

財團
法人 食品工業發展研究所

第 71 期

生物資源保存及研究簡訊

第20卷第3期

中華民國96年9月發行

補助單位：經濟部技術處 / 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

- ◎ BioTaiwan 2007第五屆台灣生技月生技展，本所生物資源保存研究中心展出「生物資源的流通管理、創新服務與加值應用」

研發成果 2

- ◎ 細胞株之引進、建立與服務
- ◎ 幹細胞之鑑定、保存與研發
- ◎ 細胞培養周邊設備創新取代方案
- ◎ Epstein-Barr病毒轉型人類B淋巴球細胞株之建立與應用

專利微生物 12

- ◎ 審定公告之專利寄存生物材料

給細胞使用者的一封信 12

細胞相關研習會訊息 12

BioTaiwan 2007 第五屆台灣生技月生技展，本所生物資源保存研究中心展出「生物資源的流通管理、創新服務與加值應用」



▲ BioTaiwan 2007第五屆台灣生技月生技展於今年7月26至29日在台北世貿中心舉行，本所生物資源中心以「建立生物資源流通平台、創新服務及生物資源加值應用」為此次的參展主軸。

(圖：企劃室 羅瑞娟小姐 提供)

今年展場中特以「生物資源流通管理、創新服務及加值應用」與業界分享成果。

在建立生物資源流通管理，本中心提供生物資源之收集引進服務與生物材料之國際流通與進出口實務諮詢，並藉由產業導向之e化平台提供各項資訊服務；在生物資源創新服務方面，引進並提供國內研發成果之人類胚幹細胞株TW1，建立客製化發酵庫之新興提供模式，建立專案保存以及機能性成分之分析檢測等多種的創新服務平台；在生物資源加值應用方面，本中心在多樣化資源的加值應用包括開發醋酸菌及其纖維素之多元應用、微生物開發保健機能性配料、微生物開發高分子素材、建構與加值多樣化發酵庫、中草藥食材固態發酵技術等以及在細胞資源的開發應用(如間葉幹細胞之開發與幹細胞無血清培養系統)等均有多樣且豐碩的研究開發成果。

一年一度的生技展是國內生技產業的盛事，國內外廠商透過生技展場的技術交流與成果展示，了解生技產業的脈動，本中心亦期待透過生技展的推廣與交流，更積極扮演在產業價值鏈上的角色，深耕多樣化生物資源之生態價值，整合研發以提昇生物資源之科學價值，創新加值以建造生物資源之經濟價值，高度滿足產業需求與產業共創生物資源之產業價值。

(文：生資中心 姚少凌 研究員)

細胞株之引進、建立與服務

生資中心／副研究員
許瓈文

I. 動物細胞株之引進

動物細胞為研究生命科學重要的生物資源和研究材料，而正確、優良的動物細胞，亦為實驗必備的先決條件。本所生物資源保存及研究中心自民國83年1月起開始進行動物細胞株之收集與保存工作，並於民國85年7月起接受國家衛生研究院委託設立細胞庫核心設施，積極推動發展動物細胞庫工作。針對國內研究人員之需要，引進並提供所保存之細胞株和相關資料，作為長期並具效率和品管的動物細胞株保存與提供場所，提供穩定且高品質的細胞來源，以滿足國內研究人員之需要。

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心動物細胞庫(以下簡稱細胞庫)，為一持續性之服務工作，對內加強細胞庫作業之管理，對外則提供保存細胞和相關培養資訊之服務。本所在尊重國際潮流的智慧財產權原則下，除了持續維持和提供細胞庫核心設施原有的功能和服務品質之外，並加強服務透明化，提供相關細胞培養、冷凍保存、品管系統等教育訓練課程和資訊之核心實驗室。

本所生資中心近年來依據國

人建立之細胞，種類囊括各種人類、大鼠、小鼠、猴、貓以及融合瘤細胞株，包括皮膚、卵巢、乳腺、神經、淋巴球、胎盤、大腸直腸、胸腺、骨髓及腎臟等各類組織來源的細胞，以廣泛的提供予各界研發人員來使用，詳細如下表1所列。

II. 初代細胞之製作與提供

為因應國內研究人員需求，細胞庫自94年度起亦開始提供初代細胞(primary cells)，包括：人類臍帶靜脈內皮細胞

表1、生資中心近年來新引進之各類細胞株

引進人類(Human)細胞株，細胞名稱如下---

NCI-H441、GCT、SW-13、A3、HT、JAR、AsPC-1、HPAC、NCI-H1688、MCF-10A、KU812、HEK 001、WI-38 VA13 subline 2RA、Kasumi-1、CA-46、JM1、SCC-25、NCI-H716[H716]、Hs 67、Hs 683、SW 1463、HuT78、SW 982、LS 123、HCT-15、MeWo、MJ、Toledo、22Rv1、C-33A、SW 1353、MDA-MB361、TL、NIH:OVCAR-3、HEC-1-A、NAMALWA、CG20、CG35、CG396、CG1150、CG1151、CG1164、CG1165、CG1252、CG1253、CG1254、TLouaR

