

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

應用毛細管電泳及高分子混合溶液分離 DNA

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2113-M-032-015-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：淡江大學化學系

計畫主持人：吳俊弘

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 1 月 2 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

應用毛細管電泳及高分子混合溶液分離 DNA DNA separation in polymer mixtures by capillary electrophoresis

計畫編號：NSC 93-2113-M-032-015

執行期限：93 年 8 月 1 日 至 94 年 7 月 31 日

主持人：吳俊弘 淡江大學化學系

一、中文摘要

我們完成了以三嵌段共聚物 F127 為主體，添加線性高分子聚葡萄糖(dextran)或金奈米粒子(AuNP)的分離介質之備製，並應用於 DNA 之毛細管電泳分離。與先前所添加之聚環氧乙烷(PEO)和聚環氧丙烷(PPO)相比較，dextran 與嵌段共聚物的混合高分子溶液，可以達到更高效率的 DNA 分離解析。另外，我們也完成了 F127-PEO(或-PPO)的溫度-濃度之溶-膠(sol-gel)相圖，因而了解線型高分子如何在微胞膠體中分布，並影響其所形成的膠體性質。將此結果配合電泳分離 dsDNA 和聚磺酸化苯乙烯 (polystyrene sulfonate, PSS)樣品的結果，使我們較清楚 DNA 異常電泳析出的原因。我們所發展的金奈米粒子(AuNP)之新合成方法及電泳分析結果已發表。其它有關 DNA 電泳分離的結果也在準備發表中。

關鍵詞：毛細管膠電泳、去氧核糖核酸分離、三嵌段共聚物微胞膠

Abstract:

We have finished the preparation of triblock copolymer based separation medium, which was formed by the addition of linear polymer dextran or gold nanoparticle(AuNP) into the F127 matrix. Comparing with the previous PEO- or PPO-adding F127, the new separation medium showed better DNA separation resolution with even higher efficiency. In addition, we have accomplished the sol-gel phase diagram of the polymer mixture and thus get a much clearer picture of how the adding linear polymers influence the gel formation

property of F127. The combining results of sol-gel phase diagram and the respective CGE separations of dsDNA and polystyrene sulfonate(PSS) make us better understand the anomalous electrophoretic migration behavior of dsDNA. We have published the newly developed AuNP synthesis method and their CE characterization results. The papers for the other DNA separation results are also in preparations.

Keywords: capillary gel electrophoresis, DNA separation, triblock copolymers

二、緣由與目的

毛細管膠電泳 (capillary gel electrophoresis, CGE) 常被使用於 DNA 定序、基因突變篩檢、蛋白質純化及鑑定、以及 DNA 和蛋白質與藥物結合作用等研究上[1]。而 CGE 分離介質的性質，包括膠體孔洞大小和機械性質，高分子的種類、濃度和分子量大小及其分布，對於生化高分子的分析能否達到高解析度和高效率，佔有絕對的重要性。未交連的線性高分子溶液所形成的動態孔洞可有效達到分離 DNA 和蛋白質的目的。為了提高電泳分離解析度及效率，許多具不同親水性、剛硬度、和特殊官能基（增強與分析物交互作用）的高分子，例如：聚丙烯醯胺 (polyacrylamide, PA) [2-4]；聚二甲基乙醯胺 (poly N, N-dimethylacrylamide, PDMA) [5]；纖維素 (cellulose) 以及其衍生物 (hydroxyalkyl cellulose)[6-10] 和聚環氧乙烷 (polyethylene oxide, PEO) [11-15] 等，都已被成功地應用在 CGE 的生化高分

子分離。由兩段或三段具有較親水性或較疏水性的嵌段所組成的共聚合物，也被證實可在 CE 中當作生物高分子的分離介質，例如烷基-聚氧乙烯醚類 C_mE_n (n-alkyl polyoxyethylene ether) [16]，Pluronic F127 ($E_{99}P_{69}E_{99}$, E:ethylene oxide, P:propylene oxide, EPE 型嵌段共聚合物) [17-21]和 PEG-氟碳烷類[22]。這些分離介質在適當濃度和溫度時，會形成球型微胞，以及由微胞堆積成的”似凝膠”狀態，或者是形成花狀 (flower-like) 的微胞，以及連結的花狀微胞膠體。這些微胞的結構具”硬核”和向外伸展的”軟殼”，再加上不同程度的堆積或架橋性連結，很容易形成特殊的孔洞分布情形，而且其分離 DNA 或蛋白質的效果很好。其中 F127 具有溫度可調整黏度的特性，在低溫時即可順利的將其注入或清洗出毛細管柱，將毛細管柱溫度提昇至室溫，則可形成結構穩固，具解析分離 DNA 的能力。此外 F127 的親水基 EO 部分可和毛細管壁產生親和性作用力 [11-13]，所以具有自身塗覆毛細管管壁的效果，故毛細管不需經過額外的塗層處理步驟，即可有效抑制電滲透流，使 DNA 之分離解析更有再現性。在去年度的計畫中，我們首先提出，利用組成 F127 三嵌段共聚物的 PEO 和 PPO 來調整 F127 的膠體結構性質，造成孔洞分布的變化，使 DNA 分離的解析度更高更有效率。本年度的研究計畫則是在三嵌段共聚物 F127 本體中添加除了 PEO、PPO 的其它可能改善 EPE 本體的線型高分子和奈米金粒子。另外，溫度效應以及合成聚電解質(PSS)樣品的分析，結合分離介質膠體的結構在溫度和濃度的 Sol-Gel 相圖，有助於我們了解這類中性微胞如何受到所添加線性高分子或 AuNP 影響其對 DNA 分離解析的機制。

