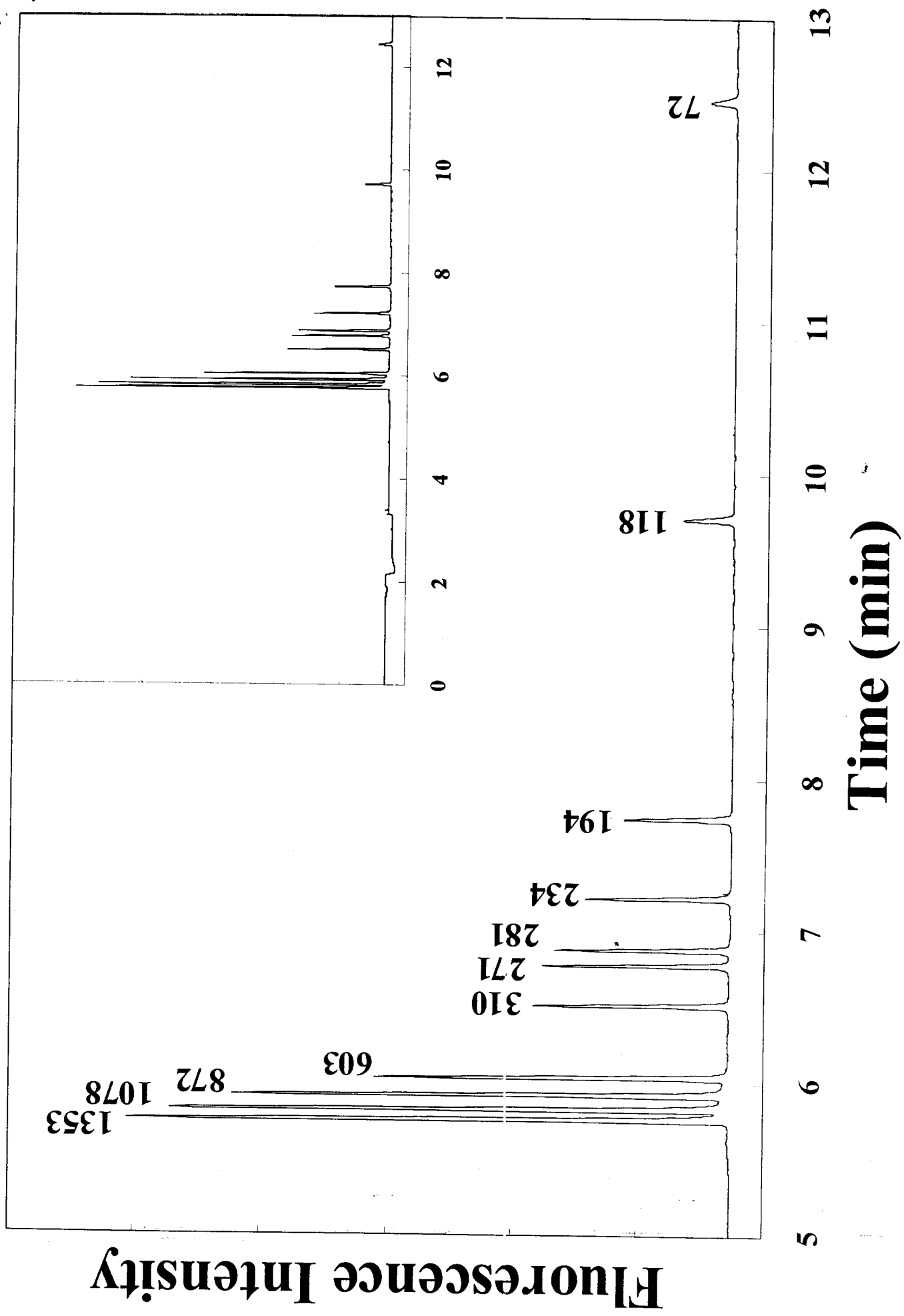


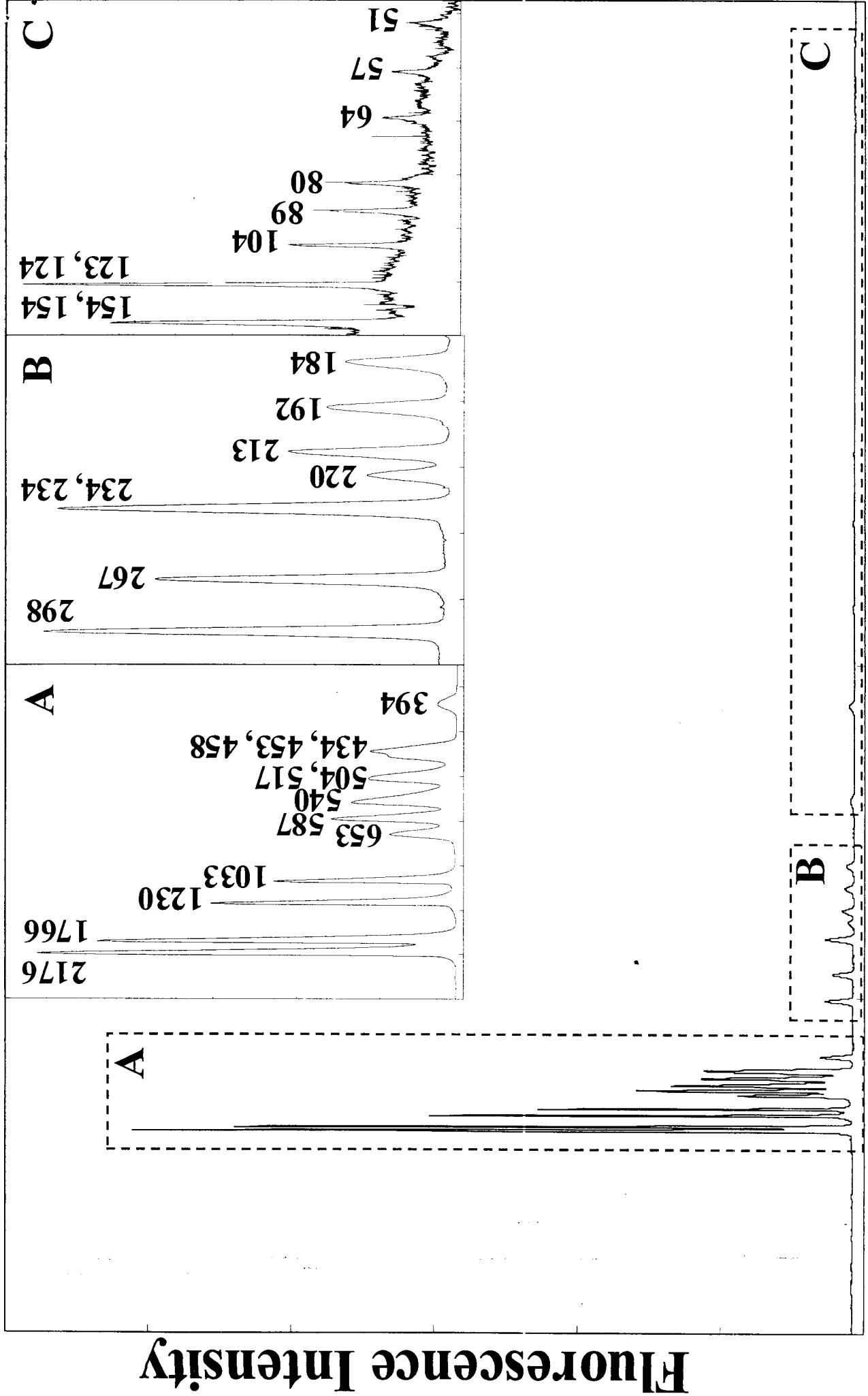
FIGURE LEGENDS

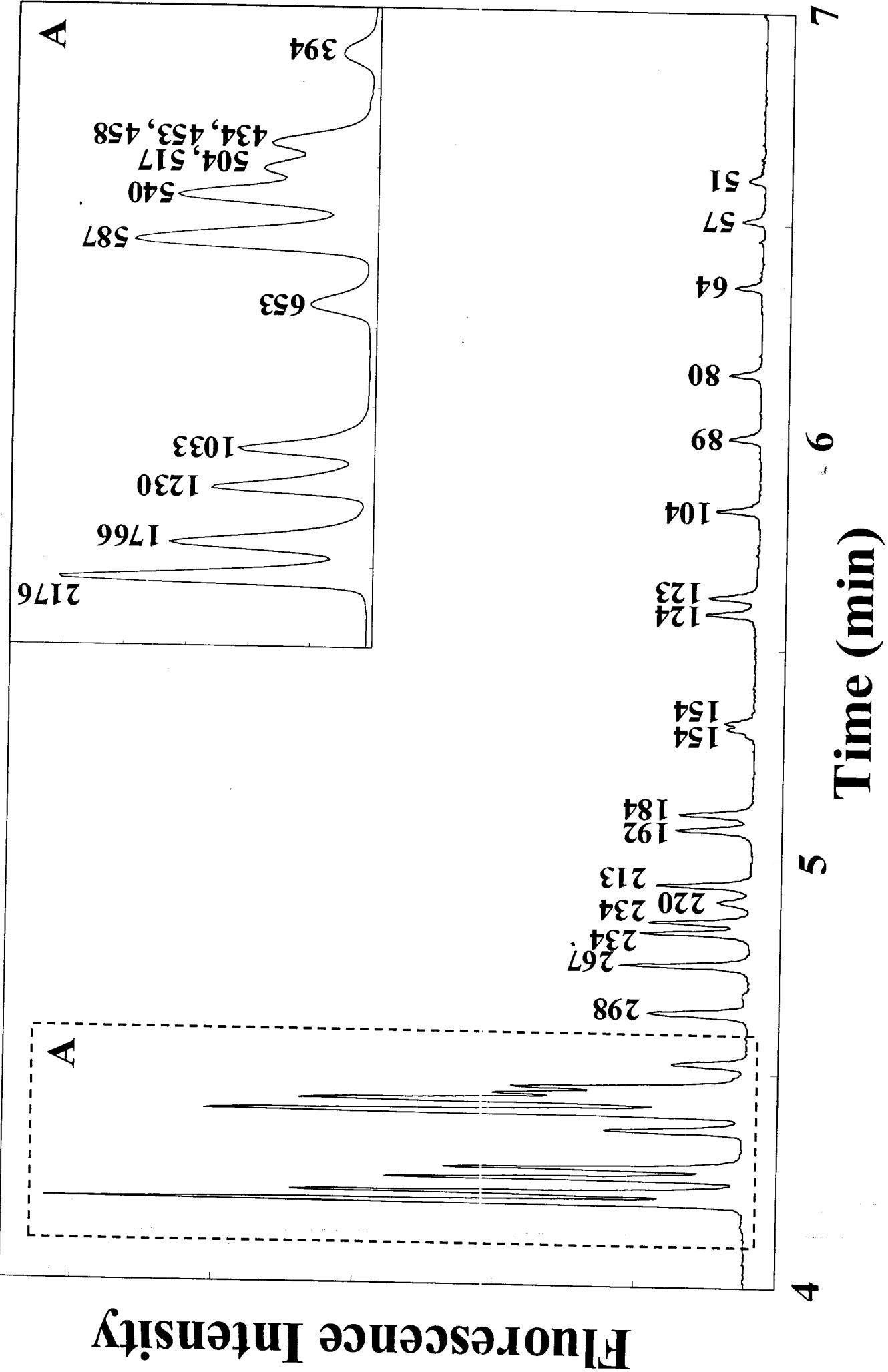
- Figure 1 Separation of 5 $\mu\text{g/mL}$ $\phi\text{X 174}$ DNA-Hae III restriction fragments in the presence of EOF at 15 KV using a 75- μm capillary. Capillary length: 40 cm (30 cm to the detector). The capillary was filled with 1X TBE containing 5 $\mu\text{g/mL}$ EtB prior to DNA injection. Buffer vials contain solutions of 2% PEO and 5 $\mu\text{g/mL}$ EtB.
- Figure 2 Separation of 5 $\mu\text{g/mL}$ DNA markers V and VI in the presence of EOF at 15 KV using a 75- μm capillary. Capillary length: 40 cm (30 cm to the detector); the capillary was filled with 1X TBE containing 1 $\mu\text{g/mL}$ EtB prior to DNA injection. Buffer vials contain solutions of 3% PEO and 1 $\mu\text{g/mL}$ EtB.
- Figure 3 Separation of 25 $\mu\text{g/mL}$ DNA markers V and VI in the presence of EOF at 15 KV using a 10- μm capillary. Capillary length: 35 cm (25 cm to the detector). The capillary was filled with 1X TBE containing 20 $\mu\text{g/mL}$ EtB. Buffer vials contain solutions of 2% PEO and 20 $\mu\text{g/mL}$ EtB.
- Figure 4 Separation of 5 $\mu\text{g/mL}$ $\phi\text{X 174}$ DNA-Hae III restriction fragments in the presence of the EOF at 15 KV using a 10- μm capillary. Other conditions are as in Figure 3.



