

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

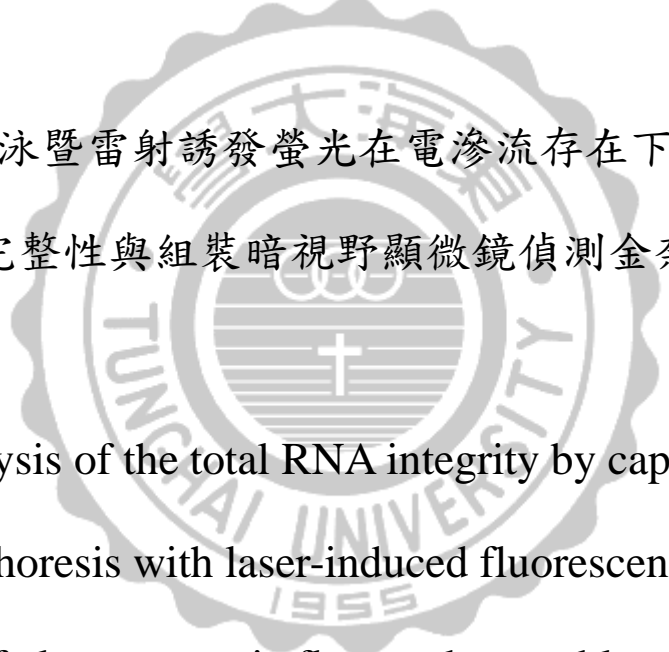
College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以毛細管電泳暨雷射誘發螢光在電滲流存在下分析總核醣

核酸之完整性與組裝暗視野顯微鏡偵測金奈米粒子

The seal of Tunghai University is a circular emblem with a scalloped border. It features the university's name in Chinese characters '東海大學' at the top and 'TUNGHAI UNIVERSITY' around the perimeter. In the center, there is a cross and the year '1955' at the bottom.

Analysis of the total RNA integrity by capillary
electrophoresis with laser-induced fluorescence in the
presence of electroosmotic flow and assembly of dark field
microscope to detect gold nanoparticles

研究生:施雅筑 Ya-Chu Shih

指導教授:張柏齡 博士 Dr. Po-Ling Chang

中華民國 102 年 7 月

謝誌

兩年碩士班生涯就這樣結束了，也即將揮別伴隨我六年的東海大學。在東海大學的這段期間，有歡樂亦有感傷，以後我還是會常常想念著東海大學的不管人、事、物。

對於我碩士論文的完成，首先要先感謝指導教授張柏齡老師，感謝您總在百忙之中耐心聽取我不定時的進度報告並予以指導。另外，也感謝口試委員陳昭慧教授與黃承文教授在論文上的指導與建議。在研究過程中亦感謝樓助教，總是麻煩您空出一段時間讓我使用儀分實驗室的儀器。還要感謝化學系最美麗的藍姐，每次只要一有問題就跑去求助您。

實驗室的瑞民學長及子學學長，謝謝兩位學長在我剛進實驗室什麼都不懂情況下耐心的教導我。亦感謝實驗室的宜蓁、孟璇、彥竹、俐雯、思樺、元裕、宜安、宜欣、靜洳、雅琪、宇君及郁萍，在實驗上的幫忙以及指教。其中還是最感謝宜蓁學妹，謝謝這兩年來的陪伴，因為有你在碩士班的這兩年我並不孤單，亦希望你在未來的這一年，在實驗上更加油。最後還要感謝大學同窗好友亭君，謝謝你老是聽我訴說在生活上各個大大小小的事。

最後僅將此獻給我摯愛的父母親及家人，因為有你們的栽培，才有今天的我。在未來的日子，我一定會更加努力。

中文摘要

RNA 之完整性在生物領域中扮演著很重要的角色，因為純度不佳之 RNA 可能對下游實驗結果造成很大的影響。在此研究中發展了一種快速及經濟之方法分析總 RNA (total RNA) 之完整性，是以毛細管電泳暨雷射誘發螢光在電滲流存在下 (capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence in the presence of electroosmotic flow) 為基礎進行分析。此方法利用 PEO (M_{ave} 4,000,000 Da) 作為分離 RNA 之篩分介質，並將溴化乙錠 (微克/毫升) 溶解在聚合物溶液作為標定 RNA 之染料。成功地在 25 分鐘內完全分離出總 RNA 中的 28S、18S、5.8S、5S 核糖體 RNA (ribosome RNA) 及傳遞 RNA (transfer RNA)。此研究中，利用線上濃縮技術注入大體積樣品可增加實驗靈敏度，使實驗可偵測到最低 28S 及 18S rRNA 濃度為 100 pg/ μ l。最後利用加熱不同時間成功監測 RNA 的降解情況。結果顯示，使用毛細管電泳暨雷射誘發螢光在電滲流存在下可有效的分析 RNA 之完整性。

實驗的第二部分是組裝暗視野顯微鏡偵測金奈米粒子。利用高數值接物鏡 (high numerical objective)、擋光片 (field stop) 以及視野限制 (iris)，成功地觀察 32 nm 金奈米粒子的布朗運動 (brownian motion)，並利用商業化相機收集此影像。結果顯示，此儀器可以用來偵測以金奈米為基礎的奈米感測器 (nanosensing)。

Abstract

RNA integrity plays an important role in RNA studies because poor RNA quality may have a great impact on downstream methodologies. This study proposed a rapid, and cost-effective method to analyze RNA integrity based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (CE-LIF) in the presence of electroosmotic flow. This proposed method used the poly(ethylene) oxide (M_{ave} 4,000,000 Da) as sieving matrix for total RNA separation. The ethidium bromide ($\mu\text{g/mL}$) was dissolved in polymer solution as interchelating dye for the on column fluorescent labeling. The separation of the 28S rRNA, 18S rRNA, 5.8S rRNA, 5S rRNAs and tRNA from cell extracted human total RNA was accomplished within 25 minutes. In this work, online concentration technique was used to increase the sensitivity by larger volume sample injection. The lower detectable concentration of 28S and 18S rRNAs is 100 pg/ μL . In addition, the temperature-induced degradation of total RNAs could be monitored by CE-LIF. The result demonstrated the separation of total RNA by CE-LIF in the presence of EOF is useful for determination of RNA quality. The second part of this thesis is to build a dark field microscope to detect gold nanoparticles. By using high numerical objective, appropriately field stop and iris, observation of brownian motion of 32 nm gold nanoparticles was successfully recorded by commercial CCD camera. This result indicated the proposed instrument may potentially be use for sensitive detection of nanoparticle-based nanosensing.

總目錄

論文摘要.....	I
總目錄.....	III
圖目錄.....	VII
參與會議.....	112
第一章 毛細管電泳及核糖核酸之簡介	1
1.1 毛細管電泳之簡介	1
1.1.1 分離原理	4
1.1.1.1 淌度 (mobility)	4
1.1.1.2 電滲流 (electrosmotic flow, EOF)	5
1.1.1.3 DNA 於毛細管凝膠電泳中之分離機制	10
1.1.1.4 流動式毛細管凝膠電泳	14
1.1.1.5 樣品注射方式	16
1.1.1.6 偵測系統	17
1.1.1.7 線上濃縮技術	18
1.1.2 毛細管電泳之應用	19
1.1.2.1 毛細管電泳於 DNA 之相關應用	19
1.1.2.2 基因突變之偵測	22
1.2 核糖核酸 (ribonucleic acid) 之簡介.....	25

1.2.1 緒論	25
1.2.2 核糖核酸歷史	28
1.2.3 傳遞核糖核酸 (transfer RNA, tRNA)	29
1.2.4 訊息核糖核酸 (messenger RNA, mRNA)	31
1.2.5 核糖體核糖核酸 (ribosomal RNA, rRNA)	34
1.2.6 小分子核糖核酸 (small RNA, sRNA)	34
1.3 參考資料	37
第二章 以毛細管電泳暨雷射誘發螢光在電滲流存在下分析核糖核酸 之完整性.....	48
2.1 緒論.....	48
2.2 實驗部分	52
2.2.1 實驗試藥	52
2.2.2 細胞培養 (cell culture) 與核糖核酸萃取 (RNA extraction)	52
2.2.3 儀器裝置	52
2.2.3.1 聚合酶連鎖反應加熱器	53
2.2.3.2 毛細管電泳暨雷射誘發螢光偵測系統	53
2.2.4 毛細管前處理	55
2.2.5 聚合物溶液製備	56

2.2.6 螢光染料	56
2.2.7 軟體分析	57
2.2.8 實驗流程	57
2.3 結果與討論	59
2.3.1 聚合物濃度對 RNA 分離效率的影響.....	60
2.3.2 分離電壓對 RNA 分離效率的影響.....	63
2.3.3 RNA 濃度的影響	65
2.3.4 線上濃縮	68
2.3.5 使用標準品標定小片段 RNA.....	70
2.3.6 溫度降解 RNA.....	74
2.4 結論.....	80
2.5 參考資料	81
第三章 組裝暗視野顯微鏡偵測金奈米粒子	87
3.1 暗視野顯微鏡 (dark-field microscopy) 之簡介.....	87
3.2 金奈米粒子 (gold nanoparticle, Au NPs) 之簡介	90
3.2.1 雷利散射應用於生物檢測及影像	91
3.2.2 布朗運動	92
3.3 實驗部分	93
3.3.1 實驗試藥	93

3.3.2 暗視野顯微鏡裝置圖	93
3.3.3 製備金奈米粒子	95
3.4 結果與討論	97
3.4.1 偵測 32 nm 及 13 nm 金奈米粒子	97
3.5 結論	105
3.6 未來展望	106
3.7 參考文獻	107
第四章 總結論	110

圖目錄

圖 1-1 電雙層的結構及 ζ 電位	7
圖 1-2 (a)電滲流 及 (b) 層流之比較圖	9
圖 1-3 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離 DNA 片段之示意圖	15
圖 1-4 DNA 轉錄轉譯之示意圖	27
圖 1-5 tRNA 之二級結構示意圖	30
圖 1-6 形成穩定之 mRNA 過程	32
圖 1-7 真核細胞中 18S rRNA 之二級結構	35
圖 2-1 毛細管電泳暨雷射誘發螢光裝置圖	54
圖 2-2 (a) EtBr 之結構圖 及 (b) 螢光光譜圖	58
圖 2-3 聚合物溶液濃度對 HK-1 的總量 RNA 分離的影響	62
圖 2-4 電場對 HK-1 的總量 RNA 分離的影響	64
圖 2-5 不同片段 HK-1 的總量 RNA 之螢光強度對電壓作圖	66
圖 2-6 偵測不同濃度人類鼻咽癌細胞 HK-1 的總量 RNA	67
圖 2-7 進行線上濃縮技術，改變進樣時間對 HK-1 的總量 RNA 訊號 強度的影響	69
圖 2-8 28S 及 18S rRNA 之螢光強度對進樣時間線性圖	70
圖 2-9 進行線上濃縮，偵測 HK-1 的總量 RNA 其進樣時間為 360 秒， 可偵測到 28S 及 18S rRNA 最低濃度為 100 pg/ μ L	72

圖 2-10 使用標準品標定小片段 HK-1 的總量 RNA	73
圖 2-11 以 70°C 加熱不同時間，觀察 HK-1 的總量 RNA 降解程度 ...	75
圖 2-12 軟體預測大片段 rRNA 結構圖	77
圖 2-13 軟體預測小片段 rRNA 結構圖	78
圖 2-14 軟體預測 tRNA 結構圖	79
圖 3-1 暗視野顯微鏡光路徑圖	88
圖 3-2 自組裝暗視野顯微鏡裝置圖	94
圖 3-3 自組裝暗視野顯微鏡原理圖	96
圖 3-4 金奈米粒子高解析度穿透電子顯微鏡圖。a) 32 nm。c)13 nm。	98
圖 3-5 32 nm 金奈米粒子。a)橢圓形。b)拖尾情形。	100
圖 3-5 32 nm 金奈米粒子。c)圓形。	101
圖 3-6 13 nm 金奈米粒子。a)水稀釋。b)甘油稀釋。	103
圖 3-6 13 nm 金奈米粒子。c)陰性對照組。d)。吸收光譜圖	104

第一章 毛細管電泳及核醣核酸之簡介

1.1 毛細管電泳之簡介

電泳 (electrophoresis) 此名詞在 1909 年由 Michaelis 所提出^[1]，但直到 1937 年之後 Tiselius 才利用電泳技術，從血漿蛋白中成功分離出白蛋白及 α 、 β 、 γ 三大類的球蛋白^[2]，使得電泳技術間隔 28 年終於有突破性發展，並於 1948 年獲得諾貝爾化學獎。電泳的原理為溶液中帶有電荷的物質，在施加電場時會因庫倫吸引或排斥作用力而產生遷移運動^[3]，而電泳之所以可以達到分離的效果是利用不同質荷比 (m/z) 的帶電粒子產生不同遷移速度，使得溶液中帶電粒子能夠分離，而此技術稱為電泳分離。

電泳技術發展至今已有百年的歷史，早期電泳是在自由溶液下進行，當施加高電壓時會產生焦耳熱問題，對分離的解析度造成嚴重影響^[4]，因此後來科學家發展出平板凝膠電泳 (slab gel electrophoresis)^[5-7]，將原本在自由溶液下進行實驗改為使用流動性較差凝膠作為篩分 (sieving) 樣品的物質，平板凝膠電泳可同時分離多種樣品，最常使用的樣品為蛋白質 (protein)、去氧核醣核酸 (DNA)、胜肽 (peptide) 等生物樣品。但因製備平板凝膠不易且散熱效果差，使得進行平板凝膠電泳時只能施加低電壓進行分離，造成分析時間較久。所以瑞典科學家 Hjerten 於 1967 年，使用 3 mm 的玻璃管柱在自由溶液下進行區帶

電泳的實驗，並結合了 UV 吸收光譜儀來偵測分析物，可成功地分離無機離子、核酸、蛋白質以及病毒^[8]。此外，因玻璃管柱變小可減少熱對流的影響，所以接著 Virtanen 於 1974 年以相同方法將毛細管內徑縮小至 0.2~0.5 mm，成功地在 10 分鐘內分離 16 種陰離子^[9]。雖然可以大幅減低熱對流的影響，但是當施加高電壓時還是會有熱對流的問題存在，而造成無法達到快速分離、高靈敏度等多項優點，使得電泳無法成為當時主要的分析工具。直到 1981 年由 Jorgenson 及 Lukacs 等人使用內徑 75 μm 毛細管成功地分離衍生化的胺基酸^[10-12]，並且結合螢光系統完成了線上偵測。此方法不僅提高實驗靈敏度，也因為內徑變小，使表面積與體積比值變大，散熱效果大幅提升，分離時間減少許多，其理論板數可達到數十萬以上，使得毛細管電泳成為良好的分離技術。

上文已提到平板凝膠電泳是使用流動性較差的凝膠作為篩分的物質而改善電泳的解析度。凝膠的篩分原理是根據分子量大小來達到分離效果，而平板凝膠電泳最常使用的樣品為生物巨分子。但因為使用平板凝膠電泳還是會受到焦耳熱的影響，所以後來發展出毛細管凝膠電泳（capillary gel electrophoresis）此分離技術^[13]，發展初期使用的凝膠為交聯性聚丙烯醯胺（cross-linked polyacrylamide, CPA）^[14]和當初平板凝膠電泳使用的凝膠相同，但因製備繁瑣、黏性高，難以利用壓力

方式注入到毛細管中，所以利用管內聚合方式注入到毛細管中。但由於毛細管徑小，要在管內聚合其製備的困難度比製備平板凝膠來的高，且管內聚合常遇到凝膠體積變化、產生氣泡、聚合的再現性低及毛細管使用壽命短等問題存在，因此發展可用的凝膠或聚合物溶液成為當時毛細管電泳的重要目標。

直到 1989 年，Zhu 和 Colbum 找到一個可以替代交聯性聚丙烯醯胺的凝膠，利用非交聯性的線性聚合物成功分離 DNA 片段^[15, 16]，而線性聚合物的優點在於黏度低，可以先在毛細管外完成聚合，再利用壓力方式注入毛細管，因使用黏度低的凝膠提升了實驗的再現性，也增加了毛細管的使用壽命，而今日毛細管凝膠電泳所使用的凝膠還是以線性聚合物為主，常見的線性聚合物包括，聚環氧乙烷 (poly (ethylene oxide), PEO)^[17, 18]、線性聚丙烯醯胺 (linear polyacrylamide, LPA)^[19, 20]、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol)^[21]、各種纖維素 (cellulose) 衍生物^[22-24] 以及瓊脂膠 (agarose)^[25] 等，至今毛細管凝膠電泳已廣泛的應用於生物樣品上。

近年來毛細管電泳已經成為良好的分析工具之一，可適用於有機分子、無機分子、帶電分子及中性分子，近幾年來更廣泛運用於生物分子，例如：DNA^[26]、RNA^[27]、胺基酸 (amino acid)^[28, 29]、蛋白質^[30] 及醣類 (carbohydrates)^[31] 等。毛細管電泳具有高分離效率、樣品需求

量少、分析時間短、高偵測靈敏度、高通量以及易於自動化等優點^[32, 33]，毛細管電泳發展至今大致可分為六大類：毛細管區帶電泳（capillary zone electrophoresis, CZE）^[34]為毛細管電泳中最常使用且最簡單的一種方法、毛細管等電聚焦法（capillary isoelectric focusing, CIEF）^[35]、毛細管等速電泳法（capillary isotachopheresis, CITP）^[36]、毛細管凝膠電泳（capillary gel electrophoresis, CGE）^[37]、毛細管電層析法（capillary electrochromatography, CEC）^[38]及用來分離中性分子和帶電粒子的微胞電動力層析法（micellar electrokinetic chromatography, MEKC）^[39]等方法。隨著科技日漸發展，科學家也將電泳技術應用於微晶片上，利用蝕刻在微晶片上形成小型通道（channel）^[40, 41]，其優點有分析時間短、樣品消耗量少以及具有高通量等，並朝著可在單一晶片上完成樣品前處理、分離及偵測等步驟來發展，亦即實驗室晶片（lab-on-a-chip）^[42]。

1.1.1 分離原理

1.1.1.1 淌度（mobility）

毛細管電泳分離的原理是利用不同物質在施加電場時會因為遷移速率不同而達到分離，帶電粒子在電場中會以一個速度（ v_{ep} ）前進，而且與電場強度（ E ）成正比，其關係式為：

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

μ_{ep} 為電泳淌度 (mobility)，為單位電場下粒子的電泳遷移速度。當施加一電場時，帶電粒子因庫倫作用力 (F) 而加速移動^[27]，其庫倫作用力會與有效電荷 (q) 和電場強度 (E) 成正比，其關係式為：

$$F = q E \quad (1-2)$$

帶電粒子在運動過程中會與介質碰撞而產生摩擦力 (f) 造成移動速率變慢，但是當帶電粒子加速到某個程度時，庫倫作用力與摩擦力會達到一個平衡，此時帶電粒子不再做加速運動而變成等速運動。從 Stokes 定律中，假設帶電粒子為剛性球體，當受到摩擦力時，其關係式為：

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

f 為剛性球體的動摩擦係數， η 為緩衝溶液黏度，而 r 為粒子半徑。當帶電粒子作等速運動時，其庫倫作用力與摩擦力相等，其關係式為：

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

由以上公式代入方程式 (1-1) 可得：

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1-5)$$

以上公式可以說明電泳淌度與有效電荷成正比關係，並且與粒子半徑成反比關係。因此可得知電泳淌度會受粒子電荷及半徑影響。

1.1.1.2 電滲流 (electrosmotic flow, EOF)

電滲流為毛細管電泳中驅動力的其中一種，因毛細管的主要材質

為融熔矽 (fused silica)，毛細管中溶液的離子在電場作用下移動而產生電滲流，當電解質溶液 pH 值大於 3.0 時，管壁的矽醇基 (SiOH) 會解離變成矽醇陰離子 (SiO⁻)，使得管壁帶負電荷，當溶液中陽離子通過毛細管時會被 SiO⁻ 吸引，而在毛細管內壁產生雙電層 (electrical double layer)。被 SiO⁻ 所吸引的陽離子為固定層 (stern layer)，固定層外則是擴散層 (diffusion layer)，如圖 1-1 所示。當施加正電壓時，擴散層中的陽離子會受到庫倫吸引力而往負極移動，此作用力會帶動溶液中的整體溶液 (bulk solution) 一起往負極移動而產生電滲流。毛細管內固定層與擴散層的電荷分布不均勻，導致整體溶液與電雙層之間產生一電位差，稱之為 ζ 電位 (zeta potential)。其關係式為^[43]：

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \quad (1-6)$$

δ 為電雙層之厚度，e 為單位面積之總電荷，而 ε 為緩衝溶液之介電常數。電滲流與 ζ 電位，其關係式為：

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (1-7)$$

μ_{eo} 為電滲流之遷移速率，η 為緩衝溶液之黏度。由此公式可看出，電滲流之遷移速率與 ζ 電位和緩衝溶液之介電常數 (ε) 成正比關係，並與緩衝溶液之黏度成反比關係。而 ζ 電位的大小與毛細管內壁矽醇基的解離程度有關，假設毛細管內壁的矽醇基解離愈多，就會吸引愈多的正離子，形成的電雙層厚度也會愈厚，ζ 電位也會變大，使電滲流之遷

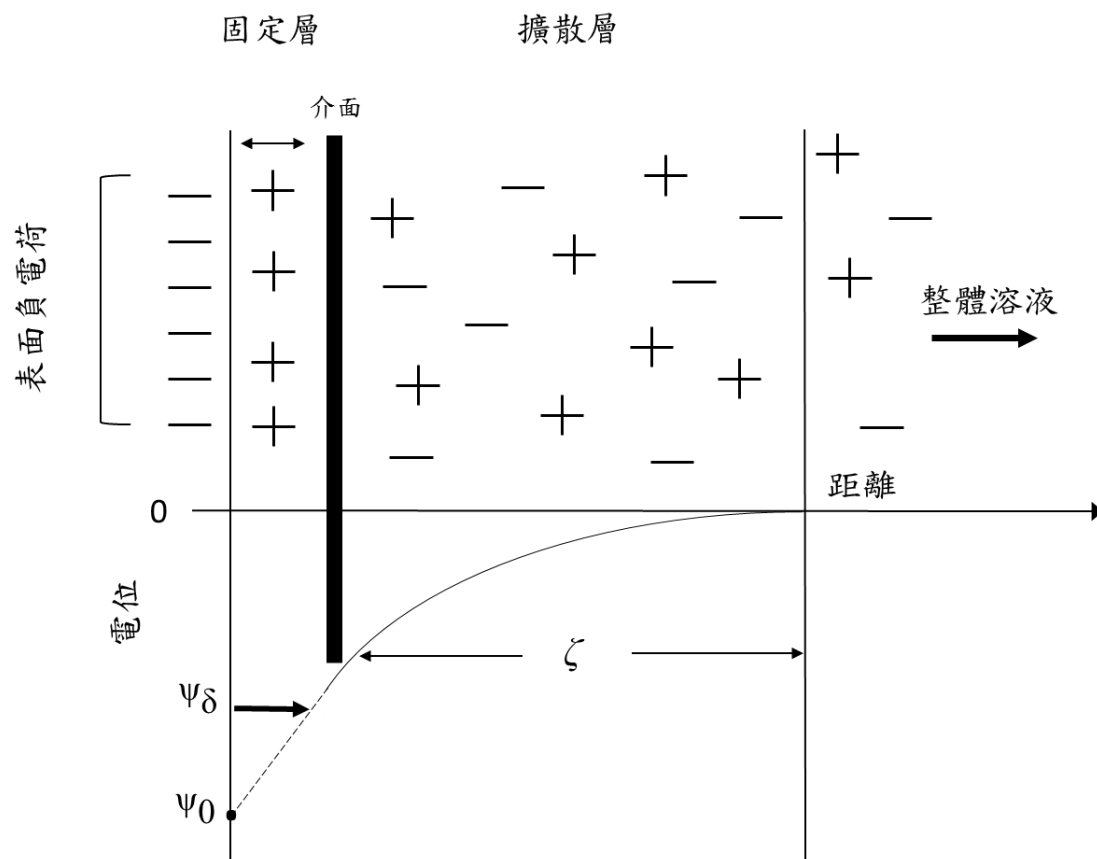


圖 1-1 電雙層的結構及 ζ 電位

移速率變快了。緩衝溶液的組成也與電滲流之遷移速率有關，包括緩衝溶液之 pH 值、離子強度、種類及添加物。緩衝溶液之 pH 值大於 3.0 時，電滲流值也會明顯增加，且隨著 pH 增加而變大，直到 pH 值大於 8.0 時，電滲流才會趨於一個定值。而緩衝溶液的離子強度也是影響電滲流的因素之一，當離子強度增強時，毛細管壁上所吸附的陽離子會與溶液中陽離子的數目相近，使電雙層變緊密， ζ 電位變小，相對的電滲流也會變小，另外改變溫度或將毛細管內壁進行改質也會影響電滲流之大小^[44]。電滲流是因擴散層中對離子受電場影響而產生移動，不需要在毛細管壁施予額外的壓力，所以理論上毛細管內壁的每一個地方的流速幾乎相同，如圖 1-2 所示，導致毛細管內壁的溶液形狀趨近於一平面。其他管柱層析法，管柱中的動相是利用幫浦產生壓力來推動，受到溶液與管壁間的摩擦力及剪切力的影響而產生層流 (laminar flow)，使管柱中的溶液形狀呈現拋物狀。層流會使得樣品注入後區帶分散，造成解析度下降，所以具有電滲流之毛細管不會使樣品區帶變寬，其理論板數也提升到數百萬以上。毛細管電泳本身雖具有電滲流的特性，但一般在分析蛋白質或 DNA 時，常常會有樣品吸附於毛細管壁的問題存在，因此通常在進行電泳分析實驗時，會於毛細管壁上塗覆一層聚合物，可減少樣品的吸附^[45, 46]，但在毛細管壁塗覆聚合物的同時其本身的 ζ 電位也消失了，所以通常分析生物樣品時都會在電滲流很小的

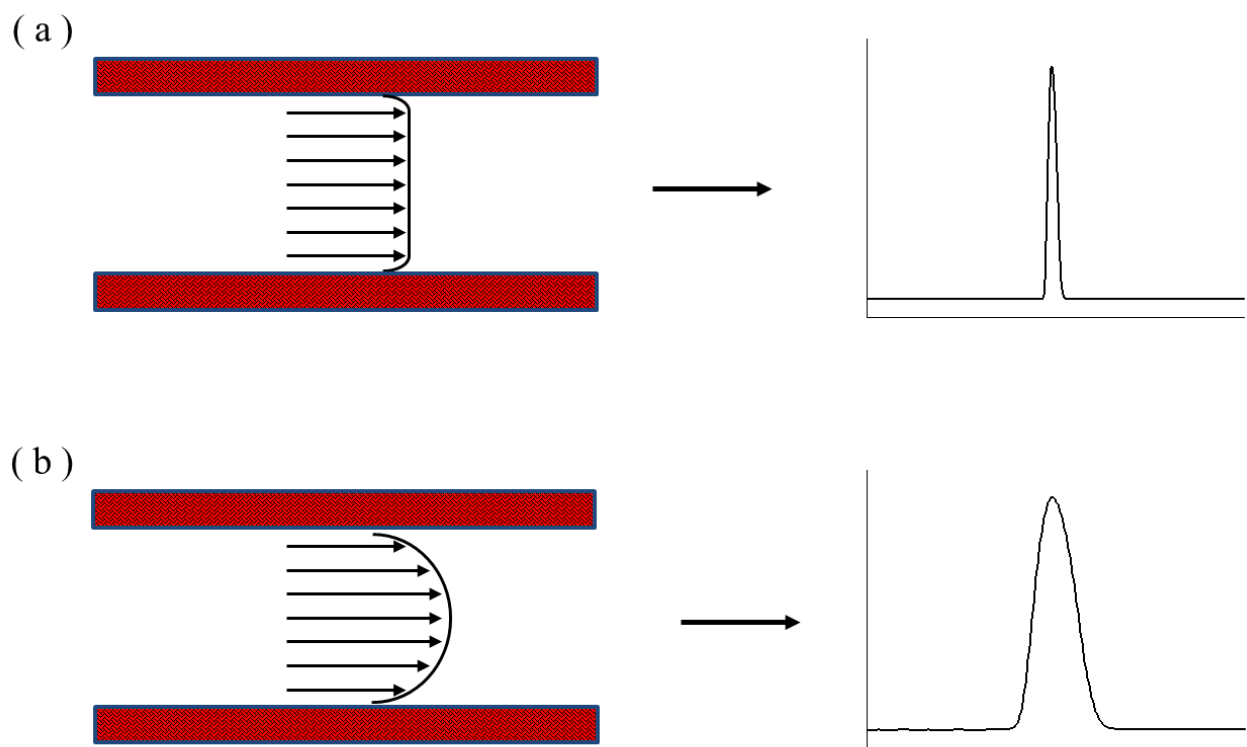


圖 1-2 (a) 電滲流及 (b) 層流之比較圖

情況下進行，生物分子的遷移是利用本身的電荷受到電場影響而移動。

1.1.1.3 DNA 於毛細管凝膠電泳中之分離機制

毛細管凝膠電泳因具有高解析度及所需樣品少等優點，近年來已成功地應用於分析 DNA。其中影響分析 DNA 的實驗參數包括：凝膠介質、毛細管表面、溫度、電場強度、進樣及偵測系統等。DNA 在自由溶液下會以隨機盤繞的方式存在，但當受到電場的影響時會展開成長鏈狀，使得 DNA 長鏈的每一處都會接觸到溶液，而 DNA 分子中鹼基對 (base pair) 之數目 (N) 會與摩擦力成正比，其關係式為：

$$f \propto N \quad (1-8)$$

且 DNA 分子中的磷酸根之負電荷 (Q) 也會與鹼基對之數目成正比，其關係式為：

$$Q \propto N \quad (1-9)$$

所以在自由溶液中的 DNA 之淌度為一定值^[47]：

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Q}{f} \propto \frac{N}{N} = \text{constant} \quad (1-10)$$

