(1) 基質輔助雷射脫附離子化暨飛行時間串聯質譜儀 (MALDI-TOF MS)

此種組合的質譜具有簡單及耐用等特性，但因無法結合線上 (on-line) 的液相層析系統對複雜的樣品作分離，所以在質譜分析前，樣品可以用 off-line 的液相層析系統作分離，並將分離後的樣品各別點在樣品盤上，加入基質之後進行分析。除此之外，在裝有反射器的基質輔助雷射脫附離子化—飛行時間質譜儀上，還可以運用後離子源衰減 (post-

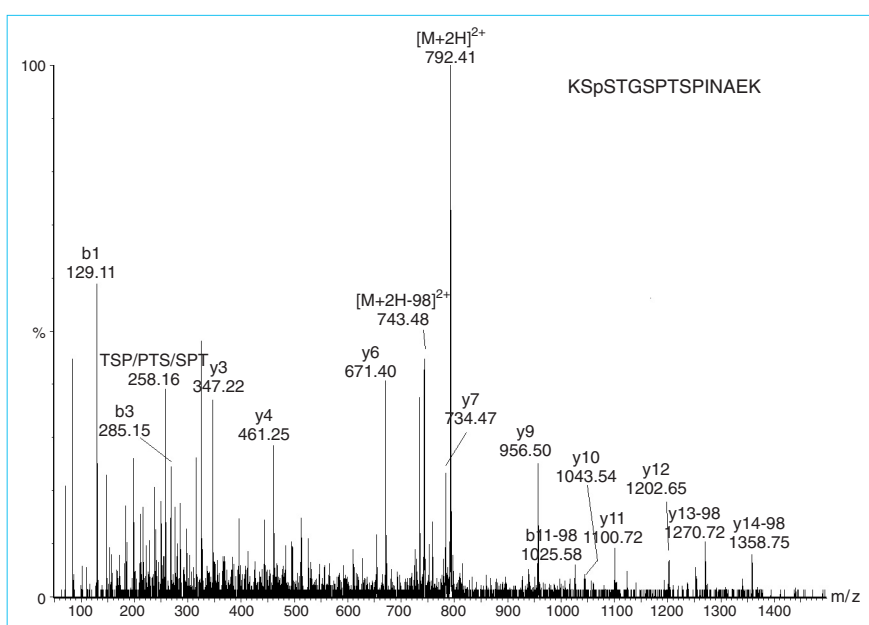
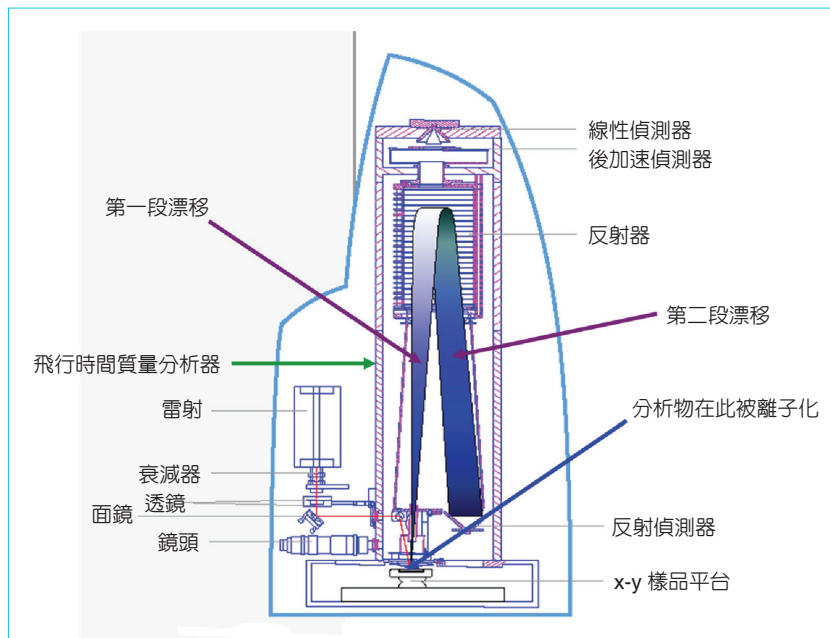


圖 9. 胜肽經碰撞誘發鍵解之後的 MS/MS 圖譜。

圖 10.
基質輔助雷射脫附離子化－飛行時間質譜儀的結構示意圖 (本圖由美商沃特斯國際股份有限公司台灣分公司所提供)。



source decay, PSD) 圖譜，即所謂的 MS/MS 圖譜，由胜肽的胺基酸序列來鑑定蛋白質。圖 10 為這型質譜的結構圖，當胜肽被雷射光源離子化並加速進入飛行時間質量分析器時，因為胜肽離子具有相當高的能量，所以在第一段的漂移過程會產生自我碎裂，並與其他沒有碎裂的胜肽離子等速且同時到達反射器。在反射器的反電場作用力下，碎片離子會有飛行距離較短的偏轉，並較沒有碎裂的胜肽離子早一步離開反射器，相反地沒有碎裂的胜肽離子則有飛行距離較長的偏轉。不同質荷比的碎片離子在離開反射器後，又陸續在第二段漂移時一一的被分離，最後到達離子偵檢器，並產生帶有胜肽胺基酸序列訊息的 MS/MS 圖譜。但由胜肽離子產生自我斷裂的比例很低，故對偵測 MS/MS 圖譜而言靈敏度較差。因此如果要有靈敏度較佳的 MS/MS 圖譜，現行此種商業化的質譜儀皆會再加上第二組的飛行時間質量分析器。此時胜肽離子則會使用前面所述的碰撞誘發鍵解反應來作碎裂，並用第二組的飛行時間質量分析器來對子離子作偵測。在完整蛋白質的偵測上，也可利用此儀器根據蛋白質會帶多電荷的特性，從不同波峰所帶的電荷數不同來算出蛋白質的分子量，或從此圖譜來確認樣品中是否有所要的蛋白質存在，甚至可從所得的質量確認蛋白質有無任何修飾。

(2) 電噴灑離子化－四極柱暨飛行時間串聯式質譜儀 (ESI-Q-TOF MS)

