

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以毛細管電泳暨雷射誘發螢光為基礎偵測微小核醣核  
酸之方法

Develop a method for the detection of microRNAs based  
on capillary electrophoresis with laser-induced  
fluorescence

江瑞民

Ruei-Min Jiang

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 100 年 7 月

私立東海大學碩士班研究生  
論文口試委員審定書

化學系 碩士班 江瑞民 君所提之論文

以毛細管電泳暨雷射誘發螢光為基礎偵測微  
小核醣核酸之方法

Develop a method for the detection of microRNAs based  
on capillary electrophoresis with laser-induced  
fluorescence

論文口試委員會 召集人 黃承文 (簽章)

委員 張有勳 (指導教授)  
韓龍

中華民國 100 年 7 月 8 日

私立東海大學碩士班研究生

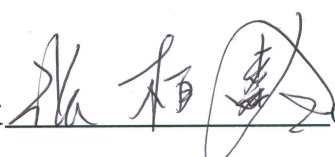
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 江瑞民 君所提之論文

以毛細管電泳暨雷射誘發螢光為基礎偵測微小  
核醣核酸之方法

Develop a method for the detection of microRNAs  
based on capillary electrophoresis with  
laser-induced fluorescence

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

100 年 7 月 8 日

## 謝誌

轉眼間，兩年的碩士班生活結束了，昔日懵懵懂懂的小鬼，如今眼神多了幾分自信。這都要感謝我的恩師，張柏齡教授，在恩師的教導下，使我在做人處事上能夠應對自如，在求學研究方面保有精益求精的態度，雖然研究的過程相當艱苦，但是成功的數據都能忘卻 try 條件時的辛苦；亦感謝黃承文教授與曾韋龍教授於百忙中撥冗審閱，並於論文寫作、觀念及實驗設計上給予寶貴的意見及指正，使論文更臻完善；感謝化學系最漂亮的藍姊，每當我求助無門時只要找藍姐就能迎刃而解；另感謝元琪助教提供我儀器上的使用，謹此獻上最誠摯的謝意。

論文研究期間，感謝同窗好友教程、庭伊、宥辰、曉薇、冠廷、品柔及筱文在修課、論文研究寫作期間的一同努力與相互砥礪；另感謝學弟子學、彥竹在實驗上的協助以及學妹雅筑、孟璇、宜蓁、俐雯帶給實驗室歡樂愉快的氣氛，在此一併致謝。

最後，謹將本論文獻給摯愛的父母親及家人，因為有你們溫情的關懷與包容，給予我最大的支持與後援，使我能夠安心順利的完成學業。另感謝所有在人生旅途上關懷及幫助我的人，願以此成果及喜悅與你們分享。

## 中文摘要

微小核糖核酸( microRNAs, miRNAs )在調節基因表現上扮演相當重要的角色，其與疾病的發展亦有密切的關聯性。由過去文獻發現 Epstein-Barr 病毒( EBV )感染宿主細胞時，除產生病毒蛋白外，亦會製造特異性的 miRNAs，並表現在鼻咽癌( Nasopharyngeal Carcinoma, NPC )病人的鼻咽組織中。有鑑於此，我們期望發展一以毛細管電泳暨雷射誘發螢光( capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence )為基礎，同時偵測多種 miRNAs 之新穎技術。研究中利用夾板式結合反應( splinted ligation )及不同長度之橋樑 DNA ( bridge DNAs )，就能於單毛細管中偵測多種相似長度的 miRNAs，並可達到 3 個指數等級的線性範圍( 1.0 nM to 1.0 pM )、其偵測極限( S/N = 3 )為 190 fM ( 2.5 zmol )。再者，我們以感染 EBV 的鼻咽癌細胞作為樣品，除了能夠偵測 5 種 EBV 的 miRNAs，亦意外的篩選出不同長度的 BART2 isomiRs ( isomer of miRNAs )。為了增加 CE 之實用性與改善靈敏度的問題，學生於末段成功地發展出 CE 暨雙波長雷射誘發螢光之技術，能夠同時偵測成對樣品中 BART9 miRNA。利用 Alexa Fluor 488 與 647 之螢光探針，可同時比較標準與未知細胞所表達的生物訊息。最後針對樣品前處理的部分進行濃縮與純化，成功地改善 10 倍之線性範圍( 1.0 nM to 100 fM )，其偵測極限為 13 fM，證明此方法確有潛力成為實用之臨床診斷工具。

## Abstract

In recent years, researchers have discovered that microRNAs (miRNAs) are related to cancer formation, neurodegeneration, and virus-induced diseases and have thus become an important biomarker for early diagnosis and for the analysis of biological processes. Therefore, we hope to develop a novel assay that simultaneously detects multiple miRNAs with capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. In this study, the method allows for the detection of multiple miRNAs within a single capillary based on the length differences of specified target bridge DNA. The linear range of the assay covers three orders of magnitude (1.0 nM to 1.0 pM) with a limit of detection ( $S/N = 3$ ) as low as 190 fM (2.5 zmol). Five miRNAs of Epstein-Barr virus were detected in EBV infected nasopharyngeal carcinoma cells. It is unexpected that the screening of isomiRs (isomer of miRNA) of BART2 by our proposed method. In the second part of this thesis, we try to develop a method based on capillary electrophoresis with dual-wavelength laser-induced fluorescence for miRNAs detection. Using probes labeled with Alexa Fluor 488 and 647, we can simultaneously detects the BART9 from paired sample. In addition, the sample treatment including pre-concentration and purification indicate that successful improve the linear range 10-fold (1.0 nM to 100 fM) than the previous report, and a limit of detection as low as 13 fM. Therefore, the data suggested the method may potentially be the powerful tool for cancer diagnosis.

# 總目錄

論文摘要.....	I
總目錄.....	III
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
總結論.....	98
參與會議.....	99
論文發表.....	100
第一章 毛細管電泳及微小核糖核酸之簡介.....	1
1.1 毛細管電泳序論.....	1
1.1.1 毛細管凝膠電泳分離原理.....	4
1.1.1.1 淌度(mobility).....	4
1.1.1.2 電滲流(electroosmotic flow, EOF)的產生.....	6
1.1.1.3 DNA 於毛細管凝膠電泳之分離機制.....	10
1.1.2 毛細管.....	13
1.1.2.1 毛細管壁之塗覆.....	13
1.1.2.2 偵測系統.....	14
1.1.3 毛細管電泳之應用.....	16

1.1.3.1	毛細管凝膠電泳之 DNA 相關應用 .....	17
1.1.3.2	基因突變之偵測 .....	19
1.2	微小核糖核酸( microRNA, miRNA ) .....	22
1.2.1	緒論 .....	22
1.2.2	microRNA .....	24
1.2.2.1	microRNA 的發現 .....	24
1.2.2.2	microRNA 的生成與作用 .....	25
1.2.3	Epstein-Barr 病毒 .....	27
1.2.3.1	Epstein-Barr 病毒所編碼的 microRNA .....	27
1.3	研究動機與目的 .....	29
1.4	參考文獻 .....	30
第二章	毛細管電泳於鼻咽癌細胞中檢測微小核糖核酸 .....	38
2.1	序論 .....	38
2.2	實驗部分 .....	41
2.2.1	儀器裝置 .....	41
2.2.1.1	聚合酶連鎖反應程式加熱器 .....	41
2.2.1.2	雷射誘發螢光偵測系統 .....	42
2.2.1.3	變性電泳系統 .....	44
2.2.2	實驗試藥 .....	44



2.2.3 細胞培養( cell culture )及 RNA 萃取( RNA extraction )	46
2.2.4 雜合反應( Hybridization )及夾板式結合反應( Splinted Ligation )	46
2.2.5 聚合物溶液的製備	47
2.2.6 毛細管前處理	49
2.2.7 樣品純化	49
2.2.8 實驗流程	50
2.3 結果與討論	52
2.3.1 設計夾板式結合反應之原理	52
2.3.2 樣品製備對螢光強度之影響	56
2.3.3 由 EB 病毒感染之鼻咽癌細胞中鑑定 miRNAs	59
2.4 結論	65
2.5 未來展望	66
2.6 參考文獻	67
第三章 以毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光同時偵測成對樣品中特 定微小核糖核酸	69
3.1 序論	69
3.2 實驗部分	74
3.2.1 實驗儀器	74

3.2.1.1	真空濃縮機.....	74
3.2.1.2	聚合酶連鎖反應加熱器.....	74
3.2.2	鏡片選擇.....	75
3.2.3	雙波長雷射誘發螢光偵測系統.....	75
3.2.3.1	雷射光源與螢光染料.....	75
3.2.3.2	偵測系統.....	76
3.2.4	變性電泳系統.....	77
3.2.5	實驗試藥.....	77
3.2.6	細胞培養( cell culture )及 RNA 萃取( RNA extraction )	79
3.2.7	樣品濃縮.....	79
3.2.8	雜合反應( Hybridization )及夾板式結合反應( Splinted Ligation ).....	79
3.2.9	聚合物溶液的製備.....	80
3.2.10	毛細管前處理.....	80
3.2.11	樣品純化.....	80
3.2.12	實驗流程.....	80
3.3	結果與討論.....	82
3.3.1	雙波長雷射之偵測特性.....	82
3.3.2	樣品濃縮對螢光強度的影響.....	85

3.3.3 樣品濃縮對解析度的影響.....	86
3.3.4 樣品製備對螢光強度之影響.....	88
3.3.5 樣品濃縮對定量真實細胞的影響.....	89
3.4 結論.....	95
3.5 未來展望.....	95
3.6 參考文獻.....	97

## 圖目錄

圖 1-1 電雙層的結構及 $\zeta$ 電位 .....	8
圖 1-2 電滲流與層流之比較圖 .....	9
圖 1-3 沒有電滲流的情況下，利用毛細管凝膠電泳分離 DNA 片段之示意圖 .....	15
圖 2-1 毛細管電泳暨雷射誘發螢光裝置圖 .....	43
圖 2-2 雜合反應與結合反應之加溫流程圖 .....	48
圖 2-3 毛細管電泳搭配夾板式結合反應之實驗流程圖 .....	53
圖 2-4 夾板式結合反應的可行性 .....	55
圖 2-5 酒精濃度對 5 個 BART DNAs 螢光訊號的影響 .....	58
圖 2-6 5 個 BART DNAs 之線性範圍 .....	60
圖 2-7 BART9 螢光強度對濃度之檢量曲線 .....	61
圖 2-8 真實樣品: HK1 與 C6661 ( 感染 EBV ) .....	62
圖 2-9 驗證 isomiRs 的存在 .....	64
圖 3-1 毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光裝置圖 .....	78
圖 3-2 雙波長雷射偵測兩種螢光探針之電泳圖 .....	83
圖 3-3 兩種螢光探針之螢光強度對濃度作圖 .....	84
圖 3-4 雙波長雷射同時檢測 2 個 BART DNAs 之電泳圖( 濃縮 10 倍 ) .....	87

圖 3-5 BART9 與 BART7 DNAs 之螢光強度對濃度作圖 .....	90
圖 3-6 螢光探針之結構 .....	91
圖 3-7 真實樣品: 1x HK1-EBV 與 10x HK1-EBV .....	93

# 表目錄

表 2-1 實驗所用之核苷酸 .....	45
----------------------	----

# 第一章 毛細管電泳及微小核糖核酸之簡介

## 1.1 毛細管電泳序論

電泳( electrophoresis )為溶液中帶有電荷的物質，施予一電場的同時，會因庫倫力的作用而產生遷移的現象<sup>[1]</sup>，利用此原理可以使不同荷質比的電荷粒子有遷移速度的差異而進行分離，稱之為電泳分離。

其實電泳這個名詞早在 1909 年就被 Michaelis 所提出<sup>[2]</sup>，一直到 1937 年才由 Tiselius 以實驗結果證實<sup>[3]</sup>，電泳技術能成功地從血漿蛋白中分離出白蛋白及  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三大類不同的球蛋白，使電泳技術有了突破性的發展，在短短十年間即獲得諾貝爾化學獎的肯定，這意味著，電泳的天下將來臨了嗎？其實不然，由於早期電泳分析是在自由溶液中進行，受到高電場的影響下，會產生熱電流及熱擴散(即焦耳熱)對分離的解析度造成影響<sup>[4]</sup>，所以爾後的科學家們試著用流動性較差的凝膠作為篩分( sieving )樣品的主要介質，發現其原理是依據分子大小進行分離的，適用於分析分子量較大的分析物如：蛋白質、胜肽、DNA 等。然而製備凝膠過程相當繁瑣，而且散熱效果不佳導致電場大小有所侷限，以致於分析時間過於冗長，這些問題一直到 1967 年 Hjérten 以內徑 1 ~ 3 mm 的玻璃管柱作為自由溶液的區帶電泳實驗才漸漸的露出曙光<sup>[5]</sup>。由於當時技術僅能使用毫米級孔徑之毛細管，加上 Hjérten 利用毛細管以旋繞縱軸的方式，已大大的降低熱對流的影響。很快的在 1974

年 Virtanen 以相同的方法<sup>[6]</sup>，將毛細管內徑縮小至 0.2 ~ 0.5 mm 的玻璃管柱，並在十分鐘內成功分離十六種陰離子，至此小孔徑管柱內進行電泳分析才正式翻開了序幕。

然而，當時毛細管電泳仍礙於實驗的靈敏度不足及焦耳熱的影響而無法達到快速、高靈敏度和自動化分離等多項優點，這也是為什麼電泳未能成為當時主流的分析工具。一直到 1981 年，Jorgenson 和 Lukacs 等人利用內徑 75  $\mu\text{m}$  的石英毛細管柱分離衍生化的氨基酸<sup>[7-9]</sup>，並成功的應用螢光系統完成線上偵測，此方法不但有效的提高靈敏度，同時縮小毛細管之內徑，達到表面積比體積的值變大，同樣的散熱效果變好，而分離時間亦大幅縮短，其理論板數可達數十萬，甚至數百萬以上。成功的解決熱擴散及熱對流的問題，使得科學家們前仆後繼的投入電泳的研究，亦因此造就日後數以萬計以毛細管電泳為基礎的相關研究。

到目前為止，毛細管電泳技術大致可分為六大類：毛細管區帶電泳( capillary zone electrophoresis, CZE )<sup>[10]</sup>、毛細管等電聚焦法( capillary isoelectric focusing, CIEF )<sup>[11]</sup>、毛細管等速電泳法( capillary isotachopheresis, CITP )<sup>[12]</sup>、毛細管凝膠電泳法( capillary gel electrophoresis, CGE )<sup>[13]</sup>、毛細管電層析法( capillary electrochromatography, CEC )<sup>[14]</sup>以及利用微胞能將中性粒子分離的微胞



電動力層析法( micellar electrokinetic chromatography, MEKC )<sup>[15]</sup>。隨著微蝕刻的興起，有科學家把電泳的技術應用於微晶片上，以蝕刻的方式在微晶片上形成微小的通道( channel )<sup>[16],[17]</sup>，與傳統的毛細管電泳比較，微晶片電泳具有較短的分析時間、樣品消耗少、多通道設計及高通量等優點，已逐漸朝單一晶片上即能完成樣品前處理、分離及偵測等期許所邁進，亦即 lab-on-a-chip<sup>[18]</sup>。

近年來，毛細管電泳儼然成為一種分析時間短、樣品進量少、解析度高、易於自動化及高通量( high throughput )的分析工具，適用於分離各種有機分子、無機離子、帶電分子及電中性分子，甚至在生物領域中皆占有一席之地。在日新月異的時代裡，對於時間、經濟及通量特別苛求的生技產業，毛細管電泳無疑的對生技發展注入了一劑強心針，在分析雙股 DNA、單股 DNA 及 PCR 產物上均有不錯的成果<sup>[19]</sup>。早期生化分析以平板凝膠電泳( slab gel electrophoresis )為主<sup>[20]</sup>，但因其分離耗時、製備繁瑣、解析度不足等缺點，而後發展成毛細管凝膠電泳，不但改善了以上之缺點，且多重性設計及自動化等優點，均對於快速篩選大量的生物資訊具有相當的潛力<sup>[21]</sup>。傳統的平板凝膠電泳，都以交聯性的聚丙烯醯胺( crosslinked polyacryamide, CPA )<sup>[22]</sup>作為主要的介質，直到毛細管凝膠電泳發展成熟時才漸漸沒落。主要因 CPA 黏度太高，很難以壓力的方式將之填充於毛細管內，所以需要在毛細管

內作聚合反應，然而毛細管內徑過小，常會產生凝膠體積變化、熱效應、氣泡等麻煩，導致製備過程困難，重點是無法確保每次聚合的再現性，以至於實驗結果不佳。有鑑於此，發展可替代的凝膠或聚合物溶液為 CGE 更重要的一個目標。

1989 年, Zhu 及 Colbum 分別以非交聯性的線性聚合物作為篩分的主要介質，成功的分離 DNA 片段<sup>[23,24]</sup>。直到現今，CGE 仍廣泛的應用在分析生物樣品上，就是因為克服了交聯性聚合物的黏度太高，而線性聚合物可以先在毛細管外作聚合，再以高壓將聚合物注入毛細管內，不但改善了實驗的再現性還大大的降低毛細管在經濟上的耗損。所以目前 CGE 實驗都以線性聚合物為主流，常見於文獻有線性聚丙烯醯胺 (linear polyacryamide, LPA)<sup>[25,26]</sup>、聚環氧乙烷 (poly [ethylene oxide], PEO)<sup>[27,28]</sup>，瓊酯膠 (agarose)<sup>[29]</sup>、各種纖維素 (cellulose) 衍生物<sup>[30-32]</sup>、聚乙醇醇 (polyvinyl alcohol)<sup>[33]</sup> 等。

### 1.1.1 毛細管凝膠電泳分離原理

#### 1.1.1.1 淌度 (mobility)

在施予一外加電場下，帶電粒子會受到庫倫力的影響而產生加速運動<sup>[34]</sup>，其大小正比於它的有效電荷 (q) 及電場強度 (E)。而運動的過程中，粒子移動時會與介質碰撞產生摩擦力 (f)，導致移動速度變慢，

此摩擦力皆正比於粒子的遷移速度(  $v$  )、半徑(  $r$  )及介質的黏滯係數(  $\eta$  )。綜合以上訊息，可以簡單的定義電泳淌度(  $\mu_{ep}$  )為單位電場下粒子的遷移速度，即：

$$\mu_{ep} = \frac{v}{E} \quad (1.1)$$

而影響淌度的兩個主要因素為庫倫力與摩擦力，其庫倫力會因帶電粒子加速到某定程度恰好與摩擦力平衡，使得帶電粒子不再加速而以等速運動，則庫倫力( $F$ )可表示為：

$$F = qE \quad (1.2)$$

其中  $q$  為粒子帶電量、 $E$  為電場強度。若由 Stokes 定律中得知，當粒子假設為球型剛體，則摩擦力( $f$ )可表示成：

$$f = f_v = 6\pi\eta rv \quad (1.3)$$

$f$  為該球體之動摩擦係數， $\eta$  是介質溶液的黏度， $r$  是粒子半徑， $v$  是粒子遷移速度。當帶電粒子到達等速度的狀態時，因庫倫力( $F$ )等於摩擦力( $f$ )，所以結合方程式(1.2)和(1.3)可得：

$$F = qE = 6\pi\eta rv \quad (1.4)$$

亦為

$$v = \frac{qE}{6\pi\eta r} \quad (1.5)$$

由方程式(1.1)代入上式可得：

$$\mu_{ep} = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1.6)$$

由式(1.6)中可以清楚的看到物種分離是取決於粒子的電荷及半徑大小有關。

### 1.1.1.2 電滲流( electroosmotic flow, EOF )的產生

電滲流為電泳中的一種驅動力。在十八世紀後期 Helmholtz 等人，在一電場下以含有電解質溶液的水平玻璃管分離陰陽離子及中性分子，證實了電滲流的存在<sup>[35]</sup>，其原理為毛細管內壁由矽醇所組成，在較高 pH 值的情況下，很容易造成毛細管內壁的質子解離到體相溶液( bulk solution )，而使得管壁遍佈帶有負電荷的 Si-O<sup>-</sup>。這層負電荷會吸引溶液中的對離子( counter ion )而形成電雙層( electrical double layer )。由圖 1-1 所示，在電雙層的結構中，被 Si-O<sup>-</sup>吸引住的對離子為固定層( stern layer )，而在固定層之外則為擴散層( diffuse layer )。由於溶液中的陽離子皆往管壁附著，使得電雙層至體相溶液間會產生一個電位，稱之為 zeta 電位。當陽離子逐漸吸附於管壁時，基於電中性的原理，大部分的陽離子停留在擴散層中，此時受到外加電場的作用下，陽離子會因庫倫力的吸引往負極移動，並同時帶動體相溶液，此即為電滲流的生成。電滲流大小亦可用淌度表示為：

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} \quad (1.7)$$

其中  $\varepsilon$  為溶液的介電常數， $\zeta$  為 zeta 電位， $\eta$  為溶液的黏度。Zeta 電位的生成是由於溶液中固定層到擴散層中的電荷並非均相分佈，所以會形成一電位差。電滲流的大小正比於 zeta 電位，並和溶液的黏度成反比，而決定 zeta 電位大小的因素為毛細管壁上電荷的多寡，當毛細管壁上的質子解離的越多時，則有越多的負電荷可以吸引溶液中的陽離子，使得電雙層變厚，zeta 電位因此增加，電滲透流也隨之變快。溶液中有許多因素會影響 zeta 電位的大小，其中溶液的 pH 值越高時，毛細管壁質子解離的越完全，所以當 pH 值大於 4 時，可觀察到明顯的電滲透流。另外溶液中所含的離子強度也是影響因素之一，當離子強度增加時，使得吸附在毛細管壁的陽離子與溶液中陽離子數量相近，導致電雙層變密，zeta 電位變小，電滲透流也隨之下降。此外改變溫度或將毛細管的表面改質亦能改變電滲透流之大小<sup>[36]</sup>。

由於電滲透的移動不同於以往的管柱層析法，並沒有在管壁形成額外的壓力，因此毛細管內每一處的流速幾乎都相同，其形狀趨於一平面，如圖 1-2 所示。若以幫浦產生的壓力為驅動，則會因溶液與管壁間的摩擦力和剪切力的影響而產生層流(laminar flow)，液面形狀像一拋物狀。層流會使樣品區帶分散，造成解析度下降，而電滲流對區帶變寬的影響不顯著，因此毛細管電泳的理論板數常可高達百萬以上。

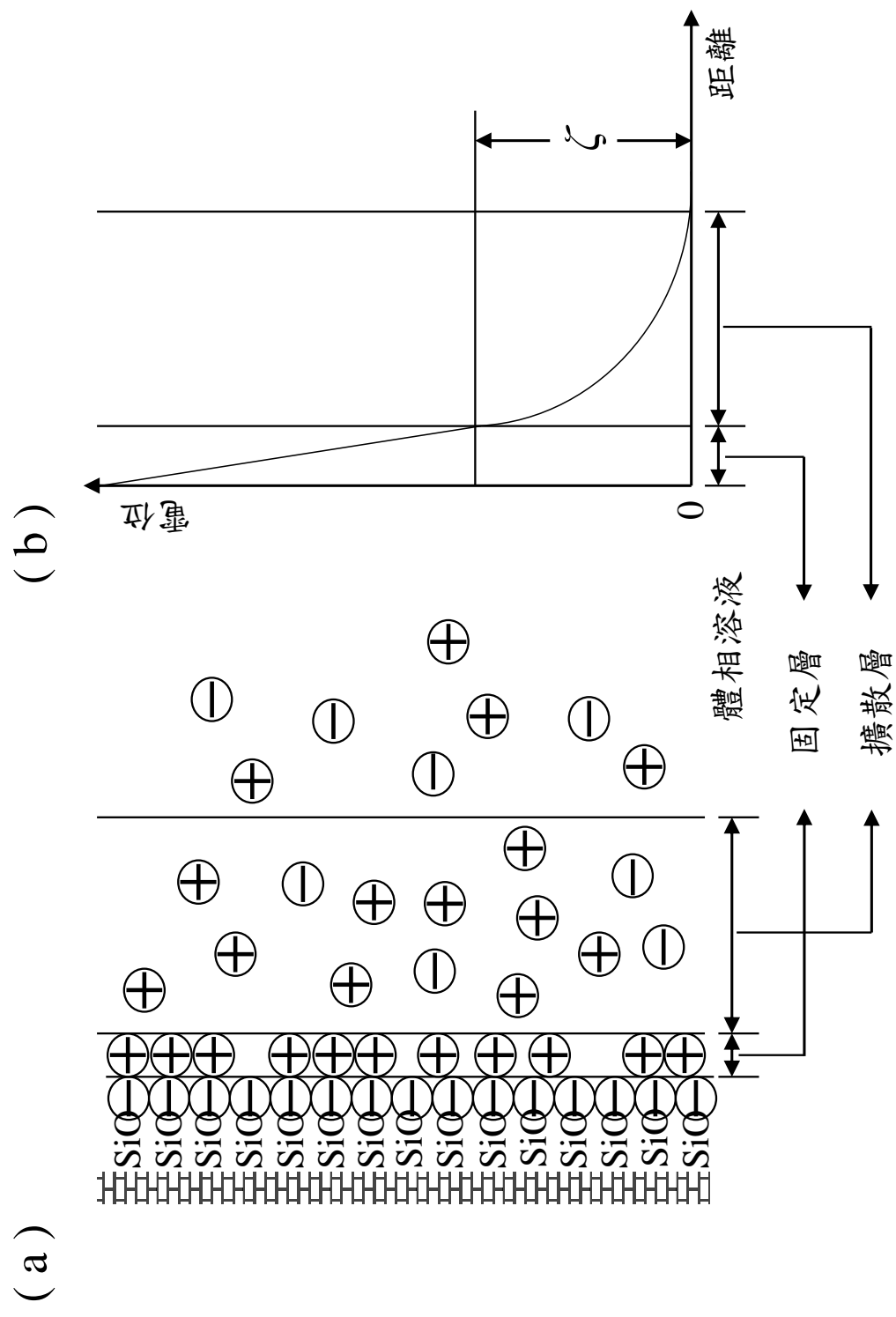


圖1-1 (a) 電雙層的結構及 (b)  $\zeta$  電位

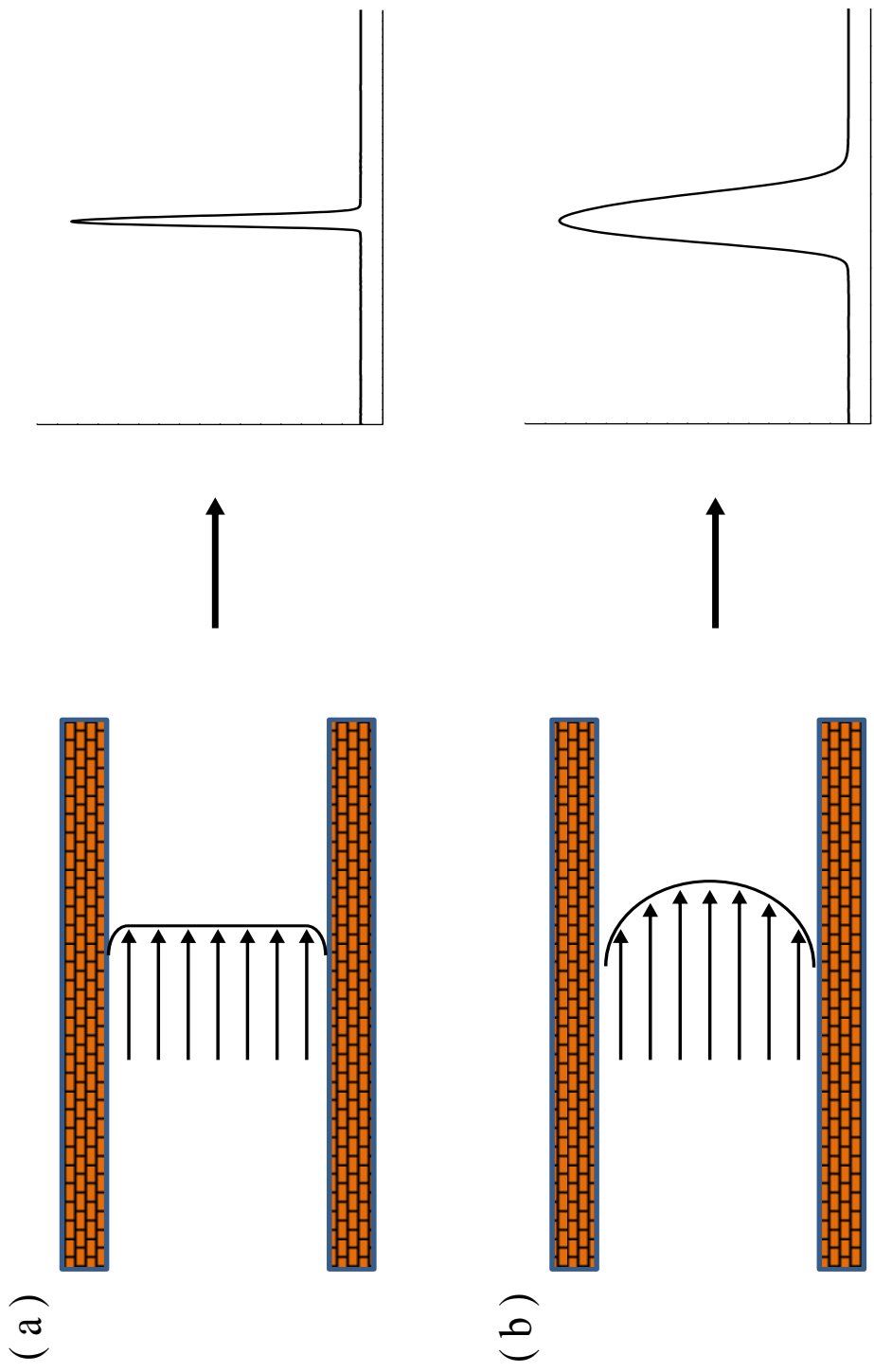


圖1-2 (a) 電滲流與 (b) 層流之比較圖

雖說電滲透流是 CE 特有的移動方式，但一般以毛細管凝膠電泳進行生物分子如蛋白質或 DNA 的分析時，因為許多的生物分子極容易吸附在毛細管壁上，因此在分析前通常會先塗佈一層聚合物在毛細管表面上，以減少生物分子的吸附<sup>[37],[38]</sup>，但塗佈的同時亦會使 zeta 電位消失，所以分析生物樣品時通常是在電滲透流很小的情況下進行的，此時生物分子幾乎因本身所帶的電荷受電場吸引而移動。

