

出國報告 (出國類別：海外研習)

捷克布拉格查理士大學
暑期海外研習

服務機關：國立屏東科技大學 生物科技系

姓名職稱：張格東 助理教授；

派赴學員：陳佳玲 同學；張育郡 同學

派赴國家：捷克 布拉格

出國期間：民國 101 年 7 月 17 日至 8 月 15 日

報告日期：民國 101 年 10 月 02 日



捷克布拉格查理士大學暑期海外研習

報告撰寫人: 張格東, 陳佳玲, 張育郡

➤ 實習活動日程表	3
➤ 實習目的	4
➤ 帶領實習過程-張格東	5
➤ 實習過程-陳佳玲	6
◇ 7月20日(五) 使用 BD FACSAria II 操作細胞分選	6
◇ 7月23日(一) 參觀動物房、抽小鼠骨髓細胞	7
◇ 7月24日(二) 血液幹細胞移植	8
◇ 7月25日(三) 準備隔天的演講	8
◇ 7月26日(四) 演講	8
◇ 7月27日(五) 練習血液幹細胞移植實驗	9
◇ 7月30日(一) 討論在台灣所做關於環磷氮芥(Cyclophosphamide)的實驗結果	9
◇ 7月31日(二) 利用不同的抗體去標的不同的血液細胞, 以應證期刊文獻 Accuri Fixed Voltage PMTs and Expanded Dynamic Range 的參考性	9
◇ 8月01日(三) 講解鈷-60 γ 射線照射儀原理, 及操作說明示範利用 FACS Canto II 分析血液幹細胞細胞週期	10
◇ 8月03日(五) 示範眼窩採血及練習骨髓與脾臟細胞抽取	11
◇ 8月07日(二) 練習利用 FACS Canto II 來分析血液幹細胞群	11
◇ 8月08日(三) 練習 SDS-PAGE 分析蛋白質電泳	11
◇ 8月09日(四) 講解西方墨點(Western blot)的技巧	11
◇ 8月13日(一) 實驗研究交流會議- Petr	12
➤ 實習過程-張育郡	13
◇ 7月23日-小鼠骨髓抽取技術	13
◇ 7月24日-小鼠血液幹細胞的移植	13
◇ 7月25日-準備明天的演講	13
◇ 7月26日-學術交流報告與參觀鼠房儀器與操作流程	14
◇ 7月27日-血液幹細胞的移植技術(以生理食鹽水代為血液做練習)	14
◇ 7月30日-實驗結果討論	15
◇ 7月31日-利用各種抗體去標的血液細胞, 使用流式細胞儀分析	15
◇ 8月01日-細胞計數、 γ 放射線的利用、利用 EdU 上 FACS 分析細胞週期	15
◇ 8月03日-脾臟摘除並使其變成細胞、眼窩採血	16
◇ 8月07日-Flow cytometry (骨髓), 如何界定細胞群	16
◇ 8月08日-SDS-PAGE 分析蛋白質電泳	16
◇ 8月09日-學術進度報告	17
◇ 8月13日-實驗研究交流會議	17



➤ 實習心得-張格東	18
➤ 實習心得-陳佳玲	18
➤ 實習心得-張育郡	19
➤ 建議	20
➤ 實習照片	21
◇ 實驗動物房	22
◇ 實驗室儀器設備	26
◇ 實驗室實驗器材	28
◇ 實驗操作	32
◇ 文化交流	35
➤ 附錄	35
◇ 查理士大學學生證	36
◇ 實習邀請函	37
◇ 查理士大學註冊單	38
◇ 實習成績證明	



日程表

	日期	內容	指導者
第一周	07.17 三	出發	Ko-Tung Chang, Ph.D
	07.20 四	抵達捷克布拉格	Ko-Tung Chang, Ph.D
	07.20 五	使用 BD FACS Aria II 操作細胞分選	Filipp Savvulidi, B.Sc
第二周	07.23 一	參觀動物房 抽取小鼠骨髓細胞	Emanuel Nečas, M.D., Ph.D Katarina Forgacova, M.Sc
	07.24 二	血液幹細胞移植實驗	Katarina Forgacova, M.Sc
	07.25 三	雙邊計畫主持人與學員學習經驗分享	Ko-Tung Chang, Ph.D
	07.26 四	實驗研究交流會議-陳佳玲	Emanuel Nečas, M.D., Ph.D
	07.27 五	練習血液幹細胞移植實驗	Katarina Forgacova, M.Sc
第三周	07.30 一	實驗結果討論	Emanuel Nečas, M.D., Ph.D
	07.31 二	利用不同的抗體去標的不同的血液細胞，以應證此篇期刊(Accuri Fixed Voltage PMTs and Expanded Dynamic Range)的正確性	Ludek Sefc, Ph.D
	08.01 三	講解鈷-60 γ 射線照射儀原理，及操作說明 示範利用 FACS Canto II 分析血液幹細胞細胞週期	Petr Páral, M.Sc.
	08.03 五	示範眼窩採血及練習骨髓與脾臟細胞抽取	Martin Molik, B.Sc
第四周	08.07 二	練習利用 FACS Canto II 來分析血液幹細胞支系	Ludek Sefc, Ph.D
	08.08 三	練習 SDS-PAGE 分析蛋白質電泳 Emanuel Nečas, M.D., Ph.D 的生日香檳慶祝	Yuzo Fujikura, Ph.D
	08.09 四	講解西方墨點的技巧 實驗研究交流會議-張育郡	Yuzo Fujikura, Ph.D Emanuel Nečas, M.D., Ph.D
第五周	08.13 一	實驗研究交流會議- Petr Páral, M.S.	Emanuel Nečas, M.D., Ph.D
	08.14 二	返家	Ko-Tung Chang, Ph.D
	08.15 三	抵達台北	Ko-Tung Chang, Ph.D



目的

張格東

捷克查理士大學(Times Higher Education 2012, ranking 301)第一醫學院人類病理生理學研究所設有實驗血液學中心(Center of Experimental Hematology)，為全捷克共和國臨床血液學與幹細胞移植之實驗動物研究試驗中心，擁有完整的試驗室設備及專業研究環境，如 SPF 無菌試驗鼠房、獨立 P2 負壓實驗動物鼠飼養系統、鈷-60 γ 射線照射儀、BD Aria II 流式細胞分選系統(FACS)、Eppendorf 全自動核酸萃取系統、Autoflex II mass spectrometer 蛋白質分析儀等，及專業的臨床醫師與來自其他國家的研究學者。前所長 Emanuel Nečas, M.D., Ph.D 教授(2012.10 退休)，是我就讀博士班的指導教授，從 2003 至今期間也與我們共同發表過許多研究報告。此行的主要目的，是帶領學生在學術研究上實地參與國際交流，透過雙邊研究經驗的分享，相互交換實驗技術上的心得，並且有機會實際操作在屏科大並未設置的專業儀器，讓我們的學生更充分具備實務方面的專業能力。另外，也利用此行的機會，將屏科大在國際事務與合作的成果簡介資料提供予查理士大學相關單位參考，讓查理士大學醫學院了解到可以與屏科大既有的華語文中心，生物科技研究所，生物資源所，及生物機電系等進行更多可能的校際合作。

陳佳玲

目前我們正在進行國科會生物處再生醫學的研究計畫，其計畫的階段性任務需要執行動物血液幹細胞的移植試驗，但在目前所處的機構還未有較適切的設備及技術可以學習。我們此趟前往捷克查理士大學，除了學習該實驗室專業的流式細胞分選技術及實驗技巧外，我們還另外安排三場實驗進度交流的會議，分別為在 7 月 26 日、8 月 09 日、8 月 13 日舉行，藉由每一次相互的討論，修正自己的實驗設計，並且更正自己的實驗方法。

除了學習上的交流外，也希望藉由此次的海外實習機會，接觸不同國家的文化，能夠就生活與專業領域得到更具國際觀的教育。

張育郡

藉由此次的海外專業實習至捷克的查理士大學第一醫學院設有的實驗動物血液學研究中心，學習有關 BD Aria II 最高等級的流式細胞分選系統(FACS)操作，以及學習骨髓抽取技術、血液幹細胞移植技術、鈷-60 γ 射線照射儀之使用原理與應用、練習 SDS-PAGE 和 Western blot 的蛋白質分析技術。除了專業技術的學習外，也希望藉由此次的海外實習來增強自己的語文能力，並能針對國際化的語言與價值觀念，來提醒自己必須更加勤學以跟上世界的腳步，面對知識與技術不斷的更新，唯有不斷充實自我，挑戰自我，才得以有所進步與成長。



過程 - 張格東

這次實習的課程內容主要是由 Prof. Nečas 所設計，他為我們三人各安排一個場次的演講，帶領我們參觀該研究所核心單位-實驗動物飼養室，並讓學員參與分子生物研究室與細胞生物研究室的實際操作，其中包括幹細胞的採集與移植試驗，幹細胞的標定與分離，流式細胞儀的操作分析，與蛋白質的分析。在出國前我們就接獲所長的通知實習過程會有雙邊研究報告的交流，這讓我們兩位參與的學員陳佳玲同學與張育郡同學非常緊張，不擅使用英語交流的她們，對於突然要站在講堂上演講專題研究確實具有相當難度與挑戰，對於身為指導教授的我，也非常擔心她們是否能夠把實驗的進度內容完整清楚的表達給在場與會的研究人員，畢竟這是國際交流，榮譽感使然讓我也不得不戰戰兢兢去準備。由於出國在即，只有一個星期可以在國內準備，因此我們攜帶了許多紙本的參考文獻，學生也向校方籌借到筆記型電腦，因此我們一到達捷克的實驗室後，我向 Prof. Nečas 表明需要再一個星期的時間做演講的準備，所以我們的演講被安排在實習的第二周與第三周。我與學員們白天在研究單位開始忙於進行實習，中間若有休息時間就趕緊到該單位的圖書室裡與學員討論演講的簡報，晚上用過晚餐後回到住的地方也是繼續跟學員修正簡報內容，由於是英語演說，學員也很認真的把演說要講的內容逐字抄寫在講稿裡，然後看著她們每天很認真地背誦講稿，我也需要不斷地為她們的發音進行糾正，直到 7 月 26 日陳佳玲同學和我與 8 月 9 日張育郡同學的演講結束為止，我們才感覺鬆了一口氣。所幸同學們都非常努力，雖然演講後有許多的問題提問，礙於學員的英語能力無法做即興流暢的回答，所以大部分問題都由我代為回答，不過演講內容可以得到大多數與會人員的了解與得到許多的會後討論，實屬不易，這次的實習經驗，也讓學員切身的了解到英語能力的重要性，比起平日我不斷的再三叮嚀，這樣的衝擊帶給她們更多的警惕也是令人相當深刻的一種教學經驗。

