

財團法人
食品工業發展研究所
Food Industry Research and Development Institute

生物資源保存及研究簡訊

第36卷第4期

中華民國 112 年 12 月發行

補助單位：經濟部產業技術司 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞

1

◎ 食品工業發展研究所

「枯草芽孢桿菌分離株及其用途」專利榮獲「2023 臺灣創新技術博覽會發明競賽銅牌獎」

會議紀要

3

◎ 國際研討會會議紀要（一）

第十五屆國際菌種收藏會議
(15th International Conference on Culture Collections)

參訪紀要

6

◎ 國際參訪紀要（二）

參訪韓國標準菌種保存中心
(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)

科技新知

7

◎ 以大分子冷凍保護劑開發即用型冷凍細胞

◎ 新增『血清與生長測試』客製化服務項目

食品工業發展研究所

「枯草芽孢桿菌分離株及其用途」專利
榮獲「2023 臺灣創新技術博覽會發明競賽銅牌獎」生物資源保存及研究中心 / 副研究員
廖巧敏

食品工業發展研究所專利「枯草芽孢桿菌分離株及其用途」(I676682) 參加經濟部智慧財產局於「2023 臺灣創新技術博覽會」舉辦之發明競賽，獲得銅牌佳績。該專利主要包含一株具有促進軟骨再生、抗關節發炎功效的枯草芽孢桿菌分離株，及其用於生產全素硫酸軟骨素關節保健原料的應用。

退化性關節炎是一種老年人常見的慢性疾病，其特點是漸進式的破壞關節軟骨，導致關節運動障礙，疼痛劇烈，最終可能導致殘疾。適當的運動可以增加軟骨中關節滑液的進出，加強關節周圍肌肉、肌腱和韌帶的結構，而減緩退化性關節炎的發生。關節炎發生時常用的治療藥物，如非固醇類的止痛抗發炎藥物，有導致胃腸道損傷、抑制血小板功能等副作用，因此近四成多的關節炎患者未採取積極的治療。許多消費者期待能透過飲食或膳食補充品，來減緩關節的不舒服，衛福部食藥署也規畫

新增『關節保健』功效的健康食品類別，將可改善雙足負重功能差異、具軟骨保護效果、減少膝關節腫脹等功效之產品可納入健康食品管理。目前常用於關節軟骨保健的原料，有葡萄糖胺 (Glucosamine)、硫酸軟骨素 (Chondroitin sulfate) 以及第二型膠原蛋白 (Collagen) 等。

本專利透過微生物代謝物及細胞活性評估技術，由食品所 BCRC 的微生物庫中，篩選具關節保健潛力的可食性菌株，並進行新穎性保健之開發。在受測的菌株中，篩選獲得安全性高，且生長快速、發酵週期短、可直接獲得無需硫酸化修飾的硫酸軟骨素能力的 2 株枯草桿菌專利菌株。並利用豬軟骨細胞及人類軟骨肉瘤細胞 (SW1353) 等兩種細胞進行專利菌功效活性評估。關節軟骨之細胞外間質 (ECM) 的主要成份為第二型膠原蛋白與蛋白聚醣 (Aggrecan)，因此在軟骨細胞模式中，評估樣品是否能刺激細胞外間質的增生以及刺激細胞外間

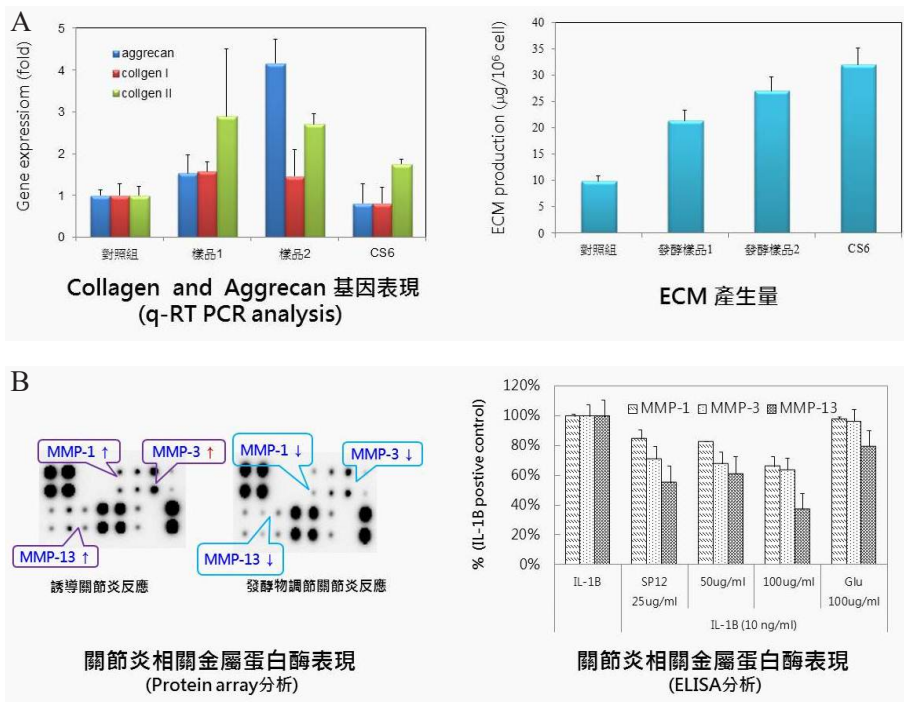
質相關基因表現的能力，結果本專利菌株的發酵物能有效促進軟骨細胞增生，並增加軟骨細胞外間質（如 collagen II、Aggrecan）的分泌（如圖二 A）。細胞激素之一的金屬蛋白酶（MMPs）被認為是軟骨組織降解過程中的關鍵物質，MMPs 可以直接切斷軟骨的第二型膠原蛋白和 Aggrecan，使軟骨的拱形纖維結構破壞，軟骨受損失去彈性，關節軟骨易受到降解酶的作用而破壞，因此在 SW1353 細胞模式中，我們利用介白素 (IL-1 β) 誘發人類軟骨肉瘤細胞 (SW1353) 產生如 IL-8、

ROS(Reactive oxygen species) 及 MMP-1、MMP-3 和 MMP-13 等關節炎相關細胞激素表現，再評估專利菌株發酵物對上述發炎性相關物質及水解酶的調節作用，結果亦顯示發酵物可以有效抑制 IL-8 及 ROS 的分泌以及 MMP-1、MMP-3 及 MMP-13 等細胞外基質分解酶的產生（如圖二 B）。上述結果說明本專利枯草桿菌能促進軟骨細胞再生、增加軟骨細胞外間質（如 collagen II、Aggrecan 等）分泌，應用於抗關節炎及開發關節軟骨保健之產品具有發展潛力。

