



## 一、中文摘要：

在本研究中，我們發展了一項新的梯度式技術來進行 DNA 的毛細管電泳分離，以設計的裝置，將所需的聚合物溶液引至毛細管入口端，再以電滲透流 (electroosmotic flow; EOF) 依序將不同濃度的聚環氧乙烷 (poly(ethylene oxide) (PEO) 和/或染色劑溶液導入毛細管內，進而改進分析之解析度、分離時間、和偵測靈敏度。例如同時變化 PEO 與 EB 濃度，依序以 1.5% PEO + 0.1  $\mu$ g/mL EB 變化到 2.5% PEO + 2.0  $\mu$ g/mL EB 的梯度化條件，在 20 分鐘內成功的將 DNA markers V and VI 全部的片段分離開來。我們亦提出在毛細管電泳中進行 DNA 分離和線上濃縮大分子的新技術。我們成功將大於 2 微升之蛋白質樣品注入到填有 400 mM TB 緩衝溶液中，並在 0.6% PEO 溶液中進行線上濃縮和分離，對 carbonic anhydrase 而言，其偵測極限可低至約 31 pM。另外我們亦將 0.67  $\mu$ L 之 DNA (1.0  $\mu$ g/mL) 注入到填有 100 mM TB 緩衝溶液中並在 2% PEO 水溶液中進行線上濃縮和分離之結果。和用傳統注射方法 (1 kV for 10 s) 之分析結果相比，起偵測極限降低約 66 倍。

## 二、英文摘要：

We demonstrated techniques of stepwise changes of poly(ethylene oxide) (PEO) solutions for DNA separations in the presence of the electroosmotic flow (EOF). During analysis, a number of PEO solutions containing different amounts of ethidium bromide (EB) were injected to a polyethylene tube by syringes, from which the polymer solutions were entered a capillary filled with 1X TBE buffer by the EOF. As a result, resolution, speed and sensitivity were optimized. For example, the separation of DNA markers V and VI was complete in 20 min under stepwise changes from 1.0% PEO solutions containing 0.1  $\mu\text{g/mL}$  EB to 2.5% PEO solutions containing 2.0  $\mu\text{g/mL}$  EB. We also demonstrated on-line concentration and separation of more than 2  $\mu\text{L}$ -proteins in 0.6% PEO solutions using a capillary filled with 400 mM TB buffers. The limit of detection (LOD) was 31 pM for carbonic anhydrase. The sensitivity improvement for injecting 0.67- $\mu\text{L}$  DNA (1.0  $\mu\text{g/mL}$ ) was 66-fold compared to a conventional injection (1 kV for 10 s) when the sample was injected into a capillary filled with 100 mM TB buffers.

### 三、計劃緣由與目的：

毛細管電泳 (CE) 近幾年來已經成為分析 DNA 主要的技術之一，跟傳統凝膠電泳比較起來，CE 具有高的解析度及快速的分析時間。毛細管凝膠電泳和使用聚合物的 CE 都是常用的技術，但膠體和聚合物比較起來，聚合物具有低黏度、較好製備、較具伸縮性等優點<sup>1-3</sup>。常用的聚合物包括線性的聚丙烯醯胺 (LPA) 及其衍生物<sup>4-6</sup>、纖維素的衍生物<sup>7,8</sup>、瓊脂膠<sup>9</sup>、及聚環氧乙烷<sup>10,11</sup>等。聚合物的濃度與性質，如結構與分子量等，在分離 DNA 上有很大的重要性<sup>12-14</sup>，如將多種不同分子量的 PEO 配在一起，配製成具多重分散性的 PEO 溶液，由於其分子量及濃度的不同，可同時在聚合物溶液中形成多種不同大小的孔隙，利用此方法可在三十分鐘之內完全分離 Marker V 及 Marker VI 包含 51 到 2176 個鹼基對的 DNA 片段<sup>15</sup>。

在沒有電滲透流的情況下便無法在毛細管內填充濃度梯度式變化的聚合物，但是在有電滲透流的情況下此技術就可以輕易的進行<sup>34</sup>。本實驗室陳氏學長日前就發展了在有電滲透流之下進行 DNA 片段分析的技術<sup>35,36</sup>，使用的是未塗佈過的毛細管，實驗前毛細管內也未填充聚合物，聚合物是利用電滲透流在實驗時引入注滿緩衝溶液的毛細管中，為了使每次實驗進行時都能維持高電滲透流，在每次實驗中間都以 0.5 M NaOH 以 1 kV 的電壓清洗 10 分鐘，務使毛細管壁能

充滿負電荷。此方法已證實可輕易的引入極高黏度的聚合物進行實驗同時也能引入內徑極窄的毛細管中。

在本篇研究中，我們利用電滲透流，在毛細管中填入多種不同的聚合物進行實驗，我們設計了如圖一的裝置將不同的聚合物在準確的時間送到毛細管的入口處將之引入毛細管中，來增加分離 DNA 的解析度，靈敏度，並同時擴大分析 DNA 的大小範圍。除此之外，我們亦進一步在 EOF 純在下，利用大分子，如 DNA 和蛋白質等，在 PEO 溶液中遷移速度下降之原理成功發展線上濃縮大分子之新技術。

#### 四、結果與討論

##### 四之一：梯度式變化 PEO 濃度

表一是單獨使用濃度分別為 1.0%、1.5%、2.0%、2.5% 的 8 M PEO 溶液時，對於 DNA 樣品 marker V 和 marker VI 的鹼基對範圍從 51 bp 到 2176 bp 的分離效果。由表中可以看出，用這四種濃度來分離 marker V 和 marker VI 的所有 DNA 片段時，無法將之全部分離。

圖二所示，DNA 依次在不同的 PEO 溶液內進行分離的結果。表二是利用電滲流分別將 1.0%、1.5%、2.0% PEO 溶液引入到毛細管中，最後再引入 2.5% PEO 溶液一直到實驗終止為止的梯度式變化所得到 marker V 和 marker VI 部分片段的分離結果。當 1.0%、1.5%、2.0% PEO

