

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(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2113-M-002-048-

執行期間：92 年 08 月 01 日至 93 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

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 93 年 5 月 24 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(1/3) ※

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：NSC92-2113-M-002-048-

執行期間：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

計畫主持人：張煥宗

一、中文摘要：

我們發展了梯度式毛細管電泳的技術進行來線上濃縮並分離 DNA，探討單一濃度的聚合物溶液對 51 bp 到 23 kbp DNA 片段的分離結果時，發覺使用 1% PEO 有最佳的效果。為了同時進行線上濃縮及分離 DNA 的目的，我們進行了 0.5%到 1.5%的 PEO 溶液的梯度式毛細管電泳，當同時變化螢光染劑 EtBr 的量從 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 到 10 $\mu\text{g/mL}$ 時有最佳的效果。DNA 樣品利用壓力方式注入 120 秒，發現最多可對 281 bp 片段有 65 倍的訊號增強效果。在聚合物中加入金奈米粒子，可用濃度極低的聚合物溶液來分離小片段 DNA，我們利用 0.2% 8M PEO 溶液，加入濃度為 0.3X 的 56 nm 金奈米粒子進行 51 bp 到 2176 bp 的 DNA 片段分離，並探討 EtBr 濃度變化、緩衝溶液組成等因素的影響，發現在 pH 9.0 下有最佳的分離效果，利用最佳的條件並可成功地在 7 分鐘內分離 51 bp 到 23 kbp 的 DNA 片段。另我們發展了在毛細管中填滿奈米粒子的溶液來進行電泳分離，我們將 32 nm 的金奈米粒子的表面修飾聚合物分子，以離心的方式濃縮金奈米粒子並去除溶液中未與金奈米粒子作用的聚合物，利用濃縮的金奈米粒子，我們發現當使用濃度為原始量的 5 倍 (5X) 時，並使用 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 EtBr，可以在 6.5 分鐘內成功分離數萬鹼基對的 DNA 片段。

二、英文摘要：

We present the on-line concentration and separation of dsDNA by gradient capillary electrophoresis in the presence of electroosmotic flow (EOF) using poly(ethylene oxide) (PEO) and hydroxyethylcellulose (HEC). Using 1.0% PEO, the separation of DNA fragments with sizes ranging from 51 bp to 23 kbp has been achieved in less than 12 min. In order to concentrate and separate the DNA sample, gradient changes in the concentrations of PEO and ethidium bromide (EtBr) have been conducted. Different concentrations of PEO solutions are introduced to the capillary by EOF. To optimize resolution and stacking efficiency, an attempt was made to conduct the separation under gradient changes of PEO concentrations in the range of 0.5-1.5% and EtBr concentration in the range of 0.1 $\mu\text{g/mL}$ -10 $\mu\text{g/mL}$. We also present DNA separation by capillary electrophoresis using poly(ethylene oxide) (PEO) containing gold nanoparticles (GNPs). The impacts of PEO, GNPs, EtBr, and pH on the separation of double-stranded DNA have been carefully explored. Using 0.2% PEO containing 0.3X GNPs (the viscosity less than 15 cP), we have demonstrated the separation of DNA markers V and VI in 5 min at different pH values. In terms of resolution and reproducibility, GNPs have a greater impact on the separation at pH 9.0. Using 0.2% PEO containing 0.3X GNPs at pH 9.0, the separation of DNA fragments ranging in size 21-23130 bp in 7 min has been achieved. In this report, we present the first example of the analysis of long double-stranded (ds) DNA molecules by nanoparticle-filled capillary electrophoresis (NFCE). The 32 nm gold nanoparticles were modified with polymer via noncovalent bonding to form gold nanoparticle/polymer composites (GNPPs). GNPPs were concentrated by centrifuging and the excess polymer was removed. The separation of High Molecular DNA (8271 bp to 48502 bp) by NFCE was accomplished in 6.5 min using 5X GNPPs and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EtBr.

三、計劃緣由與目的：

毛細管電泳是一項快速且方便的生物樣品分析技術，分析如 DNA、蛋白質、氨基酸等樣品，人類基因體計畫更利用此技術在西元 2000 年完成人類的基因定序[1]。電泳分離在傳統上是利用可形成孔洞的介質來篩分大小不同的 DNA 片段，早期是利用高黏度的交聯性凝膠，由於在分離速度及實驗方便性的考量，近十幾年來開始利用線性的聚合物分子來取代凝膠，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 上更進一步的功用，如 Barron 等人利用未形成孔洞的 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]。

奈米素材的研究是近年來極熱門的領域，除了在工業材料或電晶體設計上有極大的應用價值外，實際上奈米粒子的實際應用首見生醫檢測上，這是因為奈米粒子本身有明顯的光譜性質，而且其與常見於生物分子上的巰基或氨基具有極強的結合力，故極適合發展作為生物

