

## [研究新領域報導]

## 高通量電泳分析

台灣大學化學系 張煥宗

## 一、前言

基因定序工程的研究突破與成果可說是 90 年代生命科學家的最偉大貢獻之一，期間牽涉的領域甚廣，包括分子生物學、化學、數學和工程學等。於今年（2001）在科學和自然雜誌公開發表的基因定序草圖正是結合群體工作獲致豐腴研究成果的結晶[1, 2]。隨著基因定序研究的逐漸成熟，後基因質體學的研究 [3, 4]，包括基因質體學 (genomics)、轉譯質體學 (transcriptomics)、蛋白質體學 (proteomics)、藥物動力質體學 (pharmacogenomics)、代謝質體學 (metabolomics) 等已儼然成為目前生命科學研究新熱潮。筆者在此大膽預期此類研究將在未來數年甚至數十年內持續成為生命科學研究之主流，而生物科技的發展亦會因此而蓬勃發展。

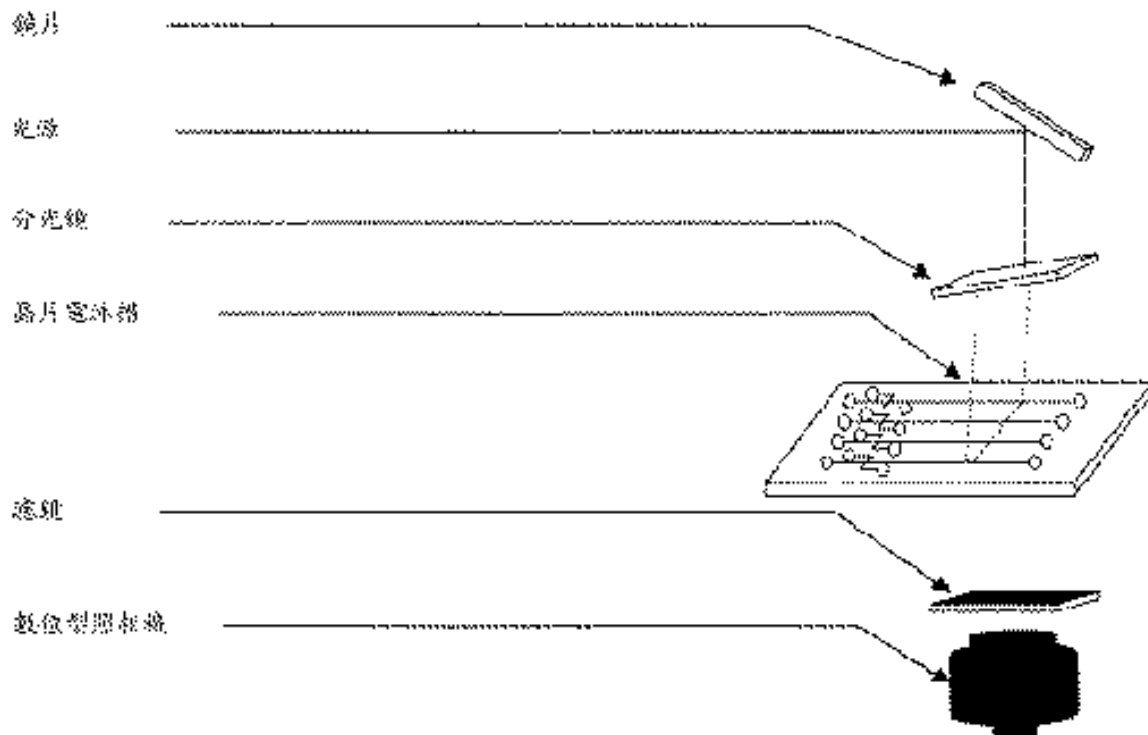
和基因定序相比，後基因質體學的研究將更加困難但有意義，因為它主要是探討個體差異、生物分子和環境間之關係以及生物分子間作用之動力學資訊等，故能提供更直接及詳實的生物資訊，有助於藥物的發展、疾病的診斷、生命演進的探討及生物工程的發展等。在研究蛋白質體學和代謝質體學時，由於蛋白質和其他小分子之訊號不若 DNA 般可藉由聚合<sup>①</sup>反應來放大，因此當其含量極低時常造成偵測方面之困難。另外欲從人體之 30 億鹼基對中找出少數基因序列的差異、從至少 2 萬至超過十萬種人類蛋白質中尋找蛋白質的差異、或從各種體液中檢測代謝物之異同等工作，其困難猶如海底撈針。因此為能在短時間內，得到較完整且有用之訊息，新分析技術的研發是刻不容緩且重要。目前以結合平板膠電泳與質譜技術為探討各種質體學為最重要之技術 [5]。而具高靈敏度之雷射誘導螢光技術則在偵測極微量物質方面，佔有一席之地，如於單細胞分子方面之研究 [6, 7]。為了提高分析速度及解析度，適於高通量(high throughput)分析之各種電泳技術便成為目前生物分析之主流。本篇將著重於