溶液引入的時間為 30 秒或 40 秒時, 517/540 及 458/504 都沒分開。綜觀表二, 可以看到當變化時間為 80 秒時, 653 bp 到 434 bp 的 8 個片段都能分離, 對於較小的片段也只有相差單鹼基對的 124/123 無法分離, 其他的片段如 154/154 或 234/234 都可看到部分分離。

圖三即是時間變化為 80 秒時的分離圖, 圖中 A 部分是表示 PEO 溶液變化的情形, 大略可以從基線的變化情形, 推測不同 PEO 溶液的介面處, B 部分則為 DNA 分離的結果, 從 B1 到 B3 為連續的分離圖, 一次的分離時間可在 15 分鐘以內完成。

#### 四之二：梯度式變化 EB 濃度

在此我們所使用的聚合物為 2.0% PEO (8M), EB 的濃度分別為 0.1、0.5、1.0、2.0 ( $\mu\text{g/mL}$ ), 表三為 marker V 和 marker VI 部分片段在四種 EB 濃度時的分離結果。表中清楚的看出, 當 EB 的濃度提高的時候, 大於 653 bp 的片段, 還有 458/453 和 453/434 的解析度跟著降低。而對較小的 DNA 片段, 如 234 bp 以下, 除了 EB 濃度 0.1  $\mu\text{g/mL}$  以外, 隨著 EB 濃度的提高, 解析度跟著提高。表四便是以四種 EB 濃度來進行梯度式分離的結果, 由結果可看出, 較低的 EB 濃度確實有助於較大 DNA 片段的分離, 當 0.1  $\mu\text{g/mL}$  或 0.5  $\mu\text{g/mL}$  的時間增加時, 大的片段解析度隨之提高。

圖四是變化 EB 濃度所得到的分離圖, 在圖中的 A 部分由基線的

變化可以判別出不同的 EB 濃度通過偵測區的時間，也由此判斷 DNA 片段是否有通過這些聚合物，不同於變化聚合物濃度，變化 EB 濃度時，基線的變化很容易便可以判別出來。圖中 B 的部分為分離的結果。

#### 四之三：同時變化 PEO 及 EB 濃度

圖五便是我們使用 1.5% PEO + 0.1  $\mu\text{g/mL}$  EB 45 秒、1.5% PEO + 0.5  $\mu\text{g/mL}$  EB 120 秒、2.0% PEO + 0.5  $\mu\text{g/mL}$  EB 45 秒、2.0% PEO + 1.0  $\mu\text{g/mL}$  EB 30 秒、最後再以 2.5% PEO + 2.0  $\mu\text{g/mL}$  EB 進行完實驗所得的一張 Marker V 和 Marker VI 全分離圖，分離的時間可在 18 分鐘內全部結束。2176 及 51 的鹼基對遷移時間的相對標準偏差值 (R.S.D.) 分別為 1.17% 及 0.62%，顯見我們的技術再現性非常好 ( $n=3$ )。

#### 四之四 線上濃縮和分析 DNA

圖六是 DNA 大分子在毛細管中進行線上濃縮和分析之示意圖，樣品注射時會因 DNA 之遷移速度下降而堆積在樣品和 TB 溶液之介面上，在引入 PEO 溶液後，樣品會因遷移速度的下降再次堆積在 PEO 和 TB 溶液介面上。圖七是分析 0.67  $\mu\text{L}$  之 DNA (1.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 之結果。和用傳統注射方法 (1 kV for 10 s) 之分析結果相比，起偵測極限降低約 66 倍。

#### 四之五 線上濃縮和分析蛋白質

圖八是將蛋白質以 1 kV for 10 s, 10 kV for 300 s 和 10 kV for 600 s 的方式注入填滿 400 mM TB 緩衝溶液並在 0.6% PEO 溶液中進行線上濃縮和分析之結果。由八之 C 結果，可推得 carbonic anhydrase 之偵測極限為 31 pM，和傳統注射方法(1 kV for 10 s) 之分析結果相比，其靈敏度約提高 1696 倍。

#### 五、計劃成果自評

在本年度研究計劃中，我們順利開發出全世界首創之高分子溶液

梯度式毛細管電泳技術，和大分子之線上濃縮極分析技術。部分

研究成果已發表於一流之分析化學雜誌：

1. Chen, H. -S. and Chang, H. -T. "Stepwise Capillary Electrophoretic Separation of DNA Fragments Using Poly(ethylene oxide) Solutions in the Presence of Electroosmotic Flow" J. Chromatogr. A. 1999, 853, 337-347.
2. Chang, H. -T., Chen, H. -S., Hsieh, M. -M, and Tseng, W. L. "Electrophoretic Separation of DNA in the Presence of Electroosmotic Flow" (Invited Review) Reviews in Anal. Chem. 2000, XIX, 45-74.
3. Hsieh, M. -M, Tseng, W. L, and Chang, H. -T "On-Column Preconcentration and Separation of DNA Fragments Using Polymer Solutions in the Presence of Electroosmotic Flow" Electrophoresis, 2000, in press.
4. Huang, M. -F. and Chang, H. -T. "Capillary Electrophoretic Separation of DNA Fragments under Stepwise Changes of Polymer Solutions" Instrumental Science & technology, 2000, in press.
5. Tseng, W. -L. and Chang, H. -T. "On-line Concentration of Proteins by Capillary Electrophoresis Using Polymer Solutions" Anal. Chem.



2000, in press.

6. Tseng, W. -L. and Chang, H. -T. "Effect of Ionic Strength, pH, and Polymer Concentration on Separations of DNA Fragments in Presence of Electroosmotic Flow" *J. Chromatogr. A*, 2000, in press.

