

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偵測傳遞核醣核酸

Determination of transfer RNA by capillary electrophoresis  
with laser-induced fluorescence

陳涵鈺

Han-Yu Chen

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 105 年 7 月



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偵測傳遞核醣核酸

Determination of transfer RNA by capillary electrophoresis  
with laser-induced fluorescence

陳涵鈺

Han-Yu Chen

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 105 年 7 月

東海大學碩士班研究生  
論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 陳涵鈺 君所提之論文

以毛細管電泳暨雷射誘發螢光偵測

傳遞核醣核酸

Determination of transfer RNA by capillary  
electrophoresis with laser-induced fluorescence.

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授 洪和達 (簽章)

105 年 7 月 2 日

東海大學碩士班研究生  
論文口試委員審定書

化學系 碩士班 陳涵鈺 君所提之論文

以毛細管電泳暨雷射誘發螢光偵測  
傳遞核醣核酸

Determination of transfer RNA by capillary  
electrophoresis with laser-induced fluorescence.

論文口試委員會 召集人 莊曼傑 (簽章)

委員 張和志

林浹蔚

中華民國 105 年 7 月 2 日

## 謝誌

在這二年的碩士生涯中，首先要感謝我的指導教授張柏齡老師，很感謝張老師在實驗上提供許多寶貴的知識，也給予很多鼓勵，我才能順利完成碩士的學業，之後即將步入職場，也會繼續努力的遵循和實踐老師的教誨。感謝兩位口試委員，百忙抽空前來的莊旻傑老師及林泱蔚老師，在論文的修訂上給予專業的意見和指正，使得本論文的内容更加充實。

此外，我要感謝實驗室已經畢業的所有成員們，當我剛進入實驗室時，教導我關於實驗上的知識及技巧，讓我更快進入狀況，還有也要感謝郁萍學姊，帶著我跑公文和報帳等事務。感謝瑋諭跟也唐陪我度過兩年的碩士生活，不管是在實驗上或是日常生活上，都給我很多靈感與支持。謝謝實驗室的成員雅琳、珮綺、芋蓁、心媛、蔚青、肇宣一起幫忙實驗室的相關事宜。另外要感謝系上其他老師對我的關心，及非常感謝化學系系辦藍姐幫忙許多公文的處理。我要感謝東海大學化學系，在我大學到碩士期間給了我無數資源與幫助。最後要謝謝所有老師同學及學弟妹，讓我在碩士這二年的生活中充滿著快樂，也讓我成長許多。

## 中文摘要

傳遞核醣核酸(transfer RNA, tRNA)在蛋白質生成上扮演重要的角色，且近來發現 tRNA 上所攜帶的特定胺基酸與癌症疾病的發展有密切的關係。先前文獻之偵測方法多為使用微陣列(Microarray)及反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)，但此兩種方法所需之成本相對較高，而北方末點法(northern blot)其靈敏度較低。因此發展一種成本較低且樣品不需經過 PCR 放大，可以直接對樣品進行偵測的方法。從先前的研究可得知四種 tRNAs 分別與不同癌細胞相關：Tyr-tRNA 與卵巢癌細胞；Arg-tRNA 與尿路上皮癌細胞；Met-tRNA、Phe-tRNA 與乳癌。此實驗是以毛細管電泳暨雷射誘發螢光(CE-LIF)來探討分離 tRNA 之 3'端處所攜帶不同胺基酸與癌症的關聯。此方法利用 PVP( $M_{ave}$  1,300,000 g/mol)作為分離 tRNAs(Tyr-tRNA、Arg-tRNA、Met-tRNA 及 Phe-tRNA)之篩分介質，並將尿素溶解在聚合物溶液中讓特定長度的短鏈雙股寡核苷酸變性，將雙股的位置解開成單股。於雜合反應過程中添加含氯化鎂之 PCR 緩衝溶液，成功將四種 tRNAs 給分離開來。此實驗之最佳條件可應用於檢測九種人體癌症細胞中的 tRNAs，並使用添加內標準將所有癌症細胞中氨醯 tRNA(Aminoacyl-tRNA)進行定量。其實驗結果與文獻內容相當一致。

## Abstract

Transfer RNA (tRNA) are key adaptor molecules in the protein translation machinery. Recently, several reports have indicated that some tRNA molecules may alter their expression levels in specific cancers. Only a few available methods can be used for the determination of tRNA, for example, microarray, reverse transcription-quantitative PCR and northern blot. However the cost of microarray and RT-PCR are expensive, and northern blot have lower sensitivity. We propose a method for detecting sample directly and without for PCR amplification. Electropherograms of different cancer cells showed varying expression levels of the four tRNAs, which correspond to those reported previously in the literature (Tyr-tRNA for ovarian cancer, Arg-tRNA for urothelial cancer and Met-tRNA and Phe-tRNA for breast cancer). This experiment is based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (CE-LIF) to explore the relation between different amino acids to cancers at the 3'-end of tRNA. Four tRNAs (Tyr-tRNA, Arg-tRNA, Met-tRNA and Phe-tRNA) could be separated by PVP ( $M_{ave}$  1,300,000 g/mol). To denature the specific length oligonucleotide, we will let urea dissolved in the polymer solution. We add the  $MgCl_2$  in sample solution to separate tRNAs when the hybridization reacts. The optimize condition can detect the other nine species tumor cell. Finally, we use internal standard to quantity aminoacyl-tRNA in cancer cell. The results performed as the literature we mention above.

## 總目錄

|           |     |
|-----------|-----|
| 論文摘要..... | I   |
| 總目錄.....  | III |
| 圖目錄.....  | VII |
| 表目錄.....  | IX  |
| 參與會議..... | 101 |

### 第一章 毛細管電泳與核醣核酸簡介

|  |    |
|--|----|
| 1.1 毛細管電泳緒論.....                             | 1  |
| 1.1.1 毛細管電泳的分離模式.....                        | 5  |
| 1.1.1.1 毛細管區帶電泳法(CZE).....                   | 5  |
| 1.1.1.2 微胞電動力層析法 (MEKC).....                 | 6  |
| 1.1.1.3 毛細管凝膠電泳法 (CGE).....                  | 7  |
| 1.1.1.4 毛細管電層析法 (CEC).....                   | 7  |
| 1.1.1.5 毛細管等速電泳法 (CITP).....                 | 8  |
| 1.1.1.6 毛細管等電聚焦法 (CIEF).....                 | 8  |
| 1.1.2 毛細管分離之原理.....                          | 9  |
| 1.1.2.1 淌度(mobility).....                    | 9  |
| 1.1.2.2 電滲流(electroosmotic flow, EOF)產生..... | 10 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1.1.2.3 | 毛細管凝膠電泳之分離機制.....                               | 15 |
| 1.1.2.4 | 毛細管內壁塗覆修飾.....                                  | 19 |
| 1.1.2.5 | 進樣方法.....                                       | 20 |
| 1.1.2.6 | 偵測系統.....                                       | 22 |
| 1.1.3   | 毛細管電泳對生物樣品之應用 .....                             | 23 |
| 1.1.3.1 | DNA 於毛細管電泳之相關應用.....                            | 24 |
| 1.1.3.2 | 基因突變之偵測 .....                                   | 27 |
| 1.2     | 核醣核酸( ribonucleic acid )之簡介 .....               | 31 |
| 1.2.1   | 緒論.....   | 31 |
| 1.2.2   | 核醣核酸歷史 .....                                    | 34 |
| 1.2.3   | 訊息核醣核酸 ( messenger RNA, mRNA ) .....            | 36 |
| 1.2.4   | 核醣體核醣核酸 ( ribosomal RNA, rRNA ) .....           | 36 |
| 1.2.5   | 傳遞核醣核酸 ( transfer RNA, tRNA ) .....             | 37 |
| 1.2.6   | 小分子核醣核酸 ( small RNA, sRNA ) .....               | 40 |
| 1.2.6.1 | 微小核醣核酸 ( mircoRNA, miRNA ) .....                | 40 |
| 1.2.6.2 | 小干擾核醣核酸 ( small interfering RNA, siRNA ) .....  | 42 |
| 1.2.6.3 | piwi 核醣核酸 ( piwi-interacting RNA, piRNA ) ..... | 42 |
| 1.3     | 參考資料.....                                       | 44 |

## 第二章 以毛細管電泳暨雷射誘發螢光偵測傳遞核醣核酸

|   |    |
|---|----|
| 2.1 緒論.....   | 54 |
| 2.2 實驗部分.....   | 59 |
| 2.2.1 實驗試藥.....   | 59 |
| 2.2.2 細胞培養( cell culture ) .....                                      | 61 |
| 2.2.3 核醣核酸萃取( RNA extraction ) .....                                  | 62 |
| 2.2.4 實驗裝置.....   | 64 |
| 2.2.5 毛細管電泳暨雷射誘發螢光 .....  | 66 |
| 2.2.6 毛細管前處理 .....  | 68 |
| 2.2.7 聚合物溶液製備 .....   | 69 |
| 2.2.8 變性電泳系統 .....  | 70 |
| 2.2.9 實驗流程.....   | 71 |
| 2.2.10 雜合反應 ( hybridization ) 與夾板式結合反應 ( splinted<br>ligation ) ..... | 71 |
| 2.2.11 酒精清洗 .....   | 74 |
| 2.2.12 核糖核酸 A ( Ribonuclease A, RNase A ) 之水解作用 .....                 | 76 |
| 2.3 結果與討論.....  | 78 |
| 2.3.1 PCR 緩衝溶液之選擇.....  | 78 |

|                              |    |
|------------------------------|----|
| 2.3.2 聚合物溶液之選擇 .....         | 80 |
| 2.3.3 使用 RNase A 進行水解反應..... | 83 |
| 2.3.4 訊號標幟.....              | 83 |
| 2.3.5 定量癌症細胞中的 tRNAs .....   | 86 |
| 2.4 結論.....                  | 97 |
| 2.5 未來展望.....                | 98 |
| 2.6 參考資料.....                | 99 |

## 圖目錄

|  |    |
|--|----|
| 圖 1-1 電雙層的結構及 $\zeta$ 電位.....                      | 12 |
| 圖 1-2 電滲流及層流的比較圖 .....                             | 14 |
| 圖 1-3 無電滲流的毛細管電泳系統中分離 DNA 片段之示意圖 .....             | 21 |
| 圖 1-4 DNA 轉錄轉譯之示意圖 .....                           | 33 |
| 圖 1-5 tRNA 之二級結構示意圖 .....                          | 38 |
| 圖 1-6 miRNA 生成與調控基因的生化路徑.....                      | 41 |
| 圖 2-1 核糖核酸萃取流程圖 .....                              | 63 |
| 圖 2-2 完整 RNA 之電泳圖 .....                            | 65 |
| 圖 2-3 毛細管電泳暨雷射誘發螢光裝置圖 .....                        | 67 |
| 圖 2-4 實驗設計之流程圖 .....                               | 73 |
| 圖 2-5 酒精清洗示意圖.....                                 | 75 |
| 圖 2-6 核糖核酸酶 A (Ribonuclease A, RNase A) 水解反應示意圖 .. | 77 |
| 圖 2-7 PCR 緩衝溶液之選擇.....                             | 79 |
| 圖 2-8 於不同 pH 值緩衝溶液下探討 EOF 的變化 .....                | 81 |
| 圖 2-9 聚合物緩衝溶液之選擇 .....                             | 82 |
| 圖 2-10 使用 RNase A 將各別 4 種 tRNAs 進行水解反應.....        | 84 |
| 圖 2-11 訊號標幟.....                                   | 85 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 圖 2-12 進行不同 RNA 濃度之測定.....      | 87 |
| 圖 2-13 RNA 之濃度對螢光強度作圖.....      | 88 |
| 圖 2-14 分離九種人體癌症細胞中之 tRNAs ..... | 90 |
| 圖 2-15 分離九種人體癌症細胞中之 tRNAs ..... | 91 |
| 圖 2-16 九種癌症細胞之完整性 .....         | 92 |
| 圖 2-17 於真實樣品中添加內標準進行定量 .....    | 94 |

## 表目錄

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 表 2-1 檢測 tRNA 之方法比較.....       | 58 |
| 表 2-2 實驗所用之核苷酸 .....           | 60 |
| 表 2-3 九種癌症中之 tRNAs 訊號表現量 ..... | 95 |

# 第一章 毛細管電泳與核糖核酸簡介

## 1.1 毛細管電泳緒論

電泳(electrophoresis)是指將具有帶電荷粒子的溶液在一外加電場作用下，使溶液中的帶電粒子發生遷移的現象，此為庫倫靜電力所造成的結果。電泳的技術是在 20 世紀初由 Michaelis 提出<sup>[1]</sup>。而電泳之所以可以達到分離的效果是利用不同荷質比( $z/m$ )的帶電粒子產生不同的遷移速度。瑞典科學家 Aren Tiselius 改善電泳之技術，並投入於血清蛋白的研究，因此成功在 20 世紀中證明血漿蛋白是由白蛋白及  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三大類的球蛋白所組成的<sup>[2]</sup>。由於 Tiselius 在電泳技術方面做出的開拓性貢獻，且其在化學及生化領域上是一種非常重要的技術，使得 Tiselius 在 1948 年獲得諾貝爾化學獎之殊榮。

電泳的技術發展至今已有百年的歷史。由於早期的電泳是在自由溶液下操作的，但在自由溶液下進行實驗會產生熱擴散及對流的問題，進而造成譜帶變寬及解析度不佳。之後科學家將研究朝向使用流動性較差的凝膠介質來作為篩分 (sieving) 樣品的物質，即為平板凝膠電泳 (slab gel electrophoresis)<sup>[3-5]</sup>。平板凝膠電泳是以凝膠板方式進行，分離依據為樣品分子的大小。此技術適合用於分子量較大的樣品，如蛋白質 (protein)、去氧核糖核酸 (DNA)、胜肽 (peptide) 等生物樣品。平板凝膠電泳最大的問題在於採用高電壓分離時所產生的焦耳熱，

會造成平板從中心至兩側或管柱內徑中的黏度與速度產生梯度變化，導致分析物區帶變寬、降低分離效率，且其影響會隨電場強度增加而加大，因而限制了電壓的使用範圍，以致分離時間過長。為了改善這些問題，瑞典科學家 Hjérten 於 1967 年成功使用內徑為 3 mm 的石英管柱取代傳統管柱，並改善散熱效率。這項技術成功分離蛋白質、核酸、病毒及無機離子<sup>[6]</sup>。1974 年，Virtanen 及 Mikkers 以內徑 0.2~0.5 mm 的玻璃毛細管來進行實驗，成功將十六種陰離子在十分鐘內分離出來<sup>[7]</sup>，也證實了使用內徑較小之毛細管可控制焦耳熱的產生。但仍受限於靈敏度不夠及內徑太大而無法在高電壓下分離等問題。於是 1981 年 Jorgenson 和 Lukacs 利用內徑 75 $\mu$ m 的毛細管柱來分離胺基酸之衍生物<sup>[8, 9]</sup>，並以螢光的方法進行偵測，靈敏度及電滲流的問題也一同解決。且因為內徑變得更小，散熱效果變得更好，故可以使用較高電場來進行分離。這證明毛細管區帶電泳法（capillary zone electrophoresis, CZE）<sup>[10]</sup>是一種高效率且具實用價值的分離技術。近年來發展出許多不同的毛細管電泳分離模式，包括毛細管區帶電泳法等六種分離模式。其餘五種為毛細管等電聚焦法（capillary isoelectric focusing, CIEF）<sup>[11]</sup>、微胞電動力層析法（micellar electrokinetic chromatography, MEKC）<sup>[12]</sup>、毛細管凝膠電泳法（capillary gel electrophoresis, CGE）<sup>[13]</sup>、毛細管電層析（capillary

electrochromatography, CEC)<sup>[14]</sup>、以及毛細管等速電泳法 (capillary isotachopheresis, CITP)<sup>[15]</sup>。隨著時代的變遷，科技的進步，近幾年有將電泳系統發展於微晶片上進行分離的研究。因為現今社會都追求以微小化來進行實驗。因此科學家將小型化後的微晶片，利用線壓法或蝕刻的技術在晶片上刻出小通道 (channel)<sup>[16, 17]</sup>，於其上進行電泳分離。其優點為樣品需求量更低、分析時間短及高通量之效果。未來發展趨勢為將實驗的所有過程，包含前處理、分離及偵測同時在一個晶片上完成，因而有晶片實驗室 (Lab-on-a-chip) 之詞誕生<sup>[18]</sup>。

傳統平板凝膠電泳和毛細管凝膠電泳皆是利用凝膠介質的篩分機制在毛細管中進行電泳分離。比起平板凝膠電泳耗時、製備繁瑣、分析效能不佳等缺點<sup>[19]</sup>，毛細管凝膠電泳具有速度快、解析度佳、靈敏度高、所需樣品量少及自動化操作等優點。傳統平板凝膠電泳所用的介質以交聯性的聚丙烯醯胺 (cross-linked polyacrylamide, CPA)<sup>[20]</sup> 為主，毛細管凝膠電泳所用之凝膠也沿用交聯性的聚丙烯醯胺，但此種凝膠介質黏度過高，無法利用壓力的方式來將其填充至毛細管中，所以只能直接在毛細管內進行聚合反應，但使用此方法會產生些許問題，例如：熱效應、產生氣泡、體積的差異等問題。且因毛細管內部空間狹小，也無法確定聚合反應是否完全，因此造成製備好的毛細管再現性不佳，凝膠壽命不長。所以學者們開始找尋其他凝膠介質

來代替。1989 年，Zhu 和 Colbum 等人利用非交聯性的線性聚合物作為篩分介質，成功分離 DNA 片段<sup>[21, 22]</sup>。此種聚合物之黏度比交聯性聚合物來的低，且也不須在毛細管內部進行聚合反應，所以就可以使用壓力將聚合物推入至毛細管中。且實驗結果顯示利用線性聚合物來進行分離之結果，不僅大大提升實驗之再現性，毛細管的壽命也提升不少。現今毛細管凝膠電泳所用之分離介質以線性聚合物為主，包括線性聚丙烯醯胺（linear polyacrylamide, LPA）<sup>[23, 24]</sup>、聚乙醇（polyvinyl alcohol）<sup>[25]</sup>、聚環氧乙烷（poly（ethylene oxide）, PEO）<sup>[26, 27]</sup>、瓊脂膠（agarose）<sup>[28]</sup>及各種纖維素（cellulose）<sup>[29-31]</sup>之衍生物等。

目前毛細管凝膠電泳發展已經相當成熟，以往所面臨的問題也依依解決，甚至具有自動化及多樣性之設計等優點。毛細管電泳已經成為分離生物樣品的重要工具，包含 DNA<sup>[32]</sup>、RNA<sup>[33]</sup>、蛋白質（protein）<sup>[34]</sup>、胺基酸（amino acid）<sup>[35, 36]</sup>、醣類（carbohydrates）<sup>[37]</sup>及藥物<sup>[38, 39]</sup>等各類物質。而科學家們為了使毛細管電泳應用於更多層面上，開始結合其他分析技術，以達到更多元化的發展。2010 年，Alkhalaf 等人使用毛細管電泳串聯質譜(CE-MS)針對糖尿病腎病變患者體內之尿蛋白進行檢測<sup>[40]</sup>。同年，Delles 團隊也是針對尿蛋白之診斷，他們則是利用毛細管電泳結合飛行時間質譜(CE-TOF/MS)來診斷

出冠狀動脈疾病<sup>[41]</sup>。由於質譜儀是目前分析技術中能提供最多有關分析化學訊息的偵測器，例如：分析物之分子量與化學結構。因此學者們藉由此特性再搭配毛細管電泳優異的分離效果進而使毛細管電泳應用在更多領域上。毛細管電泳已成為分析化學中舉足輕重的分析技術。

### **1.1.1 毛細管電泳的分離模式**

毛細管電泳技術發展至今已衍生出數種不同的分離模式，其命名通常按照分離原理而來。主要包括毛細管區帶電泳法、微胞電動力層析法、毛細管凝膠電泳法、毛細管電層析法、毛細管等速電泳法及毛細管等電聚焦法等。此六種毛細管電泳技術的分離原理與應用分別如下：

#### **1.1.1.1 毛細管區帶電泳法(capillary zone electrophoresis, CZE)**

毛細管區帶電泳是毛細管電泳中最基本、最普遍的分離模式。其分離機制是依照樣品離子本身電荷與質量的不同，使其存在差異而達到分離效果。在此分離模式下，由於有電滲流的存在，所以可用來分離陰、陽離子。而中性物質不受電場的影響，因此中性物質與電滲流的移動速度一致，故無法使用此模式將中性物質給分離出來。實驗中可藉由改變緩衝溶液的 pH 值、濃度或添加有機修飾劑

等方法來改善分離效率。因為 CZE 操作簡單及多樣化，所以應用的範圍很廣包含：蛋白質、胺基酸、鏡像異構物及離子態的分離。

2013 年，Xue 團隊利用分散微微萃取法(dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME)結合高效能(high-performance, HP)毛細管區帶電泳對化妝品中的防腐劑進行萃取<sup>[42]</sup>。

### 1.1.1.2 微胞電動力層析法 (micellar electrokinetic chromatography, MEKC)

微胞電動力層析法兼具電泳和層析的特點。其特色是唯一可以同時分離中性物質及帶電離子的電泳技術<sup>[43]</sup>。在緩衝溶液中添加大量界面活性劑，當界面活性劑之濃度達到臨界微胞濃度 (critical micelle concentration, CMC) 時，溶液中的界面活性劑分子聚集形成微胞(micelle)。由於微胞內部為疏水性，因此中性分析物受電場作用而移動的過程中會依據本身親水性或疏水性之強弱差異，與溶液中的微胞產生分配(partition)作用，藉此造成分析物之間的移動速率不同而達到分離。2015 年，本實驗室學長以混合態微胞的形式結合聚乙烯吡咯烷酮成功分離血漿中的胺基酸生物指標<sup>[44]</sup>。

### 1.1.1.3 毛細管凝膠電泳法 (capillary gel electrophoresis, CGE)

毛細管凝膠電泳是目前所有分離技術中，具有最高分離效率的一種。其理論平板數可達每米數百萬。此方法主要用於分離生物大分子，如 DNA、RNA、碳水化合物和蛋白質等。CGE 是在毛細管內填充具有分子篩作用之聚合物，在電場驅動下，分析物會因本身分子大小所受到不同程度的阻礙進而達到分離之目的。本實驗所用的毛細管電泳分離模式即是毛細管凝膠電泳法。後續會有針對毛細管凝膠電泳法更深入的介紹。

