

# 快速大量研究蛋白質的利器：高通量西方點墨微陣列晶片

## A Novel High-Throughput Proteomics Platform: The Micro-Western Array

褚志斌

Chih-Pin Chuu

Micro-Western Array (MWA) 是一種新開發的高通量蛋白質體學系統，系統由奈升蛋白質微陣列點片機、水平乾燥式電泳和近紅外線微米尺度掃描器所組成。MWA 系統的作用原理和傳統西方點墨技術相同，最多一次可以偵測 384 種蛋白質在 6 種樣品中的表現量和磷酸化狀態的變化，而且沒有現行蛋白質晶片交叉反應性的問題。MWA 系統適合用於訊號傳遞路徑、生物系統或藥物作用機轉、篩選生物標誌以及驗證新開發抗體的專一性。我們相信 MWA 是系統生物和生物醫學研究的利器。

Micro-Western Array (MWA), a novel proteomics platform, is composed of GeSim Nanoplotter protein array, GE Multiphor, and Licor Odyssey infrared scanner. MWA is a high-throughput Western blotting assay which is able to detect the abundance and phosphorylated status of 384 proteins in 6 samples simultaneously. Including electrophoresis procedure allows MWA to avoid antibody cross-reactivity, which is a common problem in protein array. MWA is most useful for signaling transduction studying, molecular mechanism investigation, biomarker screening, and antibody validation. MWA will be a very useful tool for systems biology and biomedical research.

### 一、系統生物學與高通量研究方法

在研究一個社會，或是一段歷史時，針對單一人物的研究，固然可以有許多有趣的發現，但是如果不連同該人物所處的歷史背景和與其它人物之間的互動一起研究的話，是無法完全理解該人物的所作所為和扮演的完整角色。同樣道理，如果要理解社會完整的經濟結構和經濟活動，不能只是研究單一一家公司企業，而需要考量多家公司、上下游企業和整個國家甚至國際間經濟貿易活動。

傳統生物學是針對單一基因 (gene)、單一蛋白質 (protein)、單一酵素 (enzyme) 或是一個代謝產物 (metabolite) 做深入研究，可以清楚地勾勒出基因、蛋白質、酵素或是代謝產物的功能與作用，但是如果理解一個細胞、甚至一個生物體對外界刺激的反應、功能或是現象，我們就需要掌握細胞或是個體內大多數基因、蛋白質、酵素或是代謝物的表現量狀態。這種希望能同時研究數百、數千、甚至數萬個生物分子，整合不同層次的信息，以理解生物系統如何運作的學術領域，稱為系統生物學

(systems biology)。

由於要同時研究大量生物分子，因此系統生物學需要使用新的高通量 (high throughput) 技術來蒐集數據 (data)，並以數學統計為基礎的生物資訊方法分析數據和建構模型。高通量的研究是目前系統生物最具效力的研究方式。高通量研究可以檢視大規模的系統或是大數量的樣品，並且提供大量的數據點供作分析。因此用來研究各種細胞系統內的訊息傳遞、病理疾病變化、對各種藥物的反應、發育與分化等非常重要。

近年來新的系統生物學技術不斷地被開發，基因組 (genome) 的研究稱為基因體學 (genomics)，其高通量技術包括用來測定 mRNA 變化的基因微陣列晶片 (gene microarray) 技術和次序代定序 (next generation sequencing) 等。蛋白質體 (proteome) 的研究稱為蛋白質體學 (proteomics)，其高通量技術包含質譜儀 (mass spectrometry)、蛋白質晶片 (protein array) 和流式細胞儀等 (flow cytometry)。代謝體 (metabolome) 的研究稱為代謝體學，通常使用質譜儀。

## 二、傳統蛋白質的研究方法

蛋白質的表現量與狀態 (例如是否被磷酸化活化等) 是真正影響大多數細胞生理、狀態、反應和行為的主要因素。因此如果能夠對蛋白質表現量的改變以及蛋白質狀態進行高通量的分析，將可以對各種細胞、疾病、組織、發育等系統的訊號傳遞等有更進一步的了解。生物學研究利用抗體 (antibody) 來偵測蛋白質。抗體又稱免疫球蛋白 (immunoglobulin)，是一種由 B 淋巴細胞 (B lymphocyte) 分泌，被免疫系統用來鑒別與中和外來物質如細菌、病毒等的大型 Y 形蛋白質。每一種抗體只會辨認，並與特定序列的蛋白質片段結合，就像鑰匙和鎖的關係一樣。雖然偶爾因為鑰匙孔內紋路相似，而使得一把鑰匙能開不只一個鎖，但是大多數情況一把鑰匙只能開一個鎖。一種抗體，大多數情況下只會與一種特定的蛋白質結合，因此我們可以用抗體來偵測蛋白質。

