



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201211543 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：099129405

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 09 月 01 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/72 (2006.01)**

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)  
新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：吳東昆 WU, TUNG KUNG (TW)；王裕國 WANG, YU KUO (TW)；施木青 SHIH, MU CHIN (TW)；張煜昌 CHANG, YU CHANG (TW)

(74)代理人：周良吉

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：3 共 25 頁

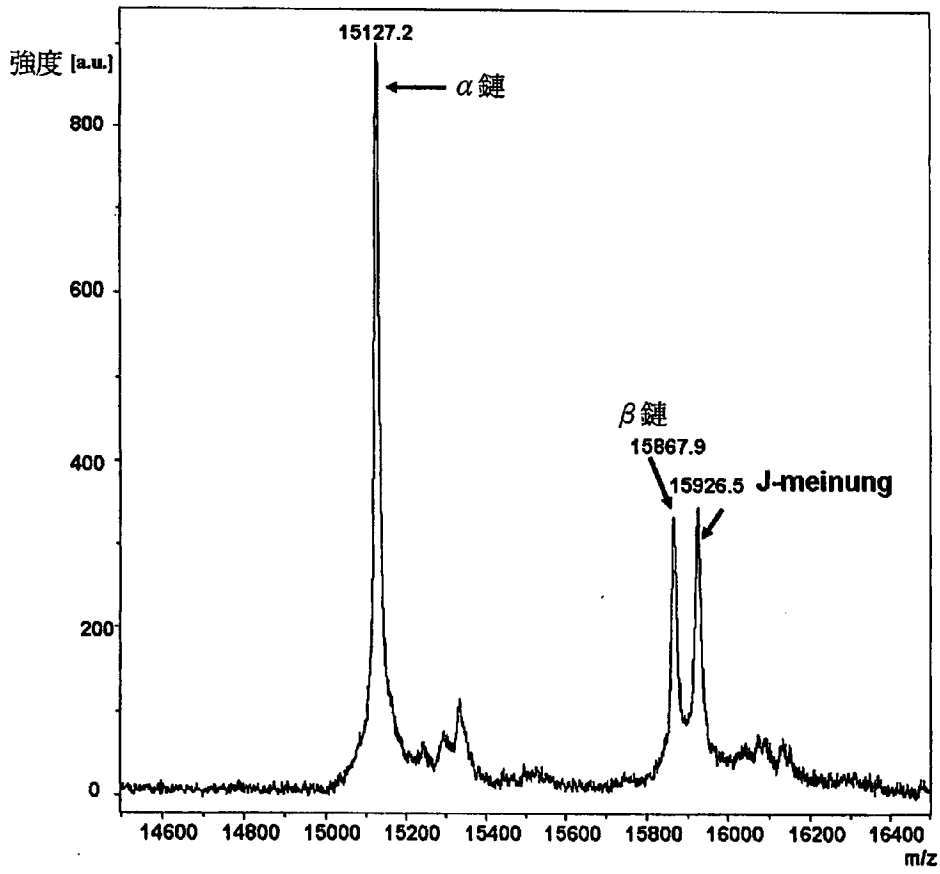
(54)名稱

快速篩檢變異血紅素之方法

A QUICK SCREENING METHOD FOR A HEMOLGLOBIN VARIANT

(57)摘要

一種快速篩檢變異血紅素之方法，包含：(a)提供血液樣品；(b)快速分離血液樣品中之血紅素；(c)藉由基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(MALDI-TOF)，以直線型(Linear mode)分析方法，判定步驟(b)之產物是否含有變異血紅素，並選擇性地執行以下步驟；(d)於超音波震盪環境下，以酵素水解步驟(b)之產物；以及(e)藉由 MALDI-TOF，以反射型(Reflection mode)分析方法，經由比對軟體來判定步驟(d)之產物所含之變異血紅素之類型。此方法更包含於步驟(e)之後，藉由串聯質譜技術(質譜-質譜技術)(Tandem mass spectrometry(MS/MS))來分析變異血紅素之部份氨基酸序列。



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 99 129 405

※ 申請日： 99. 9. 01

※IPC 分類：

G01N<sup>33</sup>/72 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

快速篩檢變異血紅素之方法/ A QUICK SCREENING  
METHOD FOR A HEMOLGLOBIN VARIANT

## 二、中文發明摘要：

一種快速篩檢變異血紅素之方法，包含：(a)提供血液樣品；(b)快速分離血液樣品中之血紅素；(c)藉由基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF)，以直線型(Linear mode)分析方法，判定步驟(b)之產物是否含有變異血紅素，並選擇性地執行以下步驟；(d)於超音波震盪環境下，以酵素水解步驟(b)之產物；以及(e)藉由 MALDI-TOF，以反射型(Reflection mode)分析方法，經由比對軟體來判定步驟(d)之產物所含之變異血紅素之類型。此方法更包含於步驟(e)之後，藉由串聯質譜技術(質譜-質譜技術)(Tandem mass spectrometry (MS/MS))來分析變異血紅素之部份氨基酸序列。

## 三、英文發明摘要：

A quick screening method for a hemolglobin variant, comprising: (a) providing a blood sample; (b) quickly separating hemoglobin from the blood sample; (c) determining whether the resulting product of step (b) contains a hemoglobin variant by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI- TOF) in Linear mode, and optionally performing the following steps; (d) enzyme hydrolyzing the resulting product of step (b) under ultrasonic vibration; and (e) determining a type of the hemolglobin variant in the resulting product of step (d) by using MALDI- TOF in reflection

201211543

mode and applying a comparison software. This method further comprises analyzing partial amino acid sequence of the hemoglobin variant by using tandem mass spectrometry (MS / MS) after performing the step (e).

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種篩檢變異血紅素之方法，特別是關於一種利用快速處理血液樣品並搭配基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(MALDI-TOF)來快速篩檢變異血紅素之方法。

### 【先前技術】

海洋性貧血(又稱地中海型貧血)是一種隱性遺傳血液疾病，分佈區域廣泛，主要分佈於地中海附近、台灣、中國大陸長江以南和東南亞一帶及美國地區。是台灣常見的單一基因遺傳疾病之一，於上述區域中大約 6%的人口帶這種基因，4.5%人口為甲型海洋性貧血症帶因者，1.5%為乙型海洋性貧血症帶因者，帶因者的身體狀況通常與一般人類似。人類的血紅素主要是由甲型血紅素蛋白、乙型血紅素蛋白，結合鐵分子而成的，三個要素缺一都可能造成貧血，而海洋性貧血即是由於遺傳物質的異常，使得血紅素蛋白製造不足，因而導致貧血症的發生。當位於第 16 對染色體上的甲型血球蛋白基因有缺損時，導致甲型血紅素蛋白製造不足，會造成甲型海洋貧血症。當位於第 11 對染色體上的乙型血紅素蛋白基因有異常，使得乙型血紅素蛋白製造不足，造成乙型海洋性貧血症。當夫妻為同型因者，則每次懷孕，其胎兒有 1/4 機會完全正常，1/2 機會成為帶因者，1/4 成為重患者。海洋性貧血患者，因所遺傳到異常基因的多寡，會出現輕重程度不同的貧血。