### 1.1.1.4 毛細管電層析法 (capillary electrochromatography, CEC)

毛細管電層析是一種結合毛細管電泳與高效能液相層析技術 (HPLC) 的分離方法。其分離的原理是在進樣端施加高電壓，不同電性的分析物會被電滲流往前推，且分析物也會受到靜相的作用力而滯留。所以分析物同時受到本身電泳特性、電滲流推動力和動、靜相分配作用力的影響，這三種作用力的總和即為影響分析物滯留時間長短的關鍵。其最大的優點在於推動動相往前的力量是電滲流，而不是 HPLC 的高壓幫浦，因此不會使區帶變寬。CEC 的解析度幾乎可達氣相層析技術 (GC) 的效果，而選擇性則可和 HPLC 相比。其亦具有極高的理論板數，又因為 CEC 所需樣品量遠小於 HPLC，所以 CEC 是一種高選擇性、高解析度的分離模式。

### 1.1.1.5 毛細管等速電泳法 (capillary isotachopheresis, CITP)

毛細管等速電泳是一種等速移動界面的電泳技術。CITP 是使用非連續的電解質系統，而非連續的電解質是由前導緩衝溶液(leading electrolyte)與殿後緩衝溶液(terminating electrolyte)構成。在毛細管中，前導緩衝溶液會形成前端層帶，殿後緩衝溶液則形成末端層帶。分離時各種分析物形成的區帶夾在前端層帶與末端層帶之間，一起等速移動。以分析陽離子為例，前導緩衝溶液的陽離子速度需大於所有分析物離子，而殿後緩衝溶液的陽離子速度需小於所有分析物離子。當施加電場時，陽離子向陰離子移動，由於前導緩衝溶液的陽離子速度最大，因此往陰極移動速度最快，接著是移動速度次之的各種分析物陽離子，最慢的是殿後緩衝溶液的陽離子。所以毛細管等速電泳的分離機制是利用分析物電泳速度的不同來達到分離之目的。2011 年，Bahga 等人改良傳統毛細管等速電泳之技術，將等速聚焦及電泳分離這兩項技術結合發展出雙向等速電泳 (bidirectional isotachopheresis)<sup>[45]</sup>。

### 1.1.1.6 毛細管等電聚焦法 (capillary isoelectric focusing, CIEF)

毛細管等電聚焦法主要是針對兩性化合物分離的一種模式。兩性化合物即為同時帶有正電荷和負電荷的化合物。其分離原理是在具有 pH 梯度的毛細管中依據等電點(isoelectric points, pI)的不同而達

到分離效果。在一特定 pH 值下，兩性分析物的正電荷與負電荷相等，即淨電荷為零，所以在電場中不會移動，此時的 pH 稱為該物質的等電點。由於不同的兩性化合物會有不同的等電點，因此可藉由 pH 梯度達到堆積效果，再經由其他方式將分析物帶到偵測視窗進行偵測。在使用 CIEF 進行實驗時，必須要抑制電滲流的產生，是因為要避免在聚焦步驟結束前電滲流就將分析物給帶出毛細管。此分離模式常用來分離胜肽、蛋白質或胺基酸等兩性物質。

## 1.1.2 毛細管分離之原理

### 1.1.2.1 淌度 (mobility)

毛細管電泳中，在施加電場作用下，不同電性及不同電荷數之離子會因為遷移速率不同而達到分離作用，而帶電粒子在電場中因受到庫倫力的影響會以一個速度 ( $v_{ep}$ ) 前進，而此速度與電場強度 ( $E$ ) 成正比關係，即：

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

其中  $\mu_{ep}$  為電泳淌度 (mobility)，可簡單定義為單位電場下帶電粒子遷移的速度。意思是當施加一個外加電場時，帶電粒子因受庫倫作用力 ( $F$ ) 影響，而加速移動，且此庫倫作用力會與有效電荷 ( $q$ ) 及電場強度 ( $E$ ) 成正比之形式，其關係式為：

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

當帶電粒子在運動的過程中，會因為與其他介質產生之摩擦，而造成移動速度下降，但當帶電粒子受電場加速到某個程度的同時，庫倫作用力會與摩擦力達到一個平衡值，此時帶電粒子將不會再繼續加速，而形成等速運動。在 Stokes 定律中，帶電粒子假設為剛性球體，受到摩擦力時，其關係式為：

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

此  $f$  為剛性球體的動摩擦係數， $\eta$  為緩衝溶液之黏度，而最後  $r$  為剛性球體半徑。若當帶電粒子因庫倫作用力與摩擦力相等時，此時帶電粒子會行等速運動，其關係式為：

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

上述公式可寫成：

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

若將方程式 (1-5) 帶入方程式 (1-1) 將得到：

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

由 1-6 公式亦可得知帶電粒子之電荷與淌度成正比關係，而淌度與帶電粒子的大小成反比，其帶電粒子的大小及電荷都將影響電泳淌度的大小。

### 1.1.2.2 電滲流 (electroosmotic flow, EOF) 產生

毛細管電泳主要分離機制是依據樣品在電場下質荷比的差異產

生不同的淌度而達到分離效果。除了物質本身的遷移速率外，還有一個控制毛細管內液體流動的重要參數：電滲流。由於毛細管主要材質為融熔矽 (fused silica)，當毛細管內電解質溶液 pH 值大於 3 的情況下，毛細管內壁的矽醇基 (SiOH) 會解離成矽醇陰離子 (SiO<sup>-</sup>)，使毛細管內壁帶負電，此時緩衝溶液中若有陽離子通過，就會受到 SiO<sup>-</sup> 吸引，便會在毛細管內壁上形成電雙層 (electrical double layer)。當施加一高電場，在電雙層中的陽離子被吸引至負極，此作用力會帶動整體溶液 (bulk solution) 一起往負極移動而產生電滲流。其中被 SiO<sup>-</sup> 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。而毛細管中擴散層與固定層之電荷分布不平均的情形，使體相溶液與電雙層間產生一個電位差，而此電位差稱之為  $\zeta$  電位 (zeta potential)。其方程式表示為<sup>[46]</sup>：

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

$\delta$  為電雙層的厚度， $\varepsilon$  為緩衝溶液的介電常數， $e$  為單位面積之總電荷。 $\zeta$  電位與電滲流關係式表示為：

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

而淌度  $\mu_{eo}$  為電滲流之遷移速率，它與溶液的介電常數 ( $\varepsilon$ ) 及  $\zeta$  電位成正比關係， $\eta$  為緩衝溶液之黏度，電滲流之遷移速率與緩衝溶液之黏度成反比。毛細管內壁矽醇基解離程度與  $\zeta$  電位的大小有關。假設

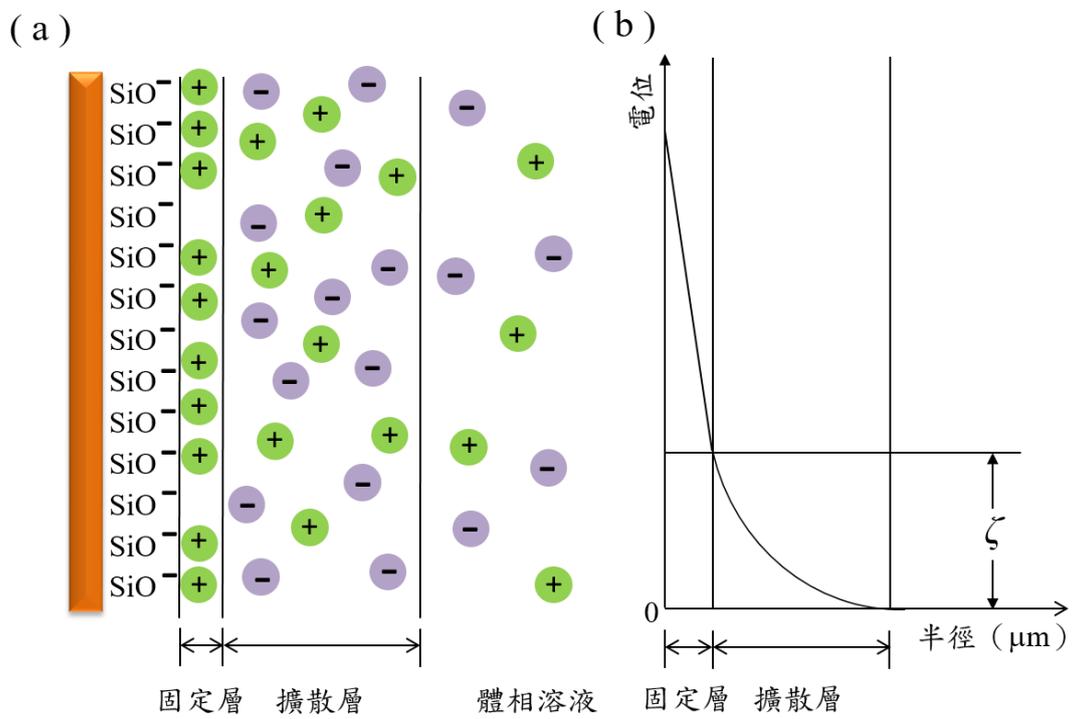


圖 1-1 電雙層的结构及  $\zeta$  電位

毛細管壁表面矽醇基解離越多，就會吸引越多陽離子，因此所形成的電雙層厚度也越厚， $\zeta$  電位也會跟著變大，使得電滲流遷移速率增快。電滲流速率主要與毛細管壁表面電荷及緩衝溶液有著密切的關係。包括緩衝溶液之離子強度、添加物之種類、pH 值，皆會影響電滲流大小。毛細管內壁進行修飾或改變溫度也會影響電滲流的大小<sup>[47]</sup>。緩衝溶液的離子強度是影響電滲流的關鍵之一。當提高離子強度時，毛細管內壁上的陽離子數目與溶液裡的陽離子數目相近時，電雙層會更緊密， $\zeta$  電位也隨之變小，此時電滲流速率也會變小。而在不同 pH 值下，電滲流的大小會隨著改變。緩衝溶液之 pH 值大於 3.0 時，電滲流會明顯增加，之後電滲流會隨著 pH 值的上升逐漸變大，直到 pH 值大於 8.0 時，電滲流才會趨近一個定值。電滲流是由擴散層中離子受電場的影響，而產生遷移的現象。理論上毛細管內壁的每一個位置流速幾乎相同，因此若將毛細管內壁溶液以切面觀察的話，會趨近於一平面，如圖 1-2a 所示。使用其他管柱層析法，其驅動力是以壓力的方式，這使管柱中的液體與毛細管壁之間產生摩擦力和剪切力，進而產生層流 (laminar flow)。若將管柱以橫切面觀察，會發現溶液以拋物線的形式前進，如圖 1-2b 所示。雖然層流在管柱中會使樣品前進，但也會使區帶變寬，造成解析度下降。使用具有電滲流之毛細管，因為切面幾乎成一直線，所以樣品區帶不會變寬，且解析度相對使用層

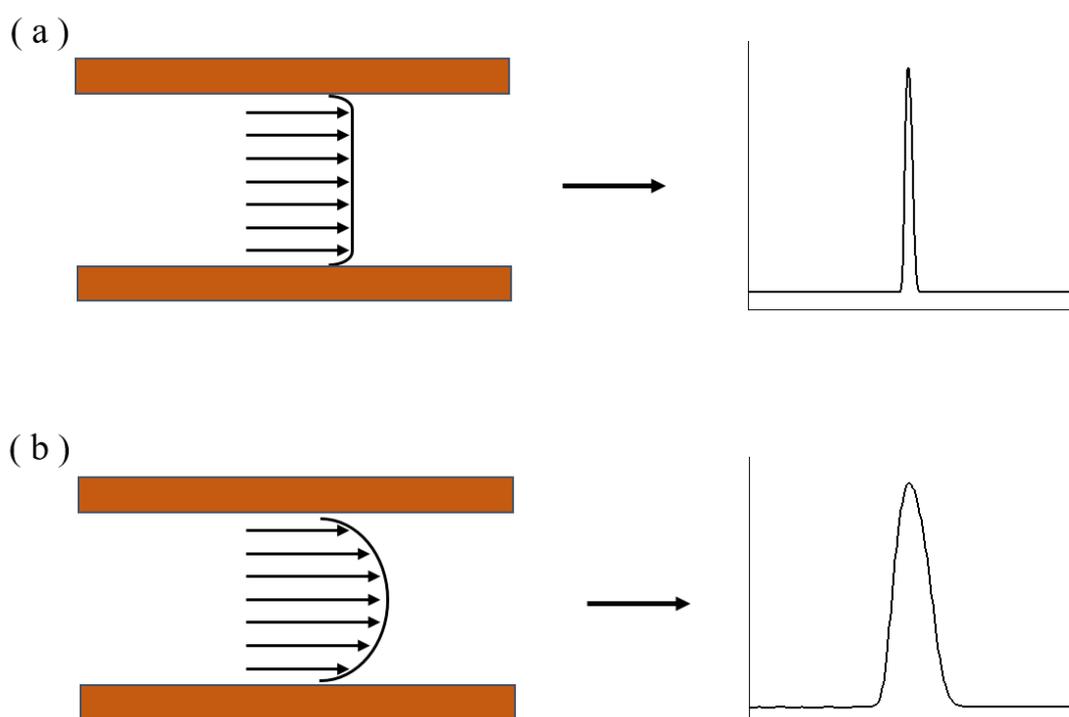


圖 1-2 (a) 電滲流及 (b) 層流之比較圖

流的方式來得好，理論平板數也能提昇到數百萬以上。電滲流現象雖然能使解析度變得更好，但由於毛細管壁的解離，會使得在分析蛋白質或 DNA 樣品時，常會有吸附的現象發生。因此若進行此方面的實驗時，通常會將毛細管內壁塗覆一層聚合物，來降低吸附現象<sup>[48, 49]</sup>。塗覆聚合物之毛細管，會因為內層管壁不帶電荷，使 $\zeta$ 電位消失，以至於在無電滲流的情況下分析生物樣品，此時遷移速率會與生物樣品本身受電場的影響程度有關。

### 1.1.2.3 毛細管凝膠電泳之分離機制

毛細管凝膠電泳有著極高的分離效率，且樣品用量比傳統平板電泳少很多，因此近幾年常被用於分析複雜生物樣品或 DNA。實驗進行完後須考慮的實驗參數包含進樣方式、偵測系統、溫度、毛細管內壁、凝膠介質及電場強度等。由於 DNA 樣品會以隨機纏繞的方式存在於自由溶液中，當施加一電場使 DNA 受影響因而展開成長鏈狀，此時 DNA 長鏈的每一處都會接觸到溶液，而 DNA 鹼基對 (base pair) 之數目 (N) 會與毛細管內之摩擦力成正比，其關係式為：

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

且 DNA 上磷酸根之負電荷 (Q) 也會與鹼基對之數目成正比，

其關係式為：

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

因此 DNA 在自由溶液之淌度為：

$$\mu = v/E = q/f \propto N/N = \text{constant} \quad (1-11)$$

由方程式 1-11 可得知 DNA 在自由溶液下之淌度為定值<sup>[50]</sup>，是無法進行分離的。分離 DNA 著重在凝膠的選擇，可利用凝膠的網狀結構特性來對 DNA 進行分離。由於不同長度之 DNA 在通過網狀結構時所受的困難程度不同因而得到不同淌度，因此可達到分離的效果。長度較短之 DNA 因為較容易通過凝膠孔隙，所以分離時間相較長度較長之 DNA 短。藉由此原理來分離不同長短之 DNA，可減少樣品在毛細管中擴散導致區帶變寬的現象。

在毛細管內填充具有孔隙的凝膠介質，使得原本具有相同淌度之樣品，現在可藉由大小的不同，在毛細管電泳中達到分離之效果。凝膠是以單體的形式存在，當凝膠聚合物的濃度較低時，凝膠分子間的碰撞機率也較低，且溶液之黏度也相當低，因此彼此之間較不易發生任何作用；當凝膠聚合物之濃度增加時，分子間碰撞機率上升，彼此間開始互相作用、產生糾結，此時就會開始形成網狀結構。而從網狀結構到形成孔隙是當凝膠聚合物的濃度超過糾結界限 (entangled limit) 時才會形成。糾結界限的定義是假設每個聚合物分子的體積都相同時，

所有聚合物所佔的體積與溶液體積相同時的濃度。可表示為：

$$\varphi^* \approx 3 M_w / 4 \pi N_A R_g^3 \quad (1-11)$$

或

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

其中， $\varphi^*$  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)， $N$  是聚合物分子所含的單體數量。但因為聚合物的分子量不是定值，而是用平均分子量來做表示，所以如果要得到實際的糾結界限數值必須透過實驗才能得知<sup>[51]</sup>。

從上述可知，當聚合物濃度高於糾結界限而形成之網狀結構會再繼續形成孔隙(mesh)，而此網狀結構之孔隙大小與聚合物濃度有關，其關係式為：

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

或

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

$\xi$  為孔隙大小， $C$  為聚合物濃度， $a$  為常數<sup>[52]</sup>，不同聚合物溶液可得到不同的數值。由 1-13 之方程式可得知聚合物的聚合程度與聚合物的特性和濃度有關，而與膠體孔隙大小並無關聯，也就是聚合物單體濃度越高所形成的孔隙就越小。

由於毛細管凝膠電泳可有效的分離 DNA 分子，因此早期學者探討生物分子在凝膠網狀結構中的遷移行為可分為兩種機制，Ogston 模型 (Ogston model) [53] 及爬行模型 (reptation model) [54]。此兩種模型可用來解釋 DNA 分子在凝膠介質中的分離機制。Ogston 在 1958 年發展用來解釋一剛性球體在纖維隨機交錯所形成的網狀結構中的運動模式。Morris 則在 1996 年首度引用此模型來解釋 DNA 分子在聚合網狀結構下的行為。Ogston 模型適合用於較小的 DNA 分子 (< 3000 bp) 之遷移，且需要將 DNA 分子視為一剛性球體。最後利用網狀結構中大孔隙將小片段的 DNA 分子給篩選出來，而較大的 DNA 分子則會無法通過，Ogston 模型中 DNA 的淌度可表示為：

$$\mu = \mu^* P \quad (1-16)$$

$\mu$  為 DNA 在凝膠介質中的淌度， $\mu^*$  為 DNA 在自由溶液中的淌度， $P$  則是 DNA 分子小於聚合網狀結構之孔隙機率。此時  $P$  可以表示為：

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

$K$  為比例常數， $C$  為聚合物濃度， $R_g$  為將 DNA 分子視為剛性球體時的半徑， $r$  為聚合物分子鏈厚度，由上述兩式加以整合，可得到 DNA 的淌度關係式：

$$\mu = \mu^* \exp [ -KC ( R_g + r )^2 ] \quad (1-18)$$

而將式子取對數後，以  $\log(\mu/\mu^*)$  對  $C$  會與呈線性關係，其斜率與 DNA 大小  $R_g$  有關，在此稱之為 Ferguson 圖 (Ferguson plot)，使用此方法可大致猜測聚合物分子鏈之厚度及孔隙大小<sup>[55]</sup>。

在爬行模型中，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 可被視為會隨機變形的長鏈分子，並以蛇行方式在聚合物中前進，所以 DNA 的移動不會受限於孔隙的大小，此時 DNA 的淌度與 DNA 分子大小其關係式為：

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

以上兩種模式都是建立於平板凝膠電泳發展的分離機制，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。聚合物的網狀結構會隨著時間而改變，屬於暫時性的 (transient)，所以若要深入探討 DNA 分子於毛細管凝膠電泳之分離機制，必須將電場效應及聚合物溶液之網狀結構這兩點問題考慮進去。

#### 1.1.2.4 毛細管內壁塗覆修飾

毛細管內壁上的負電荷會吸附正電荷的分析物，像是 DNA 或是蛋白質之分析物，因此常會出現樣品吸附於毛細管內壁的情況，進而導致偵測結果的解析度與再現性不佳。毛細管在使用前，會先將毛細管內壁塗覆一層聚合物，以降低分析物吸附至毛細管內壁之現象。於毛細管內壁塗覆聚合物除了能避免吸附現象以外，還能抑制電滲流的

產生。若毛細管內有電滲流的現象發生，會影響訊號的再現性。過去用來抑制電滲流的方法需要降低 pH 值、高離子強度的陽離子表面活性劑或是在緩衝溶液中加入有機溶劑，但這些方法皆不適用於 DNA 的生物樣品。於管壁上塗覆之原理為聚合物分子與毛細管內壁表面的矽醇基形成共價鍵結，使聚合物完整覆蓋於內壁表面，讓溶液中的陽離子無法被吸附至管壁上，如圖 1-3。在沒有電滲流的情況下，對 DNA 或其他生物樣品進行分離時，小片段的 DNA 會先到達偵測視窗，是因為在沒有電滲流的時候，小片段的 DNA 淌度會明顯增大，故會最先被偵測到。

#### 1.1.2.5 進樣方法

進樣方式的選擇是依照實驗需求不同來使用。在毛細管電泳中有三種進樣方法：電動進樣 (electrokinetically)、虹吸進樣 (siphoning) 以及壓力進樣 (hydrostatically)。電動進樣是利用電驅動的方式使樣品進入毛細管內部。進樣前需先將末端毛細管及電極放至緩衝溶液中，而進樣端的毛細管和電極插入樣品溶液，接著施加電場就能使樣品進入到毛細管內，最後再將毛細管與電極從樣品溶液中取出並放回緩衝溶液，即可通電進行分離。電動進樣所注入的樣品體積相較於其他兩種方法是最多的，若毛細管內徑及進樣時間皆相同的話，電動進樣注