由以上推論可得知 DNA 在自由溶液下是無法進行分離的，到目前為止 DNA 分離皆著重在凝膠的選擇，凝膠具有非傳導性的介質，減低樣品於毛細管中擴散導致區帶變寬的現象，且凝膠具有網狀結構之特性可

對 DNA 進行篩分的動作進而分離，不同長度 DNA 分子利用通過網狀結構困難程度不同而得到不同淌度，達到分離的效果。長度較短之 DNA 容易通過凝膠孔隙中，所以分離時間短，相對的長度較長之 DNA 則分離時間較長。

凝膠為聚合物是以單體的形式存在，當聚合物分子在濃度低時，分子間碰撞機率較低彼此之間也較難產生任何作用，聚合物溶液的黏度也較低，當濃度增加至某一程度時，分子間碰撞機率增加了，彼此之間作用產生糾結，則會開始形成網狀結構，當聚合物的濃度超過糾結界限（entangled limit）時網狀結構就會形成孔隙。糾結界限的定義是假設每個聚合物分子的體積都相同時，所有聚合物所佔的總體積與溶液體積相同時的濃度。可表示為：

$$\phi^* \approx \frac{3 M_w}{4 \pi N_A R_g^3} \quad (1-11)$$

或

$$\phi^* \propto N^{-0.8} \quad (1-12)$$

ϕ^* 為糾結界限， M_w 為聚合物分子量， N_A 為亞佛加厥常數， R_g 為聚合物分子的迴旋半徑（radius of gyration），而 N 為聚合物分子所含的單體數目。但因為聚合物的分子量不是定值而是以平均分子量表示，所以如果要得知其實際的糾結界限必須透過實驗才能得知^[48]。

凝膠為一分離介質，是利用凝膠之網狀結構所形成的孔隙（mesh）

來篩分分析物進而達到分離效果，當聚合物濃度高於糾結界限時就會形成網狀結構，而網狀結構之孔隙大小與聚合物濃度有關，其關係式為：

$$\xi = R_g \left(\frac{C}{\phi^*} \right)^{-0.75} \quad (1-13)$$

$$\xi \propto a \phi^{*0.75} \quad (1-14)$$

ξ 為孔隙大小， C 為聚合物濃度，而 a 為常數^[49]，不同聚合物溶液可得不同的值。由以上公式可得知凝膠的孔隙大小與聚合物的濃度及特性有關，而聚合物單體濃度越高形成的孔隙就越小。

毛細管凝膠電泳可以有效的分離 DNA 分子，研究者探討生物分子在凝膠網狀結構中的遷移行為上，從早期的 Ogston 模型(Ogston model)^[50]及爬行模型 (reptation model)^[51]。這兩種模型可以解釋 DNA 於毛細管凝膠電泳中的分離機制。Ogston 模型適合用來解釋小片段的 DNA 分子 (< 3000 bp) 之遷移，但前提必須先假設 DNA 分子為剛性球體，並利用較小片段之 DNA 分子能通過網狀結構中大孔隙之理論，使小片段之 DNA 分子能被篩分出來，而大片段之 DNA 分子則沒辦法通過，其 DNA 之淌度關係式為：

$$\mu = \mu^* P \quad (1-15)$$

μ^* 為 DNA 在自由溶液下之淌度， P 為 DNA 分子小於網狀結構之孔隙的機率。

P 可表示為：

$$P = \exp [-KC (r + R_g)^2] \quad (1-16)$$

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 分子為剛性球體時的半徑，結合了上述兩公式，其 DNA 之淌度關係式為：

$$\mu = \mu^* \exp [-KC (r + R_g)^2] \quad (1-17)$$

爬行模型適合用來解釋大片段之 DNA 分子，當 DNA 剛性球體的直徑大於網狀結構之孔隙時，DNA 會以隨機變形的長鏈分子的形式存在，並以蛇行方式通過聚合物往前移動，所以 DNA 的移動不會受限於孔隙的大小，此時 DNA 之淌度與 DNA 分子大小其關係式為：

$$\mu \propto \frac{N}{N^2} = \frac{1}{N} \quad (1-18)$$

以上兩種模式一開始皆建立於平板凝膠電泳上，因毛細管凝膠電泳是在高電壓下進行實驗的，所以必須考慮 DNA 的構型會受到電場而改變。另外毛細管內的線性聚合物，形成之網狀結構可能會隨著時間而改變，並非永久性的 (permanent)，所以若要深入探討 DNA 分子於毛細管凝膠電泳之分離機制則必須考慮電場強度及聚合物溶液之網狀結構這兩個問題，目前 DNA 分子於聚合物溶液中之分離機制都以上述兩個模型作解釋，但實際上詳細的分離機制到目前為止已經有許多學者致力於研究膠體相關之力學，期望未來學者們可以利用更精確的儀器及電腦

模擬分析才能有較完整之分離機制的理論出現。

1.1.1.4 流動式毛細管凝膠電泳

到目前為止，使用毛細管凝膠電泳分離 DNA 片段，為了避免電滲流會隨時間而改變，以及 DNA 分子和聚合物溶液易吸附於毛細管壁，而造成再現性不佳。所以實驗前必須先進行毛細管壁的塗覆，抑制電滲流產生，因此過去在分離 DNA 片段時，皆是在無電滲流情況下進行。但由於經過塗覆的毛細管生命期較短、製備昂貴及塗覆的聚合物容易隨時間改變，所以過去已有許多研究者開發多種在電滲流存在下分離 DNA 片段的技術^[52, 53]，先把樣品注入到充滿高濃度聚合物之 TB (tris-borate) 緩衝液中，並直接將電滲流引入毛細管中，因為 DNA 分子在系統中的移動方向與電滲流反向，且較大片段之 DNA 在聚合物溶液中的淌度較小，所以大片段之 DNA 會先被偵測到，DNA 於毛細管凝膠電泳在電滲流存在下的分離過程，如圖 1-3 所示。進行實驗的聚合物溶液包括纖維素衍生物 (cellulose derivatives)、聚環氧乙烷、聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 會在毛細管壁進行動力學之塗覆 (dynamic coating)，因此減少 DNA 分子毛細管壁之作用，電滲流也隨著時間而減少^[54, 55]。為了使得實驗的再現性佳，於每次實驗完後，以 0.5 M 的氫氧化鈉溶液在 1 kV 電壓下清洗毛細管壁，並持續 10 分鐘

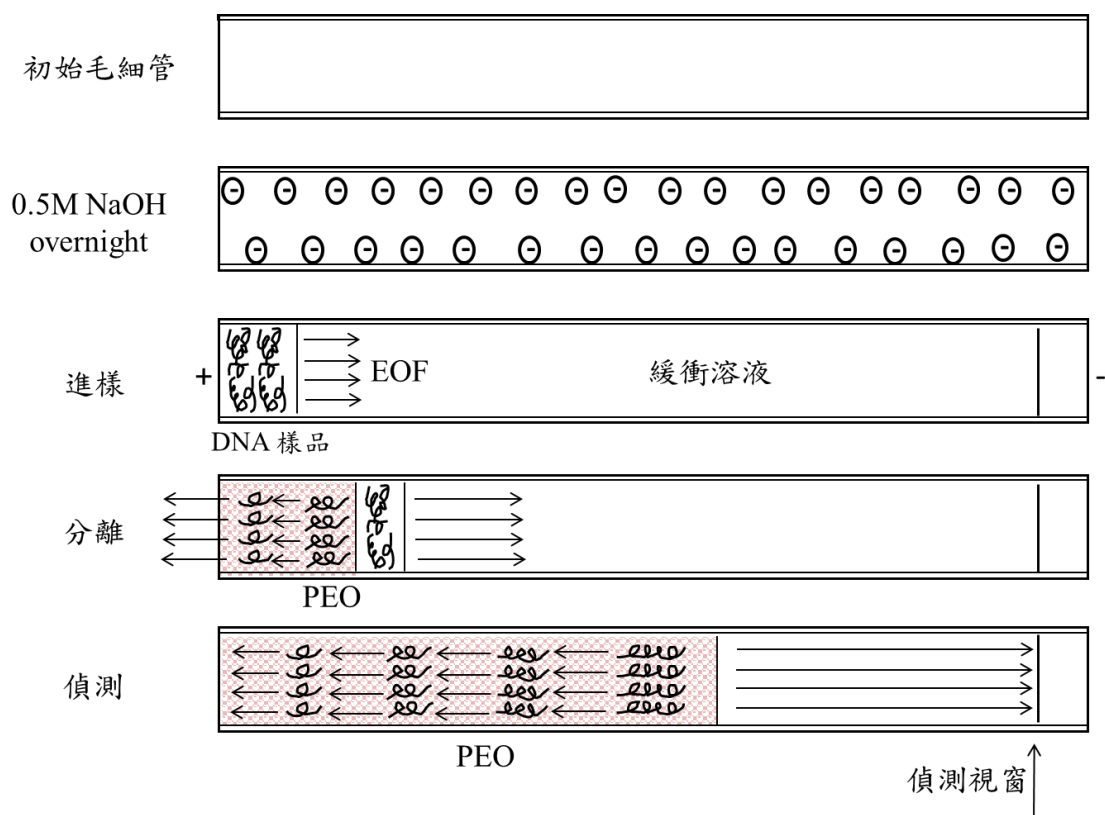


圖 1-3 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離 DNA 片段之示意圖

使毛細管壁再次充滿負電荷。過去已有學者在電滲流存在下以毛細管區帶電泳方法成功地分析大體積 DNA 分子量標準液 (DNA markers) 及聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 產物^[56]。

1.1.1.5 樣品注射方式

在毛細管電泳中最常使用之樣品導入方法為壓力進樣 (hydrostatically)、虹吸進樣 (siphoning) 及電動進樣 (electrokinetically)。壓力進樣為在樣品端施加壓力或是末端抽真空 (pump)，將樣品引入毛細管中，此方法缺點為較不方便使用；虹吸進樣是將樣品放置於一高度，利用重力差方式，驅使樣品溶液進入毛細管中。壓力及虹吸進樣之優點為不會受到離子之移動力使進樣總量改變；電動進樣，樣品導入是將毛細管末端與其電極一起放置於樣品中，對其施加電場藉由離子移動與電滲流兩現象，促使樣品進入毛細管中。最後再將毛細管末端及電極放回緩衝溶液中，即可進行分離。電動進樣之優點為注射之體積量較多。一般而言虹吸進樣，使用 75 μL 內徑的毛細管，維持 5 公分高度差進樣 10 秒時，進樣總量大約為 6 nL；電動進樣，注射之體積量大約為 5 至 50 nL。

1.1.1.6 偵測系統

毛細管電泳之偵測系統有許多種類，包括紫外光-可見光吸收 (ultraviolet-visible absorption) [57]、螢光 (fluorescence) 放射法[58]及質譜儀 (mass spectroscopy, MS) [59, 60]。而螢光放射法又可以分為傳統光源激發螢光及雷射誘發螢光，其中以雷射誘發螢光 (laser-induced fluorescence, LIF) 偵測器的靈敏度最高。雷射可輕易聚焦至微米 (micrometer) 大小的直徑，可減少訊號峰因偵測器造成的譜帶變寬。已有文獻發表利用雷射誘發螢光的偵測極限可達 50 yoctomoles (1 yoctomole = 1 ymol = 1×10^{-24} M) [60]，且此系統可應用於偵測單分子及單細胞[61, 62]。

雷射波長的選擇也極為重要，一般都使用氦氖雷射(He-Ne laser)、氬離子雷射 (argon ion laser)、固態雷射 (solid-state laser) 及紅寶石雷射 (Nd:YAG laser)，以上這些都可作為毛細管電泳之激發光源[63-67]，由於生物分子大部分都不具有螢光，所以生物分子必須使用染料進行衍生化或者將染料加入至緩衝溶液中快速 DNA 嵌合[68]後才能進行分析，到目前為止毛細管電泳結合了雷射誘發螢光偵測系統廣泛地被應用於 DNA 定序[69]及基因突變[70]等研究。

1.1.1.7 線上濃縮技術

線上濃縮技術 (on-line concentration) 於 1979 年由 Mikkers 在實驗過程中發現樣品堆積 (sample stacking) 的現象^[71]，當提高分析物注射的時間時，樣品區帶亦會隨著增加。其原理為樣品溶液與緩衝溶液之間的導電度不同，產生的電場強度也不同，使分析物在此兩種環境中的遷移速度有所改變，造成樣品區帶堆積，並稱此方法為樣品堆積技術。於 1989 年 Chien 和 Burgi 等人進一步研究樣品堆積，才成為毛細管電泳線上濃縮的重要技術之一^[72-74]。學者亦成功開發了在電滲流存在下，使用聚環氧乙烷溶液分離 DNA，並進行線上濃縮技術^[52, 53, 75, 76]。樣品進樣最高注入量約為 5 μL ，利用此技術可降低偵測極限及提高靈敏度。於具有電滲流的系統下，電滲流的方向與 DNA 剛好為反向，當施加電場時樣品會開始移動進入聚合物溶液中，受到高濃度的聚合物溶液阻擋，樣品具有堆積作用。且線上濃縮技術與篩分樣品同時進行的，與聚合物溶液的黏度有關，實驗過程若先推入一段較低聚合物之後再推入一段較高濃度的聚合物時，也會產生第二次堆積的效果。

1.1.2 毛細管電泳之應用

毛細管電泳具有高解析度、高靈敏度、樣品需求量少、分析時間短及易於自動化等優點。到目前為止，毛細管電泳在許多領域中都已作為主要的分析工具包括分析化學、臨床化學、生物化學及有機化學等等。尤其在近幾年，在生物學中廣泛的被應用於短序列重複 (short tandem repeats, STRs) 的偵測及分析上^[77, 78]。而其他應用包括植物或病毒 DNA 的基因突變偵測^[79]、定量聚合酶連鎖反應產物^[80]、單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)^[81, 82]、粒腺體 DNA 定序及 Y 染色體^[83]，並於 DNA 定序中發現不同個體間的序列幾乎都只有改變單一核苷酸，且已知 SNPs 可能與疾病的表現有關，其單一核苷酸之微小差異已成為日後研究的目標。

1.1.2.1 毛細管電泳於 DNA 之相關應用

毛細管電泳暨雷射誘發原生螢光 (laser-induced native fluorescence, LINF)^[84]，主要分析 DNA 所使用的激發光源為可見波長範圍的氬氫雷射 (543.5 nm) 及氬離子雷射 (488 nm)。DNA 分子與發光團產生共價鍵結或是與螢光團嵌合 (intercalated) 產生 DNA 錯合物。常用於與 DNA 產生共價鍵結的發光團為玫瑰紅 (rhodamine) 或是螢光黃 (fluorescein)；與螢光團嵌合產生 DNA 錯合物的螢光團為溴化乙錠

(ethidium bromide, EtBr)、TOTO1 以及 YOYO1 等等。當螢光團嵌合到 DNA 雙股螺旋結構中時，受到 DNA 結構的影響，使得染料變得較剛性。使用雷射激發後，便會產生較強的螢光訊號，因此可得到較好的 S/N 值，使得與螢光團嵌合的 DNA 錯合物的偵測極限可降至 zeptomole (10^{-21} M) [85]。

DNA 定序 (sequencing)，已成為可信度最高的 DNA 檢測方法，其應用最廣泛的是以 Sanger 法為基礎的定序分析儀，定序過程中需經 PCR 反應。PCR 過程中的組成物包括：專一性的引子、DNA、DNA 聚合酶、dNTP 及 ddNTP，進行反應時，分成四管，每管都含有 ddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP 及其他三種的 dNTP。與一般 PCR 不同的地方在於多添加 ddNTP，由於 ddNTP 與 dNTP 相較下 ddNTP 少了一個氧原子，所以 PCR 反應接到 ddNTP 時，便不能在接下一個 dNTP 上的磷酸根，而使反應終止。利用其方法，當一試管中若含有 ddATP 時，聚合酶反應進行到 template DNA 的鹼基 T 時，ddATP 會與鹼基 T 以氫鍵方式結合並終止聚合反應，所以 template DNA 含有多少個 T，則此試管就會有幾個以 A 結尾不同長度的 DNA 片段，其他試管其原理也相同，最後再利用平板凝膠電泳分離四個試管中的 PCR 產物，依照片段大小即可知道 template DNA 的序列。但由於每做一次定序就必須在四個試管下進行，不僅耗時也耗成本，因此使用毛細管凝膠電泳作為基因定

序之方法已被開發出來。其優點為可在同一試管中進行 PCR 反應^[86]，將引子標幟上四種不同波長的染料或四種 ddNTP，並以分光裝置將螢光訊號分散至四個偵測器，最後藉由軟體分析及收集數據。後來發展自動化的毛細管陣列 (array) 電泳，因為具有分析快速、解析度高及高通量等優點，使得基因體計畫提前於 2000 年完成人類基因的定序草圖。近年來研究 DNA 之文獻也相當多，Fogarty 等人使用共焦螢光光譜儀結合連續流動毛細管電泳 (two-beam fluorescence cross-correlation spectroscopy coupled with continuous flow capillary electrophoresis, 2bFCCS-CFCE) 偵測單股 DNA 5'-R6G-polyT₄₀，是利用不同電場強度及鎂離子濃度增加而影響單股 DNA 的結構變化，再經由簡單計算得知其有效電荷^[87]；Wan 等人則是利用 PEO-PPO-PEO 的共聚物作為分離 DNA 的篩分介質，因共聚物有週期性的疏水及親水區域，成功地在此共聚物所形成的 2-D 六面堆積圓柱網狀結構中分離雙股 DNA^[88]；Meagher 等人使用 end-labeled free solution electrophoresis (ELFSE)，並設計及合成 127 胺基酸長度的蛋白質聚合物，成功完成 180 個鹼基的定序^[89]；Jiang 及 Ma 利用修飾過之核苷作為癌症篩選的生物指標，成功地在 10 分鐘內以毛細管電泳分離 10 種核苷，且線性範圍佳^[90]；Wang 等人利用抗體偵測 DNA 甲基化 (methylation) 程度，而不使用消化 (digestion) 作用、重亞硫酸鹽轉換 (bisulfite conversion) 或進行

PCR 放大等步驟，偵測極限最低可達 0.3 nM，且線性範圍在 10 nM~10 μ M^[91]；吾師 Chang 則是利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光組合重亞硫酸鹽限制分析法 (combined bisulfite restriction analysis, COBRA)，偵測 DNA 甲基化的異質性 (heterogeneity)，達到快速、簡易及符合經濟效益之分析方法^[82]。

1.1.2.2 基因突變之偵測

基因突變其定義為細胞中的 DNA 發生了改變，包括單一鹼基對的改變所引起的點突變或多個鹼基對缺失、重複及插入。人類基因體中，每個個體之間的差異大部分都為 SNPs。基因突變之檢測在基因遺傳疾病上及腫瘤學上有密切的關聯性，其中又以 DNA 定序法被視為黃金級的標準實驗 (gold standard)^[92]，但要在一般臨床診斷室裡設有定序儀作為基因突變檢測之工具，明顯的經濟效益太低，所以發展快速、精確及具經濟的基因突變檢測方法，已成為現今最熱門的研究主題之一。

在基因突變的方法中，依據實驗目的和功能不同，大致可分為篩選及偵測兩大類。篩選法具有較快速及經濟等優點，用於檢測於未知樣品中是否發生基因突變，非常適合在大規模的 SNPs 檢測上，但缺點為無法分析出實際突變的鹼基。此類篩選法包括：單股構型多形性

(single-strand conformation polymorphism, SSCP)^[93-95]、異股多形性檢測 (heteroduplex polymorphism analysis, HPA)^[96]、溫度梯度毛細管電泳 (temperature-gradient capillary electrophoresis, TGCE)^[97, 98]及錯位酵素切割 (enzymatic cleavage of mismatches, EMC)^[99]等方法。SSCP 是利用 PCR 產物加熱至 94°C 5 分鐘使其雙股螺旋打開，再迅速放在冰上冷卻形成單股 DNA，並於低溫環境下進行電泳將單股 DNA 分離開。若有基因突變發生，單股 DNA 之構形會改變而影響其在電泳中的淌度，造成與正常 DNA 之電泳圖有所差異，即可得知 DNA 是否有鹼基的改變。HPA 是利用 PCR 放大後的 DNA 產物，其同股與異股之間構形不同及 GC 鹼基數量的差異在電泳中產生不同的淌度，適合用於檢測大片段的 DNA 突變。TGCE 則是利用 HPA 經加熱變性後，在緩慢降溫時，正常與突變的 DNA 發生雜合形成異源雙鏈核酸分子(heteroduplex)，因 heteroduplex 之間的鹼基對並不完全互補，因此在 TGCE 中進行分離時，會因熔點溫度 (melting temperature, T_m) 不同，在不同溫度下打開雙股 DNA，因淌度不同而達到分離效果，適用於 SNPs 的篩選。到目前為止，還是以 SSCP 作為主要的基因突變篩檢，除了篩檢 SNPs，學者也將毛細管電泳結合 SSCP 應用於鑑定綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 16S rRNA 基因^[100]、血型偵測^[101]及家族性高膽固醇血症^[102]等。

偵測突變的技術包括：DNA 定序法、對偶基因特定寡核苷酸雜交法 (allele-specific oligonucleotide hybridization) ^[103]、接合酶連鎖反應 (ligation chain reaction) ^[104]、單核苷酸引子延伸 (single-nucleotide primer extension, SNuPE) ^[105]及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) ^[106]等技術。對偶基因特定寡核苷酸可與微陣列晶片結合，於晶片上同時點上許多寡核苷酸進行 DNA 雜合反應，能夠一次偵測多種基因突變，但因微陣列晶片製作不易且判讀困難，所以無法普遍用於一般的臨床實驗中。PCR-RFLP 此法先用特定的引子進行聚合酶連鎖反應，再用具專一性的限制酶 (restriction enzyme) 切割特定 DNA 序列，會與無法被切割的 DNA 序列長度上有所差異，進而使用毛細管電泳進行分離及鑑定^[107, 108]，因其方法具有較高靈敏度及專一性，在台灣有許多分子實驗室都以這種實驗方法偵測基因突變。

然而上述的分析方法還是有缺點存在，例如：試劑昂貴及製備過程繁瑣等，所以無法適用於大規模的篩選上。因此發展精確、快速、低成本的檢測方法，成為現今許多科學家共同研究的目標。

1.2 核糖核酸 (ribonucleic acid) 之簡介

1.2.1 緒論

核糖核酸 (RNA) 是由核苷酸 (nucleotides, nt) 單元長鏈組成，每個核苷酸單元含有含氮的鹼基 (base)、五碳糖及磷酸根。RNA 的鹼基主要有四種，包含腺嘌呤 (Adenine, A)、鳥嘌呤 (Guanine, G)、胞嘧啶 (Cytosine, C) 及尿嘧啶 (Uracil, U) ^[109]。藉由四個鹼基排列組合可以形成一連串的序列。而與去氧核糖核酸 (DNA) 不同的是，RNA 為單股分子，但在水溶液中單股 RNA 會與互補的區域自行雜合成二級結構及三級結構^[110]。DNA 的鹼基大部分與 RNA 相同，不過其中尿嘧啶 (U) 在配對上的作用，相當於 DNA 中的胸腺嘧啶 (Thymine, T)，在 DNA 中 A 與 T 以兩個氫鍵鍵結，G 與 C 以三個氫鍵鍵結，而 RNA 中沒有 T 所以 DNA 上的 A，在轉錄 (transcription) mRNA 即為 U^[111]。RNA 序列包含著基因遺傳訊息能合成蛋白質^[112]，在細胞中根據結構及功能不同，RNA 主要可分為三類包括傳遞核糖核酸 (transfer RNA, tRNA)、核糖體核糖核酸 (ribosomal RNA, rRNA) 及訊息核糖核酸 (messenger RNA, mRNA)。mRNA 藉由轉錄作用將 DNA 的遺傳訊息紀錄下來，轉錄作用指的是將 DNA 的雙股打開，使 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 可依照 DNA 上的鹼基序列合成相對應的 mRNA 的過程，須進行轉錄作用才能將 mRNA 密碼子離

開細胞核進入細胞質，讓核糖體進一步的利用 mRNA 轉譯 (translation)，合成所需的蛋白質，如圖 1-4 所示。DNA 經由轉錄轉譯過程得到所需蛋白質，因此 mRNA 的表現量也就相當程度上代表蛋白質的表現。mRNA 後轉錄調控錯誤時會造成人類疾病的發生；tRNA 會攜帶胺基酸到核糖體上^[113]；rRNA 是組成核糖體(ribosome)的部分，並參與蛋白質的合成。RNA 分子兼具了生物基因型及表現型，mRNA 與 tRNA 分別以三個鹼基為一組的序列作為密碼子 (codon) 及反密碼子 (anticodon)^[114]的配對，包含起動合成、胺基酸種類及終止合成等指令。RNA 的轉譯過程是由啟動密碼子(start codon) 開始進行反應，核糖體沿著 mRNA 的序列行進且相對應的密碼子將相對應的胺基酸連接起來，最後由終止密碼子(stop codon) 終止反應，即完成蛋白質合成。

細胞中還有許多不同種類及功能的小型 RNA，如組成剪接體 (spliceosome) 的核內小核糖核酸 (small nuclear RNA, snRNA)、負責 rRNA 成型的小核仁核糖核酸 (small nucleolar RNAs, snoRNAs) 及核糖核酸干擾 (RNA interference, RNAi) 作用的微小核糖核酸 (micro RNA, miRNA)^[115]及反義 RNA (antisense RNA)^[116, 117]等，可以抑制體內基因的表現，並將 miRNA、snoRNAs、antisense RNA

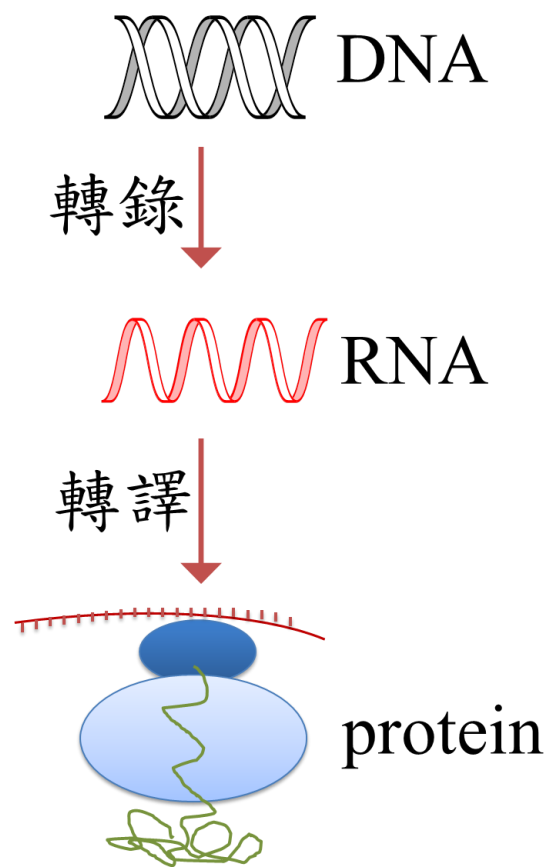


圖 1-4 DNA 轉錄轉譯之示意圖

及 piRNA(piwi-interacting RNA), 稱作非轉譯核糖核酸(noncoding RNA)^[118], 即所謂的 DNA 轉錄 RNA 卻不會轉譯成蛋白質的 RNA 序列, 亦可稱為核糖核酸干擾 (RNA interference), 可調控 mRNA 使生物達到個體發育、細胞分化^[119]、細胞增生^[120]、細胞死亡^[121]、激素分泌^[122]及腫瘤生成^[123]等等。

1.2.2 核糖核酸歷史

在 1869 年 Miescher Friedrich 藉由分離遺傳物質發現核苷酸^[109], 早期化學家及生物學家並不清楚 DNA 與 RNA 之間的差異, 直到學者分析核苷 (nucleoside) 的組成, 才能利用五碳糖結構及鹼基組成分類出 DNA 與 RNA。1958 年 Francis Crick 提出了分子生物學的中心教條 (central dogma of molecular biology), DNA 藉由轉錄生成 RNA, RNA 在轉譯中能使蛋白質生成^[124]。另外也有實驗提供一個較明確的證據解釋從胺基酸到蛋白質之間過程。此實驗是對老鼠的肝臟分析, 發現 RNA 能夠與胺基酸及 rRNA 結合來幫助蛋白質生成^[125]。於 1958 年由 Holley 等人從酵母上定出 77 核苷酸長的丙胺酸 tRNA (alanine transfer RNA, Ala-tRNA) 序列及結構, 在解釋 mRNA 轉譯成蛋白質過程中提供重要的關鍵資訊^[126, 127], 並於 1968 年獲得諾貝爾醫學獎。1997 年 Berget 等人發現基因為非連續性, 必須經過 RNA 剪切 (splicing) 的動作, 才能

形成成熟的 mRNA，之後再進行蛋白質生成^[128, 129]。1993 年 Lee 等人發現長度約 22 核苷酸長的短片段 RNA，稱為微小核糖核酸（micro RNAs, miRNAs）^[130]。

