

核酸分離、純化及高效率變異篩選分析

核酸變異的研究與大量基因多樣性的發現、篩選等分析，在近年來已經繼人類基因組計畫之後，成為生命科學研究的顯學，如何取得兼顧快速、便宜、自動化、靈敏度高以及操作簡便的高效率分析技術，似乎已經成為基礎生命科學研究尋求重大突破的關鍵之一。本文介紹的 DHPLC 核酸片段分離、純化技術，可以充分滿足上述嚴苛的分析需求，並且可以成功地檢測出核酸片段單一鹽基的變異。對於遺傳疾病風險因素的探討、人類族群遷徙以及基因藥理學診斷等領域，將可提供高效率、低成本的服務。針對國內目前正積極推廣、開發的生技產業與基礎生命科學研究而言，DHPLC 將成為不可或缺的分析工具。

周泳杉、李德仁

一、前言

核酸 (nucleic acid) 是生命科學研究中重要的課題與工具，在基礎的基因研究上，DNA 序列變異 (variation) 的分析是相當重要的工作，為了在短時間內擴大認識人類或其他生物基因體一級結構的變異，許多人投入研發更先進的 DNA 變異偵測技術，以期達到兼顧靈敏、效率且便宜的要求。過去許多 DNA 分析及突變偵測的方法，都是基於凝膠電泳 (gel electrophoresis) 技術而發展出來，有些方

法沒有自動化操作平台，執行起來相當曠日費時，例如：變性梯度凝膠電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis) 及化學切割法 (chemical cleavage) 等；有的則是因為靈敏度不足，例如：構型敏感性梯度凝膠電泳 (conformation sensitivity gel electrophoresis) 而無法普遍被使用；其他像免疫核酸雜交陣列 (immobilized DNA hybridization arrays) 以及酵素未配對切割 (enzymatic mismatch cleavage) 等分析，雖然保證了高的檢測準確性，但仍有一些失敗的陽性反應，而且每個分析都相當昂貴⁽¹⁾。

從具體可行的觀點來考量，最理想的核酸變異分析技術必須兼具高的檢測靈敏度、短的分析時間、低的分析成本，並且具備自動化平台擴充潛力的高效率方法。更理想的是經過聚合鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 放大後的核酸樣品

周泳杉先生為國立陽明大學生物化學研究所碩士，現任美商亞洲瓦里安科技股份有限公司行銷應用工程師。
李德仁先生為英國威爾斯大學化學博士，現任美商亞洲瓦里安科技股份有限公司大中華區域行銷總監。



圖 1.
DHPLC 系統外觀圖。

可以直接上樣、不需對 PCR 引子 (primers) 作任何修飾、不需特殊試劑配置、不需任何標定，或者再執行任何 PCR 以外的樣品前處理。本文即是針對上述的分析需求，介紹一種名為 DHPLC (如圖 1 所示) 的液相層析技術在快速核酸變異篩選領域的發展與應用。

二、DHPLC 簡介

所謂的 DHPLC 指的就是「DNA 變異分析儀 (denaturing high performance liquid chromatography)」，這個技術最初是美國 Stanford 大學 Oefner 和 Underhill 博士開發出來的^(2,3)，並且已經有商品化的系統問世。其主要的特徵是，該系統可以擴充自動化控制平台，相當靈敏地偵測到核酸片段單一鹽基 (base) 的取代 (substitution)，並且可以對小片段的插入 (insertion)、缺失 (deletion) 等進行快速分析，平均分離 50 到 700 鹽基對 (base pair, bp) 大約只需 7 分鐘的時間，與傳統以凝膠電泳為基礎的各項技術相比，DHPLC 不但大大地縮短分析時間，就連個別樣品的分析成本也節省許多。

由於 DHPLC 可以相當快速且靈敏地揭示核酸序列中鹽基變異的存在，因此，在個別物種基因序列的比較以及單核苷酸多態性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的研究上，DHPLC 的確提供了相當便宜且有效率的途徑。所謂的 SNP 是指 DNA 序列中一個核苷酸鹽基的變異，人類基因序列的變異以 SNP 最為常見。隨著人類基因體解碼，遺傳學家正積極思考後基因體世代 (post-genome era) 應該朝那個方向努力，一般咸認為人類基因序列的變異分析，即是其中相當明確的方向之一，藉此不但可以探討疾病遺傳的風險因素，也可以針對人類族群遷徙等問題展開更為深入的研究。隨著對 SNPs 概況的識別和瞭解的增加，亦可以幫助基因藥理學 (pharmacogenomics) 領域鑑別出影響藥物代謝的 SNPs，並且針對該 DNA 層次上每個人「體質」的差異化擬定個人化藥物治療服務，進而提高疾病的診斷和治療的效率。對於遺傳學家和分子臨床診斷而言，將變異的片段定序 (sequencing) 出來的必要性其實不大，反而是像 DHPLC 能夠提供快速、便宜而又靈敏的篩選，才是比較有用的方法。

三、DHPLC 核酸分離原理

DHPLC 是利用離子配對逆相層析 (ion-pair reversed-phase liquid chromatography) 原理 (簡稱 IPRP) 來分離核酸⁽⁴⁾，其原理是使用離子對試劑 TEAA (triethyl-ammonium acetate) 與 DNA 表面形成離子對，此時流動相中帶正電的 triethylammonium ion 會將表面帶負電的 DNA 分子包覆 (如圖 2 所示)，並以非極性的烷基端吸附在非極性固定相上 (分離管柱固定相的材質為一般為 3.5 μm 寬孔徑 alkylated 矽膠基質) 與水溶性流動相的介面之間，其吸附的強度被很多因素所決定，例如：疏水性的充填管柱材質、電荷多寡、配對離子的濃度、離子張力、溫度以及移動相的介電常數 (dielectric constant) 等。

雙股 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 在管柱中的滯流，主要決定於吸附在靜相、帶正電的 triethylammonium ion 與帶有負電磷酸基團 DNA 之間的靜電力，因此 dsDNA 鏈長越長，其在管柱的滯流時間也就越長。再者，增加流動相中 acetonitrile 的濃度，周圍帶負電親水性的 acetate 會將 dsDNA 分子置換掉，令之與 triethylammonium ion 脫附，造成 dsDNA 分子被流析出來，這個現象與陰離子交換 (anion-exchange) 層析頗為類似^(5,6)。基