Time (min)

5 10 15 20 2





以 HCl 溶液處理毛細管，並運用於 DNA 的序列分析²⁴。在過去使用聚合物溶液之 CE 分析工作，都是使用經表面修飾並已先填充聚合物溶液之毛細管，在無電滲流的條件下進行分離。一般而言，將聚合物溶液導入毛細管時，聚合物分子會藉由疏水基的作用吸附於毛細管壁，使電滲流降低甚或消失。這種吸附現象同時會導致分離再現性不佳，因此目前尚未有在電滲流存在的狀態下進行較小 DNA 片段之分離的報告出現。Barron 等人曾利用 HEC (hydroxyethyl cellulose) 溶液於未塗覆毛細管內進行較大 DNA 片段的分離²⁵⁻²⁷。由於其研究是在鹼性環境下進行分離，而 DNA 分子為陰電性，故其遷移方向與電滲流相反。但由於電滲流的速度較快，仍能將所有 DNA 分子帶往負極方向並被偵測。較大的 DNA 片段，必須變形穿過聚合物溶液中的孔隙，因此其電淌度較小，較早被偵測器所偵測。雖然在極稀釋的 HEC 溶液中，電滲流在電泳分離過程中會略為下降，但在一小時之內，HEC 經由動力塗覆於毛細管壁導致的電滲流下降相當輕微²⁵。因此，在進行分離前使用 NaOH 溶液處理毛細管可能可以避免 DNA 吸附於毛細管壁，回復毛細管壁的電荷，並且使毛細管內維持相當高的電滲流以迅速將 DNA 分子帶往負極出口。

在 CE 中使用聚合物溶液作為介質時，如何將聚合物溶液裝填入毛細管內是一大難題。雖然和交聯聚合物相比，聚合物溶液的黏度已低了許多，但一般仍需使用相當高的壓力才能進行裝填毛細管的步驟。尤其在使用較高濃度的聚合物溶液，以及較小之毛細管時，裝填毛細管的步驟愈形困難。使用較小的毛細管，可以提高解析度、降低樣品量、以及減少分離所需時間(高電場)²⁸。因此，發展一可將高黏度聚合物溶液裝填至毛細管中的方法，是一項相當重要的課題。在本研究中，我們將利用電滲流將聚合物溶液導入毛細管中，並進行 DNA 的 CE 分離。利用染料分子與 DNA 結合後螢光增強的原理，我們在聚合物溶液中加入 EB，使其與 DNA 分子嵌合，並以 543.6 nm 之氬氦雷射作為激發光源，進行偵測²⁹。

由於 PEO 具有親水性、電中性、一般可購得之分子量範圍大、以及低光學背景值等優點，故其相當適合用來製備 DNA 分離所用的聚合物溶液。目前 PEO 溶液已被應用於 DNA 以及蛋白質的電泳分離研究^{30, 31}。利用不同分子量的 PEO 可製備具多分散性(polydispersity)之聚合物溶液，此溶液可用於分子大小範圍較大的 DNA 樣品³²。在本研究中，我們將使用高黏度的 PEO 溶液(分子量 8,000,000)，在