1.2.3 傳遞核糖核酸（transfer RNA, tRNA）

tRNA 在蛋白質生成上扮演重要的角色，因為 mRNA 上的三個核苷酸會對應到一個特定胺基酸，而 mRNA 有 tRNA 的幫助才可使得核苷酸與特定胺基酸結合^[131]。tRNA 約 74~95 鹼基長，其 tRNA 雖然為單股 RNA，但會自行雜合形成二級結構^[126]，如圖 1-5 所示，為四葉苜蓿（cloverleaf）的型態及三級結構。從 tRNA 的二級結構中發現其鹼基配對除了一般的 Watson-Crick 鹼基配對之外，還具有其他鹼基配對模式，G 與 U 配對、G 與 Ψ 配對及 A 與 Ψ 配對， Ψ 為 U 分子內碳與氮位置互換而生成，稱這些配對模式為擺動式（wobbling），雖然此配對較不穩定，但形成雙股螺旋（double-helix）之結構，使 tRNA 可維持著二級結構。tRNA 具有兩個很重要特色，包括 3'端可以攜帶一個胺基酸及反密碼子與 mRNA 上的密碼子互補，而 tRNA 之 3'端可攜帶胺基酸是利用鹼基上五碳糖的氫氧鍵會藉由酯鍵（ester bond）與胺基酸鍵結。一般看到的 tRNA 序列都會接上一個胺基酸，稱為氨醯 tRNA（aminoacyl-tRNA），例如：Ala-tRNA、Arg-tRNA 及 Asn-tRNA 等等。

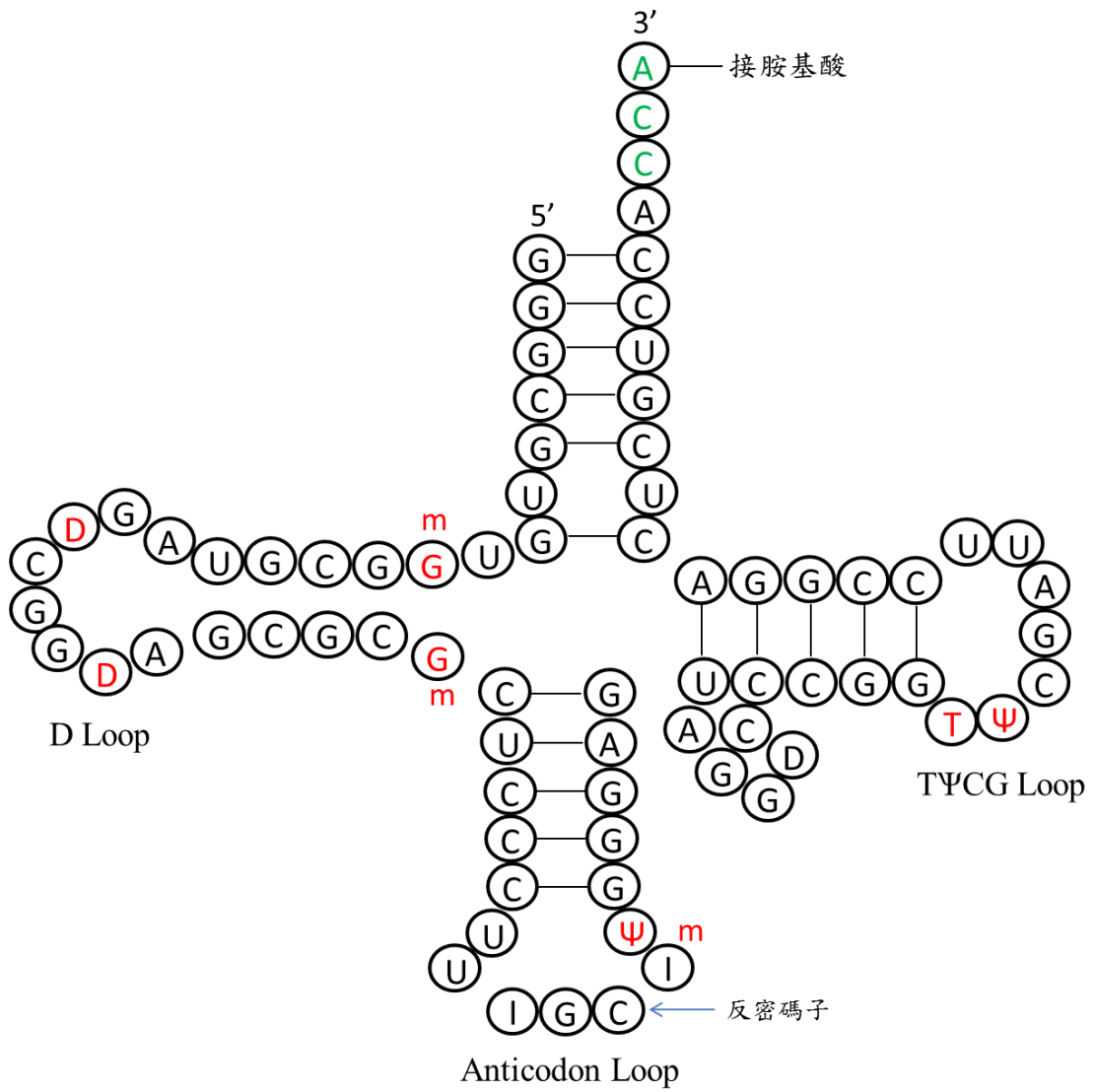


圖 1-5 tRNA 之二級結構示意圖

當 tRNA 接上胺基酸之後，可將胺基酸帶至核糖體進行轉譯作用，再將胺基酸連接起來形成多肽鏈 (poly peptidy chain)。從實驗中可觀察到 tRNA 之專一性，研究發現改變 tRNA 其 3'端之胺基酸，而不改變反密碼子的序列，並不會影響反密碼子與密碼子間的配對，tRNA 之專一性是由反密碼子決定，與 3'端之胺基酸無關。tRNA 扮演著生成蛋白質重要的角色，所以轉譯過程中的精確度相當重要。蛋白質生成的錯誤可能發生於兩個階段，一為 tRNA 和胺基酸相接時受合成酶所影響；二為反密碼子與密碼子配對時由核糖體所調控。當 DNA 序列發生單一鹼基之插入 (insertion) 或是缺失 (deletion) 時，雖然核糖體依舊會與 tRNA 作用，但突變點之後的 DNA 序列完全改變，而生成出完全不同的蛋白質。

1.2.4 訊息核糖核酸 (messenger RNA, mRNA)

成熟之 mRNA 被運送至細胞質中，由核糖體進行轉譯作用生成蛋白質。核糖體沿著 mRNA 將三個核苷酸轉為一個胺基酸，再經由胜肽鍵 (peptide bond) 連接形成多肽鏈。最後經由修飾作用形成具功能性之蛋白質。在不同種類的細胞裡會表現不同的蛋白質並且執行特定的生物功能以維持細胞正常運作。當 mRNA 轉譯成蛋白質時，只有外顯子(exon)才會形成蛋白質，如圖 1-6 所示，而 DNA 上的內含子(intron)

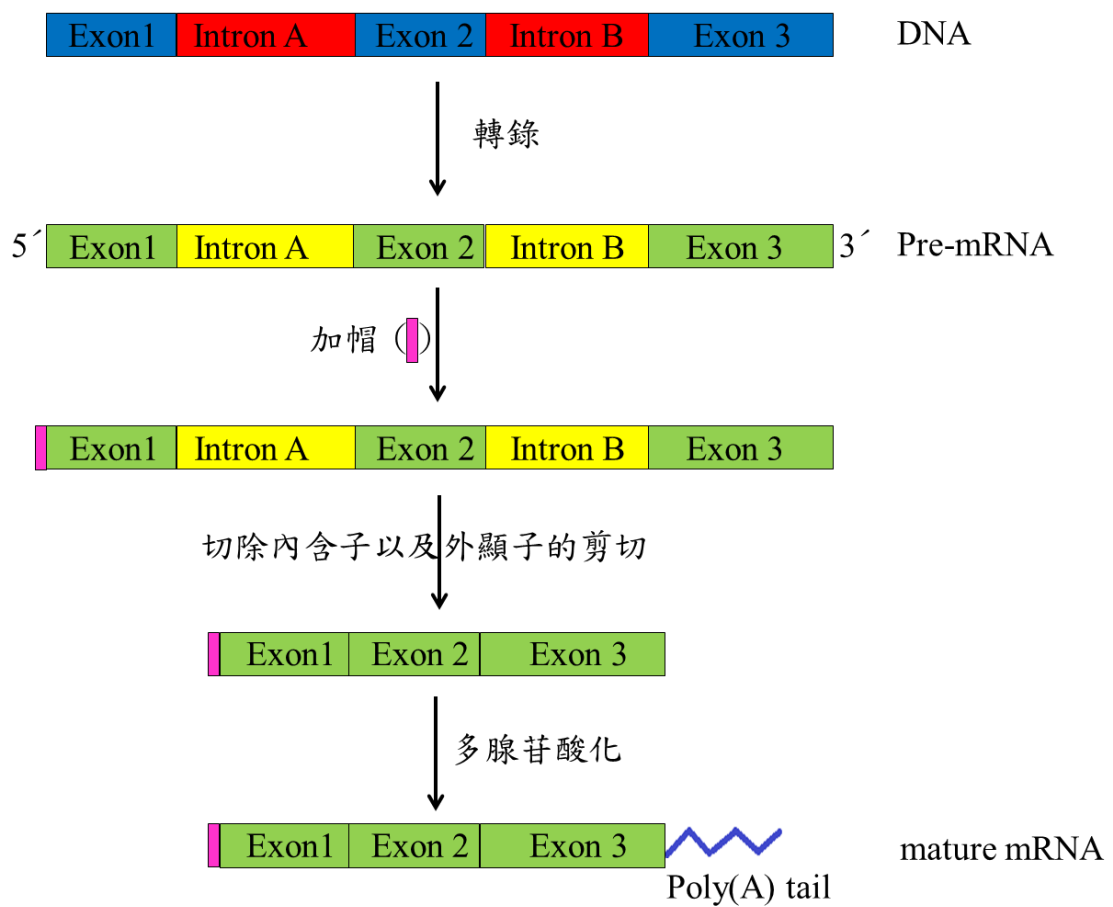


圖 1-6 形成穩定之 mRNA 過程

會被轉錄到前驅 RNA (precursor messenger RNA) 中，但在形成成熟 mRNA (mature mRNA) 之前曾經剪切將內含子切除。於轉錄之後，在 pre-mRNA 5' 端上的三磷酸根接上 7-甲基鳥苷 (7-methylguanosine, m⁷G) 稱為加帽 (capping)。其目的是為了確保成熟 mRNA 轉譯能力，並在剪切之後進行多腺苷酸化 (polyadenylation) 作用使得 mRNA 之 3' 端帶有約兩百個鹼基之聚腺苷酸 (polyadenylic acid 或 poly(A))。聚腺苷酸會與蛋白質黏合，稱為聚腺苷酸黏合蛋白 (poly(A)-binding protein, PABP) [132]，以 10~20 鹼基長黏合於 poly (A) 上，因此 mRNA 3' 端上有 poly (A) 及蛋白質。poly (A) 可保護 mRNA 不被分解且穩定 mRNA，如果沒有 poly (A) 會造成 mRNA 分解，而無法進行轉錄作用，最後成熟之 mRNA 才輸出至細胞質中。

mRNA 之穩定性是受許多成分所影響，到目前為止有兩種成分較常被研究，一為 mRNA 之 3' 端存在有 AU-rich 序列，約 50 個鹼基長的序列，稱為 ARE^[133, 134]，其中有一個序列由五個核苷酸 (AUUUA) 所組成，並在 50 個鹼基長內重複複製。ARE 作用的步驟為 mRNA 3' 端因為有 poly (A) 核糖核酸酶 (ribonuclease) 使 mRNA 被去腺苷酸 (deadenylate)，接著核糖內切酶 (endonuclease) 使其因失去保護而被分解；二為運鐵蛋白 (transferrin) mRNA 上的胰島素反應元素 (insulin response element, IRE) 序列，運鐵蛋白的功能為維持體內中鐵離子濃

度，IRE 可隨著改變體內中鐵離子濃度調控 IRE 與蛋白質 (IRE-binding protein) [135] 之間的作用力大小。當鐵離子濃度較低時，IRE 與蛋白質結合 mRNA 不被分解。

1.2.5 核糖體核糖核酸 (ribosomal RNA, rRNA)

rRNA 為生物細胞中重要的核糖核酸之一，是具有催化功能之核糖酶，單一的 rRNA 存在並無法發揮任何功能，必須與核糖蛋白共同構成核糖體。核糖體主要功能為轉譯工作，並促使蛋白質生成。核糖體帶有具催化活性的 rRNA 骨架，約由 80 個核糖蛋白支撐起來，因此核糖蛋白具有穩定核糖體立體結構之功能。rRNA 亦為單股 RNA，但因本身會自行雜合，所以形成許多雙股區域，其二級結構如圖 1-7 所示 [136]。在真核生物中包含四種沉降係數 (S: svedberg unit)，包括 28S、18S、5.8S 及 5S rRNA。

1.2.6 小分子核糖核酸 (small RNA, sRNA)

sRNA 為長度約 20~30 鹼基長的小片段 RNA 分子，sRNA 大約可分為 siRNA (small-interfering RNA)、miRNA 及 piRNA。siRNA 為長度約 20~25 鹼基長的雙股 RNA，siRNA 主要參與 RNA 干擾現象，且具有專一性的方式調節基因的表達。Thomas 等人於 2001 年發現合成的 siRNA，可誘導哺乳動物體內的 RNAi 作用。miRNA 為長度約 22

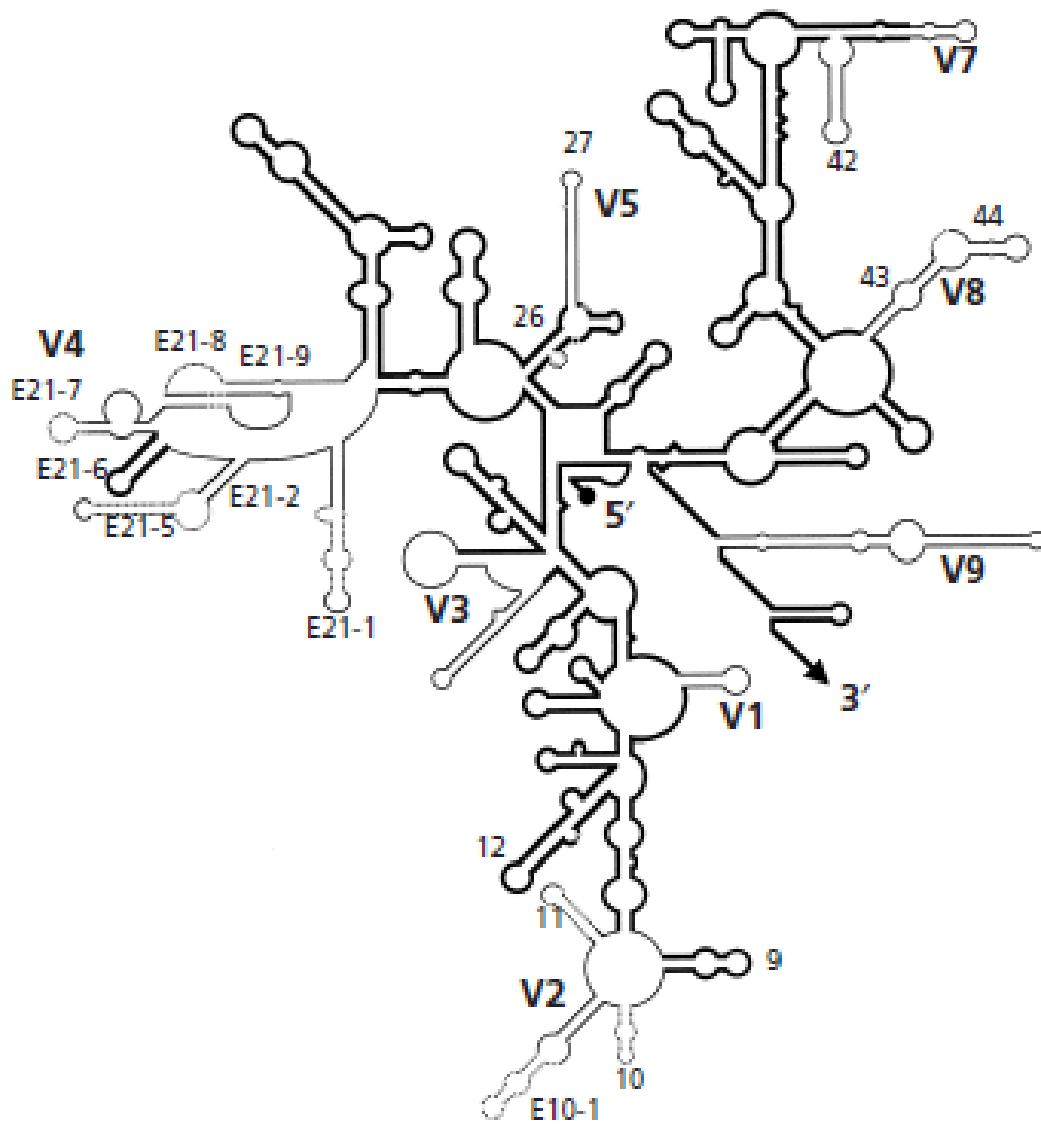


圖 1-7 真核細胞中 18S rRNA 之二级結構

鹼基長，具有調控基因的重要任務，且與癌症疾病的發展有關。亦發現 miRNA 與腫瘤的形成及抑制相關，當目標基因是致癌基因(oncogene) 時，miRNA 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質，因此無法生成腫瘤^[137]。而目標基因是腫瘤抑制基因時，因腫瘤細胞增殖少了負調控因子而造成癌症的惡化，與 miRNA 有關的癌症包括急性骨髓白血病^[138]、肺癌^[139]及前列腺癌^[140] 等等。piRNA 為長度約 29~30 鹼基長，目前只於動物細胞中發現，且 piRNA 主要分布於人類等動物睪丸的精原細胞內，學者推測 piRNA 與動物精子之發育及生殖有關^[141]。

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. Kohlrausch F: *Ann Phys Chem* 1897, **62**:209.
4. Knox JH: **Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation.** *Chromatographia* 1988, **26**:329-337.
5. Hayashi K: **PCR-SSCP: a method for detection of mutations.** *Genet Anal Tech Appl* 1992, **9**(3):73-79.
6. Smooker PM, Cotton RG: **The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations.** *Mutat Res* 1993, **288**(1):65-77.
7. Viridi AS, Loughlin JA, Irvén CM, Goodship J, Sykes BC: **Mutation screening by a combination of biotin-SSCP and direct sequencing.** *Hum Genet* 1994, **93**(3):287-290.
8. Hjérten S: **Free zone electrophoresis.** *Chromatogr Rev* 1967, **9**(2):122-219.
9. Virtanen R: *Acta Polytechnica Scand* 1974, **123**:1.
10. Jorgenson JW, Lukacs KD: **High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis.** *J Chromatogr* 1981, **218**(1-3):209-216.
11. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries.** *Anal Chem* 1981, **53**(8):1298-1302.
12. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Capillary zone electrophoresis.** *Science* 1983, **222**(4621):266-272.
13. Zhang N, Yeung ES: **On-line coupling of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis for automatic DNA typing and HIV-1 diagnosis.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998, **714**(1):3-11.
14. de Gennes JL, Truffert J, Dairou F: **[Contribution of lipoprotein electrophoresis in polyacryamide gel in the study of idiopathic hyperlipidemias].** *Ann Med Interne (Paris)* 1977, **128**(8-9):677-680.
15. Zhu M, Hansen DL, Burd S, Gannon F: *J Chromatogr* 1989, **480**.
16. Chin AM, Colburn JC: **Counter-migration capillary electrophoresis (Cmce) in DNA restriction Fragment analysis.** *American Biotech Labs* 1989, **7**(10A):16-16.
17. Chang HT, Yeung ES: **Poly(ethyleneoxide) for high-resolution and high-speed separation of DNA by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995, **669**(1):113-123.

18. 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.
19. Chiari M, Nesi M, Roncada P, Righetti PG: **Preparative isoelectric focusing in multicompartment electrolyzers: novel, hydrolytically stable and hydrophilic isoelectric membranes.** *Electrophoresis* 1994, **15**(7):953-959.
20. 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.
21. Kleemiss MH, Gilges M, Schomburg G: **Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(5-6):515-522.
22. Strege M, Lagu A: **Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries.** *Anal Chem* 1991, **63**(13):1233-1236.
23. Grossman PD, Soane DS: **Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solutions.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):257-266.
24. 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.
25. Chrambach A, Aldroubi A: **Relative efficiency of molecular sieving in solutions of four polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(1-2):18-22.
26. Heller C: **Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):629-643.
27. Skeidsvoll J, Ueland PM: **Analysis of RNA by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(9):1512-1517.
28. Dolnik V, Novotny MV: **Separation of amino acid homopolymers by capillary gel electrophoresis.** *Anal Chem* 1993, **65**(5):563-567.
29. 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.
30. Loo JA, Udseth HR, Smith RD: **Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Anal Biochem* 1989, **179**(2):404-412.
31. Honda S, Suzuki K, Kakehi K: **Simultaneous determination of iodate and periodate by capillary zone electrophoresis: application to carbohydrate analysis.** *Anal Biochem* 1989, **177**(1):62-66.

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. 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.** *J Chromatogr* 1991, **542**(2):459-471.
35. Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Zhu M: **Capillary isoelectric focusing.** *Electrophoresis* 1997, **18**(12-13):2134-2144.
36. 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.
37. Cohen AS, Karger BL: **High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins.** *J Chromatogr* 1987, **397**:409-417.
38. Freeman HC, Guss JM, Kumar V, McIntire WS, Zubak VM: **Purification, crystallization and preliminary X-ray crystal structure analysis of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis*.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1996, **52**(Pt 1):197-198.
39. Nishi H, Tsumagari N, Kakimoto T, Terabe S: **Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.** *J Chromatogr* 1989, **465**(2):331-343.
40. Jacobson SC, Ramsey JM: **Microchip electrophoresis with sample stacking.** *Electrophoresis* 1995, **16**(4):481-486.
41. Colyer CL, Mangru SD, Harrison DJ: **Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins.** *J Chromatogr A* 1997, **781**(1-2):271-276.
42. 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.
43. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S: **Capillary electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York.** 1993.
44. Colyar CL, Tang T, CHien N, Harrison DJ: *Electrophoresis* 1997, **18**:1733.
45. Hjerten S: **High-Performance Electrophoresis - Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption.** *J Chromatogr* 1985, **347**(2):191-198.
46. Liao JL, Abramson J, Hjerten S: **A Highly Stable Methyl Cellulose Coating for Capillary Electrophoresis.** *J Capillary Electrophor* 1995, **2**(4):191-196.

47. Olivera BM, Baine P, Davidson N: **Electrophoresis of the nucleic acids.** *Biopolymers* 1964, **2**:245.
48. Grossman PD, Soane DS: **Experimental and theoretical-studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer-solutions.** *Biopolymers* 1991, **31**(10):1221-1228.
49. De Gennes PG: **Scaling concepts in polymer physics.** Ithaca, New York: Cornell University Press; 1979.
50. Ogston AG: **The spaces in a uniform random suspension of fibres.** *Trans Faraday Soc* 1958, **54**:1754.
51. De Gennes PG: *J Chem Phys* 1971, **55**:572.
52. Chen HS, Chang HT: **Capillary electrophoretic separation of 1 to 10 kbp sized dsDNA using poly(ethylene oxide) solutions in the presence of electroosmotic counterflow.** *Electrophoresis* 1998, **19**(18):3149-3153.
53. Chen HS, Chang HT: **Electrophoretic separation of small DNA fragments in the presence of electroosmotic flow using poly(ethylene oxide) solutions.** *Anal Chem* 1999, **71**(10):2033-2036.
54. Horvath J, Dolnik V: **Polymer wall coatings for capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):644-655.
55. Bean SR, Lookhart GL: **Sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis of wheat proteins. 1. Uncoated capillaries.** *J Agric Food Chem* 1999, **47**(10):4246-4255.
56. Tseng WL, Hsieh MM, Wang SJ, Huang CC, Lin YC, Chang PL, Chang HT: **Analysis of large-volume DNA markers and polymerase chain reaction products by capillary electrophoresis in the presence of electroosmotic flow.** *J Chromatogr A* 2001, **927**(1-2):179-190.
57. 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.
58. 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.
59. Heitmeier S, Blaschke G: **Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, **721**(1):109-125.
60. Chen DY, Dovichi NJ: **Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994,

- 657(2):265-269.
61. Fister JC, Jacobson SC, Davis LM, Ramsey JM: **Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices.** *Anal Chem* 1998, **70**(3):431-437.
 62. Kang SH, Yeung ES: **Dynamics of single-protein molecules at a liquid/solid interface: implications in capillary electrophoresis and chromatography.** *Anal Chem* 2002, **74**(24):6334-6339.
 63. Lee IH, Pinto D, Arriaga EA, Zhang Z, Dovichi NJ: **Picomolar analysis of proteins using electrophoretically mediated microanalysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *Anal Chem* 1998, **70**(21):4546-4548.
 64. Coble PG, Timperman AT: **Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor.** *J Chromatogr A* 1998, **829**(1-2):309-315.
 65. Harvey MD, Bandilla D, Banks PR: **Subnanomolar detection limit for sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis using a fluorogenic, noncovalent dye.** *Electrophoresis* 1998, **19**(12):2169-2174.
 66. Moody ED, Viskari PJ, Colyer CL: **Non-covalent labeling of human serum albumin with indocyanine green: a study by capillary electrophoresis with diode laser-induced fluorescence detection.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, **729**(1-2):55-64.
 67. Kelly JF, Locke SJ, Ramaley L, Thibault P: **Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry.** *J Chromatogr A* 1996, **720**(1-2):409-427.
 68. Kuo IT, Chiu TC, Chang HT: **On-column concentration and separation of double-stranded DNA by gradient capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2003, **24**(19-20):3339-3347.
 69. 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.
 70. 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.** *J Capillary Electrophor* 1998, **5**(1-2):51-58.
 71. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen PEM: *J Chromatogr A* 1979, **169**:11-20.
 72. Chien RL, Helmer JC: **Electroosmotic properties and peak broadening in field-amplified capillary electrophoresis.** *Anal Chem* 1991, **63**:1354-1361.
 73. Burgi DS, Chien RL: **Optimization in Sample Stacking for**

- High-Performance Capillary Electrophoresis.** *Anal Chem* 1991, **63**:2042-2047.
74. Burgi DS, Chien RL: **Improvement in the method of sample stacking for gravity injection in capillary zone electrophoresis.** *Anal Biochem* 1992, **202**(2):306-309.
75. Tseng WL, Hsieh MM, Wang SJ, Chang HT: **Effect of ionic strength, pH and polymer concentration on the separation of DNA fragments in the presence of electroosmotic flow.** *J Chromatogr A* 2000, **894**(1-2):219-230.
76. Chang H-T, Chen H-S, Hsieh M-M, Tseng W-L: **Electrophoretic separation of DNA in the presence of electroosmotic flow.** *Rev Anal Chem* 2000, **19**(1):45-74.
77. 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.
78. 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.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999, **732**(2):365-374.
79. 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.
80. Stojkovic M, Uda NR, Brodmann P, Popovic M, Hauser PC: **Determination of PCR products by CE with contactless conductivity detection.** *J Sep Sci* 2012, **35**(24):3509-3513.
81. Choi JY, Kim YT, Ahn J, Kim KS, Gweon DG, Seo TS: **Integrated allele-specific polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microdevice for single nucleotide polymorphism genotyping.** *Biosens Bioelectron* 2012, **35**(1):327-334.
82. Chen HC, Chang YS, Chen SJ, Chang PL: **Determination of the heterogeneity of DNA methylation by combined bisulfite restriction analysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *J Chromatogr A* 2012, **1230**:123-129.
83. 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.** *Anal Biochem* 2009, **390**(2):126-135.
84. McGregor DA, Yeung ES: **Detection of DNA fragments separated by capillary electrophoresis based on their native fluorescence inside a sheath**

- flow. *Anal Chem* 1994, **680**(2):491-496.
85. Effenhauser CS, Bruin GJ, Paulus A, Ehrat M: **Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips.** *Anal Chem* 1997, **69**(17):3451-3457.
86. 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 Res* 1997, **25**(14):2816-2822.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. Ren J: **High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, **741**(2):115-128.
95. 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.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
 99. Fuhrmann M, Oertel W, Berthold P, Hegemann P: **Removal of mismatched bases from synthetic genes by enzymatic mismatch cleavage.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(6):e58.
 100. 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.
 101. 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.** *Clin Chim Acta* 2000, **301**(1-2):205-211.
 102. 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.** *Clin Chem* 1997, **43**(3):427-435.
 103. 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.
 104. 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 Res* 1994, **22**(21):4527-4534.
 105. 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.
 106. 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.
107. 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.
 108. 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.
 109. Jacobson KB: **Ribonucleotides of RNA: separation by chromatography on sheets of diethylaminoethylcellulose.** *Science* 1962, **138**(3539):515-516.
 110. Nai YH, Powell SM, Breadmore MC: **Capillary electrophoretic system of ribonucleic acid molecules.** *J Chromatogr A* 2012, **1267**:2-9.
 111. Alberts B: **Molecular Biology of the Cell, 4th ed., Garland Science, New York.** 2002.
 112. 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.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966, **55**(4):912-919.
 113. Gefter ML, Russell RL: **Role modifications in tyrosine transfer RNA: a modified base affecting ribosome binding.** *J Mol Biol* 1969, **39**(1):145-157.
 114. Felsenfeld G, Cantoni GL: **Use of Thermal Denaturation Studies to Investigate the Base Sequence of Yeast Serine Srna.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964, **51**:818-826.
 115. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
 116. Hamilton AJ, Baulcombe DC: **A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.** *Science* 1999, **286**(5441):950-952.
 117. Chapman EJ, Carrington JC: **Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**(11):884-896.
 118. Mattick JS, Makunin IV: **Non-coding RNA.** *Hum Mol Genet* 2006, **15 Spec No 1**:R17-29.
 119. Shivdasani RA: **MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation.** *Blood* 2006, **108**(12):3646-3653.
 120. Machida YJ, Chen Y, Machida Y, Malhotra A, Sarkar S, Dutta A: **Targeted comparative RNA interference analysis reveals differential requirement of genes essential for cell proliferation.** *Mol Biol Cell* 2006, **17**(11):4837-4845.
 121. Jovanovic M, Hengartner MO: **miRNAs and apoptosis: RNAs to die for.**

- Oncogene* 2006, **25**(46):6176-6187.
122. Fuke T, Yoshizaki T, Kondo M, Morino K, Obata T, Ugi S, Nishio Y, Maeda S, Kashiwagi A, Maegawa H: **Transcription factor AP-2beta inhibits expression and secretion of leptin, an insulin-sensitizing hormone, in 3T3-L1 adipocytes.** *Int J Obes (Lond)* 2010, **34**(4):670-678.
 123. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**(4):259-269.
 124. Crick F: **Central dogma of molecular biology.** *Nature* 1970, **227**(5258):561-563.
 125. Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC: **A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.** *J Biol Chem* 1958, **231**(1):241-257.
 126. 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.
 127. Holley RW, Everett GA, Madison JT, Zamir A: **Nucleotide Sequences in the Yeast Alanine Transfer Ribonucleic Acid.** *J Biol Chem* 1965, **240**:2122-2128.
 128. 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.
 129. Sharp PA: **Split Genes and Rna Splicing (Nobel Lecture).** *Angew Chem Int Edit* 1994, **33**(12):1229-1240.
 130. 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.
 131. Crick FH: **The origin of the genetic code.** *J Mol Biol* 1968, **38**(3):367-379.
 132. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB: **Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors.** *Mol Cell* 1998, **2**(1):135-140.
 133. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M: **AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs.** *Cell* 2001, **107**(4):451-464.
 134. Fenger-Gron M, Fillman C, Norrild B, Lykke-Andersen J: **Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping.** *Mol Cell* 2005, **20**(6):905-915.
 135. Hentze MW, Argos P: **Homology between IRE-BP, a regulatory RNA-binding protein, aconitase, and isopropylmalate isomerase.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**(8):1739-1740.

