



存誠 創意 務實 競爭

環球科技大學
TransWorld University

102-103 年度教學卓越計畫

結合企業實習推展主題式專題研究成果報告

分項計畫名稱：導入師徒制精神，深耕學生職場競爭力

工作編號：B-1-2-11

工作名稱：結合企業實習推展主題式專題研究

執行單位：環球科技大學健康學院、生物技術系

中華民國 102 年 10 月 31 日

目 錄

一、成果自評	2
二、活動企劃	3
(一) 工作項目基本資料	3
(二) 工作內容描述	3
三、執行內容	5
(一) 活動與系所辦學特色關聯表	5
(二) 報名清冊	6
(三) 課程資料 (講義、教材、簡報)	6
(四) 簽到表影本	30
四、成果與檢討	32
(一) 預期目標達成情形	32
(二) 活動滿意度分析	32
五、附錄：4 海報、指導記錄表、相片	34

一、成果自評

分項計畫名稱	導入師徒制精神，深耕學生職場競爭力		
工作編號	B-1-2-11	工作名稱	結合企業實習推展主題式專題研究
人員參與情形	校內同仁： 1 人	校外同仁：4 人	
	校內學生： 10 人	校外學生： 人	
	其他(職員)： 人	總計參與人數	共___15___人
執行成果			
預定成效	質化	結合產業實務研究，培養學生專題技巧	
	量化	完成兩件以上主題式專題研究報告	
實際成果	質化	訓練學生實務專題能力、實驗操作技巧及報告撰寫能力。並於2013年生物醫學聯合學術研討會發表專題有『台灣欒樹萃取物抗氧化及美白功效評估』，2013彰雲嘉聯盟暨學術研討會發表專題有『蘭花萃取物抗氧化活性』	
	量化	共計有 10 位學生參與專題訓練，並有 3 位學生完成研討會論文發表，共計兩篇主題式專題研究報告	<input type="checkbox"/> 超越目標_____ % <input checked="" type="checkbox"/> 達成目標 <input type="checkbox"/> 未達成目標，請說明： _____

二、活動企劃書

(一) 工作項目基本資料：

工作編號	B-1-2-11	預訂完成日期	102/10/31
工作名稱	結合企業實習推展主題式專題研究		
負責人姓名	蔡佳芳	校內分機/手機	8261/
E_MAIL	tsaicf@twu.edu.tw		

(二) 工作內容描述：

1.現況或需求分析：

(1) 本系教學培育目標主要為培育健康科技產業技術實務人才，職涯進路規劃學生的發展方向有精緻農業和健康產業，進而結合農業生技與生技醫藥的研究發展，以提供本系學生扎實的學習進路，以期能契合產業相關需求。

(2)健康產業導向發展目標是生技發展的潮流，加上政府提倡預防保健的觀念，促進健康保健產業的蓬勃發展，因此我們將著重於生技化妝品原料開發與植物萃取新產品開發，並著力於檢驗分析技術及安全性與功效性評估模式技術的訓練與精熟。

2.辦理單位：生物技術系

3.活動地點：光璧企業股份有限公司、麗澤生技股份有限公司、環球科技大學

4.預計參加人數：5人

5.活動時間：102年03月01日至102年10月31日

6.活動時程及任務分配表

預定完成日期	任務名稱	責任者	備註
102/10/31	杜莎藻對肝細胞氧化性損傷的保護機制	蔡佳芳	
102/10/31	玉蘭花萃取物美白及抗氧化功效評估	蔡佳芳	

三、執行內容

(一) 活動與系所辦學特色關聯表

活動名稱	結合企業實習推展主題式專題研究		
承辦單位	生物技術系	辦理時間	102/03/01-102/10/31
活動重點 (請簡述活動內容及重點)	<p>藉由結合產業專長，輔導學生進行專題研究，本次專題研究合作企業有麗澤生物科技股份有限公司及光璧企業股份有限公司。麗澤生物科技股份有限公司主要著重於金線蓮栽培、化妝品產品開發及生技飲品，該公司於 2012 年聘請本系蔡佳芳老師擔任顧問，並於 2013 年進行產學合作，希望能透過學術單位開發新天然物成為化妝品的原料。光璧企業股份有限公司位於雲林縣斗六工業區內，是台灣早期從事藻類培養的專家，該公司在綠藻及杜莎藻培養的技術非常好，藻類品質佳，並進一步作成保健食品，本次專題之一就是利用富含類胡蘿蔔素的杜莎藻進行延緩肝癌細胞生長的材料。</p> <p>生技系學生均需於三年級進行專題實務，因此學生從二年級就參與實驗，學習基礎實驗技巧，從天然物萃取、抗氧化分析，細胞培養到動物實驗操作，經過半年的訓練，並邀請企業專家、學者等進行理論與實物教學，培養學生專題精進的技巧與報告撰寫的能力，並於年度研討會進行發表，進而將實驗數據投稿發表。</p>		
系所發展特色 (請依據貴單位中長程發展計畫或核心本位課程計畫書規劃內容說明)	<p>本校位於雲林縣，發展基礎與前景都與雲林縣直接相關，雲林縣是以農業為主的大縣，本系為配合政府六大新興產業政策，加上本校附近農業試驗所花卉中心的優質人力與研發資源，採「精緻農業(農業生技)」為發展基礎，進而發展「健康產業(醫藥生技)」領域。</p> <p>本系教學的培育目標為「培育健康科技產業技術實務人才」，學生必須具備之「專業核心能力」，以「製造技術模組、品保技術模組」為訓練基礎，發展「精緻農業」與「健康產業」二大類的學生職涯進路，讓學生清晰明瞭所學知識與技術種類；同時，以「產業需求」的技職教育特色，本系將學士班「精緻農業」結合碩士班「農業生技」的研究開發，將學士班「健康產業」結合碩士班「生技醫藥」的研究發展，提供為本系學生初階與進階的學習徑路。</p>		
關聯度	<input checked="" type="checkbox"/> 高度關聯 <input type="checkbox"/> 中度關聯 <input type="checkbox"/> 低度關聯		
填表人	蔡佳芳	單位主管	徐菱松

(二)專題生名單

年級	學號	姓名
生技所二甲	100751106	許玉蓮
生技所二甲	100751107	王信生
生技四甲	99451131	黃子軒
生技三甲	100451131	丁妙玲
生技三甲	100451139	吳佳螢
生技三甲	100451104	王理偉
生技三甲	100451119	邱桂森
生技三甲	100451129	顏洋濱
生技三甲	100451142	黃敬荃
生技三甲	100451155	張家威

(二)課程資料

1.杜莎藻簡介

杜莎藻 (*Dunaliella*) 為帶有兩條鞭毛的單一細胞綠藻，由 Teodoresco 於 1905 年提出並以首先發表此藻類的 Dunal (1837 年) 來命名。杜莎藻在分類學上歸類於綠藻綱、綠藻門、杜氏藻屬；其中以 *D. salina* 和 *D. tertiolecta* 品種最被為廣泛研究，又 *D. salina* 可以累積大量的類胡蘿蔔素於藻體內，深具經濟價值，是最早被提出可做為 β -胡蘿蔔素商業量產的來源 (Massyuk, 1966 年)。

杜莎藻細胞表面沒有纖維素構成的細胞壁，而是一層薄而復有彈性的細胞膜，因而細胞的形狀和大小常常隨著週遭環境，尤其是滲透壓的變化而有不同的形狀，呈球形、卵圓形、橢圓形、葫蘆形、紡錘形等多種形狀，直徑只有十幾個微米。細胞內部有一個大的杯狀葉綠體。藻體一般為綠色，但在高溫、高光照和養分缺乏的情形下，葉綠體的外緣和類囊體片層間會累積大量富含類胡蘿蔔素的中性脂質小體，使藻體變成黃色、橙色或紅色。

杜莎藻有著很大的適應性，不僅在高鹽度日曬場的蒸發池和結晶池中有分布，在鹹水湖、海水或是淡水環境都有分布。杜莎藻是一種光能轉化率高、生長繁殖快速的單一細胞綠藻，其綠藻內存在的初級或次級代謝產物，不但結構特殊，而且具有多種生理活性。自 20 世紀的 60~70 年代，人們就開始採用生物技術萃取藻體中的生物活性物質，製造保健食品。目前有以色列、澳洲、日本以及台灣光壁在杜莎藻研發上均有成效。在自然界環境，*D. salina* 生存在鹽水湖泊或鹽水環境中；但是在這樣的環境下所培養的杜莎藻會與其他大量的海水浮游生物同時存在，因此無法生產出單一純淨的杜莎藻體產品。其中光壁企業量產的杜莎藻是經由專業人員的選種、純化和單一菌種高純度培養條件下，再經過嚴格的品管流程所生產的產品，使杜莎藻可在藻體內累積高達 6% 以上的類胡蘿蔔素，其中包括 β -胡蘿蔔素、 α -胡蘿蔔素、葉黃素及玉米黃素等多種天然胡蘿蔔素； β -胡蘿蔔素含量可高達每 100 公克含有 7660mg，相當於紅蘿蔔含量的 500 倍，而這是自然野放環境以及人工合成無法提供的胡蘿蔔素品質。胡蘿

蔔素是抗氧化劑的傑出代表，可以抑制氧自由基與正常細胞的結合，避免正常細胞被傷害；胡蘿蔔素是維生素 A 的前驅物，能通過轉化為維生素 A 發揮更多的作用。目前全世界 β -胡蘿蔔素每年的總產量在 600 公噸以上，並以每年一至二成的增加率持續成長。 β -胡蘿蔔素擁有與維生素 A 相同的效用，但不同的是維生素 A 攝取過量會造成中毒現象。杜莎藻比胡蘿蔔提供更多的天然胡蘿蔔素，所含的胡蘿蔔素具有含量高、種類多、結構優良、容易吸收等優點。

以下簡述 β -胡蘿蔔素的保健作用

β -胡蘿蔔素首次被發現是在西元一八三〇年，當時研究人員從胡蘿蔔中分離出一種黃色色素，將其命名為 β -胡蘿蔔素；但直到西元一八四九年，科學家才將進入人體體內的 β -胡蘿蔔素如何轉換成維生素 A 的機制確定，也釐清 β -胡蘿蔔素不等於維生素 A，而是可以轉換成維生素 A 的前驅物。 β -胡蘿蔔素富存於胡蘿蔔、菠菜、南瓜等黃綠色蔬菜中； β -胡蘿蔔素可以在體內轉化成維生素 A，以維生素 A 的前驅物進行作用及抗氧化等作用。

一、 β -胡蘿蔔素是抗氧化劑的傑出代表

胡蘿蔔素被稱為氧化防護劑，其基本作用是清除氧自由基，即抗氧化作用。胡蘿蔔素抗氧化作用的原理是胡蘿蔔素本身與氧自由基結合，抑制氧自由基與正常細胞的結合，避免正常細胞被氧化傷害，在防止正常細胞癌變和降低動脈硬化等疾病的發病率也發揮重要作用。

二、 β -胡蘿蔔素的多種作用

1. 防治心血管疾病

血液中的有害膽固醇含量越高時，罹患心血管疾病的機率也越大。滯留在人體細胞壁的脂肪，只有在與氧元素反應後，才變成有害的膽固醇。 β -胡蘿蔔素是優秀的氧化防護劑，能有效的阻止脂肪氧化為有害膽固醇，進而防治心血管疾病的作用。

2. 抑制腫瘤

β -胡蘿蔔素在防治腫瘤上，尤其對食道癌、肺癌、淋巴癌、子宮頸癌等多種癌症有明顯的療效，人體攝入 β -胡蘿蔔素的多寡也影響著癌症的發病率。日本京都府醫科大學的西野輔翼教授領導的研究團隊，多年來致力於 β -胡蘿蔔素的臨床試驗，該研究利用 α -胡蘿蔔素、 β -胡蘿蔔素、蕃茄紅素、 α -維生素 E、綠茶萃取物等類胡蘿蔔素複合製劑，以 186 位實驗對象進行四年投予與無投予差異性的追蹤調查，結果顯示從實驗後的第三年起癌症累積發生率的差別已經擴大；到第四年差別已經達到投予組的癌症發生率是沒有投予的三分之一。在第六十三回日本癌症學會上日健總本社，田中紀念研究所報告了使用從微細藻類萃取的多醣體及天然 β -胡蘿蔔素進行動物實驗，證實對惡性腫瘤的細胞增生有抑制作用；同一實驗也指出 β -胡蘿蔔素對大腸腫瘤及胃癌的發生有抑制作用。 β -胡蘿蔔素抗癌機制尚未確定，有可能的機制有三，一是 β -胡蘿蔔素轉化為維生素 A，二是 β -胡蘿蔔素本身或其代謝產物具有維生素 A 同樣的作用，三是 β -胡蘿蔔素充當了氧自由基的消滅劑。

3. 提高人體免疫力

動物實驗證實杜莎藻能顯著提高人體免疫力，其作用與其抗氧化、清除自由基的功能有關，即通過保護巨噬細胞的細胞膜受體，使之不受氧化，提高巨噬細胞對抗原的識別能力。免疫學研究證實腫瘤患者的免疫監視功能和自然殺手細胞活性均顯著低於正常人，一些抗腫瘤藥

物在抗腫瘤的同時，也抑制了患者本身的免疫力，杜莎藻胡蘿蔔素能增強人體的免疫力，可用於腫瘤的預防和輔助治療。

4. 抑制酒精性肝臟疾病

有研究顯示 β -胡蘿蔔素具有抑制酒精性肝臟疾病的功效，科學家針對平時不得不應酬喝酒的人進行實驗，結果發現讓這群人在「拼酒」前吃深色蔬菜、喝胡蘿蔔汁，可以降低酒精性脂肪肝發生的風險。也有文獻指出長期或過量攝取酒精的人，肝臟中維生素 A 及 β -胡蘿蔔素的含量會降低，且降低程度和酒精攝取量有相關，而低維生素 A 及 β -胡蘿蔔素可能是加速脂肪肝生發的原因之一。 β -胡蘿蔔素確實能減少細胞內膽固醇的生成量，加上其具有抗氧化能力，研究人員透過動物實驗和人體試驗證實， β -胡蘿蔔素能改善飲酒過量的老鼠和人體的酒精性脂肪肝。

台北醫學大學保健營養系在 2003 年曾經進行動物實驗，將老鼠分成控制組、酒精組及 β -胡蘿蔔素添加酒精組，每組八支餵養，十週後犧牲，結果發現 β -胡蘿蔔素添加酒精組的肝臟重量，比酒精組少了 16%，而比較肝臟中的脂肪含量，酒精組比不沾酒的控制組，其膽固醇及三酸甘油酯分別增加了 73%、33%，也比 β -胡蘿蔔素添加酒精組分別多了 38%、20%。這三組老鼠肝臟中 β -胡蘿蔔素及維生素 A 濃度， β -胡蘿蔔素添加酒精組，在肝臟中可偵測到 β -胡蘿蔔素的存在，且該組肝臟中的維生素 A 含量，也比另兩組顯著增加。因此老鼠於長期補充 β -胡蘿蔔素後，仍可完整將 β -胡蘿蔔素吸收，和腸道中轉化成的維生素 A，一同儲存於肝臟中，而補充 β -胡蘿蔔素後，也降低酒精對肝臟細胞的傷害。

5. 改善人體視覺功能

人眼睛看到圖像的過程是由物體先在眼睛的視網膜上成像，再轉化為神經衝動傳入大腦。這個過程需要一種光敏感物質，即視紫紅質。長時間注視電視、電腦螢幕，容易造成視紫紅質的大量消耗，導致視力下降，要恢復視力必須使視紫紅質恢復正常量。由於視紫紅質由維生素 A 和視力蛋白組成，血液中的維生素 A 充足時，能參與視紫紅質的合成。 β -胡蘿蔔素是維生素 A 的前驅物，攝取足夠的 β -胡蘿蔔素，可以達到人體對維生素 A 的需求。另外適量補充維生素 A 或 β -胡蘿蔔素可以有效預防夜盲症、乾眼症、近視眼、弱視等眼疾的發生。

