

中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

052003

金枝玉葉-三維細胞組織培養技術及人造肉技術
之探討

學校名稱：財團法人東海大學附屬高級中等學校

作者： 高二 宋愛琳 高二 徐慧馨	指導老師： 蔡惇仁
---------------------------------	------------------

關鍵詞：人造肉、三維細胞培養技術、葉脈支架

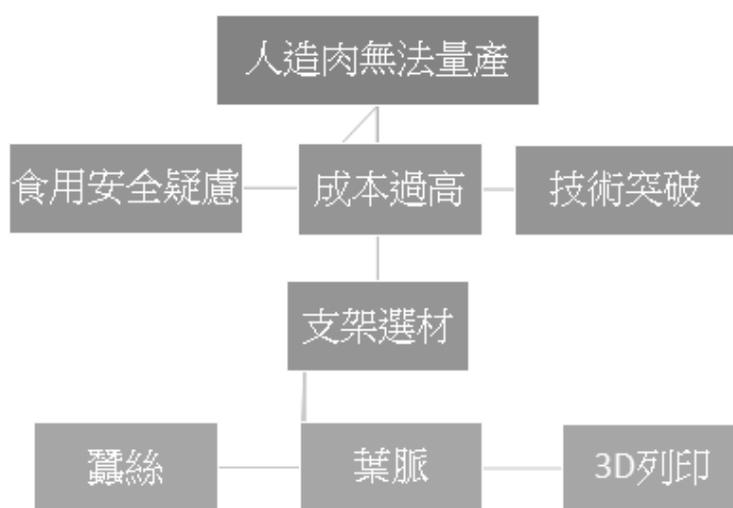
摘要

近年來糧食危機日益嚴重，而如何解決這項問題成為人們非常關切的問題。人造肉是如今許多生技公司都致力於研發的技術，但至今無法量產的原因非常值得我們去探討，而其中的原因包括食用的安全疑慮的問題、二維到三維的生長技術之突破等，而經過與指導老師討論過後，我們認為在其中幾點中，成本過高是一項重要的因素。

所以我們這組進行的實驗研究是為了要探討如何降低製造人造肉所需的成本。而在造成其成本稍高的幾種因素中，我們主要針對人造肉的支架之成本進行探討。我們想要以取得容易、處理過程簡單的葉脈作為人造肉的支架，進行三維細胞組織培養。所以我們決定以植物的葉脈做為替代支架，並透過實驗探討其可行性。

壹、研究動機

在學校的專題課程中，我們接觸到了人造肉的相關資訊^[1]，這使我們開始好奇三維細胞組織培養技術。經過進一步查詢發現，細胞支架的種類五花八門，像是用蠶絲充當軟骨支架、膠原蛋白、3D 列印細胞支架等等。為了我們試想如何取得便宜，而且容易取得的材料，充當細胞組織培養的支架。最後，我們決定用植物葉片的葉脈，充當細胞培養用支架，因為處理過程技術簡單，取得容易，而且成功率可能比較大。



圖一：統整人造肉無法量產之原因，針對成本過高提出現今已出現的辦法以及我們這組提出的解決辦法所整理出的問題架構圖

（圖一 資料來源：研究者繪製）

貳、研究目的

主要探討以葉片葉脈充當細胞之生長支架，細胞於三維空間的生長情形。

我們從文獻中得知若要使用 3D 列印的方式建構出非常緻密的支架，成本偏高的狀況使這項技術培養出的人造肉無法量產並上市，日前，美國科學家使用菠菜葉片的葉脈組織，利用菠菜的葉脈打造再生組織的毛細血管。^[2]

考量到上述幾點，我們打算以自然界既有的植物葉脈當作支架（因為纖維素支架較 3D 列印出的支架細密、成本也較低），並培養出完整的細胞組織。

參、研究設備及器材

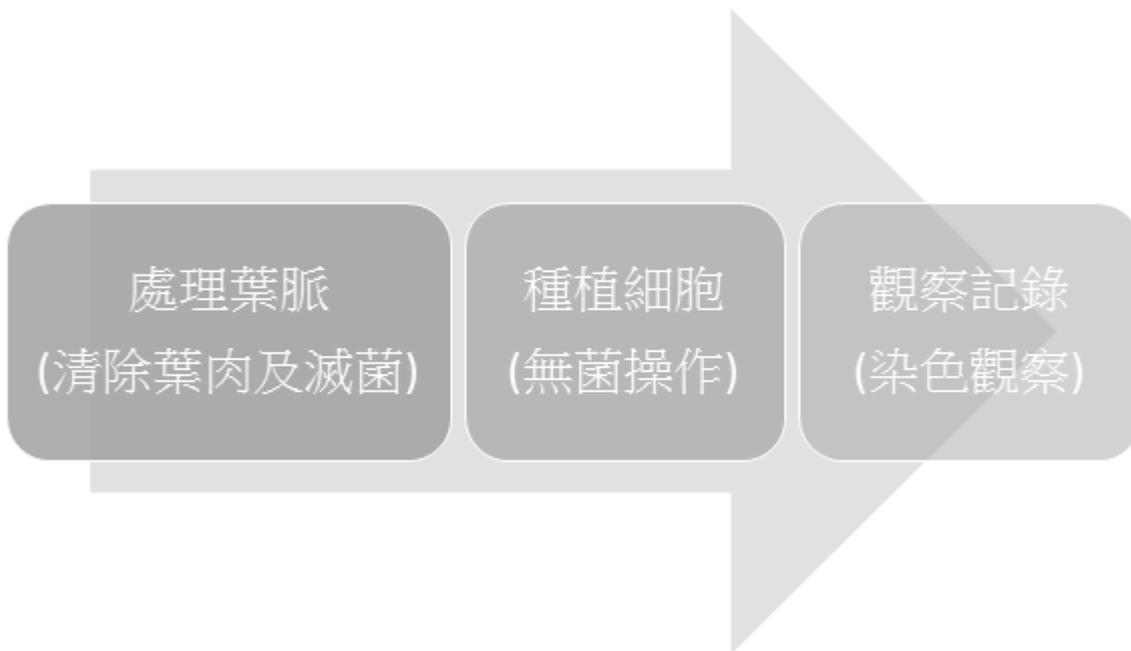
表一：設備器材列表

鹼液腐蝕法	無菌操作植入細胞	染色封片	觀察
樹葉	無菌操作台	DAPI 螢光染劑 (4',6-二脒基-2-苯基 吡啶)	螢光顯微鏡
氫氧化鉀溶液 (KOH：水=5 公克：100 毫 升)	酒精	福馬林	光學顯微鏡
燒杯	定量吸管 (Pipette)	聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100)	
酒精燈	培養皿	載玻片	
紗網	牛血清白蛋白 (BSA)	蓋玻片	

三角架	纖維蛋白 (Fibronectin)	定量吸管 (Pipette)	
玻棒	離氨酸 (PolyLysine)	結晶紫 (Crystal Violet)	
鑷子	胰蛋白酶	軌道式搖晃機 (orbital shaker)	
軟毛刷	磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS)		
托盤	細胞培養液		
	HT-29 大腸癌細胞		
	牛隻肌肉幹細胞		
	洋菜膠 (Agar)		
	細胞計數器		
	計數器		

(表一 資料來源：研究者整理)

肆、研究過程與方法



圖二：將研究過程繪製成研究架構圖，分為上述三大點—葉脈的處理、細胞種植、觀察記錄，並依照上圖的脈絡進行實驗。

(圖二 資料來源：研究者繪製)

肆、研究過程與方法

一、葉脈支架選材

為了找到適合作為支架的葉脈，我們尋找許多葉片包括變葉木、黃金葛、九層塔、菩提葉、桂花葉.....等，並使用鹼液腐蝕法去除葉肉細胞，但變葉木、黃金葛、九層塔等在泡到氫氧化鉀時，葉片就會被煮爛，唯有菩提葉及桂花葉既可以去除葉肉，也可以完好的保留葉脈，之後我們會將菩提葉及桂花葉葉脈定期換水，來清洗掉葉脈上殘餘的氫氧化鉀。

