

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫期末報告

## 生物高分子之物性研究(2/2)

計畫類別：■個別形計畫      整合形計畫

計畫編號： NSC 90-2113-M-032 -018

執行期間： 90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

計畫主持人：吳俊弘

計畫參與人員：沈昭賢、楊承熹、陳育錡

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：淡江大學化學系

中華民國 91 年 10 月 31 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

## 生物高分子之物性研究(2/2)

### Studies on The Physical Properties of Biopolymers(2/2)

計畫編號： NSC 90-2113-M-032 -018

執行期限： 90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：吳俊弘 淡江大學化學系

#### 一、中文摘要

在此報告中，我們利用毛細管電泳，探討不同染料分子和抗衡陽離子競爭結合 DNA 的行為，藉由測量 DNA 電泳遷移率的變化情形來討論 DNA 與這些染料分子以及抗衡離子間的結合作用。另外，我們也探討了超螺旋 DNA(scDNA)之抗衡離子效應，以及其對 scDNA 毛細管電泳分離解析度的影響。

**關鍵詞：**毛細管電泳，抗衡離子，染料分子

#### **Abstract:**

Capillary electrophoresis was used to study the competitive DNA-binding reactions of various dye molecules and cationic counterions. Dyes and counterions were added into electrophoretic buffers to investigate their binding reactions with DNA by measuring the resultant changes of DNA electrophoretic mobilities. The results regarding the effect of counterions on scDNA and its influence on the separation resolution of scDNA were also reported.

**Keywords:** capillary electrophoresis, counterions, fluorescent dyes

#### 二、緣由與目的

生化高分子如 DNA 具有兩個重要的特性，一是其帶電性，另一則為立體結構。這兩個特性對於此種生化高分子在其所參與的生化反應，扮演了非常重要的角色。例如 DNA 在生物體內的儲存及複製，就牽涉到構形的極端變化(電價中和及縮合)[1]。具有平面多環結構的染料分子與 DNA 分子之結合，主要是染料分子嵌入 DNA 螺旋結構中，此外，大部分螢光染料也帶正電荷[2]，因此亦具有中和 DNA 負價電荷之作用。染料分子對 DNA 分子的結合模式(立體嵌入及靜電吸引)，類似許多 DNA 斷裂化合物與 DNA 結合時所採取的模式，而此類染料分子與 DNA 的結合，也廣泛應用於 DNA 分子在分離、鑑定、及純化時的偵測系統中[3]。許多研究發現，將染料分子加入 DNA 電泳分離系統中，除了當作偵測用途外，亦有利於分離解析度的提昇[4,5]。染料分子嵌入 DNA 雙股螺旋結構會改變其鏈的撓曲性，再加上其電價中和性質，將會改變 DNA 的大小，以及電泳行為。我們希望藉著系統性的 DNA 染料分子錯合物的電泳遷移率的測量，了解其結合作用，以及其如何影響 DNA 片段的毛細管電泳分離解析度。本計畫希望針對 DNA 分子在與各種帶電小分子，嵌入式染料分子所導致的電性以及分子構形變化，

做系統性的研究，以期更加了解 DNA 分子在各類反應中所產生的物理性質之改變。本二年期計畫希望針對 DNA 分子在與各種帶電小分子 [6-10]，以及嵌入式染料分子 [11-13] 反應時，所導致的電性以及分子構形變化，做系統性的研究，以期更加了解 DNA 分子在各類反應中所產生的物理性質之改變。本實驗方法可達到快速簡便且樣品用量少等優點。

### 三、結果與討論

#### 第一部分：螢光染料分子和抗衡陽離子競爭結合 DNA 分子之研究：

在多價陽離子的系統中，染料分子對 DNA 電泳遷移率的影響會因為與陽離子間的競爭效應而減弱，幾個不帶電荷的染料分子所造成的 DNA 電泳遷移率下降程度幾乎相同，這是由於它們所造成的電價中和效應相較於多價陽離子而言較不明顯。一般而言，固定抗衡陽離子濃度，增加染料分子的濃度，會使 DNA 電泳遷移率下降，鈉離子和鋅離子對 DNA 電價中和的程度較小，染料分子濃度增加在此系統中所造成 DNA 電泳遷移率下降較明顯。二價鎂離子和 DNA 的結合作用較大，造成 DNA 電泳遷移率隨鎂離子濃度增加而明顯下降，另外，因為競爭效應使得染料分子所造成的 DNA 電泳遷移率下降程度變小。在高價陽離子如亞精胺與鈷胺錯離子系統中，其 DNA 電價中和效應以及遮蔽染料結合 DNA 效應更甚於鎂離子。

在圖 1-1 中，當緩衝溶液中所含 PI 分子濃度由  $2.5 \mu$  增加到  $37.5 \mu$  時，DNA 的電泳遷移率變化幅度非常的大，而與圖 1-2 中 EB 分子的情形相比，可以看到 EB 分子減弱 DNA 電泳遷移率的程度比 PI 分子小；這是由於 PI 分子比 EB 分子多帶一價正電荷，使得當它們以嵌入方式與 DNA 結合後，除了對 DNA 的長度拉伸外，與 DNA 的鹼基上所帶之負電荷電價中和，造成 DNA 的有效電荷減弱才是 DNA 電泳遷移率減弱的主要原因。在接下來的討論中，我們將會依照抗衡陽離子的種類，分別探討各種染料分子在多價抗衡陽離子緩衝系統中的競爭結合 DNA 作用。

#### 鈉離子系統

由實驗結果發現，七種染料分子雖然各有不同構型及特性，但對於 DNA 電泳遷移率的影響，主要還是在於所帶正電荷多寡，這可由帶四價正電荷的染料分子 EthD-1 和帶二價正電荷的染料分子 PI 大幅降低 DNA 電泳遷移率的結果看出(圖 1-3)。從結構方面來看，PI、EB、DHE 這三種染料分子的結構相似，但 PI、EB 分別帶二價和一價正電荷，DHE 則不帶電荷，根據實驗結果，可以看出染料分子所帶的正電荷是影響 DNA 電泳遷移率降低的主要因素。