另外我們亦訓練了三位博士生及五位碩士生，其中兩位亦完成兩篇碩士論文。

## 六、參考資料

1. Han, F.; Huynh, B. H.; Ma, Y. and Lin, B. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2385.
2. Dolnik, V. and Novotny, M. *J. Microcolumn Sep.* **1993**, *4*, 515.
3. Chiari, M.; Nesi, M and Righetti, P. G. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 616.
4. Carrilho, E.; Ruiz-Martinez, M. C.; Berka, J.; Smirnov, I.; Goetzinger, W.; Miller, A. W.; Brady, D. and Karger, B. L. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3305.
5. Fang, Y.; Zhang, J. Z.; Hou, J. Y.; Lu, H. and Dovichi, N. J. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 1436.
6. Chiari, M.; Riva, S.; Gelain, A.; Vitale, A. and Turati, E. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 347.
7. Barron, A. E.; Sunada, W. M. and Blanch, H. W. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 744.
8. Clark, S. M. and Mathies, R. A. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1355.
9. Chen, N.; Wu, L.; Palm, A.; Srichaiyo, T. and Hjerten, S. *Electrophoresis* **1996**, *17*, 1443.
10. Iki, N. and Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4321.
11. Madabhushi, R. S.; Vainer, M.; Dolnik, V.; Barker, D. L.; Harris, D. W. and Mansfield, E. S. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 104.
12. Tietz, D. and Chrambach, A. *Electrophoresis* **1993**, *14*, 185.
13. Viovy, J. L. and Duke, T. *Electrophoresis* **1993**, *14*, 322.
14. Sunada, W. M. and Blanch, H. W. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2243.
15. Chang, H. T. and Yeung, E. S. *J. Chromatogr. B* **1995**, *669*, 113.

**Table 1. Effect of PEO concentration on resolution**

[PEO] (%)	Resolution											
	653/587	587/540	540/517	517/504	504/458	458/453	453/434	234/234	154/154	124/123		
1.0	1.72	1.64	1.77	1.12	1.38	2.15	0	0	0	0		
1.5	1.48	1.70	1.33	1.38	0	2.36	0	0	0.50	0		
2.0	0.94	1.36	0	1.91	0	1.50	0.77	0	0.30	0		
2.5	1.38	2.07	0	2.89	0	2.69	1.57	0	1.06	0		

**Table 2. Resolution obtained under stepwise changes in PEO concentration**

Stepwise form (sec) <sup>P</sup>		Resolution										
A	B	C	653/587	587/540	540/517	517/504	504/458	458/453	453/434	234/234	154/154	124/123
30	30	30	1.29	1.95	0	2.77	0	2.36	1.34	0	0.67	0
40	40	40	1.34	1.77	0	2.60	0	2.49	1.48	0	0.54	0
50	50	50	1.18	1.71	0	2.36	1.38	0.92	1.66	0.72	0.62	0
60	60	60	1.24	1.70	1.05	1.44	0	2.87	0.89	0.39	0.59	0
70	70	70	1.48	1.30	1.18	1.24	0	2.36	0	0	0.56	0
80	80	80	1.18	1.18	1.25	1.25	0.83	1.42	0.77	0.42	0.37	0
90	90	90	1.59	1.44	1.57	1.25	0	2.46	0	0	0.63	0

<sup>A</sup> 1.0% PEO. <sup>B</sup> 1.5% PEO. <sup>C</sup> 2.0% PEO. <sup>P</sup> 2.5% for the rest.

**Table 3. Effect of EtB concentration on resolution**

[EtB] ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Resolution												
	2176/1766	1766/1230	1230/1033	653/587	587/540	540/517	517/504	504/458	458/453	453/434	234/234	154/154	124/123
0.1	2.80	6.62	5.75	0	2.28	0.93	1.02	0	2.58	2.77	1.01	0.87	0.34
0.5	2.26	6.39	3.37	1.84	1.67	1.48	1.43	0	2.10	0	0	0.52	0
1.0	1.71	4.52	3.10	2.24	1.55	1.52	1.48	0	1.67	0	0.56	0.89	1.36
2.0	1.61	3.22	2.12	1.72	0.73	1.38	0.91	0	1.26	0	1.06	1.07	2.11