引進小鼠(Mouse)細胞株，細胞名稱如下---

32D clon e 3、ES-D3 GL、TM3、LADMAC、EOC 13.31、PC 61 5.3、L Wnt-3A、MEF-CF-1、Sol8、PYS-2、bEnd.3、XB-2、SW10、EM9、A20、pgsD-677、pgsE-606、DDT1 MF-2EM9

引進大鼠(Rat)細胞株，細胞名稱如下---

RBA、CTX TNA2、13762 MATB III、SV40LT-SMC Clone HEP-SA、RSC 96、RT4-D6P2T、LC-540

引進融合瘤(Hybridoma)細胞株，細胞名稱如下---

GK1.5、2.43、R6.5.D6.E9.B2、EH7a、EH17a、5E9 TLK-2、HURP-159、HURP-196、9B2、1B1、4C4、4G1

引進猴子(Monkey)細胞株，細胞名稱如下---

VERO C1008、VERO 76、RF/6A

其他(feline、fish)

ZFL、PG-4、FL-74-UCD-1

註：細胞株之詳細背景資料請參考本所生資中心網頁，
<http://strain.bcrc.firdi.org.tw/BSAS/index.jsp>。

(HUVEC)以及小鼠胚胎纖維母細胞(MEF)，皆為目前國內研究人員在從事細胞培養相關研究工作，例如：研究血管新生和篩選心血管相關之藥物，或是胚胎幹細胞等研究方面時，需求最為熱烈之初代細胞(圖1)。

由於初代細胞的製作與培養過程十分繁瑣，而要取得好的組織與動物來源，並維持良好的細胞管控也是十分不易。且實驗人員的操作技術純熟度，對於細胞品質的優良與否，更是扮演著相當關鍵性的角色。因此，細胞庫憑藉著多年來豐富的細胞培養與品管經驗，特別新增提供初代細胞之服務項目，以嚴格的品質管控與實驗技術把關，提供給研發界一個取得優良品質之初代細胞的最佳管道來源。

因此，初代細胞的製作與提供，不僅為國內許多的研究人員解決了自行取得製備的麻煩，更為大家提供了一個更為便捷、高品質、高穩定度的細胞來源。而人類臍帶靜脈內皮

細胞(HUVEC)亦成為細胞庫於95年度應國內研究人員要求提供之最大需求量的細胞株。未來我們也將會繼續因應國內外的研究趨勢，持續開發迎合研究人員需求的各種初代細胞。

III. 人類胚幹細胞株TW1之提供

台灣第一株人類胚幹細胞株TW1，於2004年由工業技術研究院及李茂盛婦產科診所，遵循衛生署2002年公告之『胚胎幹細胞研究的倫理規範』建立完成。為國內第一例已經詳細鑑定分析，並經長期培養及冷凍解凍後，確認仍具有人類胚幹細胞特性之胚幹細胞株(圖2)。

細胞庫為促進台灣胚幹細胞研發能量，已引進此人類胚幹細胞株TW1，公開提供給國內研究單位進行學術研究。是目前國內第一株由國人自行建立，並且公開分讓提供作為研

究發展用途之人類胚幹細胞株。

現階段TW1細胞已在 *in vitro* 的培養系統中，連續繼代培養超過100個繼代數。且經鑑定分析確認細胞在長期培養後，仍具有人類胚幹細胞的特性，包括：高度的核質比例、鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)與端粒酶(telomerase)活性，以及未分化人類胚幹細胞特有之相關基因蛋白表現，例如：Oct-4、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81等。另外在胚幹細胞的分化

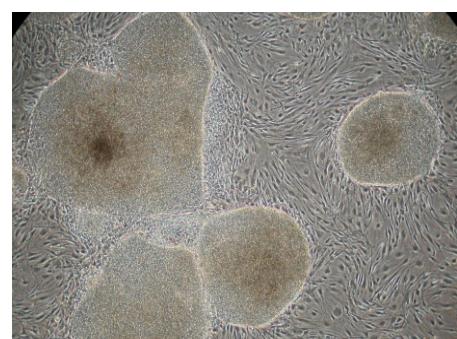


圖2、培養於飼養層細胞MEF上之人類胚幹細胞TW1(工研院提供)。

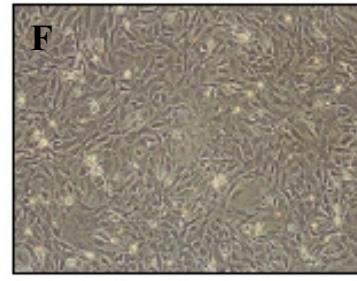
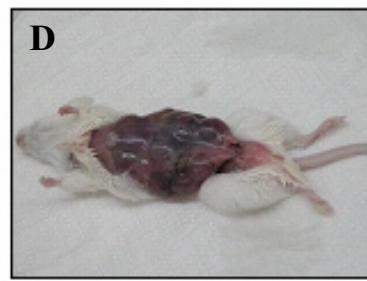
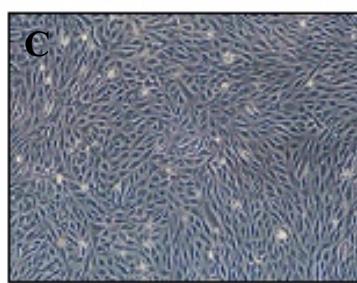
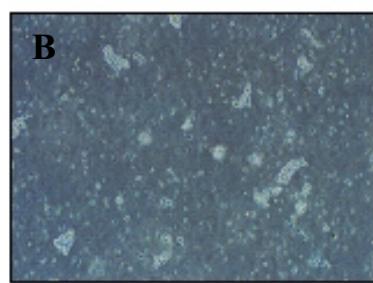
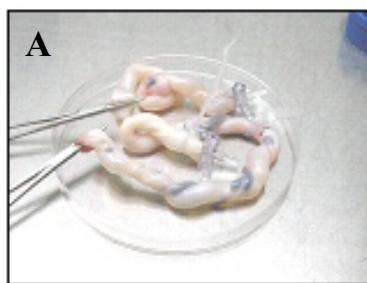