內徑 10 至 75 μm 的毛細管內進行 DNA 的電泳分離。

四、結果與討論

四之一：流動式聚合物溶液

本研究中，使用 NaOH 溶液處理毛細管，其目的為在電泳過程中維持極高的電滲流以導入聚合物溶液、避免 DNA 吸附於管壁、以及除去殘留的 PEO。在電泳開始進行後，DNA 分子的電淌度方向與電滲流相反，故其遷移速度為電滲流速度減去 DNA 分子電泳淌度；而 PEO 之遷移速度則與電滲流速度相同。因此，DNA 分子的遷移速度比 PEO 慢，在很短的時間內，DNA 樣品區帶就會進入 PEO 溶液區帶內，並藉由 PEO 的篩分達到分離。圖一為在毛細管長 40cm、15kV 下使用流動式聚合物溶液(2% PEO、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB、TBE 1x)分離 $\phi\text{X174 RF DNA}/\text{Hae III}$ restriction fragments 所得電泳圖。其中 271bp 與 281bp 的電泳順序反向為 Karger 所發現³³。對於較小的 DNA 分子而言，聚合物溶液中的孔隙大小遠大於其分子大小，不能有效地阻隔其移動，故具有較大的電淌度。從電泳圖上基線的漂移，可以估計其電滲流大約為 $4.04 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 。利用此值推算 1356-bp DNA 分子的電淌度，大約是 $1.74 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ，這與過去使用已填充凝膠介質之毛細管進行實驗所獲得的數據相近³⁴。此實驗結果表明了 PEO 與 DNA 分子的吸附效應極小，並未造成電滲流明顯的降低。實驗數據的高再現性，可以進一步佐證此項推論。不過考慮 TBE 緩衝溶液與 PEO 溶液的黏度差異，在 PEO 未完全充滿毛細管之前，電滲流應有些許變化。

以電滲流將高黏度的聚合物溶液導入毛細管中，對於較小 DNA 片段的分離，具有相當重要的應用價值³⁵。圖二為使用聚合物溶液(3% PEO、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EB、TBE 1x)分離 DNA Marker V 與 Marker VI 所得電泳圖，其電泳條件與圖一相同。濃度 3% 之 PEO 溶液其外觀已接近果凍狀，流動性極低，要使用壓力將其裝填至毛細管中幾乎是不可能的。DNA 分子良好的分離結果，證明了本方法具有將高濃度的聚合物溶液裝填至毛細管中的能力。圖二的分離時間較長，其原因除了聚合物溶液中的黏度較高之外(黏度大小與聚合物濃度成正比)，DNA 與 EB 嵌合的比例(EB 濃度較低)降低導致其電淌度增加也是另一因

素。由於 EB 帶有正電荷，與 DNA 嵌合後使其所帶電荷減少，電淌度也隨之下降。在一定範圍內，DNA 電淌度的減少與 EB 的濃度成正比。使用低濃度之 EB，會使 DNA 偵測的靈敏度大幅下降，但在較大 DNA 片段部分可得較佳之解析度。

四之二：分離之再現性

關於此新方法運用於分離 DNA 片段之再現性，可參照表一的結果。在同一毛細管進行分離時，其相對標準偏差範圍 0.52% 以內；在不同毛細管中進行分離時，其相對標準偏差範圍在 3.96% 以內。在表中可以發現，較小的 DNA 片段其偏差較大，這可能是由於 DNA 分子的擴散、DNA 與毛細管壁的交互作用、以及電滲流速度改變所引起。在不同毛細管中的再現性較差，可能導因於毛細管的性質、長度、以及有效遷移長度的不同。由這些再現性極高的分離結果，可以推論由於 PEO 對毛細管壁的動力塗附，DNA 分子與毛細管壁之間的作用變的相當微弱。依據 Yeung 等人的研究顯示，PEO 在鹼性環境中無法穩定存在(pH 7.4 以上會開始水解)³⁶，故吸附於毛細管壁之 PEO 可藉由 NaOH 的清洗將之去除。遷移時間的高再現性，顯示毛細管經過以 0.5 M NaOH 在 1 kV 下沖洗十分鐘的處理之後，便可將管內殘留之 PEO 完全去除，同時再生具高電荷密度之管壁，減少 DNA 與管壁的吸附。

