

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 毛細管與晶片電泳之生物分析(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2113-M-002-034-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學化學系暨研究所

計畫主持人：張煥宗

計畫參與人員：黃銘峰林決蔚黃郁棻張柏齡吳淑芬劉己維郭仲晟

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 27 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 毛細管與晶片電泳之生物分析( 2/3 )

計畫類別 :  個別型計畫      整合型計畫

計畫編號 : NSC93 - 2113 - M - 002 - 034 -

執行期間 : 93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

計畫主持人 : 張煥宗

## 一、中文摘要：

我們發展快速且準確鑑定 12 種不同細菌 DNA 片段的毛細管電泳分析方法。利用酵素 *Hae*III 切割細菌的 DNA，對於不同的細菌，得到不同的電泳圖譜，將來可望成為自動化的細菌檢測技術。另外，利用 DNA 適合體(aptamer, Apt)以親和力毛細管電泳探討蛋白質與蛋白質間的作用力 實驗發現只有 G-Apt 對人體凝血酵素(thrombin, Thr)具有親和力，在  $K^+$ 的存在下，可將 G-Apt 與線性 L-Apt 分離。此方法亦可用於定量 Thr 和 AT III (human anti-thrombin III)，其偵測極限分別為 9.8 和 2.1 nM。最後，我們以簡單而便宜的毛細管電泳結合發光二極體誘導螢光 (capillary electrophoresis-light-emitting diode-induced fluorescence, CE-LEDIF) 技術，分析腦脊髓液 (cerebrospinal fluid, CSF)中的胺基酸。在沒有電滲流(electroosmotic flow, EOF)的存在下，胺基酸的偵測極限為 10-30 nM。為了進一步改善靈敏度與濃縮分離腦脊髓液樣品，我們在電滲流存在下分離胺基酸，偵測極限可降低至 nM。兩種方法對具有發炎、癲癇和黃疸等症狀的病人，其離腦脊髓液中甘胺酸(glycine)、麴醯胺(glutamine)和麴胺酸(glutamate)的定量，提供了可互相比對的結果。

## 二、英文摘要：

In the presence of electroosmotic flow (EOF), we demonstrated the identification of 12 *Mycobacterium* species with *Hae*III digestion by capillary electrophoresis (CE), based on differential electrophoregrams for various species. The electrophoretic separation of high-resolution and high speed CE require < 20 min and was capable of identifying fragments as small as 12 bp. The CE approach is feasible for automation and routine use without the need for costly probes. We also report the investigation of protein-protein interaction using molecular aptamers by affinity capillary electrophoresis (ACE). We find that only G-Apt has affinity with thrombin in the presence of K<sup>+</sup>, which allows the separation of G-Apt from linear L-Apt by CE. The detection limits of thrombin and AT III are 9.8 and 2.1 nM, respectively. Finally, we present a simple and cost-effective method for the determination of amino acids in cerebrospinal fluids (CSF) by using CE-light-emitting diode-induced fluorescence detection. The detection limits of the naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) derivatized amino acids were achieved in the range of 10-30 nM in the absence of EOF. To further improve sensitivity, stacking and separation of CSF samples in the presence EOF has been applied. The LODs was down to nM level. The two methods provide comparable results for the determination of glycine, glutamine, and glutamate in CSF samples from patients suffered from inflammation, epilepsy, and jaundice without sample preparation.

### 三、計劃緣由與目的：

毛細管電泳與晶片電泳是一項快速且方便的生物分析技術，適於分析 DNA、蛋白質和胺基酸等樣品。人類基因體計畫更因為此技術的快速發展而提前於西元 2000 年完成人類的基因定序工作[1]。近十幾年，因為分離速度及實驗再現性的考量，線性的聚合物溶液漸漸取代交連性的凝膠，如線性的聚丙烯醯胺（LPA）及其衍生物、纖維素的衍生物（HEC 或 HPC）、瓊脂膠及聚環氧乙烷（PEO）等。聚合物的濃度與性質（如結構與分子量等），在分離 DNA 上扮演著重要的角色。Barron 等人以極低濃度的 HEC 溶液[2]，利用 DNA 分子與 HEC 分子的作用力不同，成功的分離數萬鹼基對的 DNA。或是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[3]。

使用聚合物溶液分離與濃縮生物樣品的機制為當分析物由低黏度的樣品區帶，進到高黏度的聚合物溶液中會被減速的原理，然後再經由聚合物溶液的篩分（大分子）或是作用（小分子）而達到濃縮與分離的效果[4-6]。本實驗室在毛細管電泳分離的研究上，我們發展聚合物溶液分離不同細菌 DNA 片段的技術，可得到不同細菌的電泳圖

譜，可應用於不同細菌的臨床檢測。開發親和力毛細管電泳探討適合體與人體凝血因子間的作用力，有助於瞭解兩者的結合位置與結合常數，未來將有利於生物奈米感測器的開發。另外，開發快速與簡單的方法檢測腦脊髓液中氨基酸的濃度，並比較不同症狀(發炎、癲癇和黃疸)的病人的氨基酸電泳圖譜，希望找出氨基酸與這些症狀之間的關係。

#### 四、結果與討論

**【一】毛細管電泳分離不同細菌的 DNA 片段：**因為毛細管電泳具有高解析度與快速度的優點。將 12 種不同細菌的 DNA 經由 *Hae*III 切割成不同片段大小，以毛細管電泳進行分析，不同細菌的 DNA 圖譜皆可於 20 min 內完成分離，有利於快速的臨床診斷。

