

出國報告（出國類別：研究）

研習家禽種原技術與轉譯應用

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

姓名職稱：郭曉芸助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：104年12月5日至104年12月18日

報告日期：105年2月3日

目 次

| | |
|-----------------|----|
| 目次 | 1 |
| 摘要 | 2 |
| 壹、目的 | 3 |
| 貳、過程 | 4 |
| 一、行程 | 4 |
| 二、研習內容重點 | 4 |
| 參、心得與建議事項 | 7 |
| 肆、附件照片 | 10 |

摘要

畜產試驗所已建立畜禽生殖生技開發的良好基礎，並於畜禽幹細胞科技方面業累積相當成果。本計畫擬藉由日本於胚胎細胞、胚胎發育研究技術、抗體製備及重組蛋白質製備等技術平台之經驗，以利本所未來在家畜禽生技產業之發展。本計畫派一名研究人員赴日本廣島大學研習畜禽種源幹細胞基因調控與誘導分化技術，建立未來長久合作關係，提昇並加速本所畜禽生技研發上的能量與成果。廣島大學生物生產學部生物圈科學研究所內免疫生物實驗室由兩名教授主持，古澤修一教授專長於動物疫苗，堀內浩幸教授專長於免疫機制、胚胎細胞分化等方面。本次研習除學習雞胚胎體外培養、胚源細胞初代培養、胚源細胞複製培養及雞隻特異抗體免疫染色等技術外，亦討論未來能藉助堀內教授於動物胚胎細胞培養分化及疫苗製作等方面之技術，加上畜產試驗所於人類疾病之動物模式研究上的經驗，共同研提合作交流計畫與創建雙邊長期合作平台，以期提昇並加速畜產試驗所畜禽生技研發上的能量、成果與國際上之能見度。

壹、目的

畜產試驗所投入畜禽生殖生技的研發已建立良好基礎，在畜禽幹細胞科技方面業累積相當成果。本計畫擬藉由日本於胚胎細胞、胚胎發育研究技術、抗體製備及重組蛋白質製備等技術平台之經驗，以利本所未來在家畜禽生技產業之發展。因此，本計畫赴日本廣島大學研習畜禽種源幹細胞基因調控與誘導分化技術，建立長久合作關係，提昇並加速本所畜禽生技研發上的能量與成果。廣島大學生物生產學部生物圈科學研究所內免疫生物實驗室由兩名教授主持，古澤修一教授專長於動物疫苗，堀內浩幸教授專長於免疫機制、胚胎細胞分化等方面。本次與堀內教授聯繫，希望能藉助在動物胚胎細胞培養分化及疫苗製作等方面經驗，提供研習機會，並將本所技術推廣交流，爭取台日合作計畫之研提與雙邊長期合作平台，以期提昇並加速畜產試驗所於畜禽生技研發上的能量與國際上的能見度。

貳、過程

一、行程：

| 日期 | | 行程 | 訪問研習內容 |
|-------|---|------------|-----------------------------------|
| 12/5 | 六 | 臺南-桃園-日本廣島 | 自本所到桃園國際機場，搭乘中華航空 CI0112 至日本廣島機場 |
| 12/6 | 日 | 廣島大學 | 與堀內浩幸教授會面，確認研習內容 |
| 12/7 | 一 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/8 | 二 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/9 | 三 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/10 | 四 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/11 | 五 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/12 | 六 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/13 | 日 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/14 | 一 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/15 | 二 | 廣島大學 | 至堀內浩幸教授免疫實驗室進行研習試驗 |
| 12/16 | 三 | 廣島大學 | 與堀內浩幸教授及團隊討論研習內容及未來台日合作項目 |
| 12/17 | 四 | 廣島大學 | 與堀內浩幸教授確認雙方共同研提台日共同研究計畫內容與研討會初步內容 |
| 12/18 | 五 | 日本廣島-桃園-臺南 | 自廣島機場搭乘中華航空 CI0113 至桃園機場，再返回本所 |

