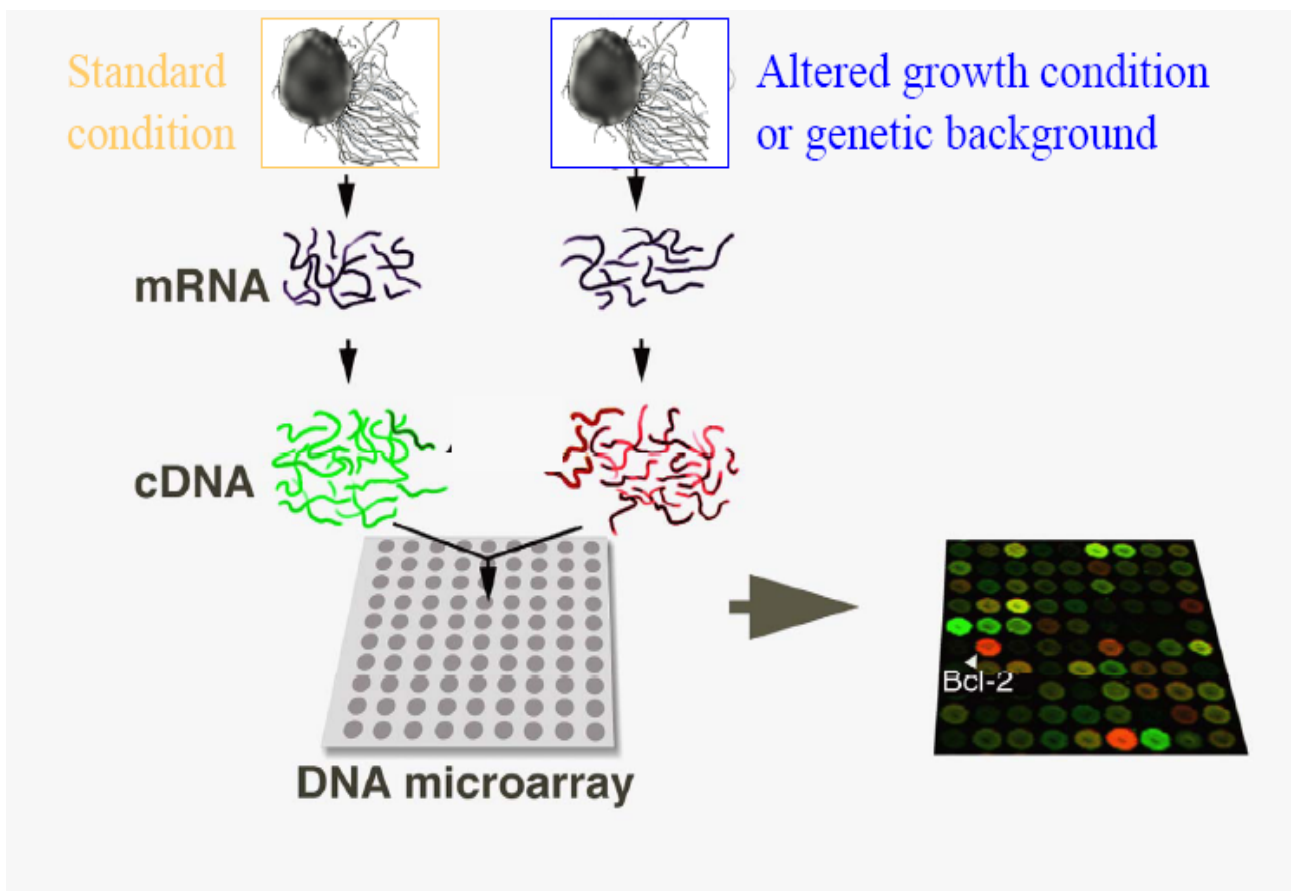


生醫工程實驗

實驗一、生物晶片實習

第二組： 電機三 吳政穎 B93901042
電機三 林王安 B93505018
電機三 黃大又 B93901151



From: <http://www.soe.ucsc.edu/classes/bme210/Spring07/Bio210-Lect1-Apr9.pdf>

實驗原理：

Microarray 微陣列法為 Brown P. 等人於 1995 年首度提出，亦是最早利用植物素材來剖繪基因表現(Gene expression profiles)差異的方法。其流程為

- (a). 經由聚合鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)且純化之基因片段以微矩陣佈放方式，再配合化學方法，將 DNA 固定於載玻片上。
- (b) 以分別標示上不同波長螢光分子的實驗及對照組核酸，同時與載玻片上的基因進行雜交反應。
- (c) 經過雷射光的激發及掃瞄後，放射出來的兩種波長的螢光可同時被收集並數位化，以用來估量基因表現的程度。此為目前技術最成熟，使用最廣泛的生物晶片類型之一。

實驗流程：

PART I：預備實驗

這部份的實驗是要我們養成正確使用 micropipet 的習慣。由於整個實驗的成功與否與 pipet 的使用有很大的關係，再加上 pipet 也不便宜，因此必需有正確的使用方法。