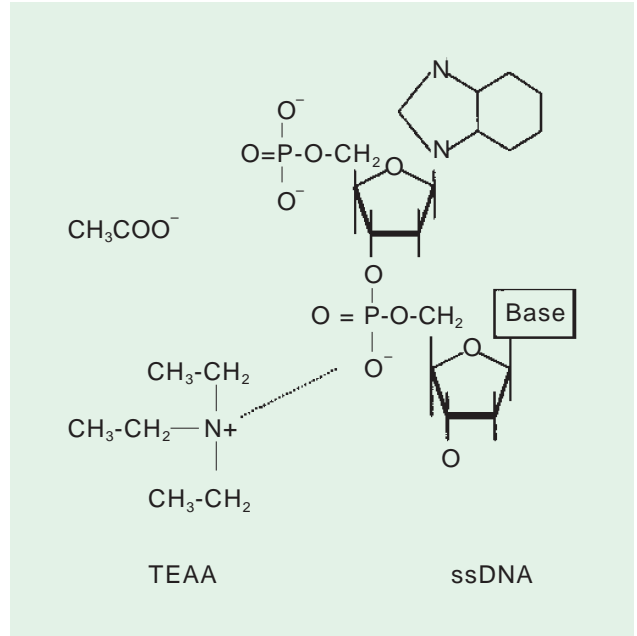
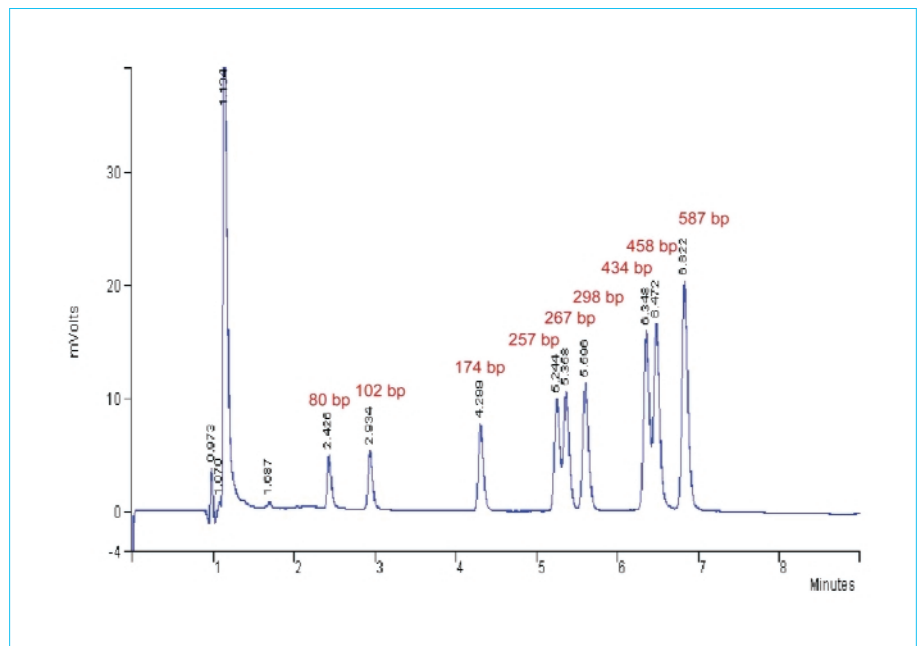


圖 2. TEAA 離子配對劑與 DNA 表面之交互作用。

於上述原理，dsDNA 片段在層析管柱 (column) 中的分離將決定於尺寸的大小 (size dependent) 而非決定於序列的組成，這一點和核酸片段在凝膠電泳中的行為一致。圖 3 顯示以 HaeIII 限制 剪切 pUC18 質體 (plasmid) DNA，得到的 dsDNA 限制 剪切片段之層析圖譜，圖中清楚顯示在非變性

圖 3. 非變性條件下 DHPLC 依尺寸分離 dsDNA 限制 剪切片段的高解析度分離圖譜。



(non-denaturing) 條件下 DHPLC 依尺寸分離 dsDNA 的高解析度結果。

四、dsDNA 在升溫管柱中的行為

在 DHPLC 的發展中，除了非變性條件的探討之外，在局部變性 (partial denaturing) 或完全變性的條件下，dsDNA 分子在加溫分離管柱中的行為，亦有相當值得關注之處，在變性溫度條件之下 DHPLC 可以靈敏地檢測到一帶有單一鹽基錯配 (mismatch) 的短核酸合成片段。以圖 4 為例：a 顯示在 50 °C 時具有單一 C/A 鹽基錯配的 43 bp DNA 片段，因單一鹽基錯配導致的結構不穩定，致使該片段在 50 °C 時完全變性，產生了兩段互補的單股 DNA 片段，並精確地在層析圖譜中展現出兩支吸收峰；而相同片段在 40 °C，未變性條件下則是以單支吸收峰流析出來 (圖 4b)；取無錯配的相同片段在 50

下進行實驗，因配對完整、結構穩定所以在該溫度下 dsDNA 並未變性，其結果與 40 °C 時相同的 (圖 4c)，只是滯留時間 (retention time) 提前了一點。然而有趣的是，因溫度增加所造成吸收峰滯留時間的減少效應並不大，反而是單股 DNA 分子表現出顯著的流析時間下降⁽⁷⁾。

另外值得注意的是，當溫度超過 53 °C 時，DNA 分子限制片段依尺寸而分離的特性將會消失。圖 5 顯示 DNA 片段在不同溫度下並非一致性地改變其在層析圖譜上的滯留時間，其改變的特性與 DNA 片段上所具有的 A-T 鹽基對百分比有關，由於鹽基配對時 A-T 間僅具有兩支氫鍵，相較於 G-C 對間的三支氫鍵，其結合力當然較不穩定，因此對於 A-T 鹽基對比例高的 DNA 片段在較低溫度下即會發生變性，相同地 A-T 鹽基對比例越高的 DNA 片段 (如圖 5 所示之出峰 4、5、8、9)，因溫度上升而降低其滯留時間的效應也就越為顯著。隨溫度上升所造成的滯留時間下降幅度的大小，亦可以作為 DNA 片段當中 A-T 鹽基對分佈的指標，亦即在 A-T 鹽基對的群集處會形成低熔解溫度 (low-melting temperature) 區域，造成 DNA 分子變性的擴大^(8,9)。

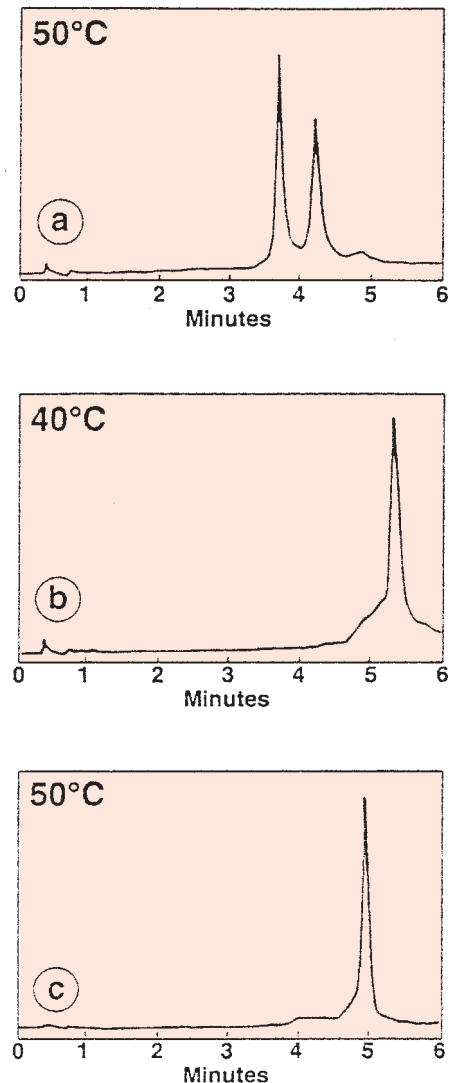


圖 4. (a) 50 °C 下 CA 錯配 43 bp dsDNA 完全變性之層析圖譜，(b) 40 °C 非變性條件層析圖譜，(c) 無錯配樣品在 50 °C 下之層析圖譜。