三、結果與討論

利用變溫觀察法測量添加不同濃度高分子於 F127 本體中，混合溶液隨著溫度變化，如何改變其外觀結構，即凝膠狀態或可流動液體，可以了解混合溶液的流變性質如何受所添加的高分子影響。我們發

現在 Pluronic 三嵌段共聚合物中添加 PEG 或 PPG，會影響其成膠行為，如圖一的混合高分子溶液之溫度-濃度 sol-gel 相圖所示，在 25% F127 中分別添加較疏水的 PPG 400 及較親水的 PEG 400，會造成其成膠溫度上升，縮小膠體範圍，或甚至無法成膠。這些線形高分子的添加，增加了分離介質的結構變化，將此結果配合電泳分析 DNA 的結果，可幫助我們了解 DNA 和分離介質之間的相互作用。我們從圖二的 DNA 電泳圖(分別取用圖一上圖中的組成 A-D 為毛細管電泳分離介質)的 DNA 析出順序可觀察到，不同大小 DNA 在電泳中的異常析出現象非常明顯，可見此類型的分離介質會對 DNA 的電泳行為造成很大的影響，大小 DNA 所受影響程度不同，不同組成的分離介質的結果也差異頗大。對於 DNA 異常析出的現象，我們認為這跟 DNA 的長短、鏈的柔軟度以及彎曲程度有關，在我們所設計的分離介質中，由於豐富的高分子密度分布和親水性質不同的區域分布，造成小分子 DNA 或較剛硬的 DNA 易陷入較小孔洞區域而造成較慢析出的現象。我們相信，在這樣的系統中，DNA 的構形差異，可以得到解析。

在已執行的計畫中，我們利用 Pluronic 共聚合物，以及添加 PEG 或 PPG 作為分離介質，成功地應用於 SSCP，HDA，以及單點突變 DNA 樣品的分離，得到很好的解析效果，如圖三所示，在 (a) 中，兩個只有單一鹼基差異的單股 DNA 可以在 35% F127 中得到解析，而添加 PEG 8000 的分離介質則可以在非變性條件下，分離兩個單點突變雙股 DNA (b)。此外，我們發現，多醣類 Dextran 對於 dsDNA 有很好的分離解析能力，將少量的 Dextran 加入 F127 中，不但可以縮短分離時間，而且解析度變得更好，如 (c)。在 (d) 中，降低溫度可增加兩個單點突變 DNA 的結構差異性，因而加大電泳的解析效果。此外，我們將分離介質的組成改為以 Dextran 為主，也獲得很好的 DNA 樣品解析能力。如圖四所示，我們所設計的分離介質，可以解析相同長度的同質雙螺旋 DNA(C+W)

以及發生在不同位置的單點未配對的異質雙螺旋 DNA。根據圖五的結果我們也發現，經限制酶切割之雙股 DNA 樣品的電泳圖中，具平切端(blunt end)和具黏合端(sticky end)的 DNA 片段，因限制酶切口不同造成 DNA 構形上的不同，相同大小的 123-bp DNA 可被完全分離；DNA 具黏合端片段比具平切端片段有較大的電泳遷移率。隨著析出時間的增加，相似大小的 DNA 片段中，具黏合端與具平切端片段之電泳遷移率有逐漸接近甚至相反的趨勢，例如，具黏合端的 527-bp DNA (Msp I digest) 片段已相對變慢而和具平切端的 540-bp (Hae III digest) 的 DNA 片段共析出。由此結果證明，因為末端構形或 DNA 序列不同，而造成的電泳些微差異，可以在我們的分離介質系統中得到解析。

由實驗結果我們發現，DNA 構形的差異性可藉由改變電泳溫度加以調節（如圖三(c)、(d)以及圖六），我們將藉由觀察不同大小 DNA 在變溫條件下，於分離介質中的電泳遷移率改變量，另外，由圖六的結果我們發現，電泳溫度的改變對於不同大小以及不同序列的 DNA 所造成之電泳遷移率的差異程度不一，這可能是因為溫度的改變造成了 DNA 細微構形的變化以及其和分離介質有不同程度的交互作用，因而提高了 DNA 片段的解析效果。

藉由觀察不同於 dsDNA 的帶電高分子在分離介質中的電泳遷移行為，可以幫助我們了解 dsDNA 在我們的分離介質中所表現出的異常泳動模式。圖七為以 25% F127 + 30% PPG400 的分離介質來分離 dsDNA(a)和不同分子量的合成電解質聚磺酸化苯乙烯(polystyrene sulfonate, PSS) (b)的電泳圖。不同分子量之 PSS 的迴轉半徑(radius of gyration)大小分為 0.67、2.11、3.69、7.59、11.78、31、65nm，與 ϕ x174RFDNA-Hae III Digest 樣品中大小相近的片段：72bp(25nm)、118bp(35nm)、194bp(51.68nm)、234bp(61.7nm) 和 271bp(65.95nm) 相比較，PSS 樣品並無異常電泳析出現象，亦即 PSS 高分子鏈可能因為骨架較剛硬，且所帶電荷密度較

小，所受電極之靜電引力較小，因此不會如較小 dsDNA 一樣，在泳動過程中陷入孔洞較小的微胞核中，而有異常的遲滯電泳行為。

由於我們的分離介質的本體是微胞膠體，其微胞核部分較疏水，殼部份則較親水，因此，除了上述所添加的親水性線性高分子外，我們也計劃將奈米金粒子 (AuNP) 融入 EPE 分離介質本體中，控制奈米金粒子的合成大小和添加濃度，將可探討此疏水奈米硬核對膠體結構的影響，並測試其 DNA 分離效果。我們已發展出利用 pyrene 和 SDS 合成可控制大小和窄分布的奈米金粒子（圖八為其電泳分析圖及顏色外觀）的新穎合成方法，由圖中可知 Au1~Au3 之電泳遷移率會隨著顆粒變大而變小，但是當顆粒大到超過 Au4 之後，其電泳遷移率就不再改變。其電泳分離效應的實驗正準備進行中。

