

以雷射為基礎的分子影像質譜法

Laser-Based Molecular Imaging Mass Spectrometry

蘇鴻、謝建台

Hung Su, Jentaie Shiea

質譜儀 (mass spectrometer) 因受近代蛋白質體學 (proteomics) 與代謝體學 (metabolomics) 興起之影響，為要能偵測到生物體液中所存在極複雜、極微量的生化分子，在製造商及學術界長年努力之下，質譜儀性能不論是在靈敏度、解析度、甚至準確度上，均有近萬倍、甚至數十萬倍的提升。較諸多現在眾多的分析儀器中，質譜儀因具有超高之分析功能，因此在現代科學研究領域上，已成為最重要且不可缺少的分析工具之一。而近代以質譜儀為基礎，也有許多突破性的分析技術被開發出來，其中最著名的技術之一，就是分子影像質譜法 (imaging mass spectrometer, IMS)。分子影像質譜法可在不需要任何化學或生物標記、或是抗體鍵結下，可直接對生物組織表面進行雷射掃描。而每一雷射掃描，可將存在一面積極小的組織區域內之許多生化分子游離，這些生化分子離子在以質譜儀檢測到後，會被存為一張質譜圖。所有得自該組織切片不同區域的數千、乃至數萬張質譜圖，可再進一步以電腦軟體分析這些質譜圖，並表現出具不同質量之分子離子在切片上分布的分子影像圖。由質譜分子影像圖的分析結果，可得到一組織切片上特定生化分子之分布 (包括生化分子是否存在以及其強度比例)，再結合病理顯微診斷結果後，可找出一組織切片中與疾病或是腫瘤區域有密切關聯的生化分子。雷射因可聚焦到非常微小的範圍，因此是現代分子影像質譜分析中之重要的工具，本文主要目的，即是介紹以雷射為基礎的分子影像質譜法。

Due to the rise of proteomics and metabolomics, mass spectrometry has played an important role in many areas. One innovative application of mass spectrometry is imaging mass spectrometry (IMS) which is a label-free bioanalytical technique. The molecular imaging obtained by mass spectrometric analysis directly reveals distribution of specific biochemical compounds on clinical tissues. Combining IMS with pathological diagnosis will be helpful in discovering cancer-related biomarkers. In this paper, laser-based molecular imaging mass spectrometry will be introduced.

一、前言

以現代質譜分析技術直接分析固體樣品 (如生物組織) 表面上不同微小部位的化學及生化分子組成，並以所得之各式分子離子訊號為基礎，以

圖像方式來表達具不同強度之各離子在該樣品中的空間分布情形，稱之為影像質譜 (imaging mass spectrometry, IMS)。可以另外一種方式來敘述影像質譜法，就是在不破壞樣品的完整結構下，直接從樣品表面上獲得不同位置其中所含之各式生化及化

學分子組成的資訊。在傳統蛋白質體的分析上，往往需以物理或化學方法來破壞細胞組織，以釋放其中的生化分子，經萃取濃縮後，再以層析質譜法進行下一步的生化分析，此種做法會失去不同生化分子在一組織上分布位置的重要訊息。IMS 因有助於科學家了解特定生化分子在一組織上的分布情形，當某些特定分子僅存在於正常或是異常組織區域內時，生化學家可由其訊號的出現與否、或是強度大小，以之作為生物指標，來區別正常或異常組織區域。此外，了解各式生化分子在一生物組織上的分布，也有助於搜尋和各式疾病相關之生物指標 (biomarker)，此應用主要是和病理分析結果相結合，由病理的染色及顯微分析結果來判斷異常細胞所分布之區域，再比較此一區域內由分子影像質譜法所偵測到的生化分子種類，和正常細胞分布區域內所偵測到的生化分子種類間兩者的差異。因此，此技術近年來已成為蛋白質體學 (proteomics)、代謝體學 (metabolomics)、及脂質體學 (lipidomics) 研究上，非常重要的研究工具⁽¹⁾。

其實以質譜儀來進行影像的研究已有超過 40 年的發展歷史，只是一開始均是以樣品中所含的小分子或是無機元素 (無機質譜) 為對象。而早期所使用的質譜技術是以二次離子質譜法 (secondary ion mass spectrometry, SIMS) 作為游離源，再以時

間飛行式質譜 (time-of-flight, TOF) 對 SIMS 所產生分析物離子進行檢測。其操作原理是以高度聚焦的一次離子 (如 Cs_{137}^+ 或 C_{60}^+) 撞擊樣品表面以進行脫附游離，分析對象則以樣品中所含的金屬元素、金屬合金、及半導體材料為主。而應用質譜技術於有機及生化分子的影像研究，則是在 1980 年代初期才開始展開，其使用的技術仍是以 SIMS 為主，當時曾有報導以 SIMS-TOF 得到一磨菇表面的脂質訊號以及其分布⁽²⁾。以 SIMS 進行分子影像的優點是其具有超高之解析度 ($< 1 \mu m$)，然而其缺點則是無法順利將較大的生化分子脫附游離，因此 SIMS 只適合小的有機物分子的分子影像分析。

1987 年隨著 MALDI-TOF 的開發⁽³⁾，使得偵測到蛋白質、胜肽等大分子的訊號成為可能。MALDI-TOF 的游離機制複雜，因此到目前為止科學界尚無定論，不過目前科學界所接受的 MALDI-TOF 游離理論為：等體積的樣品溶液在和大量具有吸收 UV 光的有機酸小分子的基質溶液混合，乾燥後，樣品中的分析物會和基質分子形成共結晶 (co-crystallization)，再以脈衝式 UV 雷射光 (Q-switch) 照射此共結晶，雷射能量會由大量的基質分子吸收，並轉移給分析物分子，進而產生脫附游離現象，形成分析物離子。圖1 所示，為目前科學界所提出可能的 MALDI-TOF 游離機制。