#### 鎂離子系統

在以鹼土族的鎂離子為抗衡陽離子的緩衝系統中，由於鎂離子是鹼土族金屬中與 DNA 結合能力最強的。我們將不同濃度的 EB、PI、DHE、ACMA、A-666 及 9-AA 染料分子添加入含鎂離子濃度  $150\text{--}667 \mu\text{M}$  的  $0.5\times\text{TB}$  緩衝液中，探討 DNA 電泳遷移率的改變情形。從圖 1-4 中染料分子在鎂離子  $150 \mu\text{M}$  下減弱 DNA 電泳遷移率程度的相對關係看出，帶二價正電荷的染料分子 PI 仍然是對 DNA 電泳遷移率減弱程度最大的，但不同於在鈉離子系統中的現象是，這些染料分子之間的差異會隨著鎂離子濃度增加而下降，這是由於鎂離子與 DNA 結合能力很強，對 DNA 電泳遷移率的影響程度也比鈉離子大，因此染料分子之間的差異變得較不明顯。除了 PI 以外，其他帶 +1 價或尤其不帶電的染料分子，其導致 DNA 電泳遷移率下降的程度差異不大。另外一個特別的現象，是在一些對 DNA 電泳遷移率影響程度較小的染料分子，也就是 PI 之外的其他染料分子結果中發現，小 DNA 片段的電泳遷移率原本應該是會因染料分子嵌入而下降，但由圖 1-5 中的結果發現，小 DNA 片段的電泳遷移率在染料分子 DHE 嵌入後反而比未添加染料分子的對照實驗之電泳遷移率還大，這種現象我們把它稱為反轉現象。

我們推測反轉現象出現的原因，主要是由於染料分子與鎂離子之間會以競爭關係與 DNA 結合，當 DNA 上的鹼基位置被染料分子佔據時，將會阻礙鎂離子與 DNA 結合，因為在以鎂離子為抗衡陽離子的緩衝系統中 DNA 的電泳遷移率減弱主要是由鎂離子與 DNA 電價中和造成，而當染料分子與鎂離子競爭結合 DNA 後，

造成鎂離子與 DNA 結合程度變少，加上 PI 之外的其他染料分子由於只帶少量或不帶電荷，對 DNA 的電泳遷移率減弱量影響不大，這種競爭關係使得 DNA 的電泳遷移率在不含染料分子存在下，反而有較多鎂離子與 DNA 結合，造成 DNA 的電泳遷移率減弱量較大。

反轉現象的出現趨勢有四種：第一是越不會影響 DNA 電泳遷移率減弱量的染料分子越容易發生，因為這樣的染料分子佔據結合位置後，阻礙了鎂離子與 DNA 結合，使得 DNA 的電價中和量變小；第二是染料分子濃度較低時容易發生，因為當染料分子濃度較高時，可能其取代鎂離子結合能力已趨於飽和，此時 DNA 電泳遷移率會隨染料濃度增加而降低，主要可能是因為染料的非嵌入性結合，整體緩衝溶液介質常數及黏度之改變。第三是鎂離子濃度越高越容易發生，因為鎂離子濃度越高時，越容易使不含染料分子存在的 DNA 電泳遷移率下降，當有染料分子競爭關係存在時，會受到更大的影響；第四是越小的 DNA 片段越容易發生，這是因為越小的 DNA 片段競爭取代結合後的電價中和程度表現於電泳遷移率的改變較明顯。

### 鋅離子系統

在以過度金屬鋅離子為抗衡陽離子的緩衝系統中，鋅與 DNA 結合能力小於鎂離子但大於一價鈉離子。將各種種類及濃度的染料分子添加入鋅離子濃度 150~333  $\mu\text{M}$  的 0.5xTB 緩衝液中；在此系統中也有小部份的小 DNA 片段反轉現象發生，但比鎂離子系統中少了許多，主要是由於鋅離子與染料分子之間也會以競爭關係與 DNA 結合，由於鋅離子影響 DNA 電泳遷移率程度小於鎂離子，所以競爭效應的結果對整體 DNA 電泳遷移率影響也會小於鎂離子系統，使得反轉現象較輕微。

### 亞精胺離子系統

在以亞精胺離子為抗衡陽離子的緩衝系統中，由於亞精胺離子帶有正三價電荷，與 DNA 結合後會和 DNA 上的負電荷電價中和，使得 DNA 電泳遷移率在所探討的亞精胺離子濃度內 (5~35  $\mu\text{M}$ )，會隨著其濃度升高而下降。在以鎂離子為抗衡陽離子的緩衝系統中沒有發生 DNA 片段電泳遷移率反轉現象的染料分子 PI，在亞

