

生醫工程實驗

# 實驗一 生物晶片實習

---

第一組 B91901150 陳建宇

B92901121 羅弘益

## 實驗結果：

### Part I. 預備實驗—micropipet 使用

表 1-1

No.	預定溶液 A( $\lambda$ )	預定溶液 B( $\lambda$ )	離心管重(g)	離心前(g)	離心後(g)
A	300	700	0.9963	1.9907	1.9911
B	820	180	0.9940	1.9840	1.9840
C	50	150	0.9905	1.1940	1.1944
D	170	30	1.0008	1.1962	1.1964
E	17	3	0.9910	1.0106	1.0108
F	8	12	0.9910	1.0107	1.0108

表 1-2

No.	理論重量(g)	離心後重(g)	差值(mg)
A	1.9945	1.9911	3.4
B	1.9922	1.9840	8.2
C	1.1945	1.1944	0.1
D	1.2000	1.1964	3.6
E	1.0110	1.0108	0.2
F	1.0110	1.0108	0.2

討論：micropipet 是否準確？

所用試劑 A、B 均為水，在室溫（ $20^{\circ}\text{C}$ ）的密度約為  $0.9982\text{g}/\text{cm}^3$ ，實驗結果顯示人為誤差為主要因素，因為我們重做了很多遍。

不準確的可能原因：1. 表面張力殘留液體，無法完全排出。

2. tip 外圍有沾附液體，造成多餘的量轉移。

3. 在所需容量和 pipet 的最大刻度相差很多時，最好取用較小容量的 pipet 多次分裝可增加精確度；但同時會造成每次 variance 的累積。如果使用熟練的話還是以多次分裝比較精確。

4. 設定容量時，漏掉從低轉到高須超過預定值的三分之一後再反轉下來，會有機械誤差。

5. 保持 pipet 的鉛直可能可以排的比較徹底。

6. 另，離心前後微量天平的 offset 不會完全一樣，所以有微量差異。

7.  $20\lambda$  用的 tip 有活塞堵住，如果不正確取用的話會被吸掉造成試劑量不正確。

### Part II. 生物晶片實做

實驗步驟流程圖附後。

實驗步驟補充事項：

1. 實驗進行前須戴上橡膠手套（其他成份：聚苯乙烯等），避免環境及生物體上的

RNasin 將實驗的 RNA degrade 掉。另外可以用清潔液噴灑擦拭會接觸到的東西，如 micropipet 等以保持試劑的清潔度。實驗室注意事項：不要戴手套碰觸儀器，以免污染。