分子感應器。而因為奈米粒子與生物分子的作用力極強，因此以有人將之利用於電泳分離上[4,5]，增加分離的效能及解析度。本實驗室近一年也成功的在極稀的聚合物溶液中加入少量的金奈米粒子，快速且高解析度的分離 DNA 片段[6]。

本實驗室在毛細管電泳分離的研究上，嘗試將多種的聚合物溶液應用在 DNA 分離上，利用梯度式電泳的方式，同時分離從數十鹼基對到數萬鹼基對等大範圍的 DNA 片段，並進行線上濃縮。在另一方面，我們結合奈米粒子與聚合物應用在毛細管電泳分離，在有奈米粒子存在下，我們利用極稀的 PEO 溶液即可對小片段 DNA 進行分離，與傳統上需使用高濃度及高黏度的聚合物溶液相較，在配置及實驗過程上更方便，我們更進一步探討金奈米粒子濃度變化以及緩衝溶液的變化對 DNA 分離的影響。另外我們發展聚合物分子修飾金奈米粒子表面的技術，直接使用修飾過的金奈米粒子就可快速且高解析度的分離數萬鹼基對之 DNA 片段。

四、結果與討論

【一】線上濃縮並分離 DNA：本實驗是在電滲透流存在下，利用高分子聚合物溶液進行 DNA 的分離。我們分別可利用 0.5%到 1.5%的 PEO 溶液以及 0.5%到 2.0%的 HEC 溶液，在 12 分鐘內分離 51 bp 到 23130 bp 的 DNA 片段，我們發覺利用單一濃度並無法完全分離如此大範圍的 DNA 片段，高濃度聚合物較適合分離較小的 DNA，低濃度適合大片段 DNA，因此我們分別引入不同濃度的 PEO 以及 HEC 溶液，利用聚合物溶液的濃度梯度變化在毛細管中進行大範圍的 DNA 分離，並利用高濃度聚合物黏度較高，DNA 片段會因此而降低淌度的原理，可成功線上濃縮 51 bp 到 23130 bp 範圍的 DNA 片段，如附圖一。

【二】含金奈米粒子的聚合物溶液分離 DNA 的因素探討：在本實驗中，，我們嘗試改變金奈米粒子濃度、緩衝溶液的 pH 值、螢光染劑 EtBr 的量、以及聚合物溶液的濃度，來探討這些因素對於分離 DNA 片段的影響，在最佳的條件下 (0.2%的 8M PEO 含 0.3X 金奈米粒子)，我們並可在 7 分鐘內成功分離大小範圍為 51 bp 到 23130 bp 的 DNA 片段，如附圖二。

【三】利用修飾高分子聚合物的金奈米粒子分離 DNA：我們利用金奈米粒子與 DNA 片段有交互作用的特性，並利用 PEO 溶液修

飾金奈米粒子的表面，使得 DNA 片段在毛細管電泳中與金奈米粒子碰撞的機會，並因為金奈米粒子與 PEO 的影響使得 DNA 片段因此而降低遷移淌度，因大小不同的 DNA 受影響的程度不同，因此淌度改變程度不同，所以不同大小的 DNA 因此可被分離開來。我們利用 32 nm 的金奈米粒子修飾分子量為 4M 的 PEO，可成功在 6.5 分鐘內分離 8271 bp 到 48502 bp 的 HMD 以及 125 鹼基對到 23130 鹼基對的 λ -DNA 兩種樣品，如附圖三。

五、計劃成果自評

在本年度研究計劃中，我們成功的利用高分子聚合物在電滲透流的存在下進行大範圍 DNA 片段的線上濃縮與分離。另外利用修飾聚合物分子的金奈米粒子，以及在聚合物溶液中加入少量金奈米粒子的技術，成功在數分內分離數萬鹼基對的大 DNA 或數千以下的小片段 DNA。部分研究成果並已發表於分析化學雜誌：

1. Chiu T.-C.; Lin Y.-W.; Huang C.-C.; Chrambach A. and Chang H.-T. "A simple, Rapid, and Sensitive Method for Analysis of SYPRO Red Labeled Sodium Dodecyl Sulfate-Protein Complexes by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence" *Electrophoresis* 2003, 24, 1730-1736.
2. Huang Y.-F.; Huang C.-C. and Chang H.-T. "Exploring the Activity and Specificity of Gold Nanoparticle-Bound Trypsin by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection"

Langmuir 2003, 19, 7498-7502.