五、DNA 變異的檢測

如同上面提及的在 IPRP 層析下，具有鹽基的錯配 DNA 雙股螺旋會比完全配對的雙股螺旋不穩定，再者，即使是 DNA 分子部份區域的局部變性，都會導致顯著的滯留時間下降；這些現象引發了一連串的實驗致使 DHPLC 系統被發明出來。如果取只有單一鹽基對變異而其他序列均相同的兩個 DNA 選殖 (clone) 系進行 PCR，其產物各取等莫耳比例混合、變性、復性 (renatured)，如圖 6 所示，

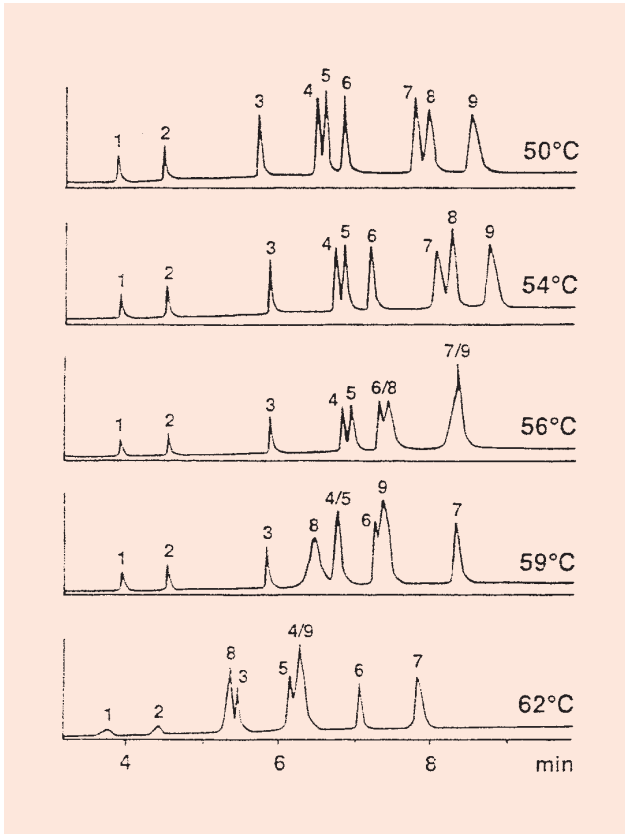


圖 5. 隨溫度上升 DNA 分子依尺寸而分離的特性消失；1 = 80 bp (41% A-T)；2 = 102 bp (45%)；3 = 174 (41%)；4 = 257 bp (49%)；5 = 267 bp (49%)；6 = 298 bp (41%)；7 = 434 bp (42%)；8 = 458 bp (57%)；9 = 587 bp (57%)。

會產生兩大類共四種 DNA 分子，其中兩種是具有完全配對序列的同質雙股螺旋 (homoduplexes)，包括 25% 的意義股 (sense strand) 和 25% 的反意股 (anti-sense strand)，另外兩種是具有單一鹽基錯配的異質雙股螺旋 (heteroduplexes)，相同的其意義股和反意股的比例亦各佔 25%。若在增溫管柱下進行分析，在未達到該 DNA 分子的熔解溫度前，異質雙股螺旋與同質雙股螺旋並無法被區隔；然而更高的溫度下，層析圖顯出四支明顯的吸收峰，這顯示了在這個 DNA 的樣品當中存在著上述四個物種，如圖 7 所示，異質雙股螺旋總是在同質雙股螺旋前被流析出來，由這四種物種流析出來的順序，同時可以判定不同 DNA 物種其結構的穩定程度。

將上述四種 DNA 物種依熱穩定性作排列，對同質雙股螺旋而言，A-T 配對的滯留時間一定比 G-C 配對短，如果將這兩者分別進樣，再將兩者混合進樣，其滯留時間會與圖 7 所顯示的一致。然而對異質雙股螺旋而言，G-T 異質雙股螺旋在典型 B 型 Watson-Crick 雙股螺旋結構中，G-T 之間會產生兩支氫鍵，所以其穩定性較 A-C 來得大，因此 G-T 異質雙股螺旋的滯留時間比 A-C 長。有關於異質雙股螺旋的結構，已由 NMR 和 X 光結晶研究中得到證實⁽¹⁰⁾。

不同錯配在特定溫度下，對核酸分子的結構將產生不同程度的去穩定性 (destabilization)，然而不同錯配所產生的層析圖譜並非是獨特的。過去 O'Donovan 等人⁽¹¹⁾ 曾經分析 Factor IX 基因 H 外顯子 (exon) 438bp 的 PCR 產物，他們一共選殖了 39