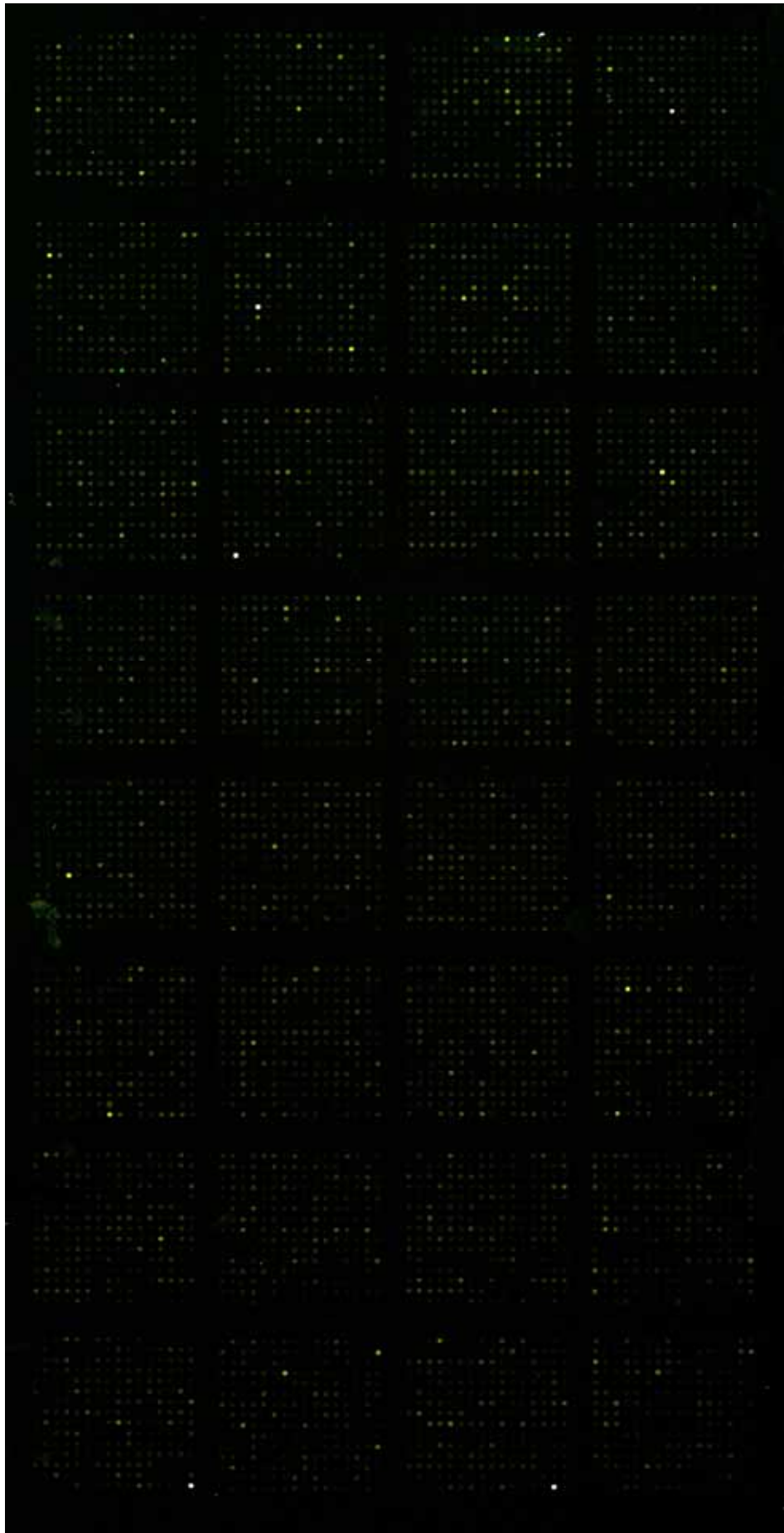
2. 實驗用試劑全程放在冰上以免 denature；若有結冰現象可以用手彈一下並讓其溶化解凍後再吸取。須注意的是若試劑還有結冰的情形，溶液的濃度會不準，會造成些微的影響；所以最好等解凍後再吸取。
3. 本實驗用的 RNA 是已經純化過的 mRNA，本實驗不作 RNA 的萃取及分離。如果使用未純化的 RNA 則裡面會包含 80~85% rRNA、10~15% tRNA 及 3~5% 的 mRNA。本實驗原本預定使用的是未純化過的 RNA 的話需分別用 40 $\mu$ g 和 20 $\mu$ g 的量，以求得比較高的 mRNA 量。使用純化過的 mRNA 則取用 5 $\mu$ g 的量就夠了。  
(其比重為 1.1678 $\mu$ g/ $\lambda$ ，取 5 $\mu$ g 其實是超量以保證實驗成功。)
4. 當微離心管液體需要混合、有氣泡或管壁上有殘留，可以拿去 shaker 上搖一下再拿去離心以集中試劑。
5. 用 pipet mix 試劑的方法：吸起來一部分再排出去；可重複多次以達到混合的功能。不過會讓部分液體殘留在 tip 內。
6. 蓋玻片在覆上之前可以清潔一下，例如以氣球吹掉灰塵之類的。在 chamber 上點 10 $\lambda$  的 prehy buffer 的目的是讓 chamber 濕濕的，以免乾掉。蓋玻片蓋上後有氣泡不能怎麼辦，在最後掃描量測時會變成一個很大的雜訊區塊。
7. 由於曝光是不可逆反應，因此 microarray 進行三次以上的曝光後 cDNA 會被破壞；就算沒有曝光，點在晶片上的 cDNA 也會因接觸空氣、溫度等因素產生質變而不能再用。因此，完成晶片後最好在 30 分鐘內掃描完。

掃描以 532nm 和 635nm 兩種波長掃描；正常情況下，不同 RNA 樣品使用不同的螢光物質來標定(Cy3 或 Cy5)，然後和 microarray 起雜合反應後留在上面，根據對兩種波長的受激發光決定哪一種 RNA 產生的 cDNA 有和 microarray 雜合或是兩種都有。本實驗 Cy3 和 Cy5 標定用同樣的樣品，所以應該兩種螢光反應會是一樣的——紅光和綠光會合成黃光。Cy3 的激發光源為 532nm 綠光雷射，激發放光為 565~595nm 間；Cy5 的激發光源為 635 紅光雷射，激發放光在 655~685nm 之間；其精確範圍視各家廠商設計 emission filter 而定。