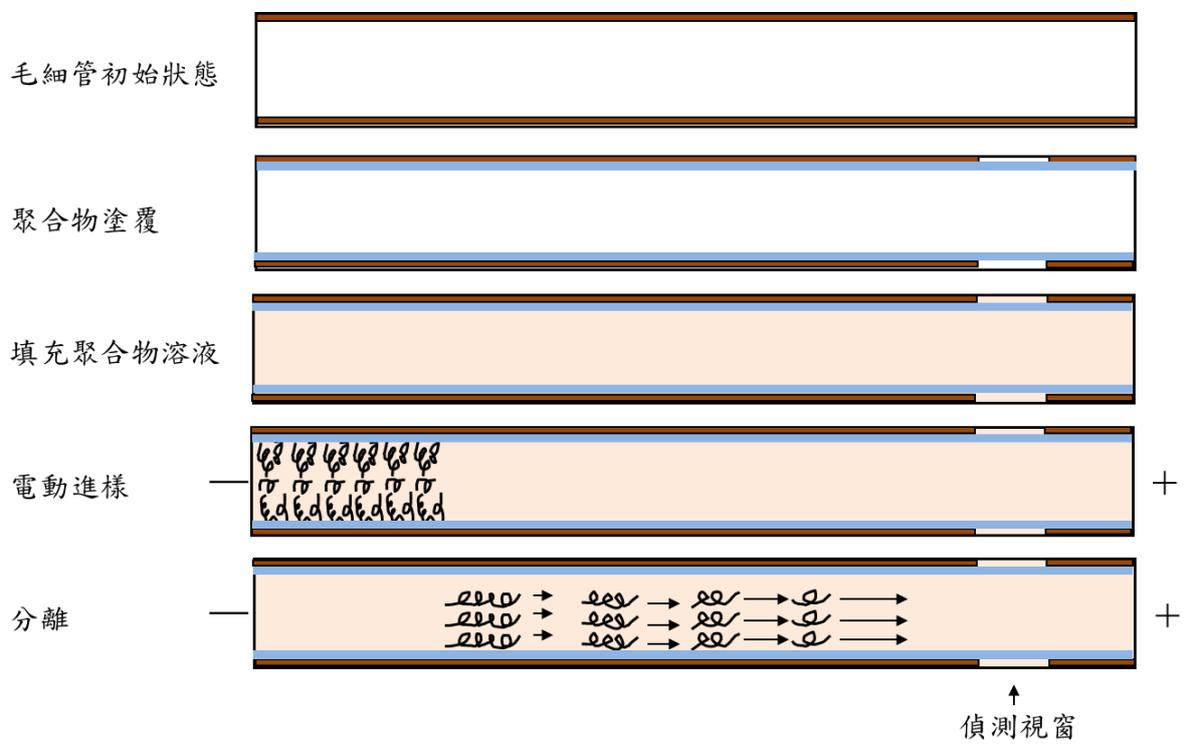


圖 1-3 無電滲流的毛細管電泳系統中分離 DNA 片段之示意圖

射體積約為 5 至 50 nL，而虹吸進樣只有約 6 nL 的樣品量。因此若是要對微量樣品進行偵測，此進樣方式是絕佳的選擇。虹吸進樣，是將待測樣品放置一定高度，藉由重力驅使樣品溶液進入毛細管中，再通電進行分離。此方式之優點在於簡單以及不受樣品內離子干擾而影響進樣的總量。壓力進樣則是在樣品的進樣端施予壓力，由此壓力將樣品導入毛細管內部或是在毛細管的出口端裝一真空幫補 (pump)，使樣品從入口端吸入毛細管中，但在使用此方式進樣時需要額外的儀器，故不方便使用，不過若想進樣具有高離子強度的樣品，可選擇此進樣方式。

#### 1.1.2.6 偵測系統

毛細管電泳之偵測系統有許多種類，包括螢光 (Fluorescence) 放射法<sup>[56]</sup>、紫外光-可見光吸收 (UV-Visible absorption)<sup>[57]</sup>及質譜儀 (Mass spectroscopy, MS)<sup>[58, 59]</sup>。其中螢光放射法又可細分為傳統光源激發螢光及雷射誘發螢光 (Laser-induced fluorescence, LIF)。比較兩者之靈敏度，雷射誘發螢光之方法具有較高的偵測靈敏度，且因雷射能聚焦到微米 (micrometer) 級大小的直徑，使單位面積的功率密度提高，即可大幅減少因偵測器造成的譜帶變寬問題。已經有文獻指出利用雷射誘發螢光此技術的偵測極限可達 50 yoctomoles (1 yoctomole =  $1 \times 10^{-24}$  M)<sup>[59]</sup>，且此系統也可應用到偵測單細胞或單分

子上<sup>[60, 61]</sup>。

通常會以激發波長來當作選擇雷射種類的首要條件。一般常用的雷射有固態雷射 (solid-state laser)、氬離子雷射 (argon ion laser)、紅寶石雷射 (Nd:YAG laser) 以及氦氖雷射 (He-Ne laser) 等。上述這些雷射都可以被拿來當作毛細管電泳中的激發光源<sup>[62-66]</sup>。近幾年也有學者將發光二極體來當作激發光源<sup>[67]</sup>，這不僅降低實驗成本，還大幅增加光源壽命。由於大部分的生物分子不含有螢光結構，因此為了使生物分子能夠被偵測到，在進行毛細管電泳實驗時，必須先使用螢光染料將生物分子進行衍生化或者將螢光染料加入至緩衝溶液中即時與 DNA 嵌合<sup>[68]</sup>。當生物分子接有螢光染料時，在光源激發後便能產生訊號以進行分析。

### 1.1.3 毛細管電泳對生物樣品之應用

由於毛細管電泳具有高解析度、高靈敏、分離時間短、樣品需求量少、高通量以及能自動化等優點。因此在許多領域中，毛細管電泳都是主要的分析工具，而它能應用的範圍相當廣泛，如生物化學、臨床化學、有機化學、分析化學以及法醫學等。尤其在生物化學，近幾年來，毛細管電泳被廣泛使用於短序列重複 (short tandem repeats, STRs) 的偵測及分析上<sup>[69, 70]</sup>。而其他應用包括偵測病毒或植物 DNA 基因突變、粒線體 DNA 定序和 Y 染色體<sup>[71]</sup>、細胞種群<sup>[72]</sup>分析<sup>[73]</sup>、

定量聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) [74] 之產物、以及單核苷酸之多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) [75, 76]。在生物體之 DNA 序列中，發現許多不同的 DNA 序列之間只有單個鹼基的差異，且已知 SNPs 與疾病的表現有密切關連，因此檢測單個核苷酸之差異已經成為往後研究的目標。

### 1.1.3.1 DNA 於毛細管電泳之相關應用

在分析 DNA 樣品時，通常會以兩種方式讓 DNA 分子與螢光發光團產生 DNA 錯合物。第一種方法為利用 DNA 分子與螢光發光團以共價鍵的形式形成鍵結。常使用的螢光團有螢光黃 (fluorescein) 或玫瑰紅 (rhodamine)；另一種是以螢光團嵌合 DNA 的方式來形成具有螢光團之 DNA 錯合物，而此方法經常使用溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr)、TOTO1 以及 YOYO1。其中 EtBr 是一種致癌物質，在使用上須格外小心。螢光團嵌合之方式是將螢光團嵌合到 DNA 的雙股螺旋結構中，若螢光團順利嵌合至 DNA 結構裡，染料會變得比較剛性。因此經雷射激發後會產生較強的螢光訊號，也會有較好的訊號雜訊比 (S/N)。使用螢光團嵌合至 DNA 的方式，能偵測到的訊號強度可達  $10^{-21}$  M<sup>[77]</sup>。毛細管電泳暨雷射誘發原生螢光 (laser-induced native fluorescence, LINF)<sup>[78]</sup> 與嵌合方式相同，皆需要有螢光團分子，才能產生訊號。此方法所用的 DNA 分子本身因不具有螢光放光之機

制，因此先將螢光染料與 DNA 分子做修飾後，使 DNA 分子帶有螢光染料結構，接著使用光源激發此 DNA 分子，就會產生螢光訊號。

DNA 定序 (Sequencing) 是指分析特定 DNA 片段的鹼基序列，因快速的 DNA 定序方法出現進而推動了生物學和醫學的研究。DNA 定序的方法有兩種，Maxam-Gilbert 化學斷裂法及 Sanger 酵素合成法。這兩種方法的發明使 Dr. Maxam、Dr. Gilbert 及 Dr. Sanger 獲得 1980 年諾貝爾獎的殊榮。其中，以 Sanger 酵素合成法最為常用，定序過程需要先經過 PCR 反應。PCR 過程中的組成物包括：專一性的引子 (primer)、模板 (template) DNA、DNA 聚合酶、dNTP (dATP\* or dCTP\*) 及雙去氧核苷酸 (dideoxynucleotide, ddNTP)。進行反應時，將四種核苷酸的類似物 (ddNTP) 隨機加入到正在合成的 DNA 片段裡，而由於 ddNTP 的 3'端缺乏氫氧基 (hydroxyl group)，無法與下一個核苷酸形成磷酸酯鍵 (phosphoester bond)，所以一旦 ddNTP 與模板 DNA 形成配對後，就會終止 PCR 的反應。簡單來說，當聚合酶反應進行到模板 DNA 的鹼基 T 時，試管中若含有 ddATP，ddATP 就會與鹼基 T 以氫鍵方式結合並終止聚合反應，所以模板 DNA 含有多少個 T，就可表示此試管有幾個以 A 結尾的不同長度 DNA 片段，因此又稱為鏈終止法。其他試管工作原理也相同，最後再利用平板凝膠電泳分離四個試管中的 PCR 產

物，即可依片段大小判讀出模板 DNA 的序列。但由於定序實驗的成本耗費高，也相當耗時，因此使用毛細管凝膠電泳作為基因定序的方法已被開發出來。其優點可在同一試管中進行 PCR 反應<sup>[79]</sup>，將引子標幟上四種不同波長的染料或四種 ddNTP，並使用分光裝置將螢光訊號分散至四個偵測器，最後經由軟體分析收集數據。後來發展出自動化的毛細管陣列（array）電泳，因為具有解析度高、分析快速、高通量等優點，因此在 2000 年時就已經將基因體計畫完成。近幾年來許多學者對於 DNA 做了相當多的研究，Wan 等人利用 PEO-PEO-PEO 之共聚物來當作分離 DNA 分子的篩分介質，且因為共聚化合物具有周期性的親水與疏水結構，因此可形成 2-D 六面堆積之圓柱網狀結構，可用來分離雙股 DNA<sup>[80]</sup>；Fogarty 等人則利用雙雷射系統之共聚焦螢光光譜儀（two-beam fluorescence cross-correlation spectroscopy coupled with continuous flow capillary electrophoresis, 2bFCCS-CFCE）偵測單股 DNA 5'-R6G-polyT<sub>40</sub>，這是藉由在不同電場強度及鎂離子濃度會影響單股 DNA 之構型，之後就可得到 DNA 的平移擴散係數及有效電荷<sup>[81]</sup>；Fundador 等人同時分離 DNA 大小與監控和癌症相關序列的特異性<sup>[82]</sup>；Li 等人利用滾環式擴增法（rolling circle amplification, RCA）來進行小分子核糖核酸（small RNA）之檢測，將環式模板與目標物進行擴增，再利用毛細管凝膠電泳來進行分離，此方法對於小分子核糖核酸具有專一

性且高靈敏之效果<sup>[83]</sup>；Meagher 等人利用 end-labeled free solution electrophoresis (ELFSE)，並設計合成 127 胺基酸長度之蛋白質聚合物，成功將序列長達 180 鹼基之 DNA 定序<sup>[84]</sup>；Jiang 及 Ma 利用尿液樣品並修飾其核苷酸，當作癌症生物標記，並成功利用毛細管電泳在 10 分鐘內分離 10 種不同之核苷酸<sup>[85]</sup>；Wang 則是利用抗體來偵測 DNA 之甲基化 (methylation) 程度，並不使用酵素消化 (enzyme digestion)、重亞硫酸鹽轉換 (bisulfite conversion) 及 PCR 放大等步驟，就能偵測到 0.3 nM 之濃度，且在 10  $\mu$ M 至 10 nM 能維持線性<sup>[86]</sup>；本實驗室學長則利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光搭配重亞硫酸鹽限制分析法 (combined bisulfite restriction analysis, COBRA)，成功偵測 DNA 之異質性 (heterogeneity)<sup>[87]</sup>。

### 1.1.3.2 基因突變之偵測

在生物學上，基因突變係指細胞中組成基因的 DNA 核苷酸序列發生改變，包括單個鹼基改變所引起的點突變，或多個鹼基的缺失、重複及插入，進而導致細胞運作不正常或死亡，在高等生物體中甚至會引發癌症。而在所有可能的 DNA 序列差異性 (sequence differentiation) 中，SNPs 是最普遍發生的一種遺傳變異。隨著分子生物醫學的進步，對於癌症的了解越多，目前已經發現許多癌症和基因之突變有關，所以如果能及早偵測出可能突變之基因，就能夠及早發

現病症。基因突變之分析方法必須要有高度的準確性，因此 DNA 核苷酸定序技術被認為是最佳選擇，因而被視為黃金級標準實驗 (gold standard)<sup>[88]</sup>，但若在一般臨床診斷室裡設置定序儀的經濟效益很低，因此大規模快速且精確的基因突變檢測研究受到高度的重視。

基因突變檢測方法大致可分為篩選及偵測兩大類。篩選法非常適合在大規模的 SNPs 檢測上，較常用來檢測未知樣品中是否發生突變。此方法具有快速且符合經濟效益等優點，但無法分析出實際突變的鹼基。篩選法包括：異股多形性檢測 (heteroduplex polymorphism analysis, HPA)<sup>[89]</sup>、溫度梯度毛細管電泳 (temperature-gradient capillary electrophoresis, TGCE)<sup>[90, 91]</sup>、單股構型多形性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP)<sup>[92-94]</sup>及錯位酵素切割 (enzymatic cleavage of mismatches, EMC)<sup>[95]</sup>等方法。HPA 是將 DNA 樣品經 PCR 放大後的產物，在電泳中因同股與異股構形不同以及鹼基 G 和 C 的數量差異而產生不同的淌度，此法適用於檢測大片段的 DNA 突變。TGCE 則是先經由 HPA 加熱變性後，緩慢降溫的過程中，正常與突變的 DNA 發生雜合形成異源雙鏈核酸分子 (heteroduplex)，由於 heteroduplex 之間的鹼基對並不完全互補，所以在進行分離時，是藉由熔點溫度 (melting temperature,  $T_m$ ) 不同而達到分離效果，適用於 SNPs 的篩選。SSCP 主要是利用高溫及甲醯胺 (formamide) 處理下，

讓雙股螺旋 DNA 變性 (denature) 形成單股 DNA，再急速冷卻。此時因加熱所形成之單股 DNA，會瞬間以較穩定的形狀維持構形，若此 DNA 有發生基因突變，在電泳中淌度就會與正常 DNA 不同，因此最後以電泳分析就能分辨正常 DNA 與突變 DNA 之差異。迄今為止，SSCP 技術是最被廣泛使用的，由於使用此方法的設備及操作過程簡單，且靈敏度高，甚至可以區分出單一核苷酸變化。學者也將 SSCP 結合毛細管電泳應用於鑑定綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 16S rRNA 基因<sup>[96]</sup>、血型偵測<sup>[97]</sup>及家族性高膽固醇血症<sup>[98]</sup>等。

另一類檢測方法為偵測突變，包括對偶基因特定寡核苷酸雜交法 (allele-specific oligonucleotide hybridization)<sup>[99]</sup>、接合酶連鎖反應 (ligation chain reaction)<sup>[100]</sup>、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)<sup>[101]</sup>、以及單核苷酸引子延伸 (single-nucleotide primer extension, SNUPE)<sup>[102]</sup>等相關技術。對偶基因特定寡核苷酸可與微陣列晶片結合，方法為將寡核苷酸滴在晶片上進行 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。在 PCR-RFLP 中，特定的引子經聚合酶連鎖反應將序列放大後，再利用具有專一性的限制酶 (restriction enzyme) 去對特定 DNA 序列進行切割，

由於有些序列因無法被限制酶所切割，故會有長度上的差異，最後再使用毛細管電泳進行分離及鑑定<sup>[103, 104]</sup>。在台灣有許多分子實驗室都以 PCR-RFLP 此技術來偵測基因突變，因此法具有較高靈敏度及專一性。

然而上述的分析方法還是存在著些許缺點，例如：耗時、製備過程繁瑣及試劑昂貴等，所以無法適用於大規模的篩選上。於是現今許多科學家極力發展具有精確、快速、低成本的檢測方法。

## 1.2 核糖核酸 (ribonucleic acid) 之簡介

### 1.2.1 緒論

核糖核酸 (RNA) 是生物重要的分子類型，由一長串的核苷酸 (nucleotides) 為組成單位，每個核苷酸皆由三個部分所組成，包含五碳糖、磷酸根以及含氮之鹼基 (base)。其中含氮鹼基主要有四種，腺嘌呤 (Adenine, A)、鳥嘌呤 (Guanine, G)、胞嘧啶 (Cytosine, C) 及尿嘧啶 (Uracil, U)。而 RNA 與去氧核糖核酸 (DNA) 非常相似，其中 DNA 的四種鹼基分別為腺嘌呤 (Adenine, A)、胸腺嘧啶 (Thymine, T)、胞嘧啶 (Cytosine, C) 及鳥嘌呤 (Guanine, G)。兩者在鹼基上只相差於胸腺嘧啶 (T) 及尿嘧啶 (U)。而在配對作用上，尿嘧啶 (U) 相當於 DNA 中的胸腺嘧啶 (T)。在 DNA 中 A 與 T 以兩個氫鍵鍵結，G 與 C 以三個氫鍵鍵結，而由於 RNA 中沒有 T，所以 DNA 在進行轉錄的過程中，DNA 上 A 會形成 mRNA 中的 U。RNA 與 DNA 組成方式皆為四種鹼基經由排列組合，形成許多不同之序列片段。兩者除了在鹼基上的不同外，在序列結構上，RNA 通常是以單股分子的型態存在於細胞中，且具有核糖並非去氧核糖，而單股 RNA 在水溶液中會與自己本身互補之區域互相雜合形成二級及三級結構。RNA 序列包含許多基因遺傳訊息，進而合成出具有特定功能之蛋白質。大部分的 RNA 都存在

細胞質內，根據結構功能的不同，主要可分成三類，即訊息核糖核酸（messenger RNA, mRNA）、傳遞核糖核酸（transfer RNA, tRNA）及核糖體核糖核酸（ribosomal RNA, rRNA）。mRNA 是經由轉錄（transcription）作用而來，並將 DNA 的遺傳訊息紀錄下來。轉錄作用也可稱為 RNA 合成，過程中是將 DNA 之雙股解開，使用 RNA 聚合酶（RNA polymerase）先讀取 DNA 上的序列合成出相對應的 mRNA，因此須進行轉錄作用才能使 mRNA 密碼子離開細胞核進入細胞質，接著讓核糖體經由轉譯（translation）作用，使用 mRNA 製造所需的蛋白質，如圖 1-4 所示。轉譯過程中會有兩種 RNA 出現，分別為 tRNA 及 rRNA。tRNA 會攜帶胺基酸到核糖體上，且 tRNA 與 mRNA 會以三個鹼基為一組序列來當作密碼子（codon）及反密碼子（anticodon）之配對，此密碼包含胺基酸種類啟動合成及終止合成等指示；rRNA 是組成核糖體（ribosome）的部分，並與 mRNA 一併進行蛋白質合成。RNA 之轉譯過程是經由啟動密碼子（start codon）來進行反應，核糖體沿著 mRNA 的序列行進且在相對應的密碼子上連接對應之胺基酸，最後經由終止密碼子（stop codon）終止反應，即可完成蛋白質之合成。

細胞中還有許多種類、功能不一的小型 RNA，像是組成剪接體（spliceosome）的核內小核糖核酸（small nuclear RNA, snRNA）、核

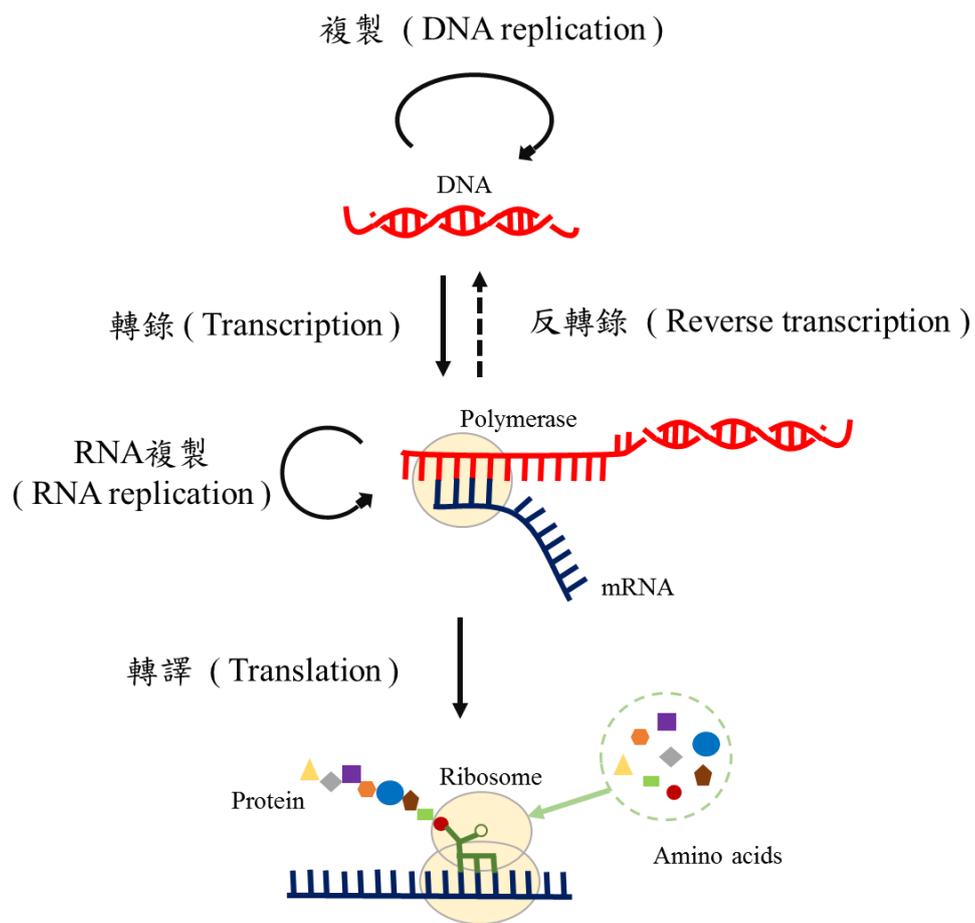


圖 1-3 DNA 轉錄轉譯之示意圖

醣核酸干擾 (RNA interference, RNAi) 作用的微小核醣核酸 (micro RNA, miRNA)、負責 rRNA 成型的小核仁核醣核酸 (Small nucleolar RNAs, snoRNAs) 及反義 RNA (antisense RNA) 等，這些小型 RNA 經由 DNA 轉錄後，不會再進行轉譯形成蛋白質，它們被稱為非轉譯核醣核酸 (noncoding RNA)，亦可稱之為核醣核酸干擾 (RNA interference)，因為可以調節基因的表現，如細胞增生、細胞死亡、細胞分化、生物個體發育、激素分泌等現象發生，甚至會引起腫瘤之生成。

### 1.2.2 核醣核酸歷史

在 1869 年 Miescher Friedrich 藉由分離遺傳物質時於細胞核中發現核苷酸，當時他將該物質稱作核素。不過早期化學家及生物學家並不清楚 DNA 與 RNA 之間的差異，直到學者分析出核苷(nucleoside)的組成，才能利用五碳醣結構及鹼基組成分類出 DNA 與 RNA。1958 年，Francis Crick 提出 DNA 是藉由轉錄而生成 RNA，RNA 則再經由轉譯生成蛋白質，這項說法也就是之後分子生物學的中心教條 (central dogma of molecular biology)。而這也清楚解釋遺傳訊息在生物體中如何傳遞及運行。另外有一實驗可在老鼠肝臟組織中清楚觀察到胺基酸轉變到蛋白質的過程，轉變過程中發現 RNA 會與胺基酸結