本專利菌的發酵程序簡便，兼具高產量、低耗能、低污染等優點，已可進行商品化生產。其使用食用植物性原料進行發酵後，可無需萃取，將發酵產物直接調整風味，即可作為富含硫酸軟骨素及具有促進軟骨再生、抗關節發炎效果之保健飲品，無論男女與任何年齡層皆方便食用。其亦可使用禽畜副產物進行發酵生產，除了可產生豐富硫酸軟骨素，同時微生物可協助分解釋放副產物中的膠原蛋白，所得之發酵液或粗製品，可用於具關節保健機能之飲品或產品。



圖一、食品所研發團隊榮獲「2023 台灣創新技術博覽會」發明競賽銅牌獎



圖二、A) 專利枯草桿菌之軟骨細胞外間質表現 (樣品 1、2 分別為 2 株專利菌株發酵樣品, CS6 為 C 型之硫酸軟骨素); B) 專利枯草桿菌之關節炎相關金屬蛋白酶表現 (SP12 為專利發酵樣品, Glu 為市售葡萄糖胺)。

Wellbeing), 為期五天的議程, 深入探討微生物資源在支持社會福祉方面的應用。

首日由大會主席 Prof. Nelson Lima 宣布大會開始, 並邀請 WFCC 副主席 Dr. Manuela de Silva (FIOCRUZ, BR)、IUMS 主席 Dr. Rino Rappuoli、EC-Research Executive Agency 的 Andreas Høltel、La Araucania 的行政首長 Luciano Rivas、智利德拉弗龍特大學的校長 Prof. Eduardo Hebel 與米尼奧大學校長 Prof. Rui Vieira de Castro 分別進行歡迎致詞。之後由風笛、手風琴、手鼓等樂器進行葡萄牙傳統音樂開幕表演。

首日的開幕演講由美國 Stanford University 的 Prof. Ellen Jo Baron 主講, 講題為「微生物檢測的未來需求: 工具與資源」(Future needs for microbial diagnostics: tools and resources)。Prof. Baron 將講題分成三部分, 包括微生物檢測和宿主反應診斷、抗菌抗藥性檢測、以及新療法和診斷所需的工具。在微生物檢測和宿主反應診斷方面, Ellen 介紹了目前市面上相關儀器、試劑與原理, 以 Covid-19 為例, 最初是以 PCR-based 的檢測方式, 後來開發出快篩套組。她強調對於臨床醫生而言, 迅速確認病原體與其對藥物的敏感性或抗性非常重要。在抗菌抗藥性檢測方面, Prof. Baron 指出抗生素耐藥性感染是全球死亡的主要原因之一, 並強調了對具抗藥性微生物的檢測和診斷技術的發展的重要性。她提到了快速鑑定或鑑別系統的作用, 例如 HelixBind 開發的 PID panel 技術, 可在 2.5 小時內直接從全血中鑑定 21 種細菌和真菌。最後, Ellen 談到了在這些微生物

國際研討會會議紀要 (一)

第十五屆國際菌種收藏會議

(15th International Conference on Culture Collections)

生資中心/研究員
林宛柔

第十五屆國際菌種收藏會議 (15th International Conference on Culture Collections) 於 2023 年 6 月 12 日至 6 月 16 日在葡萄牙布拉加市米尼奧大學舉行, 由該校的資源保存中心主辦。此次會議得到智利德拉弗龍特大學、歐盟 21 世紀微生物資源研究基礎設施實施和可持續性計畫 (IS MIRRI21 EU Project)、微生物資源研究基礎設施 - 歐洲研究基礎設施聯盟 (MIRRI-ERIC)、葡萄牙微生物資源中心網路、葡

萄牙微生物學會、葡萄牙生物技術學會等單位的共同協辦。國際菌種收藏會議 (ICCC) 是由國際菌種聯盟 (World Federation for Culture Collections, WFCC) 定期舉辦的官方國際會議, 是菌種聯盟中最大且最重要的國際會議。國際菌種聯盟關注全球範圍內的微生物資源保存、應用、流通移轉、權益與安全問題。本次大會的主題為「利用微生物資源支持社會福祉」(Exploiting Microbial Resources to Support Social

檢測套組的快速發展中，生物資源保存中心或菌種中心在產業鏈中可以扮演的角色。她強調了這些中心在支持快速發展微生物檢測技術方面的重要性。

西班牙 Valencia University 的 Prof. Rosa Aznar Novella，講題為「MIRRI：2021 至 2030 年的策略研究與創新行動計畫」（MIRRI: The Strategic Research and Innovation Agenda for 2021-2030）。MIRRI (Microbial Resource Research Infrastructure)，中文稱為「微生物資源研究基礎設施」，是一個泛歐洲分佈的研究基礎設施，致力於微生物資源和生物多樣性的保存、系統調查、提供和加值。MIRRI 匯集了來自 10 個歐洲國家的 50 多個微生物領域生物資源中心 (mBRC)、微生物保藏中心和研究機構。他們的使命是為生物科學和生技產業提供服務，透過整合多個微生物資源中心，提供高質量微生物及其衍生物、相關數據和服務，尤其關注健康與食品、農產品、環境與能源等相關領域。她詳細介紹了 MIRRI 的歷史和組成，以及其對聯合國永續發展目標 (Sustainable Development Goals, SDGs) 的貢獻，並強調了 MIRRI 如何促進內部成員的聯合與整合，並與其他研究基礎設施以及公共機構和政策制定者合作，以推動生命科學和生物技術的研究和創新，並促進可持續、有競爭力和有彈性的生物經濟。此外，她分享了 MIRRI 如何積極參與歐盟經費的合作申請，以實現其目標和使命。

巴西 FIOCRUZ 的 Dr. Manuela da Silva 在生物資源保存的法律和政策議題方面發表了題為「獲取與惠益分享法規對於生物材料分配

與利用帶來的限制」(Restrictions placed on the distribution and utilization of biological material by Access and Benefit Sharing legislations) 的演講。她指出，1992 年在巴西里約熱內盧舉行的聯合國環境與發展會議期間，《生物多樣性公約》開放供簽署，並於 1993 年生效。該公約的目標是保護生物多樣性、可持續利用其組成部分，並公平公正地分享利用遺傳資源所產生的惠益。該公約確立了獲取和惠益分享的概念，以確保生物多樣性的永續利用。2014 年，《名古屋議定書》生效，成為獲取和惠益分享的國際框架。根據生物多樣性公約和名古屋議定書，締約方擁有對其遺傳資源的主權，有權決定對這些資源的獲取，並執行事先知情同意和共同商定的條件。目前，有 139 個國家成為名古屋議定書的締約方，因此生物資源保存中心必須遵從各國對遺傳資源的不同要求和規格。許多生物多樣性豐富的國家，即生物多樣性大國，對其遺傳資源實施嚴格的控制和限制，這些規定通常包含在材料轉讓協議 (MTA) 和共同商定條款 (MAT) 等文件中。由於這些限制，國際生物資源保藏中心在轉讓來自這些國家的微生物時面臨困難，有時甚至必須刪除它們或排除它們作為模式材料。這對於生物資源的合理和有效利用提出了挑戰，需要生物資源保存中心理解和遵從各種不同的法規和條例，找出解方。