對於學員們平日的實習課程，我也是全程參與在旁，雖然大部分的課程內容我都相當熟悉，但是為了學員能夠充分了解研究人員熱心詳細的解說，尤其是儀器的操作說明與結果分析的部分，我都會適時地為她們用中文講解一遍，扮演好我身為指導教授的責任，並且我會盡量提問國外研究人員一些比較深入的問題，幫助我們學員針對課程的內容能夠與研究人員有互動討論的契機。隨著實習待在國外的時間較長了，我也慢慢地了解到學員們開始能夠開口問一些問題了，對於英語環境的適應也在發酵。Prof. Nečas 之後也邀請我們參與他們研究單位的晨間會報，共計兩次，我們可以聆聽到他們實驗進度的報告與討論，他們也請求我與學員們能夠給予意見，會後也會討論我們的實習進度與結果，讓我們深切感受到好像也融入為國外研究團隊的一員。整體而言，這一個月的帶領實習，讓我在教學經驗上收穫良多，得到許多很寶貴的經驗。



過程 - 陳佳玲

7月20日(五) 使用 BD FACSAria II 操作細胞分選

如何操作流式細胞儀進行細胞分選是我們這次來布拉格的一大學習重點，這裡有專業的操作技師專門進行相關實驗操作，而今天帶領我們的技師是 Filip Savvulidi, B.Sc，專門為我們講解 BD FACSAria II 這台機器。從機器特色，到各參數的控制以及參數所代表的意義，以及如何取捨參數的設定，到最後結果如何分析以得到我們所要的資訊...等。如：三支雷射管(488nm, 635nm, and UV)最多可以解析十三色螢光訊號，細胞解析能力很高，此次所使用的樣品為小鼠骨髓標的 LSK SLAM 細胞群，就有五種不同的抗體(Linage^{-low} Sca1⁺ cKit⁺ CD48^{-low} CD150⁺)需要去解析；自動液滴調控機能，可以藉由介面調控液滴震盪頻率，達到精確的細胞分選功能，一秒間可以震盪形成九萬顆液滴；細胞分選一次可以處理兩群到四群不同特性的細胞群。

一開始是由實驗助理 Yana Michalova, Ph.D 準備樣品，先把老鼠用乙醚迷昏後斷頸、再用器械剝除大腿骨周邊肌肉組織，取得完整的大腿骨髓部位、再用生理食鹽水(PBS)沖洗骨髓細胞、標抗體 LSK SLAM 後交由技師 Filip 來操控流式細胞儀進行細胞分選的動作。Filipp 一邊操作實驗一邊為我們講解，分選完畢後 Fillip 再把結果跟細胞交還給 Yana 進行下一個 RNA 萃取的步驟。

經由今天的實驗，可以看出整個血液學研究團隊分工之精細，每個人皆有自己專門負責的專業工作，如技師 Filip 專門負責流式細胞儀 BD FACSAria II、研究助理 Yana 專門負責後續的活體及分生實驗，還有另外一個技師 Martin Molik 負責上流式細胞儀前樣品的準備，如抽骨髓，和整個實驗室儀器的維護。

在進行骨髓抽取時，Yana 在骨髓完整取出後，藉由衛生紙擦拭把骨髓上的肌肉跟脂肪擦掉，對我們來說這樣很容易造成汙染，可能因為實驗應用的不同，對於她們要進行的移植實驗，小鼠的免疫系統很強，所以在一般環境下取出的骨髓幹細胞再移植進接受者(recipient)時，接受者的免疫系統可以把經由移植而進入到活體內的可能汙染病原清除掉。

在進行斷頸前，他們會先將小鼠用乙醚麻醉後再進行斷頸，一來可以免去小鼠臨死前的痛苦知覺，二來可以減少新手在斷頸因失誤，而造成小鼠掙扎對操作者造成的傷害。



7月23日(一) 參觀動物房、抽小鼠骨髓(Bone marrow)細胞

今天是和博班的學生 Katarina Forgacova, M.Sc 學習上流式細胞儀前，小鼠骨髓細胞的備置及抗體的標的，並且和我們的方法做比較，看有哪些地方可以改進。例如：我們在用生理食鹽水沖洗骨髓時，會因為針頭壓力過大而使得生理食鹽水噴出試管(ependrof tube)，但是 Katarina 在操作時，會把蓋子掩蓋起來，防止生理食鹽水噴出來而損失骨髓細胞。

今天也是第一次進去參觀他們的鼠房，規模和系上動物房相比，有十倍大以上。所有人員進出遵循單一方向出入口，在剛進入動物房的入口會有一個簡易的腳底清潔，先將鞋底踩在有消毒水的抹布上消毒鞋底後，在套上鞋套。

進去後穿著實驗衣再由唯一入口進入，首先就會看到進行一般實驗用的鼠房，不同品系的老鼠就不同房間分開飼養放置，每一間鼠房備有一套實驗耗材，如針頭、手套、衛生紙...等，每個鼠房墊料飼料的清理也是分開在各房間完成，以避免老鼠的排泄物交互污染。每個房間也備有洗手台，讓操作人員在結束實驗或是清潔完墊料飼料後，可以馬上洗手。在每間鼠房的門口還會擺放一塊塑膠板防止老鼠逃出。

整個動物房的設計相當複雜，越深入動物房內部的動物，越需要相對的乾淨，所以剛進去是一般實驗鼠房，一般鼠房後轉個彎就是無菌(SPF)鼠房，這裡的老鼠需要獨力飼養在隔離箱(IVC)中，並有專門的無菌操作隔離台(Isolator)來清理鼠籠及操作實驗，整個過程中人是不會和老鼠接觸的，送進去使用的器械及墊料飼料也要經過紫外線(UV)或高壓滅菌釜滅菌後，才能送進隔離箱系統使用。

在鼠房的最深處，還有一間 P2 動物房(breeding room)，需要比隔離箱系統更乾淨的空間及設備，一般動物房跟隔離箱系統中的老鼠是只要確保老鼠乾淨即可，而操作員本身只要簡單的清潔，及著實驗衣就可進行操作。但是在 P2 動物房中，連操作人員都需要完整的清潔，P2 鼠房內屬於另外一個獨立系統空間，防止飼養室裡的小鼠受到實驗用鼠房的交叉感染。

P2 飼養室(breeding room)與一間準備室相隔後，就是其他動物的飼養房，如大鼠、兔子...等，利用準備室做緩衝的空間，可以避免不同動物的氣味互相傳遞，影響動物彼此之間的情緒，如小鼠的天敵是大鼠...等。

查理士大學的實驗動物房，從老鼠的照養、廢棄物的處理、到人員的管理...等，都遵照一定的 SOP 來進行，由此可知他們對於動物實驗上的嚴謹。

參觀完查理士大學的實驗動物房後，我想對於我後續的活體實驗，在安全上也需要隔離箱系統以及隔離台，才能確保操作員的安全。

我們生物科技系的動物房雖然不比人家的規模，但是仍有值得學習的優點，如：操作人員進入動物房一律穿專用拖鞋及實驗衣進入，並且著手套、口罩及頭套，進入飼養房的空間時還得經過噴氣，吹淨身上的落塵及外來的髒東西才能進入，並且使用正壓系統維持鼠房空氣清潔...等。



✚ 7月24日(二) 血液幹細胞移植

這個實驗由 Katarina 帶領我們操作，先利用生理食鹽水跟針頭將骨髓沖洗出來，這個步驟和上流式細胞儀前的樣品備置是一樣的步驟。再利用 Nexcelom Cellometer *AutoT4* 進行自動細胞計數，計數完的細胞，取 2×10^6 顆細胞，溶於 0.5 cc. 的生理食鹽水中，用 29G*1/2", 0.3*13mm 的針頭注射到小鼠眼窩下方。

Katarina 說除了從小鼠眼窩下方進行幹細胞移植外，也可經由老鼠尾巴移植，但是老鼠尾巴相較於小鼠眼窩下方的皮膚會比較厚，針頭較不易準確插入，但是此方法新手較易成功。而從眼窩下方移植，雖然針頭較易插入，但是失敗率頗高，新手在操作時不容易找到正確的位置，錯誤的移植位置易導致小鼠受傷，如：小鼠眼球充血和注射後的不適感。

✚ 7月25日(三) 準備隔天的演講

再和 Professor Načas 接洽時，Professor Načas 有幫我們安排一場會議，是關於我們現在在做的 Notch 國科會計畫 (NSC 99-2314-8-020-001-MY3) 的實驗分享。但在行程確認後，到距離出發只剩不到一周，沒辦法準備完善，我也怕因為自己英文文法不好，當在報告時會讓聽眾聽不清楚我想表達的東西。所以今天整天都在練習用英文演講，和修改簡報的內容，在我們介紹的內容中，我們加上屏科大美麗的校景跟簡單的系所介紹，希望可以藉由美麗的校園吸引查理士大學的老師前來交流的意願。

在今天自修的的期間，發生了一個小插曲。Katarina 昨天移植的老鼠血液細胞是從綠色螢光基因鼠分離而來，可能因為綠色螢光蛋白的啟動子表現太強，而出現了綠色肌肉。

✚ 7月26日(四) 演講

早上起來就很忐忑不安，今天是我要報告的日子，我很怕因為我的發音不標準，或者是文法錯誤，使得聽眾聽不懂我的報告。所以我花了整個早上在練習念稿上的單字和英文句子，我發現我會習慣在不該加字的地方加上冠詞，或者是過去分詞和過去式搞不清楚。