電噴灑離子化－四極柱暨飛行時間串聯式質譜儀為一般蛋白質體分析實驗室所普遍使用的機器，此型質譜儀的前端通常連接液相層析系統，利用梯度沖提的方式將胜肽依序在層析管柱分離後進入質譜儀分析。此串聯式質譜儀由兩組四極柱質量分析器和一組具有反射器的飛行時間質量分析器所構成，四極柱質量分析器位於飛行時間質量分析器之前 (如圖 11 所示)。第一組四極柱質量分析器用來對不同質荷比的胜肽離子作掃描及篩選，讓不同質荷比的胜肽離子依序進入第二組四極柱質量分析器。第二組四極柱質量分析器在此不作掃描的工作，而是當作碰撞室用，將胜肽離子碎裂。碎裂後的碎片離子則在飛行時間質量分析器作質量的量測。該型質譜儀之所以會廣泛的用在蛋白質的鑑定，是因為它具有良好的質量準確度及解析度。現行最新的商業化機器除了可以對不同質荷比的離子作分離外，更可對相同質荷比但結構形狀不同的異構物作區分。

(3) 電噴灑離子化－四極柱與離子阱串聯式質譜儀 (ESI-Q-Trap MS)

現行此種類型的商業化質譜儀包含兩種，一種是使用前述內容的串聯式四極柱質量分析器之第三

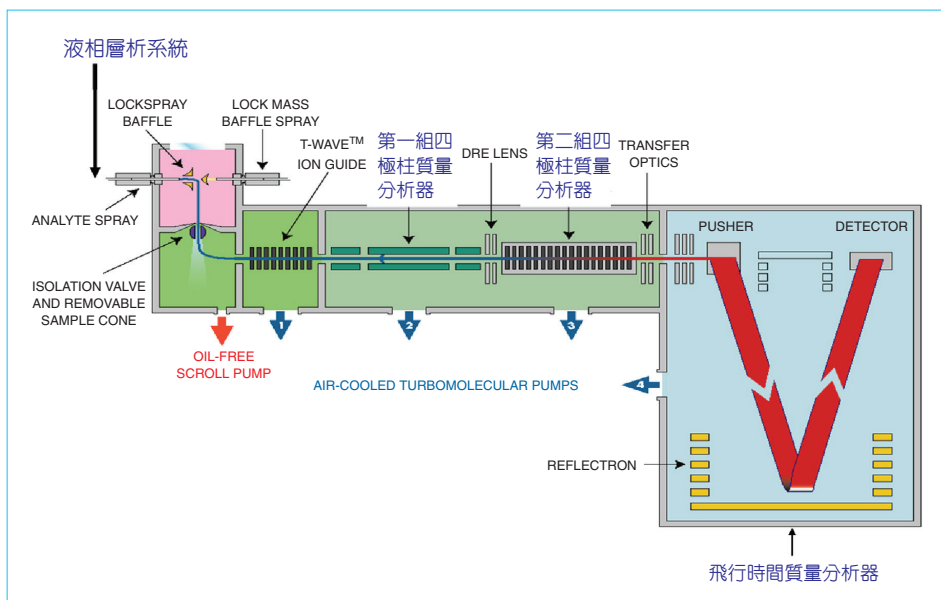


圖 11. 電噴灑離子化—四極柱暨飛行時間串聯式質譜儀的結構示意圖 (本圖由美商沃特斯國際股份有限公司台灣分公司提供)。

組四極柱質量分析器，以改良後所設計成具有捕捉離子功能的離子阱取代，此種機器稱為 **Q-Trap**。另一種就是搭配 **orbitrap** 的傳統離子阱，在蛋白質體領域較常被使用的該款質譜儀為 **LTQ-Orbitrap**。**Q-Trap** 的儀器結構類似圖 8 所示，主要由三組的四極柱質量分析器所構成，第二組四極柱不具掃描的功能，只用來碎裂前驅離子，而第三組四極柱質量分析器則同時具有離子阱和掃描的功能。另一種 **LTQ-Orbitrap** 質譜儀其設計如圖 12 所示，此種質譜儀的優點即是準確度高及掃描速度快，不過此型的串聯式質譜儀較傳統離子阱的質譜儀來得昂貴。但是這類型的儀器由於具有相當高的質量解析度 ($\text{resolution} > 60,000$) 及精確度還有掃描速度快等優勢，非常有助於肽序列的判斷。

上述兩種類型的質譜儀在蛋白質體的分析上各有其優點，**LTQ-Orbitrap** 因為有好的質量準確度及解析度，較適合使用在蛋白質的鑑定及修飾基的分析。相反地，**Q-Trap** 則非常適合用於蛋白質定量的研究。

除了上述所提到三種常用在蛋白質體分析的質譜儀外，另有多種不同的串聯式質譜儀可供選擇，如 **MALDI-Q-Trap** 與 **MALDI-Q-TOF** 等，這些串聯式質譜儀在不同的蛋白質體分析需求上都有不錯的表現。

3. 質譜分析數據如何應用於蛋白質的鑑定

前言中提到，蛋白質一開始是使用 **Edman** 定序的方法取得資訊，基因體被決定之後，可以由互

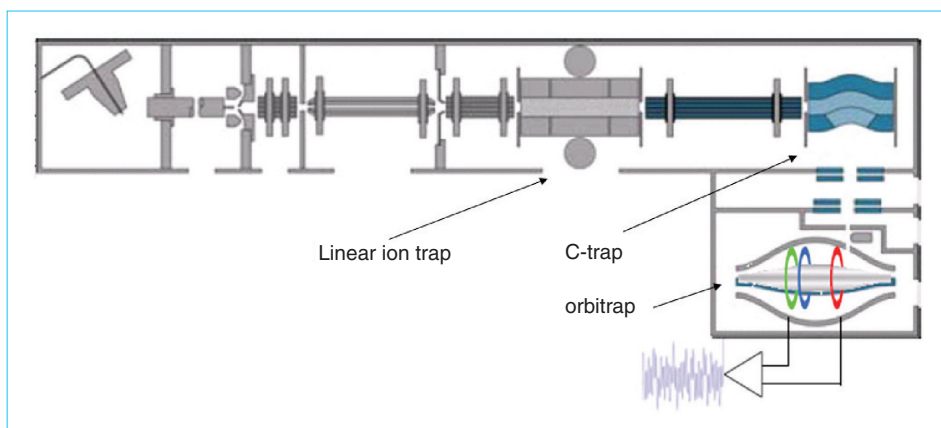


圖 12. 電噴灑離子化—離子阱串聯式質譜儀的結構圖 (本圖取自 <http://www.thermo.com/>)。

補 DNA 的方式，再利用電腦演算，大量取得蛋白質的序列而貯存成一資料庫。由質譜儀所得的數據，便可以經由搜尋軟體的協助，進行序列的比對來鑑定蛋白質。先將取得的蛋白質樣品進行初步的分離，再利用酵素 (如胰蛋白酶，trypsin) 進行消化反應，將蛋白質消化成較小片斷的胜肽，使用質譜儀進行分析，所得到的數據經蛋白質鑑定軟體轉檔，利用網路進行線上或 in house 的資料庫搜尋比對與呈現比對後的報告。