來自義大利 CNR-ISPA 的 Dr. Giancarlo Perrone 分享了他們在微生物保存技術中的研究，尤其是在薩拉米香腸上的微生物群落。微生物保存技術的不足可能導致

寶貴的生物資源和基因庫損失，而這些資源對不斷變化的環境條件和新的生產過程具有高度的適應性。一般來說，微生物學家主要關注可培養的純菌，忽視了微生物群落和整體之功能潛力。為了解決這一問題，保存完整的微生物群落是一種有效的方法。然而，很少有研究針對微生物群落的最佳儲存條件以及探討儲存條件對微生物群落結構和功能的影響。Dr. Giancarlo Perrone 的研究評估了冷凍程序和冷凍保存對薩拉米香腸表面分離的微生物群落的有效性。他們使用甘油或 DMSO 作為冷凍保護劑，並測試不同的儲存溫度 (-80°C 和 -135°C) 之短期和長期影響。結果顯示，冷凍保存一個月和八個月後，微生物群落的細菌種群活力以相同的速度下降。真菌和酵母也觀察到類似的趨勢，但若以甘油和 -135°C 儲存，八個月後可以更好地保留酵母和真菌的活力。

有關微生物菌種保藏的尖端技術議題，多位生技公司的 CEO 或產品總監分享了他們的產品或新技術。其中，Digital PCR 是一項先進的核酸絕對定量分析技術，是在即時螢光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR) 之後發展而來的。Digital PCR 通過將反應體系均分到大量獨立的微反應單元中進行 PCR 擴增，並根據普瓦松分佈和陽性比例來計算核酸拷貝數，從而實現對核酸的絕對定量分析。相較於傳統 PCR 技術，Digital PCR 技術不依賴於標準曲線，具有更高的靈敏度、準確度和高度的耐受性，使其能夠實現對樣品的絕對定量分析。這種新技術的應用，尤其在微生物菌種的保藏中，為更準確、敏感且可靠的核酸分析提供

了更強大的工具。Digital PCR 的高靈敏度和絕對定量的能力有助於更好地理解微生物菌種的組成和特性，並推動微生物學和相關領域的研究前進。

地主米尼奧大學的 Prof. Luís D.R. Melo 演講的主題為「細菌噬菌體保存對噬菌體療法的重要性」(The importance of bacteriophage collections for the development of phage therapy)。近年來，細菌噬菌體受到了科學家和主流媒體的日益關注。這主要是由於它們在治療細菌感染方面的潛在應用，尤其是在應對具有抗藥性細菌感染的挑戰上。噬菌體療法並不是一個新的方法或現象。它在 100 多年前首次被描述，當時在東歐地區廣泛應用。隨著抗生素耐藥性的上升，以及噬菌體療法在一些成功案例中的應用，使得在所有其他治療選擇都用盡時，人們再次對這種方法產生了興趣。隨著噬菌體在應對細菌問題中的應用不斷擴大，擁有一個可供科學家獲取和存放噬菌體的儲存庫變得至關重要。這也是一個我們可以發展的重要項目，有助於推動噬菌體相關之研究、應用與發展。

過去的 30 到 40 年裡，許多新技術的出現徹底改變了我們的工作方式。DNA、RNA 和蛋白質分析領域的新技術快速發展，徹底改變了生物學研究並產生了大量複雜數據。然而，管理和分析這些數據集並不容易，需要複雜的資訊技術和運算法。許多科學家在有效理解和應用這些工具方面面臨困難。

在生物資源保存中心的生物資訊與資料管理場次中，Dr. Vincent Robert 介紹了 BioloMICS 軟體與其應用。Dr. Vincent Robert



圖一、第十五屆國際菌種收藏會議 (ICCC15) 會員合照 (一)



圖二、第十五屆國際菌種收藏會議 (ICCC15) 會員合照 (二)

於 1999 年加入荷蘭 Westerdijk Fungal Biodiversity Institute，負責酵母菌的收集與保存，同時開發可應用於生物資料管理的軟體。在 2000 年，他與團隊創建了 BioAware，這是一家軟體和生物資訊學公司。BioAware 的主要產品稱為 BioloMICS，這是一種用於管理、分析和發布生物數據的軟體。BioloMICS 軟體現已被全球許多研究機構和公司使用，例如 MIRRI、MycoBank、Q-Bank 等。

多個國家的菌種中心介紹

了他們的組織和相關任務，包括來自巴西的 Paraná Network Taxonline 微生物菌種中心 (CMRP/Taxonline)、巴西的 Fiocruz Covid-19 Biobank、摩洛哥的 Moroccan Coordinated Collections of Microorganisms (CCMM)、挪威的 Norwegian Culture Collection of Algae (NORCCA)。此外，Korea Research Institute For Bioscience And Biotechnology 的 Dr. Tae-Eun Jin 說明了在韓國，多個菌種中心的分層任務與合作模式；泰國的 Dr. Lily Eurwilaichit 則講述了中

國、寮國、緬甸、泰國、柬埔寨和越南在湄公河生態系中對微生物多樣性的合作。

Prof. Wieland Meyer 的演講主題為「菌種保存在臨床診斷和醫學研究上的角色」(The role of culture collections in clinical diagnostics and medical research)。侵襲性真菌感染每年導致全球 160 萬人死亡，佔所有醫院內感染的 10%。各種致病真菌對免疫受損患者構成嚴重威脅。新興的侵襲性真菌感染正在不斷出現，如由多重耐藥耳念珠菌引起的念珠菌血症。即使有有效的抗真菌藥物，由於對真菌感染的了解仍然不足，侵襲性真菌感染的死亡率仍然很高。真菌菌株是不可或缺的生物資源，在為臨床微生物學診斷實驗室提供質

