

毛細電泳暨雷射誘導螢光技術之發展與應用

由於毛細管電泳 (capillary electrophoresis, CE) 暨雷射誘導螢光 (laser-induced fluorescence, LIF) 技術具有極快之分析速度 (短至數秒鐘)、極高之解析度 (理論板數高至數百萬)、極低之偵測極限 (低至單分子) 與適合生物樣品分析等優點, 已成為一門重要的生物分析技術。於本文中, 我們分別介紹用 CE-LIF 來進行 DNA、蛋白質和單細胞分析及單分子偵測等。由其成功被應用於 DNA 序列; 單一鹼基對突變、PCR 產物、酵素同素和抗體或抗原等分析; 單細胞中胰島素分泌的動力學研究; 及單一酵素分子活性的異同和單一 DNA 分子的檢測等實例, 我們相信 CE-LIF 將繼續在法醫學、癌症、神經學和生命科學等研究領域中佔有極重要的角色, 尤其是高通量 CE-LIF 或晶片電泳之發展與其於蛋白質體學之應用將更值得注意。

張煥宗、黃銘峰、謝明穆、黃志清

一、引言

毛細管電泳 (capillary electrophoresis, CE) 暨雷射誘導螢光 (laser-induced fluorescence, LIF) 技術指的是分析物質在高電場 (可高至約 800 V/cm) 影響下, 在細小毛細管中 (內徑通常為數微米至一百微米) 以不同遷移速度運動而進行分離, 再利用雷射做為線上激發光源, 以誘導分析物產生螢光而達偵測之目的。目前較受重視之毛細管分離方法有: 毛

張煥宗先生為美國愛荷華州立大學化學博士, 現任國立台灣大學化學系副教授。

黃銘峰先生為國立台灣大學化學所博士班研究生。

謝明穆先生為國立台灣大學化學所博士班研究生。

黃志清先生為國立台灣大學化學所博士班研究生。

細管區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)、毛細管凝膠電泳 (capillary gel electrophoresis, CGE)、等電聚焦毛細管電泳 (capillary isoelectric focusing, CIEF)、等速毛細管電泳 (capillary isotachopheresis, CITP)、微胞電動力層析 (micellar electrokinetic chromatography, MECC) 和毛細管電層析法 (capillary electrokinetic chromatography, CEC) 等。由於雷射誘導螢光毛細管電泳分析技術具有高靈敏度、選擇性、解析度佳、速度快、樣品用量少等優點, 且適用於多重性系統, 因此是目前重要生物分析技術之一。因其發展及應用極廣, 實無法一一涵蓋於本文中, 本篇內容將僅偏重於其在大分子分析方面之應用, 包括 DNA、蛋白質、單細胞之研究和單分子之偵測等。

二、大分子分析

1. DNA 研究

DNA 是生物遺傳的基本因子，控制了生物體內蛋白質的合成，其結構與功能的探討，在生物與醫學上佔有很重要的意義，也是基因工程的基礎，故此方面的研究成果將有助於了解人類基因之組合、生物技術之開發、癌症之研究。由於在電場中，DNA 於自由溶液中不管其大小皆以同速度進行遷移，故無法進行分離。為達到高解析度之目的，目前較普遍的分離技術是於管柱內進行凝膠介質，如聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 的合成；或將線性高分子溶液，如聚環氧乙烷 (poly(ethylene oxide))，利用壓力填充於毛細管中，以便對大小不同之 DNA 片段進行篩分⁽¹⁾。前者因再現性差、毛細管壽命短、價格高等缺點，已逐漸為後者所取代。於電泳中，為減小電滲透流 (electroosmotic flow) 及 DNA 和毛細管壁的作用，一般是採用去活化的毛細管。因小片段的 DNA 較易穿過篩分介質，故較早於正極端被偵測到。由於 DNA 僅在紫外光區稍具螢光性質，可見光區則不具備，故為達到較佳之靈敏度，須於高分子溶液中加入適合的鉗合染劑 (如 ethidium bromide)，或讓 DNA 分子與染劑 (如螢光黃) 形成共價鍵鍵結，而目前較常用來激發螢光分子之雷射為氬離子雷射和氬氫雷射等。簡單之 CE-LIF 裝置如圖 1 所示。和傳統平板凝膠電泳 (slab-gel electrophoresis) 比較，CE 因其散熱較