依照發光效率的不同，發出紅光和綠光的亮度會不一樣。實做時會用軟體的方式調整兩種掃描波長的 gain 提高影像平衡度，調整到兩種受激放光的強度差不多 (要 635/532 ratio 在 0.9~1.1 之間)。

下面是 GenePix Pro 掃描出來的圖像：全圖共 32 個 block 乘以 256 點每 block，一片晶片共有 4096 點。

圖 1：我們掃出來的 microarray 曝光後的 TIF 影像，  
為兩種色光的比例。



下面取 block (2,1)放大觀察：

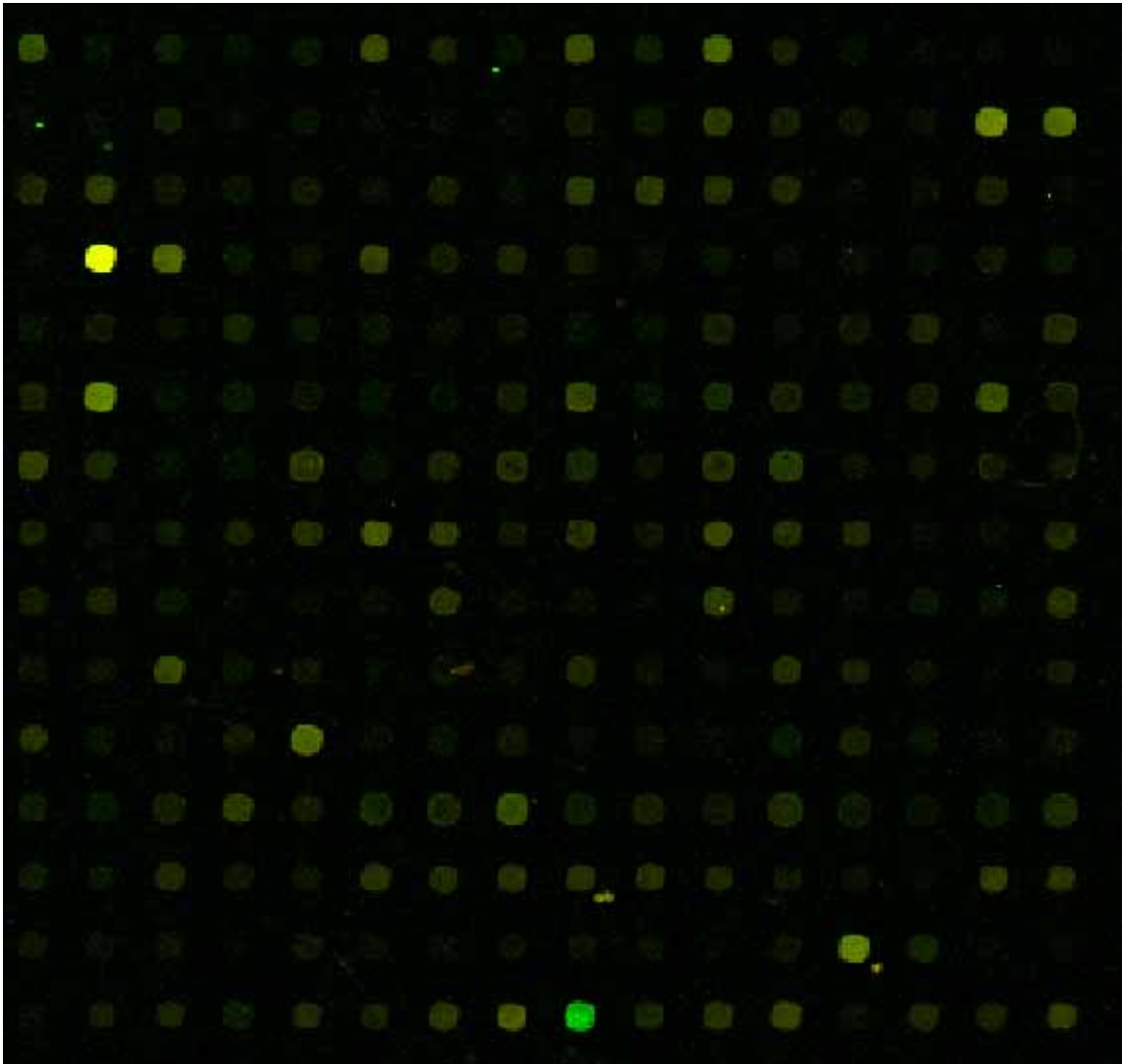
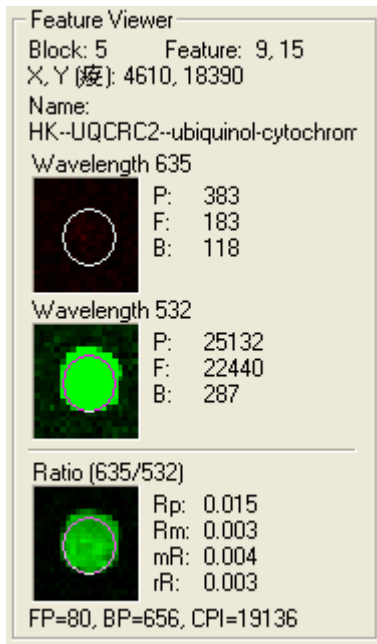