報告的順序分別由老師先和大家介紹我們台灣，然後從台灣帶到屏東，再從屏東帶到屏科大。大家對於我們學校有條媲美高速公路的大馬路很有興趣(學府



路)，以及後面北大武山的美景。期待可以勾起在座的各位老師們想要來台灣走走的想法，這樣一來我們就可以邀請他們來我們系上演講。

介紹完學校後，就是換我報告我的主題了，我先用一張簡報介紹整個實驗架構，之後介紹為什麼我們要做這個實驗，以及目前國際學術論文研究到哪個地步了。再來就是連接到我們每個階段性的實驗，秀出我們研究至今有的結果，並且邀請在座的各位老師一起討論。

結束後也有老師提出疑問。這些問題都可以幫助我們思考到我們平常不會想到的實驗盲點。以下為查理士大學的老師所提出的問題：

- ◇ 問題一：如何證明誘導多潛能幹細胞(iPSC)和胚胎幹細胞(ESC)的相似性？
- ◇ 問題二：HoxB4 和 Notch 的關係？為何不直接用 HoxB4？

✚ 7月27日(五) 練習血液幹細胞移植實驗

今天我們請 Katarina 幫我們準備材料，讓我們用生理食鹽水練習移植實驗，我們請她先示範一次，之後就交由我們來操作。同行的學妹張育郡，可能比較常做動物實驗，在老鼠保定跟注射細胞時成功率較高。而我在試了第一次時失敗了，因為生理食鹽水從眼窩溢出來，還引起老鼠不適發出唾棄聲。後來試了幾次後還有讓老鼠眼睛流血的，只有成功一次而已，我想回到台灣後我還仍需多次練習。

✚ 7月30日(一) 討論在台灣所做關於環磷氮芥的實驗結果

今天和 Professor Načas 討論到之前同行學妹張育郡做的關於環磷氮芥的實驗，在台灣因為我們所使用的流式細胞儀是 BD FACScan™，只有一支雷射管三個通道，第三個通道固定用來測量細胞存活的碘化丙啶(Propidium iodide, PI)染劑，所以我們只能再用兩種抗體。我們提出只單用 CD34⁺抗體去標的血液細胞，但是 Professor Načas 說 CD34⁺在某些細胞中是呈現 CD34^{-low}，所以他建議我們選 CD45⁺來當篩選血液幹細胞與前驅細胞的標記會更為適合。

✚ 7月31日(二) 利用不同的抗體去標的不同的血液細胞，以應證此篇期刊(Accuri Fixed Voltage PMTs and Expanded Dynamic Range)的參考性

老師拿了一篇 Accuri Fixed Voltage PMTs and Expanded Dynamic Range 請大師兄 Ludek Sefc, Ph.D 利用不同的抗體去界定(gating)，來比對此篇期刊所使用方法的參考性。



Ludek 教我們先用 FSC、FSC 分離非單一細胞，再用 SSC、SSC 一樣的原理進行篩選掉凝集的細胞群。此時圖形會呈現線性，圈選中間線性的區域，用 SSC 和 FSC 分離細胞碎片，就可以用血液細胞相關的抗體去一層一層的分離我們的血球細胞了。例如：Lineage、Sca-1、c-Kit、CD48、CD150、Ter119、CD45、CD34...等。等到最後分離出來的純細胞群後，Ludek 會在把純的細胞群再往回推做為 double check，推回一開始第一階層的 FSC、SSC。

結果證明，此文獻只用單一抗體 CD45 來分離細胞群是不足的，因為在不同的細胞群中還是會有少數例外表達多種抗原的細胞。但是假如局限於價錢跟機器的雷射管的顏色數目的話，分離造血幹細胞 CD45 是最為恰當的選擇。

✚ 8月1日(三) 講解鈷-60 γ 射線照射儀原理， 及操作說明示範利用 FACS Canto II 分析血液幹細胞細胞週期

今天要操作實驗的是 Ludek 的博士班學生 Petr Páral 和碩士班學生 Nico，他們主要的實驗架構是，小鼠經環磷氮芥注射後，馬上將小鼠照射 γ 放射線以破壞小鼠骨髓血液細胞，之後分別取不同天數，利用流式細胞儀跟抗體標的，來觀察血液幹細胞增生的情形。

Nico 很有耐心地邊操作自己的實驗，邊跟我解釋 γ 放射線的半衰期表格要怎樣看，以及如何計算使用劑量。因為鈷 60 稀有放射元素會有半衰期，時間越久效力越弱，所以他們有建立一個表格，針對不同周後的放射線元素，依照他衰退的程度延長照射的時間。

此次的實驗組是 CY 注射後 2 天和 4 天，再照射 γ 放射線破壞小鼠骨髓後馬上、1 天、3 天、5 天後，分別取骨髓和脾臟的細胞來分析。

分離脾臟細胞是用一個很特殊的玻璃研磨器，類似像試管型狀的杵跟白，只要加入 1 毫升的生理食鹽水，在把研磨的玻璃棍沿著玻璃試管周邊旋轉幾下即可。而研磨棍跟玻璃試管之間有很大的空隙，可以確保被物理切解下來的細胞不會因為管壁太緊壓迫死亡。

把抽取出來的骨髓細胞跟研磨完畢的脾臟單一細胞，利用 Nexcelom Cellometer AutoT4 進行自動細胞計數，在遵照 Invitrogen 的 Click-iT[®] EdU Flow Cytometry Assay Kits 的操作手冊指示，把固定量的骨髓細胞種在 6 孔盤中，培養 30 分鐘。30 分鐘後，依照操作手冊指示，繼續處理後續的步驟。

EdU 的操作手冊每個反應時間都很壟長，Nico 會趁這個空檔，留剩下的骨髓細胞去做另外一組小鼠活體移植的實驗。Nico 說因為移植實驗需要 γ 放射線照射後至少 2 小時才能做，所以我們早上九點取的樣品，到中午一點多差不多就可以移植了。

處理完 EdU 的骨髓細胞跟脾臟細胞，Nico 將樣品轉交給 Petr 分析。Petr 利用 FACS Canto II 流式細胞儀來分析，一樣先標的 LSK SLAM (Lineage^{-low} Sca1⁺



cKit⁺ CD48^{-low} CD150⁺)等抗體分離出純的細胞群後，再利用 EdU、PI 及 Hoechst 33342 看細胞增生及細胞凋亡的比例。

✚ 8月3日(五) 示範眼窩採血及練習骨髓與脾臟細胞抽取

今天由技師 Martin Molik 為我們示範眼窩採血。他將老鼠用乙醚迷昏，在老鼠活著昏睡時，取一根毛細管插入眼球四周，此位置是和移植實驗一樣的位置，眼窩的前後都可以。插入後旋轉，藉由毛細管的口徑壓力穿透眼窩的皮膚，讓血液順著毛細管留下來。

採血完的老鼠馬上斷頸後，從腳踝的地方剪開一個洞，用手大力的把皮往大腿骨撥開，取出大腿骨髓用生理食鹽水沖出骨髓細胞。之後把老鼠右腹側的部分用去離子水浸濕，剪開毛皮跟皮膚後，藉由鑷子的輔助小心地把脾臟取出，放入研磨器磨成單一細胞。蒐集完的骨髓細胞跟脾臟細胞，做為 Petr 練習利用 FACS Canto II 分離 LSK SLAM 細胞跟分析細胞週期用。

✚ 8月7日(二) 練習利用 FACS Canto II 來分析血液幹細胞群

今天由 Ludek 親自教我們怎樣界定細胞，以及如何判斷數據，而今天的樣品和 12.08.01 的實驗設計一樣，。

Ludek 還教我們如何利用 BD Biosciences 官方網站的工具(BD Fluorescence Spectrum Viewer A Multicolor Tool)，設計不同的抗體其所帶的螢光要怎樣選，才不會因此有衝突，或者是重疊而導致訊號干擾。波峰重疊越少越好，所以當我們在挑選抗體的同時，也還要考慮到機器本身以及抗體所帶的螢光訊號來設計。

http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp

✚ 8月8日(三) 練習 SDS-PAGE 分析蛋白質電泳

8月9日(四) 講解西方墨點(Western blot)的技巧

今天和 Yuzo Fujikura, Ph.D 學習 SDS，因為 Yuzo 都很早就來實驗室了，所以當我們到的時候，他已經幫我們把 SDS 的膠備製好了，簡單的講解一下原理後，Yuzo 就要我們一人做一個樣品-白蛋白(BSA)，練習注入 SDS 的膠。

Yuzo 邊做邊跟我講一些做 SDS 的小技巧，像是固定蛋白質他都用脫脂牛奶，他還秀出他的獨門保存膠膜的東西-食物保存封膜機。

看 Yuzo 做實驗，不同於 Petr 或者是 Yana 他們，感覺東方人比較會去找其他的小撇步來讓實驗更順利或更方便，但是西方人可能會比較遵守實驗手冊的操



作指示，或者是已經設定好的程式來做。不過不管是哪一種人，他們對實驗的嚴謹跟慎重都是值得學習的

✚ 8月13日(一) 實驗研究交流會議- Petr Páral

Petr 目前正在進行抗癌藥物環磷氮芥治療後的血液細胞動態分析，也就是從8月01日開始做的實驗結果報告，題目為「Oscillatory and complex reaction of hematopoietic system after CY injury」。由初步實驗結果顯示，LSK SLAM 和 SK SLAM 的細胞群，經由流式細胞儀分離後，其在骨髓細胞所佔的百分比是一樣的。所以之後 Petr 的實驗可以直接用 SK SLAM 標記即可。由實驗的結果，我們考慮在台灣可以藉由加入中國草本藥物的實驗設計，來研究作為改善病人的預後效果。然而，還需要今後兩個團隊的國際合作密切配合。



過程 - 張育郡

7月23日(一) - 小鼠骨髓抽取技術

◇ 過程：今天主要是跟在博士班生 Katarina Forgacova, M.Sc 身邊學習，以乙醚暫時迷昏老鼠後，在以斷頸方式做犧牲，由老鼠腳的末端剪一刀，並撕開其外皮後，去除包覆大腿骨(femur)外的周邊肌肉組織，並以扭轉方式取下大腿骨後，將其周邊肌肉組織剔除乾淨，於一端剪一點開口，在以針吸生理食鹽水插入開口，並沖出骨髓，若怕濺出，可稍以試管蓋口壓住反覆吸沖，直到大腿骨變為乳白色即可。看似簡單步驟卻涵蓋其學問與熟練技巧，例如周邊肌肉組織剔除不太乾淨，或是在扭轉大腿骨時，不小心將大腿骨扭斷，且要靈活運用手術器械，此技巧也是必須充分練習。看著操作員做的如此迅速，但上陣操作的我們卻花不少時間在剔除周邊肌肉組織上，還有如何夾緊大腿骨做沖骨髓動作。