### 1.1.1.3 DNA 於毛細管凝膠電泳之分離機制

利用毛細管凝膠電泳分離 DNA 可以獲得很高的解析度，其中影響分離的實驗參數有：分離電壓、溫度、進樣、毛細管表面、及凝膠介質等，而偵測一般都以 UV-Vis 吸收或是雷射誘發螢光的方式為主流。以偵測 DNA 分子而言在自由溶液中會以隨機盤繞的形式存在，受到電場的影響因而展開成長鏈狀，使得 DNA 的每個部分都會接觸到溶液，所以其摩擦力與 DNA 分子中鹼基對( base pair )之數目( N )成正比，即：

$$f \propto N \quad (1.8)$$

又以磷酸根之負電荷( Q )表示，亦會與鹼基對數目成正比：

$$Q \propto N \quad (1.9)$$

所以 DNA 在自由溶液中之淌度為一定值<sup>[39]</sup>：



$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{f} \propto \frac{N}{N} = \text{constant} \quad (2.1)$$

故理論上 DNA 無法於自由溶液的系統中進行分離。因此就現階段發展的技術而言，DNA 分離皆著墨於凝膠的選擇，其利用凝膠網狀結構的特性對 DNA 進行篩分，使不同長度的 DNA 分子藉由通過網狀構造之難易度而得到不同的淌度。由於聚合物是以單體的形式存在，當濃度增加至一定程度時，分子間碰撞機率上升，則會開始形成網狀結構，而網狀孔隙的大小就是依據聚合物的濃度超過糾結界限( entangled limit )所形成的。糾結界限的定義為假設每個聚合物分子的體積都一樣的情況下，所有聚合物佔有的總體積與溶液體積相同時的濃度。可以表示為：

$$\phi^* = 3M_w / 4\pi N_A R_g^3 \quad (2.2)$$

或

$$\phi^* \propto N^{-0.8} \quad (2.3)$$

其中  $\phi^*$  為糾結界限， $M_w$  為聚合物分子量， $N_A$  為亞佛加厥數， $R_g$  為聚合物分子的迴旋半徑( radius of gyration )， $N$  為聚合物分子所含的單體數目。又聚合物是以平均分子量表示，故不為一定值，因此為了得知糾結界限必須以實驗的方式<sup>[40]</sup>，在不同濃度下量測聚合物的黏度，並且找出濃度對黏度的線性關係圖。當聚合物濃度高於糾結界限時，聚合物鏈段間會有較強的作用力而形成網狀結構，並且可利用其孔隙

( mesh )來篩分分析物達到分離的效果，而孔隙的大小則和聚合物的濃度有關係，並可以下式表示：

$$\xi = R_g(C / \phi^*)^{-0.75} \quad (2.4)$$

$$\xi \propto a \phi^{*0.75} \quad (2.5)$$

$\xi$  為孔隙大小， $C$  為聚合物濃度， $a$  為常數<sup>[41]</sup>。由式(2.5)可知聚合物單體的濃度越高形成的孔隙就越小。

當前的實驗及理論知識都僅能幫助我們瞭解 DNA 在聚合物溶液中分離的現象，而早期則以 Ogston 模型( Ogston model )<sup>[42]</sup>及爬行模型( reptation model )<sup>[43]</sup>兩種模型解釋 DNA 的分離機制。其中 Ogston 適合用來解釋小的 DNA 分子( < 300bp )遷移，但須假設 DNA 分子為剛性球體，且利用小分子能夠通過較大孔隙的聚合物之理論，使得小分子 DNA 可以很快的從介質中篩分出來，則大分子不行，因此 DNA 之淌度可表示成：

$$\mu = \mu^* P \quad (2.6)$$

$\mu^*$  為 DNA 在自由溶液中的淌度， $P$  為 DNA 分子小於孔隙的機率。 $P$  則可表示為：

$$P = \exp[-KC(r+R_g)^2] \quad (2.7)$$

$K$  為比例常數，為聚合物濃度， $r$  是聚合物分子鏈厚度， $R_g$  則是將 DNA 分子視為剛性球體時的半徑。結合上述兩式，DNA 之淌度可改寫成：

$$\mu = \mu^* \exp[-KC(r+R_g)^2] \quad (2.8)$$

相反的，對於大分子 DNA 而言，就適用於爬行模式說明之。當 DNA 剛性球體的直徑超過了聚合物孔隙的有效大小時，DNA 會隨機展開成長鏈分子的形式存在，並以蛇行的方式通過聚合物，此時 DNA 的淌度會與分子量成反比：

$$\mu = \frac{1}{N} \quad (2.9)$$

以上兩種模式都是建立於平板凝膠電泳上，但是在毛細管電泳的高電場下，就必須再考慮電場對 DNA 構形的改變，因此若要深入探討 DNA 分子於毛細管凝膠電泳中的分離機制，則必須藉助影響顯微鏡 (Video-microscopy<sup>[44]</sup>)，以實際的實驗數據來觀測並提出更有力推論。目前已有學者們投入畢生的心血去研究膠體相關之力學，詳細的分離機制則有待日後以更精確的儀器及電腦模擬分析才能有確切的理論出現。

## 1.1.2 毛細管

### 1.1.2.1 毛細管壁之塗覆

在蛋白質或 DNA 分析中，往往都會受到毛細管壁的負電荷影響，導致帶正電荷的分析物吸附於管壁上，嚴重地影響分離的解析度，尤其是在分離大片段的 DNA 上。過去常用來抑制 EOF 及防止吸附的方

法有：添加低 pH 值、高離子強度、表面活性劑<sup>[45]</sup>、或有機溶劑<sup>[46]</sup>到背景電解液裡，藉此改變毛細管的性質，然而這些方法都不適用於分離 DNA。直到 Cohen 等人將聚合物溶液送入毛細管內<sup>[47]</sup>，使其塗覆於管壁之上才大大的改善 DNA 吸附於毛細管壁的情形。過程如圖 1-3 所示，實驗室都先以 5% 的聚乙烯吡咯烷酮( poly [ vinylpyrrolidone ], PVP )對毛細管內進行第一層的動力學塗覆( dynamic coating )一天，之後再以 0.1% 的聚環氧乙烷( poly [ ethylene oxide ], PEO )塗覆第二層使 DNA 分子幾乎在沒有 EOF 的情況下，引入適合的聚合物來分離 DNA 樣品，因此小片段的 DNA 會因淌度比較大的關係，最先被偵測到。

### 1.1.2.2 偵測系統

過去利用液體做為動相的層析方法搭配螢光偵測系統<sup>[48]</sup>，已經成功的提升分析的靈敏度。因此應用在毛細管電泳上再以雷射作為激發光源而產生螢光，我們稱之為雷射誘發螢光( laser-induced fluorescence, LIF )，而此種系統已有相關的文獻被報導出可以用來偵測單分子或單細胞等優點<sup>[49,50]</sup>，使得 DNA 定序有了更快速的發展，這對後來的人類基因體計畫有了莫大的幫助，亦在臨床醫學分析上打開了新的一扇窗。

首先選擇適合的雷射波長為優先，一般都以價格低廉的氬離子

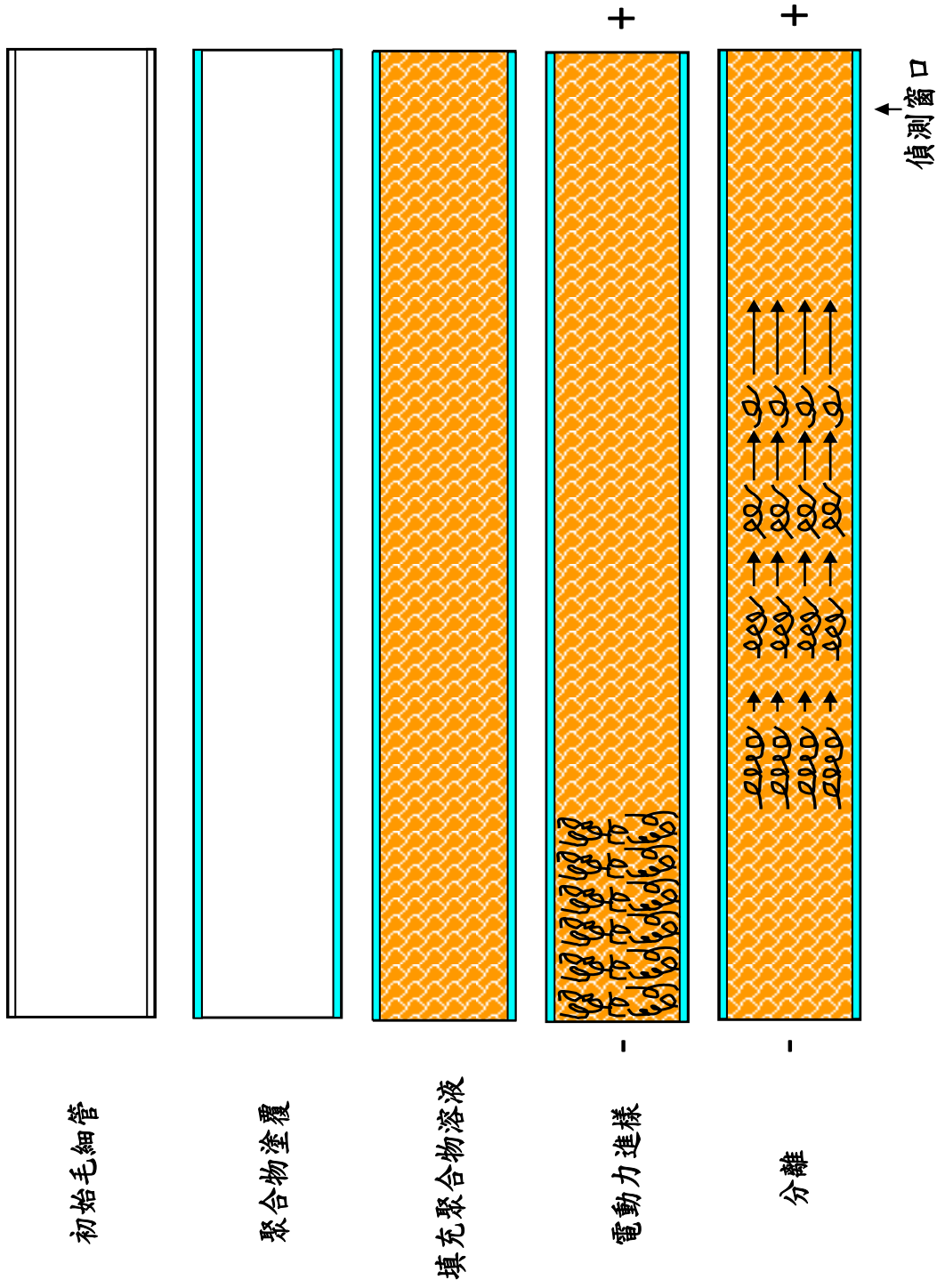


圖1-3 沒有電滲流的情況下，利用毛细管凝膠電泳分離DNA片段之示意圖

(Ar-ion)與氦氖(He-Ne)雷射作為 CE 的光源，最近固態(solid-state)雷射與紅寶石(Nd:YAG)亦相繼應用於 CE 上<sup>[51-55]</sup>。為了增加 CE-LIF 的廣泛性，都會在分析時將 DNA 分子接上螢光物質或是把螢光染料加入於自由溶液中快速與 DNA 鉗合<sup>[56]</sup>，再利用凝膠介質或線性高分子溶液進行 DNA 分子的篩分，如今已能夠普遍地應用於 DNA 定序、基因突變、以及基因藥劑等的研究。

### 1.1.3 毛細管電泳之應用

毛細管電泳在鑑定生物學中廣泛的被應用於短序列重複(short tandem repeats, STPs)的偵測及分析上<sup>[57,58]</sup>，也因為這些指標與大量的資料庫，使毛細管電泳成為目前生物科技的主流分析工具，而其他相關的應用包括：定量 PCR(polymerase chain reaction)產物<sup>[59]</sup>、Y 染色體及粒線體 DNA 的定序<sup>[60]</sup>、環境 DNA 的分析<sup>[61]</sup>、植物或病毒 DNA 的突變偵測<sup>[62]</sup>等，而結果發現不同個體間 DNA 序列的差異性並不大，幾乎只有單一核苷酸的改變，即單核苷酸多型性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)<sup>[63],[64]</sup>，就目前已知 SNPs 可能與疾病的表現有關聯性，在突變的反應機制中扮演相當重要的角色，而如何找出個體間 DNA 序列的微小差異就成為了人類日後共同的研究目標。

### 1.1.3.1 毛細管凝膠電泳之 DNA 相關應用

STRs 為分析 DNA 中最常見的方法之一，在檢測人類身分及辨別兩種或以上不同的個體差異都具有很高的可信度，其結果發現人體基因中估計超過有 100000 種 STRs 的位點存在，至今仍持續研究這些位點所扮演的確切功能，目前已有 13 種商業化的 STRs 指標被應用來鑑定 DNA 的分析。而公認可信度最高的 DNA 檢測方法則莫過於 DNA 定序(sequencing)，其定序原理是利用聚合酶連鎖反應衍生而來的，目前則以 Sanger 法為基礎的定序分析儀較為常見。其組成物包含了具有專一性的引子、DNA、聚合酶、dNTP 及 ddNTP，與一般 PCR 不同的地方在多添加了 ddNTP，當反應進行時，聚合酶會以互補的方式將 dNTP 與 ddNTP 排列組合，一但接上 ddNTP，則因 ddNTP 比 dNTP 少了一個氧原子，所以就不能再接下一個 dNTP 上的磷酸根，反應即告終止。例如：一試管中包含了 ddATP 及 dNTP，則當聚合酶反應至 template DNA 序列中的鹼基 T 時，ddATP 會與其以氫鍵接合並且停止聚合反應，所以 template DNA 含有多少個 T，則此試管中就會有幾個不同長度的 DNA 片段，再利用平板凝膠電泳平行分離 4 個試管中的 PCR 產物，即可依照片段大小定出 template DNA 的序列，然而每做一次定序就必須分成 4 管進行，不僅浪費時間亦消耗成本。因此將毛細管凝膠電泳應用於基因定序上即相繼誕生，其特點只需在一試管中進

行聚合酶連鎖反應，將引子標幟上 4 種不同波長的螢光染料，再利用分光裝置將螢光訊號分至 4 個偵測器<sup>[65]</sup>，最後利用軟體分析獲得數據。坊間早有自動化的毛細管陣列電泳問世，基於毛細管本身即具有快速、解析度高、易於自動化、高通量等優點，基因體計畫更是因此而提前完成。目前分析化學之趨勢正朝著微小化與高靈敏度的目標邁進<sup>[66]</sup>，這期間亦有不少與 DNA 分析相關的文獻問世，在基礎研究方面：Fogarty 等人利用共焦螢光光譜儀來偵測單股 DNA 5'-R6G-polyT<sub>40</sub><sup>[67]</sup>，藉由電場強度的改變與鎂離子濃度增加對 DNA 分子結構的變化，因而反映在擴散常數及影響電荷上；分離及定序方面：Wan 等人<sup>[68]</sup>，則是利用共聚合物作為分離 DNA 的篩分介質，能在室溫下形成穩定的網狀結構使溶液更易於進樣，並成功的在共聚合物所形成的 2-D 六角網狀晶格中分離雙股 DNA，達到快速、高解析、再現性佳等多項優點。Meagher 等人使用 end-labeled free solution electrophoresis ( ELFSE ) 以 127 個胺基酸組成的蛋白質聚合物<sup>[69]</sup>，成功的完成 180 個鹼基的定序；最後偵測及定量方面：Jiang 和 Ma 以修飾過的核苷作為癌症篩選的指標<sup>[70]</sup>，成功的在十分鐘內利用毛細管電泳分離 10 種核苷，其 LOD 至少 2  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ，線性範圍為 5 ~ 500  $\mu\text{mol} / \text{L}$ 。Wang 等人則以 DNA 甲基化的程度進行 digestion 或 bisulfate 的轉變<sup>[71]</sup>，在沒有經過 PCR 的情況下最低可以被偵測到 0.3 nmol / L，其線性範圍在 10 nmol / L ~ 10



$\mu\text{ mol / L}$ 。

### 1.1.3.2 基因突變之偵測

基因突變在分子生物、藥物及基因等領域已發現與人類的疾病有密切的關聯性，其中 DNA 定序法在眾多檢測基因突變的方法中是最精確、且最令人信服的，因此 DNA 定序又被視為黃金級的標準實驗( gold standard )<sup>[72]</sup>。因此發展快速、精確及經濟的突變篩檢方法於一般醫療院所進行初步的診斷，就成為現今最熱門的研究主題之一。

分析基因突變的方法中，依照實驗目的、功能，一般可分為篩檢及偵測兩大類。篩檢法是指當我們檢測未知突變的 DNA 序列時所適用的方法，然而此方法無法清楚的告知我們是否有突變的情況發生，但是它具有經濟、快速等優點，非常適用於大規模 SNPs 的檢測。除了上述的 DNA 定序法之外，亦有單股構型多型性( single-strand conformation poly morphism, SSCP )<sup>[73-75]</sup>、異股多型性檢測( heteroduplex-polymorphism assay, HPA )<sup>[76]</sup>、溫度梯度毛細管電泳( temperature-gradient capillary electrophoresis, TGCE )<sup>[77,78]</sup>及錯位酵素切割( enzymatic cleavage of mismatches, EMC )<sup>[79]</sup>等方法可以來篩選 DNA 是否突變。其中 SSCP 可以將 PCR 產物放在 94°C 下 5 分鐘使其變性後，迅速置於冰水中將其冷卻而形成單股 DNA 並於 4°C 的電泳環

境下進行單股 DNA 的分離。若有突變發生，則形成的單股 DNA 之構形會產生改變而影響其在電泳時的淌度，藉此比對正常 DNA 之電泳圖，就可以得知 DNA 是否有鹼基取代( substitution )發生。HPA 同樣也經過 PCR 放大之後的 DNA，會因同股與異股之間的構形不同，以及 GC 鹼基數量的差異，導致電泳分離時有不同的淌度，適用於檢測大片段的 DNA 突變。而 HPA 經過加熱變性後，即所謂的 TGCE，在緩慢降溫時，同樣的正常型會和突變型發生雜交形成 heteroduplex，因為 heteroduplex 之鹼基並非完全互補，所以當其在 TGCE 中進行分離時，會因為熔點溫度( melting temperature,  $T_m$  )的不同使其在相異的溫度下打開雙股 DNA 造成淌度的改變進而達到分離的目的，適用於 SNPs 的篩檢。目前以 SSCP 作為基因突變篩檢法較為常見，除了篩檢 SNPs 之外，亦有學者將 CE-SSCP 應用於鑑定綠膿桿菌( *Pseudomonas aeruginosa* )的 16S rRNA 基因<sup>[80]</sup>、血型偵測<sup>[81]</sup>及家族性高膽固醇血症<sup>[82]</sup>。

另外偵測已知點突變的技術包括有：DNA 定序法、對偶基因特定寡核苷酸雜交法( allele-specific oligonucleotide hybridization )<sup>[83]</sup>、接合酶連鎖反應( ligation chain reaction )<sup>[84]</sup>、單核苷酸引子延伸( single-nucleotide primer extension )<sup>[85]</sup>、聚合酶連鎖反應-限制片段長度多型性( polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism ,PCR-RFLP )<sup>[86]</sup>等相關技術。又以對偶基因特定寡核苷酸

雜交法最廣泛的被應用於微陣列晶片上，使其可同時點上許多寡核苷酸進行 DNA 雜交反應進而偵測較多種類的基因突變，但因微矩陣晶片製作困難而且判讀不易，亦未能普及於一般臨床實驗室。此外 PCR-RFLP 的優勢在於靈敏度高及專一性佳，所以目前台灣有很多分子生物實驗室都是利用這種方法檢測基因突變。此法會先用一特定的引子進行聚合酶連鎖反應後，再利用限制酶( restriction enzymes )的專一性，切割特定的 DNA 序列，使其長度異於無法被切割的 DNA 後，再於凝膠電泳上分離、鑑定之<sup>[87],[88]</sup>。然而上述的分析方法不是受限於試劑昂貴，就是製備過程繁瑣，雖有較高的靈敏度，但實際上並不適用於大規模的篩檢。有鑑於此針對上述的缺點加以改善，發展精確、快速、低成本的臨床檢測技術，則是現今許多科學家共同研究的目標。

## 1.2 微小核糖核酸( microRNA, miRNA )

### 1.2.1 緒論

微小核糖核酸在調控基因表現上扮演相當重要的角色，其與疾病的發展亦有密切的關聯性<sup>[89]</sup>。因此，發展有效的工具來偵測 miRNAs，進而研究細胞程序的控制與疾病的預防即成為熱門的研究話題之一<sup>[90]</sup>。那過去對於基因表現的中心教條為去氧核糖核酸( DNA )轉錄為訊息核糖核酸( mRNA )，接著轉譯成蛋白質( protein )，因此 mRNA 的表現似乎就理所當然代表蛋白質的表現。但隨著分子生物技術的發展，近幾年已證實基因體的 RNA 產物中，其實存在更多其他的訊息<sup>[91]</sup>，如 DNA 轉錄成 RNA 卻不會轉譯成 protein 的 RNA 序列，我們稱作非轉譯核糖核酸( noncoding RNA )。目前發現的 noncoding RNA 有 microRNA、small interference RNA( 小片段干擾 RNA )、small nucleolar RNA( 小核仁 RNA )、antisense RNA ( 反義 RNA )，我們都統稱為 RNA 干擾，其重要性為調控 mRNA 來達到個體發育、細胞分化、細胞增生、細胞死亡、激素分泌、腫瘤形成、及致死基因的表現<sup>[92]</sup>。

這幾年內，隨著 miRNAs 的生物意義日趨明朗，如何精確地偵測 miRNAs 就顯得格外重要。一般而言，生物醫學實驗室若要偵測 miRNA 當屬北方墨點法( Northern blot )較易進行。主要是因為以凝膠電泳為基礎的技術對生物研究人員比較沒有儀器或技術方面的技術門檻。然而，

由於輻射線的危險性、不容易自動化及定量準度等問題<sup>[93]</sup>，使得科學家們若有其他選擇就不見得會選擇 Northern blot 當作分析工具。此外，因為不同實驗室量化數據間的互相比較、參考至為重要，所以，數值的標準化同樣是實驗工作者的一大考量。近年來，miRNA 相關分析技術已經陸續被發表。其中主要以微陣列晶片( microarray )及反轉譯即時定量聚合酶連鎖反應( reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR )為主流。Microarray 的主要優點在於高通量( high-throughput )的特性，亦即同時對上千種的 miRNA 做偵測。最近幾年，亦不斷有針對改良特定問題而設計之 miRNA microarray 而被刊登於國際知名期刊上。其特殊的實驗設計使得實驗的可信度大幅增加，然而其步驟繁瑣、精確性及實驗再現性等問題一直是使用者的疑慮，即使美國食品藥物管理局( FDA )對 microarray 做了一系列相關品質管制的實驗還是同樣讓其他科學家存在許多疑慮<sup>[94],[95]</sup>。RT-qPCR 可說是目前偵測 miRNA 最靈敏的方法之一，知名生技大廠-美商生命應用( Applied Biosystems )亦以 RT-qPCR 為基礎於國際期刊發表了定量 miRNA 的偵測系統<sup>[96]</sup>。然而其試劑價格昂貴導致難以同時對上千種 miRNA 作篩檢，自然也不容易用以檢測臨床上巨量的檢體數。另外，以 PCR 為基礎的方法靈敏度較高是因為聚合酶的放大反應所致，可是就統計分析化學的角度而言，PCR 放大的同時其實驗標準偏差亦相對