目前研究者最常用來研究蛋白質表現量和狀態的方法是西方點墨法 (Western blotting assay)。

研究者將樣本 (細胞、臨床檢體、動物組織等) 的裂解液 (lysate) 置入 SDS-PAGE 膠中，利用蛋白質帶負電的特性給予上負下正的電場，蛋白質將因電性被下方的正電吸引，而穿過 SDS-PAGE 凝膠內的小孔逐漸往下移動。這種過程稱為電泳 (electrophoresis)。由於分子量小的蛋白質較容易鑽洞進行移動，因此電泳可以將樣本內的蛋白質依據分子量大小分開，膠片的上方是大分子量的蛋白質，下方則是小分子量的蛋白質。由於抗體無法有效地滲透膠片，因此無法直接在膠片上用抗體偵測特定的蛋白質，因此研究者再度給予電場，讓蛋白質離開膠片轉移到硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane) 上，稱為轉漬 (transfer)。之後將硝化纖維膜進行阻斷 (blocking)，再與抗體浸泡進、清洗，再用帶有螢光等標定的，即可黏附到進行透過電泳和第一抗體 (primary antibody) 浸泡，第一抗體會緊緊地與想要偵測的蛋白質結合，像是利用雄激素受體 (androgen receptor, AR) 抗體來偵測雄激素受體。然後再將硝化纖維膜與帶有螢光等標示的第二抗體浸泡，第二抗體會辨識第一抗體，而且一個第一抗體可以和多個第二抗體結合，因此訊息可以被放大。之後以底片顯影等技術偵測螢光，即可「看見」想要研究的蛋白質，在顯影時會呈現一條橫紋 (band)。有時候如果多個蛋白質都帶有抗體辨識的該段胺基酸序列，則一個抗體會偵測到不只一個蛋白質，那顯影後就會看到不只一條橫紋。這時候因為進行電泳時會將蛋白質標準 (protein marker) 和樣本一起跑膠，因此從分子量便可判定哪一條橫紋是正確的蛋白質。蛋白質越多，橫紋的強度就越強。透過對橫紋的定量，研究者可以分析蛋白質量或狀態的變化，但是因為抗體昂貴，加上時間有限，因此無法使用西方點墨技術進行高通量蛋白質的分析。

## 三、蛋白質晶片

90 年代開始，研究者開始開發蛋白質晶片。相較於質譜儀，蛋白質的晶片有著低成本的優勢，且研究者不需要像操縱質譜儀般進行長期訓練，因此可用於大量樣本的高通量研究<sup>(1)</sup>。科學家將數十或數百個抗體置於晶片上，然後可與血液或細胞裂

解液等浸泡，用於偵測樣本中蛋白質的表現和狀態。但是這需要先將樣本進行螢光標定，這可能會影響到樣本內蛋白質的性質。而且將抗體固定在二維平面而非三度空間，也可能影響抗體和蛋白質間的結合。因此實驗會出現相當比例的假陽性 (false-positive) 和假陰性 (false-negative) 的結果。

大約 2000 年開始，科學家發展出反相蛋白質晶片 (reverse-phase array, RPA)<sup>(1)</sup>。RPA 是將樣本的蛋白質置於晶片上，然後和抗體進行浸泡。如此螢光標定可放在抗體而非樣本上，而且抗體可在三維空間內自由作用，因此大幅度改善了蛋白質晶片的問題。但是哈佛大學的研究群發現，在 34 個抗體的分析中，有高達 22 個抗體用 RPA 的方法分析後，得到和傳統西方點墨不一致的結果，也就是大約只有 1/3 的抗體可以用於 RPA 研究。這大大地限制了 RPA 的研究實用性。會導致這樣的問題，主要是因為抗體有交叉反應性 (cross-reactivity) 的問題，也就是前面提到的一個抗體可能會偵測到不只一種蛋白質。但是因為 RPA 沒有將樣本的抗體依據分子量分開，而是全部樣本的蛋白質都混在

一起成為一個點的點墨 (dot blot) 測試，因此 cross-reactivity 會導致大量的假陽性和假陰性的問題<sup>(1)</sup>。為了解決這些問題，我們於 2008 年開始在芝加哥大學研發新的蛋白質晶片技術。