在進入實驗室後，我們會使用滅菌釜將葉脈滅菌，我們將細胞分別植入在桂花葉及菩提葉葉脈上後，發現由於菩提葉葉脈間的孔隙太大，不利細胞生長，故在後續實驗都選用桂花葉葉脈做為纖維素支架（如下圖三）。

(一) 鹼液腐蝕法³⁴：

- 1.將氫氧化鉀水溶液（KOH：水=5 公克：100 毫升）加熱至攝氏 75 度。
- 2.將葉片放入溶液中加熱並且用玻棒攪動。
- 3.將煮過的葉片夾出後放在裝滿水的托盤中，用軟毛刷輕刷去葉肉，保留葉脈。

二、Coating 藥劑選擇

為了找到合適的藥劑以吸引細胞貼附於葉脈上，我們參考了許多論文^[4]後，決定先以離氨酸（Poly-Lysine）塗層（Coating）於葉脈上。聚離氨酸（Poly-Lysine）是由離胺酸經由 α -羧基和 ϵ -胺基鏈結聚合而成之高分子聚合物，可增加生物相容性，輔助細胞貼附及生長。且具生物可分解性，對環境與人類皆不具毒性，故可食用，為製作人造肉首選塗層。

（一）Poly-lysine 加入 BSA：

在葉片表面以離氨酸（Poly-Lysine）及牛血清白蛋白（BSA）處理，探討細胞貼附之情形。

1、塗層（Coating）

我們於無菌操作臺上將葉脈以離氨酸（Poly-Lysine）塗層（Coating）於葉片表面。

- （1）將經過鹼液腐蝕法及滅菌釜高溫滅菌後的桂花葉脈裁成小塊，接著於葉脈表面 Coating 上離氨酸（Poly-Lysine），加入離氨酸（Poly-Lysine）是為了稍後植入細胞時，吸引細胞貼附葉脈。靜置四十分鐘後用磷酸鹽緩衝生理鹽水（PBS）沖洗掉多餘的以離氨酸（Poly-Lysine）。
- （2）培養皿底部 Coating 上一層牛血清白蛋白（BSA）。牛血清白蛋白（BSA）可以防止細胞貼附於培養皿底部，進而達到吸引細胞貼附於葉脈支架上的效果。
- （3）將 Coating 好離氨酸（Poly-Lysine）的葉脈放入 Coating 好胎牛血清（BSA）的培養皿中。

2、植入細胞

我們植入了約十萬顆 HT-29 大腸癌細胞。

- （1）將胰蛋白酶加入具有細胞的培養皿中，加入胰蛋白酶會分解細胞部分的膠原蛋白、彈性蛋白、糖蛋白及蛋白多糖，導致細胞外基質沒辦法連接上培養皿，使細胞離開培養皿底部，並用定量吸管（Pipette）混合約五分鐘之後用無菌操作台上的廢液抽吸系統（Suction）將胰蛋白酶取出並加入細胞培養液（如下圖四），稍後使用。
- （2）用細胞計數器估算細胞數量，並於培養皿中加入約十萬顆 HT-29 大腸癌細

胞。

(3) 將培養皿靜置於細胞培養箱中靜置一天，待其生長。

3、觀察

(1) 一天後，用光學顯微鏡觀察已經有些許細胞成功貼附於葉脈上。

(2) 三天後，我們用光學顯微鏡進行觀察，發現細胞僅成功貼附於其上，並沒有包覆住葉脈之情形。

為了改善細胞的貼覆及生長情形，我們決定改使用一般生物組織間常見的纖維蛋白 (Fibronectin) ⁵⁴。纖維蛋白 (Fibronectin) 為細胞外基質纖維蛋白可促進細胞黏連、增殖，還可以修復受損細胞，且亦可食用。因此我們將纖維蛋白 (Fibronectin) 塗層 (Coating) 於葉脈上以此輔助細胞貼附並生長於葉脈支架上。

(二) Fibronectin 加入 BSA：

在葉片表面以纖維蛋白 (Fibronectin) 及牛血清白蛋白 (BSA) 處理，並探討細胞貼附之情形。

1、塗層 (Coating)

我們於無菌操作臺中將葉脈以纖維蛋白 (Fibronectin) 塗層 (Coating)

(1) 將經過鹼液腐蝕法及滅菌釜高溫滅菌後的桂花葉脈裁成小塊，放入另一個培養皿中，再加入纖維蛋白 (Fibronectin)，使細胞更容易貼附於葉脈上，靜置四十分鐘後，用磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS) 沖洗掉多餘的纖維蛋白 (Fibronectin)。

(2) 培養皿底部 Coating 上一層牛血清白蛋白 (BSA)。牛血清白蛋白 (BSA) 可以防止細胞貼附於培養皿底部，進而達到吸引細胞貼附於葉脈支架上的效果。

(3) 將 Coating 好纖維蛋白 (Fibronectin) 的葉脈放入 Coating 好牛血清白蛋白 (BSA) 的培養皿中。

2、植入細胞

我們一樣植入了約十萬顆 HT-29 大腸癌細胞，實驗步驟同 (一)。

3、觀察

- (1) 一天後，用顯微鏡觀察已經有些許細胞成功貼附於葉脈上。
- (2) 三天後，我們用光學顯微鏡進行觀察，我們發現到細胞不但有成功貼附，且能成功長出細胞團，包覆住葉脈。

三、實驗一

(一)、Coating

經過上述 Coating 藥劑選擇的實驗後，我們決定在無菌操作臺中將葉脈以纖維連蛋白 (Fibronectin) 塗層 (Coating)。

- 1.將經過鹼液腐蝕法及滅菌釜高溫滅菌後的桂花葉脈裁成小塊，放入另一個培養皿中，再加入纖維連蛋白 (Fibronectin)，使細胞更容易貼附於葉脈上，靜置四十分鐘後，用磷酸鹽緩衝生理鹽水 (PBS) 沖洗掉多餘的纖維連蛋白 (Fibronectin)。
- 2.培養皿底部 Coating 上一層牛血清白蛋白 (BSA)。牛血清白蛋白 (BSA) 可以防止細胞貼附於培養皿底部，進而達到吸引細胞貼附於葉脈支架上的效果。
- 3.將 Coating 好纖維連蛋白 (Fibronectin) 的葉脈放入 Coating 好牛血清白蛋白 (BSA) 的培養皿中。

(二)、植入細胞

- 1.將胰蛋白酶加入具有 HT-29 大腸癌細胞的細胞盤中，並用定量吸管 (Pipette) 使母盤各個角落都接觸到胰蛋白酶，使細胞離開底部，之後再將胰蛋白酶取出並加入細胞培養液，稍後使用。
- 2.用細胞計數器估算細胞數量，在先前已置入經過 Fibronectin 塗層處理的葉脈及 Coating 好 BSA 的培養皿中加入約十萬顆 HT-29 大腸癌細胞。

經過約一周的定期紀錄，可以用光學顯微鏡看見 HT-29 大腸癌細胞已經生長成團並良好貼附於葉脈上，故進入步驟(三)，以利更仔細的觀察。

(三)、染色封片

- 1.先從培養皿中移除細胞培養液，並加入福馬林固定葉脈上的細胞，靜置

十分鐘後吸出，並用 PBS（磷酸鹽緩衝生理鹽水）沖洗三次確保無殘留的福馬林影響染色。

2.由於我們使用的 DAPI 染劑是針對細胞核作染色，所以需加入 TritonX-100 讓此藥劑於細胞膜上打洞，使染劑成功染進細胞核。加入 TritonX-100 後計時一分鐘吸出，並用 PBS 沖洗三次，確保無殘留的 TritonX-100。