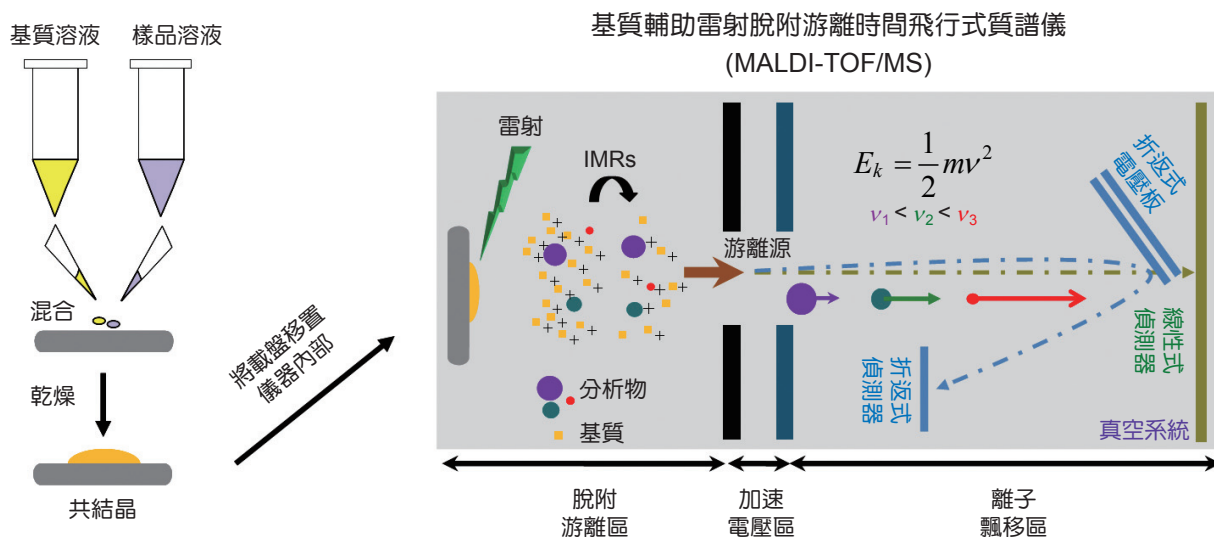


圖 1. MALDI-TOF 之樣品前處理 (左圖) 與游離機制 (右圖) 的過程。

脫附基本上是一種相位轉移 (phase transition) 之現象，在 MALDI-TOF 機制中，樣品是由固相在極短時間內因接受雷射高能量而轉成氣相分子，這種過程和其他脫附游離方法，如 SIMS 和快速原子撞擊法 (fast atom bombardment, FAB) 相類似。至於游離機制則是在脫附區中分析物分子和因吸收雷射高能所產生的基質碎片離子進行離子分子反應 (ion molecule reactions, IMRs) 以形成分析物離子，另外因雷射光照射樣品所導致的 multiple-photon ionization 也有可能是形成這些分析物離子的機制之一。

儘管 MALDI-TOF 自發展以來，已被大量用在蛋白質的鑑定上，但直到 1994 年起才有德國的 Prof. Spengler (Giessen Univ.) 首次將其應用在分子影像的研究，而自 1997 年起美國的 Prof. Caprioli (Vanderbilt Univ.) 更全面推廣應用 MALDI-TOF 來探討組織表面蛋白質分布的研究⁽⁴⁾，由於 TOF 可偵測到分子量極高的分子，加上其掃描時間又快，因此非常適合蛋白質的分子影像分析。可惜的是 TOF 本身無法進行二次質譜 (MS/MS) 分析，除非能和另一 TOF 連接以形成 TOF-TOF、或是和四極柱 (quadrupole) 連接以形成 Q-TOF，否則無法針對未知物進行 MS/MS 分析，以確認分析物的結構，而目前使用最廣的分子影像分析的質量分析器仍是以 TOF 為主。近年來所開發的大氣壓力基質輔助雷射脫附游離法 (atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption, AP-MALDI-TOF)，和傳統在真空下操作的 MALDI-TOF 比較起來，其在分析的靈敏度及解析度都不足，因此並不適合使用在分子影像上的研究。

決定一現代質譜儀是否能進行分子影像工作，其關鍵點主要在該質譜儀的游離源是否具有能自固體樣品上一極微小區域 (μm 大小)，對其內所含之生物種直接進行脫附及游離的功能。目前可以被使用在進行分子影像分析的質譜游離技術至少有 4 種，其中的兩種屬於在大氣壓力下操作的游離法 (ambient mass spectrometry, AMS)，分別為電噴灑輔助雷射脫附游離法 (electrospray-assisted laser desorption ionization, ELDI) 和脫附電噴灑游離法 (desorption electrospray ionization, DESI)⁽⁵⁻⁶⁾，另外

兩種則屬於在真空下操作的游離法，分別為基質輔助雷射脫附游離法 (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI-TOF) 與基質增強二次離子法 (matrix-enhanced secondary ion mass spectrometry, ME-SIMS)，其中 DESI、MALDI-TOF、和 ME-SIMS 屬於將分析區內所含生化分子直接進行脫附游離的分析方式；而 ELDI 則是將分析物分子的脫附及游離分兩步驟分別進行。

經上述游離法脫附游離後的分析物分子離子可以各式不同的質量分析器 (mass analyzer) 來進行偵測。而各式不同的質量分析器如離子阱式 (Ion trap)、時間飛行式 (TOF)、四極柱串聯飛行時間式 (Q-TOF)、傅立葉轉換式 (FT-ICR) 除了操作原理不同外，最大的差異就在其解析度上。離子阱式質譜儀雖屬於低解析度質譜儀，且掃描速度和質量偵測範圍也不高，但因價位低又可進行 MS/MS 分析，因此可以和以 ESI 為基礎的分子影像技術結合進行分子影像分析。傅立葉轉換式質譜儀是質譜儀器中，具最高之離子訊號峰的解析能力 (其解析度可達 1,000,000 FWHM)，因此可以很快地得到分析物分子的正確元素組成，這將有助於對未知物種的鑑定工作。可惜的是 FT-ICR 的掃描速度慢，因此無法進行快速且高解析的分子影像分析，此外 FT-ICR 的質量分析範圍一般小於 10,000 Da，因此也不適用於蛋白質分子影像。