量控制的參考菌株方面發揮關鍵作用。此外，它們還是建立真菌 DNA 條碼參考數據庫的基礎，這對分類法提供了準確性，並保持了命名法的穩定性。

本次會議涵蓋了微生物學、真菌學、多樣性、系統學、生態學、食品科學與農業應用等多個領域的最新研究發展。討論的主題涉及國際法規、專利等，凸顯了微生物的多方應用可能性以及菌種保存的重要性。水生真菌和嗜菌體成為研究的新興熱點，具有潛在的工業或商業應用。BCRC 作為亞洲乃至全球表現優秀的生物資源中心，參與這樣的國際會議有助於拓寬 BCRC 的國際視野，促進國際合作，推動全球微生物資源的流通、管理、權益和安全等議題的討論。

積極投入寶貴生物資源的核心技術研發，同時努力構建本地和國際的生物資源及其相關資訊網絡。作為政府國家研發計畫生物研究產品國家儲存庫的一部分，KCTC 目前擁有超過 40,000 株生物資源，包括細菌、放線菌、真菌、酵母菌、藻類和細胞株。KCTC 以生物資源標準化管理的方式運營，並在 2004 年通過 ISO 9001 品質驗證，在 2023 年 2 月通過 ISO 20387:2018 認證，成為亞洲第一個獲得該認證的資源中心。在韓國的生物資源管理領域，KCTC 處於領先地位。

在研究方面，KCTC 的研究實力主要由 13 名研究員及其團隊構成。KCTC 與首爾大學、慶熙大學等大學建立了緊密的合作研究關係，同時積極招收國際學生、博士生和博士後研究人員，致力於培養相關技術與產業所需的人才。2023 年度，KCTC 已在各領域共發表了 16 篇 SCI 論文，展現了其在生物資源研究領域的卓越貢獻。

我們於 2023 年 10 月 5 日晚上抵達 KCTC 後，由 Dr. Ji-Young LEE、Dr. Mi-Kyung Lee、Dr. Zhun Li 熱情接待，並協助前往住宿地點。10 月 6 日的參訪活動始於 KCTC 的 Dr. Song-Gun KIM 進行的中心介紹，接著由我們生資中心的謝松源主任簡述我們的研究實力。在會議期間，我們深入探討了有關 ISO 認證的申請和實施的相關事宜。此外，我們有機會參觀了 KCTC 的收藏庫和實驗室，並與中心的研究員們進行深入的合作討論，共同探討未來合作的潛在領域。這次參訪不僅強化了雙方之間的合作聯繫，也為未來更廣泛的國際合作奠定了基礎。

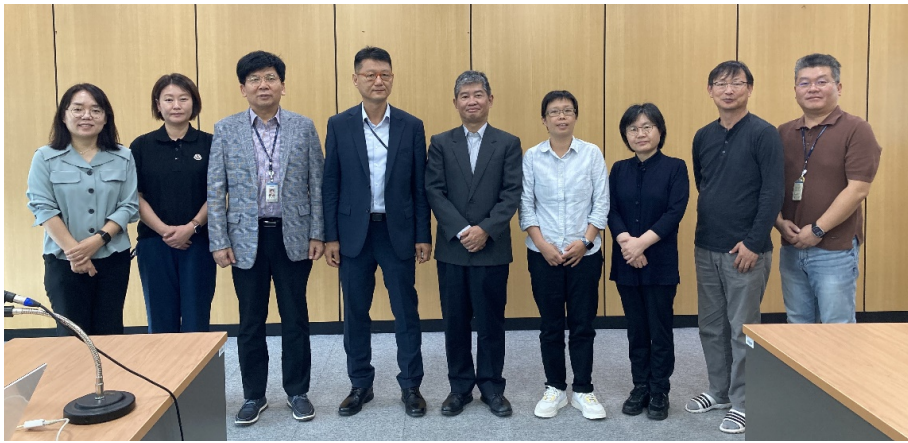
國際參訪紀要 (二) 參訪韓國標準菌種保存中心 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)

生資中心／研究員
林宛柔

韓國標準菌種中心 (Korean Collection of Type Culture, 簡稱 KCTC) 隸屬於韓國生命工學研究院 (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, 簡稱 KRIBB) 旗下，是一個致力於生物資源保存與研究的中心。KRIBB 是由韓國政府資助的科研機構，同時也是韓國生命科學領域唯一的國家研究機構，總部位於韓國大田廣域市大德科學園區，下設 3 個研究部門和 2 個業務部門，共計 34 個研究中心。

此外，2005 年 9 月，KCTC 在忠清北道設立了梧倉 (Ochang) 分院，並於 2006 年 11 月在全羅北道成立了第二個分院—全北 (Jeonbuk) 分院。

韓國標準菌種中心 (KCTC) 位於南韓全羅北道井邑市，是韓國最大的生物資源中心，擁有 13 名研究員、17 名正式員工和 70-80 名約聘博士後研究人員與學生。KCTC 致力於應對國際挑戰，為生物資源的取得、保存和分配提供重要基礎設施。中心



圖一、BCRC 參訪人員與 KCTC 成員合照。



圖二、謝松源主任簡介 BCRC 研究能量。

以大分子冷凍保護劑開發即用型冷凍細胞

生資中心 / 副研究員
許麗鳳

一、摘要

動物細胞是研究生命科學重要的生物資源和研究材料，廣泛的使用於新藥的開發和篩選以及細胞生物學與疾病的基礎研究上，因此動物細胞的品質優劣直接影響著研究結果的正確性，而其培養保存與品管也需要有相當的專業技術，並且極為耗費人力與經費，所以不斷的發展簡單實用的細胞相關技術及冷凍保存方

法更顯得重要。

通常在細胞的基礎研究上，是將細胞培養成附著於培養盤上的單層細胞形式進行測試，然而，目前的冷凍保存技術並不允許細胞在附著於組織培養盤的狀態下進行冷凍保存。因此，細胞必須從懸浮液中解凍，經過數天或數週的擴增培養，最後再轉移到多孔盤中進行實驗，此種過程會消耗大量時間來處理細胞，對生物醫學研究缺乏理想的效益，本文

介紹研究人員以合成大分子冷凍保護劑，進行即用型細胞分析盤冷凍方法的開發，對生物醫學上重要的單層細胞進行常規、可重複和穩健的冷凍保存；細胞只需簡單的以培養基解凍並放入培養箱中，即可在 24 小時內使用，冷凍保存後的細胞仍然保留了健康的形態、膜完整性、增殖能力和代謝活性，並可望提供改變常規細胞培養保存模式，促進生物醫學的發展。