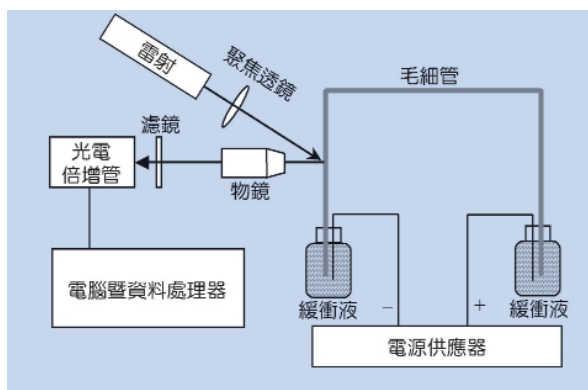


圖 1. 雷射誘導螢光毛細管電泳裝置示意圖。

快，故可以在較高電場下進行分析，所以分析的速度遠較平板電泳來得快，例如分析數百鹼基對之 DNA 片段僅需數分鐘即可完成，惟電場亦會對 DNA 構形產生影響，故須精確控制電場強度。由於將高分子溶液填充於內徑小 (如 75 微米) 之毛細管有其難度，故本研究室針對此一缺點，已成功開發於分離過程中，利用電滲流將高分子溶液引進毛細管來分離 DNA 之新技術⁽²⁻⁴⁾。由於 DNA 分子和電滲流以相反方向在電場中進行遷移，故具較大片段之 DNA 分子會先在陰極端被偵測到，此和傳統方法 (無電滲流) 分離順序相反，如圖 2 所示。值得一提的另一優點是，利用此一新技術亦可讓我們在毛細管中進行梯度式毛細管電泳，來增加分析 DNA 之解析度⁽⁵⁾。

CE-LIF 除應用於 DNA 片段的分析外，較重要的應用是結合聚合連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術來進行微量 DNA 樣品之分析，如單一鹼基對突變之檢測⁽⁶⁻⁹⁾、DNA 比對 (DNA typing) 等。為了減少分析樣品量與污染，以及樣品處理等繁瑣步驟，以自動化線上 PCR-CE-LIF 分析 PCR 產物之技術亦已被發展成功。另外值得介紹的是，目前已發展出在直徑 10 cm 的圓形晶片上同時檢測 96 個經 PCR 放大樣品之新技術⁽¹⁰⁾。由於所需之分離時間極短 (數分鐘)、解析度高 (單鹼基對)、樣品量極少，上述技術已漸受醫學及法醫學

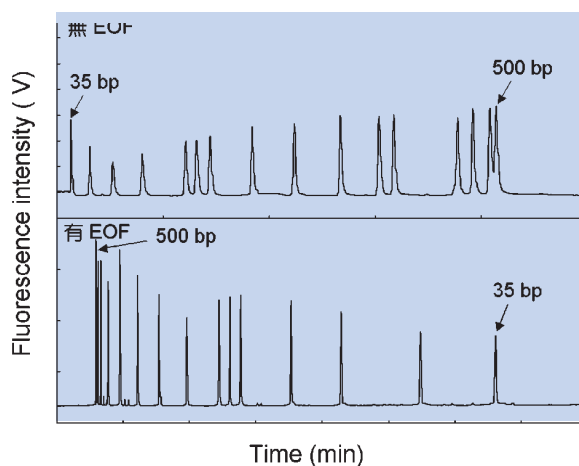


圖 2. 無 EOF 和有 EOF 存在下分離 GeneScan-500 Rox 的電泳圖。

等重視。除此之外，在基因序列研究上⁽¹¹⁻¹³⁾，其所扮演的角色更是重要。其分析速度雖快，但若想在極短時間內以低成本來解出人類基因 (3×10^9 鹼基對) 所有序列，是無法以一根毛細管來達成的，為此，科學家們已發展出數種高通量 DNA 序列分析技術⁽¹⁴⁻¹⁷⁾，儀器裝置如圖 3 所示。此類技術可讓人同時在數十至數百根毛細管上進行不同 DNA 樣品分析，因此可在短時間內分析大量樣品。在最近，宣佈完成人類基因解碼之工作即是利用此類工具。目前已有數種適合進行高通量毛細管電泳分析之產品問市，例如 ABI PRISM[®] 3700 CPE Biosystems 和 MegaBACE[™] 1000 (Amersham Pharmacia Biotech)，惟其價格仍高。

2. 蛋白質

蛋白質具有各種催化及生理機能，是細胞的主要機器，其功能乃源自蛋白質分子所具有的特定構形及其催化活性。但由於生物體中含有非常多種類及含量不同之蛋白質，且同一種類之蛋白質亦會因經過化學修飾 (如磷酸或乙酸化等) 而有不同之活性，故其研究是相當困難的。但由於對蛋白質產生、修飾過程及其構型之探討與瞭解皆有助於生命科學之研究及製藥工業之發展，因此蛋白質體學 (proteomics) 已儼然成為後基因學重要課題之一。