二、串聯式質譜儀在蛋白質體分析的應用

1. 以串聯式質譜儀對磷酸化蛋白質作分析

在蛋白質體的研究中，利用質譜儀分析蛋白質的修飾基為一門相當重要的工作，因為蛋白質上所帶有不同的修飾基及其不同的修飾位置，都夾帶著很多重要的生理訊息，而此種修飾稱為「轉譯後修飾」(post-translational modification)，這是無法由基因體密碼所得知的⁽³⁾，所以該修飾基必須直接被分析。修飾基的種類相當多，一般有磷酸化 (phosphorylation)、甲基化 (methylation)、乙醯化 (acetylation)、泛素化 (ubiquitination) 及醣基化 (glycosylation) 等，在本節的內容以分析磷酸化蛋白質作例子，詳述如何利用串聯式質譜儀對該修飾基作鑑定。

生物體內酵素的活化與去活化、細胞間的訊號傳遞、細胞的生長、分化與凋亡等，大部分都是透過 kinase 酵素磷酸化與 phosphatase 酵素去磷酸化來達到調控的目的⁽⁴⁾。而所謂的「磷酸化」是指一個磷酸根分子 (H_3PO_4) 接在胺基酸序列的絲胺酸 (serine)、羥丁胺酸 (threonine) 或酪胺酸 (tyrosine) 的氫氧基上，並脫掉一分子的水。但是在分離與分析轉譯後修飾的磷酸化蛋白質卻有其困難度。原因如下：(1) 磷酸化蛋白質含量極少。(2) 真實樣品複雜度很高。(3) 磷酸化胜肽較不易離子化。(4) 修飾磷酸根之後的產物穩定性不佳。傳統的分析都是使用放射性同位素磷 32 (^{32}P) 標定蛋白質的磷酸化位置，並搭配降解法 (Edman degradation) 來找出磷酸化在蛋白質中的位置^(5,6)，可是降解法對定序仍有

許多的限制^(7,8)。由於串聯式質譜儀的發展，使得質譜儀已變成大家對磷酸化胜肽作定序及胜肽上磷酸化位置作定位更常被使用的工具。

雖然質譜儀對磷酸化位置的定位和胜肽的定序能力是無庸置疑地，也沒有降解法所產生的限制，但是在大部分的例子中，磷酸化胜肽於質譜中的訊號常被來自同一樣品中其他高濃度沒有磷酸化胜肽的訊號所抑制，即使樣品中只含有一個蛋白消化後所產生的胜肽 (樣品複雜度較低)，且經過液相層析管柱的分離，可是與磷酸化胜肽同一時間被沖出管柱且較偏鹼性的胜肽 (即同一時間進入質譜的胜肽) 一樣會抑制磷酸化胜肽的訊號。通常有兩種方法可以克服這種問題，第一個是在進入質譜分析前，先對磷酸化胜肽進行純化，以除去其他沒有磷酸化的胜肽。第二個是依據磷酸化胜肽在質譜偵測的碎裂過程會產生特定碎片的特性，使用軟體選擇性地只針對磷酸化胜肽作偵測⁽⁹⁾。前者的方法現在最常用的有離子交換 (ion exchange)⁽¹⁰⁾ 和金屬親和性 (metal ion affinity)^(11,12) 兩種，但是這兩種方法除了會對磷酸化胜肽作純化外，也會非選擇性地純化酸性的胜肽，雖然之後有研究者以酯化 (esterification) 的方法來解決此問題，可是卻衍生出另一個反應不完全的限制⁽¹³⁾。綜合以上所述，如果想要有效且準確的對磷酸化胜肽作定序，後者所使用的方法可說是最簡單也最省時，而此種方法通稱為「母離子掃描」(precursor ion scanning)。在前面內容所提到的 Q-Trap 和 LTQ-Orbitrap 等串聯式質譜儀皆有該項掃描功能。

為何可用母離子掃描模式從磷酸化胜肽和非磷酸化胜肽的混合物中，只選擇性地偵測磷酸化胜肽而不去看非磷酸化的胜肽呢？這是因為磷酸化胜肽在質譜儀以負電荷模式掃描的情況下，經過 CID 後，會從其上的磷酸根產生質荷比 $-79 (PO_3^-)$ 的碎片，但是大部分的非磷酸化胜肽則不會產生此碎片，因此依據這個特性對磷酸化胜肽作選擇性的偵測。如圖 13 所示，當樣品經液相層析管柱分離且離子化後，會進入串聯式質譜儀的第一組質量分析器 (Q1) 進行全掃描，分離後的胜肽會個別進入碰撞室中，在此只有磷酸化胜肽會產生質荷比 -79 的碎片，第二組的質量分析器則是固定掃描來自碰撞