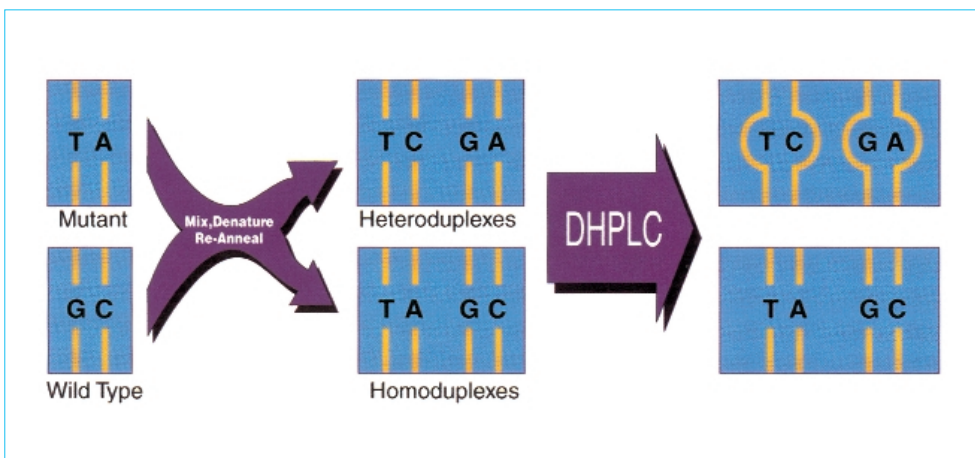


圖 6. 兩序列相同的 DNA 選殖系進行 PCR 後產物各取等莫耳比例混合、變性、復性，產生四種 DNA 雙股螺旋物種，兩種是同質雙股螺旋和兩種異質雙股螺旋。

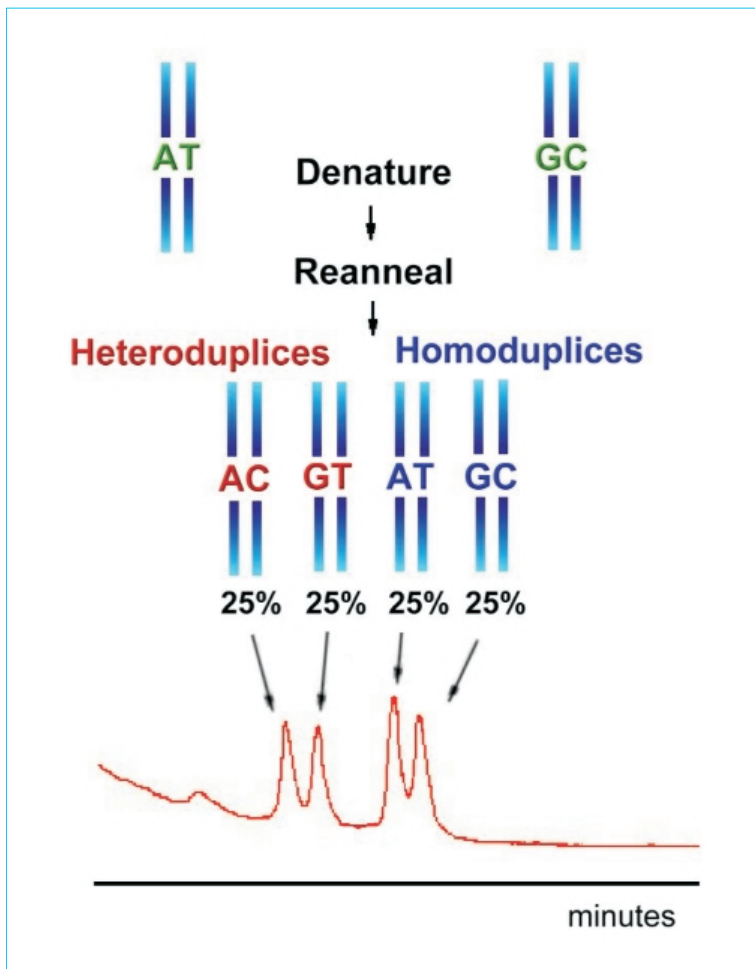


圖 7.
56 °C 時，層析圖出顯了四支明顯的吸收峰，分別是兩種異質雙股螺旋與兩種同質雙股螺旋。

個突變株，但是只得到 13 種不同模式的層析圖譜 (如圖 8 所示)。有趣的是，在相同核酸位置產生的不同突變時，總是展現出不一樣的層析圖；反而是在相同熔解區域 (melting domain) 所產生的突變，會展現出類似的層析圖譜。因此相當重要的是 DHPLC 系統對任何特定的錯配並沒有任何偏好，它可以成功地偵測所有可能的單一鹽基錯配，或是因短的寡核苷酸插入、缺失等所造成長度變異的核酸片段。

六、TEAA 濃度和 pH 值效應對異質雙股螺旋檢測的影響

圖 9 分別顯示了在濃度 100 mM 和 200 mM 的 TEAA 下，系列溫度所得到的層析圖⁽⁷⁾，圖中證實了當 TEAA 濃度增加一倍時，為了得到足夠的變

性結果以分開同質與異質雙股螺旋，管柱溫度必須增加 4 - 4.5 °C。觀察 DNA 限制 片段變性溫度的飄移，每增加 50 mM 的 TEAA 濃度，其熔解溫度就提高約 2 °C；當 TEAA 濃度超過 100 mM 時，對於改善圖譜解析度的幫助已經不大，因此 100 mM 可以說是最適當的溶劑濃度。圖 9 的例子說明了 DHPLC 系統在鑑別 A - G 錯配突變的強度約可以橫跨 5 °C 範圍。最近 Jones 等人⁽¹²⁾ 也作了類似的實驗，他們以 32 個突變株實驗的結果發現，其檢測溫度平均可以延伸到 8 °C 範圍，大約介於 4 - 11 °C。雖然如此，但仍然有相當少的突變株只在單一溫度下被檢測到，例如：BRCA1 56134 C - A 突變和 2640 C - T 突變，分別只在 59 °C 和 57 °C 時才能被檢測出來⁽¹³⁾。最近 Nickerson 等人⁽¹⁴⁾ 研究 MET proto-oncogene 外顯子 15 的三個突變株，DHPLC 分析也只在單一溫度下檢測到這些突變。

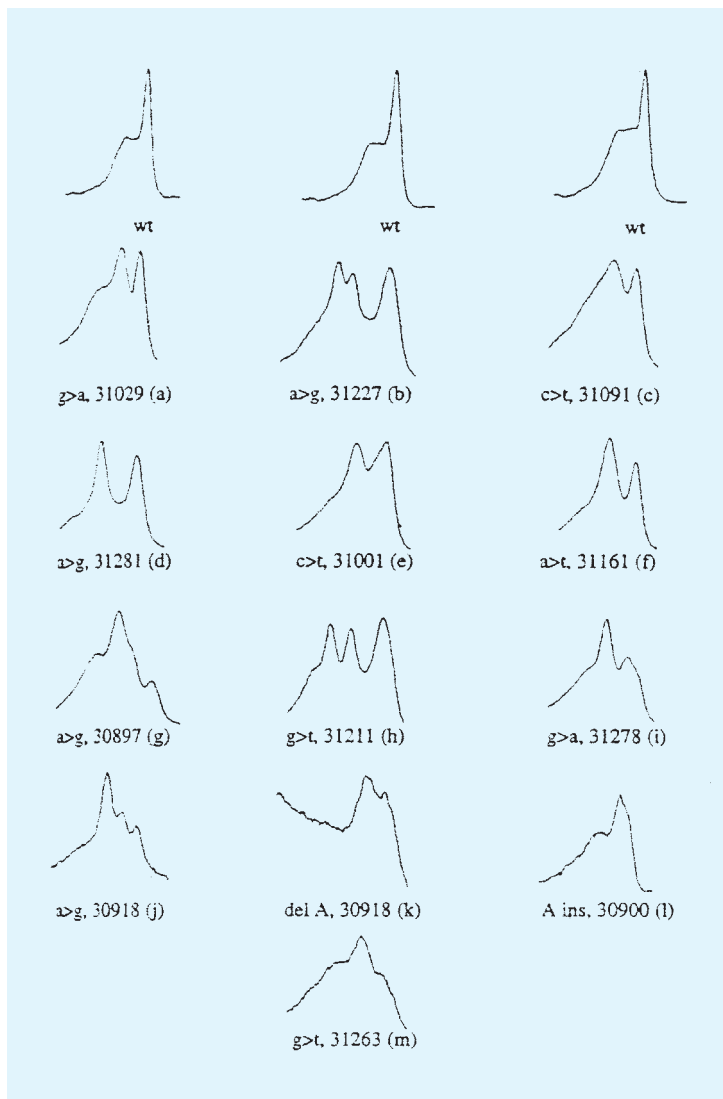


圖 8. 39 個突變株所展現的 13 種不同模式的層析圖譜。

對於 DHPLC 的分析而言，溶劑酸鹼度一般都維持在 pH 6 至 8 的範圍，在這個範圍內層析圖的表現並沒有顯著的不同，但是越酸的環境會影響 DNA 帶負電的磷酸根與帶正電的 triethylammonium ion 配對，造成未離子化 (un-ionized) 現象的增加；至於過鹼的環境則會造成 dsDNA 分子的完全變性。