二、研習內容重點：

郭曉芸助理研究員至日本廣島大學堀內浩幸教授所主持的免疫實驗室研習 14 日，研習第一日堀內浩幸教授介紹實驗室成員與近期相關研究主題做為合作與研習參考(圖 1、2、3)，並安排江崎燎研究員負責本次研習相關指導，實驗室研習內容如下所述。

(一) 胚原細胞培養: primary culture of chicken EpiSCs

1. 培養液配方：Medium

KnockOut DMEM, 20% Knockout serum replacement, 2% chicken serum, 1 mM sodium pyruvate, 1x nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, 1x nucleoside solution, 0.1 mM B-mercaptoethanol, 20 ng/ mL recombinant chicken leukemia inhibitory factor.

2. EpiSC 細胞初級培養：EpiSCs obtaining and primary culture

- (1) 破 stage X 蛋，胚盤朝上，將紙環蓋住胚盤，以剪刀沿紙環邊緣將蛋黃膜剪破，以鑷子夾起紙環(圖 4)。
- (2) 放置於 PBS 中清洗數下以去除多餘蛋黃，將胚盤以微量吸管吸取後，置於 1.5 mL 離心管中(圖 5)。
- (3) 加入培養液後，種植於 STO 飼養層細胞中(圖 6)，培養於 38°C、5% CO₂、3% O₂(圖 7)。

(二) 胚源細胞複製(cloning of EpiSCs)

1. 在懸浮前，將 cESC 以 10 uM p160-Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor 處理 2 小時。
2. 以 PBS 含 1 mM EGTA 與 0.025% trypsin 處理細胞，讓 cESC 形成單一細胞(圖 8)。
3. 讓細胞懸浮在新的 CESM 含 Y-27632，再以 1 cell/ well 種植於 96 well 盤。
4. 解離 6-7 天後，細胞移至 24 well。
5. 重複培養步驟至少 2 次。
6. 複製效率後續以特異抗體免疫染色試驗之 anti-chNanog and Anti-Cvh 抗體測試(請參見研習重點(四))。

(三) 雞隻嵌合體生成 creation of chimera chicken using chicken ES cells

1. 將 cESC 細胞(BPR)以 5000 cells/ uL 懸浮於 DMEM 含 2% 未去補體胎牛血清培養液中(圖 9)。
2. 取 2 uL 懸浮細胞注射入 stage X 的雞隻胚胎(WL) subgerminal cavity 中(圖 10)。
3. stage X 的雞隻胚胎移至含蛋白的替代蛋殼中，以透明透氣帶封起，並以 38.5°C、60 %相對溼度條件下培養 3 天(圖 11)。
4. 再移至新的替代蛋殼 (30-35 g 或更大)，在相同條件下培養至孵化。

(四) 雞隻特異抗體免疫染色試驗

1. EpiSCs 培養 3 天後進行免疫染色試驗(圖 12)。
2. 去除培養液，以 PBS 洗 3 次。
3. 加入 4% paraformaldehyde，室溫下放置 30 min
4. 以 10 mM glycine-PBS 洗 3 次，再以 PBS 洗 2 次。
5. 加 0.1% Triton-X-100-PBS，室溫培養 5 min，再以 PBS 洗 3 次。
6. 加 3% BSA-PBS 室溫培養 15 min。
7. 加入雞隻 Nanog、Cvh 抗體，室溫培養 1 小時。以 PBS 洗 6 次。
8. 加入二抗，室溫培養 1 小時，再以 PBS 洗 6 次。
9. 加入 Mount solution 並於顯微鏡下觀察，可見 EpiSCs 與 STO 細胞核呈現藍色(圖 13)，而僅 EpiSCs 可見紅色 chNanog 抗體呈色(圖 14)。

