

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

多孔型 PVDF 薄膜固定 DNA

Immobilization of DNA on porous PVDF membranes

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2216-E-032-002-

執行期間：90 年 08 月 01 日 至 91 年 07 月 31 日

計畫主持人：鄭廖平 Liao-Ping Cheng

計畫參與人員：林達鎔 Dar-Jong Lin

陳宗欽 Tsung-Chin Chen

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：淡江大學化學工程所

中 華 民 國 91 年 08 月 28 日

行政院國家科學委員專題研究計畫成果報告

多孔型 PVDF 薄膜固定 DNA

Immobilization of DNA on porous PVDF membranes

計畫編號：NSC 90-2216-E-032-002-

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：鄭廖平 Liao-Ping Cheng 淡江大學化學工程所

計畫參與人員：林達鎔 Dar-Jong Lin 淡江大學化學工程所

陳宗欽 Tsung-Chin Chen 淡江大學化學工程所

一、摘要

本論文主要是利用化學鍵結的方法，將 DNA 固定多孔型 PVDF 薄膜表面上，以便往後進行生醫方面應用研究。薄膜將採用浸漬沈澱法來製備，而製膜溶劑選用 TEP，非溶劑則採用水及異丙醇。隨著薄膜結構(緻密型、非對稱型、對稱型)不同，薄膜上 DNA 的固定量有所改變。固定 DNA 將分兩步驟進行，首先將薄膜利用電漿法接枝聚壓克力酸，再將 DNA 接在 PVDF 表面的聚壓克力酸上形成共價鍵。而此方法會因反應條件的不同，如溫度、反應物濃度、pH 值等，而影響 DNA 的固定量，此為本研究所要探討的主要課題。

Abstract

Attempts are made to chemically immobilize DNA onto porous PVDF membranes that are prepared by immersion precipitation method. The solvent for membrane formation is TEP, whereas the nonsolvents are water and 2-propanol. The amounts of immobilized DNA are found to change depending upon the structures of the membranes (dense, asymmetric, symmetric). DNA are immobilized onto the membrane by two steps: (1) the membrane is first grafted with poly(acrylic acid) using plasma method; (2) DNA is then reacted with the grafted acrylic acid on PVDF membrane to form amide bondings. The reaction conditions such as temperature, concentration of reactants, pH etc., affect the amount of immobilization, which are the central subjects of this research.

二、實驗

1. 實驗材料

(1) 高分子薄膜

高分子：聚偏二氟乙烯 (PVDF)，溶劑：磷酸三乙酯 (TEP)，非溶劑：異丙醇 (IPA)，正己烷 (1-Hexane)，水 (Water)。

(2) 電漿之聚丙烯酸接枝

丙烯酸，Ethyl-3-Aminocrotonate。

(3) 薄膜固定 DNA

DNA，活化劑：(EDC)，緩衝液：TE 緩衝溶液，指示劑：acid orange 7，其他：NaCl，0.1N HCl，

正己烷，蒸餾去離子水。

2. 實驗方法與測量

(1) 高分子薄膜製備

利用浸漬 沈澱法【1,2】製備 PVDF 薄膜，將 20% PVDF 加入 80% TEP 中，置於控溫在 60 的旋轉烘箱中，攪拌 12 小時，取出製膜液，將其靜置於室溫下 (25) 3 個小時，以除去製膜液中之氣泡；將適量製膜液均勻塗佈於玻璃板上，然後將其迅速浸入沉澱槽中，待薄膜成型與玻璃分離，將薄膜浸於純水中一天，再浸漬於異丙醇溶液中一天置，最後再浸泡於正己烷中一天，在真空烘箱中抽真空，使其完全乾燥。

(2) 電漿之聚丙烯酸接枝

a. 單體純化：取壓克力酸溶液，蒸餾去除抑止劑 (MEHQ)，純化後壓克力酸單體。

b. 除氧：將純化後壓克力酸單體與蒸餾水混合，配製成所需濃度之水溶液，氮氣除氧 20 分鐘。

c. 電漿之聚丙烯酸接枝：將 PVDF 薄膜放入電漿反應器中；將反應室抽真空至 1×10^{-3} torr 以下除氧二十分鐘，通入氫氣使壓力在 0.4 torr，打開電漿 (10~180 秒) 使薄膜的表面產生自由基，然後將其曝於空氣中 10 分鐘使自由基轉換為過氧化基；將薄膜放入配製好的壓克力酸溶液之中，置於 50~80 °C 下反應，約 16~30 小時後取出，以去離子水清洗 24 小時，烘乾備用。

d. 定量：將已接枝聚丙烯酸的薄膜裁成 $3 \times 3 \text{ cm}^2$ 的面積，加入 0.01N 氫氧化鈉水溶液 20ml，放震盪機中 24hr，取 10 ml 用 0.001N 鹽酸水溶液滴定。