1. 使用 pipet 量取最大刻度的一半的水。
2. 精密量測所取到的量，和取同樣體積的同學比較值是否正確。

★ Pipet 的使用上，比較需要注意的有：

1. 使用前轉到欲取的體積刻度，由大刻度往下轉較精確。
2. 不要用手去碰 Tip，直接以 pipet 插入前端，再利用 pipet 的退 Tip 鈕將之卸下。
3. 吸的時後只壓第一段，放的時後先壓第一段再壓第二段。
4. 如果使用 pipet 加入溶液，應儘量避免造成起泡。
5. Tip 使用後，應卸下換新的 tip 再量取其他溶液，避免之前的溶液殘留影響。

討論：

請就你練習使用的結果討論你所使用的 Micropipet 是否準確？假如不準的話，可能是由於哪些原因造成這樣的結果？

基本上量到的值誤差也都在一定的範圍之內，但由於儲存量測到的液體的容器，每個都有點誤差，因此我們無法直接判斷量到的是否精準。再加上 pipet 也有精準位的極限，使用越大刻度的 pipet 誤差相對的比較明顯，而使用者的不當使用也會造成量測時的誤差。

PART II：生物晶片實驗

現在開始這次的實驗，整個實驗需兩天的時間完成。

第一天實驗：

主要是做 Target labeling 和 Hybridization 的動作：

目的：

兩管的 mRNA，經反轉錄成 cDNA，在反轉錄期間分別在 cDNA 尾端 (UTP) 或頭端 (GTP) 加入一種螢光標識，染有螢光黃 (Cy3) 的及染有玫瑰紅螢光染劑 (Cy5)。而加上螢光染劑原理是將原本鍵結 T 或 G 的打掉，換成含有螢光染劑 U 或 G 上去。

1. 取兩管 RNA，分別取 $20\mu\text{g}$ (Cy3 管) 和 $40\mu\text{g}$ (Cy5 管)。($20\mu\text{g} \rightarrow 6.75\mu\text{L}$, $40\mu\text{g} \rightarrow 13.5\mu\text{L}$)

☆ 需注意每次配出來的 purified RNA 濃度都不同，因此要計算適量體積來實驗。

- 2. 兩管加入 poly dT $2\mu\text{L}$ 。
- 3. 兩管加入 DEPC ddH₂O 至 $19\mu\text{L}$ 。
- 兩管於 65°C 下混合加熱約 15 分鐘。

Superscript reaction mixture：取另一管 eppendorf 配製此溶液

4. 混合 $5\text{X first strand buffer } 17.6\mu\text{L}$, $20\text{ X low T-dNTP } 4.4\mu\text{L}$, $0.1\text{M DTT } 8.8\mu\text{L}$,
 $\text{RNasin } 2.2\mu\text{L}$, $\text{Superscript II } 4.4\mu\text{L}$ ，配製溶液等下使用(*)。

☆ 這裡我們使用的是更小刻度的 pipet($10\mu\text{L}$)，以取到更精確的體積。

~15 分鐘過後~

5. 各取(*)溶液 $17\mu\text{L}$ ，加入 Cy3, Cy5 兩管。

- 6. Cy3 管加入 $1\text{mM Cy3-dUTP } 4\mu\text{L}$ ，Cy5 管加入 $1\text{mM Cy5-dUTP } 4\mu\text{L}$ 。
- ☆ Cy3-dUTP 為紅色的，Cy5-dUTP 為藍色的。

→ 在此的反應需在 42°C 避光環境下進行 60 min。

現在時間為 11:50 分，在此為非常難得的吃飯休息時間，但是時間不可太長，影響之後實驗進行。如果是在生技中心做實驗，男七應為最佳選擇。

回到實驗室，繼續進行 Stop transcription reaction and hydrolyze RNA：

7. 兩管各加入 $500\text{mM EDTA } 5\mu\text{L}$, $1\text{M NaOH } 10\mu\text{L}$ 。

→ 放入 65°C 的環境下反應 60 min。

這裡又有 60 min 的等待時間，但這時要接著做 Pre-hybridization 的部份。而這裡是我覺得整個實驗裡最困難的地方，也是非常容易影響結果的步驟：

目的： 在雜合反應之後，將沒有雜合的 probe 給篩洗掉，減少雜訊。

8. 準備蓋波片，在燈光下看，儘量選乾淨的以降低失敗的部份。

9. 準備 pre-hybridization buffer $100\mu\text{L}$ ，取 $37\mu\text{L}$ 滴在蓋波片上。再將載波片上的四角框對準蓋波片，將載波片蓋在蓋波片上。最後將它倒轉過來，讓比較小的蓋波片在上面。

- ☆ 這裡必須很小心，當滴 pre-hybridization buffer 在蓋波片上時，儘量不要產生氣泡。因為氣泡裡是沒有反應物質的部份，這會大幅降低成功率。必要時後可以不要按下第二段，以減少產生氣泡的可能性。如果有氣泡產生，應以小的 Tip 小心的將氣泡弄破，不應使用攪和的方式以致氣泡變多變小。

→ 10. 將波片放入一個隔絕水的容器(chamber)，在波片四周滴 $10\mu\text{L}$ 且分散的水滴，避免在水浴期間太過乾燥。一個容器可放兩個波片，最後必須梭緊此裝置不要讓水流進去。