136. Kjer KM: **Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs.** *Mol phylogenet evol* 1995, **4**(3):314-330.
137. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS: **The essence of senescence.** *Genes Dev* 2010, **24**(22):2463-2479.
138. Agirre X, Martinez-Climent JA, Odero MD, Prosper F: **Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia.** *Leukemia* 2012, **26**(3):395-403.
139. Eder M, Scherr M: **MicroRNA and lung cancer.** *N Engl J Med* 2005, **352**(23):2446-2448.
140. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T: **MicroRNA expression profiling in prostate cancer.** *Cancer Res* 2007, **67**(13):6130-6135.
141. Lu Y, Li C, Zhang K, Sun H, Tao D, Liu Y, Zhang S, Ma Y: **Identification of piRNAs in HeLa cells by massive parallel sequencing.** *BMB Rep* 2010, **43**(9):635-641.

第二章 以毛細管電泳暨雷射誘發螢光在電滲流存在下 分析總核糖核酸之完整性

2.1 緒論

近年來核糖核酸在生物領域中廣泛地被研究，包括核糖核酸沉默 (RNA silencing) [1, 2]、研究轉錄體學 (transcriptomics) [3, 4] 及調控性小分子核糖核酸 [5, 6] 等等，所以 RNA 之完整性對於其相關研究非常重要。RNA 雖為熱力學穩定分子，但其本身非常不穩定，只要有少量的核糖核酸酵素 (ribonuclease enzymes) 就會使大片段 RNA 降解。實驗過程中如果有不適當的操作手法或是溫度也都有可能造成 RNA 降解 [7, 8]，並且造成下游 RNA 之應用或實驗數據出現誤差 [9, 10]。因此，RNA 之純度及完整性已成為研究 RNA 相關實驗中是否成功的重要因素之一。其相關實驗包括反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) [11] 與基因表現檢測 (gene expression profiling) [12, 13]。Opitz 等人證明 RNA 樣品之完整性可減少下游實驗數據出現誤差 [14]。Ibberson 等人證明 RNA 樣品當品質不佳時，會影響偵測微小核糖核酸表現 (microRNA expression profiles) 分析資料時的再現性 [11]。

從生物體中萃取出之總核糖核酸，其成分為 80 % ~ 85 % 的 rRNA，依照其片段大小可分為 28S、18S、5.8S 及 5S 四個單元、10 % ~ 15 % 的 tRNA 及 1 % ~ 5 % 的 mRNA [15]。早期利用變性瓊脂凝膠電泳分析

RNA 之完整性，使用溴化乙錠(ethidium bromide, EtBr)染色核苷酸^[16-19]，或者使用較靈敏之 SYBR Green 染料染色核苷酸^[20]，以比較 28S 及 18S rRNA 片段的帶寬 (band) 比值，當比值為 1.8~2.0，可視為純度高之完整 RNA^[8]。但使用變性凝膠電泳有許多缺點存在，包括操作不易及低通量等等。爾後發展紫外吸收光譜儀偵測 RNA 之完整性，藉由樣品在 260 nm 及 280 nm 的吸收度，當 $A_{260} : A_{280}$ 吸收強度比值大於 1.8 時可視為純度高之 RNA^[21, 22]，雖然吸收度比值能比較 RNA 之純度，但受到降解之 RNA 在 260 nm 與 280 nm 吸收度仍然有可能與未降解之 RNA 相同。因此如果要偵測 RNA 之完整性，就必須利用更精確之方法來判定。以毛細管電泳偵測 RNA 之完整性為一種有效的分析工具^[9]，而商業化的微晶片電泳系統的儀器 Agilent Bioanalyzer 2100 也可以幫助 RNA 之定性，並且利用 2100 Expert 軟體 (Agilent Technologies) 可從光譜圖中計算 RNA 之完整度指標 (RNA integrity number, RIN)^[10, 23, 24]，RIN 值由一到十個等級，RIN 值越高代表 RNA 之完整性愈高，成為分析 RNA 之完整性的一項參考指標。

本實驗則使用毛細管電泳暨雷射誘發螢光(capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, CE-LIF) 偵測 RNA 之完整性，CE-LIF 具有高分離效率、高靈敏度及消耗樣品少等優點，因為 CE-LIF 能夠分離去氧核糖核酸、核糖核酸、蛋白質及醣類等生物樣品^[25]，已成為現

今生物分析上重要的分析工具^[26-28]。但到目前為止，以毛細管電泳分析 RNA 的研究卻相當地少^[29]。而以毛細管電泳分析核糖核酸，其實驗參數也相當重要，例如：篩分介質種類及濃度、電場強度^[30, 31]、分離溫度^[31]以及電解質緩衝溶液之組成，包括變性劑的選擇等。分析 RNA 常用之篩分介質包括羥乙基纖維素(hydroxyethyl cellulose, HEC)^[31-38]、羥丙基甲基纖維素(hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC)、聚環氧乙烷^[39-42]、聚乙烯吡咯烷酮^[43]及衍生物聚 N,N-二甲基丙烯醯胺(derivative poly-N,N-dimethylacrylamide, PDMA)^[44-47]等等。本實驗所選之篩分介質為聚環氧乙烷，過去常使用聚環氧乙烷作為分離 DNA 之篩分介質。本實驗室學長則成功利用聚環氧乙烷， M_{ave} (8,000,000 Da)分離 miRNA 分子(22 核苷長(nucleotides, nt))及 miRNA 複合物(50~90 鹼基對(base pair, bp))^[48, 49]。以毛細管電泳分析核糖核酸，由於 RNA 分子內有許多自行雜合的部位而造成分離效率差，所以過去已有許多研究者提出在電解質中添加以下這些化合物都可提升分離效率，包括羥基添加劑：甘露醇(mannitol)^[35, 36, 38]以及變性劑：尿素(urea)^[32]、甲醛(formaldehyde)^[50]及醋酸(acetic acid)^[37]等。Todorov 等人顯示增加尿素濃度可降低 RNA 之淌度，但在尿素濃度 4~7 M 的變性條件下，其 RNA 仍然具有高級結構^[32]。為了克服此問題，Sumitomo 等人將醋酸作為強變性劑，可使 RNA 分子內氫鍵斷裂，所以當進行毛細管凝膠

電泳分離時，在分離介質中添加醋酸可提高 RNA 分離效率，並成功地分離小鼠纖維母細胞（NIH 3T3 cells）總核糖核酸中的 18S 與 28S rRNA^[37]。

過去以毛細管電泳分析 RNA，大多是在無電滲流情況下進行，目的是避免 RNA 樣品吸附於毛細管壁上。實驗室學長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，在無電滲流存在下進行實驗^[51]，成功發展出一種經濟、靈敏度佳及快速的方法偵測 RNA 之完整性，並且在 15 分鐘內完全分離 18S 及 28S rRNAs。但使用以上方法偵測 RNA 完整性還是有缺點存在，包括在無電滲流存在下分析 RNA，必須先將毛細管壁進行聚合物溶液塗覆，使其生命期較短、使用電動進樣較容易受到樣品中鹽類濃度影響進樣總量以及使用 SYTO 9 此染料標定 RNA，雖然靈敏度高但成本相對也較高。所以本實驗希望在電滲流存在下分析 RNA 完整性，由於毛細管壁不需要進行聚合物塗覆，使其生命期變長。並且使用虹吸進樣，較不會受到鹽類影響。最後實驗選用成本較低之 EtBr 染料，取代成本較昂貴的 SYTO 9，成功發展快速、操作方便及經濟之方法偵測 RNA 之完整性。

2.2 實驗部分

2.2.1 實驗試藥

PEO (poly(ethylene oxide), M_{ave} 4,000,000 Da)、三羥甲基氨基甲烷 (tris(hydroxymethyl)aminomethane, tris)、硼酸 (boric acid, H_3BO_3)、氫氧化鈉 (sodium hydroxide) 係由美國 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 購買。25 bp DNA Ladder、Yeast tRNA 及溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 係由美國 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 公司購買。所有化學試劑皆屬於分析級。

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

實驗所用的人類鼻咽癌細胞 (HK-1) 係由長庚大學分子醫學中心所提供。細胞皆培養於 RPMI 培養基，在 $37^\circ C$ 的培養箱中培養，經由 5% CO_2 處理三天，並利用商業化的萃取試劑萃取總核糖核酸，根據操作手冊之方法萃取 (Qiagen, Germany)。所有的 RNA 樣品皆儲存於 $-20^\circ C$ 冷凍庫中，使用前須先放置於冰上，等候樣品解凍。

2.2.3 儀器裝置

本實驗所使用的儀器裝置包括：聚合酶連鎖反應加熱器、自組裝之雷射誘發螢光偵測系統。加熱器作為避免 RNA 交叉雜合 (cross hybridization) 之反應器；雷射誘發螢光偵測系統則是用來激發染料收

集螢光訊號，並且將螢光訊號轉換成一般的電泳圖。

2.2.3.1 聚合酶連鎖反應加熱器

本實驗所使用的聚合酶連鎖反應加熱器係由 Astec 公司所生產製造，型號為 PC-818A，因加熱容器為全鋁材質可以增加熱傳導速率，並經由微電腦 PID 控制升降溫，使得在升降溫過程中，鋁塊的每個部位都能均勻受熱，其精確度可達 $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.3.2 毛細管電泳暨雷射誘發螢光偵測系統

毛細管電泳之實驗裝置為自行組裝。高電壓供應器係由 Gamma High Voltage Research 公司 (Ormond, FL, USA) 購買，用來驅動電泳，高壓電的電極輸出端會穿過自製的 plexiglass box 防止觸電。圖 2-1 為毛細管電泳裝置圖。本實驗所採用的激發光源係由唐裕有限公司所購買之固態雷射，其激發波長為 532 nm，功率為 10 mW。首先將雷射光平行置於桌面再由凸透鏡將雷射光聚焦於毛細管，當有染料嵌於 RNA 中並通過偵測視窗時，染料就會被雷射激發而產生特定波長之螢光，在 90° 方向利用 $10\times$ 接物鏡 (numerical aperture = 0.25) 收集螢光之後，藉由 610 nm 的干涉濾片 (interference filter) 及 RG 610 nm 的截斷濾片 (cut-off filter) 過濾光源干擾及不需要的散射光，最後再使用光電倍增管 (R3896, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) 偵測螢光訊號。

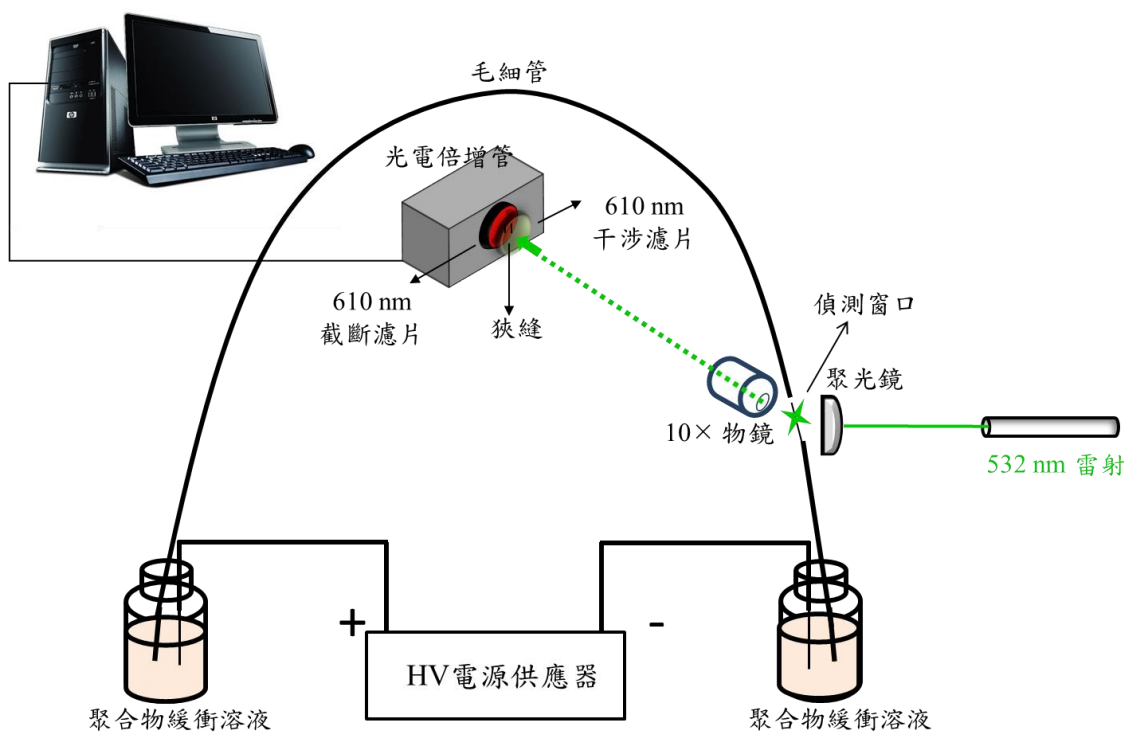


圖 2-1 毛細管電泳暨雷射誘發螢光裝置圖

訊號經光電倍增管放大後，經由 $10\ \Omega$ 的電阻將產生的電流訊號轉換成電壓訊號，並由 24-bit 數位類比轉換器 (A/D converter, JMBS Development) 以 10 Hz 的頻率擷取訊號並轉換成數位資料儲存於電腦中。最後運用層析軟體 Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) 將訊號轉換成電泳圖。本實驗是在一密閉的黑箱裡進行以避免環境光源的干擾。

2.2.4 毛細管前處理

實驗用的毛細管材質為熔融矽 (fused silica)，購自於美國 PolymicroTechnologies 公司，毛細管內徑為 $75\ \mu\text{m}$ ，外徑為 $365\ \mu\text{m}$ ，毛細管外部塗覆了一層聚亞烯胺 (polyimide)，每根新的熔融矽毛細管先以石英片切割成總長度為 40 公分，並於 33 公分處燒出約 1 公分的偵測視窗，接著注入 0.5 M 的 NaOH 溶液浸泡十二小時以上，使毛細管內壁矽醇解離。在每次實驗之間，先以高壓氮氣將毛細管內的 PEO 溶液沖出後，注入 TB (tris-borate) 1.5 M pH 10.0 緩衝溶液，推出殘餘的 PEO。接著再通入 0.5 M 的 NaOH 溶液，以 1 kV 電壓清洗毛細管壁 10 分鐘，將毛細管內壁殘餘的 PEO 洗淨，使得毛細管內壁再度矽醇解離以進行下次實驗。

2.2.5 聚合物溶液製備

緩衝溶液及聚合物溶液配製前，都須先用沙拉脫將容器刷洗乾淨，接著用容器裝滿去離子水，再以超音波震盪器震盪五分鐘來清洗容器。首先配製 100 mM tris-borate, pH 9.0 緩衝溶液（100 mM Tris 加入 boric acid 將 pH 調至 9.0 即可得到緩衝溶液）。配製聚合物溶液時先將攪拌子放入錐形瓶中，再放置於攪拌器上，可幫助聚合物溶液能攪拌均勻。接著取 50 mL 配製好的 100 mM TB pH 9.0 緩衝溶液倒入量筒再倒入錐形瓶中，慢慢增強攪拌速度使緩衝溶液成漩渦狀。取 0.5 g 的 4 M PEO，配製 1.0 % 4 M PEO 聚合物溶液，將聚合物粉末緩慢倒入錐形瓶，配製過程中應避免倒入速度太快而導致粉末無法均勻分布於溶液中。溶液須攪拌至少十二小時確定聚合物粉末已完全溶解且均勻分布。最後加入 5 μ L 的原倍 EtBr 染料，使染料最終濃度為 1 μ g/mL，攪拌後使染料均勻分布於聚合物溶液之中，將配製好的聚合物溶液倒入乾淨的 50 mL 離心管中，再利用鋁箔紙包覆離心管避光，並儲存於 4°C 冰箱中，大約可保存兩週。若放置時間過久，PEO 溶液在高 pH 值會水解而無法使用。

2.2.6 螢光染料

本實驗使用 EtBr 螢光染料標定核苷酸，EtBr 已成為現今實驗室內常

用的DNA或RNA染劑，具扁平結構，其分子式為 $C_{21}H_{20}BrN_3$ ，結構如圖2-2 (a) 所示。EtBr可嵌入雙股DNA或單股RNA的螺旋體結構中而緊密結合，每2.5個鹼基對約可嵌入1個ethidium分子，且EtBr與DNA嵌合後的螢光強度比未嵌合時增加了10倍^[52]。EtBr (λ_{ex} : 493 nm, λ_{em} : 590 nm)，在532 nm雷射激發下，EtBr可放射橙紅色的螢光，圖2-2 (b) 為EtBr之螢光光譜圖。

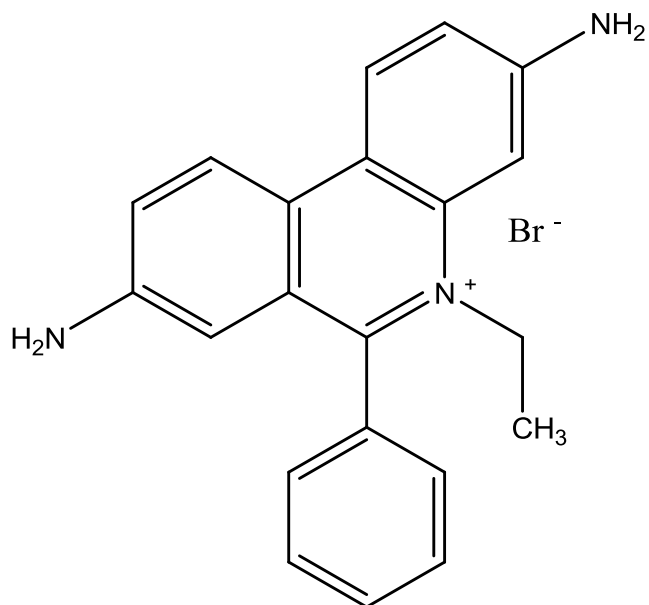
2.2.7 軟體分析

實驗計算總 RNA 之二級結構是使用 RNA structure (version 5.4) 軟體^[53]，計算總 RNA 在室溫 25°C 及加熱 70°C 的結構變化。首先利用 Oligo 7 (molecular biology insights, Inc. USA) 軟體計算總 RNA 分子量。28S rRNA (5070 nt, NR_003287.2)、18S rRNA (1869 nt, NR_003286.2)、5.8S rRNA (156 nt, NR_003285.2) 5S (121 nt, NR_023363.1) 以及 tRNA (72 nt, NT_167244.1) 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) 網站所下載 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7154>)。

2.2.8 實驗流程

每次注入樣品前，須先以注射針筒推入 1.5 M TB pH 10.0 緩衝溶液至毛細管中，以清除毛細管內壁的 0.5 M NaOH 溶液，使樣品注入前毛

a)



b)

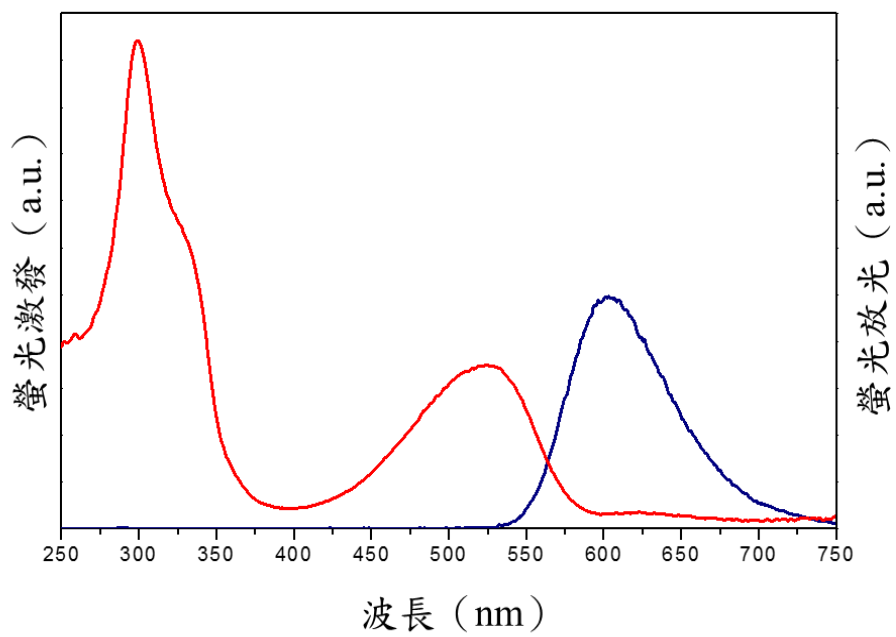


圖 2-2 (a) EtBr 之結構圖 及 (b) 螢光光譜圖

細管充滿緩衝溶液。為了防止核醣核酸樣品之間交叉雜合，導致實驗上出現問題，RNA 樣品使用前都須先加熱 70°C 5 分鐘，加熱完馬上放入冰盒中冷卻樣品。將欲引入之樣品置於 25 公分處，利用虹吸的方式將樣品引入毛細管中，接著將毛細管兩端擺放在 PEO 溶液中，在毛細管兩端插入白金電極，施加 5 kV 電壓進行電泳分離，並在毛細管入口處 33 公分以 CE-LIF 方法作偵測。

2.3 結果與討論

本實驗使用雷射誘發螢光，並在毛細管具電滲流存在下結合電泳作為分析 RNA 之系統。實驗中的緩衝溶液是以具篩分作用的 PEO 溶液添加 EtBr 染料標定 RNA，將欲分析之 RNA 樣品利用虹吸方式引入毛細管中，並藉由 EOF 將 PEO 溶液引入毛細管中。當施加正電壓時，RNA 帶負電荷會往正極方向移動，與電滲流帶動的 PEO 溶液方向相反，電滲流遷移速度較 RNA 分子快，所以 RNA 分子會被帶往負極的偵側窗口。小片段的 RNA 比大片段 RNA 較易通過 PEO 溶液的孔隙往正極移動，因此大片段的 RNA 會先被偵測到，越小片段之 RNA 則越晚被偵測到。實驗所使用的染料 EtBr，在溶液中解離成 Et^+ ，往負極方向移動，其自身淌度加上電滲流淌度，所以 Et^+ 電泳遷移速度最快，因此在電泳圖中可以看到未接上 RNA 之 EtBr 染料遷移時間會比電滲流來的

短。

實驗最後選擇 1.0 % 聚環氧化乙烷(poly(ethylene) oxide)， M_{ave} (4,000,000 Da)作為篩分的介質，分離電壓為 5 kV，此分離系統可在 25 分鐘內完全分離 28S、18S、5.8S、5S 的 rRNAs 及 tRNA。並且利用增長進樣時間，達到線上樣品濃縮的效果，可偵測最低 28S 及 18S rRNA 濃度為 100 pg/ μ L。針對 RNA 之完整性，利用加熱能成功觀察到 RNA 的降解，發現大片段之 rRNA 較容易降解，而 tRNA 較不易受到加熱而降解。此研究可成為未來偵測 RNA 之完整性新的指標。

2.3.1 聚合物濃度對 RNA 分離效率的影響

由於 PEO 易吸附於毛細管壁^[54-57]，目前已有學者認為 PEO 之所以會吸附主要是因為聚合物以氫鍵 (hydrogen bonding) 及疏水性 (hydrophobic) 和毛細管的矽表面作用而產生。如果要提升再現性及增加分離速度，最有效方法為降低 PEO 的黏度或避免 PEO 吸附於毛細管壁進而提高電滲流。有研究指出如果在進行電泳之前先在毛細管內填充 pH 10.0 的高濃度 TB 緩衝溶液，以及每次實驗間注入 0.5 M NaOH，以 1 kV 電壓沖洗毛細管壁 10 分鐘，皆可使 PEO 吸附情況大幅降低^[57]以及提高電滲流，使實驗獲得到較好再現性^[58]。本實驗亦利用此方法，使 EOF 淌度為 $(5.02 \pm 0.16) \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，藉此提高了實驗再現性。

實驗首先使用 100 mM TB pH 9.0 緩衝溶液配製濃度不同的 PEO 聚合物溶液，虹吸進樣 10 秒，使用 15 kV 電壓測試總核糖核酸在某個 PEO 濃度能夠快速完全分離 28S、18S、5.8S、5S rRNAs 及 tRNA。如圖 2-3 (a) 所示，在沒有添加聚合物溶液只有緩衝溶液時，電泳圖中顯示總核糖核酸全部堆積在一起，並無分離效果。圖 2-3 (b) 當聚合物溶液濃度提高到 0.1 % 時，開始有篩分作用，電泳圖中主要分為兩個訊號峰，根據毛細管電泳在電滲流存在下其分離機制，大片段 RNA 其遷移時間較短，而小片段 RNA 其遷移時間較長。因此可推斷圖 2-3 (b) 遷移時間較短之第一個波峰為核苷酸長度較大的 28S 及 18S rRNA，其核苷酸長度分別為 5070 nt、1869 nt 而第二個波峰為核苷酸長度較接近的 5.8S、5S rRNA 及 tRNA，其核苷酸長度分別為 156 nt^[59]、121 nt^[60]及 72 nt^[61]。兩個訊號峰的面積比大約為 6：1，因為總核糖核酸成分 rRNA 含量約佔 80~85 %，而 tRNA 含量約佔 10~15 %。圖 2-3 (c) ~ (d) 聚合物濃度從 0.5 % 提高至 1.0 % 時，28S 及 18S rRNA 解析度(resolution, R_s) 從 0.76 提升至 1.745，且小片段 RNA 解析度也從 0.65 提升至 2.589。圖 2-3 (e) 聚合物溶液濃度為 2.0 %，雖然 28S 及 18S rRNA 可完全分開，但為了減短分離時間及避免 PEO 聚合物溶液吸附於毛細管壁，本實驗最後選擇 1.0 % 4 M PEO 作為分離的聚合物溶液來進行後續的實驗。

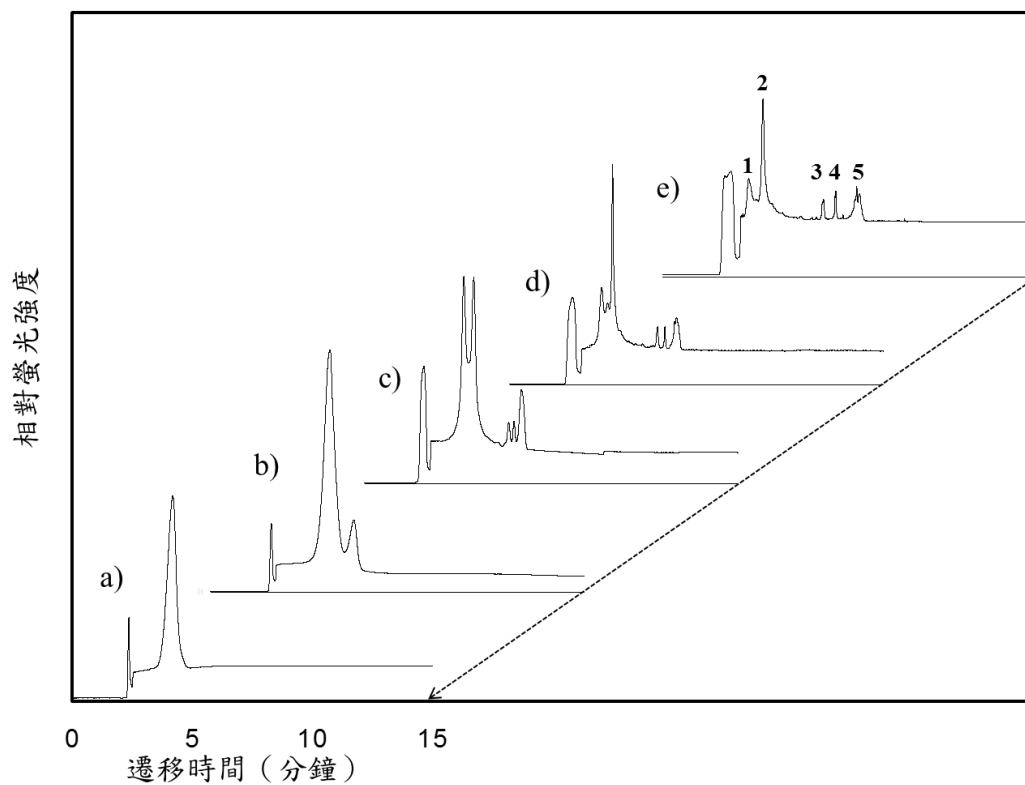


圖 2-3 聚合物溶液濃度對 HK-1 的總量 RNA 分離的影響，實驗條件為 100 ng/ μ L HK-1 的總量 RNA 及分離電壓為 15 kV。a) 100 mM TB buffer pH 9.0。b) 0.1 % PEO。c) 0.5 % PEO。d) 1.0 % PEO。e) 2.0 % PEO。訊號峰 1 為 28S rRNA、2 為 18S rRNA、3 為 5.8S rRNA、4 為 5S rRNA 及 5 為 tRNA。