本計畫提出的共聚合物系列，尚未被用於 DNA 之 CE 分離，我們的研究成果提供了在應用此類共聚合物為 DNA 分離介質時的選擇方向，這些結論也可在開拓應用其它種類分離介質時，作為重要的理論依據。DNA 毛細管電泳技術可提升 DNA 序列 (DNA sequencing)、基因突變的偵測、以及 DNA 指紋鑑定等分析技術。本計畫所設計之 DNA 分離介質，有助於毛細管電泳技術的全面自動化，更提昇其效率。

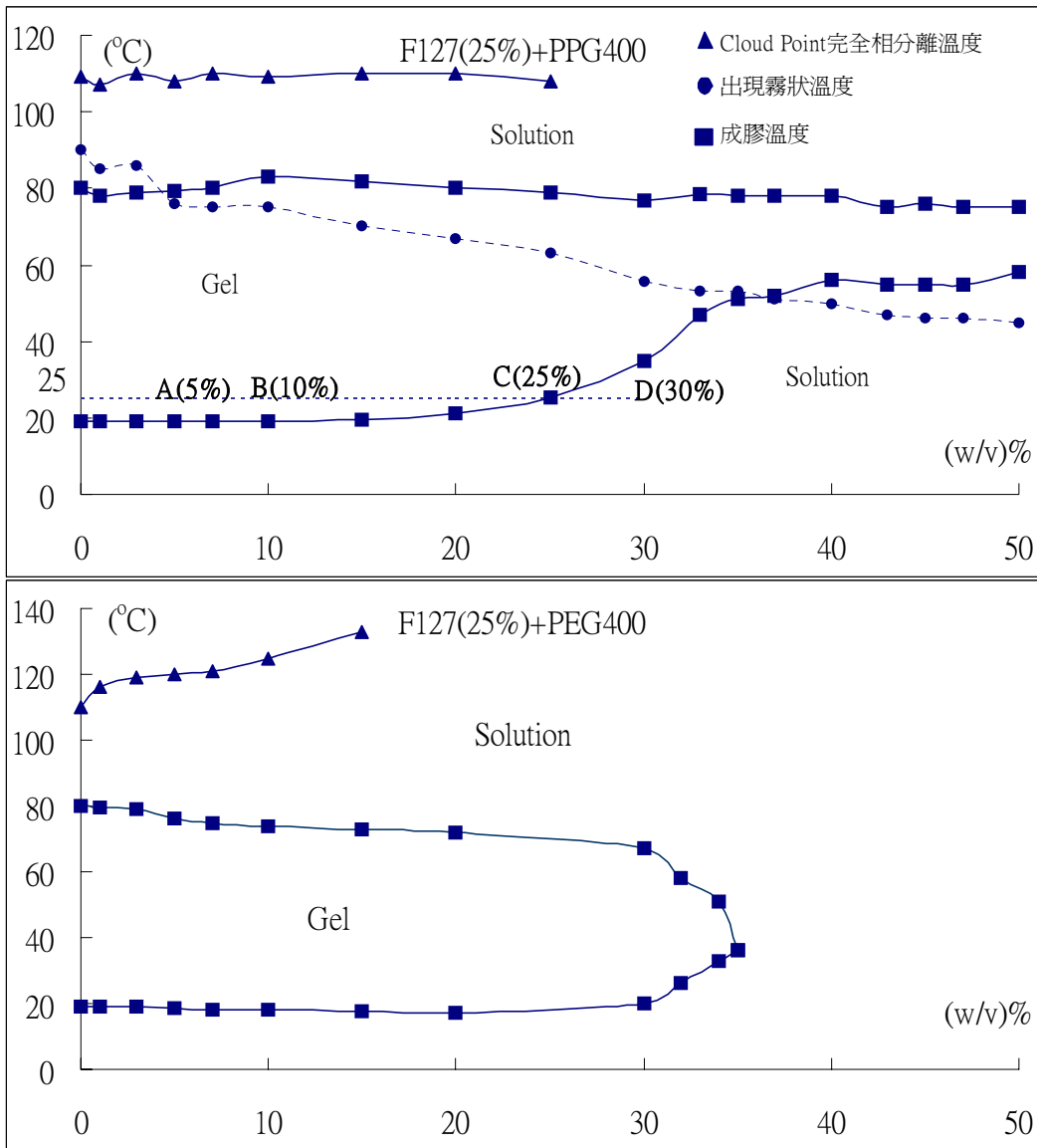
四、計畫成果自評

我們完成了以三嵌段共聚物為主體，以及添加線性高分子(如 dextran)及金奈米粒子(AuNP)的分離介質之備製，並應用於 DNA 之毛細管電泳分離，而得到了包括：單股 DNA 構形多形性 (single-strand DNA conformation polymorphism, SSCP)、異質雙螺旋 DNA 分析法 (heteroduplex analysis, HAD) 和單點突變 DNA 之偵測所需的最佳毛細管電泳分離條件。dextran 與嵌段共聚物的混合溶液，可以達到高效率的 DNA 分離解析效果。結合 F127-PEO(或-PPO)的 sol-gel 相圖以及電泳分離 dsDNA 和 PSS (polystyrene sulfonate, 聚磺酸化苯