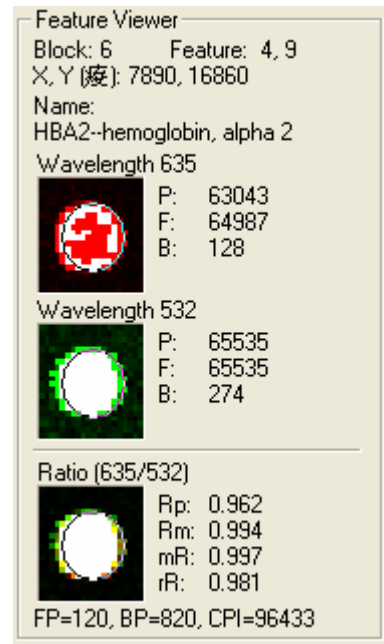
圖 2：取其中一個 block (2,1)放大分析。

以黃光影像來說，可以看到一個明顯的黃點和一個綠點。據助教說如果飽和掉會是一個亮白點。黃點就是紅色和綠色都有正常反應，所以符合預期結果；但是綠點就是表示紅色的 Cy5 染色沒標到該點，應該是運氣不好那一點沒有雜合反應發生。另外，沒有觀察到單獨紅點，可能原因是 Cy3 的 labeling efficiency 比較高，所以大部分都有和有 label 的 cDNA 雜合，而從 Cy5 那管的 cDNA 剛好沒被染到。和另一組比較的結果顯示：

