

微型蛋白質分析系統

鄒國鳳¹，李國寶¹，廖寶琦²，許惠婷¹，林中源¹，陳淑惠³，陳邦維²

¹國立成功大學工程科學系，²環境醫學研究所，³化學系

摘要

由於蛋白質種類繁多、結構複雜、性質多變使得蛋白質分析的過程耗時費事。近年來，透過微機電工程與生物科技的合作，嘗試利用微製造技術將傳統的分析儀器微小化以提升蛋白質分析的效率及精確性，目前這些研究已有相當程度的進展，包括處理透析、層析及電泳程序的微流體晶片均已成功地開發出來。這些應用於蛋白質的純化、分離的微流體晶片可進一步透過微小化的電灑離子化器與質譜儀連接，構成簡易的蛋白質分析系統，使蛋白質分析工作可一貫化作業。

一、簡介

在西元 2000 年六月，美國人類基因體計畫(Human Genome Project) 及 Celera 的研究團隊宣布了人類基因圖譜草稿完成的消息，也預告了後基因時代的來臨。全球生物科技研究者的目光焦點已對準下一個更艱鉅的目標-蛋白質體學的建構工程。而除了學界，產業界也相當看好這項新興學門所潛藏的龐大商機。一九九九年美國的蛋白質體 (Proteomics) 產業市場包括相關儀器、服務及生物資訊學等約為七億美元，預計到西元 2005 年將達五十八億美元。

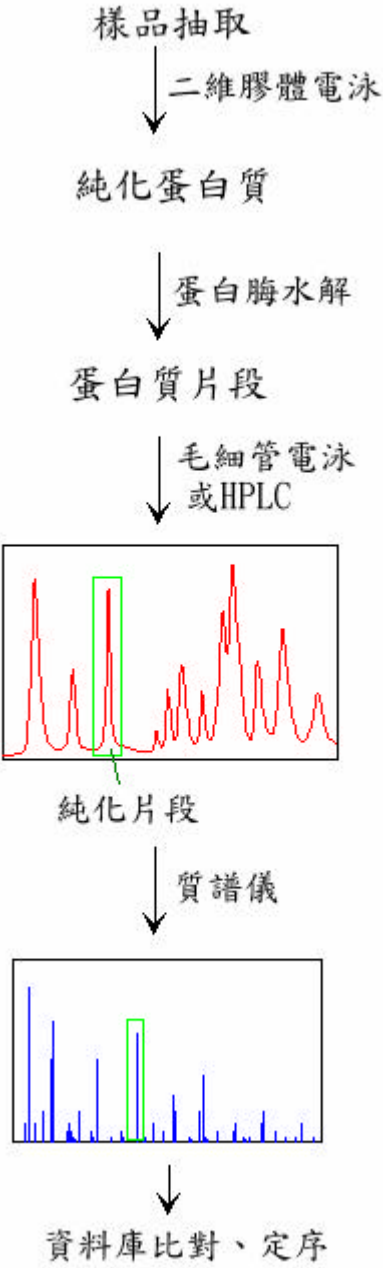
蛋白質體學的主要研究內容包括尋找基因體與蛋白質群體的關連性，研究蛋白質在細胞內的表現和對生理現象的調控。由於蛋白質直接參與各種生理機制、病理反應，我們便可藉由蛋白質體學、蛋白質表現的偵測與分析技術，進行致病機制或藥物作用機制的研究與監控、特定疾病的診斷與治療及農業技術的改良等工作。

然而，由於蛋白質的種類繁雜、對環境變化過於敏感、易於變性、其表現特性又受成分與結構、環境等多重因素的影響，使得蛋白質體學的研究成為一項高難度的工作。完整的蛋白質體研究程序包括蛋白質樣本操作、分離、篩選及測定等實驗過程，目前，蛋白質的分離是以二維膠電泳技術為主體，而在蛋白質鑑定及特性分析方面，則是利用質譜儀來對水解蛋白質片段進行序列分析、被修飾氨基酸單元體的鑑定。由於儀器設計的改良，整個蛋白質分析過程的效率已有顯著的改善，但對於複雜的蛋白質體研究，其效率仍有待提升。而研究單位也必須為精密的儀器付出高昂的成本。

為了加速蛋白質體學的研究進展及產業成長，急需發展一種大量、快速、自動化、多工、批次及低成本的分析技術。於是，微型全分析系統 (Miniaturized Total Analysis Systems) 概念應運而生[1,2]。所謂微型全分析系統是利用微製造技術將傳統的大型生化

分析儀器微小化、積集化於一個單一微流體晶片上，完整而連續地進行樣品的純化、分離、測定與分析工作。這樣的設計不但可滿足上述需求也具有提高訊號偵測靈敏度及降低樣品用量的優點。近年來，經過全球研究學者、專家的努力，微型全分析系統已漸具雛形[3,4-10]。本文將針對目前成功地應用於蛋白質分析的微流體晶片與質譜儀連接系統之設計與製作做一介紹。