地增加<sup>[97]</sup>。因此，設計一個不需酵素放大即可直接精確定量 miRNA 的分析方法是當前所缺少且絕對有必要深入去研發的課題。

## 1.2.2 microRNA

### 1.2.2.1 microRNA 的發現

西元 1990 年 Napoli 等人在矮牽牛花的基因轉染實驗中，意外的發現轉染的程度與內生或外源引入的 chalcone 合成酶基因的訊息 RNA 量有關<sup>[98]</sup>，但對於造成同源基因共同抑制( co-suppression )的現象卻無法詳細的解釋清楚，因而又以轉錄後基因沉默化<sup>[99]</sup>( post-transcriptional gene silencing )來闡述。之後 Cogoni 等人亦在麵包黴菌<sup>[100]</sup>( *Neurospora crassa* )裡發現一樣有共同抑制的現象產生，其結果與上述雷同。到了 1993 年才首次在秀麗隱桿線蟲( *Caenorhabditis elegans* )研究中發現 *lin-4* 基因參予了 *lin-14* mRNA 的基因突變之過程<sup>[101]</sup>，然而 *lin-14* 活性的降低僅反映在蛋白活性上，與其轉錄活性完全無關，這個現象告訴我們可能有一個特殊的副調控機制影響了 *lin-14* mRNAs 的活性。後來證明，這副調控正是由長約 21 個核苷酸的 *lin-4* 非編碼小分子 RNA 與 *lin-14* 的 3 端-UTR( untranslated regions )不完全互補，影響了 *lin-14* mRNAs 的轉譯，並將這些 RNA 名為 microRNA。

2000 年第二個 miRNAs *let-7* 的發現掀起了尋找 miRNAs 的熱潮<sup>[102]</sup>。其中擬南芥、野生稻、線蟲、果蠅、老鼠，甚至人類等各種生物中都

相繼有 miRNAs 被報導。目前已發現的 miRNAs 有 700 多個左右，其中哺乳類動物中就發現超過 600 餘個 miRNAs<sup>[103]</sup>，而其他生物中，又以線蟲的 88 個 miRNAs 為最多<sup>[104]</sup>，其次是擬南芥 16 個<sup>[105]</sup>。這些結果指出 miRNAs 的存在不僅不是稀少，相反，miRNAs 多樣性及作用已日漸被人們所重視，因此在研究前，我們必須了解 miRNA 的生成和作用。

#### 1.2.2.2 microRNA 的生成與作用

miRNA 主要是從染色體的 intron 利用 RNA polymerase II 轉錄出來的，少部分由 exon 產生。基因體轉錄完成後稱為 pri-miRNA( primary miRNA )，長度達數千個鹼基，同樣與 mRNA 一樣在 5 端接有端帽及 3 端 poly A。在細胞核中，pri-miRNA 會與 Microprocessor 中的 Pasha( DGCR8 )結合，然後被屬於 RNase III 的 Drosha 切割成在 3 端 OH 有兩個核甘酸突起的莖環( stem-loop )pre-miRNA( precursor miRNA )，此時的大小約 70 個核苷酸。接著經由 RNA GTP-dependent transporter exportin 5 辨識其莖環 2 級結構後，並將其傳送至細胞質中，使 Dicer 得以繼續將 pre-miRNA 切割成 miRNA duplex。當 miRNA duplex 進入 RISC( RNA-induced silencing complex )，會解旋成單股的成熟 miRNA( mature miRNA )，長度約 19~25 nt，會與 RISC 中心的

Argonaute 蛋白結合，形成非對稱的 RISC 複合物( asymmetric RISC assembly )，具有和目標 mRNA 結合的能力，大部分都作用在目標 mRNA 的 3 端 UTR 上<sup>[106]</sup>，透過與目標 mRNA 部分鹼基完全或不完全互補配對發揮調控作用。只有少部分的 miRNA 被認為可結合在 mRNA 的 ORFs( open reading frames )或 5 端 UTR 上<sup>[107], [108]</sup>。

目前已知，在動物中，成熟的 miRNA 通常會部份互補於其目標 mRNA，而 miRNA 在 5 端數來約 9~12 個核苷酸的位置恰好形成凸起( bulge )的結構，這會導致 Argonaute( Ago )蛋白在切割 mRNA 時會受到結構上的干擾，使得 RISC 結合的 mRNA 只能走向轉譯抑制( translation repression )這條路，而降低蛋白質的表現量。然而在大多數的植物中，miRNA 與其目標 mRNA 幾乎完全互補，使之進入 RNAi 途徑並且引導目標 mRNA 降解而不是轉譯抑制。此外，一般認為 mRNA 3 端 UTR 至少必須與 miRNA 5 端數來第 2~7 個核苷酸( 稱 seed region )完全互補，才會是此 miRNA 的可能目標<sup>[109]</sup>。

雖然 miRNAs 與 mRNA 的結合決定著它作用的主要方面。但是從另一個角度而言，miRNAs 與蛋白的相互作用仍然有著重要的意義存在<sup>[110]</sup>。像是在 miRNAs 發生的過程中，為什麼 Dicer 能夠辨識 pre-miRNA 並且將其切割成為成熟的 miRNAs<sup>[111]</sup>，至今都尚未被完全的釐清。除此之外，近年的研究亦發現單一 miRNA 能夠調控數百個 mRNA<sup>[112]</sup>，



因此一個 miRNA 可能包含在很多生物路徑當中，其中又以癌症為最多，其次是心血管疾病，此外還有一些病毒性的疾病<sup>[113]</sup>。miRNA 也調控神經的發育，包含樹突形態與軸突生長<sup>[114]</sup>，還有研究指出 miRNAs 可能在腦部疾病中扮演極重要的角色<sup>[115]</sup>。除了上述的作用途徑之外，最近亦發現有少數的 miRNA，可藉由與其目標 mRNA 的結合，來活化目標 mRNA 的轉譯作用(translation activation)<sup>[116]</sup>。

### 1.2.3 Epstein-Barr 病毒

#### 1.2.3.1 Epstein-Barr 病毒所編碼的 microRNA

西元 1964 年，Michael Epstein, Yvonne Barr 和 Bert Achong 三人利用電子顯微鏡在人類伯吉氏淋巴瘤( Burkitt's lymphoma )細胞中發現一種新的皰疹病毒( herpes virus )<sup>[117]</sup>，隨後命名為 Epstein –Barr virus，簡稱 EBV。而 EBV 可由唾液傳染進入人體後會感染 B 淋巴球<sup>[118]</sup>、T 淋巴球<sup>[119]</sup>，以及上皮細胞<sup>[120]</sup>，EBV 感染宿主細胞後會進入兩個階段，第一為潛伏期( latent stage )，其後為溶裂期( lytic stage )，通常 EBV 感染宿主細胞後會保持在潛伏期，此時病毒基因末端重複序列連接成環狀，以游離基因體形式( episomal form )存在於細胞核中，並隨著宿主細胞複製而複製。至今已發現，EBV 感染後在潛伏期對宿主細胞的影響與許多人類疾病相關<sup>[121]</sup>，以好發於東南亞地區的鼻咽癌為例，發現

百分之九十五以上都有 EBV 存在，因此鼻咽癌在癌症致死排名中依然榜上有名，具有一定的重要性。

EBV 基因體長達 172 Kb，其中所編碼的蛋白包括會在潛伏期表現的 EBNA 1-6、LMP1、LMP2A 及 LMP2B，或是在溶裂期表現的 BALF2、BALF5 與 BHLF1 等。除了編碼蛋白質外，EBV 還會轉錄出非編碼蛋白的短 RNA 轉錄本，如 EBERs ( EBV-encoded RNAs )<sup>[122]</sup>、BHRF ( *Bam*HI-H rightward open-reading frame )<sup>[123]</sup> 及 BARTs ( *Bam*HI-A rightward transcripts )<sup>[124]</sup>。雖然至今仍無法完全了解這些 RNA 轉錄本的機制與功能，但已知其中 EBERs 可能與細胞凋亡的抑制有關<sup>[125]</sup>，而 BHRF 和 BARTs 則是會轉錄出 EBV 的 microRNA。目前為止，已知 EBV 編碼了 25 個 miRNA 前驅物，而從這些前驅物中又可產生 44 個成熟的 miRNA，是至今發現表現最多 miRNA 的病毒。EBV 所編碼的 miRNAs 依所在位置分為兩群，分別是座落在 *Bam*H1-A 上的 BART miRNAs 和座落在 *Bam*H1-H 上的 BHRF miRNAs。BART miRNAs 包含 ebv-miR-BART1~22；BHRF miRNAs 則包含 ebv-miR-BHRF1-1、1-2、1-3。

### 1.3 研究動機與目的

在台灣已有超過百分之九十五的鼻咽癌患者感染 EBV，且與 EBV 潛伏期的基因表現有密切的關聯性<sup>[126]</sup>。就目前研究癌症的機制已知除了應用於病毒蛋白的表現上，尚有部分非編碼的 EBV miRNAs 的功能未被完全的釐清。由於 BART miRNAs 最早被發現高度表現在鼻咽癌細胞中，而利用同步即時定量聚合酶連鎖反應( quantitative real-time polymerase chain reaction, Q-PCR )<sup>[127]</sup>檢測感染 EBV 的鼻咽癌細胞，發現 ebv-miR-BART2-5p、BART4、BART7、BART9 及 BART18-5p 的表現量皆高於其他 miRNAs。因此本研究以 CE-LIF 之技術應用於檢測這五種 miRNAs，希望能提供早期篩選癌症一個經濟、快速、高通量、樣品用量少的分析方法。

## 1.4 參考文獻

1. F. Kohlrausch. (1897) *Ann Phys. Chem.*, **62**, 209.
2. L. Michaelis. (1909) Electric transport of enzymes, malt distaste and pepsin. *Biochemische Zeitschrift*, **17**, 231.
3. A. Tiselius. (1937) Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem J*, **31**, 1464-1477.
4. J.H. Knox. (1988) Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation. *Chromatographia*, **26**, 329-337.
5. S. Hjérten. (1967) Free zone electrophoresis. *Chromatographic Reviews*, **9**, 122-219.
6. R. Virtanen. (1974) *Acta Polytechnica. Scand.*, **123**, 1.
7. J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs. (1981) High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography*, **218**, 209-216.
8. J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs. (1981) Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries. *Analytical Chemistry*, **53**, 1298-1302.
9. J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs. (1983) Capillary zone electrophoresis. *Science*, **222**, 266-272.
10. A.D. Tran, S. Park, P.J. Lisi, O.T. Huynh, R.R. Ryall and P.A. Lane. (1991) Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis. Effects of pH, buffer type and organic additives. *Journal of Chromatography*, **542**, 459-471.
11. R. Rodriguez-Diaz, T. Wehr and M. Zhu. (1997) Capillary isoelectric focusing. *Electrophoresis*, **18**, 2134-2144.
12. R.D. Smith, S.M. Fields, J.A. Loo, C.J. Barinaga, H.R. Udseth and C.G. Edmonds. (1990) Capillary isotachopheresis with UV and tandem mass spectrometric detection for peptides and proteins. *Electrophoresis*, **11**, 709-717.
13. A.S. Cohen and B.L. Karger. (1987) High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *J Chromatogr*, **397**, 409-417.
14. I.H. Grant. (1996) Capillary electrochromatography. *Methods Mol Biol*, **52**, 197-209.
15. H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto and S. Terabe. (1989) Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr*, **465**, 331-343.
16. C.L. Colyer, S.D. Mangru and D.J. Harrison. (1997) Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins. *J Chromatogr A*, **781**, 271-276.
17. S.C. Jacobson and J.M. Ramsey. (1995) Microchip electrophoresis with sample stacking. *Electrophoresis*, **16**, 481-486.
18. L.D. Hutt, D.P. Glavin, J.L. Bada and R.A. Mathies. (1999) Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration. *Anal Chem*, **71**, 4000-4006.
19. M.J. Fasco. (1999) Analysis of amplified DNA molecules by capillary electrophoresis and laser induced fluorescence. *Methods Mol Med*, **26**, 131-146.

20. H. Bojar, R. Dreyfurst, K. Maar and W. Stab. (1977) Distribution of oestradiol receptor molecules in human kidney. *J Clin Chem Clin Biochem*, **15**, 319-321.
21. N. Zhang and E.S. Yeung. (1998) On-line coupling of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis for automatic DNA typing and HIV-1 diagnosis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **714**, 3-11.
22. J.L. de Gennes, J. Truffert and F. Dairou. (1977) [Contribution of lipoprotein electrophoresis in polyacryamide gel in the study of idiopathic hyperlipidemias]. *Ann Med Interne (Paris)*, **128**, 677-680.
23. M. Zhu, D.L. Hansen, S. Burd and F. Gannon. (1989) *J. Chromatogr.*, **480**.
24. A.M. Chin and J.C. Colburn. (1989) Counter-migration capillary electrophoresis (Cmce) in DNA restriction Fragment analysis. *American Biotechnology Laboratory*, **7**, 16-16.
25. M. Chiari, M. Nesi, P. Roncada and P.G. Righetti. (1994) Preparative isoelectric focusing in multicompartement electrolyzers: novel, hydrolytically stable and hydrophilic isoelectric membranes. *Electrophoresis*, **15**, 953-959.
26. E. Carrilho, M.C. Ruiz-Martinez, J. Berka, I. Smirnov, W. Goetzinger, A.W. Miller, D. Brady and B.L. Karger. (1996) Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions. *Anal Chem*, **68**, 3305-3313.
27. H.T. Chang and E.S. Yeung. (1995) Poly(ethyleneoxide) for high-resolution and high-speed separation of DNA by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, **669**, 113-123.
28. X.D. Lu and E.S. Yeung. (1995) Optimization of excitation and detection geometry for multiplexed capillary array electrophoresis of DNA fragments. *Applied Spectroscopy*, **49**, 605-609.
29. A. Chrambach and A. Aldroubi. (1993) Relative efficiency of molecular sieving in solutions of four polymers. *Electrophoresis*, **14**, 18-22.
30. M. Strege and A. Lagu. (1991) Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries. *Anal Chem*, **63**, 1233-1236.
31. P.D. Grossman and D.S. Soane. (1991) Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solutions. *J Chromatogr*, **559**, 257-266.
32. Y. Baba, N. Ishimaru, K. Samata and M. Tshako. (1993) High-resolution separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis in cellulose derivative solutions. *J Chromatogr A*, **653**, 329-335.
33. M.H. Kleemiss, M. Gilges and G. Schomburg. (1993) Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers. *Electrophoresis*, **14**, 515-522.
34. R. Kuhn and S. Hoffstetter-Kuhn. (1993) Capillary electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York.
35. H.Z. Helmholtz. (1879) About electrical interfaces (translated title). *Ann Phys. Chem.*, **7**, 337.
36. C.L. Colyar, T. Tang, N. CHien and D.J. Harrison. (1997) *Electrophoresis*, **18**, 1733.
37. S. Hjerten and B.L. Wu. (1985) Studies of fish zona pellucida by high-performance ion-exchange chromatography on agarose columns and free zone electrophoresis. *J Chromatogr*,

- 341**, 295-304.
38. J.L. Liao, J. Abramson and S. Hjerten. (1995) A highly stable methyl cellulose coating for capillary electrophoresis. *J Capillary Electrophor*, **2**, 191-196.
  39. B.M. Olivera, P. Baine and N. Davidson. (1964) Electrophoresis of the nucleic acids. *Biopolymers*, **2**, 245.
  40. P.D. Grossman and D.S. Soane. (1991) Experimental and theoretical-studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer-solutions. *Biopolymers*, **31**, 1221-1228.
  41. P.G. De Gennes. (1979) *Scaling concepts in polymer physics*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
  42. A.G. Ogston. (1958) The spaces in a uniform random suspension of fibres. *TRANSACTIONS OF THE FARADAY SOCIETY*, **54**, 1754.
  43. P.G. De Gennes. (1971) *J. Chem. Phys.*, **55**, 572.
  44. X. Shi, R.W. Hammond and M.D. Morris. (1995) Dynamics of DNA during pulsed field electrophoresis in entangled and dilute polymer solutions. *Anal Chem*, **67**, 3219-3222.
  45. H.T. Chang and E.S. Yeung. (1993) *Anal. Chem*, **65**, 650-652.
  46. R. Sebastiano, M.E. Mendieta, P. Antonioli, A. Bossi, P.G. Righetti and A. Citterio. (2006) Organic and inorganic di-cations for capillary silica coating and EOF modulation in CE: Example of application in PEG analysis. *Electrophoresis*, **27**, 1495-1501.
  47. A.S. Cohen, D.R. Najarian, A. Paulus, A. Guttman, J.A. Smith and B.L. Karger. (1988) Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9660-9663.
  48. M.C. Roach and M.D. Harmony. (1987) Determination of amino acids at subfemtomole levels by high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem*, **59**, 411-415.
  49. J.Y. Lee, H.W. Li and E.S. Yeung. (2004) Single-molecule spectroscopy for molecular identification in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, **1053**, 173-179.
  50. R. Novak, Y. Zeng, J. Shuga, G. Venugopalan, D.A. Fletcher, M.T. Smith and R.A. Mathies. (2011) Single-cell multiplex gene detection and sequencing with microfluidically generated agarose emulsions. *Angew Chem Int Ed Engl*, **50**, 390-395.
  51. I.H. Lee, D. Pinto, E.A. Arriaga, Z. Zhang and N.J. Dovichi. (1998) Picomolar analysis of proteins using electrophoretically mediated microanalysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem*, **70**, 4546-4548.
  52. P.G. Coble and A.T. Timperman. (1998) Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor. *J Chromatogr A*, **829**, 309-315.
  53. M.D. Harvey, D. Bandilla and P.R. Banks. (1998) Subnanomolar detection limit for sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis using a fluorogenic, noncovalent dye. *Electrophoresis*, **19**, 2169-2174.
  54. E.D. Moody, P.J. Viskari and C.L. Colyer. (1999) Non-covalent labeling of human serum

- albumin with indocyanine green: a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **729**, 55-64.
55. J.F. Kelly, S.J. Locke, L. Ramaley and P. Thibault. (1996) Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **720**, 409-427.
  56. I.T. Kuo, T.C. Chiu and H.T. Chang. (2003) On-column concentration and separation of double-stranded DNA by gradient capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **24**, 3339-3347.
  57. D. Miscicka-Sliwka, T. Grzybowski and M. Wozniak. (1997) Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci. *Electrophoresis*, **18**, 1627-1632.
  58. M.A. Marino, J.M. Devaney, P.A. Davis and J.E. Girard. (1999) Optimization of intercalation dye concentration for short tandem repeat allele genotyping using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **732**, 365-374.
  59. M.K. Lee and H.R. Kim. (2006) [Comparison between Real-Time PCR and Agarose Gel Electrophoresis for DNA Quantification.]. *Korean J Lab Med*, **26**, 217-222.
  60. S.S. Ranade, C.B. Chung, G. Zon and V.L. Boyd. (2009) Preparation of genome-wide DNA fragment libraries using bisulfite in polyacrylamide gel electrophoresis slices with formamide denaturation and quality control for massively parallel sequencing by oligonucleotide ligation and detection. *Anal Biochem*, **390**, 126-135.
  61. G.H. Liu, T. Nakamura, T. Amemiya, N. Rajendran and K. Itoh. (2011) Analysis of Bacterial Populations in the Environment Using Two-dimensional Gel Electrophoresis of Genomic DNA and Complementary DNA. *Microbes Environ*.
  62. I.N. Day, E. Spanakis, X. Chen and S.D. O'Dell. (1999) Microplate array diagonal gel electrophoresis for mutation research in DNA banks. *Electrophoresis*, **20**, 1250-1257.
  63. F.S. Collins, M.S. Guyer and A. Charkravarti. (1997) Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*, **278**, 1580-1581.
  64. P. Taillon-Miller, E.E. Piernot and P.Y. Kwok. (1999) Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery. *Genome Res*, **9**, 499-505.
  65. L.G. Lee, S.L. Spurgeon, C.R. Heiner, S.C. Benson, B.B. Rosenblum, S.M. Menchen, R.J. Graham, A. Constantinescu, K.G. Upadhyya and J.M. Cassel. (1997) New energy transfer dyes for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2816-2822.
  66. D. Schmalzing, L. Koutny, A. Adourian, P. Belgrader, P. Matsudaira and D. Ehrlich. (1997) DNA typing in thirty seconds with a microfabricated device. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10273-10278.
  67. K. Fogarty, J.T. McPhee, E. Scott and A. Van Orden. (2009) Probing the ionic atmosphere of single-stranded DNA using continuous flow capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy. *Anal Chem*, **81**, 465-472.
  68. F. Wan, J. Zhang, A. Lau, S. Tan, C. Burger and B. Chu. (2008) Nanostructured copolymer gels for dsDNA separation by CE. *Electrophoresis*, **29**, 4704-4713.
  69. R.J. Meagher, J.I. Won, J.A. Coyne, J. Lin and A.E. Barron. (2008) Sequencing of DNA by

- free-solution capillary electrophoresis using a genetically engineered protein polymer drag-tag. *Anal Chem*, **80**, 2842-2848.
70. Y. Jiang and Y. Ma. (2009) A fast capillary electrophoresis method for separation and quantification of modified nucleosides in urinary samples. *Anal Chem*, **81**, 6474-6480.
  71. X. Wang, Y. Song, M. Song, Z. Wang, T. Li and H. Wang. (2009) Fluorescence polarization combined capillary electrophoresis immunoassay for the sensitive detection of genomic DNA methylation. *Anal Chem*, **81**, 7885-7891.
  72. A.J. Nataraj, I. Olivos-Glander, N. Kusukawa and W.E. Highsmith, Jr. (1999) Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, **20**, 1177-1185.
  73. K. Hebenbrock, P.M. Williams and B.L. Karger. (1995) Single strand conformational polymorphism using capillary electrophoresis with two-dye laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, **16**, 1429-1436.
  74. Q.H. Ru, H.E. Jing, G.A. Luo and Q. Huang. (2000) Single-strand conformation polymorphism analysis to detect the p53 mutation in colon tumor samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, **894**, 171-177.
  75. J. Ren. (2000) High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **741**, 115-128.
  76. J. Cheng, T. Kasuga, K.R. Mitchelson, E.R. Lightly, N.D. Watson, W.J. Martin and D. Atkinson. (1994) Polymerase chain reaction heteroduplex polymorphism analysis by entangled solution capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, **677**, 169-177.
  77. P. Lindberg, P.G. Righetti, C. Gelfi and J. Roeraade. (1997) Electrophoresis of DNA sequencing fragments at elevated temperature in capillaries filled with poly(N-acryloylaminopropanol) gels. *Electrophoresis*, **18**, 2909-2914.
  78. Q. Gao and E.S. Yeung. (2000) High-throughput detection of unknown mutations by using multiplexed capillary electrophoresis with poly(vinylpyrrolidone) solution. *Anal Chem*, **72**, 2499-2506.
  79. M. Fuhrmann, W. Oertel, P. Berthold and P. Hegemann. (2005) Removal of mismatched bases from synthetic genes by enzymatic mismatch cleavage. *Nucleic Acids Res*, **33**, e58.
  80. R. Ghozzi, P. Morand, A. Ferroni, J.L. Beretti, E. Bingen, C. Segonds, M.O. Husson, D. Izard, P. Berche and J.L. Gaillard. (1999) Capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphism analysis for rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, **37**, 3374-3379.
  81. Z. Zhang, Y. Wu, W. Cheng and R. Wu. (2000) Single strand conformation polymorphism analysis of K-ras gene mutations by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (LIF) detector. *Clin Chim Acta*, **301**, 205-211.
  82. S.E. Humphries, V. Gudnason, R. Whittall and I.N. Day. (1997) Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in



- familial hypercholesterolemia. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division: Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem*, **43**, 427-435.
83. P. Bao, A.G. Frutos, C. Greef, J. Lahiri, U. Muller, T.C. Peterson, L. Warden and X. Xie. (2002) High-sensitivity detection of DNA hybridization on microarrays using resonance light scattering. *Anal Chem*, **74**, 1792-1797.
  84. P.D. Grossman, W. Bloch, E. Brinson, C.C. Chang, F.A. Eggerding, S. Fung, D.M. Iovannisci, S. Woo and E.S. Winn-Deen. (1994) High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4527-4534.
  85. C.A. Piggee, J. Muth, E. Carrilho and B.L. Karger. (1997) Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single-nucleotide primer extension and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, **781**, 367-375.
  86. M. Prado, P. Calo, A. Cepeda and J. Barros-Velazquez. (2005) Genetic evidence of an Asian background in heteroplasmic Iberian cattle (*Bos taurus*): effect on food authentication studies based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Electrophoresis*, **26**, 2918-2926.
  87. A. Devallois, K.S. Goh and N. Rastogi. (1997) Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*, **35**, 2969-2973.
  88. S.M. Hernandez, G.P. Morlock, W.R. Butler, J.T. Crawford and R.C. Cooksey. (1999) Identification of Mycobacterium species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol*, **37**, 3688-3692.
  89. P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K.C. O'Briant, A. Allen *et al.* (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 10513-10518.
  90. A. Esquela-Kerscher and F.J. Slack. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 259-269.
  91. P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A.O. Kamphorst, M. Landthaler *et al.* (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, **129**, 1401-1414.
  92. O. Hobert. (2008) Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science*, **319**, 1785-1786.
  93. Y.S. Park, H.S. Chu, S.H. Hwang, J.H. Seo, C.Y. Choi and G.Y. Jung. (2006) A precise mRNA quantification method using CE-based SSCP. *Electrophoresis*, **27**, 3836-3845.
  94. P. Liang. (2007) MAQC papers over the cracks. *Nature biotechnology*, **25**, 27-28.
  95. L. Klebanov, X. Qiu, S. Welle and A. Yakovlev. (2007) Statistical methods and microarray data. *Nat Biotechnol*, **25**, 25-26; author reply 26-27.
  96. C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu,

- V.R. Mahuvakar, M.R. Andersen *et al.* (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **33**, e179.
97. F. Souzae, A. Ntodou-Thome, C.Y. Tran, W. Rostene and P. Forgez. (1996) Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques*, **21**, 280-285.
98. C. Napoli, C. Lemieux and R. Jorgensen. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
99. W. Filipowicz, L. Jaskiewicz, F.A. Kolb and R.S. Pillai. (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 331-341.
100. C. Cogoni and G. Macino. (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, **399**, 166-169.
101. R.C. Lee, R.L. Feinbaum and V. Ambros. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
102. B.J. Reinhart, F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz and G. Ruvkun. (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**, 901-906.
103. I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri *et al.* (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, **37**, 766-770.
104. L.P. Lim, N.C. Lau, E.G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M.W. Rhoades, C.B. Burge and D.P. Bartel. (2003) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, **17**, 991-1008.
105. B.J. Reinhart, E.G. Weinstein, M.W. Rhoades, B. Bartel and D.P. Bartel. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, **16**, 1616-1626.
106. L.P. Lim, N.C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle, D.P. Bartel, P.S. Linsley and J.M. Johnson. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769-773.
107. A. Grimson, K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim and D.P. Bartel. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, **27**, 91-105.
108. D.P. Bartel. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.
109. W. Filipowicz, S.N. Bhattacharyya and N. Sonenberg. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, **9**, 102-114.
110. M.P. Perron and P. Provost. (2009) Protein components of the microRNA pathway and human diseases. *Methods Mol Biol*, **487**, 369-385.
111. M.P. Perron, P. Landry, I. Plante and P. Provost. (2011) Detection of Human Dicer and Argonaute 2 Catalytic Activity. *Methods Mol Biol*, **725**, 121-141.
112. W. Sun, Y.S. Julie Li, H.D. Huang, J.Y. Shyy and S. Chien. (2010) microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng*, **12**, 1-27.

