

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

微型 DNA 生物晶片中 DNA 解離之分佈函數模擬及 DNA 游動特徵之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2212-E-009-030-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立交通大學機械工程學系

計畫主持人：林振德

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 23 日

計畫名稱：微型 DNA 生物晶片中 DNA 解離之分佈函數模擬及 DNA 游動特徵之研究

計畫編號：NSC91-2212-E-009-030

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：林振德 國立交通大學機械系

### 中文摘要

本計畫針對微型 DNA 生物晶片運用中，雙鏈 DNA 在不同熱解離程度時，建構一描繪解離 DNA 之分佈函數，並分析雙鏈 ds-DNA 巨分子其游動之拉伸(Stretching)及動態特性。為建構解離 DNA 之分佈函數，計畫中以差分掃描熱卡計，量測不同熱解離條件下含 DNA 斷片溶液之化學能變化，去估算解離 DNA 之數量，進而建構不同操作條件下，解離 DNA 之分佈函數。計畫中亦利用半導體製程技術製作微型渠道結構並以實驗探討雙鏈 ds-DNA 巨分子之游動及拉伸特徵。本計畫可進一步對生物分子之生化和物理動態特性有所了解，並可提供一解離 DNA 之分佈函數模式，作為生物晶片設計改善之工具。

### 英文摘要

This project purposes to establish a mathematical model for describing the distribution function of denaturated DNA at various conditions of thermal denaturation in association with the MEMS-fabricated DNA biosensors. It also purposes to examine the stretching & dynamic characteristics of double stranded (ds) DNA macromolecules. Through the measurements in chemical energy change of the solution with DNA fragments via the technique of Differential Scanning Calorimetry (DSC), the amount of denaturated DNA is calculated and the distribution functions be established for the same at various contents of thermal denaturation. In this project, experiments are also performed to study the stretching and

dynamic characteristics of ds-DNA with use of MEMS-fabricated micro-channel. With this study, the stretching and dynamic characteristics of ds-DNA are further understood and formulation of the denaturated DNA distribution function is presented, which would be helpful in improving the design of DNA biosensors.

### 前言

生物晶片是利用在生物的反應過程中所產生的質量變化、熱散失、光吸收或反射等物理性質上的改變，藉由電化學、熱學、光學等方法來量測，並將訊號加以分析的一種裝置。而生物晶片之研發種類有 DNA 生物晶片、RNA 生物晶片，亦有以酵素為考量的研發。主要的 DNA 生物晶片即所謂的 DNA 微陣列晶片(DNA microarray)係將眾多單股 DNA 探針(DNA probe)以高密度固定於載體表面形成微陣列，與標的核酸(Target DNA)進行配對(Hybridization)試驗而快速測得大量基因訊息[1]。在製作標的 DNA、DNA 探針與標的 DNA 配對後的處理及基因的複製與排序，均需將雙股 DNA 裂解為單股 DNA，並對其裂解的程度能有效的掌握。

將雙股 DNA 解離的方法有靠酵素的化學方法和利用溫控的熱學方式，目前是以後者最為簡單，且被普遍的運用。而影響 DNA 熱解離程度的因素主要有鹼基序列的不同、溶液酸鹼值(pH 值)和溶液的離子強度等[2]。一般在研究雙股 DNA 熱解離過程主要採用的實驗方法有：分光光度計方法(Spectrophotometer) [3]和差分掃描熱卡計方法(DSC) [4~6]。分光光度計方法係由於單股 DNA 分子對波長為 260nm 的紫外

光有極佳的吸收性，因此隨著雙股 DNA 解離程度的不同，光被吸收的程度也會隨之不同。透過此特性，即可用來研究雙股 DNA 在不同的解離條件下的解離情形。DSC 方法則係考量雙股 DNA 熱解離成單股 DNA 時，由於鍵結的被打斷，必定會發生能量的變化。隨著雙股 DNA 熱解離程度的不同，所產生的能量變化也不同；因此，利用此一特性，我們也可用來探討雙股 DNA 在不同的條件下的解離情形。

利用溫控熱學解離方式，目前常用之估算方式係依經驗，利用一簡單式子概估溶解溫度 (Melting Temperature)，亦即 50% 解離之溫度值或逕以 90 餘度以上之高溫進行解離，對 DNA 熱解離與操作條件之關係仍缺乏了解。雙股 DNA 之熱解離多是在溶液的狀況下進行的，因此有必要對溶液 pH 值與雙股 DNA 熱解離的關係有所了解。由文獻中可知，目前針對溶液 pH 值與雙股 DNA 熱解離關係的研究主要為透過 DSC 方法來量測各個不同 pH 值下，雙股 DNA 熱解離的總反應焓量，並進一步找出不同 pH 值與雙股 DNA 熱解離總反應焓量的數據統計資料 [2, 7]。而對溶液 pH 值與雙股 DNA 熱解離程度分布函數的關係並未有進一步的研究和探討。本計畫將從熱力學的定律出發，以 DSC 方法量測在不同溶液 pH 值、不同 CG 鹼基含量與不同特徵序列之下，雙股 DNA 受熱解離的能量變化，去估算解離 DNA 之數量，並進一步完整建構雙股 DNA 熱解離程度分佈函數與溶液 pH 值、不同 CG 鹼基含量與不同特徵序列的關係。