3. Huang, C.-C.; Huang, Y.-F. and Chang, H.-T. "Plasmon Absorption of Gold Nanoparticles in Linear Polymer Solutions" *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2004, in press.
4. Lin, Y.-W.; Huang, M.-J. and Chang, H.-T. "Analysis of dsDNA by Microchip Capillary Electrophoresis Using Polymer Solutions Containing Gold Nanoparticles" *J. Chromatogr. A* 2003, 1014, 47-55.
5. Kuo, I.-T.; Chiu, T.-C. and Chang, H. T. "On-column concentration and separation of double-stranded DNA by gradient capillary electrophoresis" *Electrophoresis* 2003, 24, 3393-3347.
6. 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.
7. Chiou, H.-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, accepted.
8. Chen, S.-J. and Chang H.-T. "Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles for Selective Determination of Thiols Based on Energy Transfer and Aggregation" *Anal. Chem.* 2004, accepted.
9. 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, accepted.
10. Lin, Y.-W. and Chang, H.-T. "Multiple-layer coated poly(methyl methacrylate) chips for electrophoretic separations of double-stranded DNA" *Electrophoresis*, submitted.

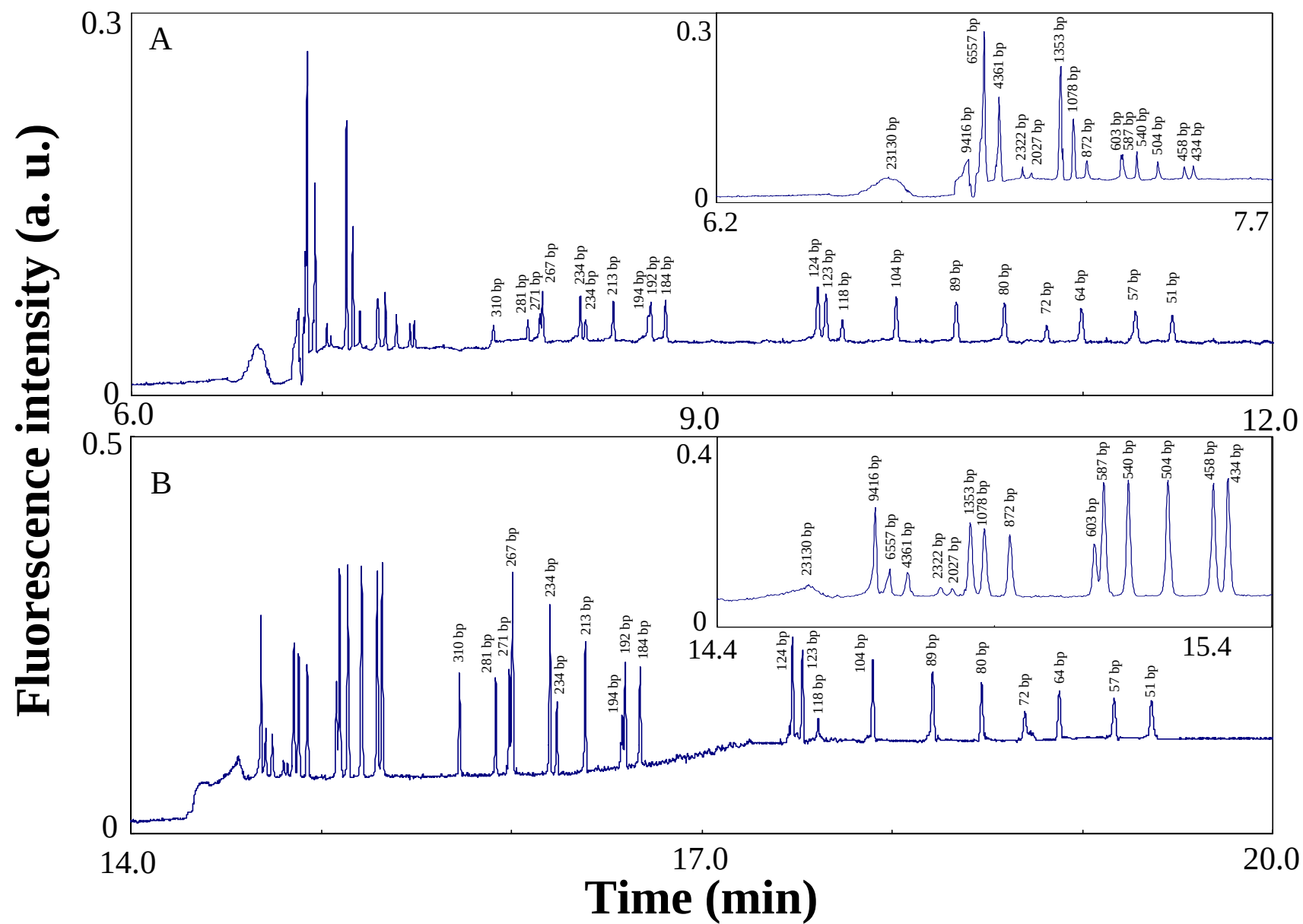
另外我們亦訓練了六位博士生及六位碩士生，其中有三位完成三篇碩士論文。

六、參考資料

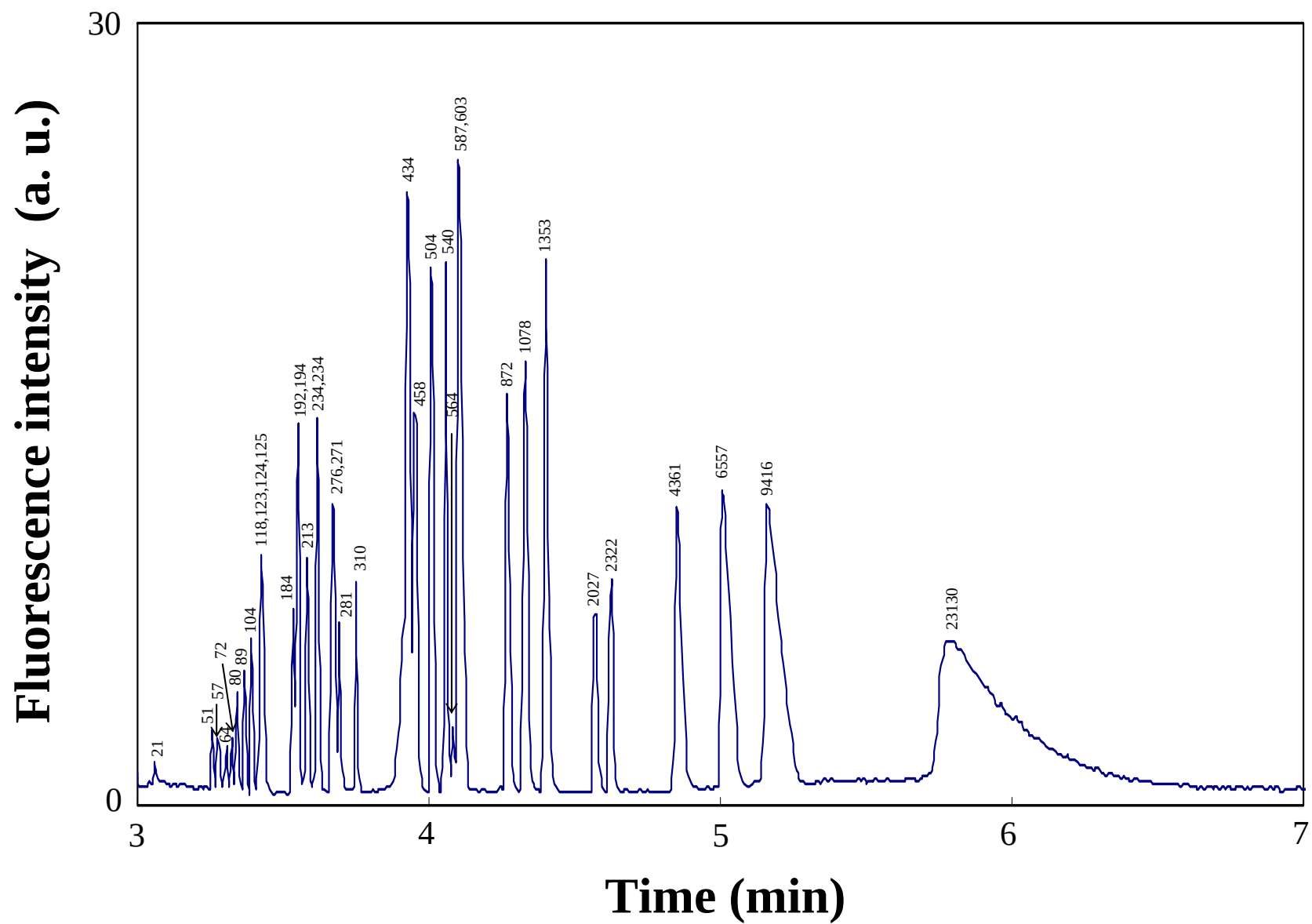
1. Venter, J. C. et al. *Science* **2001**, 291, 1304-1351.
2. Barron, A. E.; Sunada, W. M. and Blanch, H. W. *Electrophoresis* 1996, 17, 744.

3. Chang, H. T. and Yeung, E. S. *J. Chromatogr. B* 1995, 669, 113.
4. Neiman, B.; Grushka, E. and Lev, O. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5220–5227.
5. Pumera, M.; Wang, J.; Grushka, E. and Polsky, R. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5625–5628.
6. Huang, M.-F., Huang, C.-C., and Chang, H.-T. *Electrophoresis* **2003**, 24, 2896-2902.

附圖一



附圖二



附圖三