3.從培養皿中取出葉脈置於載玻片上，並滴入兩至三滴的 DAPI 螢光染劑（此步驟為染色）之後以 45 度傾斜角蓋上蓋玻片（此步驟為封片）（如下圖五）。

（四）、觀察

- 1.使用光學顯微鏡觀察。
- 2.在染色封片後使用螢光顯微鏡觀察。

四、實驗二

（一）Coating

在實驗二的塗層方法與實驗一的方法皆相同，皆是在培養皿底部 Coating 一層 BSA 及在葉脈上 Coating 一層 Fibronecting。

（二）植入細胞

在實驗二的植入細胞的步驟與實驗一的步驟皆相同，皆是選用 HT-29 大腸癌細胞。

（三）加入洋菜膠

將培養皿靜置於細胞培養箱中兩周，經過文獻查詢後決定加入洋菜膠(Agar)，測試是否洋菜膠可以達到輔助細胞生長的效果（結構如下圖六）。

1. 加入濃度為 0.3%的 Agar，因為濃度為 0.3%的 Agar 之間的空隙恰為一顆細胞的大小，利用上下夾層的方式填補細胞間的空隙，讓細胞有附著之處，可以向外生長使組織更容易形成。

(四) 染色

- 1.吸出於 Agar 上的細胞培養液。
- 2.滴入約兩到三滴結晶紫 (Crystal Violet) 放到軌道式搖晃機約十分鐘後取下。
- 3.加入 PBS 沖洗後吸出。重複此步驟約十次。

(五) 觀察

- 1.使用光學顯微鏡觀察。

(六) 數據處理：細胞生長曲線

- 1.加入 Agar 後隔兩天觀察一次，並拍照紀錄。而為了減少數據的誤差，我們種植了五盤的細胞並取平均值。
- 2.將所有照片匯入電腦並使用軟體 Imageview 用圈選的方式圈出細胞團的面積透過電腦計算細胞團大小的相對值。
- 3.取得五組數據的平均值並繪製程細胞生長曲線圖。

五、實驗三

(一) Coating

在實驗三的塗層方法與實驗一、二的方法皆相同，皆是在培養皿底部 Coating 一層 BSA 及在葉脈上 Coating 一層 Fibronecting。

(二) 植入細胞

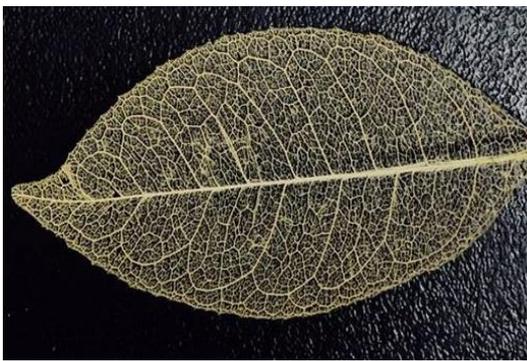
在實驗三的植入細胞的步驟與實驗一、二的步驟皆相同，但與上述實驗不同之處在於：在實驗三中我們選用的細胞為牛隻肌肉幹細胞（圖七、八）。

(三) 觀察

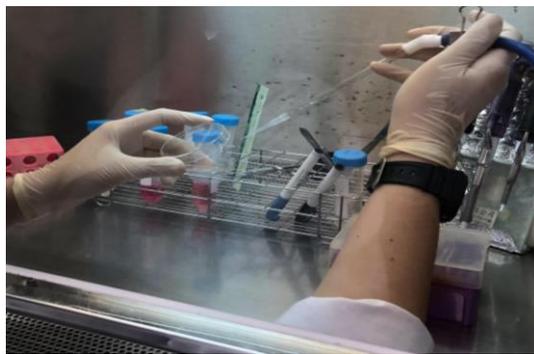
- 1.使用光學顯微鏡觀察。

六、實驗記錄

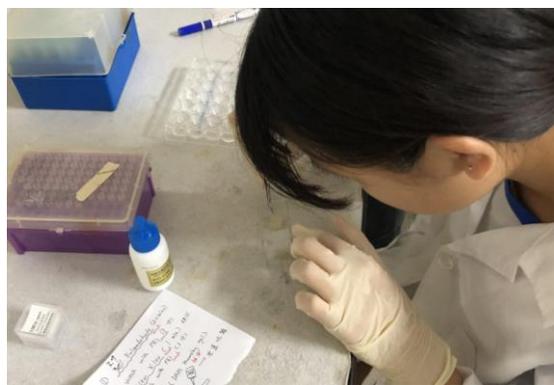
- 07/20—摘取菩提葉並使用鹼液腐蝕法去除葉肉留下葉脈。
- 07/22—摘取桂花葉並使用鹼液腐蝕法去除葉肉留下葉脈。
- 08/26—進行測試藥劑實驗，並連續觀察 6 天。
- 08/29—觀察測試藥劑實驗中的結果。
- 09/10—進行實驗一。
- 09/18—觀察實驗一中的結果，並搭配 DAPI 染劑染色封片（圖九到十二）
同時取一組細胞培養皿，進行實驗二
- 09/25—觀察實驗二中的結果，並搭配結晶紫染色。
- 11/01—進行實驗三，並陸續觀察一個月。