#### 四、高通量西方點墨微陣列系統

這新的技術稱為高通量西方點墨微陣列系統 (micro-western array, MWA)，是 2008 至 2009 年由美國伊利諾州芝加哥大學 (University of Chicago) 明美癌症研究中心 (Ben May Department for Cancer Research) 的 Richard B. Jones 助理教授發明的點子，並與博士班學生 Mark F. Ciaccio 和博士後研究員褚志斌共同開發完成，發表於 2010 年的 Nature Methods 雜誌<sup>(3)</sup>。MWA 系統是購買三個現成的大型系統組合，並修改程式和加入一些研發的小零件而成。系統最主要包含 GeSim 奈升蛋白質微陣列點片機 (GeSim Nanoplotter protein arrayer)、水平乾燥式電泳 (GE multiphor) 和近紅外線微米尺度掃描器 (Licor Odyssey infrared scanner) (圖 1)。

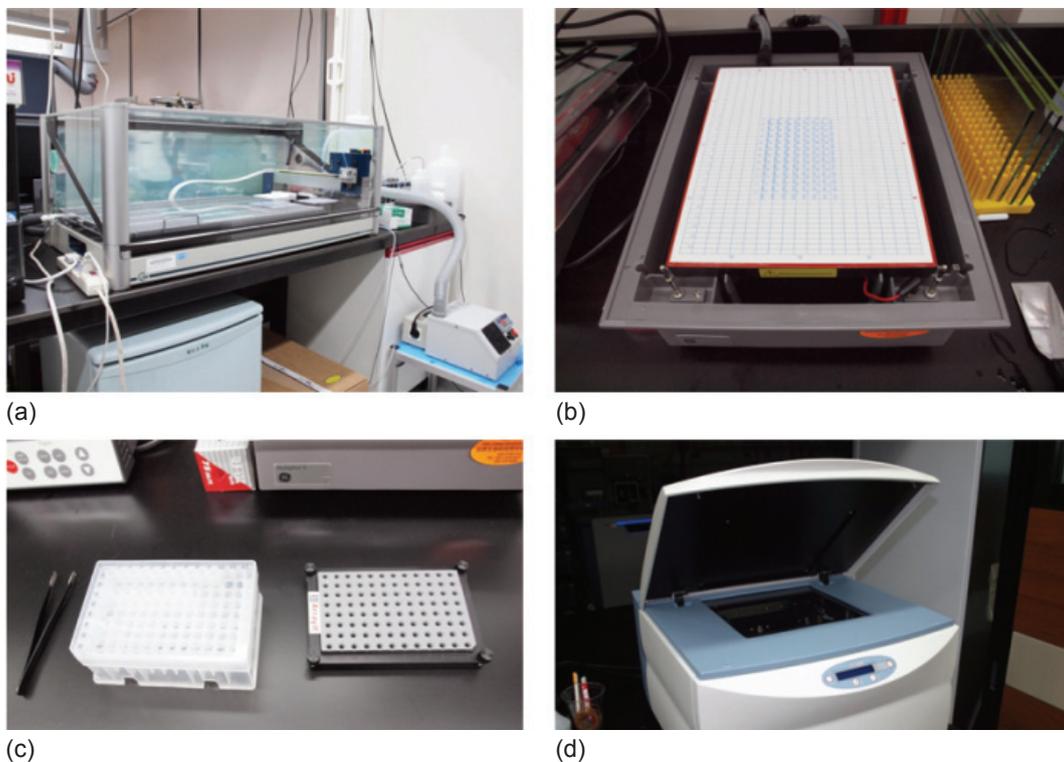


圖 1. Micro-Western Array 系統。(a) GeSim Nanoplotter protein arrayer (b) GE Multiphor (c) 96-well array gasket (d) Licor Odyssey infrared scanner。