報導高通量毛細管電泳、晶片電泳和超薄型平板膠電泳等技術之發展與應用。圖一為簡單高通量分析儀器之示意圖。

## 二、高通量毛細管電泳

高通量分析技術指的是在數十根甚至上千根毛細管電泳中同時進行分析之技術，由於毛細管電泳具有單鹼基對解析度、快速、易自動化等優點，故若同時在多根毛細管中進行分離並用雷射誘導螢光技術偵測則可加速其分析速度。目前已有數種商業化儀器如 ABI PRISM<sup>®</sup> 3700 CPE Biosystems、MegaBACE<sup>™</sup> 1000 (Amersham Pharmacia Biotech) 和 SpectruMedix SCE9610 等問世，其中後者是筆者和多位同儕於攻讀博士期間共同研發之專利 [8]。此類儀器已在基因定序工作中扮演相當重要之角色。DNA 定序的原理相當簡單，首先是將經由 Sanger 反應而帶有螢光物質之 DNA 打入毛細管中，於高電場中，藉由高分子水溶液來篩選大小不同之 DNA 片段，小片段易穿過，因此較早於正極中被偵測到，最後藉由遷移時間及螢光訊號，由程式找出 DNA 序列。由於 DNA 於介質中移動的速度受電場影響，因此目前分析技術僅適用於分析小於六七百鹼基對之 DNA 序列。為加速定序速度及降低成本，近年來已有適於分析高至 1200 鹼基對 DNA 定序之介質被開發成功，但其定序準確度仍是問題，故積極尋找新介質及開發各種溫度、電場或濃度梯度式電泳之分離仍是 DNA 分析中重要之工作。目前結合 single nucleotide polymorphisms (SNPs) 技術 [9]，高通量毛細管電泳更被廣泛用於基因分析，例如麻省 Whitehead 技術中心大量投入於研究人種、物種、或正常人與病人間之基因序列的異同。

由於毛細管電泳亦極適於蛋白質、中性小分子、離子或光學異構物之分析，因此其在後基因質體學中之應用亦極為重要。由於生物樣品之複雜性及各種分析物間之濃度差異性極大，故實無法從一根毛細管或一種特定分析技