2.3.2 分離電壓對 RNA 分離效率的影響

過去曾有學者指出，大片段之 DNA 容易受到外加電場的影響^[42, 62]。因此希望利用不同的電壓，找到一個最佳的分離條件。圖 2-4，其電泳圖表示利用不同電壓，以 1.0 % 4 M PEO 分析總核糖核酸，虹吸進樣 10 秒，四張電泳圖的遷移時間及螢光強度刻度範圍都相同，可比較四種不同電壓彼此之間訊號大小的差異。圖 2-4 (a) 以 20 kV 電壓分離 RNA，外加電場分別為 500 V/cm 高電場，此電壓分離 rRNA 的遷移時間縮短至 3 分鐘內，但分離效率較差，其 28S 及 18S rRNA 解析度為 1.054。由圖 2-4 (b) 當分離電壓降至 15 kV，外加電場為 375 V/cm 的高電場時，28S 及 18S rRNA 解析度為 1.245，這結果顯示當電壓從 20 kV 降至 15 kV 時，其分離效率未提升太多。接著將分離電壓降至 10 kV 時，28S 及 18S rRNA 解析度提升至 1.602，且 28S rRNA 的訊號峰比在 15 kV 電壓分離時高出約兩倍的高度，整體的螢光訊號面積從 2207.260 mv.s 增加至 5057 mv.s，但由於過去使用變性瓊脂凝膠電泳分析 RNA，其實驗結果顯示 28S 及 18S rRNA 片段大小比值為 2.0 才能視為完整之 RNA^[8]。所以最後將分離電壓降至 5 kV，由圖 2-4 (d) 電泳圖中觀察到當電場變小時，雖然分離時間變長，但 28S 及 18S 已可完全分離，其解析度為 1.702，且 28S 與 18S rRNA 訊號比值約為 2.0，整體的螢光訊號面積也增加至 10226.576 mv.s。從實驗結果得知無論 28S、18S rRNA

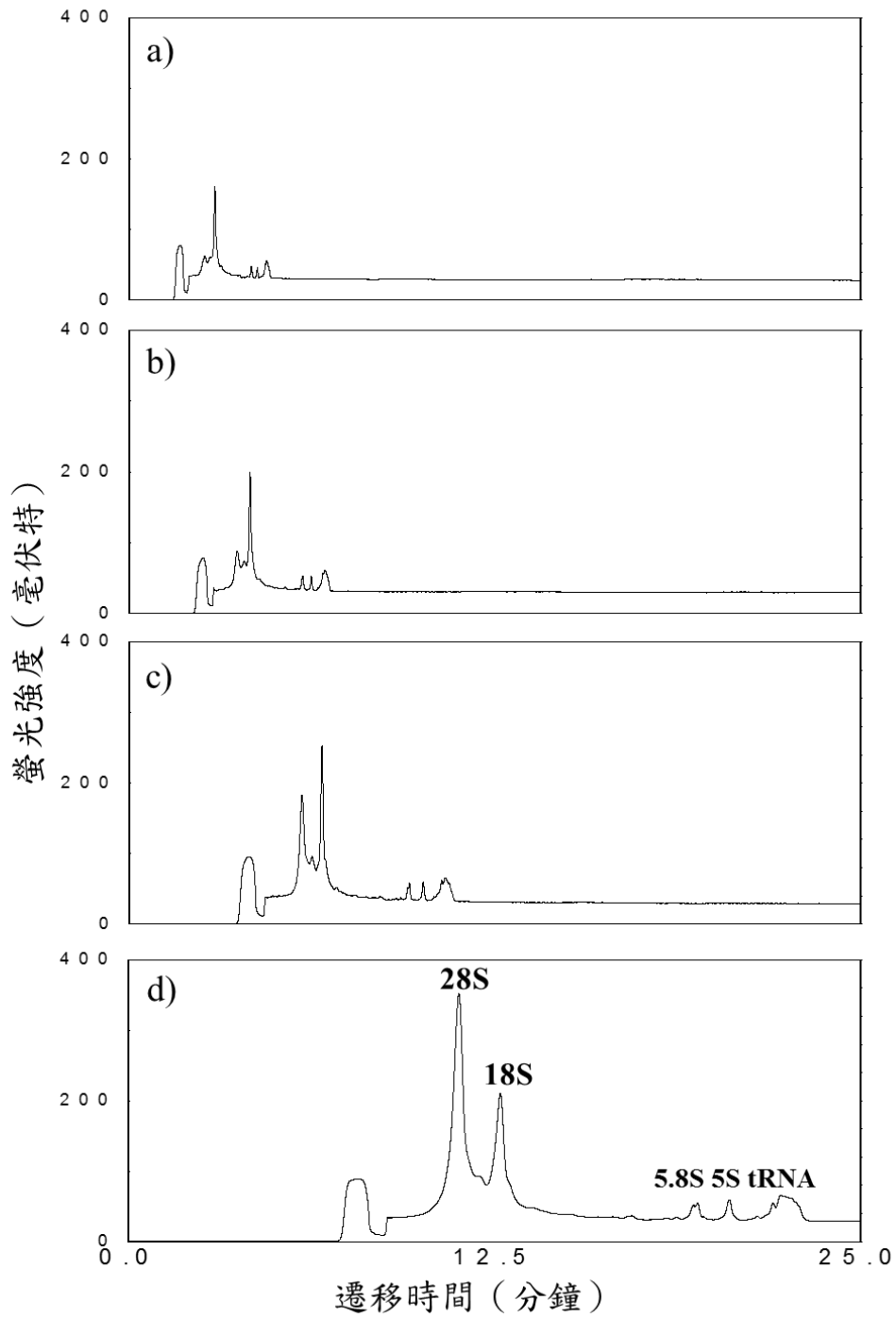


圖 2-4 電場對 HK-1 的總量 RNA 分離的影響，實驗條件為 100 ng/ μ L HK-1 的總量 RNA 及分離介質為 1.0 % 4 M PEO。a) 20 kV。b) 15 kV。c) 10 kV。d) 5 kV。

以及小片段 RNA，當使用低電壓進行分離時會使得螢光訊號強度較大，推斷可能原因為 RNA 在高電場會破壞染料與 RNA 分子之間的鍵結^[63, 64]。Yeung 等人也發現單股 DNA 在高電場或是高功率雷射下，DNA 有斷裂情況發生^[65, 66]。而從圖 2-5 線性圖中，則發現 28S 較 18S rRNA 及小片段 RNA 更容易受到高電場的影響，推斷可能原因為 28S rRNA 在高電壓分離時，會造成 rRNA 的水解。在以前研究中，Hadjiolov 等人也觀察到 28S rRNA 在高溫容易受到水解而斷裂^[67]。所以本實驗最後選擇 5 kV 當作分離電壓，並以濃度 1.0 % 4 M PEO 聚合物溶液偵測 RNA 之完整性。

2.3.3 RNA 濃度的影響

由前面結果得知的最佳化條件，進行不同濃度 RNA 對分離的影響。圖 2-6 為分析濃度從原倍 500 ng/ μ L 到 1 ng/ μ L 不同濃度的人類鼻咽癌細胞 (HK-1) 總核糖核酸。圖 2-6 (a) 由電泳圖觀察到當使用原倍的 HK-1 時，電泳圖中 EtBr 染料的訊號峰已完全不見，原因為 EtBr 染料全部都接上 RNA 導致沒多餘的 EtBr 往負極遷移，發現 28S 及 18S 的訊號強度已超過 Clarity 軟體設定的螢光強度範圍，但還是可以清楚看到 28S 及 18S rRNA 可完全分離。由圖 2-6 (b) ~ (d) 用水稀釋原倍 500 ng/ μ L 的 HK-1 至 100 ng/ μ L、10 ng/ μ L 及 1 ng/ μ L，從電泳圖中得

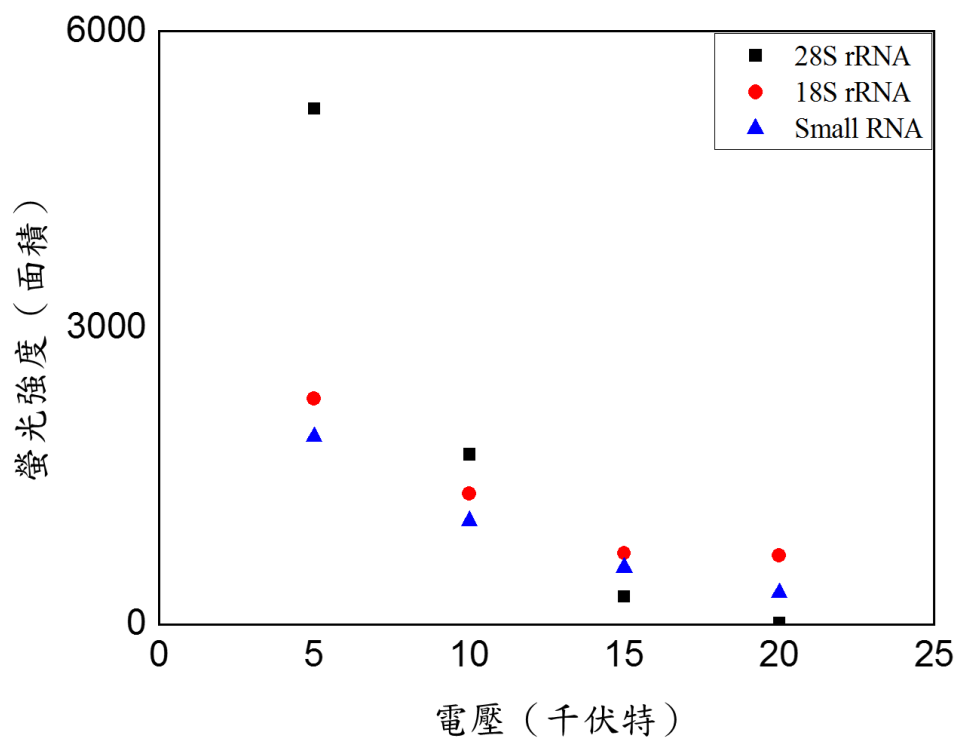


圖 2-5 不同片段 HK-1 的總量 RNA 之螢光強度對電壓作圖

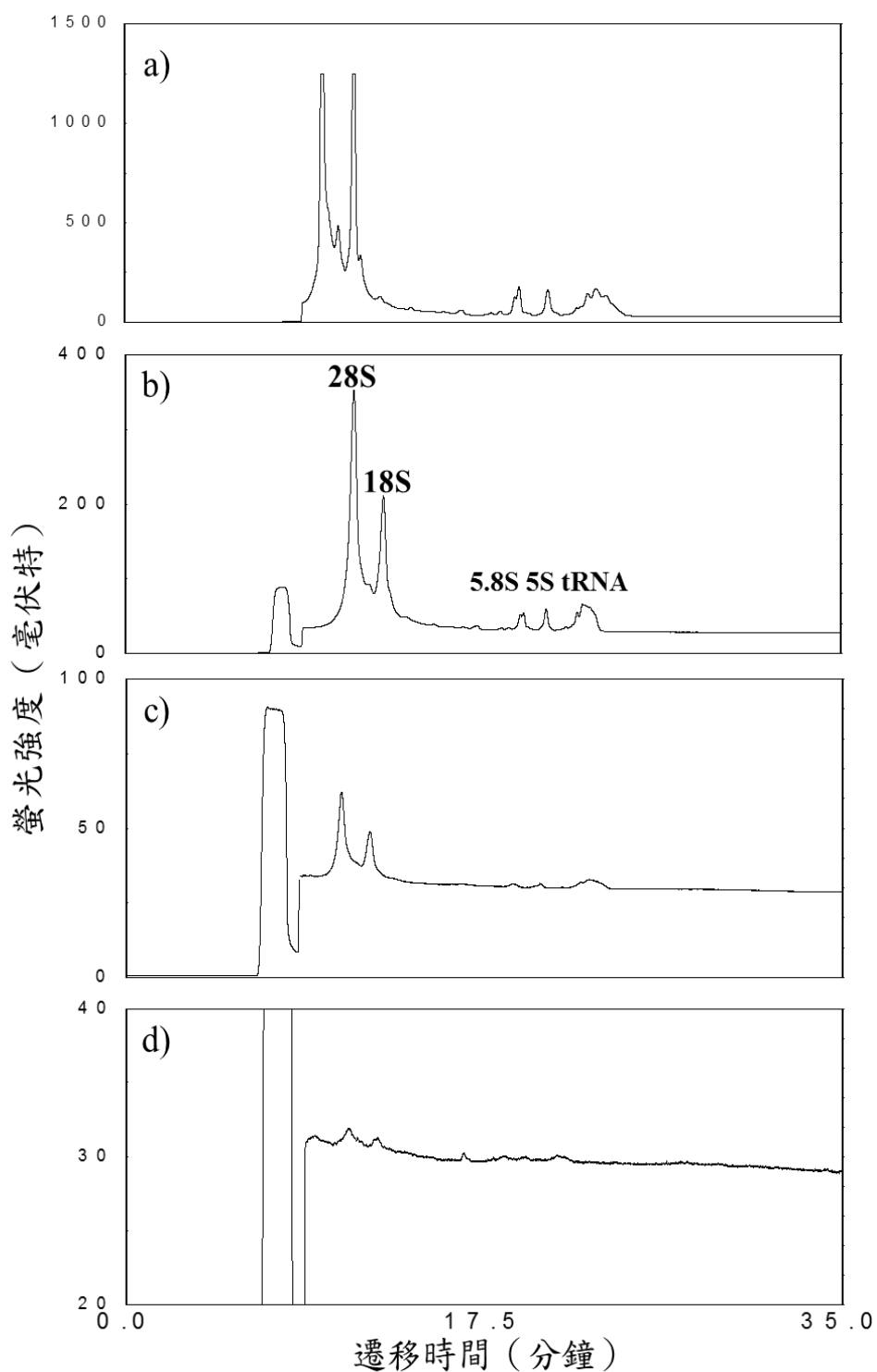


圖 2-6 偵測不同濃度人類鼻咽癌細胞 HK-1 的總量 RNA，實驗條件為 1.0 % 4 M PEO 及分離電壓為 5 kV。a) 500 ng/μL。b) 100 ng/μL。c) 10 ng/μL。d) 1 ng/μL。

知 28S 及 18S rRNA 兩個訊號峰在不同濃度下都可完全分離。圖 2-6(c) 得知當濃度低至 10 ng/μL 時，小片段 rRNA 及 tRNA 之訊號峰強度開始變小，到 1 ng/μL 時只能看到 28S 及 18S rRNA 兩個訊號峰，無法清楚看到小片段 RNA。圖 2-6 顯示，在相同分離條件下，對不同 HK-1 濃度之分離效果是一樣的，並可得知當未進行線上濃縮技術時，可偵測到 28S 及 18S rRNA 最低濃度為 1 ng/μL。

2.3.4 線上濃縮

在檢驗醫學需具備高靈敏度且快速分析的特點，才能符合臨床檢驗的需求。毛細管電泳分析過去常受限於樣品注入量 (nL) 及光徑長度 (50~100 μm)。因此過去已有人成功利用線上濃縮技術^[68-70]來改善實驗偵測靈敏度。

圖 2-7，此四張電泳圖皆為 1 ng/μL 的 HK-1 細胞。過去已有人證實，線上濃縮技術可對生物樣品進行樣品堆積，其濃縮原理可參照第一章，圖 2-7 (a) ~ (d)，分別為使用虹吸進樣時間從 60 秒、120 秒、180 秒及 360 秒，發現當進樣時間增長，其螢光訊號強度也會增強。亦可觀察到注入時間愈長，其遷移時間也愈長，這是因為樣品在低離子強度下進樣過多，使 PEO 較易吸附在毛細管壁。電泳遷移時間隨著樣品的注入量提高，其分離的解析度也可能會略微提高。將圖 2-7 以螢光

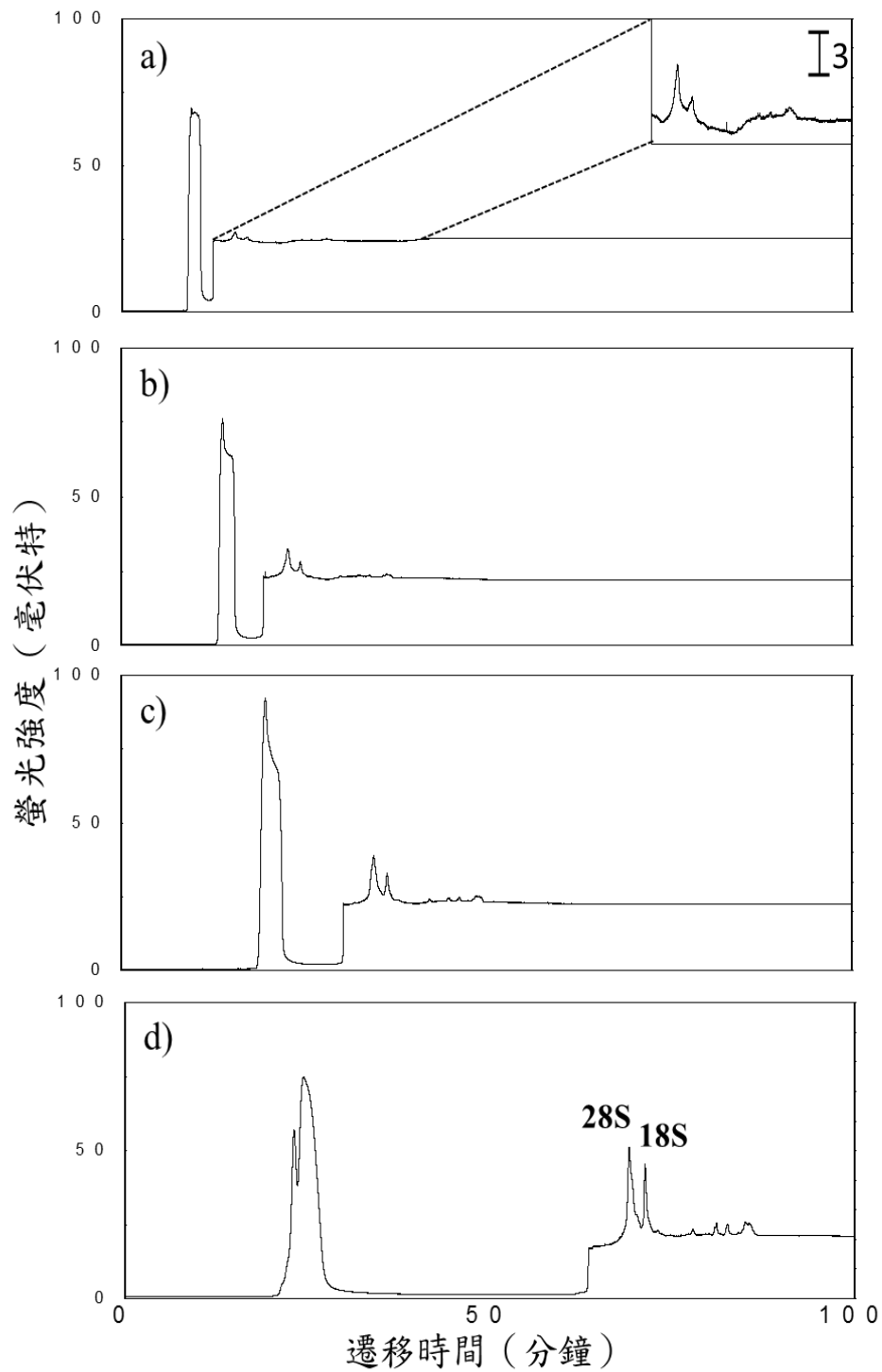


圖 2-7 1 ng/ μ L HK-1 的總量 RNA，進行線上濃縮，改變進樣時間對訊號強度的影響，實驗條件為 1.0 % 4 M PEO 及分離電壓為 5 kV。a)60 秒。b)120 秒。c)180 秒。d)360 秒

強度對進樣時間作圖，製作成圖 2-8 的線性圖，可觀察到隨著進樣時間增長，28S 及 18S rRNA 螢光強度也成線性增強，因此可證明進行線上濃縮技術，具有樣品堆積效果，可增加實驗之靈敏度。因此試著使用此方法，將偵測核糖核酸之濃度降低至 100 pg/ μ L。由圖 2-9 (b) 可看到當使用虹吸進樣時間增長至 360 秒時，從圖中可清楚看到 28S 及 18S rRNA 兩個訊號峰。因此可證明將樣品進行線上濃縮之後，樣品確實有濃縮的效果，並且可偵測到 28S 及 18S rRNA 最低濃度為 100 pg/ μ L。

2.3.5 使用標準品標定小片段 RNA

過去分析核糖核酸之完整性都是觀察大片段 28S 及 18S rRNA，而本實驗不僅可觀察到大片段 rRNA 還可觀察到小片段 rRNA 及 tRNA。為了確定電泳圖中最後三個訊號峰為 5.8S、5S rRNA 及 tRNA，所以使用 25 bp DNA Ladder 標定 5.8S 及 5S rRNA，且利用 Yeast tRNA 標定 tRNA。圖 2-10 (a) 為 25 bp DNA Ladder，由於使用分析核糖核酸相同分離條件 (1.0 % 4 M PEO) 時，無法完全分離每個訊號峰，而造成標定困難，所以分離條件改為 1.5 % 8 M PEO。由實驗結果得知小片段 rRNA 及 tRNA 較不會受電場影響分離，所以為了減短分析時間，分離電壓為 15 kV。從圖 2-10 (a) 可看到 DNA 標準品每個訊號峰，接著即可進行標定小片段 RNA。圖 2-10 (b) 為 HK-1 的總量 RNA 加入 25

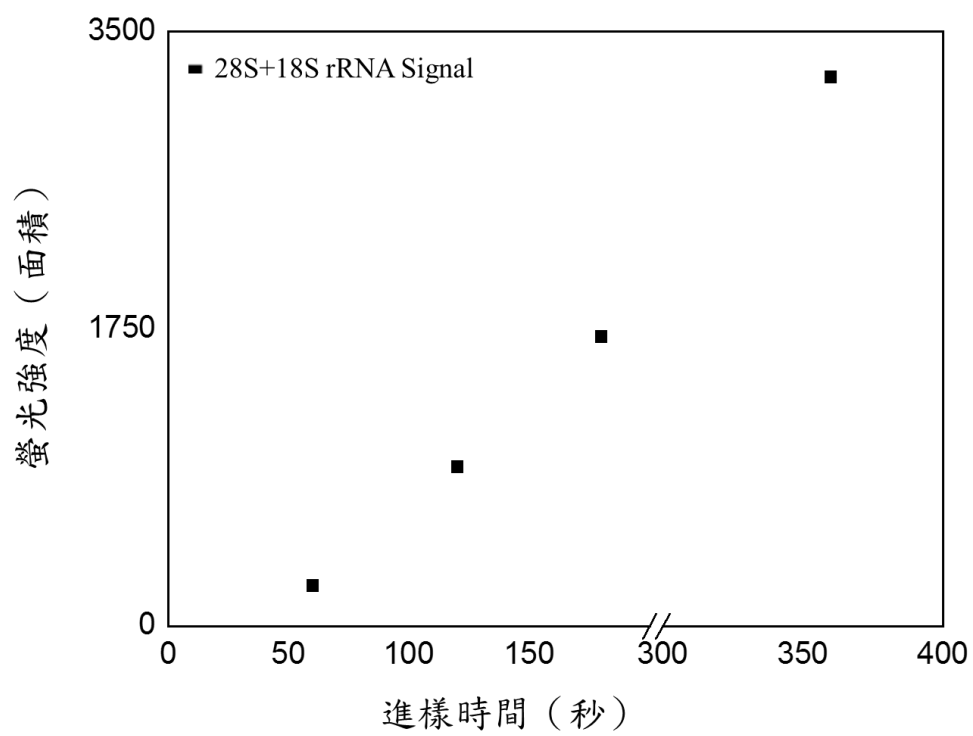


圖 2-8 28S 及 18S rRNA 之螢光強度對進樣時間線性圖

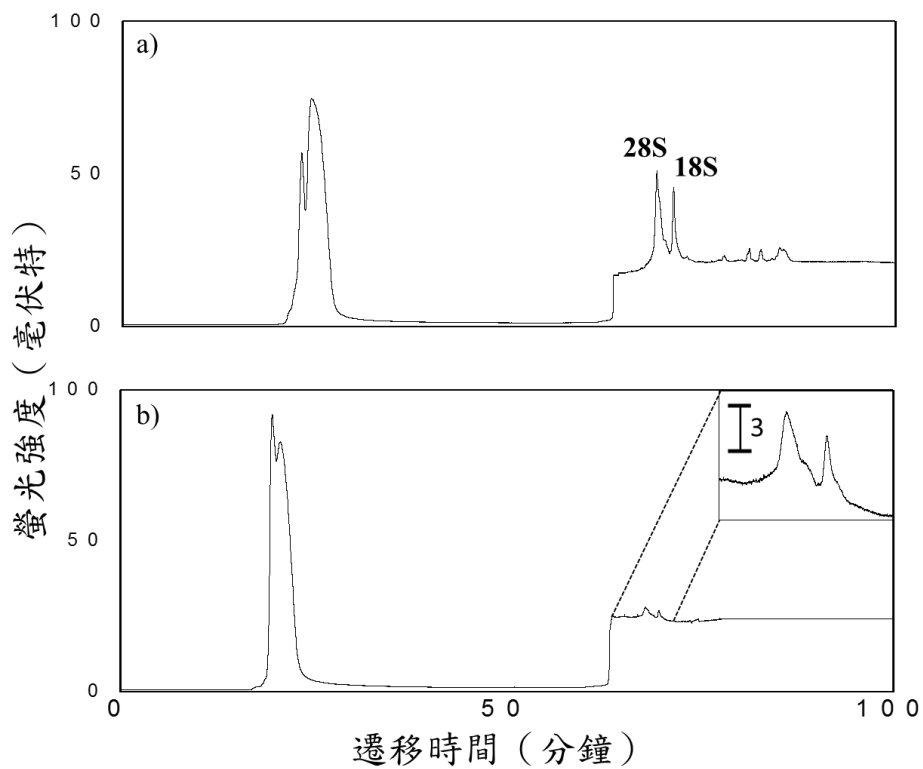


圖 2-9 進行線上濃縮，偵測 HK-1 的總量 RNA 其進樣時間為 360 秒，可偵測到 28S 及 18S rRNA 最低濃度為 100 pg/ μ L，實驗條件為 1.0 % 4 M PEO 及分離電壓為 5 kV。a) 1 ng/ μ L。b) 100 pg/ μ L。