6. 預防口腔疾病

β -胡蘿蔔素和杜莎藻也可以改善口腔潰瘍的症狀。還有預防口腔癌的作用，口腔癌患者的口腔內可發現微核細胞，研究結果顯示補充 β -胡蘿蔔素後，大多數患者口腔黏膜內的微核細胞減少。美國亞利桑那大學進行臨床研究結果顯示，給予 25 名患有口腔白斑的吸菸者每天口服 30mg 的 β -胡蘿蔔素，有 75% 的受試者口腔內的癌前白斑消失，癌前病變產生逆轉。

7. 減少輻射危害

以色列對 1990~1994 年來自前蘇聯切爾諾貝利核事件產生核能洩漏事故的 709 名兒童服用杜莎藻，結果顯示出良好的抗輻射效果。

8. 抗紫外線的作用

日本德島大學研究所的南裕子研究團隊進行動物實驗，發現經口攝取 β -胡蘿蔔素對紫外線 (UVA) 所造成的皮膚氧化傷害有減緩的效果； β -胡蘿蔔素可以消去活性氧促進細胞再生，並且對被 UVA 照射後皮膚所產生的單重態氧有捕捉消去的效果。

9. 防治缺血性貧血

中國大陸天津市保健所給予 651 位學齡前兒童進行三個月的口服 β -胡蘿蔔素臨床試驗，結果顯示所有實驗對象在維生素 A 水平提高的同時，血紅蛋白和血清蛋白也隨之提高，紅血球內的游離原卟啉則明顯下降，也就是說天然 β -胡蘿蔔素對鐵的代謝和儲存有良好的促進作用，可用來防治缺鐵性貧血。用天然 β -胡蘿蔔素的優點有三，一是直接促進鐵代謝，增加鐵在體內的儲存量；二是間接增加體內鐵元素的含量，避免傳統補充鐵而造成對人體心臟帶來的損傷；三是在獲得天然 β -胡蘿蔔素抗氧化維生素功能的同時，又補充了維生素 A 和金屬元素鐵。

三、杜莎藻比 β -胡蘿蔔更佳的胡蘿蔔素提供者

1. 杜莎藻 β -胡蘿蔔素含量高

一般 β -胡蘿蔔素的主要攝取來源為深色和黃綠色蔬菜，其中，胡蘿蔔是公認的高含量 β -胡蘿蔔素的蔬菜，紅色胡蘿蔔的 β -胡蘿蔔素含量為 1.35 mg/100 g，黃色胡蘿蔔的 β -胡蘿蔔素含量為 3.62 mg/100g。如果萎縮性胃炎患者每天需服用 50~100 mg β -胡蘿蔔素，那麼光賴飲食食用 3.4~6.9 kg 的胡蘿蔔顯然是不科學的。杜莎藻的天然 β -胡蘿蔔素的含量可達乾重的 3~12%，每天食用 1 g 左右的杜莎藻就可滿足萎縮性胃炎患者的食療需求。

2. 杜莎藻類胡蘿蔔素種類齊全

胡蘿蔔中只有 α -胡蘿蔔素和 β -胡蘿蔔素兩種；杜莎藻中存在多種類胡蘿蔔素，包括 α -胡蘿蔔素、 β -胡蘿蔔素、玉米黃素、蕃茄紅素、葉黃素、角黃素和 viloxanthin 等，被稱為天然混合類胡蘿蔔素。可以綜合調體人體正常生理活動的功能，而其中的任何一種類胡蘿蔔素都是人體不可或缺的。

3. 杜莎藻 β -胡蘿蔔素萃取方便

以胡蘿蔔為原料萃取 β -胡蘿蔔素主要有兩大缺點，一是胡蘿蔔中的 β -胡蘿蔔素含量遠遠低於杜莎藻；二是胡蘿蔔有細胞壁， β -胡蘿蔔素難與胡蘿蔔的纖維分離。杜莎藻的 β -胡蘿蔔素含量高，且 β -胡蘿蔔素容易與藻體分離萃取。

4. 杜莎藻 β -胡蘿蔔素結構優良

人工合成的 β -胡蘿蔔素是全反式結構，在各類食品中作為添加劑已經廣泛應用多年，胡蘿蔔中的 β -胡蘿蔔素 95% 為反式，5% 為順式；杜莎藻內的 β -胡蘿蔔素與人體血清中的 β -胡蘿蔔素一樣，50% 為反式，50% 為順式，順反結構比例 1:1。由動物實驗證實餵食杜莎藻的天然 β -胡蘿蔔素和餵食順、反式 1:1 的胡蘿蔔素兩組老鼠能明顯降低胃黏膜損傷，而且肝臟內測得的 β -胡蘿蔔素含量也高於僅餵食全反式 β -胡蘿蔔素的老鼠。

5. 杜莎藻更易被人體吸收

杜莎藻為單細胞構造，細胞表面沒有細胞壁，只有一層薄而富有彈性的膜，因而容易被人體吸收；胡蘿蔔的細胞壁屏障因素，影響人體對其胡蘿蔔素的吸收，一般只有 20%~25% 的胡蘿蔔素能被人體吸收，其餘都排出體外。

6. 杜莎藻安全可靠

服用高劑量的維生素 A 會使人體產生中毒反應，而且 β -胡蘿蔔素會轉化成維生素 A，那食用過多的杜莎藻是否會導致維生素 A 的中毒現象呢？實驗證實成年人每天服用 180~300mg 的 β -胡蘿蔔素不會發生中毒現象，血液中存在高量的 β -胡蘿蔔素，當人體缺乏維生素 A 時， β -胡蘿蔔素會轉化成維生素 A，一旦達到維生素 A 正常水平時，超量的 β -胡蘿蔔素轉化會受到

抑制，體內的維生素 A 也不會達到毒性含量。血液中超量的 β -胡蘿蔔素唯一會反應於人體皮膚發黃現象，醫學上稱為胡蘿蔔血症，那是過量的 β -胡蘿蔔素累積在皮下造成的，不會對人體有不良影響，一旦停止攝入 β -胡蘿蔔素，症狀即消失。

2. 高效能液相層析法

高效能液相層析法

HPLC

High Performance Liquid Chromatography

HPLC儀器原理

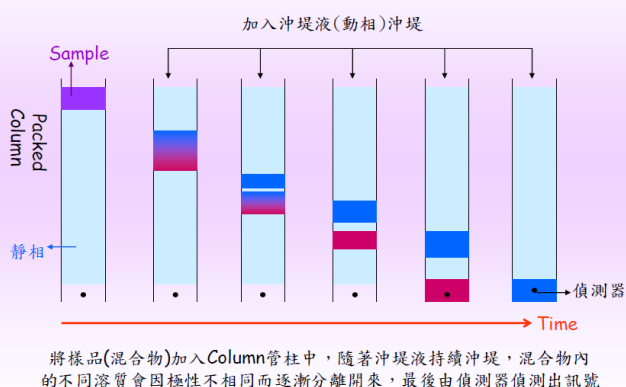
儀器設備簡介

HPLC動畫

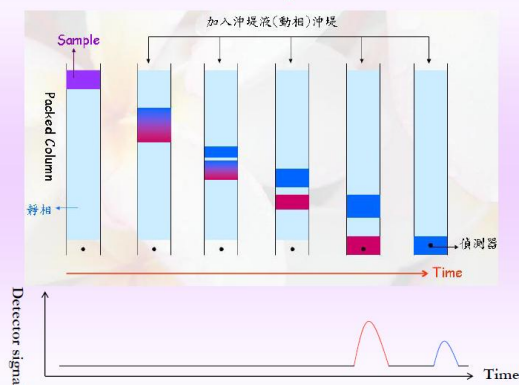
實驗範例

實驗影片

HPLC原理



HPLC原理



HPLC原理

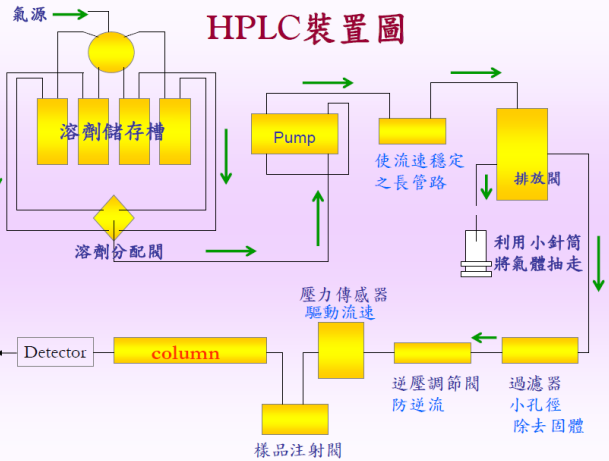
- HPLC分析是利用動相通過靜相時，混合物中的各成份在靜相和動相之間的分布係數不相同（即親和力不同），使其在管柱中的滯留時間不相同而分離的方法
- 若化合物與靜相親和力較強，則沖提較慢（即滯留時間長），而化合物與動相的親和力較強，則沖提較快（即滯留時間短），依此原理將樣品中的標的待測物與干擾物分離。

HPLC原理

- 在逆相層析法中，通常以高極性作為流動相，靜相為非極性，極性大的樣品成分會先被沖提出來，極性小的較慢沖提出來，因而達到分離效果
- 溶質、動相及靜相應選擇在適當的分子作用力間，這將會影響分離效果
- 動相的選擇可以先用TLC片來決定
- 樣品進行分離時也可以改變動相來進行梯度沖提
- Column 選用較小顆粒的Packing size 及較長鏈的填充物或者管柱半徑較小者以增加其分離效果

HPLC原理

- HPLC適用於
 - 1.半揮發性化合物
 - 2.非揮發性化合物
 - 3.樣品沸點過高
 - 4.不宜加溫而不便使用氣相層析儀者的待測物
- 應用此方法進行分析的先決條件是待測物必須溶於作為動相的溶劑中
- 做液相樣品的定性及定量分析
- 液相層析儀亦可作為製備純品之用



動相儲存槽與溶劑處理系統

- 動相儲存槽通常配有除去溶解氣體(氮氣or氧氣)的配件,此溶解氣體會管柱及偵測器中形成氣泡而干擾分析操作結果
- 溶劑中可能含有灰塵等顆粒性物質,會對pump造成損害及阻塞管線,故HPLC中配有過濾器

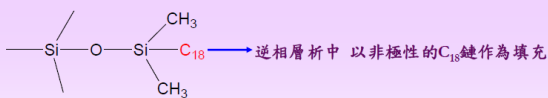
Pump

Pump選擇條件:

- 輸出壓力應可達6000Psi(408.27atm)
- 輸出流速應穩定
- 流速範圍應於0.1-10 mL/min之間
- 應使用抗腐蝕的組件

Column

- 長10-30cm,內徑4-10mm,直線型管柱
- 液相層析中,以多孔性填充物最常見,由直徑範圍3-10 μ m的多孔性微粒構成,以矽酸鹽類最常見



- 較長鏈的管柱填充物其滯留時間長,可以允許使用較大量樣品

偵測器

- 偵測器分為兩種類型

A.總體性質檢偵器:

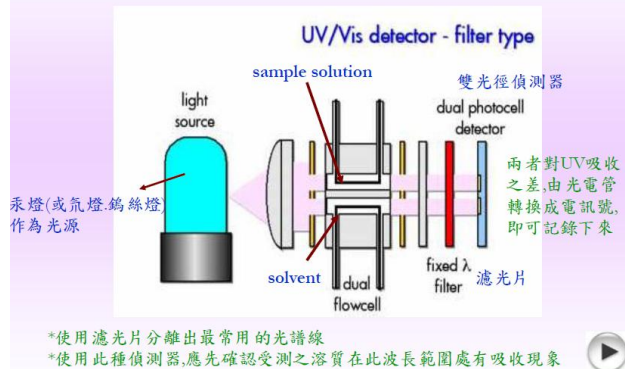
感應“動相”的折射係數.介電常數.密度等整體性質

B.溶質性質檢偵器:

只感應溶質的UV吸收值.螢光值.IR值或者擴散係數電流等各種不受流動相影響之性質

- 在HPLC中以UV-Vis偵測器最為常見

UV-Vis偵測器構造圖



實驗目的

- 利用逆向HPLC測定出混合物內Caffeine的濃度
- 學習HPLC操作流程及其應用

儀器&藥品

- 含有UV偵檢器(254nm)的HPLC
- 逆相C₁₈管柱
- 注射器, 25μL
- 試藥級咖啡因
- 動相: 50% 甲醇 and 50% HPLC級水
- 未知物

實驗步驟

A. 溶液製備

1. 緩衝液

- 將體積比為1:1之methanol及HPLC級H₂O混合, 配成1公升之動相

2. 標準溶液

- 在五個50毫升定量瓶中, 分別裝入5mg, 10mg, 15mg, 20mg, 25mg之caffeine(咖啡因), 加入上述特別留下之移動相(300毫升)溶液, 使其溶解並稀釋至標線

實驗步驟



- 以注射針筒吸取10ml標準溶液, 於注射針筒上旋上一個2μm小型過濾器, 用力壓注射針, 使標準溶液自過濾器尖端流出, 收集之

實驗步驟

B. 開機

- 打開電腦開關, 待出現windows桌面後, 打開右方 pump系統開關及MWD系統開關
- 5分鐘後, 選取桌面上的"Instrument 1 online"
- 依儀分實驗講義流程打開UV-Vis偵測器

實驗步驟

C. purge管路

- 確認移液相儲存罐所裝移動相已蓋過吸引
- 依儀分實驗講義流程除去動相儲存槽到Column的管線的氣泡

實驗步驟

D. Column之condition

- 將” Flow”設為0.2
- 查看” online plot”，調整” adjust”，見baseline穩定後，將” Flow”改為0.4。然後依此方式，將流速逐漸增加至1.0
- 讓column在此流率下run數十分鐘，直到獲得穩定baseline

實驗步驟

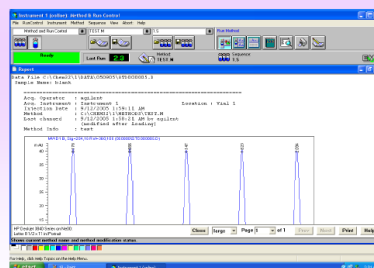
E. 標準溶液之測定

- 選取偵測波長為254nm之訊號
- 準備進行標準溶液之注射
- 打開螢幕下方的” online plot”，待輸出訊號穩定後，以25μl針筒吸取25μl已過濾、除氣之標準溶液(此為定量實驗，故針孔中不可含有空氣)
- 當注射閥處於” LOAD”位置時，如右上圖般一次注入注射孔中，並馬上將注射閥處於順時針轉至” INJECT”位置



實驗步驟

- 待出現標準溶液之波峰並回到基準線，確定無其他波峰出現後，按[F8]，停止測量，出現如下般之報告，此報內容已存檔

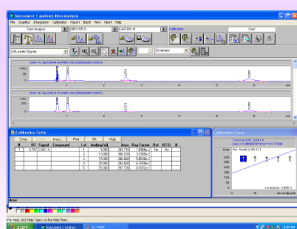


實驗步驟

F. 檢量線之製定

- 依儀分實驗講義流程操作設定參數即得到標準溶液的檢量線

刪除不要的peak(只保留波長為254nm，caffeine的波峰，其餘皆block起來delete)



實驗步驟

G. 未知物之測定

- 按[File]，選擇” Load Signal”，叫出標準溶液#3之檔案當作未知物之檔案
- 按[Report]，選擇” print Report”，即顯示未知樣品的濃度
- 按右下角之[Print]，印出未知樣品之分析結果
- 按 ，將” Flow”減為0