精胺離子濃度超過 25  $\mu\text{M}$  後，也開始發生這種現象，證明我們之前的推論。

### 第二部分：超螺旋 DNA 之抗衡離子效應及分離解析度之研究：

在含有二價過渡金屬陽離子( $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ )的緩衝溶液中，scDNA 電泳遷移率皆會隨著過渡金屬陽離子的濃度增加而減小(圖 2-1)，在相同過渡金屬離子濃度下，不同離子強度的緩衝溶液中，其 scDNA 的電泳遷移率的變化為  $0.25xTB < 0.5xTB < 1xTB > 2.5xTB > 5xTB$ (圖 2-2)。與二價陽離子所觀察到的現象一樣，這也是單價陽離子與多價陽離子競爭的結果所造成的。而觀察鈷離子、銅離子的電泳吸收峰，發現 scDNA 吸收峰都較二價鹼土族陽離子來的寬，若與鎂離子比較在相同離子強度、離子濃度中，鈷離子、銅離子穩定 scDNA 的能力顯然較差。例如：鈷離子在離子強度為 1 xTB 時，離子濃度 150-1000  $\mu\text{M}$ ，已經無法判斷 scDNA 的吸收峰，即使增加離子強度或離子濃度，仍無法進一步獲得較好的解析度。而銅離子也有相似的情形產生。scDNA 電泳遷移率在所探討的亞精胺離子濃度 (5-75  $\mu\text{M}$ )、鈷胺錯離子 (5-25  $\mu\text{M}$ )內，隨著離子濃度的增加而減小(圖 2-3)。在相同亞精胺離子濃度下，不同離子強度的緩衝溶液中，其 scDNA 的電泳遷移率的變化與二價陽離子所觀察到的現象一樣(圖 2-4)。當亞精胺離子濃度逐漸升高，可以增加 scDNA 的電泳圖譜的解析效果。而鈷胺錯離子的系統中，scDNA 的電泳吸收峰明顯變寬，在 1xTB、濃度 5  $\mu\text{M}$  有最好的解析效果，但也只能解析到 10102bp，且隨著濃度增加，scDNA 的解析越差。從抗衡離子與 scDNA 結合的實驗結果中顯示，scDNA 在適當的離子環境中，較能維持超螺旋的結構，否則其螺旋構型的分佈太大，會造成電泳吸收峰太寬而無法得到好的分離解析度，為了改善這種現象，我們在緩衝溶液中加入鎂離子以穩定 scDNA。

我們配置了四種不同濃度的 HEC(1.3M)，分別是 0.03%、0.05%、0.1%、0.2%，當我們施加電場  $E=100\text{V}/\text{cm}$  時，觀察電泳圖發現在低濃度的分離介質中(0.03%、0.05%)，scDNA 能夠完全的解析開來(圖 2-5)；相反地，在濃度較高

的分離介質 (0.1%、0.2%) 中，發現小 DNA (<10102bp) 可以被分開，但是對於大 DNA (>10102bp)，其電泳吸收峰卻有變形、拖尾的現象(圖 2-5)。這些可能是因為分離介質濃度的增加，以及因高分子鏈的動態交聯所形成的孔洞較小，導致大 DNA 在穿越高分子網絡的孔洞時，構型發生較大的改變，因而造成電泳吸收圖變差，以致於無法完全解析。此外，我們發現隨著電場強度的增加，雖然縮短了分離時間，但是 scDNA 的構型卻被拉伸得越嚴重，電泳吸收圖相對地也越來越差。而在計算解析度的時候，固定電場  $E=100\text{V/cm}$ ，發現當分離介質濃度介於 0.03%~0.1% 之間，小 DNA (<10102bp) 的解析度會隨著分離介質的濃度增加而變好(圖 2-6)。這是因為分離介質的孔洞較小，導致 scDNA 與分離介質之間的交互作用機會增加；而小 DNA 與分離介質的碰撞機會增加，因此，小 DNA 的解析度也隨著濃度增加而變好。不過，在分離介質濃度大於 0.1% 的時候，大 DNA 則因為分離介質所形成的孔洞太小，穿過孔洞時不易，導致 scDNA 構型被拉伸，電泳吸收峰有變寬的情形，所以解析度變差。而繼續增加分離介質濃度到 0.2% 時，由於 DNA 與高分子鏈的交互作用更劇烈，使得大 DNA 完全無法得到解析。分子量為  $9 \times 10^4$  的 HEC 系統中，分離 scDNA 的結果都與分子量為  $1.3 \times 10^6$  的 HEC 相似，即固定電場  $E=100\text{V/cm}$  時，小 DNA (<10102bp) 的解析度會隨著分離介質的濃度增加而變好；而在高電場及高濃度分離介質的條件下，大 DNA 解析度變差甚至無法解析。當分離介質的濃度較低時，小 DNA 的電泳吸收峰會疊在一起(圖 2-7)，這是由於高分子溶液所形成的動態孔洞太大，而疊在一起無法解析，我們也在低濃度的 HPMC 及 PEO 中都得到類似結果。而當我們加大電場後，發現可改善小 DNA 的解析度，這時由於小 DNA 待在毛細管中的時間較短，減少小 DNA 因擴散而造成電泳吸收峰重疊的機會。

#### 四、計畫成果自評

本計畫之執行獲致以下各項具體結論：

1. 期刊論文發表已進行中，會議論文發表於：

(a) D. R. Lu, S. W. Liu and C. Wu,

“Counterion-Induced Charge and Conformation Changes of DNA Fragments Studied by Capillary Electrophoresis”中國化學年會, 2000

(b) W. H. Chen, S. W. Liu and C. Wu, “Effects of Dye Molecules and Cations on the Electrophoretic Mobility of Intercalated DNA” 中國化學年會, 2000.

(c) W. H. Chen, J. C. Wu and C. Wu, “Competitive DNA Binding Reactions of Counterions and Intercalating Dyes” 中國化學年會, 2001.

(d) C. H. Shen, M. C. Li and C. Wu, “Cation Induced Mobility Reduction and Conformation Stability of Supercoiled DNA” 中國化學年會, 2001.