二、以傳統細胞冷凍保存方法進行後續實驗之限制

常規的細胞冷凍保存方法，是將貼附於培養盤上的細胞以酵素作用成單顆細胞或直接收集懸浮的細胞，置於離心管中離心後吸除上清液，再以含 5-10% DMSO 的細胞培養基作為冷凍保存液，與細胞均勻混和後平均分裝於冷凍小管中，使用階段式降溫或等速降溫方式將細胞進行冷凍保存。

以動物細胞進行研究分析的實驗中，通常是讓細胞附著於培養盤上生長成單層細胞形式進行測試，但是如果細胞已生長達到進行實驗所需的滿盤度後，就必須立即進行實驗，因為在附著於培養盤的單層細胞狀態下，以目前的冷凍保存技術是無法成功的被冷凍保存的，所以每次在實驗前都必須重新解凍細胞進行增殖培養，等待細胞復甦之後再進行測試，造成試驗時間被延遲的缺點(圖一 A)，因此目前準備實驗用細胞的方式存在著以下限制：
1. 步驟多：以細胞進行實驗研究時，必須將細胞先從冷凍的懸浮液中解凍、接種，並經過數個 flask 增殖，直到可以將足夠數量的細胞再轉移到多孔盤中，才能

作為實驗研究使用。2. 耗時長：細胞的增殖速率不一，需要花長時間在細胞的“處理”上，一般大約需要 1-3 週，耗費的時間取決於細胞的增殖速率。3. 廢棄物多：細胞的常規處理會產生大量的一次性塑料廢棄物，造成環境問題。4. 人為操作偏差：不同的細胞株特性不一，需要時間、經費和廣泛的細胞培養知識做基礎，並有一致的操作技術，例如：需要探索每株細胞的活性和培養基特性的最佳滿盤度，因此，這樣的過程中必須將更多的時間、人力、物力花在處理細胞上。

三、即用型細胞冷凍方法之開發

為了改善上述之限制，增進實驗研究的效益，近年來研究人員以合成大分子作為冷凍保護劑，對多孔盤中培養的單層細胞進行冷凍保存的探討。其研究的目標在於建立單層細胞可進行常規、可重複和穩健的冷凍保存技術。細胞可以“assay-ready (檢測就緒)”的形式從冷藏庫中取出解凍，24 小時後即可使用，減少實驗室研究人員數週的時間，達成大量快速的篩選目標，並確保細胞特性的一致性。

低溫保存的冷應力傷害取決於，在快速冷凍及緩慢升溫過程中的再結晶，由於細胞過度暴露於殘留未冰凍水中的高鹽濃度環境和細胞內冰的形成 (intracellular ice formation; IIF)，導致過度脫水造成細胞死亡。IIF 是冷凍保存單層細胞 (和球狀體) 的一個特殊問題，與懸浮細胞相比，因為細胞與細胞相接觸將促進細胞內冰的傳播，通常具致命性且會降低細胞的回復率。為了減輕冷凍保存過程中造成的損害，冷凍

保護劑 (CPA) 必不可少，其中 DMSO (二甲基亞砷) 是有核哺乳動物細胞使用最廣泛的冷凍保護劑。在典型的慢速冷凍保存過程中 (1 °C /min)，當細胞脫水時，DMSO 會補充失去的水分以減少因過度脫水而導致的細胞死亡和 IIF，DMSO 還可透過降低冷凍過程中殘留的未冷凍溶液內的電解質濃度來使滲透衝擊最小化。然而，DMSO 無法冷凍保存單層形式的細胞，通常在冷凍/解凍後僅有 ≤30% 的細胞回復率，並產生細胞碎片，這也可能影響實驗結果。

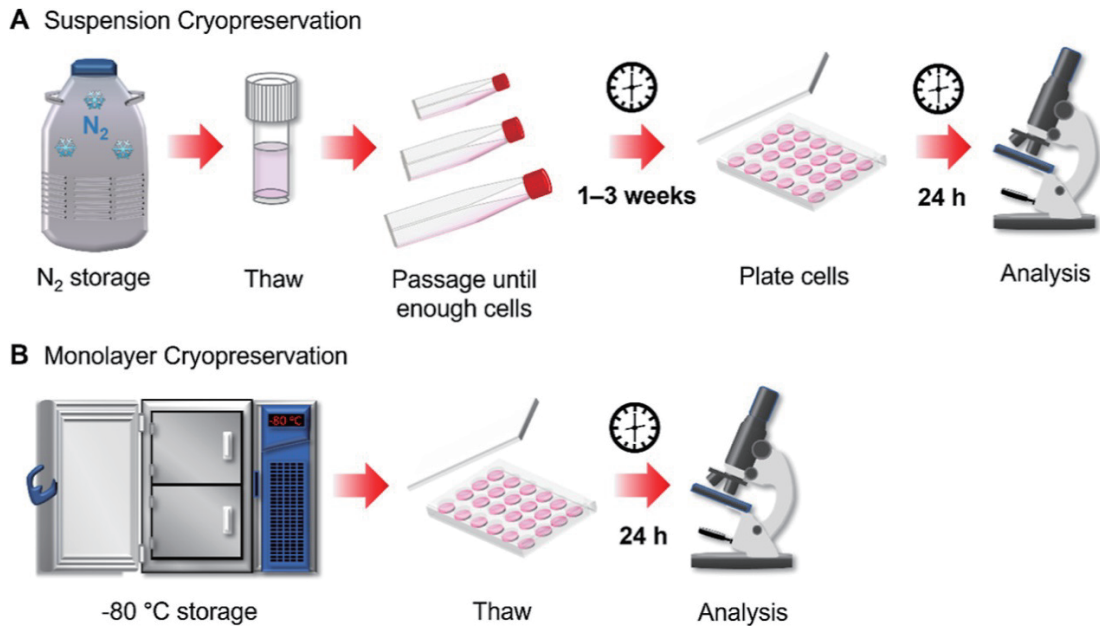
為了因應低溫保存的挑戰，研究人員已經探索了可作為再結晶抑制劑 (ice recrystallization inhibitors, IRI) 的天然及合成小分子和大分子，它們能夠抑制回溫過程中冰的再結晶現象，並調節冰的生長和形成。IRI 已被證明有利於紅血球細胞的冷凍保存；然而，在有核細胞的單層或懸浮液冷凍保存過程中效果則有限。Trehalose 和 L-proline 等保護性滲透劑可以減輕單層細胞冷凍過程中的一些損傷，將 Neuro-2a 單層細胞的回收率從 13% 提高到 53%，將 HepG2 細胞的回收率從 13% 提高到 42%。聚兩性電解質 (polyampholytes) 具有低溫保護特性，其結構中帶有陰離子 / 陽離子混合側鏈，使用 carboxylated poly (ϵ -lysine) 和 10% DMSO，將單層的 L929 和大鼠骨髓間質幹細胞冷凍保存，其性能是單獨使用 DMSO 的兩倍。而聚兩性電解質的保護作用機制尚不清楚，但有證據顯示鹽被細胞周圍的基質捕獲，可以最大限度地減少滲透破壞，同時確保充分脫水以防止自發性 IIF。聚兩性電解質也可以相互作用 /