3.化妝品美白功效評估方法簡介

A. 體外(in vitro) 酪胺酸酶抑制法

東方女性普遍喜好白皙的皮膚，而膚色是由黑色素(melanin)、b-胡蘿蔔素(b-carotene)及血紅素(hemoglobin)所構成，皮膚顏色深淺主要是受黑色素含量之多寡及紫外線照射量而影響。黑色素在生物體內是由黑色素細胞所生成，黑色素由酪胺酸氧化而產生，會聚合成不規則之聚合物，存在於 melanosome 胞器內，數量愈多則顏色愈黑，人體表皮、毛囊及網膜均會產

生。黑色素生成過程中最關鍵的酵素為酪胺酸酶，大多數美白成分具有此酵素抑制作用，因此在美白原料開發最常用的方法為體外酪胺酸酶抑制活性，流程簡單表示如圖一。將單位濃度 mushroom 酪胺酸酶加入酪胺酸溶液中，再將欲篩選之美白原料加入反應溶液中，若美白原料具有酪胺酸酶抑制活性則反應後之溶液會呈現較淡的顏色，經過分光測色計之測量，可計算其抑制率，進而計算出其 IC50，藉此評斷此美白原料是否具有很好之抑制能力。

B. 黑色素細胞瘤(B16 melanoma)黑色素抑制法

上述酪胺酸酶抑制活性的篩選法雖然在美白原料開發之使用較普遍，也較快速，缺點是無法篩選到其他美白作用機轉之物質，因此建議搭配 B16 黑色素抑制法進行篩選。此方法以細胞培養方式培養 B16 細胞株，待測美白成分經過滅菌處理後，以適量濃度加入細胞培養液中，經過 2-3 天培養後，測量對照組與實驗組之黑色素生成量，藉以評估所測定之原料是否具有美白功效。

C. 活體(in vivo)試驗

為了測試美白原料是否有功效，可採用活體試驗，通常可使用無毛鼠或是人體測試，此方法雖然較耗時，但是可同時試驗原料是否對皮膚會有副作用(刺激性或過敏反應)。此方法若使用動物試驗，需考慮部分地區有禁用動物實驗的規定。對於美白使用後的功效，可使用皮膚測色計進行膚色測定，例如塗抹樣品前先以 Minolta 分光光度計測定膚色，然後每天塗抹兩次樣品。每週以 Minolta 分光光度計測定塗抹美白乳液及塗抹對照乳液部位之皮膚的 L*a*b* 值。連續測定 4 週，然後比較 L*a*b* 值的差異，藉以判斷該原料之效果。

植物名	學名	原料名稱	主要用途
蘆薈	<i>A. barbadensis Miller</i>	Aloe vera extract	保濕、滋養主要用於頭皮乾燥
金盞花	<i>Calendula officinalis L.</i>	Calendula extract	用於頭皮刺激症狀之鎮靜與舒緩
洋甘菊	<i>Matricaria chamomilla. L.</i>	Chamomile fluid extract	具鎮靜作用，可維持頭皮之健康
薑	<i>Zingiber officinale</i>	Ginger root extract	促進血液循環，增進頭皮健康與頭髮生長
金縷梅	<i>Hamamelis virginiana L.</i>	Hamaelis extract	具收斂作用，可改善頭皮及頭髮油膩現象
迷迭香	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	Rosemary extract or oil	具收斂與抗氧化作用，可改善頭皮油膩，促進頭髮生長
茶樹	<i>Melaleuca alternifolia Ch.</i>	Tea tree oil	具抗菌及消炎作用，可改善頭皮屑症狀
小麥胚芽	<i>Triticum sp.</i>	Wheat germ oil	具抗氧化及柔膚作用，可改善頭皮與頭髮乾澀

4. 細胞凋亡與疾病

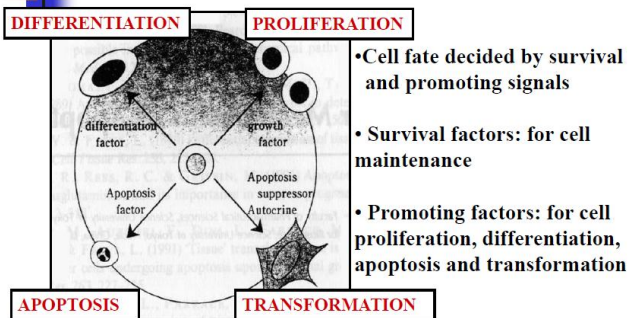
細胞凋亡與疾病 Apoptosis & Disease

講授內容

- 一、細胞的命運
- 二、細胞的死亡方式
- 三、細胞凋亡的特徵
- 四、細胞凋亡的機制
- 五、細胞凋亡與疾病

細胞的命運

Cell fate in multicellular organism



細胞是組成生物體的基本單位，其生命過程包括**增殖**、**分化**和**凋亡**。

增殖PROLIFERATION：細胞通過分裂增加細胞的數量。

分化DIFFERENTIATION：細胞通過分化形成在形態和功能上各異的細胞，組成不同的組織和器官。

死亡APOPTOSIS：通過凋亡確保胚胎正常發育和內環境穩定。

細胞增殖、分化和凋亡都是主動而有序的生命過程，任何一個環節發生變化均可引起疾病。

細胞死亡 Cell Death

- 指細胞受到損傷且影響到細胞核時，細胞會呈現代謝停止、結構破壞和功能喪失等不可逆變化的現象。
- Majno, G. and I. Joris, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol, 1995. 146(1): p. 3-15.
- 偶發性細胞死亡(Accidental cell death)
- 細胞凋亡(Apoptosis)

細胞存活測試

- 最常用之細胞存活測試之原理為 **dye exclusion**，利用染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因細胞膜完整，染料無法滲入而不會呈色。
- 操作上一般使用藍色之 **trypan blue** 染料或會與DNA結合之螢光染料。

細胞壞死 (Necrosis) 與 細胞漸進性壞死 (Necrobiosis)

- 早在150年前，細胞病理學的先驅者Rudolph Virchow (1822-1902)就觀察到細胞死亡的方式有兩種，一是「細胞壞死 (Necrosis)」，一是「細胞漸進性壞死 (Necrobiosis)」。
- 「細胞壞死 (Necrosis)」的細胞死亡方式，其細胞就像當場遭體解剖一般，「開腸破肚」地攤在原地。
- 「細胞漸進性壞死 (Necrobiosis)」的死亡方式，其細胞到最後就會則是慢慢地消失，也有人將之稱呼生理上的細胞死亡 (Physiological cell death)。

細胞的死亡形式

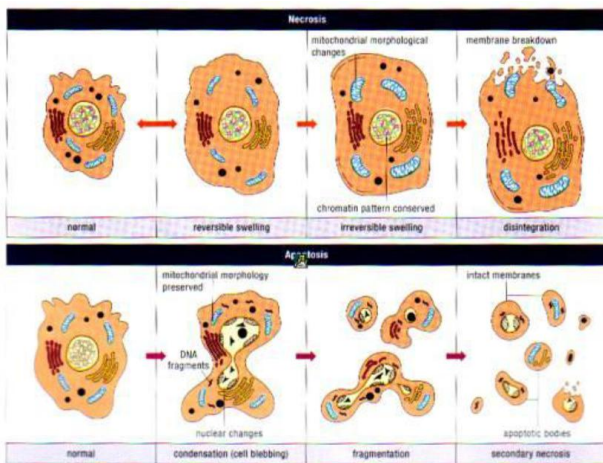
- 細胞死亡的形式簡單歸納成兩種致死細胞方式：他殺(Death by murder)與是自殺(Death by suicide)。
- 是經由外物而造成的死亡，也就是偶發性細胞死亡(Accidental cell death)或細胞壞死(Necrosis)。
- 細胞經由自殺(Cell suicide)的手段所造成的死亡，生理性細胞死亡(Physiological cell death)、程序性細胞死亡(Programmed cell death)、或稱為細胞凋亡(Apoptosis)。

偶發性細胞死亡(Accidental cell death) 細胞壞死(Necrosis)

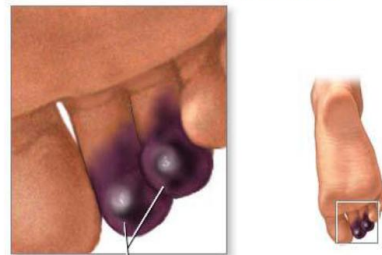
- 缺血性細胞死亡(Ischemic cell death)是偶發性細胞死亡的代表，通常會伴隨著細胞腫脹的現象，Guido Majno和Isabella Joris認為這樣的現象應該被稱為「腫脹性壞死(Oncosis)」或凝固性壞死(Coagulation necrosis)。
- 細胞之所以會有腫脹的現象，是因為細胞在缺乏ATP的幫助下，致使離子幫浦失調的緣故。
- 「腫脹性壞死」和「細胞凋亡」是兩個相對的現象，因為腫脹性壞死會有大水泡(Blebbing)與引發發炎反應，而細胞凋亡則是水泡出芽(Budding)現象。

細胞壞死(necrosis)

- 細胞壞死(necrosis)是因病理而產生的被動死亡，如物理性或化學性的損害因子及缺氧與營養不良等均導致細胞壞死。
- 壞死細胞的膜通透性增高，致使細胞腫脹，細胞器變形或腫大，早期核無明顯形態學變化，最後細胞破裂。
- 另外壞死的細胞裂解要釋放出內含物，並常引起炎症反應；在癒合過程中常伴隨組織器官的纖維化，形成癍痕。



Necrosis: The death of living cells or tissues. Necrosis can be due, for example, to ischemia (lack of blood flow). From the Greek "nekros" (dead body).



Necrosis of middle toes

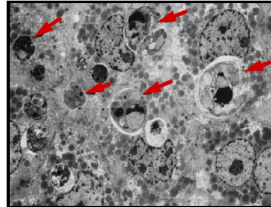
ADAM.

Concept of the Apoptosis

- Programmed cell death: a form of cell death in normal embryogenesis (Glucksmann, 1950s)

- Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death (Kerr, 1962)
 - Apoptotic bodies (arrowed) in liver lobe atrophy after portal vein ligation

- Apoptosis: distinct mechanism of controlled cell deletion that is complementary but opposite to mitosis (Kerr, Wyllie, Currie, 1970)



細胞凋亡 apoptosis 的含義

- 細胞凋亡 (apoptosis) 一詞來自希臘語，apo指分離，ptosis指落下，Apoptosis即花瓣或樹葉的枯落。

- 1972年Kerr等人首先提出了細胞凋亡的概念：細胞凋亡 (apoptosis) 是由基因調控的主動而有序的細胞死亡，又稱程式性細胞死亡 (programmed cell death, PCD)。

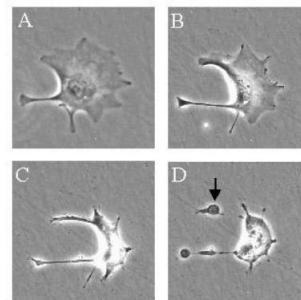
Apoptosis

- is a highly organized orchestrated form of cell death (cellular suicide; programmed cell death)

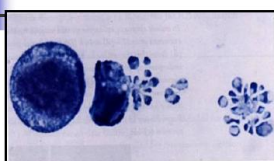
- Important role in development and homeostasis; embryo development, synaptogenesis, tissue turnover, immune response

- Apoptosis malfunction: too little apoptosis - cancer and autoimmune disease; too much apoptosis - neurodegeneration (Alzheimer's)

- Apoptosis can be triggered by stress - oxidants (ROS), DNA damage agents (uv, irradiation), chemotherapeutic drugs

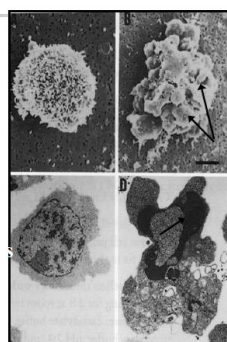


Morphological assessment

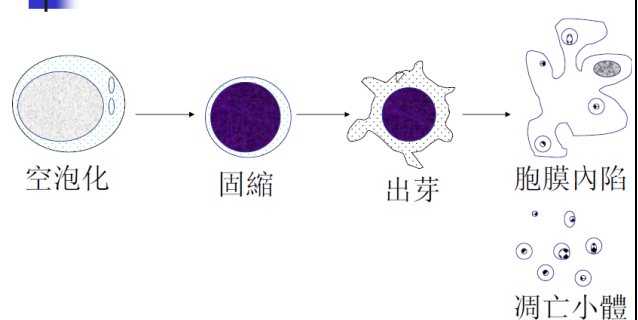


- Light microscopy:

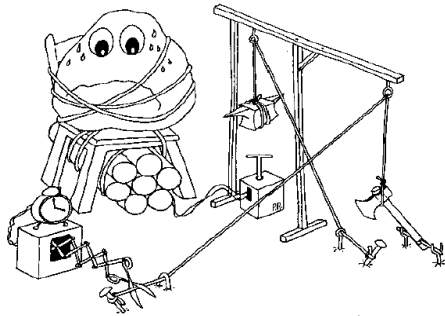
- Electron microscopy:



凋亡細胞的形態學改變



Apoptosis is a highly organized orchestrated form of cell death



Apoptosis is all around us



Apoptosis Inducer

- infected with a **virus**
- undergoing stress conditions (such as starvation)
- **ionizing radiation**
- toxic chemicals

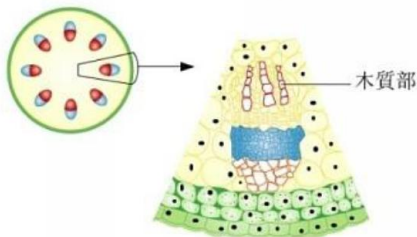
In plants as well

- 防止自花授粉

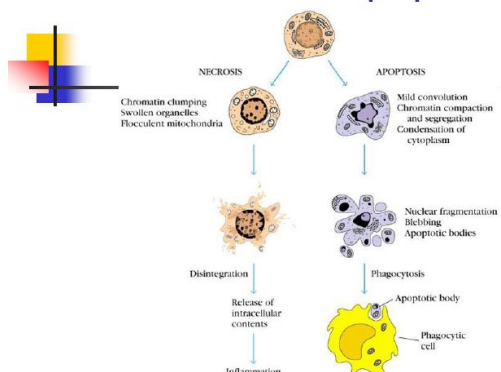


In plants as well (2)

- Transduction ducts (木質 韌皮部)



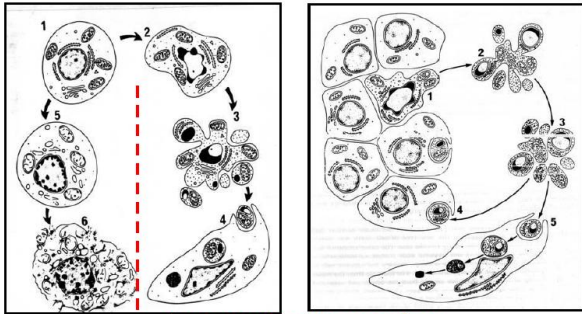
Necrosis vs. Apoptosis



- Apoptosis – programmed cell death
- Necrosis – un-programmed cell death

Necrosis vs Apoptosis

swollen cells & disrupted organelles • Chromatin compaction/margination
shrunken masses of cytoplasm with • Nuclear fragmentation; apoptotic bodies
intact cellular organelles • Phagocytosis: epithelial cells, phagocyt



! Apoptosis progression

細胞壞死與凋亡的區別

	壞死	凋亡
性質	病理性細胞死亡	生理性或病理性細胞死亡
誘導因素	強烈刺激，嚴重損傷	較弱刺激，輕度損傷
形態變化	細胞結構全面溶解、破壞、成群細胞死亡	胞膜及細胞器相對完整，形成凋亡小體，個別細胞死亡
發炎反應	溶酶體破裂，局部有發炎反應	溶酶體相對完整，局部無炎症反應
DNA降解	不規則，電泳不呈梯狀分佈	規則，電泳呈梯狀分佈
蛋白質合成	無	有新蛋白質合成
基因調控	無，被動而無序的隨機降解	有，主動而有序的有控降解