四之三：聚合物溶液濃度對 DNA 分離的影響

較大 DNA 分子與較小 DNA 分子在兩相異 PEO 濃度中遷移時間比的變化趨勢是不同的。在 PEO 濃度大於 1% 時，DNA 片段之遷移時間比隨著分子大小減少而增加。此現象可由聚合物溶液的孔隙大小隨濃度而變化來解釋，並與爬行模型所預測的結果相符³⁷。然而，PEO 濃度為 0.5% 時，在 DNA 分子小於一定程度後，其相對於 2% PEO 之遷移時間比反而減少。對於較小 DNA 分子而言，在濃度較低的聚合物溶液中，篩分對電泳淌度的影響不若較大 DNA 分子那般重要。由於其擴散速度快與立體阻礙(steric hindrance)小，較小 DNA 分子與毛細管壁之交互作用會較強，造成其電泳淌度較低，此點已由 Yeung 等人的研究證實³⁸。不同濃度之 PEO 溶液，其黏度差異也會對電滲流以及 DNA 片段的遷移時間造成影響。此點同樣可由線上即時監控電泳分離過程中電滲流與 DNA 電淌度的變化，來作進一步的研究。

四之四：內徑 10 μ m 毛細管之電泳分離

為了突顯此新技術的優點，我們使用內徑 10 μ m 的毛細管進行電泳分離，圖三為使用內徑 10 μ m 的毛細管以及含 20 μ g EB、2% PEO 溶液分離 DNA Marker V 與 Marker VI 所得之電泳圖。大於 51 bp 之 DNA 片段可在 7 分鐘內分離並被偵測。除了兩個同樣具 154 bp 之 DNA 片段有部分分離，123 bp 與 124 bp 的兩個 DNA 片段也達到完全分離，達到單鹼基解析度。在 DNA 突變的分析研究上，單鹼基解析度是必備條件之一，此分離結果顯示了流動式聚合物溶液應用於分析 DNA 突變的潛力。和圖二相較，圖三之分離時間較短，在 123、124 bp 以及兩個 154 bp 部分的解析度也較高。這可以證明 EB 濃度對 DNA 分離的影響。除了圖上顯示出的 31 個片段外，尚有 4 個 DNA 片段(分別為 8、11、18、21 bp)未被偵測，可以提高 EB 濃度來達成其偵測。圖四為使用內徑 10 μ m 的毛細管分離 ϕ X174 RF DNA-Hae III restriction fragments 所得電泳圖，DNA 樣品的總量約為 1.8 pg，整個分離過程在 7min 內完成。就我們所知，這是第一次使用這麼小的毛細管在流動式 PEO 溶液中進行 DNA 的分離。由於此方法能夠使用極小內徑的毛細管，DNA 樣品的使用量也可進一步降低，不但能減少實驗成本，同時也能提高解析度。另外，由於小毛細管的散熱效率較高，可以使用極高的外加電場，因此可快速獲得高解析度的電泳分離結果。在單細胞以及 DNA 的分析，尤其是 DNA 序列解析(DNA sequencing)方面，使用小毛細管的可行性是相當重要的。

四之五：DNA 之分離效率

表二為分別使用內徑 10、25、75 μ m 毛細管進行 ϕ X174 RF DNA-Hae III digest 之電泳分離的分離效率。很自然的，使用較小的毛細管以及較少量的 DNA 樣品所獲得的分離效率較高。由於本研究的目的並不在於探討注射體積以及 EB 濃度對理論板數的影響，因此並未對此二變數嚴格控制。特別值得注意的，在內徑 10 μ m、長度 35cm 的毛細管內，理論板數可達 11.9 million/m。Smith 曾經指出，DNA 的帶寬決定於四個因素：注射、擴散、熱梯度(thermal gradient)、以及偵測體積(detection volume)，其中後三項因素的變化與毛細管的大小有關³⁹。毛細管越小，則其散熱效率越高，其整體溫度越接近外界環境，因此其擴散效應越低。而熱梯度與毛細管內徑的平