另，為了達到生物晶片的微小化，必須整合微渠道及微反應器於晶片上 (Labs-on-a-chip)，DNA 分子於輸送過程之被拉伸，可能改變反應的接觸面積，進而影響微液晶片的生化反應效率，所以探討雙鏈 DNA 分子游動及拉伸的特性，亦是一個重要的課題。

探討單一 DNA 分子拉伸特性之實驗方法，依照不同的實驗原理有以下幾種方式：光鑷夾 (Optical tweezers) [8]、磁鑷夾 (Magnetic

tweezers) [9]、原子力顯微鏡 (Atomic force microscopy) [10]、流動阻力 (Hydrodynamic drag) [11] 等方法。這些方法均須將 DNA 分子固定於力感測器，較適合探討 DNA 分子之彈性性質。若能免除固定 DNA 分子的方法，將能最直接反映出 DNA 受流場的影響。

在實驗室內可利用標準流動 (Standard flow)，如：伸長流 (Elongational flow) [12, 13]、剪力流 (Shear flow) [14, 15] 進行 DNA 拉伸及形態的探討。剪力流存在於極靠近壁面的流場或是利用庫耶流 (Couette flow) 的方式，目前已有廣泛的研究 [13, 15]，在此則針對伸長流拉伸 DNA 分子的方法作探討。

通常用於產生伸長流的渠道有停滯渠道 [12] 與漸縮渠道 [13, 14]。針對停滯渠道而言，由於流體互相沖擊時對 DNA 的影響並沒有被考慮，且沒有對 DNA 分子的應力鬆弛作更進一步的探討；就三角形的漸縮渠道而言，作者採局部應變率來評估 DNA 的拉伸，對 DNA 伸長量的一致性，存在了疑點。有鑑於此，我們設計在渠道中心線產生均勻應變率的漸縮渠道，並分析同一個觀測區 DNA 的伸長量，在均勻的應變率作用下是否具有的一致性；另外也探討不同的流體應變率及 DNA 應力鬆弛時間下，DNA 的拉伸及應力鬆弛現象，並觀測 DNA 巨分子在溶液中之運動情形。

### 量測理論之建立

在任一溫度下，雙股 DNA 熱解離的過程可由下面的反應式來表示： $AB \leftrightarrow A + B$  其中 AB 表示雙股 DNA 分子、A 與 B 分別代表單股 DNA 分子。

### 反應焓與溫度之關係式

反應焓是指一反應其最初狀態與最後狀態間的焓變化，在溫度 T 與壓力為  $P^0$  (1 atm) 時的反應焓變化量可表示為：

$$\begin{aligned} \Delta H_T^0 &= \Delta H_R^0 + \Delta H_{298}^0 + \Delta H_P^0 \\ &= - \sum_{\text{反應物}} \left( n \int_{298}^T C_p^0 dT \right) + \Delta H_{298}^0 + \sum_{\text{生成物}} \left( n \int_{298}^T C_p^0 dT \right) \end{aligned}$$

$$= \Delta H_{298}^0 + \int_{298}^T \Delta C_p^0 dT \quad (1)$$

其中  $C_p^0$  為熱容量， $n$  為莫耳數。

假設生成物及反應物熱容量的差可用以下的實驗方程式表示：

$$\Delta C_p^0 = \Delta\alpha + (\Delta\beta)T + (\Delta\gamma)T^2 \quad (2)$$

其中  $\Delta\alpha$ 、 $\Delta\beta$ 、 $\Delta\gamma$  為特徵常數。

我們可得

$$\Delta H_T^0 = \Delta H_0 + \Delta\alpha T + \frac{\Delta\beta}{2} T^2 + \frac{\Delta\gamma}{3} T^3 \quad (3)$$

其中  $\Delta H_0$  為合併常數後的新常數項，其表示式如下

$$\Delta H_0 = \Delta H_{298}^0 - \Delta\alpha \times (298) - \frac{\Delta\beta}{2} \times (298^2) - \frac{\Delta\gamma}{3} \times (298^3)$$

反應焓變化量與溫度關係式以其他函數式子表示之可行性在稍後結果與討論之單元有更進一步之案例與說明。

### 解離分佈函數之推導

如果我們考慮的反應僅為單相與均質的化學反應，則在溫度  $T$  與壓力  $P$  下，當反應向右進行，則化學反應之 Gibbs 函數變化量即為混合物各成分的 Gibbs 函數變化量的和，亦即

$$dG_{T,P} = \overline{G}_A dn_A + \overline{G}_B dn_B + \overline{G}_{AB} dn_{AB} \quad (4)$$

若我們以  $\varepsilon$  表示反應度 (Degree of reaction)，且混合物任意成分的 Gibbs 函數可寫成

$$\overline{G}_i = \overline{g}_i^0 + RT \ln a_i \quad (5)$$

其中  $\overline{g}_i^0$  為純質  $i$  在溫度  $T$  與壓力  $P^0$  之值， $a_i$  為

其活性。我們將(5)式帶回(4)式中，經過整理與合併後，我們得到

$$dG_{T,P} = \{\Delta G^0 + RT \ln K\} d\varepsilon \quad (6)$$

其中  $\Delta G^0$  與平衡常數  $K$  可表示為

$$\Delta G^0 = \overline{g}_A^0 + \overline{g}_B^0 - \overline{g}_{AB}^0, \quad K = \frac{a_A a_B}{a_{AB}} \quad .$$

如果更進一步的考慮我們反應狀態符合理想溶液 (Ideal solution) 之假設下，即將活性定義化簡為  $a_i = x_i$ ，其中  $x_i$  為成分  $i$  之莫耳分率。