圖一 高通量電泳裝置圖

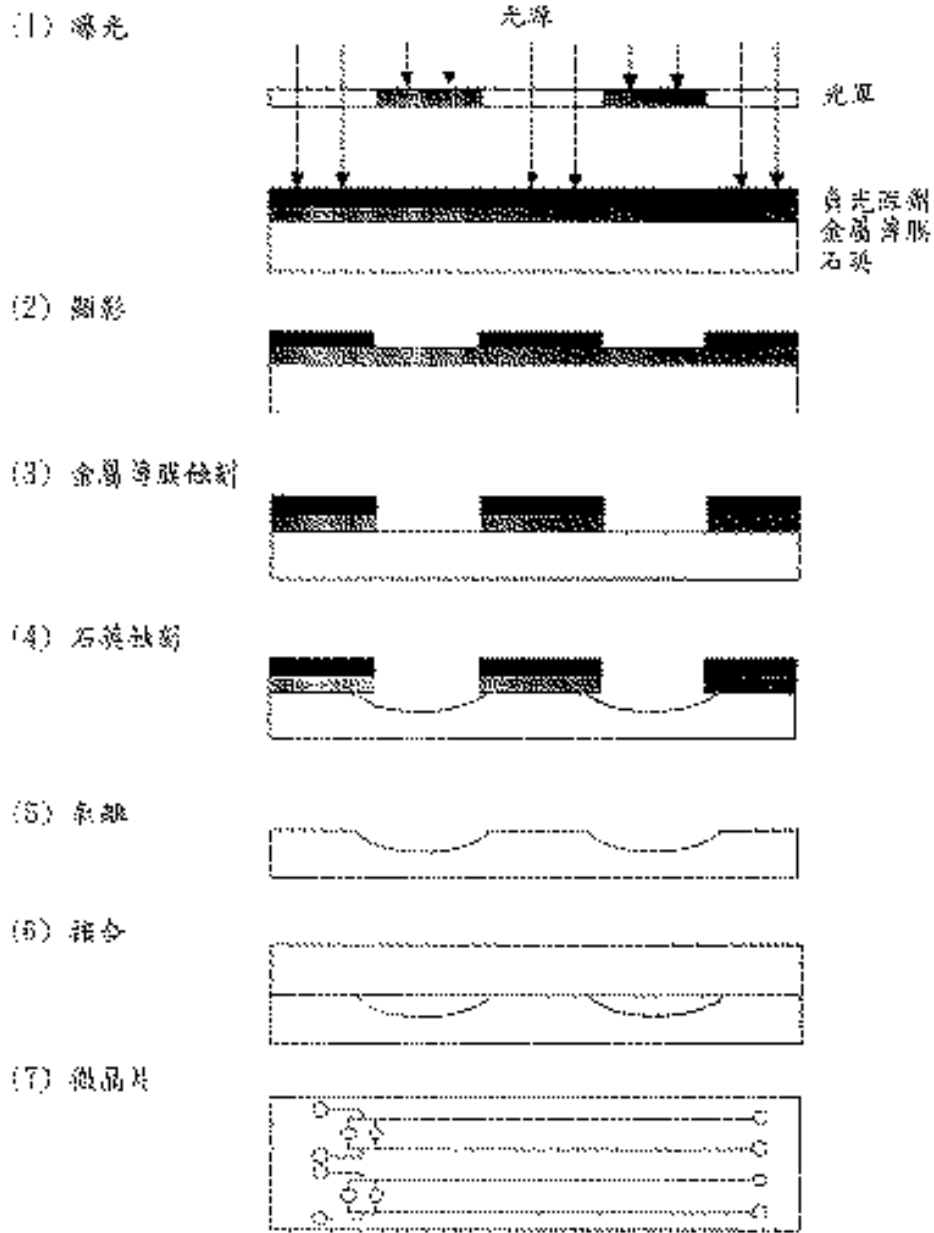
術中得到足夠訊息。解決之道，乃利用高通量毛細管電泳裝置，同時在多根毛細管中進行區帶電泳、電層析、親和性電泳分離，並藉由吸收、螢光（衍生化或直接）和質譜等不同方式偵測。在偵測極微量分析物方面則可藉由線上濃縮技術 [10] 或酵素免疫分析、能量轉移等方式來完成。利用酵素具放大訊號及其專一性之特性，科學家亦發展數種適於單細胞和單分子研究之新技術，例如，經由單分子之研究，吾人可區分出單一酵素分子之同異性，尤其是在催化能力方面 [11]。若將此類技術應用於高通量分析上，將有助於快速分析單一正常和病變細胞之異同，有益於疾病之早期診斷。另外，利用高通量技術來進行各種不同種類之單一分子間之作用力的研究，亦將有利於瞭解細胞內各種蛋白質間之作用及其功能，這正是目前蛋白質體學研究中較重要之課題之一，因為在探討許多生命現象時，常會因為訊息的欠缺而無法突破，而這些訊息的取得常常又和細胞內含量極少之蛋白質有關。

### 三、晶片電泳

晶片電泳分析具有快速（可在數秒內完成）、高解析、樣品用量少、易進行線上衍生

化等優點，故近年來已被用於聚合<sup>④</sup>產物分析、酵素免疫分析、重要生物小分子分析等。若利用光蝕刻或壓版方式吾人可在  $5 \times 10$  公分之晶片上製造數十甚至上百個之分離槽，然後再於其中進行高通量之電泳分析，以提高分析速度。光蝕刻方法雖較難，但其可用來製造高密度及適合各種分析需求之分離槽樣式 [12]，因此較常被用來製造高通量晶片電泳所用之電泳分離槽。圖二簡單介紹一種用光蝕刻法來製造晶片電泳之流程，其中較困難處，是在光柵之製造。

