

國立交通大學

機械工程學系

碩士論文

以田口法進行三明治酵素免疫分析之最佳化於早期
糖尿病腎病變篩檢晶片開發

Taguchi Method Optimization of Sandwich ELISA
Microarrays for Potential Screening of Early Stage of
Diabetic Nephropathy

研 究 生：劉胤君

指導教授：黃正昇 教授

中華民國 一百零三年七月

以田口法進行三明治酵素免疫分析之最佳化

於早期糖尿病腎病變篩檢晶片開發

研究生:劉胤君

指導教授:黃正昇

國立交通大學機械工程學系碩士班

摘要

本研究目的在於最佳化以微陣列晶片形式之三明治酵素免疫分析的參數設計，對象為 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\alpha 1$ -Antitrypsin、Cystatin C、E-Cadherin 這四種被認為可能與早期糖尿病腎病變相關的生物標記。具體研究目標分為以下兩點: 1. 使用田口法(Taguchi Method)最佳化抗體微陣列參數 2. 評估搭配訊號放大(Tyramide Signal Amplification, TSA)系統於抗體微陣列晶片的效用。

總共進行兩階段田口法，每階段皆包含無訊號放大組(without TSA)及訊號放大組(with TSA)；第一階段無訊號放大組，我們探討四種因子(factor)的濃度，包含捕獲抗體(capture antibody)、分析物(analyte)、偵測抗體(detection antibody)及 streptavidin-conjugated Cy5 (SA-Cy5)，每因子有三個水準(level)，而訊號放大組則是增加了 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (SA-HRP)；第二階段無訊號放大組探討五種因子，其中包含四種因子的培養時間(blocking、分析物、偵測抗體及 SA-Cy5)及 SA-Cy5 的濃度，每因子有兩個水準，而訊號放大組則是增加 tyramide 的培養時間進行探討。

我們利用因子反應表選擇最高 S/N 比的因子水準當作最佳參數組合，經由田口法優化後，四種不同的蛋白質於無訊號放大組及訊號放大組的偵測極限降低幅最好可達到 89.7 % 和 79.0 %。我們的結果也驗證了搭配訊號放大系統能夠改善偵測極限，對於偵測低濃度分析物是有幫助的。

關鍵字：抗體、酵素免疫分析法、糖尿病腎病變、田口法

Taguchi Method Optimization of Sandwich ELISA Microarrays for Potential Screening of Early Stage of Diabetic Nephropathy

Student: Yin-Chun Liu

Advisors: Dr. Cheng-Sheng Huang

Department of Mechanical Engineering
National Chiao Tung University

Abstract

The goal of this research is to optimize sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in microarray format with 4 different proteins (TNF α , α 1-Antitrypsin, Cystatin C and E-Cadherin), which can potentially be used as biomarkers for screening early stage of diabetic nephropathy (DN). The specific objectives are to: 1. optimize assay parameters with Taguchi Method and 2. systematically evaluate the effectiveness of incorporating Tyramide Signal Amplification (TSA) in an antibody microarray.

Two optimization rounds based on Taguchi method were performed in both assay with and without TSA. In the first round, for assay without TSA, we tested four different factors including capture antibody (CapAb), analyte, detection antibody (DetAb) and streptavidin-conjugated Cy5 (SA-Cy5) at three different concentrations. For assay with TSA, we tested one additional factor, streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (SA-HRP). In the second round, for assay without TSA, we tested five factors including four different incubation steps (blocking, analyte, DetAb, SA-Cy5) and SA-Cy5 concentration at two different levels. For assay with TSA, additional tyramide incubation time was also tested.

For each factor, the level with highest S/N ratio in response table was selected as the optimum condition. After Taguchi optimization, the limit of detection (LOD) for 4 different analytes were improved by 16.9% - 89.7% and 24.1% - 79.0% for assay without and with TSA respectively. Our result also verifies the effectiveness of incorporating TSA to improve the LOD, which will be beneficial for detection of low concentration analytes.

Keywords : antibody 、 ELISA 、 diabetic nephropathy 、 Taguchi method

誌謝

將近兩年的時間，轉眼間就過完了，這個過程當中受到相當多師長、學長姊、學弟妹和朋友們的幫助，每個人對我的小小幫助，才能讓我順利的完成碩士的學位，這些幫助不管來自研究上或是生活上，對我來說都是相當的重要。首先要感謝我的指導教授，黃正昇老師，願意收我這個門外漢當學生，學期初，對於未來的研究方向、專業知識等等，甚麼都毫無頭緒，老師提供了一些文獻給我參考、閱讀，但是由於大部分都是從未涉略過內容，所以常常找老師問了很多相當基本的問題，但老師還是不厭其煩的予以指教。碩一開始修習相關的課程，久而久之對於研究主題的內容較能駕馭，但也僅限於紙上談兵，所以開始進行實驗之初，可說是相當的生疏，不知該從何下手，因此老師還親自帶我做過一遍實驗的完整流程，仔細的教導我哪些步驟該如何進行以及注意事項等，進入了反覆的實驗，每次遇到問題的時候，都能和老師一起進行討論，看看應該要如何解決所遭遇到的問題，老師的教學風格是相當自由的，有想法都能拿出來討論，老師也會提供自己的意見，這樣的學習方式沒有壓迫感，對我來說反而效果很不錯，好好準備每一次的 meeting，都能夠有所收穫，真的很謝謝黃老師兩年來的拉拔，讓我能夠從零開始成長到現在這個階段，相信未來的學弟妹們，也都能感受到老師對學生的用心；謝謝許馨云老師跟鄭雲謙老師擔任我的口試委員，讓我順利的完成了碩班最重要的一個過程。萬分感謝中研院出借兩年 TECAN 雷射掃描機，這個設備在實驗中扮演相當重要的角色，若是沒有這台掃描機，實驗就無法進行下去。

由於是第一屆的學生，要協助老師將實驗室建立起來的過程中真的受惠於很多人，謝謝系辦的職員們，剛開始的半年一直跑系辦問問題，大家都很樂意幫我，尤其是婉珍姊和玉妃姊，總是被我黏著詢問報帳的相關事宜；謝謝李俊賢同學，剛開學認識了這位朋友，讓之後在很多事情上可以藉由他找到相關的人來協助我；謝謝呂明璋老師，讓我碩零的暑假能夠先暫時待在他們的實驗室以及使用他們的設備，讓我在碩班認識了第一批的朋友且之後的每次實驗都有二次水可以用，謝謝林政佑學長當初教我如何報帳、如何使用學校的採購系統，謝謝其他的學長及同學中午時和我一起吃飯，謝謝胡文樑同學，每次都帶我去裝 DI water；謝謝許馨云老師以及他們實驗室的學生，常常有問題沒有辦法解決的時候，會詢問許老師的經驗及意見，而老師每一次都能予以專業的回應且謝謝老師借我們冰箱冰實驗的藥品，謝謝黃新淳學長，提供我該和哪些廠商購買實驗的耗材、材料的資訊，也回答了我許多小問題，非常感謝陳子胤同學，非常頻繁的要麻煩他帶我進實驗室拿冰箱的藥品、幫我配一些溶液、借我一些耗材、回答我很多化學方面的問題，相當慶幸能夠在修課時認識陳子胤同學，否則後續的這些事情真不知道該找誰幫忙；謝謝博愛奈米中心的劉先生，當初幫我解決了很多問題，謝謝曲厚任學長的博愛奈米中心詳細 training 且帶我首次進行表面處理的實驗和提供我儀器購買的廠商資訊；謝謝徐文祥老師以及他們實驗室的學生，教導我使用接觸角量測儀；謝謝黃宣諭學長教我使用滅菌爐，提供我們冰箱使用；謝謝所有廠商，都能協助我找到需要的產品，也能幫我解決一些機台上的問題。

除此之外，謝謝林沂珊學姊當初在申請交大的時候給了我許多的幫助，幫我修改自傳、教我面試技巧、讓我借宿，謝謝徐綱駿學長面試當天當我的嚮導，消去了許多緊張感，謝謝黃薰萱學姊在我徬徨與困惑的時候給我很多劑強心針，謝謝芷嫻總在大日子的時候帶給我祝福，謝謝交大網球隊，讓我在碩班有點忙碌的研究生活，能夠藉由打球來維持運動的習慣，謝謝詹益欣教練、伍啟萌教練，允許我擁有彈性的練球時間，許堯勝胖胖學長帶領我認識球隊的各位，讓我能夠快速地融入大家，B保學長、杰保在我還不太認識大家的時候，總是帶我到處吃吃喝喝、陪我聊天，肚子餓的時候C保學長、恩慈會幫我帶宵夜回來填飽肚子還會煮晚餐跟我一起分享，雨辰、強姊總是陪我吃飯、打球、逛街、聊八卦，軒軒陪我度過每個周末、在我實驗做到很崩潰的時候幫我加油打氣、畢業倒數的晚上一起趕論文，其他球隊的學長姊、學弟妹，也很謝謝他們和我一起打球、給予關心；感謝我的老爸老媽，無限支持我想做的事情，每次回家都會煮很多我愛吃的菜、切很多水果、買很多甜點，在我遇到挫折的時候，總會給我力量，支持我；謝謝實驗室同學、學弟妹，諭安、柏聰、敬書、逸凱、智瑋、作群、信安，有你們的加入，實驗室多了許多歡笑，讓我在最後的研究所生活，充滿了許多美好。

最後，再次感謝這兩年所有幫助過我、陪伴我的人，因為有你們，才能使我順利的完成這份論文，你們給的點點滴滴，真的給了我很大的力量，希望未來的哪一天，我也能夠帶給你們幫助，在此致上我最深的感激。



目錄

摘要	i
Abstract.....	ii
誌謝	iii
目錄	v
表目錄	viii
圖目錄	ix
一、緒論	1
1.1 研究動機與目的	1
1.2 文獻回顧	3
1.2.1 微陣列技術 (Microarray Technology)	4
1.2.2 酵素免疫分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)	5
1.2.3 螢光訊號放大	6
1.滾輪式擴增法 (Rolling-Circle Amplification, RCA)	6
2. TSA 訊號放大系統 (Tyramide Signal Amplification, TSA)	7
1.2.4 田口實驗設計法 (Taguchi Method)	9
二、實驗方法與流程	11
2.1 實驗材料	11
2.2 實驗設備	12
2.2.1 壓電式非接觸噴墨點樣機 GeSiM Nano-Spotter NP2.1	12
2.2.2 雷射掃描機 Tecan Laser Scanner	12
2.3 實驗流程	14
2.4 實驗步驟	15
2.4.1 基材表面處理 (Silanization)	15
1.清洗基材	15
2.表面處理	15
2.4.2 抗體微陣列晶片	15
1.樣品製備	15

2.實驗步驟	16
3.影像掃描與分析	17
2.4.3 田口實驗設計法	18
1.決定品質特性	18
2.列出影響品質特性的因子	18
3.決定各種因子及其變動水準	18
4.選擇適合的直交表	18
5.執行實驗	18
6.資料分析	18
7.最佳參數評估	19
8.實驗驗證	19
2.5 實驗設計	19
2.5.1 單一抗體晶片 (Single assays)	19
1.以細胞激素 $TNF\alpha$ 為研究對象，製作晶片、完成檢測初步雛形	19
2.單一抗體微陣列晶片	23
2.5.2 多重抗體晶片 (Multiplex assays)	24
1.交叉反應實驗 (Cross-reactivity)	24
2.多重抗體微陣列晶片 (使用田口法前)	25
3.田口實驗設計法	27
4.多重抗體微陣列晶片(使用田口法後)	32
三、結果與討論	33
3.1 單一抗體晶片 (Single assays)	33
3.1.1 微點大小	33
3.1.2 晶片表面均勻度	33
3.1.3 三明治酵素免疫分析法	36
3.1.4 訊號放大系統 (TSA)	37
3.1.5 單一抗體微陣列晶片	38
3.1.6 討論	39
3.2 多重抗體晶片 (Multiplex assays)	41
3.2.1 交叉反應實驗 (Cross-reactivity)	41
3.2.2 多重抗體微陣列晶片 (田口法前)	43
3.2.3 田口實驗設計法	43

1.第一階段田口法	43
2.第二階段田口法	48
3.2.4 多重抗體微陣列晶片	55
1.無訊號放大組	58
2.訊號放大組	59
3.訊號放大系統的影響情況	60
3.2.5 討論	61
1.偵測極限的改善幅度	61
2.田口實驗設計法實驗因子重要性判定	61
3.田口法結果一致性	62
四、結論	63
4.1 抗體微陣列晶片製作	63
4.2 田口實驗設計法對於晶片靈敏度的影響	63
4.3 訊號放大系統對於晶片靈敏度的影響	63
五、未來展望	64
六、參考文獻	65
附錄一	68
附錄二	69
附錄三	70

表目錄

表 1-1	$L_8(2^7)$ 直交表.....	10
表 2-1	實驗材料表	11
表 2-2	單一抗體微陣列晶片參數設計表	23
表 2-3	交叉反應參數設計表	24
表 2-4	多重抗體微陣列晶片參數設計表	26
表 2-5	第一階段田口法-(a)因子水準參數設計(b)因子水準配置表	28
表 2-6	第二階段田口法無訊號放大組-(a)因子水準參數設計(b)因子水準配置表	30
表 2-7	第二階段田口法訊號放大組-(a)因子水準參數設計(b)因子水準配置表	31
表 2-8	無訊號放大組參數設計表(田口法後).....	32
表 2-9	訊號放大組參數設計表(田口法後).....	32
表 3-1	第一階段無訊號放大組-因子反應表	45
表 3-2	第一階段訊號放大組-因子反應表	46
表 3-3	第二階段無訊號放大組-因子反應圖	49
表 3-4	第二階段訊號放大組-因子反應表	52
表 3-5	田口法前、後實驗參數比較表	55
表 3-6	最低偵測極限實驗總數據比較表	56
表 3-7	田口法與訊號放大系統對於最低偵測極限的改變程度表	57
附表 1-1	$L_{18}(2^1 \times 3^7)$ 直交表	68
附表 2-1	$L_{16}(2^{15})$ 直交表	69
附表 3-1	SA-HRP 濃度選擇之實驗參數表	70
附表 3-2	HPR 濃度實驗數據 (SNR)	71

圖目錄

圖 1-1	四種酵素免疫分析法	5
圖 1-2	RCA 訊號放大示意圖	7
圖 1-3	Tyramide 與 Tyrosine 產生共價鍵結	8
圖 1-4	TSA 訊號放大技術作用原理示意圖	8
圖 2-1	壓電式非接觸噴墨點樣機	13
圖 2-2	雷射掃描機	13
圖 2-3	實驗流程圖	14
圖 2-4	PAP pen 繪製十六個區間	17
圖 2-5	迴轉式震盪器	17
圖 2-6	(a) 玻片表面未經處理(b) 玻片表面經矽烷有機溶劑處理	20
圖 2-7	微點中總訊號強度及單位面積訊號強度比較圖[12]	20
圖 2-8	樣品點陣位置	22
圖 2-9	利用矽膠乾燥劑降低環境濕度	22
圖 2-10	四組 assay 的重組蛋白濃度配置,單位: pg/ml	23
圖 2-11	交叉反應實驗配置圖及樣品點陣位置	25
圖 2-12	交叉反應發生示意圖	25
圖 2-13	各蛋白之重組蛋白濃度配置及樣品點陣位置	26
圖 2-14	第一階段田口法實驗設計示意圖	29
圖 2-15	第二階段田口法實驗設計示意圖	31
圖 3-1	不同液滴數之微點大小	33
圖 3-2	SA-Cy5 螢光掃描圖	34
圖 3-3	(a)不同材料表面處理載玻片螢光強度(b)強度不均示意圖	34
圖 3-4	改善強度不均勻前後的 epoxysilane 載玻片: (a)改善前 (b)改善後	35
圖 3-5	整片載玻片之變異係數	36
圖 3-6	TNF α 標準曲線	37
圖 3-7	TNF α 有無訊號放大系統實驗比對圖	37
圖 3-8	四種蛋白質的標準曲線	38
圖 3-9	comet tail	39
圖 3-10	coffee ring	40
圖 3-11	交叉反應實驗結果圖	41
圖 3-12	交叉反應實驗結果總數據圖	42
圖 3-13	以 Ubiquitin 進行交叉反應實驗結果圖	42
圖 3-14	第一階段無訊號放大組-因子反應圖	45
圖 3-15	第一階段訊號放大組-因子反應圖	47
圖 3-16	第二階段無訊號放大組-因子反應圖	50
圖 3-17	blocking 時間與重組蛋白培養時間之交互作用	51

圖 3-18	第二階段訊號放大組-因子反應圖	53
圖 3-19	SA-Cy5 濃度與 Tyramide 訊號放大試劑之交互作用	54
圖 3-20	無訊號放大組-田口法前、後偵測極限比較圖	56
圖 3-21	訊號放大組-田口法前、後偵測極限比較圖	56
圖 3-22	參數優化後有、無訊號放大組偵測極限比較圖	57
圖 3-23	無訊號放大組-田口法前、後標準曲線比較圖	58
圖 3-24	訊號放大組-田口法前、後標準曲線比較圖	59
圖 3-25	參數優化後有、無訊號放大組標準曲線比較圖	60
附圖 3-1	抗體點陣位置及實驗示意圖	71
附圖 3-2	HRP 濃度選擇實驗結果.....	71
附圖 3-3	過多 Tyramide 鍵結於 spot 周圍	72
附圖 3-4	不同濃度之 SA-HRP 背景值及背景值標準偏差圖	72



一、緒論

1.1 研究動機與目的

我國末期腎臟病發生率及盛行率均高居全球之冠[1]，根據中華民國統計資訊網指出，至 102 年 8 月止，腎病變死亡人數逐年攀升[2]，腎炎、腎病症候群及腎病變是目前台灣十大死因的第十位，且國健局調查指出高血糖是腎臟病最強的可歸因危險[3]，也就是說造成末期腎臟病的原發病因中以糖尿病所佔之比例最高，而通常這些病人都需要經由長期透析治療來維持身體的運作，長久下來，對於健保支出帶來很大的負擔，一篇文獻在 2002 年指出，估計當時全球人口超過一百一十萬人口透過透析來維持生命，且這些透析族群以每年 7% 的速度增加，美國每人每年所花費之醫療成本約 \$66,000 美元[4]；2009 年台灣地區透析新發個案之原發病因中，第一位原發因為糖尿病腎病變，佔 44.3%[5]。台灣在民國 98 年的透析病人數為 65236 人，僅占總人口數之 0.29%，但透析支出金額為新台幣 334.51 億元，其健保支付金額卻占健保支出總金額之 6.33%[1]，由此可看出透析所需花費的金額是相當龐大的。

糖尿病是引起末期腎臟病最常見的原因，但並非每位糖尿病患者皆會引發腎病變，其主要分為兩種，一為第一型糖尿病，另一則為第二型糖尿病，通常糖尿病腎病變大於百分之八十是由第二型糖尿病所產生[6]。主要分為以下五期：

第一期：腎臟肥大，血液流經腎絲球和腎臟的量增加，腎臟大於正常尺寸，經由胰島素治療後可恢復。

第二期：這個時期與第一期合稱為正常蛋白尿期(Normoalbuminuria)，腎絲球過濾率仍然維持正常之上，腎絲球開始有些微的損傷，尿液中時有時無相當少量的白蛋白(<30 mg/day)；如果能夠將血糖、血壓控制得當，有些患者能在此期維持數十年。

第三期：微白蛋白尿期(Microalbuminuria)(30-300 mg/day)，此時腎絲球開始有嚴重

的損傷，腎臟逐漸失去過濾的功能，血壓也會開始升高，這個時期可以算是正式進入糖尿病腎病變期且在臨床上是可以預測進入第四期的重要指標，但仍有大約30%是可以恢復的。

第四期:明顯蛋白尿期(Macroalbuminuria)(>300 mg/day)，腎絲球過濾率下降，並且有大量的蛋白尿，75%的患者有高血壓問題。

第五期:末期腎臟病，這個階段會有腎衰竭的症狀產生，需要進行透析治療或是腎臟移植。

從第一到第五期的病程平均二十三年，如果患者未對血壓、血糖加以控制的話，病程也許會縮短成五至十年。而第二型糖尿病腎病變通常因為發病的時間不確定，而且也可能合併其他併發症造成腎臟的傷害，所以病程是從第二期開始，目前的診斷是藉由檢測尿液中的微白蛋白量，此時已為第三、四期糖尿病腎病變，我們希望能在第一、二期即發現病灶，進行早期治療與診斷。進行關於預防及延緩方面，對於糖尿病初期的病人而言，加強血糖控制對早期預防糖尿病腎病變有相當大的幫助，此外體重控制、戒除菸酒也是相當重要的部分；攝食過多蛋白質、鹽類會增加腎臟的負擔，故第三、四期的患者需秉持限鹽、低蛋白飲食的精神；利用降血壓藥控制血壓可以預防及減緩第四期轉變至第五期，而當病程已經到末期腎臟病時，則需利用透析治療或腎臟移植。

目前臨床診斷糖尿病腎病變(Diabetic Nephropathy)的方法為檢測尿液中的微白蛋白(Microalbumin)來判定糖尿病病人有無糖尿病腎病變；但當病程屬於第一期及第二期時，尿液中沒有白蛋白的出現，故若無進行病理檢查是很難診斷的，到了第三、第四期，尿液中有白蛋白的出現才比較容易下診斷，但是許多研究文獻指出微白蛋白尿與糖尿病腎病變腎功能惡化的關聯性是有待討論的，而且糖尿病患者也可能會罹患其他非糖尿病腎病變的併發症，例如第二型糖尿病和持續蛋白尿的患者，只有 77%有糖尿病腎病變，而 23%是屬於非糖尿病腎病變[7]，故這種方法很容易有誤診的情況發生，亦即微白蛋白尿不是可靠的生物指標，此法僅能區分非糖尿病腎病變與糖尿病腎病變，並不能做出早期診斷，若可發現早期

預測因子，即於糖尿病病人在正常白蛋白尿時期就能預測往後是否會發生糖尿病腎病變之生物標記，即可早期預測糖尿病腎病變的發生，進而早期治療以降低疾病的發生率，減少透析病人以降低健保支付金額。針對糖尿病腎病變的早期生物標記檢測，現今大部分皆利用 2D 膠體電泳、相關質譜技術等，但是這些分析方法在偵測少量樣品或低濃度樣品上，靈敏度較低、缺乏定量的方法、耗時等，故我們以微陣列晶片取代舊有的檢測。

微陣列晶片能同時偵測數千個參數、其裝置微小、樣品需求量低且檢測快速又具有較高靈敏度，適合做為多重檢測的裝置；而蛋白質微陣列晶片相對於 DNA 微陣列晶片在疾病的診斷上又更加地貼近，由於蛋白質經由 DNA 轉錄轉譯合成後，需經過轉譯後修飾作用(Post-translational modification)，才使蛋白質產生不同的功能[8]，而體液中含有不同種類的蛋白質，這些蛋白質濃度的多寡能夠提供我們作為疾病診斷依據，且因抗體與抗原間有專一性的交互作用，所以若使用三明治酵素免疫分析法理當能提升晶片的特異性(specificity)及靈敏度(sensitivity)，對於疾病診斷的準確度無非是越高越好，故希望能以三明治酵素免疫分析法為基礎搭配螢光訊號放大系統及田口實驗設計法應用於晶片以更加提升晶片靈敏度，渴望未來能以真實樣本做早期糖尿病腎病變之篩檢。

1.2 文獻回顧

我們應用三明治酵素免疫分析法於微陣列晶片上，發展檢測糖尿病腎病變生物標記的晶片，盼未來能夠藉由此晶片針對糖尿病腎病變進行早期的篩檢與診斷，這樣的生物檢測方法，靈敏度好壞對於檢測結果是相當重要的，故我們透過使用訊號放大系統及田口實驗設計法，期望能夠降低偵測極限，使微陣列晶片具有更高的檢測實力。以下分為微陣列技術、酵素免疫分析法、訊號放大系統及田口實驗設計法，四大部分來進行介紹。

1.2.1 微陣列技術 (Microarray Technology)

微陣列技術最早的概念是 1982 年由 Augenlicht 及 Kobrin 所提出的 DNA 微陣列[9]，他們於濾紙 (nitrocellulose filter)上進行基因序列的篩選，微點大小約 1-2 mm，而蛋白質微陣列概念的出現則是 1983 年由 Chang 所提出[10]，直到 1995 年由 Patrick O. Brown 等人發展出裝置微型化(miniaturized)的 cDNA 微陣列技術[11]，使用基材為玻璃載玻片，能於 3.5 mm x 5.5 mm 的範圍內，利用點陣機點陣 96 個微點，從此使微陣列技術開始有很大的躍進，經過這些年的發展，微陣列技術運用的範圍更加地廣泛，不僅只分析 DNA、蛋白質，隨之亦發展出醣類、細胞組織分析等，由於其能進行多重檢測，具有高靈敏度、高通量等優點，透過螢光、化學發光、質譜儀、電化學等方法來偵測結果[12]，對於臨床診斷、新藥開發、法醫鑑定、食品生技等皆是目前的研究重點[13, 14]。使用此技術需透過微陣列點樣機將樣品點陣到固相基材上，常用的基材為玻璃載玻片和矽晶圓，微陣列點樣機可分為兩種，一種為接觸式 (contact)，直接以接觸的方式利用不銹鋼探針透過毛細作用將樣品吸起後快速點陣到基材上[15, 16]；而另一種則為非觸式 (non-contact)，利用壓電晶體或其他推進方法將樣品噴到基材上[16, 17]。

微陣列晶片能同時偵測數千個參數、裝置微小化、樣品需求量低且快速又具有高靈敏度[12, 16, 18-20]，依基材上探針的材質大致可分為基因晶片和蛋白質晶片，基因晶片的基本概念建立在雜交反應 (hybridization)上，將晶片上已固定的核酸探針與樣品進行反應，達到辨識基因序列的目的[21]，而蛋白質晶片的製作方式與基因晶片雷同，差異在作用對象改為蛋白質，但是由於蛋白質容易失去活性且結構較為複雜，故在實際運用上，較基因晶片困難許多。透過挑選蛋白質種類、改良式蛋白質微陣列、阻斷非專一性抗體鍵結、基材表面處理、抗體結構選定、最佳化設計參數等方法[20, 22-24]來改善以前蛋白質晶片存在的一些問題，例如：表面處理不佳、交叉反應 (cross-reactivity)、專一性、蛋白質的純化、品質的控制、固定化的方向性等[22-25]。