2. 七種染料分子 EB、PI、DHE、ACMA、A-666、9-AA 及 EthD-1 雖然各有不同構型及特性，但對於 DNA 電泳遷移率的影響，主要還是在於其所帶正電荷多寡為主，嵌入拉伸效應較不明顯。

3. DNA 電泳遷移率出現反轉現象的原因，主要是由於染料分子與多價陽離子之間會以競爭與 DNA 結合，當 DNA 上的鹼基位置被染料分子佔據時，將會阻礙多價陽離子與 DNA 結合，這使得多價陽離子與 DNA 結合量變少，減少了因為電價中和所造成的 DNA 電泳遷移率減弱，尤其是除了 EthD-1 與 PI 之外的其他染料分子，由於只帶少量或不帶電荷，使得多價陽離子與 DNA 結合量變少而減少 DNA 電價中和的情形更為顯著；這種競爭關係使得 DNA 的電泳遷移率在不含染料分子存在下，反而有較多陽離子與 DNA 結合，造成 DNA 的電泳遷移率減弱量較大。

4. 在含有二價過渡金屬陽離子( $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ )或正三價的亞精胺離子和鈷胺錯離子的緩衝溶液中，scDNA 電泳遷移率皆會隨著過渡金屬陽離子的濃度增加而減小。在上述相同多價陽離子濃度，不同離子強度的緩衝溶液中，其 scDNA 的電泳遷移率的變化為  $0.25 \times \text{TB} < 0.5 \times \text{TB} < 1 \times \text{TB} > 2.5 \times \text{TB} > 5 \times \text{TB}$ 。與二價陽離子所觀察到的現象一樣，這也是單價陽離子與多價陽離子競爭的結果所造成的。而觀察鈷離子、銅離子的電

泳吸收峰，發現 scDNA 吸收峰都較二價鹼土族陽離子來的寬，若與鎂離子比較在相同離子強度、離子濃度中，鈷離子、銅離子穩定 scDNA 的能力很差。

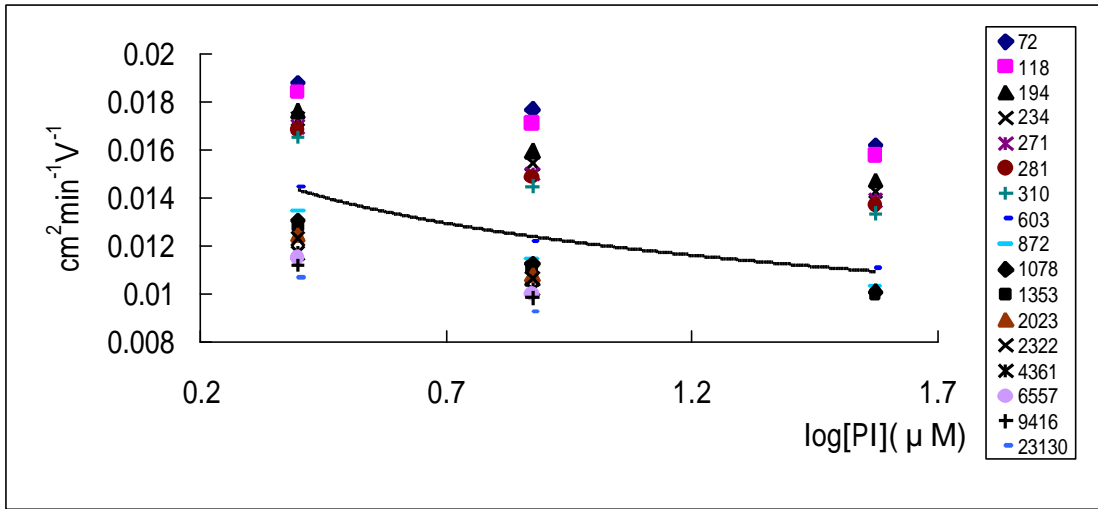
5. 在緩衝溶液中加入鎂離子可以穩定 scDNA。在較高分離介質濃度時隨著電場強度的增加，雖然分離時間縮短，但較大 scDNA 的構型卻被拉伸得越嚴重，導致解析度變差。當分離介質的濃度較低時，加大電場可改善小 DNA 的解析度，這是由於快速析出可減少小 DNA 因擴散而造成電泳吸收峰重疊的機會。

[12] Zhu, H., Clark, S. M., Benson, S. C., Rey, H. S., Glazer, A. N., and Mathies, R. A., *Anal Chem.* 1994, 66, 1941-1948.

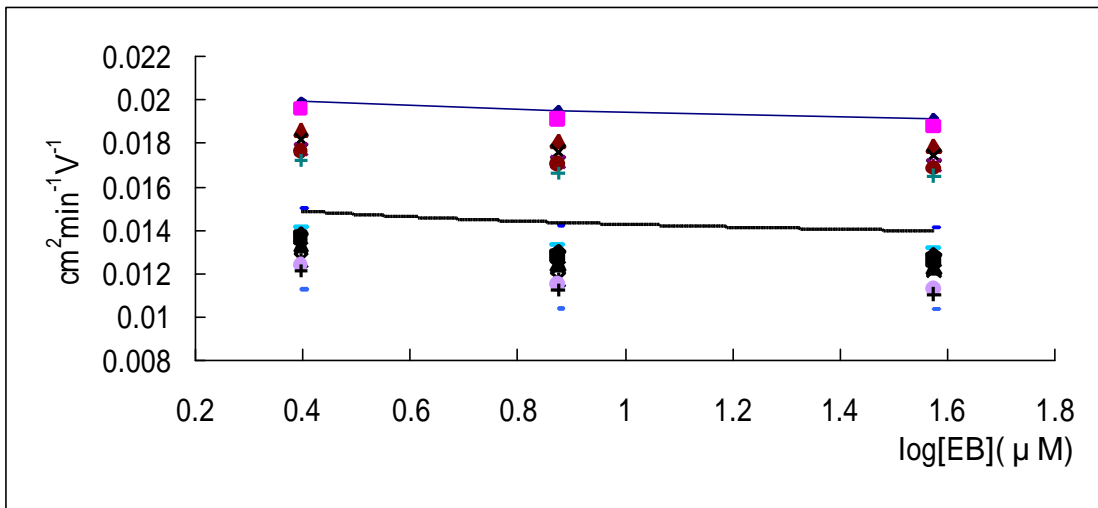
[13] Kim, Y. and Morris, M. D., *Anal Chem.* 1994, 66, 1168-1174.