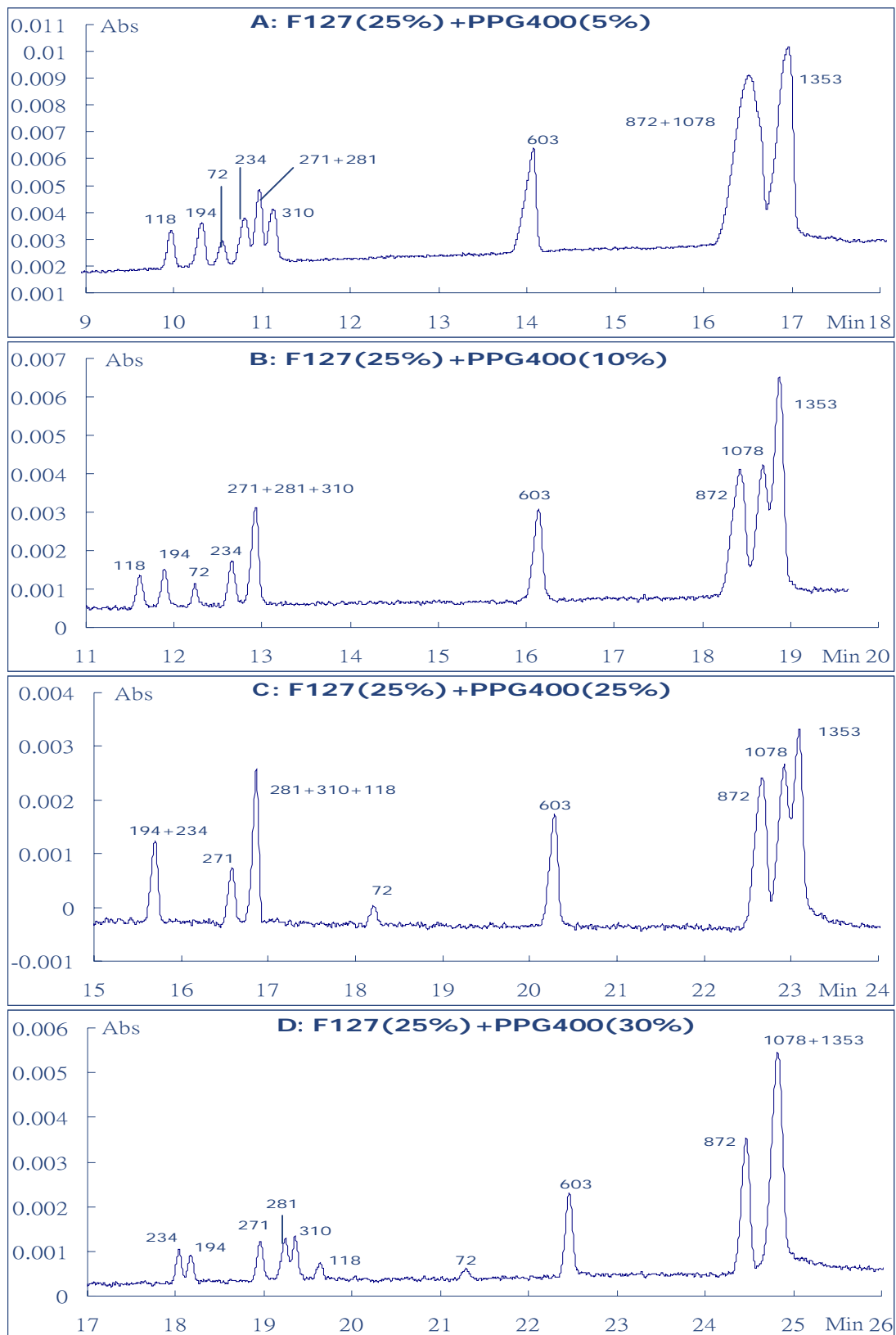
乙烯)樣品的結果,我們較清楚解線型高分子如何在微胞膠體中分布,並影響其所形成的膠體性質,對於 DNA 異常電泳析出的原因,也得到進一步的了解。就所備製的 AuNPs 之合成方法及分析,我們已發表如下論文 “ Pyrene-Assisted Synthesis of Size-Controlled Gold Nanoparticles in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles Studied by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography”, *Langmuir*, 2005, 21(19), 8947-8951。其它有關 DNA 電泳分離的結果已在 2004 年中國化學會發表: (1)文政, 吳俊弘, “毛細管填充聚葡萄糖應用於高解析度 dsDNA 電泳分析”。 (2)楊承熹, 吳俊弘, “毛細管膠電泳之單點突變 DNA 偵測”。 並正準備期刊論文之發表。