合並與 rRNA 結合來生成特定功能之蛋白質，這項研究明確解釋了 RNA 轉譯到蛋白質之過程。Robert W. Holley 等人於 1958 年從酵母菌上定出 77 核苷酸長的丙胺酸 tRNA( alanine transfer RNA, Ala-tRNA ) 序列及結構，此項發現對於 mRNA 轉譯至蛋白質的過程提供相當重要之依據，此研究使 Holley 等人於 1968 年獲得諾貝爾醫學獎之殊榮。1993 年時 Lee 等人發現長度約為 22 個核苷酸的 RNA，此 RNA 現稱為微小核糖核酸 ( micro RNA, miRNAs )。micro RNA 發現於秀麗隱桿線蟲 ( *Caenorhabditis elegans* ) 上，學著們將秀麗隱桿線蟲的 *lin-14* 基因序列進行研究，發現 *lin-14* 基因會轉譯成 LIN-14 蛋白質，而在其他不同基因中，*lin-14* 基因表現也會受 *lin-4* 基因所影響，這也會導致 LIN-14 蛋白質有所變化，因此可以判定 *lin-4* 可調控 LIN-14 之蛋白質表現量<sup>[105]</sup>。其中 *lin-4* 是由 22 nt 所組成的成熟 miRNA，而此基因是先由 61 個核苷酸所組成的 miRNA 轉變而來，且因為這段序列能與 *lin-14* mRNA 3 端非編碼區序列產生互補的作用，若此區域被 miRNA 互補，將會影響 *lin-14* mRNA 轉譯的量，最後會導致 LIN-14 蛋白質之表現差異。在 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<sup>[106,107]</sup>。到 2000 年 Reinhart 等人在 miRNA 的研究中，發現秀麗隱桿線蟲上第二個 miRNA *let 7*<sup>[108]</sup>，而此 *let 7* 不單

純只影響一種基因表現，它影響的基因分別有 *lin-14*、*lin-28*、*lin-41*、*lin-42* 及 *daf-12*。由於 miRNA 對於蛋白質生成有極大的關聯性，使得往後有許多 miRNA 陸續被發現，而在人體 miRNA 之研究中，已被順利發現上千種 miRNA 的存在<sup>[109]</sup>，其他生物種也有相關的報導，包含病毒<sup>[110]</sup>、昆蟲<sup>[111]</sup>、植物<sup>[112]</sup>及其他高等脊椎動物等。

### 1.2.3 訊息核糖核酸 (messenger RNA, mRNA)

在細胞質中，成熟的 mRNA 會經由核糖體進行轉譯作用生成蛋白質。核糖體將 mRNA 上的三個核苷酸轉變成一個胺基酸分子，不同的基因密碼，就會有不同的胺基酸，它們攜帶獨特的三位一體組合，稱為密碼子 (codons)，接著再經由胜肽鍵 (peptide bond) 將胺基酸們連接起來形成多肽鏈，最後此多肽鏈經過修飾後會形成具有特定功能之蛋白質。經過這一連串生化反應，造成生物體內蛋白質的多樣性，這種現象可在不同組織中受到嚴密的調控已符合生理功能。

### 1.2.4 核糖體核糖核酸 (ribosomal RNA, rRNA)

核糖體 (Ribosome) 是由兩個次單元 (subunits) 共同組成，大的次單元為核糖體蛋白質，小的次單元為 rRNA。其中 rRNA 在生物中廣泛存在，是一種具有催化能力的核糖酶，但單獨存在時無法發揮其作用，必須與大的次單元一同構成核糖體。rRNA 在核糖體中

扮演催化活性之骨架，而核糖蛋白則扮演穩定核糖體立體結構之角色。rRNA 為單股結構，但由於本身會自行雜合形成許多雙股區域，使它會互補成較穩定之結構。而在真核生物體中，rRNA 在總核糖核酸中約有 80%~85%之含量，且可依高速離心時之沉降速率（S : Svedberg unit）將它們分為 5S、5.8S、18S 及 28S 等四類。

rRNA 可以輔助 mRNA 附著到核糖體上，並形成 mRNA-核糖體複體（mRNA-ribosomal complex）。

### 1.2.5 傳遞核糖核酸（transfer RNA, tRNA）

tRNA 在蛋白質生成上扮演重要的角色，被稱為第二遺傳密碼。mRNA 在 tRNA 的幫助之下，成功使核苷酸與特定胺基酸結合，而 mRNA 上的三個核苷酸會對應一個特定胺基酸結合。tRNA 與 rRNA 相同，雖然是單股 RNA 之結構，但它會自己進行雜合折疊，形成穩定的四葉苜蓿（cloverleaf）形狀之二級結構與三級結構，如圖 1-5 所示。這種特殊結構可能是為了讓 tRNA 較容易進入核糖體進行轉譯時的功能。其序列長度約為 74~95 個鹼基（Nucleotide, nt）<sup>[113]</sup>。由於 tRNA 的稀有鹼基含量非常豐富，約有 70 餘種，因此不論在一級結構上，還是二、三級<sup>[114]</sup>的 tRNA 結構中發現其鹼基配對除了一般的 Watson-Crick 鹼基配對之外，還具有其他稀有鹼基配對模式，如 G 與 U 配對、G 與  $\Psi$  配對及 A 與  $\Psi$  配對， $\Psi$  為 U 分子內碳與氮位置互換

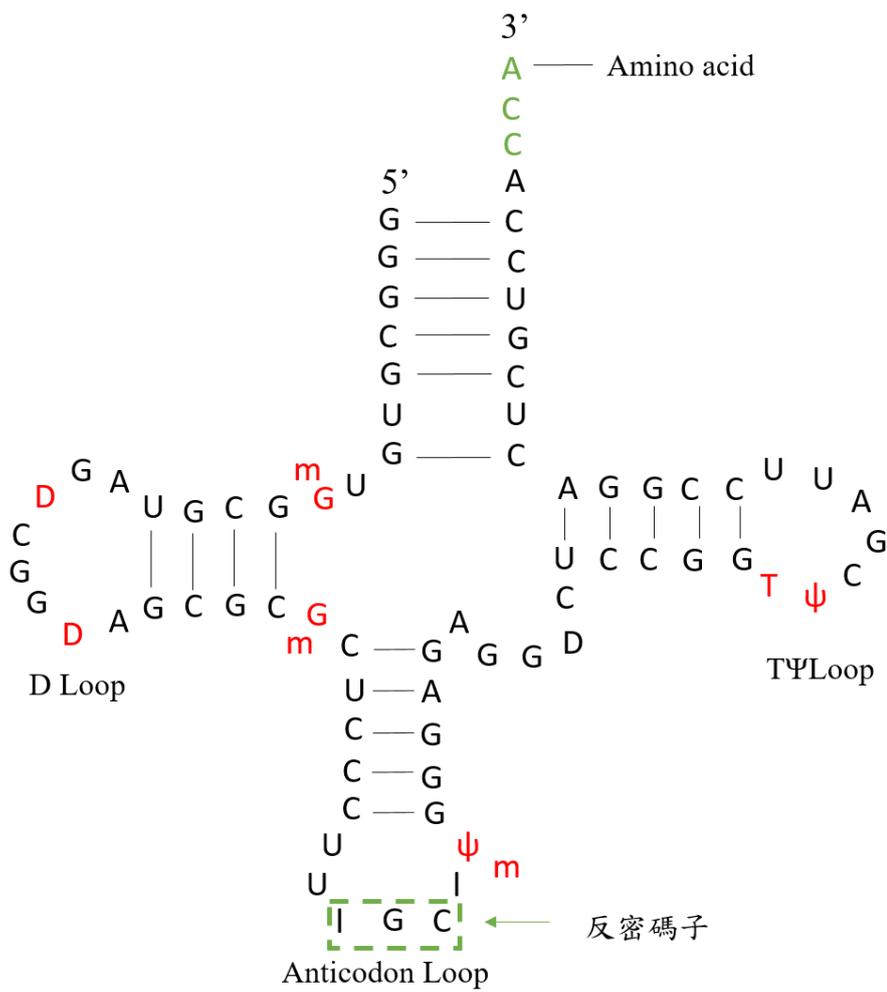


圖 1-4 tRNA 之二級結構示意圖

而生成，稱這些配對模式為擺動式 (Wobbling)，雖然此配對較不穩定，但會形成雙股螺旋 (double-helix) 之結構，使 tRNA 可維持著二級結構。在二級結構中，從 5'端起的第一個環是二氫尿嘧啶環 (Dihydrouracil Loop, D Loop)，以含二氫尿嘧啶 (Dihydrouracil, D) 為特徵；第二個環為反密碼子環 (Anticodon Loop)，其環中的三個鹼基可與 mRNA 中的三聯體密碼子互相配對，構成所謂的反密碼子，在蛋白質合成中解讀密碼子，把正確的胺基酸帶領到正確的地方；第三個環為 TΨ 環，此環以含胸腺嘧啶 (Thymine, T) 和假尿嘧啶 (Pseudouridine, PD, Ψ) 為特徵；最後在所有 tRNA 3'端均有相同的 CCA-OH 結構，此處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。大部分看到的 tRNA 序列都會接上一個胺基酸，稱為氨醯 tRNA (aminoacyl-tRNA)，例如: Tyr-tRNA、Arg-tRNA 及 Phe-tRNA 等等。所有 tRNA 均具專一性，實驗發現若改變其 3'端之胺基酸，而不改變反密碼子的序列，結果並不會影響反密碼子與密碼子間的配對，由此可知，tRNA 之專一性與 3'端上之胺基酸無關，而是由反密碼子決定。在蛋白質的生成過程中，tRNA 扮演著不可缺少之角色，因此當轉譯過程中發生錯誤時，可能會合成出完全不同的蛋白質。

## 1.2.6 小分子核糖核酸 (small RNA, sRNA)

### 1.2.6.1 微小核糖核酸 (mircoRNA, miRNA)

miRNA 是一段長度約 22 個核苷酸的核糖核酸分子，經由 DNA 轉錄而來，但無法進一步轉譯成蛋白質。其主要的功能為調控動物和植物的轉譯後修飾，很多癌症的形成是受到這些小 RNA 分子所影響<sup>[115]</sup>。miRNA 的序列長度並不是一轉錄出來就這麼短，而是在體內經過一連串的修飾後才產生的，如圖 1-6 所示。一開始先從 DNA 轉錄出一段長度為數千鹼基的初始核糖核酸 (primary miRNA, pri-miRNA)，而 pri-miRNA 會被細胞核中的 Drosha 酵素裁切形成約 70~90 個鹼基的單鏈 RNA，稱為前驅核糖核酸 (precurcor miRNA, pre-miRNA)。由於 pre-miRNA 本身序列彼此互補，因此會形成 3 端羥基上有兩個核苷酸突起莖環 (stem-loop) 之髮夾結構。接下來藉由 RNA GTP-dependent transporter exportin 5 的幫助，將 pre-miRNA 從細胞核送至細胞質中，讓水解酵素 Dicer 將其切割成雙股。此雙股 RNA 與 RNA 誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC) 之蛋白結合時，RISC 會把雙股的部分裂解成長度約為 19~25 個鹼基的單股成熟 miRNA。

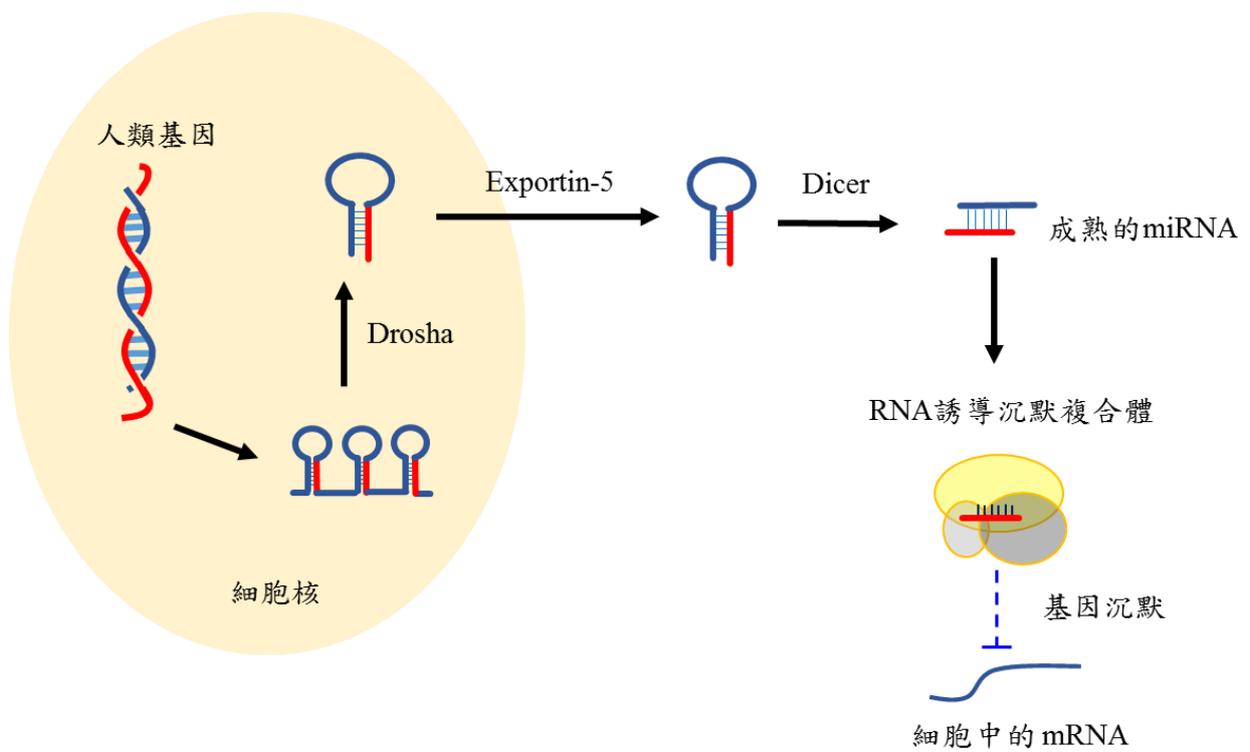


圖 1-6 miRNA 生成與調控基因的生化路徑

### 1.2.6.2 小干擾核糖核酸 (small interfering RNA, siRNA)

siRNA 是長度約 20~25 個核苷酸的雙股 RNA。在生物學上有許多不同的用途，主要是參與核糖核酸干擾 (RNA interference, RNAi) 現象。RNAi 是生物體內協助控制基因表現的一套系統，其以 miRNA 及 siRNA 這兩種小片段 RNA 為主要干擾蛋白質的表現，即可達到抑制基因表現的結果，稱為基因沉默 (gene silencing)。小干擾 RNA 可以用於病毒性疾病的基因治療。RNA 干擾可以被看成是一種與免疫系統類似的防禦機制。用小干擾 RNA 抑制人類免疫缺陷病毒 (HIV) 中的某些基因表達，阻礙 HIV 在細胞內複製。用 RNA 干擾技術抑制 HIV 的受體 (CD4) 或輔助受體 (CXCR4 或 CCR5) 在細胞內表達，即可阻礙 HIV 感染細胞，進而防止艾滋病的發生。也有其他通過 RNA 干擾技術而達到抑制病毒在細胞內複製的例子，例如脊髓灰質炎病毒、人乳頭瘤病毒、乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒等。

### 1.2.6.2 piwi 核糖核酸 (piwi-interacting RNA, piRNA)

piRNA 是由 Aravin 等人於 2006 年新發現的小分子 RNA<sup>[116]</sup>。它屬於非編碼小型核糖核酸中最主要的一種<sup>[117]</sup>，其長度約為 29-30 個核苷酸。piRNA 目前還沒有明確的二級結構，但大致可從結構上得知 5 端處有許多鹼基 U 存在。目前只在老鼠、果蠅、斑馬魚等哺乳動物細胞中發現<sup>[118, 119]</sup>，且 piRNA 主要分布於常見動物的生殖腺細胞中，

學者推測 piRNA 與動物精子之發育及生殖有關<sup>[120]</sup>。piRNA 的發現不僅為非編碼小型核糖核酸的研究開闢了一個新領域，同時，也能進一步了解生物配子發生的分子調控及機制，具有十分重要的理論價值及應用前景。

### 1.3 參考資料

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

16. Jacobson SC, Ramsey JM: **Microchip electrophoresis with sample stacking.** *Electrophoresis* 1995, **16**(4):481-486.
17. Colyer CL, Mangru SD, Harrison DJ: **Microchip-based capillary electrophoresis of human serum proteins.** *J Chromatogr A* 1997, **781**(1-2):271-276.
18. 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.
19. Knox JH: **Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation.** *Chromatographia* 1988, **26**:329-337.
20. de Gennes JL, Truffert J, Dairou F: **[Contribution of lipoprotein electrophoresis in polyacrylamide gel in the study of idiopathic hyperlipidemias].** *Ann Med Interne (Paris)* 1977, **128**(8-9):677-680.
21. Zhu M, Hansen DL, Burd S, Gannon F: *J Chromatogr* 1989, **480**.
22. Chin AM, Colburn JC: **Counter-migration capillary electrophoresis (Cmce) in DNA restriction Fragment analysis.** *American Biotechnology Laboratory* 1989, **7**(10A):16-16.
23. Chiari M, Nesi M, Roncada P, Righetti PG: **Preparative isoelectric focusing in multicompartement electrolyzers: novel, hydrolytically stable and hydrophilic isoelectric membranes.** *Electrophoresis* 1994, **15**(7):953-959.
24. Carrilho E, Ruiz-Martinez MC, Berka J, Smirnov I, Goetzinger W, Miller AW, Brady D, Karger BL: **Rapid DNA sequencing of more than 1000 bases per run by capillary electrophoresis using replaceable linear polyacrylamide solutions.** *Analytical chemistry* 1996, **68**(19):3305-3313.
25. Kleemiss MH, Gilges M, Schomburg G: **Capillary electrophoresis of DNA restriction fragments with solutions of entangled polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(5-6):515-522.
26. 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.
27. 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.
28. Chrambach A, Aldroubi A: **Relative efficiency of molecular sieving in solutions of four polymers.** *Electrophoresis* 1993, **14**(1-2):18-22.
29. Strege M, Lagu A: **Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries.** *Anal Chem* 1991, **63**(13):1233-1236.

30. Grossman PD, Soane DS: **Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solutions.** *J Chromatogr* 1991, **559**(1-2):257-266.
31. Baba Y, Ishimaru N, Samata K, Tshako M: **High-resolution separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis in cellulose derivative solutions.** *J Chromatogr A* 1993, **653**(2):329-335.
32. Heller C: **Principles of DNA separation with capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2001, **22**(4):629-643.
33. Skeidsvoll J, Ueland PM: **Analysis of RNA by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 1996, **17**(9):1512-1517.
34. Loo JA, Udseth HR, Smith RD: **Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry.** *Analytical biochemistry* 1989, **179**(2):404-412.
35. Dolnik V, Novotny MV: **Separation of amino acid homopolymers by capillary gel electrophoresis.** *Anal Chem* 1993, **65**(5):563-567.
36. 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.
37. Honda S, Suzuki K, Kakehi K: **Simultaneous determination of iodate and periodate by capillary zone electrophoresis: application to carbohydrate analysis.** *Analytical biochemistry* 1989, **177**(1):62-66.
38. Zhang CX, Aebi Y, Thormann W: **Microassay of amiodarone and desethylamiodarone in serum by capillary electrophoresis with head-column field-amplified sample stacking.** *Clin Chem* 1996, **42**(11):1805-1811.
39. Wey AB, Zhang CX, Thormann W: **Head-column field-amplified sample stacking in binary system capillary electrophoresis. Preparation of extracts for determination of opioids in microliter amounts of body fluids.** *J Chromatogr A* 1999, **853**(1-2):95-106.
40. Alkhalaf A, Zurbig P, Bakker SJ, Bilo HJ, Cerna M, Fischer C, Fuchs S, Janssen B, Medek K, Mischak H *et al*: **Multicentric validation of proteomic biomarkers in urine specific for diabetic nephropathy.** *PLoS One* 2010, **5**(10):e13421.
41. Delles C, Schiffer E, von Zur Muhlen C, Peter K, Rossing P, Parving HH, Dymott JA, Neisius U, Zimmerli LU, Snell-Bergeon JK *et al*: **Urinary proteomic diagnosis of coronary artery disease: identification and clinical validation in 623 individuals.** *J Hypertens* 2010, **28**(11):2316-2322.
42. Xue Y, Chen N, Luo CY, Wang XX, Sun CJ: **Simultaneous determination of seven preservatives in cosmetics by dispersive liquid-liquid**

- microextraction coupled with high performance capillary electrophoresis.** *Anal Methods-Uk* 2013, **5**(9):2391-2397.
43. Nakagawa T, Oda Y, Shibukawa A, Tanaka H: **Separation and determination of cefpiramide in human plasma by electrokinetic chromatography with a micellar solution and an open tubular-fused silica capillary.** *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1988, **36**(4):1622-1625.
  44. Chen YC, Chang PL: **Baseline separation of amino acid biomarkers of hepatocellular carcinoma by polyvinylpyrrolidone-filled capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence in the presence of mixed micelles.** *Analyst* 2015, **140**(3):847-853.
  45. Bahga SS, Chambers RD, Santiago JG: **Coupled isotachophoretic preconcentration and electrophoretic separation using bidirectional isotachopheresis.** *Anal Chem* 2011, **83**(16):6154-6162.
  46. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S: **Capillary electrophoresis: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York.** 1993.
  47. Colyar CL, Tang T, CHien N, Harrison DJ: *Electrophoresis* 1997, **18**:1733.
  48. Hjerten S: **High-Performance Electrophoresis - Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption.** *Journal of Chromatography* 1985, **347**(2):191-198.
  49. Liao JL, Abramson J, Hjerten S: **A Highly Stable Methyl Cellulose Coating for Capillary Electrophoresis.** *J Capillary Electrop* 1995, **2**(4):191-196.
  50. Olivera BM, Baine P, Davidson N: **Electrophoresis of the nucleic acids.** *Biopolymers* 1964, **2**:245.
  51. Grossman PD, Soane DS: **Experimental and theoretical-studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer-solutions.** *Biopolymers* 1991, **31**(10):1221-1228.
  52. De Gennes PG: **Scaling concepts in polymer physics.** Ithaca, New York: Cornell University Press; 1979.
  53. Ogston AG: **The spaces in a uniform random suspension of fibres.** *TRANSACTIONS OF THE FARADAY SOCIETY* 1958, **54**:1754.
  54. De Gennes PG: *J Chem Phys* 1971, **55**:572.
  55. Ferguson KA: **Starch-Gel Electrophoresis--Application to the Classification of Pituitary Proteins and Polypeptides.** *Metabolism: clinical and experimental* 1964, **13**:SUPPL:985-1002.
  56. 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.