**【二】親和力毛細管電泳探討蛋白質蛋白質間的作用力：**DNA 適合體(Aptamer, Apt)與人體凝血酵素(Thrombin, Thr)有很強的作用力。Apt 在含有  $K^+$ 和  $Ba^{2+}$ 的緩衝溶液中具有線性(L-Apt)與 G-quadruplex (G-Apt)兩種構型。親和力電泳實驗發現只有 G-Apt 對 Thr 具有親和力，在  $K^+$ 的存在下，可將 G-Apt 與 L-Apt

分離，並用於定量 Thr 和 AT III (human anti-Thr III)。實驗結果 Thr 和 AT III 的偵測極限分別為 9.8 nM 和 2.1 nM。

**【三】腦脊髓液中氨基酸的分析：**我們成功的以聚合物溶液進行線上濃縮與分離 naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA)衍生化的氨基酸，其偵測極為 nM。將所發展的技術應用到腦脊髓液中氨基酸(glycine, glutamine, glutamate)的檢測，並比較不同症狀(發炎、癲癇和黃疸)病人的氨基酸電泳圖譜，以瞭解兩者之間的關聯性。

## 五、計劃成果自評

在本年度研究計劃中，除了延續之前所發展的電泳分析技術，以聚合物溶液成功區分不同細菌的 DNA 片段，得到不同的細菌的電泳圖譜，未來可應用於快速臨床診斷。並成功的以親和力毛細管電泳探討 DNA 適合體與人體凝血酵素間的作用力。另外，亦以毛細管電泳探討不同症狀間，腦脊髓液中氨基酸的電泳圖譜，期望能找出兩者之間的關聯性。本年度我們共訓練七位博士生及五位碩士生，其中一位完成一篇博士論文及兩位完成兩篇碩士論文。部份研究成果已發表於分析化學雜誌：

1. Huang, M. -F., Kuo, Y. -C., Huang, C. -C. and Chang, H. -T. "Separation of Long Double-Stranded DNA by Nanoparticle-Filled Capillary Electrophoresis" *Anal. Chem.* 2004, 76, 192-196.
2. Chang, P. -L., Kuo, I -T., Chiu, T. -C., and Chang, H. -T. "Fast and Sensitive Diagnosis of Thalassemia by Capillary Electrophoresis" *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 379, 404-410.
3. Ho, H. -T., Chang, P. -L., Hung, C. -C., and Chang, H. -T. "Capillary Electrophoretic Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns for Mycobacterial hsp65 Gene" *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 3525-3531.
4. Chiou, S. -H., Huang, M. -F., and Chang, H. -T. "Separation of Double-stranded DNA Fragments by Capillary Electrophoresis: Impacts of poly(ethylene oxide), Gold nanoparticles, Ethidium Bromide and pH" *Electrophoresis* 2004, 25, 2186-2192.
5. Huang, C. -C., Cao, Z., Chang, H. -T., and Tan, W. H." Molecular Aptamer Based Affinity Capillary Electrophoresis for Protein-Protein Interactions" *Anal. Chem.* 2004, 76, 6973-6981.
6. Chang, H. -T., Huang, Y. -F., Chiou, S. -H., Chiu, T. -C., and Hsieh, M. -M. "Advanced Capillary and Microchip Electrophoretic Techniques for Proteomics", *Current Proteomics*, 2004, 4, 325-347.
7. Hsieh, M. -M. and Chang, H. -T. "Discontinuous Buffer Systems for Improved Detection of Biological Amines and Acids in Capillary Electrophoresis" *Electrophoresis* 2005, 26, 187-195.
8. Chang, S. Y., Tseng, W. -L., Sreedhar, M., and Chang, H. -T. "Determination of Small Phosphorous-containing Compounds by Capillary electrophoresis" *Talanta* 2005, 66, 411-421.
9. Lin, Y. -W. and Chang, H. -T. "Modification of Poly(methyl methacrylate) Microchannels for Highly Efficient and Reproducible Electrophoretic Separations of Double-stranded DNA", *J. Chromatogr. A* 2005, 1073, 191-199.
10. Lu, M. -J., Chiu, T. -C., Chang, P. -L., Ho, H. -T., and Chang, H. -T. "Determination of Amino Acids in Cerebrospinal Fluids by Capillary Electrophoresis-Light Emitting Diode Induced Fluorescence" *Anal. Chim. Acta*. 2005, 538, 143-150.

## 六、參考資料

1. Venter, J. C. et al. *Science* 2001, 291, 1304-1351.
2. Barron, A. E.; Sunada, W. M. and Blanch, H. W. *Electrophoresis* 1996, 17, 744-757.
3. Chang, H. T. and Yeung, E. S. *J. Chromatogr. B* 1995, 669, 113-123.
4. Tseng, W.-L., Chang, H.-T., *Anal. Chem.* 2000, 72, 4805-4811.
5. Huang, C.-C., Chiu, T.-C., Chang, H.-T., *J. Chromatogr. A* 2002, 966, 195-203.
6. Hsieh, M.-M., Hsu, C.-E., Tseng, W.-L., Chang, H.-T., *Electrophoresis* 2002, 23, 1633-1641.