血紅素蛋白是一種含有鐵離子可運輸氧氣的一種金屬蛋白質，普遍分佈於脊椎動體內。血紅素蛋白分子是由四個球蛋白的次單元所組成，每個次單元所組成的蛋白鏈緊密的與 heme 基團結合在一起；這個模式包含一個口袋型的結構，可讓 heme 基團與次單元球蛋白形成強力的結合。血紅素蛋白運輸氧的方式是通過 heme 基團中的鐵離子與氧氣結合。在成人體內，血紅素蛋白是由四聚體所組成的類型(其中包含四個次單元蛋白質)稱為血紅素蛋白 A，其中包括兩個  $\alpha$  和兩個  $\beta$  次單元蛋白以非共價鍵形式結合，每個次單元蛋白分別由 141 和 146 個氨基酸所組成。而在嬰兒時

期，血紅素蛋白則是由兩個  $\alpha$  和兩個  $\gamma$  次單元蛋白以非共價鍵形式結合，隨著嬰兒的成長，該  $\gamma$  次單元蛋白會逐步消失，而由  $\beta$  次單元蛋白取代。變異血紅素是一種不正常的血紅素；是因為血紅素蛋白基因發生突變而造成轉譯後氨基酸改變的一種遺傳疾病。這些氨基酸改變所引起的血紅素蛋白的影響包括：血紅素的產生效率、功能及穩定性等。 $\beta$  鏈血紅素蛋白的變異是經由染色體隱性遺傳的方式所獲得的一種遺傳疾病。如果一個人的基因遺傳為一個正常的  $\beta$  鏈基因，一個不正常的  $\beta$  鏈基因，則稱為異源性(heterozygous)的變異血紅素帶原者。此異常的基因可轉嫁至任何後代，但不會導致健康問題的症狀或帶原者。如果兩個  $\beta$  鏈基因皆遺傳到異常性的基因，則稱為同源性(homozygous)的帶原者。此帶原者會產生相關的變異血紅素(hemoglobin variants)，可能會有一些相關的症狀和潛在的併發症。嚴重的狀況取決於基因突變的種類而其造成的影響則因人而異。而此變異性的基因則將會遺傳至任何後代。在台灣，穩定型變異血紅素以 Hb J-Meinung、Hb G-Taichung、Hb Kaohsiung 等最常見，不穩定型變異血紅素以 Hb E 及 Hb CS 等較為常見，另外 Hb G-Ami 在阿美族中相當常見。其中，Hb J-Meinung 是因為其  $\beta$  鏈基因突變，造成其氨基酸序列的第 56 個位置的 Gly 變異成 Asp 的一種遺傳疾病。

目前標準的鑑定變異血紅素的方法，仍然停留在傳統的電泳技術或利用高效能液相層析技術來進行分析。然而這些方法，不僅費時，且只能分析一些特定的變異血紅素種類，並且容易誤判。目前在台灣變異血紅素基因的檢查，主要是依據平均血球容積(MCV)的值大小來初步判斷變異血紅素帶因者的可能，再利用高性能液相層析法(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)技術進行分析。依據平均血球容積(MCV)此方法易受眾多因素的影響，準確性很低。而利用 HPLC 技術亦只能初步判斷，無法準確判斷變異血紅素的種類。若要知道變異血紅素的種類需要經過龐大的分生實驗及基因定序來完成，其操作十分繁雜且價格昂貴，不適合作大量篩檢。因此，目前仍需一種簡便及準確的變異

血紅素篩檢方法。

美國專利案第 7,544,513 號揭露一種利用專一性抗體及特殊之試劑來辨認血紅素(hemoglobin)之方法，其受限於抗體辨認變異血紅素的種類，而只能辨識少數幾種變異血紅素種類，然而變異血紅素種類為數眾多，利用此方法只能鑑定少數之變異血紅素，更有抗體產生偽反應的訊號而造成誤判的可能；且其操作繁雜及需較長操作時間。

文獻 1 (Clinical Chemistry 53:8 1448–1454 (2007))揭露一種利用串聯質譜儀進行 hemoglobin A2 定量之方法，其需要搭配 HPLC 技術來作定量分析。其缺點為除了需要高性能液相層析儀加上串聯質譜儀外，其需較長分析時間(高性能液相層析分析即需 1.5 小時)。另外，所分析的 hemoglobin A2 是正常人血紅素的一種小成份(小於總血紅素的 3.5%)，並且易受到缺鐵性貧血的情況下受到影響而造成不準確。其方法只能判斷海洋性貧血的可能，無法準確判斷變異血紅素的種類。

文獻 2 (Clinical Biochemistry 42 (2009) 99–107)揭露一種利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀 (MALDI-TOF)結合微波及酸水解來分析 HbG Couthatta 的方法。其需要搭配逆相高性能液相層析法(Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)技術先進行 hemoglobin 的純化，再利用酸水解的方式將 heme 與 hemoglobin 分離後再進行蛋白質水解。其缺點為除了需要搭配逆相高性能液相層析儀先進行純化之外，其操作步驟亦較繁雜。

文獻 3 (Clinical Biochemistry 41 (2008) 75–81)揭露一種利用電灑質譜儀來分析 hemoglobin Q (Hb Q-India)及臨床上的 double mutant hemoglobin S/D 之方法。其亦需要搭配 HPLC 技術來分析。其缺點為除了需要高性能液相層析儀加上串聯質譜儀外，亦需較長的蛋白質水解時間(大於 12 小時)及操作。

文獻 4 (Journal of Chromatography A, 1166 (2007) 101–107)揭露一種利用超音波反應器(sonoreactor)或超音波探針(sonication



probe)，將經過凝膠(SDS PAGE)電泳分析後的樣品進行酵素水解，再利用 MALDI-TOF 進行分析。其樣品需要經過凝膠(SDS PAGE)電泳之處理，除電泳時間外，後續在凝膠中進行酵素水解都需要較長時間(處理總時間大於 6 小時)。

目前鑑定變異血紅素蛋白的方法是利用傳統的電泳技術或 HPLC 進行分析。然而這些方法受限於解析度及效能，無法有效的準確分析出正確的結果；電泳的分離及 HPLC 的分析受限於許多的變異血紅素其分離型式(patterns)類似，而容易造成誤判。此外，也受限於分析的樣品數及分析時間，而需較長的鑑定分析時間。因此，不適合做變異血紅素的鑑定。為解決上述之問題，目前仍需一種只需簡易的操作方式及簡短的時間即可完成的變異血紅素之篩檢方法。

#### 【發明內容】

本發明提供一種快速篩檢變異血紅素之方法，包含：(a)提供血液樣品；(b)快速分離血液樣品中之血紅素；(c)藉由 MALDI-TOF，以直線型(Linear mode)分析方法，判定步驟(b)之產物是否含有變異血紅素，並選擇性地執行以下步驟；(d)於超音波震盪環境下，以酵素水解步驟(b)之產物；以及(e)藉由 MALDI-TOF，以反射型(Reflection mode)分析方法，經由比對軟體來判定步驟(d)之產物所含之變異血紅素之類型。