本篇論文針對兩種以雷射脫附為基礎的分子影像質譜技術進行介紹。主要原因有二，首先是雷射可以聚焦的範圍約在 10–50 μm 之間，因此可以脫附足夠的分析物分子，在經游離過後，可被質譜儀輕易偵測到；SIMS 所使用的離子槍 (ion gun) 雖然可以聚焦到 1 μm 範圍以下，但所脫附的分析物在量上少，較難以真空度較差的離子阱式質譜儀偵測，因此多藉助靈敏度較高的 TOF 進行分析物離子的偵測。而對一個 5 × 5 mm 大小的組織切片，若以一具 50 × 50 μm 空間解析能力的雷射進行分析時，則可以將該組織分割成 100 × 100 的區域，這樣的空間解析度，將可針對該組織切片，提供一高品質而實用的分子影像。

我們專注在以雷射為基礎的分子影像技術第二個原因在於，雷射具足夠的能量，可成功將大、小

分子進行脫附，因此可以得到如蛋白質、胜肽、脂質甚至是代謝體的影像。至於 DESI 技術雖然也可以使用電噴灑所產生之帶多價電荷的溶劑液滴衝擊樣品表面，以產生分析物離子並得到脂質的分子影像，但因脫附能量的不足，加上所使用來衝擊樣品表面的帶電液滴組成多為有機溶劑(如甲醇)，因此大多只能得到易溶於有機溶劑的脂質分子影像⁽⁷⁾。

基於上述這些原因，本文後半部內容就集中在兩種和雷射相關的分子影像技術做論述，一為真空下操作的 MALDI-TOF 分子影像技術，另一為在大氣壓力下操作的 ELDI 分子影像技術。

二、真空下操作的 MALDI-TOF 分子影像技術

以 MALDI-TOF 進行分子影像研究時，第一步先以組織切片機將冷凍的組織切成適當薄片厚度(12–16 μm)後，隨即將該組織切片貼附於可導電之金屬載盤或玻片上，接著再進行 MALDI-TOF 基質塗覆的動作，再將塗覆好基質的組織切片送入 MALDI-TOF 游離源內進行脫附游離分析。現有的 MALDI-TOF 雷射(UV, Q-Switch)其聚焦能力約在 10–50 μm 之間，因此對一個 1 cm^2 的組織切片，可以 MALDI-TOF 分析到至少數千至數萬個樣品點(每一樣品點可得到一張質譜圖)，將足夠用以得到有用的分子影像，但須以每一個分析樣品點所得到的質譜圖都是高品質可用之圖譜為前提。而決定是否能以 MALDI-TOF 得到高品質的分子影像圖之關鍵即在於被送進游離源分析前，樣品的前處理步驟是否有效。目前用來得到進行分子影像分析所需的組織切片可分為三類：(1) 轉漬 (blotting)、(2) 雷射顯微擷取 (laser capture microdissection, LCM) 及 (3) 冷凍切片 (frozen section)。轉漬法是將組織置放於一經特殊處理(可吸附蛋白質及胜肽)的薄膜上，其薄膜的另一端緊貼在金屬薄片或是已塗覆具導電性的玻片(indium tin oxide, ITO)上，待其反應時間約 10 至 30 秒，組織內部分的蛋白質與胜肽會藉由薄膜而轉印在另一端的金屬薄片或玻片。待移去組織後，即可對金屬薄片或玻片上所吸附之蛋白質與胜肽進行 MALDI-TOF 的分子影像分析

(8)。雷射顯微擷取的做法為將組織切片蓋覆上一塑膠片，於欲擷取之組織範圍處施加雷射，經雷射照射處的塑膠片及組織表面，會因產生熱而使得塑膠片表面會沾黏上組織，爾後即可對沾附在塑膠片上的組織進行分子影像分析⁽⁹⁾。然而目前分子影像分析最常用來得到組織切片的方式為冷凍切片法，其作法是先將組織急速冷凍後(-80 $^{\circ}\text{C}$)，再將其置於冷凍切片機(-20 $^{\circ}\text{C}$)中進行切片。組織切片的厚度也關係到是否能得到品質好的分子影像圖示，若切的太薄，會因為分析物分子在組織上的含量過少，而無法得到這些位在組織上的分析物訊號；若切的太厚，會因為雷射無法穿透過塗覆有基質的組織切片，而降低分析物被脫附游離的效率，而無法得到好的分子影像；若組織切片被切的不平整，則會造成基質塗覆在組織切片上的量不同，會產生部分區域有較佳的分子訊號，而其他區域則會得到較差分子訊號的現象，因而無法得到正確分析物訊號的分子影像圖。此外在進行冷凍切片的過程中，非必要時應避免使用到 OCT (optimal cutting temperature) 包埋劑，雖然 OCT 使用在病理切片時，可固定組織外型、協助操作人員將切片厚度切薄至 6 μm (以觀察單一細胞之型態)，但因 OCT 是一種聚合物，在以 MALDI-TOF 進行脫附游離時，此聚合物的訊號非常強，因此往往會在進行質譜分子影像分析時，造成所謂的離子壓抑效應 (ion suppression effect)，壓抑組織切片上所存在生化分子的訊號，而無法得到正確的分子影像圖。

進行傳統的 MALDI-TOF 分析時，往往有所謂的甜點效應 (sweet spot) 發生。也就是在樣品盤上某些特定的區域，因基質分布均勻，可與分析物形成良好的共結晶，所以可以自這些區域得到很強的分析物離子訊號；相反的，若基質不均勻或是共結晶現象不佳，分析物離子訊號往往較前者則明顯要弱許多。為避免此現象發生，質譜操作人員往往會選取適當數目的質譜圖平均後，以得到能代表分析物離子平均訊號的質譜圖。然而在進行分子影像分析時，因要分析的樣品點太多(數千到數萬個樣品點)，無法以人工選取或平均質譜圖，只能完全仰賴儀器自動化 (automation) 分析的功能，因此 MALDI-TOF 基質如何與組織切片內之分析物形成