1.2.2 酵素免疫分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

1966 年由 Wide 及 Jerker Porath 所提出[26]，ELISA 利用抗原和抗體產生專一性結合，配合酵素連結進行呈色反應作為檢測方法，首先將抗原或抗體利用吸附或是共價鍵結的方式固定在固態的基材上，通常是使用 96 或 384 孔盤當作基底，透過 blocking 降低非專一性鍵結，洗去未鍵結的物質後，再加入接有酵素的抗原或抗體，鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase)、山葵過氧化物酶 (horseradish peroxidase) 和 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)是最常用的三種酵素，最後加入這些酵素的受質 (substrate)進行呈色的反應，若要反應更為專一，則可以利用生物素 (biotin)與卵白素 (streptavidin)之間的高親和力取代酵素-受質的反應；因為實驗操作簡易，已成為廣泛使用的免疫分析法之一，這種方法可以進行高通量的篩檢[27]，可用於藥物篩檢、食品工業、臨床疾病診斷...等，主要分為直接法(direct)、間接法(indirect)、三明治法(sandwich)及競爭法(competitive)[28]，如圖 1-1 所示。

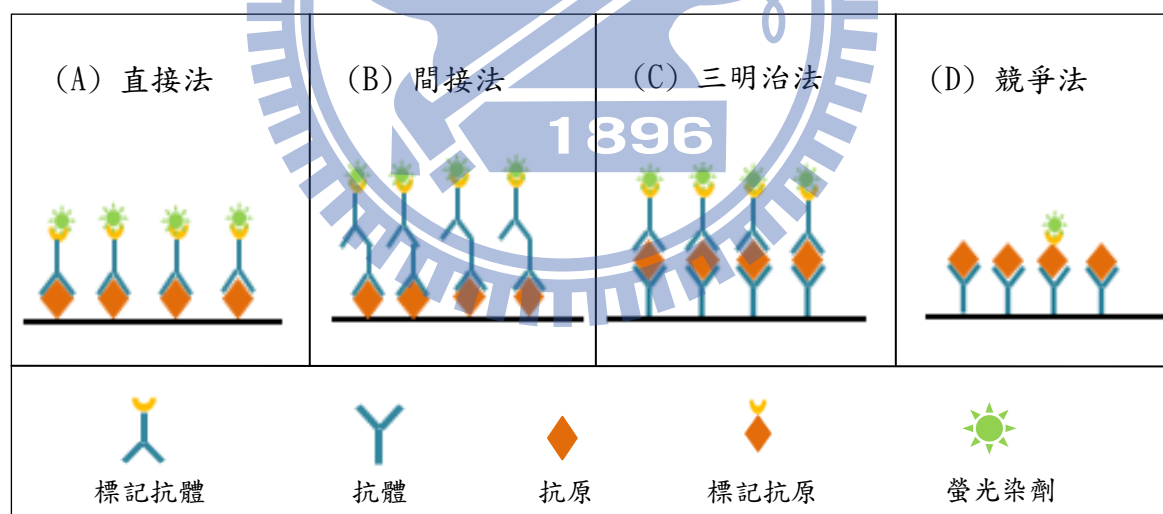


圖 1-1 四種酵素免疫分析法

1. 直接法:

可用於測定抗原總量，固定抗原後加入標記抗體；操作簡單，不需利用二級抗體，可減少交互作用，但此標記抗體的專一性非常重要。

2. 間接法:

主要用來檢測抗體量；固定已知抗原，加入待測抗體，再加入標記抗體；更換不同的已知抗原，可用同一種標記抗體檢測各種與不同抗原相對應的抗體，可降低成本。

3. 三明治法：

可用於偵測分泌性的產物如細胞激素 (cytokines)，最常用於偵測樣本中的抗原量；固定捕獲抗體 (capture antibody)，依序加入待測抗原、標記偵測抗體 (detection antibody)，四種方法中，此法擁有最高靈敏度，因為是透過二次的判定結果，但此待測抗原必須是多價抗原，才會有兩個以上的抗原決定位 (epitope)。

4. 競爭法：

是一種比較少用到的方法，通常用於檢測小分子抗原；固定抗體，先加入標記抗原當作對照組，實驗組則先後加入待測抗原及標記抗原，由於固定抗體數量有限，當待測抗原量越多時，則標記抗原可鍵結的位置越少，以顯色強度的不同來判斷結果。

更高靈敏度以及更快速的檢測方法，一直都是大家所追求的目標，一些螢光、冷光的系統技術使得實驗的流程變為更快速及敏銳，同時也發展出以 ELISA 為基礎的微陣列系統來進行多種參數的同時分析[27]，為了不同的目的而使用不同的檢測方法，而我們應用三明治法的 ELISA 於微陣列晶片上，將最高靈敏度的方法搭配微小化的設計，來達到更好的檢測效果。

1.2.3 螢光訊號放大

1. 滾輪式擴增法 (Rolling-Circle Amplification, RCA)

RCA 這項技術於 1995 年由 Yale 大學的 Paul Lizard 教授所發明[29]，2000 年經由 Schweitzer 等人首次提出將 RCA 應用在蛋白質晶片上[30]，RCA 是一種訊號放大的方法，能提高實驗的靈敏度，將訊號提升一千倍以上；使用時須添加 DNA 引子 (primer)、環狀 DNA 及 DNA 聚合酶 (polymerase) 及核苷酸 (nucleotides)[31]，DNA 引子和抗體連接後與環狀 DNA 結合，複製出一長條單股 DNA，最後以半抗原標記或螢光標記的核苷酸、酵素標記的互補核苷酸序列進行

雜交等方式做訊號的偵測[30](圖 1-2)，步驟大約 45 分鐘可完成；此方法需要較多的化學試劑且步驟較為繁雜，並非每間實驗室都能方便使用[32]。

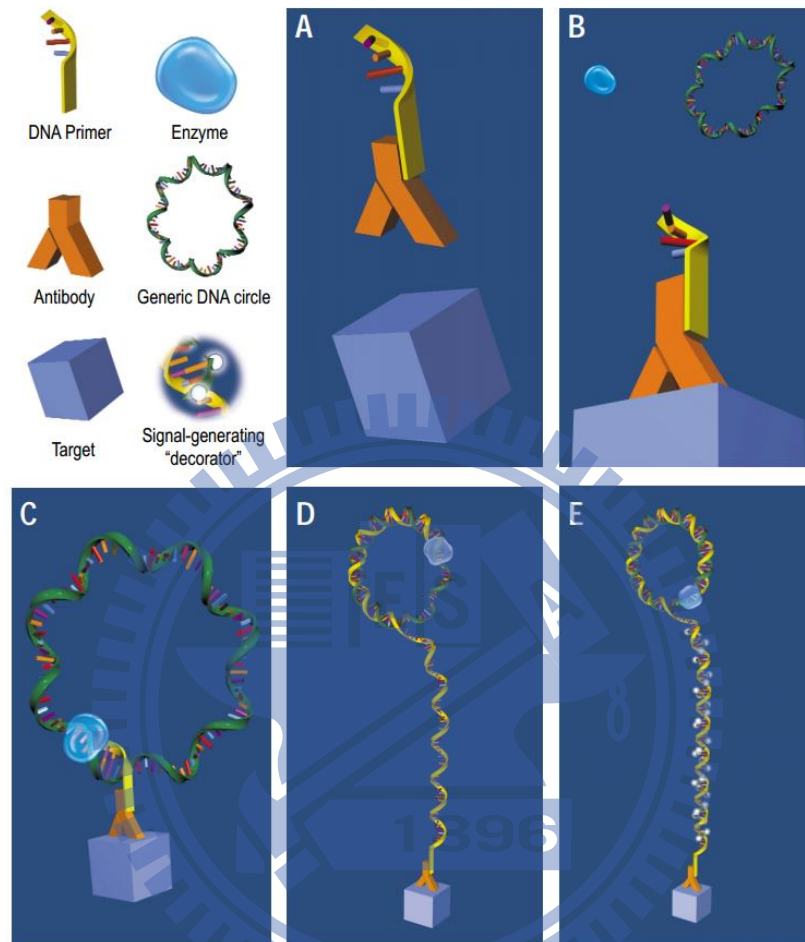


圖 1-2 RCA 訊號放大示意圖

(A) 引子的 5'端與抗體結合 (B) 接有引子的抗體會與對應之目標分子結合 (C) 環狀 DNA 與引子產生雜交後，透過 DNA 聚合酶和核苷酸開始了複製的過程 (D) 接有引子的抗體上因複製而產出一條單股的 DNA (E) 螢光分子鍵結於 DNA 長鏈 [31]

2. TSA 訊號放大系統 (Tyramide Signal Amplification, TSA)

TSA 訊號放大技術，是由美商公司 PerkinElmer 所發展出一項專利技術，該技術具有提高訊號強度、增加偵測靈敏度、降低偵測極限、減少抗體或探針使用量等多項優點[33]，使用的時候只需要添加一種酵素 horseradish

peroxidase conjugated streptavidin (SA-HRP)及 TSA 訊號放大試劑即可完成實驗，且實驗時間僅需 3~10 分鐘。TSA 訊號放大試劑為一種酚化合物(phenolic compound)，稱為 tyramide，其能被 SA-HRP 酵素所活化。此技術的作用原理為二級抗體上所帶有的 SA-HRP 酵素可將 TSA 訊號放大試劑分子活化，活化後的 tyramide 會變得極不穩定並且會快速地與鄰近蛋白質上的 Tyrosine 產生共價鍵結以恢復穩定狀態(圖 1-3)，如此一來 tyramide 就能夠大量的鍵結在待測物的附近；藉由在 tyramide 上標定螢光 (例如: Cy3、Cy5)或半抗原 (例如:Biotin、DNP)即可獲得偵測訊號，達到訊號放大的效果(圖 1-4)[34]

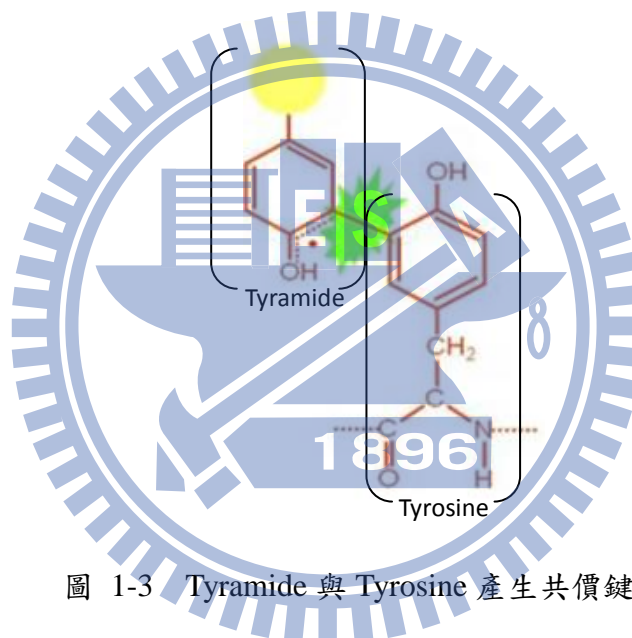


圖 1-3 Tyramide 與 Tyrosine 產生共價鍵結

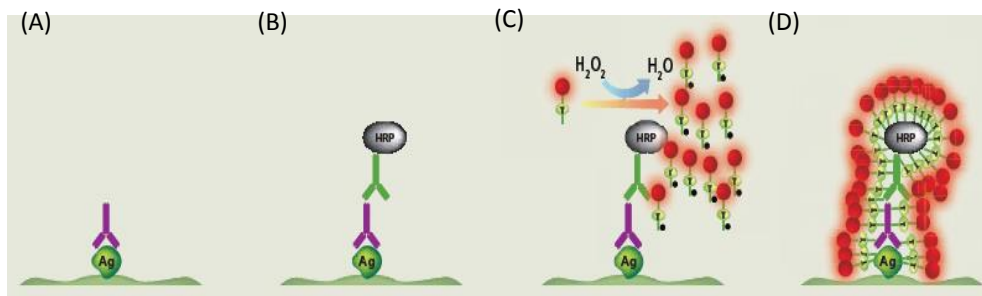


圖 1-4 TSA 訊號放大技術作用原理示意圖

(A)加入一級抗體完成培養 (B)加入 antibody conjugated HRP (C)加入 tyramide 培養 3-10 分鐘，HRP 會活化 tyramide，使之形成自由基的狀態(tyramide free radicals) (D)tyramide free radicals 會與在 HRP 附近的 tyrosine 產生共價鍵以回到穩定狀態 [33]

1.2.4 田口實驗設計法 (Taguchi Method)

此法由田口玄一博士於 1950 年代所開發，到 1970 年代晚期，這個方法在日本已經普遍的受到肯定，田口博士分別在 1951 年、1953 年和 1984 年獲得戴明品質文獻獎，更在 1990 年獲得了日本更業界最高貢獻的藍帶獎[35]。1980 年代後，越來越多美國公司開始應用田口方法，但是也有學者認為田口法缺乏嚴謹的理論背景，但是由於此方法在業界有相當多成功的案例，因此應用在製程與改善產品品質上仍然受到許多企業的歡迎。1990 年至 1995 年期間，田口博士的日文著作陸續被翻譯成中文，從此田口方法在國內工業界被廣泛的認識[35]。一種以實驗的手段來決定設計參數的方法，目的為尋求最佳的結果，維持此結果的穩健性，亦即產品的品質特性不會隨著干擾因子的變動而有太大的改變[35, 36]，換句話說，能減低產品的製作過程中，各變數間交互作用的影響，利用田口法以較少的實驗次數，取得最佳實驗參數，使晶片靈敏度提升[37]。實驗設計法中常被使用的方法有：試誤法(trial-and-error)、全因子實驗法(Full-Factorial Experiments)、一次一因子法(One-Factor-at-a-Time)、田口實驗設計法(Taguchi Design Method)。

試誤法憑著經驗與直覺，選出一組參數進行實驗，若結果不如預期，則再換一組實驗參數，直到試出理想結果為止；想要取得最佳結果，全因子實驗法為最直接的方法，由於實驗已經考慮到所有可能的排列組合，故不需要做條件篩選，直接從實驗組中挑出最佳設計即可；不過其缺點為實驗次數過於龐大，雖然能夠直接地挑選出最佳設計，但相對所花費的時間、成本，並不適用於大部分的實驗[19]；一次一因子法則是一次僅改變一個因子，其他因子固定不變[19, 35, 37]，這種方法會產生偏見 (bias)，因為因子效應是參照特定實驗條件所產生的結果，若改變了這個特定實驗條件，該因子的效應也可能會有所改變；然而田口實驗設計法除了能降低偏見，也縮短實驗所需之時間及次數[19, 35, 37]，即可得到幾乎相同的結果，雖然精確度不如全因子實驗法，但對於工程而言，這些偏差是可以忽略的。

直交表及 S/N 比是田口法的核心工具，我們藉由控制因子 (factor) 及變動水準 (level) 的數目挑選出適當的直交表進行實驗，直交是一種特性，定義為每行中出現各水準的頻率及各行間同水準出現的頻率皆相同[19, 35]。田口式直交表源自於拉丁方格 (Latin squares)，通常以 $L_a(b^c)$ 命名，L 表示田口式直交表，總共有 a 組實驗，最多可以配置 b 個水準的因子 c 個，第一欄為實驗組數，第一列為因子配置，以 $L_8(2^7)$ 直交表(表 1-1)為範例，總共進行八組實驗，最多可配置七個因子，而每因子皆有兩個變動水準；此直交表每行的數字 1 和 2 出現的次數相同，任兩行的數字組合有 (1,1)、(1,2)、(2,1)、(2,2) 四種，且每種組合出現的次數相同[41]。直交表的優點如：(1) 簡化資料分析工作，以較少的實驗次數，獲得優化結果 (2) 將因子間相互作用所產生的偏見減至最低，從中獲得較為可靠的統計資訊。

田口法使用 S/N 比作為品質指標，單位為分貝 (decibel, dB)，而此處的 S/N 比是由平均品質損失變化而來的，其值越大表示品質越佳，每提高 3 個 dB，則品質損失降為原來的一半。最佳的品質必須同時考慮平均值與目標值得偏離量及標準偏差，兩者都是越小越好[35]，每一種問題的品質特性都不盡相同，S/N 比的計算公式主要可以分成以下四種基本的型態：望目 (nominal-the-best)、望小 (smaller-the-best)、望大 (larger-the-best)、原點直線型 (zero-point proportional)，依照我們所訂定的目標來選取適合的品質特性型態。

表 1-1 $L_8(2^7)$ 直交表

Exp.	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

八組實驗 ←

→ 七個實驗因子

→ 兩個變動水準

二、實驗方法與流程

2.1 實驗材料

我們將載玻片以矽烷類有機溶劑進行表面處理，作為晶片製作的基底，而主要檢測的對象為 TNF α 、 α 1AT、Cystatin C 和 E-Cadherin 這四種蛋白質，利用 ELISA 搭配 TSA 進行實驗，最後以螢光訊號的強弱進行結果的判定，實驗材料整理如下表 2-1 所示。

表 2-1 實驗材料表

名稱	產品編號	廠商	購買商: 詠欣
75 mm×25 mm 載玻片	130500010	FEA	
Piranha solution		自行調配	
甲苯 (Toluene)	TH3102	景明化工	
甲醇 (Methanol)	ME0606	景明化工	
(3-GLYCIDOXYPROPYL)-DIMETHYL-ETHOXY-SILANE (GPDMS)	SIG5825.0	GELEST, USA	台灣代理: 景明化工
(3-AMINOPROPYL)DIMETHYL-ETHOXY-SILANE (APDMS)	LI-G-SIA0603	GELEST, USA	台灣代理: 景明化工
GAPS II Coated Slides	40006	CORNING, USA	台灣代理: 進階生技
IHC PAP (mini) pen	ADI950-232-0001	ENZO, USA	台灣代理: 伯森生技
human Tumor necrosis factor alpha DUOSET (TNF α)	DY210	R&D Systems, USA	台灣代理: 世盟生技
human α 1-Antitrypsin DUOSET (α 1AT)	DY1268	R&D Systems, USA	台灣代理: 世盟生技
human Cystatin C DUOSET	DY1196	R&D Systems, USA	台灣代理: 世盟生技
human E-Cadherin DUOSET	DY648	R&D Systems, USA	台灣代理: 世盟生技
TSA™ Plus Biotin Kit	PK-NEL749A001KT	PerkinElmer, USA	台灣代理: 伯森生技
Streptavidin-cyanine 5 (SA-Cy5)	GE-PA45001	GE healthcare, UK	台灣代理: 伯森生技
1% casein/PBS	BP161-0783	BIO-RAD, USA	台灣代理: 正茂生技
Tween-20	TB0560	捷思麥克	
10X phosphate buffer saline, PBS	GB07-4	捷思麥克	

2.2 實驗設備

2.2.1 壓電式非接觸噴墨點樣機 GeSiM Nano-Spotter NP2.1

此設備包含一台電腦及儀器本體如圖 2-1，工作台一次最多可放置五十五片載玻片，最多能掛載八支探針。藉由壓電式點陣出高品質的微點，透過壓電晶體推進形式從探針內將生物樣品噴到基材上。此儀器點陣出的微點大小藉由設定液滴(droplet)體積與顆數來控制，每顆液滴的體積約 0.6~1.1 nl，能藉由調整壓電參數(piezo parameters)控制一顆液滴的大小。除了電腦及儀器本體之外，我們額外加裝一台增濕器(humidifier)及濕度偵測器，目的是維持及偵測工作環境的溼度以防止微點因揮發而乾掉。

2.2.2 雷射掃描機 Tecan Laser Scanner

此設備屬中研院分子生物研究所基因體核心實驗室 (Microarray Core Facility Institute of Molecular Biology, Academia Sinica)所有，為影像掃描工具，如圖 2-2 所示，能夠挑選適合的雷射波長進行掃描，機器內部有三種波長，分別為 633 nm、532 nm、488 nm，雷射角度、解析度等參數可依實驗需求進行更改，適當調整 photomultiplier (PMT)使螢光強度不至於達到飽和或過低，開始掃描前須先選擇掃描範圍以及自動對焦位置，掃描出的檔案可直接用所附之軟體進行初步分析。

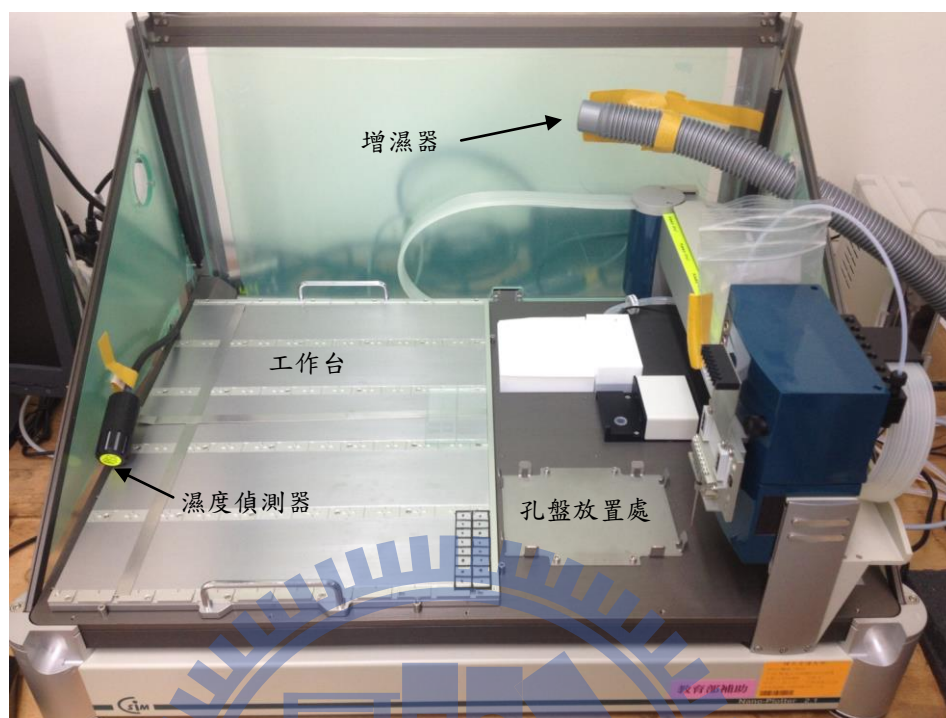


圖 2-1 壓電式非接觸噴墨點樣機



圖 2-2 雷射掃描機

2.3 實驗流程

本實驗的進行流程主要分為兩大部分，一部份為抗體微陣列晶片的製作，其中再細分成有無使用訊號放大系統，另一部份則為田口實驗設計法的使用；在將晶片的製作流程確立好之後，我們進行田口法的設計與實驗，最後挑選出最佳化的參數，以此組參數再次進行晶片的製作。

實驗流程如下：

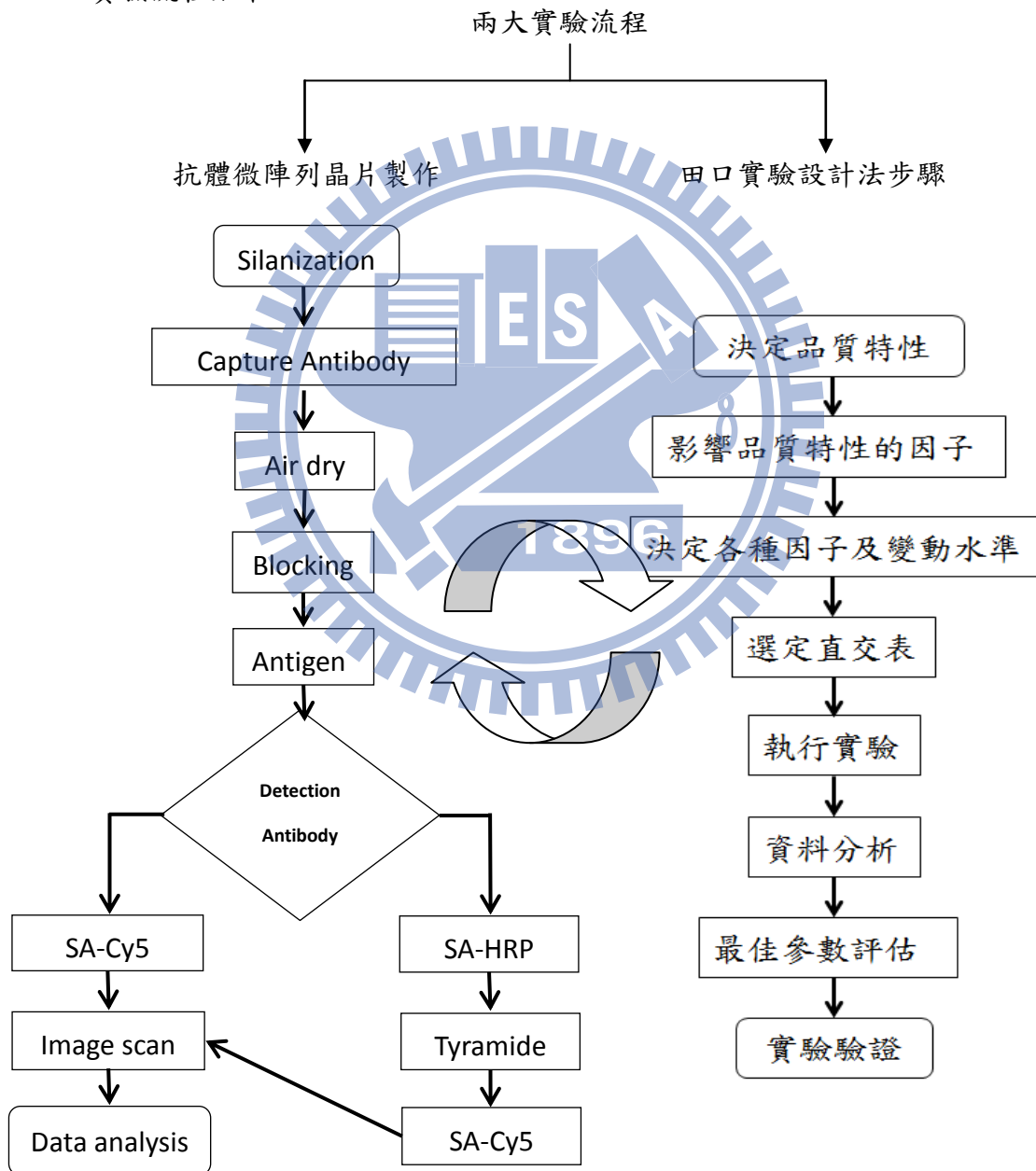


圖 2-3 實驗流程圖

2.4 實驗步驟

2.4.1 基材表面處理 (Silanization)