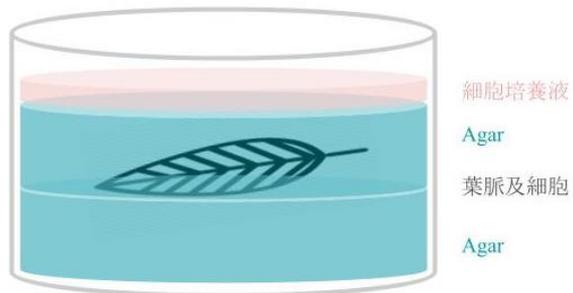
圖三：
經過鹼液腐蝕法處理過後的桂花葉葉脈



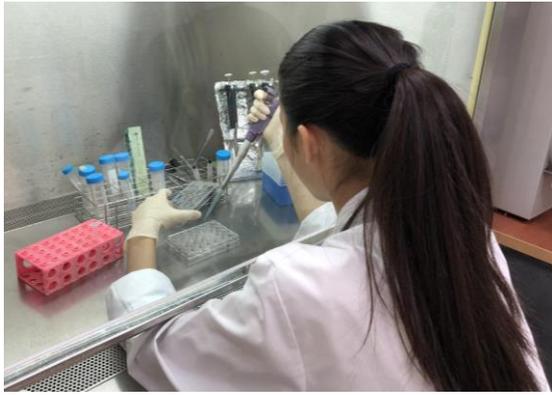
圖四：
抽離胰蛋白酶，加入細胞培養液



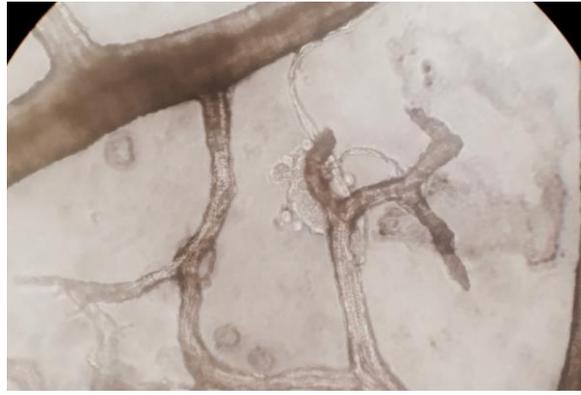
圖五：用螢光染劑封片



圖六：加入 Agar 的三維細胞培養示意圖

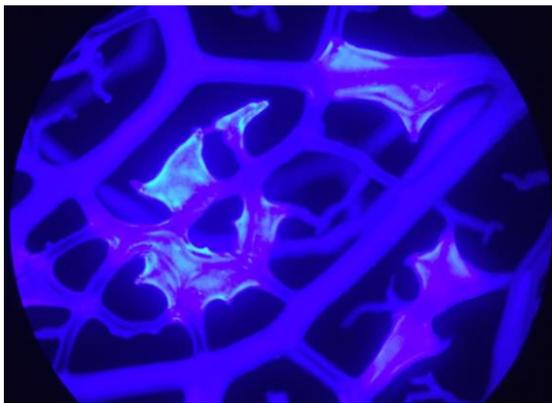


圖七：將牛隻肌肉幹細胞植入培養箱



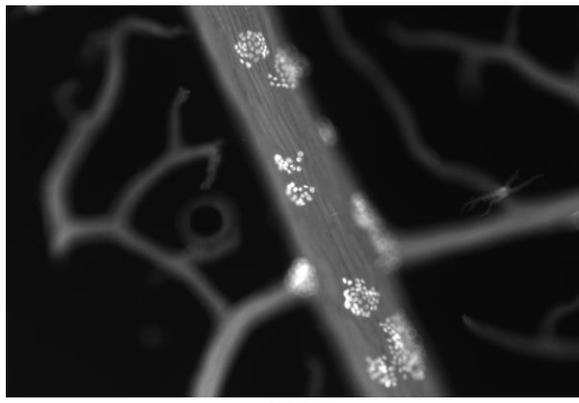
200X

圖八：於顯微鏡下觀察經過六天後的生長情形，已經可以觀察到細胞團的出現。



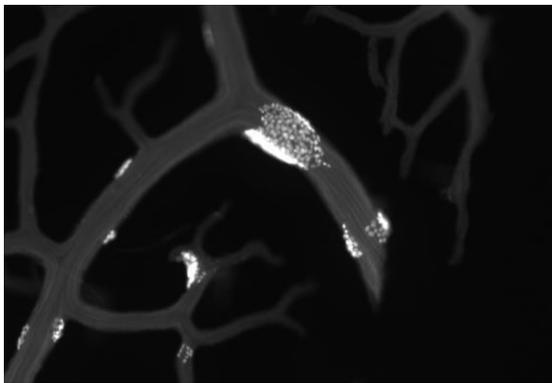
200X

圖九：螢光顯微鏡觀察並用手機拍照紀錄：圖中螢光色的地方及為細胞團。可以看到細胞已經可以完整包覆支架並生長於其上。



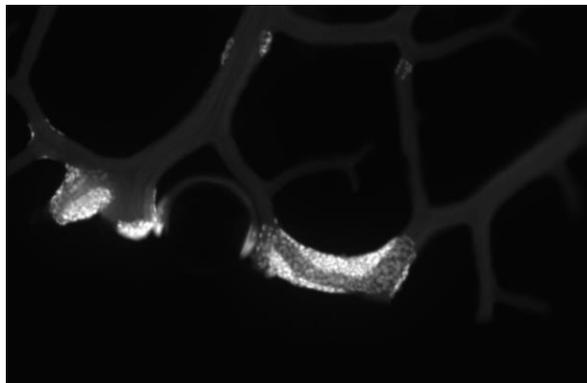
200X

圖十：（圖十到圖十二）螢光顯微鏡觀察並用連接至電腦拍照紀錄，可以看見圖上發光的點便是細胞核。



200X

圖十一：細胞團已開始包覆葉脈。



200X

圖十二：細胞團已開始向外生長。

伍、研究結果

由於我們為了打算以葉脈做為支架做實驗^{f6}所以要先挑選出適合的葉子(圖十三)，我們找了許多素材如變葉木、九層塔、桂花葉、菩提葉的葉片來做鹼液腐蝕法^{f7}的實驗以獲得洗去葉肉的葉脈來做後續種植細胞等實驗。而在用鹼液腐蝕法的過程中，我們發現變葉木的葉脈浸入氫氧化鉀的鹼液中很容易被煮爛，而九層塔的葉片太軟會在洗刷殘餘的葉肉時將葉脈刷破，只有桂花葉及菩提葉可以在實驗中保留完整的葉脈，而在下一階段的種植細胞過程中，菩提葉葉脈與葉脈間的空隙較為稀疏，不利於長出一個平面的肌肉細胞，而選用桂花葉則不會有這項問題，所以我們選用桂花葉葉脈來做後續的實驗。

除了葉脈的選用以外，我們也思考過要種植的細胞種類，在實驗一、二中我們選用的是 HT-29 大腸癌細胞，而我們選用 HT-29 大腸癌細胞的原因是他的生長速度極快、適應能力強且相較於牛隻細胞更易於取得，成本也較低。除此之外，我們選這種細胞的一大主因是這和我們實驗三中用的牛隻肌肉細胞同為貼附型細胞。因此選用 HT-29 大腸癌細胞可以讓我們在實驗中推斷動物細胞與植物組織間的生長與貼合情形，生長速度快可以讓實驗時間縮短，進行多次實驗以確保實驗的穩定性。再者，由於此種細胞適應能力極強，我們可以推測若是此種細胞都不能貼附在葉脈支架上，就遑論是其他細胞（如牛隻肌肉幹細胞）了。選出合適的葉脈充當支架後，為了使細胞更好的貼附於支架上和避免貼於培養皿底部，我們跟指導老師經過討論及文獻的參考後，決定以牛血清白蛋白(BSA)先 coating 於培養皿底部(如下圖十四)，這種塗劑可以避免細胞貼附培養皿底部。而為了吸引細胞附著於葉脈支架上，我們先將 Poly-lysine coating 於葉脈支架上，但是細胞的貼覆效果十分不佳(如下圖十五)，我們推測是因為 Poly-lysine 僅吸引細胞貼附支架，卻不能輔助動物細胞修復胰蛋白酶對細胞外基質造成的損傷，因此新分裂的動物細胞不易與植物組織形成堅固的細胞外基質連結，容易脫落，使細胞團的形成十分不易。所以我們更改了實驗方法^{f8}，參考文獻之後^{f9}改用成分為細胞外基質的 Fibronectin 以及先前實驗十分成功的牛血清白蛋白（BSA）搭配，而細胞的貼附情形也有明顯改善。(如下圖十六)

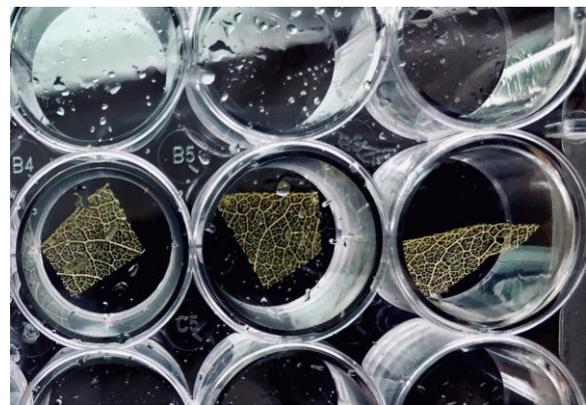
但是我們同時發現了一個問題：長出來的細胞團無法有效填滿葉脈支架間較大的空隙，並向外延伸。因此我們參考論文中的方法，加入洋菜膠(Agar)^{f10}，透過上下夾層的方式，輔助細胞生長。而之所以 Agar 輔助細胞生長的原因為 Agar 間有微小的細孔，而適當濃度(0.3%)的 Agar，細孔的空隙恰為一顆細胞的大小。因此實驗二中，我們選擇在有一定數量的細胞團生長於支架上時加入 Agar，而此時間大約一周。加入 Agar 後，細胞團能更好的填滿葉脈支架間的空隙。生長情形也更加良好。(如下圖十七)而为了更好的觀察加入洋菜膠(Agar)

後細胞的生長情形，我們透過隔兩日觀察細胞團的生長情形，拍照(如下圖二十到二十三)並經過電腦數據分析後取得細胞團隨時間的生長變化情形。隨後將取得的數據繪製成細胞生長曲線(如下圖二十四、表二)我們可以從圖中看到再加入洋菜膠(Agar)的第一到七天，生長曲線較為平緩，我們推測此時細胞在細胞生長曲線中的延遲期(lag phase)細胞剛種下時，需要一段時間修復細胞外基質，重組細胞骨架等等^[11]，因此此時細胞的生長較為延遲。而第七到十天曲線起伏明顯較為劇烈，我們推測此時細胞已經進入生長曲線的對數期(log phase)，也就是說細胞已經適應了這個環境，並且會於此時大量的分裂生長。透過數據分析我們可以得知：再加入洋菜膠(Agar)的約略第七天細胞會進入到對數期。