保護細胞膜，類似於抗凍蛋白保護脂質體模式。

聚兩性電解質增進了 A549、MC-3T3 和 Neuro-2a 細胞株的解凍後回復力，但仍然沒有證據顯示對於冷凍的單層細胞也具有良好的效果，是否可以做到直接將冷凍的單層細胞從冰箱中取出，並在最少的使用者介入下就可以使用呢？為了達到此一目標，研究人員選擇了對於毒理學或篩選試驗上具有代表意義的 A549 (人類肺泡基底上皮細胞腺癌)、HepG2 (人類肝細胞癌) 和 Caco-2 (人類結直腸腺癌) 細胞株，對冷凍後細胞的健康和功能進行深入的分析。測試材料是衍生自 Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride) 和 dimethylamino Ethanol (二甲基氨基乙醇) 聚合反應生成的聚兩性電解質。做法是將不同密度的單層細胞在 -80 °C 冰箱中冷凍儲存超過 1 個月後，再將細胞大量的解凍，並進行細胞增殖、代謝、膜完整性、凋亡和細胞週期及形態學分析，以癌症化療藥物 doxorubicin 進行藥物篩選試驗。目標是證實單層細胞是健康的，功能正常，並且已達到“assay-ready”的狀態。

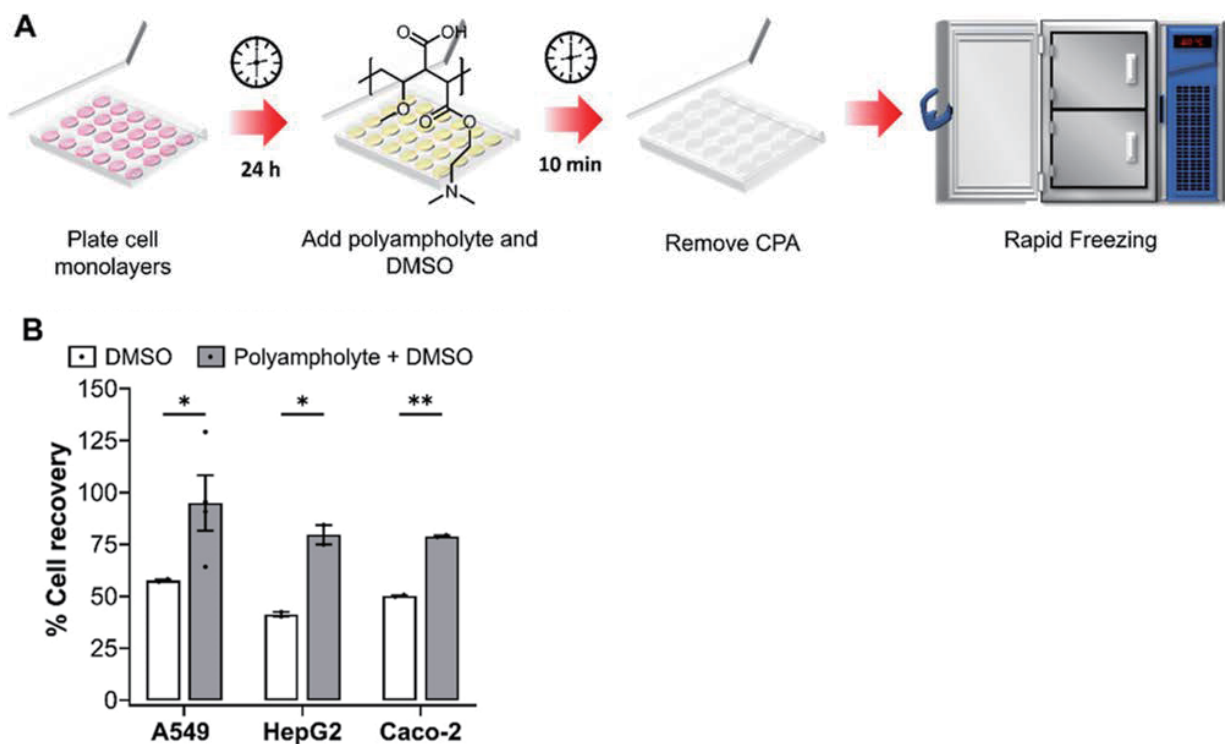
冷凍方式是將接種在 24 孔盤中的細胞與 CPA (40 mg/mL 的聚兩性電解質和 10% DMSO) 在室溫下作用 10 分鐘後，移除 CPA，僅保留薄塗層，並將孔盤放置於 -80 °C 冰箱中 (圖二 A)。由於多餘的冷凍保護劑在冷凍前已被去除，降低了冷凍保護劑的潛在細胞毒性，同時提高冷凍速率並促進解凍過程。

解凍方式是將孔盤從冰箱中取出，以回溫的細胞培養基快速解凍細胞並置於培養箱中培養，



圖一、冷凍細胞解凍後處理流程圖 (A) 懸浮液形式 (B) 『assay-ready』單層細胞形式。

摘自 Tomás et al., 2022



圖二、使用聚兩性電解質進行細胞株冷凍與活性的探討。(A) 單層細胞冷凍保存流程圖及 (B) 比較加入聚兩性電解質時解凍後的細胞回復率。

摘自 Tomás et al., 2022

準備第二天 (24 小時後) 使用 (圖一 B)。快速解凍可減少固態冰晶的生成和高電解質濃度所引起的細胞變性。選擇以 24 小時的凍後恢復時間，是因為 programmed cell

death(程序性細胞死亡)途徑可能需要 12-24 小時才能完成，時間太短 (4 小時)，可能會誇大細胞的恢復力和活性，導致出現偽陽性的結果。

四、解凍後細胞特性之評估

(一) 聚兩性電解質的低溫保護作用

為了評估聚兩性電解質對

A549、HepG2 和 Caco-2 細胞的低溫保護作用，在冷凍前和解凍後 24 小時立即對細胞進行計數，以確定單層細胞解凍後的細胞回復率 (圖二 B)。使用 10% DMSO 和 40 mg/mL 聚兩性電解質冷凍細胞，A549、HepG2 與 Caco-2 的回復率分別達 $92.5 \pm 4.1\%$ 、 $79.6 \pm 8.7\%$ 與 $79.3 \pm 8.7\%$ ，而單獨使用 10% DMSO 冷凍時僅能達到平均細胞回復率 49.9%，此數值已高於先前的文獻數值 ($\leq 30\%$)，反映出此冷凍方法的優化結果與冷凍保護劑的選擇相當重要，顯示了聚兩性電解質作為冷凍保護劑的出色效力。