圖1、初代細胞的製作

A.新鮮臍帶 B.100倍視野下，臍帶靜脈沖出液 C. 100倍視野下之HUVEC型態 D.懷孕第12.5天之ICR母鼠腹腔 E.12.5天大之ICR鼠胚胎 F. 100倍視野下之MEF型態

能力方面，也已經證實TW1細胞具有分化成中、內、外胚層，以及在*in vivo*的活體動物試驗中可形成畸胎瘤(teratoma)的能力。至於在核型分析(karyotype)方面也證實，TW1細胞具有正常人類的23對染色體。

因此，TW1人類胚幹細胞為台灣第一例由國人自行開發建立的胚幹細胞株，而以台灣人種為基礎的胚幹細胞研究，相信未來不論是在生技研發或是臨床醫療用途上，都是具有其指標性的代表意義。

IV. 教育訓練課程

現今各種動物細胞的應用，儼然已成為生命科學界的研究當中最重要的一項工具。而優良的細胞品質，與正確的培養技術觀念，也是獲致成功的研發結果最重要的基石。因此，本所生物資源保存及研究中心為迎合並服務國內眾多研究人員的需求，每年皆會定期或不定期的舉辦各種與細胞培養相關的訓練課程或研習會，包括：基礎動物細胞培養訓練班、黴漿菌污染檢測研習會、人類胚幹細胞培養訓練課程以及造血幹細胞分離、鑑定與培養研

習班(圖3)等。課程囊括各種相關實驗技術的基本概念與原理介紹，以及實習操作課程，總計92至95年度期間參加人數累計已超過300人次。

由於目前在幹細胞的研究方面，國內仍是處於較為起步的階段。因此，為了提升台灣在人類胚幹細胞研究發展領域的基礎，食品所生資中心特別在94年度開始與工研院生醫所合作，舉辦台灣首次的『人類胚幹細胞訓練課程』，次年亦應學員要求加開班次。而自95年度起，本所也增設了『造血幹細胞分離、鑑定與培養研習班』。幹細胞相關的訓練課程內容主要著重在觀念的建立與實驗操作方面的實用性，參加的學員則是來自全台各地對於幹細胞相關研究有興趣的學界、產業界以及臨床醫學等研究單位。而這些課程不僅將幹細胞相關的正確培養技術和觀念，與國內各個有志於此的研究人員共同分享，更建立起彼此間合作溝通的一個橋樑管道。課後應眾多學員的要求，未來亦預計提供進一步的相關進階課程。而食品所舉辦幹細胞相關的研習訓練課程，相信必能為台灣將來在幹細胞方面的相關研究與產業發展上，提供一個技術與資訊並重的重要平臺。

V. 結語

本所生物資源保存及研究中心已率先於90年4月27日取得ISO 9001:2000國際品質管理驗證證書，通過國際品質管理與服務標準之驗證，為全球約490個菌種中心第一家獲得ISO 9001:2000認證之專業菌種中心，亦為第一個獲得ISO 9001:2000認證之專業動物細胞庫，對於作業標準和產品品質均已達國際品管之肯定。而細胞庫穩定的持續成長運行，提供了研究人員所需生物資源最為穩定且優良之細胞來源，對於國內生物科技的研究發展，著實有相當大的助益。

細胞庫數年來的實行運作期間，我們亦不斷的自我要求砥礪精進，以期為研究人員提供更佳的服務資源和品質。諸如細胞株的引進與提供、EB病毒轉染細胞株建立、教育訓練課程的舉辦、初代細胞之製作與提供以及建立半自動細胞液快速分裝系統等等，皆為提供更優良的生物資源與服務所努力的成果。進而使研究人員可以毫無後顧之憂的全力投入研究工作，為國內生物科技界的研究發展提供最佳的優勢，創造更大的研究價值，皆為我們精益求精，追求卓越的目標。