將此關係帶入解離平衡常數  $K$  式中，我們即可得

$$K = \frac{x_A x_B}{x_{AB}}$$

考慮在平衡狀態時  $dG_{T,P} = 0$ ，且  $d\varepsilon$  為任意值時，由(6)式我們可得

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (7)$$

由 Gibbs 函數定義可知  $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$ ，則

(7) 式整理後可得：

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad (8)$$

此一方程式稱為凡得霍夫方程式 (Van't Hoff equation)。將(3)式代入(8)式中積分，我們得

$$\begin{aligned} \ln K &= \frac{1}{R} \int \frac{\Delta H_T^0}{T^2} dT + I \\ &= -\frac{\Delta H_0}{RT} + \frac{\Delta\alpha}{R} \ln T + \frac{\Delta\beta}{2R} T + \frac{\Delta\gamma}{6R} T^2 + I \end{aligned} \quad (9)$$

(9)式中之係數  $I$  可藉由 DSC 實驗中量測出熔點溫度  $T_m$  後估算出來。由熔點溫度之基本定義可知，其為單鏈 DNA 與雙鏈 DNA 各佔 1/2，由此即可找出平衡常數  $K_m$ ，將  $K_m$  與  $T_m$  代入(9)式，即可求出  $I$ 。

由化學計量方程可推導出

$$K = \frac{X^2}{(N-X)(N+X)}$$

其中令 DNA 的起始莫耳數為  $N$ ，反應中莫耳數變化量為  $X$ 。

因此，我們將上述關係整理後可得

$$\frac{X}{N} = \sqrt{\frac{e^{\left(\frac{\Delta H_0}{RT} + \frac{\Delta\alpha}{R} \ln T + \frac{\Delta\beta}{2R} T + \frac{\Delta\gamma}{6R} T^2 + I\right)}}{1 + e^{\left(\frac{\Delta H_0}{RT} + \frac{\Delta\alpha}{R} \ln T + \frac{\Delta\beta}{2R} T + \frac{\Delta\gamma}{6R} T^2 + I\right)}}$$

### 渠道之設計

為配合 DNA 游動特性之探討，渠道設計的目的在於使中心線流場產生均勻應變率，若將流場邊界以無滑移邊界條件 (No slip boundary condition) 處理，並考量下列其他假設：

1. 假設流體為牛頓流體 (Newtonian fluid)。
2. 不可壓縮流 (Incompressible flow)。

3. 流場為穩態(Steady state)。

4. 流動方向為無限延伸(二維流場)並忽略重力。

當  $Re \ll 1$  時，慣性項可以被忽略，納維爾-史托克(Navier-Stokes)方程式簡化如下：

$$\left(\frac{\partial^2 w_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 w_z}{\partial y^2}\right) = -\frac{G}{\mu},$$

令  $G = -\frac{\partial P}{\partial z}$ ，其中  $\mu$  表流體之黏滯係數。 $w_z$  為

流動方向的速度， $x$  為渠道寬度的座標， $y$  為渠道深度的座標，並引入無滑移邊界條件，可解得流動方向的速度分佈

$$w_z(x, y) = \frac{Gh^2}{8\mu} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{(2n+1)^3} \left\{1 - \frac{\cosh[(2n+1)\pi x / h]}{\cosh[(2n+1)\pi b / 2h]}\right\} \cos\left[\frac{(2n+1)\pi}{h} y\right]$$

由黏性流的觀念，在渠道中央( $x=0, y=0$ )時具有最大速度，且渠道的深寬比(Aspect ratio)  $\varepsilon = h/b$  趨近 0 時， $\cosh[(2n+1)\pi b / 2h]$  趨近無窮大；且連加項  $n=1$  之後的值相當小，所以忽略  $n=1$  之後的項。最大速度可近似成，

$$w_{\max} = \frac{Gh^2}{8\mu}$$

流場的平均速度可藉由渠道截面之面積分求得

$$\bar{w} = \frac{1}{hb} \int_{-b/2}^{b/2} \int_{-b/2}^{b/2} w(x, y) dy dx = \frac{Gh^2}{12\mu}$$

若流場為穩態，並利用平均速度與最大速度的關係，為了產生均勻的應變率下式必須被滿足，

$$\varepsilon = 1.5 \frac{dw}{dz} = \text{常數}$$

因為漸縮段的寬度隨流動方向變化，所以漸縮段渠道寬度為  $z$  的函數

$$\bar{w}(z) = \frac{Q}{2x(z)h}$$

將平均速度對  $z$  微分，若為漸縮管，當  $x=0$  時， $z$  趨近無窮大，當  $z=0$  時， $x$  趨近無窮大，所以積分常數必須相等，因此兩邊積分得，

$$\frac{1}{x} = \frac{2fh}{Q} z, \text{ 令 } \frac{Q}{2fh} = f^0$$

$$\text{故 } X \cdot Z = f^0$$

渠道中各處的流量相等，所以位於渠道中心線的應變率為

$$\varepsilon = \frac{dw_{\max}}{dz} = \frac{1.5\left(\frac{Q}{A_{out}} - \frac{Q}{A_{in}}\right)}{z_{out} - z_{in}}$$