不同的細胞接種密度 (每孔 $12.5-100 \times 10^3$ 個細胞) 對冷凍保存結果無影響，超過 75% 的細胞可在解凍後 24 小時恢復。對非冷凍和冷凍的 A549 和 HepG2 細胞進行 resazurin 還原代謝測定時，以不同密度接種的細胞解凍後 24 小時皆呈線性反應，顯示其適用於藥物篩選的細胞活性測定，A549 的代謝活性不受冷凍過程的干擾，但 HepG2 在解凍後 24 小時則活性減半。

(二) 細胞形態觀察

將 A549 和 HepG2 單層細胞冷凍保存在 10% DMSO 或 10% DMSO 和 40 mg/mL polyampholyte 中。解凍後維持正常的細胞形態，不受冷凍過程影響，細胞仍粘附在孔盤上，並可觀察到滿盤的單層細胞，無論細胞密度高低，細胞保持健康形態，且於 24 小時恢復時間內完成使用之準備，若單獨使用 DMSO 冷凍保存則會導致圓形不健康的細胞形態。

評估培養位置對細胞形態造成的影響，以 10% DMSO 和 40 mg/mL 聚兩性電解質冷凍保存

時，細胞維持健康且孔間差異小。細胞數量的變化可能是由於初始接種過程的自然變化 (均勻度或操作上的個別差異)，傳統的接種方法可能導致細胞在孔的圓周和 / 或中心的聚集增加，在 A549 和 HepG2 細胞的所有其他位置也都觀察到滿盤的單層細胞。歸納其結果，標準快速的冷凍方法可能減少細胞的脫水而增加 IIF，而聚兩性電解質和 DMSO 預培養的細胞表面積較小，具有幫助細胞脫水的作用機制，所以聚兩性電解質的作用不是完全去除 IIF，而是將其造成的損害降至最低。

(三) 細胞品質評估

1. 膜完整性

膜完整性可做為一般衡量解凍後細胞品質的評估標準，也是肝細胞株健康狀況的重要評估方式。酵素滲漏被用於肝毒性篩選，鑑定生物活性藥物及其潛在機制的酵素活性分析。細胞以 calcein (綠色、健康、完整的膜) 和 ethidium iodide (紅色、死亡、受損的膜) 染色，觀察是否有膜損傷的存在。比較非冷凍和冷凍細胞間的膜損傷細胞，即使是經過冷凍仍幾乎沒有紅色的細胞，顯示膜損傷極微小，健康的膜完整活細胞比例 A549 維持在 $\sim 96\%$ ，HepG2 維持在 $\sim 88\%$ 。此結果顯示，使用聚兩性電解質和 DMSO 在冷凍保存期間保持了膜完整性，避免了細胞的物理性破壞，降低了壞死性細胞死亡以及在其它後續的功能測定中導入偏差的可能性風險。

2. 程序性細胞死亡 - 細胞凋亡分析

檢測凋亡蛋白 (Caspase 3/7) 活性。以螢光顯微鏡觀察記錄凋亡細胞及 24 小時內的所有時間點

的變化。結果在影像記錄中觀察到極少的 caspase-3/7 陽性細胞，顯示冷凍 / 解凍後凋亡細胞在 10% 以下。

3. 生長曲線測量 - 細胞長期健康評估

膜通透性和細胞凋亡測量可評估解凍後的即時細胞健康狀況；然而，需要生長曲線測量來確定細胞是否長期維持健康。其做法是每天對非冷凍和解凍後的細胞進行計數，直到達到 80-100% 的滿盤度，以確定單層冷凍細胞的解凍後增殖時間是否受到冷凍 / 解凍過程的影響。結果顯示，A549 細胞冷凍前後倍增時間變化無顯著差異，HepG2 倍增時間則從 29 小時增加到 38 小時。然而，先前也有研究顯示 HepG2 的倍增率為 48 小時，因此解凍後 HepG2 細胞的增殖率仍於預期的正常範圍內。

冷凍保存可能會顯著改變解凍後長達 48 小時的細胞週期群體數；但是這方面的報導仍很有限。由先前的細胞回復和活性測試證實，冷凍後，細胞保持了“健康”狀態，但獲得細胞週期群體數分佈的狀態則可提供對其增殖能力、凋亡和正在進行修復過程的細胞的訊息。結果顯示，解凍後每株細胞都經歷了 G0/G1 細胞減少和 S 期細胞增加，這是一個明確的指標，表示細胞未停滯於 G0/G1 (細胞凋亡指標) 並保持了增殖的能力。A549 和 Caco-2 細胞在冷凍前和解凍後 24 小時保持相似的細胞週期群體分佈，大多數細胞處於 S 或 G2/M 期，與 HepG2 細胞明顯不同，這也反映了先前觀察到的非冷凍和冷凍 HepG2 細胞增殖率的變化，被認為是增殖潛力增加的指標。無論如何，每株細胞的凋亡數量極少，

也都保留了增殖能力，證實細胞在冷凍 / 解凍後可以正常的被使用。

4. 解凍後單層細胞的藥物篩選分析測試

在準確計算維持細胞活性所需的最佳濃度百分比之後，對細胞進行冷凍保存 24 小時，將細胞以回溫的完整培養基解凍並培養 1 天後，加入不同濃度的 doxorubicin 作用 24 小時，再加入 resazurin 反應 4 小時檢測細胞活性以計算 IC50 值。試驗結果顯示 A549 和 HepG2 細胞皆可呈現標準的劑量 - 反應 S 型曲線。證實了此方法可以應用於藉由最少的細胞處理程序來提高自動化的程度，尋找具有生物活性的化合物。

藥物代謝活性測試，進行解凍後 24 小時 HepG2 細胞色素 p450 (CYP) 活性測試。與未冷凍細胞相比，CYP3A4 活性在解凍後受到輕微抑制，而 CYP2C9 活性保持不受影響或略高。此結果顯示，HepG2 單層細胞能夠以 “ready-assay” 的形式冷凍保存，有可能實現第一個直接從儲存到自動篩選的平台。