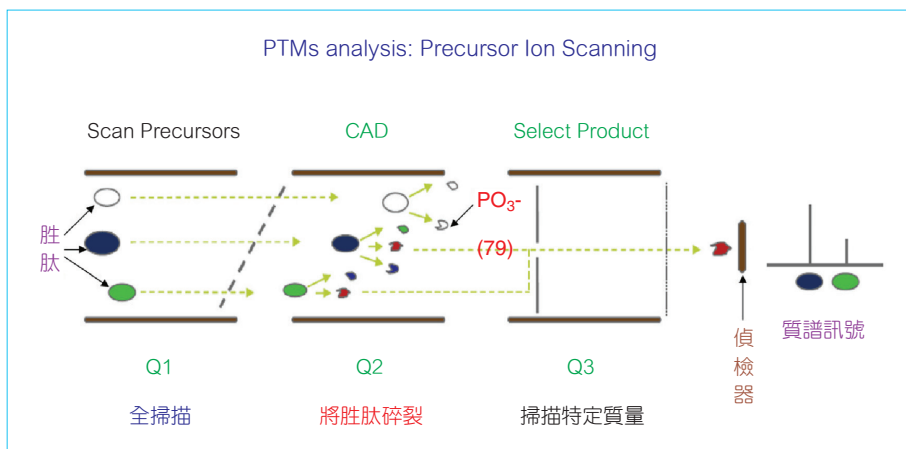


圖 13. 利用四極柱串聯式質譜的 -79 母離子掃描模式，選擇性偵測磷酸化胜肽之示意圖 (本圖由美商應用生命系統股份有限公司台灣分公司提供)。

室 -79 的碎片，藉此來達到選擇性偵測磷酸化胜肽的目的。一旦質譜偵測到有磷酸化胜肽的存在，質譜儀會瞬間切換到正電荷模式的子離子掃描 (product ion scan)，這時第一組分析器只會允許此質荷比的磷酸化胜肽通過，磷酸化胜肽到達碰撞室時，會和之前母離子掃描模式一樣讓磷酸化胜肽產生碎裂，這些碎裂所產生含有此磷酸化胜肽不同胺基酸訊息的子離子碎片，會被加速到第二組質量分析器，此時第二組四極柱質量分析器具有離子阱的功能，把所有子離子碎片困住，之後再依質荷比依序丟出子離子碎片到離子偵檢器，最後會根據這

些不同子離子的質量到蛋白質資料庫去作比對，進而找出磷酸化胜肽的序列及相對應的蛋白質。

圖 14 為將個別濃度 5 fmol 的 7 個磷酸化胜肽 (LRLSSpSSGRLR、KRRQIpSIRGIV、YPTAMpTSPR、IVADQpTPTPTR、RYPRVpSVPPpSPSLR、LLLRLpSENSG 和 KFELLpTPPLSPRRSG) 與 500 fmol 的乳糖酵素蛋白 (beta-galactosidase) 經胰蛋白 (trypsin) 消化後所產生的非磷酸化胜肽作混合，以線上液相層析管柱作分離且用四極柱串聯式質譜儀的母離子掃描和子離子掃描所得的質譜圖。圖 14(a) 為整個分析過程的

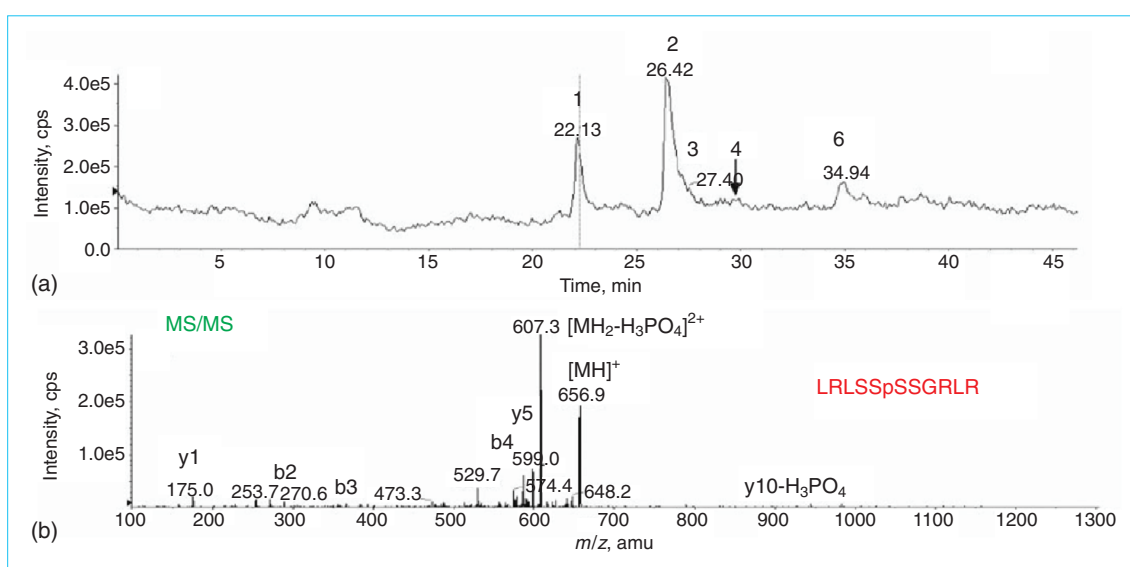


圖 14. 以四極柱串聯式質譜儀的 -79 母離子掃描模式分析個別濃度 5 fmol 的 7 個磷酸化胜肽與乳糖酵素蛋白經胰蛋白消化後的混合樣品。(a) 以 -79 母離子掃描分析此樣品所得的層析圖，(b) 以子離子掃描偵測當中某一個磷酸化胜肽 (LRLSSpSSGRLR) 所得的 MS/MS 圖譜⁽¹⁹⁾。

層析圖，從此圖可以看出在磷酸化胜肽和非磷酸化胜肽於濃度 1 : 100 如此大的懸殊比例下，以母離子掃描的模式對磷酸化胜肽所產生 -79 的碎片作選擇性的偵測，不但沒有出現先前所講來自非磷酸化胜肽的抑制效應，也可以從如此低的濃度中清楚的找到 5 個磷酸化胜肽。而圖 14(b) 則是取 5 個磷酸化胜肽當中的一個磷酸化胜肽 (LRLSSpSSGRLR)，以子離子掃描作檢測所得的 MS/MS 圖，由圖中含不同胺基酸的子離子片段和蛋白質資料庫作比對，即可以順利找出磷酸化胜肽的序列，並且從圖中出現分子離子 ($[MH]^{2+}$) 掉落磷酸根的片段離子 ($[MH_2-H_3PO_4]^{2+}$)，更可以得知此胜肽的確為磷酸化胜肽。

由以上的討論可以得知，以 -79 的母離子掃描模式來檢測磷酸化胜肽，即使是分析複雜的樣品也不會有抑制效應的形成，而且結合四極柱串聯式質譜儀與類似離子阱的功能，更可以有效地在非常低的濃度情況下，對磷酸化胜肽完成定序的工作。

2. 以「多重反應監控掃描模式」來鑑定確認蛋白質標記

蛋白質標記及目標蛋白常成為臨床上判斷疾病產生與否的重要關鍵，除此之外，也可提供相當重要的生理訊息。現行要證實蛋白質標記或目標蛋白是否存在，通常都是使用免疫分析 (immunoassay) 的方法，因為此方法具有專一性、高靈敏度以及能大量快速分析的特點。然而發展可信賴的免疫分析通常花費相當昂貴，而且需要一段長時間的實驗過程，最主要要能夠找到一個專一性非常好的抗體。

