

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

以毛細管電泳暨螢光偵測法分析總核糖核酸之完整性

及微小核糖核酸濃度

Determination of the total RNA integrity and the
concentration of microRNAs by capillary electrophoresis
with fluorescence detection

楊子學

Tzu-Hsueh Yang

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 101 年 6 月

中文摘要

RNA 在人體中是合成蛋白質重要的分子，近來也發現微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 在基因的調節上的重要性，與癌症疾病的發展有著密切的關係，因此被當作癌症早期治療上重要的生物指標。在研究 RNA 之前必須先從細胞中萃取總 RNA (total RNA)，而樣品的完整性則影響下游實驗數據的正確性，我們利用毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光 (capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence) 來偵測 RNA 的完整性，以 PEO 當作分離介質，並加入 SYTO 9 染料與核苷酸嵌合，以發光二極體取代昂貴的雷射，成功地在 15 分鐘內分離出總 RNA 中的 18S 以及 28S 核糖體 RNA (ribosome RNA)，並能使系統的偵測極限 ($S/N = 3$) 達 12 pM，線性濃度範圍從 50 pg/ μ L 到 5 ng/ μ L，也成功監測到加熱總 RNA 時的降解現象。接著為了測得序列更短的 miRNAs，改採雙波長雷射誘發螢光技術偵測，利用 Alexa Fluor 488 及 647 兩種螢光之 DNA 探針，可測得裝置的偵測線性範圍在 1.0 nM 到 0.1 pM，配合夾板式結合反應能在複雜的 RNA 樣品中測到特定 miRNA，設計長度不同之橋樑 DNA (bridge DNA) 更可將相似長度的 miRNAs 分離，能偵測 miRNA 的線性範圍為 1.0 nM 到 1.0 pM。在應用上 CE-dLIF 可同時比較有無轉染 (transfection) 特定 miRNA 之癌症細胞株，是具有專一性及高靈敏度的 miRNA 檢測方法。

Abstract

RNA integrity plays an important role in RNA studies because poor RNA quality may have a great impact on downstream methodologies. This study proposes a cost-effective, rapid, and sensitive method for determining RNA integrity based on capillary electrophoresis that utilizes a cyan light-emitted diode-induced fluorescence (CE-cLEDIF) as a separation tool. When the capillary was filled with poly(ethylene) oxide and a nucleic acid-specific fluorescent dye, SYTO 9, the baseline separation of the 18S and 28S ribosomal RNAs (rRNAs) in total RNA was accomplished within 15 min. The lowest detectable concentration for the 18S and 28S rRNAs was estimated to be 50 pg/ μ L. The temperature-induced degradation of total RNAs could be monitored by CE-cLEDIF. RNA has an important role in protein synthesis. In recent year, researchers have discovered that microRNAs (miRNAs) are related to gene regulation and cancer formation. To analyze the smaller fragments, miRNAs, a dual laser-induced fluorescence (dLIF) setup combined with capillary electrophoresis (CE) for miRNA detection is proposed in this study. The linear ranges of the device for Alexa Fluor 488 labeled-DNA and Alex Fluor 647 labeled-DNA were both from 1.0 nM to 0.1 pM. The detection of specific miRNA has been accomplished by combining splinted ligation with the fluorescent dye-labeled oligonucleotides. The linear range for the synthetic miRNA is from 1.0 nM to 1.0 pM. Without PCR amplification, CE-dLIF was applied to discriminate a pre-miR-10b* transfected cells from hepatocellular carcinoma cell. Therefore, this result indicates CE-dLIF has great potential to provide a rapid comparative assay for miRNAs detection.

總目錄

論文摘要.....	I
總目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	IX
參與會議.....	110
論文發表.....	111

第一章 毛細管電泳與核醣核酸之簡介

1.1 毛細管電泳緒論.....	1
1.1.1 毛細管凝膠電泳原理.....	4
1.1.1.1 淌度(mobility).....	4
1.1.1.2 電滲流(electroosmotic flow, EOF)的產生.....	5
1.1.1.3 毛細管凝膠電泳分離機制.....	10
1.1.1.4 毛細管內壁塗覆.....	14
1.1.1.5 偵測系統.....	16
1.1.2 毛細管電泳應用於生物樣品.....	17
1.1.2.1 毛細管電泳用於 DNA 之相關應用.....	17
1.1.2.2 偵測基因突變.....	20

1.2 核醣核酸(ribonucleic acid)	23
1.2.1 緒論	23
1.2.2 核醣核酸歷史	24
1.2.3 微小核醣核酸與疾病的關係	25
1.3 參考資料	29

第二章 以毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光偵測核醣核酸之降解作用

2.1 緒論	39
2.2 實驗部分	44
2.2.1 實驗試藥	44
2.2.2 細胞培養(cell culture)與核醣核酸萃取(RNA extraction) ...	44
2.2.3 毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光	45
2.2.4 聚合物溶液製備	47
2.2.5 螢光染料	48
2.2.6 毛細管前處理	48
2.2.7 聚合酶連鎖反應加熱器	49
2.2.8 軟體分析	49
2.2.9 實驗流程	49

2.3 結果與討論.....	51
2.3.1 毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光系統光學零件設置.....	51
2.3.2 聚合物溶液濃度對核醣體核醣核酸分離效率的影響.....	55
2.3.3 分離電壓對核醣體核醣核酸分離效率的影響.....	57
2.3.4 總核醣核酸濃度的影響.....	59
2.3.5 溫度降解總核醣核酸.....	63
2.4 結論.....	67
2.5 參考資料.....	68

第三章 毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光偵測樣品中的微小核醣核酸

3.1 緒論.....	72
3.2 實驗部分.....	76
3.2.1 實驗試劑.....	76
3.2.2 細胞培養.....	76
3.2.3 雜合反應 (hybridization) 與夾板式結合反應 (splinted ligation)	78
3.2.4 酒精清洗.....	81

3.2.5 反轉錄定量聚合酶連鎖反應 (reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)	82
3.2.6 雙波長雷射誘發螢光系統	83
3.2.7 聚合物溶液製備	85
3.2.8 變性毛細管電泳系統	86
3.2.9 實驗儀器	86
3.2.10 樣品濃縮	87
3.2.11 實驗流程	87
3.3 結果與討論	89
3.3.1 雷射光源與染料	89
3.3.2 雙波長雷射系統之偵測極限	92
3.3.3 偵測標準樣品	96
3.3.4 偵測肝癌細胞株 Huh 7 細胞內的 miR-10b*	99
3.4 結論	104
3.5 參考資料	105
第四章 總結論	108

圖目錄

圖 1-1 電雙層之結構及 zeta 電位	6
圖 1-2 電滲流和層流之比較圖	8
圖 1-3 在無電滲流的毛細管電泳系統中分離 DNA 片段之示意圖	15
圖 1-4 miRNA 的生成與調控基因之生化途徑	27
圖 2-1 毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光裝置圖	46
圖 2-2 發光二極體與染料 SYTO 9 放射光譜圖以及干涉濾片透光光譜 圖	52
圖 2-3 不同濃度之 Alexa Fluor 488 螢光核苷酸電泳圖	53
圖 2-4 Alexa Fluor 488 螢光探針之螢光強度對濃度作圖	54
圖 2-5 聚合物溶液濃度對 RNA 分離效率的影響	56
圖 2-6 電場對 RNA 分離效率的影響	58
圖 2-7 以毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光偵測總 RNA 之偵測極限	60
圖 2-8 以 70°C 加熱不同時間降解 RNA	64
圖 2-9 軟體預測 RNA 結構圖	65
圖 3-1 雙波長毛細管電泳搭配夾板式結合反應之實驗流程示意圖	79
圖 3-2 毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光偵測系統裝置圖	84
圖 3-3 三種螢光之放射光譜圖與螢光透光測試	90

圖 3-4 偵測接有 Alexa Fluor 488 與 647 螢光探針之電泳圖	93
圖 3-5 兩種螢光探針之螢光強度對濃度作圖	94
圖 3-6 兩種螢光染料結構	95
圖 3-7 雙波長雷射偵測 miR-221 及 miR-10b*之標準樣品.....	97
圖 3-8 miR-221 與 miR-10b*之螢光強度對濃度作圖.....	98
圖 3-9 雙波長雷射偵測 Huh 7 細胞內的 miR-10b*	101
圖 3-10 miR-10b*表現量之柱狀圖	102

表目錄

表 3-1 實驗用到的核苷酸之序列	77
表 3-2 染料在個別偵測窗口中的干擾數值表	91

第一章 毛細管電泳與核醣核酸之簡介

1.1 毛細管電泳緒論

1909 年 Michaelis 提出電泳 (electrophoresis) 一詞^[1]，若一溶液中具有帶電荷的粒子而且受到外加電場的作用時，會因為庫倫力的影響使得帶電粒子在溶液中產生遷移，此現象稱之為電泳。利用電泳原理，讓不同荷質比的帶電粒子產生不一樣的遷移速度，使得溶液中的帶電粒子能夠分離，此技術稱之為電泳分離。在 1937 年，Tiselius 最早利用電泳分離技術成功分離出血清蛋白中的白蛋白及 α 、 β 、 γ 三大類的球蛋白^[2]，由於這項突破性的實驗讓 Tiselius 在 1948 年得到諾貝爾化學獎。

傳統利用電泳進行生化分析方法是以平板 (slab) 式的電泳為主^[3-5]，所使用的凝膠版可同時分離多種樣品，分離完後將樣品染色就可直接觀察。但是一般的平板電泳有些缺點，最明顯的便是耗時，由於電流通過時產生的焦耳熱大會對解析度造成不良影響^[6]，所以只能用低電壓來進行分離，再者還有消耗樣品量大以及製備步驟繁瑣和重複性差等限制。而毛細管電泳技術具有分離速度快、解析度高、樣品需求量少等多種優勢，能夠改善平板電泳許多缺點。1967 年 Hjertén 使用內徑 3mm 的石英玻璃管柱，在自由溶液進行區帶電泳的實驗並結合 UV 吸收來偵測分析物，可以成功地分離無機離子、核酸、蛋白質及病毒^[7]，

由於管壁內徑小，可減低熱對流造成的影響。1974 年 Virtanen 進一步利用內徑只有 0.2~0.5 mm 的玻璃毛細管分離十六種陰離子，成功地在十分鐘內分離出來^[8]，不僅消除熱對流的問題也簡化了儀器裝置的設計，提升小孔徑管柱電泳分析的實用性。1981 年，Jorgenson 和 Lukacs 利用內徑 75 μ m 的毛細管來分離胺基酸的衍生物^[9, 10]，由於內徑變得更小讓散熱效果大幅提高，因此可以利用更高的電場來做分離，進而使分析時間減少許多，加上與螢光偵測法做結合，靈敏度能更進一步的提升，為毛細管區帶電泳法（capillary zone electrophoresis, CZE）^[11]打下基礎，也為日後毛細管電泳相關研究奠定根基。毛細管電泳技術蓬勃發展，藉由不同的機制與原理發展出多種的分離模式，大致上可分為六大類：除了形式最簡單的毛細管區帶電泳之外，還有可以分離中性粒子的微胞電動力層析法（micellar electrokinetic chromatography, MEKC）^[12]，以及毛細管等電聚焦法（capillary isoelectric focusing, CIEF）^[13]、毛細管凝膠電泳法（capillary gel electrophoresis, CGE）^[14]、毛細管電層析法（capillary electrochromatography, CEC）^[15]以及毛細管等速電泳法（capillary isotachopheresis, CITP）^[16]等方法。跟著技術的進步，電泳技術也能小型化成微晶片，有科學家利用蝕刻的技術在微晶片上形成小型通道（channel）^[17, 18]，比起傳統毛細管電泳分析時間來得快、樣品消耗更少並且能有高通量的優點。實驗室晶片（Lab-on-a-chip）系

統^[19]便是將實驗室所操作的前處理、分離以及偵測等步驟能夠微小化至一個晶片裡的技術。

在電泳分離技術早期都是在自由溶液進行實驗，不過考慮到熱擴散及熱對流對解析度會造成不好的影響^[6]，隨後就以流動性差的凝膠來篩分（sieving）樣品，藉此來改善電泳解析度。篩分方式是依據分子量大小分離樣品，此技術適合用於如生物樣品般的分子量大的樣品。毛細管凝膠電泳（capillary gel electrophoresis）技術發展初期，所用的凝膠是沿用平板凝膠電泳所使用的交聯性聚丙烯醯胺（cross-linked polyacrylamide）^[20]，由於此凝膠黏性高，很難以壓力方式來填充毛細管，因此採用如「抽吸」、「攪整」、「擊激整」等方法。利用這些技術，透過溫度或是變性劑的效果，便能使相同或相似長度片段的 DNA 被區分出來。SSCP 僅常遇到凝膠體積變化或是氣泡產生等問題，而且聚合的再現性也不好，使用壽命也不長，因此找到一個可替代的凝膠介質變成了新的課題。到了 1989 年，Zhu 和 Colbum 分別用非交聯性的線性聚合物成功分離 DNA 片段^[21, 22]，線性聚合物黏度低，不須使用在毛細管內聚合的方式，可以在毛細管外聚合完成後，再以壓力方式注入管內，如此一來不僅可提升實驗再現性，也可延長毛細管壽命，所以現今毛細管凝膠電泳常使用的凝膠介質皆為線性聚合物為主。在文獻常見的凝膠有線性聚丙烯醯胺（linear polyacrylamide, LPA）^[23, 24]、聚環氧乙烷

(poly(ethylene oxide), PEO)^[25, 26]、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol)^[27]、瓊脂膠 (agarose)^[28]及各纖維素 (cellulose)^[29-31]之衍生物等等。

在長久的時間下，毛細管電泳技術不斷地被改善研究，能夠有多重性設計以及自動化的優點^[32, 33]，對於大量分析生物資訊上相當有幫助^[34, 35]，至今已成為分離生化物質的重要技術，不論是藥物^[36, 37]、胺基酸 (amino acid)^[38, 39]、蛋白質 (protein)^[40]、醣類 (carbohydrates)^[41]、DNA^[42]或是 RNA^[43]等各種物質，都能利用毛細管電泳技術達到相當好的分離效果。

1.1.1 毛細管凝膠電泳原理

1.1.1.1 淌度 (mobility)

帶電粒子在電場中，會因為受到電場影響而開始移動，對溶液施以外加的電壓時會使粒子以一個速度 (v_{ep}) 前進，而且與應用電場 (E) 成正比，其關係式為：

$$\mu_{ep} = v_{ep} / E \quad (1-1)$$

μ_{ep} 為電泳淌度 (mobility)，可定義在單位電場下的電泳速率。當帶電粒子在外加電場的作用下，使得帶電粒子因庫倫作用力 (F) 而加速移動^[43]，作用力可寫成：

$$F = qE \quad (1-2)$$

其中 q 為粒子帶電量。而帶電粒子受力移動時會和介質摩擦造成移動速度減低，當帶電粒子加速到一定程度，庫倫作用力與摩擦力會達到平衡，此時帶電粒子便會以等速移動。在 Stokes 定律中，假設粒子是剛性的球體時，其受到的摩擦力 (f) 可以寫成：

$$f = f_v = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-3)$$

f 為球體的動摩擦係數， r 為粒子半徑而 η 是介質的黏度。當作用在帶電粒子上庫倫力與摩擦力相等時，粒子會以等速前進：

$$qE = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-4)$$

可寫成

$$v_{ep} = qE / 6 \pi \eta r \quad (1-5)$$

利用淌度的定義，代入公式 (1-5) 可得到下列公式：

$$\mu_{ep} = v_{ep} / E = q / 6 \pi \eta r \quad (1-6)$$

由公式可以知道淌度與粒子的電荷成正比，而與粒子的大小成反比，因此粒子的帶電量以及大小都會影響電泳淌度。

1.1.1.2 電滲流 (electroosmotic flow, EOF) 的產生

電滲流是毛細管電泳中第二種驅動力，由於電場作用使溶液中的離子移動而生成電滲流，當通過 pH 值大於 3 的電解質溶液，會使管壁的矽醇基解離形成矽醇陰離子，溶液中的陽離子受到矽醇陰離子的

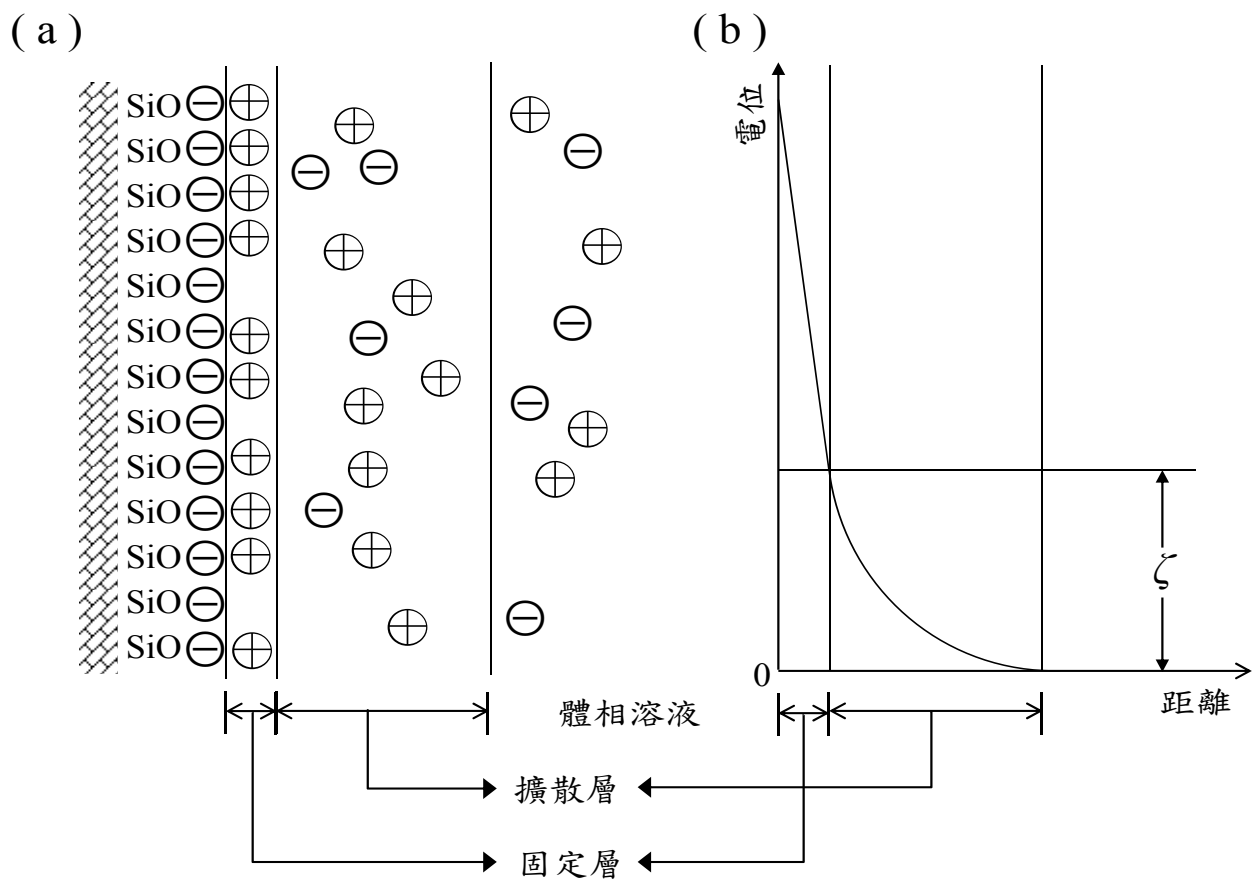


圖1-1 (a) 電雙層之結構 (b) zeta電位

負電荷吸引，便在毛細管的內壁上形成電雙層 (electrical double layer)。如圖 1-1 所示，被管壁吸引住的為固定層 (stern layer)，在固定層外是擴散層 (diffusion layer)。離管壁的距離越遠，在擴散層中被吸引的正電荷數目也隨著距離而減少。當通電後，擴散層的正電荷受到庫倫力作用而向負極移動，此時會帶動溶液中的體相溶液 (bulk solution) 一起往負極，而體相溶液的移動就產生了電滲流。電荷在毛細管內固定層與擴散層不均匀分布的情形，使得體相溶液與電雙層之間會有一電位差，此電位差稱作為 ζ 電位 (zeta potential)。其表示方程式為^[44]：

$$\zeta = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (1-7)$$

ε 為緩衝溶液的介電常數， e 為單位面積的總電荷， δ 是電雙層的厚度。

zeta 電位與電滲流的關係可表示為：

$$\mu_{eo} = \varepsilon \zeta / \eta \quad (1-8)$$

淌度 μ_{eo} 表示電滲流的大小，它正比於 zeta 電位以及溶液的介電常數，而與溶液的黏度成反比。毛細管內壁的質子解離與 zeta 電位的強度有關，若毛細管內壁的質子解離多，被吸引的陽離子也多，如此一來電雙層的厚度會變厚，zeta 電位也就增強，使得電滲流因此加速變快。電滲流的大小也與緩衝溶液的 pH 值與離子強度有關。由於 pH 值會影響矽醇基解離的程度，故當溶液有高 pH 值時，毛細管內壁的質子解離程度會比較高，如此一來 zeta 電位上升，電滲流也會變大。pH 值大於 2

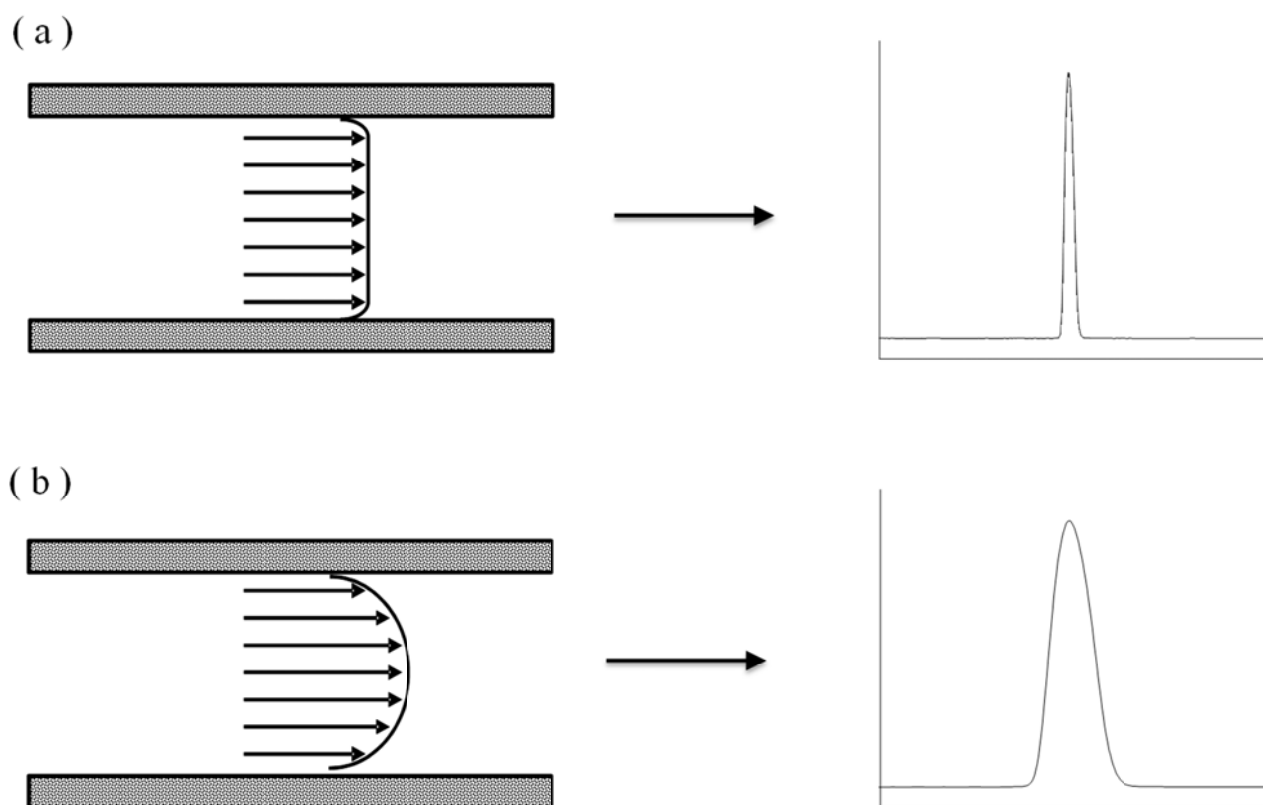


圖1-2 (a) 電滲流和 (b) 層流比較圖

時矽醇基開始解離出氫離子，而 pH 大於 4 時可以觀察到電滲流值明顯的上升。若溶液的離子強度高，則溶液中的離子數目多，便有較多的陽離子可吸附在毛細管內壁上，電雙層的厚度變得密集而因此減小，電雙層厚度減小連帶造成 zeta 電位變小，最後會使電滲流下降。除了 pH 值與離子強度之外，改變溫度可以影響緩衝溶液的黏度進而影響電滲流，或是對毛細管內壁表面加以修飾都可以改變電滲流的大小^[45]。擴散層的離子受電場影響趨使整個溶液向負極移動而產生了電滲流，在沒有外力加壓下電滲流在毛細管內壁不會有壓力差形成，因此在各處的流速幾乎一樣，如圖 1-2 所示，會讓毛細管內溶液的流型呈現平面。與其他管柱方法做比較，其管柱裡的動相若是藉由幫浦產生壓力來推動的話，由於管柱裡靠近管壁的部分摩擦力比管柱中心來得大，故會產生層流 (laminar flow) 的現象發生，使得流型呈現拋物狀。由於層流會擴散樣品區帶，降低解析度，所以有平面流型的電滲流不會使樣品區帶變寬，可以把理論板數提高至數百萬以上，大大提升管柱效率。

在利用毛細管電泳偵測生物分子時，例如蛋白質、DNA 或是 RNA 等，由於多數生物分子極容易吸附在毛細管內壁上，因此會先對毛細管內壁塗覆一層聚合物，來防止生物分子吸附在內壁上^[46, 47]。而塗覆聚合物的情況下也會使 zeta 電位消失，所以分析生物樣品通常是在無電滲流狀態下偵測，而生物分子的遷移則是依靠本身的電荷受到電場

影響來做移動。

1.1.1.3 毛細管凝膠電泳分離機制

毛細管凝膠電泳法有著極高的分離效率，其理論板數有每米數百萬的數值。在毛細管凝膠電泳法中，毛細管裡填充具有孔隙的凝膠，因為凝膠具有分子篩的功能，能夠當作電泳分離的介質，而且凝膠是種非傳導性的介質，可以減低樣品擴散讓區帶變寬的現象。凝膠可形成特定大小的孔隙，當樣品通過凝膠介質的孔隙時，會因分子篩的功能，使不同大小的分子產生不同的淌度，藉此達到分離的效果。分子量小的物質容易穿過凝膠介質的孔隙，因此分離時間短，當物質大小增大則分離時間變慢。

當聚合物分子在濃度很低時，分子間的平均距離離得很遠，很難與其他分子作用，此時聚合物溶液的黏度很低，特性就像水溶液一般。當濃度增加時，分子間碰撞機率增加，聚合物之間的鏈彼此作用產生糾結，開始形成網狀結構。 c^* 表示聚合物的鏈開始彼此糾結的濃度，稱之為糾結濃度 (entanglement threshold)，糾結濃度定義是假設每個聚合物分子體積相同時，所有聚合物佔的總體積與溶液體積同樣時的濃度，其方程式可表示為：

$$c^* \approx 3 M_w / 4 \pi N_A R_g^3 \quad (1-9)$$

$$\text{或是 } c^* \propto N^{-0.8} \quad (1-10)$$

其中 M_w 為聚合物分子量， N_A 是亞佛加厥數， R_g 為聚合物的旋轉半徑 (gyration radius)， N 為聚合物分子所含的單體數目。然而聚合物的分子量都是以平均分子量表示，在計算時不僅假設聚合物分子的大小都相同的情形下才成立，所以與實際的狀況有所差異，故實際的糾結濃度必須以實驗方式求得。

膠體分離物質是利用膠體的網狀結構所形成的孔隙 (mesh) 來篩分析物，當聚合物濃度高於糾結濃度時會開始形成網狀結構，而網狀結構所生成的孔隙大小則與聚合物濃度有關，可表示成^[48]：

$$\xi = 1.43 R_g (C / c^*)^{-(1+a)/3a} \quad (1-11)$$

ξ 指的是孔隙大小， C 為聚合物濃度， a 則為一常數，依照不同聚合物溶液有不同的值。由式子可知道膠體的孔隙大小與聚合程度無關，而與聚合物的濃度與特性相關，當聚合物濃度高時，所形成的孔隙大小越小。

