

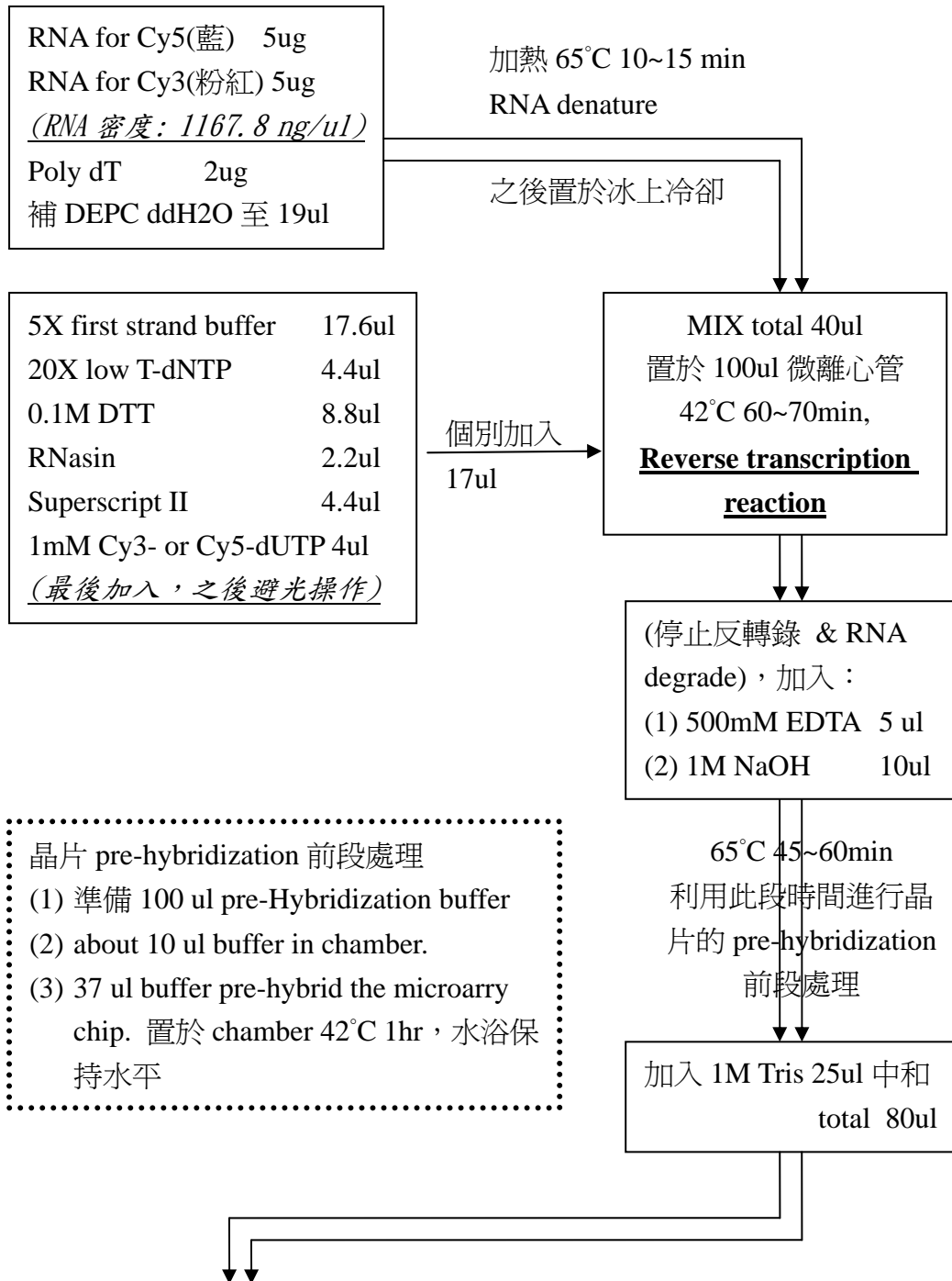
# 生醫工程實驗一 生物晶片實習

B91901070 電機四 王昱欣

B91901133 電機四 孫士育

TA：施逸優

實驗流程（以下步驟在冰上操作，務必注意藥品是否結凍，以免影響濃度）



Vortex Bio-Spin 6 Columns (to mix well gel)  
3000 r.p.m., 2min (to remove buffer) →  
去掉下層，換 new 1.5ml eppendorf →  
各別 loading labeled probes(~80ul)到不同 column→  
4000 r.p.m., 4min