七、最適分析溫度的選擇

核酸變異檢測前必須先預測分析的最適溫度，

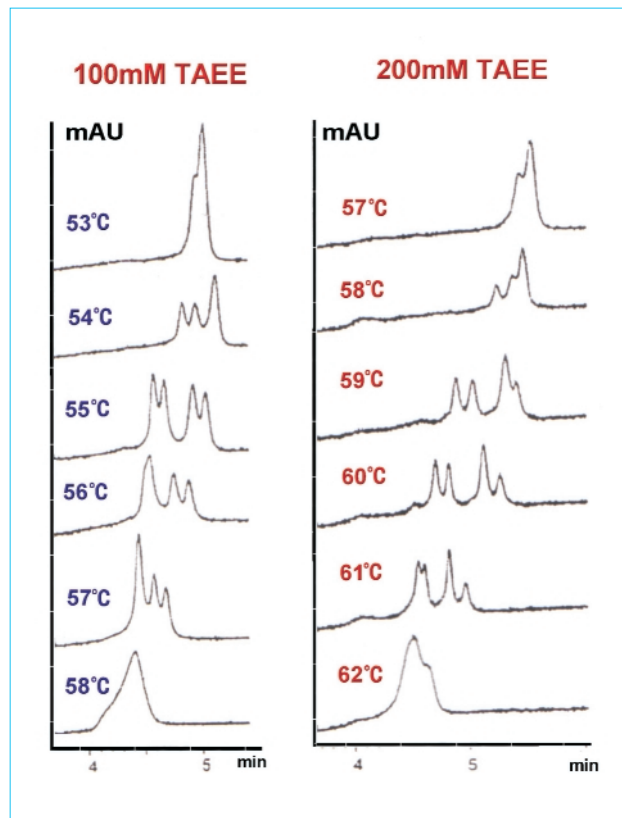


圖 9. 濃度 100 mM 和 200 mM 的 TEAA 下，系列溫度所得到的層析圖。

這一點除了憑經驗外還可以透過公式預測計算。對於極端富有 A-T 和 G-C 配對的序列來說，其最適的溫度範圍大約介於 48 - 68 °C；對於特殊 DNA 序列可透過多次重複進樣來尋找其最適分析溫度，配合每次進樣漸進式地調高或調降管柱烘箱的溫度，直到雙股螺旋產物的吸收峰滯留時間產生足夠的飄移 (約距 1 min)，在該溫度底下如果有錯配存在，則於同質雙股螺旋前面會有一或兩支多餘的吸收峰出現，至於是出現一支或兩支異質雙股螺旋吸收峰，往往決定於一些因素，例如錯配位置鄰近序列的穩定性，或是像 G-T、G-A 等非 Watson-Crick 鹽基對間所產生的氫鍵⁽¹⁵⁾，以及未配對單股 DNA 的化學特性等。在一核酸片段中如果有超過兩個錯配的位置，則異質雙股螺旋的吸收峰將超過兩支，這是因為靠近錯配位置的序列會率先形成類似氣泡 (bubble) 結構的部分變性，而且這些氣泡部位的擴大還會進一步合併成更大的氣泡，局部變性的開端常是位於低熔解溫度區域的錯配位置；甚至於在同

質雙股螺旋，若有類似氣泡結構的局部變性產生，一樣可以表現出四支吸收峰。

單憑經驗來判斷最適的分析溫度將會存在一些風險，有一些低熔解溫度的區域常被忽略，而因為這些區域的完全變性將導致突變無法被偵測到。有鑑於此在網路上提供了一個免費的網站—<http://insertion.stanford.edu/melt.html>，這個網站是由美國 Stanford 大學所提供，讓使用者可隨時上網計算、取得序列熔解溫度的建議，而欲瞭解這樣的計算規則可參考 Jones 等人⁽¹²⁾的報導。在網路上熔解溫度的預測一般會比實際狀況高 3 - 4 °C，因此在確認時可以藉由重複進樣、配合每次調降溫度以找到最適的分析條件。Spiegelman 等人⁽¹⁶⁾取了 166 種多樣性 (polymorphic) DNA 片段作研究發現，如果每一個建議溫度都作分析，則分析的靈敏度將可從 94% 提高為 99.8%，其中只有一個多樣性在建議範圍外被檢測到。有時候預測的溫度會比實際低，Jones 等人⁽¹²⁾分析 103 個突變株的盲樣，有四個就是在高於建議值 2 °C 時才被檢測到，至於為何預測的溫度會低於實際檢測溫度至今尚不甚瞭解。如果說在建議的溫度下吸收峰流析出來的時間只有稍微提早 (0.5 min)，就必須在更高的溫度下再重複作一次實驗，如果吸收峰的移動已經很大了，那麼表示已經找得適當的分析溫度。

此處有一個相當值得關注的現象，分離管柱烘箱 (oven) 的溫度調節對核酸變異的分析來說意義頗大，理論上溫度的調幅直接影響核酸變異的檢測靈敏度，越精密地溫度控制調幅將展現越精密的圖譜解析。如圖 10 揭示了 DYS271 突變株從 50 - 60 °C 序列地改變分析溫度所展現的層析圖譜，在 55 °C 到 57 °C 之間以 0.1 °C 的調幅改變分析條件，在這期間可以觀察到吸收峰解析度的微小變化，最後其最佳的解析溫度就出現在 55.2 °C；相同的例子若是以 1 °C 的調幅來改變分析溫度，則無法展現如此精密的層析圖譜，更有可能因此而造成結果的誤判，所以檢測靈敏度與管柱烘箱的溫度調幅息息相關。再者，最適溫度的選擇過程往往必須歷經一連串序列溫度的改變，因此管柱烘箱在溫度改變時所必須消耗的平衡時間因素就必須被關注，性能較差的分離管柱烘箱必須消耗較長的時間來作溫度

改變後的平衡，而過長的溫度平衡時間，常無形當中將限制了單位時間 DHPLC 所能分析的樣品數量，並增加分析成本。

溫度的效應對於 DHPLC 的分析而言既然是這麼的關鍵，因此分離管柱烘箱的校正遂變成相當重要。為確保溫度的準確度和再現性，使用者必須定期利用已經校正過的溫度探針為分離管柱烘箱作多點校正，尤其是經常使用的溫度範圍，建議每星期校正一次，特別是停電之後的再校正一定要落實。

八、PCR 品質的重要性

PCR 是相當有效率的 DNA 樣品放大反應，幾乎所有突變分析方法都必須仰賴 PCR 提供大量的樣品作為分析之用。雖然 DHPLC 不需要特殊的 PCR 引子、試劑或樣品前處理，但 DHPLC 對 PCR 產物的品質要求較高，一般與傳統核酸定序的要求相近，因此在引子的設計上就必須格外小心。為避免 PCR 產生錯誤的副產物，最好使用熱啟動 (hot-start) 模式，讓引子在較高的溫度下與模板 (template) 進行煉合 (annealing)，並注意使用適當的 Mg⁺⁺ 離子濃度，最好使用高熱穩定性、低錯誤率的 DNA 聚合 (polymerase)，而且必須忠誠地執行標準聚合 反應條件，包括適當的模板濃度及 dNTP 等。

另外有一項是常被忽略的，那就是水的品質。水不僅影響 PCR 反應，若水中鐵離子含量過多，也會直接造成分離管柱的傷害、縮短分離管柱的壽命。欲減少分離管柱中金屬離子的污染，可以重複注射 30 - 50 μ L 0.5M Na₄EDTA，以避免與 DNA 液體接觸的管路生鏽，但是這並不是斧底抽薪的方式。其實最佳 DHPLC 系統應該全機採用成本比較高的生物鈍性 (bio-inert) 材質，所有與液體接觸的部分全都必須採用 PEEK 材質或鈦 (titanium) 合金金屬，這一點是 DHPLC 系統為了保護分離管柱所必須採取的措施。