渠道幾何尺寸設計分為儲液槽、漸縮段、直管。儲液槽的長度為 5 mm，寬度為 3 mm，深度為 60  $\mu\text{m}$ ，漸縮段則配合前述之函數關係，寬度由 3000  $\mu\text{m}$  漸縮至 300  $\mu\text{m}$ ，深度為 60  $\mu\text{m}$ ；直管的尺寸乃參考文獻中的設計[14]，長度為 8 mm，寬度為 300  $\mu\text{m}$ ，深度為 60  $\mu\text{m}$ ，這樣的設計可滿足雷諾數及深寬比的限制。

### DNA 分子的應力鬆弛時間

DNA 分子的應力鬆弛時間  $\lambda$ ，可利用洛斯基模型(Rouse model)[16]來計算，如下：

$$\lambda = \frac{[\mu] \mu_{\text{solvent}} M}{RT},$$

$[\mu]$  表本質黏度(Intrinsic viscosity)， $\mu_{\text{solvent}}$  為溶劑黏度， $M$  表 DNA 分子量， $R$  為氣體常數， $T$  為實驗溫度。根據文獻資料我們得知噬菌體 DNA 的本質黏度為 3530 ml/g[17]，若溫度固定則 DNA 的應力鬆弛時間只與溶劑的黏度有關。實驗中藉由加入蔗糖(Sucrose)調整溶劑的黏度而改變 DNA 的應力鬆弛時間。

### 實驗方法

#### 樣品溶液的配製

在探討溶液 pH 值關係方面，本實驗將採用固定序列的人工合成 DNA 來配製樣品溶液。在考慮各種緩衝液(Buffer solution)的 pK<sub>a</sub> 值及可以變化的 pH 值範圍後，我們決定採用濃度為 0.1M 的磷酸鈉緩衝液(Sodium phosphate buffer)來做為溶劑。透過磷酸氫二鈉( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、磷酸二氫鈉( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )及二次去離子水不同溶液體積比例的混合，我們可以分別調配出 6 組不同 pH 值的磷酸鈉緩衝液，此

6 組不同的 pH 值為 4、6、7、8、10 及 12。

在探討不同 CG 鹼基含量與不同特徵序列的關係方面，我們設計出 8 組長度為 36 組鹼基對的 DNA 樣品，其鹼基對比例分別為 22、33、44、55%，在序列設計上，是以九個鹼基為一組，在第一至第三與第七至第九位置上，排列相同種類且順序一樣之鹼基，而在其第四至第六位置上依序排列出 ATA/TAT、AAA/TTT、AGA/TCT、ACA/TGT、GAG/CTC、GTG/CAC、GCG/CGC、GGG/CCC 這八組變化，再將這九個鹼基重複四次排列，組成一長度為 36mers 的 DNA 分子，由於 A/T 或 C/G 鹼基本身是互補對應的關係，為了方便討論，以下探討我們用 ATA、AAA、AGA、ACA、GAG、GTG、GCG、GGG 分別代表不同排序的討論。並固定 pH 值為 7.4 的磷酸鈉緩衝液為溶劑。

在探討 DNA 動態及拉伸關係方面我們取得長度為 48502 組鹼基對的雙股  $\lambda$ -DNA，因為這種 DNA 長度夠長(16.5  $\mu\text{m}$ )，因此較易偵測到長度的變化。至於緩衝液則包含 10 mM tris-HCl、2 mM EDTA、10 mM NaCl，PH 8.0，並依據所需的黏度值加入蔗糖，濃度及黏度關係乃藉由黏度計量測。螢光染料採用 YOYO-1 加入緩衝液中稀釋一萬倍，並於室溫下反應兩小時後，樣本溶液即配置完成。

### 實驗系統

在探討不同溶液 pH 值及不同 CG 鹼基含量、特徵序列關係方面所採用的實驗系統為差分掃描熱卡計(DSC)，其型號為 Seiko DSC 6200，溫度量測範圍可從-150°C 至 725°C，加熱速率可由 0.01 °C/min 至 100 °C/min，其靈敏度(Sensitivity)為 1.6  $\mu\text{w}$ 。本計畫執行期間曾試圖利用 MEMS 製程技術自行設計製作微型 DSC，惟經測試後無法獲得一電阻值與溫度間呈穩定線性關係之裝置。

在探討 DNA 動態及拉伸關係方面，則使用 Olympus IX70 倒立式螢光顯微鏡配合 100 倍的物鏡及 100 瓦的高壓汞燈光源激發螢光檢體，

攝影的部分使用 Princeton Instrument PI-MAX Camera，解析度為 512x512 pixels，至於實驗中所使用的 GENIE 可程式注射幫浦(Syringe Pump)，主要是將檢體注入渠道，至於觀測區如圖 1 所示。

## 結果與討論

### 反應焓關係式

DSC 所量測出來的圖形為熱傳率  $Q$  對溫度的變化，且每一個溫度均相互對應一時間點，因此由 DSC 也可得熱傳率  $Q$  對時間的變化關係圖。為了驗證實驗的再現性及找出能量可能跳動的範圍(error bar)，因次我們重複做了 3 次，分別為 ex-1、ex-2 及 ex-3。由於 Baseline 選定的不同，因此每次實驗所座落熱傳率  $Q$  的範圍均不盡相同。接著，我們將此熱傳率  $Q$  對時間積分即可求得反應焓對溫度的變化關係圖。圖 2 代表的是 pH=4 時，反應焓對溫度變化關係圖。由反應焓對溫度的關係圖中，任選 4 點代入(3)式的反應焓與溫度的關係方程式求解  $\Delta H_0, \Delta\alpha, \Delta\beta, \Delta\gamma$  的值。由上述所呈現的結果可以明顯的看出  $\Delta H_0 = f(\text{pH}, T)$ ，而且是呈非線性的關係。圖 3 顯示的是各個不同 pH 值下，平均總反應焓量及總反應焓量可能跳動的範圍(Error bar)。圖 4 顯示的是各個不同 pH 值下，平均  $T_m$  及  $T_m$  可能跳動的範圍(Error bar)。

