

## 專題報導

### 新式微藻鑑定法

### 奈米材料搭配雷射脫附游離質譜儀於微藻鑑種之應用

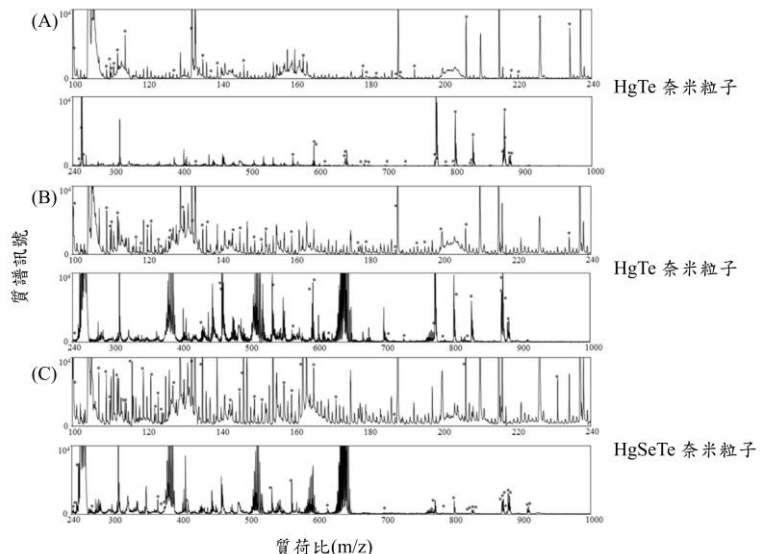


生科系  
黃志清老師

微藻鑑定在生態與環境上是重大議題，由於同品系間外觀相似程度極高，故型態鑑定時常產生誤判。本校生命科學暨生物科技研究所黃志清教授發展一種藉由表面輔助雷射脫附游離質譜儀(Laser desorption/ionization mass spectrometry, LDI-MS)結合三種奈米材料(HgSe、HgTe和HgTeSe)作為LDI-MS基質針對微藻進行簡單且快速的鑑定方法。該研究今年已發表於Marine Biotechnology國際期刊，該期刊影響因子為3.062，在海洋及淡水生物學領域103個期刊中排名第七。微藻在環境中分佈廣泛，不論是在水域、土壤及大氣中皆可見其蹤跡，而在水域尤為常見，因此常作為環境水質檢測的指標。由於一些特殊品種的微藻會含有或分泌毒性物質，在一些情況下對人類及環境具很大傷害性。因此能在短時間內正確判定微藻種類，對於環境及生態監控是相當重要的。然而微藻種類眾多且品系概括極廣，

分類上不論分布在原核生物(Prokaryota)和真核生物(Eukaryota)域中植物(Plantae)、真細菌(Eubacteria)和原藻(Chromista)界均有其存在，生物歧異度極高，故根據傳統型態辨識易產生誤判。再者微藻間的差異並非僅表現在形態上，亦存在矽殼、細胞壁、細胞膜、細胞質或內部胞器組成的成分差異。

目前鑑定微藻的方式除了型態鑑定外，還有色素鑑定、生物分子鑑定及化學成分鑑定等方式。依據微藻所含色素不同，大致可分為矽藻、褐藻、紅藻和綠藻四類。色素鑑定早期多使用比色法(colorimetry)與螢光法(Fluorometry)進行鑑識，近年則多改用高效液相層析(High performance liquid chromatography, HPLC)，高分離效率的HPLC大大改善由於色素分子性質相似而造成的誤判。然而，生物分子鑑定目前已成為微藻鑑定的主流，其主要藉由聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)將樣品DNA倍增十億倍以上，而對其遺傳物質進行鑑定。儘管生物分子鑑定準確率極佳，不過仍須面臨耗時長、操作繁複、價格昂貴等問題。而化學成分鑑定則是使用如傅立葉紅外光譜(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、拉曼光譜(Raman spectroscopy)、核磁共振光譜(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR spectroscopy)等儀器分析微藻內有機物及代謝物，但此類方法大多只能提供微藻內部分含量較高之化學成分訊息，應用於藻種鑑別相對困難。相對質譜儀(Mass spectrometry, MS)以質荷比(m/z)提供分子訊息較豐富，故近十年廣泛應用於微生物與藻類分類鑑定。其中，基質輔助雷射脫附游離質譜儀(Matrix assisted desorption/ionization mass spectrometry, MALDI-MS)具快速分析及軟性游離等特性最適合生物分子之快速鑑定。