1. 清洗基材

使用載玻片作為基材，將十片載玻片放置於有溝槽之玻璃皿中，加入 piranha 溶液，硫酸(96%)及雙氧水(30%)，以體積 3:1 配製而成，浸泡三十分鐘後進行清洗，此動作能將表面雜質、髒污洗淨並且將基材表面進行氧化，雙氧水與硫酸發生脫水反應，產生出的水具有氧化力，能置換出玻璃表面陽離子，使玻璃表面帶有氫氧基(OH)[38]，有利於矽烷類有機溶劑之鍵結，再以 DI water 沖洗十五分鐘洗淨殘餘溶液，最後使用氮氣槍將表面的水分吹乾，若有殘餘水份則會降低基材表面處理的效果。

2. 表面處理

確定載玻片、玻璃皿皆乾燥後，利用鋼製針頭吸取大約一毫升的 epoxysilane 於專用玻璃皿中，蓋上玻璃蓋；由於溶劑易揮發且對人體有害，故此動作必須在排氣櫃中進行。完成後將玻璃皿放入 80°C、壓力為 -30 torr 的真空烘箱中以氣相沈積 (vapor phase) 的製備方式形成自組性單層薄膜 (self-assembled monolayers)[39]，隔夜再將其取出。取出後的載玻片依序使用甲苯、甲醇及 DI water 以超音波震盪器各震洗兩分鐘，此步驟之目的在於將殘餘的有機溶劑除去，接著使用氮氣槍將多殘餘水分吹乾後於真空乾燥皿中保存。

2.4.2 抗體微陣列晶片

1. 樣品製備

Tumor necrosis factor alpha (TNF α)、 α 1-Antitrypsin (α 1AT)、Cystatin C 和 E-Cadherin 四種蛋白質之捕獲抗體(capture antibody, CapAb)皆以 PBS 回溶，而重組蛋白(recombinant protein)及偵測抗體(detection antibody, DetAb)皆以 0.1% casein/PBS 回溶，再依實驗需求將其稀釋為適當的濃度，每種蛋白各別分裝後儲存於 -80°C 之冰箱，冷凍保存。

2. 實驗步驟

(1) capture antibody, CapAb

利用 PAP pen 製作疏水屏障 (hydrophobic barrier)，在基材上分出十六個區塊，靜置約六十分鐘待其乾燥，亦能事前先將 PAP pen 畫於基材上，待其乾燥後，再將繪製完成之載玻片儲存於真空乾燥皿，需要時直接取出即可。接著將配好濃度之抗體溶液置於 384 孔盤，以點樣機點陣在晶片上，工作台內環境溫度維持室溫，濕度控制在 75%-80% 左右，以預防溶液蒸發，點陣完畢後，將晶片放入溼度 95% 之密閉容器中進行培養(incubate)。

(2) blocking

以目視確定晶片上之微點已經乾燥後，利用 1% casein/PBS 於常溫進行 blocking，此步驟目的是降低非專一性鍵結 (non-specific binding)，防止蛋白質鍵結於抗體之外的區域，以減低背景訊號。

(3) recombinant protein

將晶片以自製吸管稍微吸乾，使各個區塊獨立，接著將重組蛋白注入各區間(圖 2-4)，抗原濃度依實驗設計而有所調，完成後整將晶片放置於溼度 95% 的密閉容器中，在迴轉式震盪器(圖 2-5)上進行常溫培養。

(4) detection antibody, DetAb

將 DetAb 加入各區間中後放置於溼度 95% 的密閉容器中，在迴轉式震盪器上進行常溫培養。

(5) TSA 訊號放大系統

加入 SA-HRP 進行培養，再加入 tyramide 進行培養，兩步驟培養皆在迴轉式震盪器上進行。

(6) 螢光標記

將培養好的晶片取出，放入 SA-Cy5 溶液中，於迴轉式震盪器上以常溫培養。每步驟間皆需經過清洗，以 PBS-T 0.05% Tween 20 清洗兩次，每次三分鐘，而最後以 DI water 浸泡三分鐘，用氮氣槍吹乾晶片後進行影像掃描，注意整個實驗流

程需避免光照，以防止光漂白 (photobleaching)。

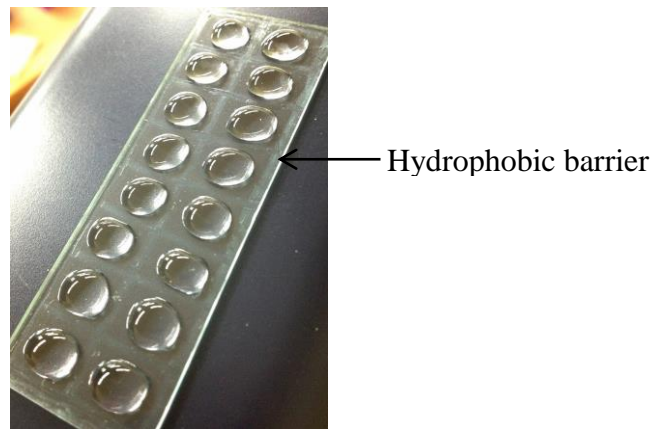


圖 2-4 PAP pen 繪製十六個區間

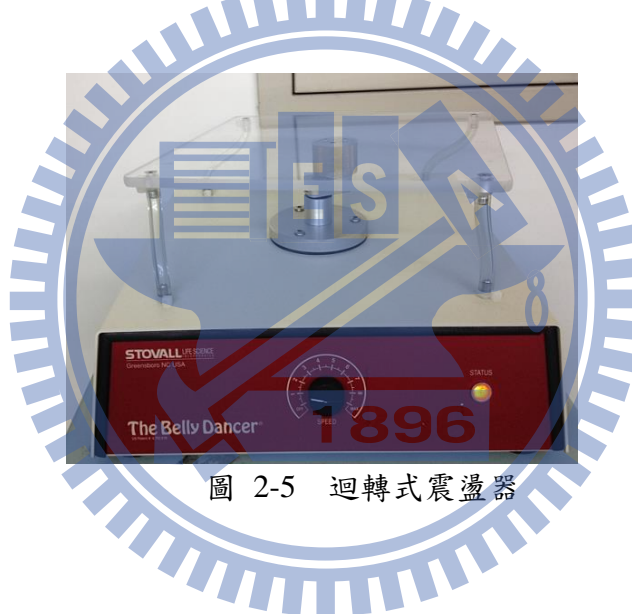


圖 2-5 迴轉式震盪器

3. 影像掃描與分析

使用雷射螢光掃描機進行影像掃描，激發波長設定為 633 nm，此為 Cy5 染劑對應之波長，濾鏡波長設定為 692 nm，設定 PMT gain 使最高濃度之螢光訊號略低於飽和，掃描完成後之晶片，收入指定玻片盒中，放置於乾燥處儲存，以備不時之需。最後以 Array-Pro Analyzer 分析影像螢光訊號，利用由 Pacific Northwest National Laboratory (PNNL), USA 所開發的 ProMAT 軟體，計算最低偵測極限，並且依據四參數對數模式 (four-parameter logistic model) 繪製重組蛋白之標準曲線。PNNL 提供軟體於 http://www.pnl.gov/statistics/ProMAT/download_software.stm 免費下載。

2.4.3 田口實驗設計法

確立晶片的製作流程後，搭配此方法，更改實驗參數設計，例如溶液濃度或培養時間，挑選出最佳參數之後再進行 2.3 章節之實驗流程，此目的為優化實驗結果，穩健整個製程，藉此方法來降低偵測極限、提升晶片靈敏度。

1. 決定品質特性

在田口方法中，所謂的品質特性為實驗的量測值，我們希望量測的螢光強度越大越好，靈敏度越高越好，屬於望大的品質特性。

2. 列出影響品質特性的因子

利用腦力激盪以魚骨圖或其他條例清楚的方式盡可能地想出所有會影響品質特性的因子。

3. 決定各種因子及其變動水準

挑選出幾個控制因子以及決定它們的變動水準。

4. 選擇適合的直交表

理論上直交表可以依實驗需求自行設計表格，但實務上通常是依照選擇出來的控制因子個數搭配變動水準的數目來挑選一個合適的直交表來進行實驗。

5. 執行實驗

(1) 第一階段田口法

這部分主要以濃度的改變作為目的，在選定實驗因子及其變動水準後，將這些參數配置於直交表中，依據直交表的因子與水準搭配來進行抗體微陣列晶片製作流程。

(2) 第二階段田口法

與第一階段相同的流程，但這部分是以培養時間的改變為主，選定實驗因子及其變動水準後，依據直交表的參數搭配來進行實驗。

6. 資料分析

將實驗數據進行分析，製作因子反應表及因子反應圖，進行分析以判斷因子的重要性。

7.最佳參數評估

由資料分析的結果，篩選出最佳的實驗參數組合。

8.實驗驗證

將選出的最佳製程參數組合進行抗體微陣列晶片實驗，將此結果與未進行田口法前的實驗結果做比較，判斷使用田口法前後之參數設計是否對於晶片的訊號強度及靈敏度有所提升。

2.5 實驗設計

我們經由文獻搜尋找到幾種被認為可能是糖尿病腎病變的生物標記，再由這些生物標記中挑選出較有突破性以及來源取得較為容易的生物標記來進行實驗。透過廠商資料以及文獻資料,參考其他作者所使用的實驗參數來當作我們選擇參數的依據。為了要確立抗體微陣列晶片的製作流程以及訊號放大系統的可用性,首先我們以 TNF α 蛋白進行初步的實驗,流程確立完成後,將四種蛋白質單獨進行實驗,以確定材料的可用性。接著將 TNF α 、 α 1AT、Cystatin C 及 E-Cadherin 四種蛋白質同時於一片基材上進行多重抗體微陣列晶片實驗,在此我們須先以交叉反應實驗確保各蛋白質間不會有非專一性鍵結後再進行蛋白的抗體微陣列晶片,此時所使用的參數是未優化的參數,且實驗分為有、無搭配訊號放大系統兩組,接著以田口法進行實驗參數的挑選,最後將挑選出最佳的參數進行微陣列晶片實驗,比較田口法前後以及使用訊號放大系統與否對於最低偵測極限和螢光強度的改善程度。

2.5.1 單一抗體晶片 (Single assays)

1. 以細胞激素 TNF α 為研究對象,製作品片、完成檢測初步雛形

這部分我們要進行基材表面處理、決定微點的大小、確認表面均勻度和控制實驗條件。首先以 75 mm×25 mm 載玻片為基材,利用 piranha 溶液清洗及氧化基材表面,將親水性的載玻片以 epoxysilane 及 aminosilane 兩種矽烷類有機溶劑

進行表面處理、改變性質，使玻片表面變得較為疏水，其接觸角大約 69 度並且帶有特定官能基，分別為環氧基和氨基；點陣於較疏水表面的微點會比未經處理的表面擴散的少(圖 2-6)，微點間不易產生交融現象，故較疏水的表面具有較高的點陣密度，而特定官能基則與蛋白質鍵結將其固定 (immobilize)於晶片表面。

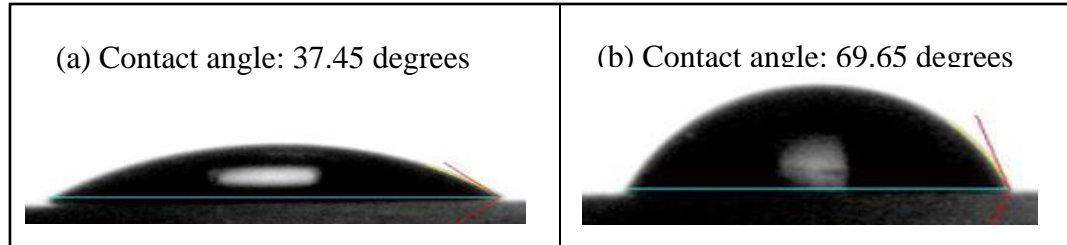


圖 2-6 (a) 玻片表面未經處理(b) 玻片表面經矽烷有機溶劑處理

決定微點大小方面，利用 SA-Cy5 螢光染劑濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ 於 epoxysilane 載玻片上分別點陣大小為 1~8 droplets 的微點，培養完成後，進行掃描分析微點的直徑，依據 Roger Ekins 等人的"ambient analyte theory"，微小化的晶片能夠達到較高的靈敏度[12]，隨著微點的大小漸減，總訊號強度亦減少，但單位面積訊號強度卻增加，即表示微點越小，靈敏度越高(圖 2-7)，故我們希望微點越小越好。為了確認表面處理的均勻度，我們測試三種不同的載玻片，分別為我們製作的 aminosilane、epoxysilane 及市售的 aminosilane 載玻片，以 SA-Cy5 螢光染劑點陣 4×6 個微點於各個區間並分析其螢光強度之變異係數 (coefficient of variation) 來確認晶片的表面處理是否均勻。

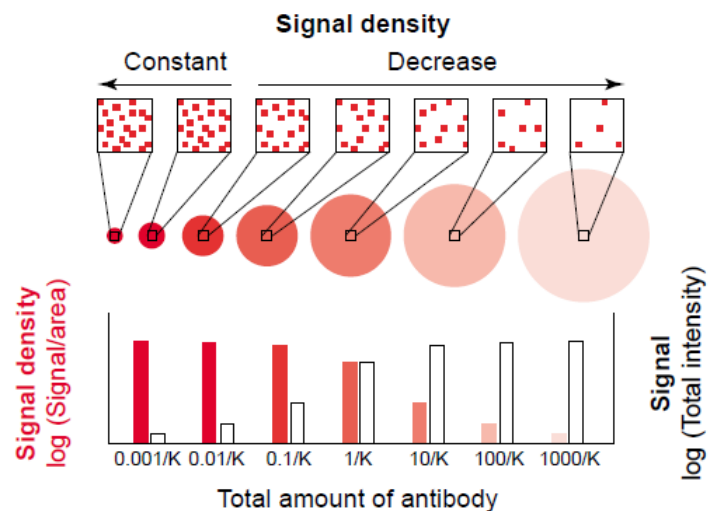


圖 2-7 微點中總訊號強度及單位面積訊號強度比較圖[12]

在防止不同濃度溶液間產生混合上，我們以 PAP pen 繪製疏水屏障於玻片上，使玻片分成十六個獨立區塊，將 TNF α 蛋白質作為抗體微陣列晶片檢測對象，利用三明治 ELISA 繪出標準曲線當作未來加入真實樣品時待測物的濃度指標，除了 ELISA，我們還搭配訊號放大系統，利用 Perkin Elmer 所研發之 TSA kit 將訊號放大，加入 1:1600 HRP 培養半小時，再加入稀釋 1:50 tyramide 溶液培養五分鐘。實驗分成兩組，分別是無 TSA 訊號放大系統組及有 TSA 訊號放大系統組，整個實驗流程已於 2.3 章節介紹。

為了使 CapAb 在微點中能達到最高密度，CapAb 的濃度選擇是依據一個微點的面積，上面剛好佈滿一層抗體數量的 8-30 倍[18]，抗體的直徑為 11 nm[40]，因此面積為 $9.5 \times 10^{-11} \text{ mm}^2$ ，假設微點平均直徑為 120 μm ，面積為 $1.1304 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$ ，故這個微點共約需 1.2×10^8 個抗體能剛好佈滿一層，以每個抗體重量為 150 kDa[41]來計算，則此微點擁有 29.85 pg 的抗體；而一個液滴體積約 1100 pl，故濃度為 0.027 mg/ml，而我們所選取的抗體濃度為 0.5 mg/ml，大約是十八倍。

每區間點陣微點的位置及溶液種類如圖 2-8 所示，共有 4×4 個抗體，其餘三個微點為 SA-Cy5，SA-Cy5 點陣目的為定位用，能使我們清楚地知道晶片的方向及位置。為了使抗體有足夠的時間培養，我們須防止微點快速蒸發，故將工作台環境維持在室溫，濕度維持在 75%-80% 左右。點樣機開機後盡可能在一小時內將樣品點陣完畢，若機器待機時間過長，會造成工作台溫度上升，此時微點會在點陣完後立刻乾燥，此現象會影響實驗結果的準確性；而濕度方面，則是利用增濕器加以控制；在執行 blocking 步驟前，需確保微點完全乾燥，我們預先以矽膠乾燥劑將密閉容器之環境濕度降至 10%-20%，盒中放置濕度指示卡(圖 2-9)，以觀察環境濕度，將培養完成之晶片放入十至二十分鐘，取出後目視已乾燥，乾燥的微點會呈現白色，再進行下一步驟。我們以 1% casein/PBS 作為 blocking 溶液，CapAb 以 PBS 回溶，濃度為 500 $\mu\text{g/ml}$ ，重組蛋白則以 0.1% casein/PBS 回溶，最高濃度為 1000 pg/ml，以三倍連續稀釋；DetAb 以 0.1% casein/PBS 回溶，濃度為 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，而 SA-Cy5 則以 PBS-T 稀釋為 1 $\mu\text{g/ml}$ ；blocking 至 SA-Cy5 incubation

後的每個步驟，晶片皆以 PBS-T 0.05% Tween 20 清洗兩次，時間各為三分鐘，而 SA-Cy5 培養完畢後，最後以 DI water 清洗三分鐘，使用氮氣槍將多殘餘水分吹乾，進行影像掃描，適當調整 PMT，掃描後的圖檔以 Array-Pro Analyzer 分析螢光訊號後，再利用 ProMAT 軟體計算最低偵測極限，以 four-parameter logistic model 為基礎進行標準曲線之繪製。

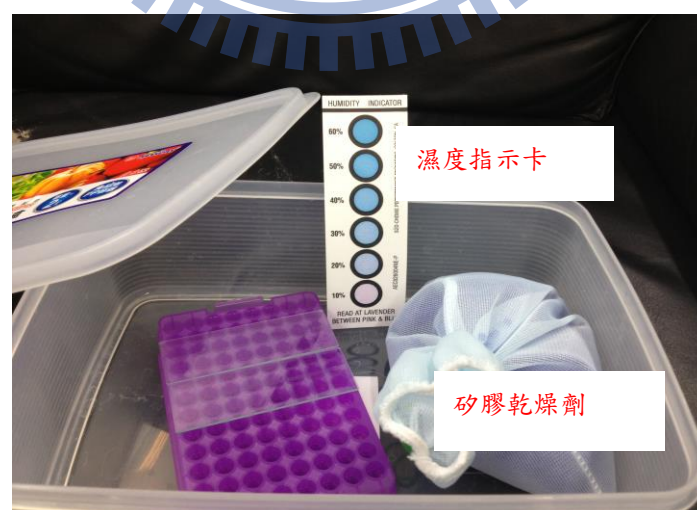
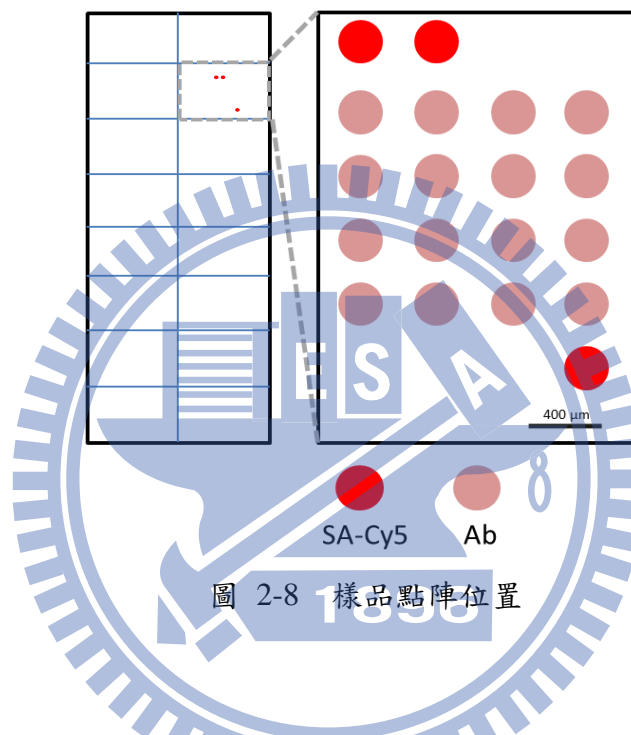


圖 2-9 利用矽膠乾燥劑降低環境濕度

2. 單一抗體微陣列晶片

確立晶片製作的流程後，我們首先嘗試將 TNF α 、 α 1AT、Cystatin C、E-Cadherin，四種蛋白質單獨製成晶片，目的為確保各蛋白質的可用性，蛋白質之參數選擇除了參照廠商提供之數據資料外，亦參考其他類似實驗的文獻資料，實驗及參數設計如表 2-2 及圖 2-10 所示，而樣品點陣位置則如圖 2-8 所示；各重組蛋白的最高濃度皆不相同，但都以三倍連續稀釋(3-fold serial dilute)，隔夜培養，最低濃度為 0 pg/ml，此區間不加入重組蛋白，以作為背景訊號的依據；除了 α 1AT 的 CapAb 濃度為 72 μ g/ml 之外，其餘的參數，CapAb 為 500 μ g/ml，培養六至七小時、blocking 一小時、DetAb 為 0.5 μ g/ml，培養兩小時而 SA-Cy5 為 1 μ g/ml，培養三十分鐘。

表 2-2 單一抗體微陣列晶片參數設計表

PMT 180	CapAb (μ g/ml)	Blocking	Max Ag (pg/ml)	DetAb (μ g/ml)	SA-Cy5 (μ g/ml)
TNF α	500	1% casein/PBS	1000	0.5	1
α 1AT	72		8000		
Cystatin C	500		2000		
E-cadherin	500		12000		
Time	6-7hr	1hr	overnight	2hr	30min

TNF α		α 1AT		Cystatin C		E-Cadherin	
1000	1000	8000	8000	2000	2000	12000	12000
333.3	333.3	2666.6	2666.6	666.6	666.6	4000	4000
111.1	111.1	888.8	888.8	222.2	222.2	1333.3	1333.3
37.04	37.04	296.3	296.3	74.04	74.04	444.4	444.4
12.35	12.35	98.76	98.76	24.69	24.69	148.15	148.15
4.12	4.12	32.92	32.92	8.23	8.23	49.38	49.38
1.37	1.37	10.97	10.97	2.74	2.74	16.46	16.46
0 (Blk)	0 (Blk)	0 (Blk)	0 (Blk)	0 (Blk)	0 (Blk)	0 (Blk)	0 (Blk)

圖 2-10 四組 assay 的重組蛋白濃度配置,單位: pg/ml

2.5.2 多重抗體晶片 (Multiplex assays)

1. 交叉反應實驗 (Cross-reactivity)

為觀察不同蛋白質間是否有非專一性結合，藉由交叉反應實驗取得數據，交叉反應的有無會影響晶片的靈敏度，若有此情況發生，必須知道哪些蛋白質有交互作用，以便設計後續實驗。我們將四種蛋白共同製作成一片晶片，實驗及參數設計如表 2-3 及圖 2-11 所示，此晶片上的 16 個區間，每區間皆含三個 SA-Cy5 定位點及四種蛋白的捕獲抗體，每種蛋白有四個重複的微點，第 1~4 區間為 TNF α 與其他三種蛋白質的交叉試驗，為了觀察是否有交互作用的發生，此處只加 TNF α 的重組蛋白和 TNF α 的偵測抗體，第 1 及 3 區間為完整的 ELISA 實驗，包含了 CapAb、重組蛋白、DetAb 及 SA-Cy5；而第 2 區間則是不加重組蛋白，第 4 區間則是不加重組蛋白及 DetAb，以此類推，第 5~8 格為 α 1AT 與其他三種蛋白質的交叉試驗，第 9~12 格為 Cystatin C，第 13~16 格為 E-cadherin。此實驗設計能讓我們確定若有交叉反應的產生，此反應為抗體與抗體間的作用或是抗體與抗原間的作用，又或者只是螢光染劑的沾黏(圖 2-12)。

表 2-3 交叉反應參數設計表

PMT 180	CapAb (μ g/ml)	Blocking	Max Ag (pg/ml)	DetAb (μ g/ml)	SA-Cy5 (μ g/ml)
TNF α	500	1% casein/PBS	250	0.5	1
α 1AT	72		4000		
Cystatin C	500		1000		
E-cadherin	500		2000		
Time	6-7hr	1hr	overnight	2hr	30min