良好的共結晶，將是是否能得到品質佳的分子影像圖之關鍵點。目前應用在分子影像分析，塗覆基質的方法有以下幾種：(1) 乾點法 (dried-droplet)、(2) 噴灑法 (spraying)、(3) 昇華法 (sublimation)、及 (4) 儀器塗覆法 (automated machine)。乾點法是將內含基質之溶液以微量吸管滴點在組織切片上，並使其乾燥，乾燥後組織內所含的分子會在該點上與基質分子形成共結晶。此方法雖然快速又簡易，但同時會產生較小的分析物／基質比例，進而降低了對分析物分子的偵測靈敏度。噴灑法是將欲塗覆在組織上的基質溶液儲存在一般美術作畫用的氣動式霧化噴槍 (airbursh) 或是 TLC sprayer 等容器中，此基質溶液再藉由所施加氣體的推送並結合細小的噴嘴，如此一來可將基質溶液以非常微小的顆粒方式噴覆在組織表面，與切片內所含的生化分子形成共結晶。以此方法施加基質需花較長的操作時間，且操作人員需要有熟練的技巧。昇華法即是將固態基質，在真空的環境下藉由加熱，使得基質分子略過液相直接由固相轉變成氣相分子，再利用冷凝水系統的低溫將氣相基質分子固定在組織表面，並和分析物分子形成均勻的共結晶。此法因操作簡便、且

不需噴灑法所需熟練的操作技巧，而且樣品表面又能得到近乎完美且均勻的基質覆蓋，因此在被提出後，即為許多質譜學家所採用，並廣泛用在分子影像分析上⁽¹⁰⁾。儀器塗覆法則是需使用精密儀器，藉由儀器內部極靈敏的感測器 (sensor)，準確測得一組織切片覆蓋在樣品盤表面時的厚度，再控制基質溶液以最適當的量，塗覆在組織切片表面，但由於儀器造價昂貴，使用此法的實驗室並不如以昇華法或是噴灑法來的多。圖 2 所示為真空下操作的 MALDI-TOF 分子影像技術的前處理過程，包含組織切片及基質塗覆。

在以 MALDI-TOF 進行分子影像分析時，其擷取訊號的方式是將一具 X (μm) \times Y (μm) 大小的樣品或組織切片分成若干小區域 (N 等分)，接著在每個小區域以雷射進行一定數目的脫附游離及質譜檢測，再平均所偵測到的離子訊號。由於分析區域的數目會影響到分子影像的解析度，當區域的數目越多的時候，影像的解析度就會越高，相對的，耗費的時間也越長。此外雷射光聚焦點的大小、移動樣品載盤的步進馬達的精密度、及移動速率也會影響到取點的密度。目前最常用於 MALDI-TOF 及