細胞凋亡的生物學特徵

APOPTOSIS .INFO

(一) 形態學特徵

(二) 生化特徵



細胞凋亡的生物學特徵

(一) 形態學特徵

1. 細胞核的變化：核固縮、核染色質凝聚、邊集，最後解離形成核碎片。
2. 細胞質的變化：細胞表面微絨毛消失，並逐漸與周圍細胞脫離。胞質脫水、體積縮小、空泡化；內質網不斷擴張並與胞膜融合，形成膜表面的芽狀突起，即出芽 (budding)。

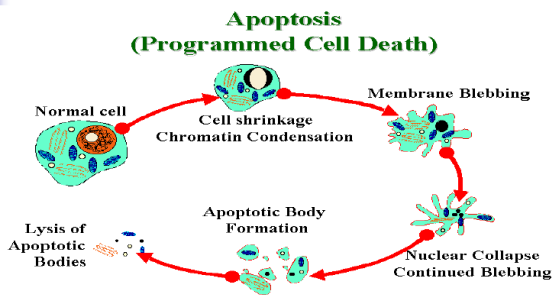
一般以細胞核染色質的形態學改變為指標來評判apoptosis

- 常用的DNA特異性染料有：Hoechst 33342，Hoechst 33258, DAPI。
- 三種染料與DNA的結合是非嵌入式的，主要結合在DNA的A-T鹼基區。紫外光激發時發射明亮的藍色螢光。
Hoechst是與DNA特異結合的活性染料，儲存液用蒸餾水配成1mg/ml的濃度，使用時用PBS稀釋成終濃度為2~5μg/ml。
DAPI為半通透性，用於常規固定細胞的染色。儲存液用蒸餾水配成1mg/ml的濃度，使用最終濃度一般為0.5~1μg/ml。

細胞凋亡過程中細胞核染色質的形態改變分為三期：

- I 期的細胞核呈波紋狀 (rippled) 或呈折縫樣 (creased)，部分染色質出現濃縮狀態。
- II a期細胞核的染色質高度凝聚、邊緣化。
- II b期的細胞核裂解為碎塊，產生凋亡小體。

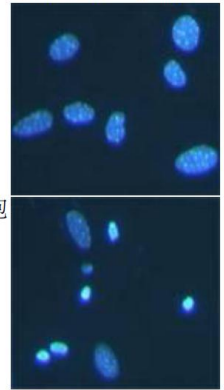
Execution phase



■ 以DNA結合螢光染料染色，細胞發生凋亡時，染色質會固縮。所以染色後，細胞核會呈緻密濃染，或呈碎塊狀緻密濃染。

■ 正常細胞核

■ 刺激後有緻密濃染的凋亡細胞



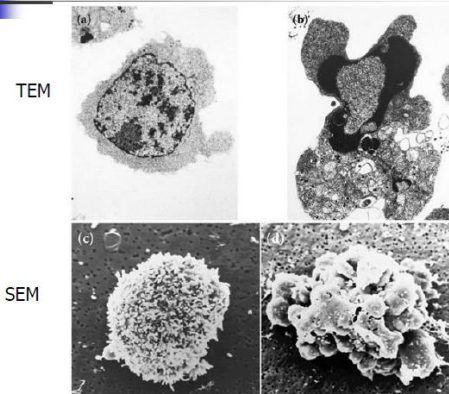
電子顯微鏡觀察

- 結果評判：凋亡細胞體積變小，細胞質濃縮。
- 凋亡 I 期 (pro-apoptosis nuclei) 的細胞核內染色質高度盤繞，出現許多稱為氣穴現象 (cavitations) 的空泡結構。
- II a 期細胞核的染色質高度凝聚、邊緣化。
- 細胞凋亡的晚期，細胞核裂解為碎塊，產生凋亡小體。

apoptosis

正常胸腺細胞

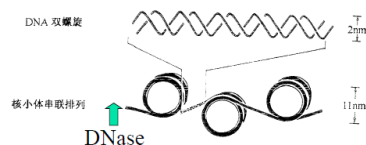
凋亡胸腺細胞



細胞凋亡生化特徵

1. DNA Ladder 階梯狀條帶

即DNA雙鏈片段化斷裂。其斷裂部位發生在染色質核小體的連接部，此處易受內源性核酸內切酶的攻擊而斷裂。

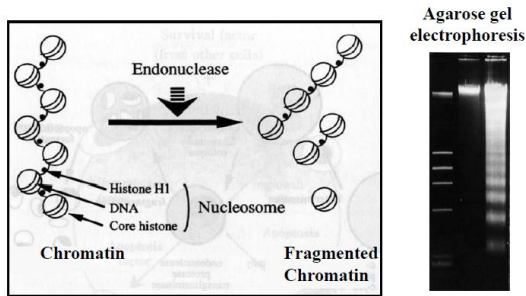


DNA Ladder 階梯狀條帶

- DNA鏈上約每隔200個核苷酸就有1個核小體，當核酸內切酶在核小體連接部切開DNA時，即可形成180~200bp或其整倍數的DNA片段。
- 這些片段在瓊脂糖凝膠電泳中可呈特徵的階梯狀條帶，是判斷細胞凋亡的客觀指標之一。

DNA fragmentation: biochemical hallmark

- DNA cleaved into non-random fragments
- Targets of endonuclease attack: linker regions between nucleosome
- 180-200 bp fragments & multiples of this unit



細胞凋亡時主要的生化特徵

- 細胞凋亡時主要的生化特徵是其染色質發生濃縮，染色質DNA在核小體單位之間的連接處斷裂，形成50~300kbp長的DNA大片段，或180~200bp整數倍的寡核苷酸片段
- 凋亡細胞DNA在凝膠電泳上表現為梯形電泳圖譜 (DNA ladder)。
- 細胞經處理後，採用常規方法分離提純DNA，進行瓊脂糖凝膠和溴化乙啶染色，在凋亡細胞群中可觀察到典型的DNA ladder。
- 如果細胞量很少，還可在分離提純DNA後，用³²P-ATP和脫氧核糖核苷酸末端轉移酶 (TdT) 使DNA標記，然後進行電泳和放射自顯影，觀察凋亡細胞中DNA ladder的形成。

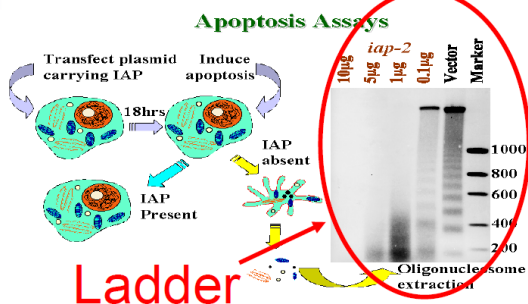
大分子染色體DNA片段的測定

- 細胞凋亡的早期，染色體斷裂成為50~300kbp長的DNA大片段。
- 細胞凋亡早期產生的50~300kbp長的DNA大片段不能用普通的瓊脂糖凝膠電泳來分離。通常採用脈衝電泳技術。
- 這個方法是在凝膠上外加正交的交流脈衝電場。每當電場方向改變後，大的DNA分子便滯留在爬行管中，直至新的電場軸向重新定向後，才能繼續向前移動。
- DNA分子量越大，這種重排所需要的時間就越長。當DNA分子變換方向的時間小於電脈衝週期時，DNA就可以按其分子量大小分開。

DNA Ladder 測定

- 方法：
 - 約需 1×10^7 顆細胞以1%SDS裂解細胞和RnaseA (5 μ g/ml) 56 $^{\circ}$ C作用2h，再加蛋白酶K (2.5 μ g/ml) 37 $^{\circ}$ C作用2h。
 - 細胞裂解液13000rpm/5min收集上清液。
 - 以1/10體積3M醋酸鈉和2.5倍體積的冷乙醇沉澱DNA，4 $^{\circ}$ C過夜。
 - 14000rpm/15min收集沉澱物。
 - 最後將沉澱溶解在TE buffer中，加DNA Loading Buffer 1.2%瓊脂糖凝膠電泳，EB染色並照相。
- 參考文獻 Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. (1993) Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. J. Biol. Chem. 268, 3037-3039

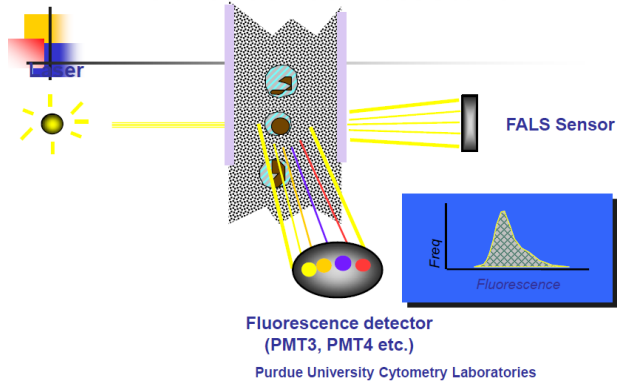
Multiples of 180~200 bp fragments



流式細胞儀分析凋亡細胞的DNA含量

- 方法：
 - 以70%冷乙醇 (in PBS) 4 $^{\circ}$ C固定細胞過夜。
 - PBS洗滌，1000rpm 10min收集細胞。
 - RNase A (0.5 μ g/ml) 37 $^{\circ}$ C消化30min。
 - 加PI (50 μ g/ml) 染色，室溫避光15min。
 - 以流式細胞儀分析少於二倍體DNA的凋亡細胞形成及細胞週期的變化。

Fluorescence Detectors



凋亡細胞的特點

- 在形態上，早期細胞核固縮，染色體邊集在核膜內側顯新月體形、核碎裂。
- 細胞漿和細胞器密度增高、細胞體積變小；細胞膜皺折捲曲，但早期細胞膜的完整性未受到破壞。
- 凋亡細胞的FSC降低，SSC增加。
- 細胞壞死時，細胞腫脹，FSC增大，SSC也增大。

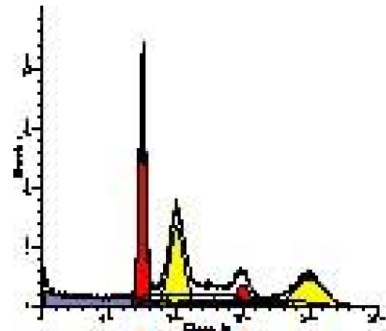
流式細胞儀分析凋亡細胞的DNA含量

- 1 螢光信號的面積：對螢光光通量進行積分。
- 2 DNA指數(DI)：相對DNA含量。
- 3 異倍體：非二倍體，包括近二倍體、四倍體、多倍體、非整倍體。

細胞週期

凋亡細胞

Sub-G₀/G₁ peaks --- PI staining



Comet assay

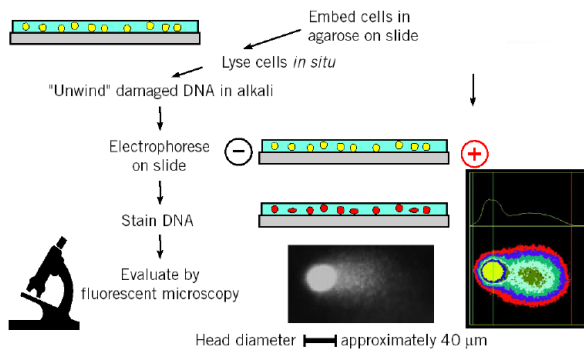


Fig 1. Principal steps of the alkaline comet assay.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling)

- 細胞凋亡中，染色體DNA雙鏈斷裂或單鏈斷裂而產生大量的粘性3'-OH末端。
- 在脫氧核糖核苷酸末端轉移酶(TdT)的作用下，將脫氧核糖核苷酸和螢光素、過氧化物酶、鹼性磷酸酶或生物素形成的衍生物標記到DNA的3'-末端，從而可進行凋亡細胞的檢測。
- 由於正常的或正在增殖的細胞幾乎沒有DNA的斷裂，因而沒有3'-OH形成，很少能夠被染色。
- 可用於細胞懸浮液、石蠟處理的組織等多種樣本及配合螢光顯微鏡或流式細胞儀的檢測。

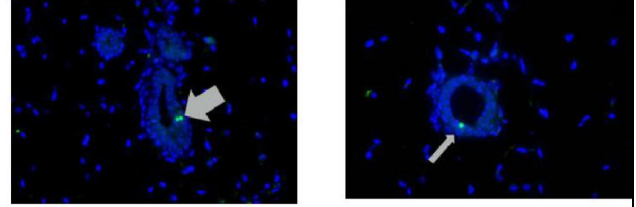
脫氧核糖核苷酸末端轉移酶介導的缺口末端標記法
terminal -deoxynucleotidyl transferase mediated nick end
labeling, TUNEL

- TUNEL 實際上是分子生物學與形態學相結合的研究方法。
- 對完整的單個凋亡細胞核或凋亡小體進行原位染色，能準確地反應細胞凋亡典型的生物化學和形態特徵。
- 可用於石蠟包埋組織切片、冰凍組織切片、培養的細胞和從組織中分離的細胞的細胞形態測定，並可檢測出極少量的凋亡細胞。



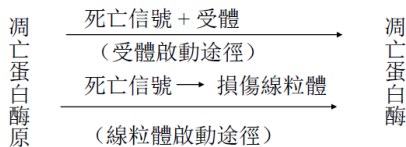
TUNEL assay

Representative Images of TUNEL staining:



2. 蛋白質降解

凋亡蛋白酶(caspases)即半胱天門冬蛋白酶，其中Caspases8、9、10 引起凋亡啟動者作用，Caspases3、6、7、9、12 引起凋亡效應者作用，能分解細胞蛋白，引起凋亡作用。



Caspase-3活性的檢測

- Caspase家族在介紹細胞凋亡的過程中起著非常重要的作用，其中caspase-3為關鍵的執行分子。
- Caspase-3正常以酶原（32KD）的形式存在於胞漿中，在凋亡的早期階段，它被激活，活化的Caspase-3由兩個大次單位（17KD）和兩個小次單位（12KD）組成，裂解相應的胞漿胞核底物，最終導致細胞凋亡。
- 可透過Western blot 分析Procaspase-3的活化，以及分析Caspase-3受質（ADP-核糖）聚合酶 [poly (ADP-ribose) polymerase, PARP] 等裂解推定apoptosis。

活性Caspase-3的western blot檢測

- 收集細胞→PBS洗滌→抽取細胞裂解液。
- 蛋白定量→SDS-PAGE電泳→PVDF膜轉移。
- 5%脫脂奶粉blocking，室溫1.5~2h或4°C過夜
→anti-Caspase-3 antibody 室溫反應1~2h或4°C過夜
→TBS-T（含0.05% Tween 20的TBS）洗3次，5~10min/次。
- HRP-標記的二抗室溫反應1~2h→ TBS-T洗3次，5~10min/次。
- ECL顯影。



- 2 螢光分光光度計分析
原理：活化的Caspase-3能夠特異切割DEVD-X底物，水解D-X肽鍵。根據這一特點，設計出螢光物質偶聯的短肽Ac-DEVD-AFC。在共價偶聯時，AFC不能被激發螢光，短肽被水解後釋放出AFC，自由的AFC才能被激發發射螢光。根據釋放的AFC螢光強度的大小，可以測定caspase-3的活性，從而反映Caspase-3被活化的程度。
- 方法：
 1. 凋亡細胞以PBS洗滌。
 2. 加細胞裂解液溶解細胞。
 3. 加Ac-DEVD-AFC（caspase-3四肽螢光底物）37°C反應1h。
 4. 螢光分光光度計（Polarstar）分析螢光強度（激發光波長380nm，發射光波長為430-460nm）。