二、現行蛋白質分析技術



圖一、蛋白質分析程序

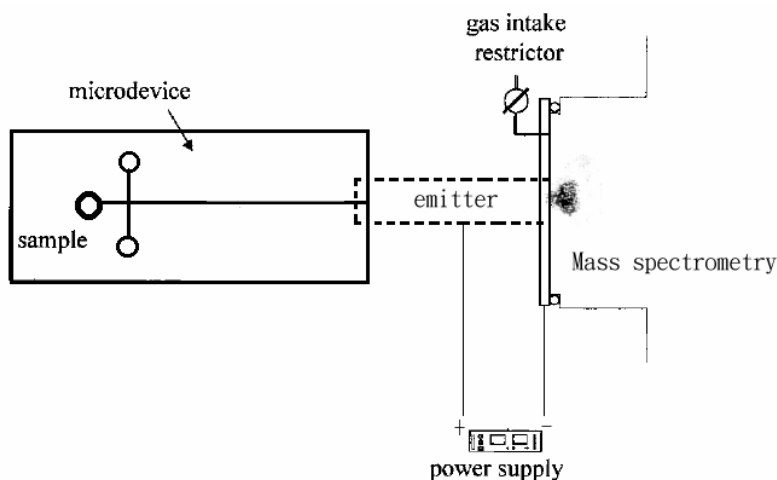
蛋白質分析的一般程序如圖一，首先將樣品中目標蛋白質利用二維膠體電泳純化，純化的蛋白質再利用蛋白酶切成 peptide。peptide 片段之分離與組成分析可利用高效液相

層析儀 (HPLC) 或雙向電泳技術來進行。而特定 peptide 片段的氨基酸的定序則可利用自動定序儀或質譜儀來完成。經由氨基酸的定序可推知蛋白質的等電點、分子量、抗原決定基片段、各種蛋白酶的水解點等資料。

目前有關蛋白質體的研究工作大致透過上述方法進行。而在早期則是利用樣品分子大小、極性、電性及親和力等性質的差異透過管柱層析的方式來分離蛋白質。隨後高效液相層析儀、二維凝膠電泳(2-dimensional gel electrophoresis)、毛細電泳的問世使分離效率提升不少。氨基酸定序的方法則是發展出利用 降解反應 (Edman degradation) 定序原理進行定序工作的的自動化定序儀。但是這些分離技術仍無法辨認出某些特定種類的蛋白質及蛋白質的三級結構。為了改善這些缺點, Aebersold 等人[3]首次利用“質譜儀分析” (Mass Spectrometry) 進行蛋白質的辨認及定量, 而得到良好的結果。此後質譜儀便成為辨認、分類蛋白質的基本研究工具。目前新一代的質譜儀已可應用於蛋白質與胺基酸的定序、結構、純度與後轉錄調節等檢測, 而分析結果的正確性、靈敏度, 效率均大幅提昇。

三、微型蛋白質分析系統

1. 系統架構與操作



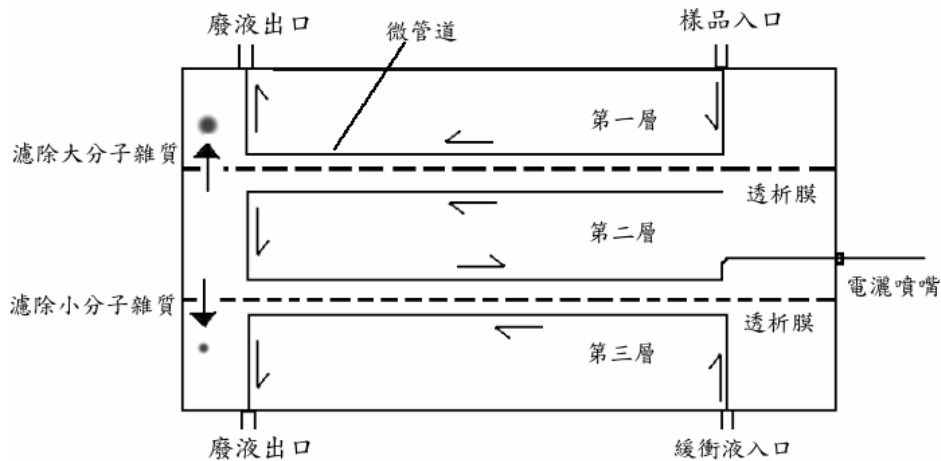
圖二、微流體晶片/質譜儀連接系統

微流體晶片與質譜儀連接系統可分為三個部分：(1) 微流體晶片 (2) 噴霧離子化器 (3) 質譜儀, 如圖二。由微流體晶片上的微管道中利用層析、電泳及透析法進行蛋白質或 peptide 樣品的純化、分離及濃縮處理。分離後的 peptide 片段流入噴霧離子化器中, 在此樣品被霧化並游離成帶電液滴, 然後注入質譜儀中, 質譜儀分析原理利用樣品在電場中會因荷質比的差異而具有不同飛行時間的特性, 產生質譜圖。各程序的連線進行將可有效減少在耗時的除鹽或樣品純化過程中所造成的樣品活性喪失問題, 並可改善質譜儀的靈敏度。