113. J. Couzin. (2008) MicroRNAs make big impression in disease after disease. *Science*, **319**, 1782-1784.
114. L. He and G.J. Hannon. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, **5**, 522-531.
115. E.I. Rogaev. (2005) Small RNAs in human brain development and disorders. *Biochemistry (Mosc)*, **70**, 1404-1407.
116. A.R. Naqvi, M.N. Islam, N.R. Choudhury and Q.M. Haq. (2009) The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci*, **5**, 97-117.
117. M.A. Epstein, B.G. Achong and Y.M. Barr. (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703.
118. G.R. Nemerow, M.D. Moore and N.R. Cooper. (1990) Structure and function of the B-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor. *Adv Cancer Res*, **54**, 273-300.
119. H. Kikuta, Y. Taguchi, K. Tomizawa, K. Kojima, N. Kawamura, A. Ishizaka, Y. Sakiyama, S. Matsumoto, S. Imai, T. Kinoshita *et al.* (1988) Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature*, **333**, 455-457.
120. J.W. Sixbey, E.H. Vesterinen, J.G. Nedrud, N. Raab-Traub, L.A. Walton and J.S. Pagano. (1983) Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature*, **306**, 480-483.
121. M.P. Thompson and R. Kurzrock. (2004) Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 803-821.
122. M.M. Hitt, M.J. Allday, T. Hara, L. Karran, M.D. Jones, P. Busson, T. Tursz, I. Ernberg and B.E. Griffin. (1989) EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J*, **8**, 2639-2651.
123. S. Pfeffer, M. Zavolan, F.A. Grasser, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, B. John, A.J. Enright, D. Marks, C. Sander *et al.* (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, **304**, 734-736.
124. A. Grundhoff, C.S. Sullivan and D. Ganem. (2006) A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA*, **12**, 733-750.
125. N. Yamamoto, T. Takizawa, Y. Iwanaga and N. Shimizu. (2000) Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett*, **484**, 153-158.
126. M. Al-Mozaini, G. Bodelon, C.E. Karstegl, B. Jin, M. Al-Ahdal and P.J. Farrell. (2009) Epstein-Barr virus BART gene expression. *J Gen Virol*, **90**, 307-316.
127. I. Reichenstein, N. Aizenberg, M. Goshen, Z. Bentwich and Y.S. Avni. (2010) A novel qPCR assay for viral encoded microRNAs. *J Virol Methods*, **163**, 323-328.

## 第二章 毛細管電泳於鼻咽癌細胞中檢測微小核糖核酸

### 2.1 序論

癌症即是惡性腫瘤，為一種疾病。它是由控制細胞生長增殖機制的失常而引起。癌細胞除了生長失控外，還會局部侵入週遭正常組織甚至經由體內循環系統或淋巴系統轉移到身體其它部份，稱為遠端轉移。引起基因突變的物質被稱為致癌物質，又以其造成基因損傷的方式可分為化學性致癌物與物理性致癌物。例如接觸放射物質，或是一些環境因數，例如，香煙、輻射、酒精。還有一些病毒可將本身的基因插入細胞的基因裡中，激活致癌基因。但突變也會自然產生，所以即使避免接觸上述的致癌因數，仍然無法完全預防癌症的產生。發生在生殖細胞的突變有可能傳至下一代。此外許多癌症亦起源於病毒感染。特別是在動物中，例如鳥類。由病毒引起的人類癌症大約佔所有人類癌症的 15 %<sup>[1]</sup>。與癌症有關的病毒主要有人類乳突病毒、乙型肝炎病毒、人類皰疹病毒第四型 Epstein-Barr virus 和人類嗜 T 細胞病毒。實驗結果和流行病學數據顯示在所有引起癌症的危險因數中，病毒排名第二<sup>[2]</sup>，僅次於菸草。由於去氧核糖核酸的損傷會隨著年齡而累積增加，年紀越大得到癌症的機會也隨之增加，因此各個年齡層的人都有可能產生癌症。在一些西方國家，例如美國等，目前所有死亡人數的 25 % 是因癌症死亡。而每年約有 0.5 % 人口診斷出癌症，其已超過心血

管疾病 ( cardiovascular disease ) 成為死亡的主要原因<sup>[3]</sup>。有鑑於此，建立一個快速、經濟、精確性高的癌症篩檢工具，能提早找出潛在未發現與早期無症狀的癌症則是有必要的。

在過去 20 年間，毛細管電泳大幅被廣泛應用於生物分子的偵測，諸如：蛋白質、胺基酸及去氧核糖核酸 (DNA)，並且已經成熟到為各種-omics 學門不可或缺的分析方法<sup>[4]</sup>。然而，當前以毛細管電泳為基礎的方法中用 CE 來分析 RNA 的期刊可謂寥寥可數。例如：Zhong 等人利用 CE-LIF 直接評估 mRNA 在細胞內的表現量，並且可以區分正常組織及乳癌細胞組織<sup>[5]</sup>。Tian 等人也發表了一篇有關 mRNA 的論文，利用 CE-LIF 搭配一種螢光分子就可以同時定量 44 個基因<sup>[6]</sup>。另外，Khan 等人則是結合 RT-PCR 和 CE-LIF 並用以定量腦中的 mRNA<sup>[7]</sup>。2008 年，吾師，Chang 等人亦發表了一篇直接偵測鼻咽癌細胞中 Epstein-Barr 病毒的 miRNA 的作品<sup>[8]</sup>。這是第一篇以 CE-LIF 對 miRNA 作檢測的期刊，其分析方法的特色能辨認單一核苷酸之特異性。然而，受限於偵測極限未能達到實用之等級，本論文初期以毛細管電泳中常用的樣品堆積 (濃縮) 技術應用於此題目中，期望能夠達到和北方點墨法同等級的偵測極限 ( $\sim 10^{-11}$  M)，但結果令人相當扼腕，其後便致力於光學方面的改善，盼能真正應用於臨床檢驗工作上。另一方面，由於螢光探針合成及純化過程中還是會有不純物存在於探針中。

因此，若以樣品進行堆積，在解析度不夠高或不純物的存在下是極度困難的。在2007年，Maroney 等人於知名期刊 RNA 中針對 miRNA 發表了一種以夾板式結合反應( splinted ligation )為基礎的偵測方法<sup>[9,10]</sup>。然而，如同一般的北方點墨法一樣，此法還是以同位素標定偵測為主，會造成輻射汙染，而且凝膠電泳亦不易用來定量 miRNA 及高通量的實驗。因此，本論文即希望以 CE 結合 splinted ligation 偵測技術，為 miRNA 當代熱門之癌症相關標幟提供一個經濟、快速、高通量、樣品用量少的分析方法。

## 2.2 實驗部分

### 2.2.1 儀器裝置

本實驗中所需要用到的裝置包括：聚合酶連鎖反應程式加熱器、變性電泳系統、雷射誘發螢光偵測系統。加熱器提供作為 DNA、RNA 雜合反應 (hybridization) 及結合反應 (ligation) 之反應器，可以藉由程式設定進而控制 DNA、RNA 變性、黏合及酵素反應的溫度與時間；毛細管變性電泳系統主要為分離單股與雙股 DNA 片段之用，藉由高濃度的尿素輔助之下，可以維持單股去氧核糖核酸探針之構型並使雜交後之雙股核酸結構不致發生變性行為，因此使其能夠於毛細管中被分離；雷射誘發螢光偵測系統則可收集螢光訊號，並將之轉換成一般的電泳圖。

#### 2.2.1.1 聚合酶連鎖反應程式加熱器

實驗中之程式加熱器係由日商 Astec 公司所生產，型號為 PC-818A，加熱容器為全鋁材質所製，如此不但可以增加熱傳導速率，並且因為散熱均勻使得鋁塊的每一部位在升降溫的過程中經由微電腦 PID 的控制，其精準度可達  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 。在設定雜合反應的程序中，此加熱器最大梯度溫差可設定至  $20^{\circ}\text{C}$ ，剛好符合本實驗所需之要求。除了精密之控溫外，鋁塊上方還具有 96 個孔洞 (well) 可以進行大量的聚合酶連鎖反

應，而且升降溫速度也快，可達每秒  $3^{\circ}\text{C}$ ，可節省許多等待的時間，來累積更多數據。

### 2.2.1.2 雷射誘發螢光偵測系統

本實驗所採用的激發光源係中國大陸 Changchun New Industries Optoelectronics Tech.公司所生產的固態雷射，其主要激發波長為  $532\text{ nm}$ ，功率為  $10\text{ mW}$ 。首先將雷射光平行射向毛細管之偵測視窗(圖 2-1)，並用凸透鏡將雷射光聚焦於毛細管上，當接有螢光團的 DNA 探針通過偵測視窗時，螢光團就會被雷射所激發而產生特定波長之螢光，螢光在  $90^{\circ}$  的方向被  $10\times$  接物鏡( numerical aperture = 0.25 )收集之後，先被一  $532\text{ nm}$ , O.D. 6 的 notch 濾片 ( Semrock, Rochester, NY, USA ) 將其大部分的雷射光反射，通過的螢光再由一  $550\text{ nm}$  的干涉濾片及 OG  $550\text{ nm}$  的截斷濾片( Edmund, Barrington, NJ, USA ) 去除不需要的散射光，最後再使用光電倍增管( R3896, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan ) 偵測我們要的螢光訊號，訊號經光電倍增管放大後，經由一  $10\ \Omega$  的電阻將產生的電流訊號轉換成電壓訊號，並由 24-bit 數位類比轉換器( A/D converter, JMBS Development 製造 ) 以  $10\text{ Hz}$  的頻率擷取訊號並轉換成數位資料儲存於電腦中，最後用層析軟體 Clarity ( DataApex, Prague, Czech Republic ) 將其轉換成電泳圖。整個實驗裝置是在一密閉



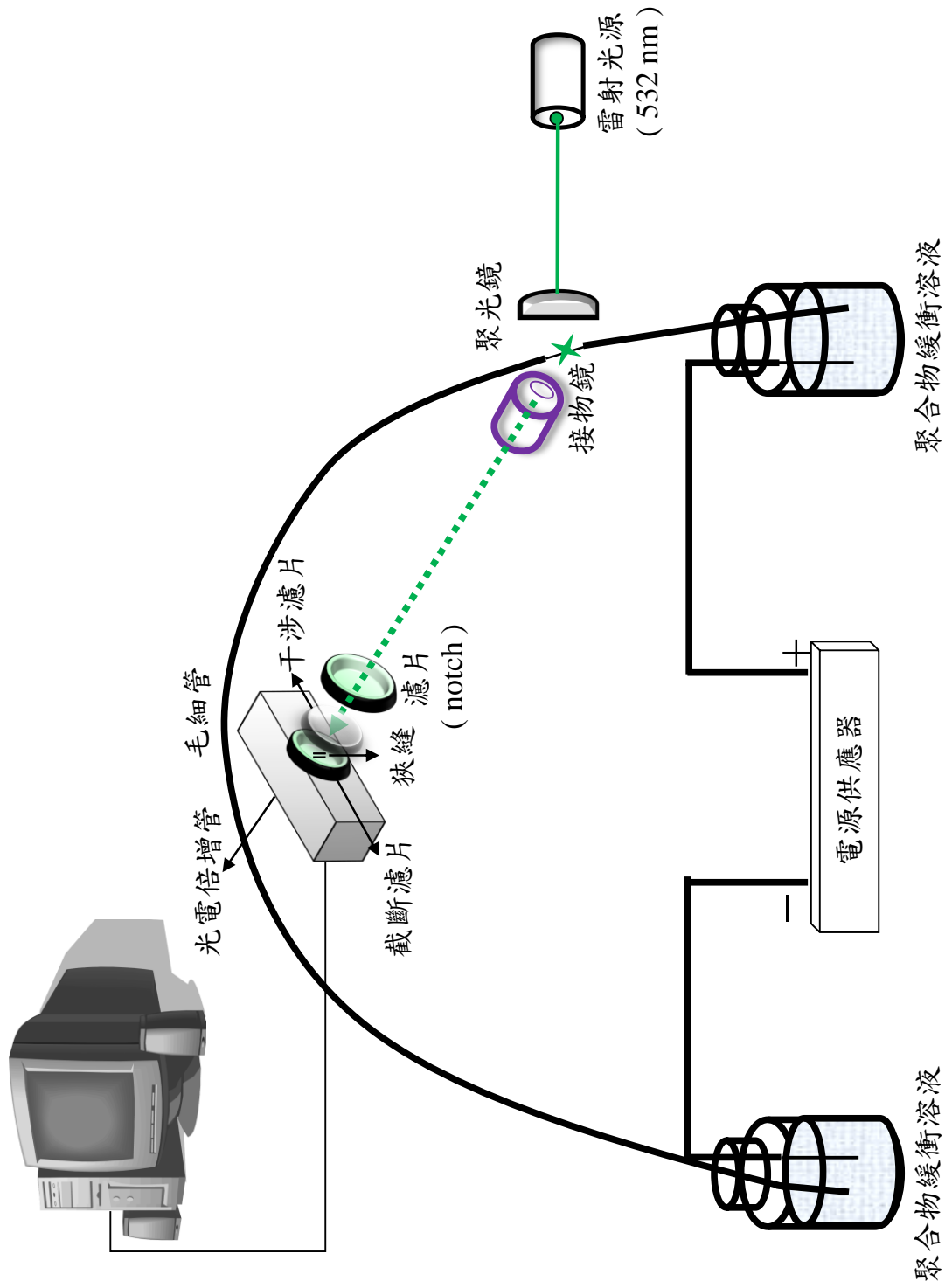


圖2-1 毛細管電泳雷射誘發螢光裝置圖

的黑箱中進行，以避免不必要的光源干擾。

### 2.2.1.3 變性電泳系統

整個毛細管變性電泳系統是自行組裝的。實驗用的毛細管購自美國 Polymicro Technologies 公司，材質為熔融矽( fused silica )，毛細管內徑為 75  $\mu\text{m}$ ，外徑為 365  $\mu\text{m}$ ，毛細管外部塗覆了一層聚亞烯胺( polyimide )，總長 50 公分，並在 43 公分處將塗覆在毛細管外的聚亞烯胺燒掉約 1 公分，作為偵測窗口。如圖 2-1 所示，實驗時將含有高濃度尿素( 7 M )的聚合物溶液，以高壓使之推入毛細管內，再插入白金電極，但為了安全起見，高電壓輸出端須穿過自製的 plexiglass box，再插入聚合物溶液中，並施以高電壓來達到電泳的目的。經由此模式可將特定長度(  $\sim 10$  bp )之雙股短鏈核苷酸變性而展開，並經由雷射誘發螢光進行訊號偵測。

### 2.2.2 實驗試藥

尿素( urea )、poly( ethylene ) oxide ( PEO, average  $M_w$  8,000,000 g/mol )、polyvinylpyrrolidone ( PVP, average  $M_w$  1,300,000 g/mol )、三羥甲基氨基甲烷( tris )、甘胺酸( glycine )、醋酸( acetate )係由美國 Sigma-Aldrich ( St. Louis, MO, USA ) 公司所購買。而實驗所用到的 HPLC 等級之寡核苷酸都是由美國 Integrated DNA Technologies 公司合

**表 2-1 實驗所用之核苷酸**

名稱	長度	序列 (5' - 3')	熔點溫度
Fluorescent probe	10	Phos-TCGGTCAGCA-Alexa Fluor 532	35.7
BART7-RNA	22	CAUCAUAGUCCAGUGUCCAGGG	67.8
BART7	22	CATCATAGTCCAGTGTCCAGGG	59
BART9	23	TAACACTTCATGGGTCCCGTAGT	60.2
BART18	22	TCAAGTTCGCACTTCCTATAACA	56.2
BART2	22	TATTTTCTGCATTCGCCCTTGC	59
BART2-2nt	20	TTTTCTGCATTCGCCCTTGC	59.1
BART2+2nt	24	ACTATTTTCTGCATTCGCCCTTGC	61.2
BART2+5nt	27	CAGACTATTTTCTGCATTCGCCCTTGC	63.4
BART4	22	GACCTGATGCTGCTGGTGTGCT	64.5
BART9-Bridge	50	TGCTGACCGAACTACGGGACCCATGAAGTGTTA(17A)	
BART7-Bridge	60	TGCTGACCGACCCTGGACACTGGACTATGATG(28A)	
BART18-Bridge	70	(19A)TGCTGACCGATGTATAGGAAGTGCGAACTTGA(19A)	
BART2-Bridge	80	(24A)TGCTGACCGAGCAAGGGCGAATGCAGAAAATA(24A)	
BART4-Bridge	90	(29A)TGCTGACCGAAGCACACCAGCAGCATCAGGTC(29A)	

成生產，皆列於表 2-1 中。RNA 抽提試劑( trizol )及 DNase/RNase-free water 係由美國 Invitrogen ( Carlsbad, CA, USA )公司所生產。T4 DNA 結合酶及 RNA extraction kit 係由德國 Qiagen ( Hilden, Germany )公司所購買。

### **2.2.3 細胞培養( cell culture )及 RNA 萃取( RNA extraction )**

人類鼻咽癌細胞( HK-1 )與 EBV 感染的人類鼻咽癌細胞( C666-1 )係由長庚大學分子醫學中心所提供，其實驗步驟簡述如下。RNA 皆培養於含有 10 % Fetal Bovine Serum 的 RPMI-1640 ( GIBCO® )中，而這些細胞株都置於含有 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培養箱中，利用胰蛋白酵素進行細胞次培養。在 culture dish 培養出來的細胞株再加入適量的 Trizol 搖晃均勻，靜置 5 分鐘後取至微量離心管中，加入 1/5 體積的 chloroform，劇烈震盪混合後靜置 10 分鐘，離心 12,000 r.p.m, 4°C, 15 分鐘。取上層溶液至等量的 isopropanol 中，混合均勻後放置冰上沉澱 10 分鐘，再以上述的離心條件進行 10 分鐘。倒除上清液，並以 75%酒精清洗 RNA 沉澱物兩次後，37°C 下乾燥，加入適量的 Diethylpyrocarbonate 溶液回溶。最後定量並做 RNA 品質測定。

### **2.2.4 雜合反應( Hybridization )及夾板式結合反應( Splinted Ligation )**

實驗中所設計的 DNA bridges 及螢光探針，都是由 miRNA Database

(miRBase) 所公布的<sup>[11]</sup>，且與 5 種 miRNAs 有完全互補的特異性。首先配置雜合反應之溶液，1  $\mu\text{L}$  的螢光探針，1  $\mu\text{L}$  的 tandem adenosine-tailed bridge DNAs，0.5  $\mu\text{L}$  的 10 $\times$  不含鎂離子之 PCR 緩衝溶液，以及 1  $\mu\text{L}$  合成的 DNA 或是由鼻咽癌細胞萃取的 total RNA (0.5  $\mu\text{g}$ )，最後以 DNase/RNase-free water 稀釋至體積為 5  $\mu\text{L}$ 。由圖 2-2 所示，先以高溫( 70 $^{\circ}\text{C}$  )變性後，利用梯度溫度的方式在 30 分鐘內( 速率：約 0.7 $^{\circ}\text{C}$ /分鐘 )從 65 $^{\circ}\text{C}$  緩慢降至 45 $^{\circ}\text{C}$ ，使 miRNAs 雜合到 tandem adenosine-tailed bridge DNA 的 3' 上，再將溫度下降至 20 $^{\circ}\text{C}$  讓螢光探針也能夠雜合到 bridge 的 5' 上形成一夾板狀，而加熱時間的部分在後面會有深入的探討結果。雜合完後會再加入 1  $\mu\text{L}$  的 10 $\times$  結合酶緩衝溶液，0.2  $\mu\text{L}$  的 T4 DNA ligase ( 5 Weiss units )，以 DNase/RNase-free water 稀釋體積至 10  $\mu\text{L}$ 。將溶液混合均勻後，於 16 $^{\circ}\text{C}$  反應 30 分鐘，此時 T4 DNA ligase 會將 3' miRNAs 的氫氧基與 5' probe 的磷酸基接合型成雙股結構的產物。而未與 miRNAs 結合之 probe 以及 tandem adenosine-tailed bridge DNAs，預期能夠在變性電泳的條件下將兩者展開，使得淌度改變而有不同的遷移時間。同樣的我們利用不同長度的 bridge DNAs，即可將數種相似長度的 miRNAs 分離。

### 2.2.5 聚合物溶液的製備

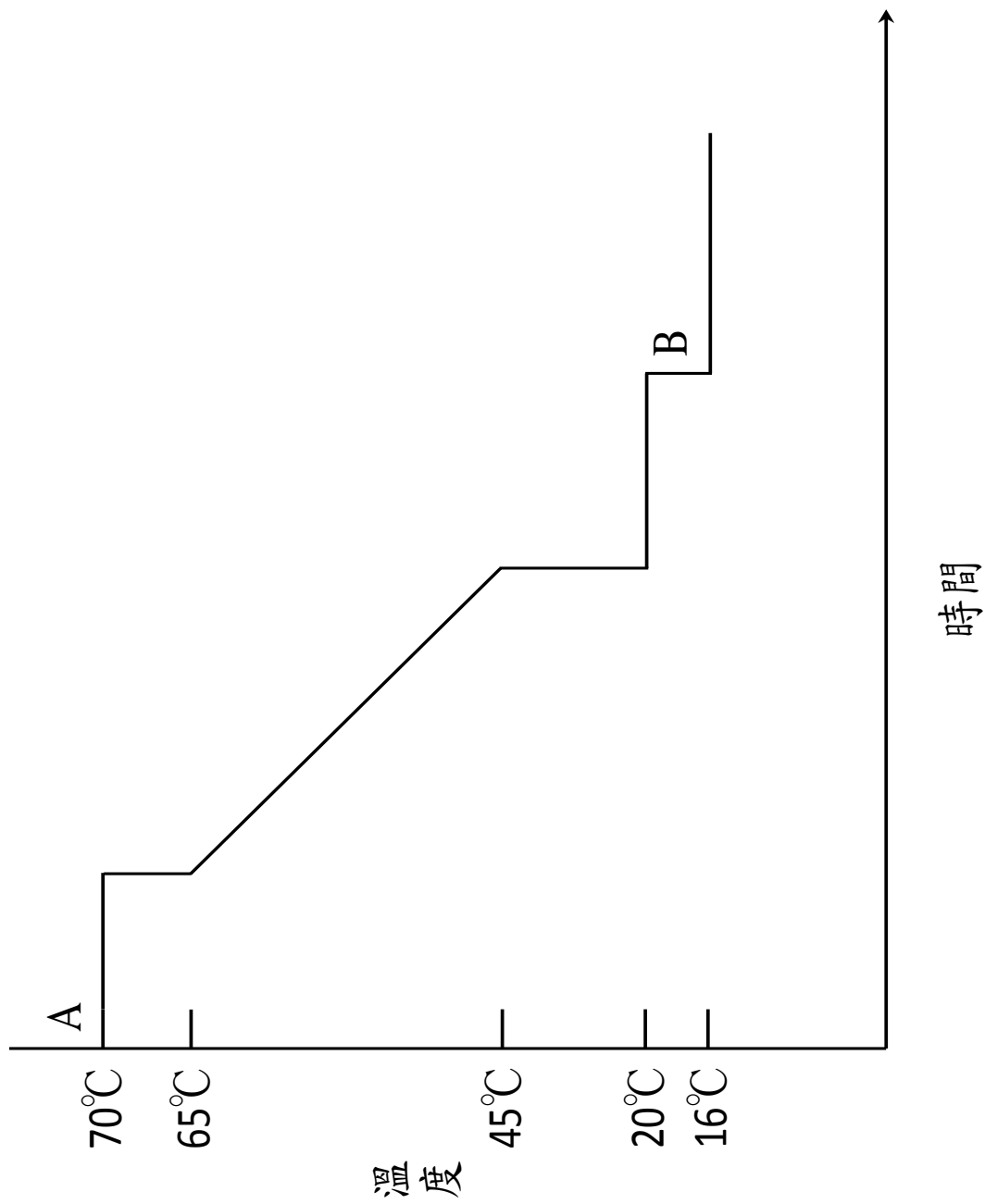


圖2-2 雜合反應與結合反應之加溫流程圖(A) hybridization (B) ligation

首先配製 4× Tris-glycine-acetate, pH 7.5 緩衝溶液( 28 mM Tris, 384 mM glycine, and 20 mM acetic acid, 4× TGA )<sup>[12]</sup>，之後將所需濃度的尿素溶於 4× Tris-glycine-acetate 緩衝溶液中，待完全溶解後，再以去離子水稀釋成 2× TGA 與 7 M 尿素。配製共聚物溶液時，為求攪拌均勻，需以攪拌子持續攪拌。首先將含有 7 M 尿素的 2X TGA 溶液裝在錐形瓶中，放入攪拌子，再置於攪拌器上，慢慢增強攪拌速度使 TGA 溶液成漩渦狀。取 0.75 g 的 PEO 與 0.25 g 的 PVP 混合之後，將粉末慢慢倒入錐形瓶中。攪拌至少要十二小時以上才能確保已完全溶解且均勻為止。然後將共聚物溶液倒入 50 c.c.離心管中，以 18,000 ×g 離心 10 分鐘藉此去除氣泡。

### 2.2.6 毛細管前處理

每根新的毛細管在開始實驗前需先燒好偵測視窗，然後先以去離子水活化表面之官能基，再通入 PVP ( 5% in H<sub>2</sub>O )於毛細管內塗覆一小時，以減少電滲流的產生，最後再塗覆一層 PEO ( 0.1% in H<sub>2</sub>O )一小時<sup>[13]</sup>。除了有效防止 DNA、RNA 吸附，以提高實驗的再現性之外，還能抑制 EOF 使分離的解析度得以改善。