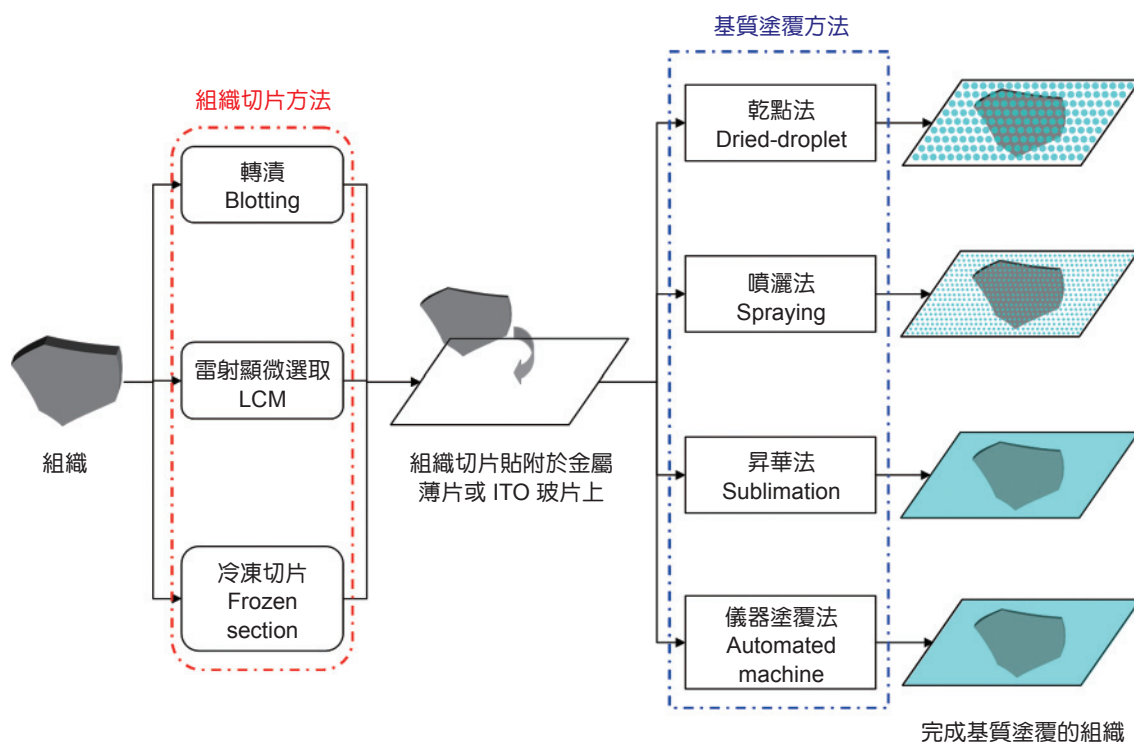


圖 2. MALDI-TOF 之前處理過程，包含組織切片 (紅框) 及基質塗覆 (藍框) 方法。

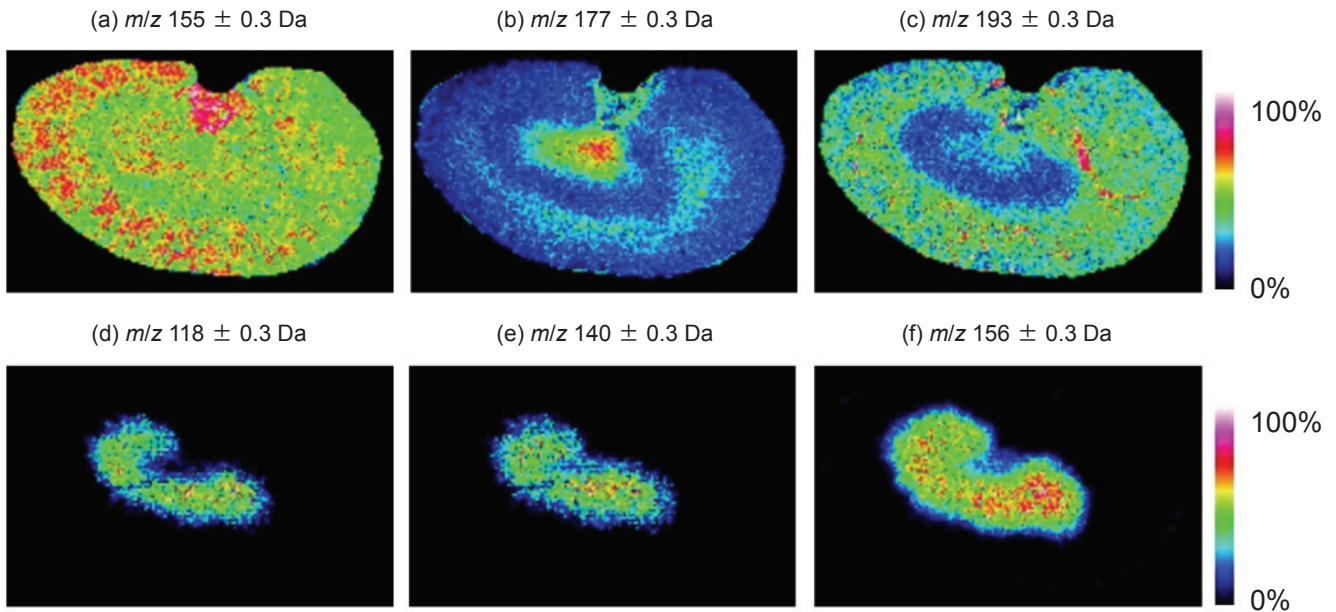


圖 3. 真空下以 MALDI-TOF 技術對大鼠腎臟組織切片 (長 × 寬: $22 \times 12 \text{ mm}^2$, 縱切面) 進行小分子影像分析: (a) 以 m/z 155, $[\text{DHB}+\text{H}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖、(b) 以 m/z 177, $[\text{DHB}+\text{Na}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖、(c) 以 m/z 193, $[\text{DHB}+\text{K}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖、(d) 以 m/z 118, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖、(e) 以 m/z 140, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖、(f) 以 m/z 156, $[\text{M}+\text{K}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖。

分子影像分析的是 Nd:YAG 固態雷射 (具 266 或是 355 nm 波長), 其空間解析的極限大在約在 $10-50 \mu\text{m}$ 。

1997 年 Caprioli 團隊發表胰臟切片的分子影像分析結果, 其作法是將老鼠的胰臟組織冷凍後切片, 乾燥後並施加 MALDI-TOF 基質, 最後再進行分子影像分析。由所得的各式蛋白質離子訊號中, 選擇 m/z 5802 (胰島素) 離子訊號繪製該胰臟組織切片的分子影像圖, 經胰島素離子訊號在組織上的分布, 可以推測胰臟能分泌胰島素的胰小島的器官大小約為 $175 \pm 25 \mu\text{m}$, 這與其他文獻所報導的 $50-230 \mu\text{m}$ 相符合⁽⁴⁾。2001 年同一團隊也以相同方式, 針對結腸癌組織切片做其上癌症生物指標的搜尋, 實驗過程是將致癌物質注入老鼠體內, 使基因突變以形成腸道腫瘤, 接著取腸道組織切片進行分子影像分析, 再比較該組織切片中癌化與正常組織區域中蛋白質的訊號。結果發現在癌化組織區域內至少有三個是正常組織區域所沒有偵測到的蛋白質離子訊號分別是 (m/z 10164、 m/z 10952、 m/z 12972)。接著再針對此癌化組織進行萃取、濃

縮, 並以液相層析儀 (liquid chromatography, LC) 分離並收集上述三個離子訊號後, 以酵素消化進行 MS/MS, 發現這三個離子分別來自 calgranulin A、calcylin 及 calgranulin B 三種蛋白質的碎片⁽¹¹⁾。

隨後世界上許多團隊也陸續提出許多生物組織的分子影像分析結果, 包括了腎臟 (kidney)、腦 (brain)、肝臟 (liver) 等組織等⁽¹²⁻¹⁴⁾。圖 3 為 MALDI-TOF 技術分析大鼠腎臟組織切片之分子影像, 其結果顯示, DHB 基質分子訊號 m/z 155, $[\text{DHB}+\text{H}]^+$ 大致均勻地分布在腎臟組織 (圖 3(a)), 而在腎臟髓質 (medulla) 處有較強的加鈉離子 m/z 177, $[\text{DHB}+\text{Na}]^+$ 訊號 (圖 3(b)), 在腎臟皮質 (cortex) 處則有強烈的加鉀離子 m/z 193, $[\text{DHB}+\text{K}]^+$ 訊號 (圖 3(c)); 對於 MW 117 (M) 分子而言, 其分子主要分布在腎臟髓質處 (圖 4(d)), 而加鈉離子 m/z 140, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (圖 3(e)) 與加鉀離子 m/z 156, $[\text{M}+\text{K}]^+$ (圖 3(f)) 訊號皆在髓質處表現, 但以鉀離子訊號表現最強。