目前研發的微流體晶片與質譜儀連接分析系統在進行蛋白質分析測試時, 多是以蛋

白朊水解後的 peptide 片段為樣品。利用電腦控制的注射筒將樣品注入系統中，再進行各片段分離與分析。本文將這些微型蛋白質分析系統歸納為下列三類：

(1) 透析-質譜串連系統[4,5]：



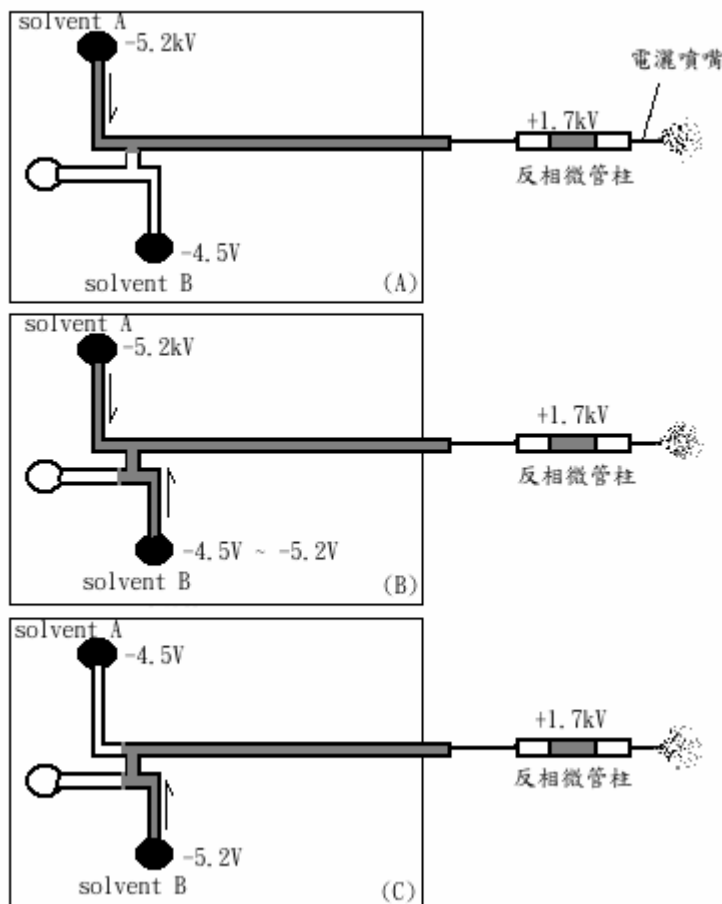
圖三、透析晶片截面示意圖[4,5]

此系統由三層高分子及兩片透析膜組成，兩片透析膜作為三層高分子的夾層，如圖三。第二層高分子層的上、下面均含微管道結構且以鑽孔連通。第一層高分子層的微管道與第二層上表面的管道利用一片透析層分隔。第三層高分子層的微管道同樣利用透析膜與第二層高分子層下表面的微管道相隔。電灑噴嘴接於中間層。樣品由第一層入口流入後管道後，樣品溶液透過透析膜流入第二層之上表面微管道，但高分子量的物質則留在第一層的管道中並流向廢液出口。濾除高分子量雜質的樣品在第二層中繼續沿管道流動，並由第二層的上表面管道流入下表面管道。樣品在第二層的下表面管道流動時，樣品溶液中的低分子量物質及鹽類會透過透析膜而被濾至第三層的微管道。最後，乾淨的樣品直接流入噴嘴。影響蛋白質通過透析元件的效率的因素包括蛋白質的分子量、構型和拒水性及溶劑流速、膜之間的壓力差。由於透析晶片的串連使質譜分析的訊號雜訊比提高二十倍。

(2) 層析-質譜串連系統[6,7]：

此系統由一組溶劑輸送管道、反相微管柱、電灑離子化質譜儀組成。反相微管柱內填入樹脂，作為吸附基材，結構如圖四。使用時，先將樣品注入樹脂管柱中，再將有機溶劑（A 相）及水溶液（B 相）分別注入不同儲液槽中，再利用電腦控制各儲液槽的電壓差來調控各溶劑的流動。首先如圖四（A）的電壓操作模式，則 A 相流出並導入反相微管柱中，接著改為圖四（B）電壓操作模式，A 相與 B 相均被注入管道中，最後以圖四（C）模式操作，則 A 相停止輸送，而 B 相仍繼續被導入反相微管柱。因此，微管道中便產生由有機相與水溶液相所形成的溶劑梯度（solvent gradient），管道中離子組成跟著溶劑梯度改變，溶劑梯度的起點和終點受樹脂管柱的尺寸影響。樣品分子在管道中流動時，因各成分分子對不同溶劑相的親和度不同，而造成流速梯度，產生分離的效果。