圖3、訓練班講課與實習課程剪影。

幹細胞之鑑定、保存與研發

生資中心／研究員
姚少凌

I. 前言

食品所生物資源保存及研究中心(簡稱生資中心)於民國85年由國家衛生研究院委託而設立國家細胞庫，成立迄今已超過十年的時間，保存量超過一萬一千種以上的細胞(包括了細胞株、癌細胞、轉形細胞與初代細胞)，細胞庫的使命除了快速、穩定的提供台灣產、學、研界品質優良的細胞外，近來更積極提昇細胞資源保存的種類，以及細胞資源應用的開發與研究，尤其是幹細胞資源的開發與研究，是為細胞庫當前最重要且前瞻的研究重心，筆者將藉由此篇簡訊，針對細胞庫近年來在幹細胞相關的研究成果上，做一個深入淺出的介紹。

II. 幹細胞簡介

在生命歲月中，組織與器官的損傷、衰竭、病變、以及遺傳疾病的發生，常常是無可避免所需要面對的問題，臨床上治療的方法包括移植(同種或異種)、外科修復、人工器官、機械裝置以及藥物治療等，目前仍難以完全修復損傷的組織與器官或是使其功能維持長時間的恢復，因此，科學家便將解決上述問題的希望寄託於幹細胞的研究。

1998年12月，美國約翰霍普金斯大學的John Gearhart實驗室和威斯康辛大學的James Thomson實驗室分別於 Proceeding of National Academy Science 和 Science 期刊同時發表有關於“人類胚胎幹細胞的體外培養”的研究。這些研究引起了生命科學界的衝擊，使的在20世紀後期，生命科學成為發展最為快速的學科之一。1999年 Science 雜誌評選「幹細胞研究的發現」為當年度世界十大科學進展成果之首，顯示了幹細胞研究的重要性，也開啟了幹細胞研究的熱潮。幹細胞最主要的市場是在醫學上的應用，包括了器官或組織的修復、替代與移植，以及藥物的開發與毒性測試等。幹細胞依照分化能力的差異，可分為全能性幹細胞(totipotent stem cell)，多能性幹細胞(pluripotent stem cell)與成體幹細胞(adult stem cell)，鑑於相關倫理道德的爭議與細胞來源取得的可行性，細胞庫選擇屬於成體幹細胞中的造血幹細胞與間質幹細胞為研究的對象，以下將分別介紹研究的成果。

II. 造血幹細胞的研究成果

造血幹細胞是指在骨髓、週邊血液或是臍帶血中具有下列能力的細胞：能自我更新，即細胞在分裂後的子代中，其中

至少一個子代細胞保持與未分裂前相同的特性，並且能不斷地分裂；能分化成多種特定的血球細胞；能從骨髓移動到周邊循環血液中以及回歸到骨髓中的能力。造血幹細胞是目前在臨床治療上的應用層面最廣泛，也是技術發展最成熟的幹細胞，然而應用上仍有細胞數量不足的瓶頸有待突破，因此細胞庫在92–95年的生物資源之創新加值與開發應用四年計畫(簡稱生資科專)中，提出了開發人類臍帶血造血幹細胞體外無血清增殖培養系統的子計畫，以符合 cGMP 與 cGTP 的標準為前提，開發人類臍帶血造血幹細胞的體外無血清培養系統，希冀能夠藉此解決臍帶血造血幹細胞移植時，細胞數量不足的問題。研究成果顯示開發出的培養系統能夠在七天的培養時間內，大幅增殖造血幹細胞達30倍，並檢驗其細胞表面抗原、細胞群落形成能力、細胞長期生長能力、端粒活性與動物移植試驗，確定該增殖後的細胞依然保有造血幹細胞的特性，並開發出個人化的放大培養系統，成功的建立造血幹細胞的分離、純化、培養、分析、保存與移植等一系列的完整開發系統，此外更藉由95年的創新前瞻計畫“癌症病人周邊血造血幹細胞體外無血清增值之評估試驗”，與台北榮總血液腫瘤科合作，進一步將該造血幹細胞體外無血清增殖培養系統擴展應用至週邊血液來源的造血幹細胞，進一步解決癌症病人治療後，採用自體週邊血造血幹細胞移植時，所面臨細胞數量不足的問題。

在完成造血幹細胞體外無血清增殖培養系統後，繼續以該系統為基礎，利用造血幹細胞具有快速分裂與多樣性分化的特性，繼續開發造血幹細胞的體外分化誘導系統，進一步專

一誘導大量增殖後的造血幹細胞分化為血小板前驅細胞(96-99年的生資科專計畫)或是自然殺手細胞(95-97年的國科會計畫)，血小板前驅細胞屬於骨髓系列的血球細胞，可透過移植以治療凝血不良或是提供患者補充體內血小板不足，取代傳統透過直接輸血來補充病人體內的血小板，並避免其缺點(例如：費用昂貴、血小板保存期限短(五天)、病毒與疾病的感染、及長期輸血會造成體內產生抗體，導致輸血無效等)，在治療血小板缺少症上更是具有前瞻之應用前景。自然殺手細胞則為淋巴系列的免疫細胞，具有不需透過抗原呈獻細胞(*antigen presenting cell*)的作用，即可獨立辨識並攻擊病原體的能力，移植自然殺手細胞可廣泛地應用於在癌症的治療，取代以外科手術、化學療法及放射線療法為主的傳統療法，並避免上述方式所造成的副作用與高風險的復發率，因此是為最具有發展潛力的免疫療法。目前研究的結果已初步證實增殖過後的造血幹細胞可成功的誘導為血小板前驅細胞與自然殺手細胞，且該誘導出的細胞在功能性上會較未增殖前所誘導之細胞為佳，目前細胞庫正積極的在開發各種特定血液或免疫細胞的無血清誘導培養系統，於未來將能提供快速、大量、安全、無污染且低成本的各種特定血液細胞來源，以供臨床治療與藥物篩選所用，突破醫療上的瓶頸，並提升醫療的品質。目前細胞庫所有相關的研究成果均於國際西文期刊(表1)，希望在未來能有助於進一步的應用於臨床的常規療法上(延伸閱讀：請參考筆者的文章，“活躍的造血幹細胞”，科學發展月刊 2007; 414:12-17)。