## 五、參考文獻

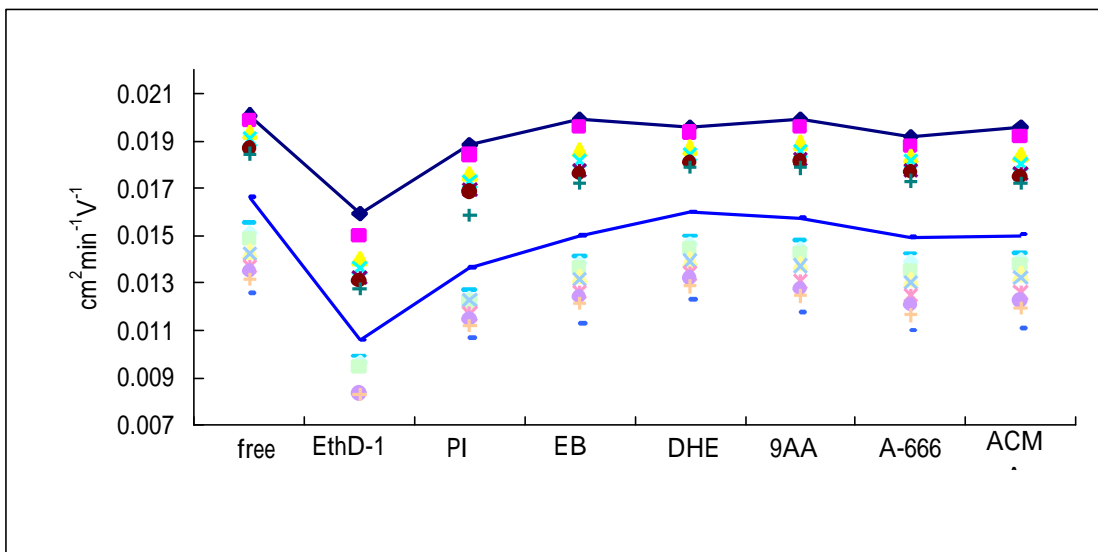
- [1] Bloomfield, V. A., *Biopolymers* 1991, 31, 1417-1481.
- [2] Haugland, R. P., *Molecular Probes*, Molecular Probes, Inc. 1992.
- [3] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Zhu, H., Clark, S. M., Benson, S. C., Rey, H. S., Glazer, A. N., and Mathies, R. A., *Anal Chem.* 1994, 66, 1941-1948.
- [5] Kim, Y. and Morris, M. D., *Anal Chem.* 1994, 66, 1168-1174.
- [6] Garcia-Ramirez, M. and Subirana J. A., *Biopolymers* 1994, 34, 285-292.
- [7] Ames, B. N. and Dubin, D. T., *J. Biol. Chem.* 1960, 235, 769-775.
- [8] Widom, J. and Baldwin, R. L., *J. Mol. Biol.* 1980, 144, 431-453.
- [9] Ma, C. and Bloomfield, V. A., *Biopolymers* 1995, 35, 211-216.
- [10] Li, A. Z., Qi, L. J., Shih, H. H., and Marx, K. A., *Biopolymers*, 1996, 38, 367-376.
- [11] Haugland, R. P., *Molecular Probes*, Molecular Probes, Inc. 1992.



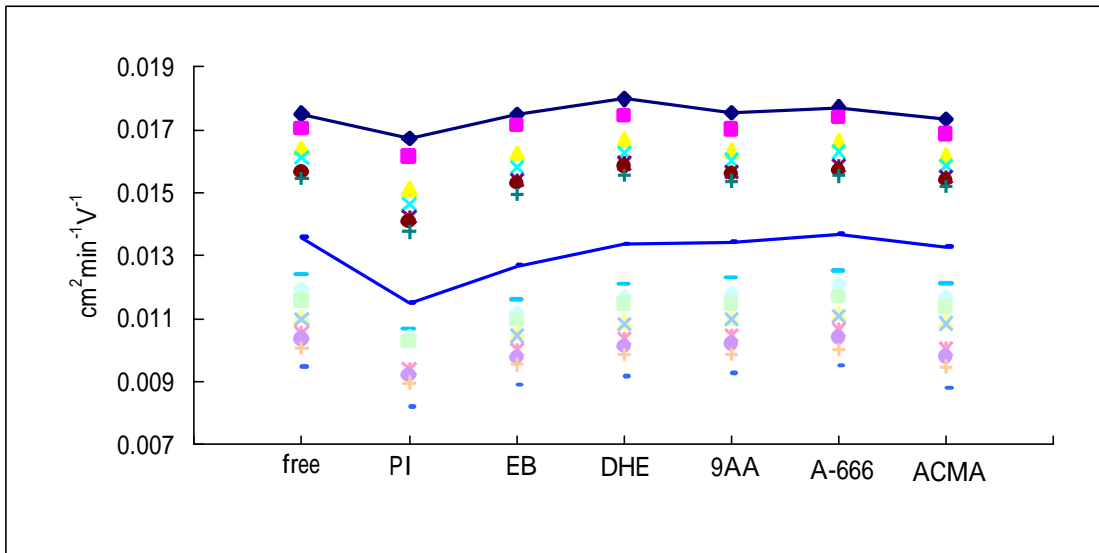
(圖 1-1) 含  $1000 \mu \text{ Na}^+$  的緩衝溶液中，PI 分子濃度效應對 DNA 電泳遷移率的影響