其中步驟(b)可包含：(b1)在水溶液中釋出血液樣品中之血紅素；(b2)離心步驟(b1)之產物；以及(b3)收集步驟(b2)之產物的上清液，其中上清液中含有大量之血紅素。或者，步驟(b)可包含：(B1)將血液樣品施加在濾紙血片上；以及(B2)萃取濾紙血片中之血紅素。其中步驟(B2)可包含：以丙酮處理濾紙血片，然後於超音波震盪環境下以水溶液從濾紙血片中萃取出血紅素。本發明之血液樣品處理可在 20 分鐘之內完成。本案中「快速分離血液樣品中之血紅素」意指有別於前述習知技術之 HPLC 或電泳分離必需耗費數小時，本發明之樣品前處理可在 20 分鐘內完成。

其中步驟(c)可包含：判定步驟(b)之產物的分子量，其中若此

分子量與正常血紅素分子量之差異大於 6 道爾頓 (Dalton, Da) 則判定血液樣品含有變異血紅素，此時可選擇執行或不執行步驟(d)和(e)；若此分子量與正常血紅素分子量之差異小於 6 道爾頓則繼續執行步驟(d)和(e)。經由直線型分析方法可獲得樣品中血紅素之完整分子量，當其與正常血紅素分子量之差異大於 6 道爾頓，可判定此樣品中帶有變異血紅素，此時可選擇結束篩檢程序。在醫院或檢驗單位欲處理大量檢體時，可利用本發明快速且簡便的判斷出血液樣品中是否含有變異血紅素。再者，若欲進一步判定此變異血紅素之類型，可繼續執行步驟(d)和(e)。另一方面，若此分子量與正常血紅素分子量之差異小於 6 道爾頓，為更精確且詳細的判斷檢體中究竟是否含有變異血紅素，則繼續執行步驟(d)和(e)。在步驟(d)和(e)中，利用酵素水解樣品中血紅素並搭配反射型分析方法(其解析度較直線型分析方法高)，可得到樣品中血紅素之胜肽質量指紋圖譜(PMF)，進而可鑑定和分析變異血紅素之種類。

前述酵素水解所處之超音波震盪環境可由超音波震盪器(sonicator)、超音波探頭(ultrasonic probe)、或超音波反應器(sonoreactor)所提供。另外，可添加有機溶劑以促進酵素水解，此有機溶劑選自於由乙腈(acetonitrile)、甲醇(methanol)或丙酮(Acetone)所構成之群組。再者，可使用微波裝置以促進酵素水解。藉由超音波震盪、促進溶劑或微波可加速樣品中血紅素之酵素水解，以縮短整體分析時間。此外，較佳是使用胰蛋白酶 (Trypsin) 或 Endoproteinase Glu C 進行水解。

本發明更包含於步驟(e)之後，藉由串聯質譜技術(質譜-質譜技術)(Tandem mass spectrometry (MS/MS))來分析變異血紅素之部份氨基酸序列。藉此可進一步確認氨基酸突變位置。

前述比對軟體乃依據分子量資料庫進行比對，此分子量資料庫包含變異血紅素之已知分析結果。而欲篩檢之變異血紅素可選自於由 Hb J-Meinung、Hb E、Hb Kaohsiung、Hb G-Taichung、Hb CS、和 Hb G-Ami 所構成之群組。所述分子量資料庫包含此等變異血紅素之已知分析結果以供比對。

再者，本發明所述之方法，較佳是使用芥子酸(Sinapinic acid)為直線型分析方法之基質，且較佳是使用  $\alpha$ -氰基-4-羥基肉桂酸( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)為反射型分析方法之基質。

本發明利用 MALDI-TOF 之高敏感、準確及快速的特性優勢，結合快速酵素水解血紅素的技術方法。可分析所有因為血紅素蛋白基因變異所造成之蛋白質分子量差異，進而判斷其變異血紅素的種類。另一優勢為操作方法簡便，只需 1 小時內即可完成操作流程，適合進行大量的篩檢，因而在市場上有很大的競爭優勢。

本發明之其它目的及優點由隨後之詳細說明及隨附之申請專利範圍當可更加明白。

### 【實施方式】

本發明之一實施例提供一種簡單且快速的方法，結合 MALDI-TOF 的分析，對 Hb J-Meinung 進行鑑定。血液樣品可經由簡單的清洗步驟後，直接點在 MALDI-TOF 的分析盤上，與基質混合後，利用直線型(linear mode)的分析方法進行血紅素蛋白質的質量分析。隨著血紅素質量的分析結果，可以初步判斷樣品中是否含變異性血紅素蛋白。

接下來利用超音波震盪輔助酵素水解血紅素蛋白的方法，進行蛋白質水解；利用反射型(reflection mode)的分析方法進行胜肽質量指紋圖譜(peptide mass fingerprint, PMF)的分析。此方法可正確識別及分辨 Hb J-Meinung 及正常的  $\beta$  鏈胜肽質量分佈。此外，也利用 MS/MS 的方法進一步對 Hb J-Meinung 胜肽片段進行氨基酸的序列分析。

Hb J-Meinung 為海洋性貧血種類之一，主要是變異血紅素所引起，其特性為血紅素蛋白的染色體基因上的 beta-chain 中的一個基因其第 56 個胺基酸的位置從 Gly 突變成 Asp，其蛋白質分子量增加 58.04 Da。

將取得的血液樣品，利用生理食鹽水清洗後，加入純水利用滲透壓方式將血球破裂，釋出血紅素蛋白(hemoglobin)；稀釋至適

當濃度，以 MALDI-TOF 分別利用直線型及 PMF 方法進行分析；依據樣品中血紅素蛋白與正常血紅素蛋白(Control)分子量差異分別使用下列方式分析：(a)當樣品中血紅素蛋白與正常血紅素蛋白(Control)分子量差異大於 6 Da 時，可利用直線型分析方式進行判讀；(b)當樣品中血紅素蛋白與正常血紅素蛋白(Control)分子量差異小於 6 Da 時可利用 PMF 分析方式進行判讀。

以下，揭示實施例以具體說明本發明，惟本發明並非以下述實施例為限。

#### [實施例 1]

本實施例所使用 MALDI-TOF 的基質有芥子酸(sinapinic acid, SA) 和  $\alpha$ -氰基-4-羥基肉桂酸( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)，購自 BRUKER 公司。配置溶液為乙晴 (ACN)、甲醇 (MeOH)、乙醇(EtOH)、三氟乙酸(TFA)均為 HPLC 級，購自 Merck 公司。胰蛋白酶 (Trypsin)購自 Promega 公司。分析儀器為 MALDI-TOF-TOF：auto flex III (購自 BRUKER 公司)。

#### (A) 實驗試劑配置：

MALDI-TOF 基質溶液：

(1) 飽和 SA 基質溶液(用於直線型分析)：秤取 20 mg 的芥子酸(Sinapinic acid) 溶於 1 mL 的 0.1% TFA 溶劑中，其溶劑包括 500  $\mu$ L 的 ACN 及 500  $\mu$ L 的純水。