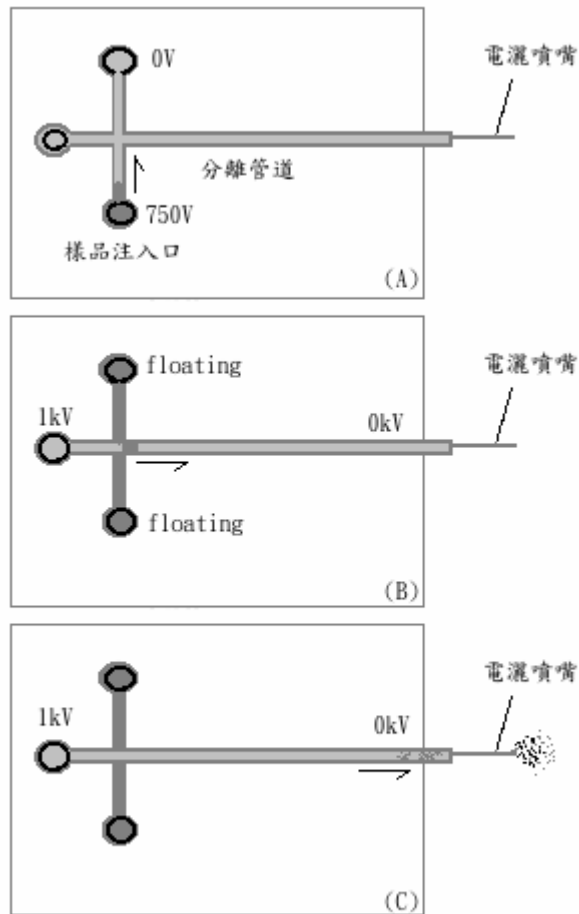
這項設計具有消除基質效應、控制分析時間等優點。梯度的分佈受溶劑流速、施加電壓和毛細管表面化學性質的影響。梯度分佈與擴散係數則會影響質譜訊號峰的寬度。



圖四、層析晶片之溶劑梯度建立過程[6,7]

(3) 電泳-質譜串連系統[8-10]：

電泳的分離作用的原理是利用帶電及中性粒子在電場作用下於毛細管內有不同遷移速度而達到分離的效果。而樣品的在管道內的輸送則是靠電滲透作用，也就是利用在微管道中施加電場則管壁與液面會聚集表面電荷而引發管內緩衝液整體流動的現象。此系統可使純化樣品，對多成分樣品做部分分離藉以提高質譜分析的效能。元件組成是由輸送管道、分離管道及儲液槽所構成，如圖五。樣品注入儲液槽後透過電滲透作用輸送至分離管道口（圖（A）（B）），再利用電泳原理在分離管道兩端加上電位壓進行樣品分離（圖（C）），在數十秒內便可完成 peptide 的分離。透過電灑噴嘴的連接，電泳晶片可與飛行時間質譜儀(Time of flight MS)配合進行快速分析。與 HPLC 相較，毛細電泳的分離具有效率高、速度快、譜峰解析度佳及使用樣品量少的優點。