下面是該點的收到訊號及一個白點〈該點為紅血球 $\alpha 2$  unit〉的比較：

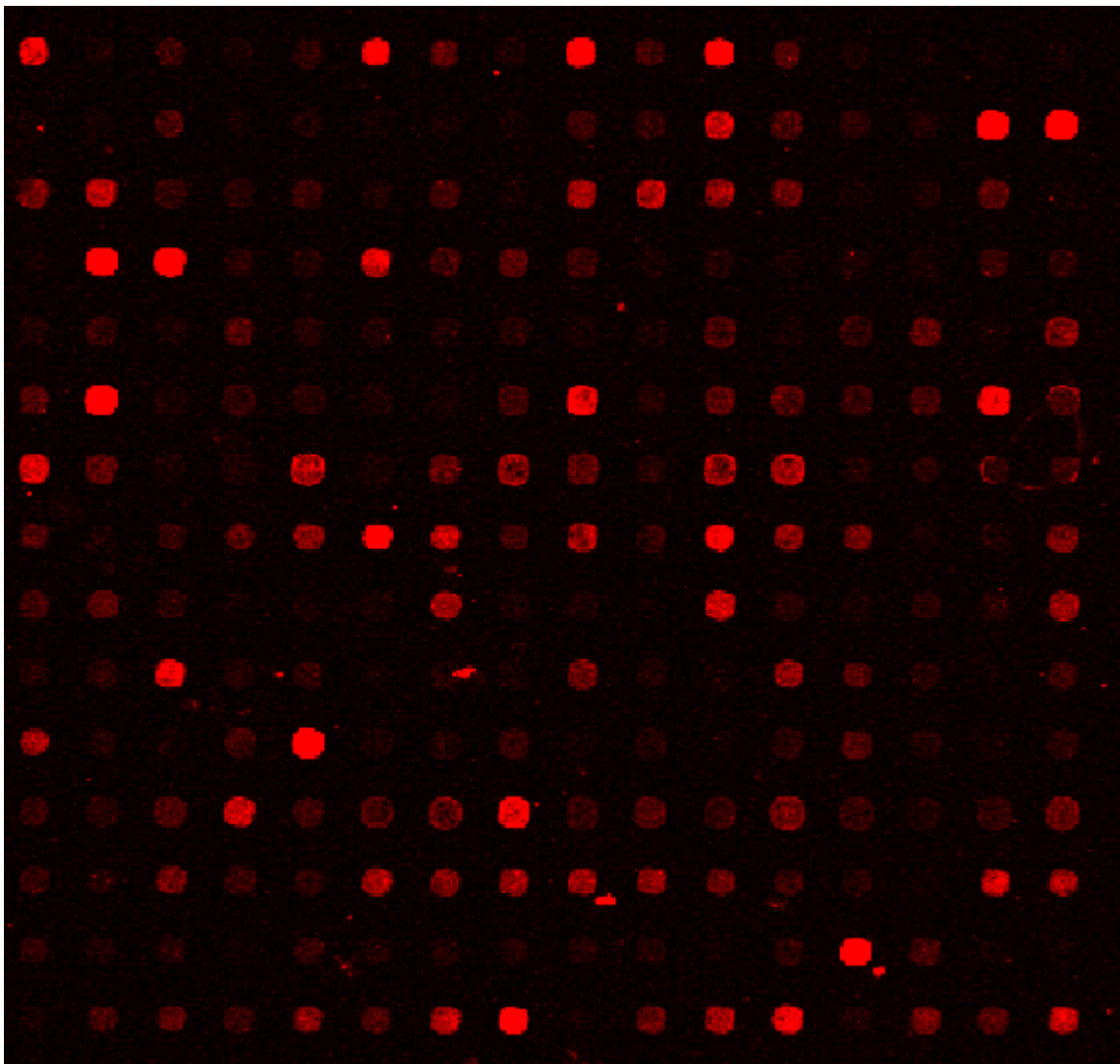


〈左〉圖 3：選定一個只有綠點的影像詳細資料。



〈右〉圖 4：選定另一個強度飽和掉的點的詳細資料。

另外，該 block 分別的紅綠成分圖在下面：



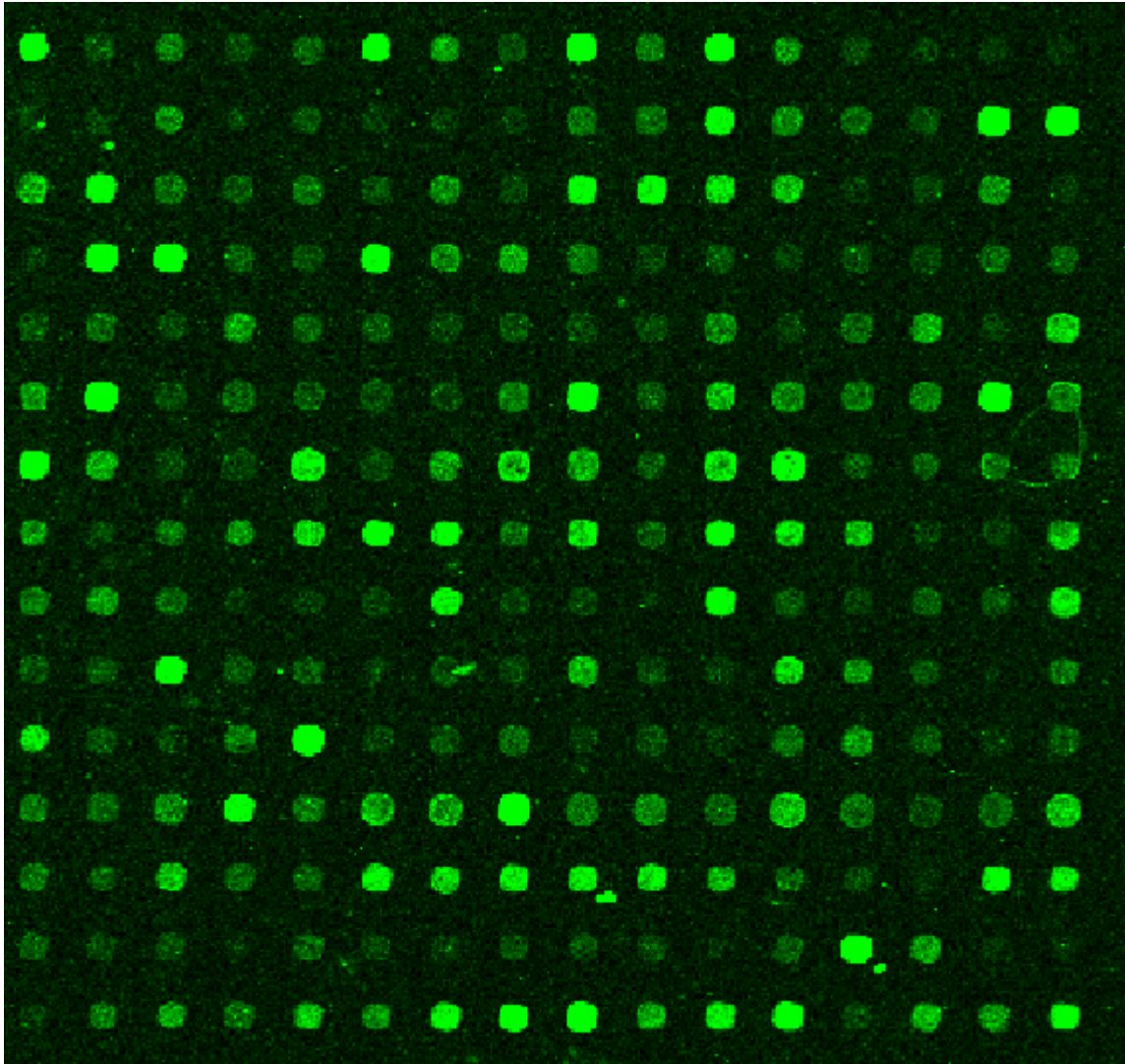


圖 5：分別在紅綠光照射下的影像。

而其 block 上的紅綠光強度為〈Row 和 Column 是這個 block 上的每個點的位置；因為不會分析所以我們不把全部數據附上。另外根據 GenePix 的晶片資料，可以給出每一個位置上的 RNA sequence 的 name，也是供進一步分析之用。〉

以上圖可以看到比較清楚的一個輪廓在右邊中間，原因可能是蓋上蓋玻片的時  
候有氣泡沒有排出。然後綠光一般來說都比紅光的圖形亮，且這還是在紅光的 gain  
比綠光大的情況下所拍出來的圖形。使用的紅光：綠光 gain 為 800:660，最後平衡  
度的 Count ratio 為 0.99。

因為使用一樣的樣品標兩種顏色作雜合，所以圖案是一樣的，看不出來有什麼  
差別。這裡附上一小部分的訊號資料：

Block	Row	Column	Dia.	F532 Mean - B532	F635 Mean - B635	Ratio of Medians (635/532)	Ratio of Means (635/532)				
5	1	3	100	963	455	0.475	0.472				
5	1	4	90	444	152	0.353	0.342				
5	1	5	100	684	324	0.502	0.474				
5	1	6	100	4083	2740	0.677	0.671				
5	1	7	100	1285	749	0.601	0.583				
5	1	8	110	478	176	0.394	0.368				
5	1	9	110	4311	3070	0.703	0.712				
5	1	10	100	969	528	0.559	0.545				
5	1	11	100	6951	4277	0.621	0.615				
5	1	12	100	1178	683	0.573	0.580				
