

行政院農業委員會所屬各機關出國報告

(出國類別：研究)

蛋白質微陣列技術的建立

服務機關：財團法人台灣動物科技研究所

出國人職稱：博士後研究員

姓名：曾博修

出國地區：美國

出國期間：中華民國91年8月30日至91年10月13日

報告日期：中華民國91年12月

I6/
CO9106089

公務出國報告提要

頁數: 40 含附件: 否

報告名稱:

蛋白質微陣列技術的建立

主辦機關:

行政院農業委員會

聯絡人/電話:

蔡慶雄/23126988

出國人員:

曾博修 生物科技組 博士後研究員

出國類別: 研究

出國地區: 美國

出國期間: 民國 91 年 08 月 30 日 -民國 91 年 10 月 13 日

報告日期: 民國 92 年 01 月 20 日

分類號/目: I6/生物學 I6/生物學

關鍵詞: 蛋白質微陣列, 蛋白質晶片,cDNA 微陣列

內容摘要: 基因的表現並不能與數以百萬計的蛋白質表現劃上等號, 因而帶動蛋白質體學的研究, 尤其是蛋白質晶片之發展。爲了發展高科技檢測技術平台, 應用在經濟性動物(包括豬、雞、牛、羊等), 特別是疾病檢疫或者是各種生長性能方面; 自民國九十一年八月三十日至十月十三日止, 奉赴美國加州大學聖地牙哥分校(University of California San Diego, UCSD)微陣列中心(ArrayCore), 進行爲期四十五天之cDNA 微陣列研習及蛋白質微陣列技術平台建立之合作實驗, 內容包含微陣列中心設施、蛋白質微陣列材料測試、蛋白質微陣列實驗、蛋白質微陣列資料分析。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

目 錄

	頁碼
壹、 摘要	2
貳、 緣起與目的	3
參、 研習過程	6
肆、 研習內容	
一、微陣列中心設施.....	9
二、蛋白質微陣列設計及材料準備.....	16
三、蛋白質微陣列實驗.....	22
四、蛋白質微陣列資料分析.....	34
伍、 研習心得之檢討與建議	38

壹、摘要

基因的表現並不能與數以百萬計的蛋白質表現劃上等號，因而帶動蛋白質體學的研究，尤其是蛋白質晶片之發展。為了發展高科技檢測技術平台，應用在經濟性動物(包括豬、雞、牛、羊等)，特別是疾病檢疫或者是各種生長性能方面；自民國九十一年八月三十日至十月十三日止，奉赴美國加州大學聖地牙哥分校(University of California San Diego, UCSD)微陣列中心(ArrayCore)，進行為期四十五天之 cDNA 微陣列研習及蛋白質微陣列技術平台建立之合作實驗，內容包含微陣列中心設施、蛋白質微陣列材料測試、蛋白質微陣列實驗、蛋白質微陣列資料分析。

貳、緣起與目的

提起蛋白質晶片的應用，目前所稱的生物晶片一直沒有明確的定義與分類；一般而言是泛指應用半導體策略以矽晶片、玻璃或高分子為基材，以微小化技術整合微機電、光電、化學、生化、醫學工程及分子生物學等領域，用以執行醫療檢驗、環境檢測、食品檢驗、新藥開發、基礎研究、軍事防禦、化學合成等用途的精密微小化設備。

其實，生物晶片最早的應用可追溯到一九九一年的波灣戰爭，美軍為了預防伊拉克發動生化戰，需要一種可以大量供應軍隊使用，快速檢測多種生化毒性的試劑，生物晶片的概念於是誕生。生物晶片依照功能分類可以分成感測晶片(Sensing Chip)和處理晶片(Processing Chip)。其中感測晶片包含基因晶片(DNA Chip)、蛋白質晶片(Protein Chip)和其他生物感測晶片等。處理晶片包含檢體前處理晶片(Sample Preparation Chip)、電泳及複製晶片(CE&PCR Chip)和多功能處理晶片(Lan-on-a-Chip)等。而這些不同功能的生物晶片又可依照應用的領域劃分成三類：(一)、研究用領域—生物研究、醫學研究和新藥研究等，(二)、臨床檢驗用領域—血液篩檢、健康檢查、疾病檢測、感染病原檢測等，(三)、非醫學用領域—環境檢驗、食品檢驗、軍事偵測、警檢辨識鑑定等。

分析工具的研發，無疑是朝向分析速度快、應用性廣泛、結果精準及使用便利等方向來發展，因此一個在理想狀態下能快速有效診斷出疾病、篩選藥物、生化分析的蛋白質晶片，正被積極的發展中。現在蛋白質晶片的狀況，就如同數年前基因晶片的情況一樣，雖在早期，但著實充滿期待。所以，未來在基因發展到達一個里程碑(milestone)之後，對於蛋白質體學的研究，將會有愈來愈多的基因體學及基因晶片研究者欲跨足至蛋白質領域中，這也將更突顯出蛋白質晶片的重要性。

隨著人類基因的解碼，目前研究結果顯示人類基因約有 3 至 4 萬個。在生理表現來說，基因表現並不能與數以百萬計的蛋白質表現劃上等號，因此在基因體研究如火如荼進行的同時，許多科學家也加速發展蛋白質體學，在技術研究的發展中，工具的供應者是往往是事先的獲利者，因此蛋白質分析工具成為研發的主軸。待基因和蛋白質功能陸續釐清後，對於健康與醫藥科技發展及應用會是無遠弗屆。

目前，經濟性動物（包括豬、雞、牛、羊等）之基因體定序計畫也已在歐美及大陸等國家如火如荼展開，相信完成之日指日可待。所以不論是對於人類或動物之疾病診斷，為求得科技創新成果，蛋白質晶片之發展與應用，將會是必然之途。而本計劃之目的，就在於研習蛋白質晶片的技術平台(platform)，並配合目前整個畜產界基因體計劃的進行，一但找到任何有關的蛋白質，期待不論是與動植物疾病或者是與各種生長性能方面，相信都能以此技術平台，迅速的發展及製成診斷或是鑑定用的蛋白質晶片之相關產品。

參、研習過程

依據行政院農業委員會民國九十一年會議決議辦理。會議中通過討論有關「農業高科技人才培育」議題，決議運用農委會經費派員出國研習蛋白質微陣列技術平台。在多位長官大力支持、多方尋求協助及本所持續不懈之聯繫及努力下，終定於八月下旬成行。

加州大學聖地牙哥分校 (UCSD) 是加州大學十個分校之一。位於氣候溫暖的南加州，UCSD 緊鄰著有豐富歷史及治安良好的城市 La Jolla。其中最為出色的科系是生物系及醫學院，而院長錢煦院士(Dr. S. Chien) 之 Whitaker 基金所支持及創辦的生物工程學院及微陣列中心，更是美國全國各大校中的喬楚。

此次有幸能參與微陣列中心之研習並學習微陣列相關技術，承蒙其中多位微陣列中心資深研究人員 Dr. Julie, Suli Yuan, Jianmin Lao, Dr. Jane Li, Ian Lian, Jerry Norwich 等人進行學習及實驗的合作交流，對於微陣列技術及蛋白質微陣列及生物資訊的處理，有更深一層認識及心得。



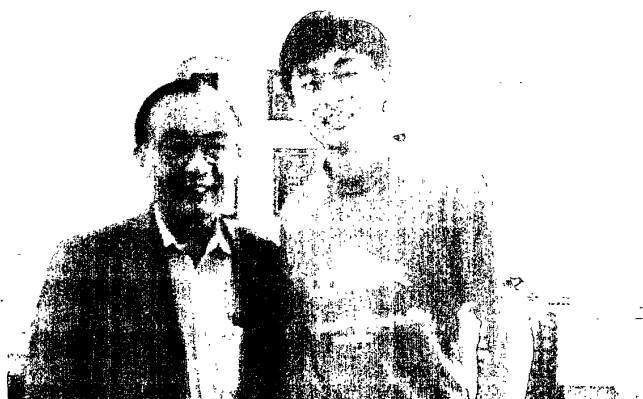
圖一、加州大學聖地牙哥分校極具特色之 Geisel 圖書館

資將參與研習之日程，表列述如下：

日 期	星 期	研 習 內 容
8 月 30 日	五	搭機前往
8 月 31 日	六	過換日線，轉機前往
9 月 1 日	日	假日、熟悉環境
9 月 2 日	一	報到、文件申報作業
9 月 3 日	二	參觀實驗室
9 月 4 日	三	實驗結果及實驗設計綜合討論會議 (1)
9 月 5 日	四	參觀微陣列中心實驗室
9 月 6 日	五	準備實驗所需試劑及材料
9 月 7 日	六	準備實驗所需試劑及材料
9 月 8 日	日	假日
9 月 9 日	一	見習點陣機操作及點針置換
9 月 10 日	二	微陣列研討會
9 月 11 日	三	實驗結果及實驗設計綜合討論會議 (2)
9 月 12 日	四	見習 cDNA 微陣列實驗操作
9 月 13 日	五	見習 cDNA 微陣列實驗操作
9 月 14 日	六	準備蛋白質微陣列打點
9 月 15 日	日	假日
9 月 16 日	一	蛋白質微陣列打點
9 月 17 日	二	見習螢光掃描機操作
9 月 18 日	三	實驗結果及實驗設計綜合討論會議 (3)