毛細管凝膠電泳已被廣泛的應用於分析生物大分子。就以 DNA 而言，當 DNA 分子在自由溶液移動時，由於受到電場作用影響其長鏈狀構形會展開，使得 DNA 分子的每個部分都會與溶液接觸，故其動摩擦係數 f 和 DNA 分子的鹼基對 (base pair) 數目 (N) 成正比，以及 DNA 骨架上的磷酸根帶有負電荷 (q) 也與 DNA 的數目成正比，所以自由

溶液中 DNA 的淌度則為：

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \propto \frac{N}{N} = \text{constant} \quad (1-12)$$

由式子可知道自由溶液中 DNA 的淌度為一定值^[49]，而利用凝膠介質的網狀結構可以篩分 DNA 分子，較小的 DNA 分子容易通過孔隙，而較大的分子不易通過的原理，使得不同大小的 DNA 分子可以得到不同的淌度進而達到分離效果。

利用聚合物溶液可以有效分離 DNA 分子，在探討生物大分子在聚合物溶液網狀結構中的遷移行為上，早期有 Ogston 模型(Ogston model)^[50]以及爬行模型 (reptation model)^[51]兩種來解釋其機制。兩者都和遷移分子大小與網狀結構的孔隙大小有關。

1985 年 Ogston 提出一套數學式子，用來說明剛性球體在交錯的網狀結構中的遷移，1966 年 Morris 以此模型說明 DNA 分子通過聚合物的網狀結構時的遷移。Ogston 模型假設 DNA 為剛性球體，半徑為 R_g ，並且視聚合物的網狀結構為分子篩，小分子容易通過大的孔隙，所以遷移較快，比較快從介質中篩分出來，大分子不易通過故較慢篩分出來。根據 Ogston 理論，DNA 分子通過聚合物孔隙的淌度，同等於在自由溶液中的淌度乘上遷移中可能會遇到直接通過孔隙的機率，可表示為：

$$\mu = \mu^* P \quad (1-13)$$

μ^* 為 DNA 在自由溶液中的淌度， μ 為 DNA 在凝膠介質中的淌度， P 為孔隙大於或等於 DNA 分子的機率。 P 可表示成：

$$P = \exp[-KC(R_g + r)^2] \quad (1-14)$$

K 為比例常數， C 為聚合物濃度， r 為聚合物分子鏈厚度，而 R_g 為假設 DNA 為剛性球體時的球體半徑。以淌度帶入 P 可寫成：

$$\mu / \mu^* = \exp[-KC(R_g + r)^2] \quad (1-15)$$

將式子取對數，會發現到 $\log \mu$ 與濃度 C 之間是呈線性的關係，此為 Ferguson 圖 (Ferguson plot)，利用 Ferguson 圖可大約猜測出孔隙大小以及聚合物分子鏈的厚度^[52]。

在 Ogston 模型中，DNA 分子被視為剛性球體，所以當膠體的孔隙比 DNA 分子來得小時，Ogston 模型便無法解釋聚合物溶液中的 DNA 遷移情形。由於 DNA 本身是鏈狀分子，可以改變自身構型來伸縮變形鑽過孔洞，因此 Ogston 模型比較適合解釋大孔隙聚合物溶液，或是小的球形分子在電泳中分離的情形。

若 DNA 分子大於孔隙時就必須使用爬行模型來解釋，爬行模型最早由 de Gennes 所提出，此模型將 DNA 視為可變形的長鏈分子，當 DNA 無法通過孔隙時會進行波狀的運動，以類似蛇行的方式順著電場方向通過網狀結構的孔隙。在此模型中 DNA 分子的動摩擦係數會與鹼基對數目的平方成反比，因此可將 DNA 的淌度與其大小表示成下列關係

式：

$$\mu \propto N/N^2 = 1/N \quad (1-16)$$

由式子可知道 DNA 的淌度與 DNA 分子的長度成反比。若提高電場到一定程度，DNA 在構型上的調整會接近平衡，再提高電場也很難有影響，此時淌度和分子大小的關係性便減小了。

目前都以上述兩種模型解釋 DNA 在凝膠介質中基礎的分離機制，更詳細的機制則需要日後以更精確的儀器與電腦模擬才能有更有力的推論出現。

1.1.1.4 毛細管內壁塗覆

毛細管內壁上的負電荷會吸附正電荷的分析物，蛋白質或是 DNA 的分析物都有可能被吸附在毛細管內壁上，影響分離的解析度，因此 DNA 的分離常常會抑制毛細管的 EOF 來防止吸附發生。過去用來抑制 EOF 的方法需要將低 pH 值、高離子強度的陽離子表面活性劑^[53]或是有機溶劑^[54]加入到背景電解質裡。但是這方法卻不適用在 DNA 的分離上，分離 DNA 必須將毛細管表面上產生的 EOF 消除掉以防止吸附，再者抑制 EOF 的方法必須能承受高 pH 值或是高濃度的尿素等條件。利用塗覆的方法可以改善 DNA 吸附在毛細管內壁的情況^[55]，塗覆是聚合物與毛細管內壁表面的矽醇基做共價結合，利用聚合物層覆蓋內

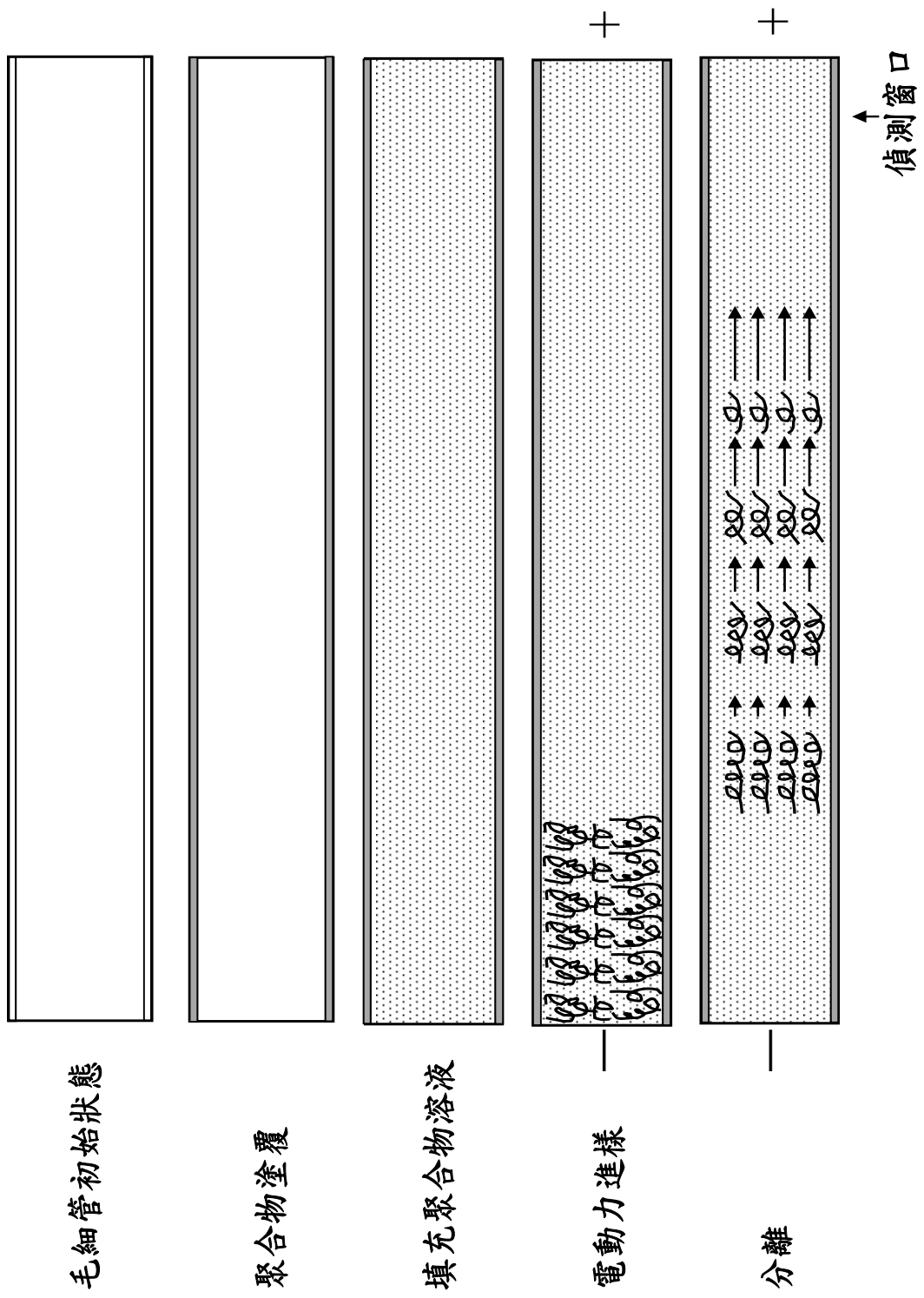


圖1-3在無電滲流的毛細管電泳系統中分離DNA片段之示意圖

壁表面以抑制 EOF，也可防止 DNA 的吸附。圖 1-3，在沒有 EOF 的狀態下，塗覆過的毛細管沒有 EOF，再利用適當的聚合物分離 DNA 樣品，由於小片段的 DNA 在沒有 EOF 的系統下淌度較大，故會被最先偵測到。

1.1.1.5 偵測系統

用在 CE 上的偵測系統有很多，包括紫外光-可見光吸收(UV-visible absorption) [56]、螢光測定法 (fluorimetry) [57] 以及質譜儀 (mass spectrometry) [58] 等等。雷射誘發螢光 (laser-induced fluorescence, LIF) 偵測器是毛細管電泳偵測系統中最靈敏的，過去有人以螢光偵測系統用在液體為移動相的層析方法上，成功提高了靈敏度。使用小內徑的毛細管能夠更加提高其靈敏度，已有文獻指出可以達到 50 yoctomoles (10^{-24} mol) 的偵測極限 [59]。此方法被廣泛應用在分析生物分子，也有相關文獻用來偵測細胞 [60]。

由於大部分的分析物都不含螢光，所以都要藉由與染料進行衍生後才能分析。若要進行快速實驗時便要考慮到衍生反應的速度，若實驗需要及時偵測或是快速回應，便需要共價鍵結衍生快的衍生試劑或是具有高親和力 (affinity) 的試劑標記分析物。如今毛細管電泳結合螢光偵測系統如今已能夠普遍地應用於 DNA 定序 [61] 或是基因突變 [62]

等等的研究。

1.1.2 毛細管電泳應用於生物樣品

毛細管電泳已是個多樣性的分析方法，從小離子、中性分子以及生物的大分子等都有很成功的應用，因此許多領域也以毛細管電泳作為分析工具，如分析化學、法醫學、臨床化學、有機化學和分子生物學等等。由於毛細管電泳有著高解析度、樣品需求量少、快速、容易自動化並能有高通量的分析等優點，在人類基因體計畫的定序工作中，毛細管電泳成了不可或缺的角色，而且在短序列重複（short tandem repeats, STRs）的偵測及分析上也都有很重要的貢獻^[63, 64]。其他的相關應用還有 Y 染色體及粒線體的 DNA 定序^[65]、細胞種群的分析^[66]、植物或病毒的 DNA 突變偵測等^[67]。除了 DNA 的定序之外，毛細管電泳也可用於定量聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）^[68]的產物或是單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphisms, SNPs）的分析上^[69, 70]。

1.1.2.1 毛細管電泳用於 DNA 之相關應用

DNA 定序是聚合酶連鎖反應衍生而來的，這是公認且可信度最高的 DNA 檢測方法，而目前應用最廣泛的是以 Sanger 法為基礎的定序

儀。利用 PCR，添加專一性的引子、DNA、聚合酶及 dNTP 進行反應。反應分成四管，每一試管各含有 ddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP 以及其他三種的 dNTP。由於 ddNTP 比 dNTP 少了三號碳上的氧原子，所以 PCR 反應接到 ddNTP 時，便無法與下一個 dNTP 的磷酸根接上，反應便會停止。因此，若是含有 ddATP 的試管，當聚合酶反應進行到 template DNA 的鹼基 T 時，ddATP 會與鹼基 T 以氫鍵結合使得聚合酶反應停止。template DNA 含多少個 T，聚合酶就會反應出以 A 結尾的不同長度之 DNA 片段，其他三個試管也是同樣道理。最後將四個試管中的 PCR 產物以平板凝膠電泳分離，按照片段大小就可以知道 template DNA 的序列。也有利用毛細管凝膠電泳應用於 DNA 定序的方法，將引子標記上四種不同波長的染料，並以分光裝置將螢光訊號分至四個偵測器，藉由軟體分析收集數據，如此一來便只須在一個試管內進行反應^[71]。

毛細管電泳的分析速度比起平板凝膠電泳相對是快很多，但在平行檢測上就沒平板凝膠電泳來得好。高通量的 DNA 定序儀使用陣列式 (array) 的毛細管，利用多根毛細管同時分析能夠改善此缺點。市面上早有自動化的毛細管陣列電泳發售，基於毛細管的優點，基因體計畫更是提前完成。近年來也有不少與 DNA 分析相關的文獻出現，Fogarty 等人利用雙雷射系統的共焦螢光光譜儀偵測單股 DNA

5'-R6G-polyT₄₀，此方法利用不同電場強度及鎂離子濃度來影響單股 DNA 的結構變化，進而可以得知 DNA 的有效電荷以及平移擴散係數^[72]；Wan 等人利用三嵌段式的共聚物當作篩分 DNA 的介質，與交聯式聚合物不同的是共聚物有週期性的疏水以及親水區域。利用共聚物的 2-D 六面堆積圓柱結構能夠成功分離雙股 DNA^[73]；Meagher 等人設計並合成 127 胺基酸長度的蛋白質聚合物，使用 end-label free solution electrophoresis (ELFSE)，成功地定序 180 鹼基長的 DNA^[74]；Fundador 等人設計了一套能分離出 DNA 大小的方法，並且能監控與致癌物質有關的序列特異性^[75]；Jiang 及 Ma 利用修飾過核苷的尿液樣品當作癌症的生物標記，能在 10 分鐘內以毛細管電泳方法分離 10 種核苷，並且具有高度的再現性^[76]；Li 等人利用滾環式擴增法 (rolling circle amplification, RCA) 偵測小分子核糖核酸 (small RNA)，針對目標核糖核酸使用環形模版，並利用毛細管凝膠電泳分離，便可專一且靈敏地偵測生物樣品裡的小分子核糖核酸^[77]；Wang 等人利用抗體來偵測甲基化 DNA (methylated DNA)，在不使用亞硫酸鹽轉換 (bisulfite conversion)、酵素消化 (enzyme digestion) 以及 PCR 等步驟的情況下，能有高靈敏度且快速分離的優點^[78]。

1.1.2.2 偵測基因突變

單核苷酸多型性是指 DNA 序列中單一鹼基對的改變，在人類基因體中，每一個體之間的差異大部分都屬於 SNPs。基因突變的檢測在腫瘤學上以及偵測基因遺傳疾病上經常被使用，也提供法醫檢定許多有用的資訊。在分析基因突變的方法中，DNA 核苷酸定序法是最精確最有信用的方法，因此被視為黃金級的標準實驗（gold standard）^[79]，但將定序儀當作一般臨床診斷實驗室的基因突變檢測工具，代價顯得太過昂貴，因此發展快速精確且具經濟效益的檢測突變方法便成為一項熱門的研究主題。

分析基因突變的方法，根據實驗目的及功能不同大致可分成篩選與偵測兩類。篩選法能檢測未知樣品中是否有突變發生，適用於待測的 DNA 樣品是否有無突變都還不明瞭的狀況時，但是此方法無法分析出實際突變的鹼基，既使如此它還是有著快速以及經濟等優點，大規模的 SNPs 篩檢上非常適用。此類的檢測方法有單股構型多形性（single-strand conformation polymorphism, SSCP）^[80-82]、異股多形性檢測（heteroduplex polymorphism analysis, HPA）^[83]及溫度梯度毛細管電泳（temperature-gradient capillary electrophoresis, TGCE）^[84, 85]等方法。利用這些技術，透過溫度或是變性劑的效果，便能使相同或相似長度片段的 DNA 被區分出來。SSCP 方法是將 PCR 產物利用 94°C 加熱變

性 5 分鐘後迅速放置冰水中，使其形成雙股 DNA 後在 4°C 的電泳環境下進行分離。假若有突變的情形，形成的單股 DNA 構型會改變並影響其淌度，藉由與正常 DNA 的電泳圖便可得知 DNA 是否有發生鹼基取代 (substitution)。HPA 方法是藉由 PCR 放大後的 DNA 產物，會因為同股與異股之間的構型不同與 GC 鹼基數的差異產生不同的淌度。TGCE 則是將 PCR 的產物經過加熱使之變性，在緩慢降溫時正常與突變的 DNA 會雜交形成異源雙鏈核酸分子 (heteroduplex)，由於 heteroduplex 之間的鹼基對並不是完全互補，所以在 TGCE 中分離時會因為溶解溫度 (melting temperature, T_m) 不同，所以會在不同溫度下打開雙股 DNA，使得淌度不同而分離。然而除了篩檢 SNPs 以外也有學者將 SSCE 結合 CE 應用於鑑定綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 16S 核糖體 RNA 基因^[86]、血型偵測^[87]以及家族性高膽固醇血症上^[88]。

除了上述方法外，還有其他可以偵測點突變的的相關技術，除了 DNA 定序之外還有對偶基因特定寡核苷酸雜交法 (allele-specific oligonucleotide hybridization)^[89]、接合酶連鎖反應 (ligase chain reaction)^[90]、單核苷酸引子延長法 (single-nucleotide primer extension, SNuPE)^[91]以及用聚合酶連鎖反應結合限制酶片段長度多形性 (polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)^[92]

等技術。寡核苷酸雜交法與微陣列晶片結合的方法，因為能夠同時點上許多寡核苷酸進行 DNA 雜交反應，能夠偵測多種基因突變，但是由於微矩陣晶片製作不易，判讀困難，無法普遍於一般的臨床實驗室。PCR-RFLP 會先利用一段特定引子進行 PCR 反應，再利用限制酶（restriction enzyme）切割特定 DNA 序列，與無法被切割的 DNA 序列產生長度上的差異後，再以凝膠電泳偵測、分離^[93, 94]。由於操作容易且具有很好的專一性，在台灣有許多分子實驗室都利用這實驗方法偵測基因突變。

1.2 核醣核酸 (ribonucleic acid) :

1.2.1 緒論

核醣核酸 (RNA) 是由核苷酸 (nucleotides) 所組合出來的長鏈，與 DNA 相似。每個核苷酸由三個部分組成，含氮的鹼基 (base)、五碳糖以及磷酸根。RNA 的鹼基部分是由 Adenine (A)、Guanine (G)、Cytosine (C)、Uracil (U) 四個所組成^[95]，藉由排列組合可以形成一連串序列。RNA 的序列包含著基因遺傳訊息能合成蛋白質^[96]，訊息核醣核酸 (messenger RNA, mRNA) 藉由轉錄 (transcription) 作用將 DNA 的遺傳訊息記錄下來，mRNA 便會攜帶著遺傳密碼結合在核醣體核醣核酸 (ribosomal RNA, rRNA) 所構成的核醣體 (ribosome) 中，並參與蛋白質的合成。傳遞核醣核酸 (transfer RNA, tRNA) 會攜帶著胺基酸到核醣體上^[97]，mRNA 與 tRNA 個別會以三個鹼基為一組的序列當作密碼子 (codon) 以及反密碼子 (anticodon) 的配對，密碼包含了起動合成、胺基酸種類以及終止合成等指令。反應由啟動密碼子 (start codon) 開始，核醣體便沿著 mRNA 的序列行進並依照相對應的密碼子將相對應的胺基酸連接起來，最後停在終止密碼子 (stop codon)，便完成了蛋白質合成，此過程稱為轉譯 (translation)。生成生物體所需的蛋白質便是 RNA 在生物體中最重要的功能之一。

1.2.2 核醣核酸歷史

早在1869年Miescher Friedrich 藉由分離遺傳物質而發現了核苷酸^[98]，但是在1900年代早期化學家以及生物學家並不清楚DNA以及RNA之間的差別，直到有科學家分析核苷（nucleoside）的組成才能明確的以五碳醣結構以及鹼基組成分類出RNA以及DNA^[99]。1958年，Francis Crick提出了分子生物學的中心教條，即是DNA藉由轉錄能生成RNA，而RNA在轉譯中能引發蛋白質的生成^[100]，此觀念能簡單地說明遺傳訊息在生物體中是如何傳送及運用。此外也有實驗對老鼠肝臟的樣品分析，並發現到RNA能夠與胺基酸結合並且與核醣體RNA結合來幫助蛋白質的形成，提供一個較明確的證據來解釋胺基酸到蛋白質過程^[101]。Holley等人從酵母上定序77核苷酸長的丙氨酸tRNA（alanine transfer RNA）序列，並且定出tRNA的結構，這是第一次做出RNA定序並且定出結構的研究，在解釋mRNA轉譯成蛋白質的過程上提供了重要的關鍵資訊^[102, 103]。這項重大研究使他獲得1968年的諾貝爾醫學獎。1977年Berget等人發現到基因是非連續性的，必須經過RNA剪切（splicing）動作。剪切是將不會表現的區域，即是內顯子（intron），加以切除，並保留會表現的外顯子（exon）並連接起來，最後形成成熟的mRNA，之後才會進行蛋白質合成^[104, 105]。

1993年，Lee等人發現了長度只有約22核苷酸長的短片段RNA，

稱作微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) ^[106]，他們研究秀丽隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*) 的 *lin-14* 基因，*lin-14* 基因會被轉譯成 LIN-14 蛋白質，但他們發現 *lin-4* 基因會影響 *lin-14* 基因的功能，結果造成 LIN-14 蛋白質的量會被 *lin-4* 基因調節。*lin-4* 基因為 22 個核苷酸長的成熟非編碼 miRNA，是由 61 個核苷酸長的 miRNA 前驅物轉變而成，而這段 miRNA 序列與 *lin-14* mRNA 的 3 端非編碼區之序列有互補，當 miRNA 互補在 *lin-14* mRNA 上時便會影響 *lin-14* mRNA 的轉譯，導致 LIN-14 蛋白質的量受到影響。在 2000 年，Reinhart 等人在秀丽隱桿線蟲上發現到第二個 miRNA，*let 7* ^[107]。*let 7* 會抑制 *lin-41*、*lin-14*、*lin-28*、*lin-42* 以及 *daf-12* 等基因的表現。在這之後便有許多 miRNA 相關的文獻陸續被報導出來，包括在昆蟲 ^[108]、植物 ^[109]、病毒 ^[110] 以及其他高等脊椎動物等等。到目前為止，已有超過 1000 多種人體 miRNA 被報導出來 ^[111]。

1.2.3 微小核糖核酸與疾病的關係

長度只有約 22 核苷酸長的 miRNA，科學家發現它有著調控基因的重要任務，而且也與癌症疾病的發展有關 ^[112]。miRNA 是屬於非轉譯核糖核酸 (noncoding RNA) 的一種，它指的是不會被轉譯成蛋白質的 RNA 序列。除了 miRNA 之外，非轉譯的小分子核糖核酸還有小片段

干擾核糖核酸 (small interference RNA, siRNA)、小核仁核糖核酸 (small nucleolar RNA, snoRNA)、反義核糖核酸 (antisense RNA) 以及 piwi 核糖核酸 (piwi-interacting RNA, piRNA) 等^[113]，這些 RNA 的作用稱作核糖核酸干擾 (RNA interference)。RNA 干擾能夠藉由調控 mRNA 來使生物達到個體發育、細胞分化^[114]、細胞死亡^[115]、激素分泌以及腫瘤形成^[116]等等。

miRNAs 要做到調節基因的功能，需經過一連串的生化合途徑。如圖 1-4 所示，miRNAs 先從人體基因中轉錄出來，基因體轉錄完成後稱為 pri-miRNA (primary miRNA)，長度約數千個鹼基。在細胞核中，pri-miRNA 會被屬於 RNase III 的 Drosha 酵素切割成在 3 端羥基有兩個核苷酸突起的莖環 (stem-loop) pre-miRNA (precursor miRNA)，長度約 70 個核苷酸長。接著由 RNA GTP-dependent transporter exportin 5 辨識莖環結構後，將 pre-miRNA 運送至細胞質中。Dicer 酵素會將 pre-miRNA 切割成雙股的 miRNA:miRNA* duplex，當這雙股與 RNA 誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC) 蛋白結合時，雙股便會解開成為單股的成熟 miRNA (mature miRNA)，此時長度約 19~25 核苷酸長，而此複合體稱作 miRISC。miRISC 之中的 miRNA 序列會與互補的目標 mRNA 結合，當目標 mRNA 序列與 miRNA 的序列是不完全的結合，這時會阻止 mRNA 轉譯成蛋白質；而當兩者的序列

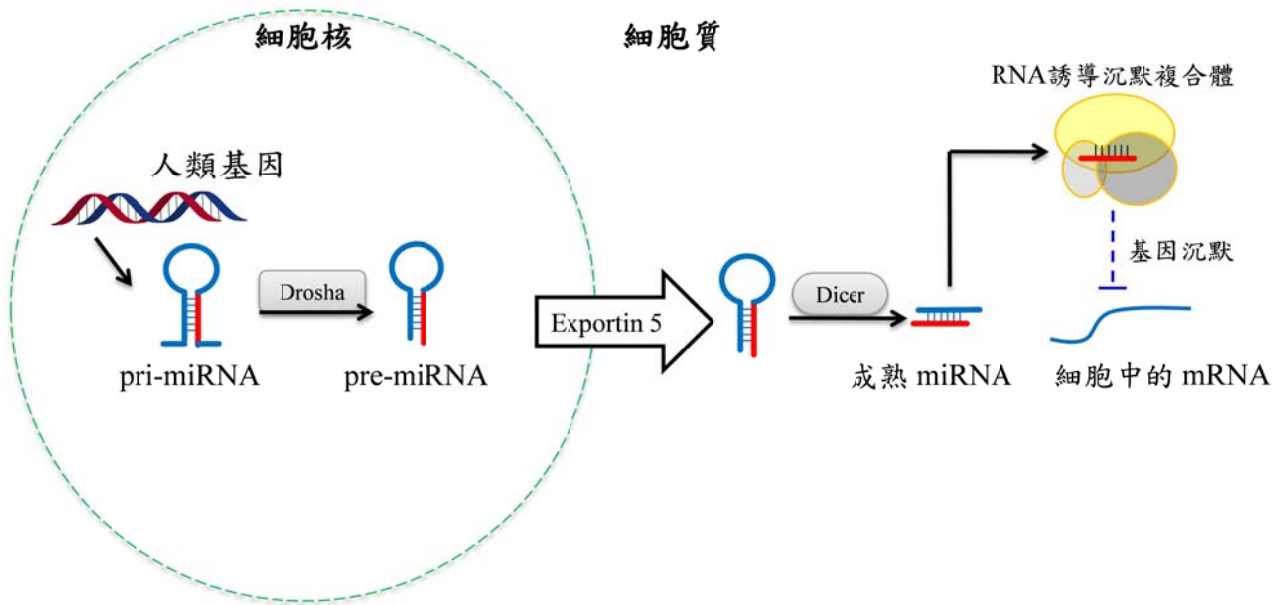


圖1-4 miRNA的生成與調控基因之生化途徑

完全結合時，誘導 mRNA 裂解的機制會啟動，導致目標 mRNA 的斷裂或抑制蛋白質的生成，miRNA 利用這機制來調控基因的表現。

miRNAs 與腫瘤的形成及抑制有關^[116]，當目標基因是致癌基因（oncogene）時，miRNAs 會進行腫瘤抑制的功能，被抑制的致癌基因無法產生腫瘤細胞生長所需的蛋白，最後導致腫瘤無法生成；而當目標基因是腫瘤抑制基因時，腫瘤細胞增殖少了負調控因子，使得癌症惡化。與 miRNAs 相關的疾病以癌症最多，譬如急性骨髓性白血病^[117]、肝癌^[118]、前列腺癌^[119]以及肺癌^[120]等等。其他還有心血管疾病、病毒性疾病以及肌肉疾病等^[121]。也有研究指出在腦部疾病中也有其重要性^[122]。

1.3 參考資料

1. Michaelis L: **Electric transport of enzymes, malt distaste and pepsin.** *Biochemische Zeitschrift* 1909, **17**:231.
2. Tiselius A: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochem J* 1937, **31**(9):1464-1477.
3. Hayashi K: **PCR-SSCP: a method for detection of mutations.** *Genetic analysis, techniques and applications* 1992, **9**(3):73-79.
4. Smooker PM, Cotton RG: **The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations.** *Mutation research* 1993, **288**(1):65-77.
5. Viridi AS, Loughlin JA, Irvén CM, Goodship J, Sykes BC: **Mutation screening by a combination of biotin-SSCP and direct sequencing.** *Human genetics* 1994, **93**(3):287-290.
6. Knox JH: **Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation.** *Chromatographia* 1988, **26**:329-337.
7. Hjérten S: **Free zone electrophoresis.** *Chromatographic Reviews* 1967, **9**(2):122-219.
8. Virtanen R: *Acta Polytechnica Scand* 1974, **123**:1.
9. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries.** *Analytical Chemistry* 1981, **53**(8):1298-1302.
10. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Capillary zone electrophoresis.** *Science* 1983, **222**(4621):266-272.
11. Tran AD, Park S, Lisi PJ, Huynh OT, Ryall RR, Lane PA: **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* 1991, **542**(2):459-471.
12. Nishi H, Tsumagari N, Kakimoto T, Terabe S: **Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.** *J Chromatogr* 1989, **465**(2):331-343.
13. Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Zhu M: **Capillary isoelectric focusing.** *Electrophoresis* 1997, **18**(12-13):2134-2144.
14. Cohen AS, Karger BL: **High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins.** *J Chromatogr* 1987, **397**:409-417.
15. Grant IH: **Capillary electrochromatography.** *Methods Mol Biol* 1996, **52**:197-209.