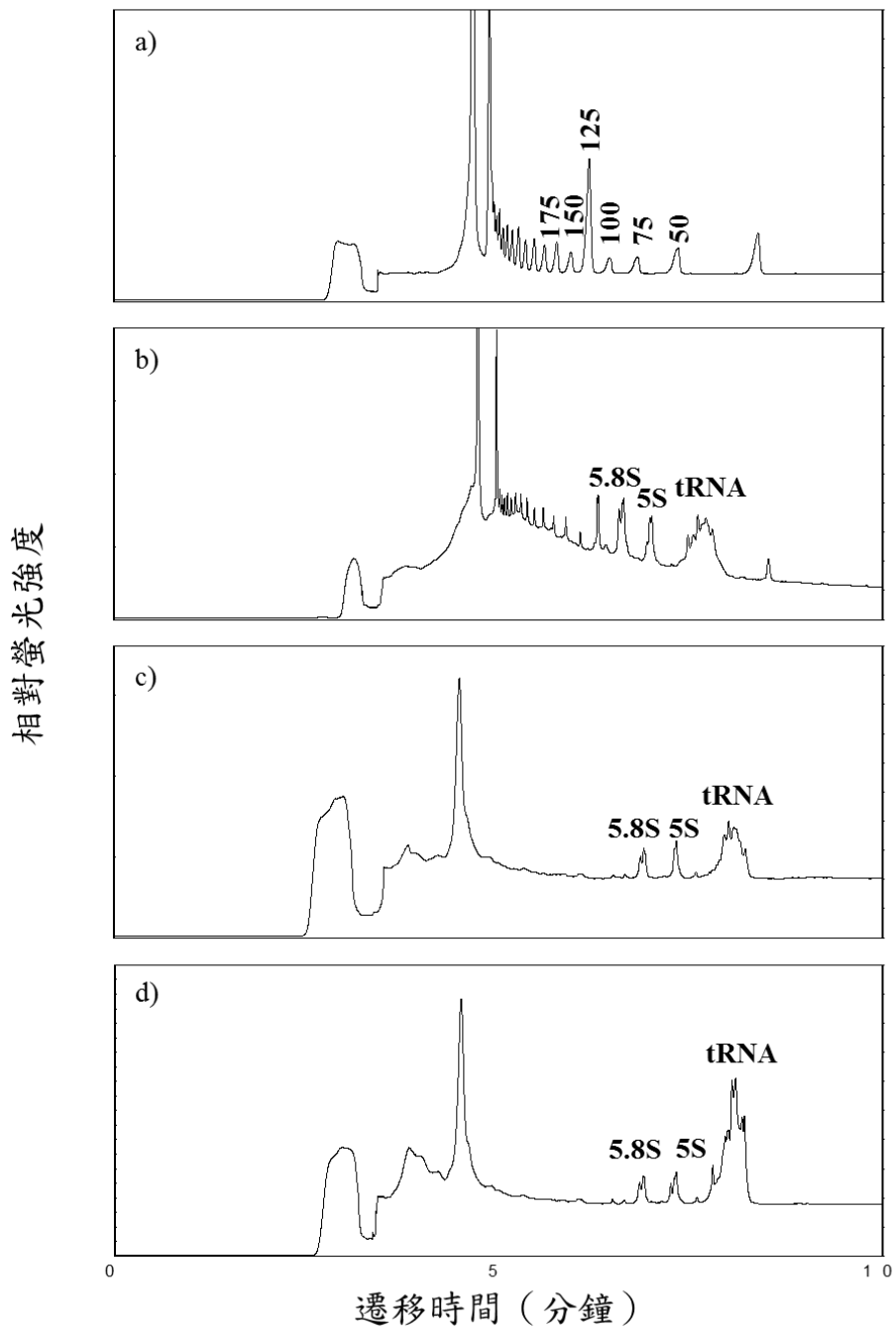


圖 2-10 使用 25 bp DNA Ladder 及 Yeast tRNA 標定小片段 HK-1 的總量 RNA。a) 25 bp DNA Ladder。b) 25 bp DNA Ladder 加入 HK-1 的總量 RNA。c) HK-1 的總量 RNA。d) HK-1 的總量 RNA 加入 Yeast tRNA。

bp DNA Ladder，由於 5.8S 片段約為 156 nt、5S rRNA 為 121 nt 及 tRNA 為 72 nt，所以初估訊號峰位置在 70~150 bp，但從圖卻觀察到此三個訊號峰分別在 50 bp、75 bp 及 100 bp 位置，推斷其原因為 RNA 為二極結構而 DNA 為長鏈狀，DNA 在聚合物溶液中的淌度較小，所以 DNA 會先被偵測到，因此 5.8S、5S rRNA 及 tRNA 才會落在 50~100 bp 位置。圖 2-10(d) 為 HK-1 的總量 RNA 加入 Yeast tRNA，與圖 2-10(c) RNA 電泳圖相比，觀察到最後一個訊號峰強度明顯增強。因此可證明電泳圖中最後三個訊號峰分別為 5.8S、5S rRNA 及 tRNA。

2.3.6 溫度降解 RNA

本實驗利用加熱的方式降解 RNA，使 RNA 完整性下降並觀察降解後的變化。許多 RNA 的研究中，在反應前都需將 RNA 做短時間加熱打開氫鍵，為了將 RNA 自行雜合的部位解開，才能減低二級結構隨機纏繞，以便進行一系列的研究^[71]。

為了證明加熱能觀察到 RNA 完整性的降解程度，以加熱 70°C 10 分鐘至 24 小時，觀察其降解之後的變化。圖 2-11(a) 當加熱 70°C 10 分鐘時，與原本實驗條件加熱 70°C 5 分鐘相比沒有太大變化。為了避免每次實驗電滲流遷移時間的些微變化，而無法確切觀察 RNA 之降解，所以加入 PCR 產物作為內標準，此產物為 342 bp^[72]，其遷移時間會在

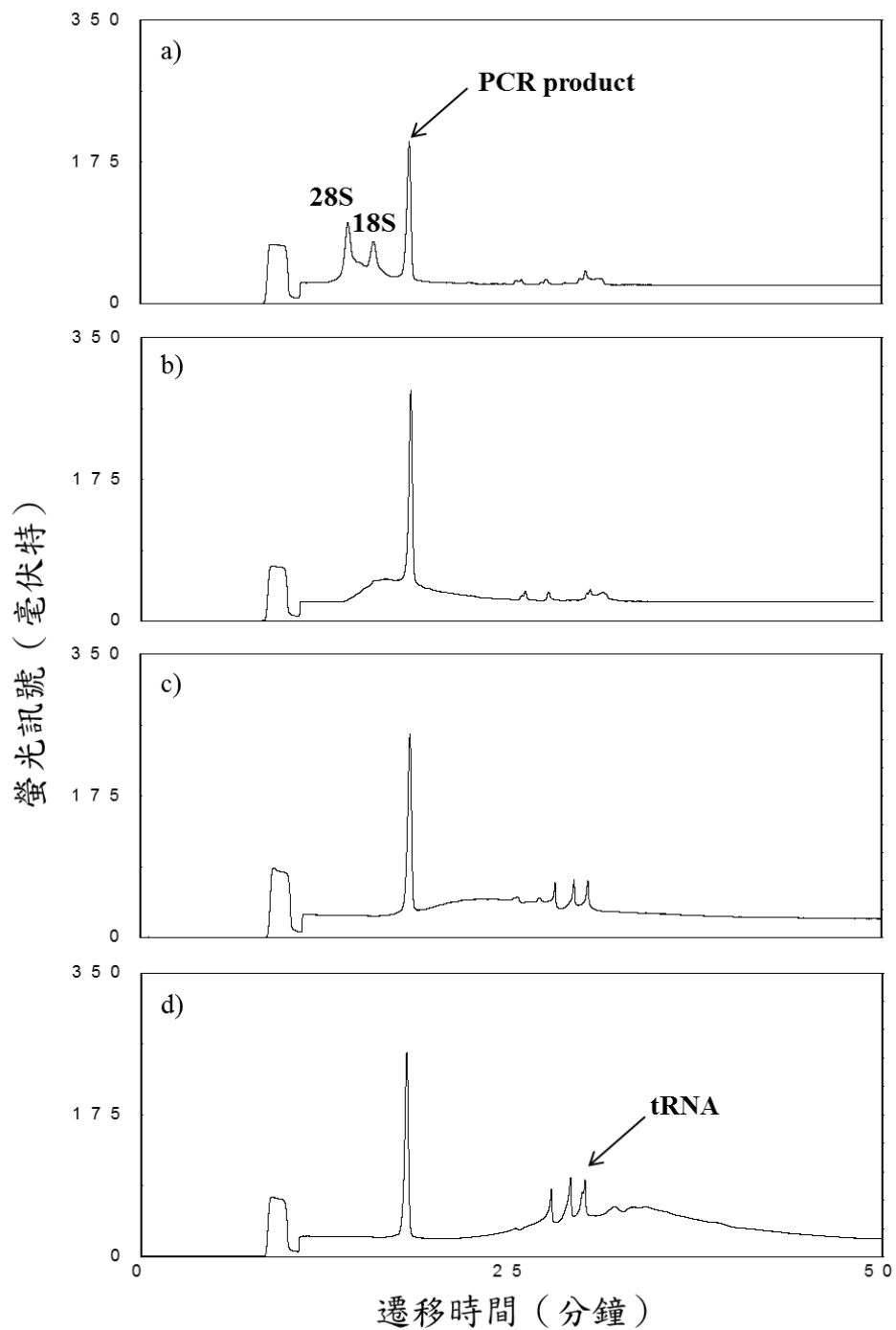


圖 2-11 以 70°C 加熱不同時間，觀察 HK-1 的總量 RNA 降解程度，且加入 342 bp PCR product 當作內標準。a) 加熱 10 分鐘。b) 加熱 1 小時。c) 加熱 8 小時。d) 加熱 24 小時。

18SrRNA (1869 nt) 及小片段 5.8S rRNA (156 nt) 之間。圖 2-11 (b) 當加熱時間提升到 1 小時後，28S 及 18S 大片段之 rRNA，已降解成不同長度。從圖中可看見原本未加熱長時間前可清楚看到 28S 及 18S rRNA 兩個訊峰，加熱 1 小時後遷移時間比加熱 10 分鐘慢，由訊號峰的遷移時間可以判定其降解片段小於 2000 nt。圖 2-11 (c) 當加熱時間增長至 12 小時，從圖觀察到 PCR 產物之後的區域背景值變高，代表著大片段都已被降解成不同片段 rRNA。圖 2-11 (d) 當加熱一天之後，5.8S rRNA 之後的區域背景值變高，代表著大片段 rRNA 皆已降解成約 100 nt 左右。從圖 2-11 (a) ~ (d) 發現 rRNA 較容易受到加熱降解，而 tRNA 經加熱之後沒有降解的情況發生。推斷可能原因為雙股 RNA 經加熱後解開氫鍵形成單股 RNA，而單股 RNA 較雙股 RNA 易受熱水解^[73]。圖 2-12、2-13 及 2-14 為軟體預測的總 RNA 在室溫下及 70°C 的二級結構圖，從圖 2-14 可觀察到 tRNA 的二級結構較為紮實，且其 T_m 約為 72.1°C，所以較不易受到加熱而降解。在合成蛋白質中，tRNA 作為主要傳遞胺基酸的功能，所以 tRNA 的完整性對於後續研究也是相當重要。由圖 2-11，加熱降解 RNA 之數據可證明此系統能成功地監測其降解情況。

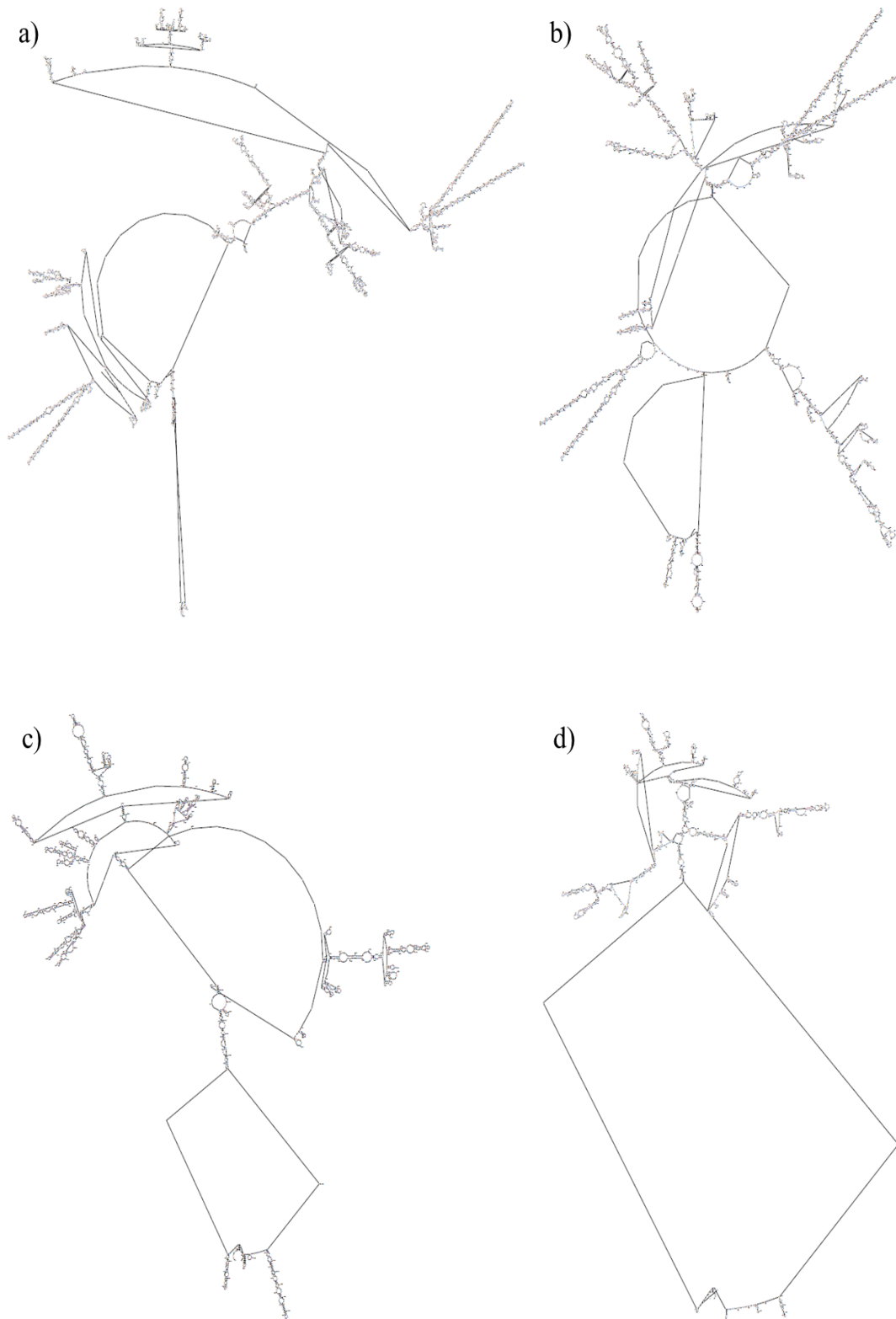


圖 2-12 軟體預測大片段 rRNA 結構圖。a) 25°C 時 28S rRNA。b) 70°C 時 28S rRNA。c) 25°C 時 18S rRNA。d) 70°C 時 18S rRNA。

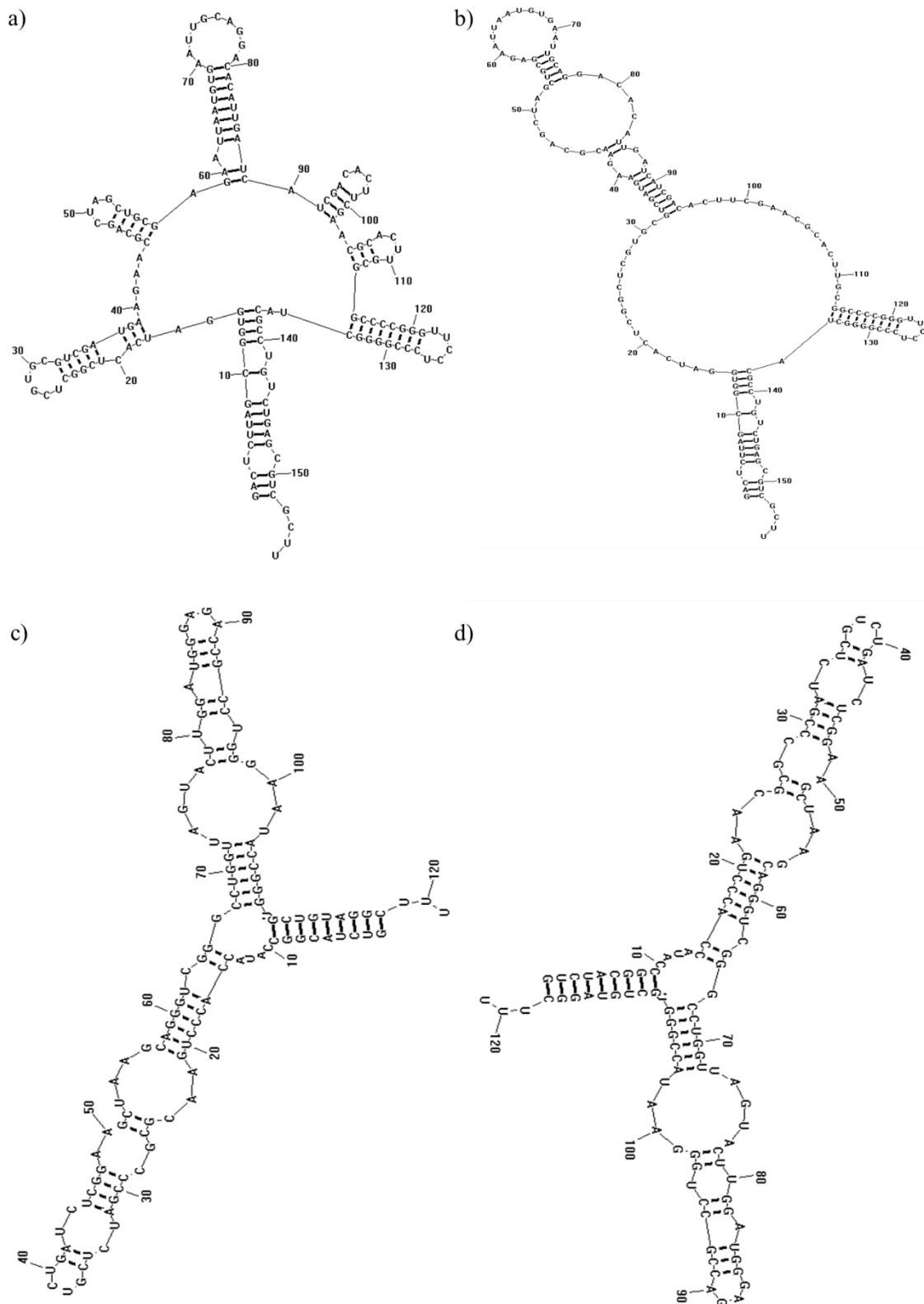
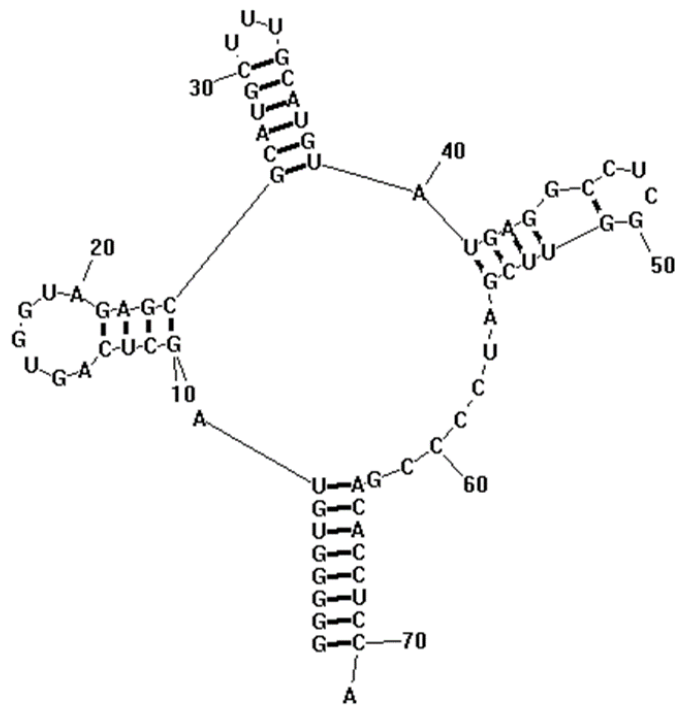


圖 2-13 軟體預測小片段 rRNA 結構圖。a) 25°C 時 5.8S rRNA。b) 70°C 時 5.8S rRNA。c) 25°C 時 5S rRNA。d) 70°C 時 5S rRNA。

a)



b)

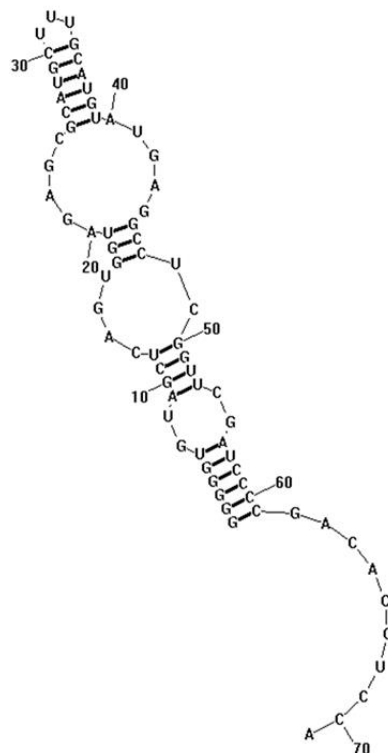


圖 2-14 軟體預測 tRNA 結構圖。a) 25°C 時 tRNA。b) 70°C 時 tRNA。

2.4 結論

此實驗使用了毛細管電泳結合雷射作為激發光源來誘發螢光，並在電滲流存在下分析核糖核酸之完整性。在電滲流存在下進行電泳分離，其毛細管管壁不需要聚合物塗覆，使得毛細管生命期較長。利用虹吸進樣，不需考慮樣品因鹽類而影響進樣總量。最後使用 1.0 % 4 M PEO 及分離電壓 5 kV，可在 25 分鐘內完全分離 28S、18S、5.8S、5S rRNAs 以及 tRNA。並且結合線上樣品濃縮技術，使本系統可偵測到 28S 及 18S rRNA 最低濃度為 100 pg/ μ L，此分析結果不但可以與雷射誘發螢光的微晶片電泳儀器（Agilent 2100 Bioanalyzer）之靈敏度相當。最後利用加熱可成功觀察到 RNA 降解情況，並且發現 tRNA 較不易受到加熱而降解。此實驗成功發展一種快速、操作方便及經濟之方法分析 RNA 之完整性。

2.5 參考資料

1. Groenenboom MA, Maree AF, Hogeweg P: **The RNA silencing pathway: the bits and pieces that matter.** *PLoS Comput Biol* 2005, **1**(2):155-165.
2. Danielson DC, Pezacki JP: **Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein.** *FEBS Lett* 2013, **587**(8):1198-1205.
3. Wang Z, Gerstein M, Snyder M: **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**(1):57-63.
4. McGettigan PA: **Transcriptomics in the RNA-seq era.** *Curr Opin Chem Biol* 2013, **17**(1):4-11.
5. Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ: **Elucidation of the small RNA component of the transcriptome.** *Science* 2005, **309**(5740):1567-1569.
6. Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC: **Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways.** *Genes Dev* 2004, **18**(14):1655-1666.
7. Deutscher MP: **Degradation of stable RNA in bacteria.** *J Biol Chem* 2003, **278**(46):45041-45044.
8. 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 Mol Biol* 2006, **7**:3.
9. Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci U, Kornacker K: **Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis.** *Nature Genetics* 2003, **35**(4):292-293.
10. 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.
11. Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M: **RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling.** *BMC Biotechnol* 2009, **9**:102.
12. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT *et al*: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**(6871):530-536.
13. Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C *et al*: **Classification and diagnostic**

- prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks.** *Nat Med* 2001, **7**(6):673-679.
14. 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 Medical Genomics* 2010, **3**:36.
 15. Alberts B: **Molecular Biology of the Cell, 4th ed., Garland Science, New York.** 2002.
 16. Le Pecq JB, Paoletti C: **A new fluorometric method for RNA and DNA determination.** *Anal Biochem* 1966, **17**(1):100-107.
 17. Vendrely R, Alexandrov K, De Sousa Lechner MC, Coirault Y: **Fractionation of ribonucleic acids by 'Sephadex' agarose gel electrophoresis.** *Nature* 1968, **218**(5138):293-294.
 18. Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H: **RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination.** *Biochemistry* 1977, **16**(21):4743-4751.
 19. Bonini JA, Hofmann C: **A rapid, accurate, nonradioactive method for quantitating RNA on agarose gels.** *Biotechniques* 1991, **11**(6):708-710.
 20. Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R: **Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain.** *PCR Methods Appl* 1995, **4**(4):234-238.
 21. 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.** *J Chromatogr A* 2007, **1165**(1-2):219-225.
 22. Manchester KL: **Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations.** *Biotechniques* 1996, **20**(6):968-970.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Hu S, Dovichi NJ: **Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers.** *Anal Chem* 2002, **74**(12):2833-2850.
 26. Kennedy RT: **Bioanalytical applications of fast capillary electrophoresis.** *Anal Chim Acta* 1999, **400**:163-180.
 27. Issaq HJ: **A decade of capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2000, **21**(10):1921-1939.
 28. Paez X, Hernandez L: **Biomedical applications of capillary electrophoresis**

- with laser-induced fluorescence detection.** *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 2001, **22**(7-8):273-289.
29. Nai YH, Powell SM, Breadmore MC: **Capillary electrophoretic system of ribonucleic acid molecules.** *J Chromatogr A* 2012, **1267**:2-9.
 30. Heller C: **Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):629-643.
 31. Skeidsvoll J, Ueland PM: **Analysis of RNA by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(9):1512-1517.
 32. Todorov TI, de Carmejane O, Walter NG, Morris MD: **Capillary electrophoresis of RNA in dilute and semidilute polymer solutions.** *Electrophoresis* 2001, **22**(12):2442-2447.
 33. Li Z, Dou X, Ni Y, Chen Q, Cheng S, Yamaguchi Y: **Is pulsed electric field still effective for RNA separation in capillary electrophoresis?** *J Chromatogr A* 2012, **1229**:274-279.
 34. Han F, Lillard SJ: **Monitoring differential synthesis of RNA in individual cells by capillary electrophoresis.** *Anal Biochem* 2002, **302**(1):136-143.
 35. Zabzdyr JL, Lillard SJ: **Electrophoretic profiling of both RNA and protein from a single 250-pL sample.** *Anal Chem* 2002, **74**(8):1857-1862.
 36. Han F, Lillard SJ: **In-situ sampling and separation of RNA from individual mammalian cells.** *Anal Chem* 2000, **72**(17):4073-4079.
 37. Sumitomo K, Sasaki M, Yamaguchi Y: **Acetic acid denaturing for RNA capillary polymer electrophoresis.** *Electrophoresis* 2009, **30**(9):1538-1543.
 38. Goldsmith JG, Ntuen EC, Goldsmith EC: **Direct quantification of gene expression using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *Anal Biochem* 2007, **360**(1):23-29.
 39. Zhang N, Yeung ES: **Genetic typing by capillary electrophoresis with the allelic ladder as an absolute standard.** *Anal Chem* 1996, **68**(17):2927-2931.
 40. Chang HT, Yeung ES: **Poly(ethyleneoxide) for high-resolution and high-speed separation of DNA by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995, **669**(1):113-123.
 41. Kim Y, Yeung ES: **Separation of DNA sequencing fragments up to 1000 bases by using poly(ethylene oxide)-filled capillary electrophoresis.** *J Chromatogr A* 1997, **781**(1-2):315-325.
 42. Madabhushi RS, Vainer M, Dolnik V, Enad S, Barker DL, Harris DW, Mansfield ES: **Versatile low-viscosity sieving matrices for nondenaturing DNA separations using capillary array electrophoresis.** *Electrophoresis* 1997, **18**(1):104-111.
 43. Khandurina J, Chang HS, Wanders B, Guttman A: **Automated high-throughput RNA analysis by capillary electrophoresis.** *Biotechniques*

- 2002, **32**(6):1226, 1228, 1230.
44. Cellai L, Onori AM, Desiderio C, Fanali S: **Capillary electrophoretic analysis of synthetic short-chain oligoribonucleotides.** *Electrophoresis* 1998, **19**(18):3160-3165.
 45. Kolesar JM, Allen PG, Doran CM: **Direct quantification of HIV-1 RNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997, **697**(1-2):189-194.
 46. Sobczak K, Krzyzosiak WJ: **RNA structure analysis assisted by capillary electrophoresis.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(22):e124.
 47. Lazard M, Meinnel T: **Role of base G-2 of pre-tRNA^fMet in cleavage site selection by Escherichia coli RNase P in vitro.** *Biochemistry* 1998, **37**(17):6041-6049.
 48. 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.
 49. 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.
 50. Bryant S, Manning DL: **Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA.** *Methods Mol Biol* 1998, **86**:69-72.
 51. 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.
 52. Mucic RC, Storhoff JJ, Mirkin CA, Letsinger RL: **DNA-Directed Synthesis of Binary Nanoparticle Network Materials.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**:12674.
 53. Reuter JS, Mathews DH: **RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis.** *BMC Bioinformatics* 2010, **11**:129.
 54. Xiong Y, Park SR, Swerdlow H: **Base stacking: pH-mediated on-column sample concentration for capillary DNA sequencing.** *Anal Chem* 1998, **70**(17):3605-3611.
 55. Guttman A: **Sample stacking during membrane-mediated loading in automated DNA sequencing.** *Anal Chem* 1999, **71**(16):3598-3602.
 56. Strege M, Lagu A: **Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries.** *Anal Chem* 1991, **63**(13):1233-1236.
 57. Grossman PD, Soane DS: **Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solutions.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):257-266.
 58. Chen HS, Chang HT: **Electrophoretic separation of small DNA fragments in the presence of electroosmotic flow using poly(ethylene oxide) solutions.**

- Anal Chem* 1999, **71**(10):2033-2036.
59. Maden BE, Dent CL, Farrell TE, Garde J, McCallum FS, Wakeman JA: **Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18 S-rRNA and 28 S-rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones.** *Biochem J* 1987, **246**(2):519-527.
 60. Magalhaes PJ, Andreu AL, Schon EA: **Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria.** *Mol Biol Cell* 1998, **9**(9):2375-2382.
 61. Buckland RA, Maule JC, Sealey PG: **A cluster of transfer RNA genes (TRM1, TRR3, and TRAN) on the short arm of human chromosome 6.** *Genomics* 1996, **35**(1):164-171.
 62. 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.
 63. Li H, Yeung ES: **Selective genotyping of individual cells by capillary polymerase chain reaction.** *Electrophoresis* 2002, **23**(19):3372-3380.
 64. 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.
 65. Zheng J, Yeung ES: **Anomalous radial migration of single DNA molecules in capillary electrophoresis.** *Anal Chem* 2002, **74**(17):4536-4547.
 66. Kang SH, Shortreed MR, Yeung ES: **Real-time dynamics of single-DNA molecules undergoing adsorption and desorption at liquid-solid interfaces.** *Anal Chem* 2001, **73**(6):1091-1099.
 67. Venkov PV, Hadjiolov AA: **Differential stability of 28s and 18s rat liver ribosomal ribonucleic acids.** *Biochem J* 1969, **115**(1):91-94.
 68. Tseng WL, Chang HT: **A new strategy for optimizing sensitivity, speed, and resolution in capillary electrophoretic separation of DNA.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):763-770.
 69. Chiu T-C: **Recent advances in on-line concentration and separation of amino acids using capillary electrophoresis.** *Anal Bioanal Chem* 2013:1-12.
 70. Huang YF, Hsieh MM, Tseng WL, Chang HT: **On-line concentration of microheterogeneous proteins by capillary electrophoresis using SDS and PEO as additives.** *J Proteome Res* 2006, **5**(2):429-436.
 71. 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.