### 雙股 DNA 熱解離分佈函數

圖 5 到圖 10 分別代表溶液 pH=4、6、7、8、10 及 12，雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖，而圖 11 到圖 18 分別為鹼基比例與排列順序之雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖。縱軸為解離雙股 DNA 量的百分比，橫軸為溫度  $T$ 。在圖 5 的情況中，我們可以觀察到在溶液 pH=4 時解離雙股 DNA 量百分比並非由 0% 開始，而是由 34% 左右開始，此與我們一般由生物學上的認知有所差異，且由於在求解雙股 DNA 熱解離分佈函數時，積分常數  $I$  的求解係利用 DSC 所量測到熱傳率  $Q$  對溫度關係圖中峰值點溫度當作溶點溫度( $T_m$ )來進行求解。溶點溫度正確與否直接

關係到解離分布函數的正確性。為了驗證溶點溫度與初始解離雙股 DNA 量百分比的正確性，因此我們嘗試以更精確的函數關係式來模擬反應焓隨溫度變化關係。假設在任一溫度下，DNA 熱解離反應的反應焓關係式如下：

$$\begin{aligned} \Delta H_{\tau}^{\circ} = & a_0 + a_1 \cdot \tanh\left(\frac{T-b_0}{c_0}\right) + a_2 \cdot \operatorname{sech}\left(\frac{T-b_0}{c_0}\right) \\ & + a_3 \cdot \operatorname{sech}\left(\frac{T-b_1}{c_1}\right) + a_4 \cdot \operatorname{sech}\left(\frac{T-b_2}{c_2}\right) \\ & + a_5 \cdot \operatorname{sech}\left(\frac{T-b_3}{c_3}\right) + a_6 \cdot \operatorname{sech}\left(\frac{T-b_4}{c_4}\right) \quad (10) \end{aligned}$$

其中  $a_0$ 、 $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_3$ 、 $a_4$ 、 $a_5$ 、 $a_6$ 、 $b_0$ 、 $b_1$ 、 $b_2$ 、 $b_3$ 、 $b_4$ 、 $c_0$ 、 $c_1$ 、 $c_2$ 、 $c_3$  及  $c_4$  為待定的特性常數。與(3)式的反應焓關係式相比，此函數關係的特色為在劇烈解離結束溫度點之處，會持續一段溫度區間(至 95°C 以上)，反應焓呈現平緩變化的狀態。而(3)式的反應焓關係式，因為是一個 3 次多項式的型態，因此不具此特色。由生物學上的經驗可知，當雙股 DNA 被加熱至 95°C 以上時，可視為是完全解離的狀態。利用(10)式函數關係的特性，我們可以假設在溫度 95°C 時為雙股 DNA 100% 解離之處，來求解分布函數中積分常數  $I$ 。接著，我們可利用所求得的雙股 DNA 熱解離分布函數反推 50% 解離之處的溫度點與 DSC 所量測到的峰值點 ( $T_m$  值) 作比較，並進一步檢視初始解離雙股 DNA 量的百分比。圖 19 顯示的是當 pH=4, ex-3 時，用(10)式所模擬出來與實驗所求得的反應焓關係比較圖。將(10)式的反應焓關係式代入 van' t Hoff Equation，且對兩邊積分可得平衡常數  $K$  與溫度變化關係式。由於此積分無簡單解析解，因此必須利用數值積分來求一近似解，如(11)式所示：

$$\ln K_{\tau} = \ln K_{95^{\circ}\text{C}} - \int_{\tau}^{95^{\circ}\text{C}} \frac{\Delta H_{\tau}^{\circ}}{RT^2} dT \quad (11)$$

上式中  $K_{95^{\circ}\text{C}}$  理論上為一無窮大的值，但在數值處理上我們只能給定一相對大的值來近似。圖 20 為當 pH=4，第 3 次實驗時，所求解出來的結

果，橫軸為溫度，縱軸為解離雙股 DNA 量的百分比。我們由圖 20 中可以看出隨著  $K_{95^{\circ}\text{C}}$  的變動，雙股 DNA 熱解離分佈函數圖也會跟著變動，且似乎無法趨於一穩定值。推究其原因可能是：

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K$$

在溫度為 95°C 時， $\Delta G^{\circ}$  必定為一有限值，所以  $K$  在數學上為一無窮大的值，但在物理上應該是一相對很大的有限值。因此， $K_{95^{\circ}\text{C}}$  無法有效的求出可能是造成上述現象的原因。由前面的量測理論可知  $\Delta G^{\circ} = \overline{g}_A^{\circ} + \overline{g}_B^{\circ} - \overline{g}_{AB}^{\circ}$ ，因此只要分別找出  $\overline{g}_A^{\circ}$ 、 $\overline{g}_B^{\circ}$  及  $\overline{g}_{AB}^{\circ}$  的值，即可決定  $K_{95^{\circ}\text{C}}$  的值，此可作為將來繼續深入研究的的方向。