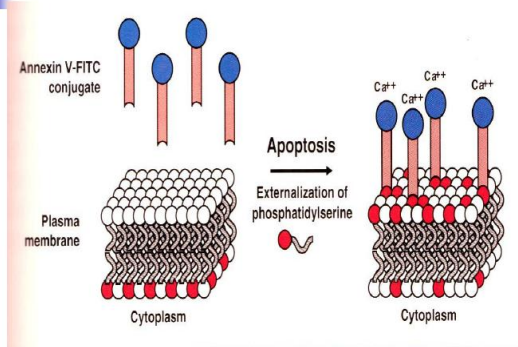
PS (磷脂酰絲氨酸) 在細胞外膜上的檢測:

- PS從細胞膜內側轉移到外側在細胞受到凋亡誘導後不久發生，可能作為免疫系統的識別標誌。
- Annexin-V，一個鈣依賴性的磷脂結合蛋白，能專一性的結合暴露在膜外側的PS，再通過簡單的顯色或發光系統進行檢測。
- 這是一種**凋亡早期的活細胞檢測**（懸浮細胞和貼壁細胞都適用），可與DNA染料或別的晚期檢測方法相結合來標記凋亡的發展階段。

磷脂酰絲氨酸外翻分析 (Annexin-V法)

- 磷脂酰絲氨酸 (Phosphatidylserine, PS) 正常位於細胞膜的內側，但在細胞凋亡的早期，PS可從細胞膜的內側翻轉到細胞膜的表面。
- Annexin-V是一種分子量為35~36KD的Ca²⁺依賴性磷脂結合蛋白，能與PS高親和力特異性結合。
- 將Annexin-V進行螢光素 (FITC、PE) 或biotin標記，以標記了的Annexin-V作為螢光探針，利用流式細胞儀或螢光顯微鏡可檢測細胞凋亡的發生。
- 碘化丙啶(propidine iodide, PI)是一種核酸染料，它不能透過完整的細胞膜，但在凋亡中晚期的細胞和死細胞，PI能夠透過細胞膜而使細胞核紅染。因此將Annexin-V與PI匹配使用，就可以將凋亡早晚期的細胞以及死細胞區分開來。

Annexin V Assay



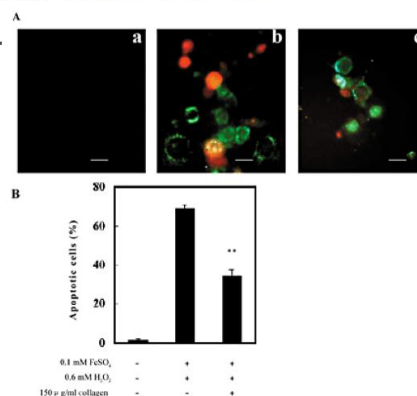
Annexin-V法

1. 懸浮細胞的染色：將正常培養和誘導凋亡的細胞用PBS洗2次調製成細胞懸浮液 (0.5~1×10⁶)；貼壁培養的細胞染色：先用0.25%的胰酶消化，PBS洗滌、製成細胞懸浮液。
 2. 加入100ul Binding Buffer和FITC標記的Annexin-V (20ug/ml) 10ul，室溫避光30min，再加入PI (50ug/ml) 5ul，避光反應5min後，加入400ul Binding Buffer，用螢光顯微鏡和共聚焦激光掃描顯微鏡進行觀察或立即用FACScan進行流式細胞術定量檢測（一般不超過1h）。
 3. 同時以不加AnnexinV-FITC及PI的一管作為陰性對照。
- 注意事項：
1. 整個操作動作要盡量輕柔，勿用力吹打細胞。
 2. 操作時注意避光，反應完畢後盡快在一小時內檢測。

Annexin V/PI 雙染色法

活細胞 (Annexin V⁻/PI⁻)
 壞死細胞 (Annexin V⁺/PI⁺)
 凋亡細胞 (Annexin V⁺/PI⁻)

AnnexinV-FITC PS檢測在細胞外膜上的PS可檢測早期的apoptosis



Annexin V Assay

能夠區分死亡與凋亡細胞

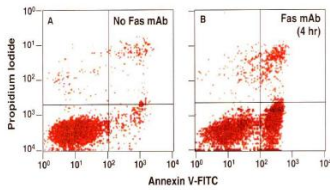


Figure 12. Flow Cytometric Analysis of Apoptotic Cells Using Annexin V-FITC. Jurkat T cells were left untreated or were treated for 4 hr with anti-human Fas mAb, clone DX2 (Cat. No. 33450D) and Protein G. Cells were incubated with Annexin V-FITC in a buffer containing PI and analyzed by flow cytometry. (A) Untreated cells were primarily Annexin V-FITC and PI negative (lower left quadrant, panel A), indicating that the cells were viable and not undergoing apoptosis. (B) After treatment with DX2 and Protein G, a significant number of cells are Annexin V-FITC positive and PI negative (lower right quadrant, panel B), indicating that the cells are in an early stage of apoptosis and are still viable. In addition, a population of cells has progressed to a later stage of apoptosis and are stained with both PI and Annexin V, indicating that the cells are no longer viable.

粒線體膜勢能的檢測

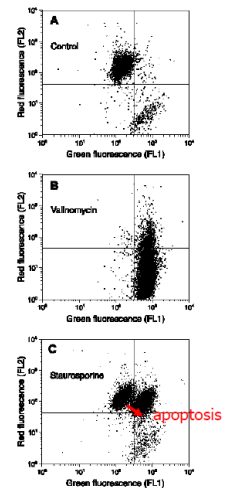
- 粒線體在細胞凋亡的過程中起著樞紐作用，多種細胞凋亡刺激因子均可誘導不同的細胞發生凋亡，而粒線體跨膜電位 $\Delta\psi_{mt}$ 的下降，被認為是細胞凋亡級聯反應過程中最早發生的事件，它發生在細胞核凋亡特徵（染色質濃縮、DNA斷裂）出現之前，一旦粒線體 $\Delta\psi_{mt}$ 崩潰，則細胞凋亡不可逆轉。

粒線體跨膜電位測定

- 粒線體跨膜電位的存在，使一些親脂性陽離子螢光染料如Rhodamine 123、DiOC₆、JC-1、TMRM等可結合到粒線體基質，其螢光的增強或減弱說明粒線體內膜電負性的增高或降低。
- 方法：將正常培養的細胞和誘導凋亡的細胞加入使用終濃度為Rhodamine 123 (1 μ M) 或最終濃度為DiOC₆ (25nM)，JC-1 (1 μ M)，TMRM (100nM)，37 $^{\circ}$ C平衡30min，流式細胞計檢測細胞的螢光強度。
- 注意事項
 - 需保持平衡染液中pH值的一致性，因為pH值的變化將影響膜電位。
 - 與染料達到平衡的細胞懸液中如果含有蛋白，他們將與部分染料結合，降低染料的濃度，引起假性結果。

粒線體與apoptosis

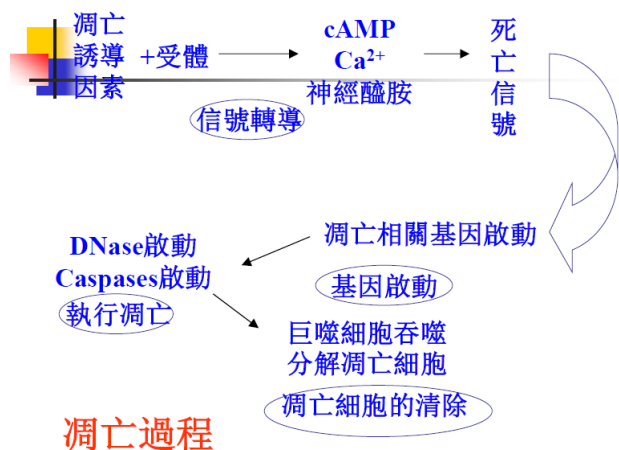
- 粒線體的離子梯度維持是誘發apoptosis一個很重要的關鍵，電子傳遞鏈中的細胞色素C (cytochrome C)的釋出會引發apoptosis。
- 粒線體membrane potential的去極化會使JC-1 Mitochondrial Potential Sensors from red (~590 nm) to green (~525 nm)

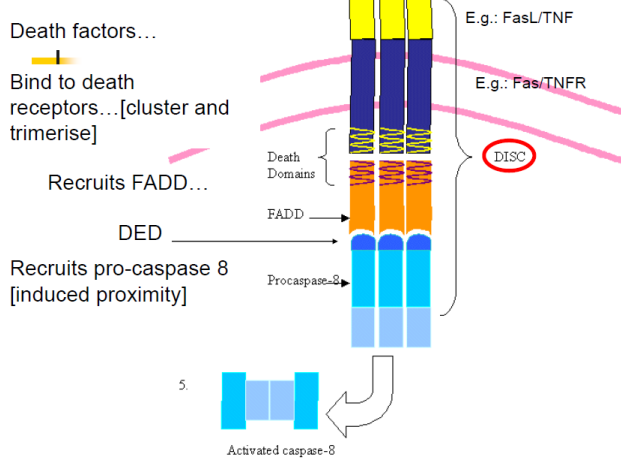


三、細胞凋亡過程與調控

(一) 細胞凋亡過程 (四個階段)

1. 凋亡信號轉導
2. 凋亡基因啟動
3. 凋亡的執行 (由DNase 和caspases執行)
4. 凋亡細胞的清除。





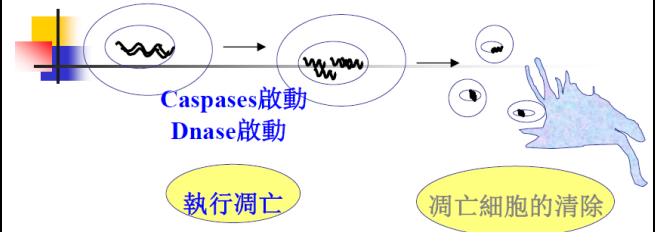
四、細胞凋亡的發生機制

(一) 氧化性傷害與自由基的損傷作用

- 1. 氧自由基對DNA損傷導致PARP活化和P53基因的啟動。前者引起NAD快速耗竭，ATP大量消耗，使細胞凋亡。後者具有促進細胞凋亡的功能。
- 2. 氧自由基攻擊細胞膜上不飽和脂肪酸，引起脂質過氧化直接造成細胞膜損傷，導致細胞凋亡。
- 3. 氧化性傷害可啟動Ca²⁺/Mg²⁺依賴的核酸內切酶及活化核轉錄因數如NF-kB，誘導細胞凋亡。
- 4. 氧化性傷害引起細胞膜結構的破壞，使Ca²⁺內流增加，誘導細胞凋亡。

2. 細胞凋亡信號的轉導

凋亡誘導因素 作用於 細胞 轉化為 凋亡信號
 → 胞內信號轉導途徑 → 啟動細胞死亡程式 →
 細胞凋亡 (DNA片段化及蛋白解體)。



凋亡過程 II

凋亡蛋白酶(caspases)作用

- (1) 水解蛋白質，分割胞質，形成凋亡小體
- (2) 滅活凋亡抑制物 (Bcl-2)
- (3) 參加凋亡反應，水解凋亡相關活性蛋白

Caspase family

- 1) C端同源區存在半胱氨酸激活位點，此激活位點結構域為QACR/QG。
- 2) 通常以酶原的形式存在，相對分子質量29000-49000 (29-49KD)，在受到激活後其內部保守的天門冬氨酸殘基經水解形成大 (P20) 小 (P10) 兩個次單位，並進而形成兩兩組成的有活性的四聚體，其中，每個P20/P10異二聚體可來源於同一前體分子也可來源於兩個不同的前體分子。
- 3) 末端具有一個小的或大的原結構域。

參與誘導凋亡的Caspase分成兩大類：啟動酶 (initiator) 和效應酶 (effector) 它們分別在死亡信號轉導的上游和下游發揮作用。

- Caspase活化機制：
- 有順序的多步水解的過程。
- 首先在caspase前體的N-端前肽和大次單位之間的特定位點被水解去除N-端前肽，然後再在大小次單位之間切割。
- 由大次單位和小次單位組成異源二聚體，再由兩個二聚體形成有活性的四聚體。

Caspase活化的兩種機制 同源活化和異源活化

- 發生同源活化的Caspase又被稱為啟動caspase (initiator caspase)，包括caspase-8,-10,-9，誘導凋亡後，起始Caspase被集合到特定的起始活化復合體，形成同源二聚體，導致同源分子之間的醣素斷切而自身活化，同源活化是細胞凋亡過程中最早發生的caspases水解活化事件，啟動Caspase活化後，即開啟細胞內的死亡程序，通過異源活化方式水解下游Caspase將死亡信號放大，同時將死亡信號向下傳遞。
- 異源活化 (hetero-activation) 即由一種caspase活化另一種caspase是凋亡蛋白酶的酶原被活化的經典途徑。被異源活化的Caspase又稱為執行caspase(executioner caspase)，包括Caspase-3,-6,-7。執行Caspase不像啟動Caspase，不能被募集到或結合起始活化復合體，它們必須依賴啟動Caspase才能活化。

Apoptosis common execution phase

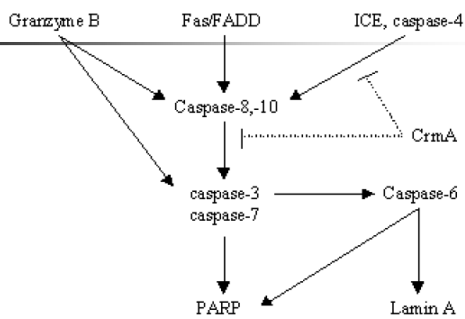


图 20. caspase 蛋白酶在细胞凋亡中的活化顺序

(二) 細胞凋亡的調控

1. 細胞凋亡的誘導因素與抑制因素

(1) 誘導因素 (啟動細胞凋亡)

理化因素：電離輻射、高溫、強酸、強鹼、細胞毒性抗癌藥等。

激素和生長因數失衡：二者過多或缺乏均可應起細胞凋亡。例：強烈應激反應、糖皮質激素、淋巴細胞凋亡。

病原體：細菌、病毒等。例：HIV、CD₄⁺T細胞凋亡。

(2) 抑制因素 (抑制細胞凋亡)

細胞生長因數：如IL-2、神經生長因數。

激素例：ACTH、腎上腺皮質細胞凋亡。

其他：如Zn²⁺、藥物、某些病毒等。

凋亡信號轉導系統的特點：

- (1) 多樣性：不同種類的細胞有不同的信號轉導系統。
- (2) 偶聯性：即死亡信號的轉導系統與細胞增殖、分化過程中的信號轉導系統在某些環節上有交叉、偶聯。同一個信號，在不同條件下既可引起凋亡，也可引起增殖。
- (3) 同一性：即不同的凋亡誘導因素可通過同一信號轉導系統引起細胞凋亡。
- (4) 多途性：即同一凋亡誘導因素，可通過多條資訊轉導途徑引起的細胞凋亡。

3. 細胞凋亡的相關基因

- (1) 抑制凋亡基因：Bcl-2、E1B、IAP等。
- (2) 促進凋亡基因：p53、ICE、Fas、Bax等。
- (3) 雙向調控基因：c-myc。

Bcl-2(B-cell lymphoma/leukemia -2)基因：

分佈：造血細胞、上皮細胞、淋巴細胞、多種瘤細胞。

功能：抑制多種凋亡誘導因素（如電離輻射、化學藥物）所引起的細胞凋亡。

機制：

- *直接抗氧化而抑制細胞調亡；
- *抑制粒線體釋放促進調亡的蛋白質；
- *抑制促進調亡調節蛋白的細胞毒作用；
- *抑制調亡蛋白酶的啟動；
- *維持細胞鈣穩態。