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.** *Journal of chromatography A* 1995, **709**(1):147-156.
58. 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.
59. Chen DY, Dovichi NJ: **Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis.** *Journal of chromatography B, Biomedical applications* 1994, **657**(2):265-269.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Coble PG, Timperman AT: **Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor.** *Journal of chromatography A* 1998, **829**(1-2):309-315.
64. 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.
65. 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.
66. Kelly JF, Locke SJ, Ramaley L, Thibault P: **Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry.** *Journal of chromatography A* 1996, **720**(1-2):409-427.
67. Yang TH, Chang PL: **Determination of RNA degradation by capillary electrophoresis with cyan light-emitted diode-induced fluorescence.** *Journal of chromatography A* 2012, **1239**:78-84.

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. 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.
70. 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.
71. Ranade SS, Chung CB, Zon G, Boyd VL: **Preparation of genome-wide DNA fragment libraries using bisulfite in polyacrylamide gel electrophoresis slices with formamide denaturation and quality control for massively parallel sequencing by oligonucleotide ligation and detection.** *Analytical biochemistry* 2009, **390**(2):126-135.
72. Liu GH, Nakamura T, Amemiya T, Rajendran N, Itoh K: **Analysis of Bacterial Populations in the Environment Using Two-dimensional Gel Electrophoresis of Genomic DNA and Complementary DNA.** *Microbes Environ* 2011.
73. 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.
74. Lee MK, Kim HR: **[Comparison between Real-Time PCR and Agarose Gel Electrophoresis for DNA Quantification.]** *Korean J Lab Med* 2006, **26**(3):217-222.
75. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A: **Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.** *Science* 1997, **278**(5343):1580-1581.
76. Taillon-Miller P, Piernot EE, Kwok PY: **Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery.** *Genome Res* 1999, **9**(5):499-505.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. Fundador EV, Choudhary D, Schenkman JB, Rusling JF: **Accurate DNA fragment sizing by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence array for detection of sequence specificity of DNA damage.** *Anal Chem* 2008, **80**(6):2212-2221.
83. Li N, Jablonowski C, Jin H, Zhong W: **Stand-alone rolling circle amplification combined with capillary electrophoresis for specific detection of small RNA.** *Anal Chem* 2009, **81**(12):4906-4913.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.** *Journal of chromatography A* 2012, **1230**:123-129.
88. 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.
89. 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.** *Journal of chromatography A* 1994, **677**(1):169-177.
90. 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.
91. 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.
92. 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.
93. Ren J: **High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, **741**(2):115-128.
94. 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.** *Journal of chromatography A* 2000, **894**(1-2):171-177.
95. 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.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
  103. 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.
  104. 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.
  105. 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.
  106. 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.
  107. Sharp PA: **Split Genes and Rna Splicing (Nobel Lecture).** *Angew Chem Int Edit* 1994, **33**(12):1229-1240.
  108. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: **The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.** *Nature* 2000, **403**(6772):901-906.
  109. Kuo TY, Hsi E, Yang IP, Tsai PC, Wang JY, Juo SH: **Computational Analysis of mRNA Expression Profiles Identifies MicroRNA-29a/c as Predictor of Colorectal Cancer Early Recurrence.** *PloS one* 2012, **7**(2):e31587.
  110. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P: **Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA.** *Science* 2005, **309**(5740):1577-1581.
  111. Tran T, Havlak P, Miller J: **MicroRNA enrichment among short 'ultraconserved' sequences in insects.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(9):e65.
  112. Bartel B, Bartel DP: **MicroRNAs: At the root of plant development?** *Plant*

- Physiol* 2003, **132**(2):709-717.
113. Sharp SJ, Schaack J, Cooley L, Burke DJ, Soll D: **Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes.** *CRC Crit Rev Biochem* 1985, **19**(2):107-144.
  114. Itoh Y, Sekine S, Suetsugu S, Yokoyama S: **Tertiary structure of bacterial selenocysteine tRNA.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(13):6729-6738.
  115. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A *et al*: **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(30):10513-10518.
  116. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T *et al*: **A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes.** *Nature* 2006, **442**(7099):203-207.
  117. Seto AG, Kingston RE, Lau NC: **The coming of age for Piwi proteins.** *Mol Cell* 2007, **26**(5):603-609.
  118. Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD: **A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline.** *Science* 2006, **313**(5785):320-324.
  119. Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Philippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB *et al*: **A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish.** *Cell* 2007, **129**(1):69-82.
  120. 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 reports* 2010, **43**(9):635-641.

## 第二章 以毛細管電泳暨雷射誘發螢光偵測傳遞核糖核酸

### 2.1 緒論

癌症即為惡性腫瘤，是人體細胞的一種疾病。它是由控制細胞生長增殖機制的失常而引起。癌細胞除了生長失控外，還會破壞周圍的正常組織及經由體內循環系統或淋巴系統擴散至其他器官，變成侵襲性的癌症。致癌物質為引起基因突變之物質，可依照基因損傷的方式分為物理性致癌物及化學性致癌物。例如接觸放射物質，或是受到周圍環境影響而引致的，例如，吸菸、輻射、不健康飲食。還有某幾類癌症是經由病毒將本身的基因插入正常細胞的基因中，導致激活致癌基因，而由病毒引起的人類癌症約佔所有人類癌症的 15%<sup>[1]</sup>。但突變也會自然產生，所以即使已經避免接觸上述的致癌因子，仍無法完全預防癌症的產生。癌症為十大死因之首，且已蟬聯 33 年，有鑑於此，建立一個快速、經濟的癌症篩檢方法，能提早發現潛在及早期無症狀的癌症是必然的。

早在數十年前學者們就已經發現了傳遞核糖核酸( transfer RNA, tRNA)。而在 RNA 的家族中，tRNA 之序列長度約為 95 個核苷酸左右或更小，其在哺乳動物細胞中的含量為總核糖核酸的 10%~15%<sup>[2]</sup>。由於在蛋白質合成的過程中，tRNA 扮演非常重要的角色，因為如果

轉譯過程中發生錯誤，就可能會合成出不同的蛋白質。且近年來在一些文獻中指出 tRNA 與癌症的形成相當密切，例如乳癌 (breast cancer)<sup>[3]</sup>、卵巢癌 (ovarian cancer)<sup>[4]</sup>、尿路上皮癌 (urothelial cancer)<sup>[5]</sup> 等。毛細管電泳可應用於 RNA 分析上，但由於 RNA 具有結構不穩定性及較高的複雜性，因此 RNA 相關研究相對於 DNA 來的少。Santiago 等人利用等速電泳並搭配預前濃縮技術整合於微晶片電泳中來偵測小型 RNA<sup>[6,7]</sup>。2003 年 Yeung 等人成功利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光為基礎進行高通量的 RNA 表現之分析<sup>[8]</sup>。在 2007 年，Maroney 等人以夾板式結合反應 (splinted ligation) 為基礎偵測 miRNA<sup>[9,10]</sup>。2008 年，吾師成功利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光直接偵測鼻咽癌細胞中 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 的 miRNA<sup>[11]</sup>，其分析方法之特色能分離出相同長度之短序列核苷酸，此為第一篇使用毛細管暨雷射螢光之裝置對 miRNA 進行檢測。此方面研究相較於現今商品化儀器設計，已具備快速、經濟及高靈敏之基礎。

想要對細胞中的特定 tRNA 進行定量是一件困難的事情。因為 tRNA 在人體中的序列長度較短 (約有 74~95 個核苷酸)，且不同 tRNA 之間除了序列相似外，也有類似的二級和三級結構<sup>[12]</sup>。而目前市面上有許多偵測 tRNA 的方法，包括即時定量聚合酶連鎖反應 (Real Time qPCR)、反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)、北方墨點法 (Northern

blot)及微陣列分析(Microarrays)<sup>[13]</sup>等等。其中，微陣列分析是一種小型的分析裝置，是以微小化技術將生物有機分子作為探針，再以大量矩陣的方式，置於一個指甲大小的矽晶片、玻璃片或尼龍薄膜上面，用以檢測經過標記的分子。此技術可廣泛應用於檢測和量化 DNA 或 RNA 上。其優勢是可提供快速、精確性高及高通量的方法去研究生物體的基因組資訊。另一種可檢測 tRNA 的方法為反轉錄聚合酶連鎖反應。RT-PCR 的定義就是將目標細胞內的 RNA 反轉錄成 DNA，接著以此為模板進行 PCR 反應使 DNA 擴增。RT-PCR 的指數擴增是一種很靈敏的技術，可用於檢測低濃度的 RNA。至於即時定量聚合酶連鎖反應是一種在 DNA 擴增反應中，以螢光染劑偵測每次聚合酶連鎖反應循環後產物總量的方法。其偵測範圍廣、靈敏度高、準確、專一及快速。因而用於癌症監測、診斷個別基因差異等應用大幅提高。此處所討論之最後一種方法為北方墨點法，北方墨點是利用標記的探針與轉印膜上的標靶 RNA 片段進行雜合，雜合完成後再針對要研究的 RNA 進行鑑定。此方法已被普遍用於研究生物體中的特定基因表現量，也是這類研究中最基本的方法。上述所提及的幾種檢測 tRNA 之方法，目前都是市面上被大家所熟知的偵測方式。不過它們還是存在著些許缺點，像是微陣列分析方法之再現性不佳，且其實驗設計繁瑣、複雜。而 RT-PCR 及 Real Time qPCR 缺點皆為成本耗費高、所需

試劑太過昂貴。至於北方墨點法的缺點為耗時、樣品需求量大以外還具有放射性危害。因此需要發展出一種檢測方法具有成本低，且專一及快速之優點。而本篇論文研究利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光結合夾板式結合反應偵測技術，以填充 7% 聚乙烯吡咯烷酮及加入高濃度尿素，能夠在 30 分鐘內成功進行螢光偵測特定 tRNA。其中，實驗上所使用之藥品試劑相較於 Syber Green 等螢光染劑便宜許多，且此方法也能針對特定 tRNA 進行偵測，是屬於具有專一性之分析方法。本實驗除了試劑成本低以外，在實驗設計上也相當容易，僅需運用到簡單的雜合原理，而在反應過程中不用經過 DNA 擴增步驟，且只使用一種螢光探針即可辨識出不同種 tRNAs。

表2-1 檢測tRNA之方法比較

| 方法          | 優點               | 缺點                    |
|-------------|------------------|-----------------------|
| 微陣列分析       | 樣品需求量低、精確性高、高通量  | 實驗設計複雜、再現性不佳、靈敏度低     |
| 反轉錄聚合酶連鎖反應  | 樣品需求量低、靈敏度高、具專一性 | 成本高、低通量               |
| 即時定量聚合酶連鎖反應 | 樣品需求量低、靈敏度高、具專一性 | 成本高、低通量               |
| 北方墨點法       | 操作簡單             | 樣品需求量大、耗時、靈敏度低、具放射性危害 |
| 毛細管電泳       | 樣品需求量低、靈敏度高、快速   | 再現性不佳、低通量             |

## 2.2 實驗部分

### 2.2.1 實驗試藥

PVP (polyvinylpyrrolidone,  $M_{ave}$  1,300,000 g/mol) 購自英國 Alfa Aesar。4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Free Acid)、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, sodium salt (HEPES, Sodium Salt)、異丙醇(isopropanol)皆購自美國 J. T. Baker。尿素(urea)購自比利時 Acros Organics 公司。10×PCR buffer, without  $MgCl_2$ 、10×PCR buffer, with  $MgCl_2$ 皆向瑞士 Roche 購買，T4 DNA 結合酵素(T4 DNA Ligase)是向美國 New England Biolabs 購買。培養基(DMEM)、胎牛血清(FBS)及 0.5% Trypsin-EDTA 皆向 Gibco 公司購買，三合一抗生素 (Pen-Strep Ampho. Solution) 及丙酮酸鈉(Sodium pyruvate)係向 Biological Industries 公司購買。TRI reagent、氯仿(chloroform)向美國 Ambion 公司購買。培養基(F12K)、DEPC Treated Water 皆向美國 Invitrogen 公司購買。乙醇(ethanol)購自台灣景明公司。核糖核酸酶 A (Ribonuclease A, RNase A) 向台灣旭基公司購買。表 2-2 為實驗中使用到的 HPLC 等級之寡核苷酸序列，其序列皆購自美國 Integrated DNA Technologies 公司，DNA Bridge 以及螢光探針之序列參考 PubMed、Transfer RNA Database、Human mt tRNA & Pathologies 所公布的 tRNA 序列來設計，螢光探針的 5'端部

表2-2 實驗所用之核苷酸

| 名稱                   | 長度  | 序列 (5' - 3')                                      | 熔點溫度 |
|----------------------|-----|---|------|
| Fluorescent probe    | 10  | Phos-TCGGTCAGCA-Alexa Fluor 647                   | 32   |
| Tyr-tRNA             | 20  | GAUUCCGGCUCGAAGGACCA                              | 64   |
| Arg-tRNA             | 20  | AUAAUCAUAAUUACCAACCA                              | 50   |
| Met-tRNA             | 20  | GAUCCUCACACGGGGCACCA                              | 66   |
| Phe-tRNA             | 20  | GAUCCCGGGUUUCGGCACCA                              | 66   |
| Tyr-tRNA bridge      | 86  | TGCTGACCGATGGTCCTTCGAGCCGGAATC                    |      |
| Arg-tRNA bridge      | 96  | (AC) <sub>9</sub> TGCTGACCGATGGTTGGTAAATATGATTAT  |      |
| Met-tRNA bridge      | 106 | (AC) <sub>10</sub> TGCTGACCGATGGTGCCCCGTGTGAGGATC |      |
| Phe-tRNA bridge      | 116 | (AC) <sub>15</sub> TGCTGACCGATGGTGCCGAAACCCGGGATC |      |
| TB11-Alexa Fluor 647 | 20  | ACCAACGATGGTGTGTCCAT                              | 56.8 |

分修飾磷酸根，3'端部分修飾有螢光分子。

## 2.2.2 細胞培養 (cell culture)

本實驗中所使用到的癌症細胞除了 SV-HUC-1 此種細胞培養於 F12 培養液以外，其他癌症細胞皆培養於 DMEM 培養液中。所有細胞皆於 6 公分的培養皿中進行培養，於培養皿中加入 3mL 的培養液，其中 DMEM 培養液中包含 10% FBS、0.01× PSA 及 1mM 丙酮酸鈉，而 F12 培養液中僅含有 7% FBS 之營養來源；接著將細胞置於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 環境下，當細胞生長至佔滿整個培養皿時，細胞會停止生長進入平穩期，若繼續培養，細胞會因培養物殆盡，代謝物增加，生長環境惡化而進入死亡期，因此若要維持細胞的存活，即需進行繼代培養，由於本實驗所使用之癌症細胞皆屬於貼附性生長的細胞，因此細胞於培養皿中生長時會貼附於盤底。於繼代培養時先以 PBS 含 EDTA 之溶液清洗細胞，清洗完後將溶液吸棄，再加入 1× trypsin-EDTA (in PBS)，於 37°C 下反應 3 至 5 分鐘，使細胞離開培養皿表面，並加入等量之培養液終止 trypsin-EDTA 反應，收集細胞懸浮液至 15mL 離心管，以 400×g 離心 5 分鐘使細胞沉澱，吸去上清液後，立即加入培養液，並反覆吸吐使沉澱之細胞完全懸浮，吸取適量之細胞分散加入至培養皿，最後將培養皿放到培養箱中持續培養。

### 2.2.3 核糖核酸萃取 (RNA extraction)

從人體細胞中將 RNA 萃取出來主要的步驟包括打破細胞、以特定方式移除細胞內的蛋白質和 DNA，及將 RNA 沉澱出來。先將細胞以 PBS 清洗後，加入 TRIzol reagent<sup>[14]</sup>，以吸吐的方式使細胞脫離培養皿，收集 TRIzol 溶液（若未立即進行 RNA 萃取程序，應保存至-60°C~-70°C，可放置一個月）至 10ml 離心管，接著在混合液中加入氯仿（chloroform）（1ml TRIzol 溶液:0.2 ml 氯仿），並以 Vortex 劇烈震盪均勻 30 秒後靜置 3 分鐘，以 12000×g，4°C 離心 15 分鐘。當離心完成後可以明顯看出分成三層，上層是透明的水層，中間層為蛋白質，最下層粉紅色溶液為有機層和 DNA，而我們要的 RNA 就溶解在水層中。將上層水溶液分段吸取到 1.5ml 的離心管中，此步驟需謹慎操作，若不慎吸取到有機溶液和蛋白質，可能會造成後續實驗處理上的困擾甚至失敗。在 1.5ml 離心管中加入 TRIzol 溶液用量一半的異丙醇（isopropanol），混合均勻並靜置 10 分鐘後，以 12000×g，4°C 離心 10 分鐘。RNA 會呈現膠狀或白色沉澱。移除離心後的上清液，加入與 TRIzol 溶液用量一樣的 4°C，75% 乙醇（ethanol）震盪，以 7500×g，4°C 離心 5 分鐘。將乙醇小心的移除，再用真空幫浦抽 3~5 分鐘，讓殘留的乙醇揮發後，再回溶於 60°C 的 DEPC 水。其流程如圖 2-1。最後在進行後續實驗之前，都必須先進行 RNA 品質的測定。

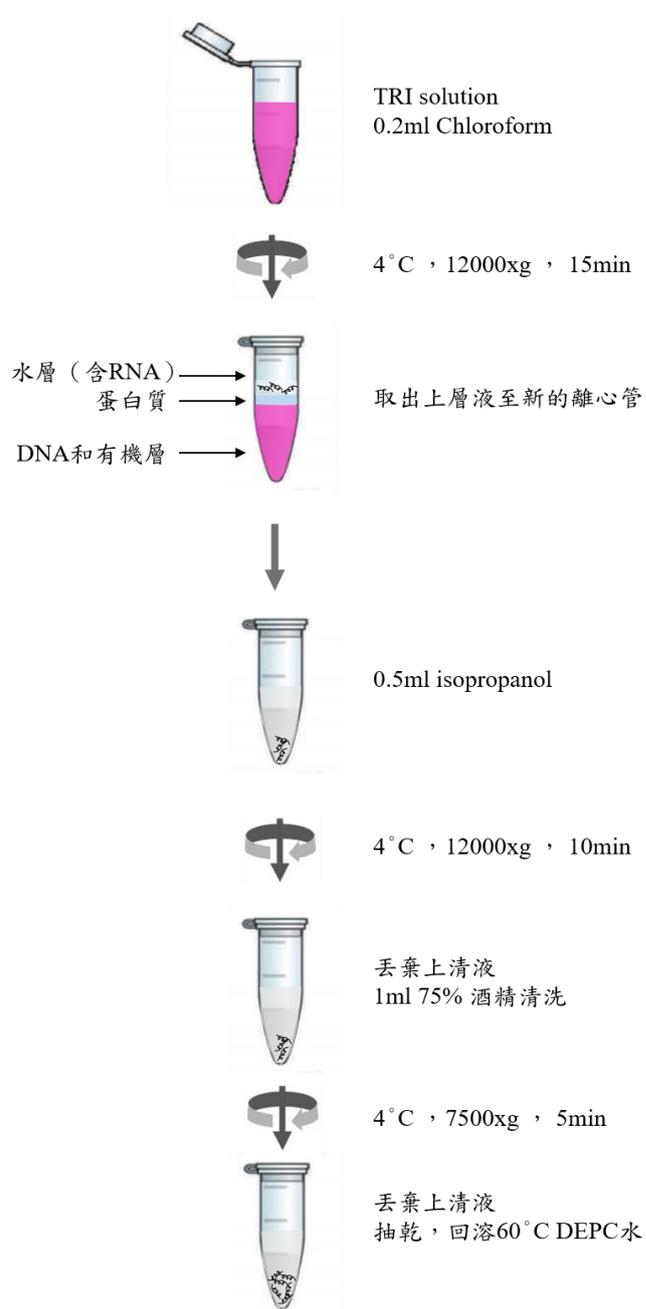


圖 2-1 核糖核酸萃取流程圖

學生會先去測 RNA 的吸收值，而理想 A260nm 與 A280nm 的吸收值 (A260/ A280) 必須在 1.9~2.1 之間，若 A260/ A280 低於 1.9，代表萃取出來的總 RNA 中殘留了過多的蛋白質。但是單頻測定 RNA 的吸收值無法確定 RNA 片段是否完整，因此除了吸收值的測定還需要配合電泳才能判斷 RNA 品質的好壞，而完整 RNA 的電泳圖如圖 2-2<sup>[15]</sup>。不論採用哪一種方法，皆需注意 RNase 所造成的問題。由於 RNase 非常穩定存在於溶液、空氣及實驗器材表面，使的萃取的 RNA 不易保存，因此在萃取 RNA 的過程中，除了玻璃、塑膠器皿要預先處理滅菌過以外，學生需全程戴手套操作，才能降低 RNase 對 RNA 的污染，以維持所獲得 RNA 之完整性。

#### 2.2.4 實驗裝置

本實驗除了毛細管電泳裝置外，還需其他儀器來處理樣品，這些儀器包括空離心濃縮機、離心機、聚合酶連鎖反應加熱器。聚合酶連鎖反應加熱器係由日商公司 Astec 所製造生產，型號為 PC-818A。加熱器內部所使用到的金屬模板皆採用全鋁材質，可使增加熱傳導速率增快，並由微電腦 PID 控制升降溫，使得在升降溫過程中，讓每個部位的鋁塊皆能受熱均勻。加熱器於本實驗中是用來加熱 DNA、RNA，並進行雜合反應 (hybridization) 及結合反應 (ligation)，可以藉由程式

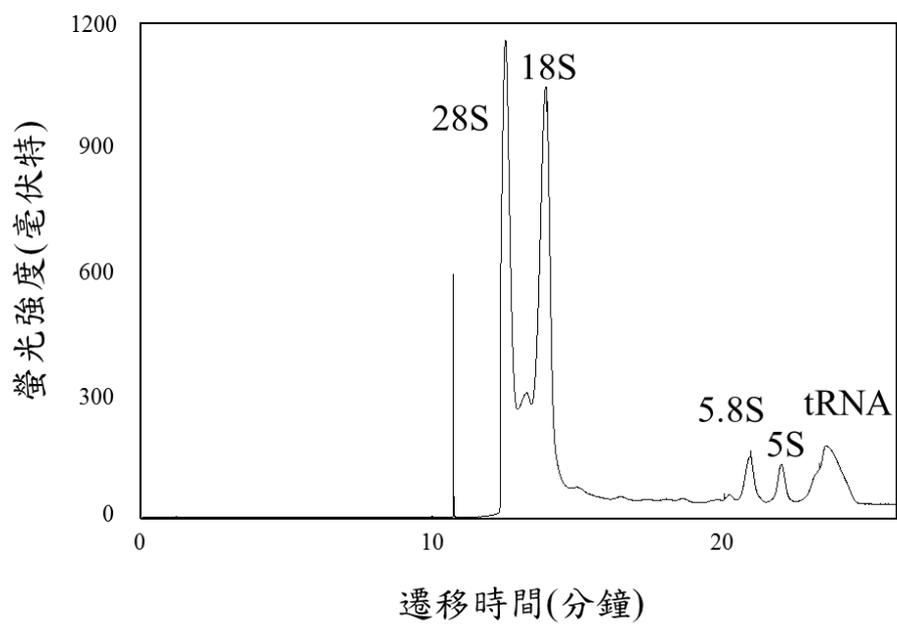


圖 2-2 完整 RNA 之電泳圖

設定進而控制 DNA、RNA 變性、黏合的溫度與時間。除了可精密控溫外，鋁塊上方具有 96 個孔洞( well )可以進行大量的聚合酶連鎖反應，而且升降溫速度也快，可達每秒 3°C，精確度可達到 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ，因此節省許多時間，來累積更多數據。離心機是由日商 KUBOTA 公司所生產，其目的在於加速 DNA 樣品的沉澱速率。真空離心濃縮機由英國 Genevac 公司所製成，型號為 DUC-12060-C00，其旋轉盤型號為 DRC-15EPP-048。在本次實驗濃縮樣品以及清洗樣品後所進行抽乾的動作所需要。