72. Chen HC, Chang YS, Chen SJ, Chang PL: **Determination of the heterogeneity of DNA methylation by combined bisulfite restriction analysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence.** *J Chromatogr A* 2012, **1230**:123-129.
73. Hegg EL, Deal KA, Kiessling LL, Burstyn JN: **Hydrolysis of Double-Stranded and Single-Stranded RNA in Hairpin Structures by the Copper(II) Macrocyclic Cu([9]aneN(3))Cl(2).** *Inorg Chem* 1997, **36**(8):1715-1718.

第三章 組裝暗視野顯微鏡偵測金奈米粒子

3.1 暗視野顯微鏡 (dark-field microscopy) 之簡介

暗視野照明指的是觀察物之背景為暗黑，而對觀察物體輪廓有清晰的映像。相較於傳統亮視野照明，由於觀測之樣品為水溶液其折射係數與水的折射係數相當，導致背景視場對比度低難以觀測。而暗視野照明系統因結構不同，可用於觀測較低弱光訊號之物體，過去暗視野顯微鏡常作為偵測粒子散射光之工具^[1]。

暗視野顯微鏡主要是在普通光學顯微鏡的基礎結構上改造而成，如圖 3-1 所示，利用一個折射聚光鏡 (condenser lens) 及一個擋光片 (field stop) 所組成。擋光片將直射光 (zero-order light) 擋住，只允許未聚焦的散射光由周圍空隙通過，再經由聚光鏡將光柱聚焦於一點並投射在樣品上。進光量與物鏡之數值孔徑 (numerical aperture, N.A.) 成正比，物鏡數值孔徑愈大表示可通過光量愈大。在暗視野顯微鏡中，通常使用的物鏡數值孔徑略小於聚光鏡，因此將樣品置於觀測平台時，物鏡所產生空心光錐入射至樣品上，利用物鏡收集物體所產生之光線散射，最後以目鏡進行觀測。當無任何樣品置於觀測平台時，其空心光錐聚焦後發散，由於物鏡孔徑數值小於聚光鏡，使得空心光錐無法被物鏡所收集，產生深暗背景。暗視野顯微鏡主要利用樣品邊緣輪廓所產生之散射光且背景視野暗黑，與樣品產生較高對比度以利於觀測。因此暗視

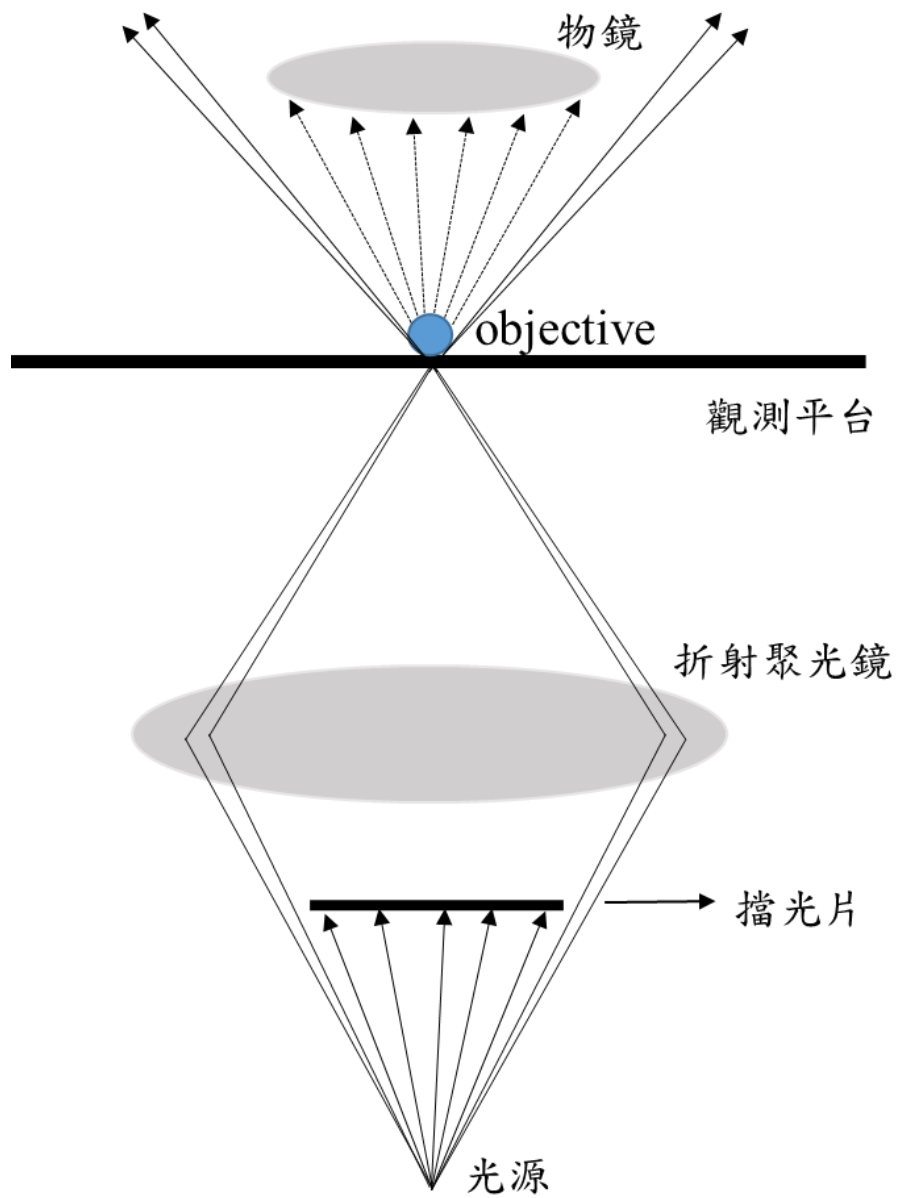


圖 3-1 暗視野顯微鏡光路徑圖

野顯微鏡常用於觀測未染色或金屬奈米粒子等樣品。除了此傳統暗視野成像方法之外，Brown 等人利用偏振技術，只偵測物體其邊緣所反射的散射光，原理與傳統暗視野顯微鏡相同^[2]。而 Yao 等人使用 Axicon 透鏡取代擋光片，保留大部分的光源亮度，藉此得到較高訊噪比 (signal to noise ratio, S/N)，以增強粒子散射光^[3, 4]；亦有學者利用拋物線形狀之反射面作為聚光鏡，獲得較高的孔徑數值及消除因折射光產生的像差現象^[5]。

過去已有許多文獻成功利用暗視野顯微鏡偵測各種不同生物分子，Yeung 等人在暗視野顯微鏡下偵測單一分子，利用金屬奈米粒子具有表面電漿共振之原理，可以即時監測多種的單一奈米粒子，進而發展偵測多種的目標細胞^[6]。Lin 等人在暗視野照明系統架構下，使用連續波長激發光源，成功地在微流體晶片中同時偵測不同大小及不同螢光標記的細胞^[1]。Xie 等人則發展一種具有微秒時間解析度及奈米空間精確度的暗視野顯微鏡，成功地在活細胞中進行金奈米粒子追蹤，未來則希望將此技術應用在其它細胞研究^[7]。Chang 等人利用適體-金奈米粒子 (aptamer-gold nanoparticles) 具瑞利散射之特性，成功地在暗視野顯微鏡中，辨認正常細胞中某些類型的癌細胞^[8]。

3.2 金奈米粒子 (gold nanoparticle, Au NPs) 之簡介

奈米 (nanometer) 是一個尺度的度量單位，一奈米為一公尺的十億分之一，奈米粒子通常指的是尺寸在 1~100 nm 之間，其形狀可分為球狀、線狀、柱狀或層狀。當物質小至奈米尺寸時，可能會出現表面效應 (surface effect)、小尺寸效應 (small size effect)、量子效應 (quantum effect) 等，導致奈米粒子之光學、物理及化學性質都有明顯改變，光學訊號的改變可藉由奈米粒子之顏色變化及吸收波長位移來判定。常用的金奈米粒子尺寸通常為幾奈米到 30 奈米左右，在波長 510~550 nm 之間有特徵吸收峰，隨著粒徑增加，特徵吸收峰也會往長波長位移 (red shift)，且溶液顏色隨著粒子大小的不同而不同。

在感測器中最常使用的奈米材料為金奈米粒子，具有製備簡易、生物相容性高、無毒性、穩定性好及符合經濟效益等優點^[9]。最重要之特性為巯基修飾之探針 (probe) 可藉由金硫 (Au-thiol) 鍵自組裝方式固定於金奈米粒子表面以及金奈米表面吸附能力強之特性將生物分子附著。使得金奈米粒子已廣泛地應用於免疫分析^[10, 11]、DNA 分析^[12, 13]及生物晶片^[14, 15]等研究。

以金奈米粒子作為感測器材料之偵測方法有很多種，包括使用可見光吸收光譜可決定金奈米粒子大小及聚集程度、具有瑞利 (rayleigh) 散射訊號，粒徑及聚集程度愈大散射光愈強、具有表面增強拉曼散射

(surface enhanced raman scattering, SERS)，當分子吸附於金奈米表面時，因表面電漿共振造成局部電場增加，使原本較微弱的拉曼散射訊號增強 $10^4 \sim 10^7$ 倍。以及金奈米粒子具有表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR)，利用分析物吸附於金奈米表面引起介電常數的變化來進行偵測。而本實驗則是利用金奈米粒子本身具有瑞利散射 (rayleigh scattering) 訊號作為偵測。奈米粒子之散射訊號與粒徑的六次方成正比，但吸收訊號只與粒徑三次方成正比，意指當奈米粒子粒徑變大時，散射強度也愈強。因此可利用此特性應用於生物分析，當未加入分析物時散射光強度較弱，而加入分析物時造成金奈米粒子聚集，且粒徑變大，因此散射光訊號也變強。除了金奈米粒子具散射特性之外，過去亦有文獻報導銀奈米粒子 (silver nanoparticle) 其共振瑞利散射效率相當於螢光團 10^6 倍^[16]。

3.2.1 瑞利散射應用於生物檢測及影像

瑞利光散射具有高靈敏度以及高選擇性，將其應用於生物晶片或其它生物檢測及分析上，由於不需要將生物分子進行螢光標記 (labeling)，使瑞利散射可達到快速、即時 (real time)、高靈敏度 (high sensitivity)、不需事先標定生物分子 (label-free)、定性 (qualitative)、定量 (quantitative) 以及可大量平行篩選 (high throughput screening)

等優點，成為具發展潛力的偵測方法之一。

當白光照射到金奈米粒子時，依照粒子的形狀及大小不同，會和特定波長產生共振，使得瑞利散射強度有增強的效果。由於瑞利散射是藉由入射光共振而發光不會因為時間而減弱，所以可長時間觀察粒子運動，但前提是金奈米粒子必須夠穩定，在進行照射實驗後不會因為不穩定造成聚集，而影響實驗的再現性。進年來已有許多文獻利用瑞利散射增強偵測各種生物分子。Mirkin 等人在基板上固定探針 (probe) DNA，當目標 (target) DNA 存在時，將修飾上另一端互補之 probe DNA 金奈米粒子固定於基板表面，再利用銀放大試劑將銀沉積於金奈米粒子表面增強散射訊號^[17]。Sang 等人在金奈米粒子表面修飾 SH-(OEG)₆-COOH 與抗體形成醯胺鍵，當與特定抗原接上時利用暗視野顯微鏡可觀察到瑞利散射增強^[18]。

由於金奈米粒子瑞利散射靈敏度比螢光高，且具有較高的再現性以及可重複使用等優點，相信未來更可以發展到基因學、免疫學、臨床診斷等研究。

3.2.2 布朗運動

西元 1827 年英國植物學家 Robert Brown (布朗) 利用顯微鏡發現懸浮在水中的花粉微粒，不停地作無固定方向的快速運動，稱為布朗運

動 (brownian motion)。布朗運動具有下列的特性包括粒子運動永不停止、粒子運動沒有固定的軌跡、溫度的改變會影響粒子運動以及粒子大小影響粒子運動速度。1905 年愛因斯坦利用布朗運動以及擴散係數的關係，推導出微粒單位時間平均位移以及擴散係數之間關係式。1908 年 Jean Baptiste Perrin 使用暗視野顯微鏡測量已知粒徑的布朗運動位移，證明了愛因斯坦推導之公式是正確的。

3.3 實驗部分

3.3.1 實驗試藥

四氯金酸鈉(sodium tetrachloroaurate(III)dehydrate)係向美國 Alfa-Aesar 購買、檸檬酸鈉(sodium citrate tribasic)、MPA(3-mercaptopropionic acid)係向美國 Sigma-Aldrich 購買。

3.3.2 暗視野顯微鏡裝置圖

此系統整合不同元件建立於 Olympus 公司所製造之倒立式顯微鏡 (inverted microscopes) IX70 型，並配合物鏡型暗視野照明 (objective type-dark-field illumination) 進行偵測。圖 3-2 為物鏡型暗視野顯微鏡裝置圖，本實驗主要是參考過去文獻裝置而成^[7, 19, 20]。本實驗激發光源為二極管泵浦固態雷射其激發波長為 532 nm，功率為 25 mW，使用寬帶

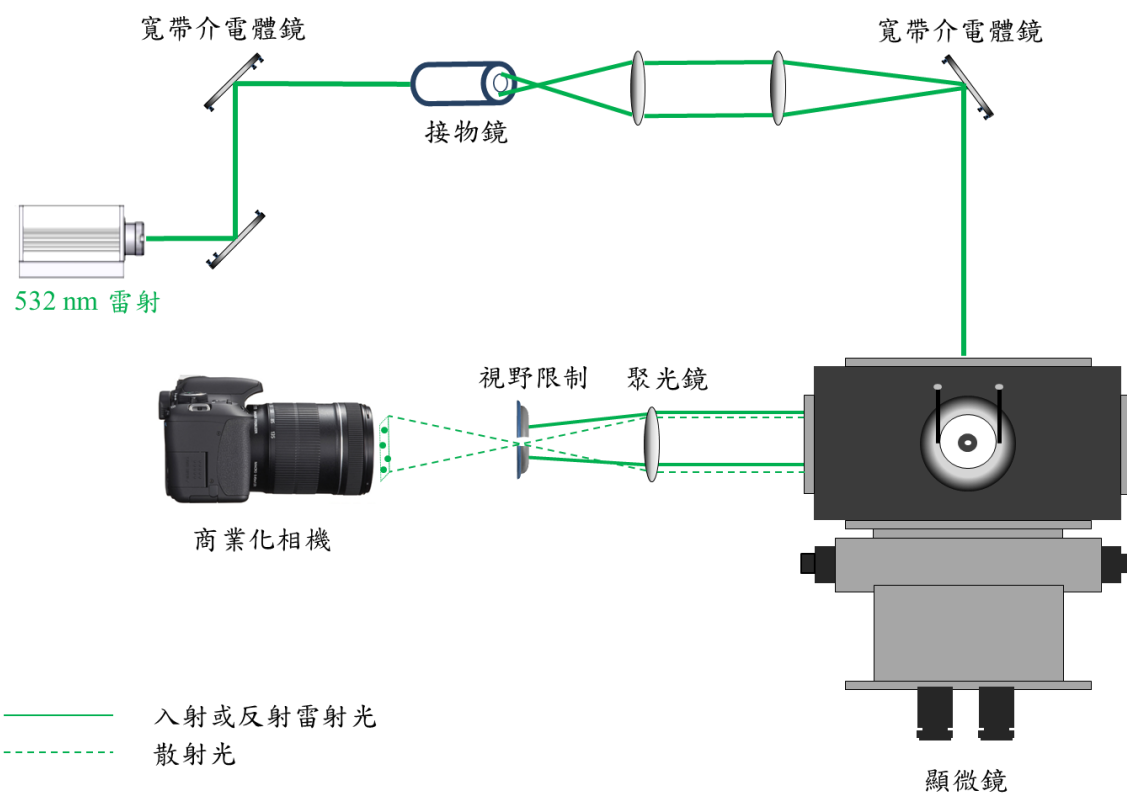


圖 3-2 自組裝暗視野顯微鏡裝置圖

介電體鏡 (broadband electric mirror)、透鏡 (lens) 及 20×低數值接物鏡 (numerical aperture = 0.4) 增強雷射光強度，並將雷射光源反射至顯微鏡背後，接著使用一個小反射鏡呈 45 度角將入射光反射至 20×高數值接物鏡 (numerical aperture = 0.75)，如圖 3-3，並利用一個半圓擋光片 (half-circle Field stop) 改善激發雷射光所產生之強背景光而造成金奈米粒子散射訊號比低弱的缺點。當產生之散射光由顯微鏡側邊出來，利用透鏡收集散射光以及視野限制 (iris) 將多餘反射光移除產生一個乾淨視場。最後使用單眼相機 (Canon EOS 550D, Japan) 收集金奈米粒子散射之影像。

3.3.3 製備金奈米粒子

本實驗使用化學還原法製備金奈米粒子，利用還原劑將 AuCl_4^- 溶液中的三價金離子還原成零價的原子態^[21]。首先於圓底燒瓶中加入 249.75 mL 去離子水，再加入 250 μL AuCl_4^- (0.25 mM)，加熱迴流至完全沸騰，接著加入 2.5 mL 還原劑 sodium citrate tribasic (0.01%)，待溶液變紫色開始計時八分鐘，移開加熱器後使用冰塊降溫，即完成製備^[22]，此時溶液顏色為紫色，在 528 nm 有最大吸收峰，32 nm 金奈米粒子濃度約為 0.27 nM^[23]，圖 3-4 (a) 為 32 nm 金奈米粒子的高解析度穿透電子顯微鏡 (HRTEM, high-resolution transmission electron microscopy,

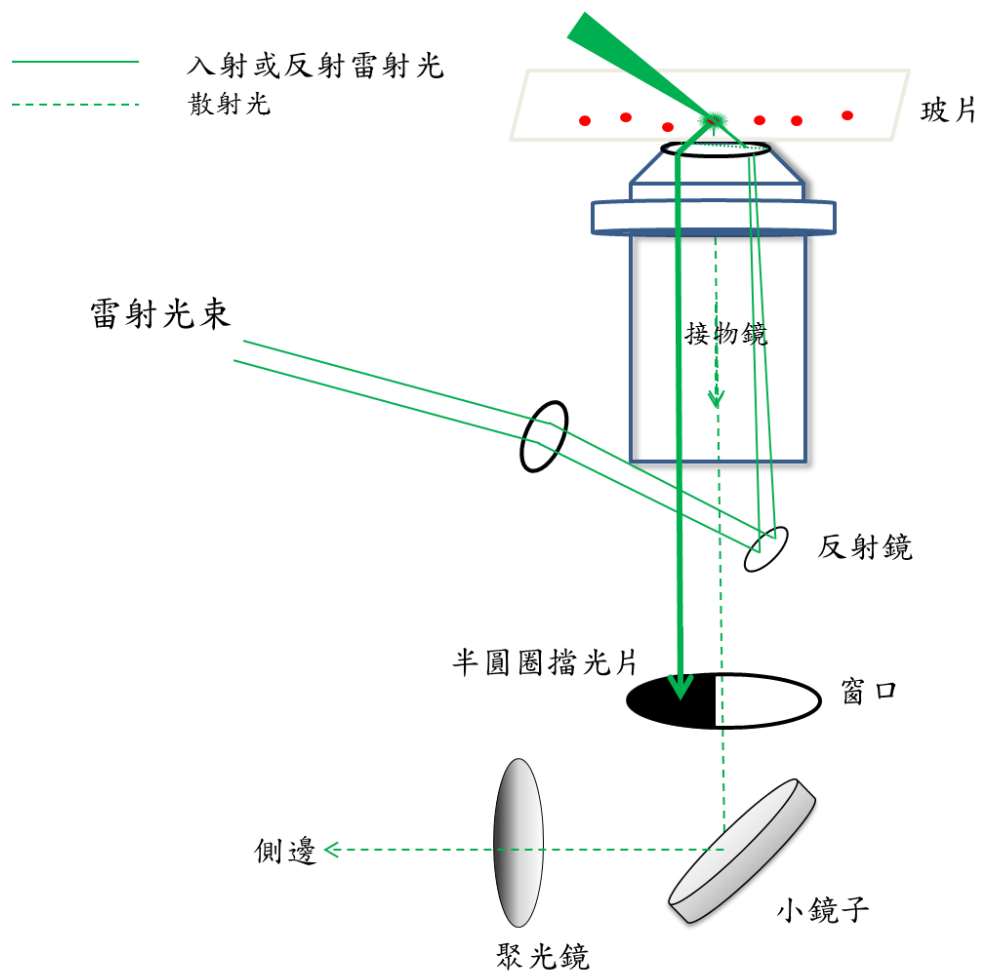


圖 3-3 自組裝暗視野顯微鏡原理圖

JEM-2100, jeol Ltd., Japan) 影像圖，平均粒徑大小為 32.6 ± 2.0 nm。而本實驗合成 13 nm 金奈米粒子^[24, 25]，其製備方法大致與 32 nm 金相同，只改變 AuCl_4^- 及還原劑的濃度，製備步驟為在圓底燒瓶中加入 249 mL 去離子水，再加入 1 mL AuCl_4^- (1 mM) 加熱迴流至沸騰，接著加入 5 mL 的 sodium citrate tribasic (3.88 mM)，待溶液完全變黑色開始計時十五分鐘，其餘步驟與製備 32 nm 金奈米粒子相同，此合成完之溶液為酒紅色，在 518 nm 有最大吸收峰，圖 3-4 (b) 為 13 nm 金奈米粒子的 HRTEM 影像圖，平均粒徑大小為 13.1 ± 0.8 nm。

以上製備完成的金奈米粒子，為了避免金奈米粒子聚集與維持金奈米粒子的穩定狀態，需要將金奈米粒子進行表面修飾，加入 MPA (1×10^{-6} M or 1 mM) 攪拌一天，即完成 Au NPs-MPA 溶液的製備。

3.4 結果與討論

3.4.1 偵測 32 nm 及 13 nm 金奈米粒子

此實驗裝置圖參照過去文獻^[7, 19, 20]，並改進幾個部分包括使用聚光元件增強激發光源、高數值接物鏡提供了一個斜對角視場照明雷射光束和有效的收集金奈米粒子產生的散射光以及使用半圓擋光片改善了激發雷射光所產生之強背景光。

將 32 nm 金奈米粒子溶液加至玻片，放置於觀測平台當轉動 z 軸

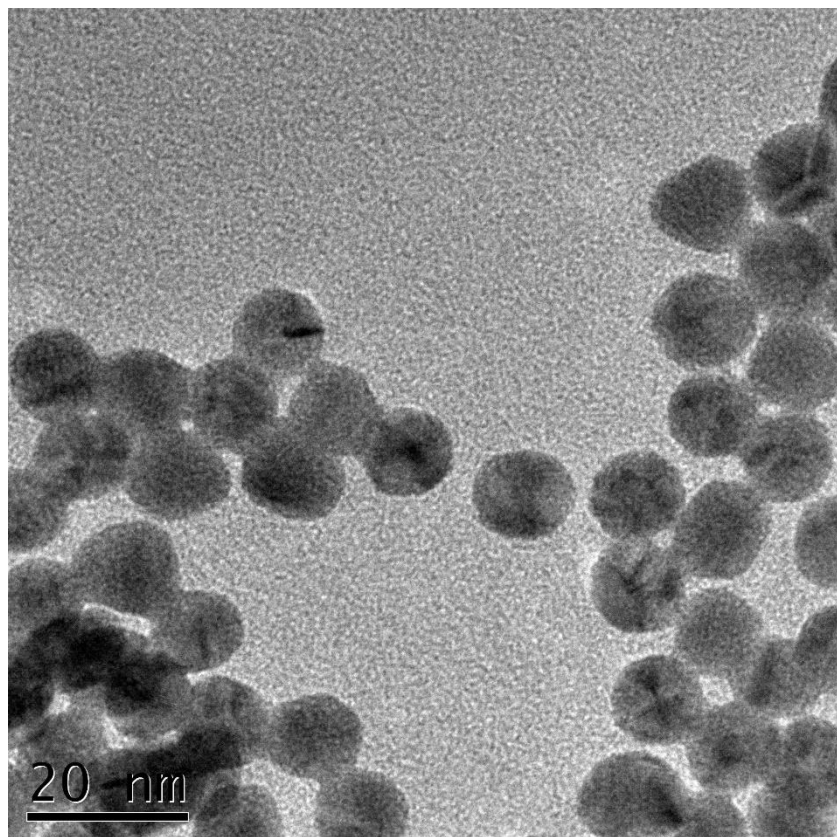
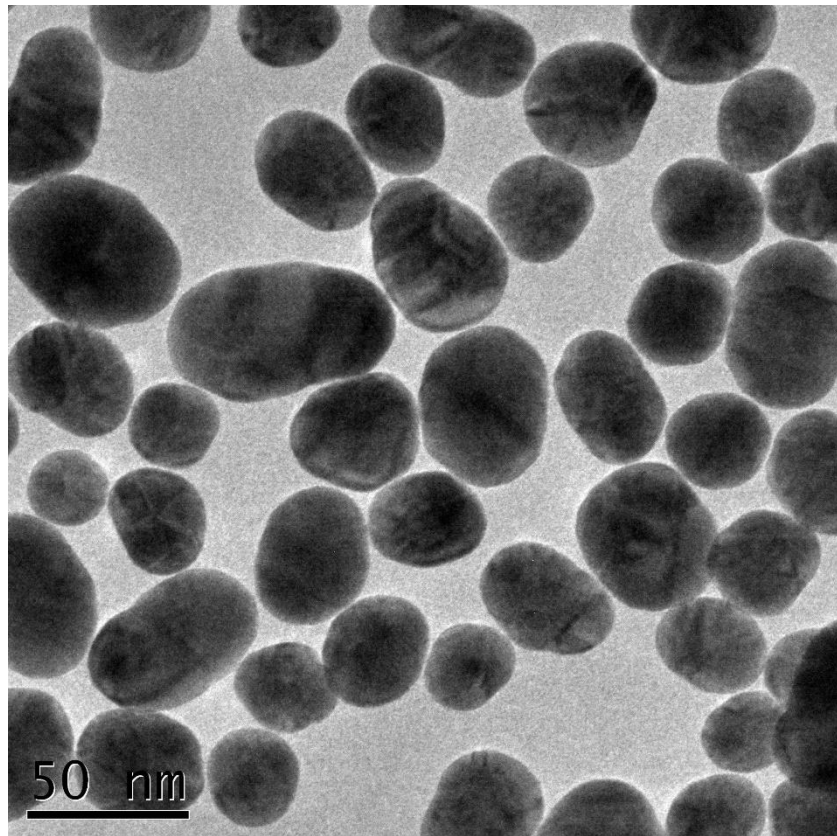


圖 3-4 金奈米粒子高解析度穿透電子顯微鏡圖。a) 32 nm。c) 13 nm。

至焦距時，從相機影像成像中可觀察到視野為暗黑，只看得到單一金奈米粒子散射光，且粒子不停地在進行布朗運動，而圖 3-5 (a)(b) 為 32 nm 金奈米粒子影像擷圖，從圖觀察到每個單一奈米粒子的形狀呈現橢圓形及拖尾情況，推測原因為後面收集散射光之透鏡未到達光聚集之焦點的距離，接著慢慢移動聚光鏡，當調到適當距離時，從圖 3-5 (c) 可以看到金奈米粒子的形狀為圓形，且沒有拖尾情況出現。從這三張圖觀察到由顯微鏡側邊出來的散射光必須需經由透鏡收光，且必須在焦距上才會出現圓形的單一金奈米粒子。接著即可藉由單一 32 nm 金奈米粒子影像圖，使用電腦軟體計算單一金奈米粒子移動軌跡，藉此得知擴散係數，最後經由 Stokes-Einstein 方程式：

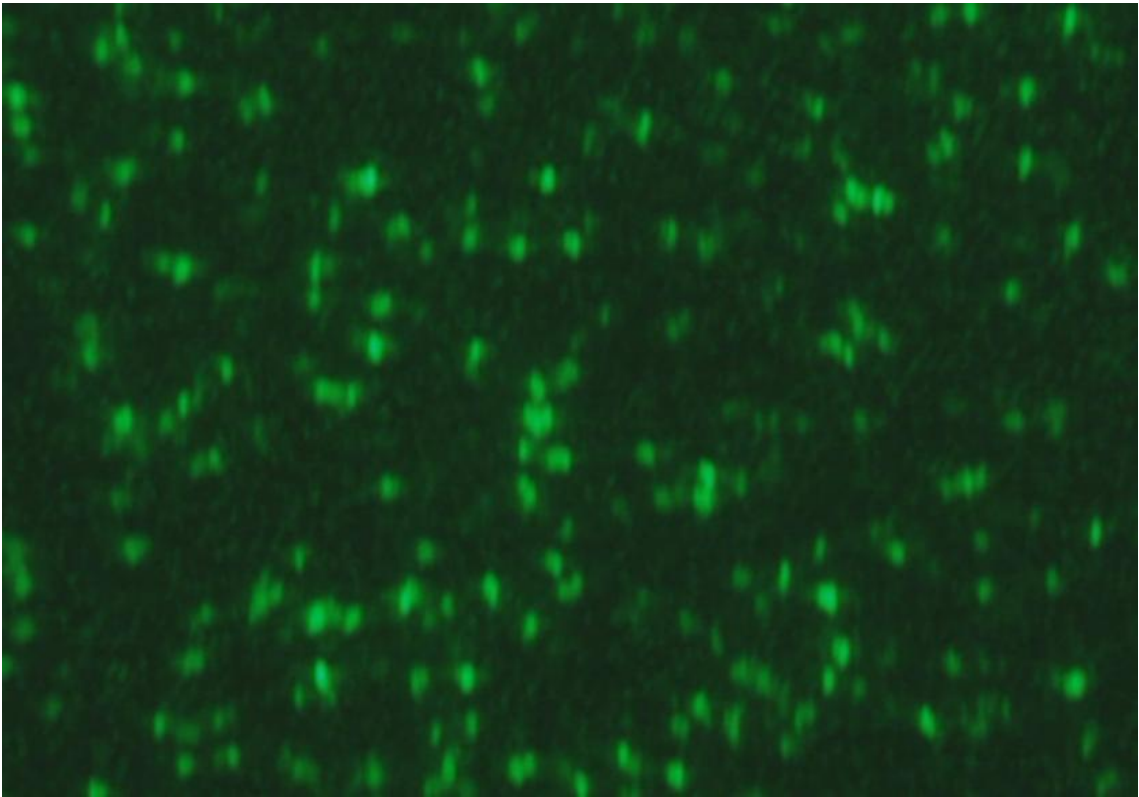
$$d_H = \frac{k_B T}{3 \pi \eta D_t} \quad (3-1)$$

d_H 為粒子半徑， k_B 為波茲曼常數 (boltzmann constant)， T 為絕對溫度， η 為黏度，而 D_t 為擴散係數。將擴散係數代入以上公式即可得到金奈米粒徑。