加入 TE 200ul 入 microcon YM30 →  
加入 80ul elution(fr Bio-6 column)，並將 Cy3 和 Cy5  
labeled probe mix to the one microcon, pipette to mix.→  
14,000 g 15min → 加入 400 ul TE (wash)→  
14,000 g 15min → 加入 400 ul TE (wash)→  
14,000 g 6~10 min to concentrate to ~ 17ul(with TE)→  
recover the concentrator over 1 clean collection tube→  
4,000 r.p.m., 3min. total 17ul

The purified probe	17ul
COT-1 mouse(human) DNA	1ul
Yeast tRNA	1ul
Poly A	1ul
(total 20ul)	

Denature 90~94°C 2min，後置於  
冰上  
並完成 pre-hybridization

晶片 pre-hybridization 後段處理  
(3) 洗掉 buffer，by rapid dunking in  
ddH2O 2min → Isopropanol 2min  
(5) spin 600 r.p.m 5 min to dry.

**Hybridization**  
準備 2X hybridization buffer:  
50ul 100%Formamide, 50 ul 20X SSC, and 2ul 10%SDS(最後加)  
20 ul hybridization buffer + 20 ul sample mix,  
about 10ul buffer in chamber.  
loading ~37 ul on coverslip  
完成放入 chamber, 42°C overnight.  
(第一天結束)

- (1) Warm up the scanner about 20min.
- (2) 準備 Washing buffer，將 slip 從 chamber 拿出，  
Washing 過程全程避光  
2X SSC, 0.1% SDS (400ml) for 10 min  
1X SSC, 0.1% SDS (400ml) for 10 min  
0.2X SSC (400ml) for 10 min  
0.05X SSC (400ml) for 2min
- (3) Spin 600 r.p.m., 5min
- (4) Scan

實驗紀錄及結果：

PIPET 預備實驗紀錄： 20°C (D = 0.998Kg/L)

單位 (ul)	A	B	C	D	E	F
A	300	820	50	170	17	8
B	700	180	150	30	3	12
總體積	1000	1000	200	200	20	20
離心管重量(g)	0.9914	0.9992	0.9933	0.9947	0.9942	0.9925
總重量	1.9847	1.9829	1.1938	1.1940	1.0138	1.0123
誤差	0.47%	1.4%	2.5%	0.15%	1.8%	0.8%

Micropipet 的使用大致還可接受，紀錄使用注意事項如下：

1. tip 使用注意事項：

每次量取務必換新，並避免接觸其他液體污染。

注意所使用型號要 match.