方成正比，毛細管越小，毛細管壁與毛細管中心的溫差越小。同樣的，由於雷射光聚焦於毛細管中心，當毛細管越小時，其偵測體積也越小。

五、計劃成果自評

由於本方法具有高解析度，簡易，快速度和高再現性等優點，相關結果已發表於 *Electrophoresis*. 19, 3149-3153 (1998); *Anal. Chem.* 71, 2033-2036 (1999); *J. Chromatogra. A*. 171, 337-347 (1999); 和台大化學系 86 級碩士論文(陳鉉升著)。

我們計劃將此方法應用於蛋白和 DNA 定序之研究、理論探討、及其他相關方法之開發。

六、參考資料

1. Swerdlow, H.; Zhang, J. Z.; Chen, D. Y.; Harken, H. R.; Grey, R.; Wu, S.; Dovichi, N. J.; Fuller, C. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2835-2841.
2. Ueno, K.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* 1994, 66, 1424-1431.
3. Collins, F.; Galas, D. *Science* 1993, 262, 43-46.
4. Quesada, M. A.; Zhang, S. *Electrophoresis* 1996, 17, 1841-1851.
5. Fang, Y.; Zhang, J. Z.; Hou, J. Y.; Lu, H.; Dovinichi, N. J. *Electrophoresis* 1996, 17, 1436-1442.
6. Kleparnik, K.; Mala, Z.; Bocek, P. *J. Chromatogr. A* 1997, 772, 243-253.
7. Peck, K.; Wung, S. -L.; Chang, G. -S.; Yen, J. J. Y.; Hsieh, Y. -Z. *Anal. Chem.* 1997, 69, 1380-1384.
8. Carrilho, E.; Ruiz-Martinez, M. C.; Berka, J.; Smirnov, I.; Goetzinger, W.; Miller, A. W.; Brady, D.; Karger, B. L. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3305-3313.
9. Woolley, A. T.; Sensabaugh, G. F.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2181-2186.
10. Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1996, 68, 720-723.
11. Effenhauser, C. S.; Bruin, G. J. M.; Paulus, A.; Ehrat, M. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3451-3457.
12. Cohen, A. S.; Najarian, D. R.; Paulus, A.; Guttman, A.; Smith, J. A.; Karger, B. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1988, 85, 9660-9663.
13. Harrington, M. G.; Zewert, T. E. *Electrophoresis* 1994, 15, 195-199.
14. Chen, N.; Wu, L.; Palm, A.; Srichaiyo, T.; Hjerten, S. *Electrophoresis* 1996, 17, 1443-1450.
15. Talmadge, K. W.; Zhu, M.; Olech, L.; Siebert, C. *J. Chromatogr. A* 1996, 744, 347-354.
16. Berka, J.; Parlat, Y. F.; Muller, O.; Hebenbrock, K.; Heiger, D. N.; Foret, F.; Karger, B. L. *Electrophoresis* 1995, 16, 377-388.
17. Lu, X.; Yeung, E. S. *Appl. Spectrosc.* 1995, 49, 605-609.
18. Chrambach, A.; Aldroubi, A. *Electrophoresis* 1993, 14, 18-22.
19. Grossman, P. D.; Soane, D. S. *Biopolymers* 1991, 31, 1221-1228.
20. Hammond, R. W.; Oana, H.; Schweinfus, J. J.; Bonadio, J.; Levy, R. J.; Morris, M. D. *Anal. Chem.* 1997, 69, 1192-1196.
21. Hjerten, S. *J. Chromatogr.* 1985, 347, 191-198.
22. Liao, J. -L.; Abramson, J.; Hjerten, S. *J. Cap. Elec.* 1995, 4, 191-196.
23. Oana, H.; Hammond, R. W.; Schweinfus, J. J.; Wang, S. -C.; Doi, M.;