### 2.2.7 樣品純化

結合反應完之溶液，除了有分析之產物外，亦含有高濃度的離子

鹽類，如以此溶液進行電泳分離，會導致進樣量變少與改變毛細管內離子的平衡，使得分析區帶變寬，大大影響分離的解析度。因此有效的去除溶液中之鹽類，便是電泳分析前必備的工作。學生參考前人利用 DNA 不溶於酒精而離子鹽能溶於酒精的特性<sup>[14]</sup>，並利用離心的方式加速 DNA 析出。首先配製 2.5 % formamide + 60 % EtOH 的混合溶液，取 190  $\mu\text{L}$  加至結合反應完的產物 10  $\mu\text{L}$  中，並以 10,000  $\times g$  離心 10 分鐘，接著丟棄上清液 190  $\mu\text{L}$ ，再加入 60% EtOH 190  $\mu\text{L}$  反覆上述離心步驟 3 次，最後將上清液吸剩 5  $\mu\text{L}$  進行真空乾燥，再以 5  $\mu\text{L}$  的去離子水回溶 DNA 產物，並於電泳中進行分離。

### 2.2.8 實驗流程

每一次注入樣品前，先以針筒注射器注入聚合物溶液到一鐵氟龍管中，此時管內不能有氣泡產生，再利用高壓氮氣(約 200 psi 左右)將鐵氟龍管中的聚合物溶液推入毛細管中，使之在樣品注入前充滿整個毛細管(50 公分)。隨後將負電極與毛細管進口端插入樣品試管中，利用電動力進樣(electrokinetic injection)的方式，在 200 V/cm 的電場下進樣 10 秒鐘。最後將毛細管進口端擺放回聚合物溶液中，並施加 15 kV 之高電壓進行電泳分離，當分析物經過毛細管 43 公分處時能被雷射誘發螢光所偵測。分析完後，同樣以高壓氮氣將高黏度的聚合物溶液推



出，再以去離子水洗清殘留之聚合物溶液，最後沖以 2× TGA 去平衡毛細管壁，便可進行下個分析實驗。

## 2.3 結果與討論

### 2.3.1 設計夾板式結合反應之原理

由於微小核糖核酸為一短序列之核苷酸，目前已發現數以千計相似長度的序列沒有辦法完全的分離，因此我們發展一種全新的方法來克服這些錯綜複雜的分析。圖 2-3 顯示，將微小核糖核酸、帶有多串腺苷之去氧核糖核酸橋梁以及螢光探針混合於微量管中，利用梯度雜合的方法在不同熔點溫度下將微小核糖核酸互補到去氧核糖核酸橋梁的 3' 上，接著將溫度下降至 20°C 使螢光標幟的 DNA 探針黏合到橋梁的 5' 上。之後利用 T4 去氧核糖核酸結合酶的特性，將微小核糖核酸和螢光探針連結與橋梁形成較長的雙股核苷酸。待反應結束後，去除不必要的鹽類，將反應產物注入毛細管中進行分離，而未被結合的去氧核糖核酸 (10 bp) 因其氫鍵少，很容易在變性電泳的條件下就被展開<sup>[8]</sup>，藉此達到特異性之偵測。

本實驗利用高濃度共聚物的控制和夾板式結合反應的輔助，不僅增加分離的解析度與特異性，還可達到一根毛細管中同時分離多種相似長度的 miRNAs。實驗中的緩衝溶液是以具篩分作用的 PEO-PVP 聚合物來分離 DNA、RNA。在實驗前先以 5% PVP 溶液對毛細管進行塗覆的動作，再將配置好具有篩分能力的 1.5% PEO + 0.5% PVP (含 7 M 尿素) 共聚物溶液，以高壓氮氣使其注入於毛細管中，並藉由電

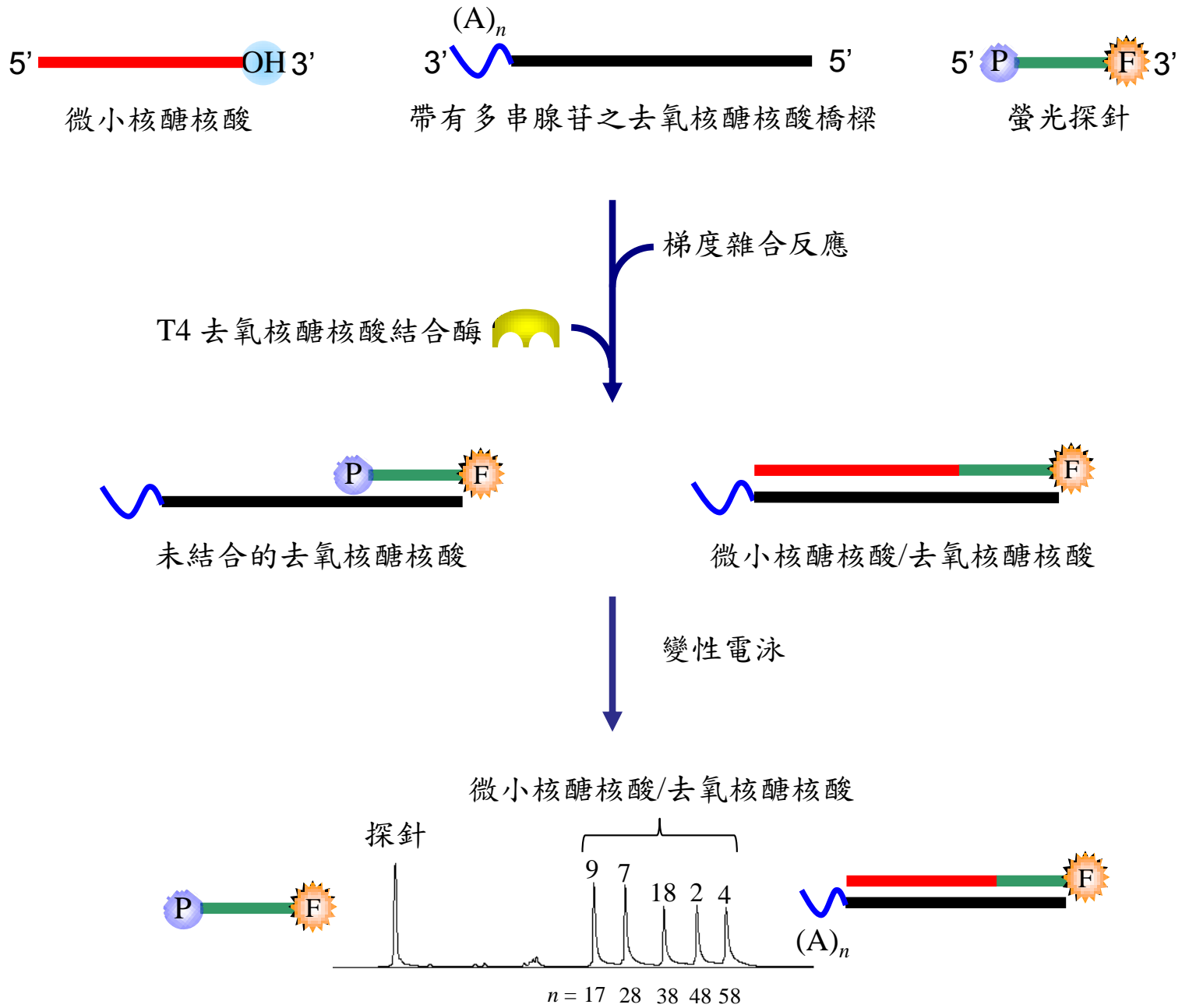
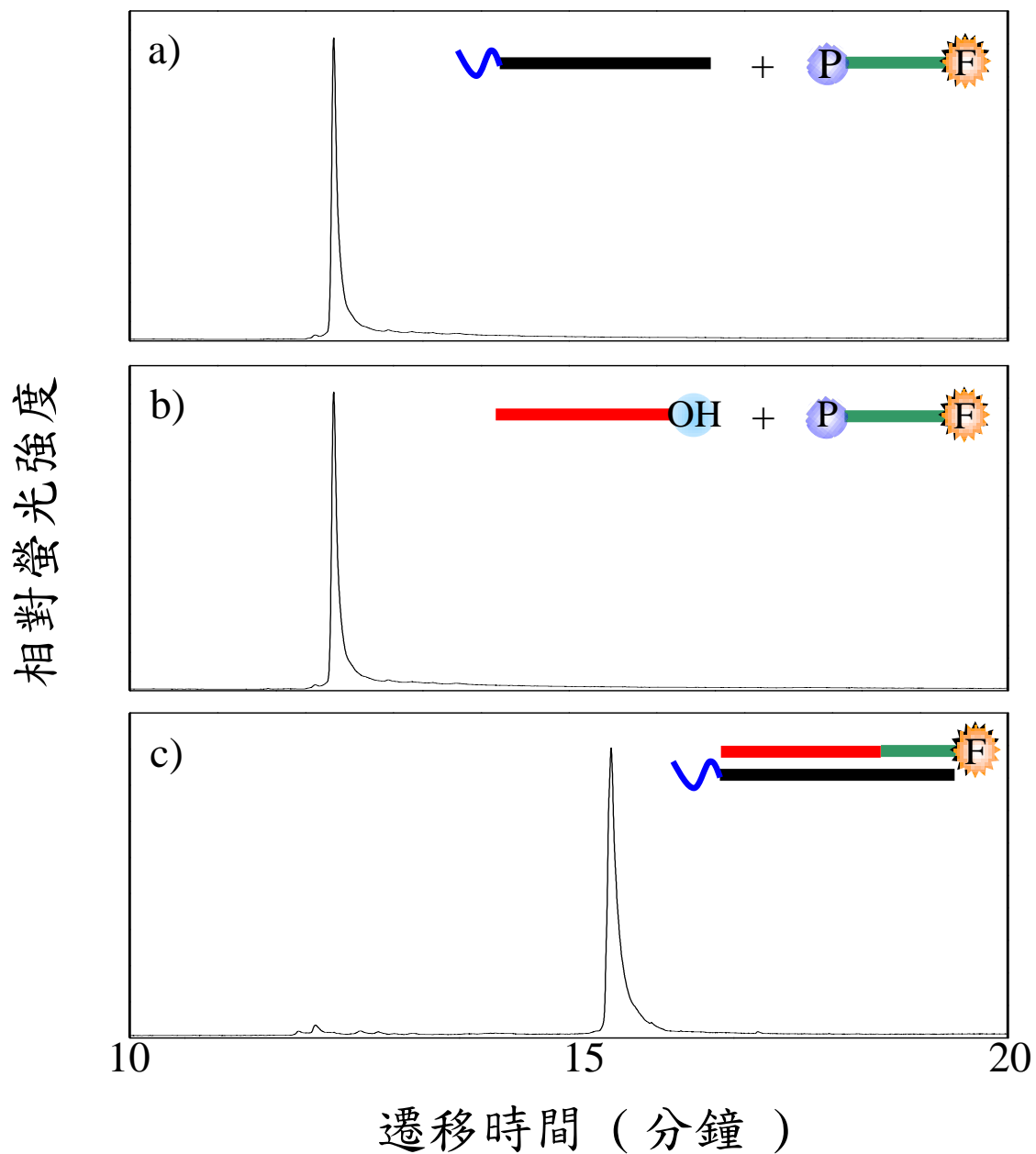


圖2-3 毛細管電泳搭配夾板式結合反應之實驗流程圖

動力進樣的方式讓分析物引入管中。由於 DNA 帶負電荷，所以會往正極移動，因此通以一高壓電後，DNA 分子會以不同的淌度往正極的偵測窗口移動。而小片段的 DNA 比大片段的 DNA 易通過共聚合物溶液的孔洞往正極移動，因此探針會先被偵測到，而越長的 DNA 則越晚被偵測到( 圖 2-3 )。

在圖 2-4a 與 2-4b 顯示，這兩種陰性對照組都只有探針的電泳訊號產生，這是因為它們缺少其中一種成分，以致於在結合反應中無法形成更長的雙股 DNA 結構，這個結果告訴我們 probe-to-bridge 或是 probe-to-miRNA 對於完整的雙股產物幾乎沒有任何影響，並不會造成實驗上的誤判。坊間同樣以偵測同位素為基礎的方法，除了需要磷酸酶的處理去減少背景過亂的問題外<sup>[10]</sup>，還要注意同位素輻射所構成的安全問題。我們根據上述之缺點去設計一種全新的方法，不但具有乾淨的電泳背景，而且不會受到輻射線的影響，足以使用在定量分析之應用上。另一方面，夾板式結合反應的效率對於 5' 磷酸根與 3' 氫氧基能否形成 RNA/DNA duplex 中之磷酸二酯鍵，在選擇專一性結合酶上就扮演著相當重要的關鍵。上述可由圖 2-4c 之陽性對照組發現，T4 DNA 結合酶對於 RNA/DNA 雜合產物能夠提供很高之結合效率( > 80% )，幾乎沒有其它副產物產生，證明此結合酶具有良好的專一性<sup>[15]</sup>，足以應用於此實驗之設計上。學生參考前人以 stem-loop RT-qPCR 為工



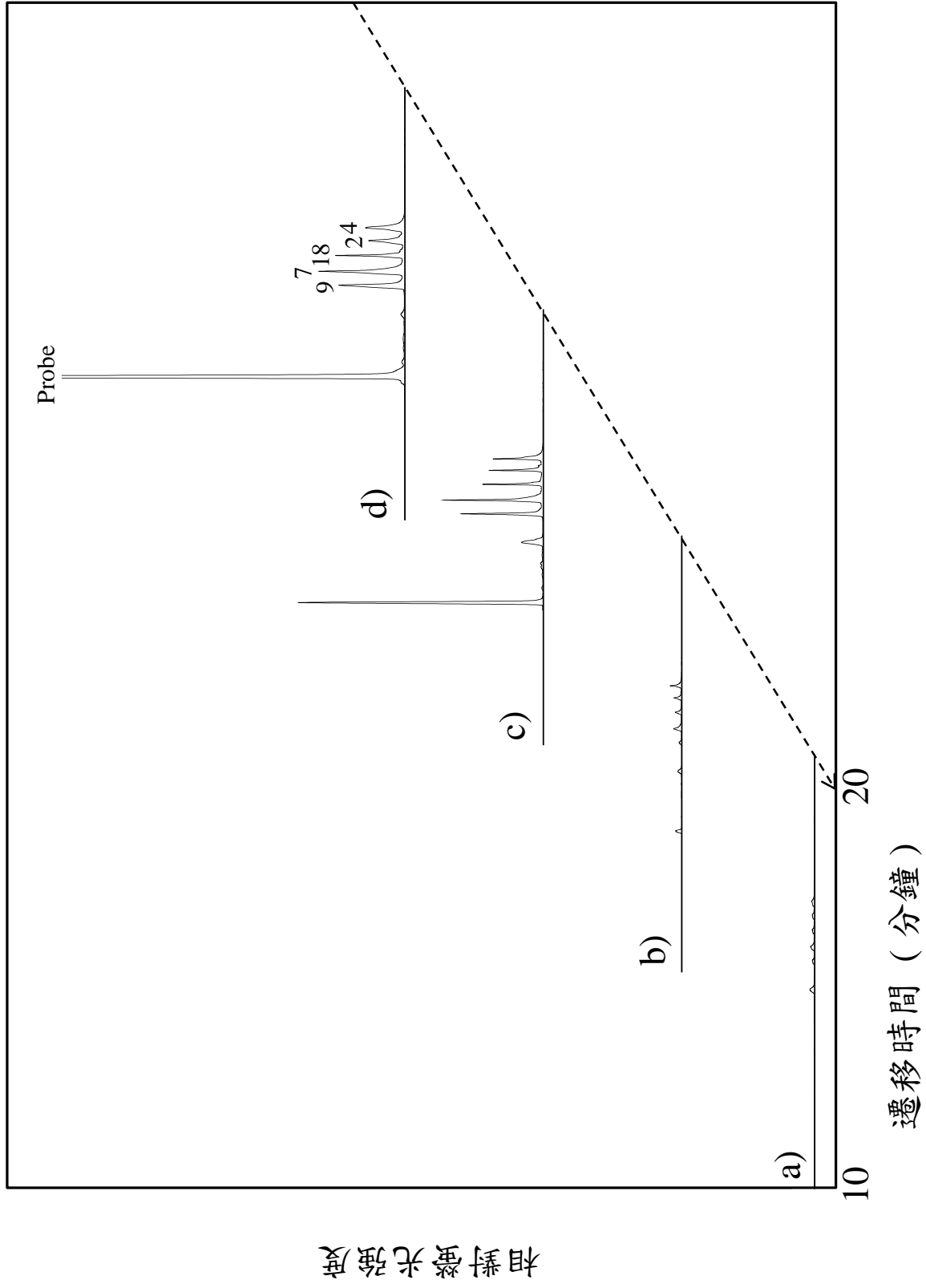
**圖2-4** 夾板式結合反應的可行性：a) 螢光探針 + BART7 去氧核糖核酸橋樑。 b) 螢光探針 + BART7 微小核糖核酸。 c) 螢光探針 + BART7 去氧核糖核酸橋樑 + BART7 微小核糖核酸。

具去鑑定 EBV 中 miRNAs 的表現，發現五種 miRNAs ( 即 BART9, BART7, BART18, BART2, and BART4 )在鼻咽癌細胞中有著高度的表現。有鑑於此，我們就選擇這五種 miRNAs 以互補的方式分別去設計不同長度且具專一性之 bridges ( 表 2-1 )，進行後續之定量實驗。

### 2.3.2 樣品製備對螢光強度之影響

由於 miRNA 可以做為早期疾病檢測的生物指標，但因濃度非常低，所以在雜合反應的過程中總是耗費許多時間去達到穩定狀態。一般我們都會將反應放置過夜以獲得最佳的動力學與熱力學變化，這是因為在不同成分中所形成的雜合產物，會受到表面密度、表面電荷、探針長度以及基質平整度所影響<sup>[16]</sup>；而相同成分中所形成的雜合產物，在濃度增加時越有利於進行雜合反應，基於此因素，學生將探針濃度遠大於 miRNAs 之濃度，希望藉此能大量縮短反應時間，以提供臨床所需之快速篩選。然而，合成之螢光探針難免殘有一些不純物質，而這些雜質在電泳圖中會產生很高的背景干擾訊號，嚴重影響分離之解析度，尤其在分析低濃度之 miRNA 時特別明顯。為了解決這個問題，我們以不同濃度之酒精純化的方式，期盼能夠將大量探針訊號去除之外，還能夠保有大部份的反應產物於電泳圖中。其結果顯示於圖 2-5 中，隨著酒精濃度由 70% 減少至 60% 時，探針的訊號明顯減少許多，而反應

產物基於核酸長度較長對酒精的溶解度也較低之原因，所以在 60% 濃度以上時皆能使產物保留於微量管中。由以上推論得知，60% 酒精濃度正符合我們最佳化之條件。此外藉由 tandem adenosine-tailed bridge DNA 的長度不同，使 5 種 miRNAs 能夠於變性電泳中完整的分離出 5 根高理論板數之波峰，這證明此方法的確有潛力可以在一根毛細管中同時偵測多種相似長度但序列不同之微小核糖核酸，對於臨床醫學所需之大量篩選，亦有莫大幫助。進一步，學生希望分析 miRNA 能夠達到以秒為等級之反應時間。所以為了提升雜合反應效率，我們將 probe 與 bridge 濃度增加為 100 nM，期望能夠偵測接近 pico 等級之莫爾濃度。而有趣的是反應時間越長( 超過一小時以上 )卻沒有獲得更高訊號之趨勢，可能是因為加熱時間過久導致樣品衰敗，亦或反應時間太長造成樣品吸附於反應試管上。儘管如此，節省時間的方法除了提供生物分子在進行微量分析時，不會吸附於玻璃或塑膠表面上之外，還能夠更快速且精準的定量目標 miRNA 作為癌症篩選之生物指標。根據以上所得之最佳化條件，我們想知道此方法的偵測極限是否有潛力作為分析癌細胞中 miRNA 的工具，其結果由圖 2-6 與 2-7 所顯示，此方法的線性範圍可以包含三個數量級( 從  $10^{-9}$  到  $10^{-12}$  M )。而在進樣體積為 13 nL 時( 10 秒 )，可由 BART9 DNA 的訊號推算出其偵測極限(  $S/N = 3$  ) 低至  $1.9 \times 10^{-13}$  M ( 2.5 zeptomole )， $y = 2.3110 \times 10^{14}x + 421$ ， $R^2 = 0.9998$



**圖2-5** 酒精濃度對5個BART DNAs螢光訊號的影響：a) 40%酒精洗4次。 b) 50%酒精洗4次。 c) 60%酒精洗4次。 d) 70%酒精洗4次。



，證明此方法確有潛力成為實用之臨床診斷工具。此外，隨著 BART DNAs 濃度增加，介於 BART9 與螢光探針之間的波峰會變得越混亂，我們推測的結果主要是因為在純化的過程中加入了 formamide，會導致部分的 bridge DNA 上之 poly adenosine 斷裂<sup>[17]</sup>，造成電泳淌度的改變。然而，這些都需要再進一步的去證明。

### 2.3.3 由 EB 病毒感染之鼻咽癌細胞中鑑定 miRNAs

本篇論文主要針對癌細胞中高度表現之 miRNAs 設計，因此在臨床應用方面則以 EB 病毒感染之鼻咽癌細胞去進行可行性測試。而沒有受到 EB 病毒感染之 HK-1 細胞株則被當作陰性的對照組來比較。圖 2-8a 顯示，除了過量的螢光探針於電泳圖中有所表現之外，其他正面的訊號皆沒有任何反應，這表示我們的方法在分析複雜的人類 RNA 樣品中有著高度專一之篩選能力。圖 2-8b 為 EB 病毒感染之鼻咽癌細胞之電泳結果，可以明顯的看到 4 根波峰出現，分別是 BART9、BART7、BART18 以及 BART4，我們利用標準添加法將上述加以定量得到的結果分別為  $2.2 \times 10^{-10}$  M、 $1.0 \times 10^{-10}$  M、 $2.7 \times 10^{-11}$  M 及  $2.6 \times 10^{-11}$  M。相較於前人的結果，BART2 轉錄的程度應該與其他 4 種成熟 BART miRNAs 相似才對<sup>[18,19]</sup>。然而，學生觀察電泳圖的結果卻是 BART2 明顯的小於其他 4 種 miRNAs，旁邊還出現未知的訊號，而這類訊號我們

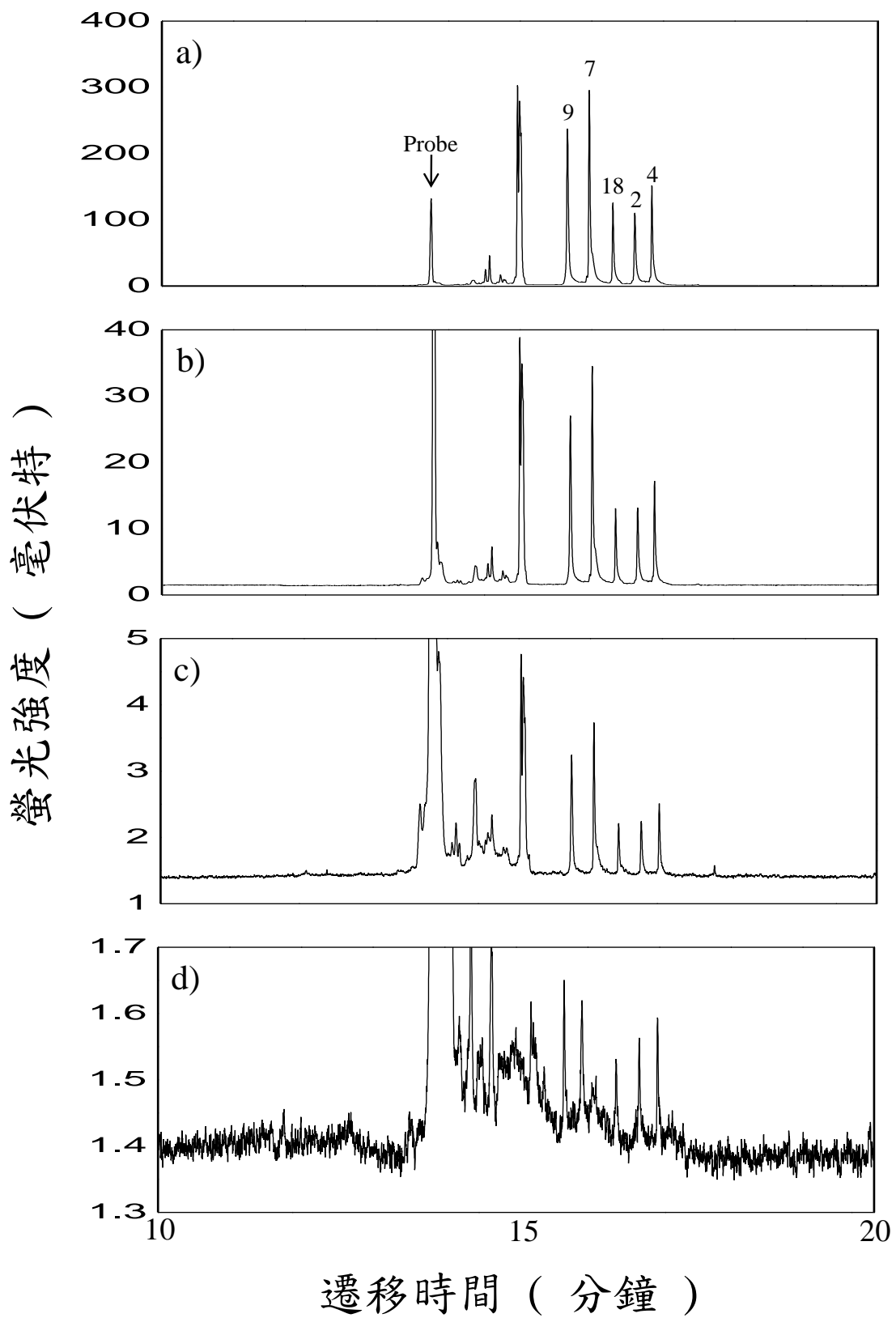


圖2-6 5個BART DNAs之線性範圍：a)  $1.0 \times 10^{-9}$  M。 b)  $1.0 \times 10^{-10}$  M。 c)  $1.0 \times 10^{-11}$  M。 d)  $1.0 \times 10^{-12}$  M。