(2) 促進調亡基因：如p53、ICE、Fas、Bax

p53基因——編碼53kD 蛋白質，故名p53。

功能：促使惡性腫瘤細胞、衰老細胞或損傷較重的細胞調亡，修復受損的細胞。

機制：射線、毒素 ——> DNA損傷+p53 蛋白 ↑

→ 啟動DNA修復機制 ——> DNA修復

→ 啟動細胞調亡機制 ——> 細胞調亡

p53 基因突變後反而抑制細胞調亡，值得注意。

(3) 雙向調控基因：C-myc

雙向調節：

誘導細胞增殖（有生長因數）

誘導細胞調亡（無生長因數）

調亡與疾病

apoptosis

- 細胞調亡與疾病的關係——該“死”的細胞不死，不該“死”的細胞卻死了，也就是說無論調亡過度或調亡不足都可以導致疾病的發生。
- 1. 細胞調亡不足：腫瘤、自身免疫病。
- 2. 細胞調亡過度：心肌缺血、心臟衰竭、神經元退行性疾病、病毒感染。
- 3. 不足與過度並存：動脈粥樣硬化。

細胞調亡不足

1. 腫瘤：調亡抑制基因Bcl-2基因過高表達----
調亡衰減（前列腺癌）
促調亡基因如p53基因突變或缺失，腫瘤發生率↑

2. 自身免疫病

—— 自身抗原受到自身抗體或致敏T淋巴細胞的攻擊而損傷

T、B淋巴細胞通過正選擇和負選擇才能發育、分化成熟

負選擇：調亡清除針對自身組織抗原和TCR的雙陽性細胞

正選擇：保留能夠識別自身組織抗原的T細胞，並增殖成熟

故，調亡不足，造成negative selection不足，
使自身免疫細胞流出胸腺

細胞調亡與疾病

(一) 細胞調亡不足

1. 腫瘤

- 細胞增殖過度、細胞調亡不足。

實驗研究：

p53基因（促調亡基因）缺失或突變

Bcl-2基因（抑制調亡基因）表達過度

細胞調亡不足

↓
腫瘤

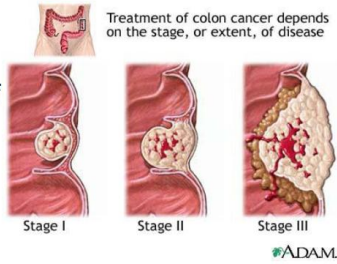
臨床應用：——

放療、化療

誘導瘤細胞調亡

Inhibition of apoptosis: Cancer

- Deletion/mutation of p53
- express high levels of Bcl-2
- FAS signaling



2. 自身免疫病

對自身抗原發生免疫反應 → 自身組織損傷。

針對自身抗原免疫細胞凋亡不足 → 自身免疫病。

例：SLE、1型糖尿病、類風濕性關節炎、多發性硬化症、慢性甲狀腺炎。

臨床應用：

固醇類激素 → 誘導自身免疫性淋巴細胞凋亡抑制免疫反應

細胞凋亡過度

1. 心血管疾病

(1) 心臟衰竭

(2) 心肌缺血再灌注損傷 —— 壞死與凋亡共存

發生機制：氧化應激；細胞內鈣超載；

Fas受體上調；p53基因轉錄增強

凋亡特點：①早期凋亡為主，晚期壞死為主

②受損區域中央以壞死為主，周邊凋亡為主

③慢性、輕度缺血以凋亡為主，急性、重度缺血則常常發生壞死

④IR引起的細胞凋亡有時比單純缺血更嚴重

(三) 細胞凋亡不足與過度並存

- 動脈粥樣硬化症（內皮細胞凋亡過度，平滑肌細胞增殖 > 凋亡）
- 心律不整（異常的神經訊號路徑）

病毒感染

病毒感染宿主細胞後有兩種結局：

1. 一是誘導細胞凋亡從而限制病毒生長（肝炎病毒）；
2. 二是由病毒基因表達的蛋白抑制宿主細胞凋亡，造成持續性感染或增加某些病毒的致癌可能性。

AIDS：由HIV感染引起，其關鍵是CD4+淋巴細胞被破壞（apoptosis），導致CD4+淋巴細胞顯著減少，相關免疫功能缺陷。CD4+淋巴細胞與HIV感染者病情發生發展有密切關係，它決定感染者是否發病、發病的速度和嚴重程度。

細胞凋亡在疾病防治中的意義

- 細胞凋亡是一個程序化過程，可以通過不同的手段在不同的階段進行干預而治療疾病合理利用凋亡相關因素：
- 1. 誘導目標細胞凋亡：放療、化療、高熱、高溫
- 2. 減少細胞凋亡：NGF、促生長因子、抗氧化劑

(三)簽到表影本

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102/05/08

地點：光壁企業股份有限公司

參與人員

吳佳螢

丁妙玲

施貞儀

蔡佳芳

張家杰

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102/05/30

地點：麗澤生科技股份有限公司

參與人員

洪煥庭

吳佳螢

黃子軒

蔡佳芳

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102/07/16

地點：創意樓 AS506

參與人員

顏洋濱

王理偉

余桂森

施亞登

黃敬崖

丁妙玲

吳佳螢

張家杰

王君生

許五蓮

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102/07/19

地點：創意樓 AS409

參與人員

丁妙玲

吳佳螢

顏洋濱

張家杰

余桂森

黃敬崖

蔡佳芳

蔡鈞祝

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102//08/02

地點：創意樓 AS409

參與人員

吳佳螢 施亞竺
顏洋濱
郭星君
王理偉
黃敬陸
丁妙玲
蔡佳芳
施貞儀

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102//09/13

地點：創意樓 AS506

參與人員

吳佳螢
施亞竺
王理偉
丁妙玲
顏洋濱
許又文
蔡佳芳

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102//09/25

地點：創意樓 AS502

參與人員

吳佳螢
施亞竺
郭星君
王理偉
丁妙玲
顏洋濱
蔡佳芳

結合企業實習推展主題式專題研究

日期：102//10/11

地點：創意樓 AS502

參與人員

吳佳螢
施亞竺
郭星君
王理偉
丁妙玲
顏洋濱
蔡佳芳

三、成果與檢討

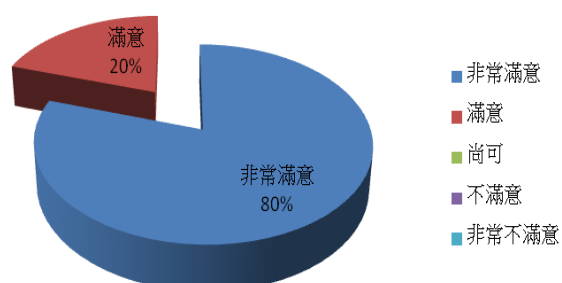
(一)預期目標達成情形

一個專題的完成必須要長時間費精力的投入，才能有一個專題的成果展現。本次主題式專題研究有 10 位同學參與，主題有野薑花抗氧化活性、豌豆蛋白與薑黃素複合物生物活性探討、EGCG 延緩白內障發生、杜莎藻延緩乙醯胺基苯酚誘發肝損傷之模式、杜莎藻對肝癌細胞氧化性損傷的保護機制、蘭花萃取物抗氧化分析等多案。原先一案由光璧企業股份有限公司指導杜莎藻對肝癌細胞氧化性損傷的保護機制，但由於本實驗所選定的 Hep G2 肝癌細胞較不易培養，訓練學生培養過程因多次操作手法不熟悉，導致細胞多次汙染或生長緩慢，至結案時僅有抑制癌細胞生長的曲線圖，仍需要進一步確認 DNA 是否有進行細胞凋亡以及細胞凋亡等相關蛋白質的表現，無法有較完整的數據。因此以另外一個台灣欒樹萃取物抗氧化及美白功效評估取代。其杜莎藻的專題實驗也仍在持續進行。第二案原先規劃玉蘭花萃取物也因為廠商無法及時提供玉蘭花的樣品，而改以蘭花萃取物進行分析。台灣欒樹萃取物的專題實驗已於 2013 年 3 月底完成生物醫學聯合學術研討會進行壁報論文發表，第二案的蘭花萃取物美白及抗氧化功效將於 2013 年 12 月 6 日投稿於彰雲嘉聯盟學術研討會進行壁報論文發表。

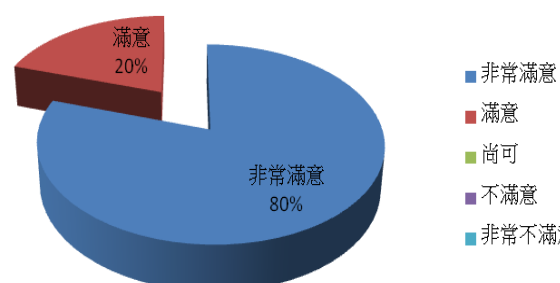
(二)活動滿意度分析

	非常滿意	滿意	尚可	不滿意	非常不滿意
1. 講師講授內容與本次主題相關性	80	20	0	0	0
2. 講師表達能力與講解清晰度	80	20	0	0	0
3. 講義資料完整度	90	10	0	0	0
4. 本活動對提升學習的助益	100	0	0	0	0
5. 承辦單位整體規劃	100	0	0	0	0

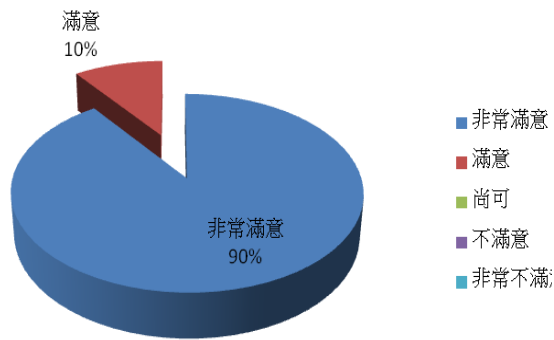
1. 講師講授內容與本次主題相關性



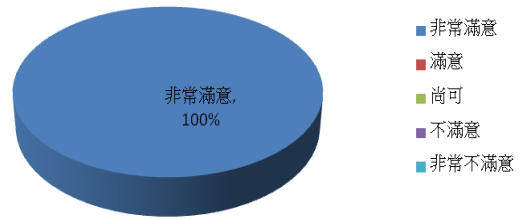
2. 講師表達能力與講解清晰度



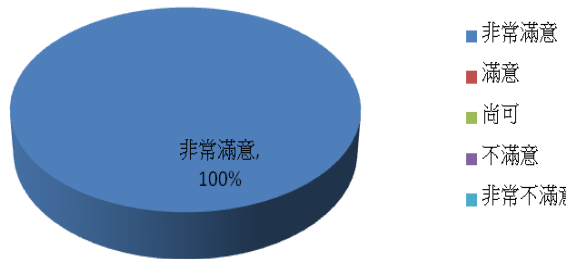
3. 講義資料完整度



4. 本活動對提升學習的助益



5. 承辦單位整體規劃



(二)海報

1. 第 28 屆生物醫學聯合學術年會



JACBS
Joint Annual Conference of Biomedical Science
生物醫學年會

第28屆生物醫學聯合學術年會

2013 The 28th Joint Annual Conference of Biomedical Science

March 23-24, 2013 國防醫學院
| 臺北市民權東路6段161號
| NO.161, Sec 6, Min-Chuan East Road, Taipei

- 中華民國毒物學學會
Toxicology Society of Taiwan
- 中華民國臨床生化學會
Chinese Association for Clinical Biochemistry
- 中國生理學會
The Chinese Physiological Society
- 台灣藥理學會
The Pharmacological Society in Taiwan
- 中華民國解剖學學會
The Association of Anatomists of the Republic of China
- 台灣生物化學及分子生物學學會
The Taiwan Society of Biochemistry and Molecular Biology
- 中華民國細胞及分子生物學學會
The Chinese Society of Cell and Molecular Biology

看 板 論 文 報 告 摘 要
Abstracts of Poster Presentations

台灣欒樹萃提取物抗氧化及美白功效評估

黃子軒(Zi-Xuan Huang)¹ 的又文(Yu-Wen Hsu)¹ 蔡佳芳(Chia-Fang Tsai)¹
¹環球科技大學生物技術系

摘要

台灣欒樹，學名：*Koeberlinia elegans* Dummer 又名苦楝屬、苦茶紅、金苦楝、板子藤油、台灣欒華、水欒仔、五色欒華，是一種茄科的落葉喬木植物，為台灣原生種有藥，耐旱性強。大約秋季 10 月開花。本研究目的在探討台灣原生種台灣欒樹新鮮熱水萃取物對於抗氧化以及抑制黑色素功效評估。採集台灣欒樹新鮮的莖子進行熱水萃取後，經冷凍乾燥得自萃取物。進行的相關試驗包括酪胺酸酶(tyrosinase)抑制率測定、清除 DPPH 自由基之能力、還原力、整合亞鐵之能力、及總酚類含量和總黃酮類測定。結果顯示台灣欒樹莖子萃取物能清除 DPPH 自由基、還原力及金屬整合能力試驗中隨著濃度的增加其抗氧化力之都有增加之趨勢。酪胺酸酶抑制劑的 EC₅₀ 濃度為 550 µg/ml。其總酚類含量及總黃酮類含量則分別為 24.12 mg of gallic acid equivalently 及 8 mg of quercetin equivalently。綜合試驗結果顯示台灣欒樹莖子萃取物具備為抗氧化之化妝品或保健品。

材料與方法

台灣欒樹莖子萃取物製備

試驗所用之台灣欒樹係採自環球科技大學，將其新鮮的莖子以 100 度熱水煮沸 30 分鐘後，以減壓濃縮機取新鮮萃取液，定置於 20 度 C 冰箱保存備用。

1. DPPH 自由基清除

參考 Sklarzoda 等人(1992)方法，DPPH 溶解於乙醇中呈深紫色，本身是一種穩定的自由基，加入的樣品，若可以和 DPPH 自由基產生反應，則會阻止 DPPH 自由基進行連鎖反應，導致顏色會轉成黃色。表示加入的樣品具有清除 DPPH 自由基的能力。在 517nm 處會測其吸光值，吸光值會與對照的樣品其抗氧化力相對，DPPH 自由基清除率(%)=(1-實驗加吸光值/對照加吸光值)×100

2. 還原力

參考 Oyaizu(1986)方法，利用試劑中的還原物質將亞鐵鹽(potassium ferricyanide (III)[Fe(CN)₆]³⁻)還原成亞鐵鹽(potassium ferrocyanide (I)[Fe(CN)₆]⁴⁻)，形成普魯士藍(Prussian blue)：[Fe(CN)₆]₄之藍色化合物，於波長 700nm 具有吸光值，會吸光值愈高表示試劑中所含還原物質愈多，還原力愈強。

3. 金屬整合能力

參考 Dink(1994)的方法，利用 Fe²⁺與 Ferrozine 的複合物在波長 562 nm 之藍色反應，可以測得樣品有 Fe²⁺的整合能力，會與品與 Fe²⁺整合時，在 562nm 處會有吸光值，吸光值愈低表示樣品整合亞鐵離子的能力愈強。

酪胺酸酶的抑制

酪胺酸酶是酪胺酸形成黑色素的關鍵酵素，會皮膚定管外細胞刺激會促進酪胺酸酶催化產生後續的氧化反應，最終形成黑色素，造成皮膚表皮產生色素沉澱現象。樣品於磷酸鹽緩衝液及 0.03%Tyrosine 水溶液反應，再加入 Tyrosinase 水溶液後，以測定 475nm 的吸光值(A1)，以磷酸鹽緩衝液換取 Tyrosinase 測定 475nm 的吸光值(A1)，以各離子取代樣品，測定 475nm 的吸光值(A2)，以各離子取代樣品，並以磷酸鹽緩衝液換取 Tyrosinase 測定 475nm 的吸光值(A3)。樣品試驗重複三次。