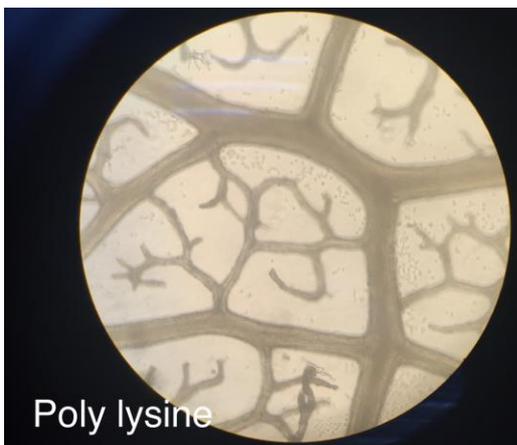
最後我們在實驗三中，選用了桂花葉葉脈並在經過牛血清白蛋白(BSA)及 Fibronectin 的 Coating 後成功在培養皿中植入了十萬顆的牛隻肌肉幹細胞，並且在完成種植後的兩個禮拜將 Agar(洋菜膠)加入培養皿中以利於細胞生長，在經過幾個禮拜的觀察，可以從照片中看出細胞良好的貼附、生長。(如下圖十九)



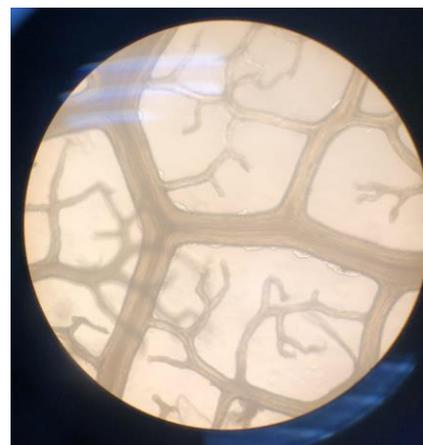
圖十三：摘取到的葉子



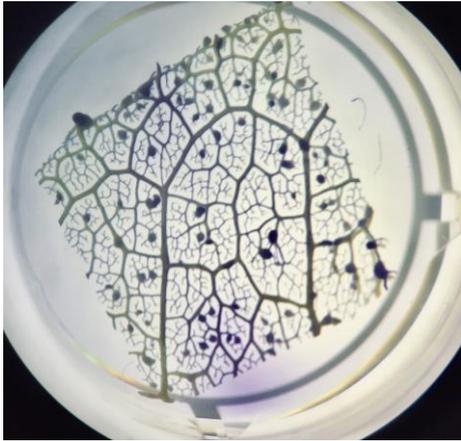
圖十四：Coating 後的葉脈及培養皿

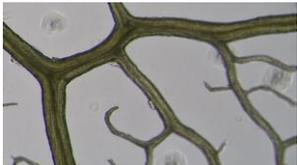
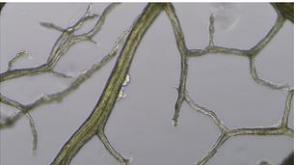
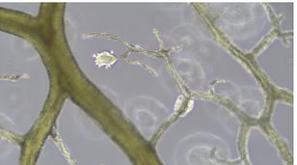


200X



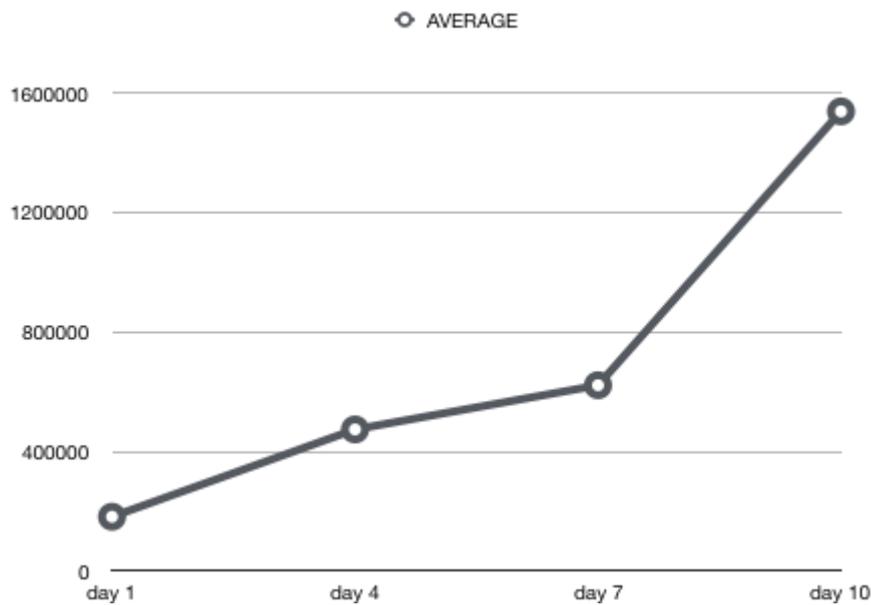
200X

<p>圖十五：加入 Poly-lysine 及細胞後於顯微鏡下觀察所見：細胞幾乎沒有貼附於支架上，反之，多數細胞仍生長於培養皿底部。</p>	<p>圖十六：加入 Fibronectin 及細胞後於顯微鏡觀察所見：細胞貼附於支架情形明顯改善，且可見到細胞團的出現。</p>
	 <p style="text-align: center;">200X</p>
<p>圖十七：加入 Agar 及用結晶紫染色後用肉眼所見：細胞團數量和體積增多，部分細胞團已經可以填滿支架間的空隙。</p>	<p>圖十九：牛隻肌肉細胞於顯微鏡下所見：細胞團數量頗多，也能部分填滿支架間之空隙。</p>

 <p style="text-align: center;">200X (day1)</p>	 <p style="text-align: center;">200X (day4)</p>	 <p style="text-align: center;">200X (day7)</p>	 <p style="text-align: center;">200X (day10)</p>
<p>圖二十：在實驗二的細胞盤中加入 Agar 後的第一天。</p>	<p>圖二十一：在實驗二的細胞盤中加入 Agar 後的第四天。</p>	<p>圖二十二：在實驗二的細胞盤中加入 Agar 後的第七天。</p>	<p>圖二十三：在實驗二的細胞盤中加入 Agar 後的第十天。</p>

表二：使用顯微鏡搭配軟體 Imageview 計算出細胞團的面積並記錄成表。

	day1 dish1~5	day4 dish1~5	day7 dish1~5	day10 dish 1~5
SUM	912763.5	2375044	3215267.5	7701999
AVERAGE	182552.7	475008.8	623053.5	1540399.8



圖二十四：由表二的數據所繪製出的生物生長速率曲線圖。
 可以從圖上推測出第一天到第七天為生物生長的適應期，
 而第七天到第十天則步入了對數期，故細胞得以大量生長。

陸、討論

一、挑選葉脈種類

我們對挑選之葉脈標準為：處理過程失敗率低、易取得、葉脈紋路夠細緻。
 我們經過不同種類葉片的嘗試後選定桂花葉。

二、選擇去細胞化的方法

去細胞化有許多方法，我們經過查詢論文獻及討論後，決定使用成本低、過程簡單基本的鹼液腐蝕法。隨後用清水長時間浸泡去掉鹼性物質，以利細胞生長。

三、選擇 Coating 藥劑

為了吸引細胞附著並生長於葉脈上，我們經過資料的參考及討論後，一開始是使用 BSA 和 Poly-Lysine，但應細胞貼附情形不佳，隨後經過論文查詢決定將 Poly-Lysine 改成 Fibronectin，細胞貼附情形也有明顯改善。

四、選擇細胞種類

理想應是使用牛隻肌肉幹細胞種植，但應時間有限，所以我們選擇在實驗一、二中先使用生長較為快速且同為貼附型的 HT-29 大腸癌細胞做實驗，並在確認實驗可行後再改以使用牛隻肌肉幹細胞。

五、洋菜膠(Agar)的加入及使用

為了使細胞可以填滿葉脈間空隙進而達到更好的生長情形，我們經討論過後決定加入洋菜膠(Agar)，作為支架空隙間的橋梁，輔助細胞更有效率的填滿葉脈支架間的空隙。

六、細胞成長曲線

為了更好了解加入洋菜膠 (Agar) 後細胞的生長情形，我們透過定期拍照觀察後，將照片輸入電腦中透過軟體 Imageview 計算細胞團的大小，藉由面積的變化，推測細胞的生長情形。