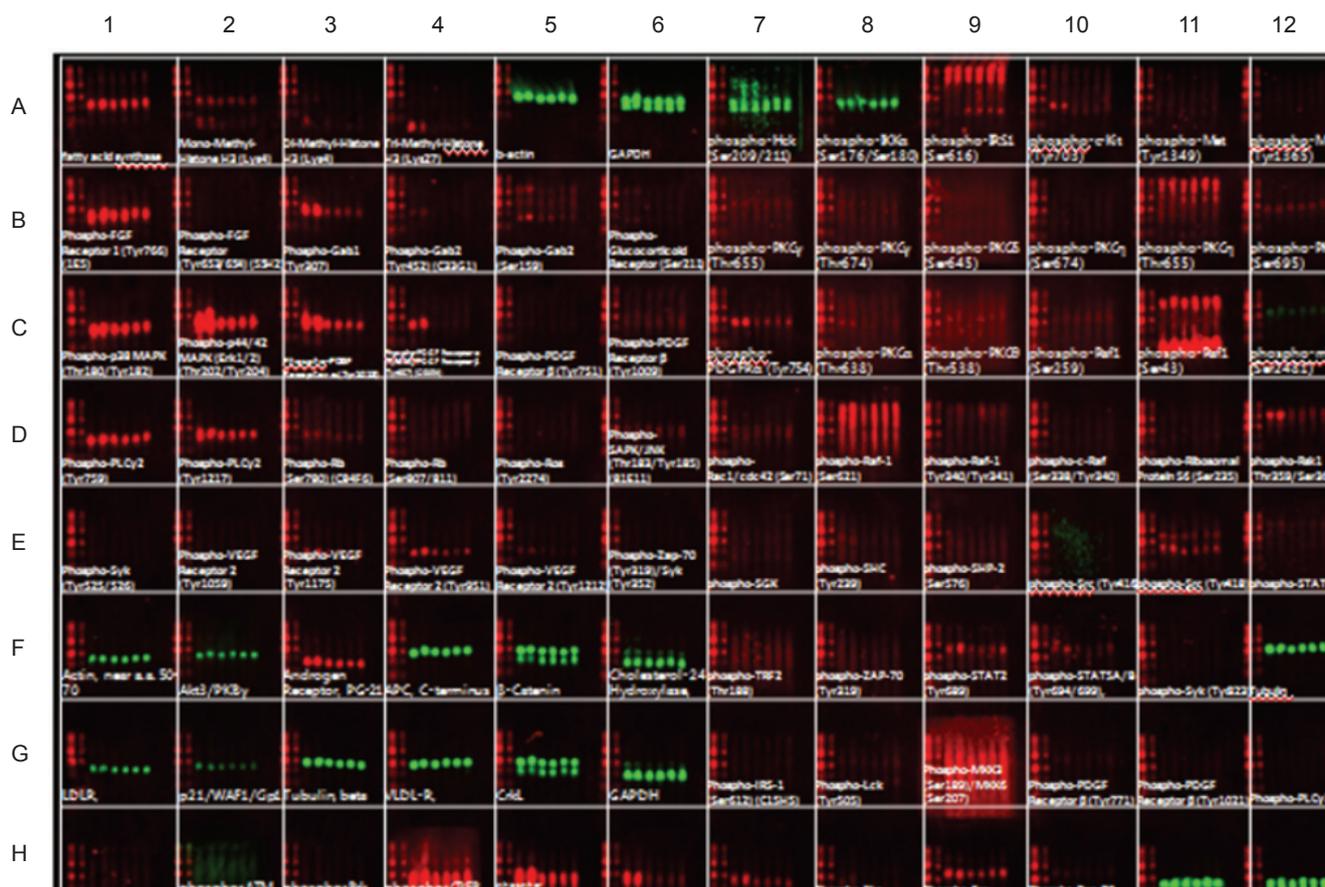


圖2. 6種樣本、96種抗體的MWA模式。

GeSim 奈升蛋白質打點系統是經由液壓控制的特質玻璃結晶針頭吸取樣品，然後依據電腦程式的控制，噴灑 (spotting) 在特製 SDS 膠片上的特定位置。SDS 膠片是我們依據研發的配方自行製作，中間有薄網增加膠片的穩定性。膠片大小和 96 孔盤 (96-well plate) 大小相同，每一個小孔 (well) 的面積，就相當於一個迷你的 Western blot。因此整個膠片上有 96 組小的 Western blot，每一組內都有一個 protein marker 和六個樣品。GeSim nanoplotter protein array 將奈升 (nano-litter) 尺度的樣本，噴灑在 SDS-PAGE 膠片上，然後利用 GE multiphor 進行乾燥式電泳。接下來，像傳統的 Western blotting 一樣進行 transfer，將蛋白質轉漬到硝化纖維膜上，再將硝化纖維膜用 Licor 公司特製以魚膠 (fish gelatin) 為主成分的阻斷液 (blocking buffer) 進行阻斷一小時後，放入特製的 96-well 的特製微陣列盒 (array gasket)。在微陣列盒內有特殊的橡皮隔膜，會將每個小孔隔開，因此我們可以在