*Katarina Forgacov, M.Sc 告訴我們抽完 A 老鼠的骨髓後，將打入 B 老鼠體內，並且依天數觀察。

7月24日(二) - 小鼠血液幹細胞的移植

◇ 過程：今天與 Katarina Forgacov, M.Sc 學習移植(transplantation)，先將 A 老鼠的骨髓取出後，計數完細胞後，取 2×10^6 顆細胞溶於 0.5 毫升的生理食鹽水中，再用 29G*1/2", 0.3*13mm 的針頭注射到小鼠眼球之中下方。注射時，需注意老鼠的狀況，若快甦醒時，就再用乙醚使其短暫昏迷，不然注射速度就得加快，避免增加老鼠的不舒服感。實驗過程中，皆須專注，避免傷害到老鼠，進而使免疫作用發生，造成數據的誤差。

7月25日(三) - 準備明天的演講

◇ 過程：經過張格東老師指導，一對一的教學，反覆練習與修飾詞彙。另外，又去觀察打入骨髓之老鼠，其解剖後所觀察到的結果。不斷重複練習雖然可以增進基本專業術語，但還是會怕臨場反應無法對答如流。為了避免自己對於佳玲學姊所研究的 Notch 不夠熟悉，所以稍微將手頭現有可消化的資料稍加複習一下。再來我也針對自己即將報告的內容：關於中藥對於造血的效能是否能與環磷氮芥的效能一樣。(例如：當歸、雞血藤、枸杞等)，等資料，著手分析，並盡可能選取較符合的中草藥著手，作為下一個研究的目標。



*Katarina Forgacov, M.Sc 告訴我們，這是之前 B 老鼠藉由眼窩注射方式，打入 A 老鼠的骨髓後，所呈現的結果。可以明顯看到帶有螢光蛋白的 A 老鼠骨髓在 B 老鼠體內的分部，其因是啟動子表現過強的緣故，也可以證實幹細胞移動至骨髓。

✚ 7 月 26 日(四)－學術交流報告與參觀鼠房儀器與操作流程

- ◇ 過程：(1)相互討論學術研究，傾聽建議並加以改善或是加以查詢其他論點。
(2)介紹鼠房專業級設備與作業流程，此過程可以幫助我們思考在飼養實驗老鼠上有需要改進的地方。

首先，張格東老師先以地球→台灣→屏東科技大學的方式，講解學校位於台灣的位置，進而將屏東科技大學的學習環境加以介紹，並誠心邀請在座的學者有機會也可以來屏東科技大學生物科技系上演講，再來輪到佳玲學姊報告「Making A Transplantable HSCs That Are Customized for Patients By Ectopic Induction Of Notch Signaling」，學者們提問，這些寶貴的問題皆幫助我們朝實驗更細微的方面做思考。待報告結束後，我們隨即參觀查理士大學的鼠房，進入鼠房需注意的事項（例如：需著實驗衣、穿戴鞋套），以及一間鼠房介紹，例如：不同品系的老鼠皆放於不同鼠房區分開（P2 的飼養室），且每一鼠房皆備有針頭、手套、酒精等耗材，以及老鼠都養在隔離箱中，並有專門的無菌操作隔離台用以清理鼠籠及操作實驗，送進去使用的器械與墊料飼料皆須要先滅菌後，再送進隔離箱系統中使用等），清洗室流程介紹，滅菌室介紹等。查理士大學的鼠房非常專業，皆由獨立操作流程與注意事項且完全遵照所定的 SOP 進行。

✚ 7 月 27 日(五)－血液幹細胞的移植技術(以生理食鹽水代為血液做練習)

- ◇ 過程：(1)學習移植可以幫助我們在進行相關實驗時，可以有另一個操作技術的選擇機會。
(2)準備第二次學術交流進度報告，以助於對方瞭解我們在台灣的實驗進度狀況（環磷氮芥誘導髓外造血對周邊血液與脾臟、骨髓的血液組成的影響），並提供些意見與思維，有助於我們未來實驗的進行。先進行前幾天操作的抽骨髓，將 A 老鼠的骨髓抽出後，再以眼窩注射的方式，打入 B 老鼠裡，觀察第 1、2、3、4... 等天的生理變化狀況。學習移植的過程，難免會不小心讓老鼠眼睛流血，或不小心戳瞎牠眼睛，所以要謹慎小心操作，盡可能在其短暫昏迷時，找對其位置並且快速準確的注入取代練習品生理食鹽水。最後抓住手趕後發現，其實這技術並不難，但需克服內



心恐懼，並且要非常專注在操作實驗鼠上，切勿在老鼠醒過來時，還硬要注入，這樣對老鼠的傷害會更大。

✚ 7月30日(一)－實驗結果討論

- ◇ 過程：今天與Professor Načas報告關於利用環磷氮芥誘導髓外造血對周邊血液與脾臟、骨髓的血液組成的影響。並針對此篇文獻(Role of the Spleen in Cyclophosphamide-induced Hematosuppression and Extramedullary Hematopoiesis in Mice) (Yuli Wang et.al.,2009, Archives of Medical Research)所使用的抗體CD34⁺與CD117⁺去標的血液細胞，但Professor Načas建議我們使用CD45⁺做標的來篩選出血液幹細胞。

✚ 7月31日(二)－利用各種抗體去標的血液細胞，使用流式細胞儀分析

- ◇ 過程：此實驗協助我們認識流式細胞分析儀(Flow cytometry)內部構造，並瞭解其原理，最重要的是BD FACS Canto II與FACScan Becton Dickinson差異，一面操作一面解說流式細胞特性與其調整注意事項，再以實際樣本(小鼠血液)，解說其正確調控方式。例如：先根據Accuri Fixed Voltage PMTs and Expanded Dynamic Range範本，調整X軸(FSC)與Y軸(FSC)的方式使其為線性，再以X軸(FSC)與Y軸(SSC)的方式呈現完整的圖，再分別去選取抗體CD45⁺位於圖上的哪一區，在將染上碘化丙啶的細胞界定去除後，最後得到的細胞群就是我們所要的細胞。但因其細胞群中還含有其他的細胞，例如單核球細胞群中含有少數淋巴球細胞或是顆粒球細胞，所以此篇範本僅能大約得知各細胞群位於分析圖中的哪個位置。所以Ludek Sefc, Ph.D建議我們多染些別的抗體以輔助我們正確區分各個細胞群，例如：單核球細胞群(CD33、CD13、CD14、CD15等)、淋巴球細胞群(CD3、CD4、CD8、CD16、CD19、CD56等)、顆粒球細胞群(CD11 α 、CDw12、CD24、CD32)，細胞碎片等。因為過程中皆以英文做解說，對於英文不是很流利的我，在聽力部分有些吃力與跟不上腳步，只能擷取自己聽懂的部分去拼湊大概意思。

✚ 8月1日－細胞計數、 γ 放射線的利用、利用EdU上FACS分析細胞週期

- ◇ 過程：跟著Petr Páral與Nico學習如何操作注射環磷氮芥後，再以鈷60- γ 放射線破壞小鼠骨髓，經由不同的天數，以流式細胞儀跟抗體標定，來觀察血液幹細胞增生的情形。從中實驗過程中瞭解他們所使用的抗體之用意。其實這兩位學者Petr與Nico講解很仔細，也很有耐心教導我們，如果依他們



的學位算一算，也沒差我多少歲，但他們所做的實驗確讓人很放心，未來我能獨當一面嗎？也能讓老師認同我所做的實驗具有意義嗎？其實我不是很確定，但目前我所知道的，就是有非常大的空間需做努力，努力填滿基本知識，努力地將整個實驗操作邏輯與所得的數據加以分析與思考其數據所告訴我們的結論為何！

✚ 8月3日(五)－脾臟摘除並使其變成單一細胞、眼窩採血

- ◇ 過程：使用研磨儀器，將解剖出的脾臟取出丟入特殊玻璃搗碎器材內，並加入白蛋白與生理食鹽水混合液，使其細胞容易存活。此器械於台灣買不到，所以以撥片仿效，難達此效果，坊間的細胞搗碎機又不便宜，所以此方式我們還需回國後再想辦法解決，或是在國外訂製一個之類的方式取代，其器具研磨出的細胞，細胞死亡率低，且可以達至任何臟器變為細胞，很方便使用，且花費少。另外，Martin 示範如何以毛細管做眼窩採血技術，先將老鼠以乙醚迷昏後，將毛細管壓於老鼠眼睛周圍，並稍微旋轉，此時血液和管壁之間的附著力大於血液本身內聚力時，就會產生毛細現象，進而將血液由老鼠眼窩中吸出來。

✚ 8月7日(二)－流式細胞分析（骨髓），如何界定細胞群

- ◇ 過程：透過腹腔注射環磷氮芥此抗癌藥物，用流式細胞分析儀（BD FACS Canto II）來檢測第 1、3、7 等天此老鼠體內的生理變化，以眼窩採血方式，收集周邊血液並去除紅血球做分析，再犧牲老鼠取出大腿骨抽出骨髓與取出脾臟並磨碎，各染上抗體做分析。這次實驗是做大約 7 天後的觀察，方法皆是我們在這其間所學的，如抽骨髓、數細胞、眼窩採血、染抗體等。一步步的複習，讓我們對此技術更加熟練一些，也對實驗流程比較熟悉，雖然結論跟前七天一樣，建議我們多使用一些抗體，例如： $c\text{-kit}^+$ 、 $Sca1^+$ 、 $CD150^+$ 、 PE 、 $CD48^+$ 等，來幫助自己所圈出的資料能更加正確。