參、心得與建議事項

- 一、堀內浩幸教授團隊有系統性針對 EpiSCs 研究，已得許多成果，同時已朝將 EpiSCs 分化為生殖細胞的方向前進，過程中遇到與預期狀況不同處，去探究家畜與家禽基因調控機制的差異而針對實驗物種調整實驗方法，並從中取得實驗物種調控蛋白專利。這些對一研究主題的設計、解決方案及產出的構思，值得我們效法與學習。
- 二、堀內教授實驗室成員有一名研究員，三位碩士研究生、八位大學部學生，這些實驗室成員均經過良好的訓練，積極與堀內教授討論實驗操作、原理及實驗設計部分的問題，堀內教授對於學生的提問均詳盡說明，亦提供參考資料讓學生能自行再精進，亦會親自示範教導實驗方法與注意事項。
- 三、短期出國研習可一窺國外新穎技術面貌，亦對於雙方進行國際合作有實質助益，回國後的信件聯繫亦不可中斷。另可利用參與國際研討會的機會，再次面對面對談，可助於長期保持合作交流的密切關係。
- 四、堀內教授與古澤教授實驗室有多名外國成員，在以英語溝通與指導上無障礙，教授亦歡迎我方研究同仁至廣島大學進行研究或進修，將更有利於合作計畫運作的密合度，除了我方研究同仁能帶回更完整的技術，雙方也可擴大長期合作空間。
- 五、目前日方針對胚胎細胞的研究尚未擴及日本當地雞隻品種，但未來勢必也要朝此方向進行，找出各方向應用中最適雞種，增加家禽胚胎細胞利用效率，更建議我方亦能採用菜鴨和鵝的胚胎細胞，不同物種間與品種間各有相似與相異之處，均為研究的好題材，亦能開發不同應用性，幫助各產業的發展。
- 六、除了技術學習，堀內教授願意提供專利蛋白及雞隻特異抗體等實驗材料，供畜產試驗所研究使用，唯須正式向廣島大學提出交流實驗材料之申請，才可完成。此

案已與廣島大學負責單位聯繫，取得申請說明與申請書，經填妥合適並經核示後即可向日方申請實驗材料交流案。

七、未來希望邀請堀內教授來台參訪並舉辦研討會，分享家畜禽胚胎細胞、遺傳基因工程等方面的研究發展與應用，面對面解答各研究人員的研究及實驗規劃上的疑問與交流。國際合作交流是畜禽生物技術的研究發展的趨勢，亦為提升全球化的競爭力的契機，藉國際研討會有助於迅速掌握了解全球相關主題研究的進展，亦為與外國學者交流的好時機，帶來新的研究創意，同時提高我國相關研究成果的能見度，將有助於技術交流、新科技學習與爭取參與國際群體合作計畫的機會。

八、未來合作方向與方式討論：

在日本廣島大學研習完成，針對雙方的家畜禽資源與核心技術均有深入的了解，並在檢討的座談會中提出未來合作的議題：

- (一) 台日雙方本地多樣雞隻品種在研究上的嘗試與應用，胚胎細胞取得、長期培養、生殖細胞分化、外源基因轉殖等，均可利於嵌合雞隻生產高價值特用生物醫藥製劑的生物工廠。
- (二) 胚胎細胞的再生性對用於疫苗生產具可行性與前瞻性，是值得發展的技術，對產業上的發展與應用有極大助益。
- (三) 家禽胚胎細胞研究有利於人類疾病之動物研究模式，可利用日方對胚胎細胞方面的專長與我方在疾病動物模式上的經驗，共同申請合作計畫，促進合作與提升。此案在共同收集資料、進行預備實驗並以電子信件溝通後，可提出共同研究方案，申請國際合作計畫。
- (四) 目前家禽研究的未知性仍多，哺乳動物的經驗不能完全複製於家禽研究上，亦表示此領域上有許多未開發的基因調控機制值得研究，若能分工著眼於全球，

建立全球性的研究團隊，專攻各自領域技術，能更有效率加速研發成果的產出，先生產製作當地產業需求之相關產品，再可放眼於全球之需。

(五) 家禽研究上遇到許多未商業化的材料，不便利之處亦為開發產品的契機，堀內教授建議研究中所需開發的特異載體與抗體可互相交流，雙方投入相同人力物力，除可獲得專屬的專利外，亦可互相交流，得到雙倍的資源。