由於抗體的關係，因此限制了免疫分析對不同目標蛋白質的分析能力。但是由於近幾年質譜儀技術的進步，在蛋白質體的領域中以質譜儀來找出診斷上的蛋白質標記已經成為另一項取代免疫分析且更受歡迎的策略。以下將詳述如何利用四極柱串聯式質譜儀的「多重反應監控掃描模式」(multiple reaction monitoring) 來鑑定蛋白質標記。

蛋白質標記或有興趣的目標蛋白在複雜的生物樣品中通常僅存在幾百皮克 (picogram) 至幾皮克的範圍，所以要有有效的鑑定蛋白質標記或目標蛋白是否存在並且對它作定序，則需要靈敏度非常高的質譜。以擁有離子阱功能的四極柱串聯式質譜儀或是使用離子阱串聯式的儀器在多重反應監控掃描模式下，對此濃度範圍的蛋白質作鑑定，已經可以達到有效的定序能力⁽¹⁴⁾。圖 15 為多重反應監控掃描模式鑑定蛋白質標記或目標蛋白的流程圖。一開始我們將所要鑑定目標蛋白的胺基酸序列放入軟體中，並選擇所用來消化蛋白質的酵素 (如圖 16(a) 所示)，軟體會依據所選的酵素自動計算目標蛋白消化後產生的胜肽及其質量，進一步算出此胜肽的質荷比 (電荷通常為 +2 及 +3)。軟體得知母離子的質荷比後，會推測母離子在經過碰撞碎裂後，可能產生訊號最強且含此胜肽胺基酸訊息的子離子 (通常選擇比母離子質量還大的第一個 y 離子或 b 離子)，最後形成許多母離子 / 子離子對 (如圖 16(b) 所示)。串聯式質譜儀就會依據這些母離子 / 子離子對來監測樣品是否有目標蛋白的存在。一旦樣品中有胜肽符合軟體所設的母離子 / 子離子對，就會在如圖 15 所示的層析圖中出現波峰，不同的母離

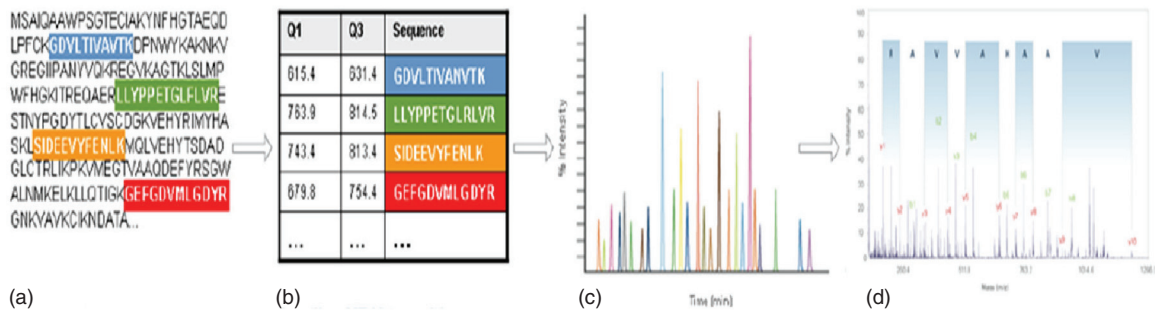


圖 15. 以多重反應監控掃描模式對目標蛋白進行鑑定之流程圖。(a) 目標蛋白的胺基酸序列，(b) 母離子與子離子的配對，(c) 以多重反應監控掃描模式檢測目標蛋白之層析圖，(d) 子離子掃描所得之 MS/MS 圖。(本圖由美商應用生命系統股份有限公司台灣分公司所提供)。

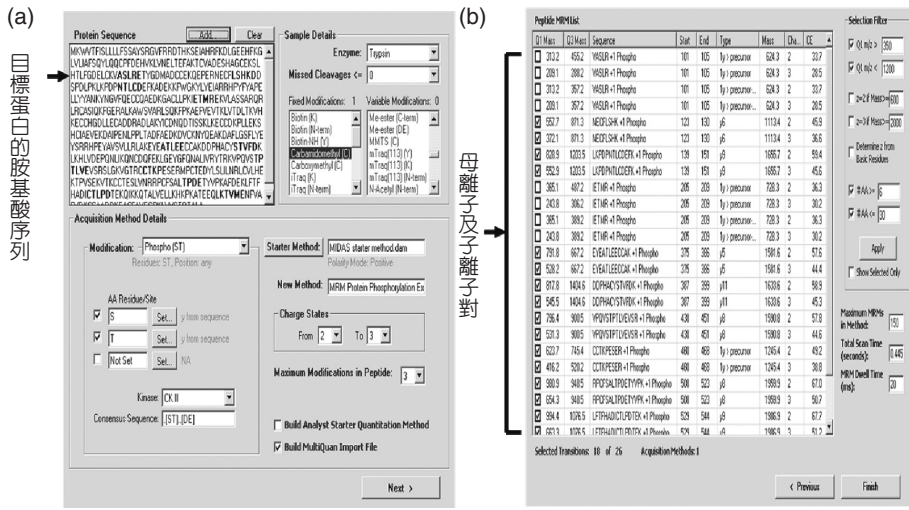


圖 16. (a) 將目標蛋白之胺基酸序列及所用酵素輸入軟體後的示意圖，(b) 軟體產生母離子/子離子對後的示意圖。

子/子離子對會以不同顏色的波峰來表示。質譜儀在偵測到我們所要的母離子/子離子對時，會把肽段進行碎裂並轉去作子離子掃描，且由類似圖 15 子離子掃描的 MS/MS 圖中找到足夠胺基酸碎片的資訊，對肽段作定序。

以多重反應監控掃描模式來找尋目標蛋白為何可以有較佳的靈敏度？這是由於此模式偵測目標蛋白的肽段時，第一組分析器只允許和所設母離子質荷比相同的離子通過，第二組分析器也只會讓吻合質量的子離子通過 (如圖 17 所示)，在一般的情況下，只有來自目標蛋白的肽段和其子離子可以通過。因此相較於其他質譜的全掃描，多重反應監控模式通常有非常低甚至幾近於零的背景雜訊，故有相當好的訊雜比 (S/N ratio)。另一個原因是：如果以全掃描來鑑定真實樣品中含量很低的目標蛋白時，因為組成複雜，雖然經過線上液相層析管柱的分離，但來自目標蛋白的肽段流出管柱的同時，仍會夾帶許多濃度遠較目標肽段濃度來得高的肽段，質譜儀掃描會先對這些高濃度的肽段作鑑定，而忽略我們所要看的目標肽段，因此即使目標肽段有存在於樣品中，也不會被質譜儀找到，這與前一節所談到的抑制效應類似。然而多重反應監控掃描模式則不會有此問題，它會優先檢測目標肽段。多重反應監控掃描模式除了可以特定地對目標蛋白質的一般肽段作鑑定外，也可以對有修飾的肽段作檢測，例如磷酸化。只要將目標蛋白的胺基酸序列放入，在軟體上選擇欲觀察的修飾，軟體會自動產生一組