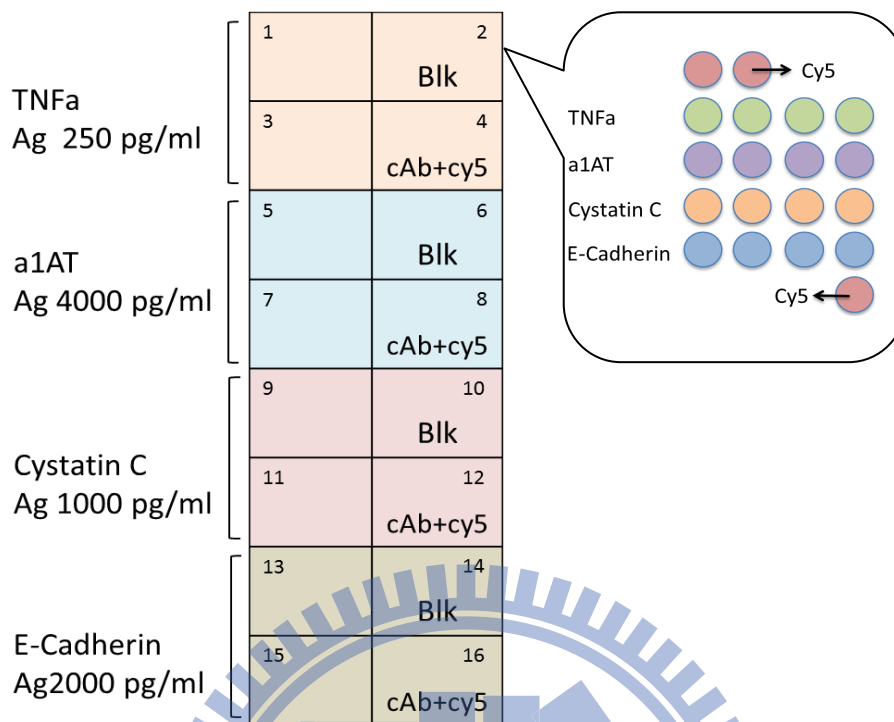


圖 2-11 交叉反應實驗配置圖及樣品點陣位置

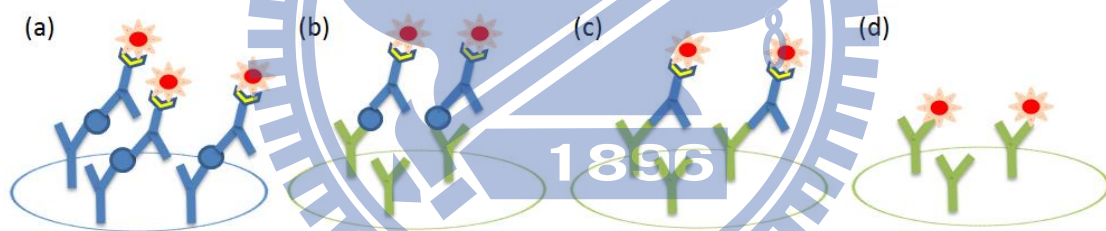


圖 2-12 交叉反應發生示意圖

(a)理想的結合情況 (b)抗原與捕獲抗體間的交互作用 (c)捕獲抗體與偵測抗體間的交互作用 (d)螢光染劑沾黏

2. 多重抗體微陣列晶片 (使用田口法前)

我們將四種蛋白質共同製作成一片晶片，此次實驗為設計兩組實驗，一組為無使用訊號放大系統 (without TSA)；另一組則為有訊號放大系統(with TSA)。實驗及參數設計如表 2-4 及圖 2-13 所示，重組蛋白濃度與 2.5.2 相同，但此處是四種重組蛋白混合在一起，DetAb 混合後的個別濃度皆為 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；此兩組實驗的

差別在於有無添加 SA-HRP 及 tyramide，觀察使用訊號放大系統是否能夠提升晶片的靈敏度，以無訊號放大組作為對照組(Control)。

表 2-4 多重抗體微陣列晶片參數設計表

PMT 160	CapAb ($\mu\text{g/ml}$)	Blocking	Max Ag (pg/ml)	DetAb ($\mu\text{g/ml}$)	SA-HRP	Tyramide	SA-Cy5 ($\mu\text{g/ml}$)
TNF α	500	1% casein/PBS	1000	0.5	1:1600	1:50	1
α 1AT	72		8000				
Cystatin C	500		2000				
E-cadherin	500		12000				
Time	6-7hr	1hr	overnight	2hr	30min	5min	30min

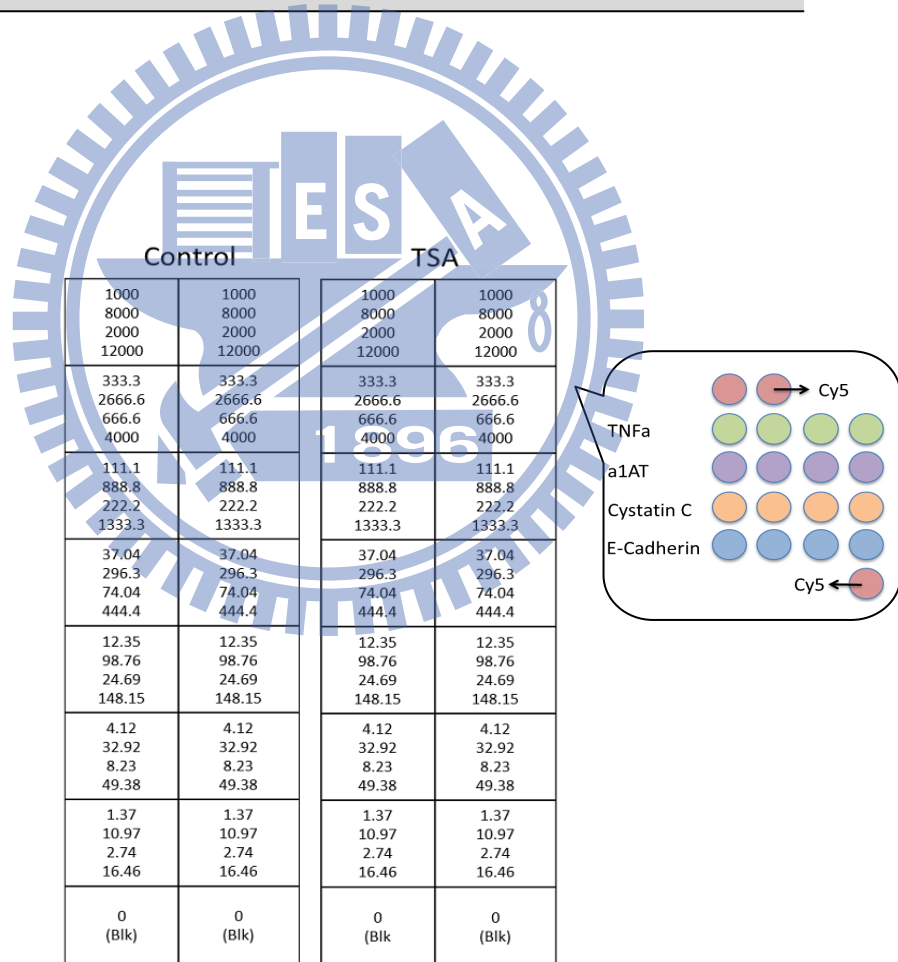


圖 2-13 各蛋白之重組蛋白濃度配置及樣品點陣位置

*載玻片上每個區間內由上到下依序為 TNF α 、 α 1AT、Cystatin C 及 E-Cadherin 重組蛋白的濃度(pg/ml)，CapAb 的點陣位置順序亦是如此。

3. 田口實驗設計法

以田口法優化實驗參數，利用此方法能以最少的實驗次數，將實驗參數及條件做最佳化設計，例如各溶液使用濃度、培養時間、緩衝液種類等，重複進行實驗流程，但是實驗參數及條件稍作更改，再與原本設計的參數條件相比較，期望能夠降低最低偵測極限、提升晶片的靈敏度。目的在比較無訊號放大組 (without TSA) 及訊號放大組 (with TSA) 各組使用田口法前後的差異，最後再進行兩組間最佳化參數結果比較。共做兩階段的田口實驗，第一階段改變參數的濃度，而第二階段則是主要改變培養的時間，每階段實驗皆再細分為兩組，一組為無訊號放大組，另一組為訊號放大組，這樣即可同時比較使用訊號放大系統與否和使用田口實驗設計法前後參數的挑選，對於最低偵測極限與訊號強度的改善情況。

(1) 第一階段田口實驗

選擇 $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ 直交表(附錄一)配置實驗因子(factor)與水準(level)，這個直交表可同時容納兩水準及三水準的因子，第一行的因子僅有兩個水準，第二到八行的因子有三個水準，稱為混和水準(mixed level)的直交表[35]，此表是最被田口博士推薦使用的表格之一，因為在這個直交表中，因子間的交互作用被分散到各行，這些表格有分散交互作用的特性是經過田口博士特別設計，讓我們在使用直交表時，即使所有行都配置了因子，因子效應與交互作用的混淆也相對得比其他直交表來得小[35]。第一組為無訊號放大組，第二組為訊號放大組，由於每組共有十八個不同條件的實驗，故我們將這十八個實驗分配到三片載玻片上完成，每片載玻片進行六個實驗，每區間為一個實驗，左邊為 ELISA 完整實驗，右邊則不加重組蛋白(圖 2-14)，我們將左邊的訊號值減去右邊的背景值作為最後的實驗計算值，在此主要目的為觀察 CapAb、重組蛋白、DetAb、SA-HRP 及 SA-Cy5 這五個實驗因子的濃度變化對結果的影響，每個因子有三個不同的水準，如表 2-5 (a)所示。這五個因子分別使用了附錄一 $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ 直交表的第二至六行，依序為 Ag、CapAb、DetAb、SA-Cy5、SA-HRP，配置圖如表 2-5 (b)所示，舉第十個實驗為例，CapAb 和 SA-HRP 為水準一、Ag 和 DetAb 為水準二、SA-Cy5 為水準三，

以這樣的條件來進行 ELISA 實驗；由於此表已將交互作用分散了，故可隨機將因子配置於表中[42]。注意，無訊號放大組與訊號放大組差別在於 SA-HRP 的有無，故進行無訊號放大組實驗時，不需考慮 SA-HRP 欄。

表 2-5 第一階段田口法-(a)因子水準參數設計(b)因子水準配置表

(a)

Assay	Factor Level	CapAb (μg/ml)	Ag (pg/ml)	DetAb (μg/ml)	SA-HRP	SA-Cy5 (μg/ml)
TNFα	Level 1	500	1000	0.72	1:200	1
	Level 2	250	250	0.5	1:800	0.5
	Level 3	100	62.5	0.1	1:1600	0.25
α1AT	Level 1	72	8000	0.72	1:200	1
	Level 2	50	2000	0.5	1:800	0.5
	Level 3	25	500	0.1	1:1600	0.25
Cystatin C	Level 1	500	2000	0.72	1:200	1
	Level 2	250	500	0.5	1:800	0.5
	Level 3	100	125	0.1	1:1600	0.25
E-Cadherin	Level 1	500	12000	0.72	1:200	1
	Level 2	250	3000	0.5	1:800	0.5
	Level 3	100	750	0.1	1:1600	0.25

(b)

Exp	Ag	CapAb	DetAb	SA-HRP	SA-Cy5
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	1	3	2	3
5	1	2	1	3	1
6	1	3	2	1	2
7	2	1	1	2	2
8	2	2	2	3	3
9	2	3	3	1	1
10	2	1	2	1	3
11	2	2	3	2	1
12	2	3	1	3	2
13	3	1	2	3	1
14	3	2	3	1	2
15	3	3	1	2	3
16	3	1	3	3	2
17	3	2	1	1	3
18	3	3	2	2	1

Exp. 1	blk	Exp. 7	blk	Exp. 13	blk
Exp. 2	blk	Exp. 8	blk	Exp. 14	blk
Exp. 3	blk	Exp. 9	blk	Exp. 15	blk
Exp. 4	blk	Exp. 10	blk	Exp. 16	blk
Exp. 5	blk	Exp. 11	blk	Exp. 17	blk
Exp. 6	blk	Exp. 12	blk	Exp. 18	blk

圖 2-14 第一階段田口法實驗設計示意圖

(2) 第二階段田口實驗

選擇 $L_{16}(2^{15})$ 直交表(附錄二)配置實驗因子與水準，這部份我們所改變的控制因子主要為時間，包括 blocking、重組蛋白、偵測抗體、tyramide 和 SA-Cy5 培養的時間，以及 SA-Cy5 的濃度，我們欲知道 blocking time 分別與 Ag、dAb 及 tyramide 培養時間的關係以及 tyramide 培養時間與 SA-Cy5 濃度之間的關係為何，是否有交互作用產生，故進行這幾組的交互作用判斷，如表 2-6 (a)、2-7 (a)；每實驗因子有兩個水準，而一片載玻片分為十六個區間，故選擇此表進行實驗。除了主要控制因子之外，我們也利用此表的特性，觀察因子間的交互作用以輔助參數的選擇。第一組為無訊號放大組，第二組為訊號放大組，每組須進行十六個不同條件的實驗，故我們將這十六個實驗分配到兩片載玻片上完成，每片載玻片進行八個實驗，與第一階段實驗相同，左邊為 ELISA 完整實驗，右邊則是不加重組蛋白(圖 2-15)，我們將左邊的訊號值減去右邊的背景值作為最後的實驗計算值。無訊號放大組的五個因子分別使用了附錄二 $L_{16}(2^{15})$ 直交表的第一、二、四、八、十五行，依序為 blocking time、Ag time、DetAb time、SA-Cy5 time 及 SA-HRP 濃度，兩個交互作用配置於第三、五行，依序為 blocking time 與 Ag time 的交互作用及 blocking time 與 dAb time 的交互作用，如表 2-6 (b)；而訊號放大組的六個

因子則使用了第一、二、四、八、十四、十五行，四個交互作用配置於第三、五、七、九行，如表 2-7 (b)所示，由於此表能進行交互作用的判斷，故我們依照附錄二點線圖(a)來配置因子。

表 2-6 第二階段田口法無訊號放大組-(a)因子水準參數設計(b)因子水準配置表

(a)

Factor	Blocking time	Ag time	DetAb time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
Level 1	2hr	4hr	1hr	15 min	1 ug/ml
Level 2	1hr	overnight	2hr	30 min	0.5 ug/ml

(b)

Exp.	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	DetAb time	Blocking time x dAb time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	2	2
3	1	1	1	2	2	1	2
4	1	1	1	2	2	2	1
5	1	2	2	1	1	1	2
6	1	2	2	1	1	2	1
7	1	2	2	2	2	1	1
8	1	2	2	2	2	2	2
9	2	1	2	1	2	1	2
10	2	1	2	1	2	2	1
11	2	1	2	2	1	1	1
12	2	1	2	2	1	2	2
13	2	2	1	1	2	1	1
14	2	2	1	1	2	2	2
15	2	2	1	2	1	1	2
16	2	2	1	2	1	2	1

表 2-7 第二階段田口法訊號放大組-(a)因子水準參數設計(b)因子水準配置表

(a)

Factor	Blocking time	Ag time	DetAb time	TSA time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
Level						
Level 1	2hr	4hr	1hr	5min	15 min	1 ug/ml
Level 2	1hr	overnight	2hr	10min	30 min	0.5 ug/ml

(b)

Exp.	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	DetAb time	Blocking time x dAb time	TSA time x SA-Cy5	TSA time	Blocking time x TSA time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1
5	1	2	2	1	1	2	1	1	2	2
6	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1
7	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1
8	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2
9	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2
10	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1
11	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1
12	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2
13	2	2	1	1	2	1	1	2	2	1
14	2	2	1	1	2	1	2	1	1	2
15	2	2	1	2	1	2	1	2	2	2
16	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1

Exp. 1	blk	Exp. 9	blk
Exp. 2	blk	Exp. 10	blk
Exp. 3	blk	Exp. 11	blk
Exp. 4	blk	Exp. 12	blk
Exp. 5	blk	Exp. 13	blk
Exp. 6	blk	Exp. 14	blk
Exp. 7	blk	Exp. 15	blk
Exp. 8	blk	Exp. 16	blk

圖 2-15 第二階段田口法實驗設計示意圖

4. 多重抗體微陣列晶片(使用田口法後)

經由田口實驗設計法，我們挑選出最佳的參數設計如表 2-8 及表 2-9 所示，實驗設計與圖 2-13 相同，對於無訊號放大組而言，唯一有變動的參數為 DetAb，濃度由 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 變為 0.72 $\mu\text{g/ml}$ ；對於訊號放大組，blocking 的時間從一小時變為兩小時，DetAb 由 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 變為 0.72 $\mu\text{g/ml}$ 、DetAb 培養時間由兩小時縮短為一小時，SA-HRP 濃度由 1:1600 變為 1:800，而 tyramide 的時間由五分鐘變為十分鐘；SA-HRP 濃度的挑選除了依據田口法的結果，亦參考附錄三的實驗。

表 2-8 無訊號放大組參數設計表(田口法後)

PMT 160	CapAb ($\mu\text{g/ml}$)	Blocking	Max Ag (pg/ml)	DetAb ($\mu\text{g/ml}$)	SA-Cy5 ($\mu\text{g/ml}$)
TNF α	500	1% casein/PBS	1000	0.72	1
α 1AT	72		8000		
Cystatin C	500		2000		
E-cadherin	500		12000		
Time	6-7hr	1hr	overnight	2hr	30min

表 2-9 訊號放大組參數設計表(田口法後)

PMT 160	CapAb ($\mu\text{g/ml}$)	Blocking	Max Ag (pg/ml)	DetAb ($\mu\text{g/ml}$)	SA-HRP	Tyramide	SA-Cy5 ($\mu\text{g/ml}$)
TNF α	250	1% casein/PBS	1000	0.72	1:800	1:50	1
α 1AT	72		8000				
Cystatin C	250		2000				
E-cadherin	250		12000				
Time	6-7hr	2hr	overnight	1hr	30min	10min	30min

三、結果與討論

3.1 單一抗體晶片(Single assays)

3.1.1 微點大小

以 200 $\mu\text{g/ml}$ 的 SA-Cy5 分別點陣 1~8 顆液滴，結果如圖 3-1 所示，微點直徑越小則每單位面積所佔之抗體越多，故靈敏度越高，一顆液滴直徑平均約為 120 μm ，為最小直徑，故以此當作實驗微點的大小，而每顆液滴的體積約 1100 pl 。

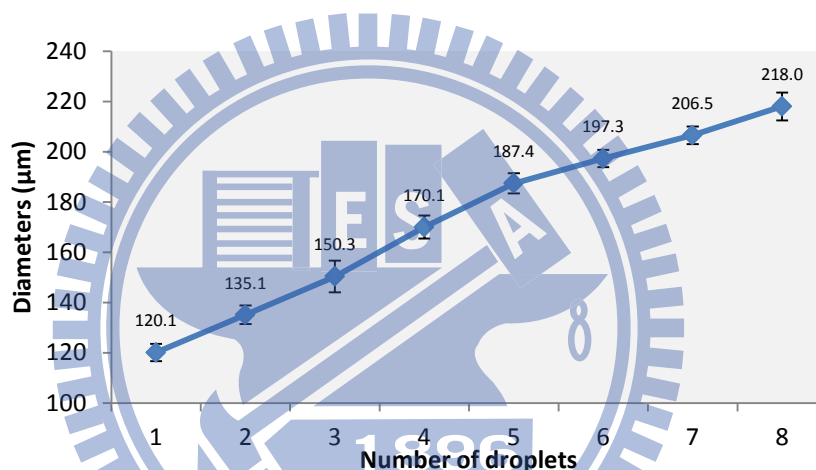


圖 3-1 不同液滴數之微點大小

3.1.2 晶片表面均勻度

以 SA-Cy5 濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ ，於十六個區間中，點陣 4×6 個微點分別於經 epoxysilane 及 aminosilane 處理的載玻片上，如圖 3-2 所示，結果發現經由 aminosilane 處理的載玻片螢光強度低於由 epoxysilane 所處理的載玻片(圖 3-3a)，這是由於環氧基反應性較強的特性，其結構容易與捕獲抗體鍵結，故我們選擇以 epoxysilane 處理的載玻片做為實驗材料。除了螢光強度高低的問題外，我們還發現同批製作表面處理的載玻片有雙側強度不平均的問題(圖 3-3b)。

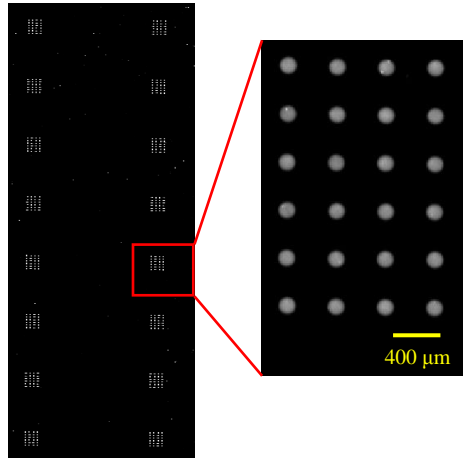


圖 3-2 SA-Cy5 螢光掃描圖

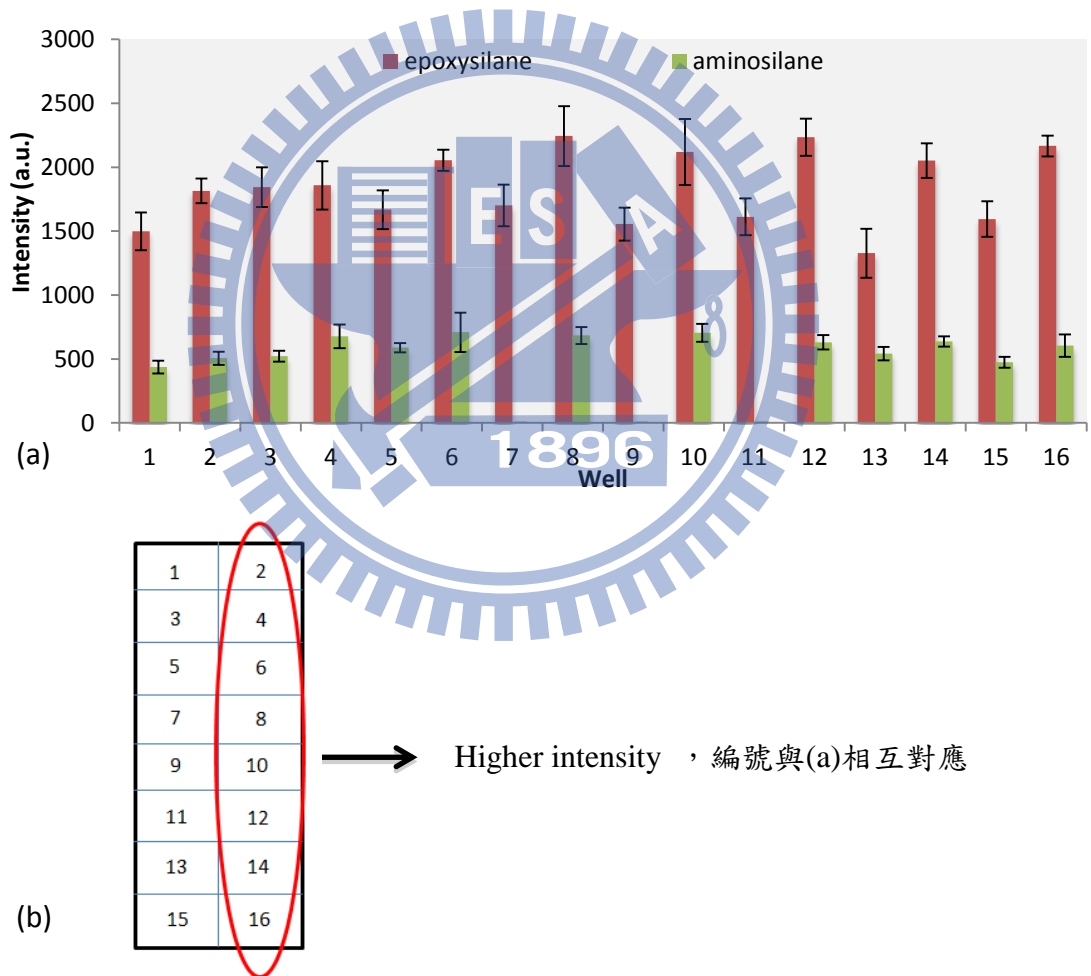


圖 3-3 (a)不同材料表面處理載玻片螢光強度(b)強度不均示意圖

為了改善均勻度問題，我們發現 piranha 溶液未攪拌均勻也許是使表面處理不均勻的主要原因，次要原因可能為雷射掃描機本身的誤差；解決機器本身誤差的方法，我們將載玻片上下顛倒重複掃描，以降低變異；在 piranha 溶液未攪拌均勻的問題方面，進行 piranha 溶液配置時，利用玻璃棒攪拌一分鐘之後再進行測試，除了我們所製作的載玻片，另外還以市售的載玻片做為對照組，以變異係數作為標準，改善後的結果(圖 3-4 及圖 3-5)顯示我們所製作的載玻片有足夠的均勻度能夠用當做抗體微陣列晶片的基材。