日 期	星期	研 習 內 容
9 月 19 日	四	測試蛋白質微陣列玻片
9 月 20 日	五	見習影像定量及分析軟體
9 月 21 日	六	進行蛋白質微陣列之測試試驗
9 月 22 日	日	假日
9 月 23 日	一	進行蛋白質微陣列之測試試驗
9 月 24 日	二	進行蛋白質微陣列之測試試驗
9 月 25 日	三	實驗結果及實驗設計綜合討論會議 (4)
9 月 26 日	四	進行蛋白質微陣列之測試試驗
9 月 27 日	五	進行蛋白質微陣列之測試試驗
9 月 28 日	六	微陣列影像定量及分析
9 月 29 日	日	假日
9 月 30 日	一	進行蛋白質微陣列之測試試驗
10 月 1 日	二	進行蛋白質微陣列之測試試驗
10 月 2 日	三	實驗結果及實驗設計綜合討論會議 (5)
10 月 3 日	四	進行蛋白質微陣列之測試試驗
10 月 4 日	五	微陣列影像定量及分析
10 月 5 日	六	微陣列資料分析整理
10 月 6 日	日	微陣列資料分析整理
10 月 7 日	一	蛋白質微陣列資料分析整理及討論
10 月 8 日	二	成果報告

日期	星期	研習內容
10月9日	三	奈米技術應用在心血管研究及微陣列實驗設計之專題演講及綜合討論會
10月10日	四	蛋白質微陣列資料分析總整理與討論
10月11日	五	實驗之階段性檢討與資料備分和交接
10月12日	六	轉機、搭機回程
10月13日	日	過換日線，搭機回程



圖二、與生物工程學院及微陣列中心創辦人錢煦教授
在加州大學聖地牙哥分校合影。

肆、研習內容

一、微陣列中心設施

1、蛋白質晶片的衍生及歷史

蛋白質晶片與基因晶片的製造及檢測基本模型相似，是將蛋白質或片段物質（peptide 或特定分子）固定於一小塊載體的表面，然後再和篩檢藥品或其他蛋白質進行反應（如酵素連結免疫分析反應，ELISA），用於檢測抗原或抗體。Protein array 的運用與 DNA array 有相同的概念相似，都是將成千的蛋白質點排列在一片載體上。但相對於基因晶片，因為蛋白質的合成及擴增較 DNA 難，且固定時容易發生結構改變而導致蛋白質失去原性（denaturation），因此以蛋白質為探針的蛋白質晶片的製造技術比 DNA 晶片來得複雜。

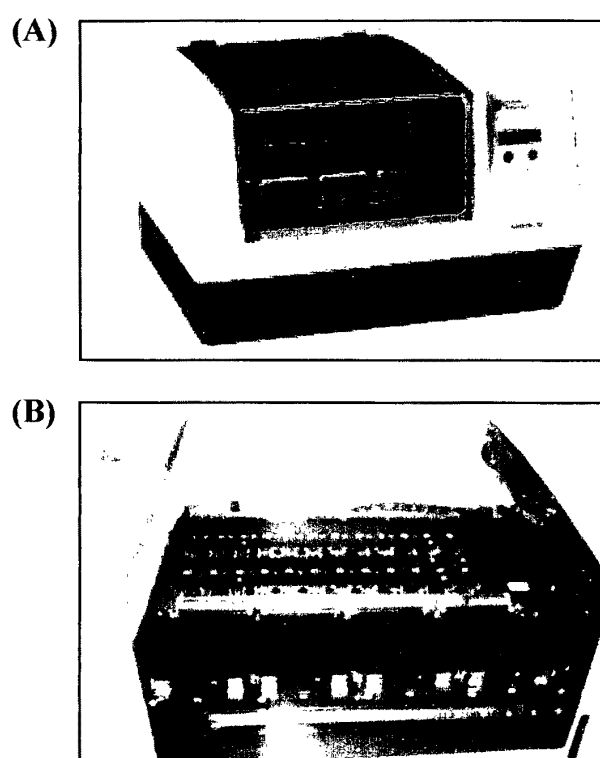
現階段而言，蛋白質晶片所使用的探針可概分為蛋白質探針（抗體及特定蛋白質）及非蛋白質探針（peptide 及特定分子），蛋白質探針與載體的接合度及蛋白質穩定度（易受環境影響）是目前發展的主要瓶頸，各生技公司也紛紛開發不同的技術平台來克服此一問題。除了探針類型不同之外，各生技公司也開發不同的蛋白質晶片偵測技術，螢光標定法為一般基因晶片的定性偵測方式，亦可用於蛋白質晶片。由於蛋白質分子較基因片段來得大且具 3D 立體結構，因此檢測的方式亦較多樣化，目前已經實際運用於蛋白質晶片的偵測技術螢光標定法之外，尚有 SELDI（Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization，表面增強雷射吸附/離子化）及 SPR（Surface Plasmon Resonance，表面薄膜共振）。

2、微陣列中心之實驗器材介紹

在加州大學聖地牙哥分校微陣列中心所使用的點陣機，為

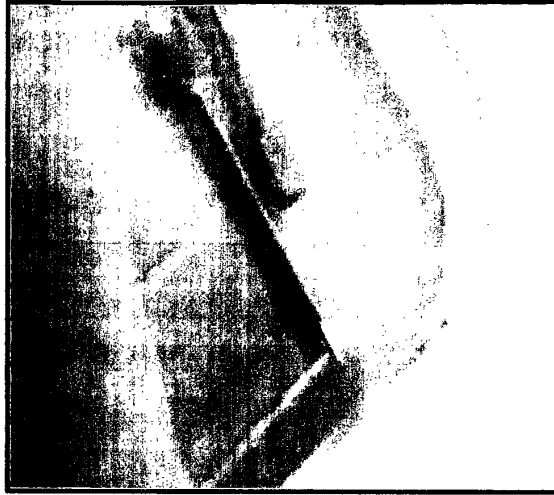
PacKard BioScience 公司所出品的 SpotArray™24, 具有溫度及溼度
監控微調設定的功能, 可確保打點時樣品不致揮發。

SpotArray™ 24
Microarray Printing System

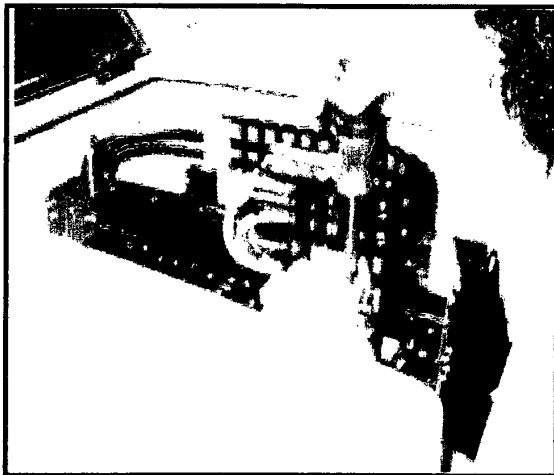


圖三、(A)為 SpotArray24 點陣機(B)為其內部空間鳥瞰

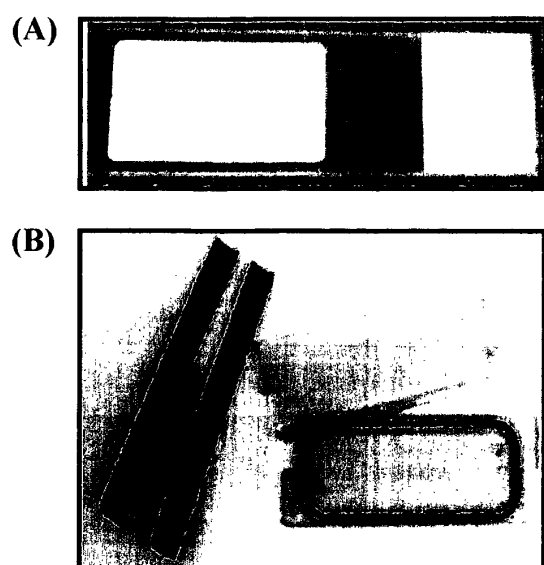
微陣列中心其他相關設備介紹如下：



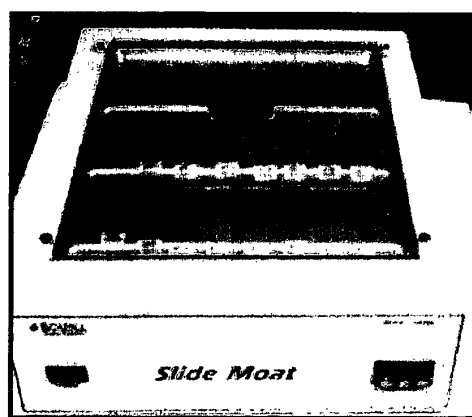
圖四、 用來打點的固態針(Solid Pin)。



圖五、 置換用來打點的針之情形。



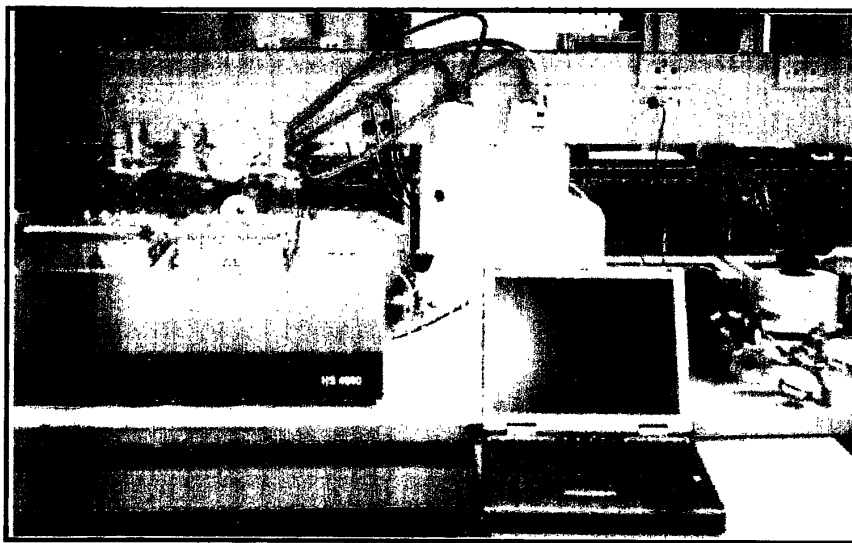
圖六、(A)所使用的 S&S 公司的 NC 玻片載體以及(B)為執行雜交反應的容器