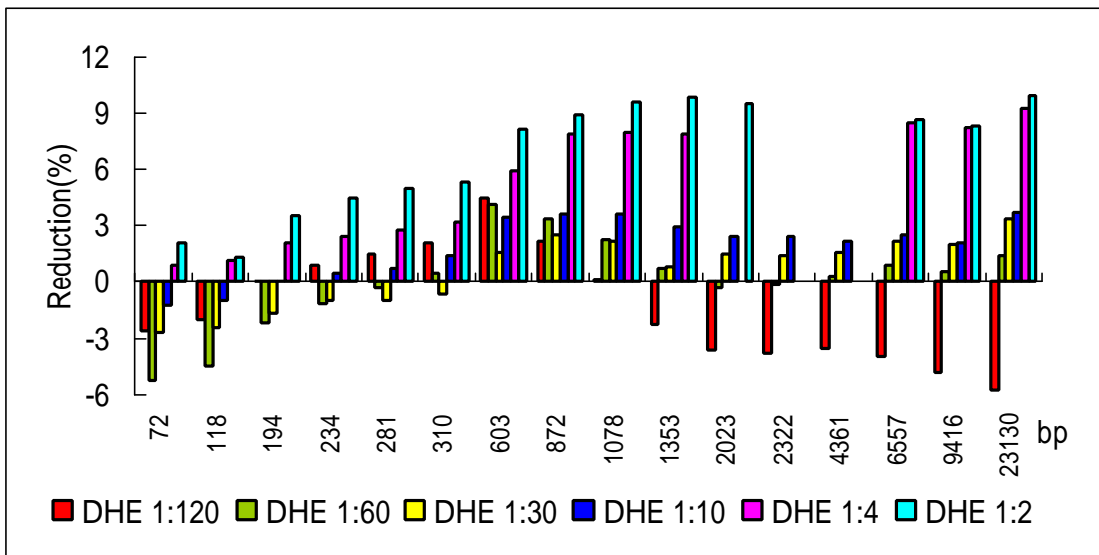
(圖 1-2) 含  $1000 \mu \text{ Na}^+$  的緩衝溶液中，EB 分子濃度效應對 DNA 電泳遷移率的影響



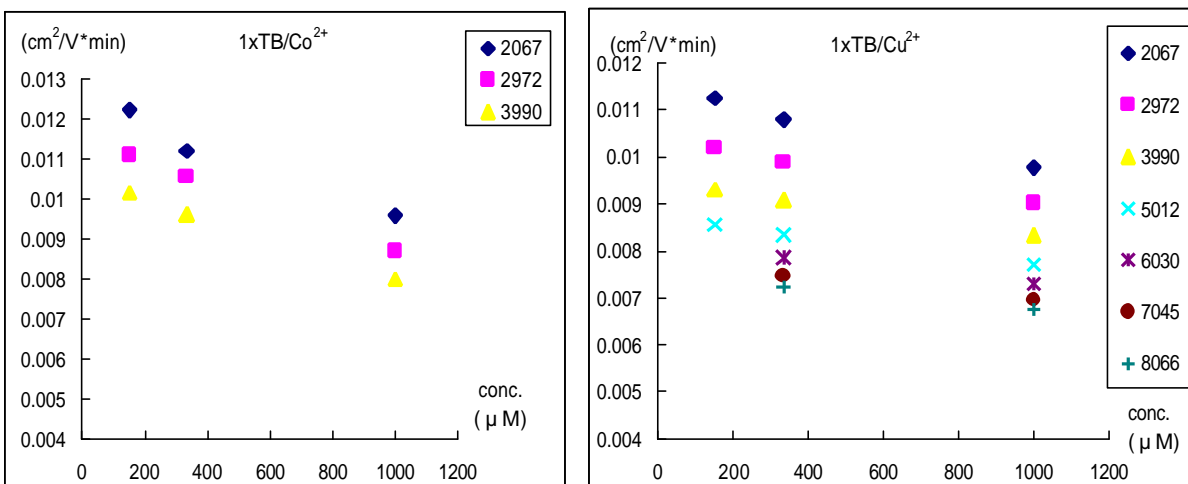
(圖 1-3) 含  $1000 \mu \text{ Na}^+$  的緩衝溶液中，在 1:30 染料分子濃度下 (dye:bp)，各種不同染料分子對 DNA 電泳遷移率造成的影響



(圖 1-4) DNA 電泳遷移率在 150  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$  及不同染料分子中的變化