### 2.2.5 毛細管電泳暨雷射誘發螢光

本實驗所使用的激發光源系由中國大陸 Changchun New Industries Optoelectronics Tech.公司所生產的固態雷射，其主要激發波長為 640nm，功率為 10mW。高電壓電源供應器是向 Gamma High Voltage Research 公司 (Ormond, FL, USA) 購買，並以此裝置來驅動電泳。本實驗所使用的毛細管電泳裝置都是自行組裝而成。實驗裝置如圖 2-3 所示。首先將雷射光源平行射向毛細管，並用凸透鏡將雷射光聚焦在毛細管偵測視窗上，再以 10 $\times$  接物鏡( numerical aperture = 0.25 )於 90° 的方向接收光源後，先以一 notch 濾片 NF03-633E (購自 Semrock, Rochester, NY, USA) 消除大部分的雷射散射光，接著加裝

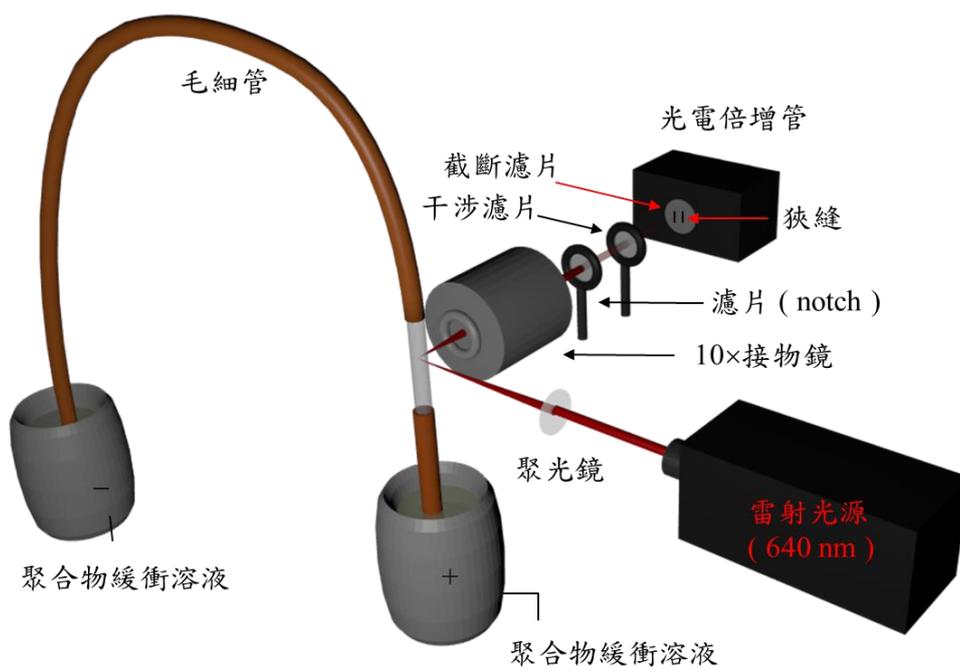


圖 2-3 毛細管電泳暨雷射誘發螢光裝置圖

671nm 的干涉濾片與 RG-665 之截斷濾片(皆購自 Edmund, Barrington, NJ, USA), 此兩種濾片是為防止散射光與其他發散螢光波長影響背景值。由於此款雷射在雜訊方面會比其他雷射大許多, 故在雷射前端加裝一雷射濾片 LD01-640, 此濾片是由美商 Semrock 所購得。其中當雷射光照射到毛細管之偵測視窗時, 若毛細管內部添加聚合物緩衝溶液有可能會因為拉曼散射的原因, 使散射光紅位移, 因此才需要添加干涉濾片以及截斷濾片來過濾散射光源。最後再使用光電倍增管 (R3896, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) 偵測光學訊號, 當訊號進入光電倍增管放大後, 再由 10  $\Omega$  的電阻將電流訊號轉換成電壓訊號, 並由 24-bit 數位類比轉換器 (A/D converter, JMBS Development 製造) 以 10 Hz 的頻率擷取訊號並轉換成數位資料儲存於電腦中, 最後用層析軟體 Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) 將其轉換成電泳圖。本實驗是利用光學的方式來進行, 因此為避免不必要的光源干擾, 整個實驗過程需使用黑布將其遮蔽。

### 2.2.6 毛細管前處理

本實驗所使用之熔融矽毛細管購自美國 Polymicro Technologies 公司, 選用內徑約為 75  $\mu\text{m}$ , 外徑約為 365  $\mu\text{m}$  之毛細管進行後續實驗。而在進行電泳分析前, 需先用石英片切一段 40 公分長之毛細管, 並在

末端 7 公分處用打火機將毛細管外壁之聚亞醯胺 (polyimide) 燒掉，露出約為 0.5 公分的玻璃面來當作偵測視窗，接著先用去離子水活化表面之官能基，再通入 PVP 聚合物溶液(5% in H<sub>2</sub>O)於毛細管內塗覆內壁，靜置至隔天，最後再使用去離子水洗掉內部多餘的聚合物，經由以上處理後，除了可有效防止 DNA 及 RNA 吸附，還能抑制 EOF 使分離的解析度得以改善，以提高實驗之再現性與靈敏度。

### 2.2.7 聚合物溶液製備

配置聚合物溶液前，所有玻璃器具、磁石皆須以去離子水清洗乾淨，並使用超音波震盪器震盪 5 分鐘。首先配置 10mM HEPES pH8.0 緩衝溶液，再將含有高濃度的尿素(7 M)溶於緩衝溶液中，待完全溶解後，將此緩衝溶液後倒入 125 ml 錐形瓶內，秤取 3.5 g 的 PVP 粉末後，再將粉末緩慢倒入錐形瓶中，再以封口蠟膜將瓶口封上，並攪拌至隔天，最終配置成 7% PVP。攪拌至少要十二小時以上才能確保已完全溶解且均勻。將配置好的聚合物溶液倒入 50 mL 離心管，之後可放置室溫，當要使用時，吸取 1.5 mL 至 1.5 mL 離心管柱，再以 10000×g 離心 10 分鐘去除裡面的氣泡，便可使用。

### 2.2.8 變性電泳系統

實驗用毛細管是選用內徑為 75  $\mu\text{m}$ 、外徑為 365  $\mu\text{m}$  的尺寸，購自美國 Polymicro Technologies 公司，材質為熔融矽(fused silica)。毛細管長度為 40 公分，有效長度為 33 公分，並於實驗前在末端 7 公分處燒一約 0.5 公分之偵測視窗。本系統因毛細管會在使用前先以去離子水活化毛細管內壁的官能基，再利用 5% PVP 塗覆於毛細管內壁，並靜置一晚，因此本系統是在沒有電滲流的情況下分離。而因為有此塗覆動作，可預防之後進行電泳時，會有 RNA 或 DNA 吸附之問題，亦可使電滲流的現象被抑制。毛細管變性電泳系統主要是用來分離單股與雙股 DNA 片段，在高濃度的尿素(7 M)輔助之下，可以維持單股去氧核糖核酸探針的構型並使雜交後之雙股核酸結構不致發生變性行為，因此能夠於毛細管中被分離。在實驗過程中，便可藉由含高濃度尿素之聚合物溶液，使特定長度的短鏈雙股寡核苷酸 (~10 bp) 在雙股的位置解開成單股，接著再藉由雷射誘發螢光之技術來進行偵測。高濃度尿素的聚合物溶液須以高壓方式推入毛細管內，再插入白金電極，但為安全起見，高電壓輸出端須穿過自製的 plexiglass box 防止觸電，並施以高電壓來達到電泳的目的。

### 2.2.9 實驗流程

在進行毛細管電泳前，除了會先使用去離子水清洗毛細管外，還會以針筒注射器注入 10 mM HEPES pH 8.0, 7M Urea, 7 % PVP 之聚合物溶液到鐵氟龍管中（此時管內不得有氣泡產生），接著使用高壓氮氣（約 200 psi 左右）將鐵氟龍管中的聚合物溶液推入毛細管中，使聚合物溶液充滿整個毛細管（40 公分），再將末端毛細管以及正電極插入聚合物溶液中。隨後將負電極與毛細管進樣端插入樣品試管中，利用電動力進樣（electrokinetic injection）的方式，在 200 V/cm 的電場下進樣 10 秒鐘。最後將毛細管進樣端插入聚合物溶液中形成電通路，並以 10kV 之高電壓進行電泳分離，當分析物經過毛細管 33 公分（偵測視窗）處時，樣品中的螢光探針能被雷射激發出螢光，最後再由層析軟體進行訊號處理。分析完後，同樣以高壓氮氣將高黏度的聚合物溶液推出，再以去離子水洗清殘留之聚合物溶液，即可進行下個實驗。

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

實驗中所設計的 DNA bridges 及螢光探針，都是由 PubMed、Transfer RNA Database、Human mt tRNA & Pathologies 所公布的 tRNA 序列來設計。首先進行雜合反應溶液之配製，添加 0.5  $\mu$ L 的 10 $\times$ 含鎂離子之 PCR 緩衝溶液（20mM）、1  $\mu$ L 的螢光探針（0.5  $\mu$ M）、1  $\mu$ L 的 tandem adenosine-tailed bridge DNAs（0.5  $\mu$ M）、及真實樣品（total RNA），最

後將混合液體積用去離子水稀釋至 5  $\mu\text{L}$ 。接著使用震盪器將樣品混合均勻後，放入聚合酶連鎖反應器中加熱，此時便開始進行雜合反應。雜合反應一開始會先將溫度上升到 70 $^{\circ}\text{C}$  持續加熱 10 分鐘，此時是為了要把糾纏在一起的 DNA 及 RNA 序列以高溫方式解開。隨後再以梯度方式將加熱溫度緩慢下降，在 30 分鐘內溫度從 70 $^{\circ}\text{C}$  下降至 60 $^{\circ}\text{C}$  (速率：約 0.3 $^{\circ}\text{C}$ /分鐘)，這是為了將 tandem adenosine-tailed bridge DNA 的 3' 序列與 tRNAs 進行雜合，之後再將溫度下降至 20 $^{\circ}\text{C}$  維持 10 分鐘，此時能將螢光探針雜合至 bridge 的 5' 序列上。當雜合反應結束後，即可形成一夾板狀的形式。將完成雜合之溶液加入 1  $\mu\text{L}$  的 10 $\times$  結合酶緩衝溶液、0.2  $\mu\text{L}$  T4 DNA ligase (5 Weiss units/ $\mu\text{L}$ )，最後同樣以去離子水稀釋至 10  $\mu\text{L}$ 。將樣品溶液混合均勻並放入聚合酶連鎖反應器中，以溫度 16 $^{\circ}\text{C}$  維持 30 分鐘。T4 DNA ligase 主要目的是將 5' 上螢光探針的磷酸基及 tRNA 3' 上 2 號碳位置的氫氧基接合，形成磷氧鍵結構，因此此處會有雙股 DNA 的結構生成，其實驗示意圖如 2-4。然而在溶液中，螢光探針與 tandem adenosine-tailed bridge DNA 皆是屬於過量試劑，而這兩者在進行雜合反應時，序列會互補在一起，但為了使這 10 bp 的互補序列氫鍵部位解開，可以利用含有 7 M 尿素之變性電泳來進行此工作，這也使得此實驗達到更具專一性的偵測效果。

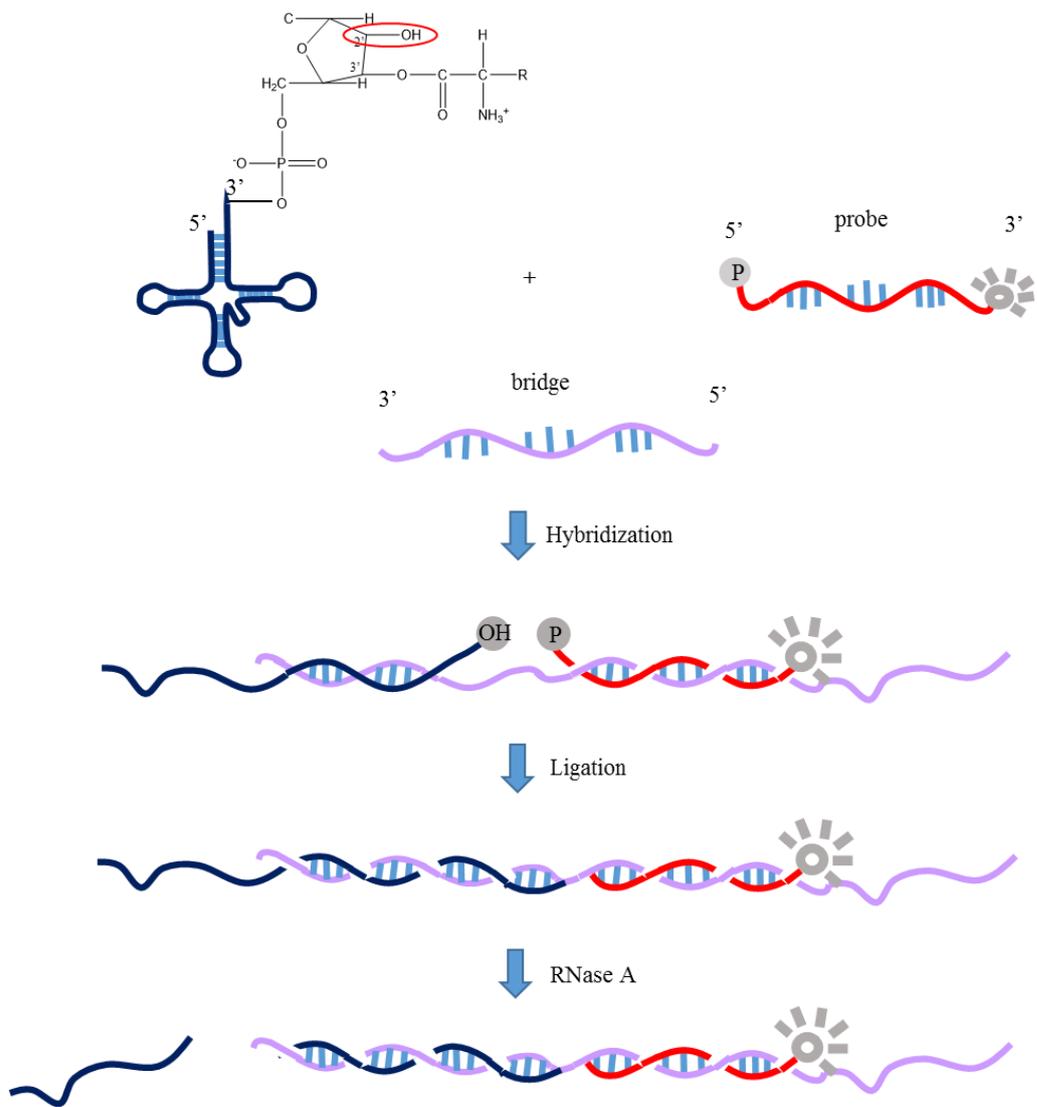


圖 2-4 實驗設計之流程圖

## 2.2.11 酒精清洗

為了使雜合反應及夾板式結合反應能夠順利進行，會在反應過程中加入高濃度的離子鹽類。因此經過一連串的生化反應後，樣品溶液中不僅含有待測產物，還會有高濃度的離子鹽類，但高濃度的離子鹽類會在電泳分析時，使樣品的進樣量減少及改變毛細管內離子之平衡，進而導致訊號區帶有變寬的情形，影響最後實驗結果之解析度。因此有效的去除溶液中之鹽類，便是電泳分析前必備的工作。其清洗步驟如圖 2-5。在進樣之前，必須使用酒精將樣品溶液中的離子鹽類去除，因為對於離子鹽類而言，在酒精溶液中的溶解度比 DNA 要來的好，因此當酒精加入樣品溶液時，離子鹽類會溶於酒精當中，而 DNA 則會產生沉澱，利用此特性以離心的方式可加速 DNA 沉澱析出，如此方可將產物純化。此純化方法首先將 190  $\mu\text{L}$  的 60%酒精緩慢加進 10 $\mu\text{L}$  的樣品溶液中，並倒立一次後，使用離心機以 15,000 $\times g$  離心 30 分鐘。結束離心後，小心地以移液管沿著液面吸取 190  $\mu\text{L}$  的上清液，並要注意吸取的動作，勿吸取到沉澱於離心管底的 DNA，之後再添加 80%的酒精 190  $\mu\text{L}$ ，來回倒立五次混合均勻，同樣使用離心機以 15,000 $\times g$  離心 5 分鐘，再以上述吸取上清液之方法吸取溶液。接著重覆上述 80%酒精清洗方法動作四次。清洗完畢後，將上清液吸到剩下約 10  $\mu\text{L}$ ，便將剩餘溶液放入真空離心機濃縮機進行抽乾，乾燥完畢

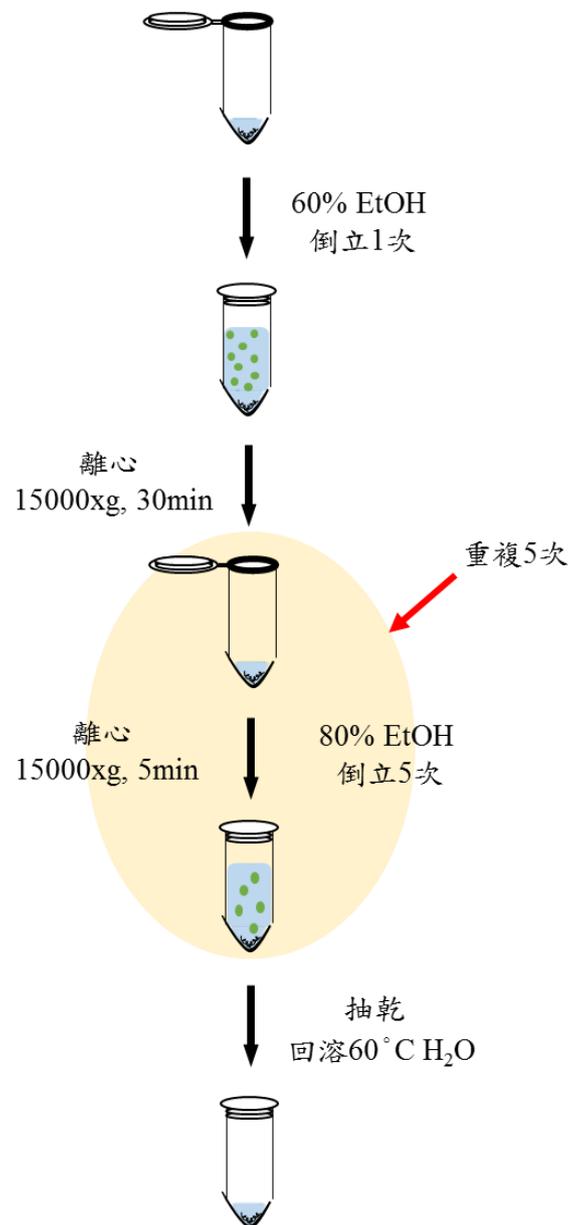


圖 2-5 酒精清洗示意圖

後以 60°C，10 μL 去離子水將沉澱在底部的 DNA 產物回溶，方可進行毛細管變性電泳之分離。

### 2.2.12 核糖核酸酶 A (Ribonuclease A, RNase A) 之水解作用

此實驗進行完生化反應以及酒精清洗步驟後，會在樣品溶液中加入 RNase A，得以證實反應完成後的產物是否如原先所預期之實驗結果。RNase A 來自牛胰腺，是一種具有廣泛應用且為高度專一性之核酸內切酶，此酵素僅對單股的 RNA 有水解作用，對雙股 RNA 及 DNA 則不起作用。而 RNase A 在鹼基 C 和 U 處專一地進行催化，將 3' 與 5' 之間的磷酸二酯鍵斷裂，形成具有 2' 與 3' 的環磷酸衍生物寡核苷酸，其反應機構圖如圖 2-6。於樣品溶液中加入 1μL 的 RNase A (50ng/μL)，放置室溫反應 10 分鐘，結束反應後方可進行電泳分析。

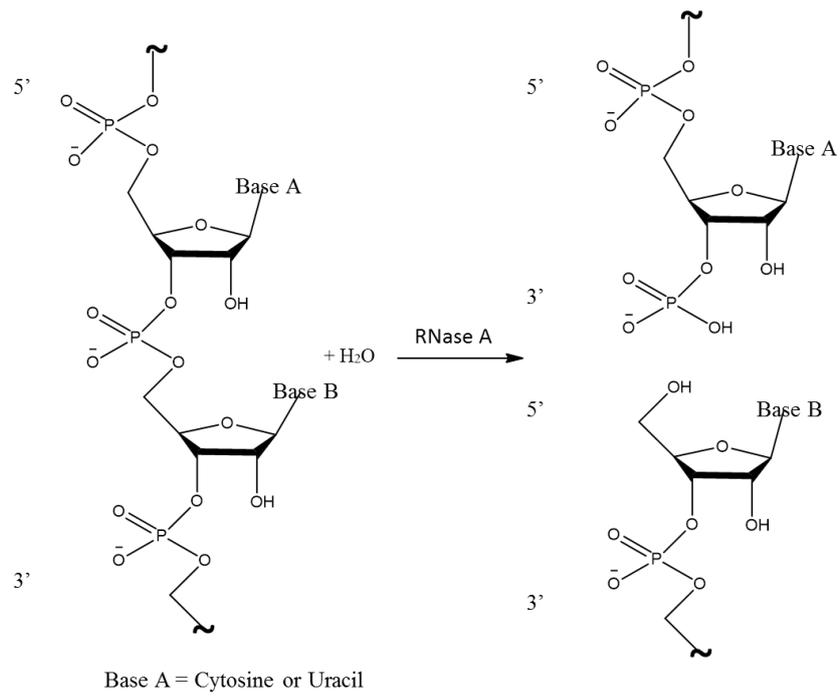


圖 2-6 RNase A 水解反應示意圖

## 2.3 結果與討論

### 2.3.1 PCR 緩衝溶液之選擇

由於傳遞核糖核酸與許多疾病息息相關，因此需要一種能夠及時針對真實樣品偵測之方法，而在先前本實驗室學長利用夾板式結合反應檢測複雜微小核糖核酸，使原本序列長短相似的微小核糖核酸在毛細管電泳中能夠被分離開來。而本實驗首先將總核糖核酸萃取出來後，再同樣使用夾板式結合反應進行傳遞核糖核酸序列長短改變。實驗中學生先針對四種與癌症相關之傳遞核糖核酸進行分析，分別是 Tyr-tRNA、Arg-tRNA、Met-tRNA 及 Phe-tRNA，而要將這四種傳遞核糖核酸分離開來，因此，設計四種序列長度各相差 10bp 的橋樑 DNA (bridge DNA) 與總核糖核酸中的核糖核酸進行生化反應，反應結束後再進行電泳分析。進行生化反應時，須於樣品溶液中加入緩衝溶液，以提供適合聚合酶行使功能的化學環境，其中 PCR 緩衝溶液可分為含有氯化鎂 ( $MgCl_2$ ) 及不含氯化鎂兩種，而氯化鎂主要是提供鎂離子作為聚合酶的輔因子。在進行實驗時分別於樣品溶液中加入含有氯化鎂及不含氯化鎂兩種，其結果如圖 2-7。可明顯看出圖 2-7a 無法將四種混合之 tRNAs 完全分離，其第一根訊號高於其它兩根是因為單獨進樣一種 tRNA 時，四種 tRNAs 分別都在相同位置有訊號，累加而得，會造成此種結果可能是因為模板變性不完全，且鹼基 G 與 C