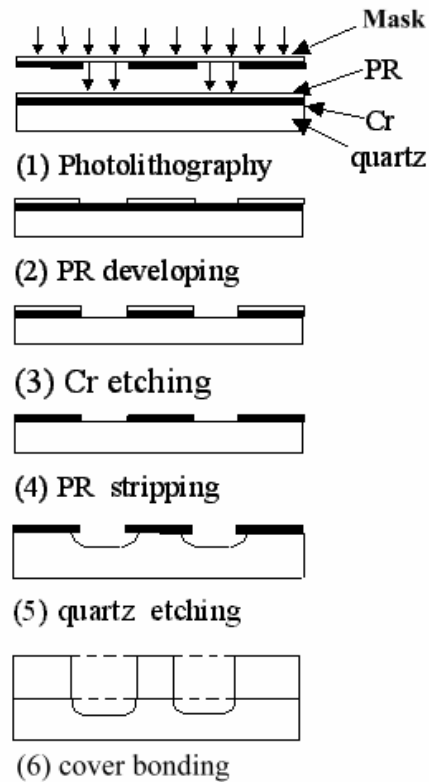
圖五電泳晶片操作示意圖

2. 系統製程

以下簡述微流體晶片與噴霧離子化器之製作過程：

(1) 微流體晶片的製作：

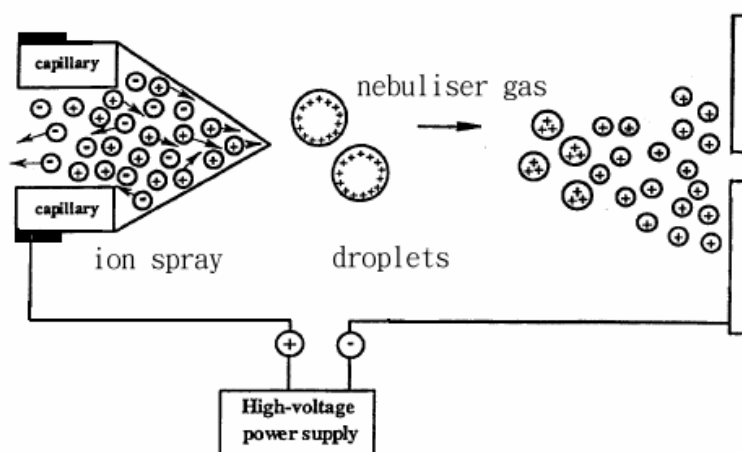
微流體晶片的主要結構包括分離及輸送用的微管道及儲存樣品的儲液槽。利用微影製程將設計好的微管道及儲液槽圖樣轉印於事先塗佈光阻的石英、玻璃或矽基板上，再經過顯影、蝕刻等步驟便可完成微管道的製作[10]，如圖六。一般微管道尺寸約為數十微米。最後，此基板再與鑽有樣品出、入孔的上蓋板接著，便完成晶片製作。為達大量製造及降低材料成本的要求，可採用熱壓、射出成型等加工技術製作以高分子為基材的微流體晶片。熱壓法是利用前述微影方法製作出硬質母模，然後將母模壓印於受熱軟化的高分子板上，使微管道圖樣轉印於高分子板上。射出成型模技術則是使液態的高分子直接在母模中硬化成型，母模上的管道圖樣可直接複製在成型的高分子基材上。製作好的微流體晶片在使用前依分離技術的需求必須加上電極或作適當的表面處理。



圖六微流體晶片製作

(2) 噴霧離子化器的製作：

噴霧離子化器的作用是使微流體晶片所分離的樣品形成微小的帶電離子液滴作為質譜儀分析的離子源。使樣品產生離子化液滴的方法分為兩種[11,12]：(1)電噴灑離子化法 (electro ionspray)：在晶片上設計兩條微管道作為氣體管道，也有利用毛細管外包覆金屬圓管，中間通以氮氣。樣品在電灑離子化器的噴嘴口形成液滴的過程如圖七[11]。當樣品流出管尖，電源供應器施加電位差於與注射幫浦連接的毛細管金屬環（陽極），產生電游離的效果，帶負電的離子向管壁移動，而帶正電的離子則向管中心聚集，此游離效應克服液體之表面張力而形成尖錐狀（Taylor cone），但錐尖的正電離子團間排斥作用及質譜儀入口之負電極吸引而脫離噴嘴，形成液滴。氣體管道噴出的氣體會噴散液滴，於是形成帶電荷霧滴，電荷會分佈於霧滴表面，同時，液滴逐漸揮發變小、最後形成帶電的單一離子型態，進入質譜儀。若金屬管通正電，液滴帶正電。反之，則液滴帶負電。(2)化學游離化法 (chemical ionization)：此法是作用於不易被電場游離的之樣品。基本裝置是將樣品與溶劑通入不鏽鋼管，管外圍包覆另一層金屬管，管中通熱氣流，管口有放電針，加高壓電。當樣品與溶劑流出管口時被氣體噴霧成氣態分子，同時溶劑受到放電針尖端放電作用而產生與高壓電同極電荷。隨後溶劑再與樣品進行離子-分子反應而使樣品達到離子化的目的。



圖七、電灑噴霧離子化過程[11]

噴嘴產生的液滴聚集程度與元件材料的表面性質及溶液的表面張力有關。噴嘴表面的濕潤度愈低形成的液滴愈小，電灑的穩定度愈好。電灑噴嘴的出口可利用化學改質使表面產生拒水性，降低濕潤程度。平面化的電灑離子化器噴出口所產生的液滴會累積較大的溢管體積（extra column volume）而破壞樣品的分離效果。解決之道是利用輔助側流（sheath flow），一般為氮氣流，但要注意控制電泳流速低於輔助氣流速，使樣品離子不致流入輔助管道中。輔助氣體流有助於移除在噴嘴出口的液滴，縮小溢管體積，並可調節樣品流速。在出口前氣流與分離管道合併的距離也會影響分散液滴的效果。低流速可大量降低樣品消耗並加強游離過程的靈敏度。電灑離子化的樣品可作為碰撞引發游離頻譜（collision-induced dissociation spectra）的離子源，進一步分析特定 peptide 片段的氨基酸序列。一般而言，電灑噴嘴愈細電灑的效率和穩定性愈高。