→ 11. 將此裝置放入 42°C 水浴中，大約一個小時。

現在我們做的是 Purify labeled probe 部份，之前 Cy3, Cy5 兩管的反應時間也差不多快到了：

12. Vortex Bio-Spin 3000rpm，直到 gel 成白色後，除去下層(直接折斷)。再將上層放入一新

的ependorf裡→離心(4000rpm)。

☆ 這是一個很神奇的filter，但這東西是有劇毒的！

- 13. 取 TE 200 μ L to YM30，混合剛離心好的 elution 80 μ L (**).
- 14. Cy3, Cy5 兩管各加入 1M Tris 25 μ L，使總體積各為 80 μ L。再用 pipet 將兩管混合。
目的：兩種樣本相混合，帶有螢光的 probe 與晶片上的標的基因做雜合反應。
- 15. 最後和(**)混合，準備重複 washing 動作。

Washing：14000 rpm 15 min → 加入 400 μ L TE → 14000 rpm 15 min → ...

☆ 這部份大概重覆兩次，由於當天實驗時此步驟比較煩，所以由當天的實驗室學長幫我們處理，所以有點忘記其他細節部份。

16. 量測 elution，是否為 17 μ L？！如果不足，加入適量 TE buffer 來補足。

☆ 一般這裡的 elution 都不會剛剛好是 17 μ L。如果不足就必須使用高難度的操作技巧量取 TE buffer 以補足。比較麻煩的是當 elution 超過 17 μ L 時，由於不能確定 elution 中 cDNA 的量分布，再加上原先的 cDNA 量就很少。因此遇到這種情形就必須重新離心，大概要再多花 20 分鐘以上。

- 17. 將它放入 4000 rpm 離心 3 min。
- 18. 依序加入 COT-1 human DNA 1 μ L, yeast tRNA 1 μ L, poly A 1 μ L。
- 19. 總共 20 μ L，denature at 90°C 2 min，再將它放在冰上(***)。

在 19. 等待時，可以邊將剛才 Pre-hybridization 的部份完成：

20. 從水浴中取出裝置，將波片取出。手指夾住有字的那一端，將它浸泡在 ddH₂O 中 2 min，使蓋波片掉落。

- 21. 再讓它浸泡在 Isopropanol 中 2 min。
- 22. 將它放入 dry 乾機中，以 600 rpm dry 5 min。

Hybridization：

23. 取 hybridization buffer 20 μ L，加入(***)，體積應為 40 μ L。

- 24. 取 37 μ L 點到剛 dry 乾的 array 上，要注意不要有氣泡出現，否則還是會失敗。
- 25. 將它置於 42°C 水浴中過夜。成敗已定！

第二天實驗：

掃瞄顯像，此部份已與成功與否無關。

目的：經由電腦程式分析其呈色結果。

此部份應於避光環境下進行：

26. 取出 slide，依序進行四次 dunk 的動作。

☆ 每一次大概上下搖動 200 下，浸泡 5 分鐘後再到下一個。

- 27. 依序為：2 X SSC, 0.1% SDS → 1 X SSC, 0.1% SDS → 0.2 X SSC → 0.05 X SSC。
- 28. 於 600 rpm 中 dry 乾 5 min。
- 29. 完成，掃瞄在電腦上看結果。