回到圖 5 的結果，解離雙股 DNA 量的百分比並非由 0% 開始，此可能意謂著雙股 DNA 受到強酸與環境溫度的影響，在還沒有進行實驗前就已經發生部分解離反應且在緩慢地加熱過程中在還沒達到劇烈解離起始溫度點時，雙股 DNA 也會發生部分解離反應，由於雙股 DNA 發生部分解離的量極少，能量訊號太小以致超過 DSC 可量測的範圍，因此雙股 DNA 發生部分解離的能量變化才無法被 DSC 量測到。

#### DNA 分子的拉伸及應力鬆弛時間之探討

圖 21, 圖 22 及圖 23 是在緩衝液黏度為 1 cp，流量分別為  $10 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$ ， $20 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$  及  $30 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$  下，分別在 A、B、C 三個觀測區中，DNA 分子長度的統計圖，其中橫軸為 DNA 分子的長度，縱軸為長度出現的次數，進入漸縮段前 DNA 皆為纏繞的分子形態；觀測區 B 及 C 處部分 DNA 分子開始出現拉伸的現象，長度的平均值從觀測區 A 到觀測區 C 逐漸增加，整體而言僅管流量增加，DNA 長度並未大幅提高，而且  $\lambda$ -DNA 完全伸展的長度為  $16.5 \mu\text{m}$ ，與流量  $30 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$  所觀測到的最大伸長量相比，僅達到完全伸展時的 40%，因此我們嘗試將緩衝液黏度增加至 10 cp。

圖 24、25 及 26 為緩衝液黏度 10 cp，圖

27 為緩衝液黏度 25 cp, 流量分別為  $10 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$ 、

$20 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$  及  $30 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$  時, DNA 分子長度統計結果, 對

於不同流量而言, 平均長度均從觀測區 A 到觀測區 C 逐漸增加, 而且隨著流量增加 DNA 分子長度分布範圍越來越廣, 甚至有部分的 DNA 分子長度超過完全伸展的長度, 就 25cp 的情況而言, DNA 分子長度分布範圍均相當廣泛, 且纏繞的形態隨流量增加而減少, 亦有部分 DNA 分子已完全伸展, 至於流量  $30 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$  的情況下, 纏

繞的 DNA 分子形態降到 5% 以下, 相較於前面幾組實驗而言大幅減少, 絕大部分的 DNA 分子均已被伸展。

圖 28、29 及 30 分別為緩衝液黏度 1 cp, 10 cp 及 25cp 下以流量  $30 \frac{\mu\text{l}}{\text{hr}}$ , 在不同的觀測區拍

攝的 DNA 分子照片, A、B、C、D、E、F、G、H、I 分別代表不同的觀測區位置, 對於 1 cp 的情況而言, 在觀測區 D 即恢復纏繞; 對 10 cp 的情況而言, DNA 分子在觀測區 B、C 處的伸長量明顯大於 1 cp 的情況, 而且進入直管後, 施加的作用力卸載, 直到觀測區 G 所有的 DNA 分子才恢復纏繞的形態, 應力鬆弛現象明顯延後發生, 至於 25 cp 時, 觀測區 C 的伸長量與 10 cp 時相比只有小幅增加, 但當 DNA 分子流過觀測區 G、H 時, 仍可觀測到拉伸的 DNA 分子, 必須至觀測區 I 之後才完全恢復纏繞。

### 結論

本論文利用 DSC 方法, 量測 DNA 在熱解離反應中的能量變化。利用實驗結果找出反應焓與溫度之關係式, 進而推導出一適用描繪 DNA 熱解離之分佈函數, 並探討 CG 鹼基含量、鹼基排列順序與不同溶液 pH 值對熱解離之影響。實驗結果顯示, C+G 鹼基比例之高低是造成不同種類 DNA 在熱解離效應上會產生差異性之主要

因素; DNA 鹼基之排列順序, 其分子與分子之間的鍵結方式、凡得瓦力與疏水作用力, 亦會對 DNA 的熱解離產生影響。至於溶液 pH 值的效應, 實驗結果顯示即使溶液的化學組成只有輕微地改變, 也會強烈地影響到雙股 DNA 結構的平衡, 進而改變整個熱解離的行為。由 DNA 游動特性及可視化之實驗研究, 我們發現黏度較高的緩衝液將有效抑制 DNA 分子的布朗運動。當進行拉伸及應力鬆弛現象觀測, 我們發現當增加流量及黏度時, 均會使 DNA 分子產生拉伸的現象, 而且當黏度提高時, DNA 分子應力鬆弛現象將延後發生。

### 參考文獻

1. Tony Yuen, Elisa Wurmbach, Robert L. Pfeffer, Barbara J. Ebersole and Stuart C. Sealson, **Nucleic Acids Research**, Vol. 30, No. 10e48, 2002.
2. G.M. Mrevlishvili, N.O. Metreveli, G.Z. Razmadze, T.D. Mdzinarashvili, G.R. Kakabadze, M.M. Khvedelidze, **Thermochimica. Acta.**, Vol. 308, pp. 41-48, 1998.
3. C.R. Cantor, P.R. Schimmel, **Biophysical Chemistry**, W.H. Freeman and Company, New York, 1971.
4. Ilian Jelesarov and Hans Rudolf Bosshard, **J. Mol. Recognit.**, Vol. 12, pp. 3-18, 1999.
5. A. Cooper, and C.M. Johnson, **Methods Mol. Biol.** Vol. 22, pp. 109-124, 1994.
6. J.F. Brandts, and L.-N. Lin, **Biochemistry**, Vol. 29, pp. 6927-6940, 1990.
7. G.M. Mrevlishvili, G.Z. Razmadze, T.D. Mdzinarashvili, N.O. Metreveli, and G.K. Kakabadze, **Thermoch. Acta**, Vol. 274, pp. 37-43, 1996.
8. R. M. Simmons, J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudich, **J. Biophys.**, Vol. 70, pp. 1813-1822, 1996.