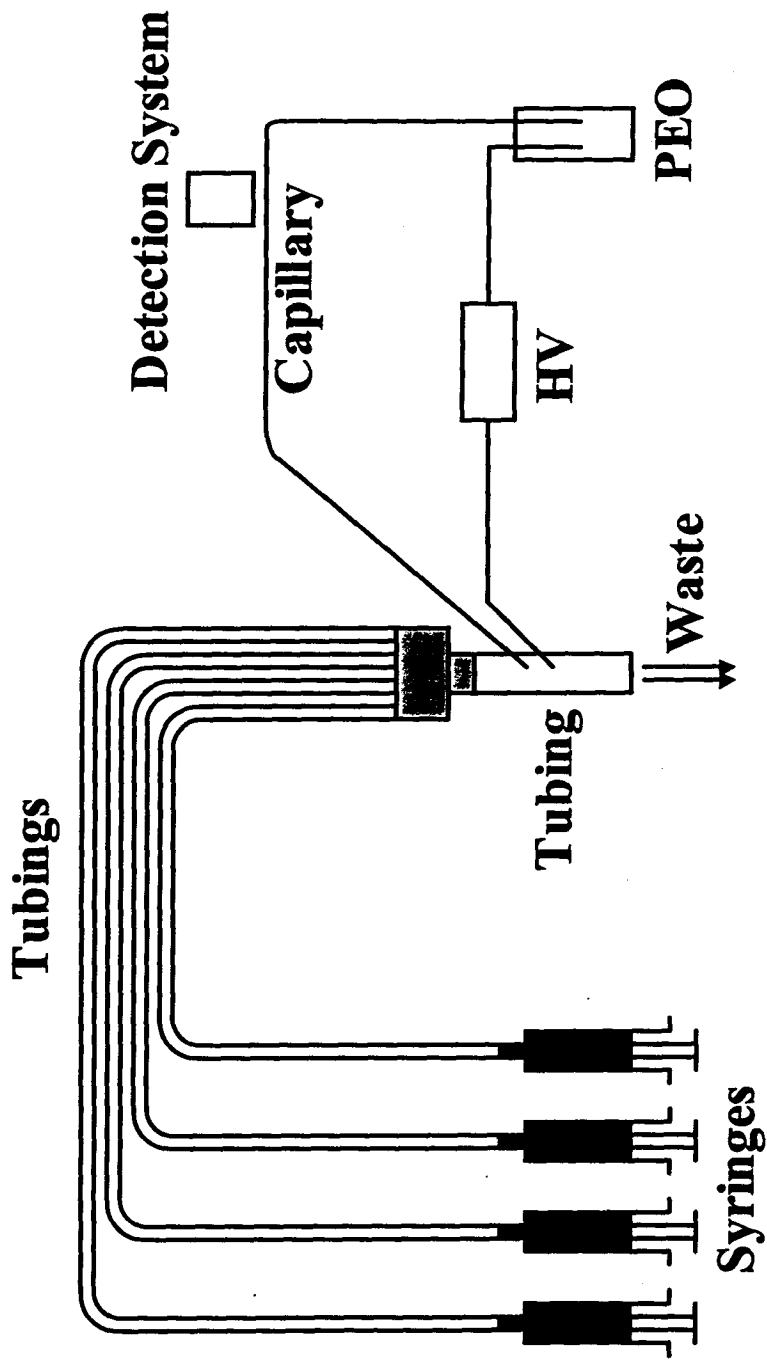


Figure 1. The schematic of the setup of performing stepwise changes of PEO solutions.

1: syringes filled with different PEO solutions; 2. polyethylene tubing (0.5 mm  $\times$  50 cm); 3. connector; 4. polyethylene tube (3 mm  $\times$  5 cm); 5. waste; 6. capillary; 7. High-voltage power supply, 8. LIF detection system; and 9. outlet vial filled with 2.0% PEO containing 0.5  $\mu$ g/mL EB.

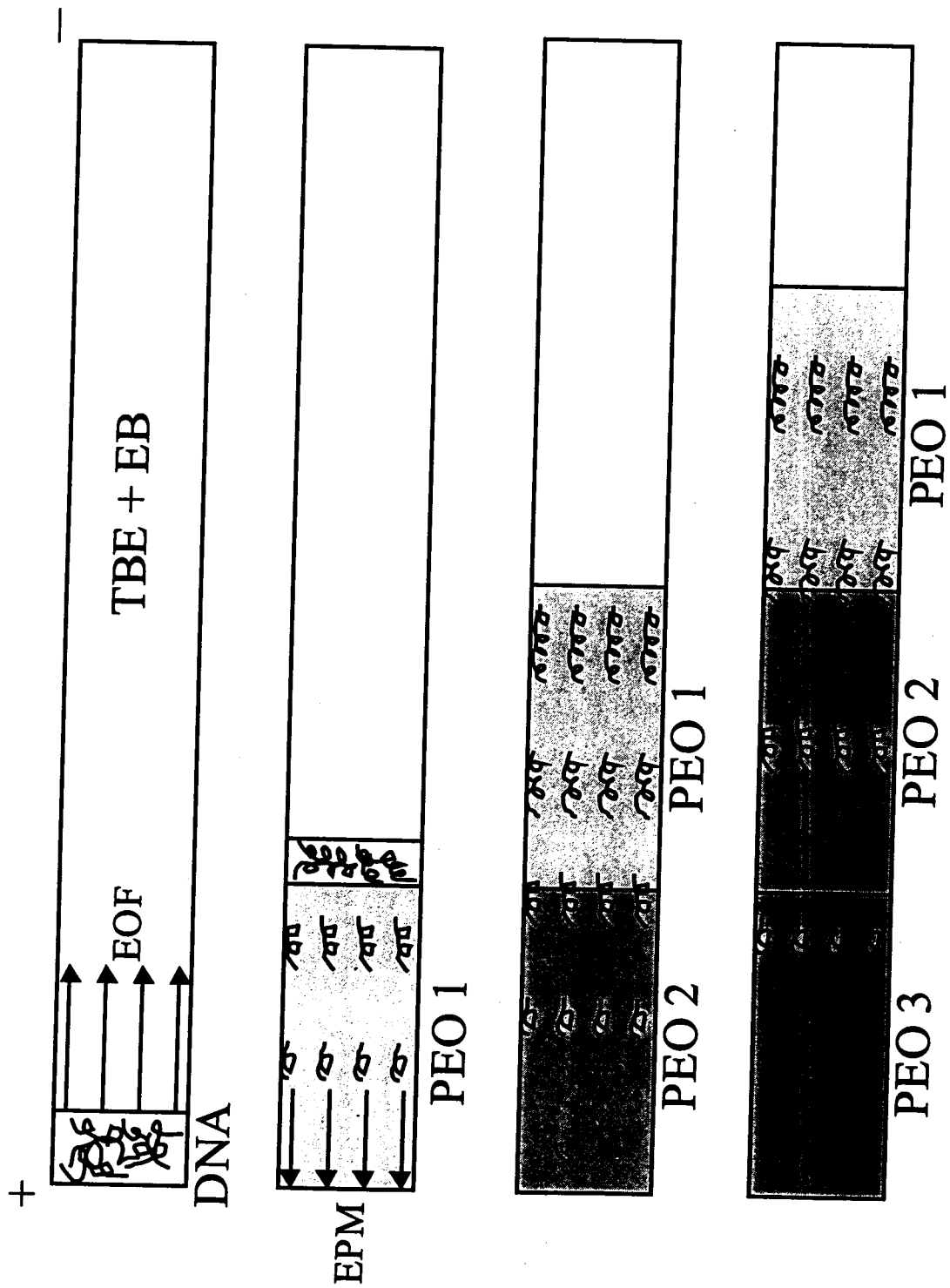


Figure 2. The separation of DNA fragments under stepwise changes of polymer solutions.