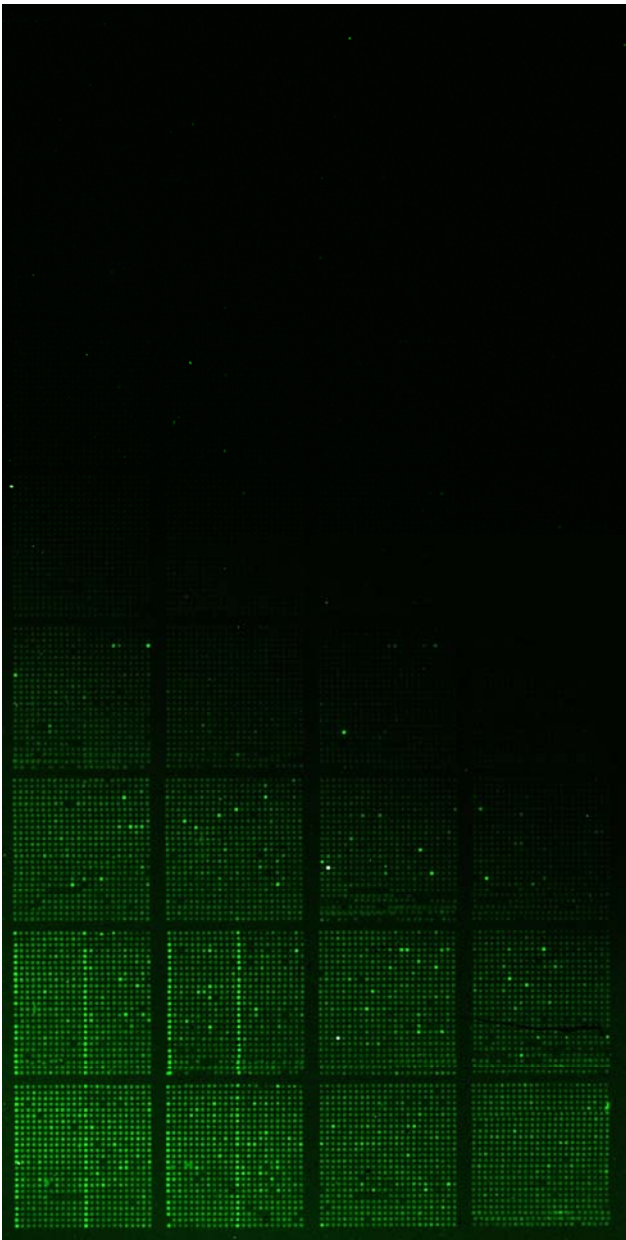
實驗結果分析：

最後的曝光掃描為不可逆反應，因為 cDNA 在經過多次曝光後會被破壞。且不能在空氣中放太久，也會使 cDNA 變質而無法得到結果。因此在完成 28. 之後，如果掃描器有其它 microarray 正在使用，應先將 dry 乾後的 array 放在暗處，儘量不要讓時間過長。

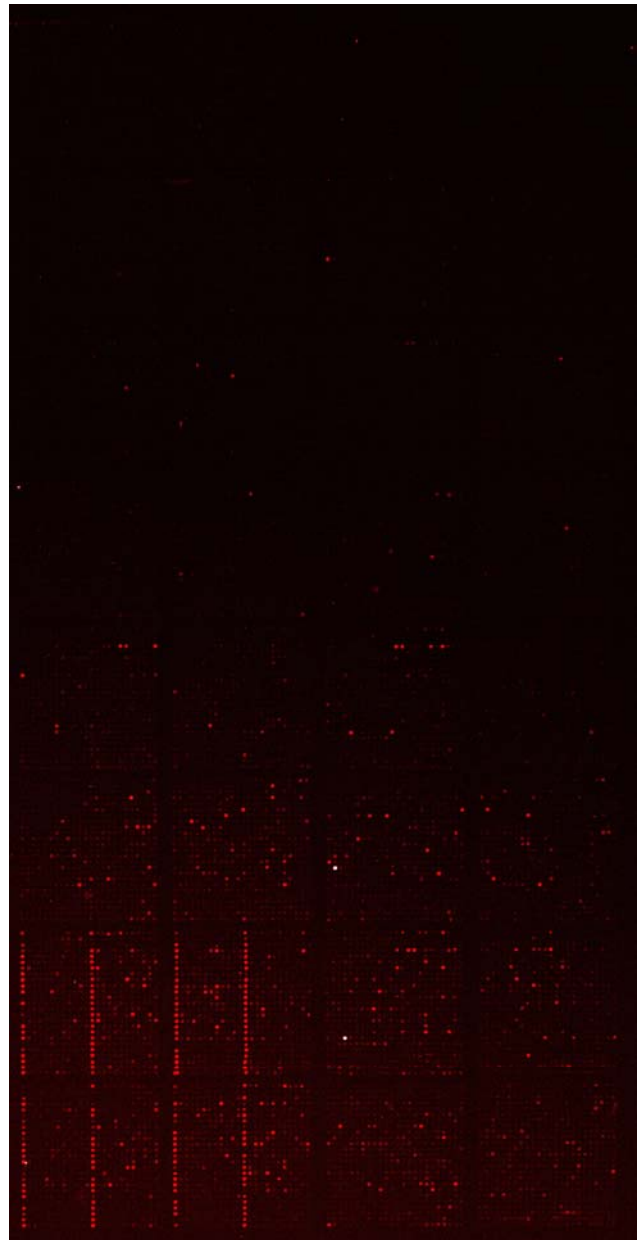
由於我們實驗的兩組 mRNA 是相同的，因此使用 Cy3 和 Cy5 的兩管標定的 mRNA，所產生的 cDNA 與 microarray 雜合效果應該相同。由於 Cy3 的激發光源為 532nm 綠光雷射，激發放光為 565~595nm 間；Cy5 的激發光源為 635nm 紅光雷射，激發放光在 655~685nm 之間。所以最漂亮最理想的 output 應為整片黃光。