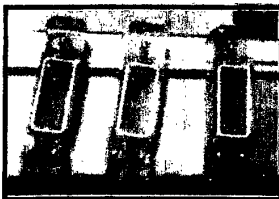
圖七、晶片乾燥用之烘乾機

另外介紹一台在該中心展示的自動晶片清洗及雜交機器,是由德國TECAN研製的HS4800機型(圖八)。是由機身及電腦微處理中心兩大部份組成,具有微流體的晶片反應容器以及精確溫度控制。只要將所想要的反應步驟輸入,並將所要用的溶液放入可調控溫度的面板上的容器,即可進行自雜交之後的所有步驟,直到進行訊號的掃描(如圖)。

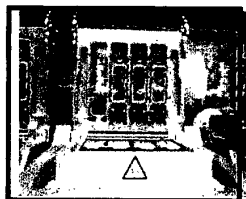
(A)



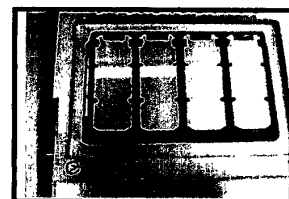
(B)



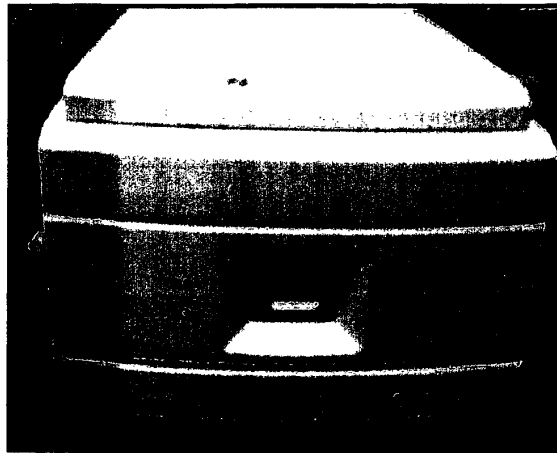
(C)



(D)



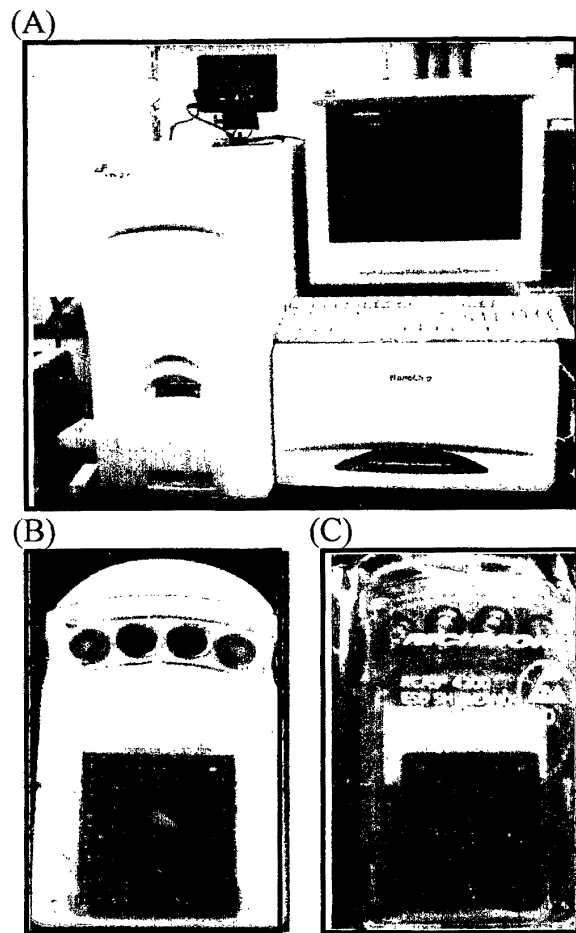
圖八、(A)為晶片雜交及自動清洗機(TACAN) (B)是微流體雜交容器(C)為裝置好之微流體雜交容器(D)為晶片載台。



圖九、為晶片掃描機(Packard Bioscience)



圖十、為微陣列中心點之點陣機及晶片掃描機之放置情形一瞥。



圖十一、奈米晶片系統 (A)為整套系統全覽
(B)為晶片管線構造圖(C)為晶片實物

奈米晶片系統主要由三大部份組成。一是樣本裝置主機部份，包含蛋白質或基因等樣品以及分析和資料處理。二是晶片掃描機部份，其上方還有一即時監看系統(箭頭所指)，可直接觀察晶片內微流之狀況。另一部份為晶片，共有 100 個樣本放置槽，其中分別佈滿微流管路。

二、蛋白質微陣列設計及材料準備

蛋白質微陣列材料，抗體，抗原及反應試劑。

表一、作為蛋白質微陣列材料所使用的抗體詳細資料如表所示,共分為十八個樣品，加上 BSA 作為負對照組(Ab19)以及有 biotin 標示的二次抗體作為正對照組(Ab20)。

名稱	重量	體積	濃度	稀釋(十倍連續稀釋, 並分別命名如下)
IL-2 MoAb	500 ug	500 ul	1mg/ml	1mg/ml(Ab1), 0.1mg/ml(A2), 0.01mg/ml(Ab3)
IL-3 PoAb	25x2 ug	50 ul	1mg/ml	1mg/ml(Ab4), 0.1mg/ml(Ab5), 0.01mg/ml(Ab6)
IL-4 MoAb	500 ug	500 ul	1mg/ml	1mg/ml(Ab7), 0.1mg/ml(Ab8), 0.01mg/ml(Ab9)
IL-5 PoAb	25x2 ug	50 ul	1mg/m	1mg/ml(Ab10), 0.1mg/ml(Ab11), 0.01mg/ml(Ab12)
IL-6 MoAb	500 ug	500 ul	1mg/ml	1mg/ml(Ab13), 0.1mg/ml(Ab14), 0.01mg/ml(Ab15)
TNF- α MoAb	500 ug	500 ul	1mg/ml	1mg/ml(Ab16), 0.1mg/ml(Ab17), 0.01mg/ml(Ab18)

表二、作為蛋白質微陣列材料所使用的抗原，其配置詳細資料如表所示。

名稱	重量	體積	濃度
IL-2	50 ug	100 ul	0.5mg/ml
IL-3	10 ug	20 ul	0.5mg/ml
IL-4	10 ug	20 ul	0.5mg/ml
IL-5	10 ug	20 ul	0.5mg/m
IL-6	20 ug	40 ul	0.5mg/ml
TNF- α	50 ug	100 ul	0.5mg/ml

表三、作為蛋白質微陣列材料所使用的 Biotin 標示的抗體其配置詳細資料如表所示。

Biotin Ab	Pack.	PBS	Conc.
IL-2	25 ug	50 ul	0.5mg/ml
IL-3	25 ug	50 ul	0.5mg/ml
IL-4	25 ug	50 ul	0.5mg/ml
IL-5	25 ug	50 ul	0.5mg/m
IL-6	25 ug	50 ul	0.5mg/ml
TNF- α	25 ug	50 ul	0.5mg/ml