使用時務必壓緊！（不然會漏空氣，影響體積）。

吸取液體時不要把 tip 放太深（壓力較大，容易吸收過多）。

放液體的時候，tip 靠管壁，注意 tip 前端是否有殘留。

2. 盡可能使用數量級接近的 pipet，以求精確量取體積。

3. 設定體積時，先旋轉超過預設量（約三分之一），再轉回至所需量吸取。不過如果由較大量轉到較少量可以免去。

4. pipet 用完要記得轉回最大值喔！不然 pipet 內部的彈簧會鬆。

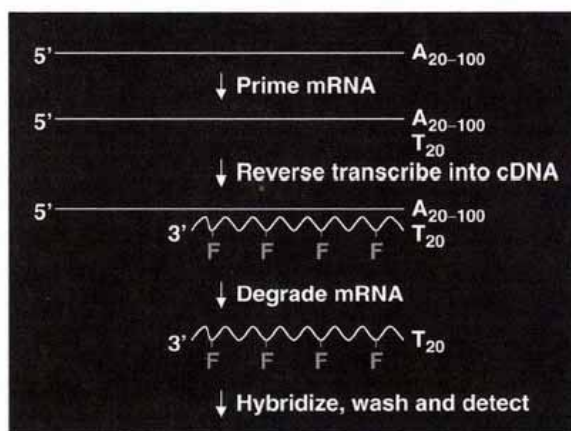
5. 用畢務必直立架好。

6. 溶液量較少的如 E,F，容易因為 shake 就看不到液體，此時拿去離心一下，就可以找回消失的液體。

7. 微量天平相當敏感，風吹或是輕壓旁邊的桌面都有可能造成重量量測的誤差。

## 生物晶片 第一天的部分：

我們所進行的流程，大致可分做：



1. 準備原料 RNA，
2. 然後進行反轉錄，製造出 cDNA (需要 DDT 抑制蛋白質水解酶之活性和 RNasin 減少 RNA 被 RNase 分解的可能)
3. 停止反轉錄 (用 EDTA)，再將 RNA degrade 掉 (用 NaOH)

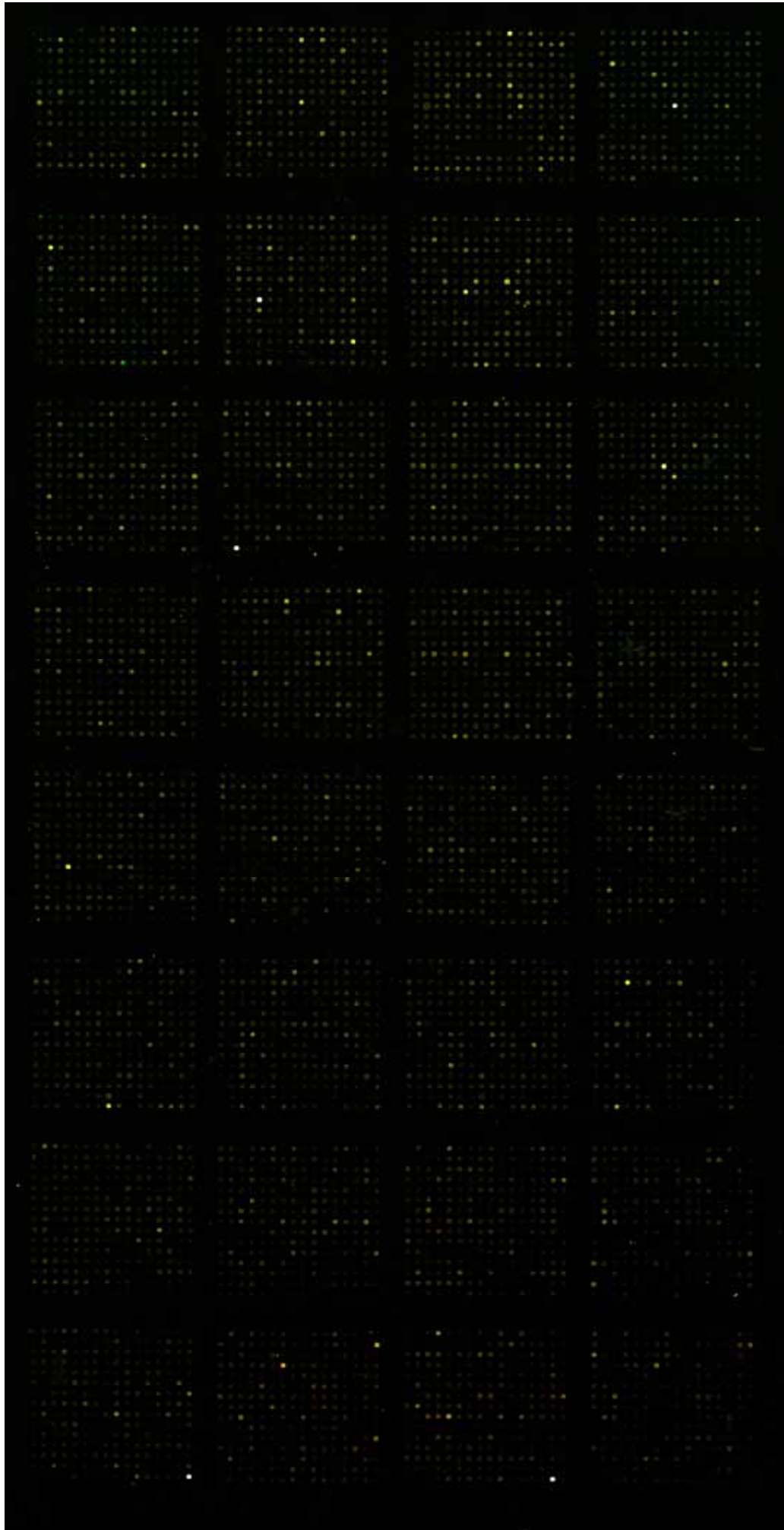
4. 先進行晶片的 Pre-hybridization，以減少掃描結果的被背景雜訊干擾
5. 過濾去除掉 free dye，純化出 labeled probe，濃縮收集
6. 最後再將 sample 和 chip 做 Hybridization，以供隔日掃描