- Morris, M. D. *Anal. Chem.* 1998, 70, 574-579
24. Fung, E. N.; Yeung, E. W. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1913-1919.
25. Barron, A. E.; Sunda, W. M.; Blanch, H. W. *Electrophoresis* 1995, 16, 64-74.
26. Barron, A. E.; Sunda, W. M.; Blanch, H. W. *Electrophoresis* 1996, 17, 744-757.
27. Nathakarnkitkool, S.; Oefner, P. J.; Bartsch, G.; Chin, M. A.; Bonn, G. K. *Electrophoresis* 1992, 13, 18-31.
28. Slater, G. W.; Mayer, P.; Grossman, P. D. *Electrophoresis* 1995, 16, 75-83.
29. Kim, Y.; Morris, M. D. *Anal. Chem.* 1994, 66, 1168-1174.
30. Iki, N.; Yeung, E. S. *J. Chromatogr. A* 1996, 731, 273-282.
31. Zhang, N.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2927-2931.
32. Chang, H. -T.; Yeung, E. S. *J. Chromatogr. B* 1995, 669, 113-123.
33. Muller, O.; Forest, F.; Karger, B. L. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2974-2980.
34. Bocek, P.; Chrambach, A. *Electrophoresis* 1989, 12, 1059-1061.
35. Belenky, A.; Smisek, D. L.; Cohen, A. S. *J. Chromatogr. A* 1995, 700, 137-149.
36. Preisler, J.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* 1996, 68, 2885-2889.
37. Viovy, J. -L.; Duke, T. *Electrophoresis* 1993, 14, 322-329.
38. Iki, N.; Kim, Y.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* 1996, 68, 4321-4325.
39. Luckey, J. A.; Norris, T. B.; Smith, L. M. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 3067-3075.

Table 1 Reproducibility of separations of ϕ X-174/Hae III DNA restriction fragments using 2% PEO solutions and 75- μ m capillaries.

DNA (bp)	Migration time (min)					Mean		R. S. D. (%)	
	1	2	3	4	5	Intra	Inter	Intra	Inter
1353	5.74	5.79	5.76	5.74	5.70	5.76	5.73	0.44	0.53
1078	5.81	5.86	5.82	5.81	5.78	5.83	5.80	0.45	0.36
872	5.90	5.96	5.92	5.90	5.89	5.93	5.90	0.52	0.26
603	6.02	6.07	6.03	6.00	6.02	6.04	6.02	0.44	0.25
310	6.49	6.55	6.51	6.43	6.71	6.52	6.55	0.47	2.20
271	6.75	6.81	6.77	6.67	6.99	6.78	6.81	0.45	2.40
281	6.86	6.91	6.87	6.76	7.10	6.88	6.91	0.39	2.51
234	7.20	7.25	7.21	7.06	7.50	7.22	7.26	0.37	3.08
194	7.72	7.77	7.74	7.52	8.07	7.74	7.78	0.33	3.56
118	9.70	9.75	9.71	9.22	9.97	9.72	9.63	0.27	3.95
72	12.48	12.54	12.45	12.76	12.91	12.49	12.71	0.37	1.85

Data shown in columns marked 1, 2, and 3 are from the same capillary; Data shown in columns marked 3, 4, and 5 are from three different capillaries.

Table 2 Separation efficiency of ϕ X-174/HaeIII DNA restriction fragments using 2% PEO solutions and different sizes of capillaries.

DNA (bp)	N (million/m)			
	75 $\mu\text{m}^{\text{a, b}}$	25 $\mu\text{m}^{\text{a, b}}$	10 $\mu\text{m}^{\text{c, d}}$	10 $\mu\text{m}^{\text{a, d}}$
1353	1.12	7.86	2.86	5.87
1078	1.15	8.07	2.90	9.31
872	1.19	6.39	2.96	9.50
603	1.23	6.67	3.05	6.25
310	2.33	6.10	4.54	6.89
271	2.52	8.31	6.76	7.13
281	2.18	6.76	4.77	7.25
234	2.05	7.41	5.02	11.91
194	2.03	8.45	5.38	8.18
118	1.93	7.43	6.83	7.16
72	1.95	5.03	6.31	8.86

a: [DNA] = 5 $\mu\text{g/mL}$; b: [EtB] = 5 $\mu\text{ g/mL}$; c: [DNA] = 25 $\mu\text{g/mL}$;
d: [EtB] = 20 $\mu\text{ g/mL}$.