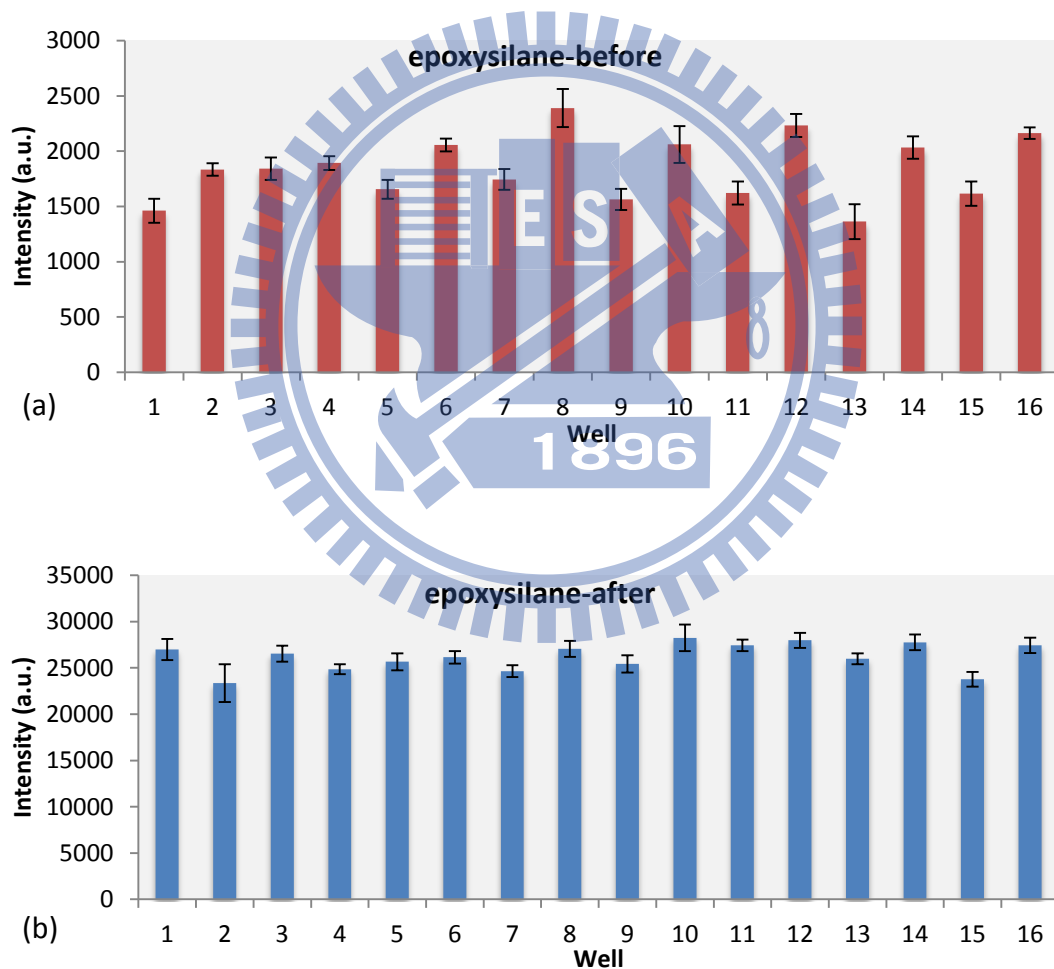


圖 3-4 改善強度不均勻前後的 epoxysilane 載玻片: (a)改善前 (b)改善後

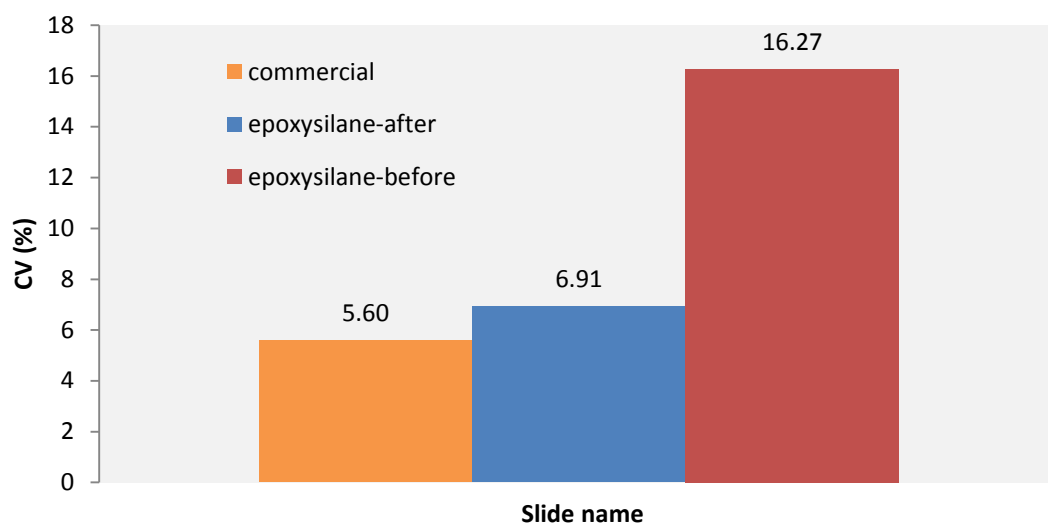


圖 3-5 整片載玻片之變異係數

3.1.3 三明治酵素免疫分析法

綜合所有實驗結果，TNF α 以最高濃度為 1000 pg/ml 進行三倍連續稀釋，繪製出標準曲線如圖 3-6 所示，此結果符合預期，濃度越高，所測得之螢光強度越高；重複進行實驗過程中發現有些沒有加入重組蛋白及濃度極低的區間也出現訊號，此結果不符合預期，理論上沒有加入抗原的區間應該不會產生訊號且重組蛋白濃度極低區間，要以特定軟體才能發現訊號，故我們推測以下三種為可能造成之原因：

- (1) 螢光染劑沾黏於點樣針上，以至於在點陣時就存在著少許的螢光染劑
- (2) 作為定位用之螢光染劑於 blocking 時吸附在 CapAb 上，影響結果
- (3) DetAb 濃度過高造成抗體間的鍵結

螢光染劑沾黏問題，我們以更變點陣順序來改善，將螢光染劑於最後進行點陣且完成後將點樣針徹底洗淨。我們將定位用之染劑濃度由 200 μ g/ml 調整至 100 μ g/ml，而 DetAb 的濃度選定，未來會在進行田口實驗設計法時一併調整。

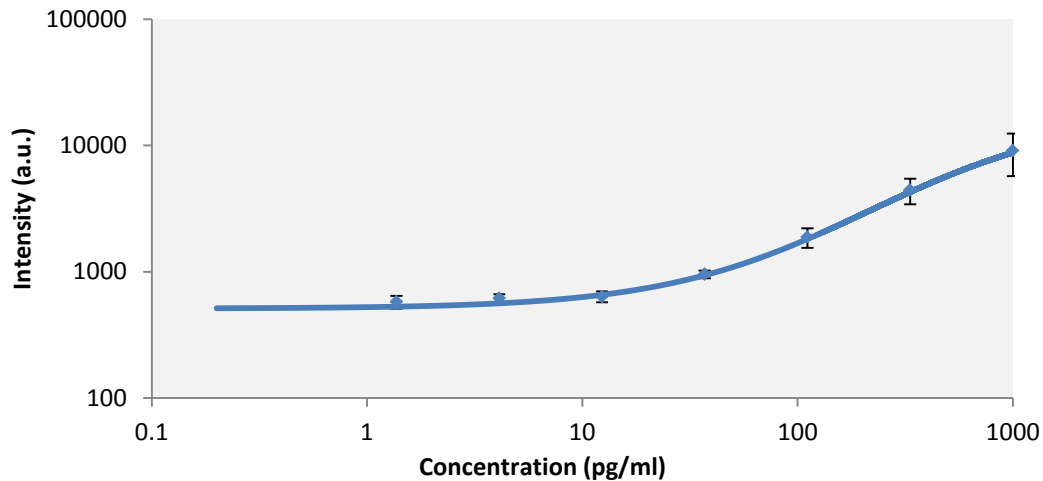


圖 3-6 TNF α 標準曲線

3.1.4 訊號放大系統 (TSA)

同時進行有無使用 TSA 的實驗，以沒有加入 TSA 作為對照組，重組蛋白濃度最高 1000 pg/ml，以三倍連續稀釋，實驗結果顯示，濃度越高，螢光訊號越強，對照組的最低偵測極限為 8.54 pg/ml，而搭配 TSA 的則為 13.9 pg/ml，將兩組實驗繪出標準曲線進行比對(圖 3-7)，我們發現這次的實驗搭配 TSA 後的螢光訊號有明顯的增加，對於最低偵測極限來說卻沒有改善，但由於這部分的數據為尚未優化實驗參數的結果，故後面章節會將參數優化後再次進行比對。

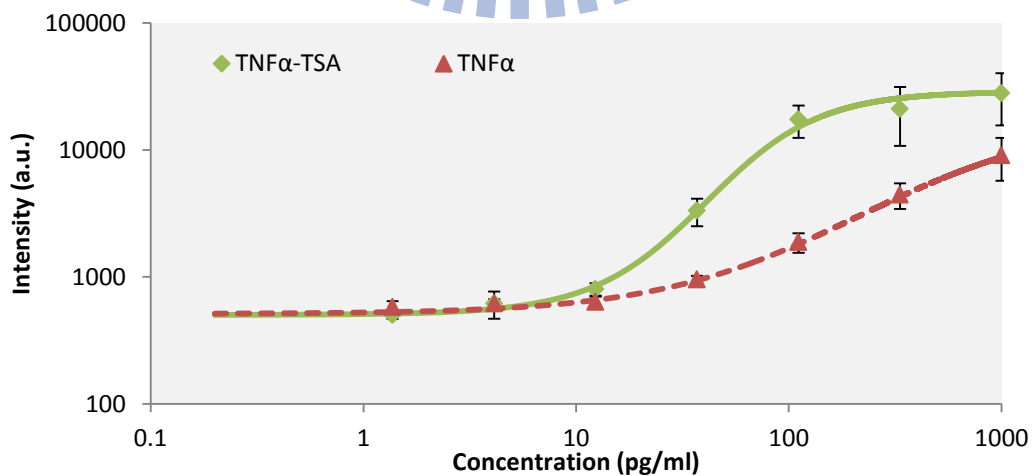


圖 3-7 TNF α 有無訊號放大系統實驗比對圖

3.1.5 單一抗體微陣列晶片

我們將 TNF α 、 α 1AT、Cystatin C 和 E-Cadherin 這四種蛋白進行實驗，實驗結果顯示四種蛋白皆有可用性，皆能繪製出標準曲線(圖 3-8)濃度越高其螢光強度越強，偵測極限依序為 8.54 pg/ml、11.48 pg/ml、42.42 pg/ml、34.53 pg/ml。

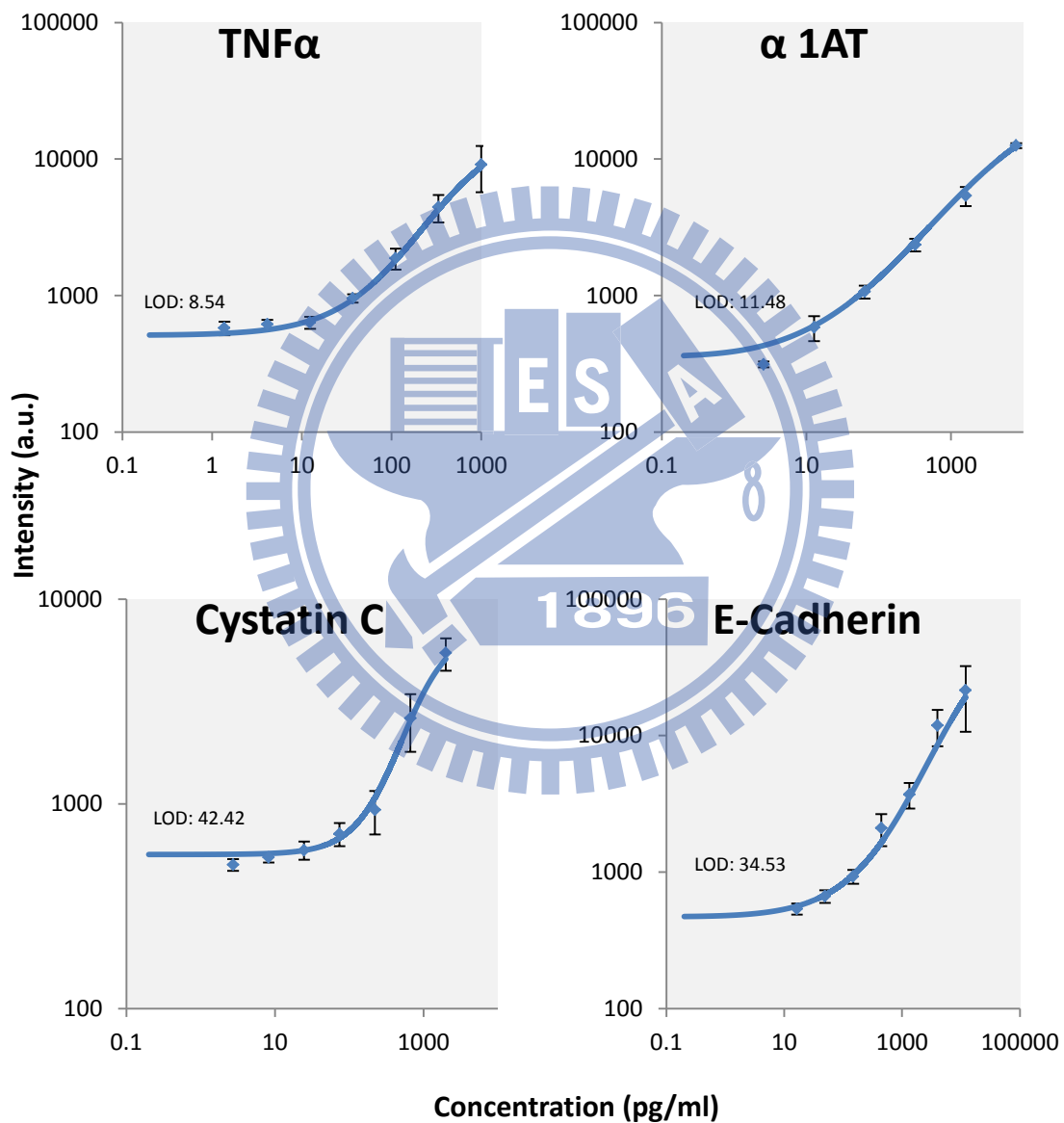


圖 3-8 四種蛋白質的標準曲線

3.1.6 討論

解決了表面均勻度的問題後，我們將三明治酵素免疫分析法應用在微陣列晶片上，此時主要問題在於晶片的重複性，在晶片的重複性方面遇到幾個困難點都是微點形態 (morphology) 的不完整，第一個問題為”comet tail”的產生，第二個問題則是”coffee ring”的產生。

由於我們無法降低環境濕度，僅能提升濕度，而每日天氣的變化，環境的濕度也都不同，使溶液的蒸發時間不穩定，我們發現在進行 blocking 步驟前須確保晶片上的微點已呈乾燥狀態，若未呈現乾燥狀態，則 blocking 後，易造成微點的型態不佳，產生 comet tail 的情況(圖 3-9)而影響分析結果。最開始的解決方法是將培養完成的晶片放在開放空間五至十分鐘，使其乾燥，此法確實有效解決 comet tail 的問題，但隨著天氣的改變，將晶片放在開放空間使其乾燥的時間日趨增長，一開始十分鐘即可乾燥，進而延長到三十分鐘，最後等待至四個小時都還未乾，為了解決乾燥問題，我們試了以下幾種條件：

- (1) 將培養完成的晶片放在環境濕度約為 60% 的開放空間進行乾燥。
- (2) 將培養完成的晶片放在以除濕機將環境濕度控制在 50% 的開放空間進行乾燥。
- (3) 將培養完成的晶片放在利用矽膠乾燥劑將環境溼度降低至 10%~20% 的密閉容器中十至二十分鐘。

實驗結果發現第三種條件能夠順利使晶片乾燥，blocking 後不會有 comet tail 的情況發生，最後以此當作乾燥的標準實驗步驟。

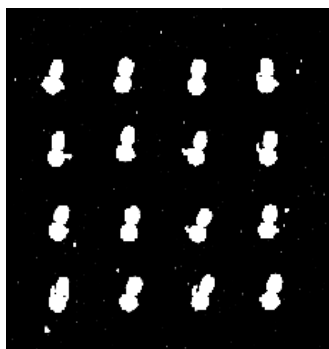


圖 3-9 comet tail

關於 coffee ring(圖 3-10)這個問題的產生，由於微點邊緣蒸發速度較快，造成微點周圍訊號較中心高出許多，這是由於表面張力梯度不同而引起，此現象被稱為 Marangoni Effect[43]，推測形成原因為以下兩點：

- (1)實驗環境控制不當；在密閉容器培養時，容器中環境濕度過低
- (2)點陣抗體時工作台溫度過高，但尚未使微點完全乾燥

此問題的解決方法為確保點陣時工作台溫度保持室溫且環境濕度維持 70% 左右，培養抗體的容器中環境濕度為 90~95%；盡量在點樣機開機後一小時內完成點陣抗體的步驟，因為我們的點樣機無法控制溫度，所以當工作時間過長時，工作台的溫度會逐漸上升，有幾次在點陣完畢後抗體因此立即完全乾燥導致實驗失敗。



圖 3-10 coffee ring

3.2 多重抗體晶片 (Multiplex assays)

3.2.1 交叉反應實驗 (Cross-reactivity)

實驗結果如圖 3-11 所示，X 軸代表所加入的重組蛋白及 DetAb 種類，Y 軸代表 CapAb 的種類，而 Z 軸則代表螢光強度，若有交叉反應的產生，則會產生非專一性鍵結的螢光訊號；而我們可以由圖 3-11,12 確定這四種蛋白質間無明顯交叉反應，故將這四種蛋白質一起進行三明治酵素免疫分析法製作品片是不會有相互混淆的情況發生。原先我們有使用 Ubiquitin 這種蛋白質，但是在進行交叉反應實驗時，發現該蛋白會與其他蛋白有所鍵結或螢光染劑沾黏在 Ubiquitin 的 CapAb 上造成非專一性鍵結的訊號產生(圖 3-13)，所以我們將不使用 Ubiquitin 進行後續的實驗。

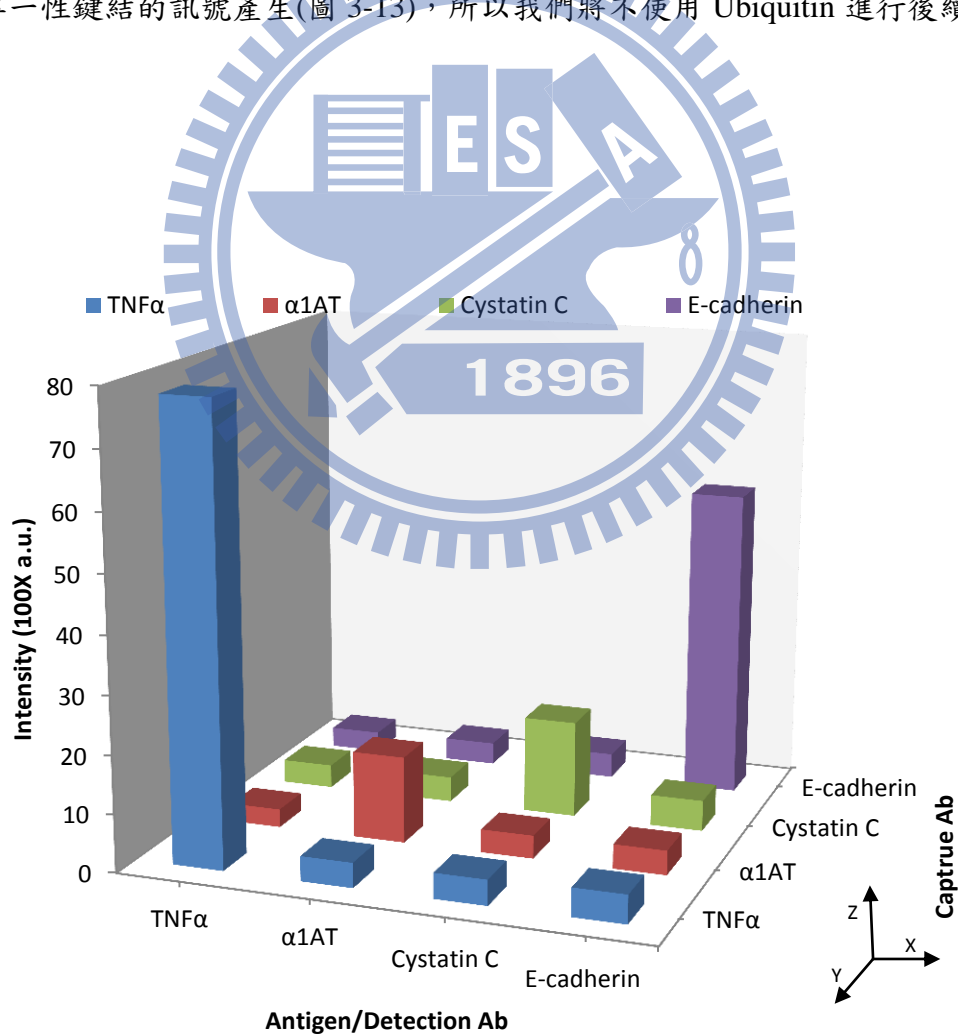


圖 3-11 交叉反應實驗結果圖

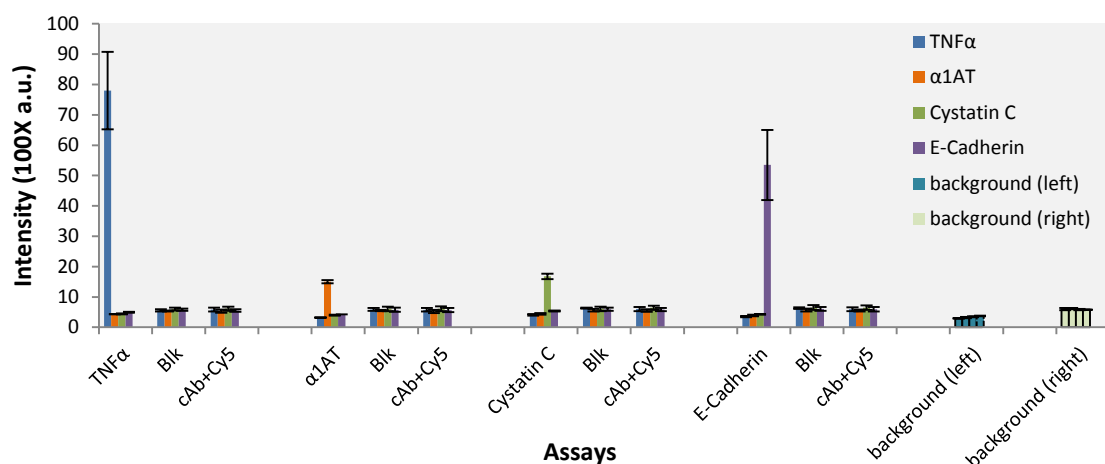


圖 3-12 交叉反應實驗結果總數據圖

此圖展示了圖 2-11 實驗設計的結果，以 TNF α 蛋白為例，水平座標 TNF α 為第 1 及 3 區間、Blk 為第 2 區間、cAb+Cy5 為第 4 區間，以此類推。由第 1 區間我們可以得知不同 CapAb 與 TNF α Ag 間的作用，第 2 區可得知不同 CapAb 與 TNF α DetAb 間的作用，由第 3 區間可以得知螢光染劑與 CapAb 的沾黏程度；而 background (left) 為載玻片左側背景值，background (right) 為載玻片右側背景值，兩邊各取十六個 spot 之外的值，每四個值為一組，平均後得到四個數據當作背景值的依據；右側略高於左側，原因是掃描機本身的誤差。若有交叉反應，我們可觀察出以下三種情況的交叉反應：CapAb 與 Ag、CapAb 與 DetAb 及 CapAb 與螢光染劑間的作用，如圖 2-12 所示。由此圖可得知，不同抗體間的鍵結與背景值差不多，且理想鍵結清楚可辨別，表示四種蛋白質間並無明顯的交叉反應。

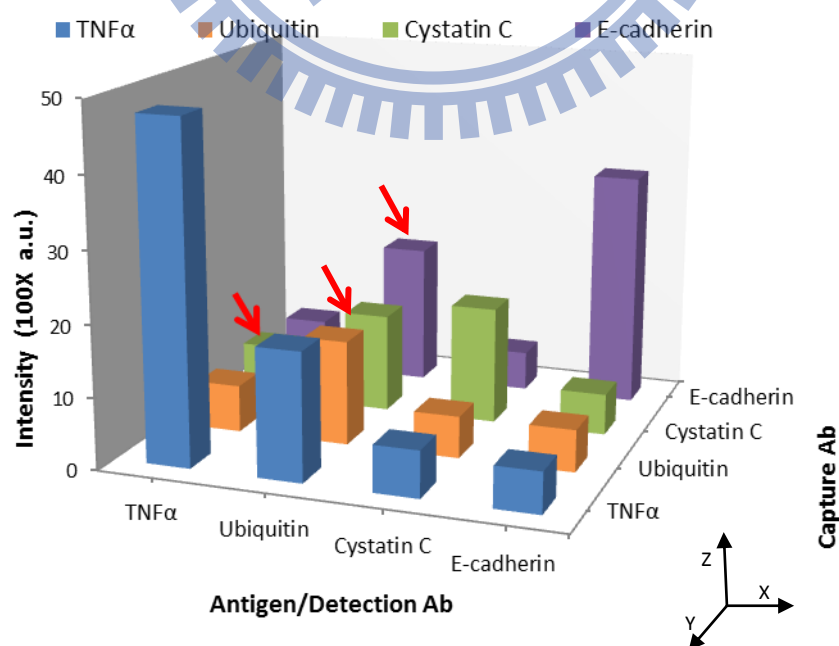


圖 3-13 以 Ubiquitin 進行交叉反應實驗結果圖

3.2.2 多重抗體微陣列晶片 (田口法前)

我們以使用田口法前的實驗參數來製作微陣列晶片，這次的實驗首先確定了我們能將順利將多種蛋白質同時於微陣列晶片上進行結果分析，能繪製出標準曲線以及計算其最低偵測極限，再者，訊號放大系統的使用對於各蛋白質都有一定的效果，而這部分的實驗結果我們於將 3.2.4 一併進行討論。

3.2.3 田口實驗設計法

兩階段的田口法，我們都將所有實驗以 Array-Pro Analyzer 進行影像螢光訊號分析，將這些實驗值數據計算出 S/N 比，以此作為品質計量的指標；我們針對望大特性的情況來進行計算，也就是品質特性越大越好的情況，其計算方程式為

$$S/N = -10 \log \frac{\sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2}}{n} \quad (1)$$

實驗計算值為 y_i ，共有 n 個， $i=1, 2, \dots, n$ ，此方程式同時包含了兩個目標，一個是最大平均螢光強度，另一個則是最小的變異，我們除了要得到最佳品質特性之外，還要使實驗結果擁有最小的標準差，以達到穩健的目的。數據分析完成後製作出 S/N 比因子反應表及 S/N 比因子反應圖，挑選出最大 S/N 比的因子組合。

1. 第一階段田口法

實驗結果分為有無訊號放大系統兩大組，以 $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ 直交表完成十八個實驗，無訊號放大組總共有四個實驗因子，每因子有三個變動水準，實驗結果如表 3-1 及圖 3-14 所示，水準的計算方式以 CapAb 在水準一(65.13)為例，將八個重複的實驗值¹以公式(1)進行計算，會獲得一個 S/N 值，而十八個實驗中有六個實驗的 CapAb 為水準一，將這六個 S/N 值取平均，即可得表格中的水準值；我們藉由一半準則進行重要因子的判斷[35]，重組蛋白、CapAb 及 DetAb 的濃度為相對重要的因子，而 SA-Cy5 的濃度改變在這次的實驗中為最不重要的因子，故我們所挑選出的最佳參數組合為 CapAb、重組蛋白及 DetAb 的濃度皆為最高濃度，對於 Cystatin C 而言，CapAb 在 250 $\mu\text{g/ml}$ 時的 S/N 比較大，不過相對於 100 $\mu\text{g/ml}$ 而言，500 $\mu\text{g/ml}$ 及 250