Depachrome 抑制率(%)=[(A3-A2)/(A3-A1)]/(A3-A1)×100%

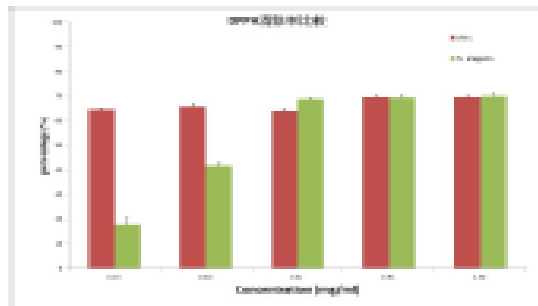
總酚含量測定

總酚的含量測定採用比色法分析，樣品中含有酚類化合物會與 Folin and Ciocalteu phenol 試劑在波長 750 nm 具有藍色反應，根據其吸光值與及電子總濃度來自標準而繪成線性方程式，換算樣品濃度之相對含量，吸光值愈高代表樣品中總酚含量愈高。

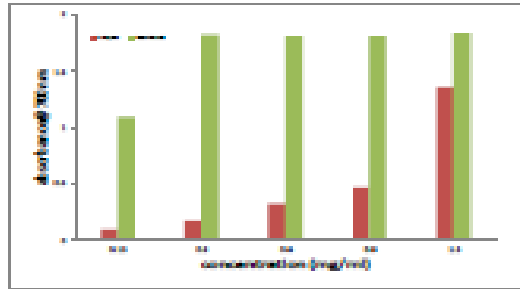
總黃酮含量測定

槲皮素為一種多酚類化合物，台灣欒樹莖子萃取物與氯化鋁、鞣酸鈣、已醌等試劑反應後，在波長 430nm 會有吸光值，根據其吸光值與電子濃度來自標準而繪成之方程式，換算樣品濃度之相對含量，其吸光值愈高，則代表樣品中總黃酮類含量愈高。

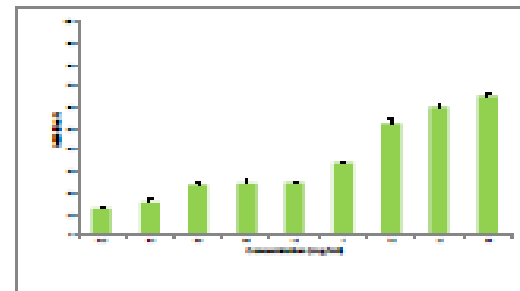
結果



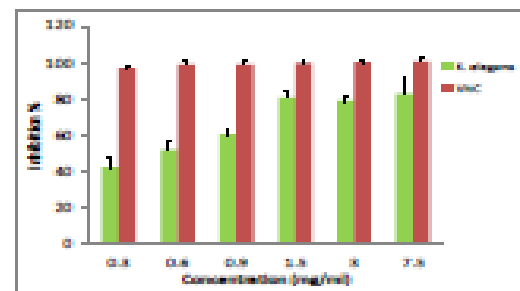
圖一、台灣欒樹莖子萃取物清除 DPPH 自由基的能力



圖二、台灣欒樹莖子萃取物還原力測定



圖三、台灣欒樹莖子萃取物整合亞鐵能力



圖四、台灣欒樹莖子萃取物抑制酪胺酸酶能力

表一、台灣欒樹莖子萃取物總多酚及總類黃酮含量測定

Specimens	Total phenolic contents (mg of GAE/g)	Total flavonoids contents (mg of QE/g)
Leaf extract	24.1±0.77	8±1

結論

由 DPPH 自由基清除試驗中台灣欒樹莖子萃取物的 EC₅₀ 為 0.42mg/ml，酪胺酸酶抑制劑的測定中發現台灣欒樹莖子萃取物在 1.5mg/ml 就有 70% 以上的抑制率，所以本研究結果顯示台灣欒樹萃取物具有不錯的抗氧化性、還原力及金屬整合能力，且亦可作為生化妝品原料開發。

P745
Cytotoxic Effects of Nanosilver Particles on Embryonic Development in Mouse Two-cell Stage
程偉輔¹, 詹文雄¹, 葉瑞銘²
Wei-Fu Chang,¹ Wen-Hsiung Chan, Ph.D.,¹ Jui-Ming Yeh Ph.D.²
¹Department of biotechnology, ²Department of Chemical, Chung Yuan Christian University

Backgrounds:
Silver nanoparticles (Ag-NPs) have existed in nature since the beginning of earth history. They have been widely used as an antimicrobial coating in various antibacterial products. However, the biological side effect on mouse early embryos remains unknown. In the present study, we investigate the cytotoxicity of Ag-NPs on mouse two-cell stage embryos.

Materials and Methods:
The mouse two-cell stage embryos were exposed to 3, 6 and 12µM Ag-NPs. Cell proliferation, apoptosis detection, early embryonic outgrowth and generation of reaction oxygen species (ROS) were evaluated by Hoechst staining, TUNEL assay, embryo transfer and DCF-DA staining, respectively.

Results:
Two-cell stage embryos treated with 6 and 12µM Ag-NPs exhibited significantly damage embryonic morphology. Percentage of two-cell stage embryo development to blastocyst stage decreased at 6µM Ag-NPs or more concentration. The results also showed that Ag-NPs inhibited cell proliferation and significantly induced cell apoptosis at 6µM Ag-NPs. Ag-NPs retarded early embryonic outgrowth at 3µM Ag-NPs. Two-cell stage embryos treated with Ag-NPs increased ROS level in dose- and time- dependent manner.

Conclusion:
The results reveal that low concentration Ag-NPs has potential to induce embryo cytotoxicity. Ag-NPs-induced cytotoxicity maybe related to generation of ROS. Further study show that NAC can prevent effect of Ag-NPs on generation of ROS.

P746
Study on The Effects of ketamine and its Metabolites on Human Kidney Cell
黃千毓, 黃瑞文, 曾莉娟, 黃美涵, 陳昌裕, 林冠華
Chien-Yu Huang, Pei-Wen Huang, Li-Chuan Tseng, Mei-Fan Huang, Chang-Yu Chen, Kuan-Hua Lin
Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Fooyin University, Kaohsiung, Taiwan

Backgrounds:
According to previous study, the complications of ketamine including impairment with raised serum urea and creatinine levels. The effect of ketamine and its metabolites on kidney remain unknown. In this study, we explore the extent and the impact on kidney cell line by the ketamine and its metabolites.

Materials and Methods:
Human kidney cell line (HEK293) has been used in our study to explore the effects in morphological changes and cell viability after treatment with ketamine and its metabolites (norketamine and dehydronorketamine). Cell viability was detected by MTT assay, Western blot and flow cytometry.

Results:
The viability of HEK293 cells decreased significantly after treatment with ketamine and its metabolites (norketamine and dehydronorketamine) for 24-48 hours incubation period. The expression of NF-κB is increased in ketamine-treated HEK293 cells. On the other hand, not only the ketamine and dehydronorketamine-treated cells were in round-shape when compared with control group and other ketamine metabolites did, but also its growth rate was down as well.

Conclusion:
The ketamine and its metabolites decreased the viability of HEK293 cells for 20-25%. In addition, we also showed that the ketamine and its metabolites treated HEK293 cells increased the expression of NF-κB in the 24-48 hours incubation period. In conclusion, the ketamine and its metabolites decrease HEK293 cells viability probably through the NF-κB-dependent mechanism. The exact mechanism that cause the morphological and the viability changes need much further study.

P747
The antioxidant capacity and whitening effects of extract from the leaves of *Koelreuteria henryi* Dummer
黃子軒¹, 許又文², 蔡桂芳¹
Zi-xuan Huang, B.S.,¹ Chia-Fang Tsai, Ph.D.,¹ Yu-Wen Hsu, Ph.D.²
¹Department of Biotechnology, TransWorld University, ²School of Optometry, Chung Shan Medical University

Backgrounds:
Koelreuteria henryi Dummer, a deciduous tree, is an indigenous plant in Taiwan. In this study, the antioxidant capacity and whitening effects of hot water extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer were investigated with a number of established *in vitro* assays.

Materials and Methods:
The fresh leaves of *Koelreuteria henryi* Dummer were extracted by hot water. The antioxidant activities were examined by DPPH radical scavenging activity, ferrous ion chelating activity, reducing power and TEAC. The whitening effects were examined by the assay of inhibits tyrosinase activity. Additionally, we also measured the amount of total flavonoids and total phenolic in the leaves of *Koelreuteria henryi* Dummer.

Results:
The results showed that DPPH radical scavenging activity, ferrous ion chelating activity, reducing power and TEAC all increased with increasing concentrations of leaf extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer. Moreover, the EC₅₀ values of leaf extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer from the tyrosinase inhibiting assay was 0.55 mg/ml. Additionally, the contents of total phenolic and total flavonoids of leaf extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer were 8.00 µg of GAE/mg and 24.12 µg of QE/mg, respectively.

Conclusion:
The results of this study demonstrated that the leaf extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer contained abundant total phenolic and total flavonoids, which are known to have significant antioxidant activities. Furthermore, we also found that the leaf extracts of *Koelreuteria henryi* Dummer exhibited remarkable antioxidant activity, as well as high inhibiting activity of tyrosinase. These results clearly indicate that *Koelreuteria henryi* Dummer has significant potential as a natural antioxidant agent.

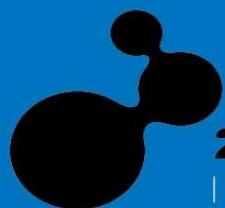
P748
Systemic and intestine specific enhance EPA and DHA biosynthesis to resist cold shock and oxidative stress in zebrafish
黃元星, 王嘉馨, 耿全福
Yuan-Shing Huang, Chia-Jung Wang, Chuan-Fu Ken.
National Changhua University of Education

Backgrounds:
The n-3 PUFA include EPA(20:5n-3) and DHA(22:6n-3), is important to human health, but we can't synthesis these essential fatty acid in our body. The major resource of n-3 PUFA were came from deep sea marine fish oil, recently, over-fishing and marine pollution caused the production of PUFA was seriously effect.

Materials and Methods:
In this study, we try to use β-actin and gut-specific expression promoter IFABP link Δ5, Δ6 desaturase, and elongase 5a genes, microinjected these constructs into zebrafish embryos. The transgenic fish F0 were examined at 3-5 dpf by fluorescence microscopy and RT-PCR. We also used high PUFA contained forage to feed fish for 8 months as compare group, then put these fish into cold shock at 8°C, or ip 900 mg/ml TAA/LPS into adult fish, or treated to embryos. The ROS were assay by DCFH-DA and the oxidative stress was assay by lipid hydroperoxide.

Results:
We have generated 30 fish for IFABP-Fad5, 4 fish for IFABP-Fad6 and 14 fish for IFABP-elongase 5a transgenic fish, and 10 fish for β-actin-Fad5, 13 fish for β-actin-Fad6, and 3 fish for β-actin-elongase 5a transgenic fish. The transgene integration was confirmed by genomic analysis and RT-PCR. The high PUFA contained fish can maintain normal breathing and balance of swimming under cold shock. 900 mg/ml TAA was injected into fish by ip, and the basophilic cytoplasm were shown by HE stained after 2 weeks injection, we also found TAA can induce H2O2, NO and oxidative damage increasing significantly. In the pre-test, high PUFA fish can partially reduce TAA/LPS induced oxidative stress.

Conclusion:
High PUFA synthesis zebrafish are generate by either β-actin or gut-specific expression promoter IFABP drive Δ5, Δ6 desaturase, and elongase 5a genes expression. The transgene were integrated into fish genome, and can express either in whole body or in specific tissue. The high PUFA fish can resist cold shock and TAA/LPS induced oxidative.



2013

| 彰 | 雲 | 嘉 | 大 | 學 | 校 | 院 | 聯 | 盟 |

年度大會 & 學術研討會

臺灣農業創新與發展 – 論文摘要集
Abstracts of Oral and Poster Presentations



December 6, 2013(星期五)

環球科技大學

雲林縣斗六市嘉東里鎮南路1221號

主辦單位 | 彰雲嘉大學校院聯盟、環球科技大學

承辦單位 | 環球科技大學健康學院、生物技術系、研發處

指導單位 | 教育部區域產學中心

摘要內容

編號:PE-7

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *ORCHID* EXTRACT

蘭花萃取物之抗氧化活性

Miao Ling Ding¹, Jia Ying Wu¹, Chia-Fang Tsai¹

丁妙玲¹、吳佳螢¹、蔡佳芳¹

¹Department of Biotechnology, TransWorld University

¹環球科技大學生物技術系

摘要

蘭花，學名：Orchidaceae (蘭科)，台灣為全球最大的蘭花輸出國，而台南是蘭花產量最多的地方，蘭花目前在台灣觀賞用較多，應用在化妝品方面極為少數。本研究目的是探討蘭花萃取物於抗氧化的功效。將蘭花的花經由冷凍乾燥後，以50%乙醇萃取，試驗方法有清除 DPPH 自由基、還原力、金屬螯合能力以及總酚類和總類黃酮含量測定。結果表明在 DPPH 自由基捕捉、還原力及金屬螯合能力試驗中蘭花萃取物在 10mg/ml 濃度是最好的。總酚類含量測定顯示蘭花的含量含有 47.279 $\mu\text{g/mL}$ 。總類黃酮含量測定顯示蘭花的含量含有 18 $\mu\text{g/mL}$ 。蘭花是具有顯著的抗氧化活性，可深入探討其抑制黑色素生成能力，因此極具開發價值。

關鍵字：Orchid; antioxidant properties

蘭花萃取物之抗氧化活性

丁妙玲(Miaoling Ding) 吳佳蓉(Jia Ying Wu) 蔡佳芳(Chia-Fang Tsai)
環球科技大學生物技術系

摘要

蘭花，學名：*Orethulaceae* (蘭科)，台灣為全球最大的蘭花輸出國，而台南是蘭花產量最多的地方，蘭花目前在台灣觀賞用較多，使用在美容上極為少數，所以這次研究目的是在探討其抗氧化上的功效。將蘭花的花瓣由冷凍乾燥後，以 50% 乙醇萃取，測驗方法為 DPPH 自由基捕捉、還原力、金屬螯合能力以及總酚類和總類黃酮含量測定。結果表明在 DPPH 自由基捕捉、還原力及金屬螯合能力試驗中蘭花在 10mg/ml 濃度是最好的。總酚類含量測定顯示蘭花的含量含有 47.28mg/g。總類黃酮含量測定顯示蘭花的含量含有 3.70 mg/g。蘭花是具有抗氧化活性，且效果是顯著的。

關鍵字: *Orethulaceae* antioxidant properties

材料與方法

蘭花萃取物製備

將蘭花由利用冷凍乾燥技術進行乾燥，將取花萃取物樣品 1g 加 50% 的乙醇 20mL，進行 3 小時室溫萃取，將濾液以 90mm 濾紙抽氣過濾後進行減壓濃縮至乾，再以 50% 的乙醇定重至一定濃度，儲存於 -20℃ 備用。

抗氧化活性分析

1. DPPH 自由基捕捉

參考 Shimada 等人(1992)方法，DPPH 溶于乙醇中呈藍紫色，本身是一種穩定的自由基，加入的樣品，若可以和 DPPH 自由基產生反應，則會阻止 DPPH 自由基進行連鎖反應，溶液顏色會轉成黃色，表示加入的樣品具有捕捉 DPPH 自由基的能力，在 517nm 處會有強烈吸光值，吸光值會依照表示樣品具抗氧化力強弱，DPPH 自由基清除率(%)=(1-實驗組吸光值/對照組吸光值)×100

2. 還原力

參考 Ouyang(1986)方法，利用試劑中的還原物質將赤血鹽(potassium ferricyanide $III[K_3Fe(CN)_6]^{1-}$)還原成黃血鹽(potassium ferriyanide $IV[K_3Fe(CN)_6]^{4-}$)，形成普魯士藍(Prussian blue; $[Fe_4(CN)_{12}]_3$)此深藍色複合物，於波長 700nm 具有吸光值，當吸光值愈高表示試劑中所含還原物質愈多，還原力愈強。