柒、結論

透過數次的實驗我們發現，以葉脈充當人造肉的支架，及配以 BSA 和 Fibronectin 的 coating 以培養人造肉是可行的，其中又加入洋菜膠 (Agar) 之培養皿中的肌肉細胞生長為最佳。我們推論會產生此結果是因為洋菜膠中微小的空隙，恰好提供細胞良好的大小的空間生長，達到支持及輔助細胞生長之功用。經過數據分析後我們發現，加入洋菜膠 (Agar) 後約略七天左右細胞就可以適應此生長環境，並達到細胞生長取線中的對數期。同時因為時間的限制，我們還不能觀察到細胞真正填滿了葉脈間的空隙，我們也好奇當生長曲線由對數期進到穩定期的時候，細胞能否如我們預期的填滿葉脈。

捌、引註資料

1. <https://reurl.cc/gvqA4Q> 撰文／Jeffrey Bartholet、翻譯／林雅玲（2011）。[培養皿裡的人造肉] 撰文／Jeffrey Bartholet、翻譯／林雅玲。科學人雜誌，1月22日，918期。
2. <https://reurl.cc/VadxNZ> 撰文／Delaney Chambers、編譯／石頤珊（2017）。[把菠菜葉變成會跳動的心臟組織] 撰文／Delaney Chambers、編譯／石頤珊。國家地理雜誌，4月5日。
3. <https://reurl.cc/Zn6kea> 葉脈標本的製作。取自國立台中教育大學（NTCU）科學教育與應用學系的科學遊戲實驗室。
4. <https://reurl.cc/b5ye9o> Crompton, K. E., Goud, J. D., Bellamkonda, R. V., Gengenbach, T. R., Finkelstein, D. I., Horne, M. K., & Forsythe, J. S. (2007). Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 28(3), 441-449.
5. <https://reurl.cc/V6q7ZN>：維基百科／纖維蛋白 fibronectin
6. <https://reurl.cc/E783q1> Gershlak, J. R., Hernandez, S., Fontana, G., Perreault, L. R., Hansen, K. J., Larson, S. A., ... & Rolle, M. W. (2017). Crossing kingdoms: using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 125, 13-22.
7. <https://reurl.cc/M7p6Vk> Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683.
8. <https://reurl.cc/4R5ZaV> van den Dolder, J., Bancroft, G. N., Sikavitsas, V. I., Spauwen, P. H., Mikos, A. G., & Jansen, J. A. (2003). Effect of fibronectin-and collagen I-coated titanium fiber mesh on proliferation and differentiation of osteogenic cells. *Tissue engineering*, 9(3), 505-515.
9. <https://reurl.cc/qdzQ10> Li, M., Cui, T., Mills, D. K., Lvov, Y. M., & McShane, M. J. (2005). Comparison of selective attachment and growth of smooth muscle cells on gelatin-and fibronectin-coated micropatterns. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 5(11), 1809-1815.
10. <https://reurl.cc/E7Ka5v> Courtenay, V. D., Selby, P. J., Smith, I. E., Mills, J., & Peckham, M. J. (1978). Growth of human tumour cell colonies from biopsies using two soft-agar techniques. *British journal of cancer*, 38(1), 77-81.
11. <https://reurl.cc/V6q7vQ>：細胞培養 Cell Culture

【評語】 052003

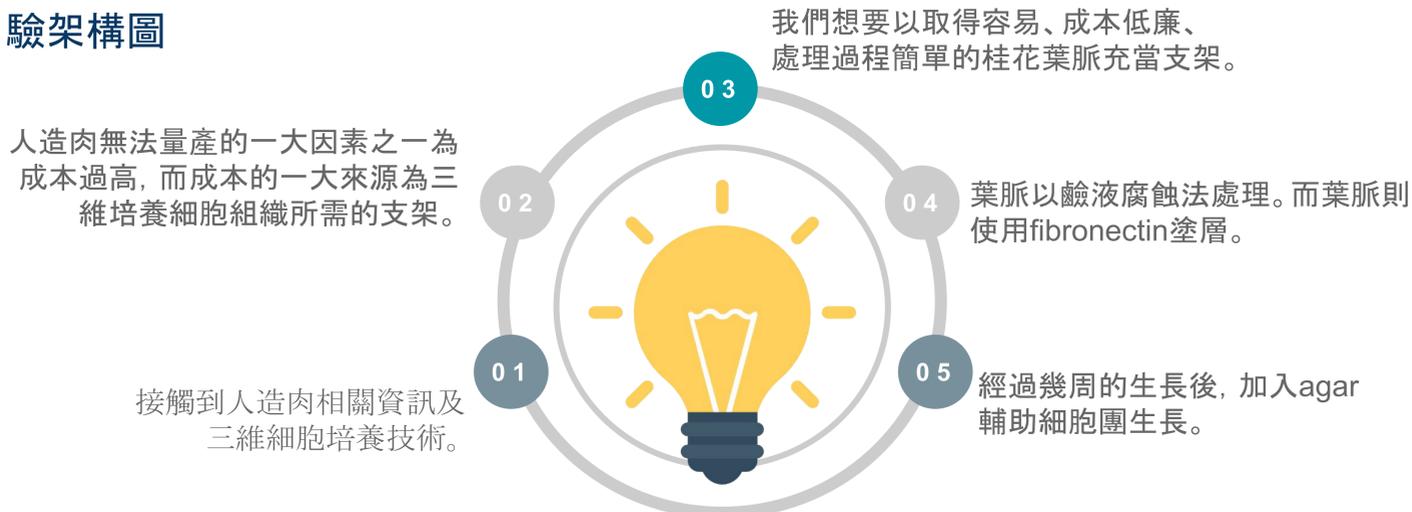
1. 本研究探討如何降低製造人造肉所需的成本，主要針對人造肉的支架之成本進行探討。以植物的葉脈做為細胞之生長支架，探討細胞於三維空間的生長情形。替代支架，並透過實驗探討其可行性。
2. 實驗發現，以葉脈充當細胞支架，及配以 BSA 和 Fibronectin 的 coating 以培養人造肉是可行的，其中又加入洋菜膠（Agar）之培養皿中的肌肉細胞生長為最佳。
3. 實驗記錄簿的記錄相當簡單，不夠確實。只有成功的實驗，看不到實驗失敗的紀錄。可是口頭說明時，就有談到失敗的實驗。記錄本應該詳實記錄所有的實驗經過。
4. 許多重要成果都只有一次的記錄。如果時間許可，需要至少做三重複，取得平均值，以確定實驗的正確性。

摘要

近年來糧食危機日益嚴重，而如何解決這項問題成為人們非常關切的問題。人造肉是現今許多生技公司都致力研發的技術，但至今無法量產的原因值得我們去探究。可能的原因包含：食用的安全疑慮、細胞到組織生長過程的技術突破、製作的方式無法量產與成本過高……等問題。

而經過與指導老師討論後，我們認為成本過高是阻礙人造肉技術發展的重要因素。所以我們想探討如何降低製造人造肉所需成本。在眾多製造人造肉高成本的因素中，本研究想就細胞生長所需的支架進行改良。在查詢資料後，我們發現以葉脈作為細胞攀附的支架，有取得容易、處理過程簡單的優點。且食用此方式製作的人造肉，亦可同時補充植物纖維。所以我們決定以植物葉脈做為替代支架，來探討細胞在不同處理的葉脈下，形成組織的差異性。

統整人造肉無法量產原因及實驗架構圖



研究動機及目的

在學校的專題課程中，我們接觸到了人造肉^{『註一』}的相關資訊，這使我們開始好奇三維細胞組織培養的技術。經過進一步的查詢發現，細胞形成組織所用的支架種類五花八門，有用蠶絲充當軟骨支架、3D列印細胞支架等。這資訊使我們好奇生活周遭中，有什麼容易取得、處理過程簡單的自然材料，可以用來做為肌肉組織培養的支架。

經過搜尋相關資料得知，日前有美國科學家使用菠菜葉片的葉脈組織^{『註二』}，經去細胞化後，利用人體細胞培養，使菠菜的葉脈形成類似人體微血管的組織構造。所以我們決定以自然界既有的植物葉脈當作支架^{『註三』}，培養出可補充植物纖維的人造肉。經過測試篩選後，本研究以不同處理方式的桂花葉葉脈，作為組織培養的纖維素支架^{『註四』}，並進一步探討並改良細胞於三維空間中的生長條件。