¹ 每種蛋白有四個重複的微點，進行兩次掃描，故有八個螢光訊號強度的實驗值

$\mu\text{g/ml}$ 可算是無差異，故我們將 $500\ \mu\text{g/ml}$ 及 $250\ \mu\text{g/ml}$ 這兩個參數當作最佳參數於最後的實驗一起進行再做比較；由於正式檢測生物標記時，樣品的濃度是未知數，所以抗原的濃度是無法挑選的。訊號放大系統組總共有五個實驗因子，每個因子亦有三個變動水準，實驗結果如表 3-2 及圖 3-15 所示，經由一半準則判斷，結果顯示 SA-HRP 濃度的改變為最重要的因子，其參數為 1:200 最佳，但是我們透過經驗法則以及附件三的實驗結果，我們選擇 1:800 當作本實驗的最佳參數，因為當使用 SA-HRP 濃度為 1:200 時，會有太多的 Tyramide 鍵結在微點上，導致微點與微點之間幾乎連在一起且 1:200 的標準差過大。CapAb 則是選擇 $250\ \mu\text{g/ml}$ ，對於 DetAb 而言， α1AT 在 $0.72\ \mu\text{g/ml}$ 時 S/N 比明顯較大，而其餘的蛋白則是 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ 和 $0.72\ \mu\text{g/ml}$ 沒有差別，故我們選擇水準一， $0.72\ \mu\text{g/ml}$ 為實驗參數，而 SA-Cy5 濃度的改變依然為不重要的因子。



表 3-1 第一階段無訊號放大組-因子反應表

TNF α	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5
Level1	65.13	66.27	65.10	60.41
Level2	63.63	63.07	62.50	56.34
Level3	46.16	45.59	47.34	58.18
E1→2	-1.49	-3.19	-2.60	-4.06
E2→3	-17.47	-17.48	-15.15	1.83
Range	18.97	20.67	17.75	4.06
Rank	2	1	3	4

α 1AT	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5
Level 1	55.44	42.01	39.15	35.67
Level 2	25.35	35.07	37.72	34.04
Level 3	26.10	29.80	30.02	37.18
E1→2	-30.09	-6.94	-1.42	-1.63
E2→3	0.74	-5.27	-7.70	3.14
Range	30.09	12.21	9.13	3.14
Rank	1	2	3	4

Cystatin C	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5
Level 1	43.82	54.76	50.21	41.01
Level 2	49.48	45.04	43.43	42.71
Level 3	32.41	25.91	32.06	42.00
E1→2	5.65	-9.71	-6.77	1.69
E2→3	-17.06	-19.13	-11.36	-0.70
Range	17.06	28.84	18.14	1.69
Rank	3	1	2	4

E-Cadherin	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5
Level 1	69.81	67.81	66.82	58.31
Level 2	70.23	60.69	64.07	63.29
Level 3	40.19	51.72	49.33	58.62
E1→2	0.418	-7.12	-2.748	4.97
E2→3	-30.03	-8.96	-14.74	-4.67
Range	30.03	16.09	17.48	4.97
Rank	1	3	2	4

*E1→2 表示由 level 1 到 level 2 的變動量；E 2→3 表示由 level 2 到 level 3 的變動量

*Range 表示 level 的總變動量

*Rank 表示計算值的大小排序，變動越大排序越前面，表示影響越大、為越重要的因子

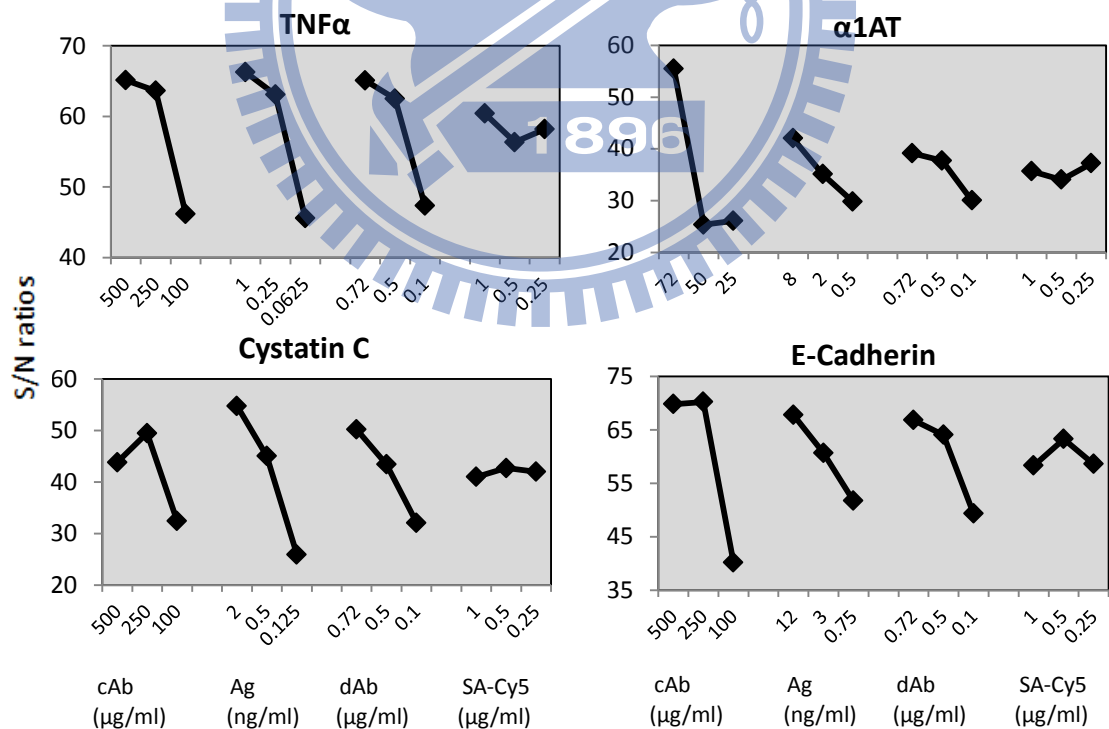


圖 3-14 第一階段無訊號放大組-因子反應圖

*X 軸為不同水準的因子，Y 軸為 S/N 比

*線段差異越大表示該因子水準的變動影響實驗結果的程度越大

表 3-2 第一階段訊號放大組-因子反應表

TNFα	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5	SA-HRP
Level 1	71.88	69.61	70.97	67.82	75.24
Level 2	78.26	69.70	71.00	66.10	71.59
Level 3	46.76	57.59	54.93	62.98	50.07
E1→2	6.38	0.08	0.020	-1.72	-3.65
E2→3	-31.50	-12.10	-16.06	-3.11	-21.51
Range	31.50	12.10	16.06	4.84	25.16
Rank	1	4	3	5	2

α1AT	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5	SA-HRP
Level 1	56.98	51.22	53.46	50.33	61.11
Level 2	40.49	49.17	50.07	49.08	51.03
Level 3	51.02	48.11	44.96	49.08	36.36
E1→2	-16.48	-2.05	-3.39	-1.24	-10.08
E2→3	10.52	-1.05	-5.10	0.00	-14.66
Range	16.48	3.11	8.50	1.25	24.75
Rank	2	4	3	5	1

Cystatin C	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5	SA-HRP
Level 1	64.81	77.34	66.60	65.97	73.20
Level 2	65.81	69.21	66.02	58.95	69.10
Level 3	61.0	45.10	59.04	66.72	49.35
E1→2	1.00	-8.12	-0.58	-7.02	-4.09
E2→3	-4.78	-24.11	-6.97	7.77	-19.74
Range	4.78	32.24	7.56	7.77	23.84
Rank	5	1	4	3	2

E-Cadherin	CapAb	Ag	DetAb	SA-Cy5	SA-HRP
Level 1	74.87	78.44	74.42	72.38	81.68
Level 2	82.44	76.33	73.86	73.03	73.82
Level 3	60.58	63.12	69.60	72.48	62.39
E1→2	7.566	-2.10	-0.56	0.65	-7.85
E2→3	-21.85	-13.21	-4.26	-0.54	-11.43
Range	21.85	15.31	4.82	0.65	19.28
Rank	1	3	4	5	2

*E1→2 表示由 level 1 到 level 2 的變動量；E2→3 表示由 level 2 到 level 3 的變動量

*Range 表示 level 的總變動量

*Rank 表示計算值的大小排序，變動越大排序越前面，表示影響越大、為越重要的因子

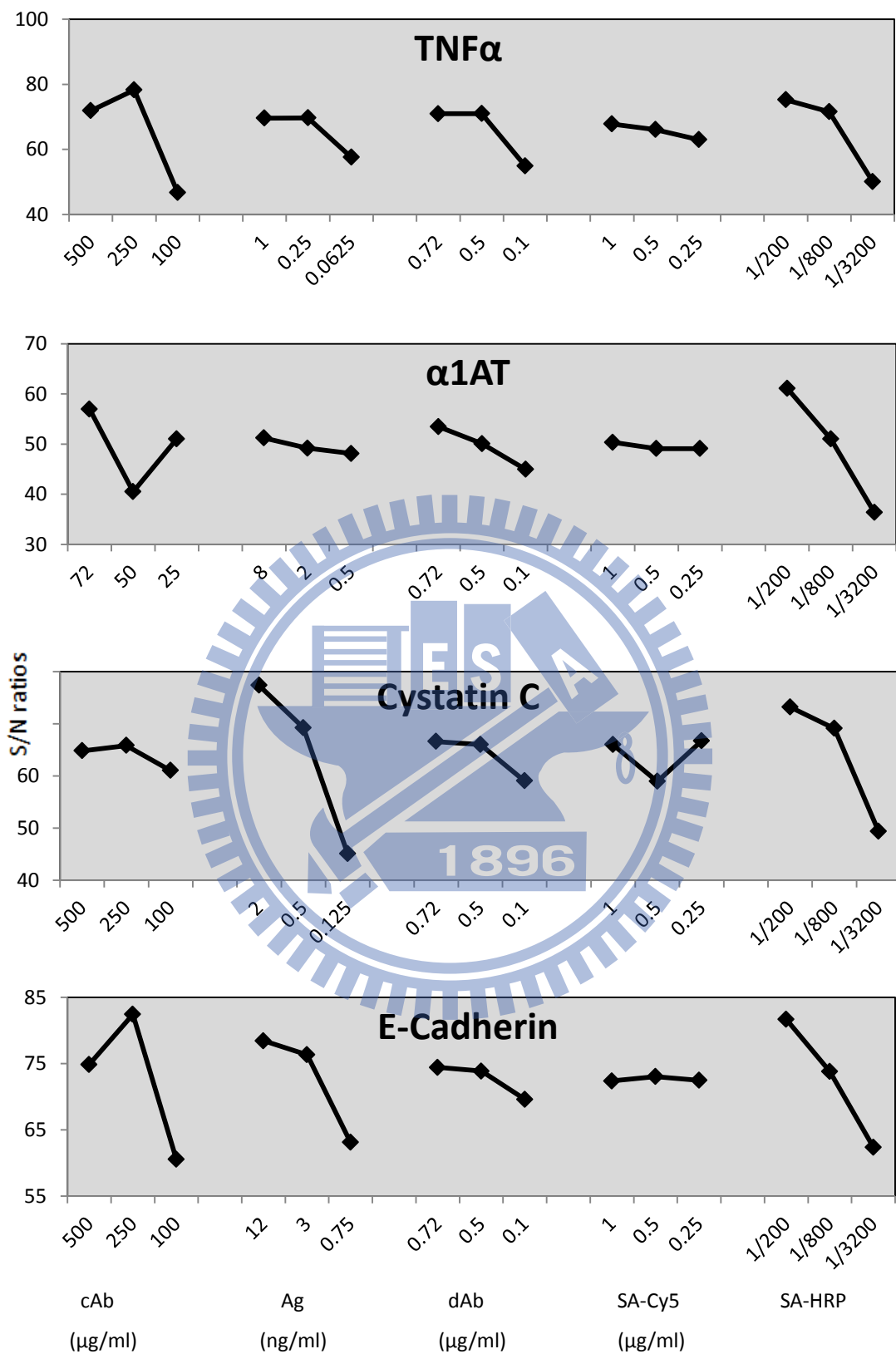


圖 3-15 第一階段訊號放大組-因子反應圖

*X 軸為不同水準的因子，Y 軸為 S/N 比

*線段差異越大表示該因子水準的變動影響實驗結果的程度越大

2. 第二階段田口法

實驗結果分為無訊號放大組與訊號放大組，以 $L_{16}(2^{15})$ 直交表完成十六個實驗，無訊號放大組總共有五個實驗因子，兩組交互作用，每因子有兩個變動水準，實驗結果如表 3-3 及圖 3-16 所示，重組蛋白及 DetAb 的培養時間為最主要的變動影響因子，其次則是 SA-Cy5 的培養時間以及 blocking 時間與重組蛋白培養時間的交互作用，故我們所挑選出的最佳參數組合為 blocking 一小時、重組蛋白培養隔夜、DetAb 的培養時間兩小時及 SA-Cy5 培養半小時，由單獨 blocking 時間來看，blocking 時間的變動並不會有所影響，所以我們選擇時間較短的一小時當作最佳參數；從 blocking 時間與重組蛋白培養時間的交互作用來看(圖 3-17)，我們可以更加地確定一小時的 blocking 時間是較好的實驗參數。而螢光染劑濃度的變動，對於 Cystatin C 而言是有影響的，且 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 較好，故我們選擇 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 作為參數。訊號放大系統組總共有六個實驗因子，三組交互作用，每因子亦有兩個變動水準，實驗結果如表 3-4 及圖 3-18 所示，結果顯示 tyramide、重組蛋白培養時間及 blocking 時間為主要的影響因子。由 tyramide 與 SA-Cy5 濃度的交互作用(圖 3-19)，對 Cystatin C 和 E-Cadherin 是有影響的，且濃度 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 較好，而對其它的蛋白質也有些許相同趨勢的影響；DetAb 的培養時間影響不大，故最後我們所挑選出的最佳參數組合為 blocking 兩小時、重組蛋白培養隔夜、DetAb 培養時間一小時、tyramide 培養十分鐘、SA-Cy5 濃度為 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 培養半小時。

表 3-3 第二階段無訊號放大組-因子反應圖

TNF α	A	B	AxB	C	AxC	D	E
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	64.72	58.24	66.89	61.38	65.65	63.11	66.05
level 2	65.57	72.05	63.40	68.91	64.64	67.18	64.24
E12	0.85	13.80	-3.48	7.52	-1.01	4.07	-1.80
Range	0.85	13.80	3.48	7.52	1.01	4.07	1.80
Rank	7	1	4	2	6	3	5

α 1AT	A	B	AxB	C	AxC	D	E
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	57.13	50.71	59.01	53.67	56.18	55.38	57.36
level 2	57.09	63.50	55.21	60.54	58.03	58.84	56.86
E12	-0.04	12.78	-3.79	6.86	1.84	3.46	-0.50
Range	0.04	12.78	3.79	6.86	1.84	3.46	0.50
Rank	7	1	3	2	5	4	6

Cystatin C	A	B	AxB	C	AxC	D	E
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	41.62	31.51	42.63	36.31	39.99	40.19	39.18
level 2	40.59	50.70	39.58	45.90	42.22	42.09	43.04
E12	-1.03	19.18	-3.05	9.58	2.23	1.82	3.85
Range	1.03	19.18	3.05	9.58	2.23	1.82	3.85
Rank	7	1	4	2	5	6	3

E-Cadherin	A	B	AxB	C	AxC	D	E
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	67.05	60.16	69.07	65.39	66.84	66.47	67.54
level 2	66.72	73.62	64.70	68.39	66.94	67.31	66.24
E12	-0.33	13.46	-4.36	2.99	0.10	0.83	-1.30
Range	0.33	13.46	4.36	2.99	0.10	0.83	1.30
Rank	6	1	2	3	7	5	4

*A, B, AxB, ...E 為因子於因子反應圖的編號 *E12 表示由 level 1 到 level 2 的變動量*Range 表示 level 總變動量 *Rank 表示計算值大小排序，變動越大排序越前面，表示影響越大

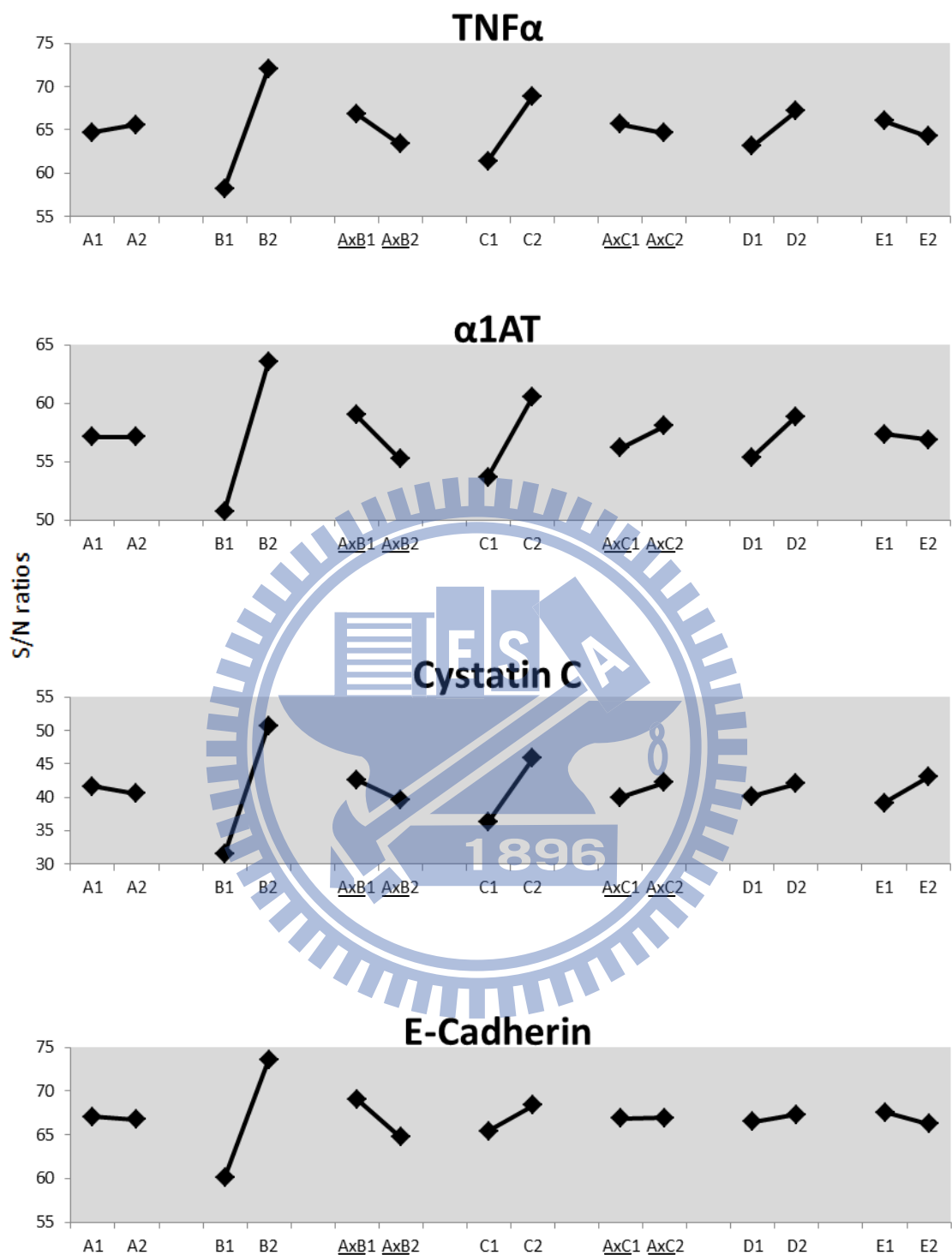


圖 3-16 第二階段無訊號放大組-因子反應圖

*A, B, AxB, C,...E 為因子於因子反應表的編號;1 表示水準一，2 表示水準二

*X 軸為不同水準的因子，Y 軸為 S/N 比

*線段差異越大表示該因子水準的變動影響實驗結果的程度越大

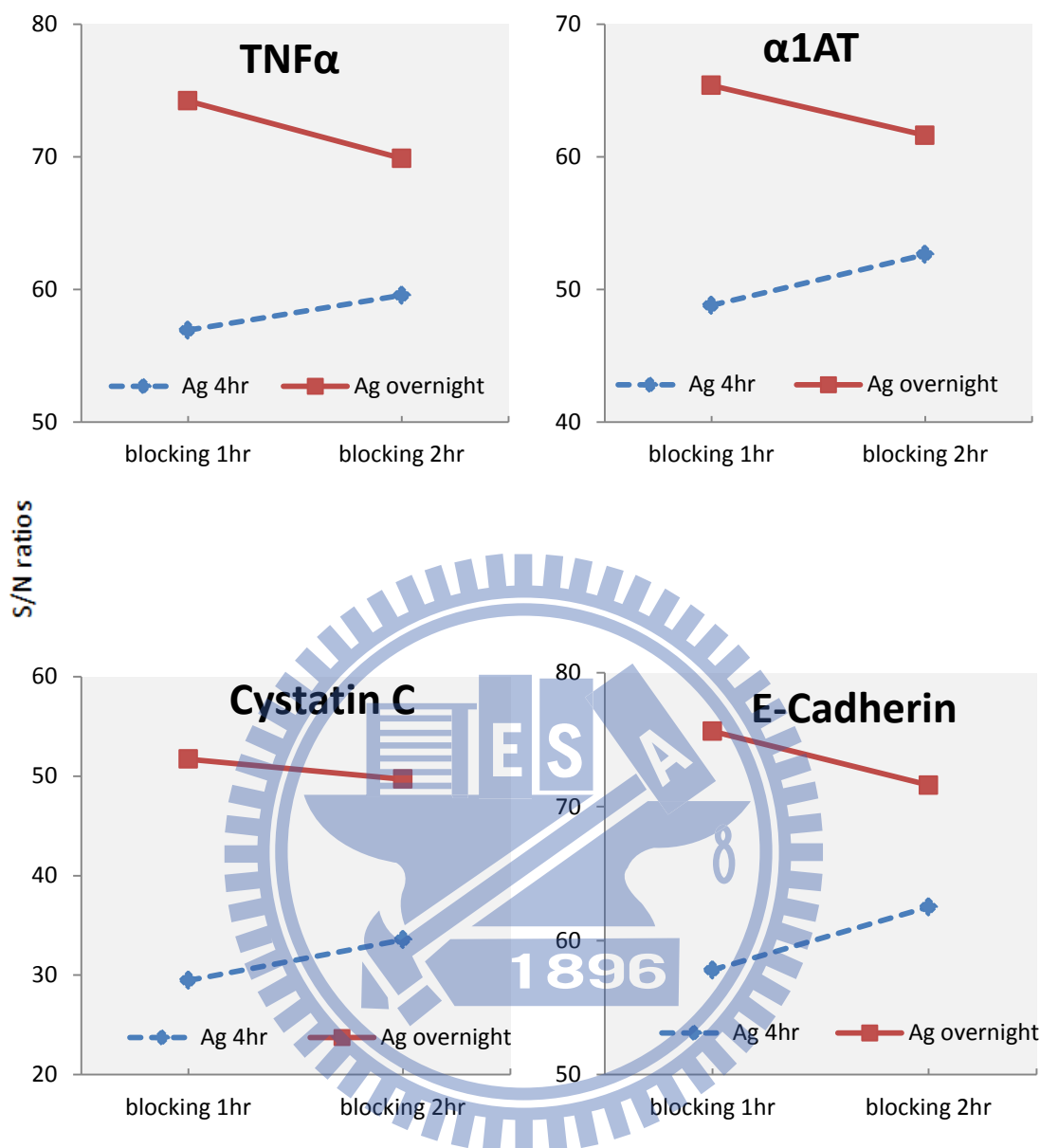


圖 3-17 blocking 時間與重組蛋白培養時間之交互作用

當無交互作用時，兩條線會呈現平行，表示兩者為獨立的因子，故兩條線不平行的程度為交互作用的程度，越不平行表示兩因子間的交互作用越大。當 Ag 培養 overnight 時(red curve)，blocking 的時間選擇 1hr 的效果會優於 2hr；當 Ag 培養 4hr 時(blue curve)，blocking 的時間選擇 2hr 的效果會優於 1hr，由此可知 Ag 培養的時間與 blocking 的時間在特定的條件下有加乘的效果，我們選擇 Ag 培養 overnight，故 blocking 的時間選擇 1hr。

表 3-4 第二階段訊號放大組-因子反應表

TNF α	A	B	AxB	C	AxC	DxF	D	E	F
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	TSA time x SA-Cy5	TSA time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	79.67	77.24	78.94	77.91	79.51	78.99	75.651	78.447	78.06
level 2	77.78	80.21	78.51	79.54	77.94	78.46	81.80	79.01	79.40
E12	-1.88	2.97	-0.43	1.62	-1.56	-0.52	6.15	0.56	1.34
Range	1.88	2.97	0.43	1.62	1.56	0.52	6.15	0.57	1.34
Rank	3	2	9	4	5	8	1	7	6

α 1AT	A	B	AxB	C	AxC	DxF	D	E	F
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	TSA time x SA-Cy5	TSA time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	76.44	73.86	74.05	74.43	74.25	75.87	72.26	74.98	74.36
level 2	73.86	76.44	76.25	75.87	76.05	74.43	78.04	75.32	75.94
E12	-2.58	2.57	2.20	1.43	1.79	-1.44	5.77	0.34	1.57
Range	2.58	2.57	2.20	1.43	1.79	1.44	5.77	0.34	1.57
Rank	2	3	4	8	5	7	1	14	6

Cystatin C	A	B	AxB	C	AxC	DxF	D	E	F
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	TSA time x SA-Cy5	TSA time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	70.88	71.49	71.25	70.83	71.49	71.11	67.80	70.72	70.26
level 2	70.03	69.42	69.66	70.08	69.42	69.80	73.11	70.19	70.65
E12	-0.85	-2.06	-1.59	-0.75	-2.07	-1.31	5.31	-0.53	0.38
Range	0.85	2.06	1.59	0.75	2.07	1.31	5.31	0.53	0.38
Rank	6	3	4	7	2	5	1	8	9