16. Smith RD, Fields SM, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth HR, Edmonds CG: **Capillary isotachopheresis with UV and tandem mass spectrometric detection for peptides and proteins.** *Electrophoresis* 1990, **11**(9):709-717.
17. Jacobson SC, Ramsey JM: **Microchip electrophoresis with sample stacking.** *Electrophoresis* 1995, **16**(4):481-486.
18. Colyer CL, Mangru SD, Harrison DJ: **Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins.** *J Chromatogr A* 1997, **781**(1-2):271-276.
19. Hutt LD, Glavin DP, Bada JL, Mathies RA: **Microfabricated capillary electrophoresis amino acid chirality analyzer for extraterrestrial exploration.** *Anal Chem* 1999, **71**(18):4000-4006.
20. Naito HK, Wada M, Ehrhart LA, Lewis LA: **Polyacrylamide-Gel Disk-Electrophoresis as a Screening Procedure for Serum Lipoprotein Abnormalities.** *Clinical Chemistry* 1973, **19**(2):228-234.
21. Zhu M, Hansen DL, Burd S, Gannon F: *J Chromatogr* 1989, **480**.
22. Chin AM, Colburn JC: **Counter-migration capillary electrophoresis (Cmce) in DNA restriction Fragment analysis.** *American biotechnology laboratory* 1989, **7**(10A):16-16.
23. Chiari M, Nesi M, Roncada P, Righetti PG: **Preparative isoelectric focusing in multicompartement electrolyzers: novel, hydrolytically stable and hydrophilic isoelectric membranes.** *Electrophoresis* 1994, **15**(7):953-959.
24. Carrilho E, Ruiz-Martinez MC, Berka J, Smirnov I, Goetzinger W, Miller AW, Brady D, Karger BL: **Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions.** *Anal Chem* 1996, **68**(19):3305-3313.
25. Chang HT, Yeung ES: **Poly(ethyleneoxide) for high-resolution and high-speed separation of DNA by capillary electrophoresis.** *Journal of Chromatography B* 1995, **669**(1):113-123.
26. Lu XD, Yeung ES: **Optimization of excitation and detection geometry for multiplexed capillary array electrophoresis of DNA fragments.** *Applied spectroscopy* 1995, **49**(5):605-609.
27. Kleemiss MH, Gilges M, Schomburg G: **Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(5-6):515-522.
28. Chrambach A, Aldroubi A: **Relative efficiency of molecular sieving in solutions of four polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(1-2):18-22.
29. Strege M, Lagu A: **Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries.** *Anal Chem* 1991,

- 63(13):1233-1236.
30. Grossman PD, Soane DS: **Experimental and theoretical-studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer-solutions.** *Biopolymers* 1991, **31**(10):1221-1228.
 31. Baba Y, Ishimaru N, Samata K, Tshako M: **High-resolution separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis in cellulose derivative solutions.** *J Chromatogr A* 1993, **653**(2):329-335.
 32. Xu XH, Yeung ES: **Direct measurement of single-molecule diffusion and photodecomposition in free solution.** *Science* 1997, **275**(5303):1106-1109.
 33. Xu XH, Yeung ES: **Long-range electrostatic trapping of single-protein molecules at a liquid-solid interface.** *Science* 1998, **281**(5383):1650-1653.
 34. Huang XC, Quesada MA, Mathies RA: **DNA sequencing using capillary array electrophoresis.** *Anal Chem* 1992, **64**(18):2149-2154.
 35. Takahashi S, Murakami K, Anazawa T, Kambara H: **Multiple Sheath-Flow Gel Capillary-Array Electrophoresis for Multicolor Fluorescent DNA Detection.** *Anal Chem* 1994, **66**(7):1021-1026.
 36. Zhang CX, Aebi Y, Thormann W: **Microassay of amiodarone and desethylamiodarone in serum by capillary electrophoresis with head-column field-amplified sample stacking.** *Clinical chemistry* 1996, **42**(11):1805-1811.
 37. Wey AB, Zhang CX, Thormann W: **Head-column field-amplified sample stacking in binary system capillary electrophoresis. Preparation of extracts for determination of opioids in microliter amounts of body fluids.** *J Chromatogr A* 1999, **853**(1-2):95-106.
 38. Dolnik V, Novotny MV: **Separation of amino acid homopolymers by capillary gel electrophoresis.** *Anal Chem* 1993, **65**(5):563-567.
 39. Chang PL, Lee KH, Hu CC, Chang HT: **CE with sequential light-emitting diode-induced fluorescence and electro-chemiluminescence detections for the determination of amino acids and alkaloids.** *Electrophoresis* 2007, **28**(7):1092-1099.
 40. Loo JA, Udseth HR, Smith RD: **Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Analytical biochemistry* 1989, **179**(2):404-412.
 41. Honda S, Suzuki K, Kakehi K: **Simultaneous determination of iodate and periodate by capillary zone electrophoresis: application to carbohydrate analysis.** *Analytical biochemistry* 1989, **177**(1):62-66.
 42. Heller C: **Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):629-643.

43. Skeidsvoll J, Ueland PM: **Analysis of RNA by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(9):1512-1517.
44. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S: **Capillary electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York.** 1993.
45. Colyar CL, Tang T, CHien N, Harrison DJ: *Electrophoresis* 1997, **18**:1733.
46. Hjerten S: **High-Performance Electrophoresis - Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption.** *Journal of Chromatography* 1985, **347**(2):191-198.
47. Liao JL, Abramson J, Hjerten S: **A Highly Stable Methyl Cellulose Coating for Capillary Electrophoresis.** *Journal of capillary electrophoresis* 1995, **2**(4):191-196.
48. Broseta D, Leibler L, Lapp A, Strazielle C: **Universal Properties of Semidilute Polymer-Solutions - a Comparison between Experiments and Theory.** *Europhys Lett* 1986, **2**(9):733-737.
49. Olivera BM, Baine P, Davidson N: **Electrophoresis of the nucleic acids.** *Biopolymers* 1964, **2**:245.
50. Ogston AG: **The spaces in a uniform random suspension of fibres.** *TRANSACTIONS OF THE FARADAY SOCIETY* 1958, **54**:1754.
51. De Gennes PG: *J Chem Phys* 1971, **55**:572.
52. Ferguson KA: **Starch-Gel Electrophoresis--Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides.** *Metabolism: clinical and experimental* 1964, **13**:SUPPL:985-1002.
53. Chang HT, Yeung ES: *Anal Chem* 1993, **65**:650-652.
54. Sebastiano R, Mendieta ME, Antonioli P, Bossi A, Righetti PG, Citterio A: **Organic and inorganic di-cations for capillary silica coating and EOF modulation in CE: Example of application in PEG analysis.** *Electrophoresis* 2006, **27**(8):1495-1501.
55. Cohen AS, Najarian DR, Paulus A, Guttman A, Smith JA, Karger BL: **Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**(24):9660-9663.
56. Caslavská J, Gassmann E, Thormann W: **Modification of a tunable UV-visible capillary electrophoresis detector for simultaneous absorbance and fluorescence detection: profiling of body fluids for drugs and endogenous compounds.** *J Chromatogr A* 1995, **709**(1):147-156.
57. Zhang T, Fang Q, Wang SL, Qin LF, Wang P, Wu ZY, Fang ZL: **Enhancement of signal-to-noise level by synchronized dual wavelength modulation for light emitting diode fluorimetry in a liquid-core-waveguide microfluidic**

- capillary electrophoresis system.** *Talanta* 2005, **68**(1):19-24.
58. Heitmeier S, Blaschke G: **Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1999, **721**(1):109-125.
 59. Chen DY, Dovichi NJ: **Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 1994, **657**(2):265-269.
 60. Fishman HA, Orwar O, Allbritton NL, Modi BP, Shear JB, Scheller RH, Zare RN: **Cell-to-cell scanning in capillary electrophoresis.** *Anal Chem* 1996, **68**(7):1181-1186.
 61. Chen DY, Swerdlow HP, Harke HR, Zhang JZ, Dovichi NJ: **Low-cost, high-sensitivity laser-induced fluorescence detection for DNA sequencing by capillary gel electrophoresis.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):237-246.
 62. Siles BA, O'Neil KA, Tung DL, Bazar L, Collier GB, Lovelace CI: **The use of dynamic size-sieving capillary electrophoresis and mismatch repair enzymes for mutant DNA analysis.** *Journal of capillary electrophoresis* 1998, **5**(1-2):51-58.
 63. Miscicka-Sliwka D, Grzybowski T, Wozniak M: **Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci.** *Electrophoresis* 1997, **18**(9):1627-1632.
 64. Marino MA, Devaney JM, Davis PA, Girard JE: **Optimization of intercalation dye concentration for short tandem repeat allele genotyping using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 1999, **732**(2):365-374.
 65. Ranade SS, Chung CB, Zon G, Boyd VL: **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.** *Analytical biochemistry* 2009, **390**(2):126-135.
 66. Liu GH, Nakamura T, Amemiya T, Rajendran N, Itoh K: **Analysis of Bacterial Populations in the Environment Using Two-dimensional Gel Electrophoresis of Genomic DNA and Complementary DNA.** *Microbes Environ* 2011.
 67. Day IN, Spanakis E, Chen X, O'Dell SD: **Microplate array diagonal gel electrophoresis for mutation research in DNA banks.** *Electrophoresis* 1999, **20**(6):1250-1257.
 68. Lee MK, Kim HR: **[Comparison between Real-Time PCR and Agarose Gel**

- Electrophoresis for DNA Quantification.].** *The Korean journal of laboratory medicine* 2006, **26**(3):217-222.
69. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A: **Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.** *Science* 1997, **278**(5343):1580-1581.
 70. Taillon-Miller P, Piernot EE, Kwok PY: **Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery.** *Genome research* 1999, **9**(5):499-505.
 71. Lee LG, Spurgeon SL, Heiner CR, Benson SC, Rosenblum BB, Menchen SM, Graham RJ, Constantinescu A, Upadhyya KG, Cassel JM: **New energy transfer dyes for DNA sequencing.** *Nucleic acids research* 1997, **25**(14):2816-2822.
 72. Fogarty K, McPhee JT, Scott E, Van Orden A: **Probing the ionic atmosphere of single-stranded DNA using continuous flow capillary electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy.** *Anal Chem* 2009, **81**(1):465-472.
 73. Wan F, Zhang J, Lau A, Tan S, Burger C, Chu B: **Nanostructured copolymer gels for dsDNA separation by CE.** *Electrophoresis* 2008, **29**(23):4704-4713.
 74. Meagher RJ, Won JI, Coyne JA, Lin J, Barron AE: **Sequencing of DNA by free-solution capillary electrophoresis using a genetically engineered protein polymer drag-tag.** *Anal Chem* 2008, **80**(8):2842-2848.
 75. Fundador EV, Choudhary D, Schenkman JB, Rusling JF: **Accurate DNA fragment sizing by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence array for detection of sequence specificity of DNA damage.** *Anal Chem* 2008, **80**(6):2212-2221.
 76. Jiang Y, Ma Y: **A fast capillary electrophoresis method for separation and quantification of modified nucleosides in urinary samples.** *Anal Chem* 2009, **81**(15):6474-6480.
 77. Li N, Jablonowski C, Jin H, Zhong W: **Stand-alone rolling circle amplification combined with capillary electrophoresis for specific detection of small RNA.** *Anal Chem* 2009, **81**(12):4906-4913.
 78. Wang X, Song Y, Song M, Wang Z, Li T, Wang H: **Fluorescence polarization combined capillary electrophoresis immunoassay for the sensitive detection of genomic DNA methylation.** *Anal Chem* 2009, **81**(19):7885-7891.
 79. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE, Jr.: **Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection.** *Electrophoresis* 1999, **20**(6):1177-1185.
 80. Hebenbrock K, Williams PM, Karger BL: **Single strand conformational polymorphism using capillary electrophoresis with two-dye laser-induced fluorescence detection.** *Electrophoresis* 1995, **16**(8):1429-1436.
 81. Ru QH, Jing HE, Luo GA, Huang Q: **Single-strand conformation**

- polymorphism analysis to detect the p53 mutation in colon tumor samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2000, **894**(1-2):171-177.
82. Ren J: **High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications* 2000, **741**(2):115-128.
 83. Cheng J, Kasuga T, Mitchelson KR, Lightly ER, Watson ND, Martin WJ, Atkinson D: **Polymerase chain reaction heteroduplex polymorphism analysis by entangled solution capillary electrophoresis.** *J Chromatogr A* 1994, **677**(1):169-177.
 84. Lindberg P, Righetti PG, Gelfi C, Roeraade J: **Electrophoresis of DNA sequencing fragments at elevated temperature in capillaries filled with poly(N-acryloylaminopropanol) gels.** *Electrophoresis* 1997, **18**(15):2909-2914.
 85. Gao Q, Yeung ES: **High-throughput detection of unknown mutations by using multiplexed capillary electrophoresis with poly(vinylpyrrolidone) solution.** *Anal Chem* 2000, **72**(11):2499-2506.
 86. Ghozzi R, Morand P, Ferroni A, Beretti JL, Bingen E, Segonds C, Husson MO, Izard D, Berche P, Gaillard JL: **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* 1999, **37**(10):3374-3379.
 87. Zhang Z, Wu Y, Cheng W, Wu R: **Single strand conformation polymorphism analysis of K-ras gene mutations by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (LIF) detector.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2000, **301**(1-2):205-211.
 88. Humphries SE, Gudnason V, Whittall R, Day IN: **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.** *Clinical chemistry* 1997, **43**(3):427-435.
 89. Bao P, Frutos AG, Greef C, Lahiri J, Muller U, Peterson TC, Warden L, Xie X: **High-sensitivity detection of DNA hybridization on microarrays using resonance light scattering.** *Anal Chem* 2002, **74**(8):1792-1797.
 90. Grossman PD, Bloch W, Brinson E, Chang CC, Eggerding FA, Fung S, Iovannisci DM, Woo S, Winn-Deen ES: **High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation.** *Nucleic acids research* 1994, **22**(21):4527-4534.

91. Piggee CA, Muth J, Carrilho E, Karger BL: **Capillary electrophoresis for the detection of known point mutations by single-nucleotide primer extension and laser-induced fluorescence detection.** *J Chromatogr A* 1997, **781**(1-2):367-375.
92. Prado M, Calo P, Cepeda A, Barros-Velazquez J: **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* 2005, **26**(15):2918-2926.
93. Devallois A, Goh KS, Rastogi N: **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* 1997, **35**(11):2969-2973.
94. Hernandez SM, Morlock GP, Butler WR, Crawford JT, Cooksey RC: **Identification of Mycobacterium species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**(11):3688-3692.
95. Jacobson KB: **Ribonucleotides of RNA: separation by chromatography on sheets of diethylaminoethylcellulose.** *Science* 1962, **138**(3539):515-516.
96. Kellogg DA, Doctor BP, Loebel JE, Nirenberg MW: **RNA codons and protein synthesis. IX. Synonym codon recognition by multiple species of valine-, alanine-, and methionine-sRNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1966, **55**(4):912-919.
97. Gefter ML, Russell RL: **Role modifications in tyrosine transfer RNA: a modified base affecting ribosome binding.** *Journal of molecular biology* 1969, **39**(1):145-157.
98. Dahm R: **Friedrich Miescher and the discovery of DNA.** *Developmental biology* 2005, **278**(2):274-288.
99. Allen F: **The Biochemistry of the Nucleic Acids, Purines, and Pyrimidines.** *Annual Review of Biochemistry* 1941, **10**:221-244.
100. Crick F: **Central dogma of molecular biology.** *Nature* 1970, **227**(5258):561-563.
101. Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC: **A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.** *The Journal of biological chemistry* 1958, **231**(1):241-257.
102. Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, Penswick JR, Zamir A: **Structure of a Ribonucleic Acid.** *Science* 1965, **147**(3664):1462-1465.

103. Holley RW, Everett GA, Madison JT, Zamir A: **Nucleotide Sequences in the Yeast Alanine Transfer Ribonucleic Acid.** *The Journal of biological chemistry* 1965, **240**:2122-2128.
104. Berget SM, Moore C, Sharp PA: **Spliced segments at the 5 ' terminus of adenovirus 2 late mRNA - (adenovirus 2 mRNA processing/5 ' tails on mRNAs/electron microscopy of mRNA DNA hybrids) (Reprinted from Proc Natl Acad Sci USA, vol 74, pg 3171-3175, 1977).** *Rev Med Virol* 2000, **10**(6):356-362.
105. Sharp PA: **Split Genes and Rna Splicing (Nobel Lecture).** *Angew Chem Int Edit* 1994, **33**(12):1229-1240.
106. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell* 1993, **75**(5):843-854.
107. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.** *Nature* 2000, **403**(6772):901-906.
108. Tran T, Havlak P, Miller J: **MicroRNA enrichment among short 'ultraconserved' sequences in insects.** *Nucleic acids research* 2006, **34**(9):e65.
109. Bartel B, Bartel DP: **MicroRNAs: At the root of plant development?** *Plant physiology* 2003, **132**(2):709-717.
110. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P: **Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA.** *Science* 2005, **309**(5740):1577-1581.
111. Kuo TY, Hsi E, Yang IP, Tsai PC, Wang JY, Juo SH: **Computational Analysis of mRNA Expression Profiles Identifies MicroRNA-29a/c as Predictor of Colorectal Cancer Early Recurrence.** *PloS one* 2012, **7**(2):e31587.
112. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A *et al*: **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(30):10513-10518.
113. Chapman EJ, Carrington JC: **Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways.** *Nature reviews Genetics* 2007, **8**(11):884-896.
114. Shivdasani RA: **MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation.** *Blood* 2006, **108**(12):3646-3653.
115. Jovanovic M, Hengartner MO: **miRNAs and apoptosis: RNAs to die for.** *Oncogene* 2006, **25**(46):6176-6187.

116. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(4):259-269.
117. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T *et al*: **MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia.** *Blood* 2008, **111**(6):3183-3189.
118. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T: **MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.** *Gastroenterology* 2007, **133**(2):647-658.
119. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C *et al*: **The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities.** *Nat Med* 2008, **14**(11):1271-1277.
120. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C *et al*: **MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(40):15805-15810.
121. Couzin J: **MicroRNAs make big impression in disease after disease.** *Science* 2008, **319**(5871):1782-1784.
122. Rogaev EI: **Small RNAs in human brain development and disorders.** *Biochemistry (Mosc)* 2005, **70**(12):1404-1407.

第二章 以毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光偵測核糖核酸之降解作用

2.1 緒論

毛細管電泳暨雷射誘發螢光 (capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, CE-LIF) 因為有著高分離效率以及消耗樣品量少等優點，是生物分析上一項重要的分析工具^[1-3]，CE-LIF 不僅能夠分析蛋白質、核苷酸以及醣類等等^[4]的多種樣品，也是各種-omics 學科重要的分析方法^[5]，但目前利用毛細管電泳分析 RNA 的研究卻相對地少。Zhong 等人利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光直接評估訊息核糖核酸 (messenger RNA) 的表現量，且能區分乳癌細胞組織以及正常組織^[6]。Tian 等人利用複合式的技術偵測基因的表現，並且有著高通量以及良好的靈敏度等優點^[7]。Sumitomo 等人發現醋酸是非常強的變性劑，可使 RNA 的分子內氫鍵斷裂，在毛細管凝膠電泳分離時，分離介質若含有醋酸能大大提升 RNA 的分離效率，他們也成功地分離小鼠纖維母細胞 (NIH 3T3 cells) 的總核糖核酸 (total RNA) 中的 18S 與 28S 核糖體核糖核酸 (ribosomal RNA, rRNA) ^[8]。

近幾年來 RNA 的研究在生化領域中引起廣泛重視，例如核糖核酸的沉默 (RNA silencing)、轉錄體學 (transcriptomics) 的研究以及小分子核糖核酸 (small RNA) 的調控等等的相關研究。上述的方法都會

與樣品清潔、萃取 RNA、以及保存有關。RNA 是熱力學穩定的分子，但是只要有少量的核糖核酸酵素 (ribonuclease enzymes) 就會使大片的 RNA 被消化，降解成小片段的 RNA，不適當的操作手法或是溫度的因素也都有可能使 RNA 降解^[9, 10]，如此一來很有可能造成下游應用或是實驗出現誤差^[11, 12]，不僅會浪費時間也浪費金錢與勞力。因此 RNA 的純度和完整度便成為 RNA 相關實驗的重要因素，相關實驗包括基因表現檢測 (gene expression profiling) 與反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 等等。由於 RNA 的降解會妨礙到後續的實驗結果，Opitz 等人證明選擇完整的 RNA 樣品有助於減少實驗的誤差，因此有必要對 RNA 做品質評估^[13]。即使是在偵測小分子 RNA 也有相同情況，Ibberson 等人證明在總 RNA 的品質不佳時，會影響偵測微小核糖核酸表現分析資料 (microRNA expression profiles) 時的再現性^[14]。

自生物體中萃取出來的總 RNA 之中，含有 80%~85% 的 rRNA，依照片段的大小分成 5S、5.8S、18S 以及 28S (S: svedberg unit) 四個單元。早期的 RNA 完整性常以瓊脂凝膠電泳來確認，並使用溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 染色核苷酸，以比較 28S 與 18S rRNA 片段的帶寬 (bands) 比值，當比值為 2.0 或是更高時，則能視為高純度的完整 RNA^[10]。目前也有使用光譜儀偵測 RNA 的完整性方法，藉由樣

品在 260 nm 以及在 280 nm 的吸收度，將 $A_{260} : A_{280}$ 的吸收強度比值來認定 RNA 的純度，普遍以比值大於 1.8 時視其為純度高的 RNA^[15]，雖然吸收度比值能比較 RNA 的純度，但受到降解的 RNA 在 260 nm 與 280 nm 吸收度仍然有可能與未降解時相同，因此 RNA 的純度需要更精確的方法來判定。以毛細管電泳是偵測 RNA 完整性一種很有效的工具^[16]，目前已有微晶片電泳的儀器 Agilent 2100 Bioanalyzer 來幫助 RNA 的定性工作，並以 2100 Expert 軟體（Agilent Technologies）可從光譜圖中計算 RNA 的完整度指標（RNA integrity number, RIN）^[17, 18]，RIN 值將 RNA 的完整度分作一到十個等級，為下游的 RNA 實驗提供了一項參考指標。

毛細管電泳結合螢光偵測普遍使用雷射當作激發光源，由於雷射光單色以及高強度低發散的特性，可輕易的聚焦在毛細管的偵測窗口上。常見的雷射光源包括氬離子雷射（argon ion laser）或是氦氖雷射（He-Ne laser），也有體積較小的固態雷射（solid-state），此外還有紅寶石雷射（Nd:YAG laser）等等。但礙於雷射的價格昂貴，而且體積龐大佔空間以及生命週期太短（約 3000 小時）等因素，因此尋找成本低以及不佔空間的雷射替代光源，將有助於降低分析的成本。已有研究使用發光二極體（light-emitting diodes, LEDs）代替雷射作為毛細管電泳光學偵測器之激發光源，結果顯示發光二極體光源比傳統用的氬燈

(deuterium lamps) 和鎢絲燈 (tungsten lamps) 有更多好處^[19, 20]，如成本較低、壽命較長 (>10000 小時)、產生的熱比較少、光的強度與電流有良好的線性關係、相當穩定的放射光以及極低的雜訊 (noise)。此外發光二極體有紅外光到紫外光波長範圍的商業化產品，在波長的選擇上更加方便。發光二極體體積較小，很適合小型化的分析裝置。雖然發光二極體的光是發散的，無法像雷射光一般，不過這問題可以利用物鏡將光聚焦來解決，因此仍然能做為毛細管電泳的光源。Tong 與 Yeung 使用紅光發光二極體當作毛細管電泳光源的吸收偵測系統^[19]，能夠有效的降低背景雜訊。Macka 等人以實驗結果發現發光二極體比汞燈 (mercury lamps) 或是鎢絲燈有比較穩定的輸出以及比較低的雜訊^[20]。毛細管電泳的偵測極限是由噪訊比 (signal-to-noise ratio, S/N) 求得，因此雜訊降低就會使偵測極限降低。Hillebrand 等人以紫外光發光二極體誘發螢光偵測系統，並結合毛細管電泳，利用螢光胺 (fluorescamine) 對血管緩激肽 (bradykinin) 以及離胺酸 (lysine) 衍生化並進行偵測，能測得偵測極限分別是 3 fmol 以及 18 fmol^[21]。Sluszny 等人使用紫外光發光二極體作為毛細管區帶電泳激發光源，並以此裝置偵測卵伴蛋白 (conalbumin)，偵測極限可達 20 nM，並且利用此光源結合毛細管凝膠電泳，成功地分析出混合八種蛋白質之標準品^[22]。Breadmore 等人使用紅色發光二極體，偵測尼羅藍 (Nile Blue)

染料衍生過的脂肪酸 (fatty acid)，偵測極限有 0.5 μM ，此實驗結果能比間接 UV 吸收檢測與間接螢光偵測法還來得靈敏 [23]。

本章研究利用毛細管電泳結合發光二極體誘導螢光來評估 RNA 的完整度，以聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP, M_{ave} 1,300,000 g/mol) 塗覆的毛細管填充 0.4% 的聚氧乙烯 (poly(ethylene) oxide, PEO, M_{ave} 4,000,000 g/mol) 以及加入具有核苷酸特異性的螢光染料 SYTO 9，能夠在 15 分鐘內成功分離總 RNA 的 18S 與 28S rRNA，並且能監測到在溫度影響下的變化。

2.2 實驗部分

2.2.1 實驗試藥

PEO (M_{ave} 4,000,000 g/mol) 、PVP (M_{ave} 1,300,000 g/mol) 、三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, tris)、甘胺酸(glycine) 以及醋酸 (acetic acid) 是向美國 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 購買。實驗所需而訂製的寡核苷酸是購自美國 Integrated DNA Technologies 公司 (San Diego, CA, USA)。SYTO 9 染料以及 DNase/RNase-free water 是與美國 Invitrogen 公司(Carlsbad, CA, USA) 購買。所有的化學藥劑皆屬於分析級。

2.2.2 細胞培養 (cell culture) 與核糖核酸萃取 (RNA extraction)

實驗所用到的人類鼻咽癌細胞 (HK-1) 是由長庚大學分子醫學中心所提供。細胞皆培養於 RPMI 培養基之中，並放置在含有 5% 的二氧化碳與溫度 37°C 的培養箱中，總核糖核酸的萃取是利用已經商業化的萃取試劑，並且根據其操作手冊的方法萃取出來 (Qiagen, Germany)。總 RNA 的濃度皆由 DNase/RNase-free water 來稀釋調整。所有的 RNA 樣品都會儲存在 -20°C 的溫度之下，使用前會先放置在冰上等候樣品解凍。