✚ 8月8日(三)－SDS-PAGE 分析蛋白質電泳

- ◇ 過程：今天跟在 Yuzo Fujikura 身旁學習操作 SDS-PAGE，SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) 為變性 (denature) 的蛋白質電泳，可依分子量分離出不同大小的蛋白質成分，其後以 CBR 染色或銀染判讀結果。電泳操作一架設電泳裝置套組，將緩衝溶液倒入電泳槽中，



取下孔梳，分別將處理好的樣品白蛋白各 12 μ l 注入膠內。蓋上電泳槽，連接電極線於電源供應器，調整電壓至 80 V 開始跑電泳約 30 mins，至上下膠體間集膠，後電壓調至 120 V，由追蹤染劑觀察蛋白質泳動情形，接近膠體底部時停止電泳。過程中 Yuzo 與我們分享很多小撇步，例如：固定蛋白質都使用脫脂牛奶、使用封膜機來保存其膠膜等。

✚ 8月9日(四)－學術進度報告

- ◇ 過程：今天與 Professor Načas 報告關於利用環磷氮芥誘導髓外造血對周邊血液與脾臟、骨髓的血液組成的影響。盡量以流利英文表達實驗進度，並且能與對方討論出未來方向。逐一地解說，我們實驗室對於環磷氮芥誘導髓外造血的研究，另外，我們也將我們希望加入中草藥（雞血藤、當歸、阿膠、枸杞等）來與環磷氮芥的化療藥物做比較，是否一樣也能誘發髓外造血作用。我發現，如果英文不是很流利，但事先把要把達的句子背好，再搭配投影片製作的陳訴，其實整個學術進度報告很順利，並沒有想像中可怕與嚴厲。因為教授聽得懂，所以給了我們很多建議，並且也期待我們未來的研究結果。

✚ 8月13日(一)－實驗研究交流會議

- ◇ 過程：今天是由 Petr Páral, M.S. 來報告他的實驗研究內容，題目為 Oscillatory and complex reaction of hematopoietic system after CY injury，我們可以藉由他所做的實驗架構與數據，作為我們將以中草藥來研究造血幹細胞的實驗中的有效參考數據，例如：環磷氮芥對於骨髓的影響結果，並根據這些數據加以衍生到標定抗體的使用模式，例如：Sca1⁺（幹胞表面抗原）、c-Kit⁺（細胞素受體）、CD48（淋巴細胞活化因子）、CD150⁺（淋巴細胞活化因子）等抗體使用的先後順序，與其所代表的含意。



心得

張格東

此行所規劃的目的都非常圓滿的達成，學員們充分地在查理士大學第一醫學院進行他們在專業領域上的學習，也很認真地將學習成果紀錄在實驗紀錄簿上，在語言溝通上學員們也都下定決心未來在英語上要再加強，我非常樂意見到學員在海外實際受到衝擊後對於外語學習的覺悟。我也透過此行將屏科大的國際文宣轉交給查理士大學醫學院的國際事務處，轉達了我們願意在雙方相關系所上未來可以進行更多的實質合作，透過交流得知查理士大學每年固定會與台灣進行交換學生，我則是建議屏科大華語文中心可以提供捷克中文系學生來台學習，成為雙方邁向交流的第一步。回國後目前我們也正在著手進行雙方的聯絡事宜。

在此感謝教育部與屏科大國際事務處提供我們可以到國外與研究學者進行交流的機會，也感謝查理士大學 Dr. Emanuel Nečas 教授能夠提供我們學員優質教學的課程安排以及妥善的生活照顧。

陳佳玲

在布拉格的一個月，要是沒有查理士大學第一醫學院人類病理生理學研究所前所長 Emanuel Nečas, M.D., Ph.D 教授的熱情邀約，我想我們這趟旅程也不會那麼充實豐富。也因為 Nečas 教授的安排，讓我們很有進度地跟隨他們的實驗血液學中心團隊的成員學習，如流式細胞儀的原理及操作應用、造血幹細胞的萃取分選及移植、抗體標的及分析、蛋白質電泳操作與蛋白質抗體標的技巧...等。甚至替我們安排團隊成員都有空的時間，讓我們可以互相分享彼此的研究計畫及成果。也很感謝實驗血液學中心團隊的成員，從教師 Ludek 和 Yuzo，到碩博士班的學生 Katarina、Petr、Nico，技術員 Martin、Filipp，還有博士後研究助理 Yana...等，雖然我們的英文不好，但是他(她)們每個人都很耐心的教導我們，不厭其煩的重複講解到我們懂為止。

除了實驗上的幫助，在生活上他們也樂於分享他們所知道的訊息，介紹一些好玩的景點給我們參考，還有帶我們一起體驗他們的香檳生日派對，及品嚐道地的捷克美食...等。這些美好的體驗及感動，都將成為我這趟旅程中，最重要的回憶。

除了學習外，在這段期間獨自走晃異國城市的經驗，也是一個重要的回憶。漫步在異國街頭上的悠閒及從容，市集中人與人誠信的交易，搭乘運輸工具時對陌生人慷慨的幫助...等，都是有別於台灣的另一種文化，暫且不論對與錯，但是在布拉格城市生活，給了我台灣自己獨立旅行時，都沒有過的感受，很熱鬧但又不擁擠，很從容但又很充實。

這段旅程給了我一個很正面的衝擊，第一次這麼深切的體會到學習語言的重要性。在學校，教材或課堂成績的打擊都遠不及實際經驗的衝擊，語言不對，就



易產生不同文化上錯誤的見解，造成溝通的障礙。我想回到台灣，我得趁還沒出社會前，多利用學校提供的資源增進自己的國際語言才行。也因為這次的經驗，讓我體驗到未來還有更多的選擇性，而不再那麼狹隘。

也很感謝教育部跟國事處的幫助，讓我們才得以有這個機會，可以出去增長自己的見聞。也感謝指導老師張格東老師的帶領，讓我們這趟旅程中才得以平安順利。

張育郡

非常感謝查理士大學醫學院人類病理生理學研究所前所長 Professor Načas 教授熱情的幫助與指導，以及我的指導教授張格東老師，為我爭取的難得機會，還有與我同行的學姊陳佳玲，因為他們的幫忙與協助我才得以出國至捷克，並順利進入該研究所設有的實驗動物血液學研究試驗中心實習。此血液學研究試驗中心擁有最先進的實驗設備以及專業的技術人員，因各個分析的面向不同，所以中心內的專業實驗室與負責的技術員也有所差異，例如：流式細胞儀的研究室、分析蛋白質表現的實驗室、實驗輔助技術人員等。

在這不到一個月的實習過程中，從跟隨幾位博碩士 Katarina、Yana、Petr、Nico 與技術員 Martin、Filipp 等，學習一些經驗與技術，例如血液幹細胞移植、眼窩採血、抽骨髓等；Ludek 教授特別指導我們如何 Gating 細胞群；Yuzo 博士也特別指導我們 SDS-PAGE 等，這些都是經驗之談與分享，而我從中感受到人情的溫暖，每個人都非常耐心地指導，並且也都非常樂意解答我們任何問題，以及與我們一起同桌慶祝特別的節日，例如：Professor Načas 生日、歡送會等，還有帶領我們在當地享用最平價的在地美食，這些種種都成為我最美好的回憶。在這的各種研究數據，因有了這些專業技術人員，得以順利進行並發表，雖然在台灣的實驗室裡我們沒有專業的技術操作人員，但我們會將在此學習到的技術，應用到未來的實驗中，並期許能夠如期發表我們的專題內容。

學習過程中有受挫也有歡樂之時，這些受挫的經驗將會成為下一步的規劃目標，另外語言的選修也相當重要，處處都是國際語言，每個大學畢業生，至少都會三種語言，這也警惕我還有許多學習的地方需要再做加強，未來是國際化，講就專業化以及語言上的溝通，如果不多加強，就算有再好的技術，也很難與對方交流；反之，就算語言再好，技術與學術不足，也很難在這領域有所成就。在這，我也期許自己，眼光要放遠一些，才能看到自己的不足之處，以及未來所需要的專業技術人才。

特別在此感謝教育部所提供的幫助，讓我的實習能更加圓滿成功、屏科大國際事務處所提供的寶貴資訊，也感謝這趟旅途所遇到的任何一人，因為有你們，使我的學習旅程更加地豐富，也使我面對任何的問題時，能夠轉換思考來解決。



建議

- (1) 國外實驗室雖然都有電腦可查詢資料，但會因當地語言不同(例如:捷克-捷語)，而電腦內件具備的語言也有所不同，在操作編輯上常遇到障礙。所以誠心希望學校可以提供一台具備圖片編輯與檔案資料編輯等多功能，且使用性佳的筆記型電腦，借予想申請出借筆記型電腦的同學方便使用。
- (2) 國外給予各實驗室的補助非常優渥，希望學校也能多撥些預算在實驗室的研究經費上。不管有無國科會的津貼，學校的補助多少對每間實驗室皆有不小的貢獻，甚至能幫忙很多計畫快速進行且順利完成。
- (3) 此次出國決定倉促，希望在訂定計畫案結果公布的時間，可以再提前兩個月，因為此次是五月底公告，但是我們預定七月初就要出國。這短短一個月的時間，剛好又卡一個期末考，其實準備時間非常緊促。假如在提前一個月公告，我們就可以多一個月的時間去準備必要的證明文件，以及更多的時間可以思考我們去國外時，可以向對方怎麼介紹台灣。對於國際文化的交流有更正面的效果。