5	1	13	110	415	158	0.348	0.381				
5	1	14	90	367	108	0.291	0.294				
5	1	15	100	272	78	0.204	0.287				
5	1	16	100	215	103	0.369	0.479				
5	2	1	100	1354	244	0.387	0.180				
5	2	2	100	309	91	0.229	0.294				
5	2	3	100	1105	616	0.542	0.557				
5	2	4	70	411	120	0.238	0.292				
5	2	5	100	520	210	0.372	0.404				
5	2	6	110	299	95	0.337	0.318				
5	2	7	90	407	113	0.339	0.278				
5	2	8	80	304	124	0.281	0.408				
5	2	9	110	858	444	0.452	0.517				
5	2	10	110	806	344	0.422	0.427				
5	2	11	110	2775	1877	0.678	0.676				
5	2	12	110	1112	630	0.568	0.567				
5	2	13	110	751	307	0.385	0.409				
5	2	14	100	468	193	0.427	0.412				
5	2	15	110	12520	8038	0.649	0.642				
5	2	16	110	8432	5169	0.618	0.613				
5	3	1	120	1300	828	0.683	0.637				
5	3	2	110	3111	1797	0.583	0.578				
5	3	3	110	821	387	0.460	0.471				
5	3	4	110	625	280	0.420	0.448				
5	3	5	110	834	445	0.538	0.534				
5	3	6	100	496	186	0.364	0.375				
5	3	7	110	1100	542	0.504	0.493				
5	3	8	100	400	110	0.245	0.290				
Linked				Hardware Key: not found		Disk = 36.56 GB		No barcode		A: Hs-RDSP-8k-	