符合有修飾基肽的母離子/子離子對。一般而言，若是想看特定蛋白的磷酸化修飾，會比較適合以多重反應監控掃描模式來作檢測。但是如果是針對複雜的未知樣品中大量磷酸化肽段的鑑定，則比較適合 -79 的母離子掃描模式。以下將以幾個實際的應用，來顯現多重反應監控掃描模式的優勢。

圖 18 為以多重反應監控掃描模式對 10 fmol 的酪蛋白 (α -casein) 經胰蛋白消化後所產生的肽段與 4 fmol 的血纖維肽 ([Glu]-fibrinopeptide) 之混合樣品的分析。在這個分析過程中，酪蛋白及血纖維肽的胺基酸序列被同時放入軟體中，並選用胰蛋白作為使用的酵素。最後選定來自酪蛋白的磷酸化肽段及血纖維肽所產生的母離子及子離子對為

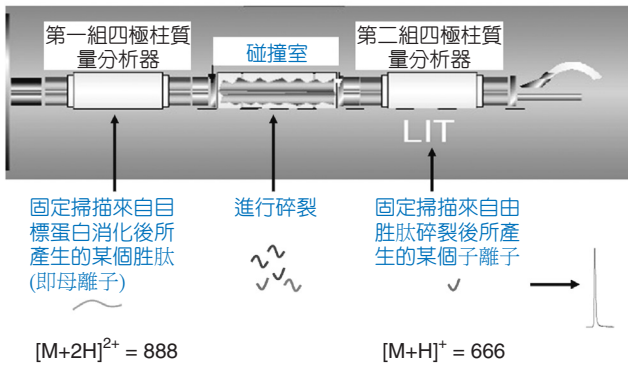


圖 17. 以多重反應監控掃描模式鑑定特定肽段時，串聯式質譜其四極柱的運作圖 (本圖由美商應用生命系統股份有限公司台灣分公司提供)。

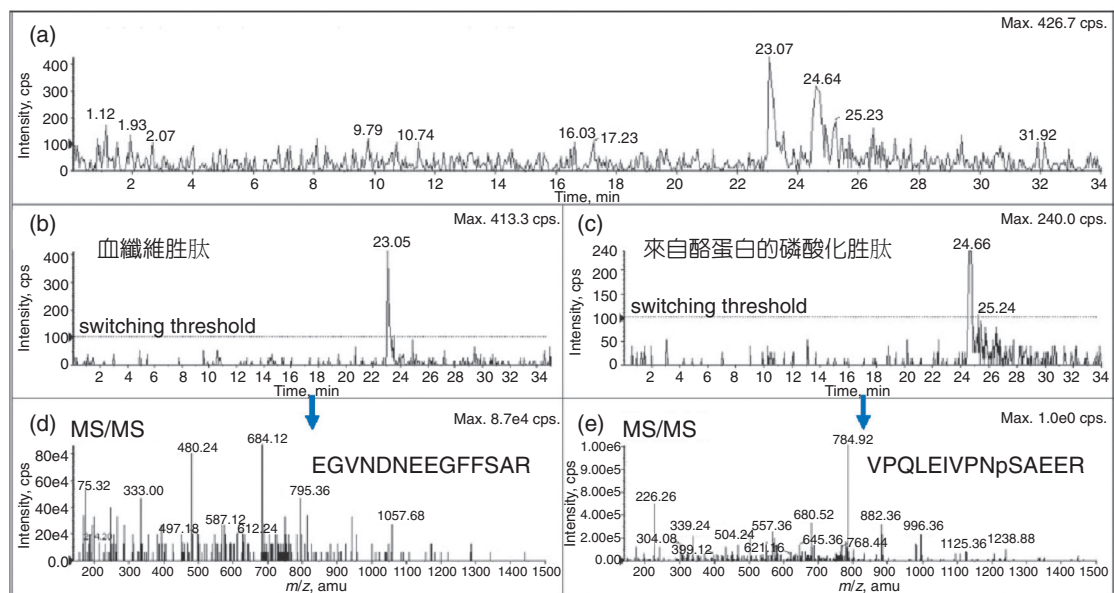


圖 18. (a) 多重反應監控掃描模式之層析圖，(b) 自圖 (a) 篩選血纖維胜肽的母離子／子離子對後所得的層析圖，(c) 自圖 (a) 篩選酪蛋白的磷酸化胜肽的母離子／子離子對後所得的層析圖，(d) 血纖維胜肽的 MS/MS 圖，(e) 酪蛋白的磷酸化胜肽的 MS/MS 圖⁽²⁰⁾。

偵測的對象。由圖 18(a) 多重反應監控掃描模式的層析圖中，可以清楚的看到明顯有母離子／子離子對在管柱滯留時間 22 分到 26 分之間被四極柱串聯式質譜儀所偵測到。圖 18(b) 和 18(c) 則是分別以血纖維胜肽及來自酪蛋白之磷酸化胜肽的母離子／子離子對用軟體從圖 18(a) 作篩選所得的圖譜。在圖 18(b) 的 23.05 分鐘和圖 18(c) 的 24.66 分鐘皆有波峰出現，明確的顯示四極柱串聯式質譜儀的確偵測到來自兩者相當低濃度的血纖維胜肽及酪蛋白的磷酸化胜肽。為了準確地對兩個胜肽作定序，也以子離子掃描來取得兩個胜肽的 MS/MS 圖，從圖 18(d) 和 (e) 的 MS/MS 圖中的碎片離子質量與資料庫作比對，可以清楚的找到胜肽的胺基酸序列。