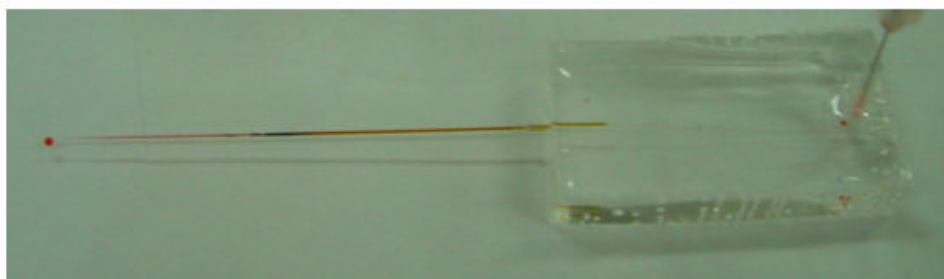
至於噴霧離子化器的製作，在早期電噴灑作用直接在玻璃晶片邊緣的微流體管道開口進行[13,14]，這會造成液滴在開口處累積使分離系統的解析度降低。而大部分的電灑微流體晶片則利用傳統電灑激發器如熔矽毛細管連接，但仍存在兩個問題，第一、接點所造成的滯留體積（dead volume）會導致分離品質的降低。第二、失去微製造技術的優勢。目前的製作方式可分為下列兩類：

（1）毛細管組合[4,8,15,16]：

此噴霧離子化器一般由毛細管、不鏽鋼管及鐵氟龍套管組成。可在晶片邊緣分離管道口鑽孔，作為與毛細管的連接位置，使滯留體積降至最低。將一段 12 公分長，內徑 75 μm ，外徑 150 μm 熔矽毛細管插入接孔，晶片與毛細管之間利用封膠及鐵氟龍套管連接固定，毛細管另一端再與內徑 30 μm 3cm 長的不鏽鋼管相接，再接上電源施以 1.7-1.9kV 的電壓產生電灑離子。毛細管的尺寸和電位差可控制流速。管路選擇需耐高壓的材質，使用內徑、長度較小的管路避免分離物種在介面處發生擴散效應使頻譜峰變寬，影響到鑑別能力。

另一種以聚二甲基矽烷(PDMS)灌模技術製作毛細管噴嘴的方法將可消除滯留體

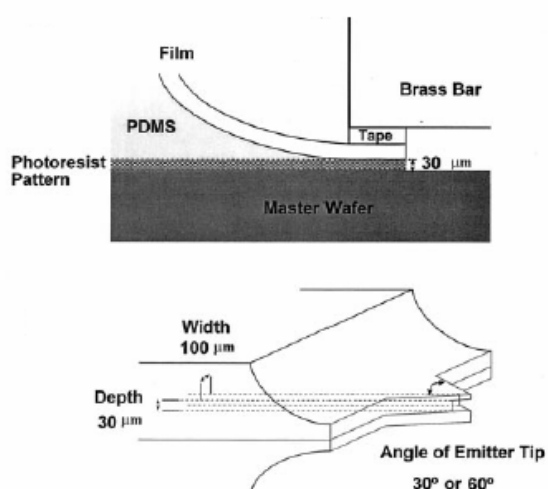
積。其作法是先製作一簡單的電灑元件灌模模型，再以一細金屬線（ $76\ \mu\text{m}$ ）穿入拉尖之毛細管（內徑 $200\ \mu\text{m}$ ），並固定在模型上。然後將液態的 PDMS 與硬化劑灌入模中，再經過加溫硬化，成型後抽取出內部的金屬線。此製程的特點是在灌模成型的過程中，利用金屬線的鑲埋可形成管道，而且可同時將毛細管接著於晶片上而不致產生滯留體積（圖八）。