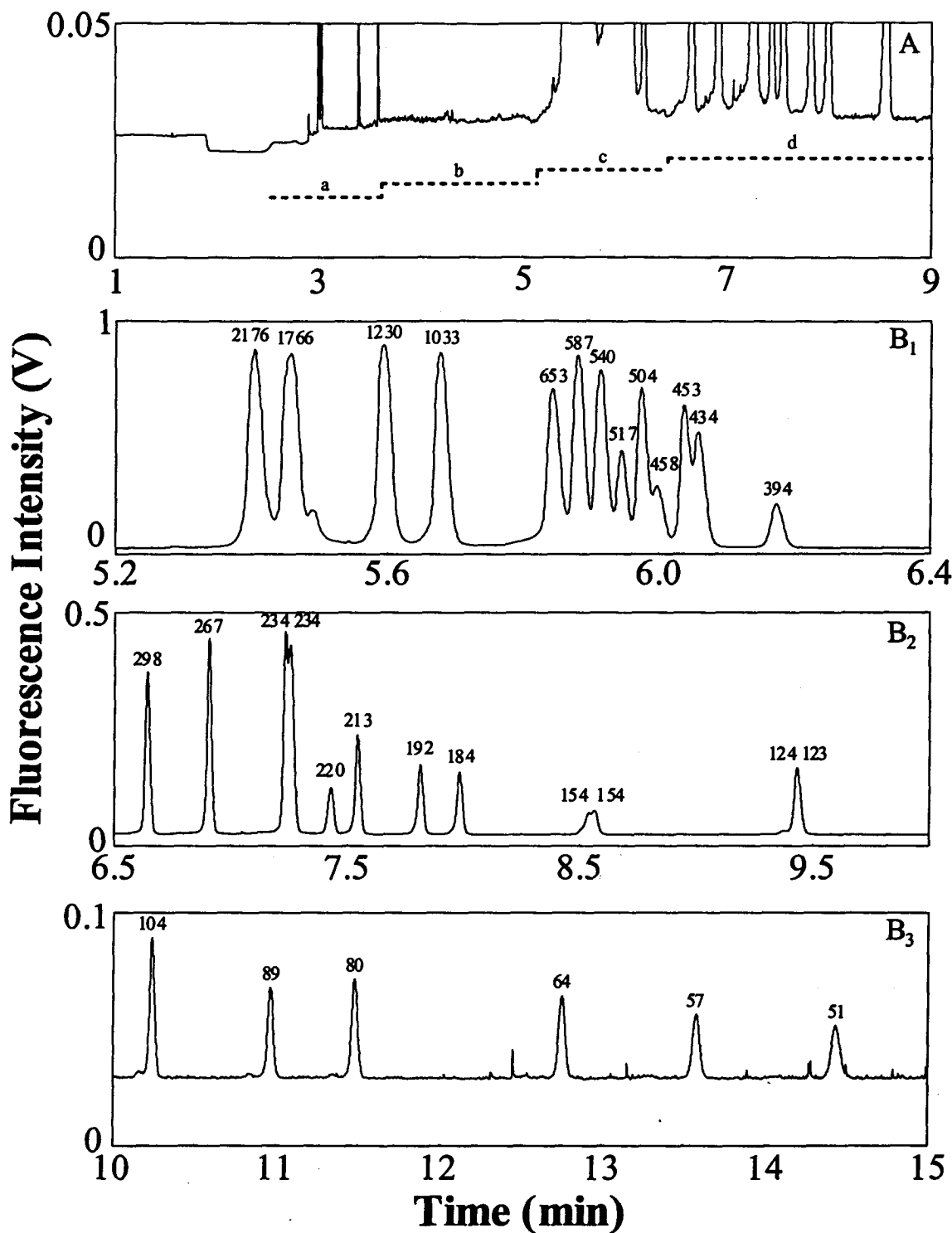


Figure 3. Separation of DNA markers V and VI in the presence of the EOF at 15 kV under stepwise changes in PEO concentrations using  $0.5 \mu\text{g/mL}$  EB solutions. Capillary: 40 cm in total length and 30 cm in effective length; filled with free 1X TBE containing  $0.5 \mu\text{g/mL}$  EB. Stepwise form shown in panel A: (a) 1.0% PEO for 80 s, (b) 1.5% PEO for 80 s, (c) 2.0% PEO for 80 s, and (d) 2.5% PEO for the rest.