2.2.3 毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光

毛細管電泳實驗裝置都是自行組裝。高電壓供應器是向 Gamma High Voltage Research 公司 (Ormond, FL, USA) 購買並用來驅動電泳，在高電壓的電極輸出端會穿過自製的 plexiglass box 來防止觸電。實驗用的光源是購自 Roithner Lasertechnik (Vienna, Austria) 的 490-nm InGaN 發光二極體，並使用 1.2 mW 的總輻射功率來激發。圖 2-1 為毛細管電泳裝置圖。青色的發光二極體放入 40× 物鏡 (numerical aperture = 0.65)，而物鏡會事先嵌入 488 nm 的干涉濾片 (Edmund, Barrington, NJ, USA)，干涉濾片只會通過發光二極體的 488 nm 波段之放射光。將這組光源裝置平行於毛細管的偵測窗口。實驗所用的熔融矽 (fused silica) 材質毛細管是購自美國 Polymicro Technologies 公司，毛細管內徑為 75 μm ，外徑為 365 μm ，毛細管外壁塗覆了一層聚亞稀胺 (polyimide)，總長度 40 公分，在 33 公分處以打火機燒去聚亞稀胺，露出約 1 公分的玻璃面作為偵測窗口，故有效長度為 33 公分。40× 接物鏡將光源聚焦在毛細管的偵測窗口上，當接有螢光的樣品通過時會被光源激發而發散出特定波長之螢光，發散出來的螢光會以 10× 接物鏡 (numerical aperture = 0.25) 收集，藉由 520 nm 干涉濾片以及 OG 515 nm 截斷濾片 (Edmund, Barrington, NJ, USA) 過濾光源干擾以及散射光。最後以光電倍增管 (R3896, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan)

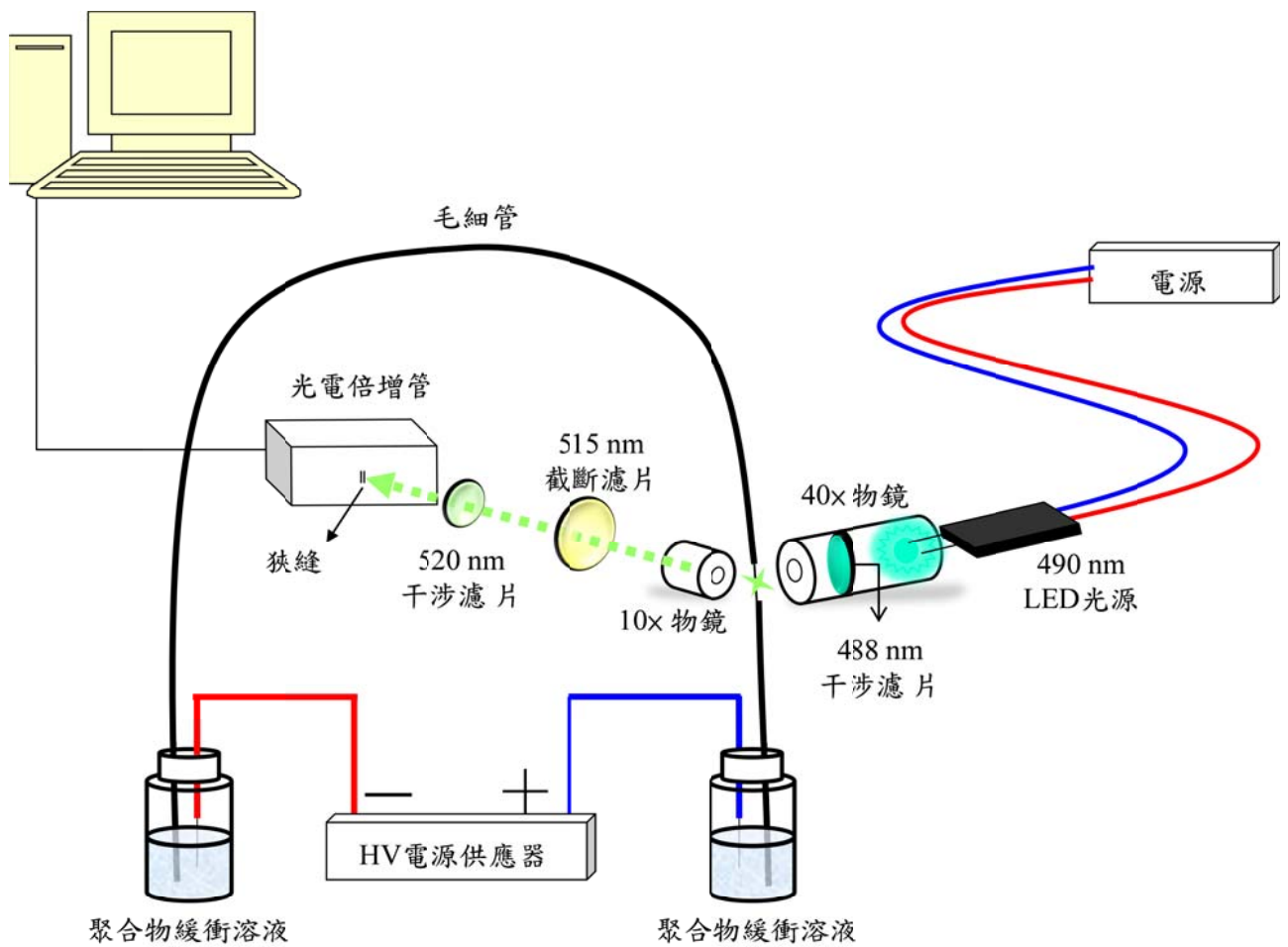


圖2-1 毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光裝置圖

偵測螢光訊號。光電倍增管固定在黑色密封的盒子裡，並在盒子上開出一個小狹縫使螢光能夠通過狹縫並直射光電倍增管。螢光進入光電倍增管後，螢光訊號會被放大並且利用 10-k Ω 電阻將產生的電流訊號轉換成電壓訊號，藉由 24-bit 數位類比轉換器 (A/D converter, JMBS Development) 以 10 Hz 的頻率來擷取訊號並轉換成數位資料儲存於電腦之中，最後以層析軟體 Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) 將資料轉換成電泳圖。

2.2.4 聚合物溶液製備

聚合物溶液配置時，所有的容器都先以二次水洗過，再以超音波震盪機震盪 5 分鐘來清洗容器。所使用的緩衝溶液為 pH 7.5 的 2 \times tris-glycine-acetate 緩衝溶液 (14 mM tris, 192 mM glycine, 10 mM acetic acid, 2 \times TGA) ^[24]。配置聚合物溶液時會利用攪拌子與攪拌器幫助溶液能攪拌均勻。取 50 mL 的 2 \times TGA 緩衝溶液倒入錐形瓶內，慢慢增強攪拌速度使溶液產生漩渦，取 0.2 g 的 PEO 與 0.05 g PVP 粉末加以混合後，將粉末緩緩倒入溶液之中，配置成 0.4% PEO 混和 0.1% PVP。溶液攪拌至少要十二個小時才能確保聚合物完全溶解。最後加入 5 μ L 的原倍 SYTO 9 染料 (5 mM) 並且要在避光下攪拌 5 分鐘左右，讓染料能均勻分布在聚合物溶液之中。將配好的聚合物溶液倒入 50 mL 離

心管中，並以 $10000 \times g$ 離心 10 分鐘去除氣泡。最後以鋁箔紙包覆離心管來避光，並保存在 4°C 的冰箱裡以便使用。

2.2.5 螢光染料

本實驗使用 SYTO 9 螢光染料來標示核苷酸，SYTO 9 著高莫耳吸收係數，其係數值大於 $50,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 。SYTO 9 與 DNA 結合時會有最大吸收波長 485 nm，並激發出最大波長為 498 nm 的螢光；當與 RNA 結合時會有最大吸收波長 486 nm，激發最大波長為 501 nm 的螢光。SYTO 9 是嵌入式的染料^[25]，染料分子會嵌入兩個鹼基之中，且 SYTO 9 染料嵌合上核苷酸後的螢光放光比未嵌合時增強許多，量子產率可提升至少 40 倍以上。SYTO 染料除了可以應用在 DNA 及 RNA 之外，它也應用於細胞的染色上^[26]。

2.2.6 毛細管前處理

熔融矽毛細管會先以石英片切成 40 公分的長度，並在 33 公分處燒出約 1 公分的偵測視窗。毛細管再塗覆前會先以去離子水推進毛細管內，活化毛細管內壁表面的官能基，之後在毛細管內通入 PVP (5% in H_2O) 並靜置一晚，如此一來能有效防止 DNA 以及 RNA 的吸附，以提高實驗的再現性^[27]。

2.2.7 聚合酶連鎖反應加熱器

本實驗利用聚合酶連鎖反應加熱器加熱 RNA 樣品，此加熱器是日商 Astec 公司生產製造的 PC-818A，加熱容器全為鋁製素材，加速導熱而且經由微電腦 PID 控制升降溫，可以使鋁塊每個部位都能夠均勻受熱，升降溫速度快，可達每秒 3°C，其精準度可達 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.8 軟體分析

實驗計算 RNA 的二級結構是利用 RNA structure (version 5.3) 軟體來計算 18S 以及 28S rRNA^[28]，計算 RNA 在室溫 25°C 與注入樣品前加熱 70°C 的結構變化，並選擇計算結果中自由能最低的結構。還利用 Oligo 7 (Molecular Biology Insights, Inc. USA) 軟體來計算 rRNA 的分子量。18S rRNA (1869 nt, NR_003286.2) 以及 28S rRNA (5070 nt, NR_003287.2) 的參考序列是從美國國家衛生研究院生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information) 網站中下載 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

2.2.9 實驗流程

注入樣品前先利用針筒將聚合物溶液注入毛細管中，使其充滿整個毛細管，針頭部分會插上一小段的鐵氟龍管以便容易注入毛細管內，

正電部分擺上聚合物溶液以及電極，負電部分電極與毛細管插入樣品中，在電場 250 V/cm 下利用電動進樣 (electrokinetic injection) 的方式進樣 10 秒鐘。在總 RNA 樣品要注入毛細管之前，都會先加熱 70°C 5 分鐘並立即放入冰水冷卻，這麼做是為了防止核醣核酸樣品之間交叉雜合 (cross hybridization) 導致偵測上出現問題。之後將毛細管小心並迅速地擺回聚合物溶液中，將負電電極也擺入後再次施加 250 V/cm 的電場進行分離。當聚合物溶液中的 SYTO 9 染料與欲偵測的 RNA 有結合時，在經過 33 公分處的偵測窗口時便會被發光二極體激發出螢光，而在聚合物溶液中沒與 RNA 結合的染料在發光二極體的激發下螢光訊號微乎其微，影響背景值並不明顯。分析結束後以去離子水將聚合物溶液推出，便可進行下個實驗。

2.3 結果與討論

2.3.1 毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光系統光學零件設置

為了建立低成本的系統，便使用發光二極體當激發光源，與雷射相比其耗電量較低，而且在價格上較便宜，但是缺點就是放出的波長帶寬廣，會導致高背景值的產生。實驗選擇青色的發光二極體當光源 (λ_{\max} 493.2 nm)，以 1.2 mW 的電源來驅動發光二極體激發染料 SYTO 9。發光二極體波長範圍如圖 2-2，其放射帶寬從 440 到 570 nm，紅線區域是欲收集的 SYTO 9 放光範圍，由於發光二極體放射帶寬與欲收光範圍重疊面積大，這會造成收光時連同光源一起進入 PMT 內，造成背景值增大。為了解決這問題，在光源處會放置 488 nm 的干涉濾片，能將發光二極體的放射波長帶寬縮窄至 475~505 nm。在收光處會在 PMT 前放置 520 nm 的干涉濾片，藉此來減少激發光波長以及螢光放射波長的重疊範圍，能夠有效的降低背景雜訊。

使用濾片將發光二極體放射波長帶寬廣的問題降低，進一步利用合成的核苷酸 (TB11, 5'到 3'序列: ACCAACGATGGTGTGTCCAT)，在 5'端標記有 Alexa Fluor 488 染料 (λ_{ex} : 492 nm, λ_{em} : 517 nm)，以此螢光核苷酸來偵測發光二極體系統的靈敏度。圖 2-3 顯示利用發光二極體誘發螢光可偵測螢光標記之核苷酸濃度從 100 nM 到 100 pM，線性範圍可包括三個數量級。將圖 2-3 以螢光強度對濃度作圖，製作成圖 2-4

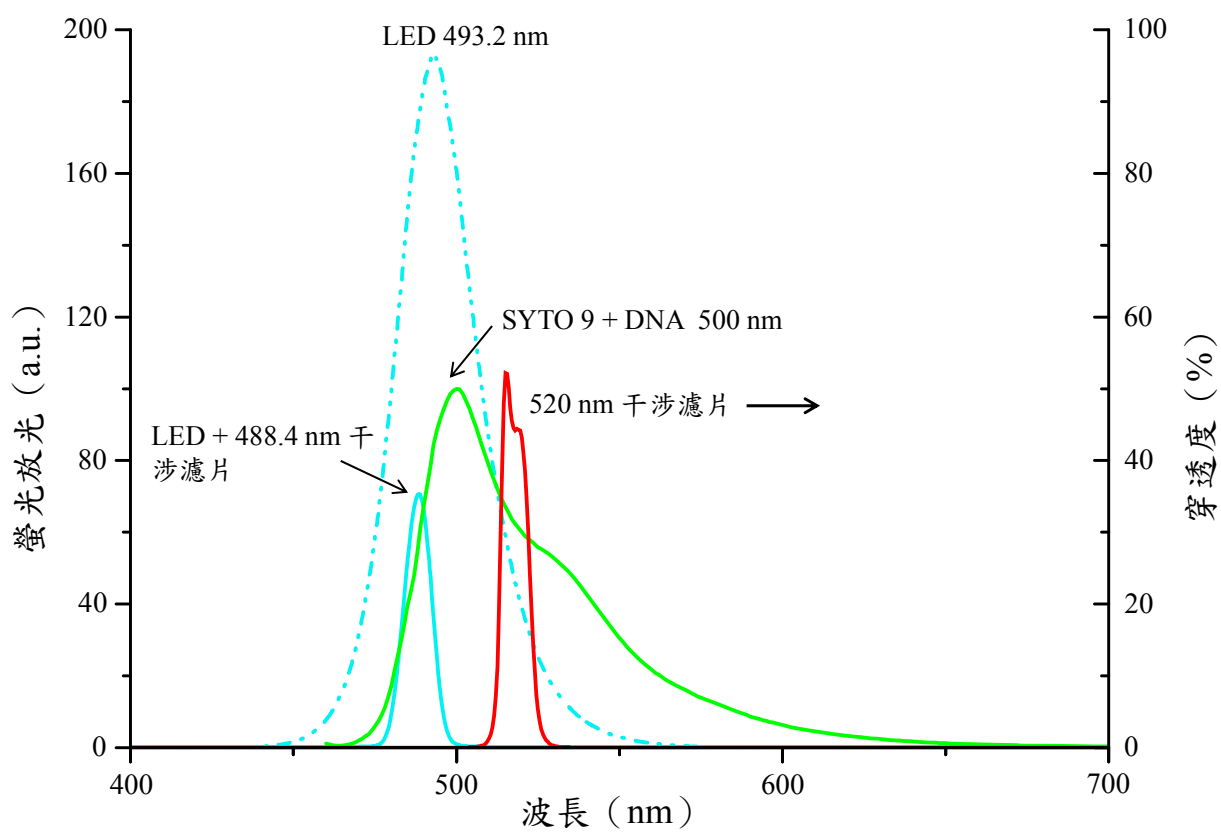


圖2-2 發光二極體與染料SYTO 9放射光譜圖以及干涉濾片穿透光譜圖

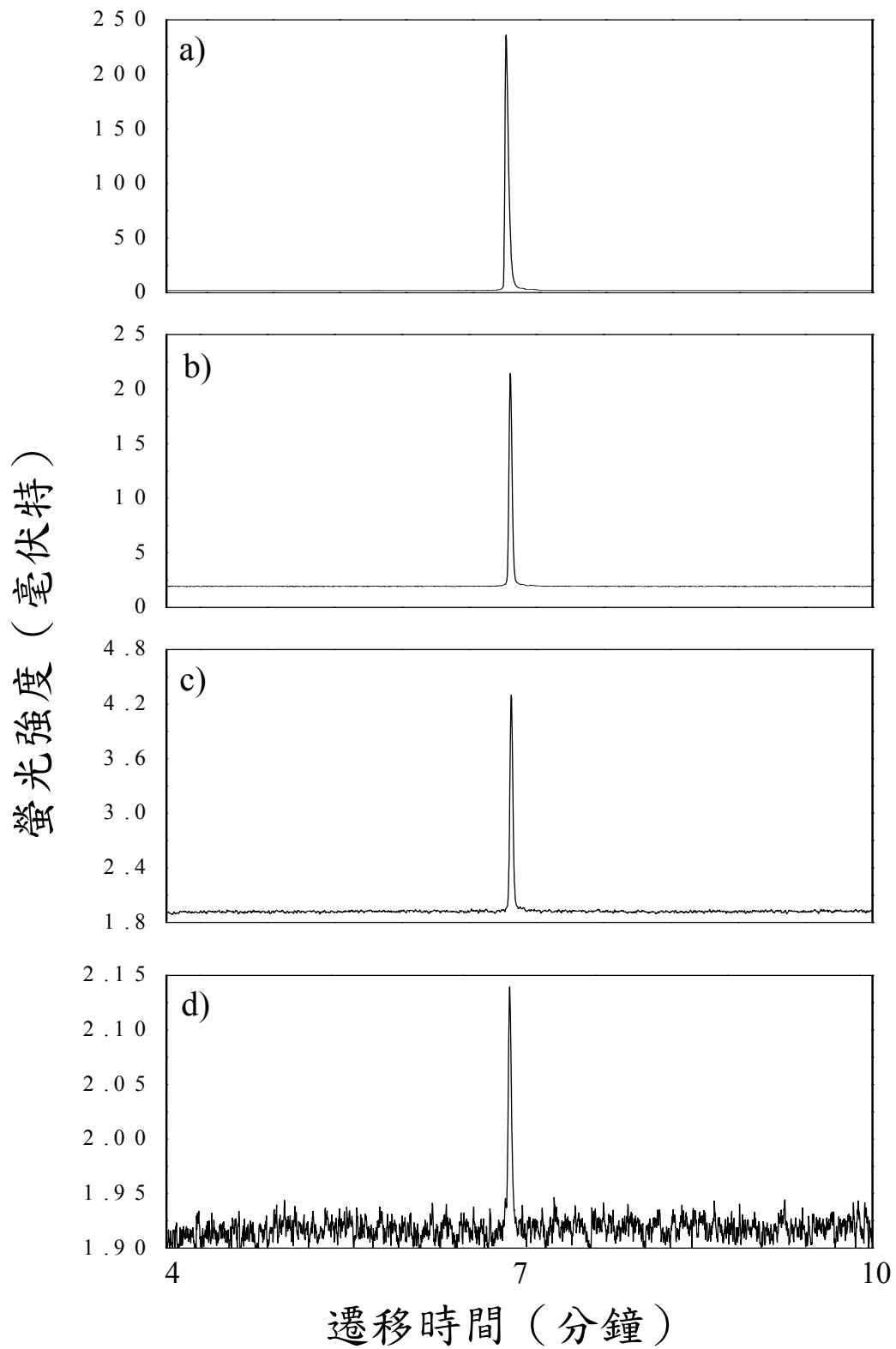


圖2-3 不同濃度之Alexa Fluor 488螢光核苷酸電泳圖。a) 100 nM。b) 10 nM。c) 1.0 nM。d) 0.1 nM。

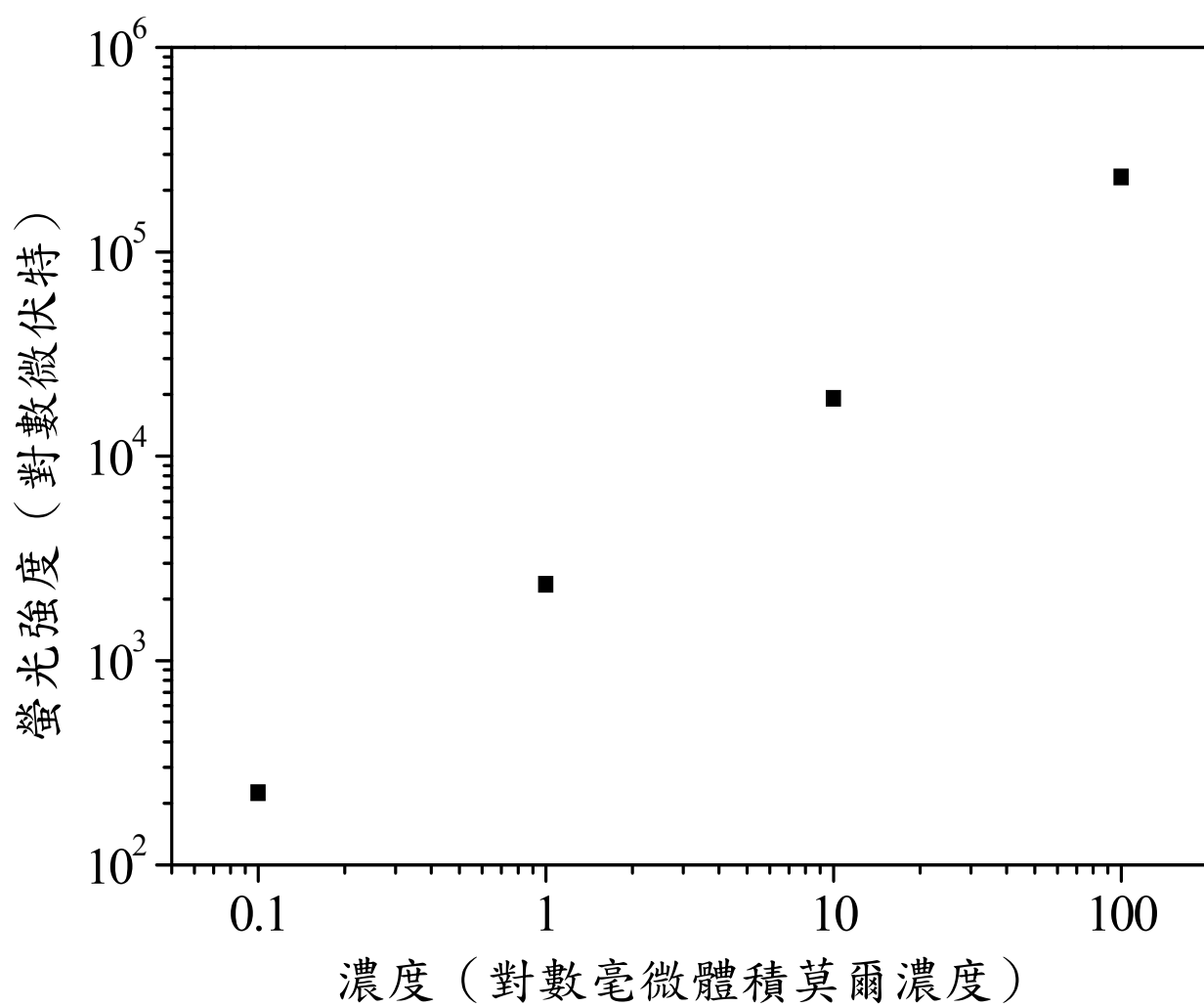


圖2-4 Alexa Fluor 488螢光探針之螢光強度對濃度作圖

的線性圖，其線性方程式為 $y = 2.3 \times 10^{12}x - 1291.1$ ， R^2 為 0.9995，並且有偵測極限 12 pM ($S/N = 3$)。結果顯示此偵測系統有益於 DNA 定序^[29]或是基因突變的偵測^[30, 31]等以 PCR 為基礎的研究上。

2.3.2 聚合物溶液濃度對核糖體核糖核酸分離效率的影響

塗覆上 PVP 的毛細管能夠有效地防止吸附，又有研究指出 pH 7.5 的 TGA 緩衝溶液能夠穩定染料以及核苷酸的複合物，防止染料脫落^[32]。因此使用 2× TGA 緩衝液配製濃度不等的 PEO (M_{ave} 4,000,000 g/mol) 聚合物溶液，使用 15 kV 電壓來測試總 RNA 在哪個 PEO 濃度下，能夠使 28S 及 18S rRNA 快速分離開來。圖 2-5a 中，在沒有聚合物溶液只有緩衝液的情況下沒有分離效果，結果顯示總 RNA 全部推積在一起分不開。當提升聚合物濃度後，rRNA 開始被分離開來，由於總 RNA 中有八成是 rRNA 所組成，而 rRNA 主要分成 28S、18S、5.8S 及 5S 四個單元。在圖 2-5b 中很清楚可以看到電泳圖的最後有兩大訊號峰，由於 RNA 在電泳中的移動方式是遵從 Ogston 理論，因此時間越久出來的表示其分子量越大。28S 的核苷酸長度約 5070 nt，而 18S 的長度約 1869 nt，因此可得知最晚出現的訊號峰為 28S rRNA，在前面的訊號峰為 18S。rRNA 剩下兩個單元：5.8S rRNA (長度約 160 nt) 與 5S rRNA (長度約 120 nt) 便分布在電泳圖最初的訊號峰區，而除了 rRNA 之外

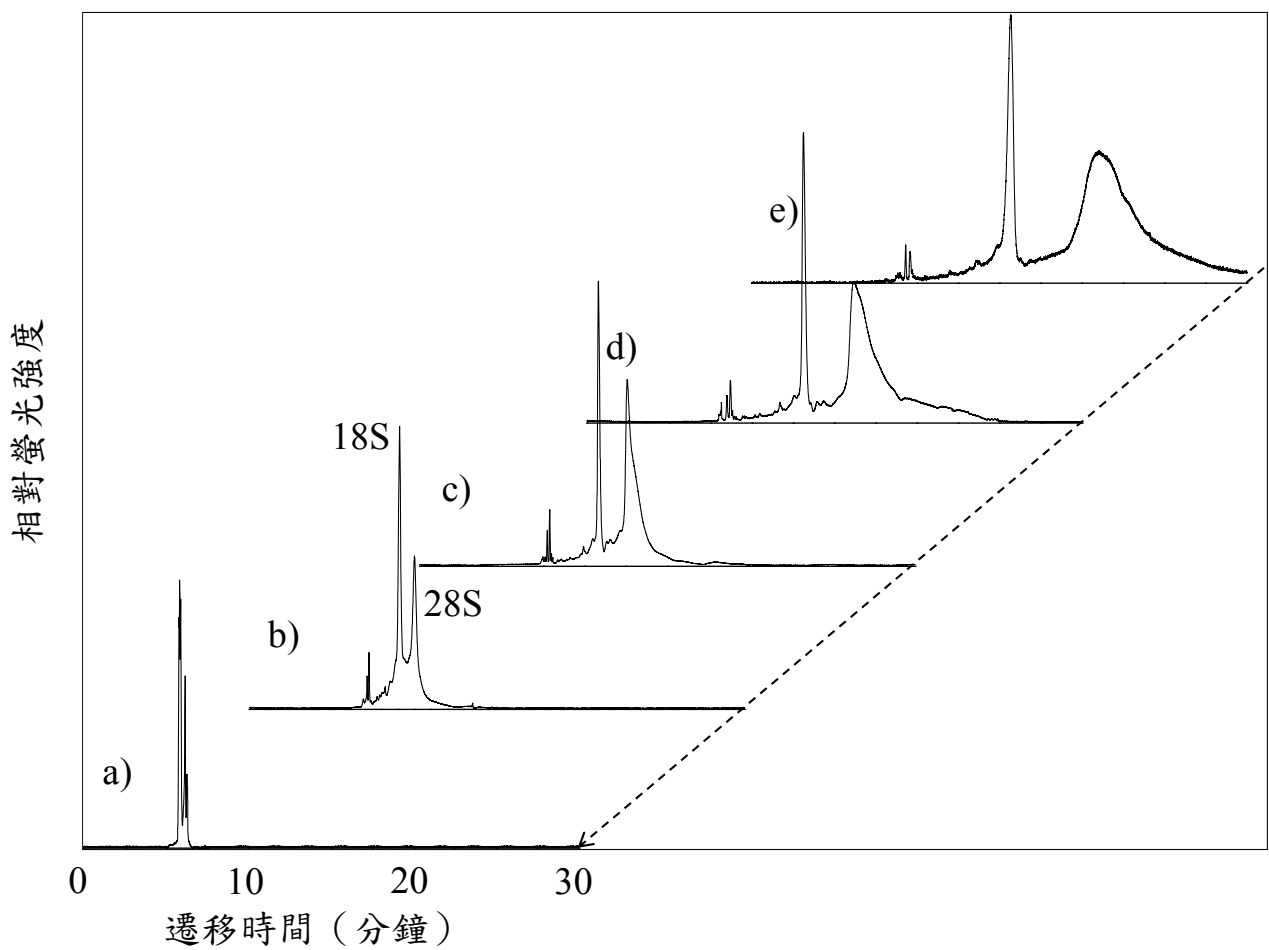


圖2-5 聚合物溶液濃度對RNA分離效率的影響。a) 2x TGA。b) 0.2% PEO。c) 0.4% PEO。d) 0.6% PEO。e) 0.8% PEO。