下面圖形為掃描後的結果：

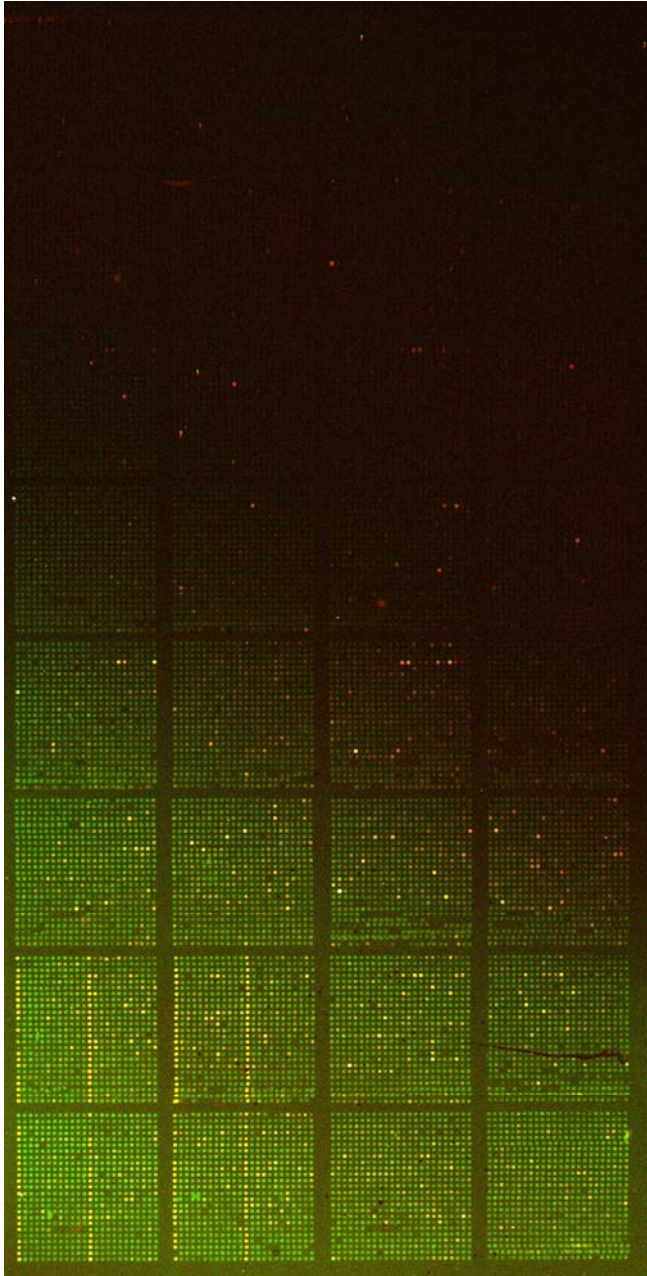
▼ 以 532nm 綠光激發：



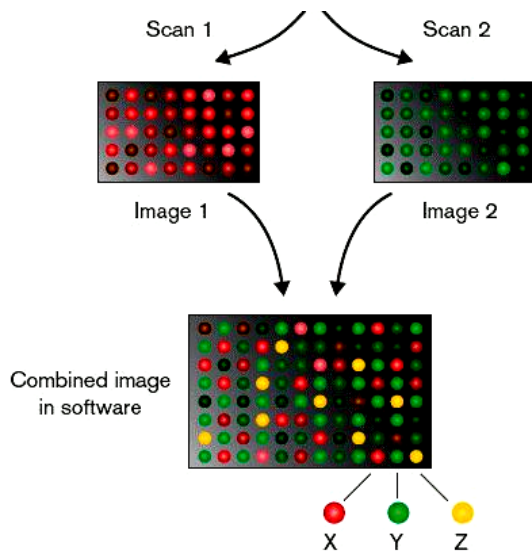
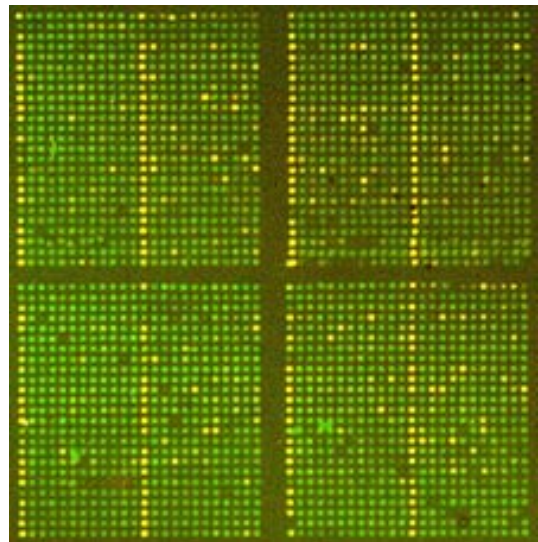
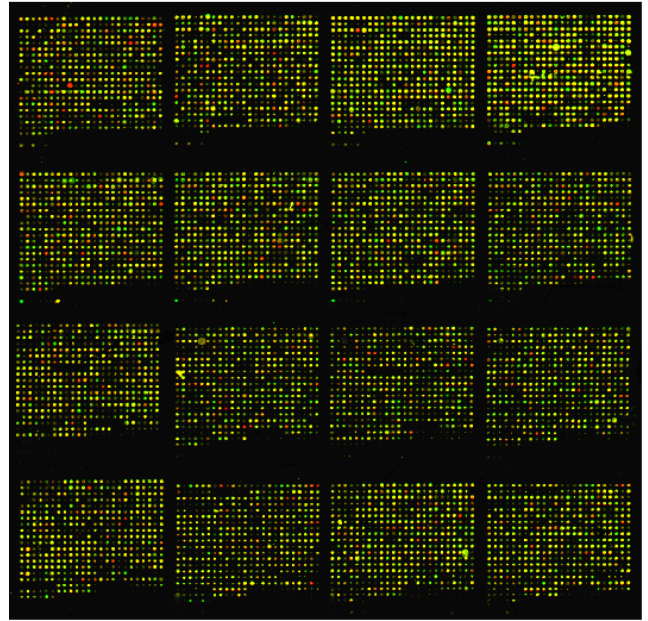
▼ 以 635nm 紅光激發：