九、DHPLC 的靈敏度與專一性

近年來許多文獻都報導了 DHPLC 系統具有相

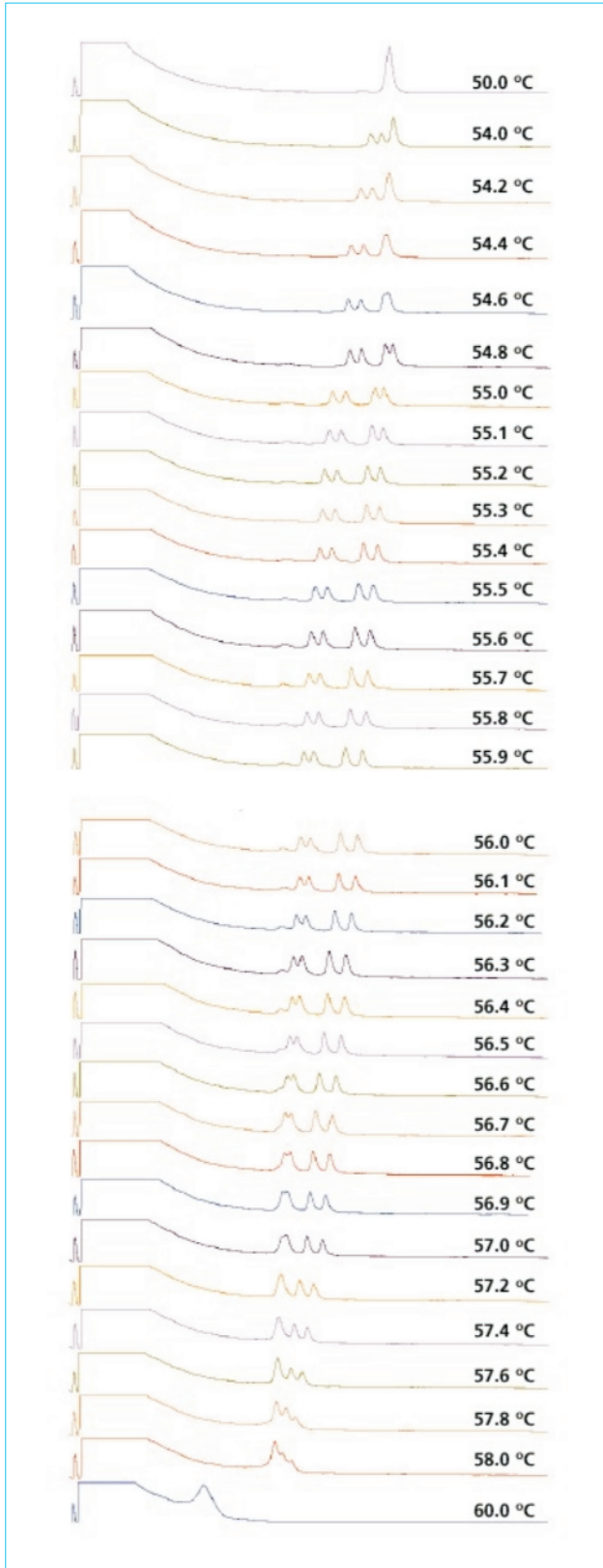


圖 10. DYS271 突變株從 50 - 60 °C 分析溫度所展現的層析圖譜，55 - 57 °C 間以 0.1 °C 的調幅改變分析條件，讓檢測更靈敏。

當優異的靈敏度與專一性，O'Donovan 等人⁽¹¹⁾ 於 1998 年發表 Factor IX 凝血基因外顯子 H 的盲樣分析結果，進而指出 DHPLC 具有 100% 的靈敏度與專一性。在美國加州分子基因與分子診斷部 (Department of Molecular Genetic and Molecular Diagnostics) 製備了 93 個 F9 基因及 17 個 NF1 基因樣品，提供給英國威爾斯醫學院生理醫學系以 DHPLC 分析，其結果不但成功地標出 55 種異形核子 (heterozygous) 中的 48 種突變 (其他 7 種是重複性樣品)，也正確地指出所有的同形核子樣品；同樣的 F9 基因若以單股構型分析法 (single strand conformation analysis, SSCA) 分析其檢測成功率只有 50%。Choy 等人⁽¹⁷⁾ 報導了 SSCA 的突變檢測能力為 69%，DHPLC 則比 SSCA 更佳，而以聚丙烯醯 (polyacrylamide) 凝膠電泳為基礎的異質雙股螺旋檢測方法 - CSGE 的檢出率只有 54%。

Skopek 等人⁽¹⁸⁾ 於 1999 年分析人類 HPRT 基因外顯子 8 的 20 個單點突變，這 20 個單點突變分佈在 279 bp 片段的任一處，而這一段基因是由一段高熔解溫度區域嵌入低熔解溫度範圍所組成；無論突變位於高或低熔解溫度區域，以 DHPLC 分析可以在 69 °C 到 65 °C 的範圍內找到所有 20 個突變；若以變性梯度凝膠電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 分析時，在高熔解溫度區域的突變株將不會被檢測到。

Wagner 等人⁽¹³⁾ 則於同年 (1999) 指出 DHPLC 的成本約只有定序的十分之一，主要是因為節省了試劑與勞力的成本；此外，DHPLC 分析亦比 DNA 晶片 (chips) 便宜。在靈敏度與專一性上，不同的序列表現在晶片探針雜交 (hybridization) 上的行為差異很大，DHPLC 在這一點上亦勝過 DNA 晶片。在單一的雜交條件下，有一些探針並不能以最佳的動力學模式去作雜交，若標記座落在這樣的序列附近就無法被分析了。Steinmetz 和 Davis⁽¹⁹⁾ 就曾指出，多數研究顯示 DNA 晶片的靈敏度約介於 85 - 95%，而專一性在某些例子中甚至低於 55%。雖然如此，以雜交為基礎的定序，在對偶基因 SNPs 的發現上仍是相當有力的工具，因為將所有標記都鑑別出來並不是相當必要的⁽¹⁾。

Arnold 等人⁽²⁰⁾ 分析 626 個 BRCA1 突變，並以核酸定序來驗證 DHPLC 的結果，發現 DHPLC 的

靈敏度與專一性均為 100%，在偵測 432 個 BRCA1 與 136 個 BRCA2 異形核子時，也只出現一個失敗的例子；若與含有已知標準品的樣品進行層析圖譜吸收峰的交替比對，甚至不需透過定序即可正確偵測出突變所在⁽²¹⁾。Wagner 等人⁽¹³⁾ 發現，在 186 個 BRCA1 和 BRCA2 突變中，只有 BRCA1 外顯子 5 的兩個突變株之層析圖譜與同形核子對照組不易區別，其原因可能是在這段特殊的片段中會形成一穩定的二級結構，此時可以用直接定序來確認。即使是少數 DHPLC 表現相似的圖譜需要以定序來確認，但整體而言 DHPLC 仍然足以節省大量的 BRCA1 基因的分析成本。

Dobosn-Stone 等人⁽²²⁾ 在 2000 年時曾發表毛細電泳為基礎的螢光單股構型分析法 (fluorescent single strand conformation analysis, F-SSCA) 與 DHPLC 檢測率之間的比較，其結果發現 DHPLC 的成功檢測率介於 93 - 100% 之間，而 F-SSCA 的成功檢測率則為 100%。然而對於 SSCA 分析而言，樣品的尺寸必須限制在 164 - 270 bp 之間，再加上 DNA 上必須標定螢光，並以固相萃取 (SPE) 純化、濃縮，最後樣品再與染料混合，因此成本遠比 DHPLC 高。總體而言，SSCA 對於 300 bp 以上的片段、或是突變位於 hairpin-like 結構中時，其成功檢測率是很低的；而 DHPLC 在 150 - 700 bp 範圍內，其成功檢測率並未有任何下降。