五、參考文獻

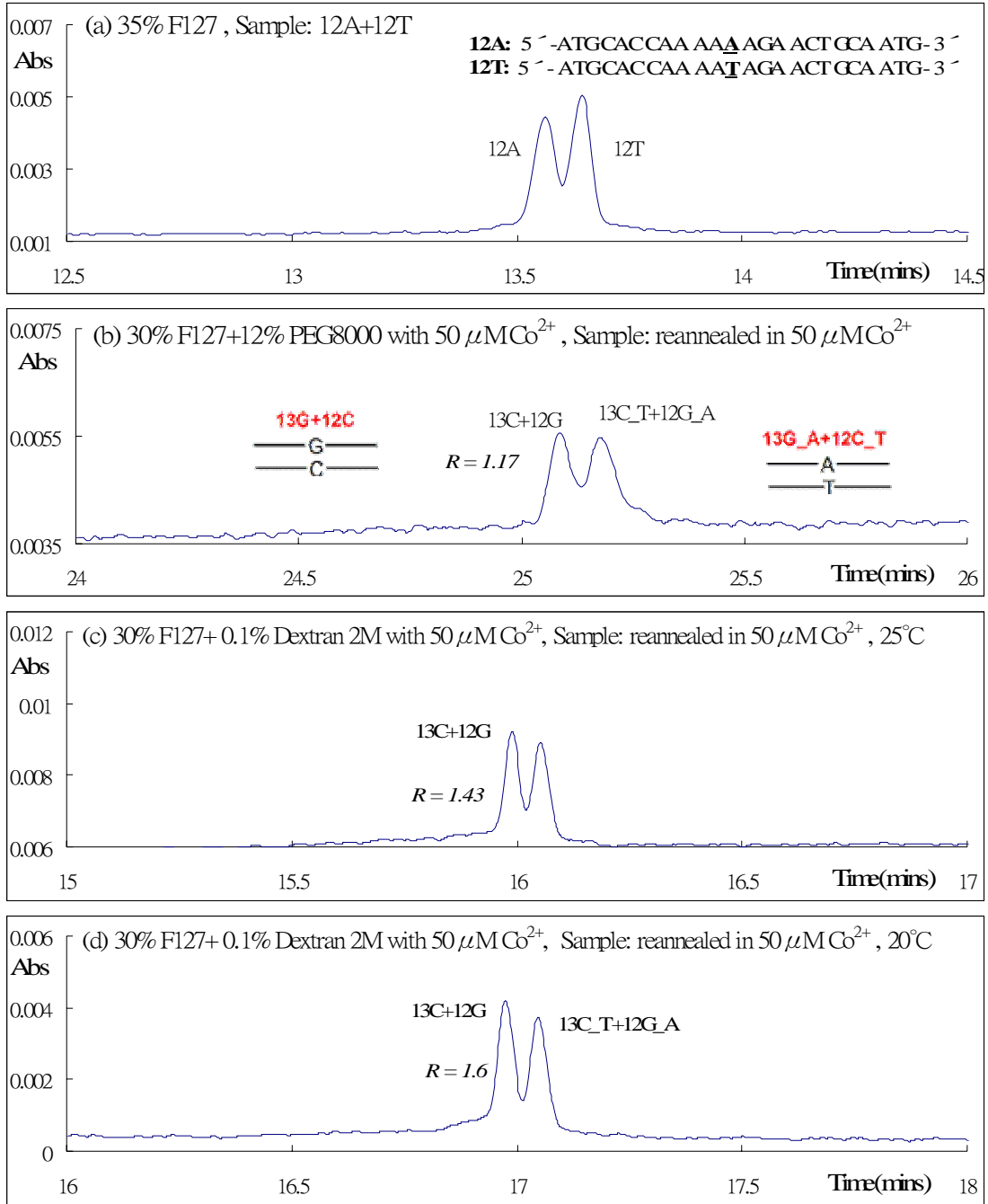
- [1] Li, S. F. Y., *Capillary Electrophoresis: principles, practice and applications* 1992, Elsevier, New York.
- [2] Heiger, D. N. ; Cohen, A. S. ; Karger, B. L., *J. Chromatogr.* 1990, 516, 33-48.
- [3] Guttman, A. ; Cooke, N., *Anal. Chem.* 1991, 63, 2038-2042.
- [4] Kleemi , M. H. ; Gilges, M. ; Schomburg, G., *Electrophoresis* 1993, 14, 515-522.
- [5] Menchen, S. ; Johnson, B. ; Madabhushi, R. ; Winnik, M., *Progress in Biomedical Optics: Proceedings of Ultrasensitive Biochemical Diagnostics* 1996. San Jose, CA: SPIE-The International Society for Optical Engineering.
- [6] Grossman, P. D. ; Soane, D. S., *Biopolymers* 1991, 31, 1221-1228.
- [7] Baba, Y. ; Ishimaru, N. ; Samata, K. ; Tshako, M., *J. Chromatogr. A* 1993, 653, 329-335.
- [8] MacCrehan, W. A.; Rasmussen, H. T.; Northrop, D. M. *J. Liq. Chromatogr.* 1992, 15(6,7), 1063-1080.
- [9] Kim, Y.; Morris, M. D. *Anal. Chem.* 1994, 66, 1168-1174.
- [10] Barron, A. E.; Soane, D. S.; blanch H. W. *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 3-16.
- [11] Chang, H.-T. ; Yeung, E. S., *J. Chromatogr. B* 1995, 669, 113.
- [12] Fung, E. N. ; Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 1995, 67, 1913.
- [13] Iki, N. ; Yeung, E. S., *J. Chromatogr. A* 1996, 731, 273.
- [14] Kasper, T. J.; Melera, M.; Gozel, P.; Brownlee, R. G. *J. Chromatogr.* 1988, 458, 303-312.
- [15] Guttman, A.; Cooke, N. *Anal. Chem.*, 1991, 63, 2038-2042.
- [16] Wei, W.; Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 2001, 73, 1776-1783.
- [17] Wu, C.; Liu, T.; Chu, B. *Electrophoresis*, 1998, 19, 231-241.
- [18] Rill, R. L.; Locke, B. R.; Liu, Y.; Van Winkle, D. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 1534-1539.
- [19] Liang, D.; Chu, B. *Electrophoresis*, 1998, 19, 2447-2453.
- [20] Rill, R. L.; Liu, Y. D.; Van Winkle, H.; Locke, B. R. *Journal of Chromatography A*, 1998, 817, 287-295.
- [21] Miksík, I.; Deyl, Z.; Kasicka, V. *Journal of Chromatography B* 2000, 741, 37-42.
- [22] Menchen, S.; Johnson, B.; Winnik, M. A.; Xu, Bai., *Electrophoresis* 1996, 17, 1451-1459.