ALL products were purchased from PeproTech EC Ltd

排列設計

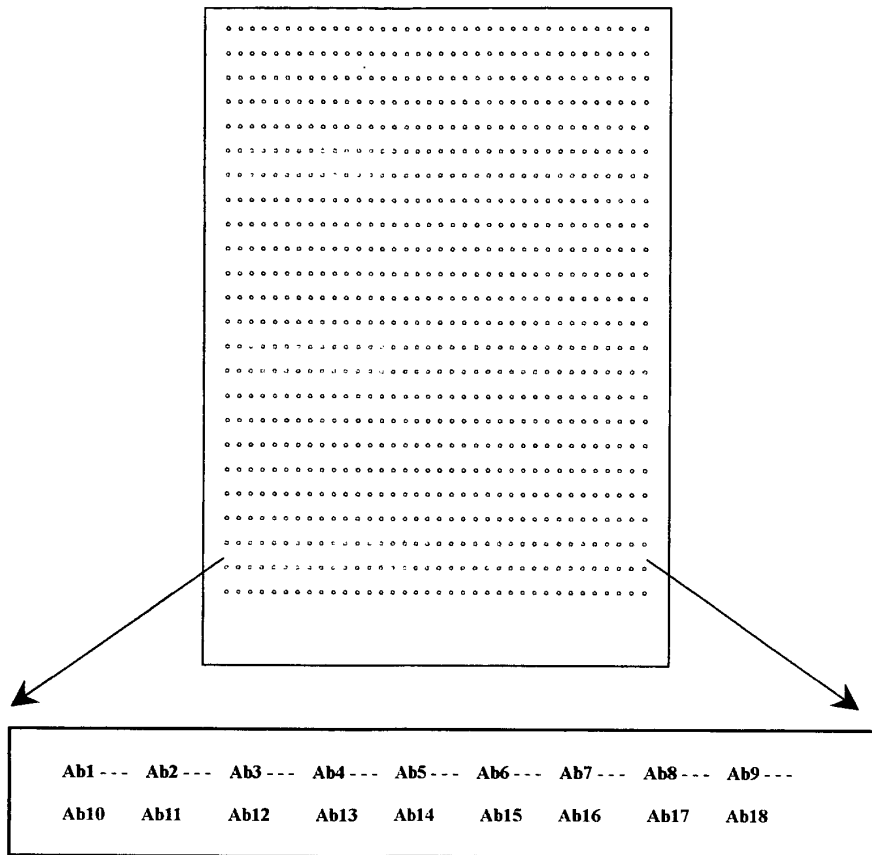
作為蛋白質微列材料所使用的抗體詳細資料如表一所示,共分為十八個樣品,分別為六種細胞激素的抗體及其稀釋液。為簡化稱謂,依序分別叫做 Ab1 到 Ab18。除此之外,再加上 BSA 作為負對照組 (negative control group, Ab19) 以及有 biotin 標示的二次抗體作為正對照組 (positive control group, Ab20), 共計有二十個要打點的樣品。為了使打出的點能夠有一致的規律性, 必須將要打上的蛋白質樣品放置於 384 well 盤中正確的位置。

以下是第一次的測試 Plate design, 只安排 18 個樣品, 蛋白質點位置的放置在 384 well ELISA plate 中。

表四、18 個樣品依序標示為 Ab1 ~ Ab18。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A					Ab11					Ab10					Ab9										
B					Ab12					Ab11					Ab10										
C					Ab13					Ab12					Ab11										
D					Ab14					Ab13					Ab12										
E					Ab15					Ab14					Ab13										
F					Ab16					Ab15					Ab14										
G				Ab1	Ab17					Ab16					Ab15										
H				Ab2	Ab18				Ab1	Ab17					Ab16										
I				Ab3					Ab2	Ab18					Ab1	Ab17									
J				Ab4					Ab3						Ab2	Ab18									
K				Ab5					Ab4						Ab3										
L				Ab6					Ab5						Ab4										
M				Ab7					Ab6						Ab5										
N				Ab8					Ab7						Ab6										
O				Ab9					Ab8						Ab7										
P				Ab10					Ab9						Ab8										

微陣列的軟體為 SpotArray24 (Packard BioScience) 每個點會有 4 個重複, 若以一支 solid pin 打點 每個點直徑會有 250 um spot 每兩個點之間的位置, 550 spot spacing 如此設計之後, 則打出的點會有每一列 36 個。本次實驗之 18 個樣品則會有兩列, 示意圖如下

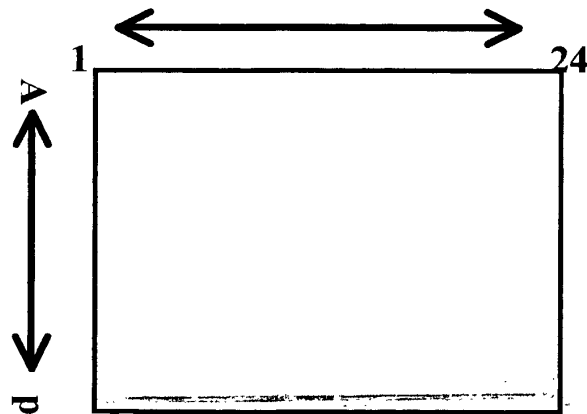


圖十二、十八個樣品(Ab1 ~ Ab18)點出來會是剛好兩行, 如紅點所表示的位置。每行有 36 個點, 第一行剛好是樣品 Ab1 到 Ab9 重複四次, 第二行則剛好是樣品 Ab10 到 Ab18 重複四次。而三個重複則是同樣樣品放了三次所致。

但是若採用 4 repeats 以 4 pins 來打點 則相對的時間會節省三倍以上。以下是第二次測試的設計，以及樣本在 384 wells plate 排列之情形。

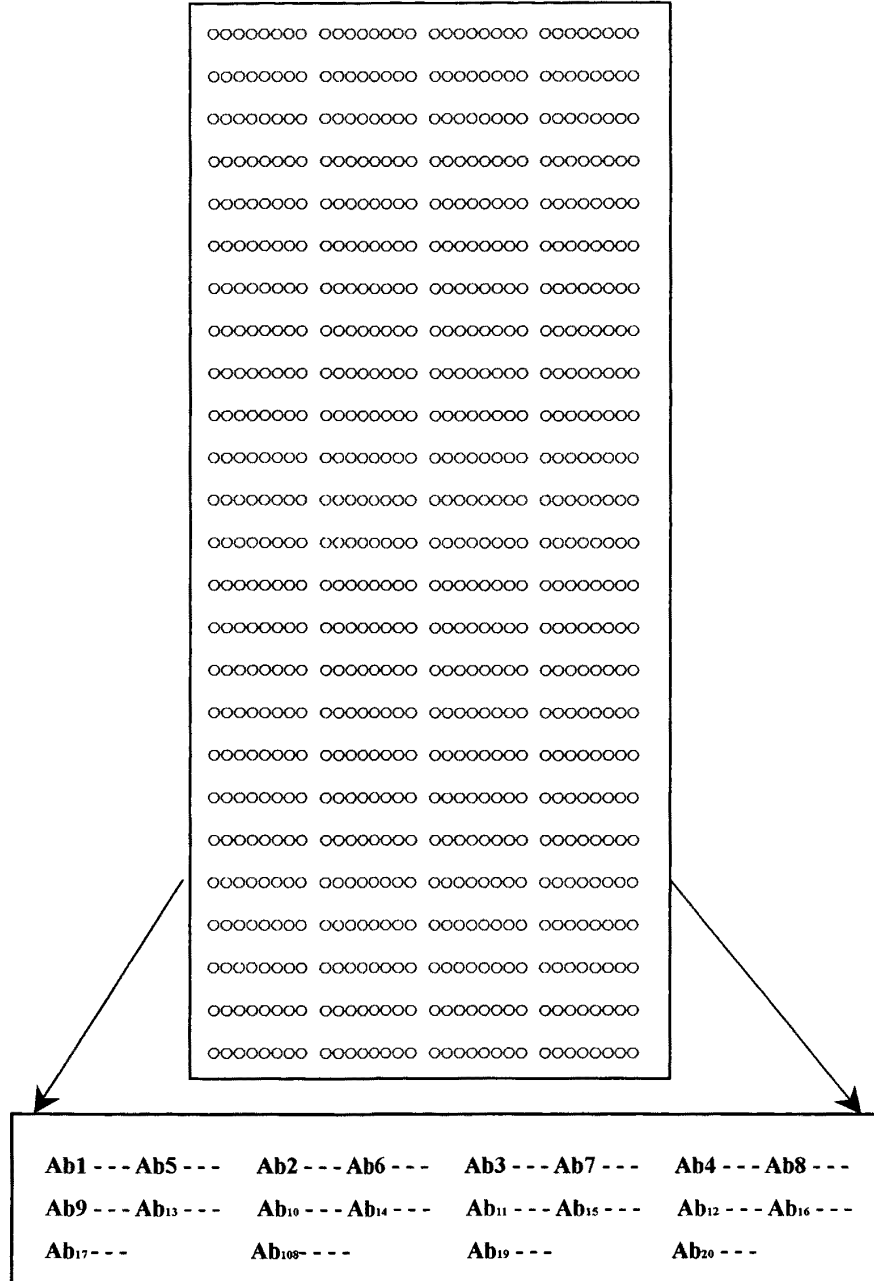
表五、二十個樣品依序標示為 Ab1 ~ Ab20。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A	Ab1	Ab17				Ab1	Ab17				Ab1	Ab17													
B	Ab2	Ab18				Ab2	Ab18				Ab2	Ab18													
C	Ab3	Ab19				Ab3	Ab19				Ab3	Ab19													
D	Ab4	Ab20				Ab4	Ab20				Ab4	Ab20													
E	Ab5					Ab5					Ab5														
F	Ab6					Ab6					Ab6														
G	Ab7					Ab7					Ab7														
H	Ab8					Ab8					Ab8														
I	Ab9					Ab9					Ab9														
J	Ab10					Ab10					Ab10														
K	Ab11					Ab11					Ab11														
L	Ab12					Ab12					Ab12														
M	Ab13					Ab13					Ab13														
N	Ab14					Ab14					Ab14														
O	Ab15					Ab15					Ab15														
P	Ab16					Ab16					Ab16														