(3) 薄膜表面固定 DNA

a. 接枝膜活化反應：如圖一，將已接枝聚丙烯酸的薄膜放入活化劑中 (EDC 溶於緩衝溶液中)，主要的目的是將丙烯酸上的羧基轉變成酸酐的形式，活化劑的 PH 值 1 至 5 (需在酸性環境下反應)，溫度保持在 4 ，反應 6 小時，然後用 TE 緩衝溶液清洗、烘乾。

b. DNA 的熱變性反應：如圖二，將 DNA 配置於 TE 緩衝溶液中，濃度為 1.0 mg/ml，將溶液置於 90 高溫下 5 分鐘，再放入冰浴中，使 DNA 由雙螺旋結構成單股結構，並且能維持約 24 小時。

c. DNA 接枝反應：將活化完成接枝膜置於熱處理後的 DNA 溶液中，在 4 的低溫下反應，經過

24 小時反應後取出，用緩衝液清洗兩次即可。

d. 比色法定量：DNA 固定量分析可利用 UV 比色法來實施【3】。指示劑 acid orange 7 會和 DNA 上的胺基產生錯合物，而由減少的 acid orange 7 量即可知道 DNA 的含量。首先製作檢量線，acid orange 7 在 UV 485nm 的地方具有一特定波長(如圖三)，當 DNA 量越多，消耗的 acid orange 7 也越多，吸收強度即變小【4】，檢量線如圖四。

取 $1 \times 1\text{cm}^2$ 固定 DNA 薄膜，加入固定量的 acid orange 7 溶液，放入震盪機中震盪 10 分鐘，使其反應形成染色 DNA，取出薄膜後，測其 UV 吸收率，檢量線比較可定出薄膜之 DNA 固定量。

三. 結果與討論

1. 高分子薄膜

薄膜結構之分析

圖五為薄膜上表面結構之 SEM 結構圖。圖五(a)為將 20% 製膜液浸漬於純水所生成薄膜，可發現此上表面為一平整且緻密的皮層；當沉澱槽含 50% TEP 時其薄膜結構示於圖五(b)，可以發現表面有不規則隆起且又稍具皮層，但並不平整；當沉澱槽含 70% TEP 時其薄膜結構示於圖五(c)，可發現已有條狀結構產生，但不明顯，三薄膜的上表面差異極大，可能是因為製膜液中溶劑和沉澱槽中非溶劑，相互間質傳速度不同所導致的結果。而三者的截面類似，但並不完全相同，是因為內部的質傳效果會降低的緣故。

2. 電漿之聚丙烯酸接枝

(1) FT-IR 全反射光譜對薄膜接枝聚丙烯酸分析

圖六為 FT-IR 全反射光譜分析圖，從圖中可以明顯看出，薄膜有無接枝壓克力酸與否的差異，(a)為未接枝前的薄膜，其在 1714 cm^{-1} 無吸收峰，而(b)則有明顯的吸收峰 (1714 cm^{-1} 為聚丙烯酸結構中的 C=O stretching)。

(2) 電漿處理時間對接枝量的影響

電漿處理主要是將薄膜表面活化，使表面產生自由基，經過曝氣後，形成過氧化基，進而進行接枝反應。而電漿處理時間的長短，對於自由基產生的程度有相當的影響。由文獻可以得知，基材表面所能產生的自由基對處理時間作圖有一極大值【5】，而不同材質之極大值位置皆不相同【6】，由圖七薄膜 A 在 120 秒時有極大值，薄膜 B 在 100 秒左右有極大值，而薄膜 C 極大值出現於 90 秒左右，是因為薄膜 A 具有皮層，薄膜 B 的結構較薄膜 A 豐富且脆弱，而薄膜 C 則完全呈現多孔型結構；但電漿處理過久，電漿處理器的離子束會破壞表面結構，接枝量就有下降的趨勢。整體的接枝效果中薄膜 C > 薄膜 B > 薄膜 A，是因為薄膜 C 結構中表面積最大的緣故。