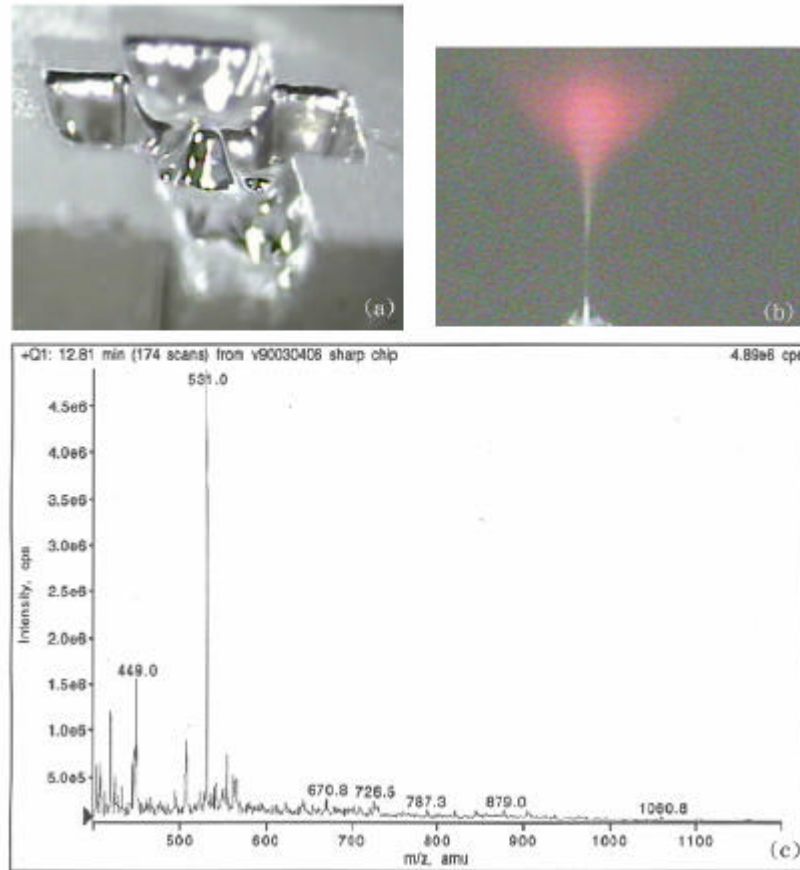
圖八灌模技術所製作的毛細管電灑噴嘴元件

(2) 高分子加工[17,18]：利用高分子加工技術製作電灑噴嘴的優點包括成本低廉、可進行光訊號偵測及快速、簡易的製程。製作技術包括：(a) 注模成型技術：此製造技術可一體成型，不需做個別零件組裝。以聚二甲基矽烷為注模材料，其製程是利用微影製程在矽晶片上製作含微管道圖樣光阻之灌注母模，同時在負光阻所形成的微管道結構末端覆蓋一層彎曲的透明薄膜，藉以在注模時形成噴嘴的側曲面（如圖九），然後插入毛細管，使其接觸到光阻，再將液態 PDMS 與硬化劑注入模中，並加熱硬化。元件硬化後將毛細管抽出。另以同樣方式製作上蓋板。成型的上下板接面以電漿處理再加熱接著。最後利用機械加工的方式削出噴嘴尖端。PDMS 的拒水性有助於降低形成 Taylor 錐的電壓。

(b) 準分子雷射加工：在聚碳酸酯或壓克力基材上利用雷射加工技術直接刻製出錐狀的電灑離子噴嘴，如圖十 a。此加工方式可達到自動化及大量製造的目的。圖十 b 及 c 顯示由壓克力製作的噴嘴產生的電噴灑現象及 $10\text{pmol}/\mu\text{l}$ Bradykinin 之質譜分析圖。



圖九、射出成型技術製作之 PDMS 噴嘴[18]



圖十、(a)雷射加工技術製作壓克力電灑噴嘴(b)壓克力噴嘴產生之電噴灑現象
(c)壓克力噴嘴產稱的離子化樣品之質譜分析圖

3. 應用於蛋白質分析之高效率多管道微流體晶片之研發計畫

成功大學工程科學系、化學系及環境醫學系所組成的蛋白質分析晶片的研發團隊於去年成軍。在過去一年中已先後完成蛋白質分析微流體晶片之系列元件[10,19-21]，包括(1)進樣系統部分：無滯留體積進樣接頭、連續進樣元件、多流道切換元件。(2)微流體晶片部分：玻璃、石英及壓克力材料的微電泳晶片。(3)電灑離子化噴嘴部分：以準分子雷射加工技術製作之壓克力電灑噴嘴、射出成型技術製作之PDMS無滯留體積毛細噴嘴等。其中，微電泳晶片配合雷射誘導螢光技術已成功的應用於DNA片段的分析[10]，而壓克力電灑噴嘴功能也順利通過質譜分析測試(圖十)。未來將進一步整合各功能元件並配合蛋白質純化技術及質譜分析技術完成高靈敏度，高效率及低成本之微型蛋白質分析系統晶片之開發，對大量未知之蛋白質進行快速篩檢。

四、未來展望

微小化的透析、層析及電泳晶片的應用改善了蛋白質分離程序的靈敏度及效率。而藉由與質譜儀的連線設計可即時提供質譜儀高度純化的離子化樣品，同時也降低蛋白質樣品去活性的機率，進而得到更精確的蛋白質分析結果。

目前微製造技術在生物科技上的應用均屬於研發階段，而作為一項生物醫學的分析利器除達到精確度的要求外也必須能夠落實實用的目的。為使微流體生物晶片能夠早日由實驗室推向市場，形成產業，必須朝下列幾個目標來努力：(1) 產業化-必須開發自動化及量產化的製程技術。(2) 商品化-考慮功能性、實用性及成本因素，必須具備自動化連續性的樣品處理方式、良好的使用者介面設計及低成本套件的條件(3) 系統化-整合完整的蛋白質分析程序，製作出功能強大的微型全分析系統，使血液取樣、萃取、純化、分離、偵測及分析等程序能夠完全在單一的微流體裝置上完成。這些工作必須透過產業界與學術界的密切配合才能獲致實質的成功。