圖 4 為 MALDI-TOF 技術觀察脂質在人類乳癌組織切片中的分布情形, 結果顯示, 磷脂質

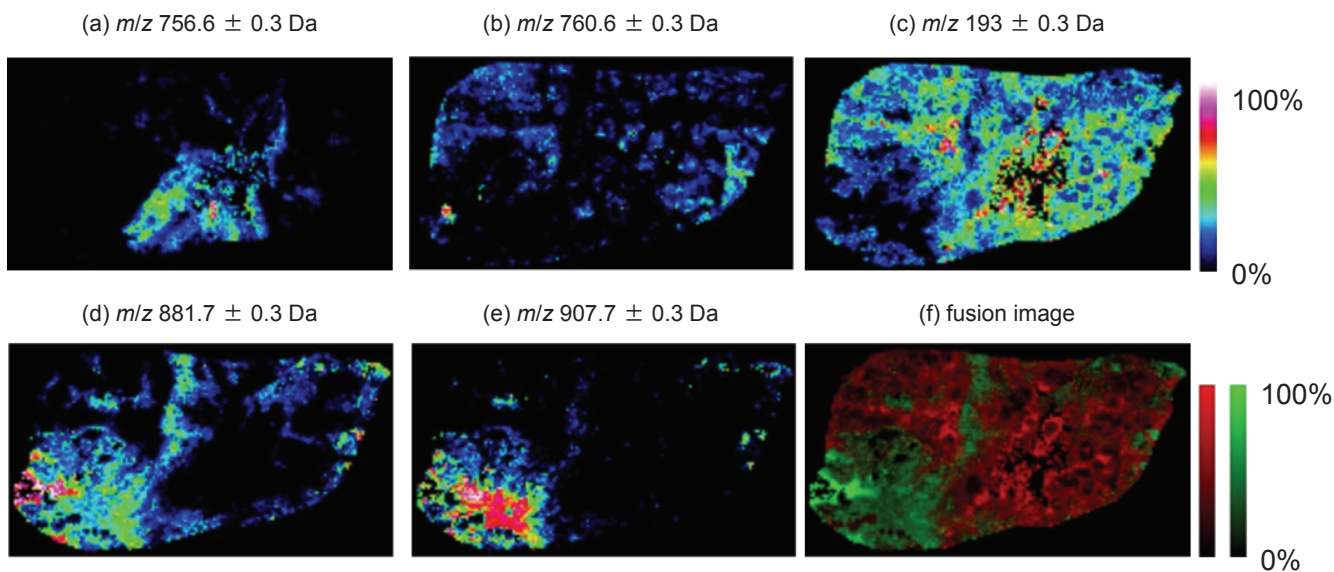


圖 4. 真空下以 MALDI-TOF 技術對人類乳癌組織切片 (長 × 寬: 16.5 × 8 mm²) 進行脂質影像分析: (a) 以 m/z 756.6, [PC(32:0)+Na]⁺ 離子所繪製之分子影像圖、(b) 以 m/z 760.6, [PC(34:1)+H]⁺ 離子所繪製之分子影像圖、(c) 以 m/z 782.6, [PC(34:1)+Na]⁺ 離子所繪製之分子影像圖、(d) 以 m/z 881.7, [TG(52:2)+Na]⁺ 離子所繪製之分子影像圖、(e) 以 m/z 907.7 [TG(54:3)+Na]⁺ 離子所繪製之分子影像圖、(f) 分子影像融合圖 (m/z 782.6 + m/z 907.7)。

(phospholipids, PL) 大都分布在乳癌組織的右半及上半處 (圖 4(a)–(c))，而三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 則分布在乳癌組織的左下角 (圖 4(d)、(e))。乳癌組織經 H&E 染色後，癌化組織的分布範圍與 PL 的分子影像圖符合，而正常組織的分布範圍則與 TG 的分子影像圖符合。

圖 5 為 MALDI-TOF 技術觀察蛋白質在小鼠腦部組織切片中的分布情形，其結果顯示，不同的蛋白質在腦部組織中呈現特異性的分布 (圖 5(a)–(e))。

三、大氣壓力下操作的 ELDI 分子影像技術

在真空下以 MALDI-TOF 進行分子影像分析，其儀器發展早且技術成熟，是目前生化及質譜界進行分子影像分析的主流技術。但因分析必須在真空下進行，因此不僅分析費時，而且在轉換樣品時也須破儀器真空，增加等待時間。此外樣品必須先進行一系列之前處理 (如乾燥與基質塗覆)，而且前

處理的好壞，將會大幅影響到分子影像分析的品質。另外在進行蛋白質相關的分子影像分析時，因蛋白質分子離子的質量大，所帶的電荷數目少 (多為一價)，因此 MALDI-TOF 儀器必須使用線性模式 (linear mode) 對蛋白質離子進行偵測，但此模式會導致離子飛行的長度變短、及無法進行二次聚焦，導致質譜儀所偵測到的蛋白質分子離子峰的解析度不佳，因此無法準確得到蛋白質的分子量。因此儘管可以得蛋白質的分子影像，但因質量並不準確，因此在蛋白質的鑑定上就無法有效進行，解決這些問題的方法之一就是以能在大氣壓力下操作的 ELDI 來進行分子影像的分析。如此一來樣品置換可以很容易在大氣壓力下進行，而且樣品並不需要塗覆基質或是經過任何前處理過程。以 ELDI 進行蛋白質分子影像分析還有一個更大的好處，即在於蛋白質分子在以雷射脫附後，會被導入一電噴灑區內，在和帶多價電荷 (multiple charge) 之溶劑液滴作用後，會產生和以 ESI 分析蛋白質一樣具多價電荷的蛋白質分子離子，由於一蛋白質分子離子往往具多根分別帶不同電荷的信號峰，因此可以非常準