(3) 丙烯酸濃度與接枝時間對接枝量的影響

取其中薄膜 A 與薄膜 C 兩個結構差距較大的材質來做討論，由圖八(a)、(b)可以觀察到接枝量隨丙烯酸濃度增高而增加，而且當丙烯酸濃度達到 60% 時，接枝效果是最好的而接枝量也隨接枝時間增長而放大，其中有兩個主要的理由：(1) 丙烯酸濃度高，自由基接枝的機率增加，接枝量較大(但是丙烯酸濃度過高，會導致快速結膠，薄膜無法取出)。(2) 接枝時間較長，所能反應的時間長，相對的接枝量就增加。

(4) 接枝溫度對接枝量的影響

溫度的高低對接枝量的影響相當的大，由圖九(a)、(b)可觀察到接枝量隨溫度上升而增加，當溫度到達 80 時，接枝量明顯較高，溫度在 80 下的化學反應，相當劇烈，很容易快速形成接枝反應(當然要配合接枝時間，90 的接枝時間太短)，所以在 80 下的反應是最理想的。

3. 薄膜固定 DNA

(1) 活化劑濃度對 DNA 固定量的影響

EDC 活化劑是將丙烯酸羧基轉變成酸酐，活化劑濃度會影響活化的程度，間接的會影響 DNA 鍵結的數量，由圖十可以觀察到 EDC 濃度增加時，DNA 固定量也隨之小幅度增加，但是薄膜 C 在 EDC 濃度達到 $4.35 \times 10^{-2}\text{M}$ 時，薄膜 A 在 EDC 濃度達到 $2.61 \times 10^{-2}\text{M}$ 時，接枝量已不再增加了，這表示羧基完全轉化成酸酐，或是活化已達飽和，以增加 EDC 濃度，卻無增加 DNA 固定量。

(2) 酸鹼度對 DNA 固定量的影響

a. 活化過程之 pH 值對 DNA 固定量的影響

活化過程中酸鹼對丙烯酸活化度有影響，EDC 與羧基須在酸性下有利反應生成 O-acylisourea，對縮合反應更有利進行。圖十一 pH 值 2-3 左右時接枝量最大，但在過酸環境下會抑制活化反應進行，導致 DNA 的接枝量下降。

b. 接枝反應之 pH 值對 DNA 固定量的影響

圖十一當 pH 值 3-4 時接枝效果最好，因為接枝時處在低溫的情況下，會有部分 DNA 由單股回覆成雙螺旋狀態，可是在酸性的環境下會抑制雙螺旋的回覆，使得 DNA 的接枝量能夠增加。

四. 結論

1. 高分子薄膜

改變沉澱槽濃度可以改變薄膜的結構，不同的結構，將有利於隨後的改質與應用。

2. 電漿之聚丙烯酸接枝

(1) 電漿處理時間長短，對於接枝效果有相當影響。對不同材質基材，所能產生最大接枝量之時間並不相同，而薄膜 A 為 120 秒，薄膜 B 為 100 秒，薄膜 C 為 90 秒。

(2) 影響接枝反應因素很多，其中接枝濃度、溫度與時間等三者對接枝量的影響最大，其相互的關

係也是密不可分的。接枝聚丙烯酸實驗中，達到最大接枝量的條件為，接枝濃度：60% 丙烯酸溶液，溫度：80℃，時間：16-20 小時。

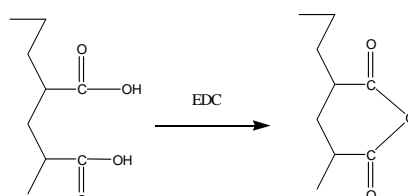
(3)不同結構的薄膜其接枝量也不同，本研究發現孔隙愈大愈多者，接枝量也愈高，即薄膜 C > 薄膜 B > 薄膜 A，而薄膜 C 對丙烯酸的最大接枝量為：0.6552mg/cm²。