還有 tRNA，佔有總 RNA 含量約 15%~20%，長度約 70 nt 左右，位置也在電泳圖最開始的訊號峰區。圖 2-5b 到 e 分別以 0.2%~0.8% 的 PEO 分離總 RNA，發現濃度在 0.4% 時便可以完全分離 28S 以及 18S rRNA，當濃度大於 0.4%，雖然能使 18S 以及 28S rRNA 的距離能夠分得更開，但是 RNA 的總分離時間也會變長。可看到 28S 在高濃度 PEO 分離時有較大的訊號面積，這是由於 DNA 或 RNA 在無 EOF 的電泳下分離時會受電場影響而使結構展開呈直線狀，當結構一被打開，可與染料嵌合的地方就會越多。當遷移時間變長時 28S 的結構越會被打開呈直線狀，因此高濃度 PEO 所分離出的 28S 訊號面積會明顯的比其他的 28S 訊號面積大。為了達到快速分離的目的，本實驗選擇 0.4% 的 PEO 當作分離用的聚合物溶液來進行接下來的實驗。

2.3.3 分離電壓對核糖體核糖核酸分離效率的影響

在以前的研究中有指出，大片段的 DNA 容易受到外部電場的影響^[33]，有鑑於此，我們希望從不同的外加電場當中，找到一個最佳的分離效率。圖 2-6 表示不同分離電壓下，以 0.4% PEO 分離總 RNA 的電泳圖，四張電泳圖的縱軸刻度範圍皆相同，以比較彼此相對訊號大小的不同。圖 2-6a 是以 20 kV 分離 RNA，外加電場為 500 V/cm 的高電場，雖然分離時間非常的短，但是分離的效率就被犧牲了，當利用 15 kV

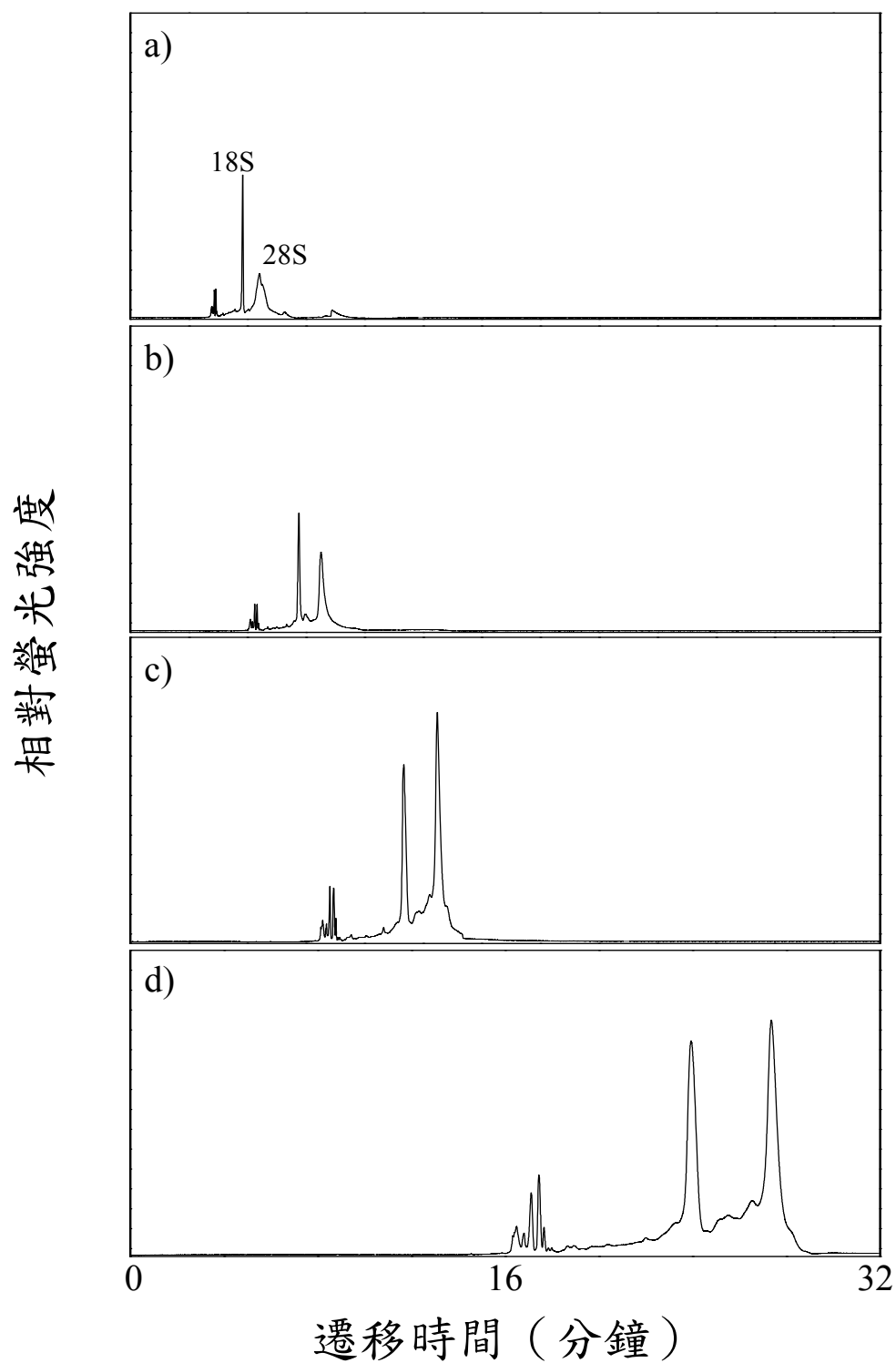


圖2-6 電場對RNA分離效率的影響。a) 20 kV。b) 15 kV。c) 10 kV。d) 5kV。

分離時，會觀察到 28S rRNA 的訊號峰比在 20 kV 分離時高出約兩倍的高度，但是 18S rRNA 以及 5S 的訊號峰區卻沒有明顯的改變，只有電場變小影響分離時間變慢。更進一步觀察，可以看到在當使用 10 kV 分離時，28S 比上 18S 的比例會比用 15kV 時來得大，整體的螢光訊號也比較大。而在使用 5 kV 時，整體的螢光強度又比使用 10 kV 時還大，但 28S 與 18S rRNA 的比例沒有明顯的差異。因此在圖 2-6a 到 d 中，無論是小片段的 5S rRNA 訊號峰區或是 28S 以及 18S rRNA，可知道當使用較低電場時會使得訊號峰強度增加，依結果可推測當 RNA 在高電場 (500 V/cm) 分離時，會造成 rRNA 的分解。在以前的研究中，Yeung 等人也觀察到單股 DNA 在高電壓或是高功率雷射下會使得 DNA 分子斷裂的情況^[28]。並且因為高電場影響染料 SYTO 9 與 RNA 分子之間的互相作用而導致訊號下降，曾有研究指出在高電場會打斷染料與 DNA 分子之間的鍵結^[34, 35]，這可解釋為何使用低電壓時會使得訊號增高。為了能達到快速分離的目的，這實驗使用 10 kV 當作分離電壓，並以濃度 0.4% 的分子量 4,000,000 g/mol 之 PEO 當作聚合物溶液來偵測 RNA 的完整性。

2.3.4 總核糖核酸濃度的影響

利用前面的最佳實驗條件，進行不同 RNA 濃度的分析，看濃度對

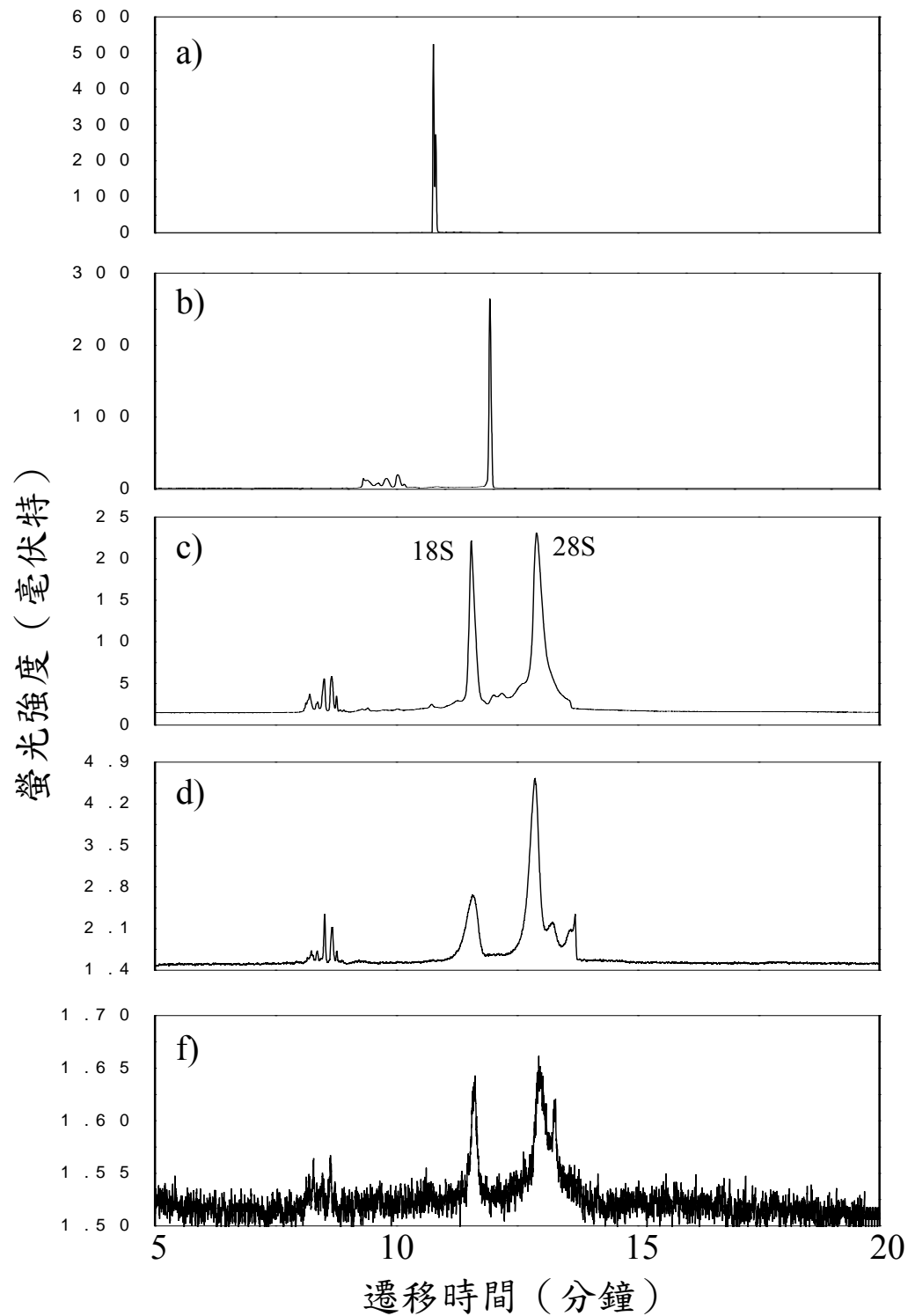


圖2-7 以毛細管電泳暨發光二極體誘發螢光偵測總RNA之偵測極限。a) 500 ng/ μ L。b) 50 ng/ μ L。c) 5 ng/ μ L。d) 500 pg/ μ L。e) 50 pg/ μ L。

分離會造成甚麼影響。圖 2-7 為分析濃度從 500 ng/ μ L 到 50 pg/ μ L 不同濃度的人類鼻咽癌細胞 (HK-1) 總 RNA。在圖 2-7a 中，能觀察到只有單一個訊號峰，未能成功分出總 RNA，這很有可能是 SYTO 9 的量不夠多所導致。聚合物溶液在配製時是在 50 毫升中加入 5 μ L 的 SYTO 9，SYTO 9 的最終濃度為 0.5 μ M。將聚合物溶液填充至毛細管內後，在毛細管內所含有的 SYTO 9 量約有 0.36 ng，除此之外，由於 SYTO 9 本身帶有正電荷，在此電泳系統中移動方向會與 RNA 相反，因此末端出口所擺置的聚合物溶液中的 SYTO 9 會往回跑進毛細管內。藉由計算 SYTO 9 在此電泳環境中的遷移速率，以 28S rRNA 遷移至偵測窗口的時間來計算 (< 14 分鐘)，並且扣除掉非有效長度的 7 公分，因此大約有 0.32 ng 的 SYTO 9 染料分子進入毛細管並且通過偵測窗口，故總共會有 0.68 ng 的 SYTO 9 染料分子有機會碰撞到總 RNA。在圖 2-7a 中，由於染料分子有限所以導致部分的小片段 RNA 與染料連接，產生單一的訊號峰。因此有可能是高濃度的 RNA 使得解析度變差，或者是染料的濃度不夠高。在圖 2-7b 中，在稀釋到 50 ng/ μ L 可看出降低 RNA 濃度能使小片段 RNA 的訊號峰出現，但解析度還是不夠好，要讓 18S 及 28S rRNA 出現還是稍顯不夠。稀釋到 5 ng/ μ L 之後，除了小片段的 RNA 區域之外，18S 以及 28S rRNA 的訊號峰也能分辨出來，這可證明高濃度的 RNA 會使得染料分子相對量太少，才會只讓部份 RNA 訊

號峰出現。

在比較 500 ng/ μ L 到 5 ng/ μ L 小片段的 RNA 區域遷移時間上，發現到在高濃度時小片段 RNA 區域部分的訊號峰時間比較慢，在濃度稀釋之後時間會縮短，這是因為接上染料的 RNA 分子，自身所帶的負電與染料的正電中和了，因此遷移時間會比未接上染料的分子來得慢。而圖 2-7b 與圖 2-7c 的小片段 RNA 遷移時間比較圖 2-7a 快的原因，有可能是濃度稀的 RNA 能夠避免大片段的 RNA 與小片段的 RNA 在遷移時互相作用而導致解析度變差。繼續稀釋下去，從圖 2-7c 到 e，遷移時間變慢的情況就不見了，並且能夠測得的總 RNA 最小濃度可到 50 pg/ μ L。此分析範圍的結果，與使用雷射誘發螢光的微晶片電泳儀器 (Agilent 2100 Bioanalyzer) 所測的數據相比有同樣的偵測極限 (RNA 6000 Pico kit: 50 pg/ μ L 到 5 ng/ μ L)，而分析時間比 2100 Bioanalyzer 的 30 分鐘來得快。由數據結果顯示，此方法有著很好的靈敏性，分析時間短，而且能夠減小在生醫應用上樣品的消耗。另外，在圖 2-7d 中，分析 500 pg/ μ L 時發現會在 28S rRNA 之後冒出比 28S 還大的片段，因此接下的實驗會利用加熱的方式來觀察 500 pg/ μ L 總 RNA 的降解情形時，也觀察其片段是否為大於 28S rRNA 的片段，或是其他因素所造成。

2.3.5 溫度降解總核糖核酸

為了觀察 RNA 完整性的變化，此實驗以加熱的方式降解 RNA，讓 RNA 完整性下降並分析降解後的變化。分析不同濃度的總 RNA 實驗中，觀察到在 500 pg/ μ L 的濃度時，在全體訊號的最尾端出現比 28S rRNA 片段還大的訊號峰，為了瞭解大片段 RNA 的降解情形因此選用 500 pg/ μ L 進行加熱降解的實驗。圖 2-8a 為不加熱的 RNA，與圖 2-7d 比較能得知加熱 70°C 的 RNA 在變性過之後，18S rRNA 訊號峰有明顯的變寬。圖 2-9a 與 b 為軟體預測的 18S rRNA 在室溫下以及 70°C 下的結構圖，由於在加熱 70°C 5 分鐘之後會立即放入冰水冷卻，使得 18S rRNA 分子內形成的氫鍵變少，因此打開的單股容易在電泳過程中與其他分子互相雜合形成不規則形態 (random coil)，導致 18S rRNA 的訊號峰分布變寬。而加熱 10 分鐘的圖 2-8b 與加熱 5 分鐘的圖 2-7d 並無太大的差異。在 28S rRNA 的部分，圖 2-8b 中卻解析出了三個訊號峰，然而遷移時間與圖 2-8a 的 28S rRNA 相同，在圖 2-9c 與 d 中，由於加熱會造成 28S rRNA 部分結構被解開，因此遷移時間會稍微跑得比 28S rRNA 慢，而出現電泳圖的最末端。圖 2-8c 到 d 中，當加熱時間變長，28S rRNA 後端的訊號峰越拖越長，這能有可能是被解開的 28S rRNA 部分結構在低溫下會彼此間或是與其他 RNA 分子雜合，造成訊號拖長。在許多 RNA 的研究在反應前，第一步都要將 RNA 做短時間加熱打開

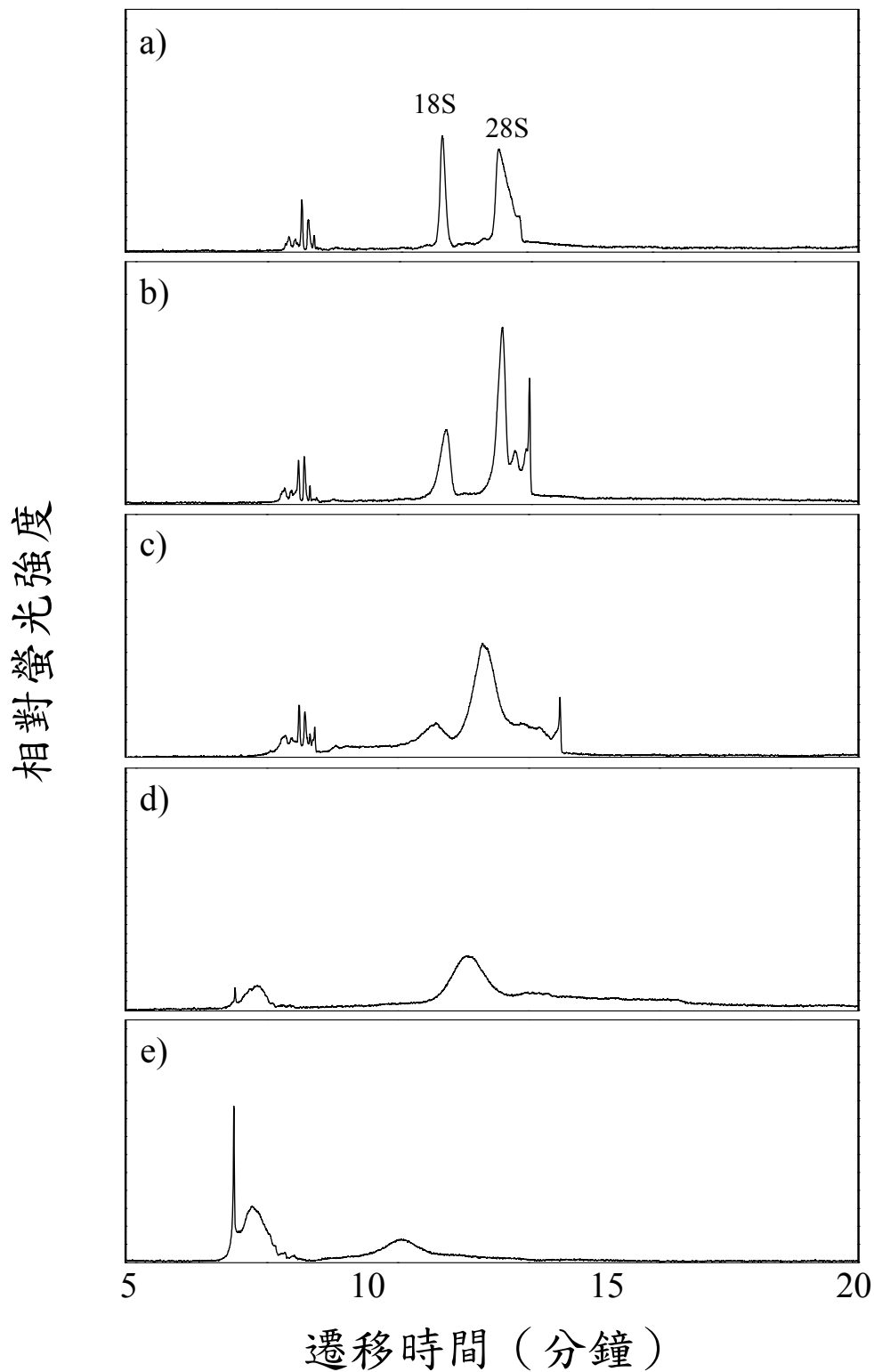
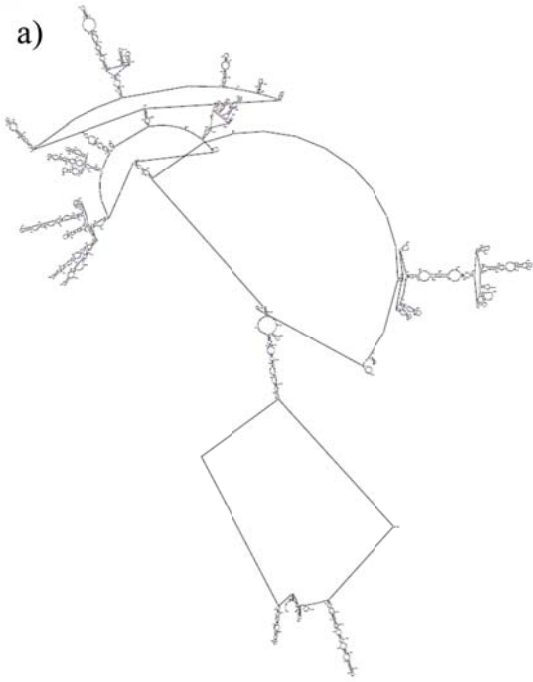
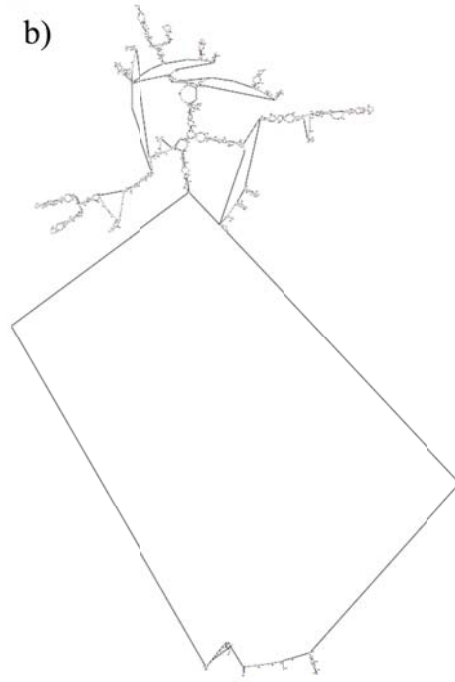


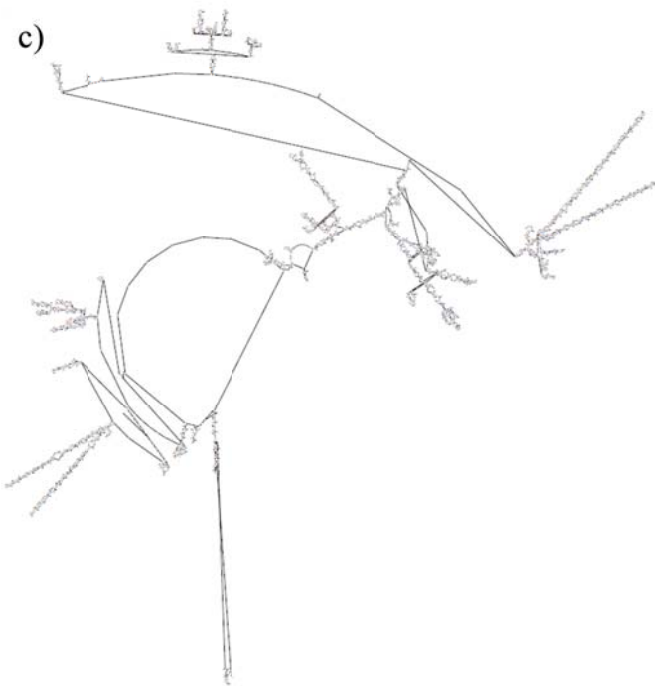
圖2-8 以70°C加熱不同時間降解RNA。a)不加熱。b) 10分鐘。c) 60分鐘。d) 8小時。e) 24小時。



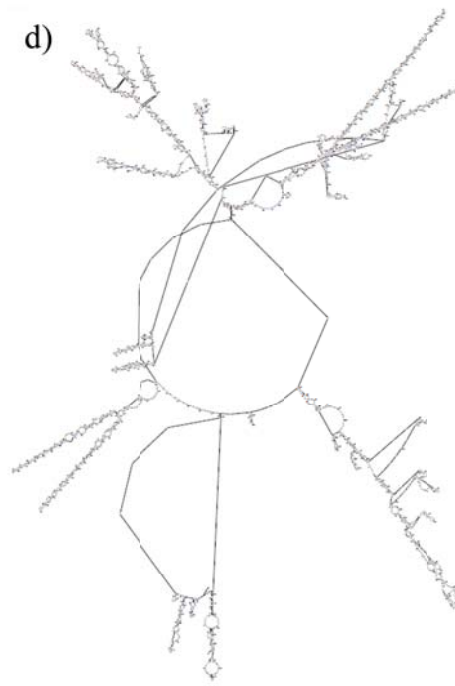
Gibbs free energy = -936.5 kcal/mol



Gibbs free energy = -251.9 kcal/mol



Gibbs free energy = -2870.9 kcal/mol



Gibbs free energy = -1205.9 kcal/mol

圖2-9 軟體預測RNA結構圖。a) 25 °C 時18S rRNA。b) 70 °C 時18S rRNA。c) 25 °C 時28S rRNA。d) 70°C 時28S rRNA。

氫鍵，為的就是將 RNA 結構解開，如此一來便能與其他結構序列雜合來進行一系列的研究^[37]。因此比 28S rRNA 晚出現的訊號峰，可能是由交叉雜合的雙股 RNA 變性成為單股 RNA 導致遷移時間變長。

為了更加證明此系統對 RNA 完整性的降解能有效的偵測觀察，利用加熱 70°C 從 10 分鐘到 24 小時不同的加熱時間觀察 RNA 降解後的片段分布情形。圖 2-8c，當加熱時間提升到一小時後，28S 及 18S rRNA 的遷移時間比加熱 10 分鐘時來得快，而且訊號峰也明顯變寬，加熱時間再加長，整體的遷移時間也越快，在 5S rRNA 的小片段 RNA 區域到 18S rRNA 之間的背景值也變高，可見 RNA 已被被降解成不同長度。從圖 2-8c 到 d 的過程，小片段的區域也明顯的被降解，不僅如此，小片段區域的訊號高度也隨之增加，可知 RNA 的大片段大都被降解成小片段並且分布在前段區域。由加熱誘導 RNA 降解之數據可知，發光二極體誘發螢光能夠監測其降解狀況。

2.4 結論

本篇實驗使用毛細管電泳為基礎，使用發光二極體當作激發光源來誘發螢光，能讓系統偵測極限到達 12 pM。發光二極體當作光源優於雷射的好處有：低成本、體積小、壽命較長等等。針對 RNA 完整性來分析，能夠成功地監測 RNA 的降解。使用 0.4% 的 PEO 能夠完全分離 28S 以及 18S rRNA，可偵測的最低濃度為 50 pg/ μ L，而具有線性濃度範圍從 50 pg/ μ L 到 5 ng/ μ L，由結果可知道偵測總 RNA 的濃度能具有很高的靈敏性。本篇實驗是使用 SYTO 9 染料，並利用青色發光二極體加上 488 nm 干涉濾片來激發染料，其他染料也能與核苷酸結合並用在此系統上，如：SYBR green ($\lambda_{\text{ex}} = 497 \text{ nm}$) 或是 SYBR gold ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$) 等等，能夠針對實驗需求選擇較適當的螢光染料。若選擇發光效率更高的染料，相信能有助於提升偵測的靈敏性。希望此方法能夠幫助進行 RNA 相關實驗時可以獲得更正確的數據。

2.5 參考資料

1. Kennedy RT: **Bioanalytical applications of fast capillary electrophoresis.** *Anal Chim Acta* 1999, **400**:163-180.
2. Issaq HJ: **A decade of capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2000, **21**(10):1921-1939.
3. Paez X, Hernandez L: **Biomedical applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *Biopharm Drug Dispos* 2001, **22**(7-8):273-289.
4. Hu S, Dovichi NJ: **Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers.** *Analytical chemistry* 2002, **74**(12):2833-2850.
5. Perco P, Rapberger R, Siehs C, Lukas A, Oberbauer R, Mayer G, Mayer B: **Transforming omics data into context: bioinformatics on genomics and proteomics raw data.** *Electrophoresis* 2006, **27**(13):2659-2675.
6. Zhong W, Yeung ES: **High-throughput analysis of total RNA expression profiles by capillary gel electrophoresis.** *Analytical chemistry* 2003, **75**(17):4415-4422.
7. Tian H, Cao L, Tan Y, Williams S, Chen L, Matray T, Chenna A, Moore S, Hernandez V, Xiao V *et al*: **Multiplex mRNA assay using electrophoretic tags for high-throughput gene expression analysis.** *Nucleic acids research* 2004, **32**(16):e126.
8. Sumitomo K, Sasaki M, Yamaguchi Y: **Acetic acid denaturing for RNA capillary polymer electrophoresis.** *Electrophoresis* 2009, **30**(9):1538-1543.
9. Deutscher MP: **Degradation of stable RNA in bacteria.** *J Biol Chem* 2003, **278**(46):45041-45044.
10. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T: **The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.** *BMC molecular biology* 2006, **7**:3.
11. Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci U, Kornacker K: **Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis.** *Nat Genet* 2003, **35**(4):292-293.
12. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C: **Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces.** *Nucleic acids research* 2005, **33**(6):e56.

13. Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, Ghadimi BM, Beissbarth T, Gaedcke J: **Impact of RNA degradation on gene expression profiling.** *BMC Med Genomics* 2010, **3**:36.
14. Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M: **RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling.** *BMC Biotechnol* 2009, **9**:102.
15. Lin CY, Yu CJ, Chen YM, Chang HC, Tseng WL: **Simultaneous separation of anionic and cationic proteins by capillary electrophoresis using high concentration of poly(diallyldimethylammonium chloride) as an additive.** *Journal of Chromatography A* 2007, **1165**(1-2):219-225.
16. Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci G, Kornacker K: **Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis.** *Nature genetics* 2003, **35**(4):292-293.
17. Song EJ, Babar SM, Oh E, Hasan MN, Hong HM, Yoo YS: **CE at the omics level: Towards systems biology - An update.** *Electrophoresis* 2007, **29**(1):129-142.
18. Yeung SH, Liu P, Del Bueno N, Greenspoon SA, Mathies RA: **Integrated sample cleanup-capillary electrophoresis microchip for high-performance short tandem repeat genetic analysis.** *Anal Chem* 2009, **81**(1):210-217.
19. Tong W, Yeung ES: **Simple double-beam absorption detection systems for capillary electrophoresis based on diode lasers and light-emitting diodes.** *Journal of Chromatography A* 1995, **718**(1):177-185.
20. Macka M, Andersson P, Haddad PR: **Linearity evaluation in absorbance detection: the use of light-emitting diodes for on-capillary detection in capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(12):1898-1905.
21. Hillebrand S, Schoffen JR, Mandaji M, Termignoni C, Grieneisen HP, Kist TB: **Performance of an ultraviolet light-emitting diode-induced fluorescence detector in capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2002, **23**(15):2445-2448.
22. Sluszny C, He Y, Yeung ES: **Light-emitting diode-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2005, **26**(21):4197-4203.
23. Breadmore MC, Henderson RD, Fakhari AR, Macka M, Haddad PR: **Separation of Nile Blue-labelled fatty acids by CE with absorbance detection using a red light-emitting diode.** *Electrophoresis* 2007, **28**(8):1252-1258.
24. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C: **Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces.**

- Nucleic Acids Res* 2005, **33**(6):e56.
25. Monis PT, Giglio S, Saint CP: **Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis.** *Analytical biochemistry* 2005, **340**(1):24-34.
 26. Johnson I, Spence MTZ (eds.): **The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies**, 11th edn: Life Technologies; 2010.
 27. Song JM, Yeung ES: **Optimization of DNA electrophoretic behavior in poly(vinyl pyrrolidone) sieving matrix for DNA sequencing.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):748-754.
 28. Reuter JS, Mathews DH: **RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis.** *BMC bioinformatics* 2010, **11**:129.
 29. Ju J, Ruan C, Fuller CW, Glazer AN, Mathies RA: **Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(10):4347-4351.
 30. Sang F, Ren H, Ren J: **Genetic mutation analysis by CE with LIF detection using inverse-flow derivatization of DNA fragments.** *Electrophoresis* 2006, **27**(19):3846-3855.
 31. Lyko F, Stach D, Brenner A, Stilgenbauer S, Dohner H, Wirtz M, Wiessler M, Schmitz OJ: **Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients.** *Electrophoresis* 2004, **25**(10-11):1530-1535.
 32. Wang Z, Wang C, Yin J, Li T, Song M, Lu M, Wang H: **Focusing and stabilization of bis-intercalating dye-DNA complexes for high-sensitive CE-LIF DNA analysis.** *Electrophoresis* 2008, **29**(22):4454-4462.
 33. Chang PL, Lee KH, Hu CC, Chang HT: **CE with sequential light-emitting diode-induced fluorescence and electro-chemiluminescence detections for the determination of amino acids and alkaloids.** *Electrophoresis* 2007, **28**(7):1092-1099.
 34. Li H, Yeung ES: **Selective genotyping of individual cells by capillary polymerase chain reaction.** *Electrophoresis* 2002, **23**(19):3372-3380.
 35. Jin LJ, Giordano BC, Landers JP: **Dynamic labeling during capillary or microchip electrophoresis for laser-induced fluorescence detection of protein-SDS complexes without pre- or postcolumn labeling.** *Anal Chem* 2001, **73**(20):4994-4999.
 36. Tseng WL, Huang MF, Huang YF, Chang HT: **Nanoparticle-filled capillary electrophoresis for the separation of long DNA molecules in the presence of hydrodynamic and electrokinetic forces.** *Electrophoresis* 2005,

26(16):3069-3075.

37. Sambrook J, Russell DW: **Molecular Cloning - A Laboratory Manual** In: *In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. Volume 2*, 3 rd edn.; 2001: 8.46.

第三章 毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光偵測樣品中的微小核糖核酸

3.1 緒論

微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 是不會被轉譯成蛋白質的非編碼核糖核酸，長度約 22 個核苷酸左右。由於近年來發現到它與癌症的形成關係密切^[1, 2]，故此片段短小的 RNA 便受到了廣大的注目。miRNA 能夠調節 mRNA 的表現，影響許多目標蛋白質的生成，當 miRNA 的表現失調時，很容易衍生出不同疾病，如急性骨髓性白血病 (acute myeloid leukemia)^[3]、肝癌 (hepatocellular cancer)^[4]、前列腺癌 (prostate cancer)^[5] 以及肺癌 (lung cancer)^[6] 等等，且 miRNA 已被證明與其他癌症之間的重要關聯性^[7, 8]。微陣列分析平台 (microarray platform) 有高通量快速篩選 miRNAs 的特色因此廣受歡迎^[9]。反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse-transcription quantitative PCR, RT-qPCR) 可以偵測出 RNA 的表現量並藉由 PCR 放大使訊號增強，是個高靈敏的偵測工具^[10]。Maroney 等人發表一種以夾板式結合反應 (splinted ligation) 為基礎的 miRNAs 偵測方法^[11, 12]，利用同位素進行北方點墨法的偵測。最近更有次世代定序 (next-generation sequencing) 技術能快速偵測出大量 miRNAs 的表現量^[13, 14]。為了能進一步研究出 miRNAs 與疾病上的關聯性，需要低成本且能大量篩選的自動化方法來偵測特定的

miRNA。

毛細管凝膠電泳在分析 DNA 及 RNA 上具有高分離效率、快速且靈敏的優點，使用雷射誘發螢光偵測能使此方法更具靈敏度，所以廣泛地被應用在許多基礎研究以及臨床檢測上^[15]，其中最多應用於 DNA 的定序上，DNA 定序的成功使基因研究有了更進一步的發展，例如 Pang 等人使用毛細管陣列電泳結合電荷耦合元件（charge-coupled device）偵測，有效的提高 DNA 定序的通量^[16]。而 Zhang 等人以毛細管陣列電泳為基礎，建立了一套二維螢光光譜儀來定序 DNA^[17]。除了裝置上的設計，另有許多改善 DNA 分離效率方面的研究。Carrilho 等人利用線性聚丙醯烯胺成功分離 1000 核苷酸長的 DNA 序列^[18]。Gao 等人 PEO 結合溫度梯度技術能有效分析異源雜合雙鏈以及 SNP 篩選^[19]。

由於 RNA 本身的複雜性以及結構的不穩定，毛細管電泳應用在 RNA 分析上為數較少。Yeung 的團隊報導了一個高通量的 RNA 表現的分析方法，並以毛細管電泳暨雷射誘發螢光為基礎^[20]。2008 年，我的指導老師發表了一篇以 CE-LIF 直接偵測鼻咽癌細胞中 Epstein-Barr 病毒（EBV）的 miRNA^[21]，這是不僅是第一個成功分離相同長度的單股及雙股之短序列核苷酸，也是首次利用 CE-LIF 偵測 miRNA 的研究。之後更成功地在聚合物溶液中分離鼻咽癌細胞內的 5 種特定

miRNAs^[22]。與現存的商業化來比已具有經濟、快速以及高靈敏的基礎條件。除了 CE-LIF 偵測 RNA 之外，Santiago 等人用等速電泳與預前濃縮技術整合在微晶片電泳系統裡以偵測小型 RNA^[23, 24]。

以臨床醫學的觀點來看，為了檢測腫瘤是否被切除乾淨，一般會比較癌症腫瘤組織及其周遭的正常組織。如要提供外科醫生快速且準確的分析腫瘤以及周圍正常組織之差異，以目前的單一光束之偵測系統是很難達到。近來不少研究團隊將兩種雷射光與毛細管電泳做結合，且使用這雙波長系統偵測生物分子。例如 Carson 等人使用 488 nm 氬離子雷射以及 532 nm 氬氖雷射偵測四種螢光標記的引子，LOD 能達到 pM 等級。1994 年，Takahashi 等人使用氬離子雷射 (argon ion laser, 488nm) 以及 YAG 雷射 (YAG laser, 532nm) 這兩種雷射作為激發光源，並讓 DNA 序列上四種鹼基的末端個別接上四種不同的螢光，同時對 20 個毛細管進行 DNA 片段的偵測，能快速並有高通量的分析 DNA，增進了 DNA 定序的效率^[25]。在 1995 年，Hebenbrock 等人利用毛細管電泳進行單股構型多型性的檢測，使用到兩種不同顏色的螢光偵測^[26]。在他們的系統中，樣品藉由 PCR 放大，最後會在不同的鹼基末端上標示不同的螢光，可以做到檢測 276 鹼基對長的基因突變。Iyer 等人以 488 nm 的氬離子雷射與 532 nm 之 Nd-YAG 二極體雷射，在單一毛細管下同時偵測 fluorescein isothiocyanate (FITC) 以及 rhodamine 兩種螢

光，並且可偵測出接有兩種不同螢光的抗原^[27]。Xue 等人使用 488 nm 以及 514 nm 兩色的激發系統結合毛細管陣列電泳與螢光偵測以定序 DNA^[28]。

在本次實驗中我們嘗試建立一種能偵測成對樣品的方法，加上濃縮大體積的樣品來增加偵測的靈敏度，並使用 488 nm 以及 640 nm 兩種雷射光建立的毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光系統偵測特定 miRNA。

3.2 實驗部分

3.2.1 實驗試劑

實驗所用到的 poly(ethylene oxide) (PEO, M_{ave} 8,000,000 g/mol) 、 polyvinylpyrrolidone (PVP, M_{ave} 1,300,000 g/mol) 、尿素 (urea) 、三羥甲基氨基甲烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, tris) 、甘胺酸 (glycine) 以及醋酸 (acetic acid) 皆購自美國 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 。表 3-1 為實驗中使用到的 HPLC 等級之寡核苷酸序列，其序列皆購自美國 Integrated DNA Technologies 公司 (San Diego, CA, USA) ，miRNA、DNA Bridge 以及螢光探針之序列皆參考 miRNA Database 所公布的 miRNA 序列來設計^[29]，螢光探針的 3'端部分修飾有螢光分子，5'端部分修飾磷酸根。RNA 萃取試劑 (trizol) 以及 DNA/RNA-free water 是向美國 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 購買。T4 DNA 結合酵素及 RNA extraction kit 是向德國 Qiagen (Hilden, Germany) 公司購買。

3.2.2 細胞培養

肝癌細胞株 Huh 7 細胞是來自 Health Science Research Resources Bank。細胞培養在 DMEM 培養基中，並含有 10 % 胎牛血清、100 unit/mL 青黴素 (penicillin) 、100 μ g/mL 鏈黴素 (streptomycin) 、2 mmol/L

表3-1 實驗用到的核苷酸之序列

名稱	長度	序列 (5'–3')	熔點溫度
Alexa Fluor 488 probe	10	phosphate-TCGGTCAGCA-Alexa Fluor 488	37.1°C
Alexa Fluor 647 probe	10	phosphate-TCGGTCAGCA-Alexa Fluor 647	37.1°C
miR 221	23	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC	62.0°C
miR 221-bridge	50	TGCTGACCGAGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTA ₁₇	79.0°C
miR 10b*	22	ACAGATTCGATTCTAGGGGAAT	58.0°C
miR 10b*-bridge	70	A ₁₉ TGCTGACCGAATTCCCCTAGAATCGAATCTGTA ₁₉	80.0°C

的L-glutamine與丙酮酸鈉，培養在含有5%的二氧化碳與溫度37°C的培養箱中。總RNA萃取是利用RNA 抽提試劑並且根據其操作手冊的方法萃取出（Qiagen, Germany），並保存在 -20°C。

在本章實驗中會使用兩種Huh 7細胞，一般的肝癌細胞株Huh 7當作陰性對照組（Ambion ID: PM17010），另一個Huh 7細胞會在培養時將miRNA的前驅物pre-miR-10b*（Ambion ID: PM12387）轉染（transfected）進細胞內，使得Huh 7細胞大量表現出成熟的miR-10b*，希望能在細胞中萃取出總RNA當中可以測出過度表現的miR-10b*的量。

3.2.3 雜合反應（hybridization）與夾板式結合反應（splinted ligation）

夾板式結合步驟類似於過去文獻中所提到^[11, 12, 22]。夾板式結合反應示意圖如圖 3-1，DNA 橋樑上的序列設計會與螢光探針以及目標miRNA（miR-10b*及 miR-221）互補，不同的miRNA 會設計出相對應的DNA 橋樑，在橋樑的端上接著有多腺苷（adenosine），不同橋樑會設計不同長度的多腺苷，並在電泳圖上顯現不一樣的遷移時間，以此達到分離效果。多腺苷的長度設計有兩種，針對內標準的DNA 橋樑會在3'端加上17個腺苷，橋樑全長為50核苷酸長；針對目標miRNA的DNA 橋樑在5'端及3'端上各接有19個腺苷，橋樑全長為70核苷酸長。

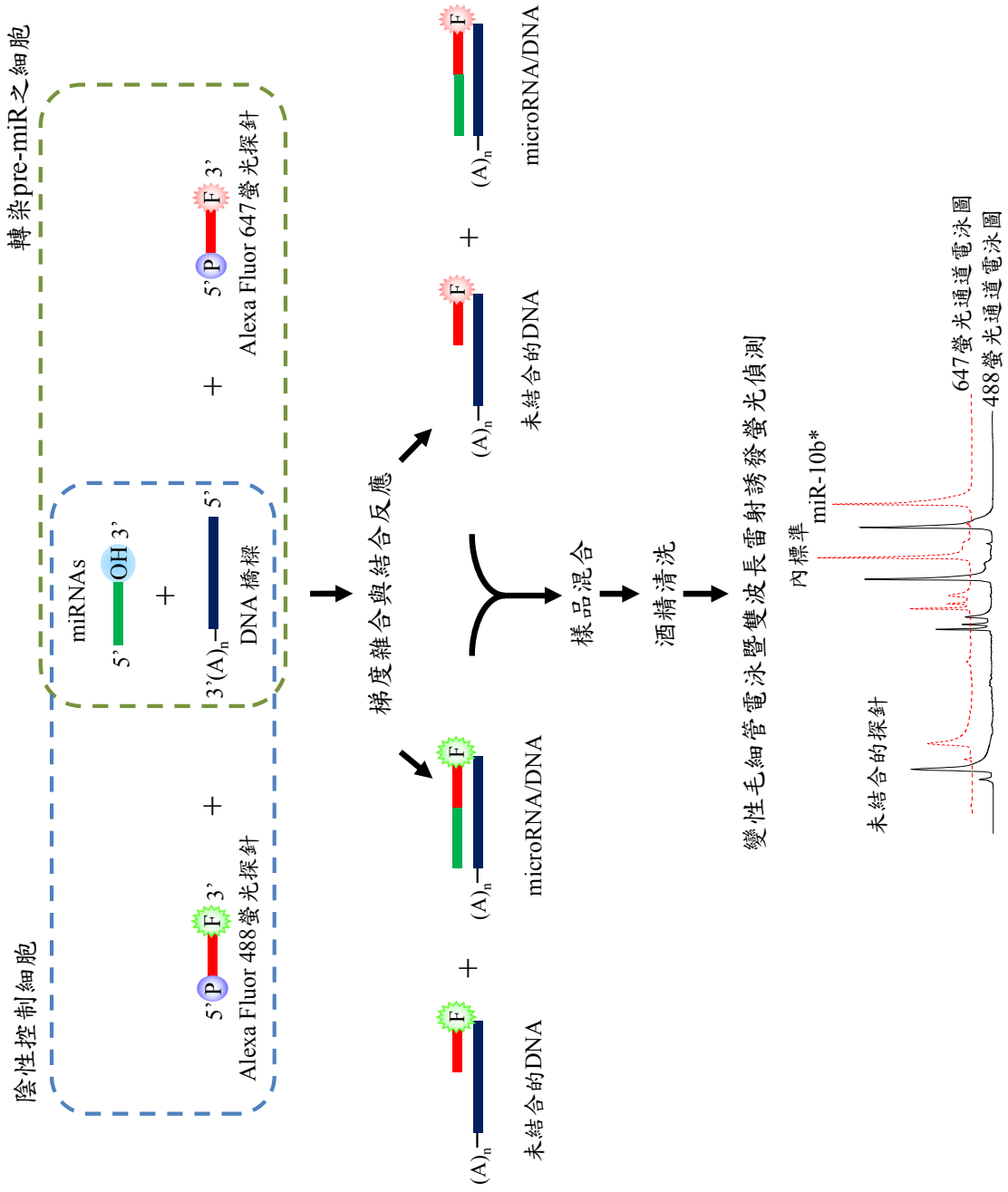


圖3-1 雙波長毛細管電泳搭配夾板式結合反應之實驗流程示意圖

首先對兩種螢光分別進行反應，各別加入 1 μL 的螢光探針 (0.2 μM)、0.5 μL 不含鎂離子之 10 \times PCR 緩衝溶液 (Roche, USA)、0.5 μL 的內標準 (miR-221)、0.5 μL 目標 miRNA (miR-10b*) 或是總 RNA，以及對應內標準與 miR-10b* 之 DNA 橋樑各 0.5 μL (0.2 μM) 加入至 PCR 微量離心管。最後以 DNase/RNase-free water 將體積稀釋到 5 μL ，混合後便放入聚合酶連鎖反應器中加熱，開始雜合反應。加熱溫度一開始以 70 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 15 分鐘，先將纏繞在一起的 DNA 打開。接著加熱溫度利用梯度溫度的方式從 65 $^{\circ}\text{C}$ 降溫到 45 $^{\circ}\text{C}$ ，當溫度從 70 $^{\circ}\text{C}$ 降到 65 $^{\circ}\text{C}$ 時在 65 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 30 秒，接著以 0.7 $^{\circ}\text{C}$ /分鐘的速率降溫，在 30 分鐘內降溫到 45 $^{\circ}\text{C}$ ，並在 45 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 30 秒，此目的是為了把目標 miRNA 與 DNA 橋樑 3' 端上的互補序列做雜合。溫度降到 20 $^{\circ}\text{C}$ 並加熱 30 分鐘，使螢光探針與 DNA 橋樑上的 5' 端互補序列雜合形成夾板狀。將雜合反應完的產物加入 1 μL 的 10 \times 結合酶緩衝溶液以及 0.2 μL 的 T4 結合酶 (5 Weiss unit/ μL)，以 DNase/RNase-free water 將體積稀釋到 10 μL 。混合均勻後，在結合酶的最適溫度下加熱 16 $^{\circ}\text{C}$ 30 分鐘，此時結合酶會將 miRNA 的 3' 端羥基與螢光探針的 5' 端的磷酸根部分連接，形成磷氧鍵後會與 DNA 橋樑形成雙股的 DNA 結構。然而未與 miRNA 結合的 DNA 橋樑只會與探針結合，由於探針與橋樑連接的序列只有 10 bp，在氫鍵較少的情況下，含有 7 M 尿素的變性電泳會將此雙股展開^[21]，藉此達到更

具專一性的偵測。反應完的產物會利用酒精清洗來去除反應時添加的鹽類。

3.2.4 酒精清洗

在反應時除了產物以外，還會添加高濃度的離子鹽類幫助反應，由於高濃度的離子鹽類會在電泳分析時，影響樣品的進樣量減少以及改變毛細管內離子的平衡，導致分析的訊號區帶變寬，影響分離的解析度。因此在進樣前必須將產物溶液中的離子去除，由於離子鹽類可溶於酒精而 DNA 則因無法溶解而沉澱^[30]，利用此特性並以離心的方式可加速 DNA 沉澱析出，如此一來便可將產物純化。純化過程首先會將兩種螢光的夾板式結合反應後產物各取 10 μL 混合，再將 60% 的酒精與 2.5% formamide 的混合溶液取 190 μL 緩緩加入混合的產物中，並以 10,000 $\times g$ 離心 10 分鐘。待離心完後小心地以微量吸管沿著液面吸取 190 μL 的上清液，並要注意吸取的動作，切勿吸取到沉澱於離心管底的 DNA，之後再緩緩地加入 60% 的酒精 190 μL ，同樣用離心機以 10,000 $\times g$ 離心 10 分鐘。然後再以 80% 的酒精重複同上述清洗動作兩次。最後將上清液吸到剩下約 5 μL 後，便將剩餘溶液放進真空離心濃縮機中進行乾燥，乾燥完以 5 μL 的去離子水將 DNA 產物回溶便可進行毛細管變性電泳的分離。

3.2.5 反轉錄定量聚合酶連鎖反應 (reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

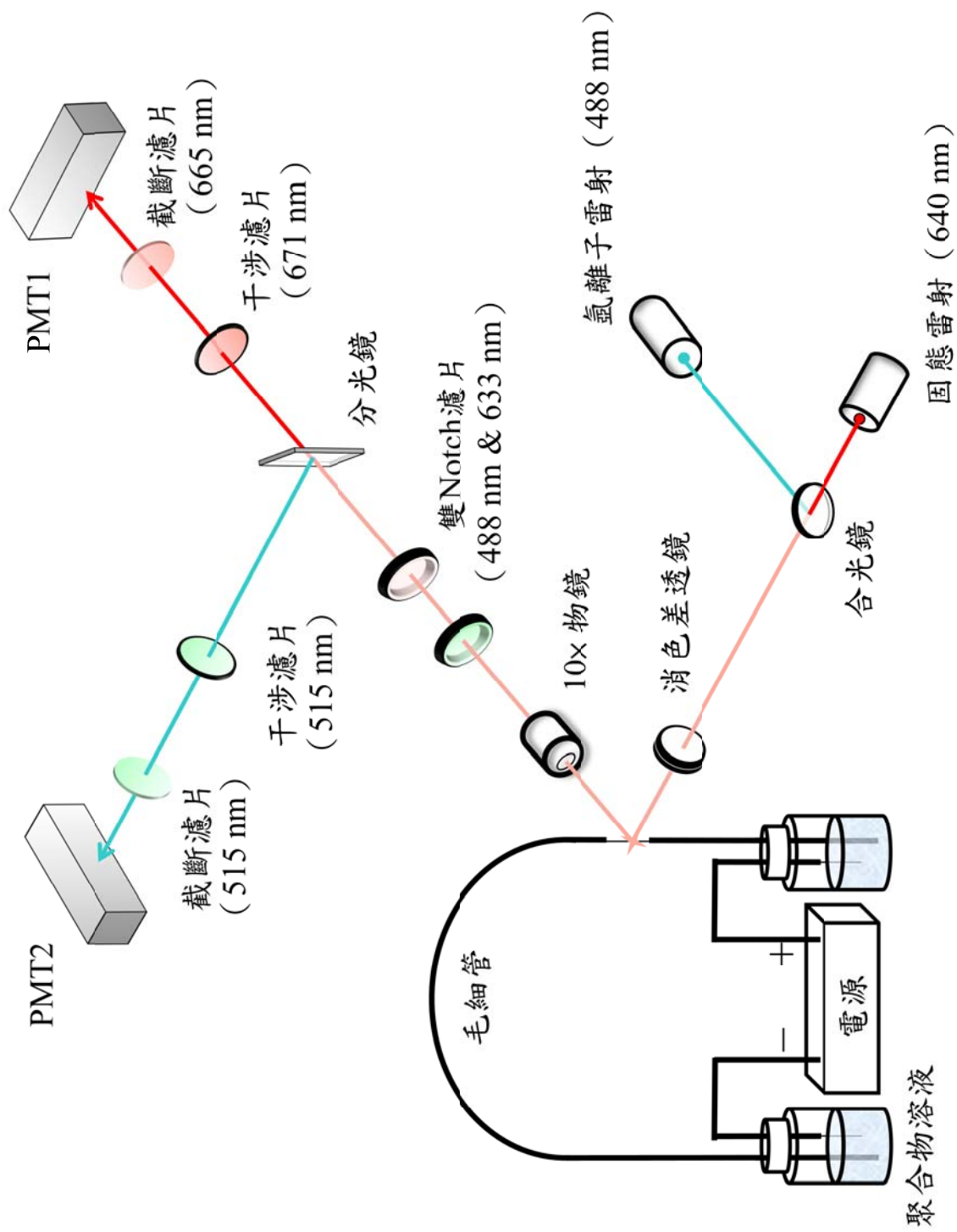
RT-qPCR 實驗要感謝國立台灣大學醫學院腫瘤醫學研究所提供技術支援。首先總 RNA 會利用 mirVana isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) 進行萃取，並以 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) 確定 RNA 的品質，以 Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) 確定 RNA 的量。進行 miR-10b* 之 RT-qPCR 反應時，使用 TaqMan MicroRNA hsa-miR-10b* (ABI assay ID: 002315) 以及利用特殊引子 U6 snRNA (ABI assay ID: 001973) 當作內源性的控制基因，與 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) 將 10 ng 的總 RNA 合成 cDNA。過程是將反應物 15 μ L 於 Applied Biosystems GeneAmp PCR system 9700 儀器中先後加熱 16°C 30 分鐘、42°C 30 分鐘、85°C 5 分鐘最後維持在 4°C。在下一步使用標準的 TaqMan PCR kit protocol，設定 PCR 條件為 50°C 2 分鐘、95°C 10 分鐘，然後以 95°C 15 秒 (變性) 與 60°C 1 分鐘 (黏合與延展) 為一次循環來進行 40 次，完成 qPCR 反應。目標基因與控制基因 (U6) 的相對的 miRNA 量可利用 Δ Ct (循環閾值) 來計算，以方程式來表示則為：

$$\text{相對表現量} = 2^{-[\Delta\text{Ct sample} - \Delta\text{Ct control}]} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.2.6 雙波長雷射誘發螢光系統

整個實驗裝置是自行組裝的雙波長雷射誘發螢光系統。圖 3-2 為 CE-dLIF 裝置圖，兩道光以夾角 90° 入射至合光鏡，合光鏡會將長波長穿透並使短波長的反射的原理將兩道光合成一道光束，分光鏡也是同樣的原理，利用長波長穿透短波長反射將單光束再分成兩道光。合光鏡與分光鏡皆從美商 Semrock 公司 (Semrock, Lake Forest, Illinois, USA) 購得，合光鏡為 LM01-503，其反射波段為 473 ~ 491 nm，穿透波段為 514 ~ 647 nm；分光鏡為 FF648-Di01，能反射 400 ~ 629 nm 的波段並使 658 ~ 700 nm 波段的光穿透。在分光鏡前放置 488 nm 及 633 nm 兩個 notch 濾片，目的是為了過濾掉散射的雷射光以及延長分光鏡的壽命，notch 濾片是購自美商 Semrock 公司，型號為 NF02-488S 以及 NF03-633E。干涉濾片是購自美商 Edmund 公司 (Edmund, Barrington, NJ, USA) 所生產的 515 nm、671 nm 干涉濾片，截斷濾片也是購自 Edmund 公司，型號分別為 OG-515 以及 RG-665。干涉濾片與截斷濾片的目的是在於防止散射光與其他發散螢光波長影響背景值。