http://www.nsc.gov.tw/newfile/s/popular_science.asp?add_year=2007&popsc_aid=77&page=2。

IV . 間質幹細胞的研究成果

間質幹細胞是負責中胚層細胞生長與分化的細胞群，最早是1976年由 Friedenstein等人發現骨髓中含有大量的間質幹細

胞，並證明這些存在於骨髓的細胞具有可快速分裂以及分化為骨骼、軟骨、脂肪、肌腱與肌肉的特性。最近的研究甚至發現間質幹細胞具有跨胚層分化的能力，可分化為肝臟細胞、神經細胞與心肌細胞等，此外，亦有研究指出，間質幹細胞具有調節免疫反應的能力，在進行器官或造血幹細胞移植時，同時移植間質幹細胞

表1、生資中心近年所發表幹細胞相關之期刊論文

期刊	年份;卷期:頁數	題目
造血幹細胞		
Stem Cells Dev.	2007 (Accepted)	Generation of natural killer cells from serum-free expanded human umbilical cord blood CD34 ⁺ cells
Stem Cells Dev.	2006;15:70-80	Characterization of serum-free ex vivo-expanded hematopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood CD133 ⁺ cells
Exp Hematol.	2005;33:1273-4	Systematic strategy approach in medium design
Exp Hematol.	2004;32:720-7	A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells
Enzyme Microb Technol.	2003;33:343-52	Factorial designs combined with the steepest ascent method to optimize serum-free media for ex vivo expansion of human hematopoietic progenitor cells
間質幹細胞		
Biochem Eng J.	2007;33:1-9	Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells
Cell Biol Int.	2006;30:495-9	Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood
Stem Cells	2006;24:679-85	Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood
Gene therapy	2006;13:1471-9	Baculovirus transduction of human mesenchymal stem cell-derived progenitor cells
Biomaterials	2006;27:5409-19	Porous acellular bovine pericardia seeded with mesenchymal stem cells as a patch to repair a myocardial defect in a syngeneic rat model
Biol. Reprod.	2006;74:545-51	Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells
Cytokine	2005;32:270-9	Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood
J. Gene Med.	2005;7:860-8	Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells
Hum. Reprod.	2004;19:1450-6	Isolation of human multipotential mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol

能夠降低免疫排斥的反應，提升移植的成功率。雖然目前對於間質幹細胞的跨胚層分化能力仍有所爭議，但是在組織工程與再生醫學上的應用，間質幹細胞仍是最熱門的研究標的。在開發各種幹細胞來源的方面，細胞庫目前已可從不同物種間(人、豬、老鼠等)的各種組織中(骨髓、臍帶血、臍帶、胎盤、羊水、羊膜等)，建立了間質幹細胞的分離、純化、培養與保存系統，並完成特性分析與誘導能力的測試，增加幹細胞庫保存的多樣性，同時目前所有的研究成果亦發表於國際西文期刊上(表1)。此外，有鑑於間質幹細胞於未來臨床應用上的前瞻性，細胞庫亦積極開發人類間質幹細胞的無血清培養基，藉由人類造血幹細胞體外無血清培養基開發的經驗，進而開發出符合臨床使用標準的間質幹細胞增殖系統，希冀能加速人類幹細胞於臨床上的應用。

V. 結語

經過多年來的研究與臨床試驗，幹細胞已被人們所逐漸瞭解，也將會是應用最廣的細胞。一直至今，幹細胞依然不斷的有著快速的突破與發展，也為許多新的臨床治療奠定了良好的基礎，甚至帶動了許多新興產業的出現。食品所生資中心在經濟部科專計畫的支持下得以進行幹細胞相關的研究，細胞庫的研究同仁也期許能在幹細胞的領域下繼續努力，協助帶動台灣幹細胞研究、醫療與產業的發展，也為人類的健康帶來更好的保障。