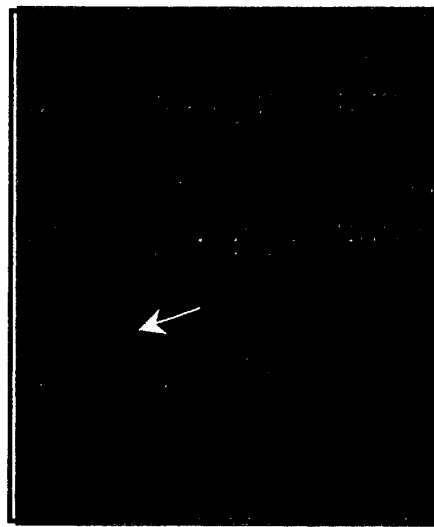
圖十三、二十個樣品(Ab1 ~ Ab20)在 384 well 盤中。

而第二次的示意圖如下所示，可以見到紅點所表示的位置就是所打上的蛋白質點的位置。



圖十四、二十個樣品(Ab1 ~ Ab20)點出來會是三行，如紅點所表示的位置。每行有 32 個點，其相對位置如圖型所表示。

本二次設計之不同之處，在於設計者是要著重在樣品加入時的方便，或者是在結果輸出時的排列。當然，本次試驗由於所要打上的點並不多，而且為了測試及考量玻片不同位置的差異性，所以選擇第二次測試所設計的方式打點。另外，為確定所打出的點是在所想要的區域內，先以螢光的染料點在片子上，觀察其真實位置，以確保在打蛋白質點時，能座落於正確的位置。如圖所示。



圖十五、利用 SpotArray 以 4 pins 打點後，
樣品座落之真實位置。

由上圖可清楚見到螢光點就如第二次測試時所設計的位置一樣，並且在所想要的範圍內。而另一些較弱的螢光點（如箭頭所示），是因為移動 wells 中的螢光物質時，並沒有很完全移除而有些許的殘留所致。由此可見，此系統雖然具有相當高的敏感度，但是在樣品處理時卻要更小心。

三、蛋白質微陣列實驗

A、雜交反應步驟之標準步驟之流程

1. 取放在室溫真空打好點的 slides。用 5% BSA in PBS block 室溫下 60 分鐘 (用保存打好點之 slides 之盒子裝 5 % BSA block)
2. 用準備好之抗原溶液 Ag mix (A) mix 10ul 加入 1ml 1%BSA PBS-T (500 ul 就足夠)反應，室溫下靜置反應 60 分鐘
3. 用 PBS-T 在 50 ml 離心管中洗三次 每次 10 分鐘
4. 用 biotin 標示的抗體 stock, 加 2 ul 至 1ml 1%BSA PBS-T，室溫下靜置反應 60 分鐘
5. 用 PBS-T 在 50 ml 離心管中洗三次 每次 10 分鐘
6. 用 Cy3-avidin / Cy5-avidin (10ul in 500ul 1%BSA PBS-T)室溫下靜置 40 分鐘 並避光
7. 用 PBS-T 在 50 ml 離心管中洗三次 每次 10 分鐘
8. 先用濾紙吸乾 再用 dryer 50°C 乾燥五分鐘
9. 避光保存在 4°C 或進行掃描

B、自動雜交反應步驟之標準步驟之流程

前處理、

清洗機器管路

1. Brushing 30 seconds with PBS, 0.1% Tween-20
2. Agitation of hybridization chamber for 60 seconds
3. Brushing 30 seconds with PBS, 0.1% Tween-20
4. Brushing 10 seconds with EtOH
5. Heater 5 seconds

步驟一、

Step 1 (apply sample/ antigen)

1. Set Slide
2. Set temperature at temp:25° C
3. Blocking the slides with 5%BSA for 1hr
4. Agitation: module 2 and speed 2
5. Wash Slides 20 Cycles with PBS, 0.1% Tween-20
6. Inject the sample/antigen
7. Hold for 30 min
8. Wash slides 20 Cycles with PBS, 0.1% Tween-20
9. Flow for 30s
10. Hold for 3min
11. drain slides 5s

步驟二、

Step 2 (apply 2nd Antibodies)

12. Inject the 2nd AB
13. Agitation: module 2 and speed 2
14. Hold for 30 min

15. Wash Slides 20 Cycles with PBS, 0.1% Tween-20
16. Hold for 30 s
17. Flow for 30s
18. Hold for 3min
19. Drain slides 5s

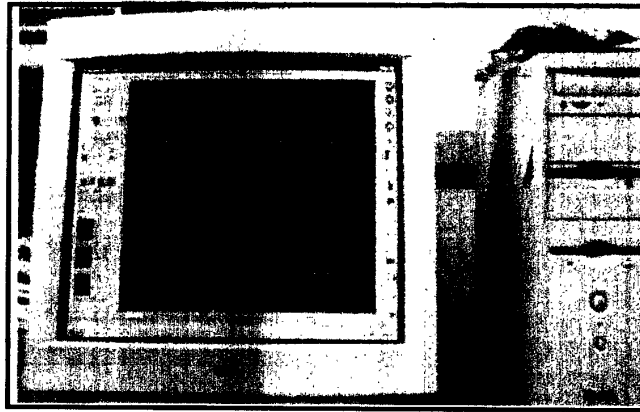
步驟三、

Step 3 (apply avidin Cy5)

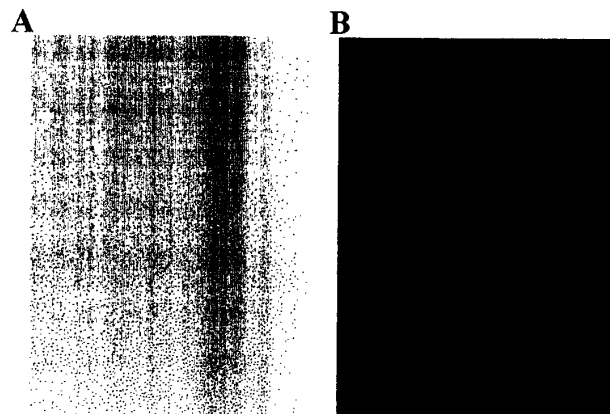
20. Inject the avidin Cy5
21. Agitation: module 2 and speed 2
22. Hold for 20 min
23. Wash Slides 20 Cycles with PBS, 0.1% Tween-20
24. Hold for 30 s
25. Flow for 30s
26. Hold for 3min
27. Drain slides 2min
28. Scan the slides

C、背景比較

微陣列結果之偵測所常用的螢光物質有 Cy3 及 Cy5，而在本次實驗中，由於所採用的玻片材質上有 NC (Fast Slide, Schleicher & Schuell)，在雷射光激發下也會有螢光，所以首先要做一個玻片背景值的性質比較及對照。