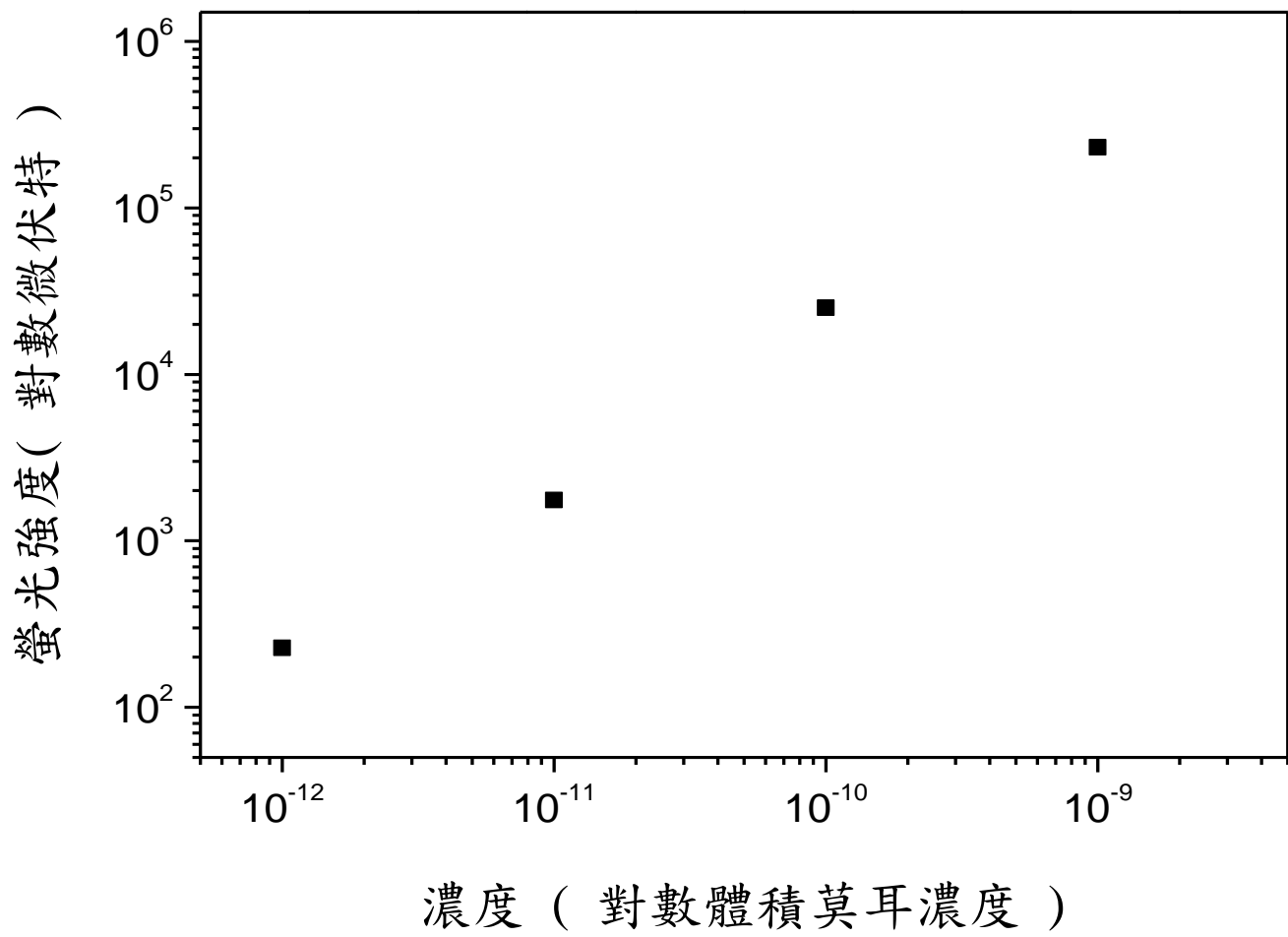


圖2-7 BART9螢光強度對濃度之檢量曲線

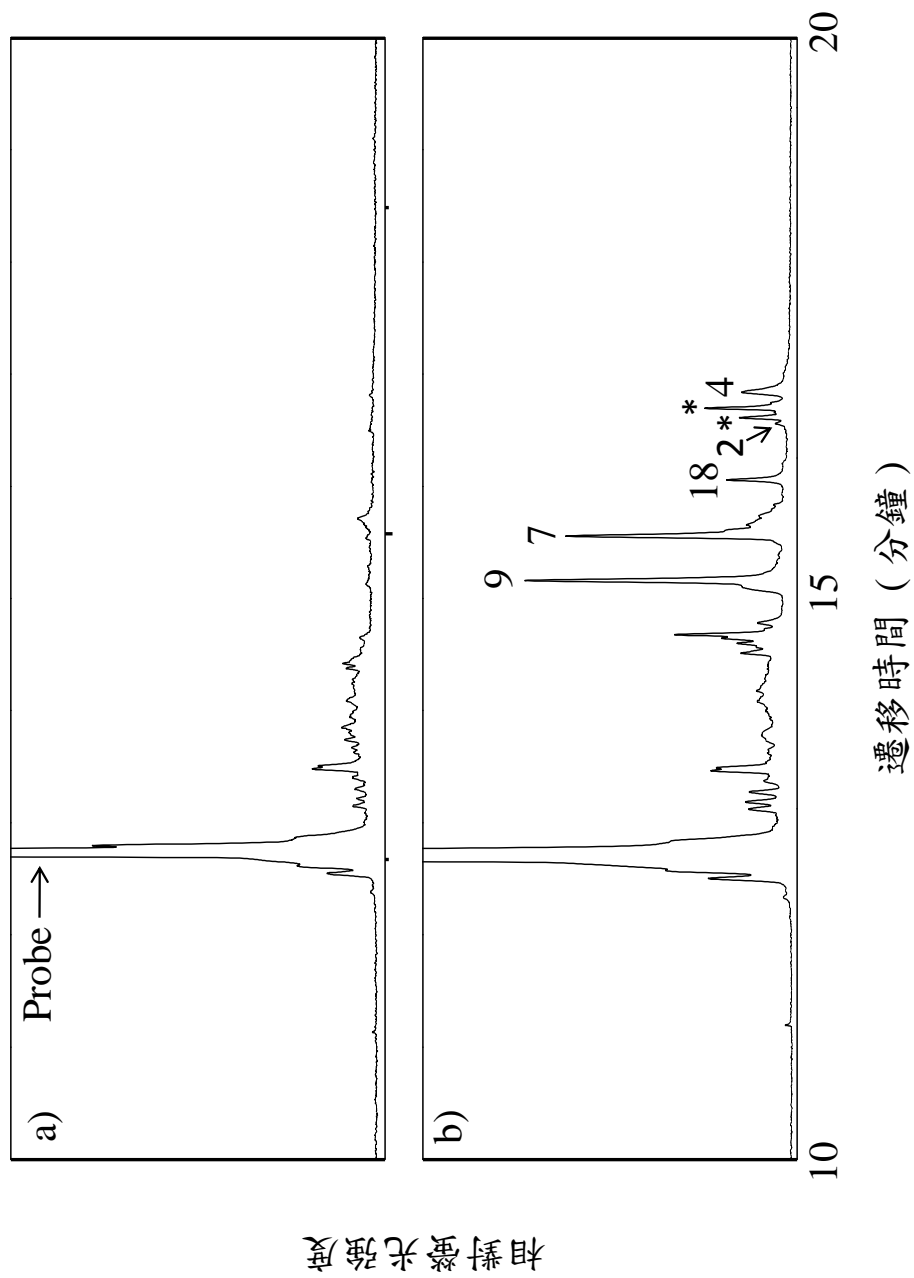


圖2-8 真實樣品：a) HK1。b) C6661(感染EBV)。

推測可能是 BART2 的長度所影響。不過根據實驗設計，miRNAs 的 3' 必須保持在一個不變的長度，才能與 5' 帶有磷酸根之探針結合，因此初步推測的結果為 BART2 miRNA 的 5' 多了數個核苷酸，導致反應產物在電泳中的淌度改變影響了遷移時間。為了證實這個假設，學生先將合成的 BART2 DNA 5' 刪去兩個核苷酸(即 BART2-2nt)，與 5 種合成的 BART 核苷酸一同於電泳中進行分離。由圖 2-9a 可以很明顯的看出 BART2-2nt 的訊號與 BART2 的位置重疊，因此合成的 BART2-2nt 沒有辦法於 1.5% PEO + 0.5% PVP 共聚合物溶液中與 BART2 分離。接下來我們將 BART2 的 5' 增加了 2 個核苷酸(即 BART2+2nt)，再進行上述分離。結果顯示於圖 2-9b，BART2+2nt 恰好介於 BART2 與 BART4 中間，與我們假設結果相符。最後我們需要更有力的結果去證實這個假設，因此又在 BART2 的 5' 增加了 5 個核苷酸(即 BART2+5nt)，得到的結果與預期相同，BART2+5nt 比 BART2 以及 BART2+2nt 都還要慢上許多，幾乎已經接近 BART4 的位置了(圖 2-8c)。綜合以上結果，得知增加 2 nt 與 5 nt 會導致遷移時間變慢，而這個情形都要歸功於增加的核苷酸與 poly-adenosine bridge DNA 所形成的非配對結構，因此在高黏度的聚合物溶液存在下會有較慢的淌度去進行電泳分離。最後這些意外的電泳訊號可能是因為 primary EBV miRNA 在轉錄的過程中沒有完全的切除<sup>[20]</sup>，導致 isomiR 的存在。

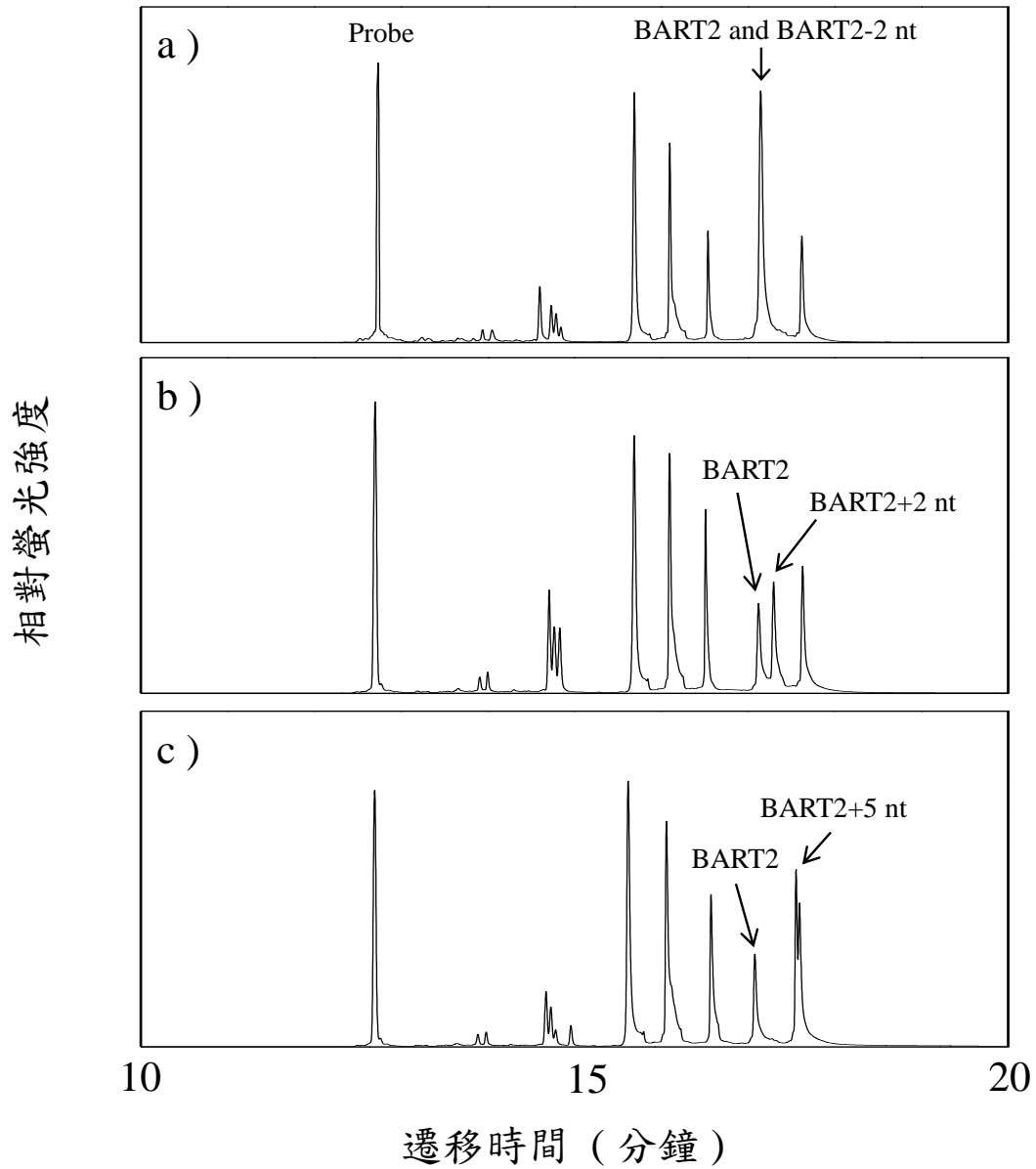


圖2-9 驗證isomiRs的存在： a)BART2-2nt。 b) BART2+2nt。 c) BART2+5nt。

## 2.4 結論

本篇論文報導一種全新的方法去偵測 miRNAs，其原理是利用 tandem adenosine-tailed DNA bridge-assisted splinted ligation 結合變性毛細管凝膠電泳暨雷射誘發螢光作為分析癌細胞之工具，而此方法以毛細管電泳為基礎具有以下優點如：快速、不需聚合酶放大、高通量、經濟等多項優點，使得毛細管電泳能夠成為實用之基礎工具去鑑定 miRNA。由電泳的數據證明我們的方法可以在一根毛細管中分離數種相同長度的 miRNAs，僅需一種螢光探針即可辨識所有的 miRNA，以及非常微量的樣品需求，這比起一般商業化的產品還要更經濟實惠，對於實驗成本的開銷亦有莫大之助益。亦意外的報導，這經濟之方法可以在 EB 病毒感染的鼻咽癌細胞中快速篩選出不同長度的 isomiRs 以及定量成熟的 miRNAs。如果將此方法結合自動化之毛細管陣列電泳<sup>[21]</sup>，與完整的微流體裝置<sup>[22]</sup>，對於能夠同時篩選數百種 miRNAs 或少數重要 miRNAs 指標的長度檢驗，以及達到超靈敏偵測之特性，似乎並不是那麼遙不可期的。最後在下一章希望利用雙波長偵測技術同時於單毛細管電泳實驗比較正常細胞與癌細胞內特定微小核酸之差異性。實驗過程可選擇以兩種雷射進行激發及挑選兩種染料標幟於 DNA 探針上。假若可如預期進行雙波長偵測，除了可望提供外科醫師一個區分腫瘤與正常組織之參考工具之外，亦期望能增加技術產業化的機會。

## 2.5 未來展望

在本實驗中已經確定能夠分離五種相似長度( 22~23 nt )的 miRNAs，如果藉由改善其他的分離條件以及加長 bridge DNAs 上的 poly adenosine，相信在未来應該可以於一根毛細管中分離數百種 miRNAs。值得注意的是在本實驗中，我們只用了一種螢光探針就能辨識出所有的 miRNAs，若是使用兩種不同波長的螢光探針，應該可以大大提高分離的效率進而同時偵測兩種不同的樣品。

此外，ligation 產物曾經樣品純化過後，才於電泳上進行分離。但是在純化的過程中，難免會造成些微的損失，導致電泳的結果無法非常準確的定量，因此若以正常的細胞標幟一種螢光作為標準品，與標幟另外一種螢光之癌症細胞同時進行電泳分離，進而去定量微小核糖核酸的表現，應該能得到更加客觀的實驗結果。

雖然本實驗可以分離數種相似片段的 miRNAs，但是對於分離的解析度仍無法達到單一核甘酸的程度。對此末學將期待日後學弟妹們能致力於改善凝膠介質的條件，希望能夠開發出在一根毛細管中同時篩選不同癌症疾病內之百種 miRNAs 表現，對人類基因學貢獻一份微薄的心力。



## 2.6 參考文獻

1. S. Xu, C. Xue, J. Li, Y. Bi and Y. Cao. (2011) Marek's disease virus type 1 microRNA miR-M3 suppresses cisplatin-induced apoptosis by targeting Smad2 of the transforming growth factor beta signal pathway. *J. Virol.*, **85**, 276-285.
2. H. zur Hausen. (1991) Viruses in human cancers. *Science*, **254**, 1167-1173.
3. A. Jemal, T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R.C. Tiwari, A. Ghafoor, E.J. Feuer and M.J. Thun. (2005) Cancer statistics, 2005. *CA. Cancer J. Clin.*, **55**, 10-30.
4. P. Perco, R. Rapberger, C. Siehs, A. Lukas, R. Oberbauer, G. Mayer and B. Mayer. (2006) Transforming omics data into context: bioinformatics on genomics and proteomics raw data. *Electrophoresis*, **27**, 2659-2675.
5. W. Zhong and E.S. Yeung. (2003) High-throughput analysis of total RNA expression profiles by capillary gel electrophoresis. *Anal. Chem.*, **75**, 4415-4422.
6. H. Tian, L. Cao, Y. Tan, S. Williams, L. Chen, T. Matray, A. Chenna, S. Moore, V. Hernandez, V. Xiao *et al.* (2004) Multiplex mRNA assay using electrophoretic tags for high-throughput gene expression analysis. *Nucleic Acids Res*, **32**, e126.
7. H.A. Khan. (2004) Detection and semi-quantitative determination of low abundance GFAP mRNA in mouse brain by capillary electrophoresis coupled with laser-induced fluorescence. *Brain Res Brain Res Protoc*, **14**, 13-17.
8. P.L. Chang, Y.S. Chang, J.H. Chen, S.J. Chen and H.C. Chen. (2008) Analysis of BART7 microRNA from Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **80**, 8554-8560.
9. P.A. Maroney, S. Chamnongpol, F. Souret and T.W. Nilsen. (2007) A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation. *RNA*, **13**, 930-936.
10. P.A. Maroney, S. Chamnongpol, F. Souret and T.W. Nilsen. (2008) Direct detection of small RNAs using splinted ligation. *Nat Protoc*, **3**, 279-287.
11. S. Griffiths-Jones, H.K. Saini, S. van Dongen and A.J. Enright. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, **36**, D154-158.
12. Z. Wang, C. Wang, J. Yin, T. Li, M. Song, M. Lu and H. Wang. (2008) Focusing and stabilization of bis-intercalating dye-DNA complexes for high-sensitive CE-LIF DNA analysis. *Electrophoresis*, **29**, 4454-4462.
13. J.M. Song and E.S. Yeung. (2001) Optimization of DNA electrophoretic behavior in poly(vinyl pyrrolidone) sieving matrix for DNA sequencing. *Electrophoresis*, **22**, 748-754.
14. L.A. Christel, K. Petersen, W. McMillan and M.A. Northrup. (1999) Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration. *J. Biomech. Eng.*, **121**, 22-27.
15. D.R. Bullard and R.P. Bowater. (2006) Direct comparison of nick-joining activity of the nucleic acid ligases from bacteriophage T4. *Biochem. J.*, **398**, 135-144.
16. C. Chen, W. Wang, J. Ge and X.S. Zhao. (2009) Kinetics and thermodynamics of DNA

- hybridization on gold nanoparticles. *Nucleic Acids Res*, **37**, 3756-3765.
17. S. Greer and S. Zamenhof. **(1962)** Studies on depurination of DNA by heat. *J. Mol. Biol.*, **4**, 123-141.
  18. K. Cosmopoulos, M. Pegtel, J. Hawkins, H. Moffett, C. Novina, J. Middeldorp and D.A. Thorley-Lawson. **(2009)** Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.*, **83**, 2357-2367.
  19. S. Pfeffer, A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F.A. Grasser, L.F. van Dyk, C.K. Ho, S. Shuman, M. Chien *et al.* **(2005)** Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods*, **2**, 269-276.
  20. R.D. Morin, M.D. O'Connor, M. Griffith, F. Kuchenbauer, A. Delaney, A.L. Prabhu, Y. Zhao, H. McDonald, T. Zeng, M. Hirst *et al.* **(2008)** Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res.*, **18**, 610-621.
  21. W. Zhong and E.S. Yeung. **(2003)** High-throughput analysis of total RNA expression profiles by capillary gel electrophoresis. *Anal. Chem.*, **75**, 4415-4422.
  22. K.A. Hagan, J.M. Bienvenue, C.A. Moskaluk and J.P. Landers. **(2008)** Microchip-based solid-phase purification of RNA from biological samples. *Anal. Chem.*, **80**, 8453-8460.

## 第三章 以毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光同時偵測成對樣品中特定微小核糖核酸

### 3.1 序論

一般傳統的毛細管電泳使用單一光束來誘發螢光進行量測，其靈敏度高、樣品用量少、易於自動化等優點，一直廣泛地應用在許多基礎研究及臨床檢驗的工作上<sup>[1]</sup>；然而儘管此法應用性不容置疑，但是為了能夠提供外科醫生快速及準確的區分腫瘤與正常組織之實用性，就目前的靈敏度與偵測系統的設計是無法達到的。因此學生希望開發一種以雙波長雷射偵測系統結合樣品濃縮之技術，使之能在一根毛細管中即能同時分辨正常與癌症細胞。

傳統光源激發螢光於 1981 年被 Jorgenson 和 Lukacs 所提出<sup>[2]</sup>，常用的傳統光源有汞、氬等電弧燈。利用一些簡單的濾片特性分離出所需的波長，去激發出特定分子，產生螢光；但由於傳統光源在可見光譜範圍內之連續波長，故必須使用特殊的濾光片、稜鏡或單光器來分離特定的波長，大幅降低激發光的入射光強度而同時也就限制偵測的靈敏度，其偵測極限一般在  $10^{-5}$  到  $10^{-8}$  M 之間。為了能夠提升偵測的靈敏度，目前大部分都以雷射作為激發光源；因其強度高、寬帶窄及同調性的特點，所以容易以透鏡聚焦在毛細管上，在單位面積上產生強烈的能量，能有效提高靈敏度，此種偵測方式稱為雷射激發螢光。

而相關的文獻早在 1985 年就被 McGuffin 提出以 325 nm 氬／鎘雷射作為激發光源，直接利用透鏡聚焦於毛細管內，激發 dansylated amino acids 的螢光<sup>[3]</sup>。另外紫外-可見光(UV-VIS)吸收偵測是目前毛細管電泳應用最廣泛的偵測方法，屬於一種 on-column 的光學檢測法，但礙於毛細管內徑窄而導致偵測光徑短，偵測靈敏度較差；然而其所適用的分析範圍廣，且在儀器上的操作簡單，所以它仍是目前最普遍使用的偵測方法。同樣的為了提高偵測的靈敏度，亦可使用雷射作為光源，進行雙光束(double-beam)校正背景雜訊，能有效提升紫外-可見光吸收偵測的靈敏度與應用範圍。

過去平板凝膠電泳系統能夠在單次分析中同時分離多種生物樣品。然而，在一般的毛細管電泳中想要達到高通量的分析似乎是不太可能的事情，主要受限於毛細管內體積微量化所導致。因此目前已發展能在單次分析中同時偵測數種樣品之毛細管電泳系統。在 1993 年，Taylor 等人成功的發展一套多通道毛細管電泳系統同時分離核黃素(riboflavin)與螢光黃(fluorescein)<sup>[4]</sup>，以及 2007 年由 Götz 和 Karst 所發展的可見光譜(350 nm ~ 800 nm)偵測技術，能夠同時偵測三種不同波長的螢光物質<sup>[5]</sup>。雖然多通道毛細管系統已能夠相仿於平板凝膠電泳之優點，但是為了達到單毛細管即能偵測多種分析物的話，則必須將雷射光束打在偵測窗口上，同時激發窗口內數種標誌有螢光的分析物。

舉個例子，Takahashi 等人利用兩種雷射( Ar<sup>+</sup> 488 nm, YAG 532 nm )同時偵測標幟有 4 種不同螢光染料之 DNA 片段，能夠在 1 小時篩選近 200 個鹼基，證明此方法比傳統單一偵測光源明顯提升了不少通量<sup>[6]</sup>。

Iyer 等人在 2003 年報導了利用雙波長雷射( Ar<sup>+</sup> 488 nm, YAG 532 nm )於單一毛細管中同時偵測 fluorescein isothiocyanate ( FITC )及 Rhodamine fluorescence，以兩台光電倍增管收集訊號<sup>[7]</sup>。因此學生希望以上述的原理，將兩種特定波長的雷射光束利用光學鏡片結合，並同時聚焦於毛細管上，再分別將標準品與待測物標幟有不同的螢光染料，當兩者的混合溶液通過偵測窗口時，會激發出兩種不同波長的螢光分別被兩台偵測器所收集，如預期的一樣，便能應用於臨床檢測上，同時偵測癌症與正常組織之間微小核糖核酸的差異，達到快速、準確及高通量等優點。

有鑑於此學生已於第二章利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光搭配夾板式結合反應，成功的在聚合物溶液中分離出鼻咽癌細胞內 5 種特定的微小核糖核酸，如與現存商業化的方法來比較的話，已具有經濟、快速、高靈敏之基礎條件。然而在定量及高通量的部分，學生期盼能藉由雙波長之光源同時檢測癌症與正常組織，這將有別於前章一次只能分析一種細胞的缺點，不但提高了分離的效率，還能降低實驗間所產生之誤差，亦助此方法在臨床定量上更具有公信力。因此首要面臨

的挑戰包括有 ( 1 )雷射的純度與功率對螢光強度的影響? ( 2 )如何選擇適當的螢光染料去減少光譜間的干擾?( 3 )兩道雷射光如何聚焦以及分光?( 4 )如何減少雷射所產生的散射光?( 5 )兩種螢光是否可獲得相同的斜率。

CE 為近十年來發展相當迅速的微量分析技術，適用於各式各樣的大小分子，只可惜對於生物樣品的分析，依然是力有未逮。其中，最主要受限於注入的樣品量( 10 nL 以下 )以及光徑長度( 100  $\mu\text{m}$  以下 )等問題，使得無法有效降低分析的偵測極限。為了改進上述之問題，有數種技術被提出以增加量測的路徑長度。如 Z 字形毛細管、氣泡狀內徑毛細管、多次反射槽等，但均對於偵測靈敏度的提升成效不大，僅 3 到 10 倍左右。爾後，發展的樣品線上濃縮( on-line concentration )技術為目前最常用來提高靈敏度的方式之一<sup>[8]</sup>，主要是因為不必更改或變換任何儀器設備，可說是既簡便又經濟的方法。其原理是增加毛細管中樣品的注入量，透過不同的分離方式，將樣品聚集成更小的區帶，以提高樣品的相對濃度，此種技術亦稱之為樣品堆積( sample stacking )。以一般 CE 而言，樣品區帶的長度應小於毛細管總長度的 1 至 2%，若樣品超載，則會導致區帶變寬、解析度下降；相反的，在不喪失解析度的前提下，增加樣品注入的體積或區帶長度，以提高樣品區帶內的總莫耳數，再將超載的樣品濃縮成合適的區帶長度，即可有效地增加