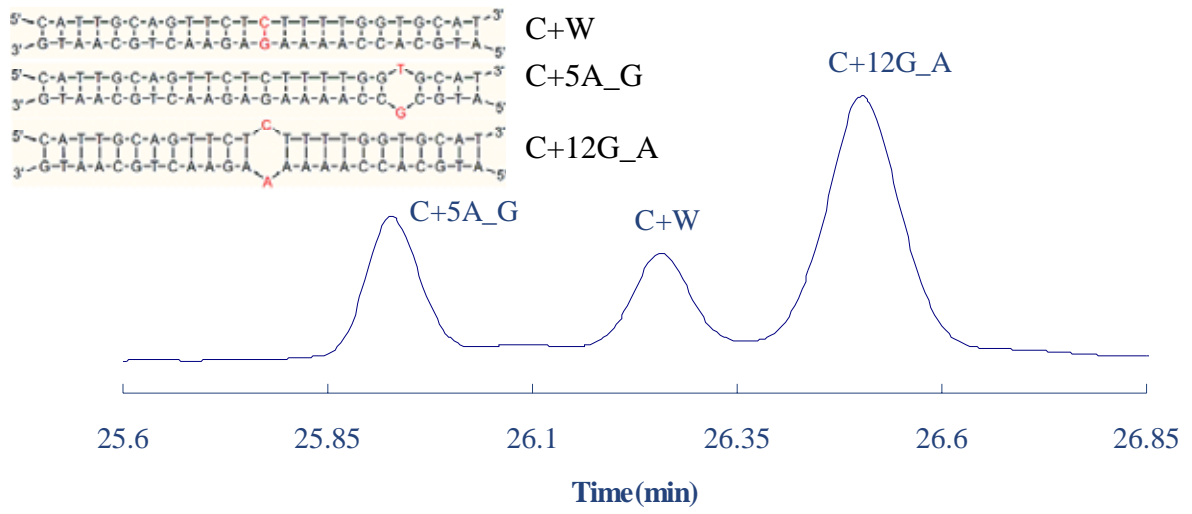
圖一：F127 凝膠態－溶液態相圖，在 25% F127 中分別添加 PPG 400（上圖）及 PEG 400（下圖）。



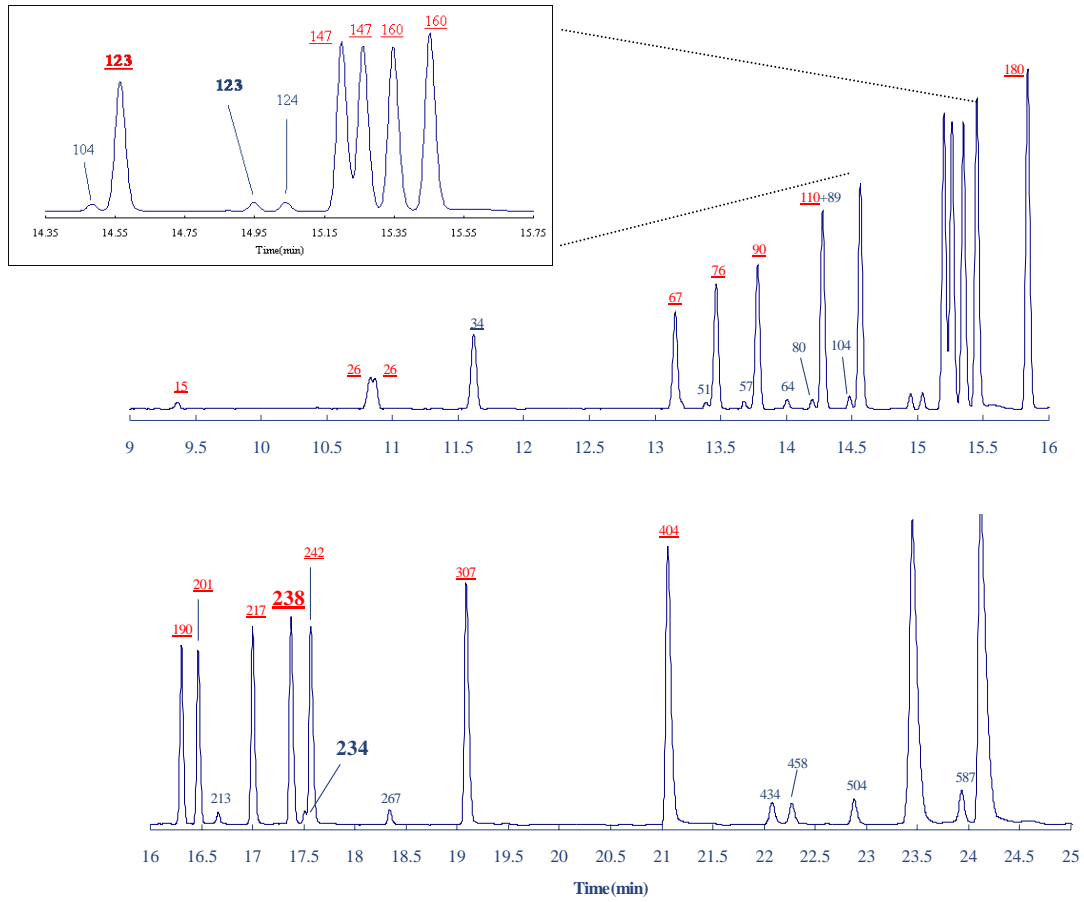
圖二： ϕ x174 RF-*Hae*III Digest DNA 電泳圖，分別取用圖一上圖中的組成 A 至 D 作為毛細管電泳分離介質。