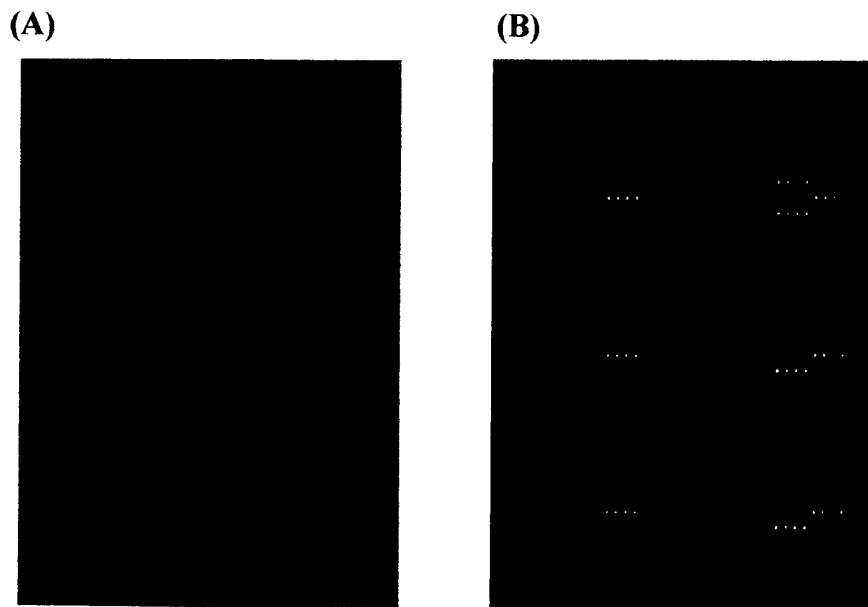
圖十六、所採用的 SpotArray24 之分析系全貌。



圖十七、A 與 B 為分別以 Cy3-avidin 及 Cy5-avidin 為偵測之螢光物質在相同雷射光激發的條件所得到的背景。

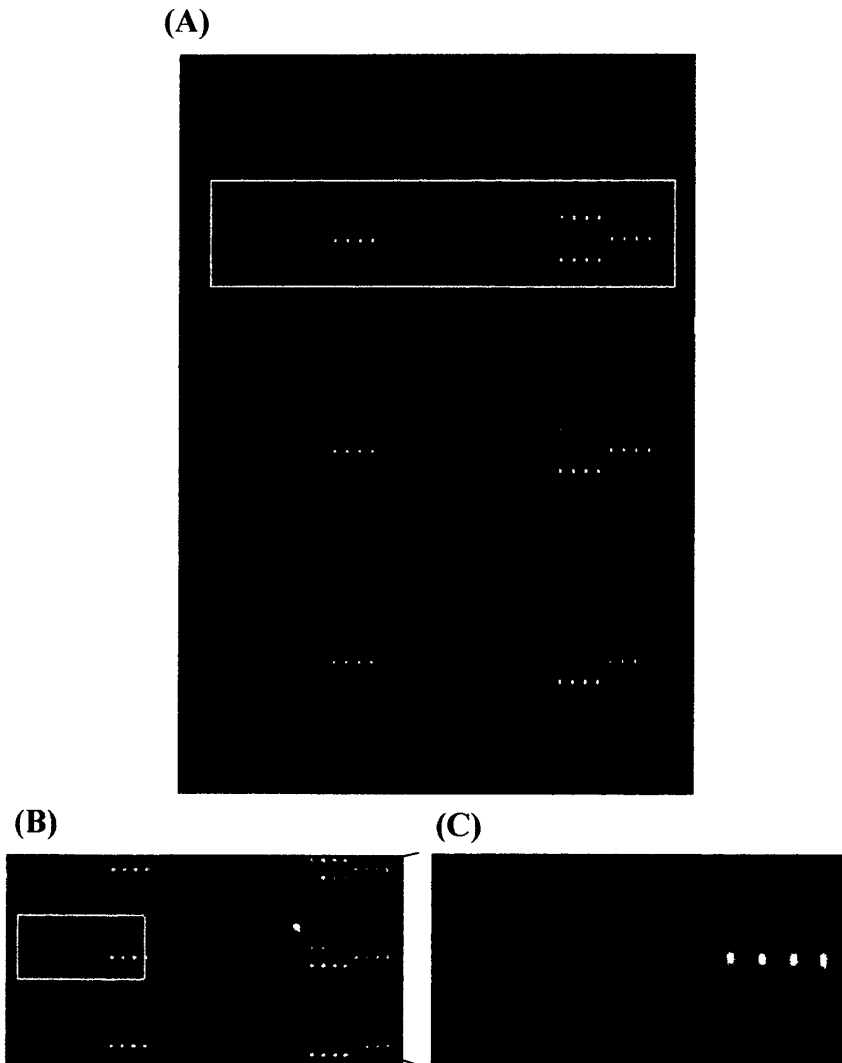
在相同能量(Laser Power 50% , PMT Gain 70 %)雷射光的激發下 Cy3-avidin 及 Cy5-avidin 所得到的背景明顯不同。Cy3-avidin 的背景比 Cy5-avidin 高出許多，這對往後訊號的偵測將造成很大不良的影響(在第一次實驗結果中可清楚見到)，所以之後得實驗將利用 Cy5-avidin 進行之。

C、第一次實驗結果



圖十八、相同條件下之雷射光激發所得到的影像。A 及 b 分別代表以 Cy3-avidin 及 Cy5-avidin 為螢光偵測物質所得到的結果。

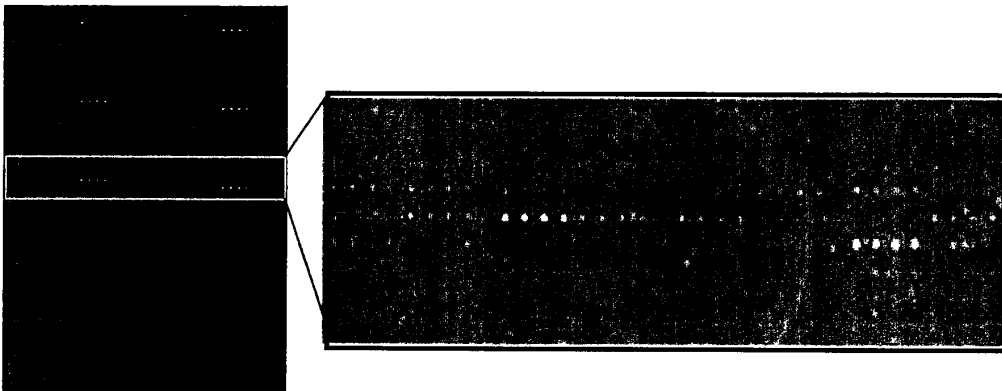
可以見到在以 Cy5-avidin 為螢光偵測物質所得到的訊號再三次重複中相當一致。Cy3-avidin 則因背景問題對訊號之影響極大。而每個重複中所打的四個重複點目視下都很一致。



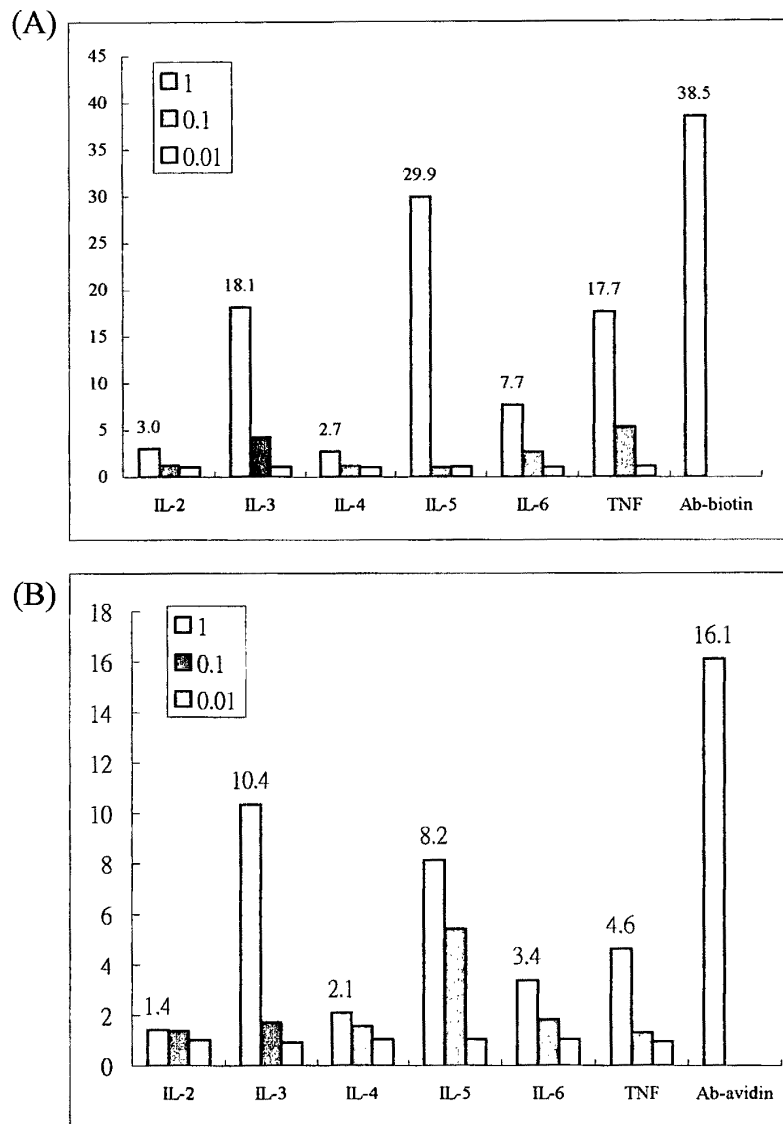
圖十九、(A) Cy5-avidin 所作出的結果，(B)及(C)則分別為 A 局部放大後所觀察到影像。

敏感度的測試

雖然我們本次試驗所用的玻片表面材質是 NC，其背景值很高，但是在將用以偵測的抗原濃度降至 100 ng/ml 及 100pg/ml 時仍可清楚的偵測到我們所預期的訊號。