由於化學或生物感測器的靈敏度經常與感測物體的總表面積有關，而粒子尺寸愈小時，其表面積對體積比大增。所以為了增加實驗靈敏度就必須測試小於 32 nm 的金奈米粒子，以下瑞利方程式為光散射強度與粒徑大小關係式：

$$I \propto \frac{d^6}{\lambda^4} \left| \frac{(n)^2 - 1}{(n)^2 + 2} \right|^2 \quad (3-2)$$

(a)



(b)

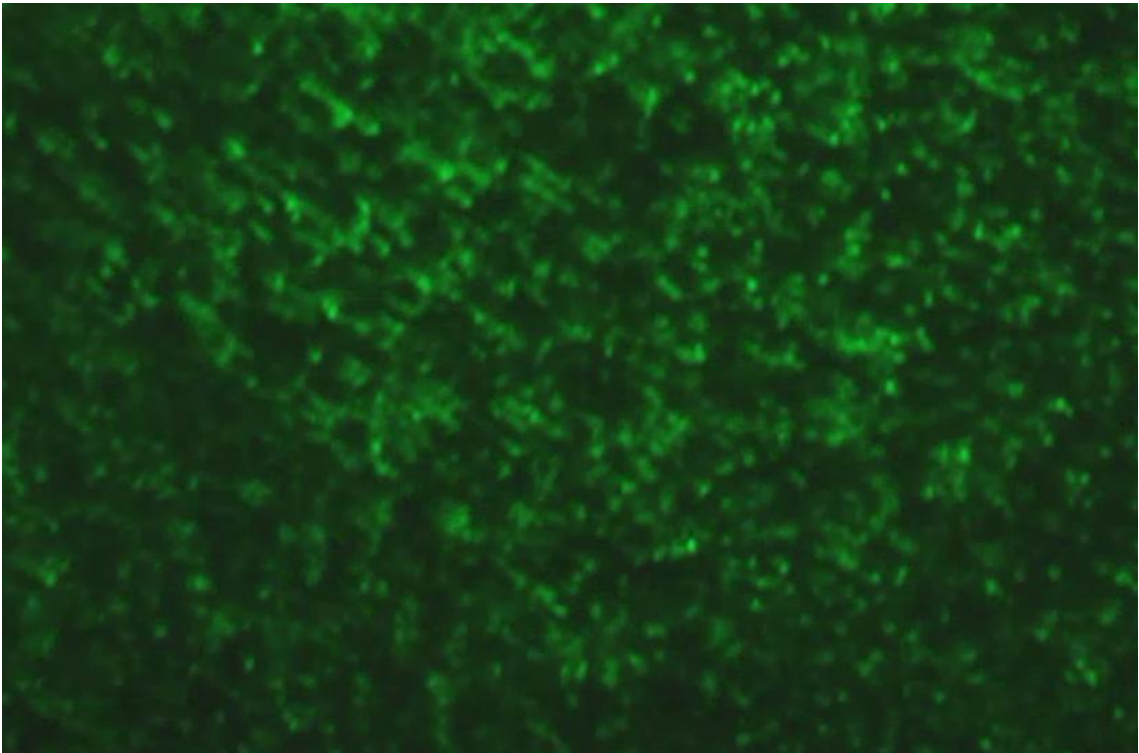


圖 3-5 32 nm 金奈米粒子。a)金奈米形狀為橢圓型。b)拖尾情形。

(c)

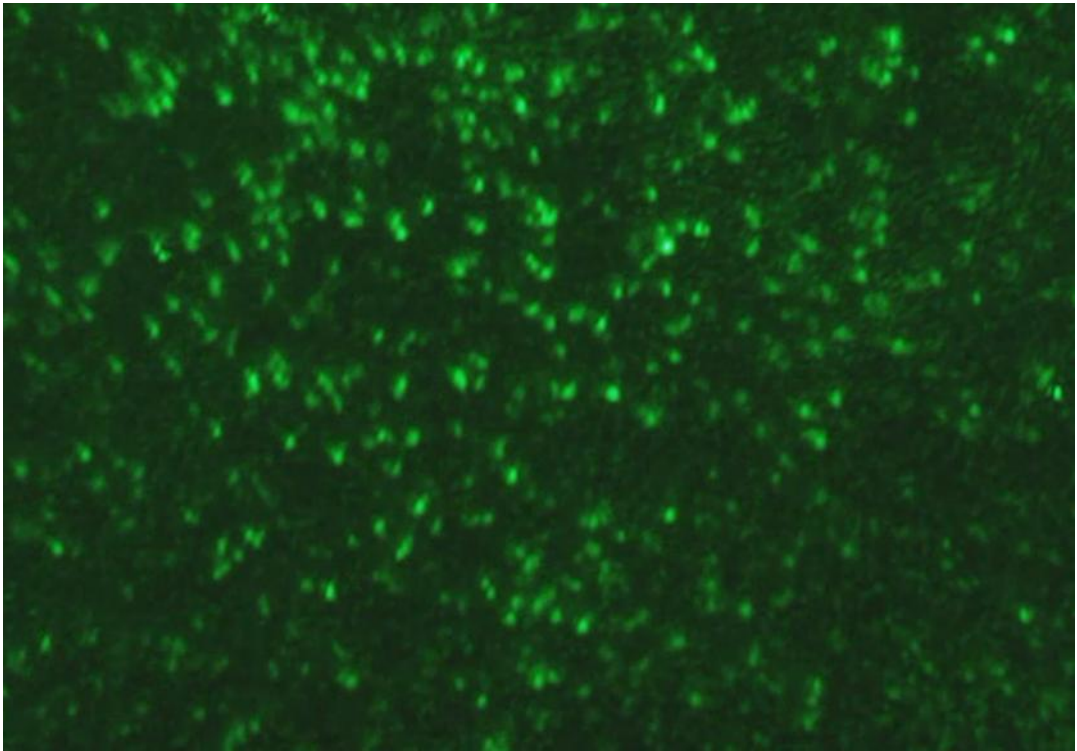
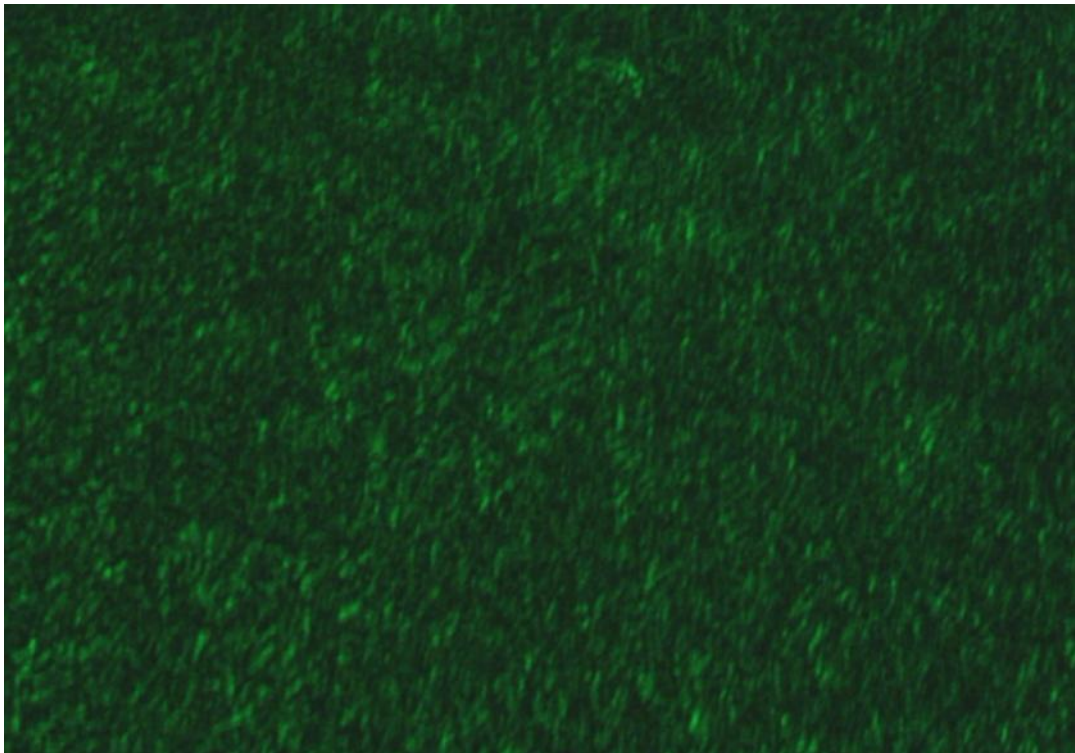


圖 3-5 32 nm 金奈米粒子。c)圓形。

I 為光散射強度， d 為粒子半徑， λ 為照明的波長而 n 是粒子折射率與溶劑折射率之比值（金奈米粒子的 n 值為 2.78，水為 1.33）。

由以上公式得知粒子半徑愈大時瑞利散射光也愈強，當粒子半徑增加 2 倍其光散射強度增強 64 倍，所以理論上 13 nm 金奈米粒子散射光強度會比 32 nm 弱 222 倍。所以觀測 13 nm 金奈米粒子，從影像圖中無法看到任何單一金奈米粒子，推斷可能原因為合成完的金奈米粒子初始濃度太高、反射光造成的高背景值以及移動太快，皆可能造成無法觀測到單一 13 nm 金奈米粒子。首先探討是否因為 13 nm 金奈米粒子濃度太高而無法觀測到單一金奈米粒子，所以使用水作為稀釋液將 13 nm 金奈米粒子稀釋 10 倍，從圖 3-5 (a) 中也沒有觀察到任何單一金奈米粒子。接著再探討是否因移動太快而無法觀測到金奈米粒子，所以使用丙三酸 (Glycerol, 俗稱甘油) 作為稀釋液將 13 nm 金奈米粒子稀釋 10 倍，從圖 3-5 (b) 可觀測到單一金奈米粒子，但無法清楚觀察到是否進行著布朗運動。為了確定使用甘油稀釋確實可以看到單一金奈米粒子，做了一個陰性對照組，圖 3-5 (c) 為甘油影像圖，從圖中也未觀察到有任何的粒子在移動。最後為了證明實驗觀察到的單一 13 nm 金奈米粒子，不是因為使用甘油稀釋而造成 13 nm 金奈米粒子聚集，粒徑變大散射光強度增強才可觀測到單一 13 nm 金奈米粒子，所以實驗透過紫外光可見光吸收光譜 (UV/VIS Spectrophotometer, ultraviolet visible

(a)



(b)

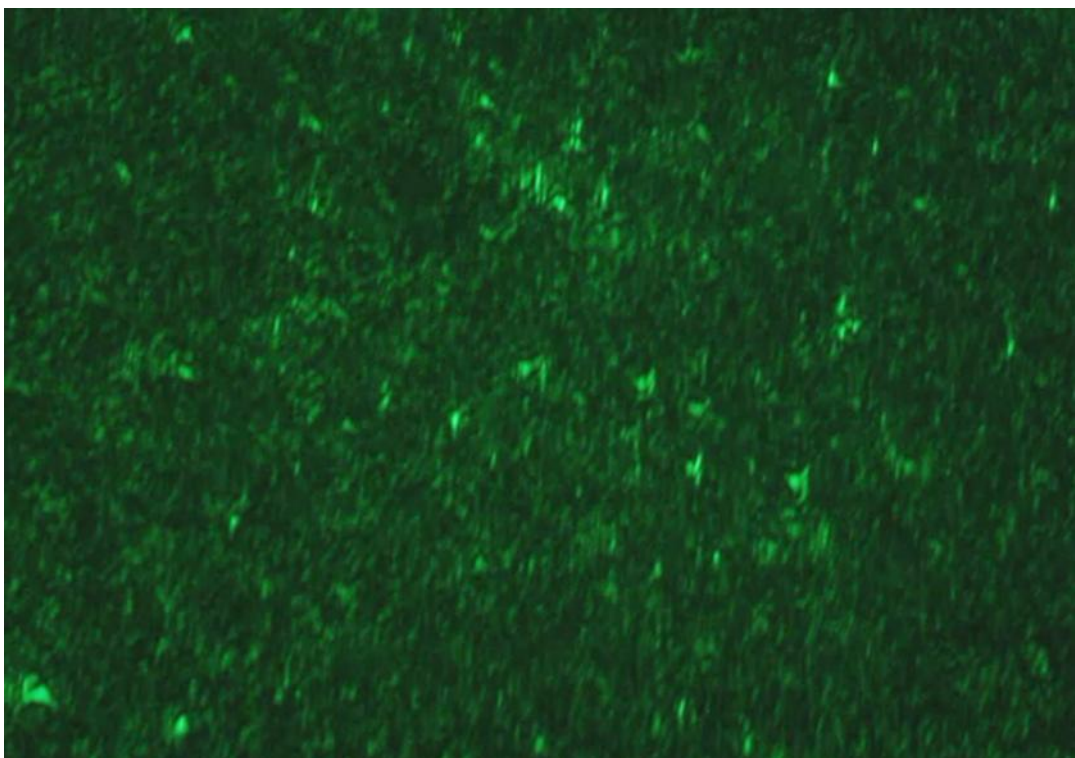
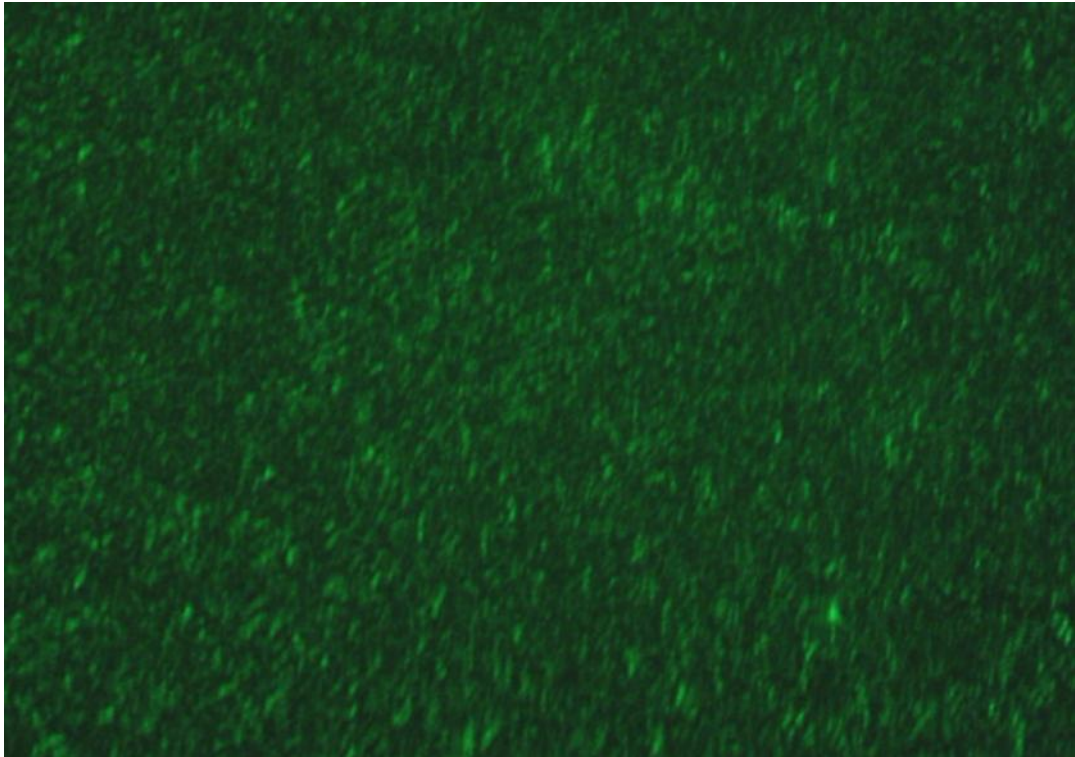


圖 3-6 13 nm 金奈米粒子。a)水稀釋。b)甘油稀釋。

(c)



(d)

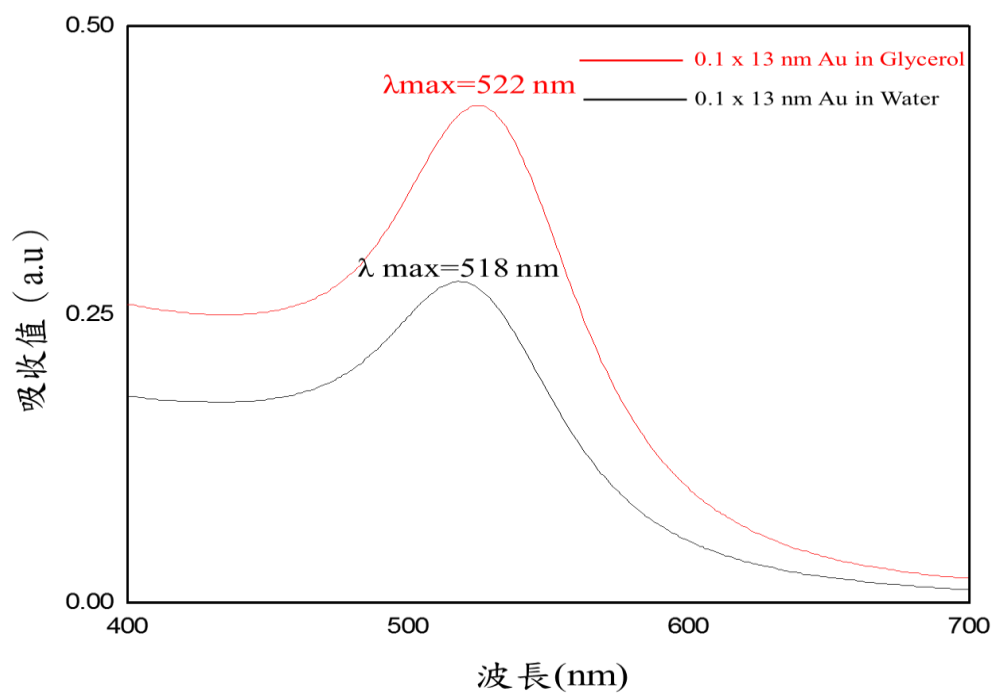


圖 3-6 13 nm 金奈米粒子。c)陰性對照組。d)吸收光譜圖。

spectrophotometer, UV1800, shimadzu Ltd., Japan) 測量金奈米粒子聚集程度，從圖 3-5 (d) 可見光吸收光譜可以觀察到使用水稀釋的 13 nm 金奈米粒子最大吸收峰為 518 nm，而使用甘油稀釋的金奈米粒子最大吸收峰為 522 nm，所以使用甘油稀釋確實會造成 13 nm 金奈米粒子有些微聚集情況發生。因此在未來實驗有必要再找到一個方法，可以降低 13 nm 金奈米粒子移動速度，並且不會造成 13 nm 金奈米粒子聚集。

3.5 結論

此研究發展了一種即時、快速、經濟、水溶液下進行分析以及所需樣品少等優點之方法偵測單一金奈米粒子的布朗運動。本實驗所組裝的物鏡型暗視野顯微鏡，使用高數值接物鏡、半圓擋光片及限制視野，不僅能有效收集金奈米粒子也降低了反射光造成的背景雜訊，增加訊噪比，藉此達到暗視野顯微鏡的特性。此儀器裝置可觀察到單一 32 nm 金奈米粒子的布朗運動，未來可將此影像檔代入電腦軟體中，計算其奈米粒徑大小，使此研究不僅可取代過去常用動態光散射分析儀 (dynamic light scattering, DLS) [26, 27] 及穿透式電子顯微鏡 [28]，也已可與 Nanosight 所生產的奈米追蹤分析儀 (nanoparticle tracking analysis, NTA) [29] 相當。

3.6 未來展望

研究初期已可以即時觀察到單一金奈米粒子的布朗運動，未來目標是發展一種無螢光標記法應用於生物之分析上，由於螢光奈米粒子容易光漂白 (photobleaching) 及光閃爍 (blinking)，而金奈米粒子則能提供一個更強與更穩定的訊號，所以至今已有許多學者利用金奈米粒子取代螢光標記法。其主要應用包括免疫分析、腫瘤細胞治療以及 DNA 分析等研究領域。本實驗未來則是著重在免疫分析上，先在金奈米粒子修飾抗體，當抗體與特定抗原結合後，金奈米粒子的布朗運動速度，會因為抗體吸附於金奈米表面，粒徑變大而造成金奈米粒子移動軌跡改變，藉此方法應用於免疫分析。希望未來可以發展出一種不需任何螢光標之方法偵測各種不同生物分子。然而，要完成此實驗之前還有許多問題需要解決，例如金奈米粒子修飾抗體時，必須在鹽類溶液下才能進行反應，但純化過後的金奈米粒子缺乏還原劑的保護，所以易受到高鹽類影響造成金奈米粒子聚集，而無法進行分析。所以當前最重要的問題為找到一個最佳實驗條件，抗體可修飾在金奈米表面，且沒有聚集情況發生，才能進一步進行免疫分析法。未來如果要提高實驗靈敏度，前提為必須清楚觀測到單一 13 nm 甚至更小的金奈米粒子的布朗運動，可利用靈敏度較高的 CCD 相機或使用其它方法降低背景雜訊，或許有機會清楚看到更小金奈米粒子進行布朗運動，進而增加實驗的靈敏度。

3.7 參考文獻

1. Lin SW, Wang PY, Chen A, Chang CH, Lin CH : **Wavelength-Resolved Flow Cytometer Under a Dark-Field Illumination Configuration.** *IEEE Sens J* 2011, **11**(11) : 2845-2851.
2. Biss DP, Youngworth KS, Brown TG : **Dark-field imaging with cylindrical-vector beams.** *Appl Opt* 2006, **45**(3) : 470-479.
3. Noda N, Kamimura S : **A new microscope optics for laser dark-field illumination applied to high precision two dimensional measurement of specimen displacement.** *Rev Sci Instrum* 2008, **79**(2 Pt 1) : 023704.
4. Lei M, Yao B : **Multifunctional darkfield microscopy using an axicon.** *J Biomed Opt* 2008, **13**(4) : 044024.
5. Debus C, Lieb MA, Drechsler A, Meixner AJ : **Probing highly confined optical fields in the focal region of a high NA parabolic mirror with subwavelength spatial resolution.** *J Microsc* 2003, **210**(Pt 3) : 203-208.
6. Xiao L, Wei L, He Y, Yeung ES : **Single molecule biosensing using color coded plasmon resonant metal nanoparticles.** *Anal Chem* 2010, **82**(14) : 6308-6314.
7. Nan X, Sims PA, Xie XS : **Organelle tracking in a living cell with microsecond time resolution and nanometer spatial precision.** *Chemphyschem* 2008, **9**(5) : 707-712.
8. Huang YF, Lin YW, Lin ZH, Chang HT : **Aptamer-modified gold nanoparticles for targeting breast cancer cells through light scattering.** *J Nanoparts* 2009, **11** : 775-783.
9. Wang Z, Ma L : **Gold nanoparticle probes.** *Coord Chem Rev* 2009, **253** : 1607-1618.
10. Faulk WP, Taylor GM : **An immunocolloid method for the electron microscope.** *Immunochemistry* 1971, **8**(11) : 1081-1083.
11. Liu Y, Liu Y, Mernaugh RL, Zeng X : **Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay.** *Biosens Bioelectron* 2009, **24**(9) : 2853-2857.
12. Harpster MH, Zhang H, Sankara-Warrier AK, Ray BH, Ward TR, Kollmar JP, Carron KT, Mecham JO, Corcoran RC, Wilson WC *et al* : **SERS detection of indirect viral DNA capture using colloidal gold and methylene blue as a Raman label.** *Biosens Bioelectron* 2009, **25**(4) : 674-681.
13. Zhang D, Carr DJ, Alcocilja EC : **Fluorescent bio-barcode DNA assay for the detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis.** *Biosens Bioelectron* 2009, **24**(5) : 1377-1381.

14. Storhoff JJ, Marla SS, Bao P, Hagenow S, Mehta H, Lucas A, Garimella V, Patno T, Buckingham W, Cork W *et al* : **Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system.** *Biosens Bioelectron* 2004, **19**(8) : 875-883.
15. Wang Z, Lee J, Cossins AR, Brust M : **Microarray-based detection of protein binding and functionality by gold nanoparticle probes.** *Anal Chem* 2005, **77**(17) : 5770-5774.
16. Yguerabide J, Yguerabide EE : **Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications.** *Anal Bioanal Chem* 1998, **262** : 157-176.
17. Thaxton CS, Hill HD, Georganopoulou DG, Stoeva SI, Mirkin CA : **A bio-bar-code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release.** *Anal Chem* 2005, **77**(24) : 8174-8178.
18. Cao C, Sim SJ : **Resonant Rayleigh light scattering response of individual Au nanoparticles to antigen-antibody interaction.** *Lab Chip* 2009, **9**(13) : 1836-1839.
19. Braslavsky I, Amit R, Jaffar Ali BM, Gileadi O, Oppenheim A, Stavans J : **Objective-type dark-field illumination for scattering from microbeads.** *Appl Opt* 2001, **40**(31) : 5650-5657.
20. Kim S, Blainey PC, Schroeder CM, Xie XS : **Multiplexed single-molecule assay for enzymatic activity on flow-stretched DNA.** *Nat Methods* 2007, **4**(5) : 397-399.
21. Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ : **Preparation and characterization of Au Colloid Monolayers.** *Anal Chem* 1995, **67**(4) : 735-743.
22. Frens G, Kolloid Z : **Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions.** *Nature* 1973, **241** : 20-22.
23. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ : **Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles.** *langmuir* 2001, **17** : 6782-6786.
24. Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, Natan MJ : **Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers.** *Anal Chem* 1995, **67** : 735.
25. Gearheart LA, Ploehn HJ, Murphy CJ : **Oligonucleotide Adsorption to Gold Nanoparticles : A Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Study of Intrinsically Bent DNA.** *J Phys Chem B* 2001, **105** : 12609-12615.
26. Berne BJ, Pecora R : **Dynamic light scattering : with applications to chemistry, biology, and physics :** Courier Dover Publications; 1976.
27. Bootz A, Vogel V, Schubert D, Kreuter J : **Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles.** *Eur J Pharm Biopharm*

- 2004, **57**(2) : 369-375.
28. Wang Z: **Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies.** *J Phys Chem B* 2000, **104**(6) : 1153-1175.
29. Malloy A, Carr B : **NanoParticle Tracking Analysis–The Halo™ System.** *Part Part Syst Charact* 2006, **23**(2) : 197-204.

總結論

實驗的第一部分是以毛細管電泳暨雷射誘發螢光在電滲流存在下分析總 RNA 之完整性。過去本實驗室學長曾以毛細管電泳在無電滲流存在下分析總 RNA 之完整性，但由於有以下這些缺點，包括毛細管壁必須進行聚合物溶液塗覆，使其生命期較短、使用電動進樣法較容易受到樣品中鹽類，而影響進樣總量以及利用 SYTO 9 染料標定 RNA，雖然靈敏度高但相對的成本也較高。所以本實驗為了改善以上缺點，使用毛細管電泳暨雷射誘發螢光在電滲流存在下分析總 RNA，不僅毛細管壁不需進行聚合物溶液塗覆，使其生命期變長、使用虹吸進樣較不會受到樣品中鹽類而影響進樣總量以及利用溴化乙錠作為標定 RNA 之染料，不僅在一般生化實驗室較易取得且成本也較低。本實驗成功地找到一個最佳實驗條件 1.0 % 4 M PEO 以及分離電壓 5 kV，可在 25 分鐘內完全分離 28S、18S、5.8S、5S rRNA 以及 tRNA。並進行線上濃縮技術增加進樣時間以增加實驗靈敏度，使實驗可偵測到的 28S 及 18S rRNA 最低樣品濃度為 100 pg/ μ l。最後成功地利用加熱監測總 RNA 的降解情況。發展了一種快速、經濟及操作方便之方法分析 RNA 之完整性。

實驗第二部分為組裝暗視野顯微鏡偵測金奈米粒子，實驗自組裝的暗視野顯微鏡，利用高數值接物鏡，可有效收集金奈米粒子散射光，

且使用半圓擋光片與視野限制，可降低激發光源所產生的高背景雜訊，藉此達到暗視野顯微鏡的效果。從暗視野顯微鏡影像中觀察到單一 32 nm 金奈米粒子的布朗運動，未來則可將此影像檔代入電腦軟體中，計算出奈米粒徑大小，使此研究不僅可以取代動態光散射粒徑分析儀及穿透電子顯微鏡，也可與奈米粒子追蹤分析儀相當。發展一種即時、快速、經濟及所需樣品少等優點之方法偵測單一金奈米粒子的布朗運動。

參與學術會議

1. 2012 年中國化學年會
2. 第十八屆分析化學技術交流研討會
3. 第十九屆分析化學技術交流研討會