(2) 飽和 CHCA 基質溶液(用於反射型分析)：秤取 10 mg 的  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid 溶於 1 mL 的 0.1% TFA 溶劑中，其溶劑包括 500  $\mu$ L 的 ACN 及 500  $\mu$ L 的純水。

#### (B) 分析樣品置備：

將血液樣品於 1200 xg 速度下，離心 3 分鐘，移去血清，再利用 1x PBS buffer 於 1200 xg 速度下，離心 3 分鐘清洗三次。將清洗後的血球，取適量稀釋於純水中 1000 倍。於 10000 xg 速度下，離心 3 分鐘。收集上清液，並保存於冰上待分析。此時，上清液中含有血紅素。

或者，可從濾紙血片中萃取出血紅素。將血液樣品施加在濾

紙血片上，取 0.5x0.5 cm 大小的濾紙血片，放入 1 mL 的容器管 (eppendorf) 中，以 1 mL 的丙酮(Acetone)清洗 1 分鐘後，將丙酮除去，加入 1 mL 的純水，置於超音波震盪器(sonicator)下震盪 3 分鐘，利用超音波震盪方式將血紅素從濾紙血片中萃取出來。

(C) 酵素水解反應(胰蛋白酶消化反應，trypsin digestion)：

將 Trypsin 以 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  溶液配製，其濃度為 20 ng/ $\mu\text{L}$  (新鮮配製)。將上述(B)之樣品各取 2  $\mu\text{L}$ ，加入 2 $\mu\text{L}$  的胰蛋白酶溶液 (Trypsin solution)及 3 $\mu\text{L}$  的 ACN 或甲醇溶劑於超音波震盪下反應 10 分鐘，最後再混以 1 比 1 比例的 CHCA 基質以 MALDI-TOF-TOF 偵測經酵素水解反應後的胜肽質譜訊號。上述水解反應亦可使用 Endoproteinase Glu C 取代胰蛋白酶。

(D) MALDI 的樣品製備：

首先將配製好具有吸收雷射能量特質的基質溶液與分析溶液，以適當的比例(1:1)混合均勻後，將其點在樣品盤上，利用空氣自然乾燥的方式，等待混合溶液的溶劑在大氣下揮發，基質和分析物會在樣品盤上形成固體共結晶，將樣品送入質譜儀內進行分析。

(E) 質譜分析方法：

首先利用飛行時間偵測器(Time-of-Flight, TOF)中的直線型方法分析上述(B)之樣品，以判定其中血紅素蛋白的質量，比較是否有與正常血紅素分子量差異的訊號，初步判斷是否有變異性血紅素的存在。

接下來，利用反射型方法分析上述(C)之樣品(經酵素水解反應後)，將胜肽質譜訊號經由軟體比對後，判別變異性血紅素之種類；最後再將目標胜肽進行質譜-質譜(MS/MS)碎裂以 life mode 分析，確定變異性血紅素胜肽的胺基酸序列。

(F) 分析軟體：

先利用 flexAnalysis 軟體進行質量分析後，再以 Biotoool 軟體、Mascot 軟體及 Sequence Editor 軟體進行比對分析。

在此實施例中，利用 MALDI-TOF 技術，對變異性血紅素的

樣品進行蛋白質質量及胜肽質量指紋圖譜的分析。所使用的方法有二種：首先利用直線型分析方法測定樣品中蛋白質的質量分佈，初步判定是否有變異性血紅素的的存在。接下來利用反射型的分析方法，測定經酵素水解後的蛋白質胜肽質量分佈圖。偵測除了正常的血紅素蛋白的胜肽質量片段之外，是否有變異性血紅素蛋白的胜肽質量片段。

圖 1 展示依據本發明之實施例，藉由 MALDI-TOF，以直線型分析方法所得之正常及變異血紅素(Hb J-Meinung)之  $\beta$  鏈的蛋白質質量分析圖。從圖 1 中可觀察出利用直線型分析方法可準確的測定出正常的  $\alpha$  鏈蛋白和  $\beta$  鏈蛋白的分子量分別為 15127.2 Da 和 15867.9 Da。此外也發現，在正常的  $\beta$  鏈蛋白訊號附近有一個分子量 15926.5 的蛋白質。比正常的  $\beta$  鏈蛋白質分子量大約多 58 Da。由此結果初步判斷，此樣品可能含有  $\beta$  鏈蛋白的變異血紅素蛋白。準確的分析將由反射型方法進行分析。

圖 2A 展示依據本發明之實施例，藉由 MALDI-TOF，以反射型分析方法所得之上述(C)之樣品(經酵素水解後)的質譜圖。圖 2B 展示以 MASCOT 軟體分析比對後之結果及序列的涵蓋百分比。圖 2C 展示正常及變異血紅素(Hb J-Meinung)之  $\beta$  鏈的質譜胜肽質量分析圖。反射型方法的質譜分析結果(圖 2A)經由 MASCOT 的分析軟體比對資料庫後(圖 2B)，確定樣品中的物質除了正常的血紅素蛋白質胜肽質量片段之外尚有額外的訊號。經過比對分析後有一胜肽質量片段符合 Hb J-Meinung 的胜肽質量片段。胜肽質量指紋圖譜的分析中，除了有正常的  $\beta$  鏈蛋白的胜肽質量片段外，尚有一個比正常的  $\beta$  鏈胜肽質量片段大約多 58 Da 的胜肽質量片段，其質荷比(m/z)的分子量分別為 2059.047 和 2117.056 (圖 2C)。此結果符合 Hb J-Meinung 的胜肽質量指紋圖譜。因此，接下來將這二個片段利用 MALDI-TOF 中的 CID 方法進行片段碎裂(MS/MS)分析。結果指出分子量 2059.047 的片段經由 MASCOT 的分析軟體比對資料庫後，其序列結果符合正常  $\beta$  鏈胜肽片段中的 42-60 的序列。

圖 3A 展示依據本發明之實施例，以質譜-質譜(MS/MS)分析所得之 CID 方法的質譜圖，其用以分析變異血紅素的胜肽位置。圖 3B 展示 *de novo* 序列分析結果：a、b 和 y 離子(ions)的質量分佈結果。圖 3C 展示 Biotoools 軟體對變異血紅素 (Hb J-Meinung) 的比對結果：a、b 和 y 離子(ions)的質量分佈符合結果。分子量 2117.056 的片段經過片段碎裂(MS/MS)分析後，經由 *de novo* 的分析軟體比對結果指出(圖 3A)：y2 到 y3 的離子片段(ions)在 CID 的圖譜中的質量是符合的；此結果指出從 y1 到 y3 (KPN)並沒有突變發生。此外，a 和 b 離子(ions)片段分佈也是相同的結果，指出 b1 到 b10 的離子片段(-FFESFGDLST)是沒有突變發生的，此結果清楚的指出突變的地方在 b11/y4 的離子片段位置。另外，從 a19、b18 及 y4 到 y17 的離子片段皆可發現其分子量皆增加大約 58 Da (圖 3B)。由上述的結果指出此片段為 Hb J-Meinung，因此，利用 Biotoools 及 sequence editor 的軟體進行 Hb J-Meinung 的序列比對，發現序列的分子量分佈是符合的(圖 3C)。這些結果指出，此變異血紅素的蛋白質氨基酸突變是發生在  $\beta$  鏈蛋白中的第 56 個位置，從氨基酸 Gly 突變成氨基酸 Asp。