利用 CE-LIF 進行蛋白質分析時，常遭遇之問題是分析物與毛細管的管壁作用，而造成定量上之誤差、分析解析度之降低，和遷移時間之改變等問題。為增加分析之再現性，可在 $\text{pH} \leq 3$ 或 $\text{pH} \geq 9$ 時進行分析，或用表面已被高分子塗覆的毛細管來進行分析。另為增加蛋白質分析解析度，等電聚焦毛細管電泳、等速毛細管電泳或在高分子水溶液中進行分析等技術亦常常被使用。在偵測方面，由於僅具色胺酸 (tryptophan)、胰蛋白 (trypsin) 和苯丙胺酸 (phenylalanine) 殘基之蛋白質可被紫外光雷射激發，而達到 nM 左右之偵測極限。大部分蛋白質並無法產生自發性螢光，故常需經由化學方法來將蛋白質衍生化，例如用 fluorescein isothiocyanate 和 indocyanine green 等，將螢光物質共價鍵結於蛋白質上，或將 AB580、SYPRO Red 等染料以非共價鍵結加至蛋白質上。近來，為降低生物樣品基質之

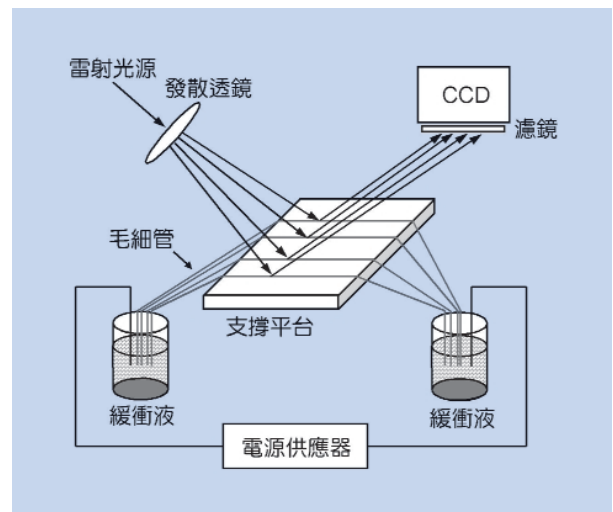


圖 3. 高通量毛細管電泳裝置示意圖。

偵測干擾，使用近紅外螢光物質來衍生化蛋白質，再用低成本氦氖雷射來激發螢光物質之技術亦漸受重視。利用抗原和抗體之作用，亦可用來分析特定之物質⁽¹⁸⁻²¹⁾。另外，亦可利用部分酵素具專一性催化能力之特性來偵測酵素，如利用乳酸去氫 (lactate dehydrogenase, LDH) 轉換 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) 成 NADH 之作用：



如上式所示，觀測 NADH 之螢光訊號的轉換，即可得知 LDH 之活性⁽²²⁾。

CE-LIF 除用於檢測生物體內之重要蛋白質，如尿液中的 HSA、血液中的血紅素和唾液中之蛋白的含量之外，亦常被用來檢測經由 DNA 再併合技術製造之蛋白質的純度^(23,24)。由於其鑑定蛋白質純度之能力極佳，故已然成為製藥工業重要分析技術之一。利用蛋白質和藥物作用後其遷移速度或訊號改變等特性，吾人可用 CE-LIF 來進行藥物篩選⁽²⁵⁾或計算其結合常數等。同樣地，若將特定之抗體或抗原加至緩衝溶液中，亦可快速地檢測出樣品中特定之抗原或抗體。此外，目前另一受重視之主題是利用 CE-LIF 來進行蛋白質體學之研究，但由於其複雜性，故將此技術和二維平板膠電泳或和質譜等技術結合將是爾後幾年內值得開發之新技術。

三、單細胞

由於一般哺乳類動物細胞半徑和體積皆小(如人類紅血球細胞內徑和體積約為 $8\ \mu\text{m}$ 和小於 $1\ \text{pL}$)，若用一般的氣相和液相層析來偵測單細胞將會造成樣品稀釋約 10^6 倍，即使液相層析中所使用的管柱半徑只有 $300\ \mu\text{m}$ 也會造成 $100 - 1000$ 倍的稀釋，相較下 CE 不會有如此嚴重的稀釋效果。因 CE 分離理論板數可輕易達數十萬，故即使像細胞這樣如此複雜的生物樣品，在 CE 中也可達到很好的分離效果。由於 CE 可容許在較高的電場下進行分離(可在數秒內完成分離)，故可用來探討細胞受藥物或物理因子刺激所釋放之物質和時間的關係。目前一般血液檢驗技術所用的樣品皆含有數十萬個以上之細胞，故其檢驗的結果是一平均值表現。但由於疾病和癌症的初期通常只有一小部分的細胞遭受感染或發生病變，所以一般的檢驗技術並無法在發病的最初期偵測出細胞病變的程度，故分析單細胞內所含的一些特殊化學物質和生物分子標誌含量的多寡，方可反應出細胞病變的程度。但因初期時其含量相當低，故需用靈敏度相當高之偵測方法(如 LIF)，方能達此目的。