Photographs

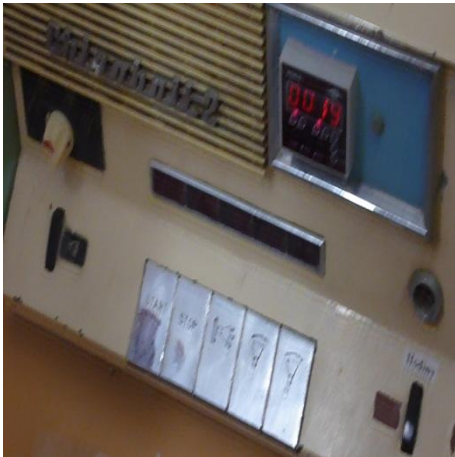
實驗動物房



用來關準備照射鈷-60 老鼠的盒子



鈷-60 γ 射線照射儀



鈷-60 γ 射線照射儀操作面板



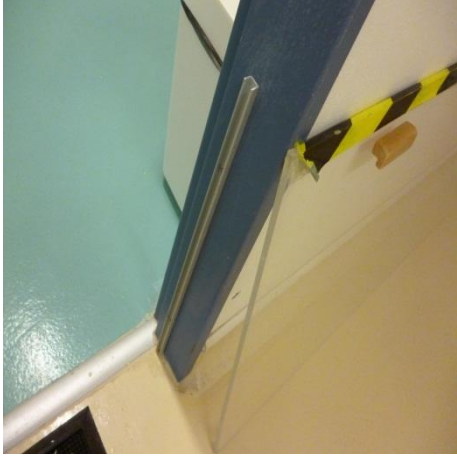
SPF 鼠房中的無菌操作隔離台



無菌鼠房中的無菌操作隔離台，裡面為獨立飼養隔離箱系統



P2 負壓動物飼養室



鼠房門口的塑膠板，防止老鼠逃出



實驗動物房中操作環磷氮芥注射實驗

🐛 實驗室儀器設備



BD Aria II 流式細胞分選系統(FACS)



Bayer ADVIA60 全自動三分類血球細胞分類計數儀



Eppendorf 5804 多功能高速離心機



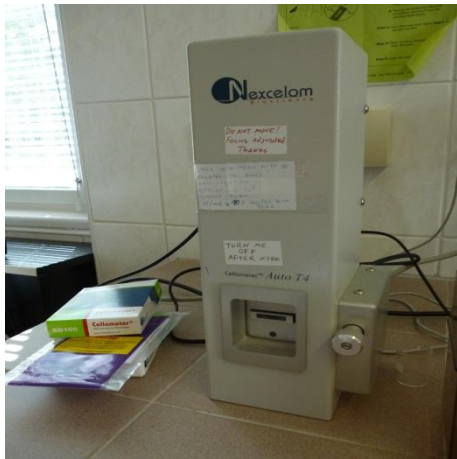
滅菌釜



Eppendorf 化學抽氣櫃



Eppendorf RNA 核酸自動萃取系統



Nexcelom Cellometer *AutoT4* 進行自動
細胞計數



Autoflex II mass spectrometer 蛋白質分
析儀



Autoflex II mass spectrometer 蛋白質分
析儀專用降溫壓縮機



Labnet 乾浴槽



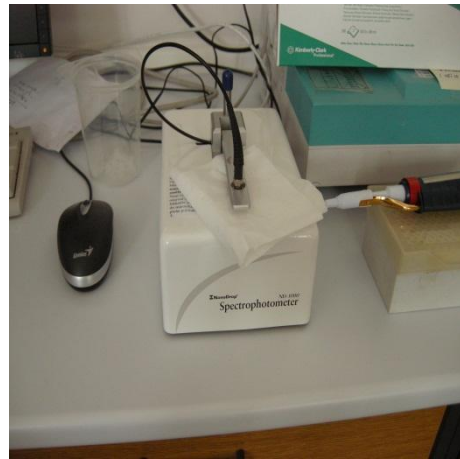
Agilent 2100 Bioanalyzer



實驗動物隔離操作台



左：Biometra WT 16 震盪板
右：BIO-RED iCycle real-time PCR



NanoDrop ND-1000 分光光度計



BD FACS Canto II



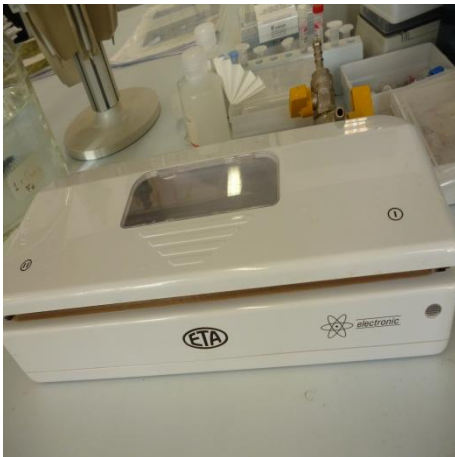
BD FACS Canto II



蛋白質萃尿管柱



Unicam SP 1700 UV 分光光度計



蛋白質膠片密封機



Stuart 控溫搖晃培養箱



Tecan HydroFlex microplate washer



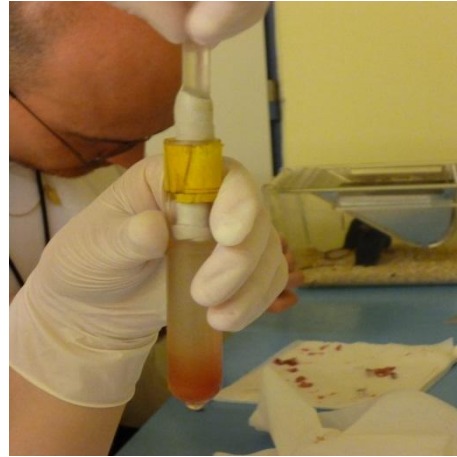
Sterilab 蒸氣滅菌釜



實驗室實驗器材



拋棄式細胞計數玻片



組織研磨器



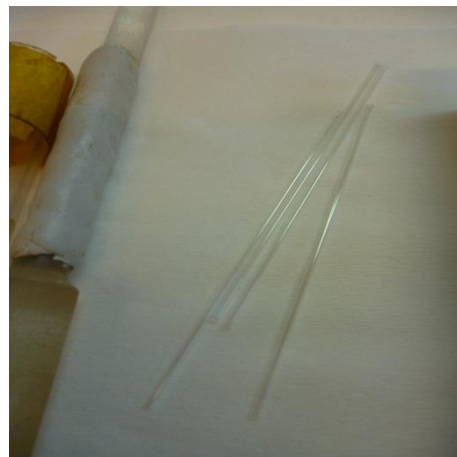
組織研磨器



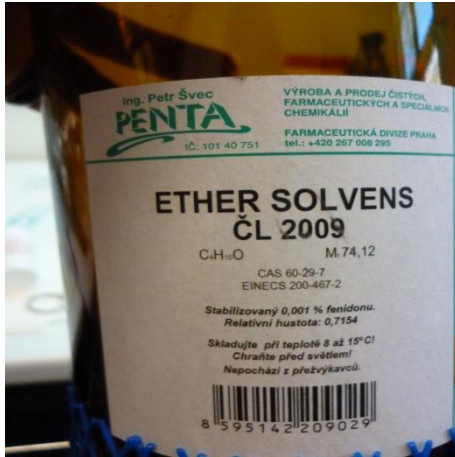
毛細管



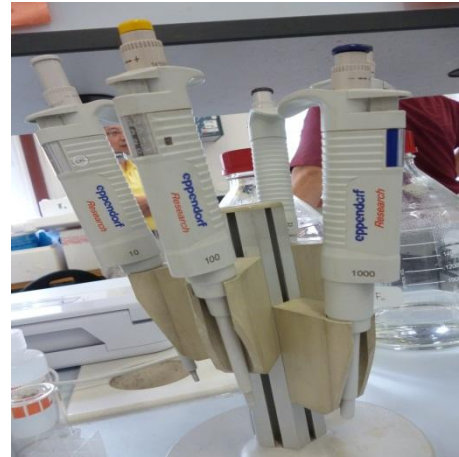
毛細管



毛細管



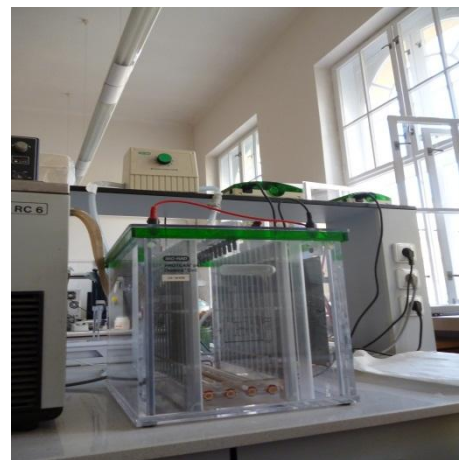
乙醚



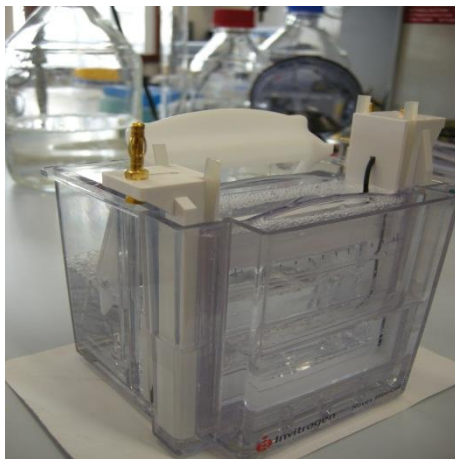
Eppendorf pipetman



紅外線感溫自動震盪儀



大型蛋白質電泳槽



小型蛋白質電泳槽



血液細胞抗體，依不同顏色標的分類



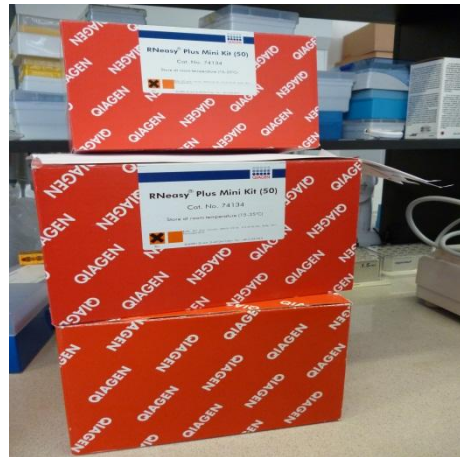
Eppendorf 自動定量吸取 pipette



Eppendorf 八爪電動 pipette



多功能轉子



QIAGEN 小量 RNA 萃取試劑套組

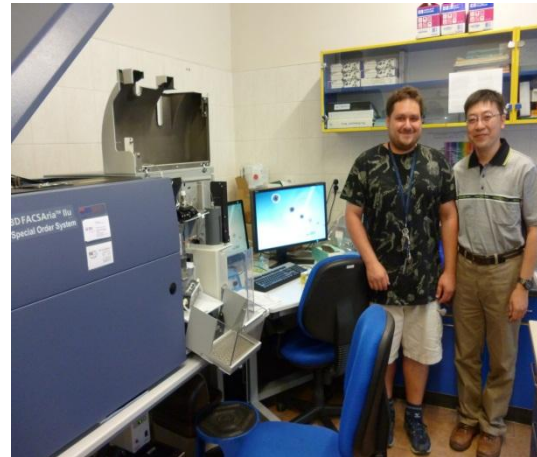
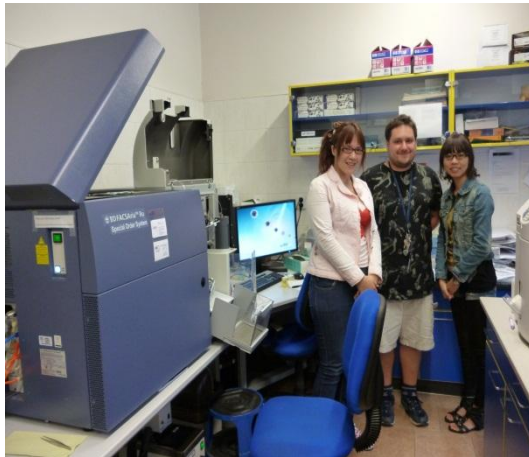