其他步驟的注意事項：

1. 本次實驗是用 RNA 為原料，由於環境中 RNase 眾多，容易造成 RNA degrade，我們在實驗進行期間必須小心，並使用橡膠手套。
2. 由於藥品置於冰上，抽取時可能會有結凍的情況發生，利用拇指輕輕彈打管壁，讓藥品恢復液狀，避免結凍造成濃度的變化。
3. 要隨時注意藥品處理的小動作，如溫度掌握和加入染劑後利用錫箔紙進行避光，任何小細節都可能影響最後的掃描影像。
4. tip 真的要壓緊！
5. Chamber 的部分：首先要注意玻片上面是否有髒東西附著（我們利用氣球吹氣方式吹掉），另在 chamber 內滴入一些 buffer，好讓內部維持一定溼度。接著蓋上蓋玻片後務必小心，盡可能不要產生氣泡（Bubble 再掃描的時候會是嚴重的雜訊）。鎖緊 chamber，避免水浴過程中有水流入。
6. 在步驟六中，第三次用 TE wash 時，記得在 microcon 上的孔膜留些水分。

回答問題：

OD (optical density, 吸光值, 通常做比例後取對數表示) ”  $260/280 = 2.24$ ,  $260/230 = 2.3$ ”， $260/280$  表示 260nm 波長的光對 280nm 波長的光，經該物質的光強度比例，該值顯示應該是為核酸物質，且純度較高 ( $260/280 > 1.7$ ,  $260/230 > 2$ )。  $260/280$  決定核酸受蛋白質污染程度，而  $260/230$  決定核酸受其他有機物如 carbohydrate 污染程度。



第二天的部分：(上頁為掃描結果)

Hardware setting

(Red) Wavelength 635nm, PMT Gain (Voltage) 840, Power 33%

(Green) Wavelength 532 nm, PMT Gain (Voltage) 660, Power 33%

(兩者合起來所見掃描出來的黃光)

上頁圖則是我們當天掃描出來的影像結果。實驗紀錄如下，

1. 如果改變 PMT Gain 之大小，強度分布是可能會改變，可以從分析軟體中的 histogram 和 Intensity Ratio 中發現，我們這次實驗是希望 Intensity Ratio 介於 0.9~1 之間)
2. Label 的 unequal incorporation 問題：通常 532nm (綠色的部分) 會較 635nm (紅色的) 好，往往在之後的分析，需要藉著調整 PMT Gain 或是其他方式做 normalization，以利於進行後面的資料分析。

雖然我們沒有繼續進行之後的部分，不過分析軟體還可以進一步擷取某區域的結果和資料庫比對，進行結果分析。

### 問題與討論

1. 由於 Cy3 和 Cy5 的 labeling efficiency 不同，所以在實驗一開始時我們加入的 RNA 量是不一樣的，這樣操作的目的為何？假如沒有這樣調整，可能會出現什麼現象？

其實我們這次使用加入 RNA for Cy3 和 Cy5 量是一樣的 (是因為 RNA 已經純化了)，但是一般說來，雖兩者皆能 label dUTP 和 dCTP，但 Cy3 的 label efficiency 較好，該 photo emission 波長約為 510~550nm，為綠光，而 Cy5 的波長則是在 630~650nm，為紅光；既然 label 的效率不同，如果最剛開始未先做調整，等到最後掃描的時候，就會有 unequal incorporation of labels 的情況發生。