為避免細胞破碎後在毛細管中被稀釋，因此在 CE 中用來分析單細胞所使用的毛細管其內徑大都為 $10 - 25\ \mu\text{m}$ ，由於聚焦不易且光徑太小，一般 UV 偵測器並不適合用來偵測在如此小內徑毛細管內的訊號變化。另外 UV 偵測並不靈敏(偵測極限約 $10^{-6}\ \text{M}$)，且易受細胞基質的影響，故 UV 偵測器並不適於單細胞的研究。雖電化學偵測器⁽²⁶⁾、放射性化學偵測器⁽²⁷⁾、質譜儀偵測器⁽²⁸⁾ 可提供極佳之靈敏度，亦可用於單細胞研究，但皆不若 LIF 優越，此乃因 LIF 具易聚焦於極小的區域(較好的空間解析度)、訊號器本身較不受基質影響及適於多重性系統(multiplexed system)的特性。一般單細胞研究是先將含細胞之樣品滴到玻璃表面上，再將毛細管移至細胞附近，用壓力或電泳方法將單細胞注入毛細管內並進行分離，一般細胞注射裝置如圖 4 所示。

細胞內所含之許多蛋白質和神經傳導物質可利用雷射光激發產生自然螢光(laser-induced native

fluorescence, LINF) 來直接偵測⁽²⁹⁾，直接偵測即不需管柱外(off-column)或管柱內(on-column)的衍生化。衍生化會面臨一些問題，如衍生化速率太慢、衍生化不完全、樣品的稀釋和污染，而造成定量或分離等問題，故在單細胞研究上，不若直接偵測優異。以下列舉一些分析單細胞的實例。

1. 測紅血球內血紅素組成的含量

人體紅血球內血紅素(hemoglobin, Hb)最主要成分為 HbA_0 (90%, $\text{MW} = 65500\ \text{g/mol}$)，是由四共聚物($\alpha_2\beta_2$)所組成。其他常見血紅素組成有：如由轉譯後修飾的 HbA_{1c} ，其在糖尿病患者身上發現含量高於正常人含量 2 - 4 倍；而 HbS 在鐮刀型紅血球患者及 HbA_2 和 HbF 在地中海貧血患者之血液中含有量相對也較高，故測紅血球細胞內不同蛋白質的含量為臨床血液檢驗的重要指標之一。利用在毛細管內打破單個紅血球細胞，並藉由界面活性劑(sodium dodecyl sulfate, SDS)使血紅素($\alpha_2\beta_2$)變性(denature)而解離成四個單體後，用 CZE 分離並在激發波長 $275\ \text{nm}$ 下做偵測⁽³⁰⁾。結果發現此一方法可分析出一正常成人單一紅血球內血紅素所含的 4 個不同胜鏈(polypeptide chains)，其中糖化的 α 和 β 胜鏈所佔的比例只有 4.8% 和 9.6%。相較之下，糖尿病患者單一紅血球細胞的糖化 α 和 β 胜鏈所佔的比例高達 12% 和 30%。另外利用等電聚焦電泳來研究單一紅血球細胞⁽³¹⁾，可得到更好的解析度和靈敏度，故可分析正常和具鐮刀型血球之成人和嬰兒單紅血球細胞中 HbA_0 、 HbA_{1c} 、 HbS 與