表 2：特定 block 的詳細資料分析(produced by GenePix™)

問題討論：

- 根據 [1]，labeling efficiency 的定義是每 picomol Cy3-dCTP/Cy5-dCTP 跟合成後 DNA 鹼基的量(用 550nm 雷射掃描 Cy3、650nm 雷射掃描 Cy5 來看)。這個量是一個 base-to-dye ratio。Cy3 的量是  $150,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，Cy5 的量是  $250,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 。所以 Cy3 的 labeling efficiency 較好。如果使用一樣的 RNA 量，被 Cy5 標定量會少很多，最後在掃描時會發現紅光比較暗，不容易觀察被 Cy5 標定的 RNA 的表現。所以一開始加入的 RNA 量應該不一樣，Cy5 應比 Cy3 多 1.66 倍。本實驗設計 2 倍的理由是確保 Cy5 結合量足夠多。
- 所謂的 low T dNTP 是指 dATP、dGTP、dCTP 和比較少量的 dTTP 的混合溶液的意思：可以作為反轉錄的 cDNA 原料。然後因為實際上 cDNA 並不是全都用 A、T、C、G 做為遺傳訊息物質，實際上還有少量 U，而這些 U 就是用來做標定的。



如果用 high T 的話 cDNA 因幾乎不含 U 而最後沒有被標定，使得最後掃瞄失敗。

3. 掃描的影像品質可能跟下列因素有關：

(a) 鹼基成份——A 與 T 以雙鍵結合，C 與 G 以參鍵結合，所以當一段 DNA 中 AT 含量較大時雜合 cDNA 的親合力較小，使影像品質下降；當 CG 含量較大時雜合 cDNA 的親合力較大，影像品質較佳。本實驗用 T 去標定，屬於 indirect labeling，所以用 dUTP；若用 direct labeling 才會用 dCTP。所以似乎用 direct labeling 的影像品質較好，其實不然，因為用 direct labeling 的話 Cy3 與 Cy5 的量不會相同，產生因染料導致的 artifact 機率較大。整體來說，這個實驗在這一點是 trade-off。

(b) blocking——如果沒有任何 blocking 方法就直接做晶片，可能因 non-specific binding 造成掃描結果不是我們要的，所以本實驗才有 pre-hybridization 這一步。下圖 [2] 是比較 blocking 有無的影像結果(皆在 42°C)。左圖是有 blocking，右圖沒有 blocking。

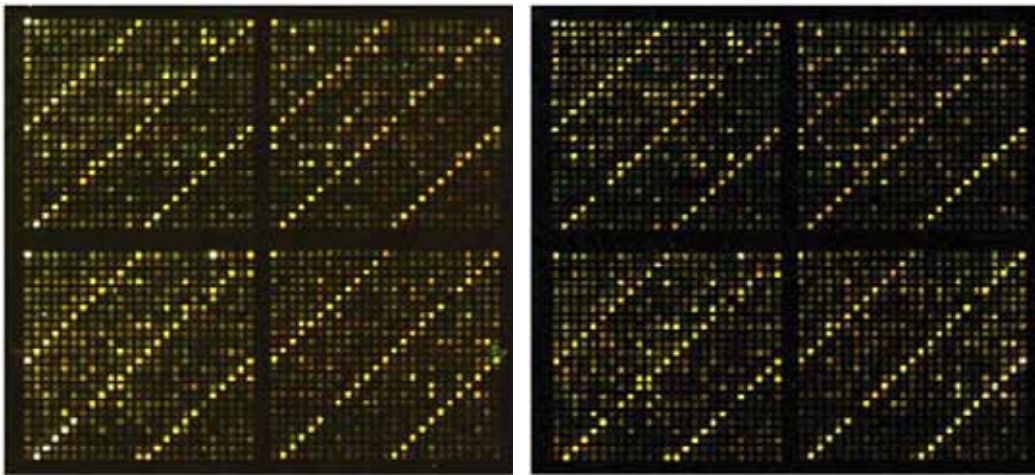


圖 6：比較有無 blocking 的影像結果。

(c) 溫度——根據[3]的結論顯示，低溫時 non-specific binding 容易進行，而高溫時 DNA 雜環會被破壞，所以溫度需要 optimize 在適合的溫度。其中 42°C 的效果最好，本實驗也是使用這個溫度。