和上述高通量毛細管電泳比較，晶片電泳之好處是其成本低、易進行線上分析及自動化且儀器本身所佔體積小。目前市面上已有 Agilent Technologies 生產之晶片電泳儀器（Agilent 2100 Bioanalyzer），其主要是用於 DNA 和 RNA 之分析。另外值得一提的是，近來在美國、日本及歐洲有許多生技公司投入在晶片中進行酵素免疫分析之研究工作，其目的是期望在短時間內可在同一晶片中同時偵測多種疾病標記物 [13]。將所須檢測之 DNA 經過 20 至 30 次聚合<sup>④</sup>循環反應放大後，再進行晶片電泳分離之新技術亦被成功應用於基因分析及單一 DNA 分子之偵測 [14, 15]。一般感信單



圖二 高通量晶片製作流程圖

一 DNA 分子之檢測除有助於早期偵測疾病外，單一 DNA 分子及蛋白質間作用力的探討將有助於蛋白質製造機制及對細胞功能之瞭解，這對生命科學研究將有相當深遠的影響。另外，在晶片上進行聚合反應和電泳分離，則可減低成本並加速分析速度，將可應用於醫院之臨床檢驗 [16]。

雖晶片電泳具有上述諸多優點，但其製造較難、樣品注射量準度較差且須較靈敏之偵測器（因注射量僅 pL），故其目前之發展尚未臻至成熟。為能降低製造成本及達到丟棄式之設

計要求，目前有許多實驗室投入利用不同材質製造高通量電泳之研究，較常被使用之塑膠材質如表一所示。但由於許多塑膠材質具有微弱螢光或吸光性質而造成較高背景訊號，致使靈敏度降低，故須視實驗需求而慎選所須材質。另外，易吸附分析物及不耐有機溶劑亦是塑膠材質嚴重問題之一。為增加分析解析度及增進再現性，吾人常利用適當化學物質或高分子來塗覆材質表面以減少分析物和晶片表面之作用力。另外塗覆亦有助於控制穩定或適當大小之電滲流。在增加靈敏度方面則可經由增長光

表一 電泳分析常用塑膠材質之物性與化性

	耐酸鹼性	耐有機溶劑	熱導係數 $\lambda(\text{w/m}\cdot\text{k})$	壓微管道溫度 ( )	黏合溫度 ( )	電滲流 $(\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{sec})^a$
Poly(methyl methacrylate)	+	-	0.186	105	108	$1.4 \times 10^{-4}$
Polystyrene	+	-	0.18	112	105	$1.8 \times 10^{-4}$
Polycarbonate	-	-	0.21	150	155	$3.0 \times 10^{-4}$
Poly(ethylene terephthalate) glycol	+	-	-	80	-	$4.3 \times 10^{-4}$
Copolyester	+	-	0.32	80	75	$4.3 \times 10^{-4}$

a: 10 mM phosphate buffer, pH = 7

徑、線上濃縮、或利用各種高靈敏度之光學、電化學或質譜儀等來達成。近年來亦有人在晶片上同時進行液相層析及電泳分離以增加分析解析度 [17]。而為增加分析物結構之鑑定，晶片電泳和質譜之結合更是受到重視，目前已有數種可將經由晶片電泳分析出來之分析物直接送至質譜儀分析之新技術 [18]，此方面之研究將有助於藥物篩選和藥物製程監控。

#### 四、超薄型平板膠電泳

平板膠電泳和上述兩種電泳方法最大不同是其可進行二維式電泳分析（例如先在蛋白質等電點附近進行等電點聚焦式分離，之後再於 SDS 和 polyacrylamide gel 中進行大小不同之分離），故可分離出上千甚至上萬種之分析物，因此是目前蛋白質體學研究中極重要之工具之一。但其缺點是須在較低電場中進行分離，故速度較慢。為提高速度（在較高電場下進行分離）及解析度，目前已有數種超薄型膠電泳被用於分析蛋白質 [19]。但由於樣品進量少，故其對靈敏度之需求將更加嚴格。平板膠電泳之其他缺點還包括不易自動化和線上偵測等，例如通常須經由繁雜之染色及去染色步驟來發現分析物之所在。為解決此問題，目前已有數種具高量子產率之螢光染劑被用於增加蛋白質之偵測靈敏度。目前本研究室亦利用自行開發之儀器來偵測經由二維超薄型膠電泳分離之蛋白質。我們分別使用 Nd:YAG 和氬氫雷射作為激發源來激發本身具有螢光或經染色之蛋白質，再藉由數位型照相機來偵測蛋白質，以增進蛋白質偵測之靈敏度及判讀。為了能定出蛋白質序列，目前較常用的方法是將蛋白質自膠體中切割下來，再經由適當步驟處理和消化後，送至質譜中分析，再由電腦比對其荷質比，