圖一、等邊金藻之LDI-MS質譜圖，分別以(A) HgSe、(B) HgTe和(C) HgTeSe奈米材料為基質。標示(\*)代表等邊金藻之特徵訊號。

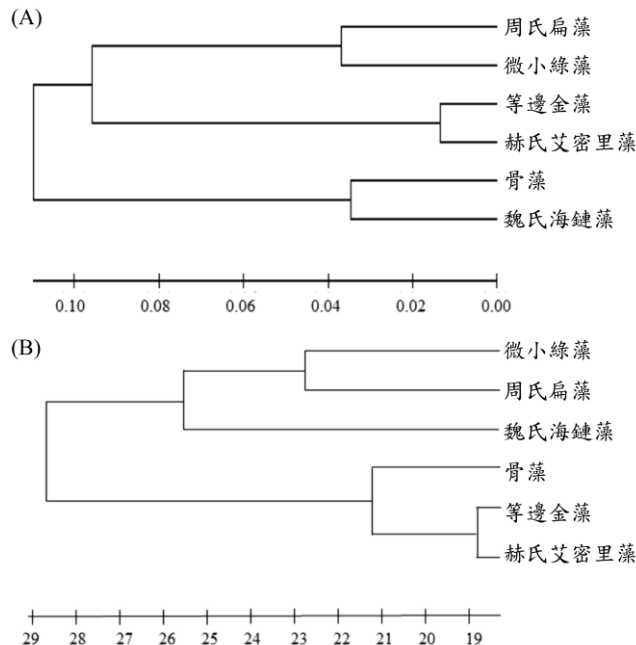
# 海洋中心電子報

CENTER OF EXCELLENCE FOR THE OCEANS

因此，本研究中以三種汞為基材的奈米材料(HgSe、HgTe和HgTeSe)作為LDI-MS基質，藉由LDI-MS開發出快速且無需前處理即可對微藻進行鑑定的方法。相較於使用傳統有機基質，以奈米材料作為基質可幫助降低質譜背景雜訊、提高實驗再現性並能夠對小分子物質在低m/z區域進行分析。由於HgSe、HgTe和HgTeSe此類材料皆具有半導體性質且電子傳導效率佳等優點，故能有效幫助分析物進行脫附游離。相較於其它奈米材料基質，亦具有相對較低的熱傳導率與比熱，可產生更高的脫附游離溫度幫助生物分子進行游離。

本研究於微藻鑑種中，選用六種藻類：等邊金藻(*Isochrysis galbana*)、微小綠藻(*Nannochloris sp.*)、骨藻(*Skeletonema cf. costatum*)、赫氏艾密里藻(*Emiliania huxleyi*)、魏氏海鏈藻(*Thalassiosira weissflogii*)和周氏扁藻(*Tetraselmis Chui*)，以LDI-MS進行分析。由於微藻本身分子組成差異以及奈米材料的物理性質(能隙、紫外光吸收、熱傳導率、比熱容和介電常數)的不同，導致其吸收光及導熱特性亦有所差異，進而改變分子脫附游離及碎裂過程。故使用不同基質分析各式微藻，其具有獨特之指紋圖譜(圖一)。

然而，使用不同基質對微藻分析具有其互補性，結合單一基質及所有基質集合之獨特訊號可作為分類統計依據，避免單一基質誤判情形，增加分類之正確性。以FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics)軟體，將單種微藻使用HgSe、HgTe和HgTeSe 奈米材料為基質所得LDI-MS圖譜中的訊號(訊雜比大於 3)統計分析後，分別繪製成文氏圖(Vann diagram)，計算出三種奈米材料分析訊號同異之處，並建立邏輯關係以獨特訊號作為分類依據。進而，將單種基質及所有基質集合對應六種微藻之LDI-MS圖譜訊號分析各藻種間訊號之差異程度，以建立各藻種間組成分子同異關係，最後利用ClinPro 3.0工具(Bruker Daltonics)，建立出各微藻間親緣關係圖，比對以18S rRNA基因分析序列訊息之親緣關係圖(圖二)，兩者間具有高度相似性。故我們相信此開發技術可建立微藻鑑定的質譜數據資料庫，未來可快速進行各種藻種鑑定。



圖二、六種微藻以(A) 18S rRNA分析及(B) LDI-MS指紋訊號所建立之親緣關係圖。

※本研究已發表於Peng, L.H., Unnikrishnan, B., Shih, C.Y., Hsiung, T.M., Chang, J., Hsu, P.H., Chiu, T.C., and Huang, C.C. (2016). Identification of Microalgae by Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Coupled with Multiple Nanomaterials. *Mar Biotechnol* 18, 283-292.