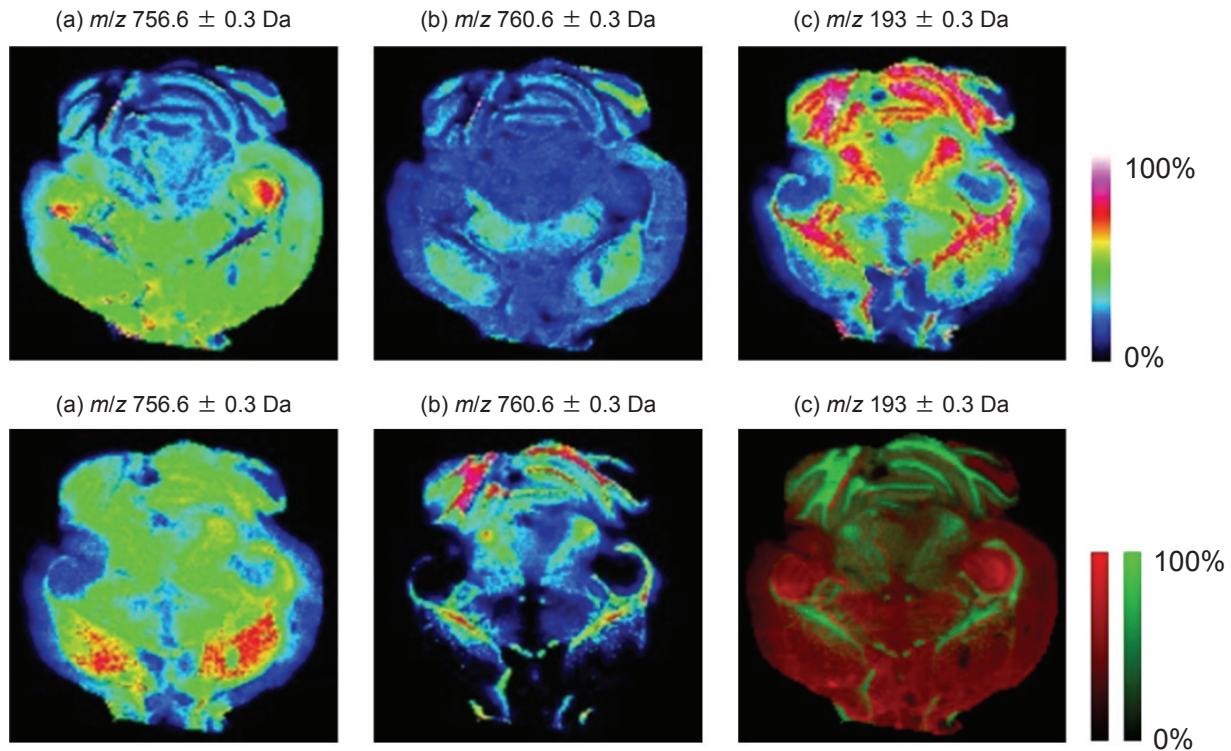


圖 5. 真空下以 MALDI-TOF 技術對小鼠腦部組織切片 (長 × 寬: $11 \times 10 \text{ mm}^2$, 水平切面) 進行蛋白質影像分析: (a) 以 m/z 5009 離子所繪製之分子影像圖、(b) 以 m/z 6768 離子所繪製之分子影像圖、(c) 以 m/z 7189 離子所繪製之分子影像圖、(d) 以 m/z 7342 離子所繪製之分子影像圖、(e) 以 m/z 14118 離子所繪製之分子影像圖、(f) 分子影像融合圖 (m/z 5009 + m/z 14118)。

確回推算出其分子量，這也是以 MALDI-TOF 進行分子影像分析所無法達到的⁽¹⁵⁾。

ELDI 的做法，首先是先將具適當厚度的組織切片放置在一金屬薄片上，再將此金屬薄片置放在 X-Y 軸移動平台，再以控制軟體設定移動的方向和速度後，即可進行大氣壓力下的分子影像分析。樣品在移動時，同時會開啟雷射 (如氮氣雷射， $100-200 \mu\text{J}$) 以照射組織，組織內分析物分子會因雷射照射的關係而被脫附或氣化出來，雷射能量可直接施加到分析物分子上或是藉由穿透組織而加熱金屬薄片使之溫度升高，並氣化位於其上方組織切片內的分析物分子。這些氣相分析物分子及其分解的產物，在往上移動離開金屬薄片後，會馬上進入到以一甲醇水溶液進行電噴灑噴霧區 (位於金屬薄片上方約 $2-4 \text{ mm}$)。由於此噴霧區內含大量的帶多價電荷溶劑液滴 (如純甲醇、甲醇/水) 以及各式帶電的溶劑離子 (如 CH_3OH_2^+ 、 H_3O^+ 等)，這些經

雷射脫附或氣化的分析物分子就可以和噴霧區內帶電荷的溶劑物種反應以產生具單價的分析物離子。分析物分子也可溶入帶多價電荷的溶劑液滴內，而 ESI 游離過程將持續自這些液滴進行，而產生具多價電荷之分析物離子。圖 6 所示，為 ELDI 進行分子影像的過程。因 ELDI 的分析是在大氣壓力下進行，且加上雷射可以聚焦到相當小的範圍，因此具有非常大的潛力可以進行快速的分子影像分析。

圖 7 為 MALDI-TOF 技術觀察 α -chaconine 與 α -solanine 兩種生物鹼在馬鈴薯組織切片中的分布情形，其結果顯示，在馬鈴薯芽端及接近發芽端的果肉中累積了大量的生物鹼 (圖 7(b)、(c))。