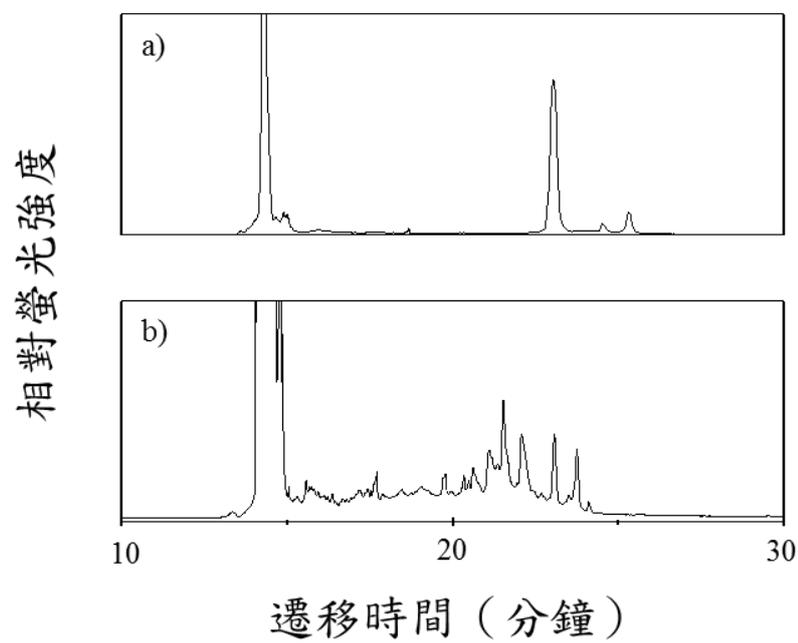


圖 2-7 於雜合反應過程中使用不同 PCR 緩衝溶液，其分離之電

泳圖：a) 不含氯化鎂 PCR 緩衝溶液。b) 含氯化鎂 PCR 緩衝溶液。

配對的數目較多變性溫度也會比較高，為了使 tRNAs 能夠分離，將 PCR 緩衝溶液換成含有氯化鎂的條件，其結果如圖 2-7b 所示，由於鎂離子的濃度會影響引子的黏合、雙股模板變性溫度、產物的特異性及酵素的活性，所以當反應過程中有鎂離子時，DNA 變性溫度降低，使 DNA 與模板 DNA 之間的打開及黏合過程變的更容易，不易發生錯誤。本實驗最後選擇含有氯化鎂之 PCR 緩衝溶液作為雜合反應的條件。

### 2.3.2 聚合溶液之選擇

此實驗與本實驗室之學長先前所進行的研究相似，因此學生也利用 7% PVP 聚合物進行不同長度之核糖核酸序列分離，且內含有 7 M 的尿素，配製聚合物所使用的緩衝溶液則使用 10 mM HEPES pH 8.0。由於經實驗結果得知，緩衝溶液在低 pH 值下能有效抑制 EOF 的產生，如圖 2-8。因此學生嘗試將配製聚合物所使用的緩衝溶液 pH 值調為 7.0，藉此希望能使分離效率更好，但由實驗結果可看出分離速率雖然有稍微提升，但解析度卻降低，如圖 2-9。因此在聚合物溶液的選擇上，由於原先之聚合物緩衝溶液條件能有效克服解析度問題，也能夠提升分離的速率，所以最後還是以 10 mM HEPES pH 8.0 來當作配製聚合物的緩衝溶液。

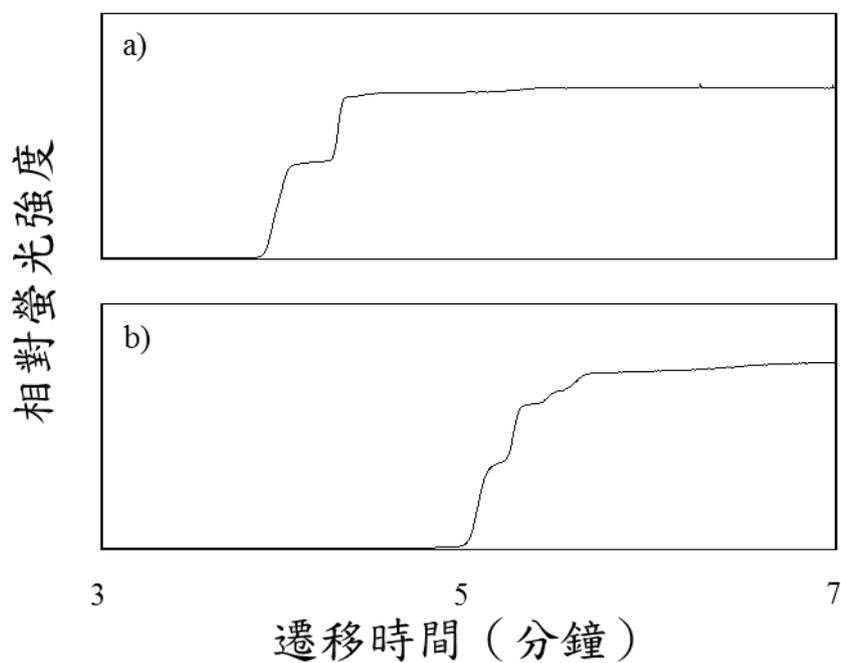


圖 2-8 於不同實驗條件下，連續進樣 TB11 Alexa647，探討 EOF 的變化，實驗條件為電壓 10 kV 進樣 10 秒，分離電壓為 10 kV：a) 10 mM HEPES pH 7.0。b) 10 mM HEPES pH 8.0。

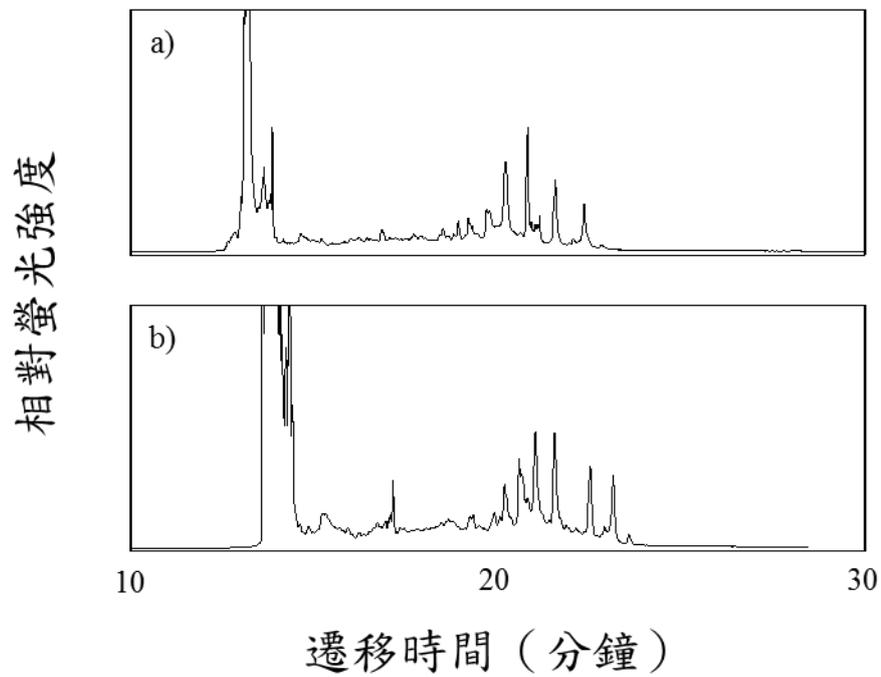


圖 2-9 配置不同聚合物緩衝溶液進行 4 個 tRNAs 之分離，實驗條件為電壓 10 kV 進樣 10 秒，分離電壓為 10 kV：a) 7% PVP in 7M Urea 10 mM HEPES pH 7.0。b) 7% PVP in 7M Urea 10 mM HEPES pH 8.0

### 2.3.3 使用 RNase A 進行水解反應

核糖核酸酶 A 的功能包括將 RNA 分解為小分子的核酸酶、催化核糖核酸降解、改變宿主細胞代謝、抑制病毒合成、水解蛋白樣品中的 RNA、在 DNA:RNA 或 RNA:RNA 單鹼基錯配時用核糖核酸酶 A 切割、確定 DNA 或 RNA 中單鹼基突變的位置及純化 DNA 樣品。本實驗主要是運用到催化核糖核酸降解之功能。實驗中分別於四種 tRNAs 之樣品溶液中加入 RNase A。經由此步驟即可確定用來與 bridge DNA 雜合之 tRNA 已成功鍵結。而其結果如圖 2-10。由於 RNase A 此種酵素僅會對單股 RNA 中的鹼基 C 或 U 進行水解作用，因此經過水解作用後，這四種 tRNAs 序列長度分別為 30 (Tyr-tRNA)、49 (Arg-tRNA)、50 (Met-tRNA) 及 60 (Phe-tRNA) 個核苷酸。由於毛細管電泳對於分離的解析度無法達到單一核苷酸的程度，因此無法將 Arg-tRNA 及 Met-tRNA 兩者分離。

### 2.3.4 訊號標幟

經由上述的最佳化實驗條件將四種 tRNAs 分離出來後，接著要確定圖 2-9b 中的四根訊號是否為正確產物，因此分別將四種 tRNAs 單獨進行電泳分離，其結果如圖 2-11。將圖 2-11a~d 對應至 2-11e，可明確的將四種 tRNAs 之訊號位置給標定出來。由圖 2-11e 中，

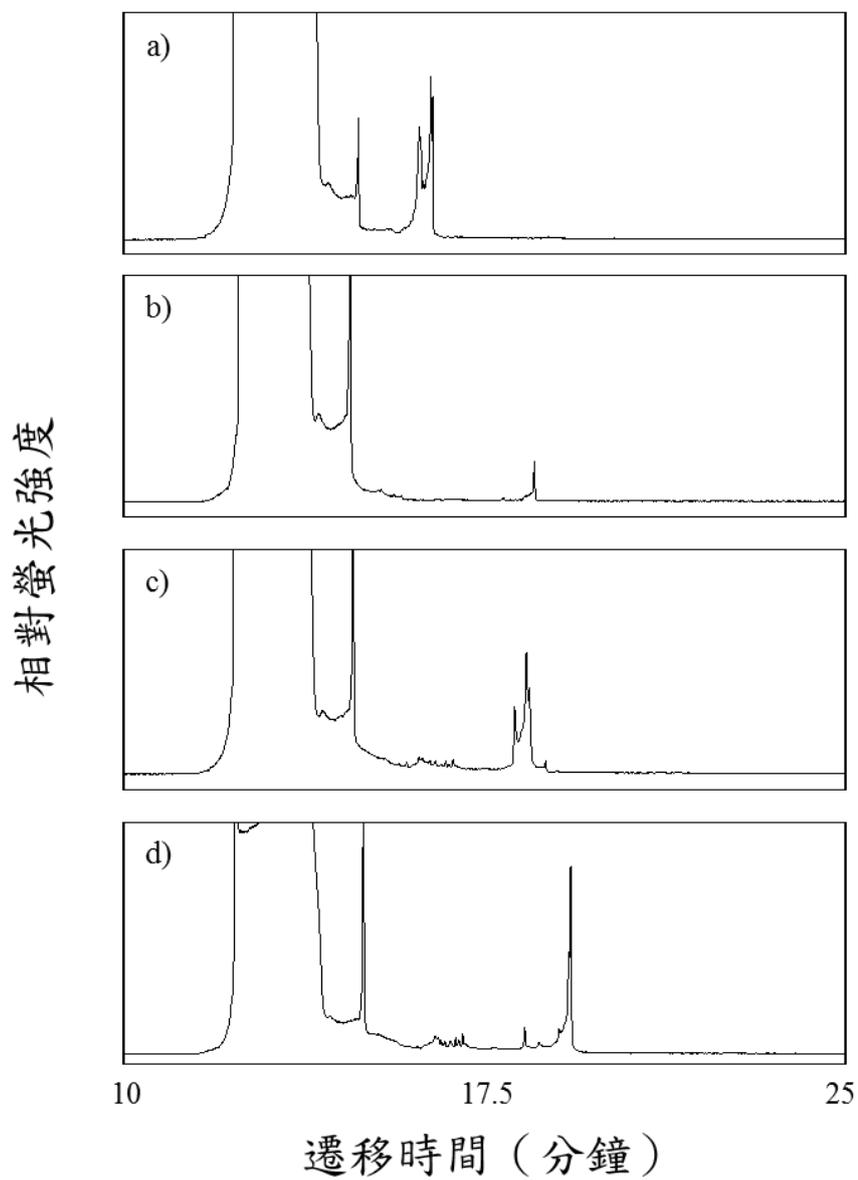


圖 2-10 使用 RNase A 將各別 4 種 tRNAs 進行水解反應：a) Tyr-tRNA。b) Arg-tRNA。c) Met-tRNA。d) Phe-tRNA。

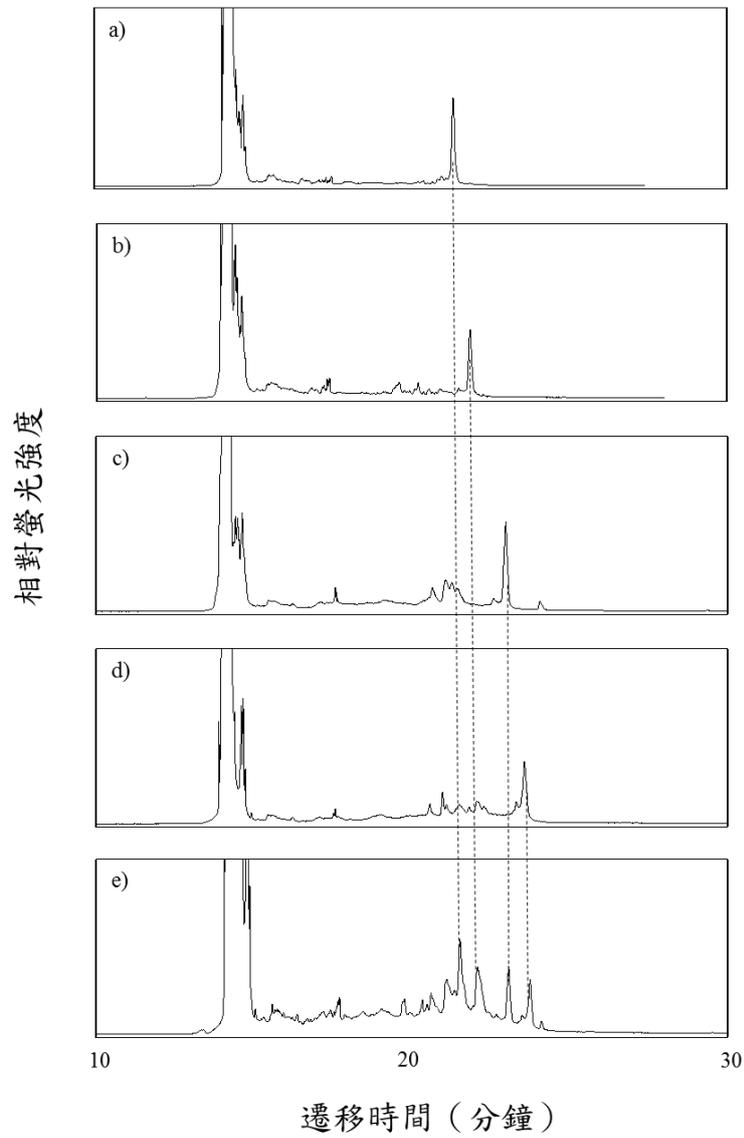


圖 2-11 將 4 種 tRNAs 進行訊號標幟：a) Tyr-tRNA。b) Arg-tRNA。  
c) Met-tRNA。d) Phe-tRNA。e) 混合 4 種 tRNAs。

Tyr-tRNA 的訊號前面有其他訊號存在，這些可從圖 2-11a~d 看出，在最高訊號峰產生前都會有其餘的訊號峰，因此當混合四種 tRNAs 去進行電泳分離時，這些其餘的訊號峰累加而成圖 2-11e 中 Tyr-tRNA 前之訊號。學生認為這是序列長度較小之副產物訊號。由於此實驗系統裝置為負電系統，因此樣品溶液中若含有短序列之副產物，在進行電泳分析時短序列產物之訊號相較長序列產物之訊號就會比較快出現，進而造成 Tyr-tRNA 前的訊號，不過這些訊號並不會影響這四種 tRNAs 的訊號判定。

### 2.3.5 定量癌症細胞中的 tRNAs

由於癌症嚴重威脅著人們的生命安全，而癌症種類多達數十種，若是不能明確診斷出病症，只會造成更嚴重的後果，所以需要一種檢測方法能夠針對各種癌症細胞進行分析，並且快速得到結果。經由訊號標幟步驟後，即可判定正確的 tRNAs 訊號位置，接著要找到一個適合的 RNA 濃度來進行後續的實驗，因此進行不同 RNA 濃度的測定。圖 2-12 為分析濃度從 25 ng/ $\mu$ L 到 400 ng/ $\mu$ L 不同濃度的人類肝癌細胞 (Huh7) 總核糖核酸。由結果得知隨著 RNA 濃度的增加，訊號面積也會跟著上升，因此學生將每個濃度重複三次，其各種 tRNA 濃度與訊號面積之線性圖如圖 2-13 所示。而 Tyr-tRNA 之

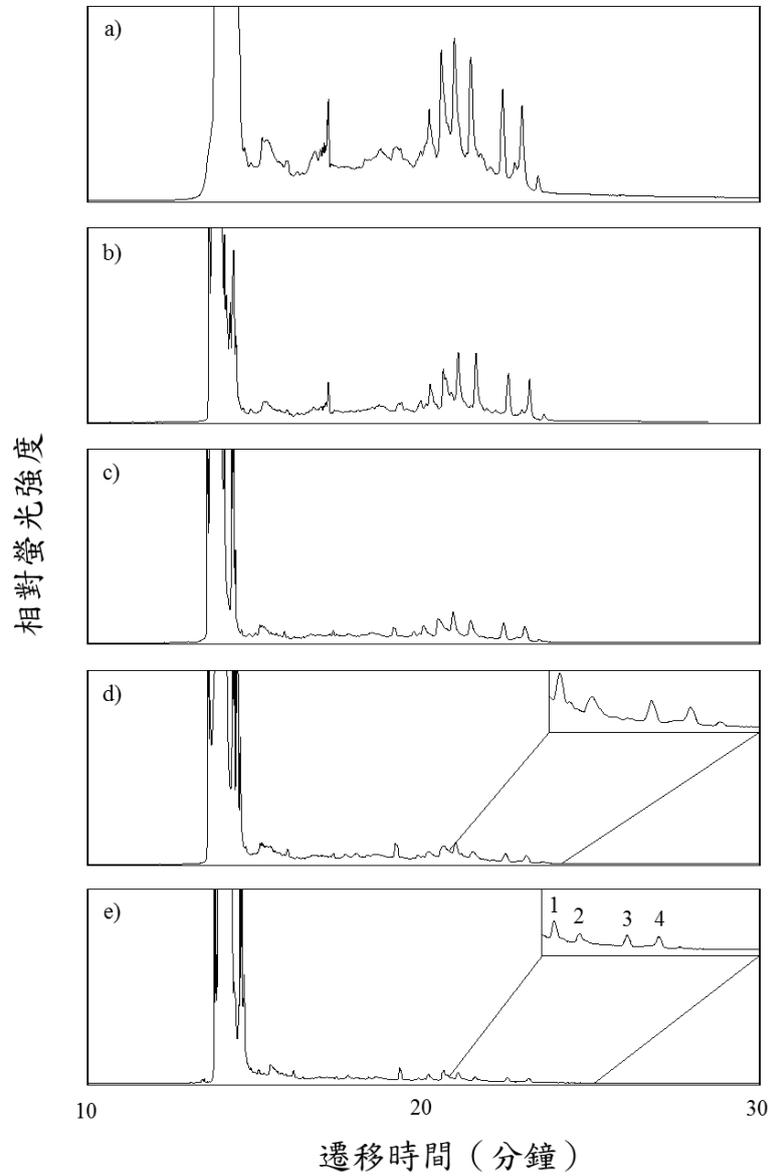


圖 2-12 進行不同 RNA 濃度之測定：a) 400 ng/μl。b) 200 ng/μl。  
 c) 100 ng/μl。d) 50 ng/μl。e) 25 ng/μl。其中 1 為 Tyr-tRNA，2 為 Arg-tRNA，3 為 Met-tRNA，4 為 Phe-tRNA。