目前鑑定變異血紅素蛋白的方法是利用傳統的電泳技術或 HPLC 進行分析。然而這些方法受限於解析度及效能，無法有效的準確分析出正確的結果；電泳的分離及 HPLC 的分析受限於許多的變異血紅素其分離型式(patterns)類似，而容易造成誤判。此外，也受限於分析的樣品數及分析時間，而需較長的鑑定分析時間。因此，不適合做變異血紅素的鑑定。本發明之方法，可將複雜的血液樣品，只經過簡單的清洗及離心、或者是從濾紙血片中將血紅素萃取出來，即能立刻進行酵素水解，然後進行 MALDI-TOF 的分析。樣品處理所需的時間僅需小於 20 分鐘，酵素水解的過程結合特定的試劑可有效的對血紅素蛋白進行水解，所分析的樣品是複合物的血紅素蛋白，可分析所有因為血紅素蛋白基因變異所造成之蛋白質氨基酸差異，進而判斷其變異血紅素的種類。

本發明提供一種利用 MALDI-TOF 技術結合快速水解蛋白質

的方法，對血紅素蛋白進行蛋白質的質量及水解後的肽質量片段分析。MALDI-TOF 的優點為：可快速及準確的分析物質的分子量，因此廣泛的運用於蛋白質體學上的蛋白質及其肽的序列分析。因此本發明利用其快速且準確的效能，分析樣品中血紅素蛋白的質量，如所舉例子中發現有一個蛋白質其分子量比正常的  $\beta$  鏈蛋白質分子量大約多 58 Da。此結果可以讓我們快速且簡單的判斷是否有變異血紅素蛋白的存在。然後，再利用準確的肽質量指紋圖譜及進一步利用 MS/MS 的方法，可讓我們正確鑑定此變異血紅素蛋白的種類為 Hb J-Meinung，且此變異血紅素的蛋白質氨基酸突變是發生在  $\beta$  鏈蛋白中的第 56 個位置，從氨基酸 Gly 突變成氨基酸 Asp。比較傳統的電泳技術或 HPLC 技術，此技術方法的優點為：不需經過任何的純化過程，且樣品處理簡單、時間短、分析時間快等。甚者，只需要非常少量的樣品(1  $\mu$ L 血液樣品)即足夠分析，分析的層次可達到變異血紅素蛋白的氨基酸序列。有異於傳統上的基因層次的分析，更有助於臨床上的診斷及病因的了解。

本發明可在不離開本發明之精神及基本特徵下做各種特定之例示。因此上述實施例應被視為舉例性而非限制性者，且本發明之範圍為由隨附之申請專利範圍所限定，而非由上述說明所限制，所有與申請專利範圍意義相等之變化均應包含於本發明之範疇中。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 展示依據本發明之實施例，藉由 MALDI-TOF，以直線型分析方法所得之正常及變異血紅素(Hb J-Meinung)之  $\beta$  鏈的蛋白質質量分析圖；

圖 2A 展示依據本發明之實施例，藉由 MALDI-TOF，以反射型分析方法所得之經酵素水解後之樣品的質譜圖；

圖 2B 展示以 MASCOT 軟體分析比對後之結果及序列的涵蓋百分比；

圖 2C 展示正常及變異血紅素(Hb J-Meinung)之  $\beta$  鏈的質譜



肽質量分析圖；

圖 3A 展示依據本發明之實施例，以質譜-質譜(MS/MS)分析所得之 CID 方法的質譜圖，其用以分析變異血紅素的胜肽位置；

圖 3B 展示 *de novo* 序列分析結果：a、b 和 y 離子(ions)的質量分佈結果；以及

圖 3C 展示 Biotools 軟體對變異血紅素 (Hb J-Meinung) 的比對結果：a、b 和 y 離子(ions)的質量分佈符合結果。

【主要元件符號說明】

(無)

七、申請專利範圍：

1. 一種快速篩檢變異血紅素之方法，包含：

(a) 提供一血液樣品；

(b) 快速分離該血液樣品中之血紅素；

(c) 藉由一基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(MALDI-TOF)，以一直線型(Linear mode)分析方法，判定步驟(b)之產物是否含有一變異血紅素，並選擇性地執行以下步驟；

(d) 於一超音波震盪環境下，以酵素水解步驟(b)之產物；以及

(e) 藉由該 MALDI-TOF，以一反射型(Reflection mode)分析方法，經由一比對軟體來判定步驟(d)之產物所含之該變異血紅素之類型。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該步驟(b)包含：

(b1) 在一水溶液中釋出該血液樣品中之血紅素；

(b2) 離心步驟(b1)之產物；以及

(b3) 收集步驟(b2)之產物的上清液，其中該上清液中含有大量之血紅素。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該步驟(b)包含：

(b<sub>I</sub>) 將該血液樣品施加在一濾紙血片上；以及

(b<sub>II</sub>) 萃取該濾紙血片中之血紅素。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該步驟(B<sub>II</sub>)包含：以丙酮處理該濾紙血片，然後於一超音波震盪環境下以一水溶液從該濾紙血片中萃取出血紅素。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該步驟(c)包含：判定步驟(b)之產物的一分子量，其中若該分子

量與正常血紅素分子量之差異大於 6 道爾頓 (Dalton) 則判定該血液樣品含有該變異血紅素，此時可選擇執行或不執行該步驟(d)和(e)；若該分子量與正常血紅素分子量之差異小於 6 道爾頓則繼續執行該步驟(d)和(e)。

6. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該超音波震盪環境係由一超音波震盪器(sonicator)、一超音波探頭(ultrasonic probe)、或一超音波反應器(sonoreactor)所提供。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該步驟(d)更包含添加一有機溶劑以促進前述之酵素水解，該有機溶劑係選自於由乙腈(acetonitrile)、甲醇(methanol)或丙酮(Acetone)所構成之群組。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該步驟(d)更包含使用一微波裝置以促進前述之酵素水解。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，更包含於該步驟(e)之後，藉由串聯質譜技術(質譜-質譜技術)(Tandem mass spectrometry (MS/MS))來分析該變異血紅素之部份氨基酸序列。

10. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該比對軟體係依據一分子量資料庫進行比對，該分子量資料庫包含該變異血紅素之已知分析結果。

11. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該變異血紅素係選自於由 Hb J-Meinung、Hb E、Hb Kaohsiung、Hb G-Taichung、Hb CS、和 Hb G-Ami 所構成之群組。

12. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該直線型分析方法係使用芥子酸(Sinapinic acid)為基質。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中該反射型分析方法係使用  $\alpha$ - 氰基 -4- 羥基肉桂酸 ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA) 為基質。