Liu⁽²³⁾ 等人早在 1998 年就已經分析 40 個 CFTR 和 RET 基因的突變株，並且從 63 個有害的神經膠質瘤 (glioma) 中找到 18 個新的體細胞 PTEF 基因突變，DHPLC 的成功檢出率為 95%。而 Nickerson 等人⁽¹⁴⁾ 則在 2001 年發表文獻指出，研究 RET 基因外顯子 10 時，原本有兩個突變並未找到，但在將分離管柱烘箱溫度增加 2 °C 後，就成功地檢測到這兩個突變，同樣的狀況也發生在 MET 基因外顯子 15 的三個突變上。Spiegelmen 等人⁽²⁴⁾ 分析來自兩株 *Arabidopsis thaliana* 的 476 個核酸片段，並同時以定序來確認，結果 DHPLC 在 166 個多樣性片段中檢測出 165 個，其中只有四個分析是偽陽性的。

從以上實驗可以看出來，DHPLC 的專一性平均都在 96% 以上；然而並不是所有的檢測失敗都

可以被解釋的，有一種狀況可能造成 DHPLC 檢測相當大的挑戰，那就是一段擁有極端高熔解溫度的片段，被足夠低熔解溫度 (小於 8 °C) 片段所包圍時，Hayward-Lester 等人⁽²⁵⁾ 曾經指出，如果在 PCR 當中以 7-deaza-2'-dGTP 取代 dGTP，將可以改善上述序列在 DHPLC 的檢測靈敏度。一般來說高的 GC 比例並不影響 DHPLC 的檢測靈敏度，這一點被 Escary 等人⁽²⁶⁾ 所證明，他們分析 GC 百分比平均為 66%，最高時甚至達 88% 的 NOTCH3 基因突變，結果有 97% 的 NOTCH3 突變被解析出來，其中有許多突變的層析圖譜並未展現出明顯的吸收峰增加，而只是吸收峰變寬而已，關於這樣的樣品就必須透過同形核子層析峰圖譜的比對，才能進一步作正確的判定。DHPLC 就是因此而發現兩個新的 NOTCH3 致病突變，而這兩個突變在 SSCA 及以凝膠為基礎的異質雙股螺旋分析中是沒有被檢測到的。

十、DHPLC 在單股 DNA 的應用分析

離子配對逆相高效液相層析儀 (IPRP-HPLC) 利用離子配對原理成功地在非變性條件下依尺寸分離了 dsDNA，相對於 dsDNA，有醣類磷酸骨架產生一高親水性表面，有效遮蔽了內部鹽基的疏水性，單股 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 的鹽基則是暴露在外的，因不同鹽基有不同程度的疏水性，所以 ssDNA 會因為組成的鹽基不同而造成滯留時間的差異。舉例來說：T 因為有疏水性的烷基，因此有較長的保留時間；G 具有親水性的 carbonyl 和 amino 基團，因此它的保留時間較只有 amino 基團的 A 短，而 C 因為親水性最高所以保留時間最短；因此這四種鹽基在管柱中的保留時間順序為：T > A > G > C。取一段只有 3' 端鹽基有差異，而其他序列則完全相同的 ssDNA，完全證實了以上的現象；但是如果鹽基的差異不是發生在末端，則 G 和 C 滯留時間的順序正好相反，這個現象的原因至今不明⁽²⁷⁾。

許多的研究發現，在 50 °C 以上的溫度下即可將 ssDNA 片段做適當的解析，然而當分離管柱烘箱的溫度增加時，解析度會跟著增加，一般來說

在 70 °C 即可得到相當好的解析。Oefner⁽²⁷⁾ 曾成功地 在 70 - 80 °C 之間解析短的異質寡核苷酸 (heterooligonucleotides) 片段，這些片段只有一個鹽基的差異，其 PCR 產物的大小介於 51 - 79 bp 之間。上述實驗指出了一個可行性，在鑑別對偶基因的研究裡，可以不需要在部份變性的條件下，用已知的同形核子來當作比對，而是直接以完全變性的條件來解析單一鹽基的變異。在 C T 和 A G 轉換 (transition) 及 C A、C G、T A、T G 等顛換 (transversion) 中，除了 C G 之外均可以成功地被區分出來。在最近有文獻指出，DHPLC 可以進一步與飛行時間質譜儀 (time-of-flight mass spectrometer) 結合，這樣的組合提供更多的定性資訊，可以進一步將 C G 顛換區分出來，80 寡核苷酸片段的質譜在線 (on-line) 分析已被準確地報導出來⁽²⁸⁾，同樣的概念可以被延伸到研究多重取代 (multiple substitutions) 的短核酸片段，質譜可以將這些相似的對偶基因區別開來；但是如果有兩個 A G 轉換時，MS 無法成功地區別時就必須仰賴 MS/MS 了。

十一、DHPLC 基因突變檢測與種族遷徙應用

直接定序對於比對少量基因的少數外顯子、建立基因與表現型之間的關係來說也許是有效益的，但是對於大量基因篩選時，就必須考量到成本與努力的效應。即使是基因在表現型的角色已經被建立，但是一個表現型很有可能不只受到一個基因的影響，例如遺傳性乳癌與子宮癌至少與兩個基因有關，BRCA1 和 BRCA2 是目前已被鑑別出來的兩個。Ophoff 等人⁽²⁹⁾ 早於 1996 年即以 DHPLC 篩選家族偏癱型偏頭痛 (familial hemiplegic migraine, FHM) 與家族性共濟失調併發作間期眼震 (episodic ataxia type-2, EA-2) 兩疾病有關的鈣離子通道基因：CACNA1A。在 FHM 病人中發現有四個不同的錯意 (missense) 突變，而 EA-2 病人則發現有兩個無意 (nonsense) 突變。

截至目前為止，以 DHPLC 篩選出的遺傳疾病基因突變例子已經相當的多，Xiao 和 Oefner⁽⁷⁾ 整

理了從 1997 - 2001 年間，利用 DHPLC 技術篩選的 56 種遺傳疾病基因突變，其中以 BRCA1 和 BRCA2 的報導最為廣泛，而該基因突變的研究可以說是當前 DHPLC 應用的主流，其他的像腫瘤易感性基因如：TSC1、TSC2、ATM、PTEN、SNF5、MLH1、MSH2、p53 及 p73 等的報導亦相當多。此外，DHPLC 亦檢測到 CCR5 基因促進子 (promoter) 區域四個對偶基因變異，CCR5 基因是細胞表面 chemokine 受器的基因，此受器是 HIV-1 病毒的標的，分析 AIDS 病人發現 CCR5P1/P1 有一個變異。

未重組的 Y 染色體可以用來建構種族的歷史，Y 染色體是由父親遺傳給兒子，它是父系基因的遺產，在長度約為 6 Mb 未重組的 Y 染色體上 (non-recombining region of the Y-chromosome, NRY)，可選擇的多樣性相對稀少，最近利用 DHPLC 的方法一共有 205 個標記已經被鑑別出來⁽³⁰⁻³³⁾。由於具有相當高的族群親密關係，Y 染色體單套型 (haplotype) 在重建族群遷移事件上，展現出相當大的應用潛力，目前有相當多的文獻報導了該項分析研究的成果。