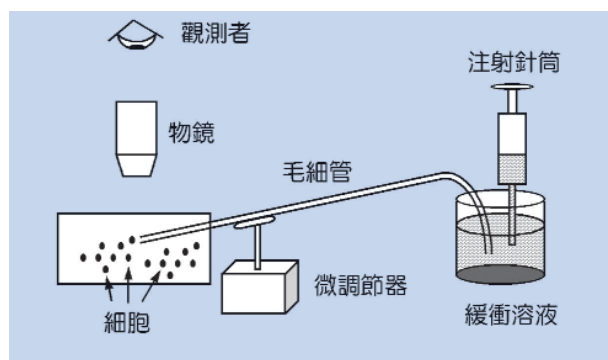


圖 4. 單細胞注射裝置示意圖。

HbF 的含量。

2. 胰臟細胞內胰島素的含量

胰島素是由胰臟所分泌的一種賀爾蒙，其主要功能是在調解葡萄糖的代謝。當血中葡萄糖濃度上升時會刺激胰臟 β 細胞分泌胰島素，胰島素藉由血液循環到達肝臟而將葡萄糖轉換成肝糖，以維持血液中正常的葡萄糖含量。缺乏胰島素不僅會使血液中葡萄糖濃度不正常，而且也會引起整個內分泌的失調。一般而言，糖尿病患者就是因胰島 β 細胞本身的胰島素或是其分泌出的胰島素不足所導致。進行胰臟 β 細胞分析時，利用內壁經聚環氧乙烷修飾之毛細管，不僅可防止胰島素的吸附，更可降低電滲流及其不穩定度。降低電滲流的最大好處是因在電場的作用下其它陰離子移動方向和胰島素相反，故可降低偵測時的干擾⁽³²⁾，因而可得較好的偵測極限 (73 amol)。分析單細胞時，先將細胞引進毛細管後再利用 0.05% SDS 打破，於電場下進行分離，並利用氫離子雷射 (波長為 275 nm) 來激發分析物，可成功測得 RINm5F 和 β TC3 等單細胞內胰島素的含量。另一研究為在毛細管柱內打入一小段洋地黃 (digitonin)，因其可將細胞壁的膽固醇溶解掉並使細胞壁產生孔洞，以促進含有胰島素的微粒子通過並釋放出胰島素，經施予電場或用壓力方式將釋放出胰島素移往毛細管的另一端進行分析，最後再施予較高電壓將細胞打破並分析剩餘的胰島素含量。故利用此法可同時分析單細胞內 β 胰島素釋放的量，並進而得到相關藥物動力學 (pharmacokinetics) 的訊息⁽³³⁾。

3. 測乳酸去氫同素在單淋巴球細胞的含量

乳酸去氫是一種診斷疾病上的重要生物指標 (biomarker) 之一，如肝病和心肌梗塞等都和 LDH 的含量有密切關係，而 LDH 的活性和其同素 (isoenzyme) 的比例也和一些癌症有關，LDH 的同素共可分為 LDH-1、LDH-2、LDH-3、LDH-4、LDH-5 五種，其含量之多寡與組織來源或病變有關，如有些癌症患者其淋巴液裡的 LDH-2 的活性會比一般正常人還要高，而白血病患者之大部分 LDH 活性皆較正常人為低，但 LDH-4 相對活性會

較高，故其 LDH-4/LDH-2 的比率也較正常人為高。利用臺斯拉變壓器 (Tesla coil) 將淋巴球細胞在毛細管柱內打破，並分離偵測出五個 LDH 的同素⁽²²⁾。另用此技術來分析正常淋巴球單細胞和不正常 B 型、T 型淋巴胚白血病細胞時，結果發現不正常 B 型、T 型淋巴胚白血病細胞 LDH-4/LDH-2 的比率分別高於正常淋巴球細胞 73% 和 43%。

四、單分子

微量分析可減少樣品的消耗，並使一些微量存在的樣品有可能被偵測到，如存在人體中一些微量但重要的酵素或蛋白質 (如 alkaline phosphatase, AP) 等。此外，微量分析的另一個目的是使偵測單一分子成為可能。以往的分析方法所測得的是樣品整體的平均結果，但不可否認的，樣品中的每個樣品均可視為獨立的個體，彼此之間所展現的行為均有其差異，故整體性的分析方法所得的結果僅是全部樣品的平均行為，並無法將不同分子間的特異性展現出來。對一般有機或無機分子，單一分子所展現的特性和全體平均差異並不大，但對生物分子來說，不同分子間可能由於結構上一點小差距而使其顯現出全然不同的化學或物理特性，故單分子的偵測在生物分子上的應用特別重要。尤其應用在疾病的檢測方面，對於發病初期的病患來說，身上可能只有少數幾個細胞產生變異，若以一般的方法檢測並沒辦法檢測出其變異性，因此單分子偵測技術的開發必將有助於疾病的初期診斷。另外，單分子偵測亦有助於細胞和細胞間之作用、蛋白質產生之機制等的探討。

單分子偵測是一種需要極高靈敏度的分析方法，常用的有電化學及螢光，在此處我們只討論螢光方法的應用。螢光的基本原理是利用激發光源將樣品的基態電子激發到激發態，電子經歷振動鬆弛後，再從激發態以光的形式釋放能量回到基態，形成一個循環，此時放出的光就是螢光，其再生期 (lifetime) 極短 (10^{-5} - 10^{-8} 秒)，遠比一般儀器處理一次訊號的時間短，所以在偵測器收集並處理一次訊號的時間中，通常可釋放出 10^5 到 10^6 次螢光^(34,35)，故偵測螢光是極靈敏的一種方法，即使是偵