雷射誘發螢光所使用的雷射光源，在 647 螢光通道部分是由 Changchun New Industries Optoelectronics Tech. 公司所生產的固態雷射激發螢光，主要發射波長為 640 nm，功率為 10mW。由於此雷射放光出來的雜訊較大，因此會在雷射出口裝上購自 Semrock 公司的雷射濾



片 LD01-640。另一道雷射光是由美商 JDS Uniphase 公司生產的 488 nm 氬離子雷射，主要激發波長為 488 nm，功率可從 8.8 ~ 64 mW，而偵測時會固定功率在 20 mW。圖 3-2 為雙波長毛細管雷射系統裝置示意圖，兩道雷射光以 90° 角的夾角交會在合光鏡上，並利用消色差透鏡 (Edmund, Barrington, NJ, USA) 將兩道折射率不同的光能共聚焦在毛細管窗口上，發散出的螢光以 10× 物鏡 (N.A. = 0.25, Edmund, Barrington, NJ, USA) 收集，經過 notch 濾片除去大部分的雷射光後，以分光鏡分離出兩道光，Alexa Fluor 647 的光會穿透分光鏡到達 647 螢光通道的 1 號光電倍增管 (PMT1) (R3896, Hamamatsu Photonics, Japan)；Alexa Fluor 488 的光會在分光鏡上反射並到達 488 螢光通道的 2 號光電倍增管 (PMT2)。訊號經光電倍增管放大並利用 10-kΩ 電阻將電流訊號轉換成電壓訊號，藉由 24-bit 數位類比轉換器以 10Hz 的頻率擷取訊號，最後藉由層析軟體 Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) 同時處理雙通道的訊號呈現在一張電泳圖上。

3.2.7 聚合物溶液製備

分離用的聚合物溶液與與前一章相同是使用 PEO 與 PVP，與前章不同的是在此實驗要分離短序列的核苷酸，因此使用的分子量是 8,000,000 g/mol，濃度是使用 1.5%，加上分子量 1,300,000 g/mol 的 PVP

0.5%。緩衝溶液與前一章相同是使用 2× TGA。在倒入混合聚合物前會先將尿素溶於 TGA 緩衝溶液中，配置成 50 mL 含 7 M 的尿素濃度的 2× TGA 緩衝溶液，再將 0.75 g 的 PEO 與 0.25 g 的 PVP 緩緩倒入，並慢慢增強攪拌磁石的轉速。待聚合物溶液攪拌 12 小時以確保完全溶解。

3.2.8 變性毛細管電泳系統

毛細管是購自美國 Polymicro Technologies 公司，內徑為 75 μm ，外徑為 365 μm 。實驗用的毛細管長度為 50 公分，有效長度為 43 公分。實驗前會先燒出約 1 公分的偵測視窗。與前一章相同系統會在沒有電滲流的影響下分離，因此會先以去離子水活化毛細管內壁的官能基後，再使用 5% PVP 塗覆在毛細管內壁上並靜置一晚來防止 RNA 的吸附，如此一來也抑制了電滲流作用^[31]，在聚合物溶液中加入濃度 7 M 之尿素，能使特定長度的短鏈雙股寡核苷酸 (~10 bp) 變性，打開成單股並藉由雷射誘發螢光做偵測。

3.2.9 實驗儀器

除了毛細管電泳暨雙波長雷射誘發螢光系統外，處理樣品所需的儀器有聚合酶連鎖反應器、真空離心濃縮機。聚合酶連鎖反應器是日

商 Astec 公司生產的 PC-818A，加熱容器全為鋁製材質，能在加熱時使得每一部位都能均勻受熱，並且由微電腦控制 PID 控制升降溫，精準度可到達 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ，用來加熱 DNA 及 RNA 來進行雜合反應(hybridization reaction) 與結合反應 (ligation reaction)，並藉由儀器中的程式設定來控制 DNA 與 RNA 的變性、黏合以及酵素反應的時間。真空離心濃縮機是由英國 Genevac 公司製造，目的在於濃縮樣品以及清洗樣品時的抽乾動作。

3.2.10 樣品濃縮

在這次實驗嘗試以真空離心濃縮機濃縮大體積的樣品，將 100 μL 的標準樣品取至微量離心管中，將真空濃縮機加熱至 30°C 以縮短濃縮時間，在濃縮時會添加 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 yeast RNA 以防止微量 DNA 吸附在管壁上，增加濃縮時的回收率，濃縮約 50 分鐘後，視樣品剩下體積，以 1 分鐘為單位，將樣品體積抽至 0.5 μL 以下，再回溶於 1 μL 水後便可進行夾板式結合反應。

3.2.11 實驗流程

實驗的流程大致與第二章相同，但在注入黏度較高的聚合物溶液需要高壓氮氣的幫助。聚合物溶液先以針筒注入到鐵氟龍管之中，並

要確保鐵氟龍之中沒有氣泡，再利用高壓氮氣 (~ 200 psi) 把鐵氟龍管中的聚合物溶液推進毛細管內 (50 公分)，在毛細管前後端皆放同樣的聚合物溶液。樣品以電動力進樣，在 200 V/cm 的電場下注入 30 秒，並在 300 V/cm 的電場中做分離，樣品經過 43 公分處的偵測窗口時會被雷射誘發螢光偵測到。分析完後會以高壓氮氣將毛細管內的聚合物溶液推出，最後再以去離子水將殘留的聚合物溶液清洗乾淨，便可進行下一個實驗。

3.3 結果與討論

3.3.1 雷射光源與染料

螢光放射是個高靈敏的偵測法，以雷射激發螢光可在 CE 偵測出單一分子或是單細胞。然而螢光放光是一段連續的波長範圍，因此要進行雙波長偵測時必須避免兩個螢光之間互相干擾，故選擇雷射波長和螢光染料便是首要之事。目前在市面上常見到作為 CE 光源的雷射有固態雷射(solid-state laser)、氬離子雷射(argon ion laser)、氦氖雷射(He-Ne laser) 以及紅寶石雷射 (Nd:YAG laser)。由於紅寶石雷射要價昂貴，實驗室為了發展便宜及經濟的方法，因此選擇成本較低的固態雷射、氦氖雷射以及氬離子為主。

圖 3-3a 是三種染料的放射光譜圖，三種螢光染料的波段都有重疊的部分，因此必須考慮到螢光之間互相干擾的情形。為了避免螢光之間的干擾所帶來的誤差，因此本實驗選擇 647 nm 以及 488 nm 兩種螢光染料的組合，使用 640 nm 固體雷射以及 488 nm 氬離子雷射作為激發光源，並搭配光學鏡片的濾光功能，希望能使兩種螢光在互不干擾的情況下能達到高靈敏度偵測。圖 3-3b 與 c 為測試兩種螢光互相干擾之電泳圖，並依照圖 3-3b、c 的訊號高度結果製成表 3-2，結果可看出 Alexa Fluor 488 螢光被 PMT1(647 螢光通道)偵測到的量只有 1.47%，影響 647 nm 螢光訊號的程度非常小；而 Alexa Fluor 647 螢光並未被

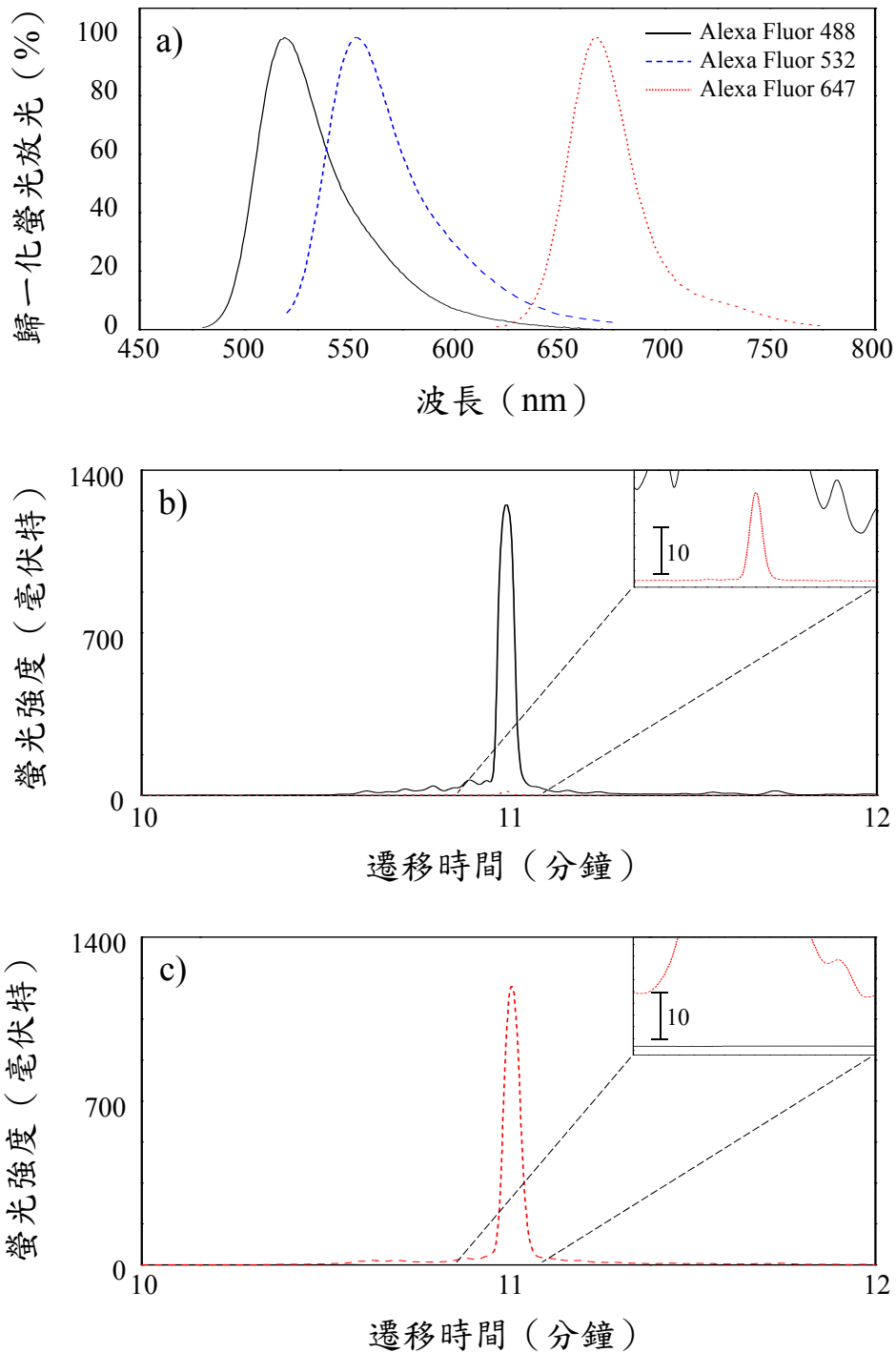


表 3-2 染料在個別偵測窗口中的干擾數值表^a

	偵測窗口	
	515 nm ^b	671 nm
Alexa Fluor 488 探針	1	0.0142
Alexa Fluor 647 探針	N.D. ^c	1

^a 此表的數值的皆由量測 1.0 nM 之 Alexa Fluor 染料電動注射 10 秒鐘所得之訊號高度數據，均一化至 1 之數據。

^b 偵測窗口之波長為個別置於 PMT 前端之干涉濾片波長。

^c 未檢出。

PMT2 (488 螢光通道) 偵測到，可知道 Alexa Fluor 647 不會影響到 488 nm 的螢光訊號。因此本篇研究選擇 647 螢光通道作為偵測目標分子用，488 螢光通道作為陰性對照用。

3.3.2 雙波長雷射系統之偵測極限

雙波長雷射系統中，利用 488 nm 氬離子雷射通道當作陰性對照組，激發標記 Alexa Fluor 488 螢光之標準樣品，有最大放射波長 515 nm。並利用 640 nm 固體雷射當作控制組激發標記 Alexa Fluor 647 螢光之樣品，有最大放射波長 665 nm。圖 3-4 為雙波長雷射同時偵測核苷酸探針接兩種螢光染料的電泳圖，濃度從 1.0 nM 向下稀釋，可偵測的最低濃度為 0.1 pM，顯示此偵測系統與單波長雷射一樣有很好的靈敏度。圖 3-5 將兩種螢光的強度對濃度作圖，在接上 Alexa Fluor 488 的探針之線性方程式為 $y = 9.74 \times 10^{14} x + 1185$ ， R^2 為 0.9999，並且有偵測極限 9 fM；Alexa Fluor 647 的探針之線性方程式則是 $y = 8.45 \times 10^{14} x - 2119$ ， R^2 為 0.9999，偵測極限有 31 fM。雙波長雷射系統與螢光放射偵測結合也能做到如單波長雷射一樣的靈敏度，比起單波長，雙波長雷射的最大優點為能在同一時間偵測出兩種不同的樣品。利用調整光電倍增管的電阻可以減小雙通道間因為吸收係數以及雷射強度不同而造成兩個訊號大小的差異。同樣是偵測長度相同的探針，雙通道之間探

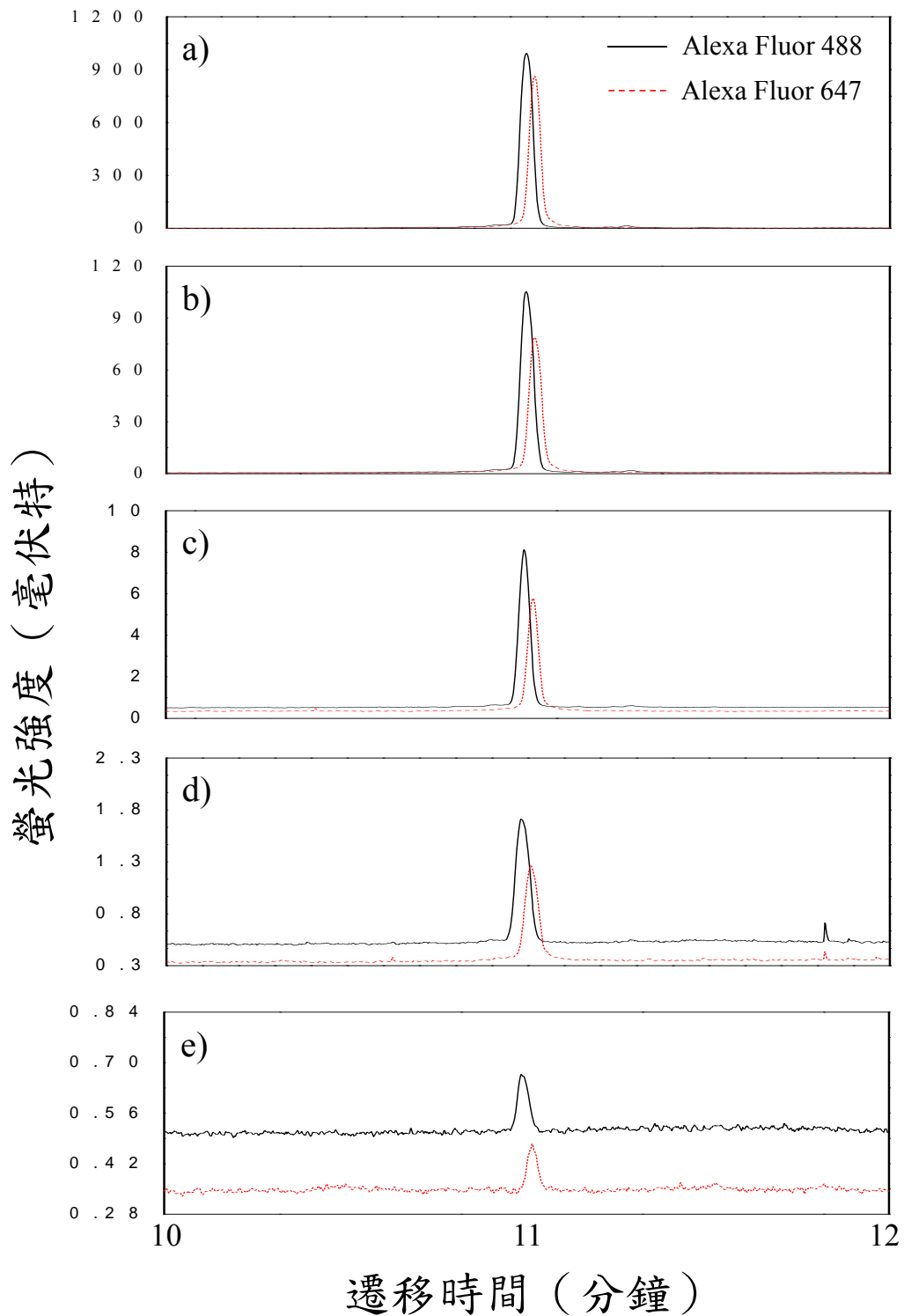


圖3-4 偵測接有Alexa Fluor 488與647螢光探針之電泳圖。a) 1.0 nM。b) 100 pM。c) 10 pM。d) 1.0 pM。e) 0.1 pM。雙通道中的探針濃度皆相同。

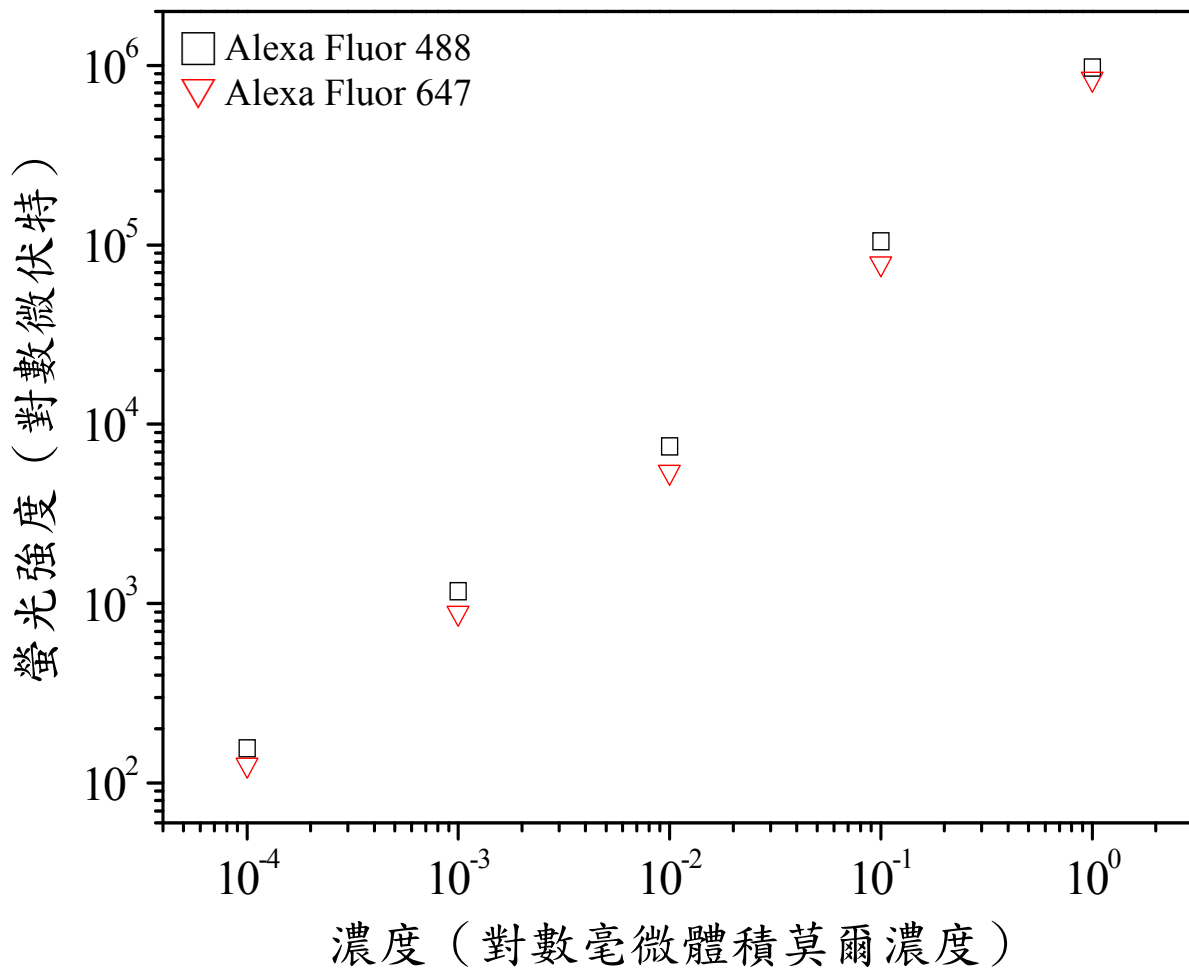
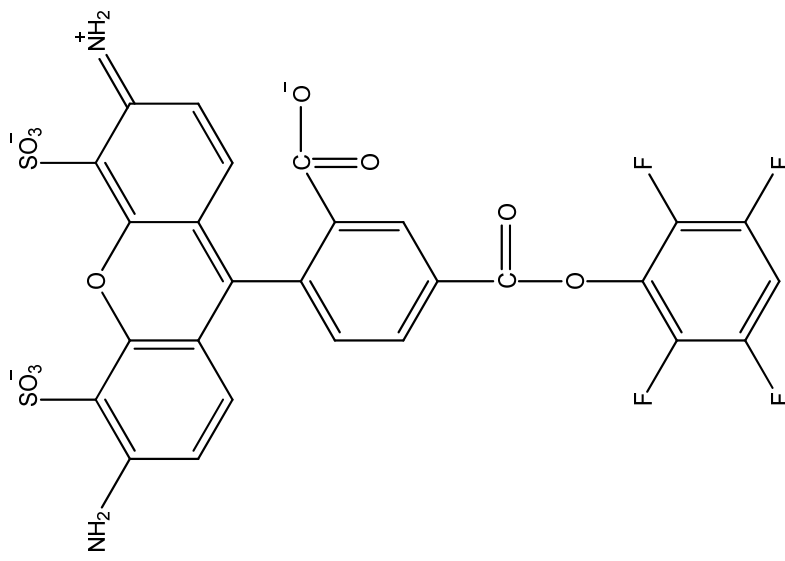


圖3-5 兩種螢光探針之螢光強度對濃度作圖

a)



b)

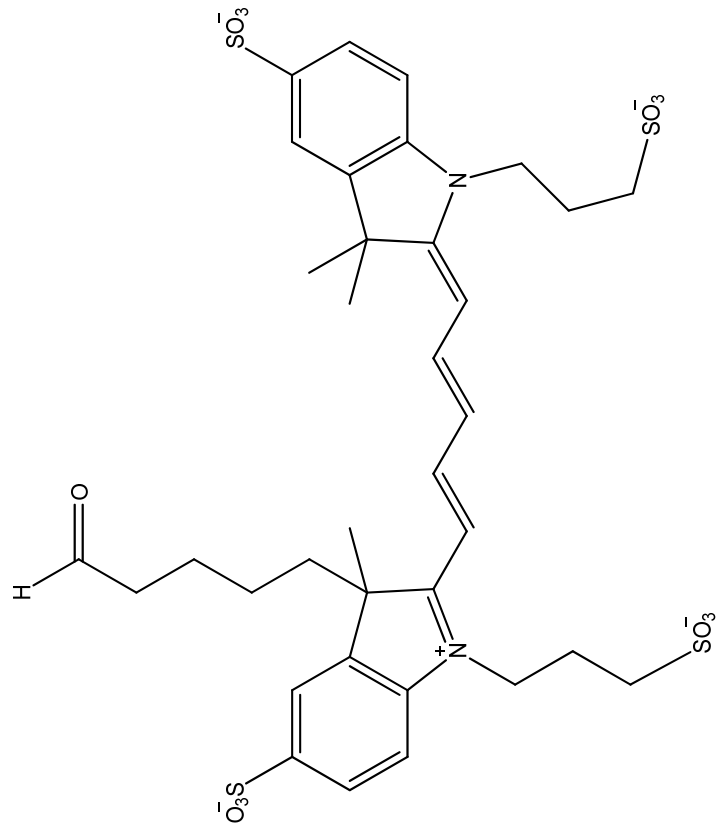


圖3-6 兩種螢光染料結構。a) Alexa Fluor 488。b) Alexa Fluor 647。

針的螢光訊號遷移時間有著些微的不同，主要是因為兩種探針上的螢光結構不同所致，圖 3-6 為兩種螢光的結構，Alexa Fluor 488 的分子量為 679.98 g/mol，Alexa Fluor 647 的分子量為 825.15 g/mol，因為兩者的分子量差導致兩種探針的遷移時間產生些微的差異，分子量較重的 Alexa Fluor 647 會比 Alexa Fluor 488 還慢一點到達偵測窗口。

3.3.3 偵測標準樣品

毛細管電泳應用在生化樣品上具有很高的分離效率，但是由於基質的干擾使得偵測遇到了阻礙，通常必須要將樣品前處理才能使基質的干擾降低。實驗利用夾板式結合反應嘗試從複雜的生物樣品中分析出特定的 miRNA，並以不同長度的 DNA 橋樑達到分離相似長度 miRNAs 的目的。可是前處理步驟的酒精清洗，以及 DNA 吸附問題都有可能造成分析物的流失，在以前的實驗中，Lu 等人發現 DNA 會吸附在微量離心管的塑膠表面上，影響到超微量分析的效率^[32]。為了改善此現象，在樣品中會加入載體 RNA (carrier RNA)，我們以酵母 RNA (yeast RNA) 當作載體 RNA，並加入濃度 10 ng/ μ L 來減緩低濃度的樣品因為吸附而流失在微量離心管上的現象，並且以濃縮方法來提高分析 miRNA 的偵測極限。圖 3-7 為利用夾板式結合反應偵測不同濃度的標準品 miRNA，首先利用真空離心濃縮機將各個濃度的樣品從體積

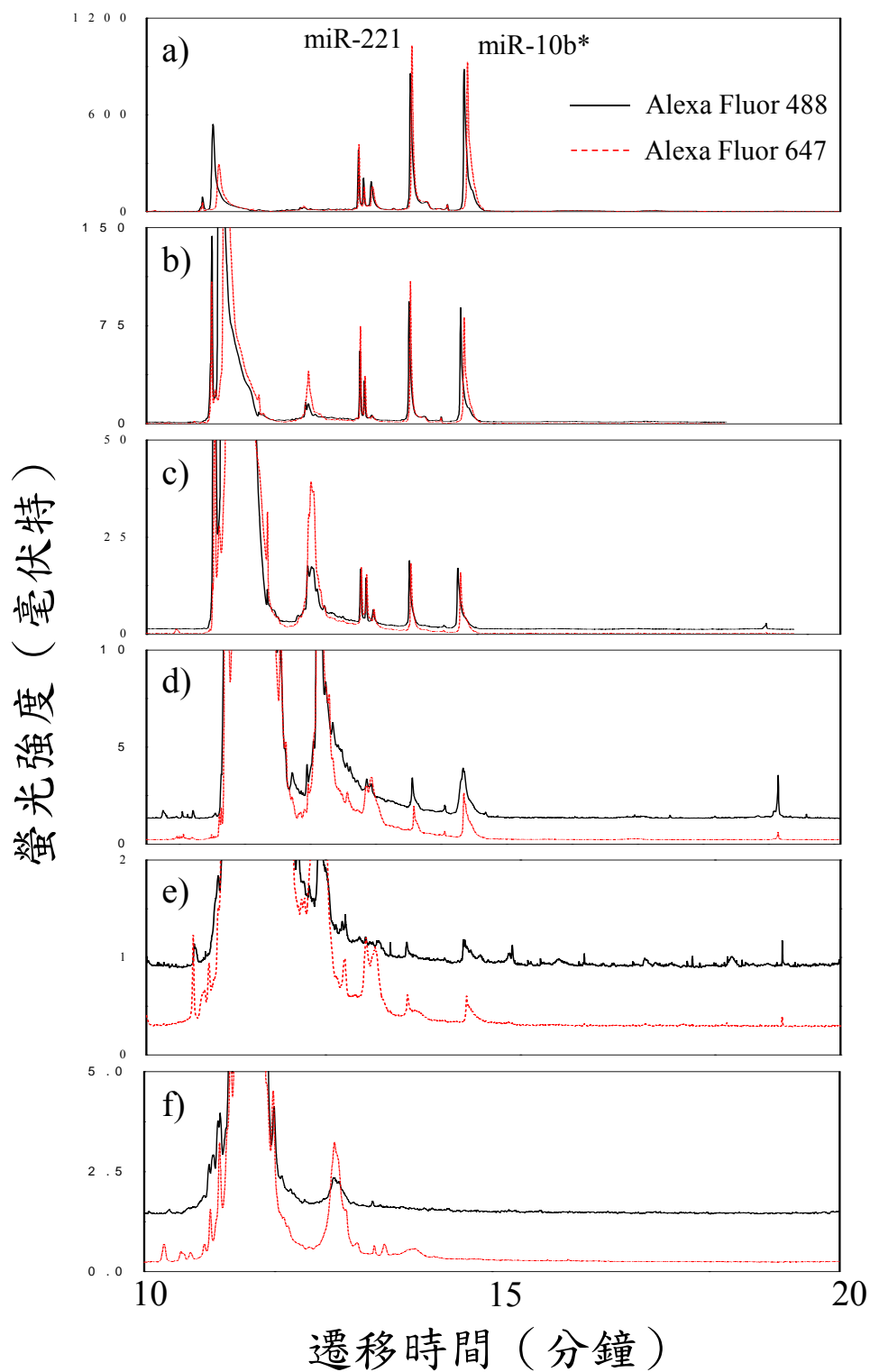


圖3-7 雙波長雷射偵測內標準 (miR-221) 及 miR-10b* 之標準樣品。兩種樣品在雙通道的濃度皆為：a) 1.0 nM。b) 100 pM。c) 10 pM。d) 1.0 pM。e) 0.1 pM。f) 陰性對照組。