E-Cadherin	A	B	AxB	C	AxC	DxF	D	E	F
	Blocking time	Ag time	Blocking time x Ag time	dAb time	Blocking time x dAb time	TSA time x SA-Cy5	TSA time	SA-Cy5 time	SA-Cy5
level 1	82.29	81.21	81.33	82.94	81.34	83.74	80.94	82.98	81.93
level 2	82.38	83.46	83.33	81.72	83.33	80.93	83.73	81.68	82.73
E12	0.086	2.24	2.00	-1.21	1.99	-2.80	2.79	-1.29	0.79
Range	0.086	2.24	2.00	1.21	1.99	2.80	2.79	1.29	0.79
Rank	9	3	4	7	5	1	2	6	8

*A, B, AxB, C,...F 為因子於因子反應圖的編號 *E12 表示由 level 1 到 level 2 的變動量 *Range 表示 level 總變動量 *Rank 表示計算值的大小排序，變動越大排序越前面，影響越大

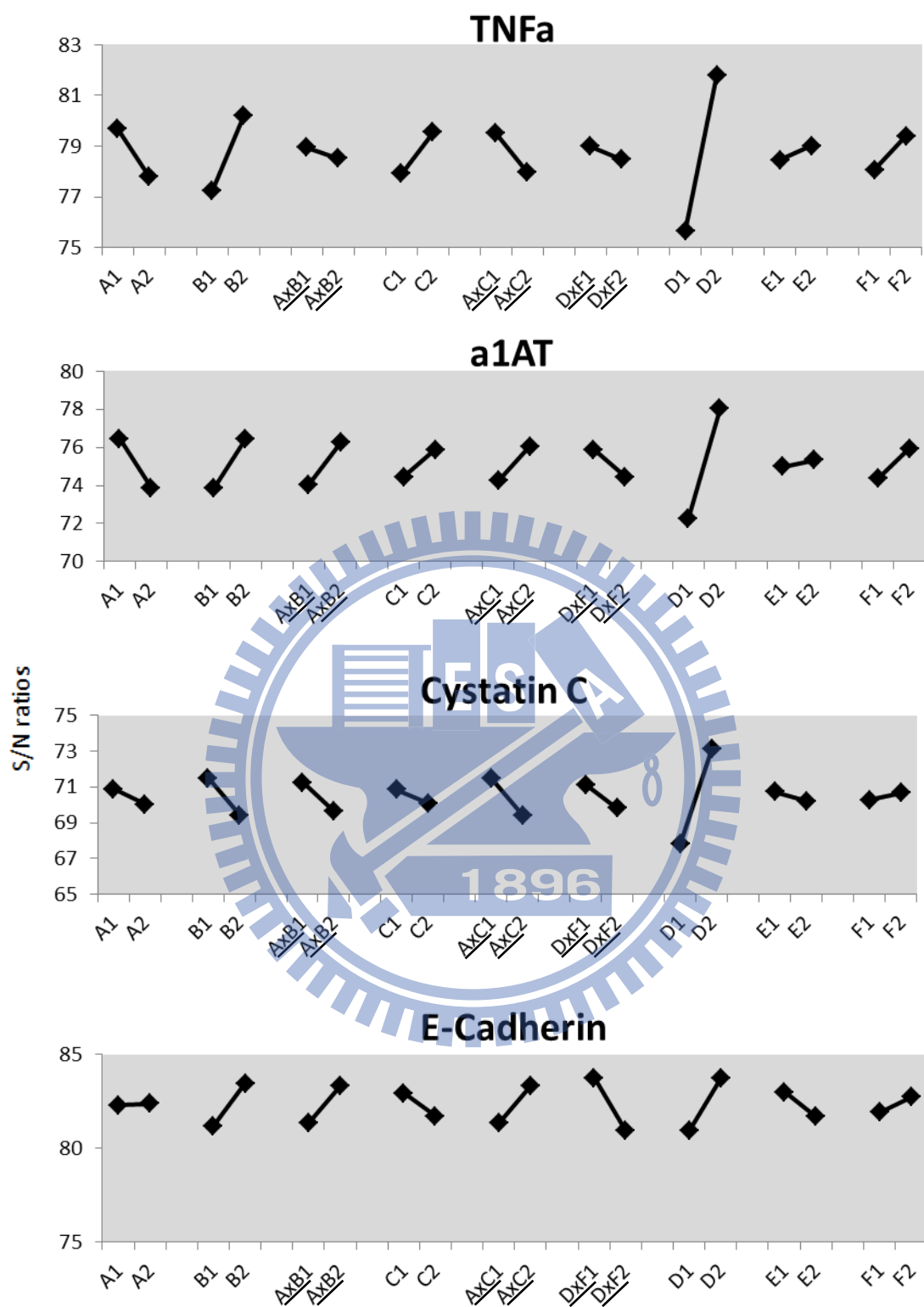


圖 3-18 第二階段訊號放大組-因子反應圖

*A, B, AxB, C,...F 為因子於因子反應表的編號;1 表示水準一，2 表示水準二

*X 軸為不同水準的因子，Y 軸為 S/N 比

*線段差異越大表示該因子水準的變動影響實驗結果的程度越大

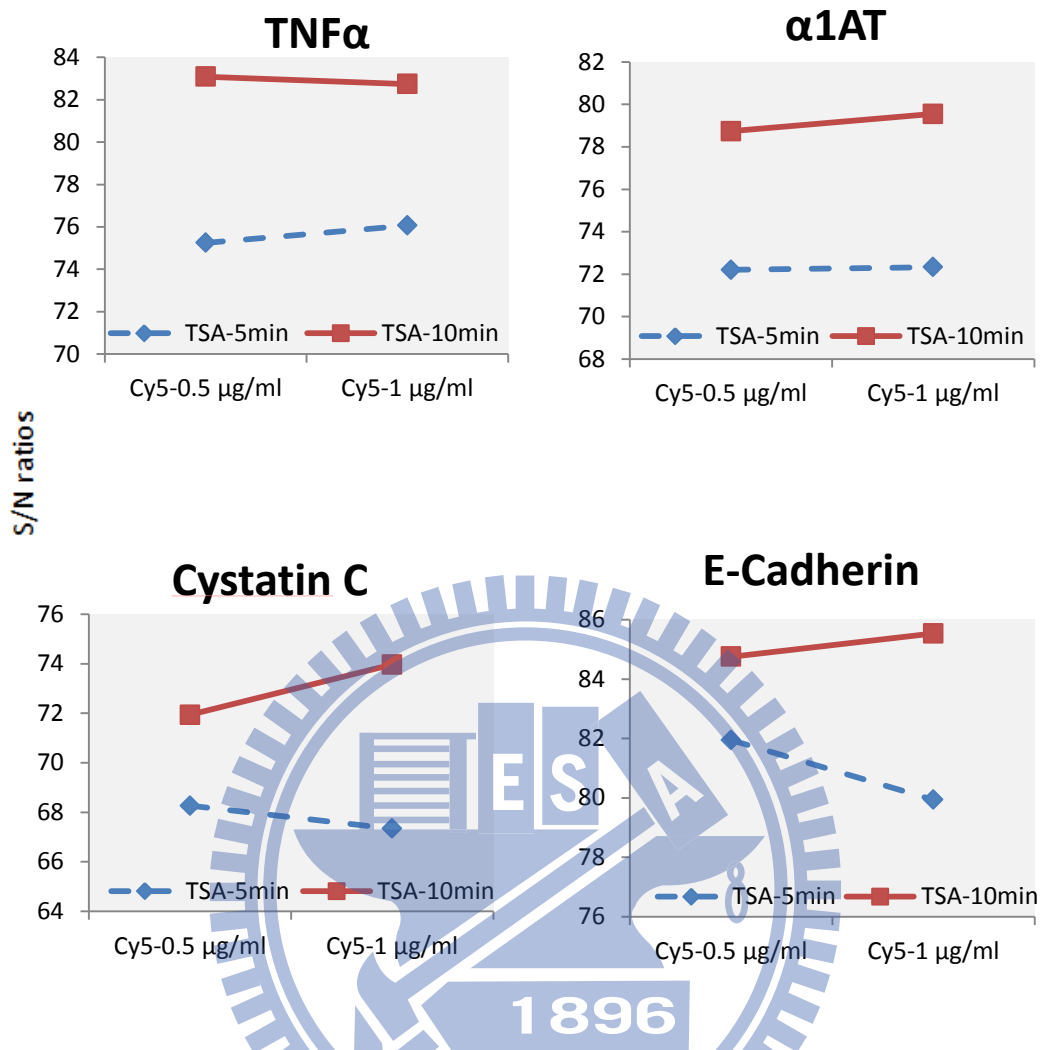


圖 3-19 SA-Cy5 濃度與 Tyramide 訊號放大試劑之交互作用

Cystatin C 與 E-Cadherin 的 TSA time x SA-Cy5 交互作用較為明顯，TNFα 與 α1AT 的 TSA time x SA-Cy5 交互作用則可忽略。當 TSA 培養 10min 時(red curve)，SA-Cy5 的濃度選擇 1 μg/ml 的效果會優於 0.5 μg/ml；當 TSA 培養 5min 時(blue curve)，SA-Cy5 的濃度選擇 0.5 μg/ml 的效果會優於 1 μg/ml，由此可知 TSA 時間與 SA-Cy5 濃度在特定的條件下有加乘的效果，我們選擇 TSA 培養十分鐘，故 SA-Cy5 濃度選擇 1μg/ml。

3.2.4 多重抗體微陣列晶片

我們將 TNF α 、 α 1AT、Cystatin C 和 E-Cadherin 這四種蛋白質同時進行微陣列晶片的製作，以原本的實驗參數和由田口法挑選出的最佳參數進行實驗，計算出最低偵測極限以及繪製標準曲線，最低偵測極限的改善程度以百分比表示，計算公式如下：

$$\frac{LOD_{after}-LOD_{before}}{LOD_{before}} \times 100 \% \quad (2)$$

實驗總結果之數據如表 3-5、3-6 所示，偵測極限的變化趨勢以圖 3-20,21,22 表示，而偵測極限的改變程度由表 3-7 以百分比呈現。我們分別針對無添加訊號放大組的結果以及有添加訊號放大組的結果，探討田口法前、後使用的實驗參數是否能改善晶片的靈敏度;除此之外，也針對使用訊號放大系統對於晶片靈敏度的影響情況進行描述。

表 3-5 田口法前、後實驗參數比較表

Factors	initial		optimized	
	without TSA	with TSA	without TSA	with TSA
cAb concentration (μ g/ml)	500	500	500	250
dAb concentration (μ g/ml)	0.5	0.5	0.72	0.72
SA-HRP concentration		1:1600		1:800
blocking time (hr)	1	1	1	2
Ag incubation time	overnight	overnight	overnight	overnight
dAb incubation time (hr)	2	2	2	1
TSA time (min)		5		10
SA-Cy5 concentration (μ g/ml)	1	1	1	1
SA-Cy5 time (min)	30	30	30	30

* α 1AT 的 cAb 濃度皆維持 72 μ g/ml，田口法前後都沒有改變

表 3-6 最低偵測極限實驗總數據比較表

	without TSA	with TSA	without TSA	with TSA
Assay name	Taguchi-before		Taguchi-after	
TNF α	5.56	9.7	4.62	2.86
α 1AT	343.94	37.5	128.5	28.47
Cystatin C	737.68	20	247.65	4.2
E-Cadherin	105.15	27.15	10.8	5.72
	(pg/ml)			

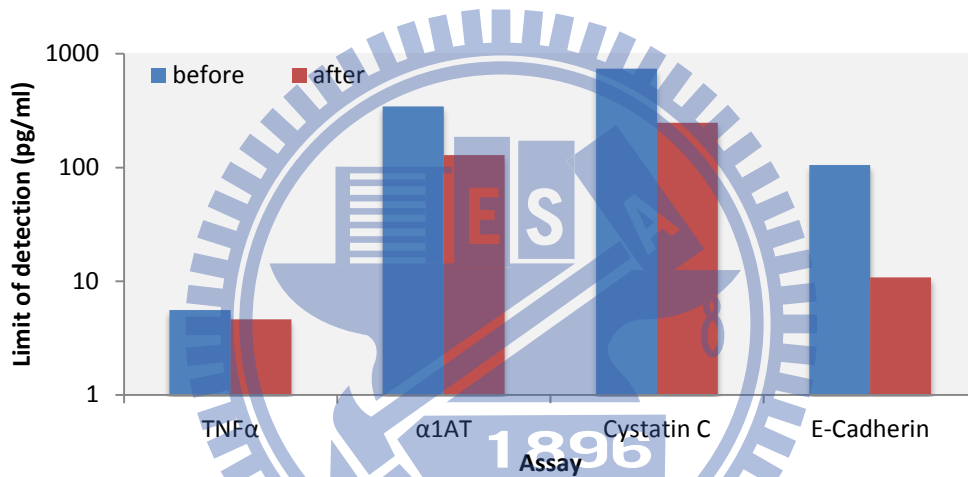


圖 3-20 無訊號放大組-田口法前、後偵測極限比較圖

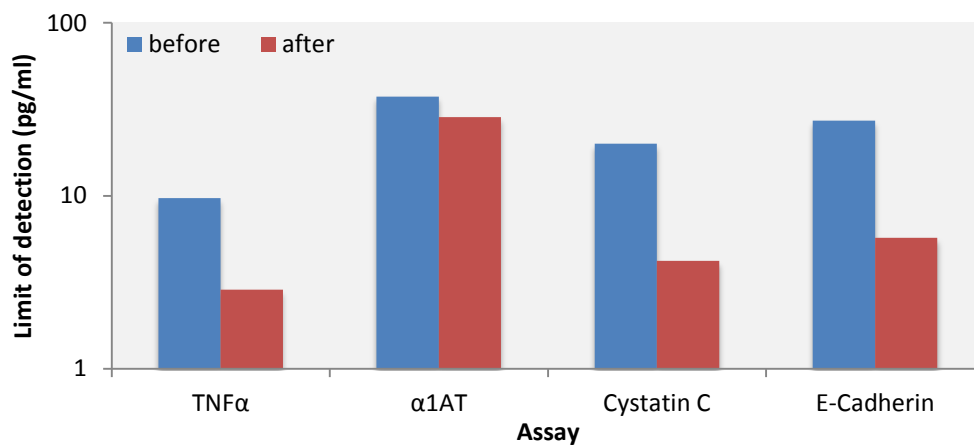


圖 3-21 訊號放大組-田口法前、後偵測極限比較圖

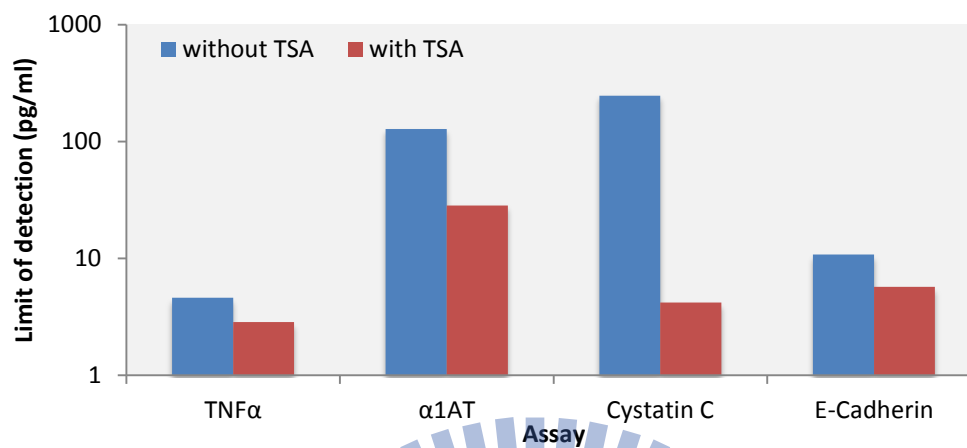


圖 3-22 參數優化後有、無訊號放大組偵測極限比較圖

表 3-7 田口法與訊號放大系統對於最低偵測極限的改變程度表

% change	Taguchi		TSA
	without TSA	with TSA	
TNFα	-16.91%	-70.52%	-38.10%
α1AT	-62.64%	-24.08%	-77.84%
Cystatin C	-66.43%	-79.00%	-98.30%
E-Cadherin	-89.73%	-78.93%	-47.04%

*負號表示方向，表示偵測極限變小；數值越大表示差異越大

1. 無訊號放大組

由這組實驗我們能得知田口法的使用對於無訊號放大系統晶片的影響力，透過實驗結果分析，我們發現 TNF α 、Cystatin C 和 E-Cadherin 的捕獲抗體濃度為 500 $\mu\text{g/ml}$ 時的效果較好，而 α1AT 則是 72 $\mu\text{g/ml}$ ；四種蛋白質的偵測極限都有因為偵測抗體濃度的改變而有降低，TNF α 、 α1AT 、Cystatin C 和 E-Cadherin 依序改變程度為 16.91 %、62.64 %、66.43 %、89.73 %，而其標準曲線如圖 3-23 所示。

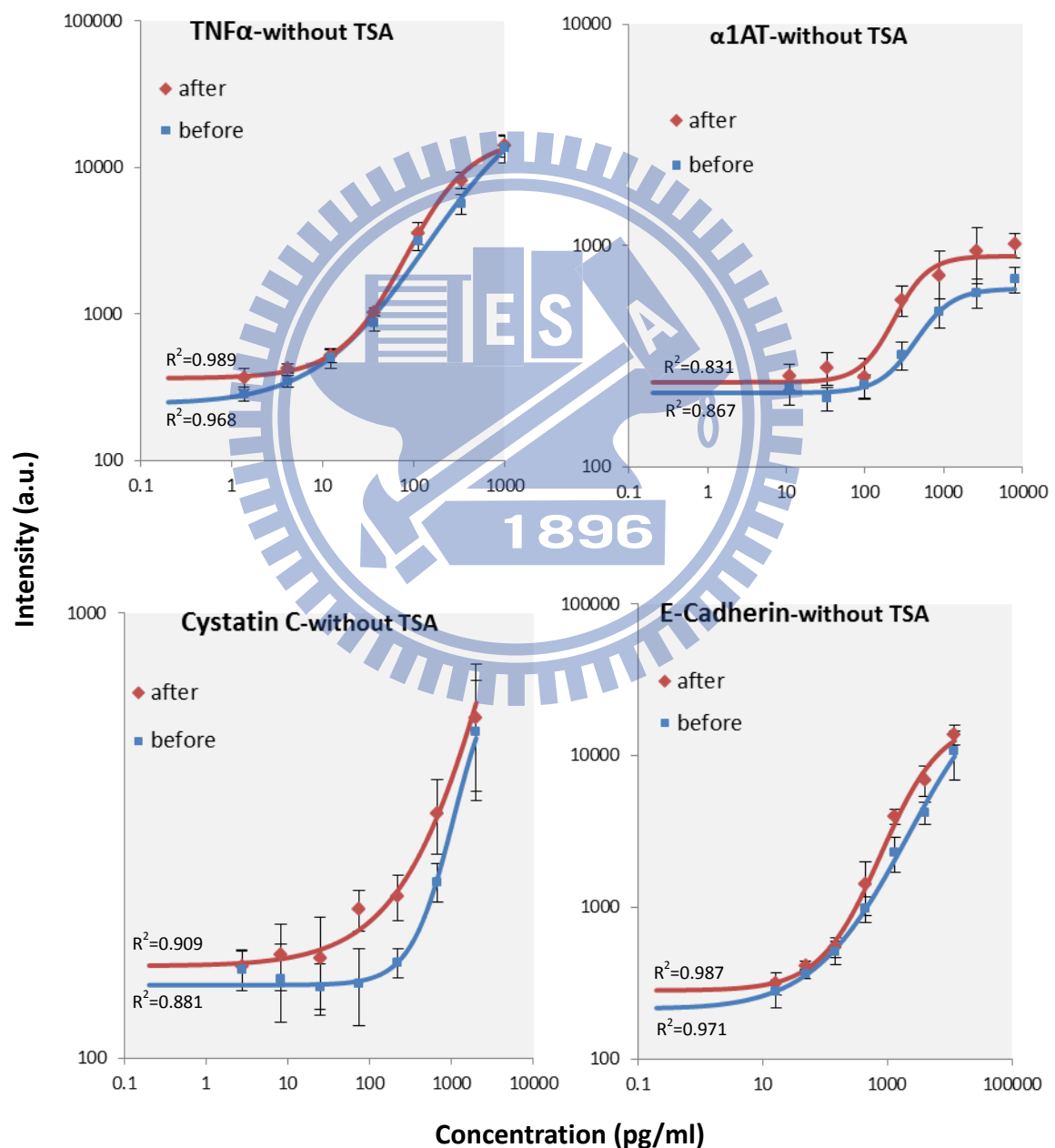


圖 3-23 無訊號放大組-田口法前、後標準曲線比較圖

2. 訊號放大組

由這組實驗我們能得知田口法的使用對於訊號放大系統晶片的影響力，實驗結果顯示，透過田口法挑選過的實驗參數對於偵測極限有降低的效果，TNF α 、 α 1AT、Cystatin C 和 E-Cadherin 依序影響程度為 70.52 %、24.08 %、79.00 %、78.93 %，而其標準曲線如圖 3-24 所示。由以上實驗可知田口法對於優化實驗的參數是有一定程度的效果。

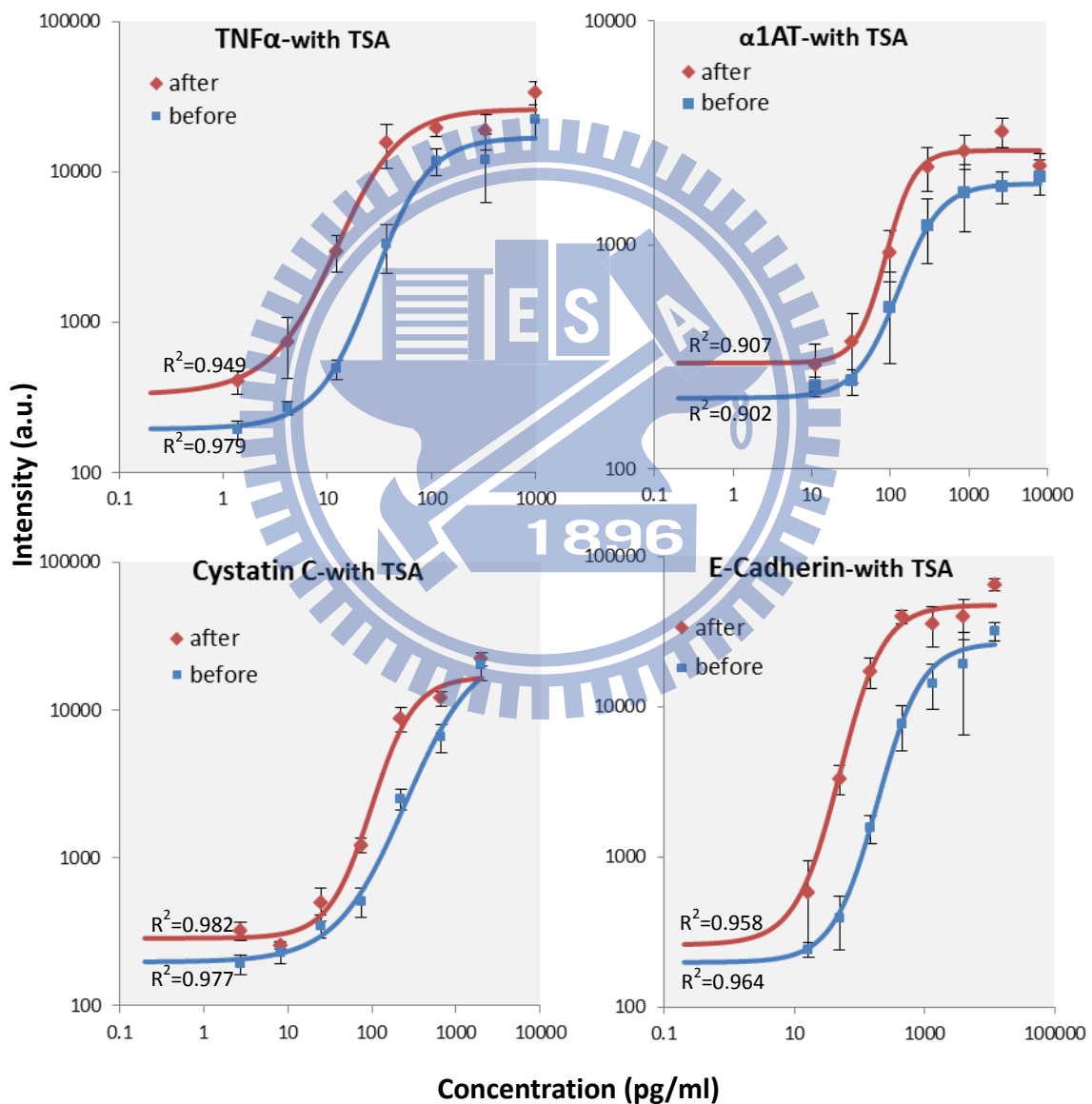


圖 3-24 訊號放大組-田口法前、後標準曲線比較圖

3. 訊號放大系統的影響情況

我們將優化過後有、無訊號放大組的實驗進行比較，主要目的在於判斷訊號放大系統的使用與否對於晶片偵測極限的影響，實驗結果顯示，四種蛋白質使用訊號放大系統後整體的螢光強度都有所提升(圖 3-25)，而偵測極限亦有降低，由此可知，訊號放大系統能確實夠提升整體的訊號強度也能降低偵測極限。