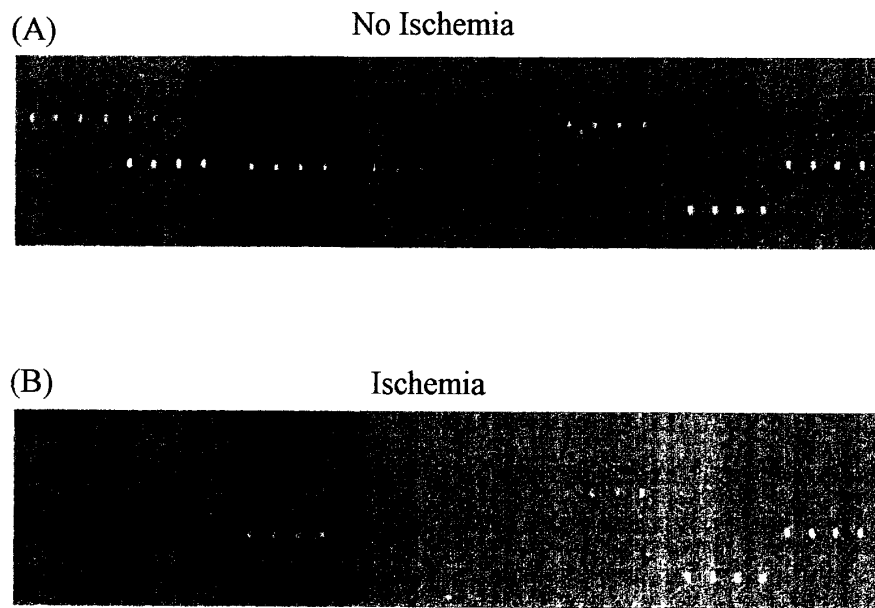
圖二十、以抗原濃度 0.1µg/ml 所得之雜交結果。



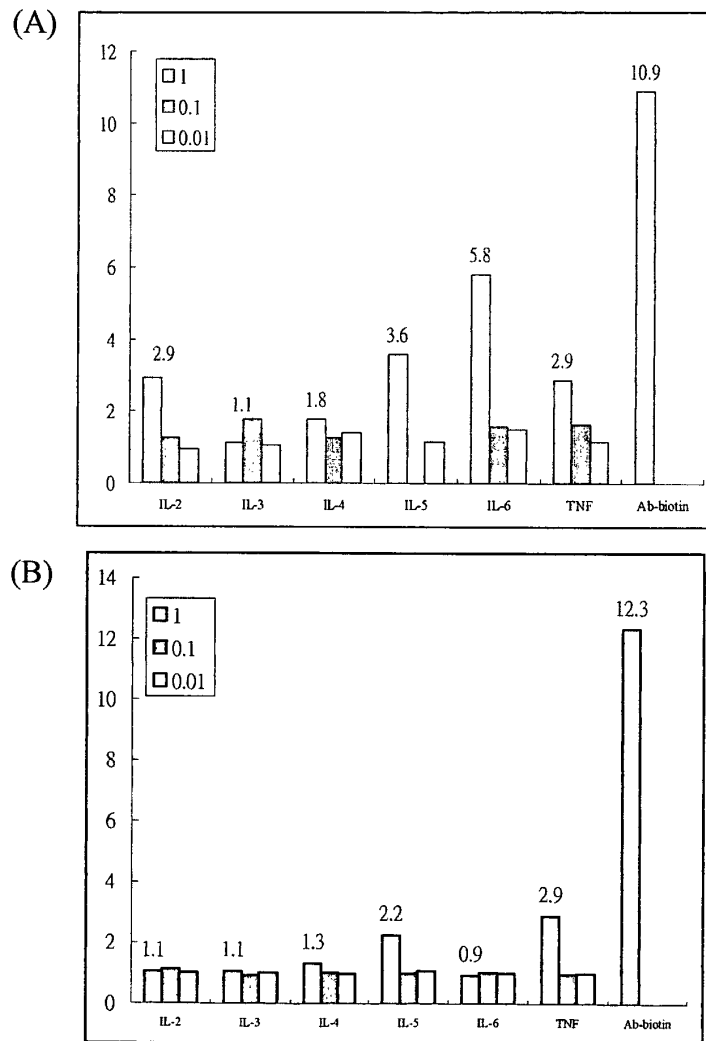
圖二十一、比較不同濃度抗原雜交所得到的訊號。

(A) 為抗原濃度 0.1ug/ml 的結果(B)為抗原濃度 0.1ng/ml 的結果。

測試 Ischemia 對細胞激素的變化影響



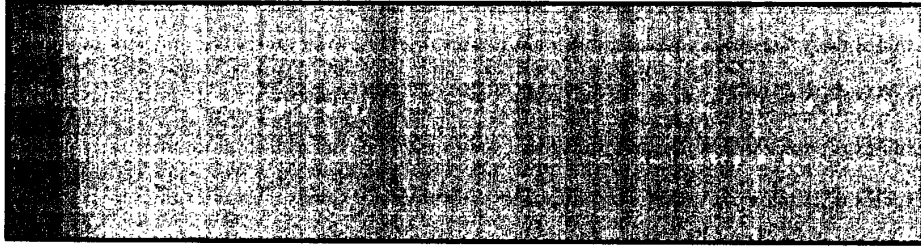
圖二十二、比較 Ischemia 前後之細胞激素的變化。(A)為 Ischemia 前之結果(B)為 Ischemia 後之結果。



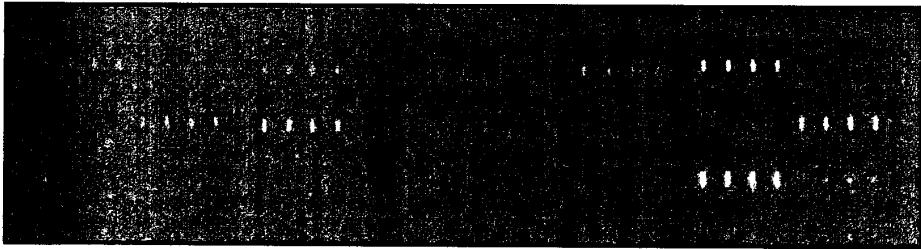
圖二十三、量化之後比較 Ischemia 前後同細胞激素的變化。
(A)為 Ischemia 前之結果(B)為 Ischemia 後之結果。

細胞激素在 LPS 刺激後之變化

(A)

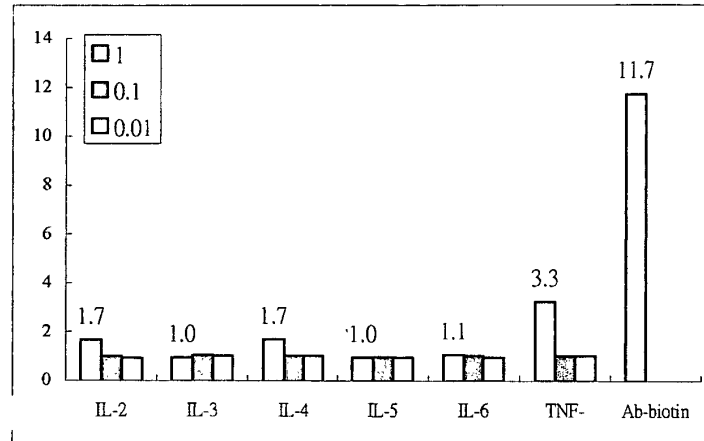


(B)

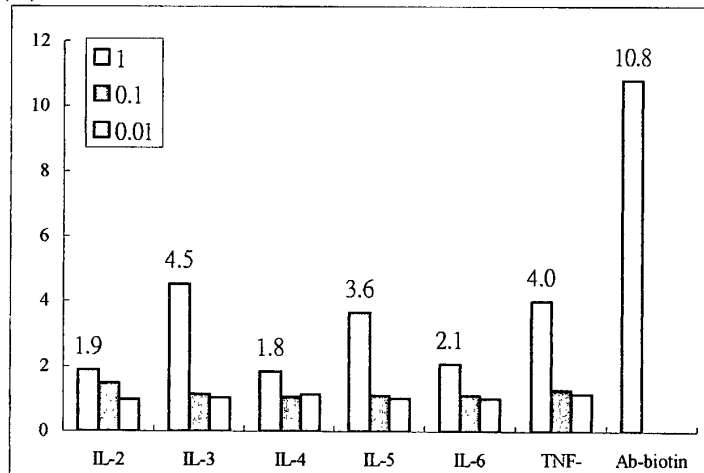


圖二十四、比較 LPS 刺激前後之細胞激素的變化。(A)為 LPS 刺激前之結果(B)為 LPS 刺激後之結果。

(A)



(B)



圖二十五、量化之後比較LPS刺激前後細胞激素的變化。

(A)為LPS刺激前之結果(B)為LPS刺激後之結果。

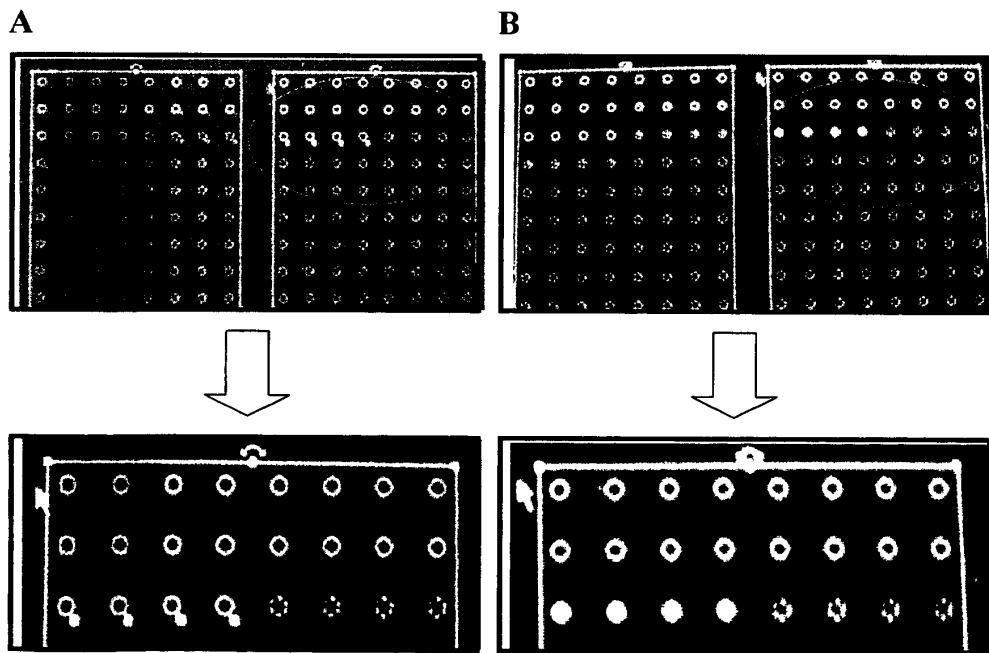
四、蛋白質微陣列資料分析

訊號之分析及定量

Packard 公司之晶片掃描機所用的定量分析軟體，較常使用的幾項功能為 Grid, Line Scan 及 Register，以下將分別以圖文方式，配合著實驗結果進行解釋。以下為 grid 定量的方式。