十二、結語

DHPLC 是一種利用離子配對逆相層析的原理來分離、純化核酸片段的技術，在局部變性條件下 DHPLC 可以成功地檢測出單一鹽基的變異，因為 DHPLC 可以擴充自動化分析的平台，再加上具備有快速、低成本及高檢測靈敏度的特性，因此可以應用在大量 SNPs 的發現與篩選，進而對疾病遺傳風險因素的探討、人類族群遷徙以及基因藥理學診斷等領域提供高效率與低成本的服務。對國內目前正積極推廣與開發的生化、遺傳、基因、腫瘤及生物晶片等應用，DHPLC 將成為不可或缺且極有潛力的分析工具。

參考文獻

1. D. G. Wang, J. B. Fan, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Robinson, M. Mittmann,

- M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, and E. S. Lander, *Science.*, **208**, 1077 (1998).
2. P. J. Oefner, and P. A. Underhill, *Am. J. Hum Genet.*, **57**, A266 (1995).
 3. P. A. Underhill, L. Jin, A. A. Lin, S. Q. Mehdi, T. Jenkin, D. Vollrath, R. W. Davis, L. L. Cavalli-Sforza, and P. J. Oefner, *Genome Res.*, **7**, 996 (1997).
 4. C. G. Huber, P. J. Oefner, and G. K. Bonn, *Anal. Biochem.*, **212**, 351 (1993).
 5. P. J. Oefner, C. G. Huber, F. Umlauf, G. N. Berti, E. Stimpfl, and G. K. Bonn, *Anal. Biochem.*, **223**, 39 (1994).
 6. C. G. Huber, *J. Chromatogr. A.*, **806**, 3 (1998).
 7. W. Xiao and P. J. Oefner, *Hum. Mutat.*, **17**, 439 (2001).
 8. C.G. Huber and G.N. Berti, *Anal. Chem.*, **68**, 2959 (1996).
 9. P. J. Oefner and P. A. Underhill, *US Patent. 5*, 795, 976 (1998).
 10. P. Modrich, *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 435 (1987).
 11. M. C. O'Donovan, P. J. Oefner, S. C. Roberts, J. Austin, B. Hoogendoorn, C. Guy, G. Upadhyaya, S. S. Sommer, and P. McGuffin, *Genomics.*, **52**, 44 (1998).
 12. A. C. Jones, J. Austin, N. Hansen, B. Hoogendoorn, P. J. Oefner, J. P. Cheadle, and M. C. O'Donovan, *Clin. Chem.*, **45**, 1133 (1999).
 13. T. M. U. Wagner, D. Stoppa-Lyonnet, E. Fleischmann, D. Muhr, S. Pages, T. Sandberg, V. Caux, R. Moeslinger, G. Langbauer, A. Borg, and P. J. Oefner, *Genomics.*, **62**, 369 (1999).
 14. M. L. Nickerson, M. B. Warren, B. Zbar, and L. S. Schmidt, *Hum. Mutat.*, **17**, 210 (2001).
 15. F. Abou-ela, D. Koh, I. Tinoco, and F. H. Martin, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4811 (1985).
 16. J. I. Spiegelman, M. N. Mindrinos, and P. J. Oefner, *Biotechniques.*, **29**, 1084 (2000).
 17. Y. S. Choy, S. L. Dabora, F. Hall, V. Niida, D. Franz, J. Kasprzyk-Obara, M. P. Reeve, and D. J. Kwiatkowski, *Ann. Hum. Genet.*, **63**, 383 (1999).
 18. T. R. Skopek, W. E. Glaab, J. J. Monroe, K. L. Kort, and W. Schaefer, *Mutat.Res.*, **430**, 13 (1999).
 19. L. M. Steinmetz and R. W. Davis, *Biotech. Genet. Eng. Rev.*, **17**, 109 (2001).
 20. N. Arnold, E. Gross, U. Schwarz-Boeger, J. Pfisterer, W. Jonat, and M. Kiechle, *Hum. Mutat.*, **14**, 333 (1999).
 21. E. Gross, N. Arnold, K. Pfeifer, K. Bandick, and M. Kiechle, *Hum. Mutat.*, **16**, 345 (2000).
 22. C. Dobosn-Stone, R. D. Cox, L. Lonie, L. Southam, M. Fraser, C. Wise, F. Bernier, S. Hodgson, D. E. Porwer, A.H. Simpson, and A. P. Monaco, *Eur. J. Hum. Genet.*, **8**, 24 (2000).
 23. W. Liu, D. I. Smith, K. J. Rechtzigel, S. N. Thibodeau, and C. D. James, *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1396 (1998).
 24. J. I. Spiegelman, M. N. Mindrinos, C. Fankhauser, D. Richard, J. Lutes, J. Chory, and P. J. Oefner, *Plant Cell.*, **12**, 2485 (2000).
 25. A. Hayward-Lester, P. J. Oefner, S. Sabatini, and P. A. Doris, *Genome Res.*, **5**, 494 (1997).
 26. J. L. Escary, M. Cecillon, J. Maciazek, M. Lthrop, E. Tournier-Lasserve, and A. Joutel, *Hum. Mutat.*, **16**, 518 (2000).
 27. P. J. Oefner, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. App.*, **739**, 345 (2000).
 28. A. Premstaller, H. Oberacher, and C. G. Huber, *Biopolymers.*, **13**, 1859 (2000).
 29. R. A. Ophoff, G. M. Terwindt, M. N. Vergouwe, R. van Eijk, P. J. Oefner, S. M. Hoffman, J. E. Lamerdin, H. W. Mohrenweiser, D. E. Bulman, M. Fferrari, J. Haan, D. Lindhiut, G. J. van Ommen, M. H. Hofker, M. D. Ferrari, and R. R. Frants, *Cell.*, **87**, 543 (1996).
 30. P. A. Underhill, L. Jin, A. A. Lin, S. Q. Mehdi, T. Jenkins, D. Vollrath, R. W. Davis, L. L. Cavalli-avis, Sforza, and P. J. Oefner, *Genome Res.*, **7**, 996 (1997).
 31. P. A. Underhill, P. Shen, A. A. Lin, L. Jin, G. Passarino, W. H. Yang, E. Kauffman, A. Hurlbut, B. Bonne-Tamir, J. Bertranpetit, P. Francalacci, M. Ibrahim, T. Jenkins, J. R. Kidd, S. Q. Mehdi, M. T. Seielstad, R. S. Wells, A. Piazza, D. Soergel, S. Sherry, M. W. Feldman, R. W. Davis, L.L.Cavalli-Sforza, and P. J. Oefner, *Nat. Genet.*, **26**, 358 (2000).
 32. P. A. Underhill, G. Passarino, A. A. Lin, P. Shen, R. A. Foley, M. Lahr, P. J. Oefner, and L. L. Cavalli-Sforza, *Ann. Hum. Genet.*, **65**, 43 (2001).
 33. P. Shen, F. Wang, P. A. Underhill, C. Franco, W.H. Yang, A. Roxas, R. Sung, A. A. Lin, R. W. Hyman, D. Vollrath, R. W. Davis, L. L. Cavalli-avis, Sforza, and P. J. Oefner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 7354 (2000).