偵測的靈敏度。而在 CE 中，大致可分為幾種常用的堆積模式：(a) 場放大堆積法、(b) 毛細管等速電泳法、(c) pH 調控堆積法、(d) 固相萃取法與薄膜濃縮法、(e) 中空纖維濃縮法、(f) 聚合物溶液堆積法等。其中最受注目的為「場放大堆積法( field-amplified sample stacking, FASS )」，主要歸因於製備樣品容易與操作系統簡單。目前已成功地應用於濃縮蛋白質與縮氨酸，其偵測極限可達  $\text{pM}^{[9]}$ 。

本章初期嘗試以聚合物溶液堆積之技術，利用 DNA 分子在自由緩衝溶液( free buffer )與聚合物溶液中電泳遷移率( electrophoretic mobility )的差異，使得 DNA 分子堆積於兩溶液的界面上。主要是利用毛細管中充滿 100 mM, pH 10 的 Tris-borate 溶液時，會產生高電滲流( electroosmotic flow )，將 1.5 % polyethylene oxide ( PEO )溶液導入。但是堆積的時間至少要 8 分鐘以上，才能勉強與前章相近。由於結果不盡理想，學生希望從樣品濃縮的部分著手，利用簡單的方法將大體積的樣品濃縮 10~100 倍，如此一來便能有效的增加偵測之靈敏度，同時縮短進樣的時間。在本研究中，係以高靈敏度之偵測系統對於微量或非常微量之 DNA 樣品進行濃縮，冀望能進一步地應用於實際樣品上。

## 3.2 實驗部分

### 3.2.1 實驗儀器

本實驗所需之實驗儀器由三部分組裝而成：真空濃縮機、聚合酶連鎖反應加熱器、變性電泳系統、雙波長雷射誘發螢光偵測系統。儀器組件包含微量塑膠吸管(tip)、高電壓電源供應器、白金電極、雷射光源、毛細管、凸透鏡、合光鏡(beam combiner)、分光鏡(beam splitter)、接物鏡、雷射濾鏡(laser diode filter)、截斷濾片、干涉濾片、notch 濾片、光電倍增管等，以下將詳細敘述組裝流程與儀器出處。

#### 3.2.1.1 真空濃縮機

本研究中所使用的真空濃縮機，係由英商 Genevac 公司所生產，型號為 DUC-12060-C00，其旋轉盤型號為 DRC-15EPP-048。最大濃縮量為 48 支 × 1.5 mL 試管，亦可針對不同之溶劑調整真空閥門。最大離心力為 250 xg，加熱溫度範圍可達 80°C，附內藏式自動洩壓裝置與計時器，能夠準確地濃縮 DNA 與 RNA 樣品。

#### 3.2.1.2 聚合酶連鎖反應加熱器

如 2.2.1.1 節所述。



### 3.2.2 鏡片選擇

首先針對實驗室三種染料波長(Alexa Fluor 488、532、647)去購買所需之合光鏡及分光鏡。其中合光鏡的作用是在 $45^\circ$ 角的平面，利用長波長通過而短波長反射的原理，將兩道雷射整合成一道光束。系由美商 Semrock 公司所生產，分別購有：LM01-503 其反射的波段 473 ~ 491 nm，穿透為 514 ~ 647 nm；LM01-552 其反射的波段 514.5 ~ 543.5 nm，穿透為 561 ~ 790 nm。再來分光鏡亦是相同之原理，系由美商 Semrock 公司所生產，根據螢光所選擇的有 FF648-Di01，能讓長波長( 658~700 nm )螢光通過及短波長( 400~629 nm )螢光反射，只是無法長時間受雷射光照射。因此分光鏡的前面我們會遮一個 notch 濾片，不但可以延長分光鏡使用的壽命，同時能夠過濾掉散射的雷射光，型號為 NF02-488S、NF01-532U、NF03-633E，購自美商 Semrock 公司。干涉濾片則選用美商 Edmund 公司所生產的 interference 515 nm、550 nm、671 nm。截斷濾片同樣也為 Edmund 公司所生產的，其截斷的波段分別為：OG-515、OG-550、RG-665。

### 3.2.3 雙波長雷射誘發螢光偵測系統

#### 3.2.3.1 雷射光源與螢光染料

延續前一章所使用的雷射誘發螢光系統並加以改良。主要是因為

螢光放射是一種高靈敏度的偵測法，尤其是搭配雷射作為激發光源，可於 CE 中達到單一分子或單一細胞內組成的偵測；但是螢光所發射的光譜為一連續的波段，所以在兩種不同波長的螢光物質進行偵測時，為了避免光譜間的重疊而產生不必要的干擾，以及達到較好的靈敏度，第一要務便是審慎選擇適合的雷射波長以及螢光染料。目前市面上常被用來作為 CE 的光源有固態(solid-state)雷射、氬離子(Ar-ion)雷射、氦氖(He-Ne)雷射，以及價格昂貴的紅寶石(Nd:YAG)雷射，其中紅寶石雷射要價一兩百萬台幣左右，因此我們實驗室為了發展便宜及經濟之方法，故都以成本較低的固態、氬離子以及氦氖雷射為主。現有的雷射波長分別為：405、488、532、543.5、632.8 及 635 nm。在實驗初期，我們先以常見的紅光染料(Alexa Fluor 647)與橙光染料(Alexa Fluor 532)測試此方法之可行性，結果發現 Alexa Fluor 532 的螢光訊號會穿透 OG-665 的截斷濾片至光電倍增管，產生不必要的干擾。因此學生則改以 Alexa Fluor 488 的螢光染料對上 Alexa Fluor 647 的螢光染料來作為本次研究的特色之一，冀望能達到更甚前章之靈敏度。

### 3.2.3.2 偵測系統

本研究最後所選用的激發光源分別為 635 nm 及 488 nm。其中 635 nm 係由中國大陸 Changchun New Industries Optoelectronics Tech.公

司所生產的固態雷射，其主要激發波長為 635 nm，功率為 10 mW，由於此雷射的雜訊較其他雷射大，因此我們會在雷射前端加裝一個雷射濾片 LD01-640 過濾不純的雷射光，此濾片購自美商 Semrock 公司。另外一個 488 nm 係由美商 JDS Uniphase 公司所生產的氬離子雷射系統，主要激發波長為 488 nm，功率範圍可從 8.8 ~ 64 mW，在偵測時都固定為 20 mW。圖 3-1 顯示，我們利用雙波長毛細管電泳暨雷射誘發螢光，將兩種不同波長的雷射以 90° 角的方式交會於一合光鏡(LM01-503)上，利用聚焦鏡使兩道不同折射率之光束合併並聚焦於分離毛細管末端窗口上激發樣品，由該偵測點上所發出的螢光會先經由物鏡(objective)收集，再穿過一 notch 濾片消除大部分的雷射光，最後經由分光鏡以特定波段(400 ~ 629 nm)反射與(658 ~ 700 nm)穿透的特性，將兩種螢光分子分別由兩台光電倍增管進行收集，企圖發展一快速、高靈敏之雙波長雷射偵測系統。

### 3.2.4 變性電泳系統

如 2.2.1.3 節所述。

### 3.2.5 實驗試藥

如 2.2.2 節所述。

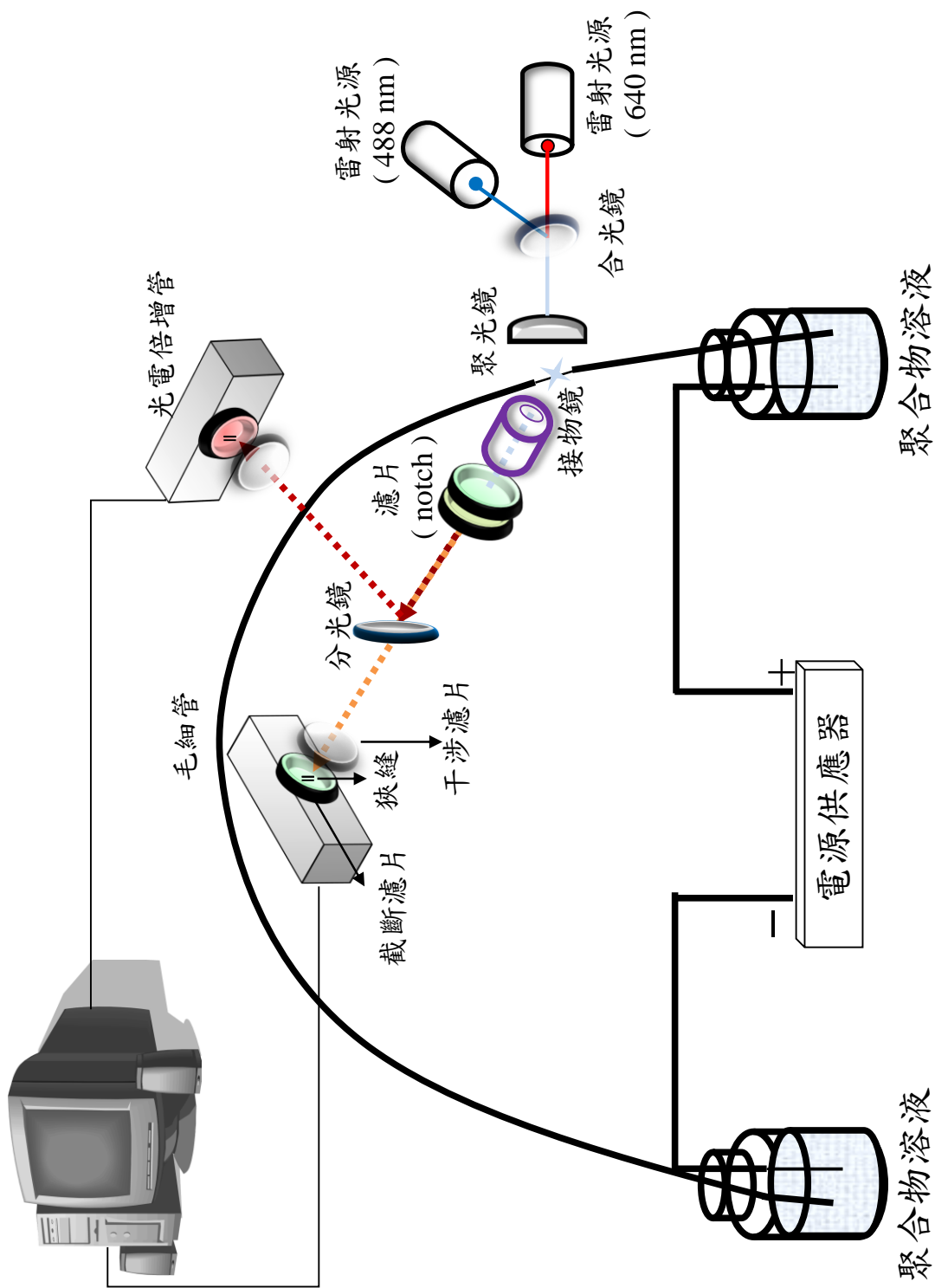


圖3-1 毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光裝置圖

### 3.2.6 細胞培養( cell culture )及 RNA 萃取( RNA extraction )

如 2.2.3 節所述。

### 3.2.7 樣品濃縮

首先將樣品取出 20  $\mu\text{L}$  於微量離心管中，待濃縮機溫度上升至 30  $^{\circ}\text{C}$  左右時( 以縮短濃縮時間 )，再進行濃縮。由於微量的 DNA 樣品很容易吸附於管壁上，因此我們在稀釋樣品時都會添加 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  的 yeast RNA，來增加樣品濃縮時的回收率。此外在抽真空的過程中切莫完全抽乾，這是因為抽太乾會導致樣品完全吸附於管壁上，而無法回溶，所以最好能夠控制在僅剩 0.5  $\mu\text{L}$  以下。接著開始進行濃縮，大致分為兩個部分，首先約略估計從 20  $\mu\text{L}$  到 2  $\mu\text{L}$  的時間為多少( 30 $^{\circ}\text{C}$  時約 30 分鐘 )。第二，以一分鐘為單位慢慢將剩餘的溶液，抽至 0.5  $\mu\text{L}$  以下。最後再以水回溶至 2  $\mu\text{L}$  去進行雜合反應( hybridization )。

### 3.2.8 雜合反應( Hybridization )及夾板式結合反應( Splinted Ligation )

本章所使用的探針分別接有不同的螢光物質，如：Alexa Fluor 488、647。因此在配置雜合反應溶液時，會將不同螢光物質的探針於不同試管中先進行雜合反應。待結合反應完成後，將兩試管以 1:1 的比例混合，最後經變性電泳即可將兩種癌症以不同顏色的訊號分離出數種相似長度的 miRNAs。詳細的配置步驟請參閱第二章。

### 3.2.9 聚合物溶液的製備

本實驗所用的共聚合物溶液均為 1.5 % 的 PEO 與 0.5 % 的 PVP 溶於 2X 的 TGA 緩衝液中，pH 7.5。詳細的配置步驟請參閱第二章。

### 3.2.10 毛細管前處理

請參閱 2.2.6 節。

### 3.2.11 樣品純化

根據前章推論的結果，以前人利用 DNA 不溶於酒精而離子鹽能溶於酒精的特性，作為純化樣品之方法，雖能有效的去除不純物之干擾及降低成本上的開銷，但勢必也會損失部分的分析物，直接影響此方法在定量上的準確度。有鑑於此，學生希望將結合反應完之產物以 1：1 的比例均勻混合，再取 20  $\mu\text{L}$  出來與 190  $\mu\text{L}$  的 2.5 % formamide + 60 % EtOH 均勻混合及離心第一次，接著取出上清液後再加入 60 % EtOH 190  $\mu\text{L}$  離心第二次，最後再以 80 % EtOH 反覆上述兩次。如此便能有效的減少實驗間產生之誤差與損失，更可準確定量出兩種癌症間相對之差異。詳細步驟請參閱 2.2.7 節所述。

### 3.2.12 實驗流程

毛細管處理的部分與第二章相同。在進行電泳分析之前，利用注

射器將 1.5 % PEO + 0.5 % PVP 聚合物溶液充滿整個毛細管，而毛細管前後端皆為聚合物溶液，為一連續性之系統。隨後，再利用 200 V/cm 的電場，將所需的樣品體積以電動力進樣( electrokinetic injection )的方式注入毛細管內。當樣品進行分離時，利用高濃度的 PEO 溶液作為分離的介質。詳細步驟請參閱 2.2.8 節所述。

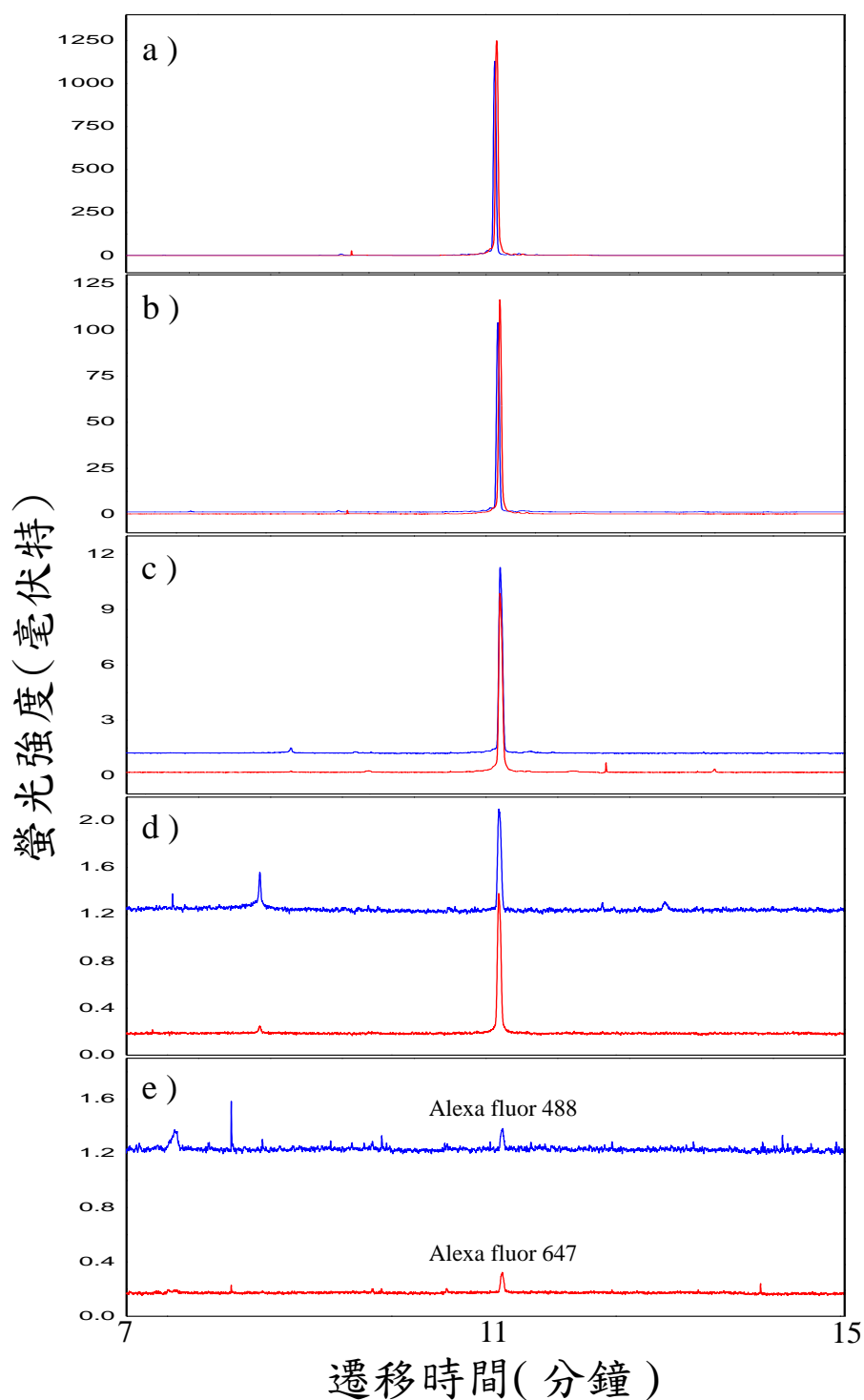
### 3.3 結果與討論

#### 3.3.1 雙波長雷射之偵測特性

使用雙波長雷射系統能夠在成對的樣品中同時偵測兩種不同的螢光訊息。其中 488 nm 氬離子雷射被用來當作陰性的對照組，去激發 Alexa Fluor 488 之標準樣品，最大發射波長為 519 nm。640 nm 固態雷射則為正面的控制組去激發標幟有 Alexa Fluor 647 之未知樣品，最大發射波長為 665 nm。由圖 3-2 顯示，雙波長雷射偵測兩種螢光探針之電泳圖。其最大的優點在於相同的時間，就能得到雙倍的數據量。如果應用在臨床偵測時還可以忽略檢量線的需求以及人為因素的誤差，不須進行定量即能直接比較腫瘤與非腫瘤的區塊去進行切除，不僅減少分析的時間，同時也控制了不規則的分析參數。目前已有非常多的學者們，根據這個議題去進一步的縮小樣品遷移時的差異，這我就不一一贅述。總之此方法能夠直接添加相同的標準品去定量不同樣品間的濃度，不但有效的縮短分離時間，還可減少實驗間的相對誤差。

由於前章之單波長誘發螢光系統所能偵測的線性範圍為  $10^{-9} \sim 10^{-13}$  M，因此學生在雙波長系統裡同樣的也能夠達到相同的靈敏度。圖 3-3 顯示，以雙波長雷射同時對 Alexa Fluor 488 與 Alexa Fluor 647 probe 測量，所得到的線性範圍從  $10^{-9} \sim 10^{-13}$  M，證明 Alexa Fluor 488 與 647 能夠同時應用在真實樣品的偵測上。其斜率分別為  $1.1294 \times 10^{15}$ 、





**圖3-2** 雙波長雷射偵測兩種螢光探針之電泳圖。藍色為標幟Alexa Fluor 488之核酸探針，紅色為標幟Alexa Fluor 647之核酸探針：a)  $1.0 \times 10^{-9}$  M。b)  $1.0 \times 10^{-10}$  M。c)  $1.0 \times 10^{-11}$  M。d)  $1.0 \times 10^{-12}$  M。e)  $1.0 \times 10^{-13}$  M。

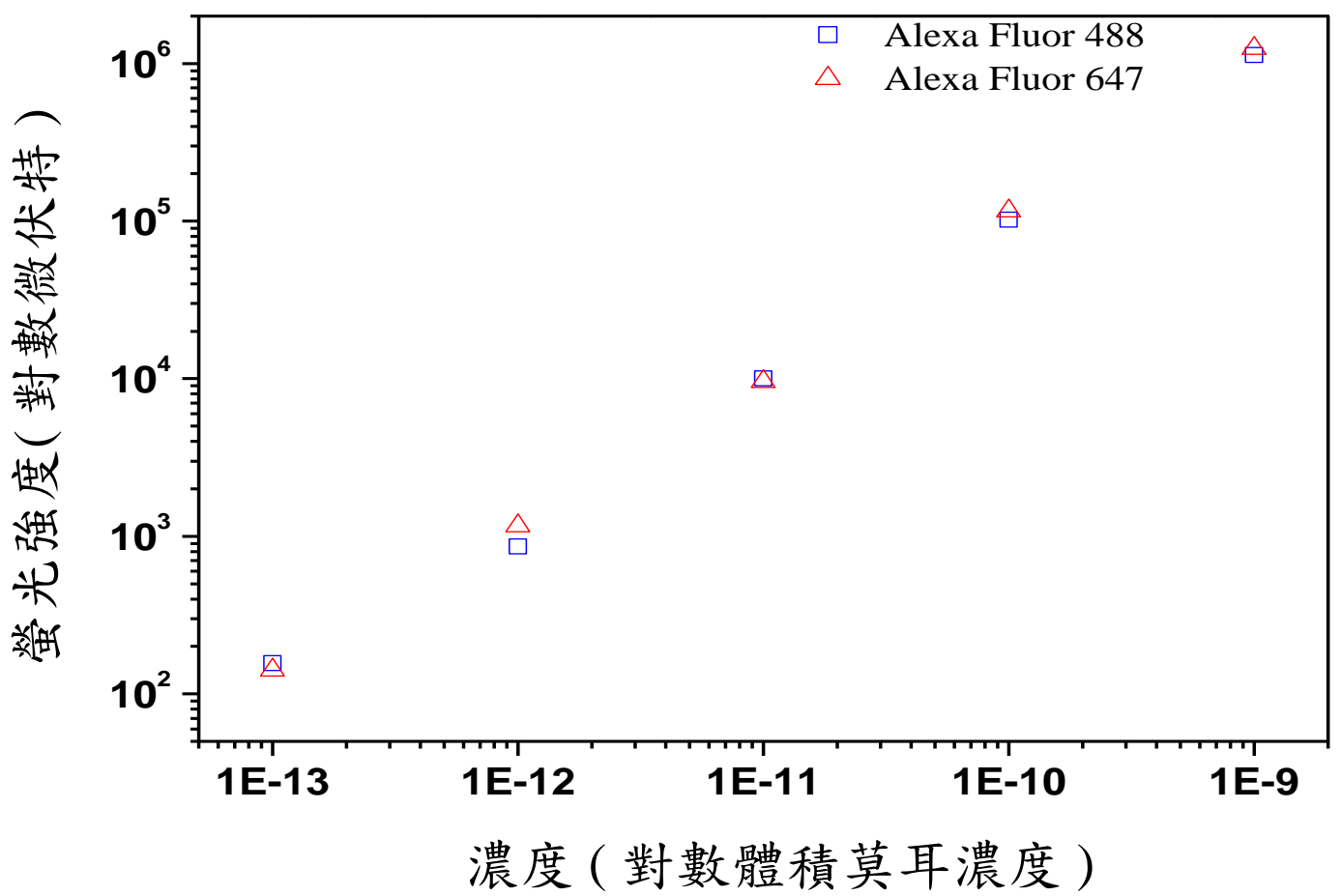


圖3-3 兩種螢光探針之螢光強度對濃度作圖

$1.2481 \times 10^{15}$ ，說明兩者訊號強度並不會因為吸收係數的不同而影響，主要是因為調整光電倍增管的電阻，來達到相同的螢光強度。 $R^2$  分別為 0.9998、0.9999，證明此方法確有潛力成為實用之臨床診斷工具。

### 3.3.2 樣品濃縮對螢光強度的影響

毛細管電泳具有高解析度、較短的分析時間、較少的樣品和溶劑用量等優點，而被廣泛的應用在許多不同的領域。雖然毛細管電泳相較於傳統的液相層析，具有較高的分離效率，但它在生化樣品分析應用上面臨了基質的嚴重干擾，使得偵測極限仍未達理想，而需要進行樣品前處理，造成分析步驟的繁瑣而有較長的分析時間。因此我們已於前章利用夾板式結合反應(splinted ligation)，直接地從複雜的生物樣品中分析出數種微小核糖核酸。當然這僅是從非常微量的樣品中去偵測，假設從生物體取得的樣品具有複雜的基質和低濃度的特性，導致分析時樣品訊號受到干擾或壓抑，而原始樣品的濃度則可能未達儀器的偵測極限，而無法被偵測，此時分析生物樣品常常需借助樣品濃縮來降低分析時的偵測極限。有鑑於此，學生將目標體積濃縮 10 倍去進行可行性之測試。首先將高濃度的 2 BART DNAs(9、7)稀釋至含有 10 ng/ $\mu\text{L}$  的 yeast RNA 中，目的是希望在濃縮的過程中能減少 DNAs 的吸附。接著取出特定的濃度( $10^{-9} \sim 10^{-13}$  M)10  $\mu\text{L}$  並放置在真空濃縮

機進行乾裸(詳步驟請參閱 3.2.7 節)，最後回溶於 1  $\mu\text{L}$  的溫水做雜合反應及結合反應(詳步驟請參閱 3.2.8 節)。結果如圖 3-4 所示，藍色的線代表 Alexa Fluor 488 所產生之訊號，紅色部分則為 Alexa Fluor 647。從 a)到 e)分別為  $10^{-9} \sim 10^{-13}$  M，證明此方法的線性範圍可以包含四個數量級，更勝前章最低所能測到的初始濃度達 100 倍左右(前章 5 BART 初始濃度為  $10^{-11}$  M)。這都要歸功於樣品濃縮了 10 倍之後，訊號也跟著增加 10 倍，此結果證明樣品加入了少量的 yeast RNA(10 ng/ $\mu\text{L}$ )的確可以有效的去抑制管壁的吸附。此外，學生在前章以酒精純化樣品中之鹽類，除了能夠達到良好的解析度之外，同時亦會使樣品中的目標損失，導致回收率不佳(減少一個數量級)。因此為了解決回收率不佳等問題，學生在純化的部分，第一、二次維持不變，而第三次(含)之後則改以 80% EtOH 離心 5 分鐘，如此一來便能回復一個數量級的靈敏度，證明我們的方法是足以洗清所有的鹽類，同時保有大量的目標產物。綜合以上所述，改善了純化條件及濃縮樣品，最少獲得比先前好 100 倍之靈敏度，已非常有潛力成為區分腫瘤與正常組織之參考工具。