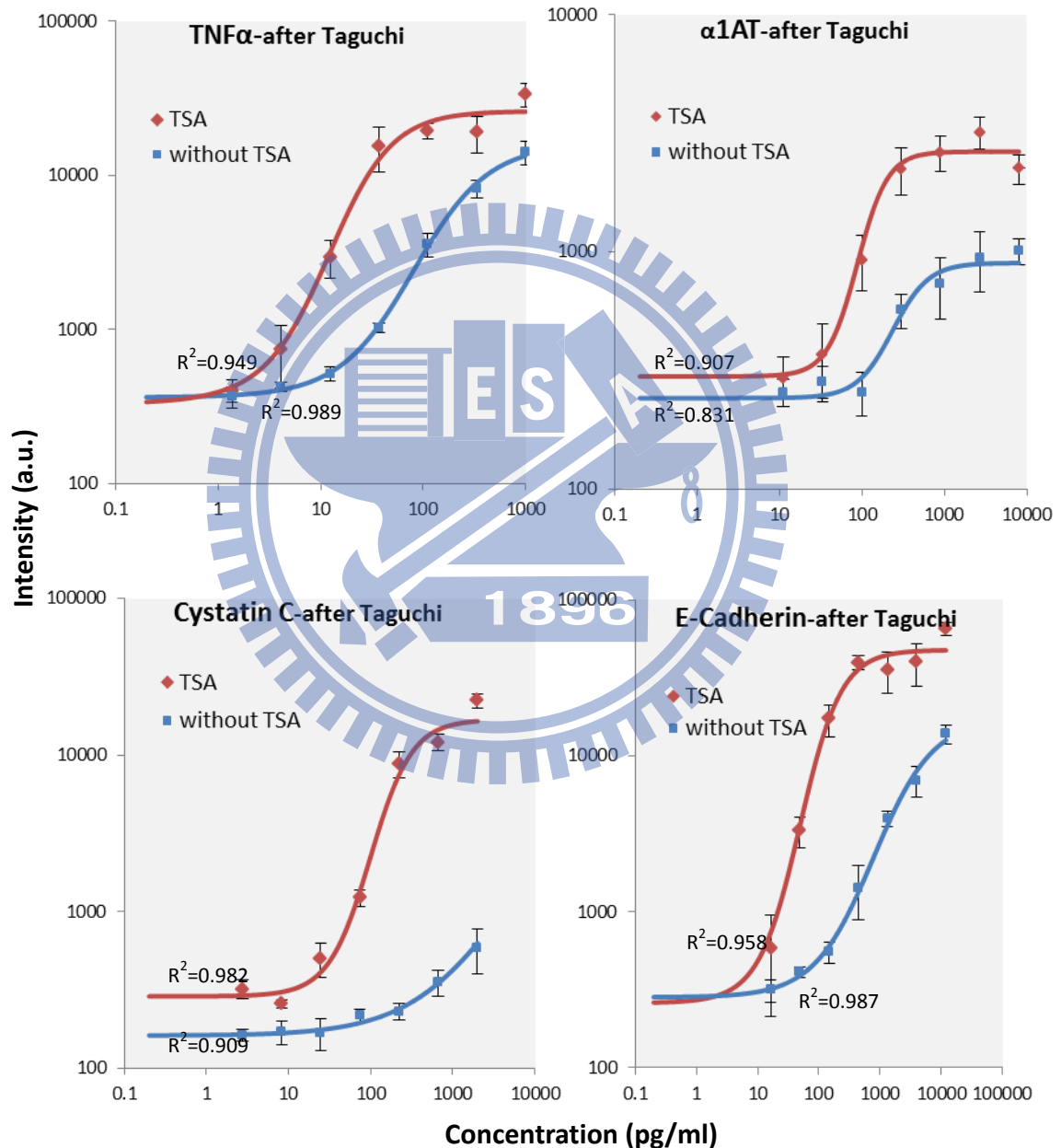


圖 3-25 參數優化後有、無訊號放大組標準曲線比較圖

3.2.5 討論

1.偵測極限的改善幅度

無訊號放大組的 TNF α 蛋白，其偵測極限只有 16.91% 的改變，我們推測原因可能在於 CapAb 的濃度選擇，CapAb 濃度在田口法前後是沒有改變的，若原本的 CapAb 濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ ，相信整體的偵測極限會降低得更明顯，由田口法的因子反應圖也可以推論出相同的結果；而為什麼使用訊號放大系統後，CapAb 濃度 250 $\mu\text{g/ml}$ 會比 500 $\mu\text{g/ml}$ 好，原因也許在於 CapAb 濃度為 500 $\mu\text{g/ml}$ 時，過多的抗體固定在微點的表面區域，以至於 tyramide 鍵結的空間變小，結構不易和周邊的 tyrosine 結合，而濃度為 250 $\mu\text{g/ml}$ 時，有較多的空間能讓 tyramide 鍵結，故 CapAb 濃度為 250 $\mu\text{g/ml}$ 較 500 $\mu\text{g/ml}$ 效果更佳。再者，使用田口法時，重組蛋白濃度選擇，我們是以該蛋白最高濃度稀釋四倍之後來進行實驗，所以優化的參數是以這個濃度為基礎，故若將重組蛋白的濃度將低至標準曲線後段的部分，對於晶片偵測極限的改善或許會更加地顯著。且由於我們在田口法前所選擇的參數是參考其他作者以及廠商資料，所以這些實驗參數是經由他人挑選過，算是比較合適的參數，我們再以這些參數進行微調，所以實驗結果的變化程度不大，但卻有一定的趨勢。最後，若將整體的實驗控制良好，例如：點陣時的環境濕度、工作台的溫度、實驗操作的程序、表面處理的好壞...等，使標準差變小，亦能更有效的降低偵測極限。

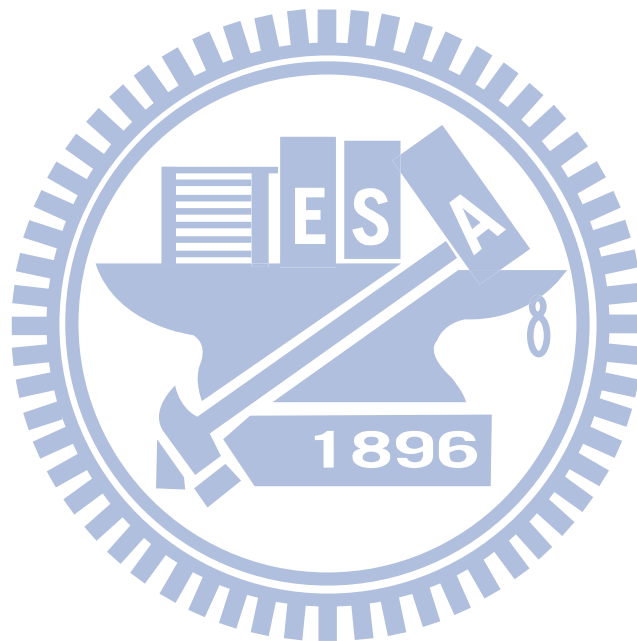
2.田口實驗設計法實驗因子重要性判定

田口實驗設計法實驗因子選擇的部分，如何準確地判斷實驗因子的重要性，這個部分未來還需要再做更詳細的研究與探討，目前我們依據因子反應表的重要度排序以及交互作用的影響作為主要參考，利用一半準則進行判定，製作 ANOVA 變異數分析表作為輔助，我們能從 ANOVA 分析表得知最重要的影響因子為何，但次要的因子不見得能從表中得知，即使 ANOVA 分析表判斷該因子為不重要因子時，我們依舊必須選擇一個水準來進行實驗，理論上要選擇節省成本的水準，但各蛋白間對於不重要的因子卻可能有著相同的趨勢，故被判定為不重要因子的水準抉擇，

或許會影響實驗的結果，關於這個部分應該要再設計更多的實驗進行驗證，雖然這樣就失去了田口法簡單、快速的核心意義，但也許能因此探討是否田口法適用於蛋白質微陣列晶片這樣複雜的生物檢測實驗。

3. 田口法結果一致性

我們發現搭配訊號放大系統後，選擇重要因子一致性相對於無訊號放大組的低，推測可能原因為訊號放大系統會使晶片整體的標準差提高，使整個實驗的穩定性沒有無訊號放大組好，也許未來能夠針對 tyramide 濃度進行調整，來降低整體實驗的標準差。



四、結論

4.1 抗體微陣列晶片製作

我們確立了抗體微陣列晶片的製作流程,利用矽烷類有機溶劑將載玻片進行表面處理,處理完成的晶片,能使捕獲抗體以共價鍵的方式固定於晶片表面。使用三明治酵素免疫法搭配訊號放大系統於晶片完成實驗,最後利用雷射螢光掃描機做影像掃描進行結果分析。

我們順利克服了兩個微點形態缺陷的問題,利用矽膠乾燥劑將容器中環境濕度控制在 10~20% 解決了 comet tail 的問題;抗體點陣時,工作台保持室溫、環境濕度維持在 70% 左右及抗體培養時容器濕度保持 90~95%, 解決 coffee ring 的問題。

4.2 田口實驗設計法對於晶片靈敏度的影響

使用田口實驗設計法進行優化之後的參數對於有、無搭配訊號放大系統的晶片皆能降低整體的偵測極限,故由田口實驗設計法來挑選實驗參數確實有助於提升晶片的靈敏度。

4.3 訊號放大系統對於晶片靈敏度的影響

訊號放大系統對於不同的蛋白質影響力不盡相同,其能提升整體的螢光強度,且使晶片的偵測極限都有降低的趨勢,故搭配訊號放大系統於三明治酵素免疫分析法能夠提升晶片的靈敏度。

五、未來展望

由於這是我們初次嘗試田口實驗設計法，也是初次將田口法應用在微陣列晶片上，操作上顯得不純熟，許多實驗的設計、結果的分析、因子重要性的判斷、交互作用的影響...等，都還需要再做更深層的學習及探討。未來希望能進行其他濃度區間的田口實驗設計法，例如更低濃度的偵測抗體區間、重組蛋白的實驗濃度等等，再將實驗結果與這次實驗進行比對，期望能夠對於偵測極限以及實驗成本上有更突破的改善，除此之外，也能將三明治酵素免疫分析法或是其他檢測的方法應用在以非載玻片為基材的晶片，例如帶有特定結構的矽晶片、光子晶體...等，讓晶片製作得盡善盡美，最後將執行實驗的環境調整完善，穩定實驗條件與參數後，希望能與醫院合作利用真實樣品進行早期糖尿病腎病變生物標記的檢測。



六、參考文獻

1. 黃煌雄，沈美真，劉興善，全民健保總體檢，五南，台灣，民國一百年。
2. 行政院主計總處，「行政院第 572 期統計月報」，民國一百零二年。
3. 孫建安，白其卉，「2007 年台灣地區高血壓、高血糖、高血脂之追蹤調查研究」，民國九十六年。
4. M. J. Lysaght, "Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications," Journal of the American Society of Nephrology , **13**, S37-S40 (2002).
5. M.-S. Wu, I.-W. Wu, C.-P. Shih, and K.-H. Hsu, "Establishing a platform for battling end-stage renal disease and continuing quality improvement in dialysis therapy in Taiwan—Taiwan Renal Registry Data System (TWRDS)," Acta Nephrologica , **25**, pp. 148-153 (2011).
6. 陳建銘，陳建良，「糖尿病腎病變」，腎臟與透析 , **17**, pp. 117-122 (2005).
7. M. Mann, and O. N. Jensen, "Proteomic analysis of post-translational modifications," Nature biotechnology , **21**, pp. 255-261 (2003).
8. E. Ritz, R. Nowack, D. Fliser, M. Koch, and W. Tschöpe, "Type II diabetes mellitus: is the renal risk adequately appreciated?," Nephrology Dialysis Transplantation , **6**, pp. 679-682 (1991).
9. L. H. Augenlicht, and D. Kobrin, "Cloning and screening of sequences expressed in a mouse colon tumor," Cancer research , **42**, pp. 1088-1093 (1982).
10. T.-W. Chang, "Binding of cells to matrixes of distinct antibodies coated on solid surface," Journal of immunological methods, **65**, pp. 217-223 (1983).
11. M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray," Science, **270**, pp. 467-470 (1995).
12. M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vöhringer, and T. O. Joos, "Protein microarray technology," Drug Discovery Today , **7**, pp. 815-822 (2002).
13. J. Glökler, and P. Angenendt, "Protein and antibody microarray technology," Journal of Chromatography B , **797**, pp. 229-240 (2003).
14. A. Fadiel, and F. Naftolin, "Microarray applications and challenges: a vast array of possibilities," Int Arch Biosci , **2003**, pp. 1111-1121 (2003).
15. "<http://arrayit.com>."
16. R. M. Gonzalez, S. M. Varnum, and R. C. Zangar, "Sandwich ELISA microarrays: Generating reliable and reproducible assays for high-throughput screens," in *Biomarker methods in drug discovery and development*(Springer, 2008), pp. 273-290.

17. "<http://www.gesim.de/en/>."
18. S. M. Varnum, R. L. Woodbury, and R. C. Zangar, "A protein microarray ELISA for screening biological fluids," in *Protein Arrays*(Springer, 2004), pp. 161-172.
19. W. Luo, M. Pla-Roca, and D. Juncker, "Taguchi design-based optimization of sandwich immunoassay microarrays for detecting breast cancer biomarkers," *Analytical chemistry* (2011).
20. R. M. Gonzalez, S. L. Seurynck-Servoss, S. A. Crowley, M. Brown, G. S. Omenn, D. F. Hayes, and R. C. Zangar, "Development and validation of sandwich ELISA microarrays with minimal assay interference," *Journal of Proteome Research* , **7**, pp. 2406-2414 (2008).
21. M. J. Heller, "DNA microarray technology: devices, systems, and applications," *Annual review of biomedical engineering* , **4**, pp. 129-153 (2002).
22. B. Lu, M. R. Smyth, and R. O'Kennedy, "Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors," *Analyst*, **121**, 29R-32R (1996).
23. J.-Y. Byun, K.-H. Lee, K.-Y. Lee, M.-G. Kim, and D.-M. Kim, "In-gel expression and in situ immobilization of proteins for generation of three dimensional protein arrays in a hydrogel matrix," *Lab on a Chip*, **13**, pp. 886-891 (2013).
24. K. S. Anderson, S. Sibani, G. Wallstrom, J. Qiu, E. A. Mendoza, J. Raphael, E. Hainsworth, W. R. Montor, J. Wong, J. G. Park, N. Lokko, T. Logvinenko, N. Ramachandran, A. K. Godwin, J. Marks, P. Engstrom, and J. Labaer, "Protein microarray signature of autoantibody biomarkers for the early detection of breast cancer," *J Proteome Res* ,**10**, pp. 85-96 (2011).
25. M. Moschallski, A. Evers, T. Brandstetter, and J. R  he, "Sensitivity of Microarray Based Immunoassays Using Surface-Attached Hydrogels," *Analytica chimica acta* (2013).
26. E. Engvall, and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes," *The Journal of Immunology* , **109**, 129-135 (1972).
27. S. Paulie, H. Perlmann, and P. Perlmann, "Enzyme-linked Immunosorbent Assay," *eLS* (2003).
28. P. Hornbeck, "Enzyme - Linked Immunosorbent Assays," *Current protocols in immunology*, 2.1. 1-2.1. 22 (1991).
29. P. M. Lizardi, "Rolling circle replication reporter systems," (Google Patents, 1998).
30. B. Schweitzer, S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kukanskis, Z. Zhu, S. F. Kingsmore, P. M. Lizardi, and D. C. Ward, "Immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection," *Proceedings of the National Academy of Sciences* , **97**, pp. 10113-10119 (2000).
31. B. Schweitzer, S. Roberts, B. Grimwade, W. Shao, M. Wang, Q. Fu, Q. Shu, I. Laroche, Z. Zhou, and V. T. Tchernev, "Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle

- amplification," Nature biotechnology ,**20** ,pp. 359-365 (2002).
32. R. L. Woodbury, S. M. Varnum, and R. C. Zangar, "Elevated HGF levels in sera from breast cancer patients detected using a protein microarray ELISA," Journal of proteome research ,**1**, pp. 233-237 (2002).
33. PerkinElmer, "SEE IHC TARGETS MORE CLEARLY," (2010).
34. PerkinElmer, "TSA (Tyramide Signal Amplification)."
35. 李輝煌，田口方法：品質設計的原理與實務 第四版 Taguchi Methods: Principles and Practices of Quality Design，高立，民國一百年。
36. R. K. Roy, A PRIMER ON THE TAGUCHI METHOD, Van Nostrand Reinhold, New York (1990).
37. C. Jeney, O. Dobay, A. Lengyel, É. Ádám, and I. Nász, "Taguchi optimisation of ELISA procedures," Journal of immunological methods, **223**, pp. 137-146 (1999).
38. 蕭正彥，「微陣列蛋白質晶片基材的製作」，國立台北科技大學，碩士論文，民國一百年。
39. B. Dorvel, B. Reddy, I. Block, P. Mathias, S. E. Clare, B. Cunningham, D. E. Bergstrom, and R. Bashir, "Vapor-Phase Deposition of Monofunctional Alkoxysilanes for Sub-Nanometer-Level Biointerfacing on Silicon Oxide Surfaces," Advanced Functional Materials ,**20**, pp. 87-95 (2010).
40. L. J. Harris, E. Skaletsky, and A. McPherson, "Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody," Journal of molecular biology ,**275**, pp. 861-872 (1998).
41. W. Wang, S. Singh, D. L. Zeng, K. King, and S. Nema, "Antibody structure, instability, and formulation," Journal of pharmaceutical sciences ,**96**, pp. 1-26 (2007).
42. 楊素芬，品質管理，初版，華泰，民國九十一年。
43. H. Hu, and R. G. Larson, "Marangoni effect reverses coffee-ring depositions," The Journal of Physical Chemistry B ,**110**, pp. 7090-7094 (2006).

附錄一

附表 1-1 $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ 直交表

Exp.	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	2	2
3	1	1	3	3	3	3	3	3
4	1	2	1	1	2	2	3	3
5	1	2	2	2	3	3	1	1
6	1	2	3	3	1	1	2	2
7	1	3	1	2	1	3	2	3
8	1	3	2	3	2	1	3	1
9	1	3	3	1	3	2	1	2
10	2	1	1	3	3	2	2	1
11	2	1	2	1	1	3	3	2
12	2	1	3	2	2	1	1	3
13	2	2	1	2	3	1	3	2
14	2	2	2	3	1	2	1	3
15	2	2	3	1	2	3	2	1
16	2	3	1	3	2	3	1	2
17	2	3	2	1	3	1	2	3
18	2	3	3	2	1	2	3	1

點線圖(Linear Graphs)



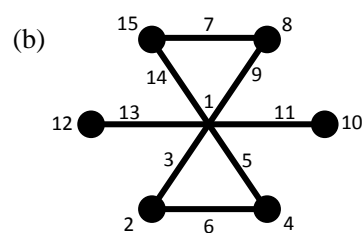
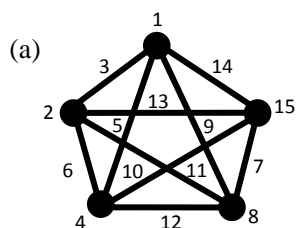
點的編號為控制因子配置欄位，線為評估兩控制因子間的交互作用。

附錄二

附表 2-1 $L_{16}(2^{15})$ 直交表

Exp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
8	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1
11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1
12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2
13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1
14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2
15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2
16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1

點線圖(Linear Graphs)



點的編號為控制因子配置欄位，線為評估兩控制因子間的交互作用。

附錄三

HRP 濃度的選擇

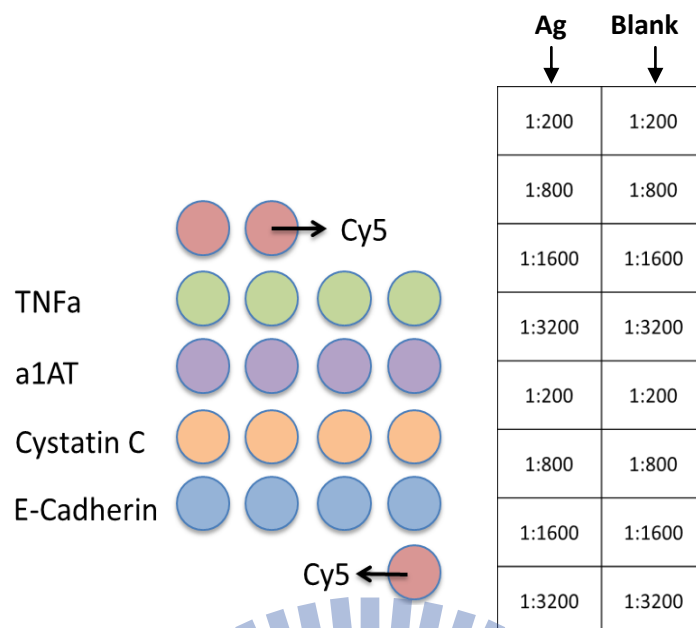
由於 TSA kit 內容物沒有 SA-HRP，故我們使用 ELISA kit 的 SA-HRP 進行實驗，為了要選擇 HRP 的使用濃度，我們挑選了四個濃度，分別為 1:200、1:800、1:1600 及 1:3200，附表 3-1 為本次實驗的參數，附圖 3-1 為抗體點陣位置及實驗示意圖，載玻片左側為完整 ELISA 實驗，右側為不添加重組蛋白的控制組。實驗結果如附表 3-2 及附圖 3-2 所示，我們以信噪比(signal-to-noise ratio)進行計算，公式如下：

$$SNR = \frac{P_{signal}}{P_{noise}} \quad (3)$$

Signal = spot intensity; noise = 3σ ; σ =blank 的標準差，SNR 值越大越好。結果顯示 SA-HRP 濃度 1:800 是較好的選擇；SA-HRP 1:200 濃度太高以至於過多的 Tyramide 會鍵結在周圍，使得不同 spot 間會相連在一起(附圖 3-3)且標準差較大，也會使得背景值稍微升高(附圖 3-4)。

附表 3-1 SA-HRP 濃度選擇之實驗參數表

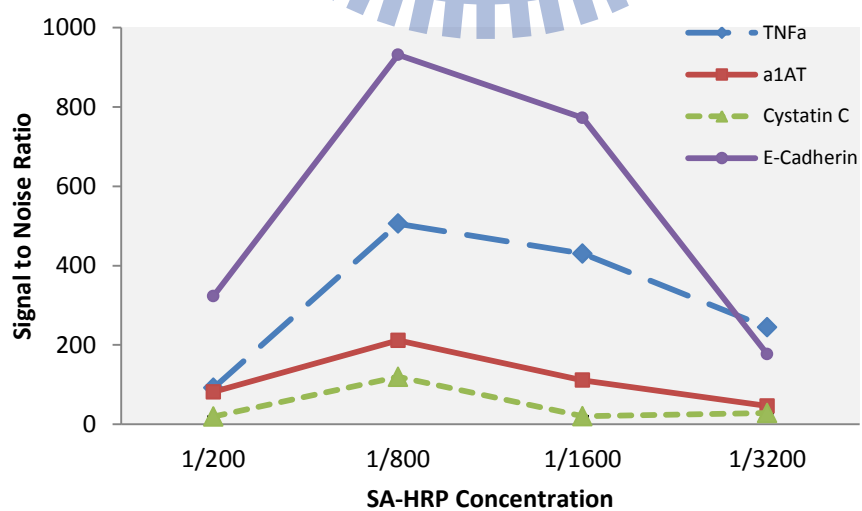
PMT 150	CapAb ($\mu\text{g/ml}$)	Blocking	Ag (pg/ml)	DetAb ($\mu\text{g/ml}$)	SA-HRP	Tyramide	SA-Cy5 ($\mu\text{g/ml}$)
TNF α	500	1% casein/PBS	250	0.5	1:200	1:50	1
α 1AT	72		4000		1:800		
Cystatin C	500		1000		1:1600		
E-cadherin	500		2000		1:3200		
Time	6-7hr	1hr	overnight	2hr	30min	10min	30min



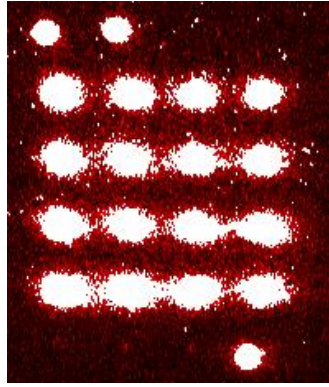
附圖 3-1 抗體點陣位置及實驗示意圖

附表 3-2 HPR 濃度實驗數據 (SNR)

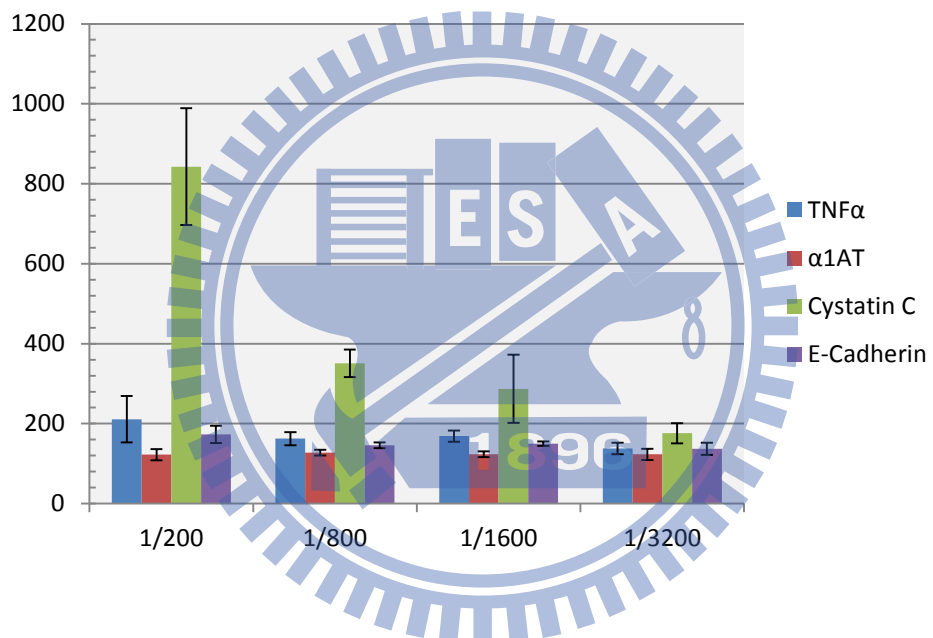
Concentration	TNFα	α1AT	Cystatin C	E-Cadherin
1:200	91.52	505.41	430.03	244.03
1:800	81.52	211.46	110.99	46.11
1:1600	19.43	119.55	20.13	28.18
1:3200	322.95	930.96	772.34	176.41



附圖 3-2 HRP 濃度選擇實驗結果



附圖 3-3 過多 Tyramide 鍵結於 spot 周圍



附圖 3-4 不同濃度之 SA-HRP 背景值及背景值標準偏差圖