細胞培養周邊設備創新取代方案

生資中心／副研究員
葉慧蓉

細胞培養在生命科學與臨床醫學研究上佔有越趨重要的地位，在新藥開發、反應機制、毒性試驗等領域，常常是藉由細胞生長實驗以預測結果，同時藉此取代大量實驗動物的使用。良好的細胞冷凍保存程序，是維持研究成果再現性與持續性的基礎。目前細胞是透過冷凍保存來達到長期的保存，傳統的細胞冷凍保存過程是將細胞大量培養後，分裝於冷凍小管，利用程式降溫儀以每分鐘約降溫 1°C 的速度，將溫度降到 -80°C ，再迅速移至液態氮中長久保存。然而在目前這樣的冷凍保存過程中，常遭遇到的問題有：1. 大量細胞分裝時均勻度與時效性問題、2. 程式降溫儀昂貴與使用上需要大量液態氮充填問題、以及3. 液氮槽氣態儲存空間不夠的問題。針對上列細胞冷凍保存所遭遇到的問題，細胞庫目前已建立半自動胞液快速分裝系統、程式降溫儀取代方案以及冷凍封膜機等產品加以解決，茲分述如下：

I. 建立半自動細胞液快速分裝系統

這項系統主要是在進行大量細胞分裝時，解決細胞分裝不均勻與分裝速度過慢的問題。傳統上細胞的分裝是利用無菌

吸管手動分裝，然而有著耗時，且分裝後批次間細胞濃度差異過大的缺點，由於細胞濃度會影響解凍活化後細胞生長的狀況，有鑑於此，細胞庫利用市場上現有之分裝系統—Unispense® μ P Microprocessor Controlled Dispenser，再加以進一步的設計改良—外加細胞懸浮液承裝瓶(血清瓶內附攪拌子)、鐘型罩與管線，建立了一套半自動細胞液快速分裝系統。

這套系統的建立，不僅操作簡單方便，且可以在細胞液的分裝上達到更精確的定量分裝，透過攪拌子低速攪拌以達到細胞分裝的均勻度，更可以縮短大量細胞液分裝時所耗費的時間，並減少操作時可能的污染發生機率，為研究人員提供品質及穩定度皆為更佳的細胞品質。

II. 程式降溫儀取代方案之建立

程式降溫儀售價昂貴，且需使用液態氮充填方能達到快速降溫的效果，實驗室一般不會常備該儀器。然細胞冷凍保存的過程，對後續細胞存活率與型態特性有著深遠的影響。目前市面上除了程式降溫儀外，尚有Nalgene出品的Mr. Frosty，它是利用Isopropanol於 -80°C 冰箱內具有緩慢降溫的特性，而

達到與程式降溫儀類似的效果。由於保麗龍盒亦具有降低熱傳導與熱穿透的特性，基於此，我們想將細胞庫平日寄送細胞的保麗龍盒，開發出新的用途，於是便進行保麗龍盒、Mr. Frosty與程式降溫儀之細胞冷凍保存的測試(圖2)。

在此，我們利用3T3-L1細胞對溫度敏感以及其可誘導分化成脂肪細胞的特性來進行實驗分析。經過一個月液態氮保存後，進行細胞凍後存活率及細胞特性分析，結果顯示保麗龍盒、Mr. Frosty與程式降溫儀的凍後存活率均大於85%，並且經過七天分化誘導，不論是以何

種方式進行冷凍保存的3T3-L1細胞，均可以成功的分化成脂肪細胞。

食品工業發展研究所目前所使用於細胞運送的保麗龍盒，除了運送細胞外，目前我們已成功地開發出其新的用途：可將之應用於細胞進行冷凍保存時的新工具，其操作簡單，只需-80°C冰箱便可完成。並可同時解決程式降溫儀昂貴以及Mr. Frosty容量小與需大量使用Isopropanol不環保的問題，為研究人員提供更簡便且便宜的細胞冷凍降溫方法新方案。

III. 冷凍封膜機之開發

長時間的儲存細胞，正規的作法是將細胞置於液態氮上層的氣相層中保存，然而許多實驗室因液態氮槽空間有限，與液態氮一次充填多一點，可減少充填次數與液態氮損失等等因素，導致很多實驗室都將細胞冷凍管浸置於液態氮中儲存。但若大家仔細看我們平常使用的冷凍小管，包裝上面都會寫：“Storage by immersion in liquid nitrogen is not advised” (NALGEN Co.)與“Do not use cryogenic vials for storage in the liquid phase of liquid nitrogen” (CORNING Co.)等，來提醒使用者勿將冷凍小管浸置於液態氮中。主要是因為浸置於液態氮中常常會導致液態氮的滲入，而液態氮並非無菌，隨著液態氮在冷凍小管之間的流動，可能會造成細菌、黴菌等汙染，更甚者造成細胞種間的汙染；且由於液態氮的存在，可能會導致操作人員在解凍冷凍小管時，液態氮因迅速加熱汽化成氣態，體積瞬間膨脹而釀成氣爆之危險。

為了在節省空間、降低成本與零污染、安全性之間作個平



圖1、半自動細胞液快速分裝系統



圖2、A：冷凍細胞運送之保麗龍盒；B：Mr. Frosty；C：程式降溫儀

(<http://www.nalgenelabware.com>)

衡，我們設計了冷凍封膜機解決上述的窘境。我們利用一種市售特殊熱封膜(NUNC Co.)遇熱會收縮的特性，將之剪一小段套在冷凍小管頸部縫隙處，置於冷凍管封膜機隔熱基座，經過不斷旋轉(熱均勻)、上升至定位後、熱風、冷風交替吹送，達到完整封膜的效果(圖3)。