14. 如申請專利範圍第 1 項所述之快速篩檢變異血紅素之方法，其中所述之酵素水解係使用胰蛋白酶 (Trypsin) 或 Endoproteinase Glu C 進行水解。

八、圖式：

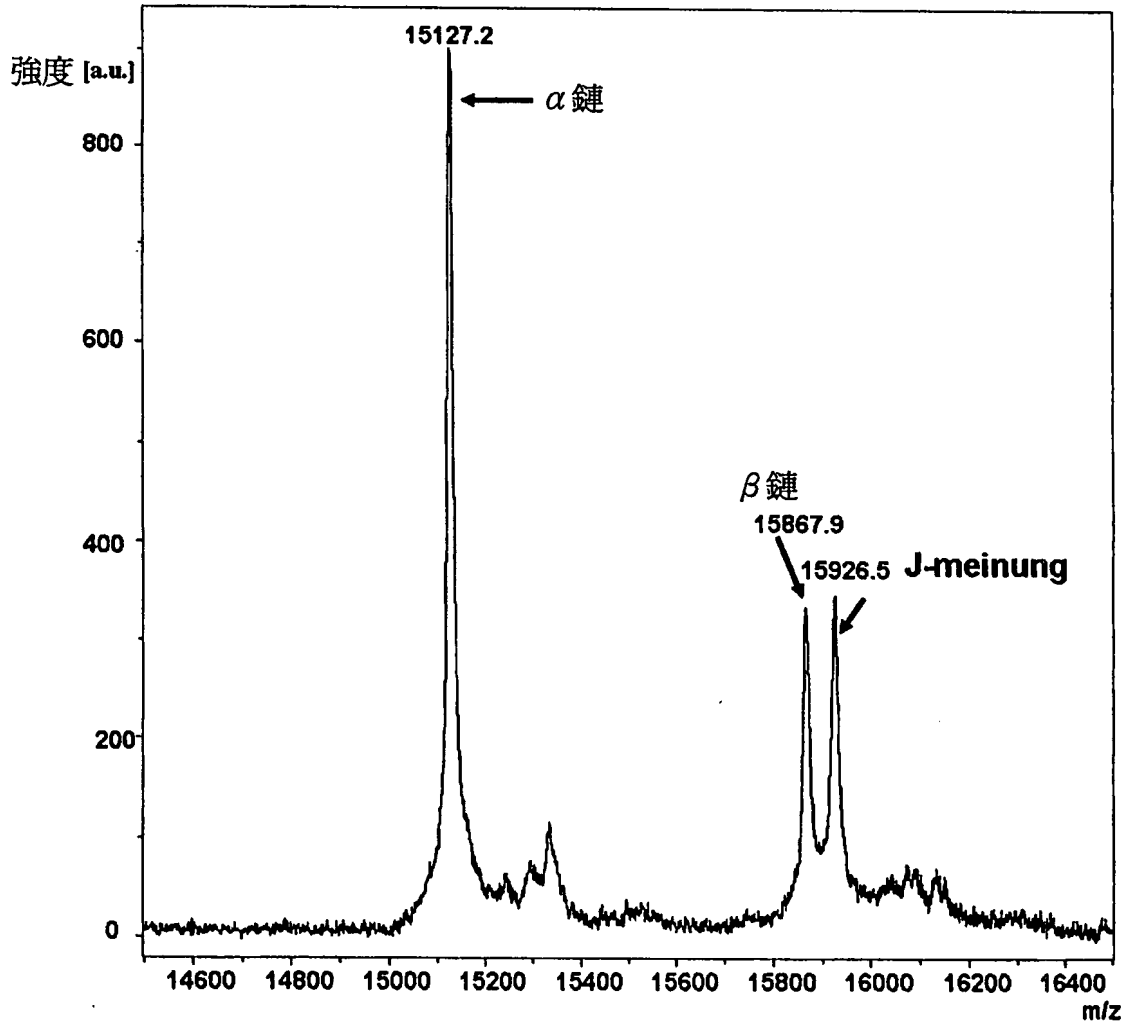


圖 1

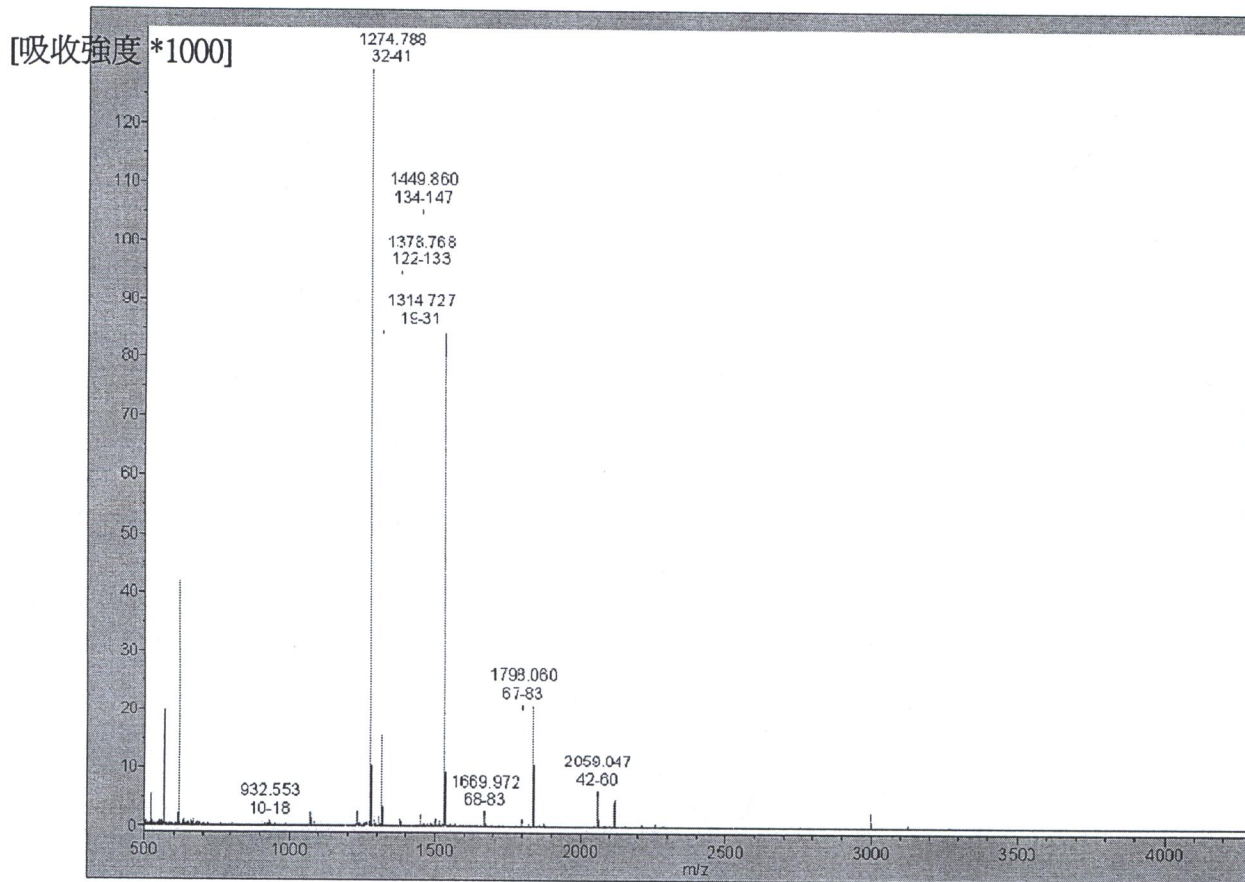
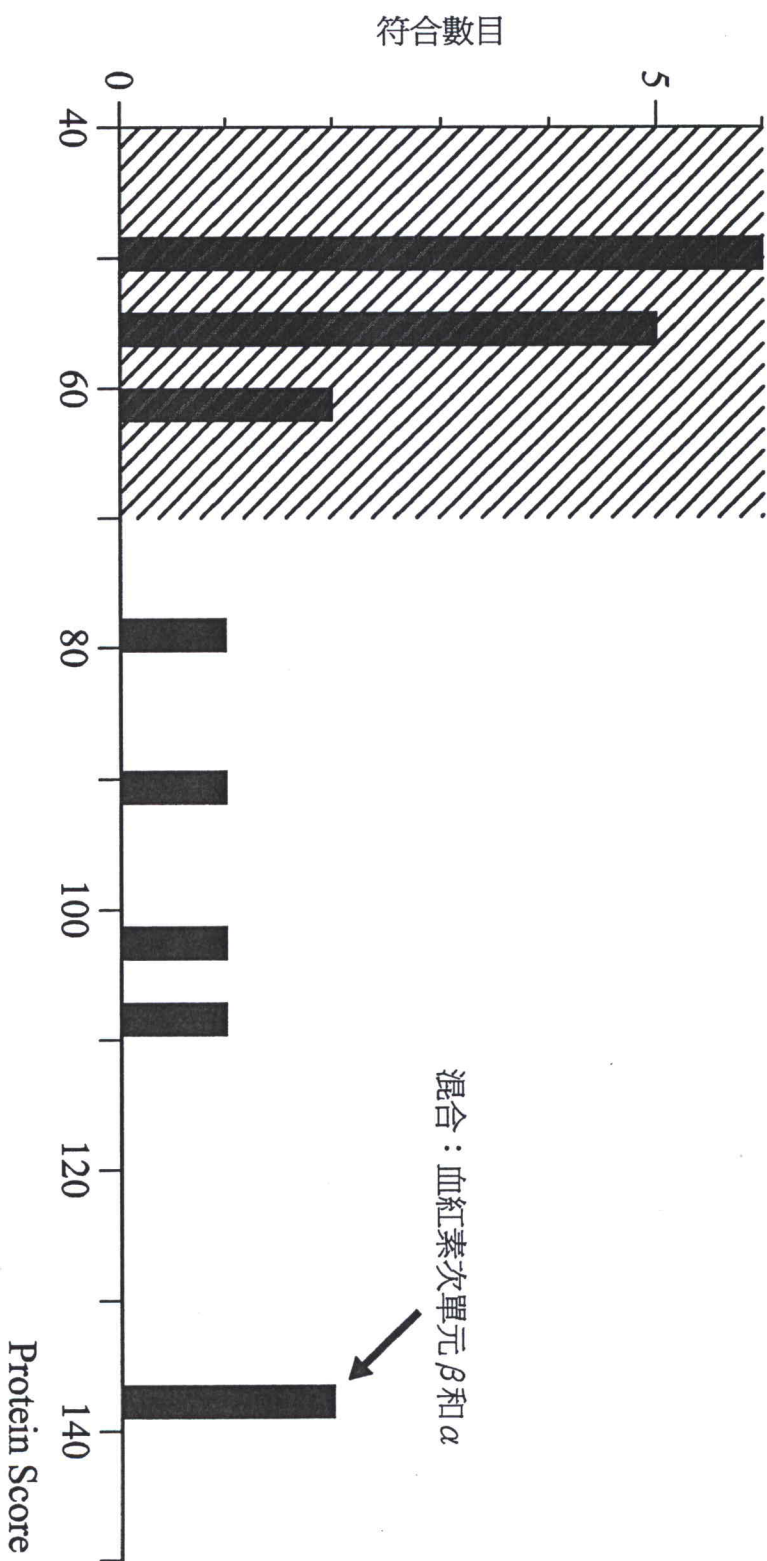