研究設備及器材

鹼液腐蝕法處理葉脈



- 桂花葉
- 氫氧化鉀溶液
- 燒杯
- 酒精燈
- 砂網
- 三腳架
- 玻棒
- 鑷子
- 軟毛刷

無菌操作植入細胞



- 無菌操作台
- 酒精
- 定量吸管
- 培養皿
- BSA
- Fibronectin
- PBS
- 胰蛋白酶
- 細胞培養液

染色封片



- DAPI
- 福馬林
- TritonX-100
- 載玻片
- 蓋玻片
- 定量吸管
- Crystal Violet

觀察紀錄



- 螢光顯微鏡
- 解剖顯微鏡
- 光學顯微鏡

備註

BSA(胎牛血清)

- 防止細胞貼附於培養皿底部

Fibronectin(纖蛋白)^{『註五、六』}

- 為一種蛋白質，可吸引細胞貼附於葉脈上。

PBS(磷酸鹽緩衝生理鹽水)

- 將多餘的藥劑沖洗掉

TritonX-100(聚乙二醇辛基苯基醚)

- 將細胞膜打洞，以便染色細胞核

DAPI(螢光染劑)

- 染色細胞核，方便觀察

Crystal Violet(結晶紫)

- 加入洋菜膠時染色用

1 實驗

實驗目的: 以BSA和FIBRONECTIN塗層, 測試細胞的貼附情形。



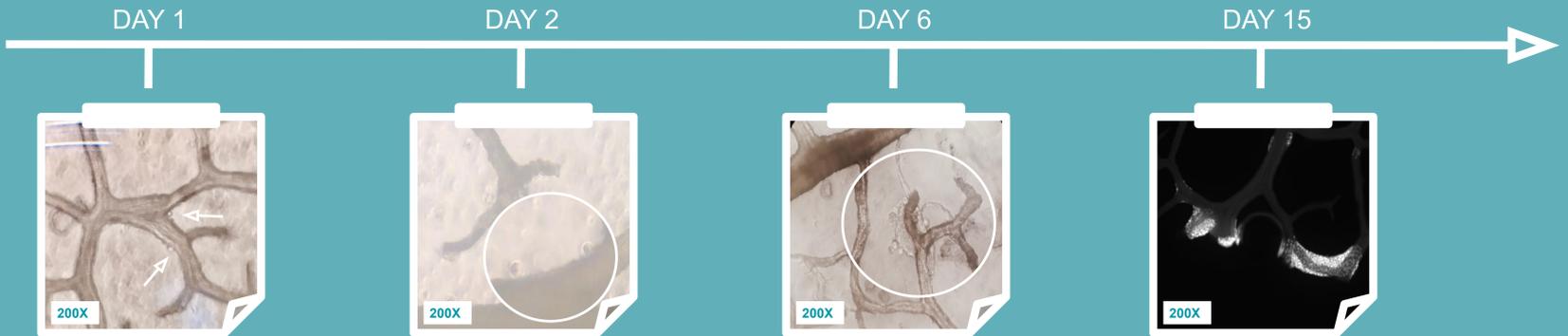
Coating BSA於培養皿底部
Coating Fibronectin於葉脈上



植入十萬顆
HT-29大腸癌細胞
靜置於細胞培養箱中約15天



用螢光染料DAPI染色
並製成玻片觀察



上述四張圖為實驗一的實驗記錄, 而圖片的放大倍率為200倍, 從圖DAY 1中可以看見, 單顆的HT-29大腸癌細胞起初會先貼附於葉脈的分支點。
接著會逐漸有越來越多的單顆細胞貼附在分支點的兩側, 如圖DAY 2可以看見有三、四顆細胞貼附在分支點的兩旁。
後續可以看見細胞會聚集成團, 如DAY 6的圖上可以看見成團的細胞出現於纖維素支架的分支點, 再向外生長、擴張至葉脈的分支點兩側的細脈上。

為了確認細胞團為三維成長情形, 我們以DAPI螢光染料染色細胞核來觀察細胞。圖DAY 15為使用DAPI螢光染料染色, 再封片後於顯微鏡下所見。可以從圖中確認細胞團已經可以完整包覆住葉脈。我們可以看見, 細胞團僅僅是包覆住葉脈, 並沒有辦法繼續向外生長填滿葉脈間的孔隙, 可能是因為葉脈間的空隙對於細胞而言還是太大, 無法有效形成整片「細胞組織」, 與我們理想中的情況仍有一段差距, 所以我們打算在實驗二中進一步探討並處理這項問題。

實驗結果: 以BSA和FIBRONECTIN塗層, 細胞貼附於葉脈的成果良好。

2 實驗

實驗目的: 加入Agar後測試細胞的生長速度。



Coating BSA於培養皿底部
Coating Fibronectin於葉脈上



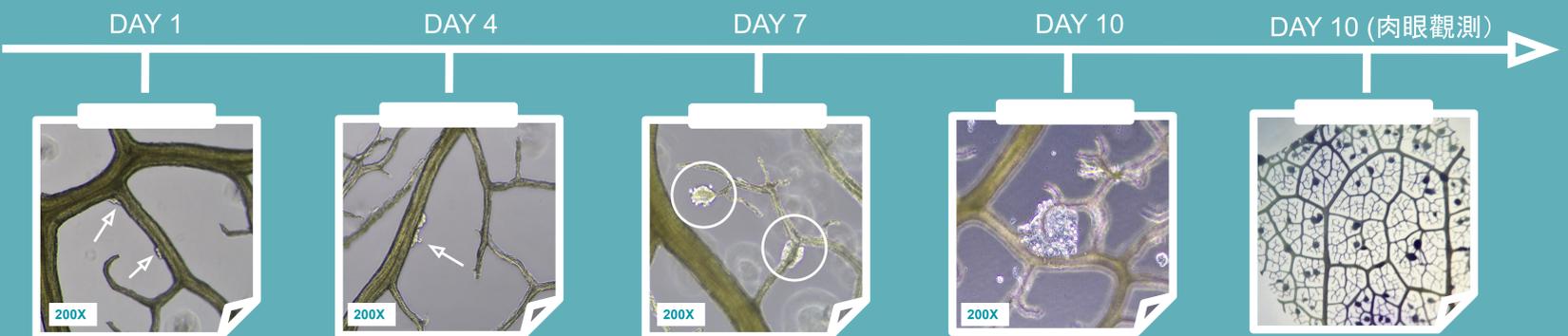
植入十萬顆HT-29大腸癌細胞
靜置於細胞培養箱中約15天



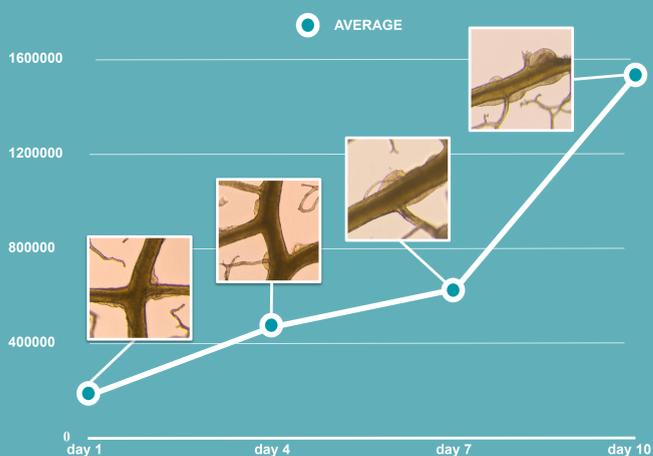
透過上下夾層的方式在培養皿中加入濃度為0.3%的Agar, 並觀察其生長情形^[註7]



用結晶紫染色, 並製成玻片觀察



	day 1 dish1~5	day 4 dish1~5	day 7 dish1~5	day 10 dish 1~5
SUM	912763.5	2375044	3215267.5	7701999
AVERAGE	182552.7	475008.8	623053.5	1540399.8