(六) 日方提供胚胎細胞培養專利生長因子與雞隻特異抗體，讓我方於胚胎細胞培養與識別研究上能加速進展，可作為近期合作計畫的開端。

肆、附件照片



圖 1、郭曉芸助理研究員至日本廣島大學進行研習



圖 2、郭曉芸助理研究員(中)、堀內浩幸教授(右)與江崎燎研究員(左)於免疫實驗室前合影



圖 3、堀內浩幸教授介紹實驗室成員與研究主題

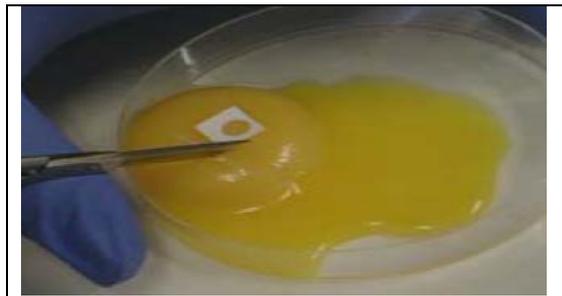


圖 4、stage X 胚盤朝上以紙環蓋住胚盤，沿紙環邊緣將膜剪破後，夾起紙環與附於上之胚盤



圖 5、放置於 PBS 中清洗後，將胚盤移至 1.5 mL 離心管



圖 6、江崎研究員示範 EpiSCs 飼養層細胞解凍與種植操作



圖 7、初級培養的 EpiSC 細胞



圖 8、郭曉芸助理研究員操作 EpiSCs 複製



圖 9、江崎研究員示範注射胚胎的 EpiSCs 操作以生成嵌合體

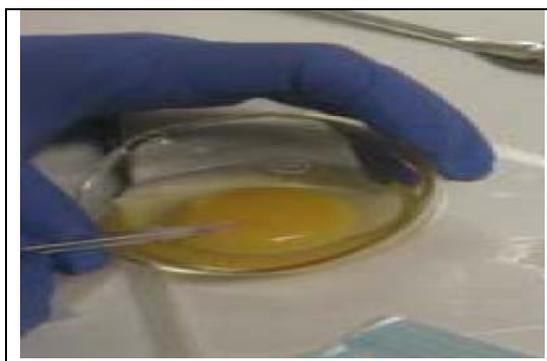


圖 10、EpiSCs 注射入 stage X 的雞隻胚胎中



圖 11、移植後的雞隻胚胎移至含蛋白的替代蛋殼中，以透明透氣帶封起後培養



圖 12、平野小姐示範雞隻特異抗體免疫染色試驗

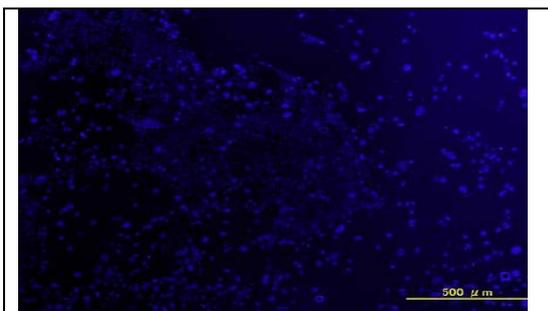


圖 13、顯微鏡下 EpiSCs 和飼養細胞 STO 之細胞核(藍色)

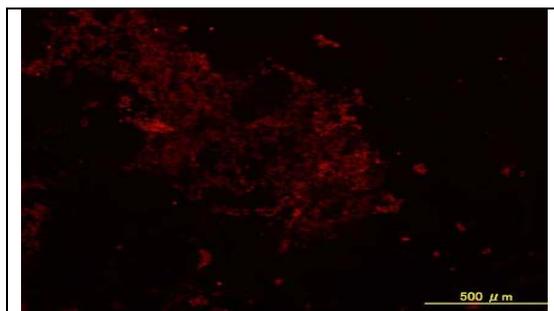


圖 14、EpiSC 與 Nanog 抗體結合成色(紅色)