

生醫工程實驗
實驗一
生物晶片實習

第三組

B93910064 蔡希鈞

B92901079 林光威

B92901031 黃俊仁

實驗原理：

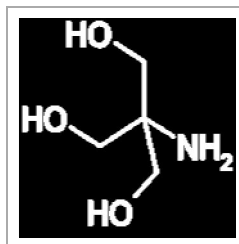
DNA 晶片的原理是將數千或數萬點 (spot)，單股的 DNA 又稱探針 (probe)，主要有兩種來源：核苷酸 (oligonucleotide) 和已經存在於基因庫中的互補核苷酸 (cDNA)。以高密度的方點製在拇指般大的晶片上，其材料可能為玻璃片或是尼龍薄膜。方法之一的寡核苷酸晶片主要是由 Affymetrix(位於加州的 Santa Clara) 這家生技公司所製造。他們主要是利用 DNA 的 A、T、C、G 四種鹼基，用類似築摩天大樓的方式，一個個不同的組合，築上約 20~25 個寡核苷酸。方法二的互補核苷酸的晶片主要是利用從病人的檢體或是其他的生物體抽取出的已知的互補核苷酸，然後將這些互補核苷酸點在晶片上。

實驗步驟：

見後流程。

實驗用藥劑及其功能：

- 1.poly dT：mRNA 反轉錄 cDNA 用的 primer
- 2.DEPC ddH₂O：有加入 RNase inhibitor 的水 而且有滅過菌
- 3.lowT-dNTP:見問題討論
- 4.DTT：dithiothreitol；還原劑 可以保護 -SH 基
- 5.RNasin：RNase inhibitor 也就是 RNA 分解酶的抑制劑
- 6.Superscript II：逆轉錄酶



- 7.Tris：三羥甲基氨基甲烷，緩衝用。

8.

SSC：Standard saline citrate

SDS：十二烷基磺酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (也就是一種肥皂)