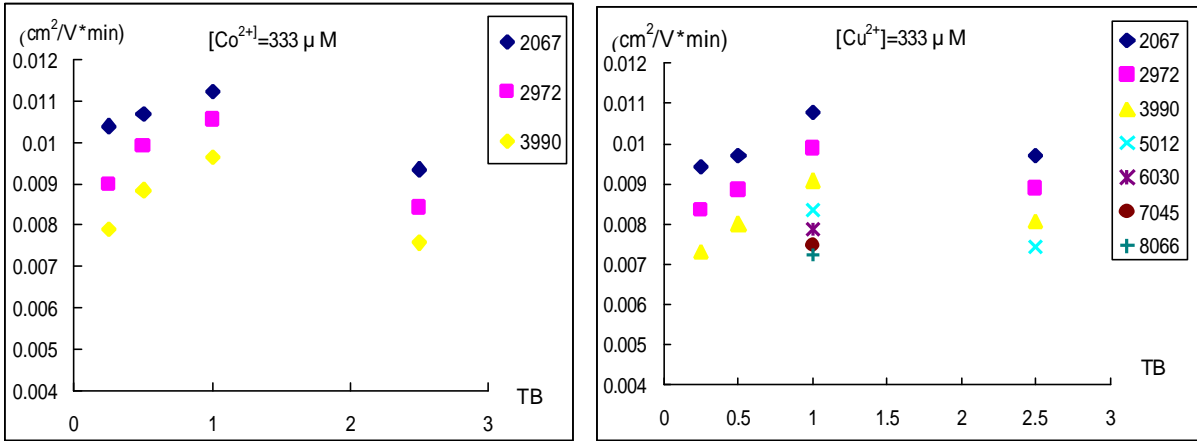


(圖 1-5) 在鎂離子 150  $\mu\text{M}$  緩衝系統中染料分子 DHE 濃度對電泳遷移率減弱量及反轉現象的影響

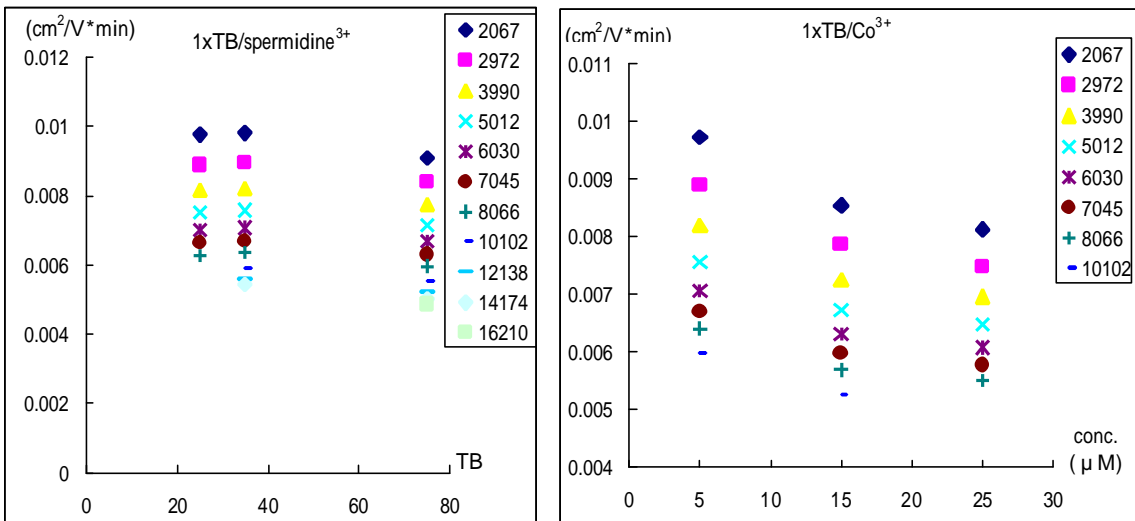


(圖 2-1) 相同離子強度下，鈷、銅離子濃度對 scDNA 電泳遷移率的影響

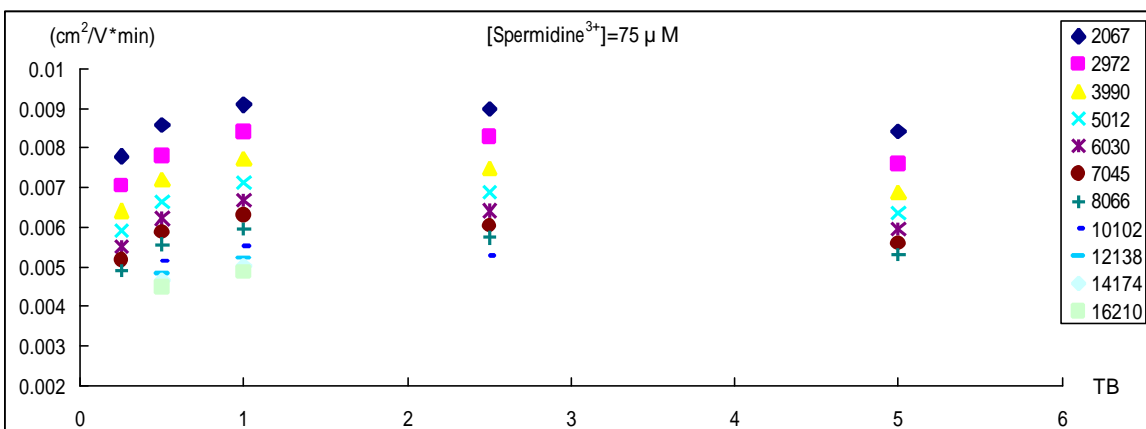




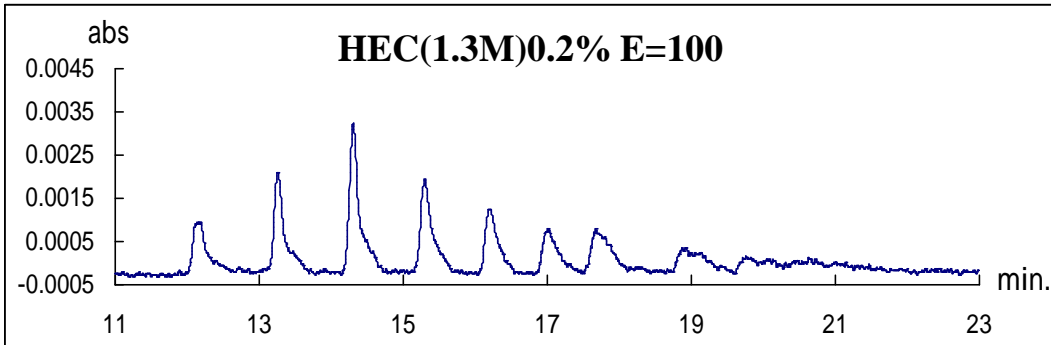
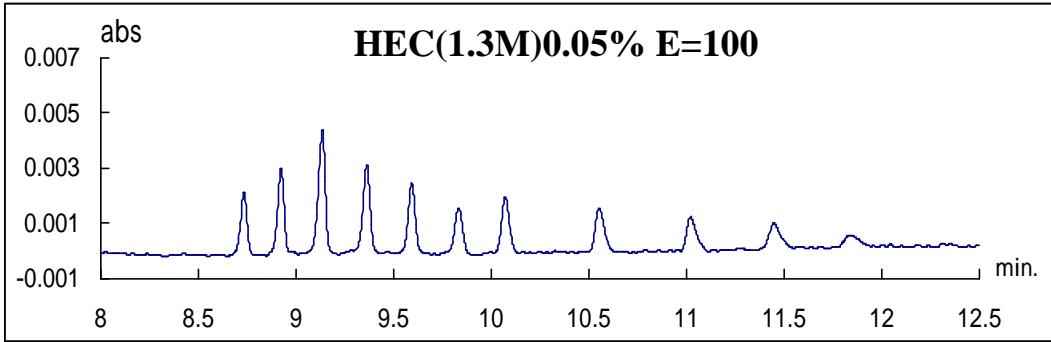
(圖 2-2)相同離子濃度下，離子強度對 scDNA 電泳遷移率的影響