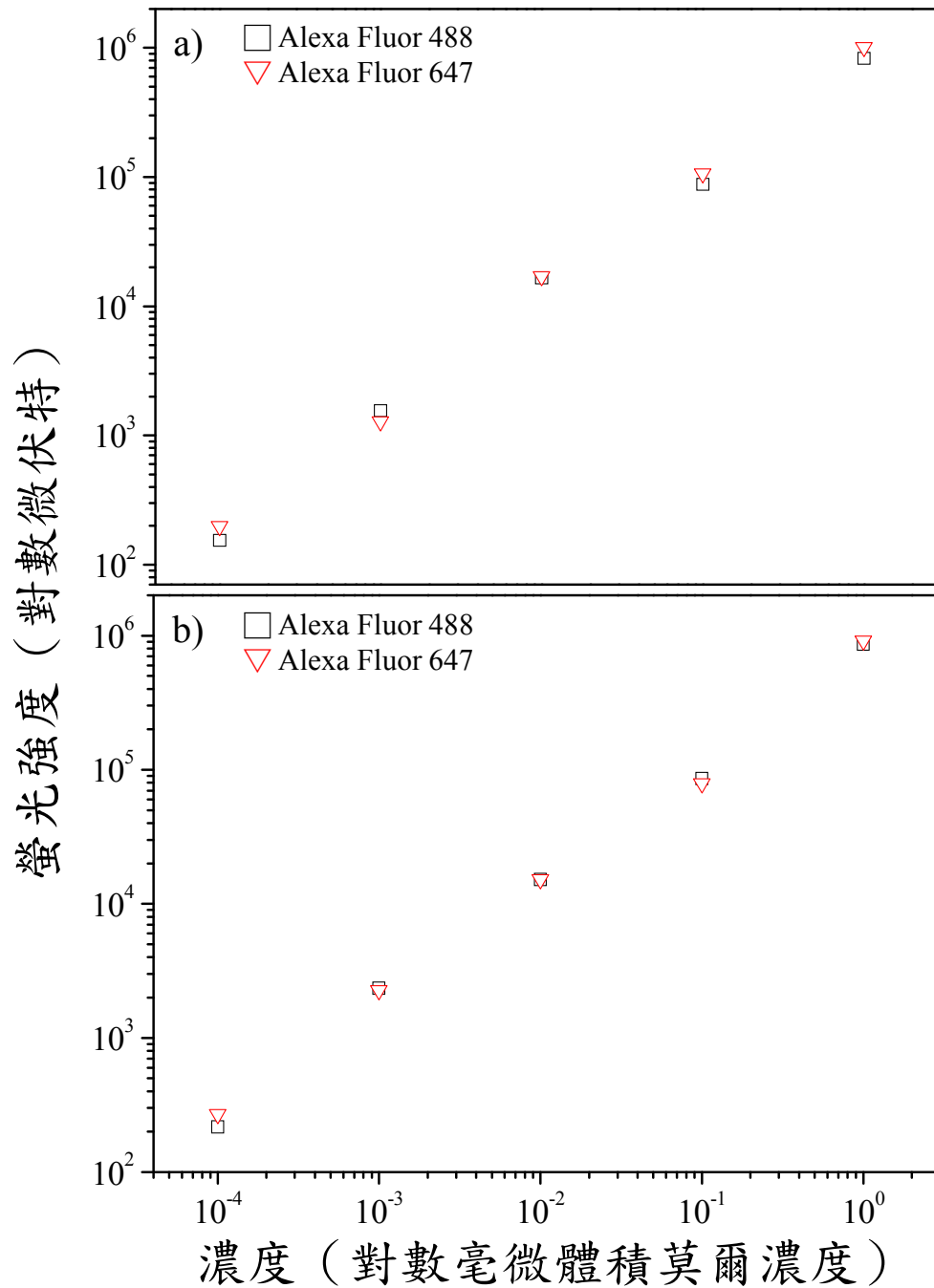


圖3-8 miR-221與miR-10b*之螢光強度對濃度作圖。a) miR-221。b) miR-10b*。

100 μL 抽乾到約 1 μL ，可濃縮將近 100 倍來加強偵測極限，接著個別進行雜合反應以及結合反應，並增加注入樣品的時間至 30 秒，能夠測得 miR-10b* 以及內標準 miR-221 的起始濃度從 1.0 nM 到 0.1 pM，反應的衍伸極限則為 0.1 pM。將兩種 miRNA 在雙通道的訊號高度做檢量線便如圖 3-8 所示，miR-221 在 488 螢光通道的線性方程式為 $y = 8.266 \times 10^{14} x + 3407$ ， R^2 為 0.9999；在 647 螢光通道的線性方程式為 $y = 1.005 \times 10^{15} x + 3154$ ， R^2 為 0.9999。miR-10b* 在 488 螢光通道的線性方程式為 $y = 8.63 \times 10^{14} x + 2007$ ， R^2 為 0.9999；在 647 螢光通道的線性方程式 $y = 9.132 \times 10^{14} x - 903$ ， R^2 為 0.9996。miR-221 在 488 螢光通道有偵測極限 92.8 fM；在 647 螢光通道有偵測極限 44.5 fM。miR-10* 在 488 螢光通道有偵測極限 65 fM；在 647 螢光通道有偵測極限 32.6 fM。利用測試 miRNA 標準品的能力考驗雙波長雷射誘發螢光偵測系統，利用增加注入樣品的量以及濃縮技術，能夠補償樣品在夾板式結合反應完後經過酒精清洗後的流失，可以很靈敏地偵測 miRNA，使偵測極限與直接偵測螢光探針相當。

3.3.4 比較偵測肝癌細胞株 Huh 7 細胞內的 miR-10b*

miRNA 依照目標 messenger RNA 的種類不同，它可以是致癌基因也可以是腫瘤抑制基因。因此在 miRNA 的研究常常會找出其對應的

messenger RNA 為何。在研究 messenger RNA 時常常會將特定的 miRNA 的前驅物 (pre-miRNA) 送進活體細胞內，此動作稱作轉染 (transfection)，結果細胞體內會對特定的 pre-miRNA 過度表現而產生大量的成熟 miRNA，進而找出 miRNA 與 mRNA 之間的關係。因此在 RNA 研究上，比較轉染前後的轉染效率便顯得非常重要。

利用雙波長誘發螢光偵測系統同時分析細胞在轉染前以及轉染過特定 miRNA 之總 RNA 樣品，並從中偵測出特定 miRNA 來證明此方法的應用性。488 螢光通道分析未轉染的肝癌細胞株 Huh 7 細胞當作陰性對照組；在 647 螢光通道分析轉染過 miR-10b* 的前驅物 pre-miR-10b* 之 Huh 7 細胞，兩種樣品混和後，由於轉染過的細胞會產生大量的成熟 miR-10*，利用本實驗方法同時進樣混和樣品至進入毛細管，可以從細胞萃取出來的總 RNA 中直接偵測到成熟 miR-10* 量，如圖 3-9 所顯示，在 488 螢光通道中為偵測沒轉染 pre-miR-10b* 的 Huh 7 細胞之總 RNA，可以看出並沒有任何 miR-10b* 的訊號峰，而在 647 螢光通道中，偵測轉染過 pre-miR-10b* 的 Huh 7 細胞之總 RNA 很明顯可看出有 miR-10b* 的訊號峰。加入 1.0 nM 的 miR-221 內標準可定量出 miR-10b* 在 Huh 7 細胞體內的濃度約 1.4 nM。

藉由 RT-qPCR 進行 miR-10b* 的分析來與 CE-dLIF 方法的效能做比較，經過 RT-qPCR 後能得到循環閾值 (Ct)，Ct 值能計算出在樣品中

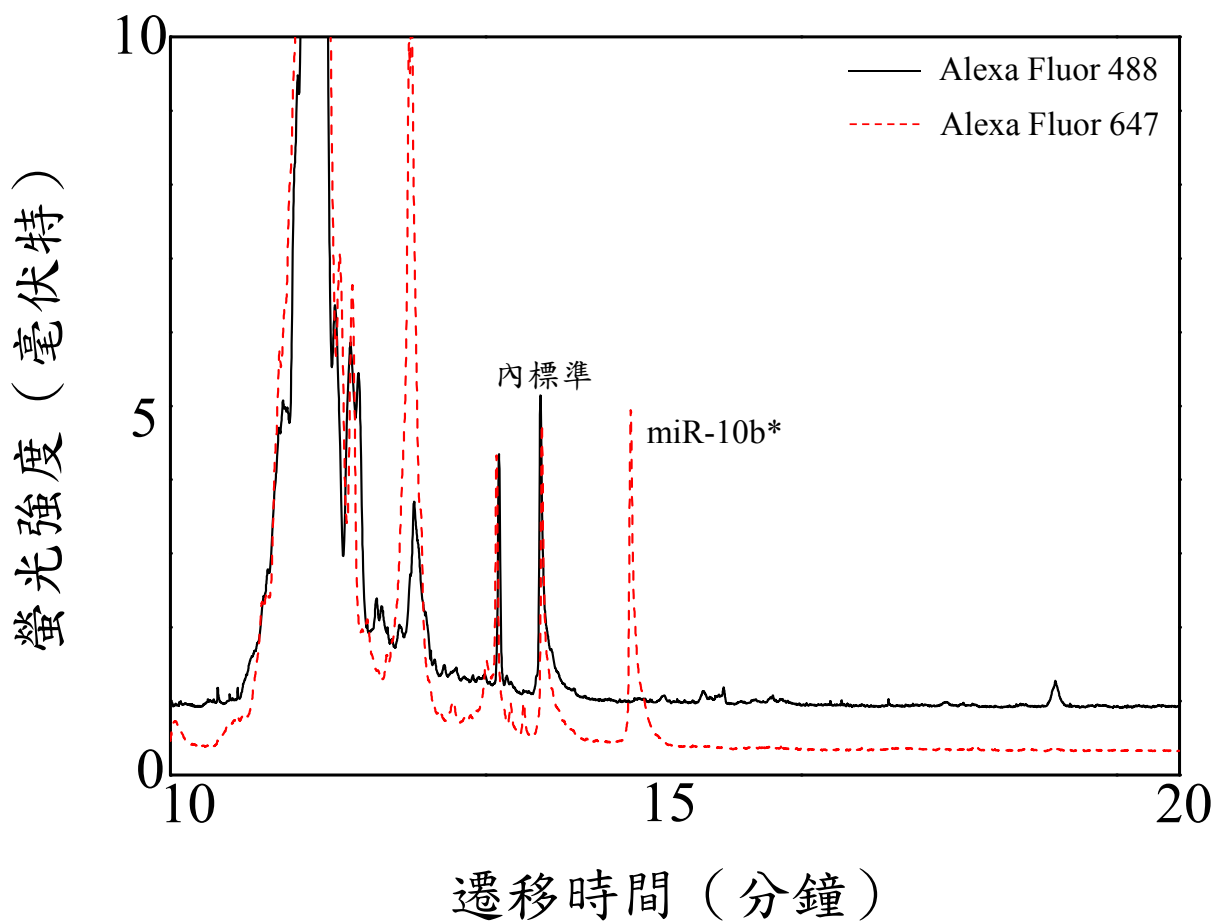


圖3-9 雙波長雷射偵測Huh 7細胞內的miR-10b*。

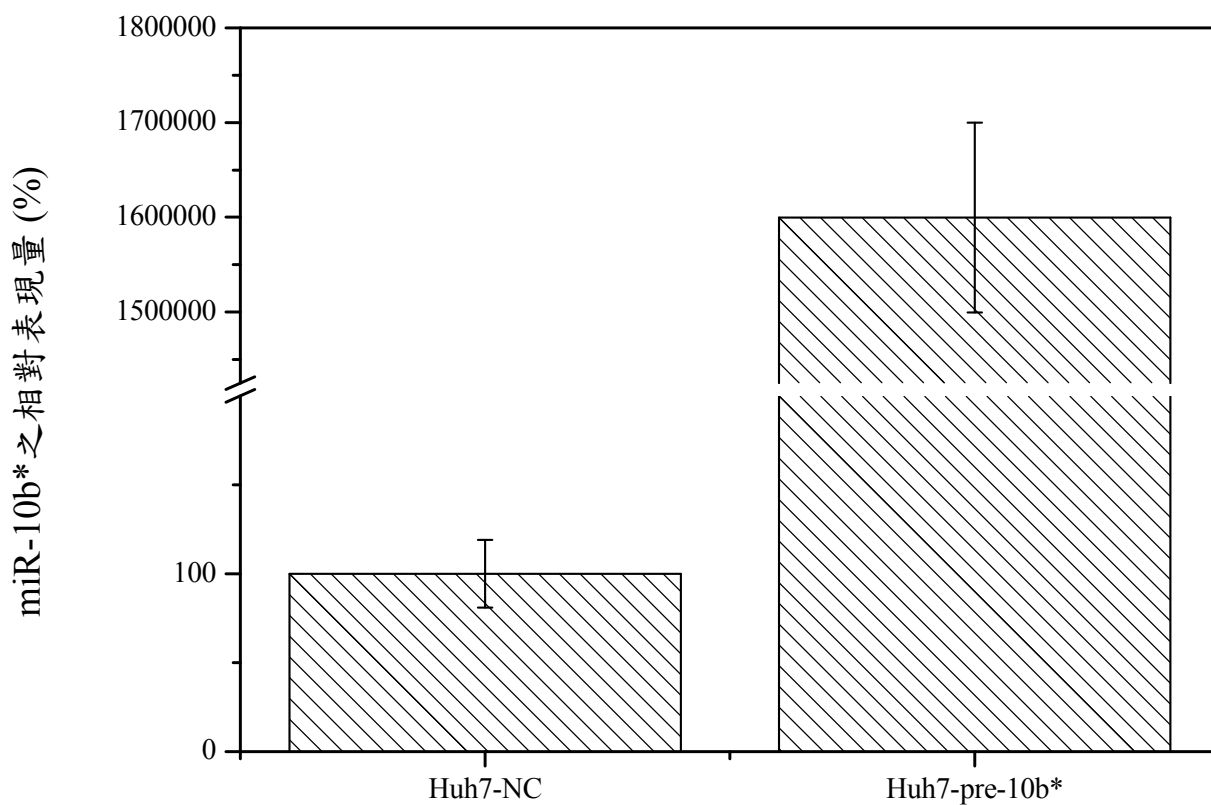


圖3-10 miR-10b*表現量之柱狀圖。數據來自RT-qPCR，Huh 7-NC為陰性控制組之Huh 7細胞，Huh 7-pre-10b*為轉染過pre-miR-10b*的Huh 7細胞。

的 DNA 之理論含量。若 Ct 值大，則表示 PCR 所經過的循環數多，也就表示在樣品中起始的 DNA 含量少。圖 3-10 為利用 RT-qPCR 做相對定量法所獲得的相對表現量，陰性對照的 Huh 7 細胞其 Ct 值為 26.8，與參考基因 U6 的 Ct 值 17.4 相比可獲得 ΔCt 值 9.39；轉染過 pre-miR-10b* 的 Huh 7 細胞 Ct 值為 13.9，與其參考基因 U6 的 Ct 值 18.8 相比，可獲得 ΔCt 值 -4.91。藉由兩個 ΔCt 值可計算出 miR-10b* 之相對表現量 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(-14.3)} = 20,171$ ，這表示陰性對照的 Huh 7 細胞 (Ct = 26.8) 與轉染過的 Huh 7 細胞 (Ct = 13.9) 表現量相差有 20,171 倍。比較 CE-dLIF 與 RT-qPCR 兩個方法的精確度，RT-qPCR 的相對標準偏差 (Relative standard deviation, RSD) 高達 19.1% (n = 4)，而 CE-dLIF 的 RSD 為 4.38% (n = 4)，可知道 CE-dLIF 的精確度比 RT-qPCR 好。由於 RT-qPCR 經過 PCR 放大之後，誤差也會一起被放大^[33]，精確度也會降低。因此由結果可證明 CE-dLIF 有著比 RT-qPCR 方法還要來得精確，並且能夠有效的比較成對的 miRNA 樣品。

3.4 結論

本章實驗利用毛細管電泳結合雙波長雷射誘發螢光偵測系統，選擇合適的波長以及螢光染料來避免兩個通道互相干擾，此方法可以偵測到非常微量的 miRNA，比起使用單波長螢光偵測，雙通道的優點在於可一次檢驗出成對的樣品。樣品使用夾板式結合反應，針對目標所設計 DNA 橋樑可準確抓到目標 miRNA，再藉由不同腺苷長度的 DNA 橋樑，更可以使相似長度的 miRNA 會有相異的遷移時間。樣品在結合反應完之後須經過酒精清洗，然而清洗的過程多少都會造成樣品流失，且樣品會吸附於離心管的塑膠表面上的問題，都會影響偵測的靈敏度。在本章實驗中嘗試使用濃縮技術來強化偵測極限，並由數據顯示此方法在偵測 miRNA 線性範圍為可從 1.0 nM~0.1 pM。使用合適的內標準，不須經過聚合酶連鎖反應放大，可以定量細胞的總 RNA 中的特定 miRNA，我們偵測有轉染以及沒轉染過特定 RNA 前驅物的成對 RNA 樣品，成功在一次分析中比較出轉染後的效率。與 RT-qPCR 方法結果比較顯示此方法的 RSD 能有較好的表現。

近年來有學者以修飾官能基的奈米粒子抓取 miRNA^[34, 35]，將來的學弟妹也會朝此方向邁進，利用奈米粒子抓取目標物，簡化酒精清洗的動作，並期盼能夠達到高靈敏度的分析。

3.5 參考資料

1. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(4):259-269.
2. Braconi C, Patel T: **MicroRNA expression profiling: A molecular tool for defining, the phenotype of hepatocellular tumors.** *Hepatology* 2008, **47**(6):1807-1809.
3. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T *et al*: **MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia.** *Blood* 2008, **111**(6):3183-3189.
4. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T: **MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.** *Gastroenterology* 2007, **133**(2):647-658.
5. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C *et al*: **The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities.** *Nat Med* 2008, **14**(11):1271-1277.
6. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C *et al*: **MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(40):15805-15810.
7. Duttgupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW: **Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures.** *PLoS One* 2011, **6**(6):e20769.
8. Bianchi F, Nicassio F, Marzi M, Belloni E, Dall'olio V, Bernard L, Pelosi G, Maisonneuve P, Veronesi G, Di Fiore PP: **A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer.** *EMBO molecular medicine* 2011, **3**(8):495-503.
9. Ranade AR, Weiss GJ: **Methods for microRNA microarray profiling.** *Methods Mol Biol* 2011, **700**:145-152.
10. Camarillo C, Swerdel M, Hart RP: **Comparison of microarray and quantitative real-time PCR methods for measuring MicroRNA levels in MSC cultures.** *Methods Mol Biol* 2011, **698**:419-429.
11. Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, Nilsen TW: **A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using**

- splinted ligation.** *RNA* 2007, **13**(6):930-936.
12. Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, Nilsen TW: **Direct detection of small RNAs using splinted ligation.** *Nat Protoc* 2008, **3**(2):279-287.
 13. Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P, Caldas C: **Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression.** *RNA* 2010, **16**(5):991-1006.
 14. Fehniger TA, Wylie T, Germino E, Leong JW, Magrini VJ, Koul S, Keppel CR, Schneider SE, Koboldt DC, Sullivan RP *et al*: **Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome.** *Genome Res* 2010, **20**(11):1590-1604.
 15. Zhang D, Li W, Zhang J, Tang W, Qian C, Feng M, Chu Q, Ye J: **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* 2011, **694**(1-2):61-66.
 16. Pang H, Pavski V, Yeung ES: **DNA sequencing using 96-capillary array electrophoresis.** *J Biochem Biophys Methods* 1999, **41**(2-3):121-132.
 17. Zhang J, Yang M, Puyang X, Fang Y, Cook LM, Dovichi NJ: **Two-dimensional direct-reading fluorescence spectrograph for DNA sequencing by capillary array electrophoresis.** *Anal Chem* 2001, **73**(6):1234-1239.
 18. Carrilho E, Ruiz-Martinez MC, Berka J, Smirnov I, Goetzinger W, Miller AW, Brady D, Karger BL: **Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions.** *Anal Chem* 1996, **68**(19):3305-3313.
 19. Gao Q, Yeung ES: **A matrix for DNA separation: genotyping and sequencing using poly(vinylpyrrolidone) solution in uncoated capillaries.** *Anal Chem* 1998, **70**(7):1382-1388.
 20. Zhong W, Yeung ES: **High-throughput analysis of total RNA expression profiles by capillary gel electrophoresis.** *Anal Chem* 2003, **75**(17):4415-4422.
 21. Chang PL, Chang YS, Chen JH, Chen SJ, Chen HC: **Analysis of BART7 microRNA from Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells by capillary electrophoresis.** *Anal Chem* 2008, **80**(22):8554-8560.
 22. Jiang RM, Chang YS, Chen SJ, Chen JH, Chen HC, Chang PL: **Multiplexed microRNA detection by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *J Chromatogr A* 2011, **1218**(18):2604-2610.
 23. Schoch RB, Ronaghi M, Santiago JG: **Rapid and selective extraction, isolation, preconcentration, and quantitation of small RNAs from cell lysate using**

- on-chip isotachophoresis.** *Lab Chip* 2009, **9**(15):2145-2152.
24. Persat A, Chivukula RR, Mendell JT, Santiago JG: **Quantification of global microRNA abundance by selective isotachophoresis.** *Anal Chem* 2010, **82**(23):9631-9635.
 25. Takahashi S, Murakami K, Anazawa T, Kambara H: **Multiple Sheath-Flow Gel Capillary-Array Electrophoresis for Multicolor Fluorescent DNA Detection.** *Anal Chem* 1994, **66**(7):1021-1026.
 26. Hebenbrock K, Williams PM, Karger BL: **Single strand conformational polymorphism using capillary electrophoresis with two-dye laser-induced fluorescence detection.** *Electrophoresis* 1995, **16**(8):1429-1436.
 27. Iyer S, Stark P, Olivares J: **Two-Color Capillary Electrophoresis with On-Column Excitation and Wave-Guide Based Fluorescent Detection.** *Journal of the Association for Laboratory Automation* 2003, **8**(4):41-45.
 28. Xue G, Yeung ES: **Two-color excitation system for fluorescence detection in DNA sequencing by capillary array electrophoresis.** *Electrophoresis* 2002, **23**(10):1490-1498.
 29. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ: **miRBase: tools for microRNA genomics.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(Database issue):D154-158.
 30. Christel LA, Petersen K, McMillan W, Northrup MA: **Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration.** *Journal of Biomechanical Engineering* 1999, **121**(1):22-27.
 31. Song JM, Yeung ES: **Optimization of DNA electrophoretic behavior in poly(vinyl pyrrolidone) sieving matrix for DNA sequencing.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):748-754.
 32. Lu JH, Li HK, An HJ, Wang GH, Wang Y, Li MQ, Zhang Y, Hu J: **Positioning isolation and biochemical analysis of single DNA molecules based on nanomanipulation and single-molecule PCR.** *Journal of the American Chemical Society* 2004, **126**(36):11136-11137.
 33. Harris DC: **Quantitative Chemical Analysis:** W. H. Freeman; 2010.
 34. Crew E, Rahman S, Razzak-Jaffar A, Mott D, Kamundi M, Yu G, Tchah N, Lee J, Bellavia M, Zhong CJ: **MicroRNA conjugated gold nanoparticles and cell transfection.** *Anal Chem* 2012, **84**(1):26-29.
 35. Li J, Schachermeyer S, Wang Y, Yin Y, Zhong W: **Detection of microRNA by fluorescence amplification based on cation-exchange in nanocrystals.** *Anal Chem* 2009, **81**(23):9723-9729.

第四章 總結論

本篇論文以毛細管電泳分析作為基礎，搭配螢光放射偵測系統以偵測不同的核醣核酸。一開始嘗試使用成本較低的方法偵測總核醣核酸，並與商業化的儀器做比較。為了偵測總核醣核酸的完整性，會以染料與核苷酸嵌合並利用到光學濾片來減少背景值的影響，能使系統的偵測極限 ($S/N = 3$) 達到 12 pM，可偵測的總核醣核酸濃度之線性範圍從 50 pg/ μ L 到 5 ng/ μ L，結果能與雷射誘發螢光的微晶片電泳儀器 Agilent 2100 Bioanalyzer 相當，且總分析時間為 15 分鐘，能比 2100 Bioanalyzer 的 30 分鐘來得快。使用發光二極體代替雷射作為激發光源除了可以降低成本，還可以達到快速、高靈敏度的偵測，也能成功地監測總核醣核酸的裂解情況。由於發光二極體有許多顏色的發光波長，因此可以依據使用的螢光種類不同來搭配發光二極體光源，也可以依據發光二極體的波長來選擇螢光染料。

分析完總核醣核酸後，更進一步地希望從中分析出數量少、片段小而且與癌症有關聯性的微小核醣核酸。利用雙波長通道偵測系統搭配夾板式結合反應，能夠專一性地分析微小核醣核酸，可偵測 miRNA 的線性範圍為 1.0 nM 到 1.0 pM。利用兩道光特色，可以一次偵測兩種細胞樣品，並可同時判斷是否含有特定微小核醣核酸，利用內標準法更可以進一步知道細胞中特定微小核醣核酸的含量。本實驗以轉染

過 pre-miR-10b* 的肝癌細胞株 Huh 7 之總核醣核酸，成功地從中分析出 miR-10b* 的量，並可以同時與正常的 Huh 7 細胞做比對。以 RT-qPCR 方法來與 CE-dLIF 方法做比較，數據結果顯示本實驗方法的 RSD 比較優秀，誤差不會因為經過 PCR 放大而增加。

本篇論文前半分析總核醣核酸的完整性，以利研究核醣核酸的下游實驗能夠獲得更好的更正確的研究數據，後半利用雙波長通道偵測系統分析轉染過特定微小核醣核酸的細胞總核醣核酸，提供更清楚的資訊給研究微小核醣核酸與訊息核醣核酸相關性的實驗，能夠知道細胞是否有正確轉染入欲研究之微小核醣核酸。希望這些技術能夠幫助研究核醣核酸的實驗能夠有更加正確，更加有信服力的數據，未來期望幫助臨床研究以及疾病診斷的實驗上。

參與學術會議

1. 2010 年中國化學年會
2. 2011 年中國化學年會
3. 第十七屆分析化學技術交流研討會
4. 第十八屆分析化學技術交流研討會

論文發表

1. Yang TH, Chang PL: **Determination of RNA degradation by capillary electrophoresis with cyan light-emitted diode-induced fluorescence.** *J Chromatogr A* 2012, **1239**:78-84.
2. Yang T-H, Ou D-L, Hsu C, Huang S-H, Chang P-L: **Comparative microRNA detection from precursor-microRNA transfected hepatocellular carcinoma cells by capillary electrophoresis with dual color laser-induced fluorescence.** *Electrophoresis* 2012: article in press.