可以讓蛋白質變性，通常配合 DTT 使用以穩定還原態的雙硫鍵

BSA：bovine serum albumin 牛血清白蛋白，這是在做 in situ hybridization 時

在加入 probe 之前要先加的 buffer，裡面的成分主要都是用來穩定 RNA，還有降低蛋白質污染背景值用的。

9.Isopropanol：異丙醇

10.TE：Tris+EDTA:緩衝並除去一些二價離子。

11.COT-1 human DNA

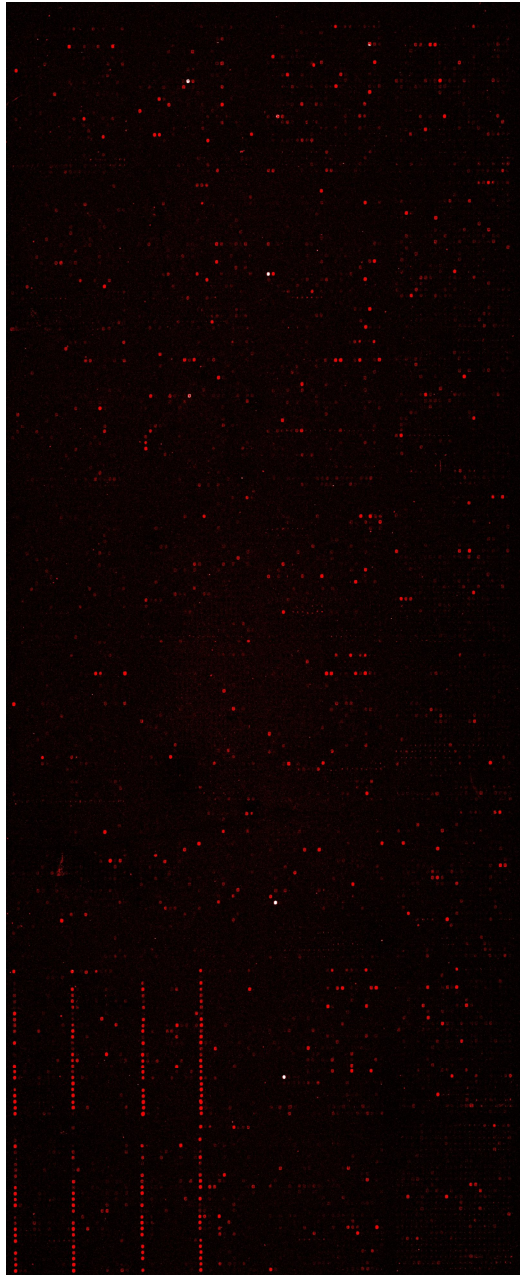
12.yeast t-RNA

13.poly A : 防止 mRNA 反轉錄出的 DNA 與目標進行不正常或不正確的配對

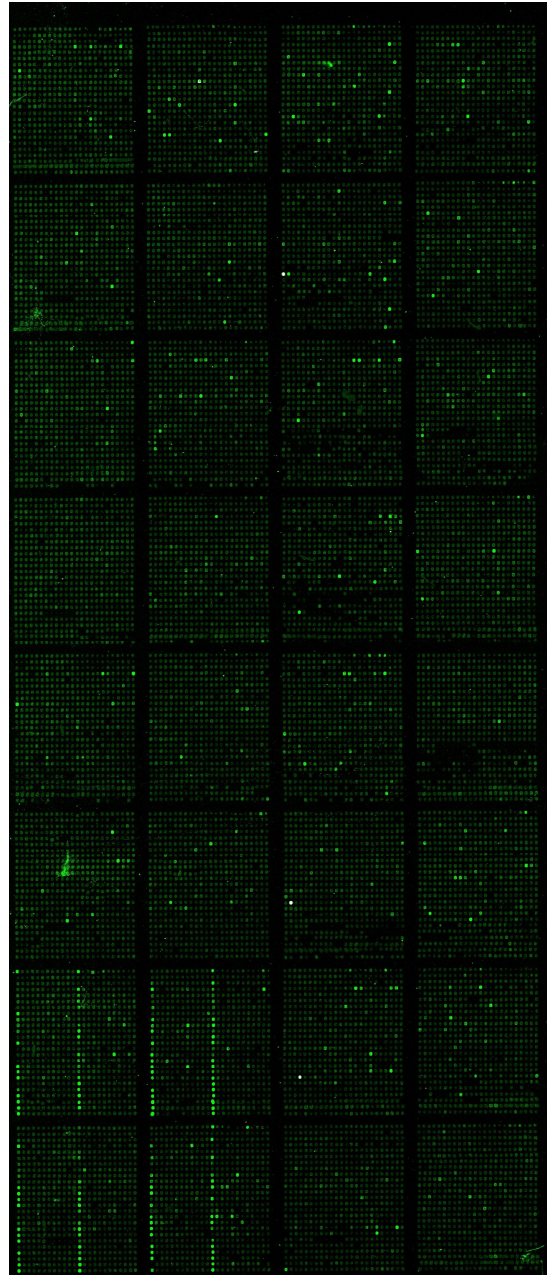
14.Formamide : 穩定 RNA 。

實驗結果：

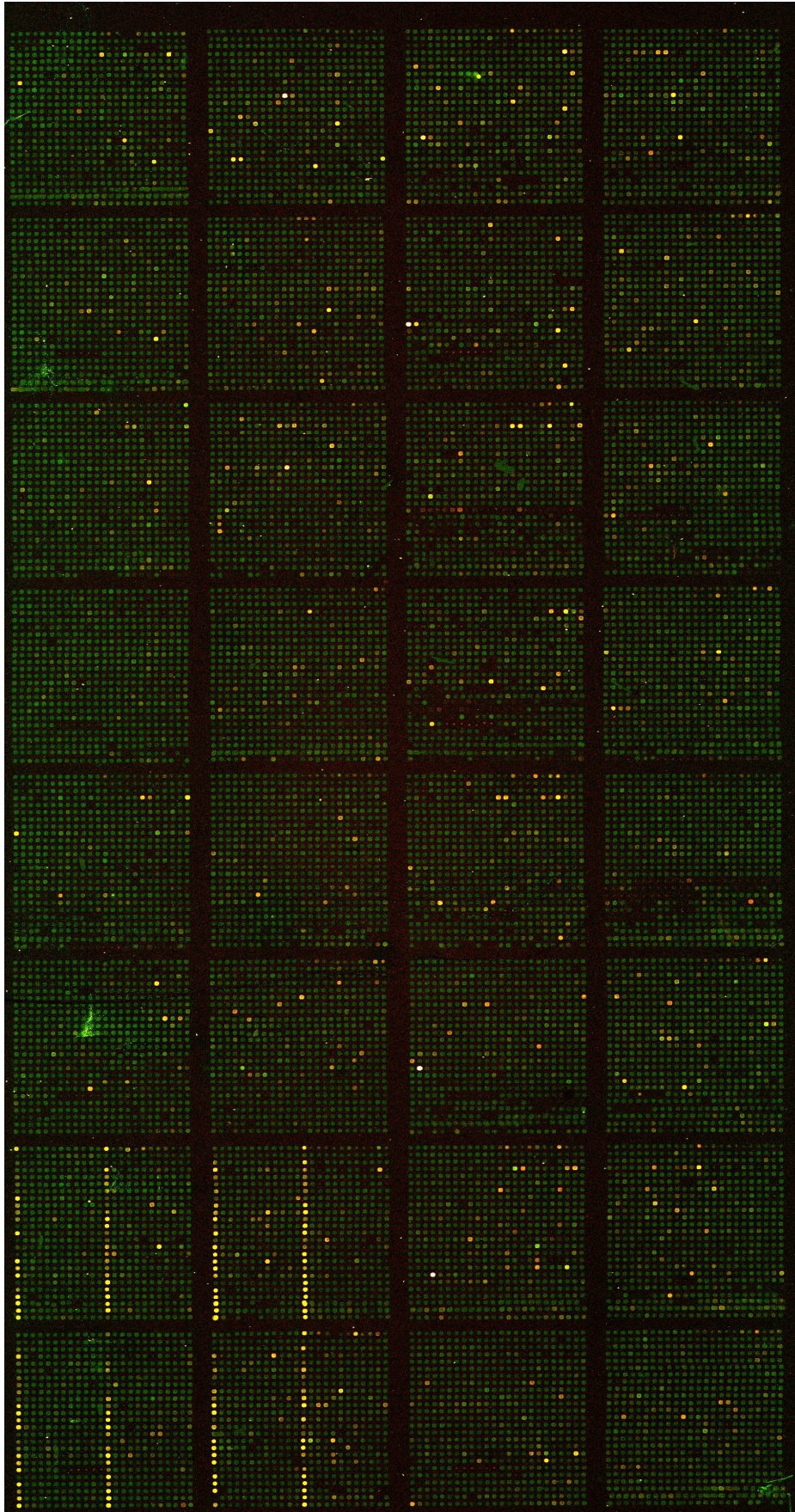
532nm : (Cy3)