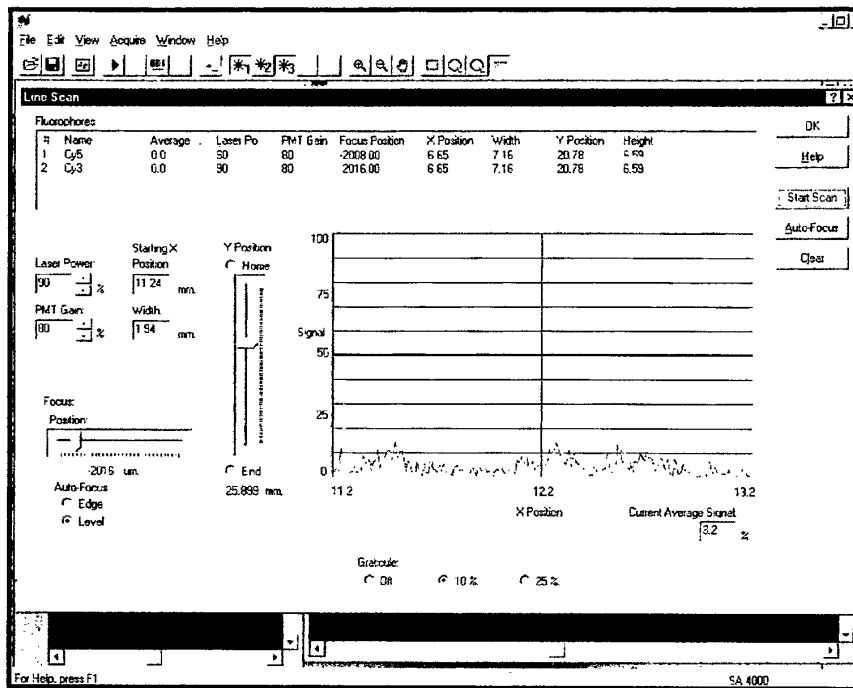
Grid，

首先，將掃描所得到的影像檔在分析軟體中開啟，進入分析視窗，套上 grid 以選取有訊號的蛋白質點。



圖二十六、將訊號分析時的圖形放大來看。A 及 B 分別為圈選訊號點分析之微調前後比較。

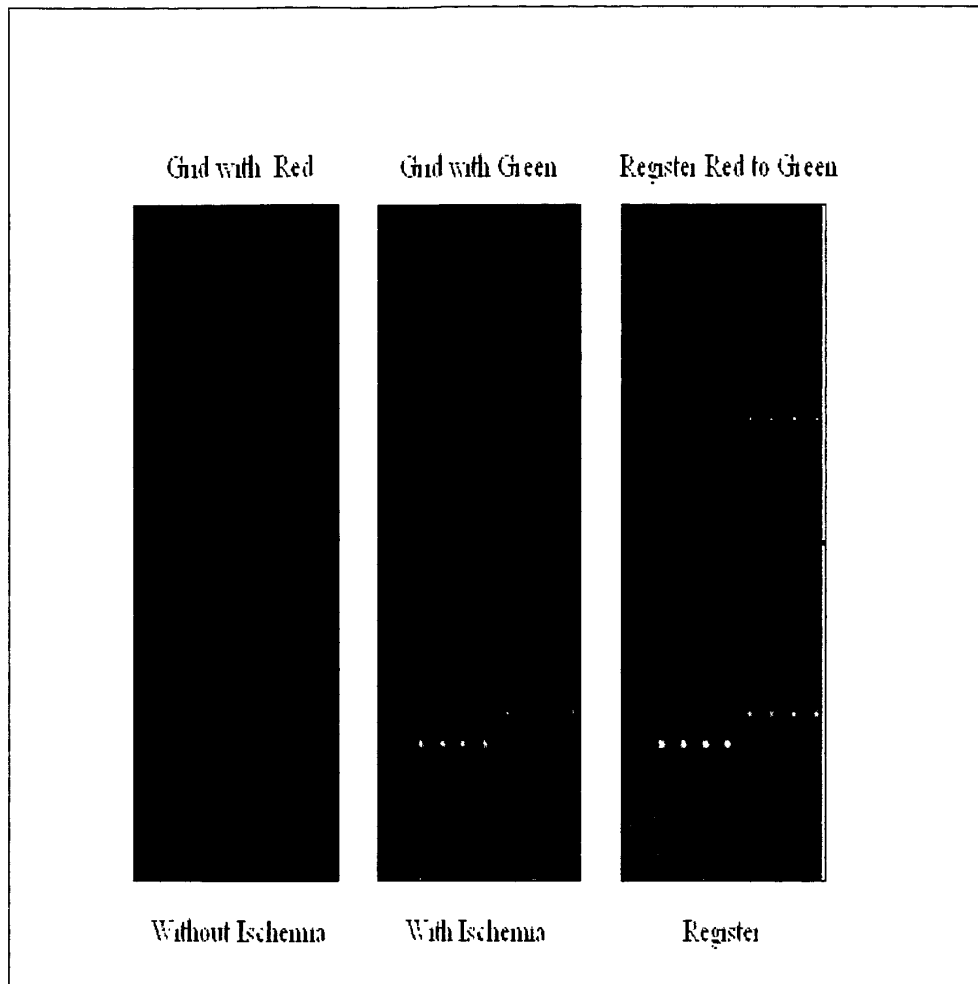
Line Scan



圖二十七、將要做線分析的影像進行快速掃描或一般掃描，之後選取要分析的線性區域，即分別分析 Cy3 和 Cy5 的密度。

此分析只可以在雷射還開啟的狀態下使用，亦可以做為訊號之即時監看。但如果由於背景值過高，則所顯示之訊號不會有明顯差異。反之則會有明顯差別。

Register



圖二十八、此為將 Cy3 及 Cy5 掃描後重疊比較的功能。例如將 ischemia 前後的影像分別以 Cy3 及 Cy5 掃讀後，再將影像進行重疊。可以由顏色的變化進行表現量的比較。例如黃色就是指表現量相似，而紅色或綠色則是表示分別偏向不同之變化。

伍、 研習心得之檢討與建議

本次研習中，除了學習到基本微陣列的知識技巧之外，也和許多長期從事微陣列工作的研究人員，進行了實驗和知識及技術的交流。

一、 蛋白質晶片之重要性

如前面所述，人類基因草圖已完整解析出來，待基因和蛋白質功能陸續釐清後，對於健康與醫藥科技發展及應用會是無遠弗屆。而在現階段，幾乎所有得研究結果都指出同一件事，就是光靠基因的解碼並不能真正解除生物之謎，還是要能了解蛋白質真正的功能，才有可能研發出對策。在農業畜產界，經濟性動物(包括豬、雞、牛、羊等)之基因體定序計畫也已在歐美及大陸等國家如火如荼展開，相信完成之日指日可待。所以不論是對於人類或動物之疾病診斷，為求得科技創新成果，蛋白質晶片之發展與應用，將會是必需要的。

二、 微陣列中心資源充足及人力固定

本次在加州大學聖地牙哥分校之微陣列中心研習，發現該中心規模雖然不大，但是卻資源完善，人力固定。所有基本耗材，如RNA萃取試劑及螢光標示物標定試劑組及點陣用晶片皆為routine運作；儀器方面除了基本的點陣系統、螢光偵測系統外、為了考量實驗結果的一致與穩定，目前也正考慮選購自動雜交及清洗機。另外有多套微陣列分析系統可供作分析和比較之用；除點陣機有專門之技術員操作外，對於軟體及電腦使用之管理也都有專人專門管理。當然此人力也支援其他相關工作，但仍以原設定工作為第一優先。此外,軟硬體除平日的維護外，亦會定期請原廠更新及維修。這些制度亦是確保該中心品質的重要因素。

三、技術的改良研發

從以上描述看來，蛋白質晶片的原理，似乎與西方墨點法或是酵素連結受質反應相差無幾，但實際上確有著諸多瓶頸尚待克服；包括：(1) 蛋白質的取得及製備不易。(2) 蛋白質本身活性的測定及容易失去活性，也就是說較核甘酸不穩定的問題。(3) 蛋白質不易附著於載體，因為不同蛋白質有不同鍵結的性質。(4) 蛋白質的最佳反應條件嚴苛，各蛋白質最佳反應條件不一。(5) 蛋白質資料庫內容有限。在分辨蛋白質晶片的技術是否有所突破時，以上瓶頸絕對會是相當重要之評估參考。當然，在蛋白晶片方面由於仍在起始階段，仍需要多測試，例如單單當作蛋白質的載體的晶片就有不下十數種在使用，而這些不同晶片的負載效果及種類就已經是一相當複雜之問題，更遑論抗原抗體本身的結合特性及製備問題的解決。

微陣列中心的打點技術已經相當純熟穩定，而且目前也已建立並擁三種基因資料庫及晶片，並有多套分析軟體，此外也在持續測試不同標示或放大探針的方式，不斷改進整套系統及結果。

四、合作與委託

微陣列中心除了自身的研究之外，也接受外界的委託實驗，包含各種晶片的打點，雜交實驗的執行。除此之外，更有許多合作測試的計劃。例如本次蛋白質微陣列技術之建立，就屬於此種方式。

五、微陣列中心創設之必要性及高科技人才之培育

近年來我國針對農業畜產相關高科技研習的人才出國培育計畫已大為減少，且研習時間多為短期進修。本次出國機會承蒙多位長官多方奔走大力支持，才得以順利成行。然礙於經費有限，僅能在該實驗室停留六週，所設計的試驗及規模都相當有限。雖然

已盡力學習各種相關微陣列技術及操作相關儀器及分析軟體，然受限於時間，僅能有一次流程的設計及試驗；此類先進技術，仍需要多方測試才能穩定及突破。而且本次出國計畫原本希望能再參訪一些位於加州研發蛋白晶片之生技公司，如 Gene Way，且因時間較短，過於緊迫，許多材料都要在該中心先準備，所以難免有遺珠之憾。

因為診斷技術不斷地進步，新興的疾病不斷發生，若要確保國民健康與畜牧產業之永續發展，研發迅速確實地診斷或判別工具，實為當務之急。所以在讚賞此農業高科技人才之培育制度建立之餘，更希望主事單位能夠繼續支持此研究的進行及延伸，使所學傳承下去，持續農業高科技人才培育之精神。