實驗動物的手術器械

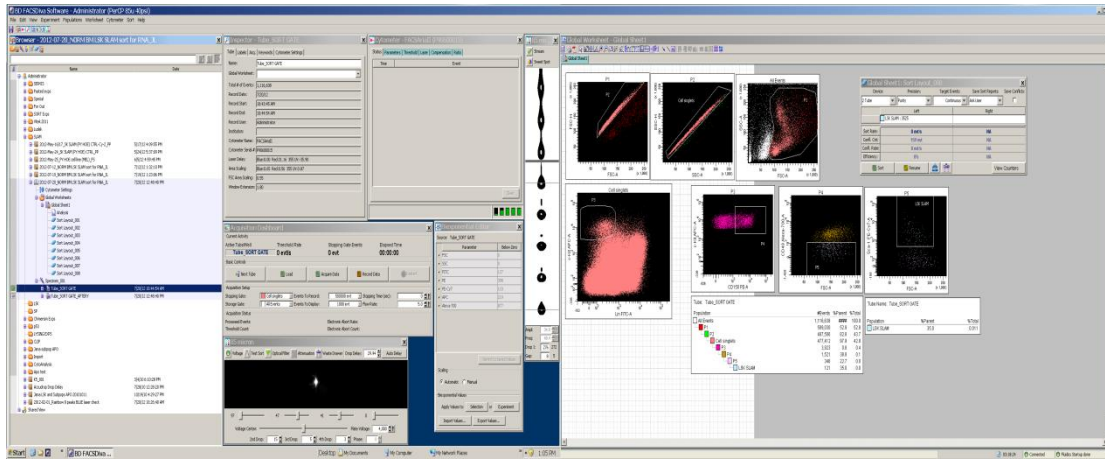


固定動物的釘板

實驗操作



Filipp Savvulidi, BSc 為我們講解 BD FACSAria II



BD FACSAria II 的操作介面

Archives of Medical Research

ORIGINAL ARTICLE

Role of the Spleen in Cyclophosphamide-induced Hematosuppression and Extramedullary Hematopoiesis in Mice

Yuli Wang,^{1*} Qinggang Meng,^{1*} Haiquan Qiao,² Hongchi Jiang,² and Xueying Sun¹

¹The Hepatobiliary Surgery Center, Department of General Surgery, The First Clinical Medical School of Jinan Medical University, Jinan, China
²Department of Organized Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of Jinan Medical University, Jinan, China

Received for publication September 8, 2008; accepted March 25, 2009 (ARCHIVED 10 DECEMBER 2009); published online June 2, 2009.

Background and Aim: Extramedullary hematopoiesis (EMH) is induced in spleens due to various diseases. The aim of this study is to investigate the role of spleen in cyclophosphamide (CTX) induced hematosuppression and EMH in mice.

Methods: Balb/c mice were IP injected with 300 mg/kg CTX 2 weeks after splenectomy or sham operation and randomly sacrificed 1, 3, 7, 14, and 21 days after injection. Blood samples were collected, and spleens were weighed, histologically analyzed, and then used for flow cytometry.

Results: There were significant differences in white blood count, red blood count, platelet numbers and hemoglobin concentration between the splenectomized and sham-operated mice after CTX injection. The cellularity of the spleen was reduced 3 days following CTX treatment but then rose 7 days after CTX treatment. The numbers of colony-forming units in the spleen reached a peak 7 days after CTX injection, then declined. Flow cytometry demonstrated the percentage of CD34⁺ and CD117⁺ cells in the spleen increased 7 days after CTX injection, indicating the hematopoietic stem and progenitor cells in the spleen.

Conclusions: The study indicates that EMH occurs as a compensatory reaction to CTX-induced hematosuppression in the murine spleen, implying that conservation of the spleen may promote the recovery of cancer patients from chemotherapy-induced hematosuppression. © 2009 BMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Spleen, Extramedullary hematopoiesis, Cyclophosphamide, Hematosuppression.

accuri

A Flow Cytometer with Fixed Voltage PMTs and Expanded Dynamic Range Simplifies Collection and Analysis of Complex Cell Populations

Introduction: Due to the wide variations in fluorescence and light scatter signals, cells with different levels of expression of a given marker are often lost in the background of other cells. This is especially true for cells with low fluorescence intensity. The Accuri C6 flow cytometer has a fixed voltage PMT system that provides a linear relationship between fluorescence intensity and signal. This allows for the detection of cells with low fluorescence intensity. The Accuri C6 flow cytometer has a fixed voltage PMT system that provides a linear relationship between fluorescence intensity and signal. This allows for the detection of cells with low fluorescence intensity.

Materials and Methods: Human peripheral blood mononuclear cells were analyzed on the Accuri C6 flow cytometer. The cells were stained with FITC-conjugated anti-CD34 antibody and PE-conjugated anti-CD117 antibody. The cells were analyzed on the Accuri C6 flow cytometer. The results are shown in the flow cytometry plots.

Results: The flow cytometry plots show the distribution of CD34⁺ and CD117⁺ cells in the spleen. The plots show that the number of CD34⁺ and CD117⁺ cells in the spleen increased 7 days after CTX injection, indicating the hematopoietic stem and progenitor cells in the spleen.

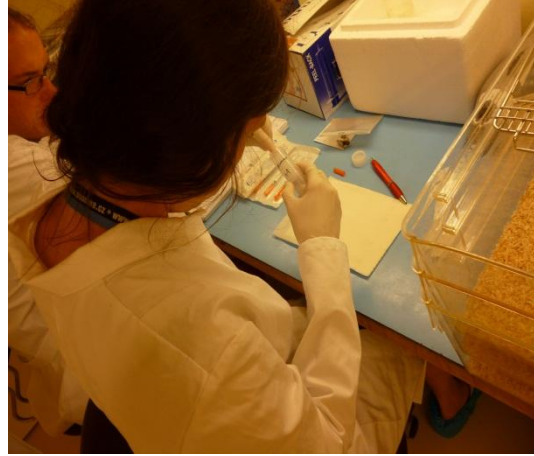
Conclusion: The study indicates that EMH occurs as a compensatory reaction to CTX-induced hematosuppression in the murine spleen, implying that conservation of the spleen may promote the recovery of cancer patients from chemotherapy-induced hematosuppression.

Professor Nečas 要團隊人員預讀有關 Notch 的文獻

利用不同的抗體去標的不同的血液細胞，以應證此篇期刊(Accuri Fixed Voltage PMTs and Expanded Dynamic Range)的正確性



鈷-60 γ 射線照射



骨髓移植



骨髓移植



移植結果圖，GFP 基因強烈表現在肌肉



實驗研究交流會議



1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

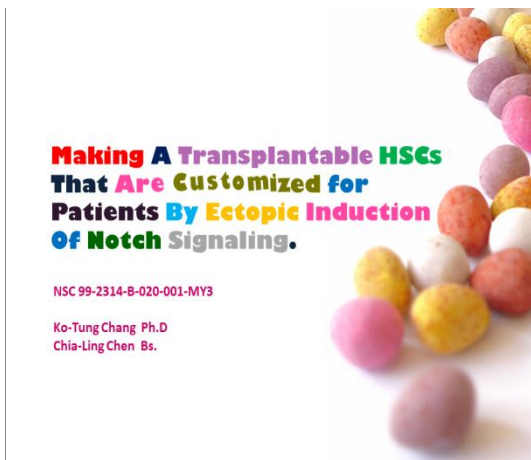
NPUST, located on a hillside in northeastern Neipu Township in Pingtung, occupies 285 hectares adjacent to Da-Wu Mountain and Dong-Gang Creek with the largest and most beautiful campus in the nation.