5. 單層細胞冷凍回復性試驗

為了確保單層冷凍細胞株可持續供應，需要長期儲存細胞。然而，目前雖有懸浮細胞可以在低於或等於 -80 °C 下長期冷凍保存，並維持解凍後存活率 >90%，但尚無關於單層細胞凍存在 -80°C 冰箱中長期保存的研究。於 -80 °C 冰箱中儲存 1 個月後，比較在冷凍前和解凍後 24 小時的細胞，滿盤的單層細胞回復百分比下降，表示在解凍或細胞死亡過程中可能造成一些細胞的脫落，但並沒有發現細胞的碎片，且約有 70% 的細胞回收率，這已足夠讓細胞用於所需的用途。而

將細胞置於乾冰中儲存超過 5 天時，細胞回收率沒有顯著的降低，這也為運輸冷凍保存的單層細胞盤提供了一個可行的路徑。

五、結論

加入聚兩性電解質的細胞冷凍方式，解凍後細胞回復力大於 80%，孔間差異小確保其均勻性。此外細胞維持健康的形態、膜完整性、增殖能力和代謝活性，凋亡細胞僅少量增加，且對 doxorubicin 的毒理學測試反應良好，證實細胞在解凍 24 小時後已 “ready-assay”。簡化貼附型單層細胞於標準微孔盤中冷凍保存的步驟，直接從冰箱中取出後，亦無需過多的操作、管理以及其他與細胞培養和生物醫學相關測試的耗時和資源消耗，只需進行最少的處理，即可 “ready-assay”。因此相較於單獨使用 DMSO，與聚兩性電解質合併使用時，解凍後細胞產量和活性顯著由 50% 增

加至 93%，初步顯示，聚兩性電解質有助於冷凍過程中細胞脫水，減少 IIF 的破壞作用。此冷凍細胞方法有助於促進自動化、減輕研究人員的實驗負擔與時間負荷、開發新的篩選技術以及生物醫學的發展。

參考文獻

- Tomás RMF, Bissoyi A, Congdon TR, Gibson MI. 2022. Assay-ready Cryopreserved Cell Monolayers Enabled by Macromolecular Cryoprotectants. *Biomacromolecules*. 23, 3948-3959.
- Bailey TL, Stubbs C, Murray K, Tomás RMF, Otten L, Gibson MI. 2019. Synthetically Scalable Poly(ampholyte) Which Dramatically Enhances Cellular Cryopreservation. *Biomacromolecules*. 20, 3104-3114.

新增『血清與生長測試』客製化服務項目

生資中心 / 研究員
許璿文

血清為血液去除細胞、血小板和凝血因子後，所分離出的透明淡黃色液體。富含各種營養成分，包括胺基酸、蛋白質、維生素、碳水化合物、脂質、荷爾蒙、生長因子、礦物質和微量元素等組成。可促進和維持細胞生長，並提供細胞緩衝保護，具有抑制蛋白分解酶活性、增加培養基黏度，和維持適合細胞生長的培養容器表面條件等功用，是細胞培養基中最重要的組成分之一，使

用添加範圍為 5-20%(v/v)。

血清是一種極為複雜的混合物，不同批次間存在相當大的差異性，很難達到規格標準化。除了血清來源動物個體差異外，不同的製備和滅菌方法，動物飼養的區域、氣候和環境等條件，都是造成血清批次差異的主要因素。由於血清是影響細胞培養品質的關鍵要素之一，因此選擇合適的血清批次，並盡可能長時間的在有效期限內使用同一批次的

血清，是維持穩定的細胞培養品質和獲得良好的實驗再現性，最基本的必要條件。

目前國際主要的血清供應商，大部分皆會根據美國/歐洲藥典、美國食品藥物管理局(FDA)和美國農業部(USDA)所頒布的聯邦法規準則(Code of Federal Regulations, CFR)等標準，提供批次血清的成份分析檢驗報告(Certificate of Analysis, CoA)，作為客戶挑選血清參考使用(表一)。其中，細胞培養生長測試，則是作為血清適用性和購買選擇的最重要依據。然而，血清供應商所提供的細胞生長性能測試，通常都是使用可連續繼代培養的細胞株。因此，想要挑選和購買更符合實驗室需求的血清，利用實驗室常用(或不易培養/

對血清品質要求較高)的細胞來進行生長性能檢測，是非常重要的。

常用於血清之生長測試方法如下：

1. 細胞生長測試(Growth promotion test)

通常用於評估血清的營養支持作用。透過3次以上的細胞繼代培養，計算平均細胞倍增時間(doubling time)，細胞倍增時間越短，血清支持細胞生長的效果越佳。適用於貼附型和懸浮型細胞之生長測試。

2. 細胞種植效率(Plating efficiency assay)

用於評估血清促進細胞貼附到固體表面生長的能力，適用於貼附型細胞之測試。以不同濃度血清(0.2-10%)，進行低密度(10-

100 cells/mL)細胞培養。經5-14天培養後，進行染色計算群落數(serum plating efficiency, SPE)。

3. 細胞克隆效率(Cloning efficiency assay)

用於評估血清支持骨髓瘤細胞(myeloma cell)和融合瘤細胞(hybridoma)之生長能力，多用於非貼附型細胞之測試。細胞以低密度(0.1 - 3 cells/well)接種在含有5-10%血清培養基之96孔盤。經10-14天培養後，進行染色計算96孔盤中有細胞生長之well數(serum cloning frequency, SCF)。

食品所生資中心針對客戶需求，可提供客製化『血清與生長測試』服務。如有相關需求，請洽詢03-5223191生資中心委託試驗服務：唐先生，分機512。

表一、血清常規執行測試項目如下：

檢測項目	說明
內毒素	以 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 凝膠法進行測定。
酸鹼值	以氫離子濃度檢測標準方法進行測量。
滲透壓	透過冰點降低來測量。
血紅素	以比色測定法進行測定。
黴漿菌	依據藥典規定，進行黴漿菌直接培養法 / 指示細胞法檢測。
病毒檢測	根據不同物種來源，依 CFR Title 9 Part 113.53. 進行檢測。
蛋白質電泳鑑定譜	定量血清中的白蛋白與球蛋白佔總蛋白百分比。
總蛋白質	以 Biuret colorimetric assays 進行分光光度測定。
無菌性	依據法規標準，進行無菌性測試。
化學成分	以 SMAC 或同等方法進行分析。

生物資源保存及研究簡訊 第136期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：廖啓成所長

主編：陳倩琪

編輯：王俐婷、許璣文、黃喬盈、吳明德

本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路331號

電話：(03)5223191-6

傳真：(03)5224171-2

承印：國大打字行

電話：(03)5264220

ISSN：1021-7932

GPN：2009001214

中華郵政新竹誌字第0030號

交寄登記證登記為雜誌交寄