96 個小孔內放入 96 種抗體，同時進行 96 組迷你西方點墨實驗。

由於 Micro-Western Array 將樣品內的蛋白質依據分子量大小分開，而且有放置蛋白質標準，因此可以避免 RPA 的抗體 cross-reactivity 的問題。Micro-Western Array 的結果和傳統的 Western blotting 一致<sup>(3)</sup>。但是 Micro-Western Array 相較於傳統 Western blotting 而言，節省許多成本和時間。傳統的 Western blotting 每次約需 50  $\mu\text{g}$  的樣品和 2  $\mu\text{g}$  的抗體，而 Micro-Western Array 的每個小 blot 只需 0.25  $\mu\text{g}$  的樣品和 0.2  $\mu\text{g}$  的抗體<sup>(3)</sup>。Micro-Western Array 進行樣品噴灑，四個小時可以完成兩片 SDS-PAGE 膠片的樣本噴灑，也就是 192 組迷你 blotting，也就是可以同時探討 6 個樣本中 192 種蛋白質的變化，如此一共是 1152 個數據點。MWA 系統最高紀錄可以同時噴灑 4 片膠，也就是一次測試 384 種蛋白質的變化。此外，經改良後，MWA 可以進行 6 種樣本搭配 96 種抗體 (圖 2)、或

是 15 種樣本搭配 48 種抗體的形式 (圖 3)。後者對研究大量臨床檢體來說更為實用。

筆者於 2009 年 9 月底返國後成為國家衛生研究院細胞及系統醫學研究所助研究員。在國衛院伍焜玉前院長和現任國衛院核心設施中心張中和主任的支持與協助下，我們採購了 GeSim Nanoplotter protein arrayer, GE multiphor, Licor Odyssey infrared scanner，然後筆者開始修改系統的程式、一一聯繫諸多國外廠商訂購小型配件、並逐步測試實驗修正參數，最終成功於 2011 年初建立我國第一套、全世界第二套 MWA 系統。目前 MWA 系統僅提供國衛院院內實驗室做非營利性質之學術服務，相關費用從送件實驗室之國衛院院內計畫扣款。院外各大專院校老師有興趣使用此服務者，可藉由與國衛院之 PI 的合作進行送件，截至目前為止，國衛院和其它大專院校已經有六篇使用 MWA 技術的 SCI 論文發表。

## 五、MWA 系統的優勢與應用

MWA 除了樣本噴灑外的多數步驟跟傳統西方點墨一樣，從樣品噴灑、阻斷、抗體浸泡、清洗到最後風乾共需要兩天，另外需要一天的時間利用 Licor Odyssey scanner 進行影像掃描、定量和數據分析。因此一個研究人員、花費三天時間，進行 MWA，完成的蛋白質分析之工作量，約是同樣一個工作人員利用傳統西方點墨方法持續忙碌 24 周，也就是約半年的工作量。這種新的 MWA 技術的最大優點是，可以用極少量的樣品和眾多的抗體分析大量數目不同蛋白質的變化。我們認為 MWA 的應用主要有下列幾種範疇：(1) 研究癌細胞、幹細胞、各種體細胞在各種生長因子、環境壓力、或是藥物等刺激下的訊息傳遞路徑 (signaling transduction pathway) 的變化，可用於細胞生物分子機轉 (molecular mechanism) 的研究。(2) 研究癌