3. 薄膜固定 DNA

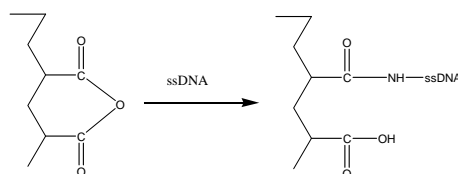
(1)DNA 本身為雙螺旋結構(一般穩定狀態下)，為了利用它的-NH₂ 官能基進行固定反應，我們必須使它變性為單股結構，在 90-100℃ 左右，變性情況已達 80% 以上，所以加熱是使其變性的一個好方法【7】。

(2)在丙烯酸接枝 DNA 部分，需使用 EDC 活化劑，其濃度對活化程度有一定影響，但濃度到 4.35×10⁻²M 時即達飽和；酸鹼度對此活化反應也有相當的影響，由實驗觀察到此反應需在酸性環境進行，而在 pH 為 2-3 時最佳。

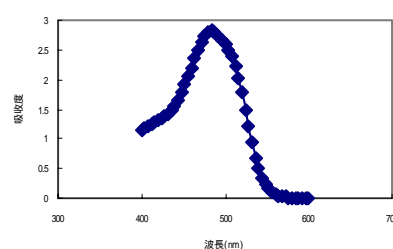
(3)在丙烯酸與 DNA 反應時 pH 值控制於 3-4 之間，接枝效果將處於最佳狀態；在丙烯酸接枝 DNA 部分，DNA 最大定量為：0.098169μg/cm²。



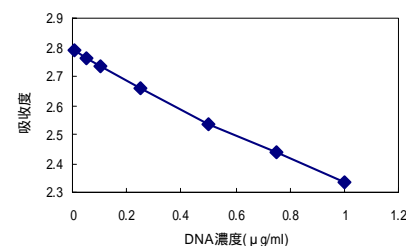
圖一 聚丙烯酸薄膜活化反應



圖二 DNA 與酸酐反應示意圖



圖三 acid orange 7 在 UV 之特定波長



圖四 DNA 檢量線圖

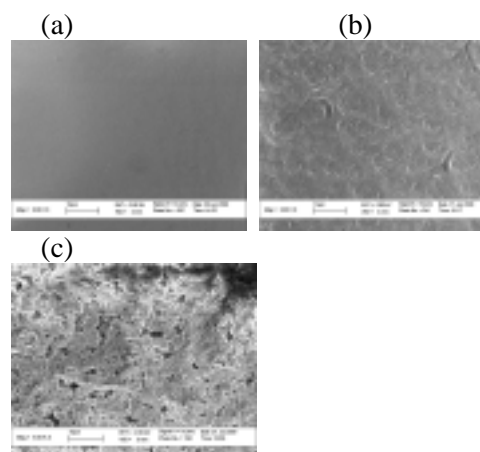
五. 參考文獻

1. M. Mulder, "Basic Principles of Membrane Technology," Ch. 3 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991
2. R. E. Kesting, "Synthetic Polymeric Membranes," John, Wiley & Sons, Inc., New York, 1985.
3. P. K. Smith, A. K. Mallia and G. T. Hermanson, *Analytical Biochemistry*, **109** (1980) 466 .
4. Sano. S., Kato. K., Ikada, Y, *Biochemistry.*, **14**, (1993) 817 .
5. J. Chen, Y. C. Nho, and J. S. Park, *Radiat Phys Chem.*, **52** (1998) 201 .
6. Y. M. Lee, J. K. Shim, *Jornal of Applied Polymer Sci.*, **61** (1996) 1245 .
7. Lubert Stryer ; 譯者：曾國輝，“大學生物化學”，藝軒圖書出版社，(1982) 631 .

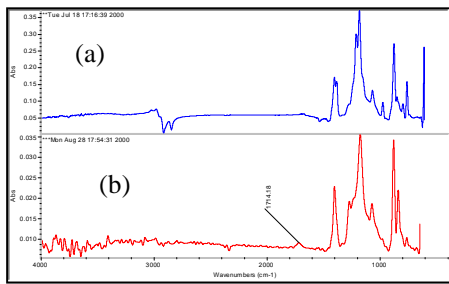
六. 附圖

薄膜	製膜液成分	沉澱槽成分
薄膜 A	20 %PVDF 80%TEP	+ 純水
薄膜 B	20 %PVDF 80%TEP	+ 50%水+50%TEP
薄膜 C	20 %PVDF 80%TEP	+ 30%水+70%TEP