9. F. Amblard, B. Yurke, A. Pargellis, and S. Leibler, **Rev. Sci. Instrum.**, Vol. 67, pp. 1-10, 1996.
10. E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, **Science.**, Vol. 264, pp. 415-417, 1994.
11. S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, **Science.**, Vol. 258, pp. 1122-1126, 1992.
12. T. P. Thomas, E. S. Douglas, and S. Chu, **Science.**, Vol. 276, pp. 2016-2021, 1997.
13. P. J. Shrewsbury, S. J. Muller, and D. Liepmann, **Biomedical Microdevices.**, Vol. 4, pp. 17-26, 2002.
14. P. J. Shrewsbury, S. J. Muller, and D. Liepmann, "Flow of Lambda Phage DNA in Microfluidic Devices," 1<sup>st</sup> Annual International IEEE-EMBS Special Topics Conference on Micro-technologies in Medicine and Biology., 2000.
15. E. S. Douglas, P. B. Hazen, and S. Chu, **Science.**, Vol. 283, pp. 1724-1727, 1999.
16. S. Matsuoka, *Relaxation Phenomena in Polymer*, The Oxford University Press, New York, 1992.
17. P. J. Shrewsbury, S. J. Muller, and D. Liepmann, **Biomedical. Microdevices.**, Vol. 3, pp. 225-238, 2001.