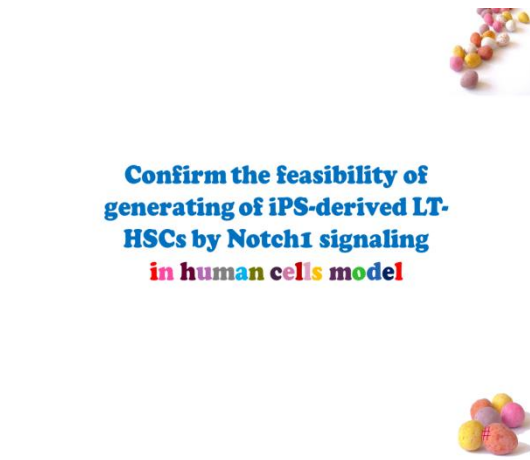
實驗研究交流會議-介紹屏科



實驗研究交流會議-介紹張老師實驗室



實驗研究交流會議-計畫題目



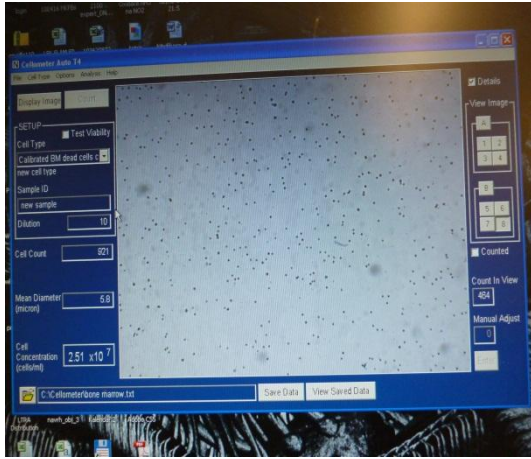
實驗研究交流會議-未來工作



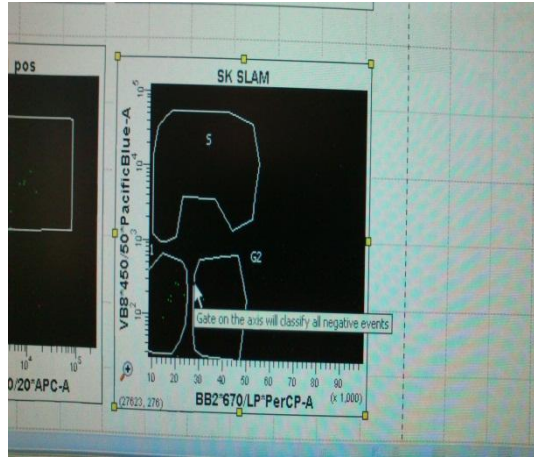
腹腔注射環磷氮芥



抽大腿骨髓



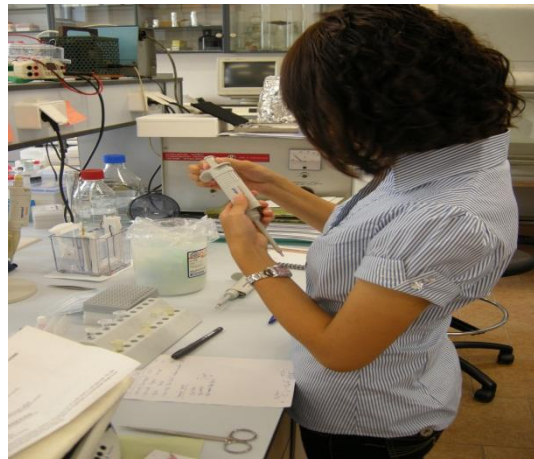
自動細胞計數器操作介面



流式細胞儀界定結果圖



操作 FACS Canto II 來分析血液幹細胞群與 Dr. L. Šefc 合影



操作 SDS-PAGE



操作 SDS-PAGE



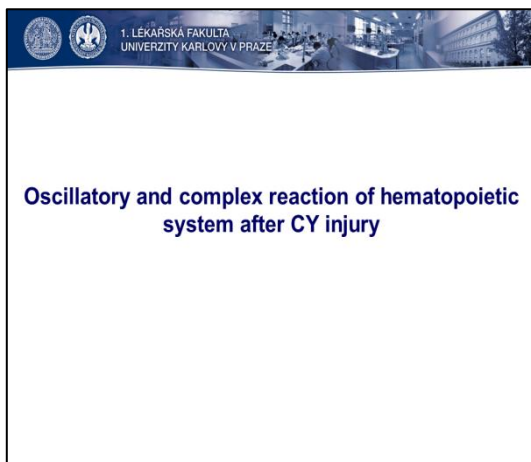
操作 SDS-PAGE



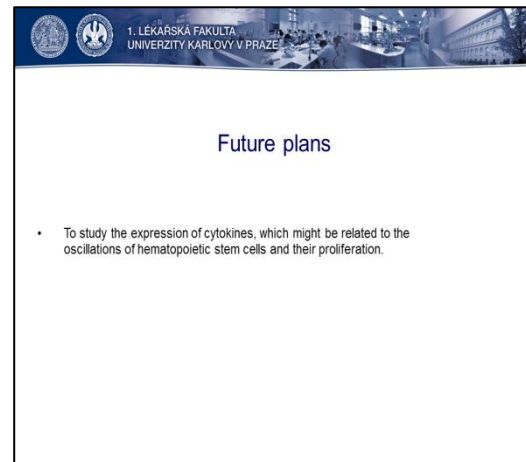
操作 SDS-PAGE 取膠



操作 SDS-PAGE 封膜



實驗研究交流會議 Petr 的演講題目



實驗研究交流會議 Petr 未來工作

👉 文化交流





右起 Dr. Sefc, 張老師與 Dana (助佐)



右起 Prof Nečas, 張老師與 Dana (助佐)



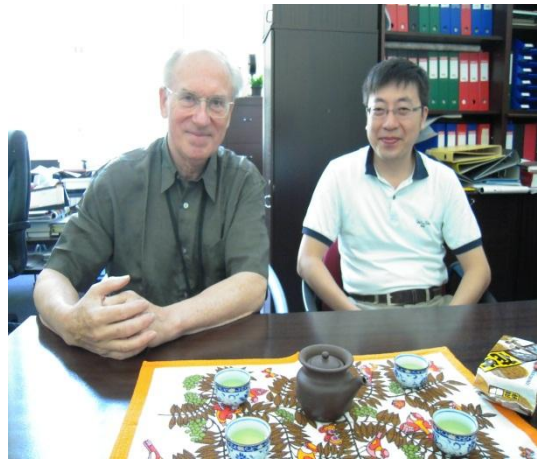
在 Prof. Nečas 辦公室進行會報後留影



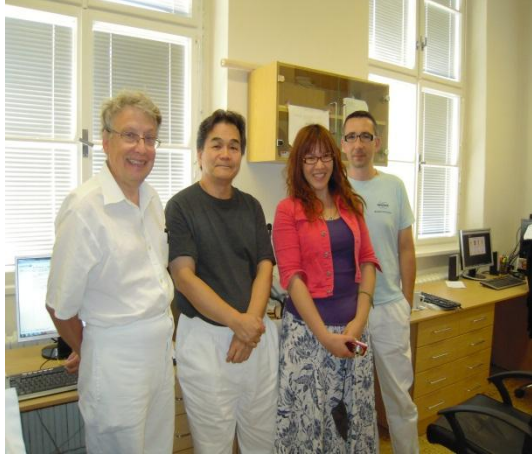
與 Prof. Nečas 家人聚餐合影



Dr. Y. Fujikura 與張老師合影



Porf. E. Nečas, MD.Ph.D 與張老師在辦公室合影



與 Dr. J.Krijt, Dr. Y. Fujikura and Dr. Petr
Přikryl 合影



由左至右分別為陳佳玲，Katarina, Petr,
Jana 與張育郡



Jan Jivny, M.D. Ph.D 與張老師合影



與 Prof. Nečas 夫婦合影



附錄

查理士大學學生證

Univerzita Karlova v Praze
Charles University in Prague

Foreign student

Narozen/a:
31.8.1989

Jméno:
Chia-Ling Chen





93634754

Valid until:
15.8.2012


GPJTMPT

Univerzita Karlova v Praze
Charles University in Prague

Foreign student

Narozen/a:
4.2.1990

Jméno:
Yu Chun Chang





75536697

Valid until:
15.8.2012


MTNQQSJ



張格東老師帶領陳佳玲與張育郡同學出國研習的國外邀請函



CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
1st MEDICAL FACULTY
INSTITUTE OF PATHOPHYSIOLOGY

U Nemocnice 5, 128 53 PRAHA 2, Czech Republic
Head: Prof. Emanuel Nečas, MD. DrSc.

Ko-Tung Chang, Ph.D.

1, Shuefu Road, Neipu, Pingtung 912, Taiwan

Dear Dr. Ko-Tung Chang,

I was pleased to hear that you, **Ms. Chia-Ling Chen** and **Ms. Yu-Chun Chang** could visit the Charles University in Prague and stay with us for four weeks to discuss and execute our research work. You are welcome to come and I am sure that we will have fruitful discussions and exchange of experiences.

During your visit to Prague from July 18 till August 14, 2012 you can stay in our house on the address: U Rysanky 8, 147 00 Prague 4.

Sincerely yours,

Emanuel Nečas, M.D., Ph.D.
Professor and Head

In Prague 3/7/2012



陳佳玲與張育郡同學在捷克查理士大學的教務處註冊單(暑期研習)



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. lékařská fakulta
Děkanát - Kateřinská 32, 121 08 Praha 2

V Praze dne 19. 7. 2012

POTVRZENÍ

Děkanát 1. lékařské fakulty UK potvrzuje, že studentky:

příjmení, jméno	místo a datum narození
Chang Yu Chun	Tchaj-wan, 04.02.1990
Chen Chia-Ling	Tchaj-wan, 31.08.1989

byly dne 19.7. 2012 zapsány jako studentky 1. LF UK na měsíční stáž.


Jana Parkanová



Odd. pro vědeckou činnost a zahraniční styky
1. LF UK v Praze
tel.: 224 964 372
email: jana.parkanova@lf1.cuni.cz



陳佳玲與張育郡同學的暑期研習成績單證明



CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
1st MEDICAL FACULTY

INSTITUTE OF PATHOPHYSIOLOGY

U Nemocnice 5, 128 53 PRAHA 2, Czech Republic
Head: Prof. Emanuel Nečas, MD, DrSc.


Tzou-Chi Huang, Ph.D.
1, Shuefu Road, Neipu
Pingtung 912, Taiwan

September 10, 2012

Dear dr. Tzou-Chi Huang,

This is to certify, that Ms. Chia-Ling Chen and Ms. Yu-Chun Chang have completed a practical training course (four weeks, July 18 till August 14, 2012.) aimed at the cellular and molecular biology. The course included performing experimental bone marrow (stem cell) transplantations, FACS analyses and sorting of blood and marrow cells, Western blotting of the hemojuvelin protein in liver tissue extracts and some other methods. They also reported about their own research.

According to our grading system they both passed the course at an excellent level corresponding to A+ or 95-100% performance.


Emanuel Nečas, M.D., DSc
Professor of Pathophysiology
Head of the Department

Charles University
1st Faculty of Medicine
Department of Pathophysiology
U nemocnice 5, 128 53 Praha 2
Czech Republic

Tel.:
+420-2-2496 5901

Fax:
+420-224 965 916

VAT No.:
001-00216208

e-mail:
patfyz@fl.cuni.cz