### 3.3.3 樣品濃縮對解析度的影響

由圖 3-4 發現，無論是 Alexa Fluor 488 或 647 在 BART 7 的波

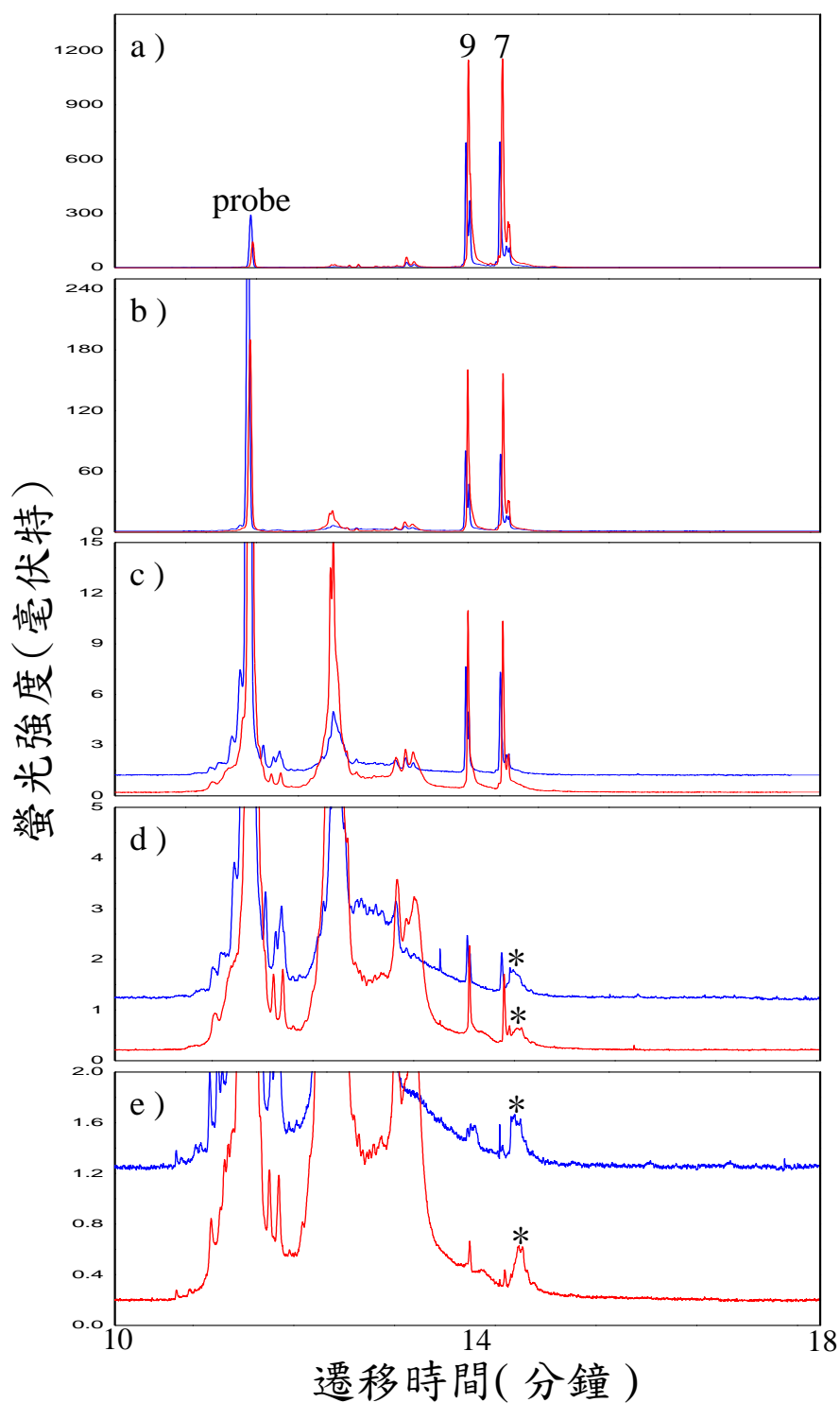


圖3-4 雙波長雷射同時檢測2個BART DNAs之電泳圖(濃縮10倍)：a)  $1.0 \times 10^{-9}$  M。 b)  $1.0 \times 10^{-10}$  M。 c)  $1.0 \times 10^{-11}$  M。 d)  $1.0 \times 10^{-12}$  M。 e)  $1.0 \times 10^{-13}$  M。

鋒都有分岔的情形發生，這個結果與第二章所推測的 isomiRs 論點不同。主要是因為先前的 BART 2 在 5' 上增加了數個核苷酸，導致遷移時間改變。而這邊推測是 bridge DNA 上之 poly adenosine，因越長鏈的關係而在高黏度的聚合物中有比較明顯的作用力。當於 1.5 % PEO + 0.5 % PVP 共聚物溶液下，同時分離兩種不同螢光探針之雙股 DNAs，由於兩者的遷移速度趨近一樣，溶液中又存在著高濃度的尿素。因此我們推測可能是雙股 DNA 受到尿素的影響下，有部分的結構被展開，加上高黏度的凝膠濃縮成一窄區帶，而在電泳行進中形成意外的構型<sup>[10]</sup>。此時兩種不同螢光的雙股 DNA，會因氫鍵的關係而相互吸引，進而影響部分 DNA 的遷移時間。然而，這些都需要我們更進一步的去證明。此外，我們從圖 3-4d 與 3-4e 發現，隨著濃度越低時，背景的干擾也越大，而且旁邊還有未知的訊號產生(以\*標示)。我們初步推測的結果是因為樣品濃縮時，同樣的也把 10 ng/μL 的 yeast RNA 濃縮成 100 ng/μL，因此在雜合反應與結合反應的過程產生了背景上的干擾。當然這些都必須再進一步的確認，值得慶幸的是我們在  $10^{-13}$  M 仍然能看到些微的訊號。

### 3.3.4 樣品製備對螢光強度之影響

在圖 3-2 中顯示，同樣濃度的 Alexa Fluor 488 與 647 的斜率近乎

一致。但是由圖 3-4 證明，不同螢光探針所合成的雙股 DNA 結果卻相差一倍。然而為什麼會發生這個情形，我們推測有兩種可能性。第一為純化的過程中損失，其二為螢光探針的結構影響了雜合反應的效率。但由於純化的過程中是同時進行的，因次初步排除為純化的可能。所以我們參考了兩種螢光探針的結構，發現形狀完全不一樣(圖 3-6)，這或許會影響雜合反應時結合的效率，導致探針的熔點改變。但礙於儀器上的限制，我們沒辦法觀看雜合反應的過程中發生了什麼事情。儘管如此，我相信只要調整反應溫度與增加雜合反應的時間，因能立即改善此問題。最後我們可以從圖 3-5 的訊號推算出 Alexa Fluor 488 的 BART 9 與 BART 7 之線性方程式分別為  $y = 6.75429 \times 10^{14}x + 2266$ 、 $y = 6.84929 \times 10^{14}x + 1129$ ， $R^2$  為 0.9997、0.9999，偵測極限( S/N = 3 ) 為  $4.3 \times 10^{-14}$  M；以及 Alexa Fluor 647 的 BART 9 與 BART 7 之線性方程式為  $y = 1.12197 \times 10^{15}x + 9555$ 、 $y = 1.13663 \times 10^{15}x + 8304$ ， $R^2$  為 0.9981、0.9985，偵測極限為  $1.3 \times 10^{-14}$  M。相信這對於微量的癌症疾病診斷應具有相當大的助益。

### 3.3.5 樣品濃縮對定量真實細胞的影響

本研究特別針對癌細胞中高度表現之 BART 9 miRNA 設計，額外添加 BART 7 miRNA 作為內標準去定量 BART 9 miRNA。因此陽性對

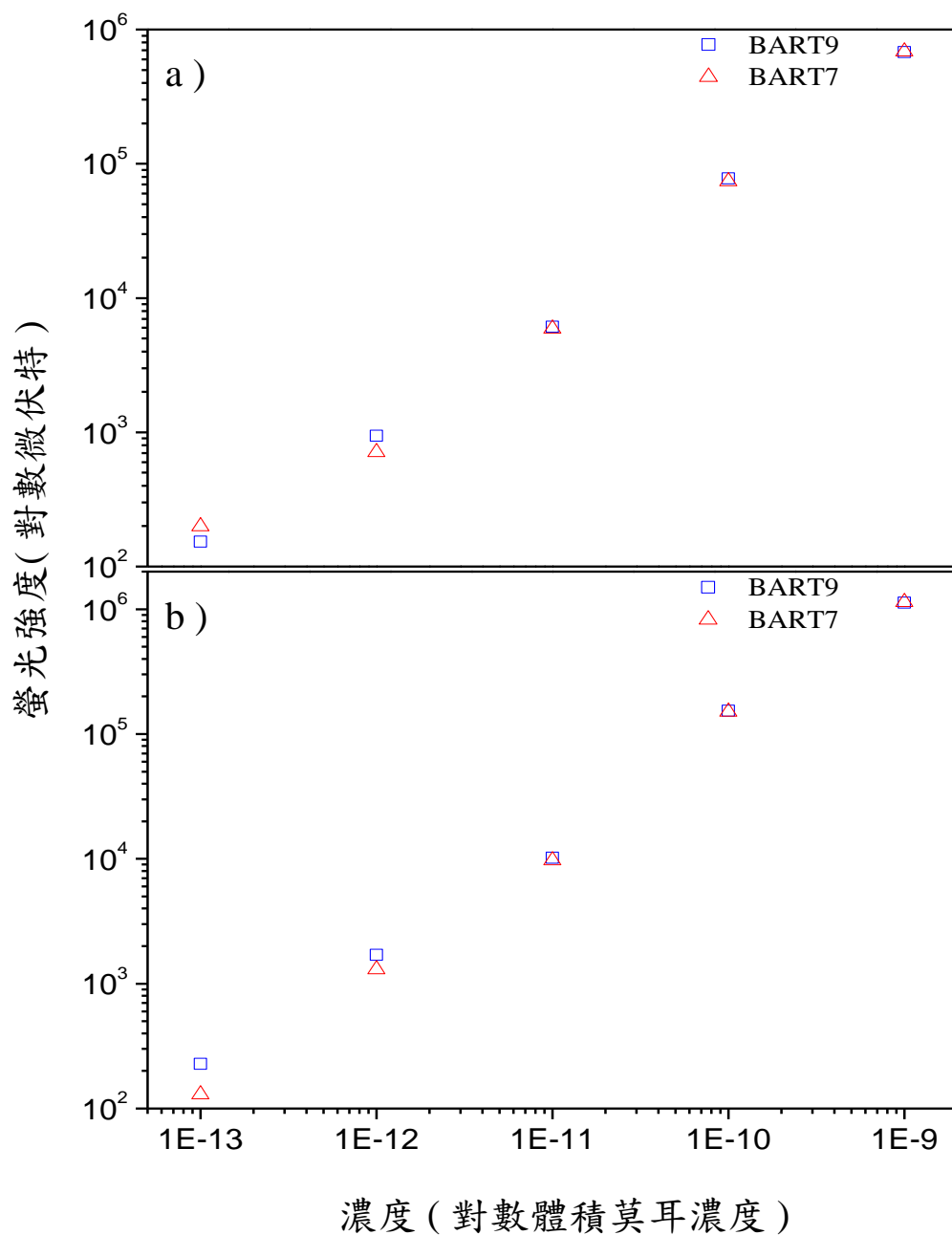
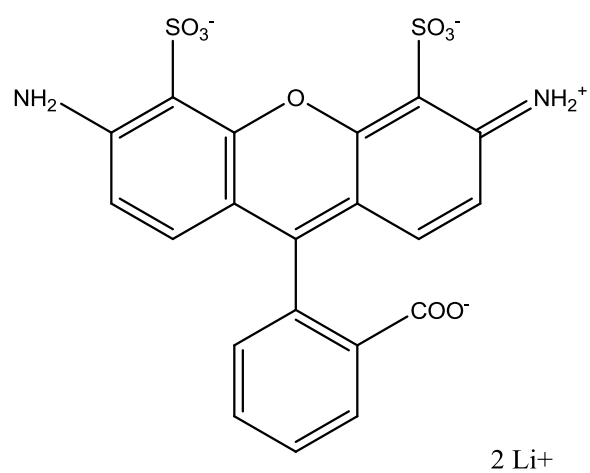


圖3-5 BART9與BART7 DNAs之螢光強度對濃度作圖：  
 a) Alexa Fluor 488螢光探針。 b) Alexa Fluor 647  
 螢光探針。



a)



b)

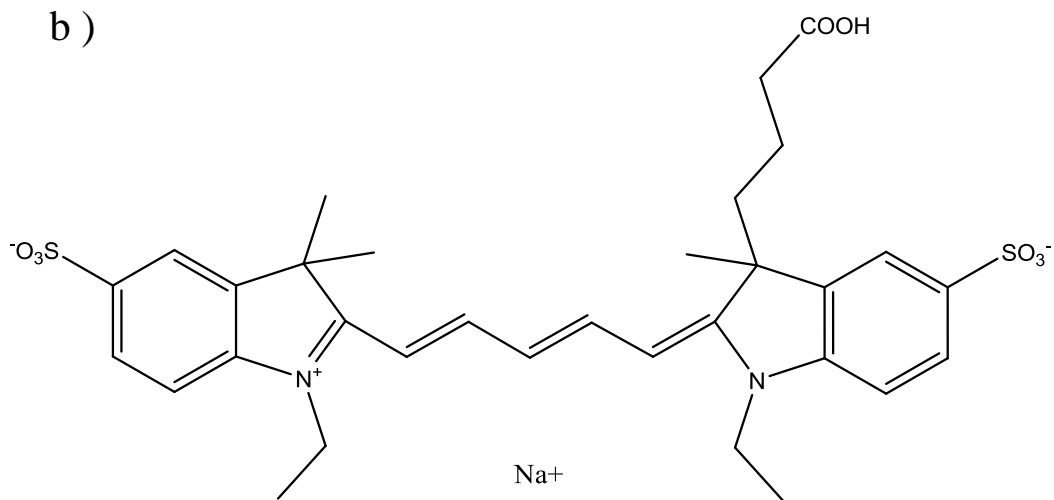


圖3-6 螢光探針之結構： a ) Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 。 b ) Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 。

照組則以 EB 病毒感染之 HK-1( 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  , 標幟有 Alexa Fluor 647 )去進行可行性測試, 陰性對照組的部分則為沒有受到 EB 病毒感染之 HK-1 細胞株( 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  , 標幟有 Alexa Fluor 488 )。圖 3-7a 顯示, 我們在沒有進行濃縮的情況下( 1  $\mu\text{L}$  HK-1-EBV ) , 已明顯得看到 BART 9 與 BART 7 之訊號, 而且在陰性對照組的電泳圖中皆沒有任何訊號產生, 證明我們的方法的確能應用在同時偵測臨床樣品上, 不僅縮短了分析時間, 還可以直接判斷患者是否罹癌, 不用再像以往必須進行繁瑣的比對處理。為了能夠提升臨床偵測的靈敏度, 我們同樣的把真實樣品濃縮 10 倍去進行電泳分析。從圖 3-7b 可以看到, 雖然真實樣品的訊號增加, 但是濃縮之後亦會對分離造成影響, 尤其是電泳的解析度。從圖中發現在 16 分鐘的地方產生意外的界面訊號( 以\*標示 ) , 我們推測可能是因為樣品基質的影響, 使得大量的生物分子在毛細管中形成一界面, 讓毛細管內部呈現半斷電的狀態, 會導致電流下降, 淌度變慢。雖然濃縮大量的生物樣品會產生高度的基質效應<sup>[11]</sup> , 但是我們觀察電泳圖的結果, 還是可以明顯的分離出 BART 9 與 BART 7 的訊號, 只不過 BART 9 的解析度仍受限於樣品基質的影響。儘管如此, 在濃縮真實樣品上還是可以達到提升靈敏度的效果。

此外為了給臨床醫學一個具體的數字, 我們先以 BART 7 的檢量線求得圖 3-7 中的 BART 7 濃度為  $6.8 \times 10^{-13}$  M, 再利用內標準法去定量

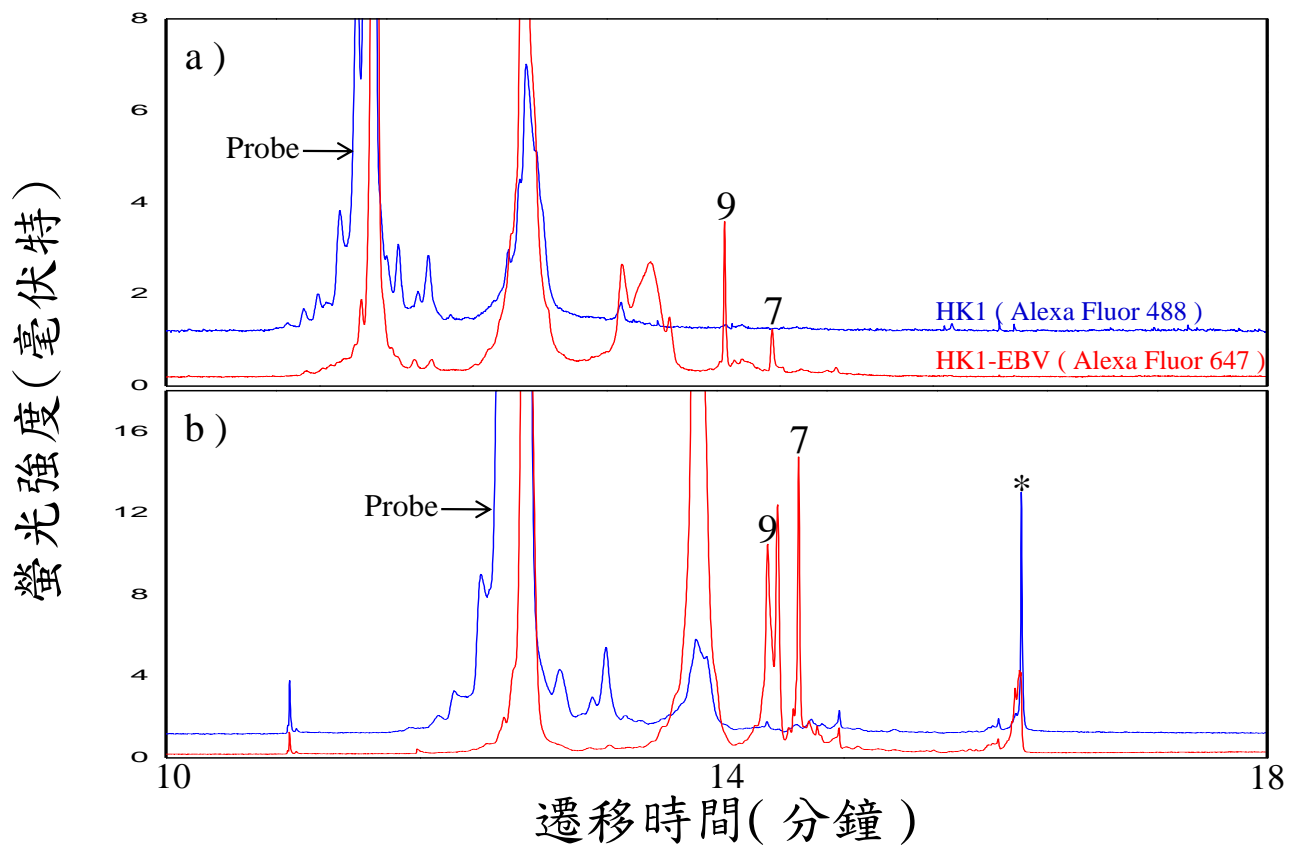


圖3-7 真實樣品： a) 1x HK1-EBV 。 b) 10x HK1-EBV 。

出 BART 9 為  $1.7 \times 10^{-12}$  M。接著我們也定量 BART 9 濃縮 10 倍的結果為  $2.3 \times 10^{-11}$  M，與上述結果幾乎完全吻合。證明我們的方法在定量真實樣品的表現上，並不會受到基質效應的影響，而臨床應用上至少能夠降低一個數量級的偵測極限。如與現今可信度最高的 qPCR 相比，已足以達到相同的偵測極限( $10^{-14}$  M)。

### 3.4 結論

本章已開發一種高通量的方法去偵測非常微量之微小核醣核酸，是利用雙波長雷射誘發螢光偵測系統，以及添加相似的內標準品，於單毛細管中同時比較標準與未知細胞所表達的生物訊息，這對於醫生在比對腫瘤組織上更具有公信力。並針對樣品前處理的部分進行濃縮與純化，使此方法能夠改善第二章的靈敏度至少 100 倍以上。我們的方法具有以下優點如：雙倍數據量、高靈敏度等，使得雙波長毛細管電泳在臨床應用方面更能廣泛的運行。由數據的結果證明我們的線性範圍可從  $10^{-9} \sim 10^{-13}$  M，其偵測極限為  $1.3 \times 10^{-14}$  M。而在濃縮方面至少能夠提升 10 倍的偵測極限，我想對於目前微小核醣核酸之偵測，已綽綽有餘。未來，如果能利用商業化的薄膜管柱將生物樣品中的大分子移除，相信應當能濃縮樣品百倍或千倍，藉此達到提升千倍的靈敏度亦不是難事。綜合以上來說，出色的靈敏度與減少時間的特色，使此方法在臨床研究與疾病診斷上具有相當大的助益。

### 3.5 未來展望

在實驗的初期，我們已證實了雙波長雷射誘發螢光的可行性，將來學弟妹們亦會逐步地修飾實驗的條件，增加其靈敏度，期盼能夠進一步地達到單分子之偵測極限。除了濃縮樣品前處理之外，未來我們

希望能夠將實驗室的另一技術-線上濃縮，結合本章的靈敏度期望能超越目前 qPCR 可偵測的範圍。我想，要達到第二章中所提及的單分子之靈敏度亦非夢想。然而，要達到此夢想前，還存在許多問題需要我們一一去解決，例如此方法對於非常微量的標準 DNA 樣品，仍然無法達到有效的濃縮，這可能是因為 DNA 在濃縮的過程中很容易吸附於管壁上，導致回溶時的回收率下降。此外，當濃縮大量真實樣品時，由於 RNA 有一定的溶解度存在，固濃縮樣品時限制了偵測的極限。再者，大量的 RNA 分子亦會引起較差遷移時間再現性及區帶變寬等問題。在未來的計劃中，實驗室將嘗試直接對真實樣品進行純化，期盼能夠改善濃縮時之靈敏度與解析度等問題，如此便能真正應用到極微量之癌症偵測上。

### 3.6 參考文獻

1. D. Zhang, W. Li, J. Zhang, W. Tang, C. Qian, M. Feng, Q. Chu and J. Ye. (2011) Study on urinary metabolic profile of phenylketonuria by micellar electrokinetic capillary chromatography with dual electrochemical detection-Potential clinical application in fast diagnosis of phenylketonuria. *Anal Chim Acta*, **694**, 61-66.
2. J.W. Jorgenson and K.D. Lukacs. (1981) Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clin Chem*, **27**, 1551-1553.
3. V.L. McGuffin and R.N. Zare. (1985) Femtomole analysis of prostaglandin pharmaceuticals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8315-8319.
4. J.A. Taylor and E.A. Yeung. (1993) Multiplexed Fluorescence Detector for Capillary Electrophoresis Using Axial Optical Fiber Illumination. *Anal. Chem.*, **65**, 956-960.
5. S. Gotz and U. Karst. (2007) Wavelength-resolved fluorescence detector for microchip capillary electrophoresis separations. *Sensors and Actuators B*, **123**, 622-627.
6. S. Takahashi, K.M. , T. Anazawa and H. Kambara. (1994) Multiple Sheath-Flow Gel Capillary-Array Electrophoresis for Multicolor Fluorescent DNA Detection. *Anal. Chem.*, **66**, 1021-1026.
7. S. Iyer, P. Stark and J. Olivares. (2003) Two-Color Capillary Electrophoresis with On-Column Excitation and Wave-Guide Based Fluorescent Detection. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, **8**, 41-45.
8. P. Kuban, M. Berg, C. Garcia and B. Karlberg. (2001) On-line flow sample stacking in a flow injection analysis-capillary electrophoresis system: 2000-fold enhancement of detection sensitivity for priority phenol pollutants. *J Chromatogr A*, **912**, 163-170.
9. S. Locke and D. Figeys. (2000) Techniques for the optimization of proteomic strategies based on head column stacking capillary electrophoresis. *Anal Chem*, **72**, 2684-2689.
10. H. Lu, E. Arriaga, D.Y. Chen, D. Figeys and N.J. Dovichi. (1994) Activation energy of single-stranded DNA moving through cross-linked polyacrylamide gels at 300 V/cm. Effect of temperature on sequencing rate in high-electric-field capillary gel electrophoresis. *J Chromatogr A*, **680**, 503-510.
11. R. Dams, M.A. Huestis, W.E. Lambert and C.M. Murphy. (2003) Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *J Am Soc Mass Spectrom*, **14**, 1290-1294.

## 總結論

本論文朝著以毛細管電泳為基礎去開發一新穎檢測微小核糖核酸技術的目標行進，得到的結果綜合如下：

- 一、以雷射誘發螢光之技術，搭配夾板式結合反應，已能在單毛細管中同時分離數種微小核糖核酸。藉由不同長度的 tandem adenosine-tailed bridge DNAs，將感染 EB 病毒之鼻咽癌內五種相似長度的微小核糖核酸分離，僅需一種螢光探針。在背景干擾的部分，我們利用酒精純化的方式，可以有效增加解析度與改善低濃度時螢光探針的干擾，其偵測極限可達  $1.9 \times 10^{-13}$  M ( 2.5 zeptomole )。最後，意外的在真實樣品中發現，可能有不同長度的 isomiRs 存在，並證明我們的方法的確可以用來篩選不同長度的 isomiRs 以及定量成熟的 miRNAs。
- 二、為了提升此方法的實用性與靈敏度，我們已於第三章發展一套雙波長雷射偵測系統。並藉由改善純化的條件與簡單的濃縮樣品，能夠比第二章報導真實樣品的靈敏度好上百倍，其偵測極限可達到  $1.3 \times 10^{-14}$  M。在添加內標準品的情況下，我們能夠同時針對兩種相似細胞進行定量與篩檢，且濃縮後仍能維持其準確性，更增加了本研究於臨床研究與疾病診斷的應用性。



## 參與會議

1. 2010 年中國化學會年會
2. 第十六屆分析化學技術交流研討會
3. 第十七屆分析化學技術交流研討會

## 論文發表

1. **R.M. Jiang**, Y.S. Chang, S.J. Chen, J.H. Chen, H.C. Chen and P.L. Chang. (2011) Multiplexed microRNA detection by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *J Chromatogr A*, **1218**, 2604-2610.