綜合以上所述，以多重反應監控掃描模式來鑑定微量的目標蛋白或其修飾，不僅擁有好的偵測靈敏度及訊雜比，也比傳統免疫分析法有較少的花費及較高的準確度。

3. 以串聯式質譜儀對蛋白質作定量

質譜儀在蛋白質體的領域完成蛋白質修飾基的分析及蛋白質身分的鑑定等工作後，也逐漸將應用

的方向轉移到蛋白質的定量。其主要的研究目的是針對治療疾病前後、外在藥物刺激或探討體內新陳代謝等情況下，生物體體內及體外蛋白質的差異表現變化，從找出的定量結果可以讓我們知道許多有用的資訊，如生物體對不同藥物的反應作用、體內生理訊息的傳遞途徑及疾病的致病原因等，其中最熱門的主題，便是生物指標 (biomarker) 的尋找。

有數種協助研究者定量的工具或是質譜儀的技術，其中同位素 (isotope) 標定法是可直接以質譜偵測之離子訊號進行定量分析。同位素的標定依反應的階段不同分成兩大類：體內標示 (*in vivo labeling*) 與體外標示 (*in vitro labeling*)。體內標示以細胞培養為例，通常會在培養初期加入含同位素的培養基質如氮 14 (^{14}N) 和氮 15 (^{15}N)⁽¹⁵⁾ (如圖 19 所示)，之後給予不同的刺激或實驗參數，讓相關的蛋白質表現。最後萃取兩組細胞的蛋白質並等量混合，經純化、分離與水解消化之後，以質譜儀鑑定蛋白質的相對強度。在體外標示的部分，有相當多的同位素標定方法可供選擇，市面上可買到的有 ICAT (isotope-coded affinity tag)⁽¹⁶⁾ 與 iTRAQ (isobaric tagging for relative and absolute quantitation)⁽¹⁷⁾。本節將介

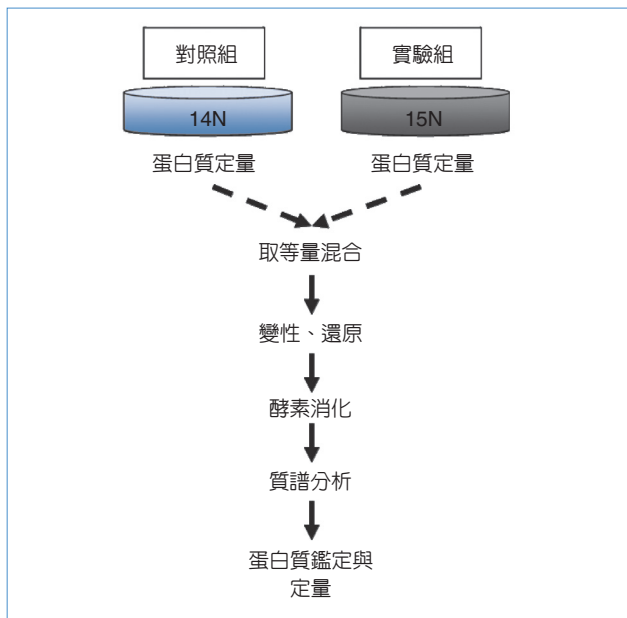


圖 19. 以同位素對細胞培養進行體內標示的示意圖。

紹本研究團隊自行開發的穩定同位素雙甲基標示，該技術具有反應完全、快速、試劑便宜等優點。

穩定同位素雙甲基標示是藉由 reductive amination 反應導入含有氫 (輕; light) 與氘 (重; heavy) 的甲醛分子與胜肽之 N 端 (除 proline 外) 及離胺酸 (lysine, K) 的胺基反應，而接上兩個甲基分子，使得每一標示點產生 4Da 質量差之同位素對。Proline N 端只會接上一甲基分子。在質譜儀的偵測過程中，對照組與實驗組為同一序列的胜肽，卻分別標示上含有氫 (輕; light) 與氘 (重; heavy) 的同位素分子而表現出不同的分子量。

圖 20 為不同濃度比例的磷酸化胜肽標準品 (AEEElpYGVLFAK) 個別以含有氫與氘的甲醛分子作標示且混合後，以基質輔助雷射脫附離子化—飛行時間質譜儀作偵測所得的質譜圖。在圖 20 中有六個濃度比例，其重 (氘) 同位素標示與輕 (氫) 同位素標示的磷酸化胜肽之濃度比例，由下而上分別為 0.5、1、1.5、2、5 及 20。從上面括弧中磷酸化胜肽的胺基酸序列可以得知，此胜肽含有四個離胺酸及一個胜肽的 N 端，因此有五個會與甲醛分子進行反應，而接上兩個甲基分子。單一個離胺酸或胜肽的 N 端與甲醛分子進行反應後，經重同位素標示的胜肽其質量就會比輕同位素標示的多

4 Da，故如果有五個反應位置就有 20 Da。所以由圖 20 可以看出重同位素標示的磷酸化胜肽和輕同位素標示的磷酸化胜肽雖擁有同樣的胺基酸序列，但質量卻相差 20 Da。除此之外，由重同位素標示的胜肽訊號強度和輕同位素標示的胜肽訊號強度作比較，也清楚的反映出兩者磷酸化胜肽的實際濃度比例。

從上述內容可以清楚的知道，以穩定同位素雙甲基標示搭配質譜儀，的確可以直接準確地對胜肽作定量的工作，更可以胜肽的比例回推至蛋白質的相對含量。現行對特定蛋白質的定量，除了使用同位素標示外，在串聯式質譜儀的偵測方面，也常會使用先前所談到的多重反應監控掃描模式，來對有標示或無標示同位素的胜肽樣品作相對與絕對定量，所得的訊號不僅有更好的訊雜比，也擁有更低的偵測極限。

三、結論

由上述的研究成果得知，質譜儀技術的進步、分析方法及策略的建立與快速便宜兼準確的定量試劑，對蛋白質體學的蓬勃發展功不可沒。而研究者的期盼不外乎三少與一多：更少的樣品 (偵測極限)、更少的分析時間與更少的人力，卻能得到更多的可用資訊。近年來質譜蛋白質體分析技術隨著儀器性能的提升、分析策略的創新與新穎分析材料的引進已漸趨成熟，質譜儀在蛋白質體的研究中必能發揮更多的功效，且讓我們拭目以待。

參考文獻

1. J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).
2. F. Hillenkamp and M. Karas, *Methods Enzymol*, **193**, 280 (1990).
3. C. Temporini, E. Callerli, G. Massolini, and G. Caccialanza, *Mass Spectrometry Reviews*, **27**, 207 (2008).
4. S. A. Johnson and T. Hunter, *Nature Methods*, **2**, 17 (2005).
5. J. M. Coull, D. J. Pappin, J. Mark, R. Aebersold, and H. Koster, *Anal Biochem*, **194**, 110 (1991).
6. J. A. MacDonald, A. J. Mackey, W. R. Pearson, and T. A. Haystead, *Mol Cell Proteomics*, **1**, 314 (2002).
7. R. Aebersold, J. D. Watts, H. D. Morrison, and E. J. Bures, *Anal Biochem*, **199**, 51 (1991).