▼ 532nm 綠光 + 635nm 紅光激發：



▼ 較理想的掃描結果：



◀ 結果判讀：

將分別掃描之兩者影像，使用軟體結合後，可得出其合併結果：

● 紅色者為 RNA 1 表現較強部份

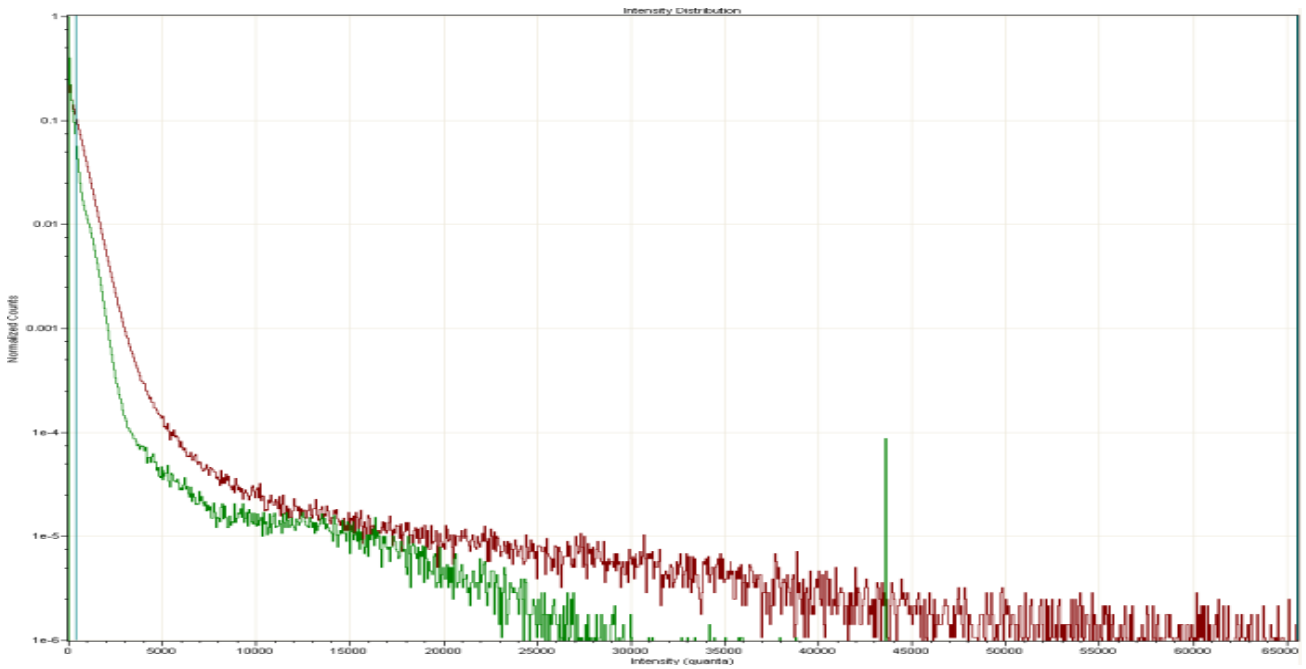
● 綠色者為 RNA 2 表現較強部份

● 黃色者則為兩者表現強弱相似

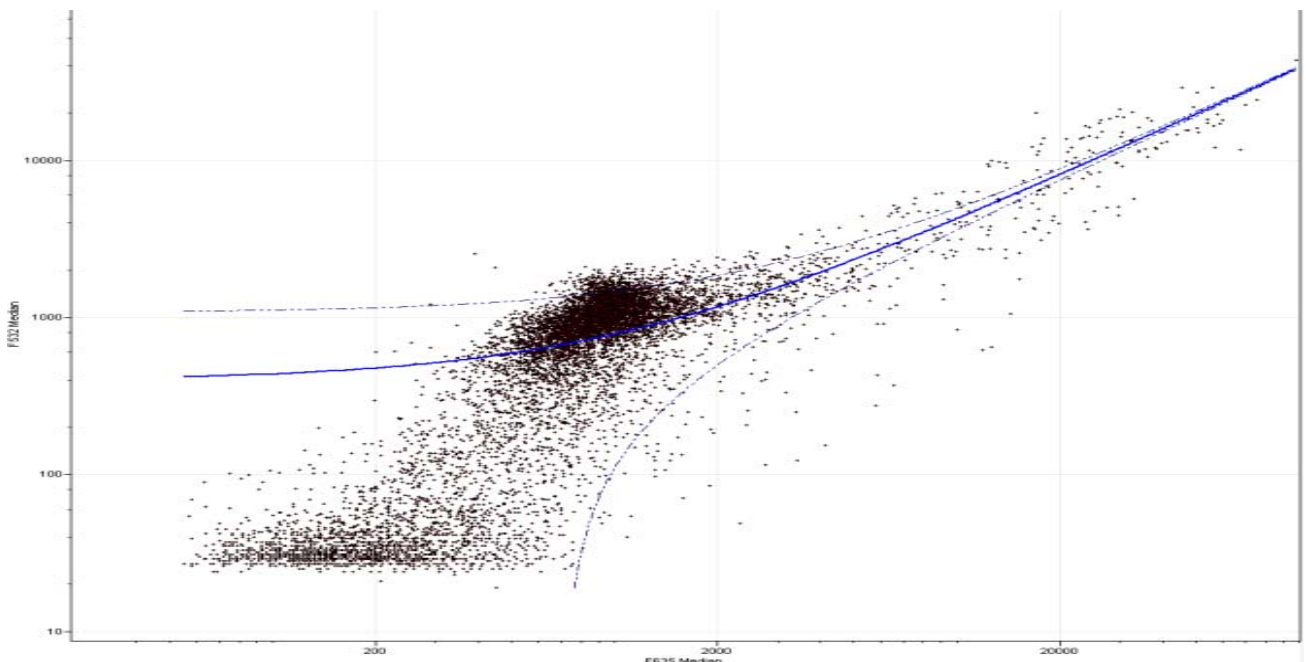
Comments :