五、參考文獻

- (1) Manz, A., Graber, N. and Widmer, H. M., Miniaturized Total Analysis Systems: A Novel Concept for Chemical Sensing, *Sensors and Actuators, B1*, 244-248(1990).
- (2) Chiem, N. C., Colyer, C. and Harrison, D. J., Microfluidic Systems for Clinical Diagnostics, *The International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, (TRANSDUCERS' 97)*, Chicago, Vol.1, 183-186(1997).
- (3) Affolter, M.; Watts, J. D.; Krebs, D. L.; Aebersold, R., *Anal. Biochem.*, 15, 74-81(1994).
- (4) Xiang, F., Lin, Y., Wen, J., Matson, D. W. and Smith, R. D., An Integrated Microfabricated Device for Dual Microdialysis and On-Line ESI-Ion Trap Mass Spectrometry for Analysis of Complex Biological Samples, *Anal. Chem.*, 71, 1485-1490 (1999).
- (5) Xu, N.; Lin, Y.; Hofstadler, S. A.; Matson, D.; Call, C. J. and Smith, R. D. *Anal. Chem.*, 70, 3553-3556(1998).
- (6) Figeys, D. and Aebersold, R., Nanoflow Solvent Gradient Delivery from a Microfabricated Device for Protein Identifications by Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 70, 3721-3727(1998).
- (7) Moore, A. W., Jr.; Jacobson, S. C. and Ramsey, J. M., *Anal. Chem.*, 67, 4184-4189 (1995).
- (8) Zhang, B., Liu, H., Karger, B. L. and Foret, F., Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 71, 3258-3264(1999).
- (9) Li, J., Kelly, J. F., Chernushevich, I., Harrison, D. J. and Thibault P, Separation and Identification of Peptides from Gel-Isolated Membrane Proteins Using a Microfabricated Device for Combined Capillary Electrophoresis/Nanoelectrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 72, 599-609(2000).
- (10) Lee, G. B., Chen, S. H., Huang, G. R., Sung, W. C., and Lin, Y. H., Microfabricated Plastic Chips by Hot Embossing Methods and Their Applications for DNA Separation and Detection, *Sensors and Actuators B:Chemical*, 3708,1(2001).
- (11) Henderson, W., Nicholson, B. and Mclaffrey, L. J., Applications of Electrospray Mass Spectrometry in Organometallic Chemistry, *Polyhedron*, 17, 4291(1998).
- (12) 黃堯斐，液相層析串連質譜儀於結構分析之應用，*科儀新知*，第二十六卷，第六期，81-87(1999).

- (13) Xue, Q.; Foret, F.; Dunayevskiy, Y. M.; Zavracky, P. M.; McGruer, N. E. and Karger, B. L. *Anal. Chem.*, 69, 426-430(1997).
- (14) Ramsey, R. S. and Ramsey, J. M. *Anal. Chem.*, 69, 1174-1178(1997).
- (15) Lazar, I. M., Ramsey, R. S., Jacobson, S. C., Foote, R. S., and Ramsey, J. M., Novel Microfabricated Device for Electrokinetically Induced Pressure Flow and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 892 195-201(2000).
- (16) Deng, Y. and Henion, J., Chip-Based Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry Determination of Carnitines in Human Urine, *Anal. Chem.*, 73, 639-646(2001).
- (17) Kim, J. S. and Knapp, D. R., Microfabricated PDMS Multichannel Emitter for Electrospray Ionization Mass Spectrometry *J Am Soc Mass Spectrometry* , 12, 463–469 (2001).
- (18) Wen, J. Y.; Xiang, F.; Matson, D. W.; Udseth, H. R.; and Smith R. D. *Electrophoresis*, 21, 191–198(2000).
- (19) 李國賓, 黃冠瑞, 回寶珩, 林中源, 郭子, 熒巫婉瑜, 陳淑惠, 廖寶琦, 微流體生物晶片模組之研發, 微系統科技協會季刊第四期, April (2000).
- (20) Lee, G. B., Huang, G. R., Chen, S. H., Hwei, B. H., and Lai, H. F., Microfluidic Chips with Mxn Continuous Sample Introduction Function Using Hydrodynamic Flow Switching, accepted, *Transducers* (2001).
- (21) Sung, W. C., Lee, G. B., Tzeng, C. C., Chen, S. H., Plastic Microchip Electrophoresis for Genetic Screening- The Analysis of PCR Products of Fragile X (CGG)_n Alleles, accepted for publishing, *J. Electrophoresis* (2001).