而定出較可能之蛋白質。但此方法耗時且易產生誤差，為解決此問題，目前我們正和美國衛生總署合作開發適於線上進樣之分析方法 [20]，主要的技巧是利用毛細管電泳將經由超薄型二維膠電泳分離之蛋白質以電泳方式引至毛細管中，再進行消化作用，最後以自動化方式送入質譜進行分析。

#### 五、未來展望

隨著電泳、螢光和質譜等分析技術之改進、基因序列之建立、勝肽片段質譜圖之建立及電腦資訊之發達，未來數年內人們將在各種質體學研究取得長足進步。利用高解析、靈敏和快速之新分析技術來探討蛋白質和蛋白質間、蛋白質和 DNA 間、或酵素分子和其受質間之作用，將有助於藥物之開發、疾病之診斷及生物演進之探討等。為了能透視更多奧秘的生命現象，許多可偵測單分子和具單元子解析度之分析工具亦將陸續被應用於生命科學的研究。另外，筆者亦相信結合各種分離技術之多維分離系統亦將逐漸被開發成功並應用於質體學之研究。吾人可預期在未來數年中將有更多重大的理論被提出，而患有癌症、巴金斯症、愛滋等疾病之病人亦可能因而受惠。

#### 參考文獻

- [1] *Science*, **291**, Feb. 16 (2001).
- [2] *Nature*, **409**, Feb. 15 (2001).
- [3] S. Oliver, *Nature*, **403**, 601 (2000).
- [4] N.G. Anderson, A. Matheson and N.L. Anderson, *Proteomics*, **1**, 3 (2001).
- [5] J.R. Yates, III, *J. Mass Spectro.*, **33**, 1 (1998).
- [6] H.P. Lu, L. Xun and S. Xie, *Science*, **282**, 1877 (1998).

- [7] X.H. N. Xu and E.S. Yeung, *Science*, **281**, 1650 (1998).
- [8] E.S. Yeung, H-T. Chang, E.N. Fung, X. Lu and Q. Li, *U.S. Patent* 5,582,705, Dec. 10 (1996).
- [9] I. Medintz, W.W. Wong, G. Sensabaugh and R.A. Mathies, *Electrophoresis*, **21**, 2352 (2000).
- [10] W.-L. Tseng and H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **72**, 4805 (2000).
- [11] R. Polakowski, D.B. Craig, A. Skelly and N.J. Dovichi, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4853 (2000).
- [12] D.T. Chiu, N.L. Jeon, S. Huang, R.S. Kane, C.J. Wargo, I.S. Choi, D.E. Ingber and G.M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2408 (2000).
- [13] D.C. Duffy, H.L. Gillis, J. Lin, N.F. Sheppard, Jr and G.J. Kellogg, *Anal. Chem.*, **71**, 4669 (1999).
- [14] E.M. Smith, H. Xu and A.G. Ewing, *Electrophoresis*, **22**, 363 (2001).
- [15] C.S. Effenhauser, G.J.M. Bruin, A. Paulus and M. Ehrat, *Anal. Chem.*, **69**, 3451 (1997).
- [16] J. Khandurina, T. E. McKnight, S. C. Jacobson, L. C. Waters, R. S. Foote and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **72**, 2995 (2000).
- [17] R.D. Rocklin, R.S. Ramsey and J.M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **72**, 5244 (2000).
- [18] J. Li, J.F. Kelly, I. Chernushevich, D.J. Harrison and P. Thibault, *Anal. Chem.*, **72**, 599 (2000).
- [19] A. Guttman and Z. Rónai, *Electrophoresis*, **21**, 3952 (2000).
- [20] H.-T. Chang, A.L. Yergey and A. Chrambach, *Electrophoresis*, **22**, 94 (2001).