1. 我們的掃瞄結果圖形中，很明顯得可以看到上半部都無法有效顯像。當然這其中原因非常多，但很有可能是在步驟 24 的時後，在蓋上 array 時不小心讓氣泡產生。印象中在此步驟時，滴上蓋波片有一個小氣泡，之後用 Tip 弄破之後，還剩一個非常小的在旁邊。於是當我們蓋上 array 之後，或許那小氣泡就變大了，但是我們當時沒注意到(因為這要在避光的環境下做)，所以這可能是最大的原因。
2. 左下角那四個區塊，理論上應該呈現相當明顯的四條黃線(如上圖所示)。這代表反應有發生，也就是所有藥品都有進入反應。
3. 圖形上半部也可發現幾個特別亮的點，理論上這些點是可以正常呈現的。
4. 利用軟體 GenePix Pro，將 output 圖形作分析：

▼ Histogram :



▼ Scatter Plot :



- (1). Histogram : x :intensity, y :normalized counts。可以看出兩種光在整個輸出圖上的影響，包括 intensity 大小以及量的多少。
- (2). Scatter Plot : x :F635 Median, y :F532 Median。這是將每個基因所顯示出的顏色取 Median，分別算出 532nm 和 635nm 之下的情形，所呈現的分布圖。如果兩者的值很接近，代表這個點應呈現黃色。由趨勢線可看出，我們的 output 不是很理想，應該還是跟那個步驟 24.時產生的小泡泡有關。所以，我深刻體會到，這個實驗要做得好其實需要非常多的經驗與技巧，並沒有那麼容易做成功。

問題與討論：

1. 由於 Cy3 跟 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。請問這樣操作的目的為何，假如沒有這樣的調整可能會出現什麼現象？

因為我們是用 Cy3 和 Cy5 來 label cDNA，如果讓一開始用的 RNA 量相同，由於 Cy3 和 Cy5 label 的 efficiency 會有差異(Cy5 較差)，因此會造成一大片綠色的 output。也正因如此，我們會讓加入 Cy5 管的 RNA 量比較多。這樣操縱的目的是希望藉由 RNA 量分配的不同，在轉成 cDNA 之後能讓 Cy3 和 Cy5 能 label 下相近的數量。這樣才可以有效的從掃描結果判讀出反應情形。

2. 實驗步驟三中，什麼是 low T-dNTP？加入這個 low T-dNTP 在實驗操作過程中有什麼用意？(Please discuss this term focusing on LOW T)

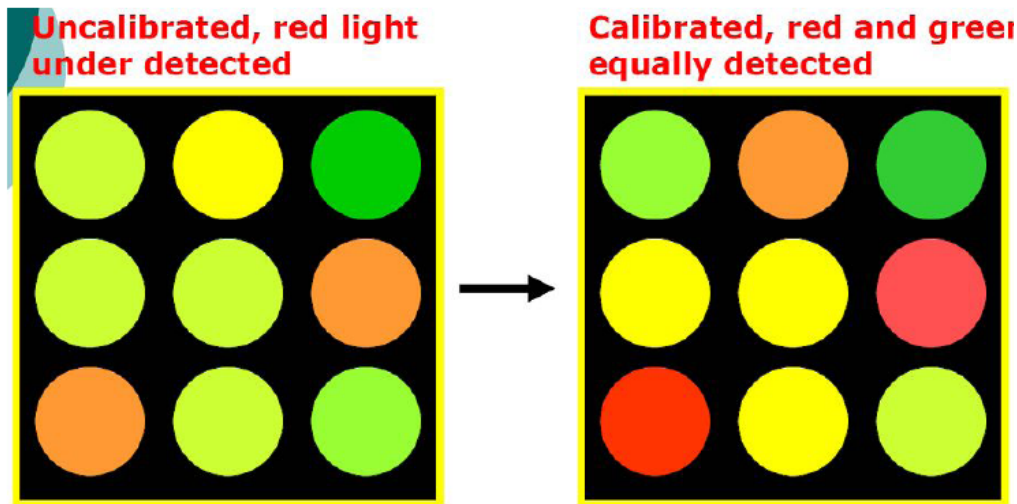
NTP(Nucleotide Triphosphate)，一般廣義指 A(Adenosine), T(Thymidine), C(Cytidine), G(Guanosine)四種合成 DNA 的原料。low T-dNTP 是有許多 NTP 的溶液，是其中”T”是指濃度較低的 dNTP。dNTP 一般適用於鹼基序列的確認，在實驗中會用到比較低濃度，一般是因為要做染色。在反轉錄過程，如果 dNTP 濃度太高，會導致鹼基的配對無法順利合成，一般會在 T 上面加上螢光染料，然後 T 會和 A 結合，這樣就可以做進一步分析。所以說 low T-dNTP 是一種低濃度，用於 T 的染色劑(T-dNTP)。