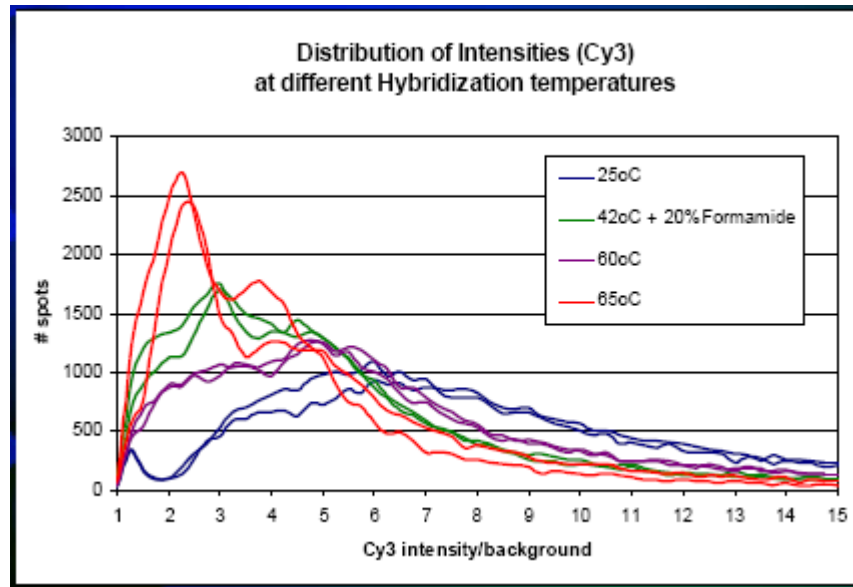


圖 7: 比較不同溫度下的 labeling 結果

- (d) pH——操作 pH 環境過大時鹼基間氫鍵結合力下降，過小時鹼基會 depurinate，所以有一個合適的範圍(5.5~8.5)。本實驗用 TE buffer 跟 Tris 調整到 7.6。
- (e) RNase——自然環境中有很多酶會分解 RNA，因此做實驗前應該先把它去除，否則加上去的 mRNA 會被分解，最後看不到結果。本實驗第一步就是噴 RNasin 在 pipet 上，達成目的。
4. (a) 希望能做不同 mRNA 的雜合，這樣就能看到因基因不同導致不會只看到一大片黃點。
- (b) 因二組在最後收集 cDNA 的時候都不足 17λ，建議最後一次離心時間縮短。
- (c) 為了使信雜比再提高，可以在 blocking 時加一些 blocking 溶液，像是已經商品化的 [4] 配方等等。
- (d) 由於只有電機背景，個人認為只知道照步驟作有點不太了解到底在做什麼。如果要進一步提出有生物意義的解釋，還需要多一點對生物知識的了解。這點可以在做實驗之前先找時間學一下：像是 central dogma 的報告如果提前到實驗前，會比較知道 reverse transcription 是什麼。另外像是一些專有名詞也可以先解釋一下，像是一開始看步驟裡面的很多 ddH<sub>2</sub>O 和 DEPC water 的差別，助教沒講是都不會知道。
- (e) 手套用完後的感覺是手非常乾燥，好像手上的水被吸得一乾二淨，不太舒服，建議以後的手套能避免這個問題。
5. 助教抄的 260/280 = 2.24、260/230 = 2.3 是指 RNA 純度很高。260/280 的意思是用 260nm 的光打到 RNA 上看吸收度，280nm 也一樣；二個的比例就是等號右邊的數字。260/280 是量測該 RNA 樣品被蛋白質汙染的程度，260/230 是量測該 RNA 樣品被醣類或其它代謝物汙染的程度。一般來說，1.9 表示不理想，2.1 表示還不錯，

本實驗的質都比 2.1 高不少，表示我們一開始拿到的 RNA 樣品是很純的。

參考資料：

[1] Pauline T. Lieu, Peter Jozsi, Patrick Gilles and Todd Peterson , “Development of a DNA-Labeling System for Array-Based Comparative Genomic Hybridization” , Journal of Biomolecular Techniques, 16:104-111.

<http://jbt.abrf.org/cgi/content/full/16/2/104>

[2] 莊曜宇，生物晶片技術概論，2004/10/14.

[3] Lab Automation Booth # 202, SciGene,

[http://www.scigene.com/data/SciGene\\_workshop.pdf](http://www.scigene.com/data/SciGene_workshop.pdf).

[4] Kadushin, James M., *et al*, “Methods for blocking nonspecific hybridizations of nucleic acid sequences,” US patent 20040009487, January 15, 2004.