完成熱封膜的冷凍小管，將之浸置於液態氮中保存一個禮拜後，分別進行細胞凍後存活

率及細菌黴菌污染測試，我們分別測試了三株細胞：Vero、K562與NS0，其凍後存活率均大於80%，與沒有進行封膜的冷凍管並沒有顯著差異。而在細菌污染檢測方面經過熱封膜封口的冷凍管，均沒有污染，而未經熱封膜封口的冷凍管則有20%的污染率。證實經過冷凍封膜機封膜的冷凍小管即使浸置在液態氮中儲存，也可以完全地避免液態氮滲入。

冷凍封膜機已經發展出第一

代與第二代雛形機(圖4)，這兩者的差別在於第二代比第一代更為輕巧，封管的速度也較快。目前冷凍封膜機已經獲得日本、台灣、澳洲、韓國、大陸及英國等多國的專利。相信在不久的將來，便可量產，替研究學者門解決儲存空間不夠與液態氮滲入冷凍小管中的問題，並可以避免解凍細胞時氣爆的危險。

細胞庫除了本著提供優良無污染的細胞給研究學者使用外，目前已建立半自動胞液快速分裝系統、程式降溫儀取代方案以及冷凍封膜機等產品，以簡便並便宜的方式，替大家解決細胞保存上所遭遇的問題。未來將會繼續研發細胞周邊相關的產品，以提供更便捷系統以服務各位研究學者。

參考文獻

Chen H. I., Tsai C. D., Wang H. T. and Hwang S. M. Cryovial with partial membrane sealing can prevent liquid nitrogen penetration in submerged storage. *Cryobiology* 2006; 53: 283-287.



圖3、冷凍小管封膜圖示



圖4、冷凍封膜機第一代(左)與第二代(右)雛形機。

Epstein-Barr病毒轉型人類B淋巴球細胞株之建立與應用

生資中心／助理技師
呂欣怡

I. 前言

隨著生物醫學領域的發展，加上人類基因體計劃於2003年的基因體定序完成，遺傳學家提供我們比以往更多不同的疾病訊息，幫助我們在後基因體時代進行更深入的致病機轉研究；如同諾貝爾獎得主Sydney Brenner所表示的：「接著人類基因體計畫之後，我們的下一個任務是去研究族群間甚至是個體間的遺傳差異」。亦即，從單一個體的研究轉變成對整個族群的研究，目前世界上許多國家都已積極參與生物資料庫的計劃，因此若能建立一個屬於台灣地區本土的資料庫，結合基因與其他醫學資訊，針對本土常見疾病進行大規模的世代研究，以瞭解國人常見疾病的致病因子與機轉，將助於改善治療與預防策略，降低醫療成本，達成促進國人健康的目標。

生資中心於2002年開始與中央研究院生物醫學科學研究所合作，建構“台灣人群特定疾病遺傳資源細胞庫”，並於同年建立完成符合無塵室1,000等級規格之血液分離與EB病毒轉染人類血液B淋巴球細胞標準實驗室(圖1)，以及細胞冷凍儲存

設備。

Epstein-Barr virus (EBV) 轉染目前已被廣泛應用在建立人類B淋巴球細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)上。LCL能源源不絕的提供各種臨床或遺傳實驗所需的實驗材料。B淋巴球細胞帶有EBV的受體，EBV會專一性的感染B淋巴球細胞(圖2)。感染後的B淋巴球細胞之基因表現因為受到EBV感染而有所改變(Carter *et al.* 2002)。這些基因表現的改變，包括了端粒酶(telomerase)的活性增加(Kataoka *et al.* 1997)及 p53基因的突變

(Sugimoto *et al.* 2004)。這些變化都會使得以受感染的B淋巴球細胞具有旺盛的增生能力，所以利用這項特性，便可以在實驗室中持續的增殖培養B淋巴球細胞。細胞庫累積五年多的相關經驗，B淋巴球細胞轉染之成功率可達 95%以上，並將其研究成果於 2006 年發表於國際 SCI 期刊 Cell Proliferation，同時研究發現由血液分離出的B淋巴球細胞(freshly isolated lymphocytes)立刻進行EBV 轉染後，約需30天轉染成B淋巴球細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)，但經冷凍保存後再重新解凍進行轉染的B淋巴球細胞所需要的轉染天數則約36天，此外，細胞轉染時的密度與存活率，以及細胞冷凍保存的時間與解凍後的細胞存活率，都是影響冷凍保存後的B淋巴球細胞所需轉染時間的主要因素。

目前生資中心更積極持續的



圖1、血液分離與EB病毒轉染人類血液B淋巴球細胞標準實驗室

發展改善EBV轉染相關技術，例如利用自動化的操作流程縮短操作時間或更進一步提升轉染成功率，期望能夠提供國內各研究室保存更多珍貴的人類B淋巴球細胞株的管道。

參考文獻

- 1.Carter KL, Cahir-McFarland E, Kieff E. 2002. Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *J Virol* 76(20):10427-36.
- 2.Chang IC, Wu JY, Lu HI, Ko HW, Kuo JL, Wang CY, Shen PS, Hwang SM. 2006. High-potentiality preliminary selection criteria and transformation time-dependent factors analysis for establishing Epstein-Barr virus transformed human lymphoblastoid cell lines. *Cell Prolif* 39(6):457-69.
- 3.Kataoka H, Tahara H, Watanabe T, Sugawara M, Ide T, Goto M, Furuichi Y, Sugimoto M. 1997. Immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity. *Differentiation* 62(4):203-11.
- 4.Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y. 2004. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* 64(10):3361-4.
- 5.<http://www.twbiobank.org.tw/content/application/biobank/homepage/index.php>