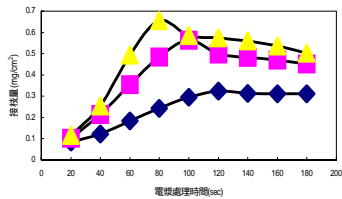
表一 各薄膜之成分



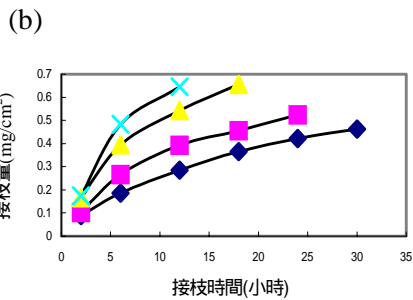
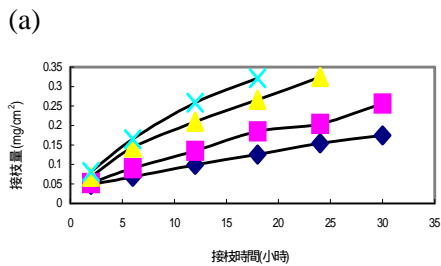
圖五 PVDF 薄膜上表面結構(50000 倍)
沉澱槽：(a)純水，(b) 50%TEP，(c) 70%TEP



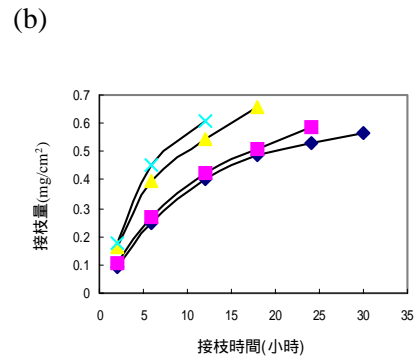
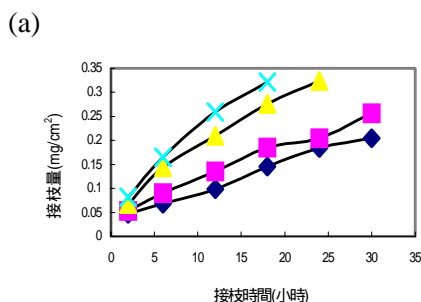
圖六 薄膜 FT-IR 光譜，(a)接枝前(b)接枝後



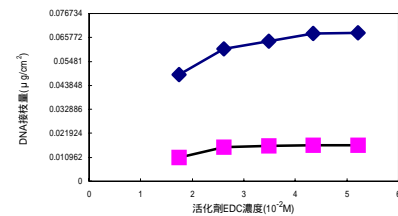
圖七 電漿處理時間對聚丙烯酸接枝量之影響
薄膜 A 薄膜 B 薄膜 C



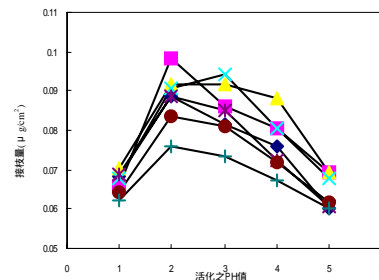
圖八 薄膜丙烯酸接枝量隨時間與接枝濃度變化
(a) 薄膜 A (b) 薄膜 C
40% , 50% , 60% , X70% 丙烯酸



圖九 薄膜聚丙烯酸接枝量與反應溫度之關係
(a) 薄膜 A , (b) 薄膜 C
: 60 , : 70 , : 80 , X : 90
電漿 90 120 秒, 60% 丙烯酸, 接枝 16 20 小時



圖十 活化劑 EDC 對接枝量之影響
: 薄膜 A : 薄膜 C
固定: 活化 6 小時, 溫度 4 , pH 2 3; 接枝
時間: 24 小時, 溫度: 4 , 酸鹼度: pH 3 4



圖十一 酸鹼度與 DNA 固定量的關係
: pH 1 : pH 2 : pH 3 X : pH 4
* : pH 5 : pH 6 + : pH 7
固定: 活化劑: $4.35 \times 10^{-2} M$, 時間: 6 小時, 溫度: 4 , 接枝濃度: $1 \mu g/ml$, 時間: 24 小時, 溫度: 4