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？

可能造成影像品質不佳的情形非常多，最根本的還是我們對於整個實驗的不熟悉以及信心度不足。做這種一點點誤差就會失敗的不可逆實驗確實是一大挑戰，所以我想這是個很重要的原因。除了個人因素之外，影響電腦正確辨識反應點的因素也有許多：

1. 反應點大小或形狀不正確 (Irregular size or shape)
2. 反應點強度太弱反應點間互相渲染干擾 (Spot variance)
3. 背景污染干擾 (background variance)

另外有一個有趣的東西：資料正規化，它也會影響掃描出來的影像品質。下圖中左圖為未正規化資料，右圖則是已正規化之資料，明顯可看出正規化後的顏色較為鮮明易辨認。



4. 對於這個實驗，你有沒有什麼看法或者建議？

我們覺得實驗速度是稍微拖長了一點，其實整個步驟並不是特別多，但因為實驗的進行是一組一組分別執行，所以效率上比較不好(如果可以的話，**pipeline** 應該比較好，能 **parallel** 就更好)。不過也因為這是一個非常燒錢的實驗，所以助教為了確保每一個步驟都是正確的執行這倒也無可厚非，不過還是希望能有多一點學長姊來帶大家應該會更有效率，也才有比較多的機會讓我們認識整個實驗，而不僅僅按照流程一步一步操作而已。基本上這個實驗能夠學的東西其實非常非常的多，光是每個藥品的用法以及每個流程之中如何銜接都是一門很大的學問，甚至連蓋一個蓋玻片，要如何避免氣泡產生，都必須依靠許多的經驗以及累積的熟練度才能做到最好。但我真的覺得這東西很厲害，確實是相當了不起的成就，對於從來沒看過生物晶片的我們來說，能動手操作已經相當難得了。本實驗讓我們對於生物晶片的認識應該只是算一個起步吧，而我們相信經過這次實做實驗之後讓我們對生物晶片有更深一層的接觸與了解。

實驗心得感想：

以前在閱讀雜誌以及參觀竹科的時候曾經聽過「生物晶片」這個新潮的名詞，卻對它一點概念也沒有，拜這次實驗之賜，學校花了這麼多錢讓我們了解生命科學領域裡這麼前衛的技術，實在是太幸運了。

這個實驗對藥品劑量的要求那麼的精確，再加上藥品的成本又這麼高昂，因此我們需要非常精確的滴管；第一次拿到 **Pipet** 的時候，我真的相當驚訝而且佩服，這麼精準的東西，到底是怎麼做出來的呢？旋轉調整的刻度和前端的免洗噴嘴都需要對我們來說相當神奇的機械技巧含流體力學的搭配才做得到吧，看來生醫工程的發展也是需要各種學門的專家集合起來才能有所突破。

在做這個實驗的時候，可以體認到經驗是相當重要的，每個步驟是否確實完成都事關成敗，甚至速度快慢影響曝光時間也會影響實驗結果的可靠性。換句話說，這樣子的實驗需要非常高度的熟練度，我們這組的成果說真的不太明顯，雖然左下部分的點幾乎都表現出應有的黃色，但是其他地方都蠻淒慘的，我覺得最有可能發生問題的步驟就在會後一次蓋載玻片

的時候，我不小心在上面留下了一個不小的氣泡，這個氣泡會造成什麼影響我也不太清楚；或者其他步驟也有很多出錯的可能更未可知。助教們說這些事他們幾乎每天都在做，那麼為什麼不能發展出一套機器，只要輸入流程他就會自動做好所有工作？以機械手相較於人更精確、更具重複動作能力的特性來說，不是更適合這個實驗嗎？電機相關知識除了處理生物訊號方面對生醫工程領域能有大助力以外，設計控制實驗流程的系統似乎也會很有幫助。如此一來，生醫實驗將會更有效率吧。

Reference :

1. http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols/ampprotocol_3.html
2. <http://www.soe.ucsc.edu/classes/bme210/Spring07/>
3. <http://www.soe.ucsc.edu/classes/bme210/Spring07/Bio210-Lect1-Apr9.pdf>
4. <http://www.soe.ucsc.edu/classes/bme210/Spring07/Bio210-Lect2-Apr11.pdf>
5. <http://life.nthu.edu.tw/~lseduip/U-BET/ubet/F4/312.ppt>
6. http://bbsc.imb.sinica.edu.tw/biotech/15_17.pdf
7. http://users.rowan.edu/~jansson/spring03/frontiers/Present2003/Biochips_final.ppt
8. <http://juang.bst.ntu.edu.tw/BCT/Chapters/Chap3-1.htm>
9. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201175>
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/DNTP>