測單分子也能收集到數量夠大的螢光訊號。利用螢光偵測單分子有兩種不同的方式。第一種是以雷射等激發光源激發樣品，直接偵測單分子所放射出的螢光。第二種則是間接偵測法，此方法通常會經過一系列的催化反應，以我們有興趣的單分子為催化劑，將原本無螢光的受質催化成有螢光的產物，再測此產物的螢光⁽³⁶⁾，藉此得知單分子的訊息。通常第二種方法是我們較有興趣的方法，因為這方法不僅能偵測單分子，更能進一步得知單分子的活性。例如，相同的一種酵素假如其構形不一樣，催化的速率也會因此而不同，但若欲得知其差別，則須利用可偵測單分子能力之偵測器方能得知。

為了能偵測到單分子，背景訊號必須降至最低，這可由光解雜質或經由樣品前處理等方式，或由設計僅可觀測微小體積之偵測器得到，一般是用共聚焦方式來達此目的。另外，產生夠大的訊號及使用靈敏度高的偵測器亦是必備的。一般而言，為能偵測單分子，偵測器必須能捕捉微量的樣品體積 (nL 或更小) 及微小濃度 (通常小於 fM)。最先開始單生物分子研究可追溯到六十年代初期，Rothman 以微滴來進行研究⁽³⁷⁾，將極稀的半乳糖苷酶 (galactosidase) 溶液噴灑成 μm 大小的液滴，經過一段時間的催化後產生一定數目的螢光產物，測這些產物的螢光大小可得知每個液滴中半乳糖苷酶的小。另外近年來是以毛細管或微小化的反應槽 (microwells, 大小約在 pL 左右) 來進行單分子研究。偵測器方面，光學偵測器如光電倍增管、增強電荷耦合元件 (intensified charge-coupled device, ICCD) 或是電荷耦合元件 (charge-coupled device, CCD) 是最常用的偵測器⁽³⁸⁾。ICCD 或 CCD 除了能像一般的光學偵測器捕捉光子訊號外，最大的特點是它的偵測範圍可同時涵蓋一整個平面，並可對平面上的每個點進行分析，因此當以微小化的反應槽進行單分子實驗，ICCD 恰可以對每個反應槽內的樣品進行分析，其儀器裝置如圖 5 所示。以下介紹螢光在數種單分子偵測方面的應用。

1. 酵素

酵素是蛋白質的一種，是生物體內進行催化的重要物質。在酵素研究中，獲得活性或動力學常數

等方面資料常是重要的⁽³⁹⁾。一般在酵素偵測時，並非直接測其螢光，而是利用酵素將無螢光的受質催化成有螢光訊號的產物，藉由偵測此產物來得知酵素的催化速率。Yeung 等人⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ 利用偵測螢光來得知 LDH-1 的活性及其動力學常數。他們將極稀的 LDH-1 溶液與含有濃度較高的 NAD^+ 及乳酸鹽 (lactate) 溶液注射到毛細管中進行一個小時的反應，每個 LDH-1 分子會將其附近的 NAD^+ 催化成 NADH，待反應完成後以電泳將 NADH 帶到偵測器偵測，因 NADH 螢光訊號的大小與其濃度有關，而其濃度又取決於 LDH-1 的活性，故由螢光變化，便可得知 LDH-1 的活性大小及其動力學常數。在此研究中，不同 LDH-1 分子的活性分佈非但不是呈現一個高斯分佈，甚且活性大小可差到四倍以上。後來更利用微小化的反應槽進行此實驗⁽⁴¹⁾，利用 CCD 進行即時偵測，分別測其反應初期的反應速率及三十分鐘後的平均反應速率，藉由分別觀察每個反應槽的變化，便可得知不同分子間的差異。

Dovich⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ 等人則是利用毛細管進行 alkaline phosphatase (AP) 的單分子研究。AP 是一種可從細菌萃取的鹼性磷酸酶，可把化合物中的磷酸根給切斷。此研究是以 AttoPhos, 2'-((2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole phosphate 作為受質，AP 會把 AttoPhos 上的磷酸根所切斷，所得的產物在氫離子雷射激發下，會產生螢光，故可在不同催化時間及不同催化溫度下，用 CE 來探討不同 AP 分子的活