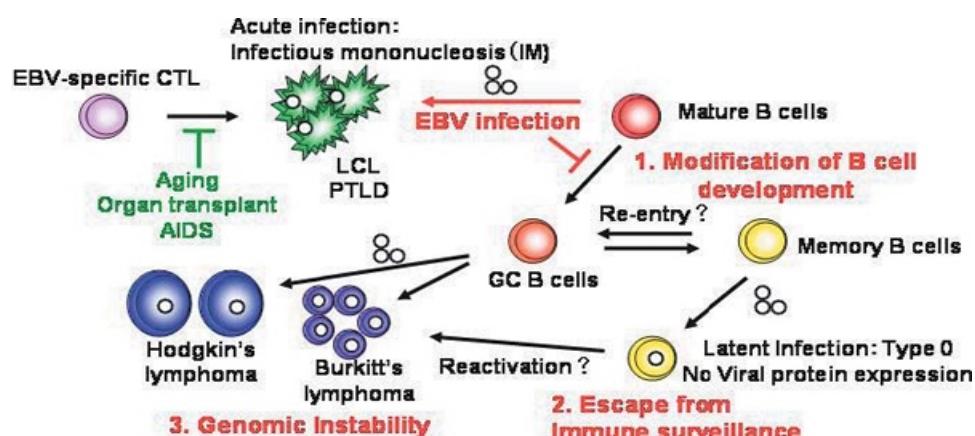


圖2、EBV轉染B cell的流程圖
(http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_kikutani_e.php)



圖3、A：血液細胞庫房管理系統；B：血液細胞庫房

審定公告之專利寄存生物材料

資料範圍自96年7月至96年9月

專利名稱關鍵字/公告號	寄存生物材料名稱	BCRC編號	專利申請人
促進排除戴奧辛用劑 / I280134	<i>Caldothrix satsumae</i> YMO81	910277	可爾必思股份有限公司(日本)
超級分泌麵包酵母菌株 / I282367	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NI-C-D4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DP1	920020 920021	中央研究院
新穎微生物株及治療過敏相關疾病用途 / I284149	副乾酪乳桿菌(<i>Lactobacillus paracasei</i>)GMNL-32	910220	景岳生物科技股份有限公司

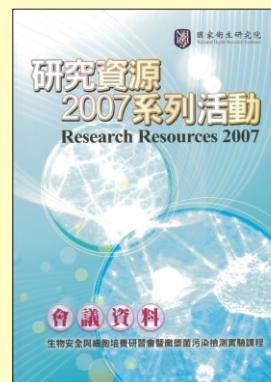
- 說明：1.上述生物材料為申請專利而依有關專利申請之生物材料寄存辦法寄存於食品所，相關專利已審定公告，其專利名稱之關鍵字、專利公告號及專利申請人資料如上表。
 2.任何人可依有關專利申請之生物材料寄存辦法第十七條向食品所申請提供上述生物材料，作為研究及實驗用。
 3.洽詢專線：(03)5223191 轉 233 或 513。

給細胞使用者的一封信

依據美國標準菌種中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 之使用說明，若客戶之細胞並非直接由ATCC提供，則在任何情形下需說明細胞之來源時，不可引述來自ATCC，亦不應直接使用ATCC之細胞編號。若您的細胞直接來自本所生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)，則在說明細胞來源時，應使用食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，並使用BCRC細胞編號，其細胞相關之品管資料亦由BCRC負責。若有任何疑問，歡迎來電 03-5223191 分機 577 或 email: bcrcweb@firdi.org.tw 詢問。

細胞相關研習會訊息

生物資源保存及研究中心九月份分別舉辦二場大型研習會：一為9月7日配合國家衛生研究院研究資源2007系列活動生物安全與細胞培養研習會暨黴漿菌污染檢測實驗課程，地點為竹南國家衛生研究院，參加人數達到235人；另一為9月21日與台灣康寧 (Corning International Taiwan) 合辦之Skill and Techniques of Cell Culture，地點為臺大醫院國際會議廳，參加人數達到240人。會後反應極為良好，希冀生資中心能有類似之教育訓練課程，服務更多之研究人員和學生。



生物資源保存及研究簡訊 第71期

發行者：財團法人食品工業發展研究所
 發行人：劉廷英所長
 主編：陳倩琪
 編輯：劉桂郁、黃麗娜
 王培銘、姚少凌
 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)522-3191-6
 傳真：(03)5224171-2
 承印：彥光打字印刷商行
 電話：(03)530-1116
 ISSN:1021-7932
 GPN:2009001214