圖 2A



混合：血紅素次單元β和α

蛋白質 血紅素次單元β OS=現代人 GN=HBB PE=1 SV=2 HBB 人類

強度覆蓋率: 56.5% (158539 cont) 序列覆蓋率 MS: 63.9% 序列覆蓋率 MS/MS: 00%

波峰閾值: 0.0

PI: 6.9 MW (kDa): 0.0

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

MVHLTPEEKS AVTALWGVN VDEVGGENLG RLLWVYPTQ RFEESGDLG TPDVNGDPE VKNHGKVLG AFSDGLAHLD NLKGTATLS ELHCDKLVHD

110 120 130 140 150

PERFKLLGMV LVCVLAHFG KETTFVQA YQKVAQVAN ALAHKYH

圖 2B

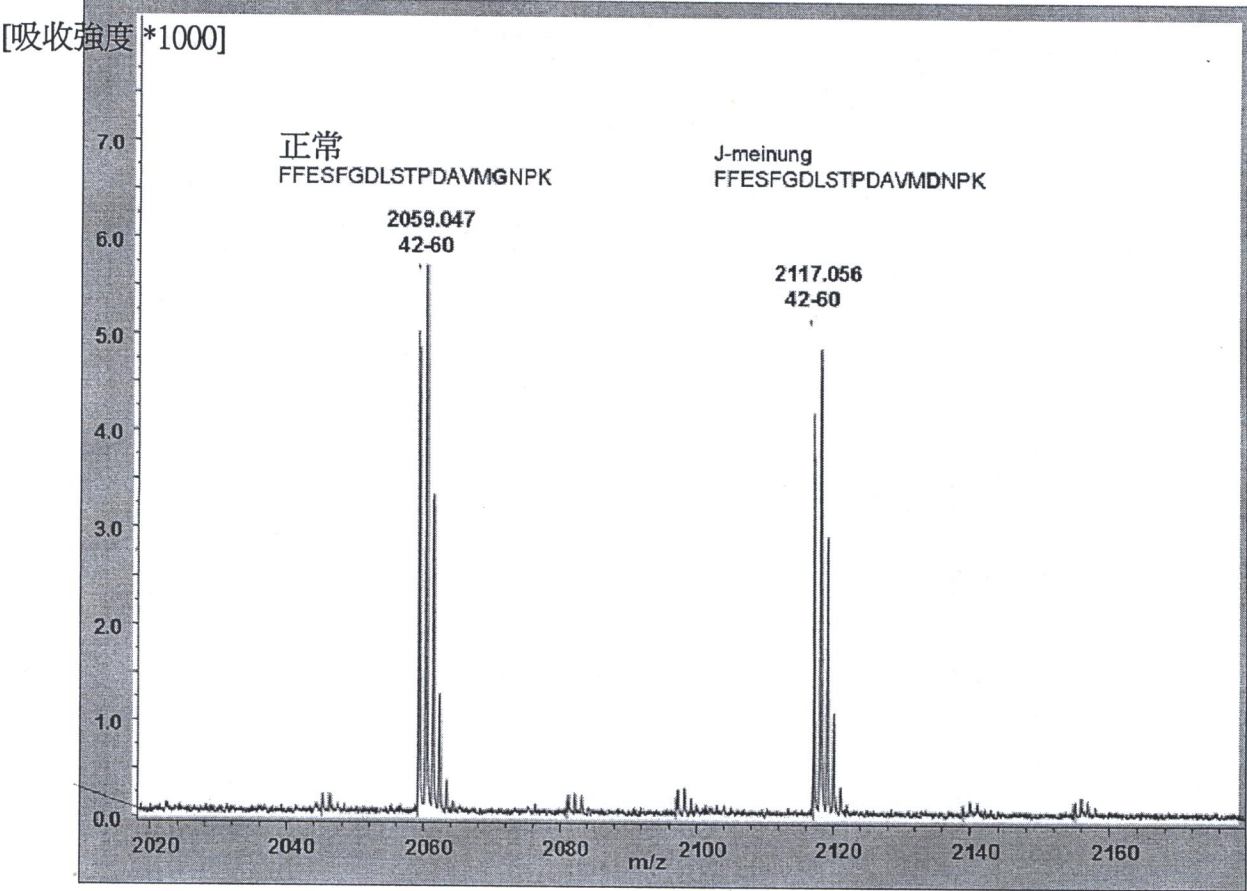


圖 2C



[吸収強度 \*1000]

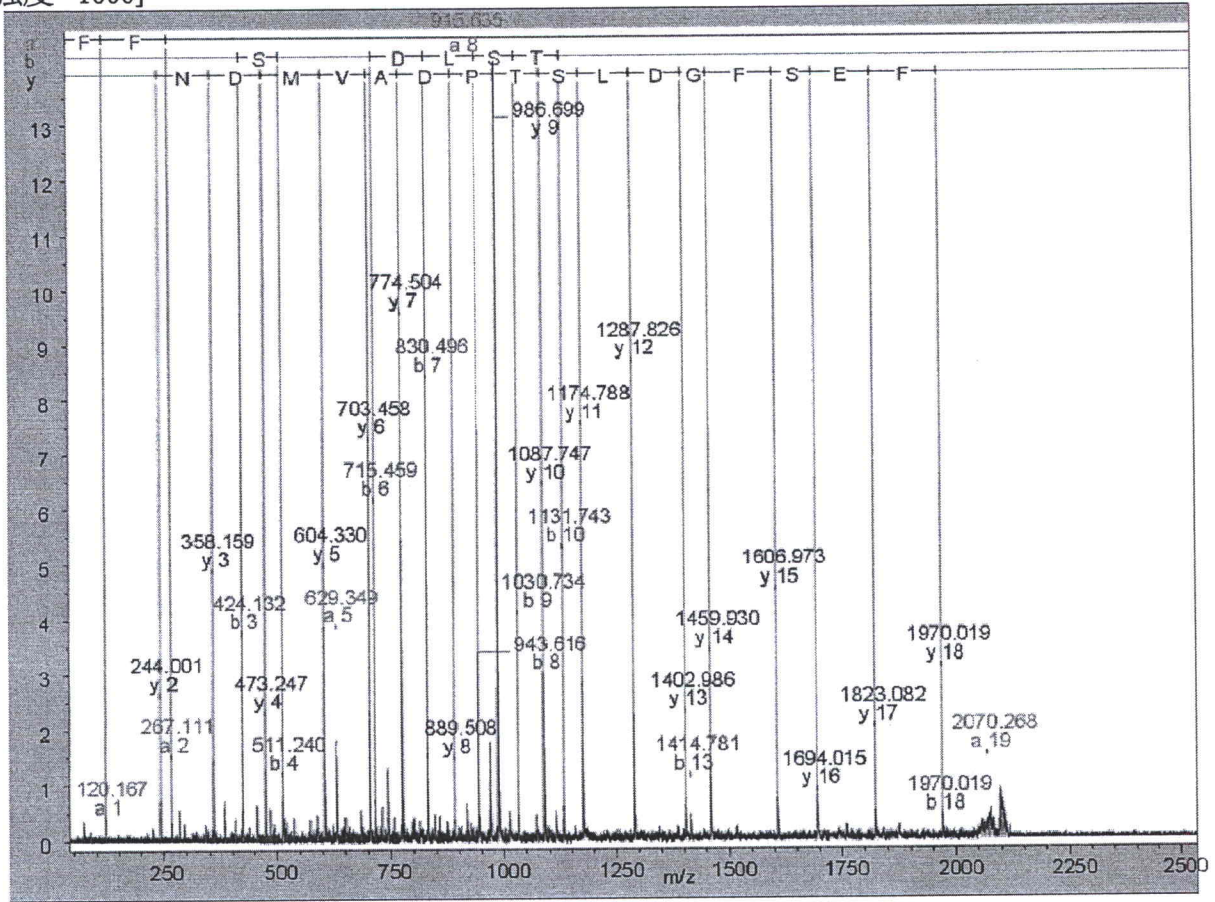


圖 3A

	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys
Ion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
a	120.081	267.149	396.192	483.224	630.292	687.314	802.341	915.425	1002.457	1103.504	1200.557	1315.584	1386.621	1485.69	1616.73	1673.752	1787.795	1884.847	2012.942
b	148.076	295.144	424.187	511.219	658.287	715.309	830.336	943.42	1030.452	1131.499	1228.552	1343.579	1414.616	1513.685	1644.725	1701.746	1815.789	1912.842	2040.937
y	147.113	244.166	358.208	415.23	546.27	645.339	716.376	831.403	928.456	1029.503	1116.535	1229.619	1344.646	1401.668	1548.736	1635.768	1764.811	1911.879	2058.948
	Lys	Pro	Asn	Gly	Met	Val	Ala	Asp	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Ser	Glu	Phe	Phe

圖 3B

	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Asp	Asn	Pro	Lys
Ion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
a	120.081	267.149	396.192	483.224	630.292	687.314	802.341	915.425	1002.46	1103.5	1200.56	1315.58	1386.62	1485.69	1616.73	1731.76	1845.8	1942.85	2070.95
b	148.076	295.144	424.187	511.219	658.287	715.309	830.336	943.42	1030.45	1131.5	1228.55	1343.58	1414.62	1513.69	1644.73	1759.75	1873.8	1970.85	2098.94
y	147.113	244.166	358.208	473.235	604.276	703.344	774.381	889.408	986.461	1087.51	1174.54	1287.63	1402.65	1459.67	1606.74	1693.77	1822.82	1969.89	2116.95
	Lys	Pro	Asn	Asp	Met	Val	Ala	Asp	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	Gly	Phe	Ser	Glu	Phe	Phe

圖 3C