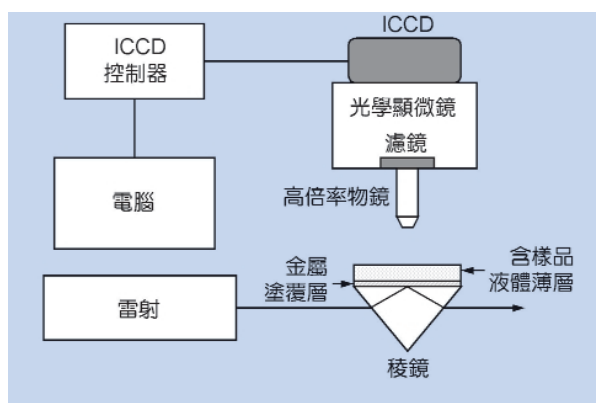


圖 5. ICCD 光學顯微鏡的單分子偵測裝置示意圖。

性及活化能的分佈。由結果可得知這種分佈同樣是非高斯分佈，不同的 AP 分子活性大小可差到十倍，而活化能可差到兩倍左右。其次比較純化和未經純化之 AP 的活性差別，進而推測出這種差距應是由於各種 glycosylation 及 post-translational modification 造成結構上的差異所造成的。

2. DNA

目前 DNA 的研究包含序列分析、點突變偵測及 PCR 產物偵測等。以近年來熱門的基因解碼為例，首要工作便是將 DNA 的鹼基序列分析出來。在八零年代末期，Keller 等人⁽⁴⁶⁾ 便將單分子偵測應用到 DNA 定序方面。由於 DNA 本身的螢光性質不強，故通常會先將 DNA 以螢光物質標記，測此螢光物質的訊號可得知 DNA 的存在。在此研究中，欲分析的 DNA 片段以 Sanger 法合成，不同的是在合成的過程中所用的四種 dNTP 分別接上四種不同的螢光染劑，所以在複製出的片段上每個鹼基皆含有染劑，等複製完後再將 DNA 片段的一端接上微小的圓球 (microbead) 上，圓球則被固定在一個流動的緩衝溶液系統中，並在緩衝溶液中加入一種能將 DNA 片段開股及鹼基一個個切斷的酵素 exonuclease enzyme，如此從未接圓球的一端開始，接上染劑的鹼基依序被切斷並被緩衝溶液帶到偵測區，以雷射激發再以偵測器偵測其螢光，如此便可將 DNA 片段定序。Shera 及 Mathies^(47,48) 則利用嵌合染劑結合 DNA 片段的方法，以 CE-LIF 進行單一 DNA 片段的偵測。由於 DNA 的突變會造成如癌症等疾病，故如能應用單分子偵測的技術，便有可能在發病初期即將僅有的少數突變給偵測出來，而對病人及早進行治療。另外，Yeung 等人利用單分子偵測方法來研究單分子 DNA 於電場中移動⁽⁴⁹⁾ 的模式，進而對於用高分子溶液或凝膠分離 DNA 提出更深入的直接證據及理論。

五、總結

雖於本文中，我們並未對 CE-LIF 做全面性介紹，如在環境化學中有毒物質之分析等，但由文中所介紹的一些實例，吾人便可對 CE-LIF 的優異及

重要性略知一二。在往後幾年中，由於人們對於快速藥物篩選、疾病早期偵測、深入探討生命訊息 (如 DNA 和蛋白質、蛋白質和蛋白質、神經細胞訊息之轉換等) 皆有強烈使命感，因此 CE-LIF 亦將扮演極重要之角色。尤其是可進行高通量分析之多重性系統或晶片電泳技術之開發與應用將更形重要。另外，結合二維超小型平板凝膠電泳、CE-LIF 及質譜等自動化技術將是生物分析技術亟需突破的重要課題之一。