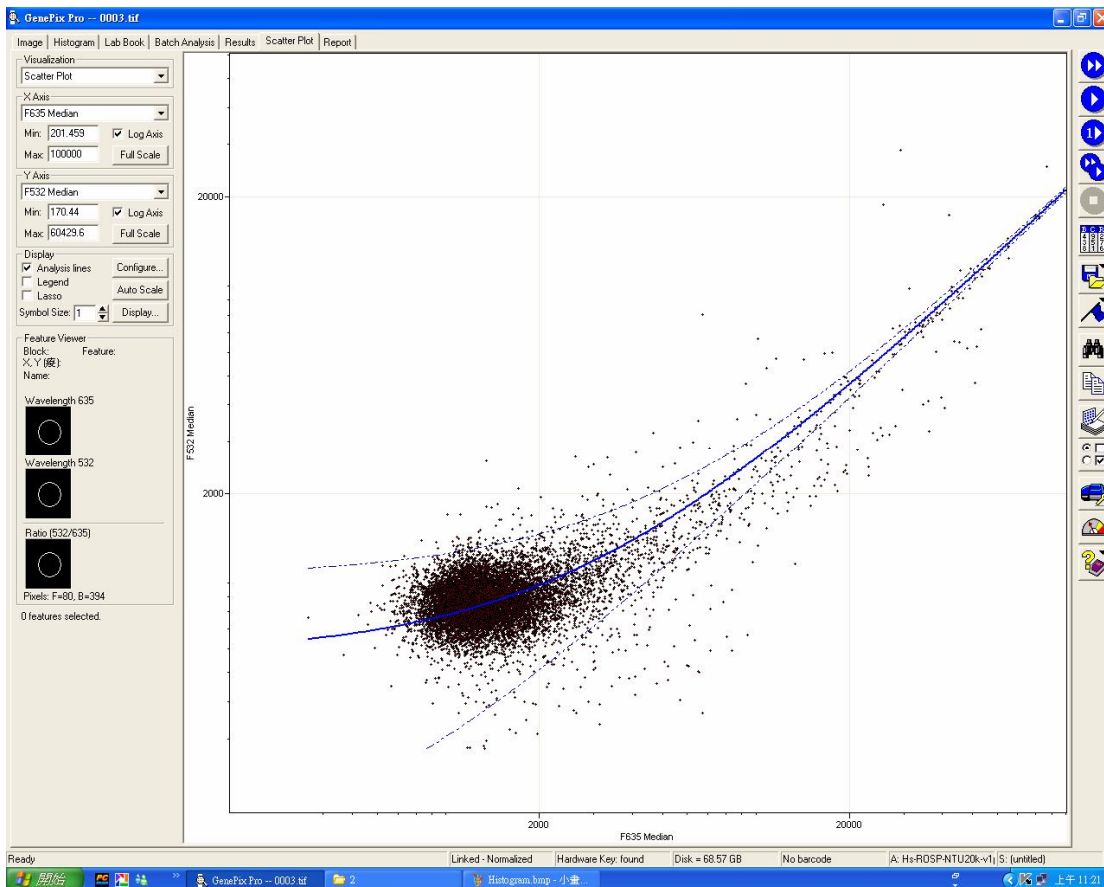
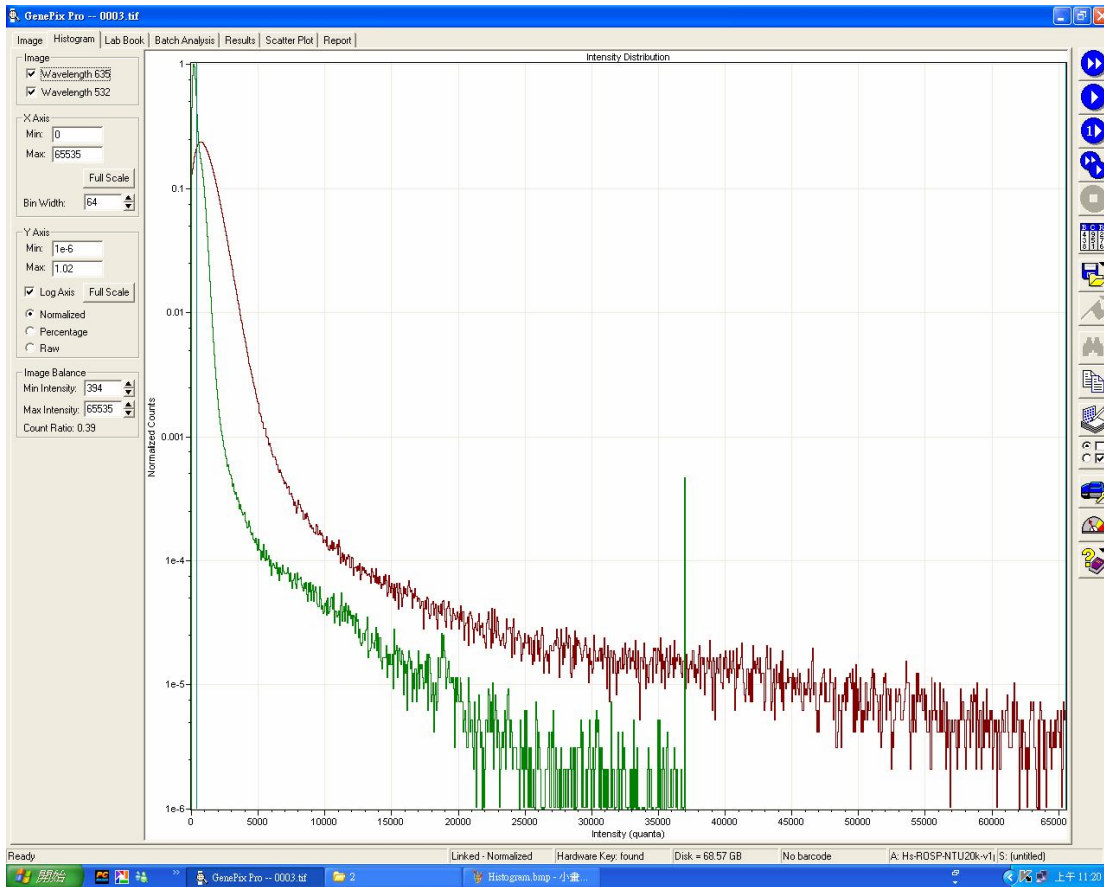