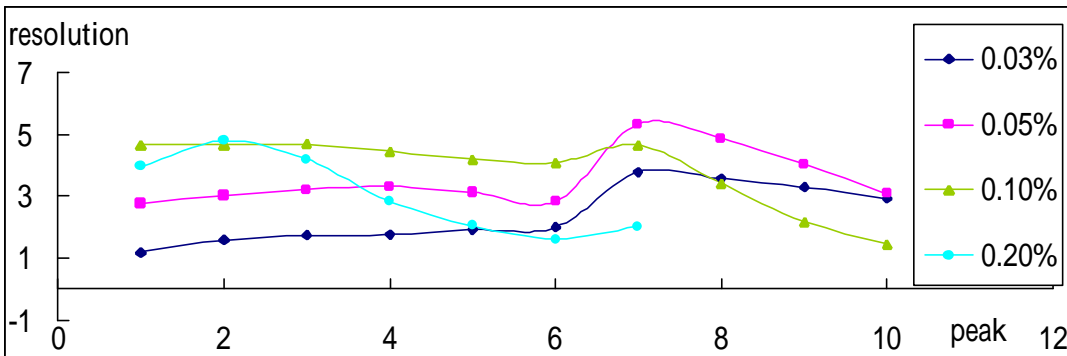
(圖 2-3)相同離子強度下，亞精胺、鈷胺錯離子濃度對 scDNA 電泳遷移率的影響



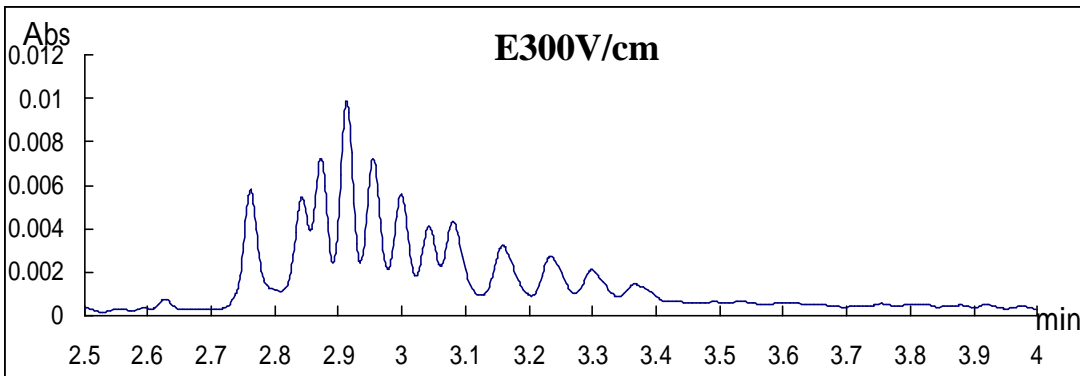
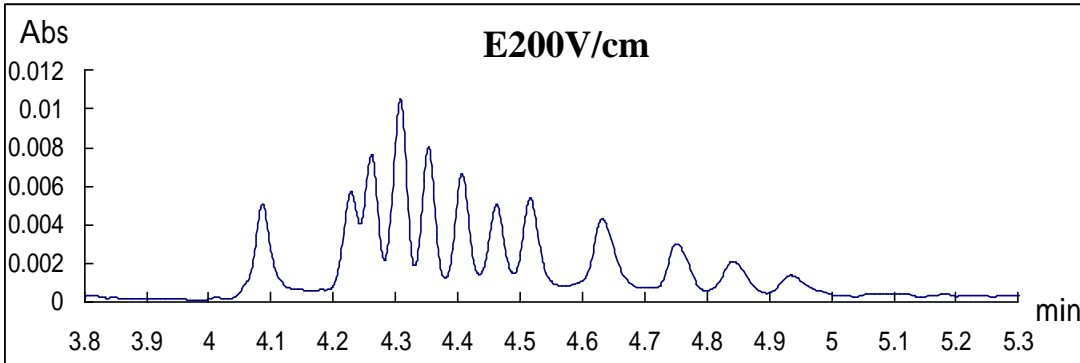
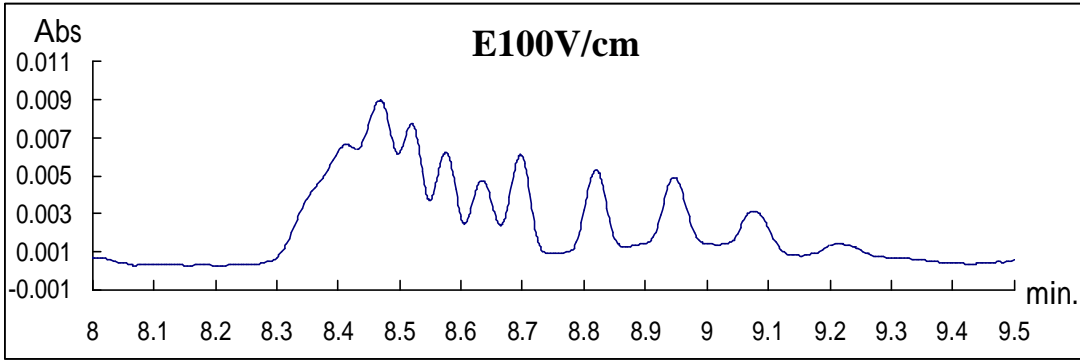
(圖 2-4)相同離子濃度下，離子強度對 scDNA 電泳遷移率的影響



(圖 2-5) HEC(1.3M), E=100 (V/cm)



(圖 2-6) HEC(1.3M), E=100V/cm



(圖 2-7) 0.03% HEC(90K)