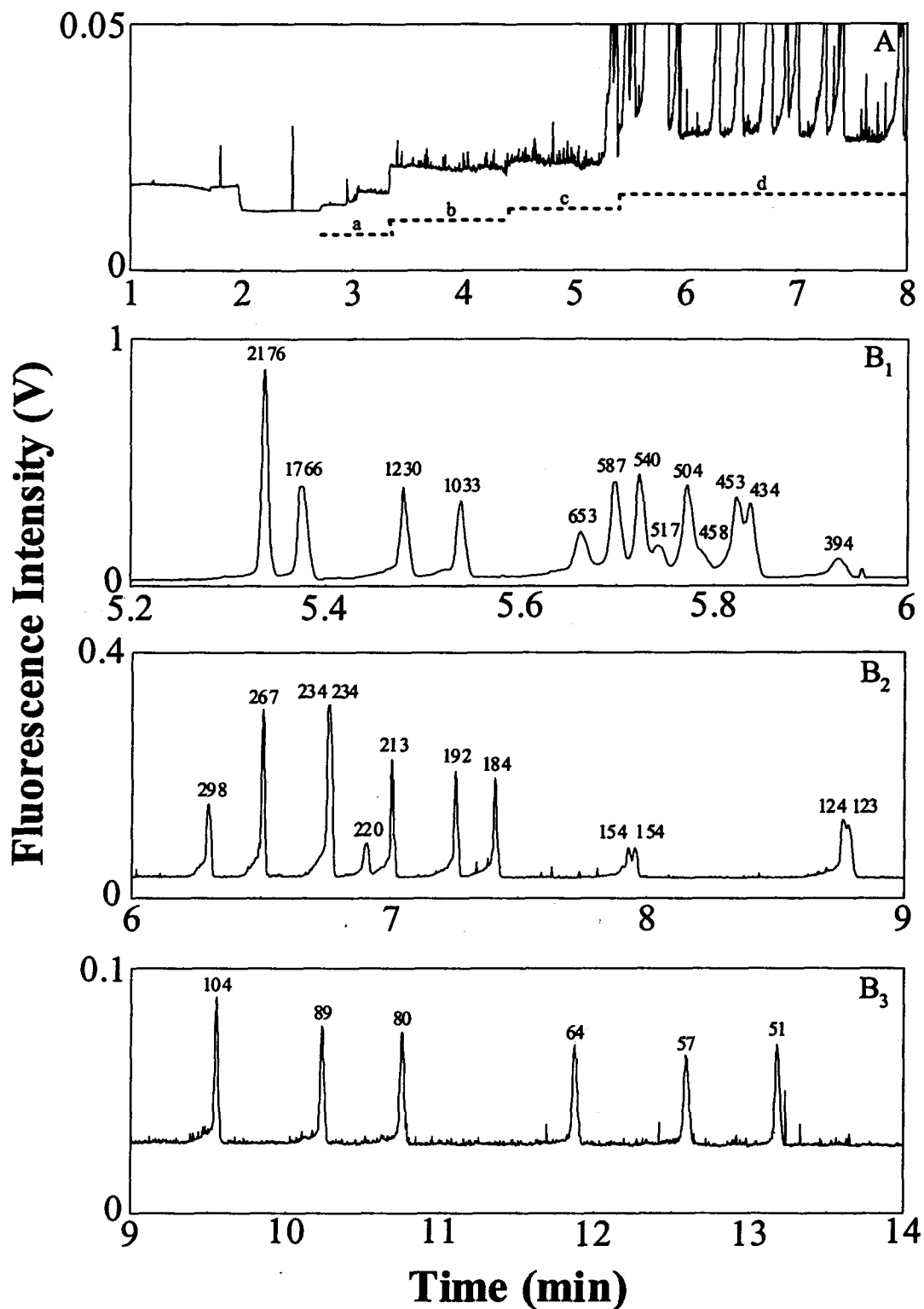


Figure 4. Separation of DNA Marker V and Marker VI in the presence of the EOF at 15 kV, under stepwise change in EB concentration using 8M 2% PEO solutions. Stepwise form in panel A: (a) 0.1 $\mu$ g/mL EB for 60s, (b) 0.5 $\mu$ g/mL EB for 60s, (c) 1.0 $\mu$ g/mL EB for 60s, and (d) 2.0 $\mu$ g/mL EB for the rest. Other conditions as in fig. 3.



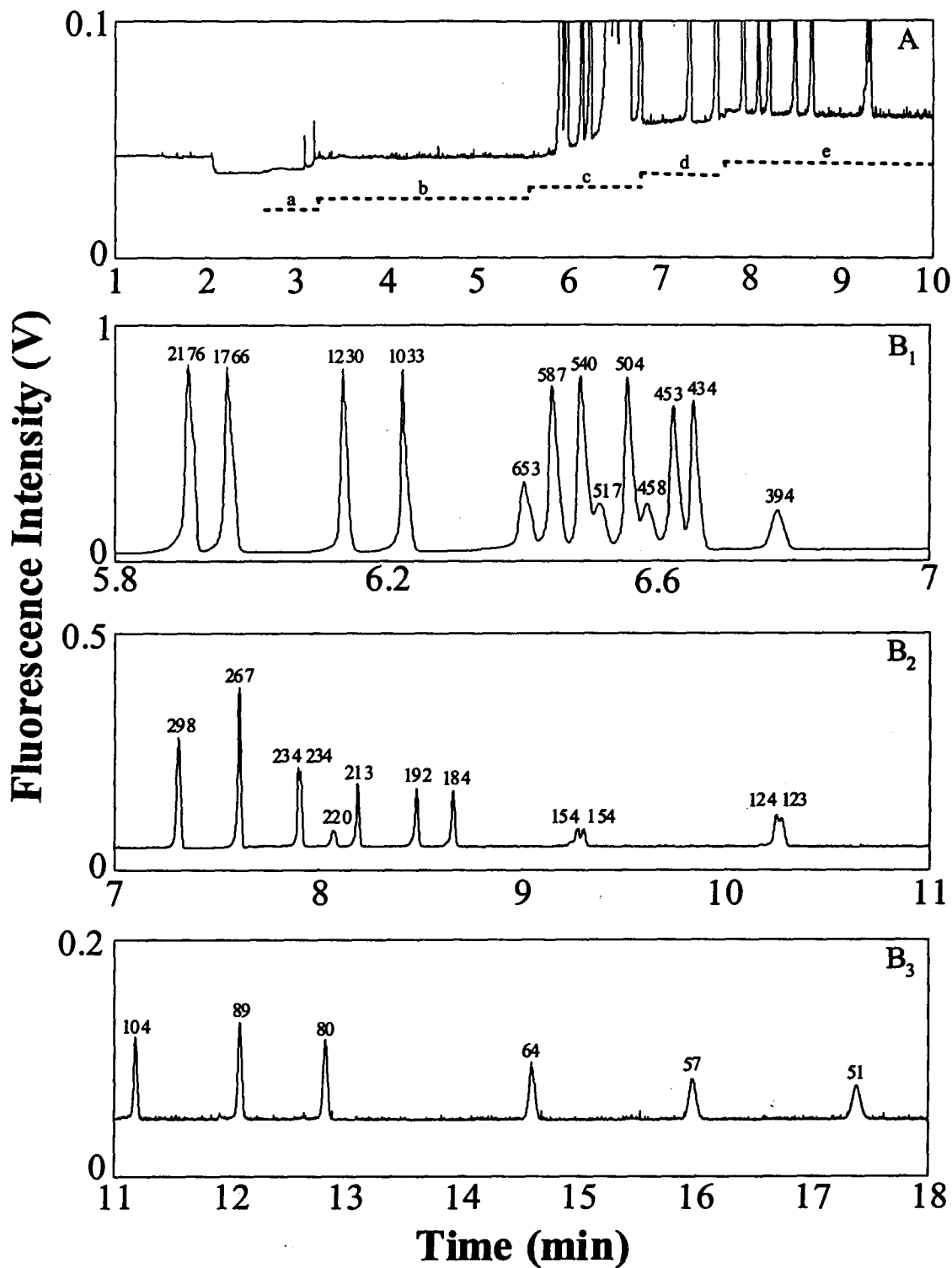
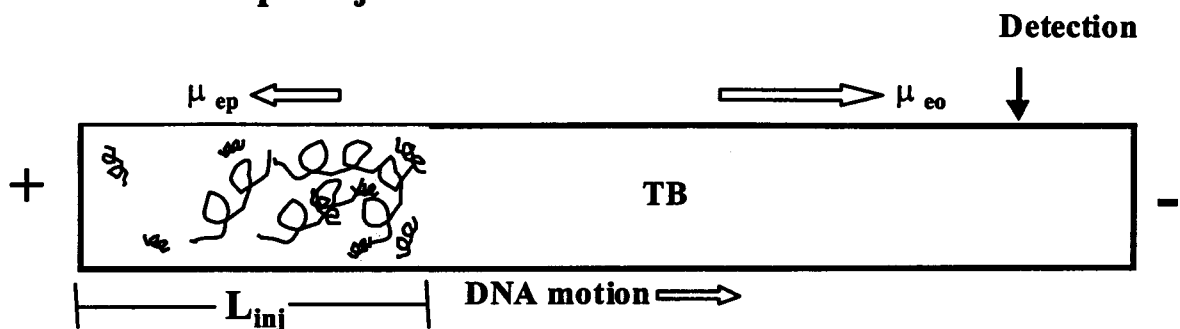