635nm : (Cy5)



532nm&635nm :





討論：

相較於去年來說我們的結果算是比較好的（至少有出現黃點），但與理想的全部都出現黃點仍相差許多。會產生誤差的原因有很多。如：

1. pipet 的不熟練造成在很小的刻度下容易產生很大的誤差，雖然在後期有學長的幫忙，但持續的累積下造成結果的不佳
2. 我們使用的是含有 mRNA、rRNA、tRNA 的藥品，其中 mRNA 的含量大約只有 3%~5%，再加上不見得所有的 mRNA，所以有些點沒有反應出來加上實驗過程中 RNA 的耗損是十分正常的。
3. 實驗步驟的不熟練加上參與實驗的組別過多導致有些只能在一般環境下保存很短暫時間的樣本停留過久造成變質。或是像例如在滴至玻片時產生了不該產生的氣泡導致樣本的大量耗損或是在溶液混合時沒有混合均勻也會產生問題，諸如此類的誤差也大量的累積。
4. 器材的瑕疵導致在如此小微度的實驗下產生巨大的誤差，例如說載玻片上的一點塵埃或是不平都會對掃描產生不良的影響
5. 實驗時的環境也會影響結果。例如說溫度或是濕度的因子都會讓有機的反應物產生變化導致誤差。

在掃描的圖中我們可以看到左下角有四條黃線，這表示基本上實驗並沒有失敗，這四條是人類最主要表現的基因，所以正確的實驗步驟應該會讓這四條黃線正常的出現。而我們的黃點出現的頻率已經是各組之中最高的，協助實驗的學長也表示這樣的一個結果在初次做生物晶片的人來說算是十分成功的。從第一張 Intensity Distribution 的圖中我們看出 Cy3 的接合能力比 Cy5 要來得好。再從第二張的 Scatter Plot 中理論上應該所有的點都要落在 45 度的線上，但因為誤差產生所以落在 45 度線的附近，在兩條曲線內。我們大部分的點都落在這些區域中表示我們的結果還不至於太差。

問題：

1. 因為 Cy3 與 Cy5 他們與鹼基的接合能力不同，Cy3 的接合能力較好。若使用一樣 RNA 量，那麼 Cy5 會接合上鹼基的量就會比 Cy3 少上許多。根據 Cy5 的量應該要比 Cy3 多上至少 1.66 倍
2. lowT dNTP 是指 dATP、dGTP、dCTP 以及比較少量的 dTTP 的混合溶液。因為 cDNA 中含有少量的 U 而這些 U 是用來做標定的。所以必須要有部分的 dTTP 來使 cDNA 有更好的表現。
3. 掃描的品質基本上就與誤差的產生有直接的關連，有關誤差的部分在討論的部分已做了探討。在此針對於一些非誤差的因素做討論。
 - (i) AT 鍵結為雙鍵，GC 鍵結為單鍵。若 AT 鍵結較多則成像的品質會較差，若 GC 鍵較多則成像品質較好。
 - (ii) 實驗中有許多步驟都是單純為了讓成像品質更好。例如說像

pre-Hybridization 就是爲了讓成像不被雜訊干擾所增加的步驟。

4. 這次的實驗做起來十分的冗長，但因爲步驟本來就需要一定的時間加上我們對實驗的不熟悉讓實驗又更加的漫長。不過這實驗對我們來說還算新奇，因爲是很久沒碰的化學加生物。而且能夠藉由這種強力的工具來做以往做不到的事又能夠把好幾個領域結束在一起十分不錯

心得：

光威：

參考資料：

<http://en.wikipedia.org/wiki/Tris>

<http://ultrasound.ee.ntu.edu.tw/belab/Exp1Group1.pdf>

http://ultrasound.ee.ntu.edu.tw/belab/Exp1_handout.pdf

<http://www.ncku.edu.tw/~cbst/biochip.htm>