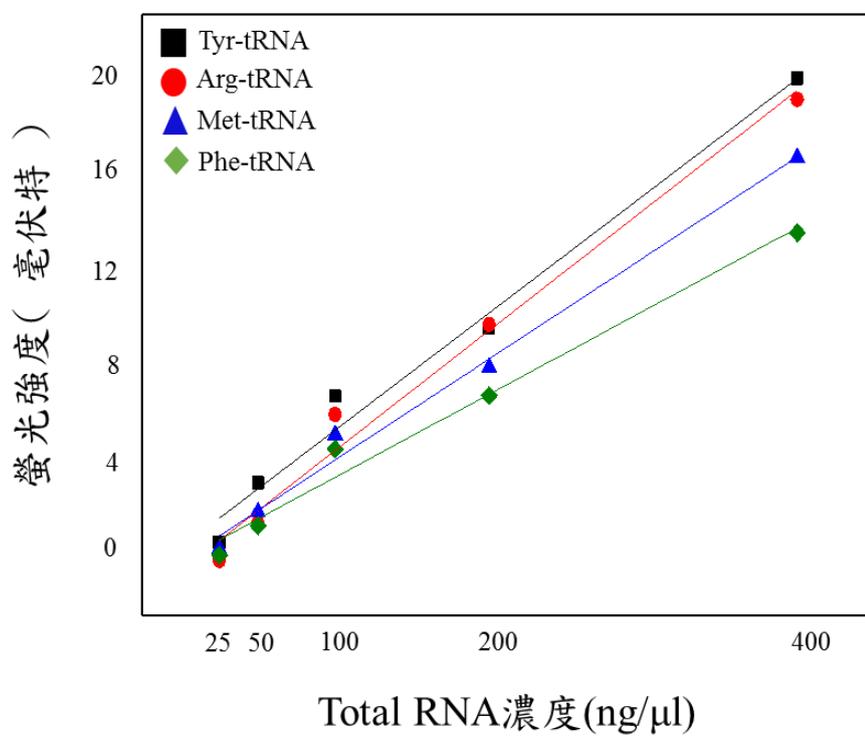
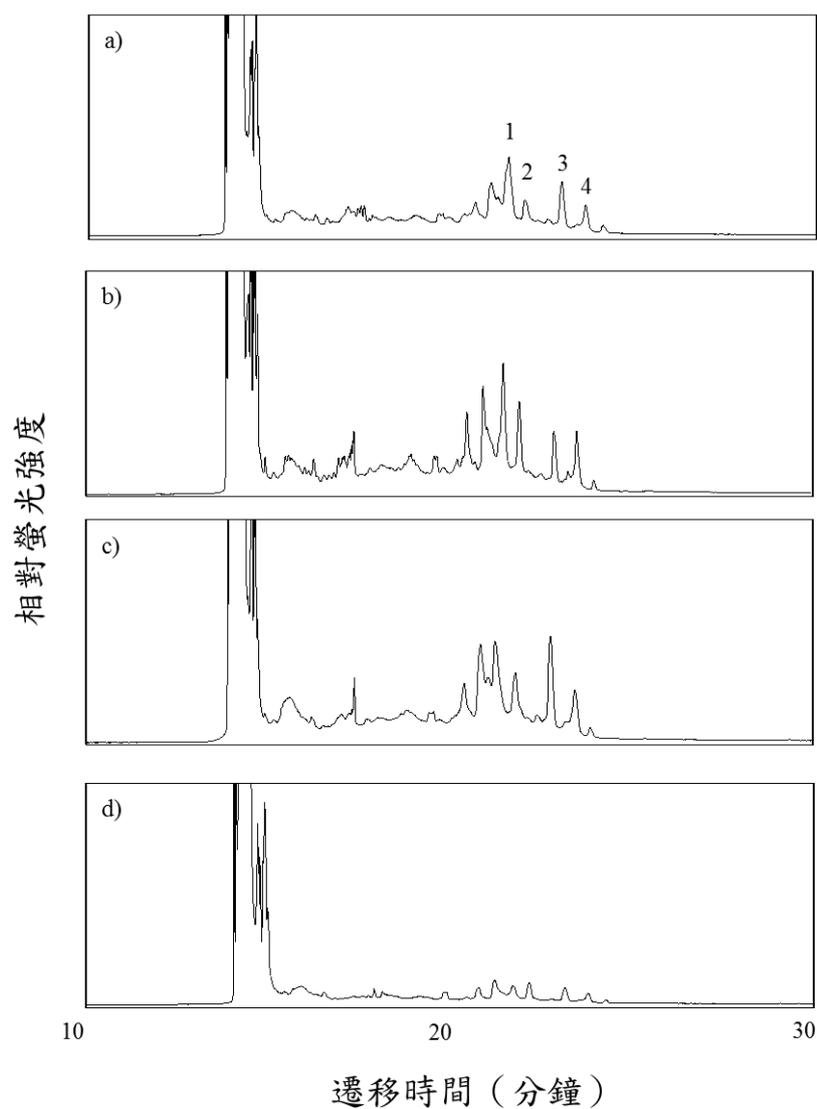
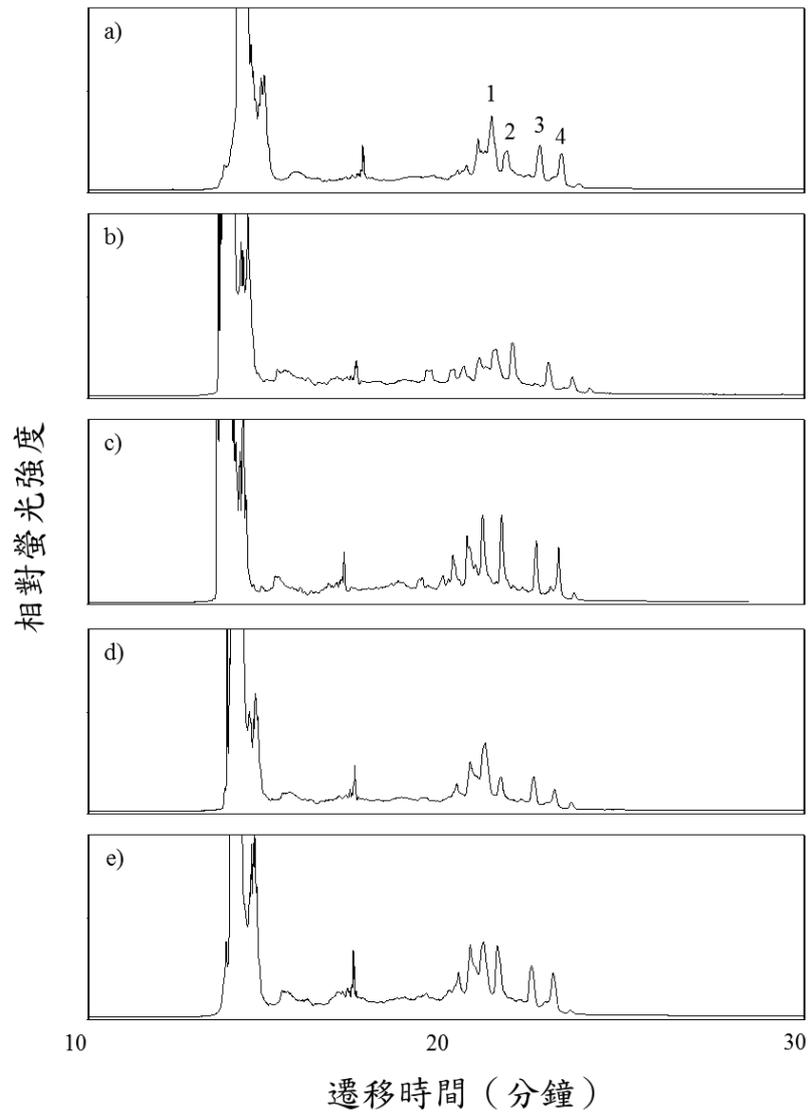


圖 2-13 RNA 之濃度對螢光強度作圖。

線性方程式為  $y = 0.04097x + 1.37951$ ， $R^2$  為 0.9794；Arg-tRNA 之線性方程式為  $y = 0.04196x + 0.56815$ ， $R^2$  為 0.9808；Met-tRNA 之線性方程式為  $y = 0.03531x + 0.90297$ ， $R^2$  為 0.9875；Phe-tRNA 之線性方程式為  $y = 0.0290x + 0.9220$ ， $R^2$  為 0.9775。目前學生最低能偵測到的 RNA 濃度為 25 ng/ $\mu$ L，可從這些 RNA 濃度中挑選出一個最適當的條件去進行後續的實驗。後續實驗皆使用 200 ng/ $\mu$ L 的人類癌症細胞進行毛細管電泳分離，由於在此 RNA 濃度下，四種 tRNAs 之訊號並不會被其餘訊號給影響，而造成判定錯誤的情況。因此之後的所有癌症細胞濃度皆選擇 200 ng/ $\mu$ L。接下來學生嘗試將本實驗室所有自行培養之癌症細胞進行最佳化實驗程序，其結果如圖 2-14 及 2-15。人體癌症細胞包含鼻咽癌細胞 (TW02 及 TW04)、肝癌細胞 (Huh7 及 H7R)、肺癌細胞 (A549)、口腔癌細胞 (OECM)、卵巢癌細胞 (SKOV3)、乳腺癌細胞 (MCF-7) 和尿路上皮癌細胞 (SV-HUC-1) 等九種。由實驗結果可得知使用此方法可將九種癌症細胞之傳遞核糖核酸成功分離出來，因此可證實此方法不僅可分離單一癌症中的傳遞核糖核酸，還可應用於分析其他人體癌症上。其中，SV-HUC-1 此種癌症細胞中之 tRNAs 的訊號表現量相對其他癌症細胞低很多。除了重複數次實驗以確定此細胞表現量之再現性以外，也針對每種細胞的完整性再做一次確認，如圖 2-16。由電泳分



**圖 2-14** 使用相同分析方法分離九種人體癌症細胞中之 tRNAs，包括：a) OECM。b) SKOV3。c) MCF-7。d) SV-HUC-1。其中 1 為 Tyr-tRNA，2 為 Arg-tRNA，3 為 Met-tRNA，4 為 Phe-tRNA。



**圖 2-15** 使用相同分析方法分離九種人體癌症細胞中之 tRNAs，包括：a) TW02。b) TW04。c) Huh7。d) H7R。e) A549。其中 1 為 Tyr-tRNA，2 為 Arg-tRNA，3 為 Met-tRNA，4 為 Phe-tRNA。

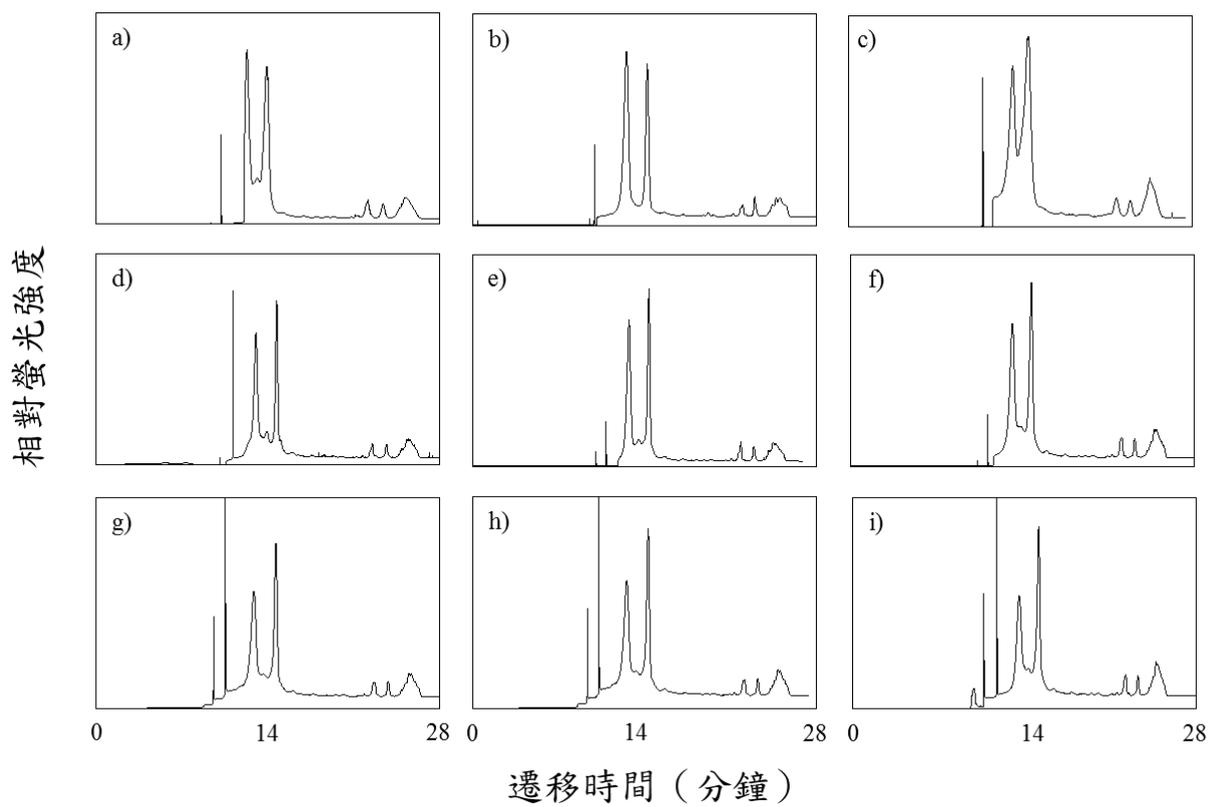


圖 2-16 九種癌症細胞之完整性電泳圖：a) OECM。

b) SKOV3。c) MCF-7。d) SV-HUC-1。e) TW02。

f) TW04。g) Huh7。h) H7R。i) A549。

析結果可看出，SV-HUC-1 中的 tRNAs 含量與他種細胞比較是正常的，並未有偏低的狀況。學生認為 tRNAs 的種類有很多，而此實驗只針對四種 tRNAs 進行檢測，所以可能是這四種 tRNAs 在 SV-HUC-1 此種癌症細胞中本身的含量就較低，所以會造成圖 2-14d 此種實驗結果。

本實驗使用 7% PVP 內含有 7 M 的尿素，緩衝溶液則使用 10 mM HEPES pH 8.0 進行電泳分離，成功將四種傳遞核糖核酸分離出來。使用此最佳實驗條件將傳遞核糖核酸分離出來後，最重要的就是要將其進行定量分析。因此學生將上述九種癌症細胞皆使用添加內標準之定量方法將四種傳遞核糖核酸進行定量。由於此實驗在 15 分鐘處因雜訊訊號較高，因此在挑選內標準時，需在背景雜訊較乾淨之地方。最後則選擇 BART9 來當作內標準，其訊號位置大約出現在 17 分鐘。如圖 2-17。這是為觀察 Tyr-tRNA、Arg-tRNA、Met-tRNA 及 Phe-tRNA 的總量。將九種癌症細胞都使用相同內標準進行定量，其每種癌症中之 tRNAs 含量如表 2-3。在進行定量的工作時，由於每次內標準經電泳分析出來後的訊號面積不完全相同，因此需要以一內標準之數值為基本值調整訊號後算出表 2-3 的結果。由於從先前文獻得知在卵巢癌細胞中，Tyr-tRNA 之訊號表現量相較於他種 tRNAs 的訊號表現量高，在尿路上皮癌細胞中則是 Arg-tRNA 之訊號表現量較高，而 Met-tRNA

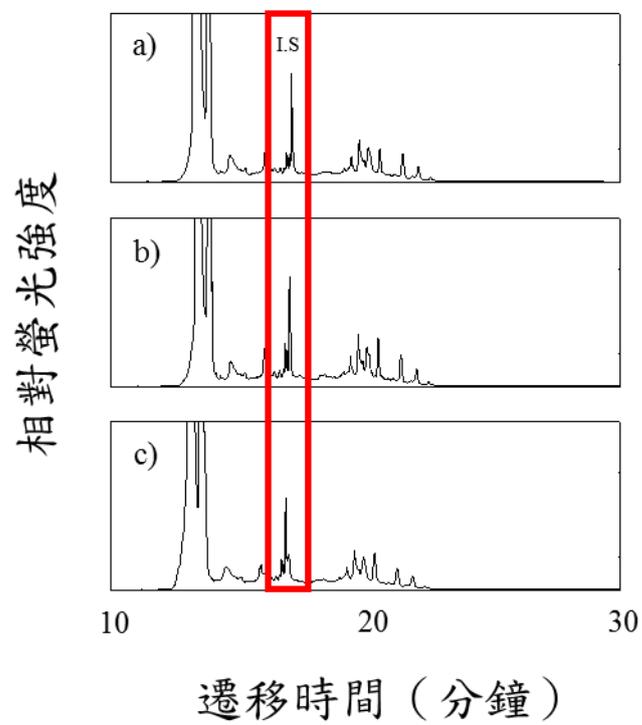


圖 2-17 於真實樣品中添加內標準進行電泳之分離圖譜。

表2-3 九種癌症中之tRNAs訊號表現量

| Area(n=3)       | Tyr-tRNA | Arg-tRNA | Met-tRNA | Phe-tRNA |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| SKOV3(卵巢癌)      |          |          |          |          |
| Mean            | 56.20    | 47.66    | 17.87    | 5.82     |
| SD              | 3.93     | 4.70     | 1.15     | 0.61     |
| SV-HUC-1(尿路上皮癌) |          |          |          |          |
| Mean            | 5.88     | 9.05     | 4.27     | 1.74     |
| SD              | 0.08     | 0.99     | 0.53     | 0.15     |
| MCF-7(乳腺癌)      |          |          |          |          |
| Mean            | 58.79    | 19.43    | 43.01    | 19.39    |
| SD              | 9.85     | 5.61     | 7.87     | 3.45     |
| A549(肺癌)        |          |          |          |          |
| Mean            | 52.54    | 47.72    | 41.31    | 23.43    |
| SD              | 5.17     | 5.55     | 3.06     | 2.61     |
| Huh7(肝癌)        |          |          |          |          |
| Mean            | 48.11    | 47.17    | 30.03    | 16.03    |
| SD              | 5.29     | 4.10     | 2.88     | 2.07     |
| H7R(肝癌)         |          |          |          |          |
| Mean            | 60.61    | 20.63    | 30.56    | 13.95    |
| SD              | 6.48     | 1.79     | 1.50     | 0.81     |
| TW02(鼻咽癌)       |          |          |          |          |
| Mean            | 36.02    | 23.79    | 22.74    | 12.85    |
| SD              | 3.58     | 4.61     | 1.72     | 1.75     |
| TW04(鼻咽癌)       |          |          |          |          |
| Mean            | 30.63    | 39.96    | 22.10    | 12.25    |
| SD              | 3.86     | 3.86     | 1.45     | 1.30     |
| OECM(口腔癌)       |          |          |          |          |
| Mean            | 57.13    | 23.77    | 32.96    | 14.43    |
| SD              | 5.14     | 1.00     | 2.78     | 3.48     |

及 Phe-tRNA 的表現量則會影響乳腺癌細胞之形成。其中，Phe-tRNA 的表現量在乳腺癌中還是比較低的，但若去跟他種癌症細胞比較的話，其訊號表現量還是有提升。

## 2.4 結論

本實驗利用 tandem adenosine-tailed DNA bridge-assisted splinted ligation 結合變性毛細管凝膠電泳暨雷射誘發螢光之分析方法將序列長短相似之 tRNA 分離開來。且此實驗方法僅需一種螢光探針即可辨識數種 tRNA，比起市面上的產品還要更經濟實惠，對於降低實驗成本也有很大的幫助。而此方法以毛細管電泳為基礎具有以下優點如：快速、經濟、不需聚合酶放大等多項優點。生化反應過程中使用含氯化鎂之 PCR 緩衝溶液成功將四種 tRNA 分離出來，且為了提高實驗之訊號解析度與降低毛細管電泳時間，學生最後選擇使用 10 mM 之 HEPES 配置 7% PVP 內含 7 M 尿素之聚合物來進行電泳分析。由實驗結果得知，使用相同分析方法可將九種人體癌症細胞中之 tRNAs 給分開，因此學生可推斷此方法確實有助於檢測生物樣品中傳遞核糖核酸。經由添加內標準將癌症細胞中的四種 tRNAs 進行定量，其結果與文獻結果相符合。

## 2.5 未來展望

於本實驗中已經能夠分離四種序列長度相似的 tRNAs，如果藉由改善其他的分離條件以及設計出不同橋梁 DNA，相信未來可以在一根毛細管中分離數種 tRNAs。值得注意的是在本實驗中，學生只使用一種螢光探針就能辨識出四種 tRNAs，若是使用兩種不同波長的螢光探針，應該可以大幅提高分離的效率進而同時偵測兩種不同的樣品。由於目前使用相同實驗程序僅針對九種癌細胞進行電泳分離，希望未來能夠去對更多人體癌症細胞進行分析，藉此能整合出完整的資料庫，這對於未來疾病診斷及臨床研究將有極大幫助。

## 2.6 參考資料

1. Xu S, Xue C, Li J, Bi Y, Cao Y: **Marek's disease virus type 1 microRNA miR-M3 suppresses cisplatin-induced apoptosis by targeting Smad2 of the transforming growth factor beta signal pathway.** *J Virol* 2011, **85**(1):276-285.
2. Alberts B: **Molecular Biology of the Cell, 4th ed., Garland Science, New York.** 2002.
3. Pavon-Eternod M, Gomes S, Geslain R, Dai Q, Rosner MR, Pan T: **tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(21):7268-7280.
4. Winter AG, Sourvinos G, Allison SJ, Tosh K, Scott PH, Spandidos DA, White RJ: **RNA polymerase III transcription factor TFIIC2 is overexpressed in ovarian tumors.** *P Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(23):12619-12624.
5. Torres AG, Batlle E, de Pouplana LR: **Role of tRNA modifications in human diseases.** *Trends Mol Med* 2014, **20**(6):306-314.
6. Schoch RB, Ronaghi M, Santiago JG: **Rapid and selective extraction, isolation, preconcentration, and quantitation of small RNAs from cell lysate using on-chip isotachopheresis.** *Lab on a chip* 2009, **9**(15):2145-2152.
7. Persat A, Chivukula RR, Mendell JT, Santiago JG: **Quantification of global microRNA abundance by selective isotachopheresis.** *Analytical chemistry* 2010, **82**(23):9631-9635.
8. Zhong W, Yeung ES: **High-throughput analysis of total RNA expression profiles by capillary gel electrophoresis.** *Analytical chemistry* 2003, **75**(17):4415-4422.
9. Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, Nilsen TW: **A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation.** *RNA* 2007, **13**(6):930-936.
10. Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, Nilsen TW: **Direct detection of small RNAs using splinted ligation.** *Nat Protoc* 2008, **3**(2):279-287.
11. 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.** *Analytical chemistry* 2008, **80**(22):8554-8560.
12. Czech A, Fedyunin I, Zhang G, Ignatova Z: **Silent mutations in sight: co-variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations.** *Mol Biosyst* 2010, **6**(10):1767-1772.
13. Dittmar KA, Goodenbour JM, Pan T: **Tissue-specific differences in human**

- transfer RNA expression.** *PLoS Genet* 2006, **2**(12):e221.
14. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**(1):156-159.
  15. Shih YC, Liao CR, Chung IC, Chang YS, Chang PL: **Simultaneous separation of five major ribonucleic acids by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence in the presence of electroosmotic flow: application to the rapid screening of 5S rRNA from ovarian cancer cells.** *Anal Chim Acta* 2014, **847**:73-79.

## 參與學術會議

1. 2014年中國化學年會
2. 2015年中國化學年會
3. 第十五屆亞太地區微分離及分析研討會APCE
4. 2016年分析化學小組春季研討會
5. 第二十二屆分析化學技術交流研討會