參考文獻

1. H. T. Chang and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. B*, **669**, 113 (1995).
2. H. S. Chen and H. T. Chang, *Electrophoresis*, **19**, 3149 (1998).
3. H. S. Chen and H. T. Chang, *Anal. Chem.*, **71**, 2033 (1999).
4. H. S. Chen and H. T. Chang, *J. Chromatogr. A*, 853, 337 (1999).
5. M. F. Huang and H. T. Chang, *Instrumental Science & Technology*, **28**, 387 (2000).
6. X. C. Li-Sucholeiki, K. Khrapko, P. C. Andre, L. A. Marcelino, B. L. Karger, and W. G. Thilly, *Electrophoresis*, **20**, 1224 (1999).
7. J. Ren and P. M. Ueland, *Hum. Mutat.*, **13**, 458 (1999).
8. J. Ren, A. Ulvik, H. Refsum, and P. M. Ueland, *Clin. Chem.*, **44**, 2108 (1998).
9. A. Ulvik, J. Ren, H. Refsum, and P. M. Ueland, *Clin. Chem.*, **44**, 264 (1998).
10. P. C. Simpson, D. Roach, A. T. Woolley, T. Thorsen, R. Johnson, G. F. Sensabaugh, and R. A. Mathies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2256 (1998).
11. A. Doglio, C. Laffont, S. Thyss, and J. C. Lefebvre, *Res. Virol.*, **149**, 219 (1998).
12. H. Wenz, J. M. Robertson, S. Menchen, F. Oaks, D. M. Demorest, D. Scheiber, B. B. Rosenblum, C. Wike, D. A. Gilbert, and J. W. Efcavitch, *Genome Res.*, **8**, 69 (1998).
13. L. Sacchetti, G. Calcagno, I. Coto, N. Tinto, E. Vuttariello, and F. Salvatore, *Clin. Chem.*, **45**, 178 (1999).
14. I. Kheterpal and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **71**, 31A (1999).
15. T. M. Sunada and H. W. Blanch, *Electrophoresis*, **18**, 2243 (1997).
16. N. J. Dovichi, *Electrophoresis*, **18**, 2393 (1997).
17. X. Gong and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. B*, **741**, 15 (2000).
18. H. H. Heegaard, S. Nilsson, and N. A. Guzman, *J. Chromatogr. B*, **715**, 29 (1998).
19. G. Rippel, H. orstjens, H. A. H. Billet, and J. Frank, *Electrophoresis*, **18**, 2175 (1997).
20. B. L. Legendre Jr, D. L. Moberg, D. L. Williams, and S. A. Soper, *J. Chromatogr. A*, **779**, 185 (1997).

21. T. Li and R. T. Kennedy, *Anal. Chem.*, **68**, 3899 (1996).
22. Q. Xue and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. A*, **677**, 233 (1996).
23. H. P. Bietlot and M. Girard, *J. Chromatogr. A*, **759**, 177 (1997).
24. T. K. Jorgensen, L. H. Bagger, J. Christiansen, G. H. Johnsen, J. R. Aarbak, L. Jorgensen, and B. S. Welinder, *J. Chromatogr. A*, **817**, 205 (1998).
25. W. L. Tseng, T. C. Chiu, J. M. Weng, and H. T. Chang, *J. Liq. Chromatogr. & Related Technologies*, Submit.
26. J. B. Chein, R. A. Wallingford, and A. G. Ewing, *J. Neurochem.*, **54**, 633 (1990).
27. J. A. Jankowski, S. Tracht, and J. V. Sweedler, *Trends Anal. Chem.*, **14**, 170 (1995).
28. S. A. Hofstadler, F. D. Swanek, D. C. Gale, A. G. Ewing, and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **67**, 1477 (1995).
29. H. T. Chang and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **67**, 1079 (1995).
30. S. J. Lillard, E. S. Yeung, R. M. A. Lautamo, and D. T. Mao, *J. Chromatogr. A*, **718**, 597 (1995).
31. S. J. Lillard and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. B*, **687**, 363 (1996).
32. W. Tong and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. B*, **685**, 35 (1996).
33. W. Tong and E. S. Yeung, *J. Chromatogr. B*, **689**, 321 (1997).
34. M. D. Barnes, W. B. Whitten, and J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, **67**, 418A (1995).
35. J. K. Trautman, J. J. Macklin, L. E. Brus, and E. Betzig, *Nature*, **369**, 40 (1994).
36. X. S. Xie and H. P. Lu, *J. Biol. Chem.*, **274**, 15967 (1999).
37. B. Rotman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1081 (1961).
38. S. Nie and R. N. Zare, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 567 (1997).
39. P. H. Lu, L. Xun, and S. Xie, *Science*, **282**, 1877 (1998).
40. Q. Xue and E. S. Yeung, *Nature*, **274**, 681 (1995).
41. W. Tan and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **69**, 4242 (1997).
42. X. H. Xu and E. S. Yeung, *Science*, **181**, 1650 (1998).
43. D. B. Craig, E. A. Arriaga, J. C. Y. Wong, H. Lu, and N. J. Dovichi, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5245 (1996).
44. D. B. Craig and N. J. Dovichi, *Can. J. Chem.*, **76**, 623 (1998).
45. R. Polakowski, D. B. Craig, A. Skelly, and N. J. Dovichi, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4853 (2000).
46. J. Jett, R. A. Keller, J. C. Martin, B. L. Marrone, and R. K. Moyzis, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **7**, 301 (1989).
47. A. Castro, F. R. Fairfield, and E. B. Shera, *Anal. Chem.*, **65**, 849 (1993).
48. B. B. Haab and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **67**, 3253 (1995).
49. R. Michael, W. H. Huang, and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **72**, 2879 (2000).