2. 實驗步驟三中，什麼是 low T-d NTP？加入 low T-d NTP 在實驗操作過程中有什麼用意？

Low T-dNTP 指的是 dTTP 濃度較低的 dNTP(去氧核糖核苷酸，合成 DNA 的原料)，我們可以從實驗講義中的解釋發現該步驟中的 low T-Dntp 的材料為：10mM 的 A,C, and GTP(應該是 dATP, dCTP, dGTP?)和 4mM 的 dTTP，其中 dTTP 的濃度較其他核苷酸少。

至於為什麼要使用 low T，則和 label 使用染劑 Cy3 和 Cy5 的特性有關，由於在反轉錄過程中，我們必須將帶有螢光染劑(Cy3 或 Cy5)的 dUTP 加到 cDNA，如果 dTTP 的濃度太高，那麼 dUTP 就沒有辦法順利的跟 RNA template 中的 Base A 配對，也就無法標記、掃描。一般說來 dUTP 的濃度約要是 dTTP 的 2~3 倍左右。

### 3. 就你所知，請問最後掃描出來的影像品質可能跟哪些因素有關？

掃描影像受到許多因素的影響，首先我們先針對 Hybridization Efficiency 的部分做討論，再從影像偵測的部分做討論：

影響 Hybridization 的因素有：

1. base pair 的親合力，如 C≡G 的 hybridization affinity 強過 A=T，因其氫鍵不同，可加入緩衝液將此影響減至最低。
2. 溫度的掌控影響 Hybridization 甚重，溫度太低將會嚴重影響其 efficiency，但溫度過高亦會影響分子結構，讓 hybridization 效果不佳或因此出現其他雜訊。我們在最後步驟所加的 Formamide，可以降低 hybridization 的反應溫度，並藉此減少背景雜訊。
3. 鹽類濃度，受核苷酸上之磷酸跟帶負電影響，鹽類離子之價電決定 Hybridization efficiency(因此在許多 Hybridization buffer 裡面會加入鈉離子以控制)
4. pH 值很容易影響核苷酸特性，太低的 pH 值會傷害含氮鹽基，而太高的 pH 值則會讓 base pair 的氫鍵能力減弱，都會影響到 Hybridization 的效果
5. 其他因素如 target molecule 和 probe molecule 的大小，也會影響反應效率（一般說來希望能夠用較小的分子，避免產生二次結構影響 hybridization efficiency）

除了實驗設計已經控制好的原料，讓 base pair 和分子大小有受限制之外，其他步驟決定於流程細心與否，是否控制好溫度、酸鹼鹽度和時間上的掌握等。再來我們討論影響影像偵測的因素。

影響影像偵測的因素有：

1. 我們在實驗掃描過程中，有些點特別亮，顯示其飽和情況，這樣會影響其他相對較暗點的偵測。
2. 由於影像偵測是藉由激發螢光轉為電信號，則激發光源的功率及增益等會影響我們最後得到的影像，我們使用兩種光源，分別是 635nm 和 532nm，通常會有 unequal 的情況發生，必須再進一步做 normalize 調整（不過這一部分我們沒有進一步處理），將 variation 控制在 10% 之內。
3. 解析度影響：雖然這部分已經由實驗室控制好了，不過操作上來說，一個 microarray spot 必須由 8 pixels(per dimension，所以整體來說至少要 64 pixels)以上來表示。
4. 背景雜訊，來自於 non-specific interactions between probe molecules and micro-array surface，可藉由 blocking schemes 或是較好的 labeling procedure, washing 等降低干擾。
5. 其他 noise 之干擾，例如在影像系統常出現的 Dark current, Electronic noise 或是 optical detection 來自非 microarray 上的反射信號干擾等等。

這部分大多由實驗室已經控制好了，但降低背景雜訊及盡可能避免飽和情況是我們先前在準備 sample 可以掌握的。

#### 4. 針對這個實驗提出看法或建議？

這個實驗對我們電機系的學生來說可說是相當新鮮，真的很感謝教授願意提供這樣的機會讓我們嚐試，並感謝助教，真是辛苦您了<(\_ \_)>。

雖然助教講解的很仔細，不過實際上在操作的時候還是有很多疑惑，我想建議可以在講義裡面附上一些器材的圖片，或是在講解的時候可以先拿給我們看過，可能會比較好理解☺