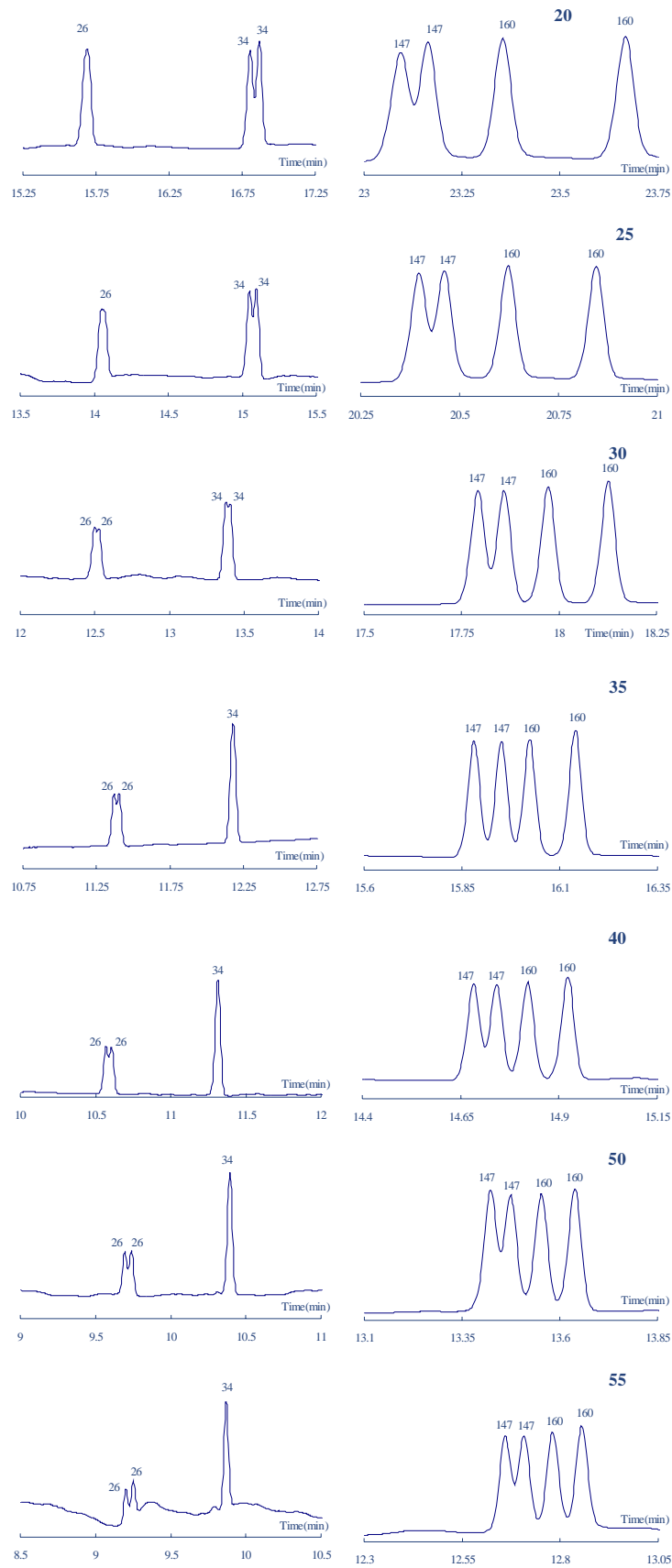
圖三：SSCP 以及單點突變 DNA 樣品的分離



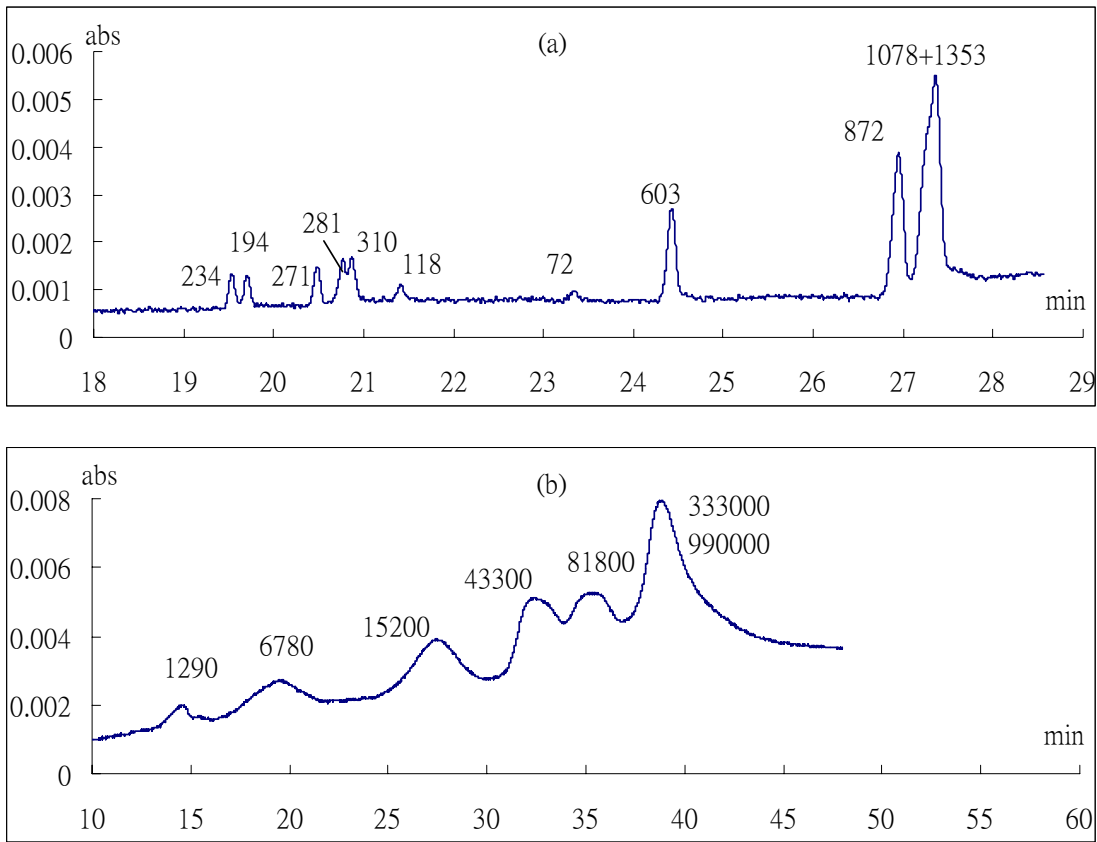
圖四：混合正常型 DNA 和不同位置發生未配對 DNA 之電泳圖



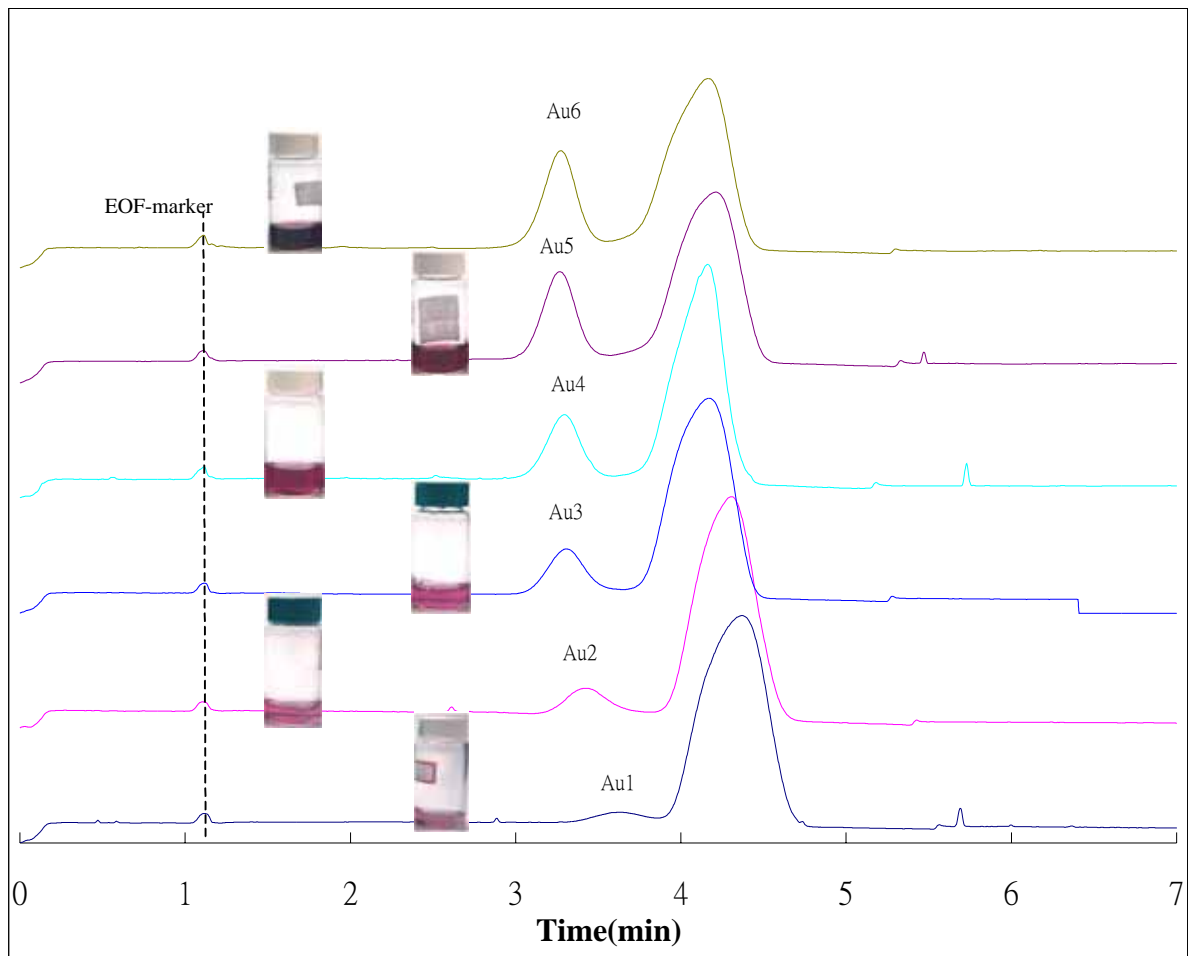
圖五：不同限制酶(Hae III-平切, Msp I-黏合切)切割的 pBR322 DNA 樣品之電泳圖



圖六：溫度對 dsDNA 之分離效應。當分離溫度為 35°C 時可以達到 147/147bp、160/160bp(大小相同但序列不同)基線解析效果。樣品：pBR322 DNA (Msp I digest)



圖七：(a) $\phi x 174$ RFDNA-Hae III Digest 樣品；(b) 聚磺酸化苯乙烯(PSS) 在 25% F127 + 30% PPG400 的分離介質中的毛細管電泳圖



圖八：為我們所合成奈米金粒子之電泳分析圖及顏色外觀。