Figure 5. Separation of markers V and VI in the presence of the EOF at 15 kV, under simultaneous stepwise changes in PEO and EB concentrations. Stepwise form shown in panel A: (a) 1.5% PEO containing 0.1  $\mu\text{g/mL}$  EB for 45 s, (b) 1.5% PEO containing 0.5  $\mu\text{g/mL}$  EB for 120 s, (c) 2.0% PEO containing 0.5  $\mu\text{g/mL}$  EB for 45 s, (d) 2.0% PEO containing 1.0  $\mu\text{g/mL}$  EB for 30 s, and (e) 2.5% PEO containing 2.0  $\mu\text{g/mL}$  EB for the rest. Other conditions as in Fig. 3.

### A. Sample injection



### B. Concentration and separation



Fig. 6 Evolution of zones in the separation of DNA in the presence of the EOF. After a plug of DNA sample ( $L_{inj}$ ) was injected into a capillary filled with free buffers, PEO solutions entered the capillary by the EOF. The DNA was subjected to stacking in the PEO zones and the large DNA fragments were detected earlier since they migrated slowly against the EOF.  $\mu_{ep}$  and  $\mu_{eof}$  represent the electrophoretic mobility and the EOF mobility, respectively.

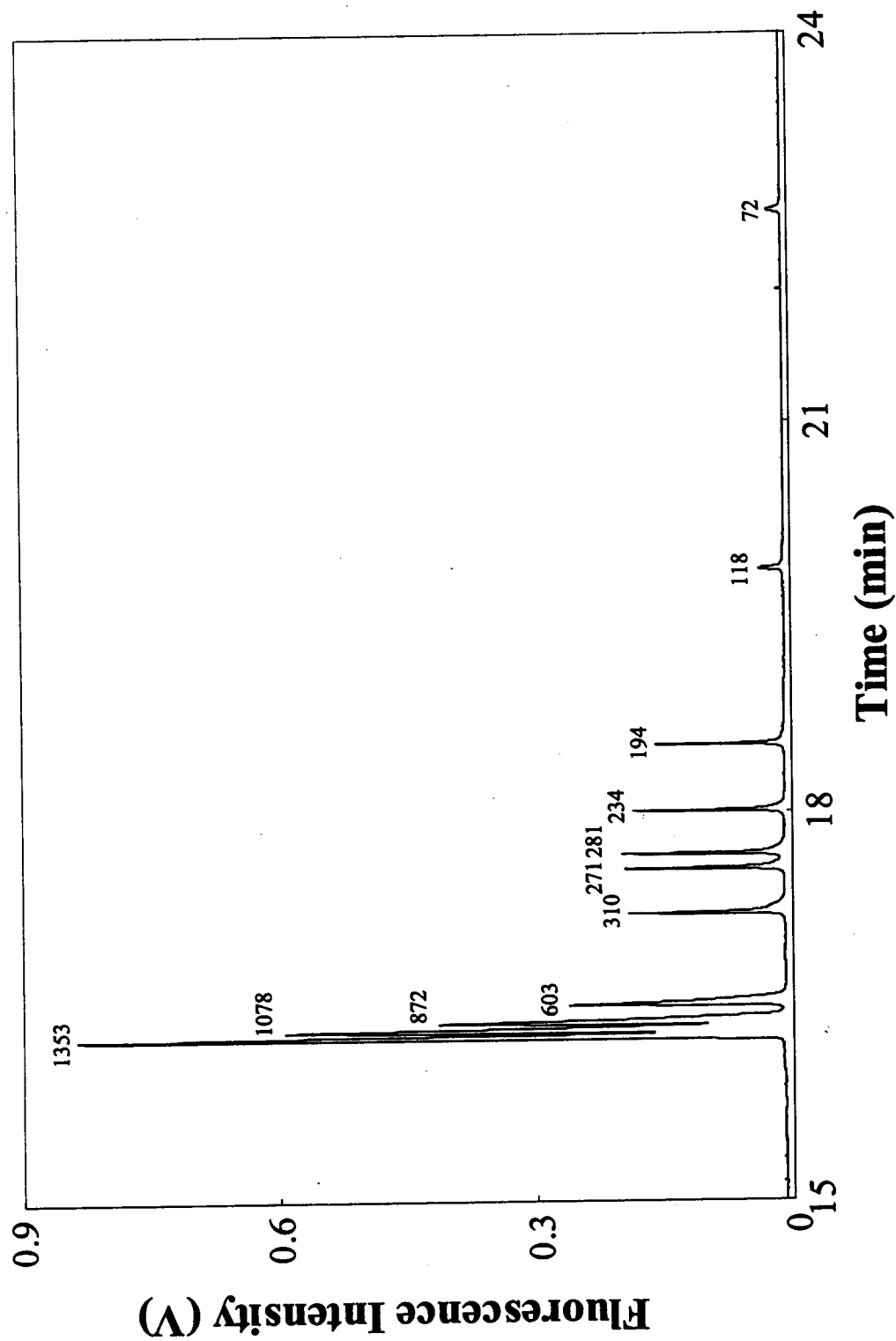


Fig 7. Separation of  $\phi$ X 174 RF DNA-Hae III digest DNA in the presence of the EOF at 15 kV using 1.5% PEO solutions prepared in 100 mM TB buffers, pH 9.0, containing 5  $\mu$ g/mL EtB. Capillary: 40 cm in total length and 30 cm in effective length; filled with 100 mM free TB buffers, pH 10.0. Injections were performed at 250 V/cm for 60 s.

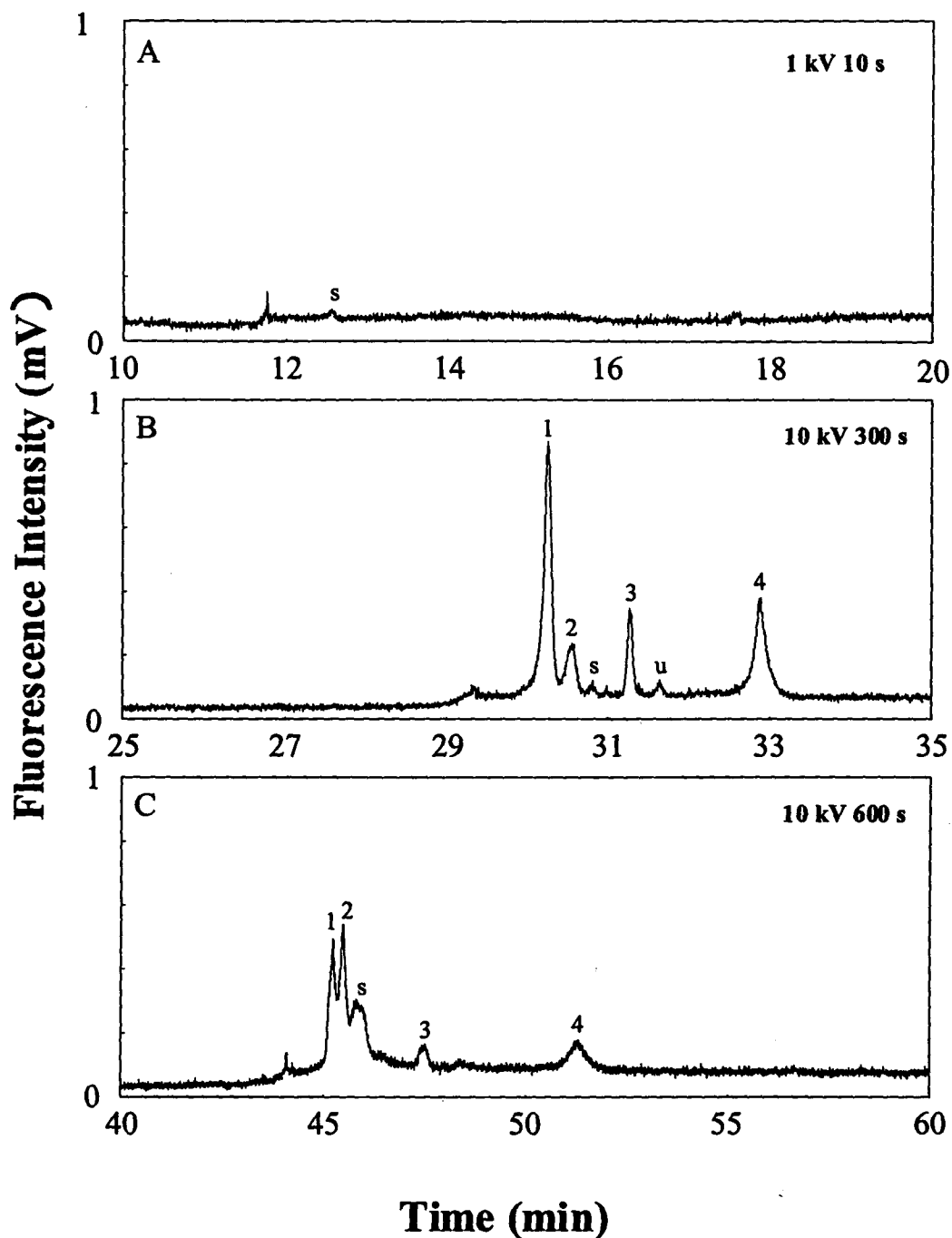


Fig. 8 On-line concentration and separation of sample proteins dissolved in TB buffers in 0.6% PEO solutions using capillaries filled with 400 mM TB buffers, pH 10.0. Sample injection: (A) 1 kV for 10 s; (B) 10 kV for 300 s; and (C) 10 kV for 600 s. The capillary length is 60 cm in (A) and (B), and 80 cm in (C). Peak identity in (B): 1. and 2. CA (50 nM), 3.  $\alpha$ -lactalbumin (200 nM), 4. BSA (100 nM). Peak identity in (C): 1. CA (1 nM), 2. conalbumin (25 nM), 3.  $\alpha$ -lactalbumin (50 nM), 4. BSA (25 nM). The symbol s in (B) and (C) represents the system peaks and u represents unknown in (B).