四、結論

近代由於有上述這些可以自組織切片上直接將生化分子脫附游離質譜技術的開發，在與傳統蛋白

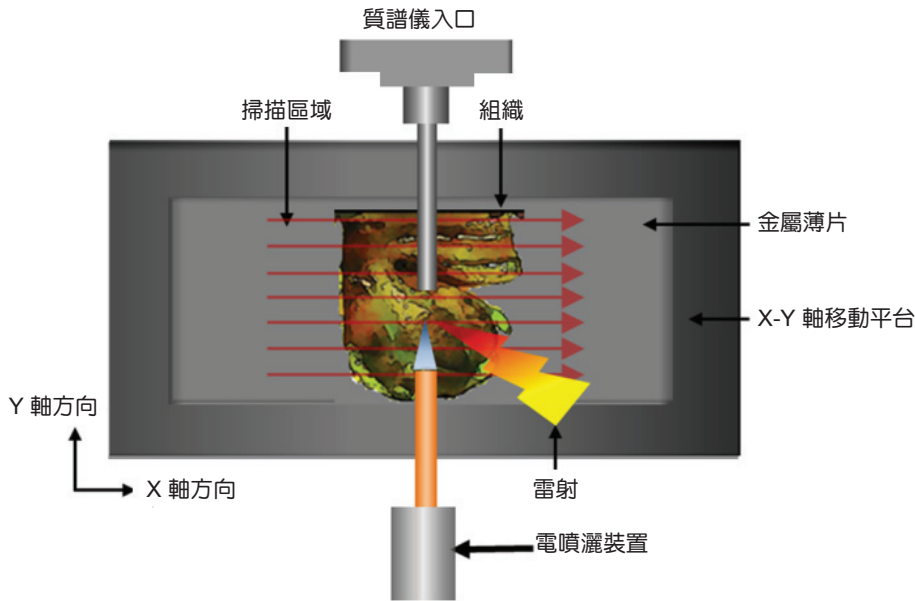


圖 6. 大氣壓力下以 ELDI 技術進行分子影像的過程。

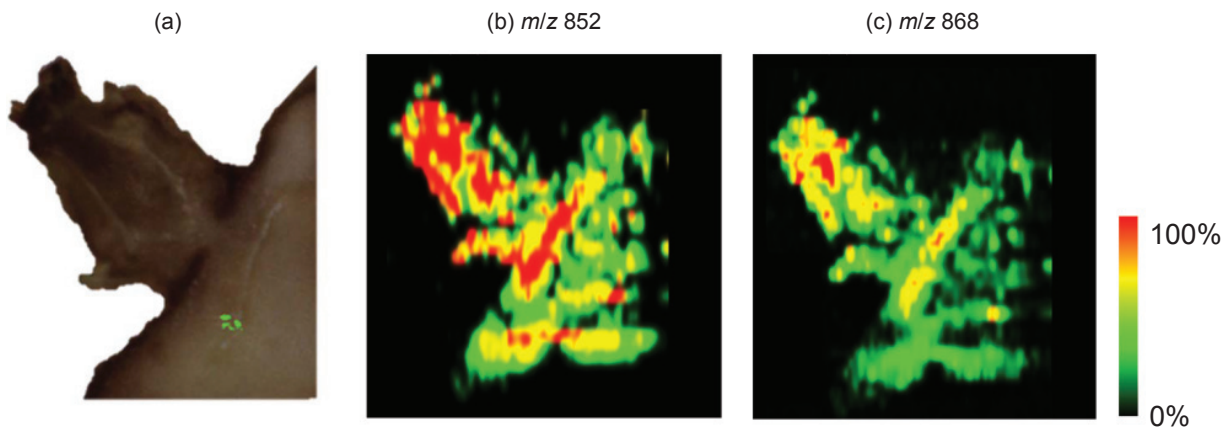


圖 7. 大氣壓力下以 ELDI 技術對馬鈴薯組織切片 (長 \times 寬: $9 \times 9 \text{ mm}^2$, 縱切面) 進行分子影像分析: (a) 馬鈴薯照片、(b) 以 m/z 852, $[\alpha\text{-Chaconine+H}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖、(c) 以 m/z 868 $[\alpha\text{-Solanine+H}]^+$ 離子所繪製之分子影像圖。

質體、代謝體及脂質體的研究相結合後，使得質譜除了應用在各式生物體學的基礎研究外，又增加了此一新興研究領域—分子影像。分子影像不僅可以提供各式人體、動物、植物組織中所含生化分子的種類及相對含量，更重要的是可以提供一特定生化分子在一組織切片中分布的訊息，這對於疾病生物指標的搜尋將會有相當大的助益。

參考文獻

1. L. A. McDonnell, G. L. Corthals, S. M. Willems, A. van Remoortere, R. J. van Zeijl, and A. M. Deelder, *J Proteomics.*, **73**, 1921 (2010).
2. P. J. Todd, J. M. McMahon, R. T. Short, and C. A. McCandlish, *Anal chem.*, **69**, 529A (1997).
3. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1998).
4. R. M. Caprioli, T. B. Farmer, and J. Gile, *Anal chem.*, **69**, 4751 (1997).

5. J. Shiea, M. Z. Huang, H. J. HSu, C. Y. Lee, C. H. Yuan, I. Beech, and J. Sunner, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **19**, 3701 (2005).
6. Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, and R. G. Cooks, *Science.*, **306**, 471 (2004).
7. J. M. Wiseman, D. R. Ifa, A. Venter, and R. G. Cooks, *Nat Protoc.*, **3**, 517 (2008).
8. G. Lowe, *J Neurosci Meth.*, **90**, 117 (1999).
9. M. R. Emmert-Buck, R. F. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuaqui, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss, and L. A. Liotta, *Science.*, **274**, 998 (1996).
10. J. A. Hankin, R. M. Barkley, and R. C. Murphy, *J Am Soc Mass Spectrom.*, **18**, 1646 (2007).
11. P. Chaurand, B. B. DaGue, R. S. Pearsall, D. W. Threadgill, and R. M. Caprioli, *Proteomics.*, **1**, 1320 (2001).
12. H. Y. Wang, L. H. Lo, Y. C. Tyan, H. C. Chen, M. H. Yang, T. Y. Chen, H. Y. J. Wang, and J. Shiea, *Anal Methods-Uk.*, **2**, 1974 (2010).
13. J. A. Hankin, S. E. Farias, R. Barkley, K. Heidenreich, L. C. Frey, K. Hamazaki, H. Y. Kim, and R. C. Murphy, *J Am Soc Mass Spectrom.*, **22**, 1014 (2011).
14. C. Marquardt, T. Tolstik, C. Bielecki, R. Kaufmann, A. C. Crecelius, U. S. Schubert, U. Settmacher, A. Stallmach, and O. Dirsch, *Z Gastroenterol.*, **53** 33 (2015).
15. M. Z. Huang, H. J. Hsu, L. Y. Lee, J. Y. Jeng, and J. T. Shiea, *J Proteome Res.*, **5**, 1107 (2006).



蘇鴻先生現為國立中山大學化學研究所博士班學生。

Hung Su is currently a Ph.D. student in the Department of Chemistry at National Sun Yat-Sen University.



謝建台先生為美國蒙大拿州州立大學化學博士，現任國立中山大學化學系特聘教授。

Jentaie Shiea received his Ph.D. in chemistry from Montana State University, USA. He is a currently a distinguished professor in the Department of Chemistry at National Sun Yat-Sen University.