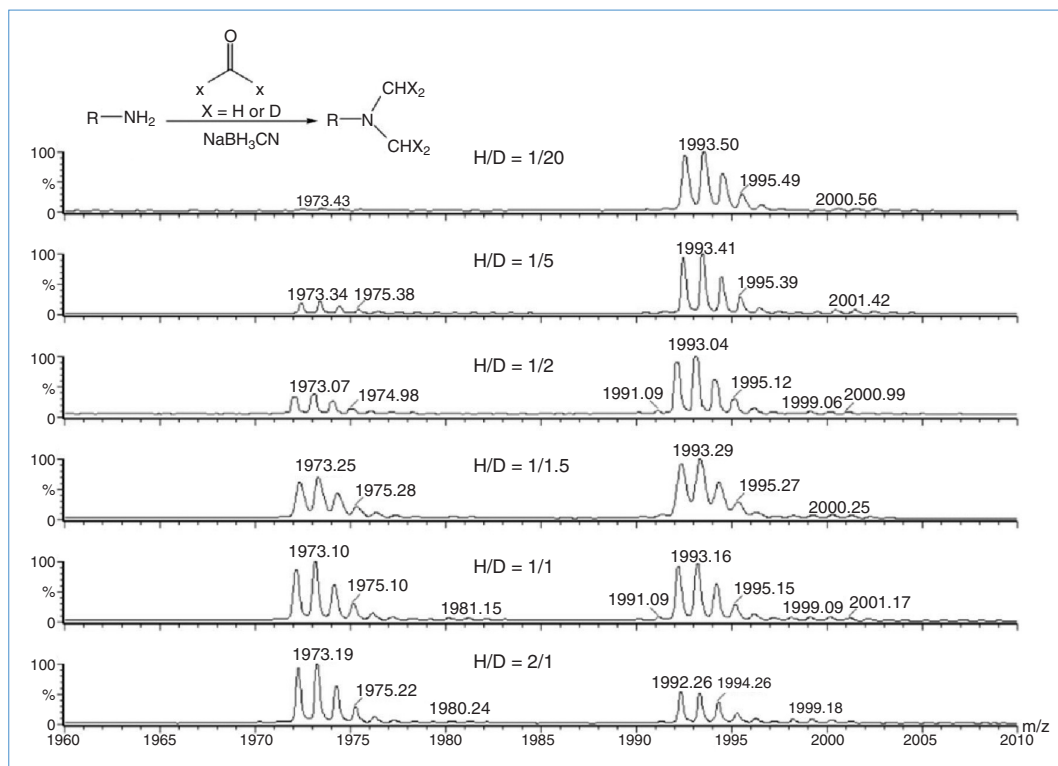


圖 20. 以基質輔助雷射脫附離子化—飛行時間質譜儀對經由穩定同位素雙甲基標示且混合不同濃度比例的磷酸化胜肽作偵測，所得的質譜圖與雙甲基標示的化學反應方程式⁽²¹⁾。

8. H. E. Meyer, E. Hoffmann-Posorske, H. Korte, and L. M. Heilmeyer, Jr., *FEBS Lett*, **204**, 64 (1986).
9. J. C. Le Blanc, J. W. Hager, A. M. Ilisiu, C. Hunter, F. Zhong, and I. Chu, *Proteomics*, **3**, 859 (2003).
10. A. Motoyama, T. Xu, C. I. Ruse, J. A. Wohlschlegel, and J. R. Yates, 3rd, *Anal Chem*, **79**, 3623 (2007).
11. S. Li and C. Dass, *Anal Biochem*, **270**, 9 (1999).
12. M. C. Posewitz and P. Tempst, *Anal Chem*, **71**, 2883 (1999).
13. W. A. Tao, B. Wollscheid, R. O'Brien, J. K. Eng, X. J. Li, B. Bodenmiller, J. D. Watts, L. Hood, and R. Aebersold, *Nat Methods*, **2**, 591 (2005).
14. H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, E. Kuhn, and S. A. Carr, *Mol Cell Proteomics*, **6**, 2212 (2007).
15. M. B. Goshe and R. D. Smith, *Curr Opin Biotechnol*, **14**, 101 (2003).
16. S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold, *Nat Biotechnol*, **17**, 994 (1999).
17. S. D. Garbis, S. I. Tyrizis, T. Roumeliotis, P. Zerefos, E. G. Giannopoulou, A. Vlahou, S. Kossida, J. Diaz, S. Vourekas, C. Tamvakopoulos, K. Pavlakis, D. Sanoudou, and C. A. Constantinides, *J Proteome Res*, **7**, 3146 (2008).
18. G. Werth, *Contemp. Phys.*, **26**, 241 (1985).
19. B. L. Williamson, J. Marchese, and N. A. Morrice, *Mol Cell Proteomics*, **5**, 337 (2006).
20. R. D. Unwin, J. R. Griffiths, M. K. Leverenz, A. Grallert, I. M. Hagan, and A. D. Whetton, *Mol Cell Proteomics*, **4**, 1134 (2005).
21. J. L. Hsu, S. Y. Huang, N. H. Chow, and S. H. Chen, *Anal Chem*, **75**, 6843 (2003).

- 吳晉任先生為國立成功大學化學研究所博士候選人。
- 梁世欣先生為國立成功大學化學研究所博士候選人。
- 陳淑慧女士為美國密西根州立大學分析化學博士，現任國立成功大學儀器設備中心主任與化學系教授。
- Chin-Jen Wu is a Ph.D. candidate in the Department of Chemistry at National Cheng Kung University.
- Shih-Shin Liang is a Ph.D. candidate in the Department of Chemistry at National Cheng Kung University.
- Shu-Hui Chen received her Ph.D. in analytic chemistry from Michigan State University, USA. She is currently the director of Instrument Development Center and a professor in the Department of Chemistry at National Cheng Kung University.