3. 金屬螯合能力

參考 Dixit(1994)的方法，利用 Fe^{2+} 與 Ferrozine 的複合物在波長 562 nm 之藍色反應，可以測得樣品對 Fe^{2+} 的螯合能力，當樣品與 Fe^{2+} 螯合時，在 562nm 處會有吸光值，吸光值愈低表示樣品螯合亞鐵離子的能力愈強。

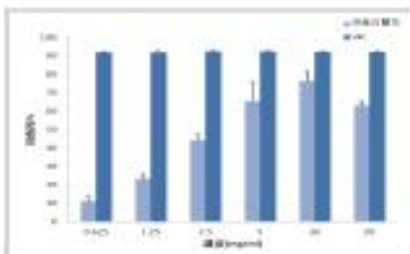
總酚含量測定

總酚的含量測定採用比色法分析，樣品中含有酚類化合物會與 Folin and Ciocalteu's phenol 試劑在波長 750 nm 具有藍色反應，根據此吸光值與沒食子酸濃度來自標準回歸曲線方程式，換算標準品濃度之相對含量，吸光值愈高代表樣品中總酚含量愈高。

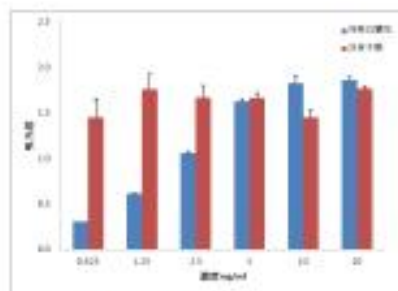
總類黃酮含量測定

類黃酮為一種多酚類化合物，野薑花萃取物與氯化錒、鞣酸鈣、乙醇等試劑反應後，在波長 430nm 會有吸光值，根據此吸光值與類黃酮標準品濃度來自標準回歸曲線方程式，換算標準品濃度之相對含量，其吸光值愈高，則代表樣品中總類黃酮含量愈高。

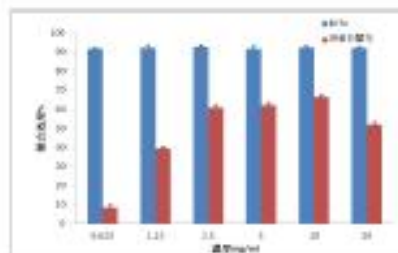
結果



圖一、蘭花萃取物清除 DPPH 自由基的能力



圖二、蘭花萃取物還原力測定



圖三、蘭花萃取物螯合亞鐵能力測定

總酚類	47.28±0.31(mg/g)
總類黃酮	3.70±0.96(mg/g)

表一、蘭花萃取物總多酚及總類黃酮含量測定

結論

在 DPPH 自由基捕捉、還原力、金屬螯合能力試驗中在 10mg/ml 有最好的效果。總酚類含量測定有 47.28±0.31 (mg/g) 總類黃酮含量測定有 3.70±0.96(mg/g)，所以本研究發現野薑花是具有抗氧化活性，因此可成為天然抗氧化劑，並其可作為的保健食品材料之一。

(三)指導記錄表

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	杜莎藻的藻類特性		工作編號	B-1-2-11
指導老師	施貞儀	指導地點	光壁企業股份有限公司	
指導日期	102/05/08	指導時間	13:30-15:30	
應到人數	4	實到人數	4	
指導內容或回饋意見				
<p>杜沙藻細胞表面沒有纖維素構成的細胞壁，而是一層薄而富有彈性的細胞膜，因而細胞的形狀和大小常常隨著週遭環境，尤其是滲透壓的變化而有不同的形狀，呈球形、卵圓形、橢圓形、葫蘆形、紡錘形等多種形狀，直徑只有十幾個微米。細胞內部有一個大的杯狀葉綠體。藻體一般為綠色，但在高溫、高光照和養分缺乏的情形下，葉綠體的外緣和類囊體片層間會累積大量富含類胡蘿蔔素的中性脂質小體，使藻體變成黃色、橙色或紅色。杜沙藻有著很大的適應性，在鹹水湖、海水或是淡水環境都有分布。杜沙藻是一種光能轉化率高、生長繁殖快速的單細胞綠藻，其綠藻內存在的初級或次級代謝產物，不但結構特殊，而且具有多種生理活性。自 20 世紀的 60~70 年代，人們就開始採用生物技術萃取藻體中的生物活性物質，製造保健食品。杜沙藻可在藻體內累積高量的類胡蘿蔔素，其種類包括 β-胡蘿蔔素、α-胡蘿蔔素、葉黃素、蕃茄紅素及玉米黃素等多種天然類胡蘿蔔素。</p>				

指導老師簽名處：施貞儀

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	蘭花萃取技術		工作編號	B-1-2-11
指導老師	洪煥庭	指導地點	麗澤生技股份有限公司	
指導日期	102/05/30	指導時間	14:00-16:00	
應到人數	7	實到人數	7	
指導內容或回饋意見				
<p>1. 教導學生認識生技化妝品研發的最新發展，以及如何利用蘭花萃取液開發新產品。</p> <p>2. 教導蘭花的挑選，經過冷凍乾燥處理，以低溫萃取出粗萃取液，並進行抗氧化分析。</p>				

指導老師簽名處：洪煥庭

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	金線連培養技術		工作編號	B-1-2-11
指導老師	洪煥智	指導地點	麗澤生技股份有限公司	
指導日期	102/07/16	指導時間	10:00-16:00	
應到人數	1	實到人數	1	
指導內容或回饋意見				
<p>1. 教導學生如何判斷實驗室內栽培台灣金線連的品質好壞，一般來說台灣金線連培養的時間大約需要六個月，其中約需要更換培養土 2-3 次，利用 LED 的燈光和溫度濕度的控制下，以無菌的培養土栽培，可以產出富含有效成份的金線連。學升學會如何選取營養足夠、飽滿的金線連，並學會更換培養土。經過挑選之後的金線連，以去離子水清洗，晾乾後再重新種入培養土內。</p>				

指導老師簽名處：洪煥智

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	HPLC 原理與應用		工作編號	B-1-2-11
指導老師	許又文	指導地點	創意樓 AS506	
指導日期	102/07/19	指導時間	14:00-16:00	
應到人數	11	實到人數	11	
指導內容或回饋意見				
<p>1. 教導學生 HPLC 的原理，儀器設備介紹，</p> <p>2. HPLC 適用於半揮發性化合物、非揮發性化合物、樣品沸點過高、不宜加溫而不便使用氣相層析儀者的待測物，</p> <p>3. 應用 HPLC 進行分析的先決條件是待測物必須溶於作為動相的溶劑中做液相樣品的定性及定量分析。</p>				

指導老師簽名處：許又文

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	杜莎藻的保健食品開發		工作編號	B-1-2-11
指導老師	施貞儀	指導地點	光壁企業股份有限公司	
指導日期	102/08/02	指導時間	13:30-15:30	
應到人數	4	實到人數	4	
指導內容或回饋意見				
<p>光壁企業專業培養微藻類，10 年前投入杜莎藻正式量產，能培養含量高達每 100 公克含有 7,660mg/100g 之 β-胡蘿蔔素，與學術單位進行產學合作深度研究，經動物實驗研究結果發現能減緩四氯化碳對肝臟的損傷，於 2008 年發表在國際醫學期刊，並進一步開發成保健食品。杜莎藻內，除含有大量 β-胡蘿蔔素，尚含 α-胡蘿蔔素、葉黃素和玉米黃素及其他類胡蘿蔔素如蕃茄紅素，含量是紅蘿蔔的 500 倍。其所表現的是多方面的生理生化功能，比單獨任何一項胡蘿蔔素的功能多，杜莎藻之生產確實可對平日黃綠色蔬菜攝取不足之國人，提供良好之天然綜合類胡蘿蔔素來源。</p> <p>另外研究發現小鼠吃杜莎藻後照射紫外線實驗，發現能減緩紫外線對水晶體及角膜氧化的損傷，也發表於分子視力 (Molecular Vision) 與生命科學期刊 (Life Science Journal)。並取得衛生署健康食品小綠人標章。</p>				

指導老師簽名處：施貞儀

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	化妝品功效評估方法		工作編號	B-1-2-11
指導老師	許又文	指導地點	AS506	
指導日期	102/09/13	指導時間	13:30-15:30	
應到人數	4	實到人數	4	
<p>指導內容或回饋意見</p> <p>化妝產品或活性成份都是經過科學方法所驗證，這些研究內容的成果會顯現在某些產品的說明上來證實產品的功效性。普遍的評估方式有</p> <p>A. 體外(in vitro) 酪胺酸酶抑制法</p> <p>東方女性普遍喜好白皙的皮膚，而膚色是由黑色素(melanin)、b-胡蘿蔔素(b-carotene)及血紅素(hemoglobin)所構成，皮膚顏色深淺主要是受黑色素含量之多寡及紫外線照射量而影響。黑色素在生物體內是由黑色素細胞所生成，黑色素由酪胺酸氧化而產生，會聚合成不規則之聚合物，存在於 melanosome 胞器內，數量愈多則顏色愈黑，人體表皮、毛囊及網膜均會產生。黑色素生成過程中最關鍵的酵素為酪胺酸酶，大多數美白成分具有此酵素抑制作用，因此在美白原料開發最常用的方法為體外酪胺酸酶抑制活性。將單位濃度 mushroom 酪胺酸酶加入酪胺酸溶液中，再將欲篩選之美白原料加入反應溶液中，若美白原料具有酪胺酸酶抑制活性則反應後之溶液會呈現較淡的顏色，經過分光測色計之測量，可計算其抑制率，進而計算出其 IC50，藉此評斷此美白原料是否具有很好之抑制能力。</p> <p>B. 黑色素細胞瘤(B16 melanoma)黑色素抑制法</p> <p>上述酪胺酸酶抑制活性的篩選法雖然在美白原料開發之使用較普遍，也較快速，缺點是無法篩選到其他美白作用機轉之物質，因此建議搭配 B16 黑色素抑制法進行篩選。此方法以細胞培養方式培養 B16 細胞株，待測美白成分經過滅菌處理後，以適量濃度加入細胞培養液中，經過 2-3 天培養後，測量對照組與實驗組之黑色素生成量，藉以評估所測定之原料是否具有美白功效。</p> <p>C. 活體(in vivo)試驗</p> <p>為了測試美白原料是否有功效，可採用活體試驗，通常可使用無毛鼠或是人體測試，此方法雖然較耗時，但是可同時試驗原料是否對皮膚會有副作用(刺激性或過敏反應)。對於美白使用後的功效，可使用皮膚測色計進行膚色測定，例如塗抹樣品前先以 Minolta 分光光度計測定膚色，然後每天塗抹兩次樣品。每週以 Minolta 分光光度計測定塗抹美白乳液及塗抹對照乳液部位之皮膚的 L*a*b*值。連續測定 4 週，然後比較 L*a*b*值的差異，藉以判斷該原料之效果。</p>				

指導老師簽名處： 許又文

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	細胞凋亡機制 I		工作編號	B-1-2-11
指導老師	郭星君	指導地點	As 506	
指導日期	102/09/25	指導時間	13:30-15:30	
應到人數	4	實到人數	4	
<p>指導內容或回饋意見</p> <p>細胞凋亡的生理意義</p> <p>不會造成組織的發炎反應可能是細胞凋亡與細胞壞死最不同的結果。也正因如此，細胞凋亡才可以在多細胞生物中扮演下列幾個生理角色。(1) 個體發生時的可塑性 (developmental plasticity) 及挑選最適細胞 (the fittest cells)：個體發生學的一個通則是在某個組織形成時，一開始往往製造數量過多的細胞，繼而再依據某種需求準則來選擇最後留存的功能細胞。例如，個體發生學的組織形成時，只有 50% 以下的原始腦神經細胞、少於 5% 的原始胸腺細胞、及大約 0.1% 的原始卵母細胞發育到能發揮生理功能。(2) 細胞凋亡是塑造個體及器官形態的機制：舉凡指頭形成、腸管腔道的形成、人類尾巴的消失、到昆蟲的蛻變 (metamorphosis) 等等的一切形態的形成。(3) 原狀恆定 (homeostasis)：細胞數目的原狀恆定由細胞增殖與細胞凋亡二大動力來平衡。最明顯的例子可見於血液系統，血液細胞的細胞增殖與細胞凋亡可依其所需要的生長因子與介白質存在與否來決定；此時生長因子與介白質就是扮演著存活因子的角色。(4) 剔除危險性細胞：細胞凋亡也是保護生物個體的一項重要機制。當生物個體的某些細胞受到環境傷害或病毒感染而有傷害到遺傳物質之虞時，細胞凋亡就會被用來剔除這些有致癌可能的危險細胞，因而可保全整個生物個體。</p> <p>疾病時的細胞凋亡</p> <p>雖然細胞凋亡是一切正常發育及生理功能所不可或缺，過多或過少的細胞凋亡卻也可能導致疾病。</p> <p>細胞凋亡的形態學特徵</p> <p>細胞凋亡的形態學特徵包括有：染色質濃縮 (pyknosis)、細胞質濃縮、細胞形態變得不規則而且有段裂 (fragmentation)、及由凋亡細胞脫落出細胞凋亡體 (apoptotic body)。</p>				

指導老師簽名處：郭星君

102-103 年度獎勵科技大學及技術學院教學卓越計畫

指導記錄表

指導主題	細胞凋亡機制 II		工作編號	B-1-2-11
指導老師	郭星君	指導地點	AS 502	
指導日期	102/10/11	指導時間	13:30-15:30	
應到人數	4	實到人數	4	
<p>指導內容或回饋意見</p> <p>細胞凋亡的生化學特徵</p> <p>細胞凋亡的生化學特徵包括了：細胞膜變化、凋亡蛋白酶 (caspases) 的活化、與去氧核糖核酸的段裂 (DNA fragmentation)。(1) 細胞膜變化：凋亡中的細胞會在細胞膜上表現出一些 “請吞噬我” 的信號來告知其鄰近細胞或巨噬細胞。這些信號已知有 phosphatidylserine, anionic thrombospondin binding sites, 與一些醣分子。這些信號可能在細胞凋亡的早期便會出現，以確保凋亡中的細胞會在細胞膜破壞前就已被吞噬。如此，凋亡細胞內可能會引起發炎反應的內容物才不至於漏出來。(2) 凋亡蛋白酶的活化：這些凋亡蛋白酶的作用造成大部份細胞凋亡的典型表徵。其標的受質 (target substrates) 可歸納成三大類：凋亡蛋白酶的前質、凋亡過程中必須去活化的蛋白質、與凋亡過程中必須活化的蛋白質。(3) 去氧核糖核酸的段裂：凋亡細胞所產生的段裂去氧核糖核酸會在膠片電泳上呈現 “階梯” 圖案。這個階梯圖案曾被認為是細胞凋亡的生化學特徵之一，但是現在已知它並不一定會出現在每一種細胞凋亡。儘管如此，看到去氧核糖核酸的段裂仍然是偵測細胞凋亡有用的方法，例如 terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 可用來測定細胞凋亡。另外，利用 ELISA 的段裂去氧核糖核酸測定法更可用來定量細胞凋亡的程度。</p>				

指導老師簽名處：郭星君

(三)相片



相片說明:斗六工業區光壁企業公司施貞儀老師介紹廠內藻類的飼養環境



相片說明:斗六工業區光壁企業公司施貞儀老師說明綠藻、杜莎藻產品



相片說明：麗澤生技洪煥智老師講授金線蓮栽種的重要



相片說明：金線連經過三個月的無菌培養的健康植株



相片說明:老師講授有關細胞凋亡的機制



相片說明:老師講授有關液相層析儀的原理



相片說明:老師講授有關保健食品開發與應用



相片說明:老師講授有關化妝品功效評估方法