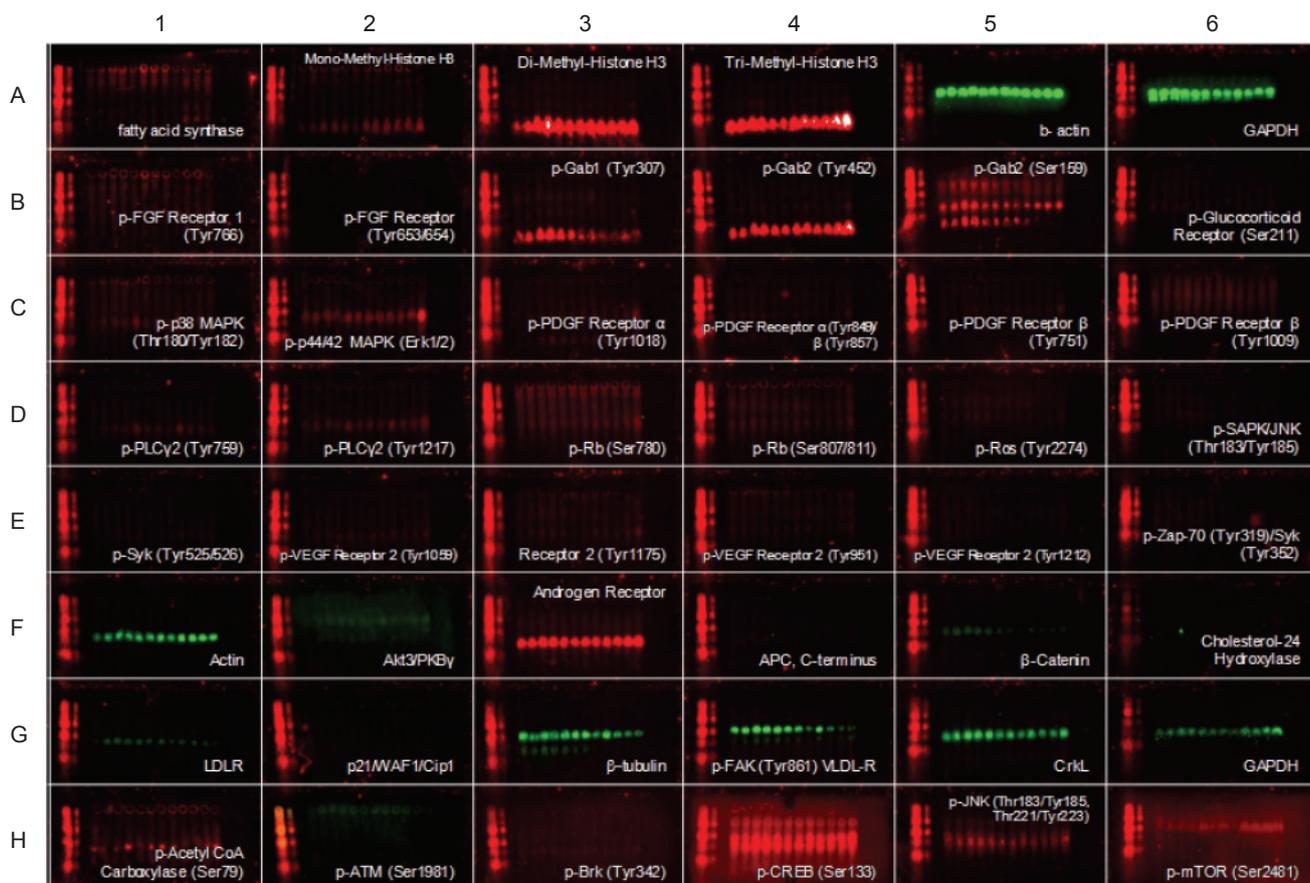


圖 3. 15 種樣本、48 種抗體的 MWA 模式。

症發生、惡化與轉移或疾病進程中，病患組織、血液或是特定細胞內蛋白質表徵 (protein profile) 的變化，並與正常健康人的檢體比較，找尋可供做為癌症或疾病診斷 (diagnosis) 或預後 (prognosis) 的生物標誌 (biomarker)。(3) 研究者可以探討癌細胞經過不同濃度的藥物處理後，不同時間點上百種訊息蛋白質 (signaling protein) 的變化，獲得的資訊可建構藥物作用的機轉。(4) 新抗體的專一性驗證，MWA 系統允許研究者於多種細胞或是樣本中驗證新開發之抗體是否能正確偵測特定蛋白質。

## 六、結語

我們相信 MWA 這種新的高通量蛋白質體學技術，將成為系統生物與生物醫學研究的新利器。

## 參考文獻

1. R. J. Hause, H. D. Kim, K. K. Leung, and R. B. Jones, *Expert Rev Proteomics.*, **8** (5), 565 (2011).
2. M. Sevecka and G. MacBeath, *Nat. Methods.*, **3** (10), 825 (2006).
3. M. F. Ciaccio, J. P. Wagner, C. P. Chuu, D. A. Lauffenburger, and R. B. Jones, *Nat. Methods.*, **7** (2), 148 (2010).



褚志斌先生為美國芝加哥大學癌症生物博士，現任國家衛生研究院細胞及系統醫學研究所助研究員。

Chih-Pin Chuu received his Ph.D. in cancer biology from University of Chicago, U.S.A. He is currently an assistant investigator at the Institute of Cellular and System Medicine, National Health Research Institutes.