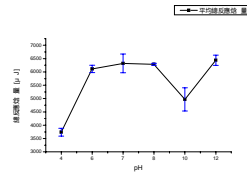


圖 3 總反應焓與 pH 值

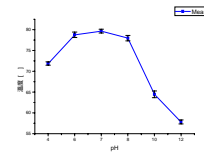


圖 4 Tm 與 pH 值的關係圖

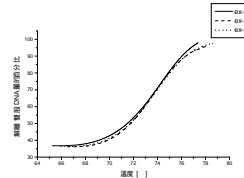


圖 5 pH=4, 雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖

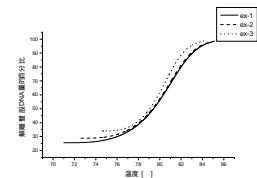


圖 6 pH=6, 雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖

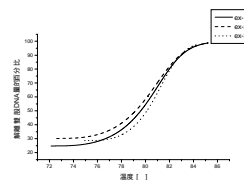


圖 7 pH=7, 雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖

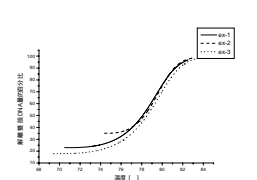


圖 8 pH=8, 雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖

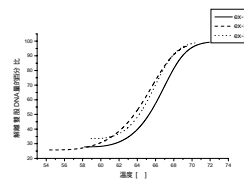


圖 9 pH=10, 雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖

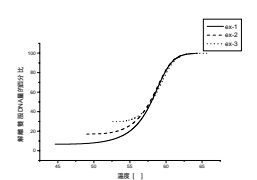


圖 10 pH=12, 雙股 DNA 熱解離程度分佈函數圖



圖 1 通道觀測區示意圖

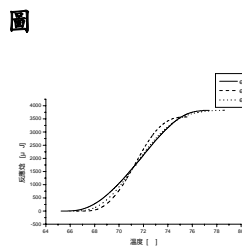


圖 2 溶液 pH=4 時, 反應焓對溫度圖

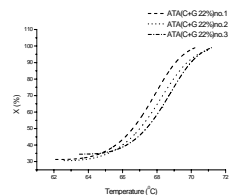


圖 11 C+G 含量 22%, 鹼基排列為 ATA 之解離分佈函數

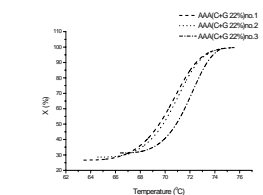


圖 12 C+G 含量 22%, 鹼基排列為 AAA 之解離分佈函數

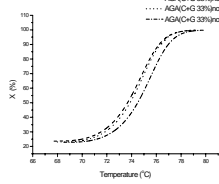


圖 13 C+G 含量 33%，鹼基排列為 AGA 之解離分佈函數

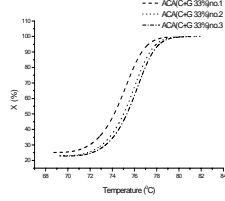


圖 14 C+G 含量 33%，鹼基排列為 ACA 之解離分佈函數

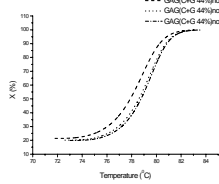


圖 15 C+G 含量 44%，鹼基排列為 GAG 之解離分佈函數

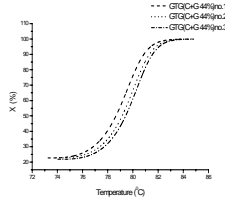


圖 16 C+G 含量 44%，鹼基排列為 GTG 之解離分佈函數

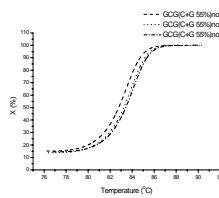


圖 17 C+G 含量 55%，鹼基排列為 GCG 之解離分佈函數

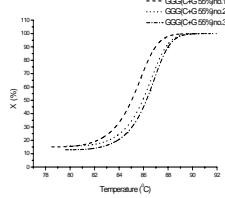


圖 18 C+G 含量 55%，鹼基排列為 GGG 之解離分佈函數

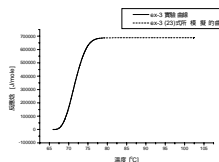


圖 19 pH=4，ex-3 時，(10)式與實驗所求得的反應焓關係比較圖

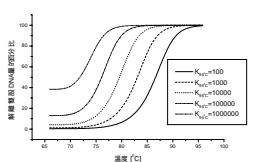


圖 20 pH=4，ex-3 時，(10)式所求雙股 DNA 熱解離程度分佈函數

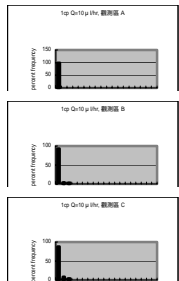


圖 21 緩衝液黏度 1cp，流量  $10 \frac{\mu l}{hr}$  時，分別在觀測區 A、B、C 之 DNA 分子長度統計圖

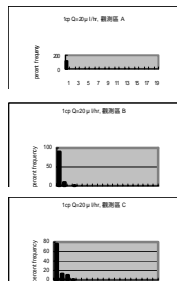


圖 22 緩衝液黏度 1cp，流量  $20 \frac{\mu l}{hr}$  時，分別在觀測區 A、B、C 之 DNA 分子長度統計圖

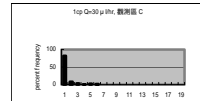
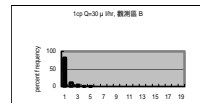
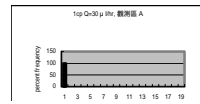


圖 23 緩衝液黏度 1cp，流量  $30 \frac{\mu l}{hr}$  時，分別在觀測區 A、B、C 之 DNA 分子長度統計圖

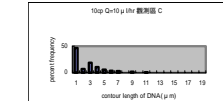
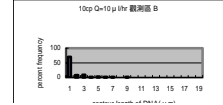
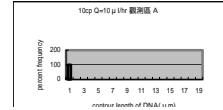


圖 24 緩衝液黏度 10cp，流量  $10 \frac{\mu l}{hr}$  時，分別在觀測區 A、B、C 之 DNA 分子長度統計圖

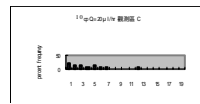
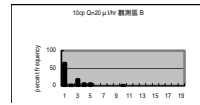
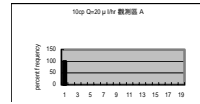


圖 25 緩衝液黏度 10cp，流量  $20 \frac{\mu l}{hr}$  時，分別在觀測區 A、B、C 之 DNA 分子長度統計圖

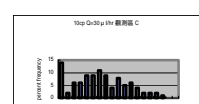
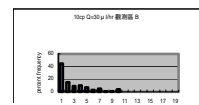
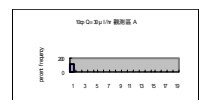


圖 26 緩衝液黏度 10cp，流量  $30 \frac{\mu l}{hr}$  時，分別在觀測區 A、B、C 之 DNA 分子長度統計圖

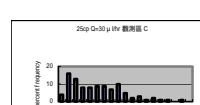
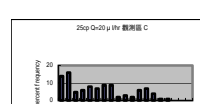
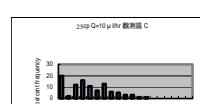


圖 27 緩衝液黏度 25cp

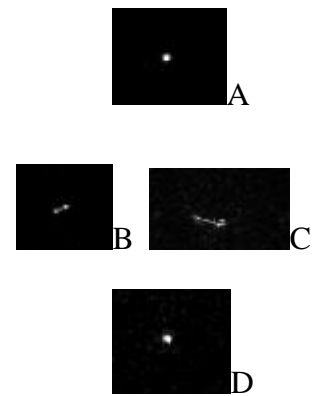


圖 28 緩衝液黏度 1cp

時，分別以 10、20、 下，分別在不同觀測  
 $30 \frac{\mu l}{hr}$ ，分別在觀測區 C 區位置 DNA 分子形態  
 的 DNA 分子長度統計圖 轉變

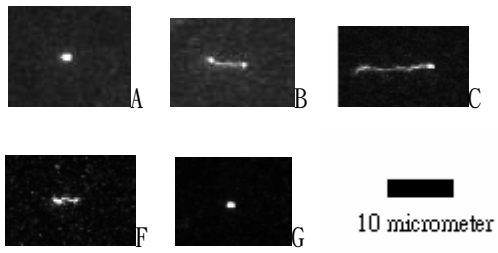


圖 29 緩衝液黏度 10cp 下，分別在不同觀測區  
 位置 DNA 分子形態轉變

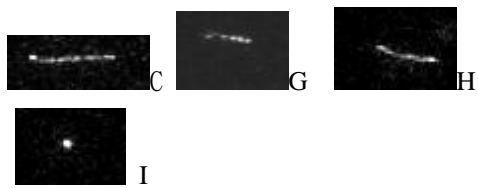


圖 30 緩衝液黏度 25cp 下，分別在不同觀測  
 區位置 DNA 分子形態轉變