上述五張圖為實驗二的實驗記錄, 顯微鏡觀測圖放大倍率為200倍, 而最右邊的圖是無透過顯微鏡、直接用肉眼觀察紀錄的。從加入Agar的第一天起(圖DAY 1)就有些許細胞貼附於葉脈支架的分支處, 而在圖DAY 4可以看見已有細胞團出現於纖維素支架的細脈上。在圖DAY 7中可以發現細胞團已成功包覆住葉脈的分支處(圓圈處), 除此之外, 細胞團也會生長及包覆住細脈的末端(圖中左上側)在圖DAY 10中(第四張圖)可以用顯微鏡看見細胞團幾乎填滿了葉脈間的空隙, 搭配下方的生長曲線圖, 我們可以推測是因為進入了生長曲線的對數期, 細胞適應環境後大量生長。而第五張圖是經過結晶紫染色後直接以肉眼觀察, 可以從其中看見成團的細胞團, 由此可以推斷出加入濃度為0.3%的Agar是可以輔助細胞生長, 以達到更好的生長情形。

細胞生長曲線圖

此圖表是由預實驗2收集數據而來的。我們於顯微鏡下觀察細胞團, 盡可能收集細胞團數量拍照, 再藉由電腦量化細胞團的面積, 並且定期觀察, 以紀錄細胞的生長曲線。
此次實驗種植了五組細胞(dish1~5), 藉由取平均值而得此數據。經由電腦量化後, 再繪製出生長曲線圖。此圖面積單位為 μm^2 , 為我們使用計數軟體的計算單位, 用來計算細胞團面積, 以此紀錄細胞團的生長倍率。我們加入Agar後, 定期拍照並量化細胞團面積, 並取得生長曲線。由圖中可見, day 1 到day 7 之間, 生長曲線增加幅度較為平緩, 我們推斷此時為細胞生長曲線的適應期。而day 7 到day 10, 生長曲線有大幅度的增加, 我們推斷此時為細胞生長曲線的對數期。

實驗結果: 以BSA和FIBRONECTIN塗層, 細胞貼附於葉脈的成果良好。

3 實驗

實驗目的：以BSA和FIBRONECTIN塗層，觀察牛隻肌肉幹細胞的貼附及生長情形。

1



Coating BSA於培養皿底部
Coating Fibronectin於葉脈上

2



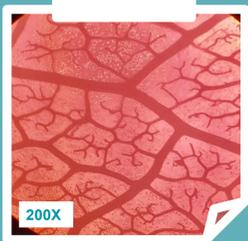
植入十萬顆牛隻肌肉幹細胞
靜置於細胞培養箱中約30天

3

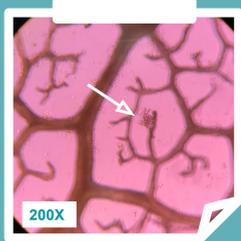


於顯微鏡下觀察

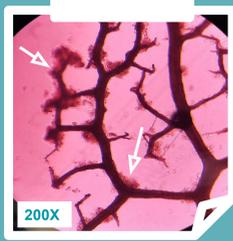
DAY 1



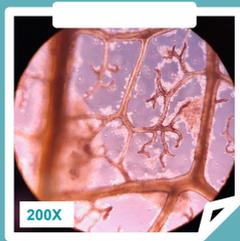
DAY 5



DAY 13



DAY 30



上述四張圖為實驗三的實驗記錄圖，而四張圖的放大倍率為200倍，可以由圖DAY 1中看見，植入牛隻肌肉幹細胞後的貼附情形較HT-29大腸癌細胞差，只有少許的單顆細胞貼附在纖維素支架上。而到了DAY 5的圖上可以觀察到已有較多的細胞於葉脈支架的末端聚集成細胞團，與大腸癌細胞起初貼附於葉脈支架的生支點不同(可見實驗一 圖一)

後續到了DAY 13的圖上可以看見已有大量的細胞團生長並包覆於細胞的末端，同時也有細胞團包覆於纖維素支架的側脈及細脈上到了DAY 30的圖上可以觀察到細胞團已經達到一定的數量，並可以貼附並包覆住葉脈支架的主脈上，可以由此得出牛隻肌肉幹細胞是可以貼附、生長於纖維素支架上，並達到良好的生長情形的。

實驗結果：以BSA和FIBRONECTIN塗層，細胞貼附於葉脈的成果良好。

結果與討論

A



一、選擇去細胞化的方法：

去細胞化有許多方法，我們經過查詢文獻及討論後，決定使用成本低，過程簡單的鹼液腐蝕法。去除細胞後，保留的纖維素骨架，使用清水長時間浸泡，去除掉多餘的鹼性物質，以利細胞後續生長的環境與條件。

二、葉脈種類：

我們經由實驗，篩選在校園中容易取得的不同種類的葉片後，最終決定選用易取得、易保留纖維素骨架且葉脈紋路細緻的桂花葉。

三、選擇Coating藥劑：

為了吸引細胞附著並生長於葉脈上，我們經過資料的參考及討論以及多次實驗後，決定選用Fibronectin作為纖維素骨架外的塗層，以大幅度改善動植物細胞間的貼附效果及達到最好的組織生長情形。

四、選擇細胞種類：

預實驗時，我們使用生長快速、貼附組織能力強的HT-29大腸癌細胞進行實驗，可在更短的時間內，取得細胞在纖維素骨架上附著的條件。成功取得實驗條件後，我們使用牛隻肌肉幹細胞來製作人造肉，並觀察肌肉細胞於有Fibronectin塗層的纖維素骨架上的生長情形。

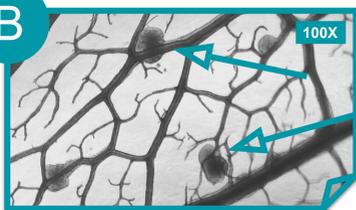
五、洋菜膠(Agar)的加入及使用：

為了縮短細胞填滿葉脈間空隙所需的時間，我們經討論過後決定加入洋菜膠(Agar)，作為支架空隙間的橋梁，輔助細胞更有效率，且更容易的填滿葉脈支架間的空隙，形成組織。

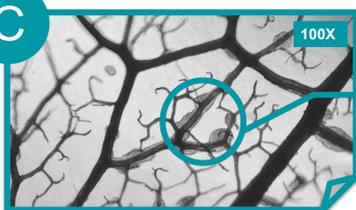
六、細胞生長情形

細胞團較容易形成於纖維素骨架的分支點(如圖A、B)，我們推測此現象的原因為在分支點有較多支撐，因此較利於細胞團的形成。所以我們推測為了讓細胞有更好的生長效果，就要加入Agar的使用，以給予更多的支撐。而圖C為加入Agar後的生長情形，由圖中我們可以發現，加入Agar後細胞團會開始包裹纖維素骨架，以此達到更好的生長效果。而圖D中我們發現細胞在葉脈較細的分支上較易形成球狀的細胞團，而在較粗的分支上易包裹著葉脈。而圖E為加入Agar後第十天於顯微鏡下所見。由圖中可見細胞已可完整包覆葉脈，使動植物細胞之間得以完整貼附並生長，細胞的生長情形十分良好。

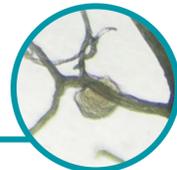
B



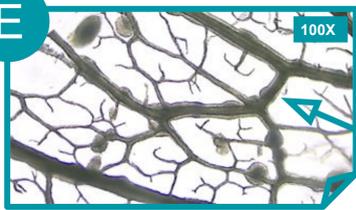
C



D



E



引註資料

註一、作者：巴特勒特(Jeffrey Bartholet)、譯者：林雅玲(2016)。培養皿裡的人造肉。科學人月刊，918期，146-150。

註二、作者：Delaney Chambers、譯者：石頭珊(2017)。把菠菜葉變成會跳動的心臟組織。國家地理雜誌，4月5日。

註三、Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badyak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683.

註四、Gershlak, J. R., Hernandez, S., Fontana, G., Perreault, L. R., Hansen, K. J., Larson, S. A., ... & Rolle, M. W. (2017). Crossing kingdoms: using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 125, 13-22.

註五、van den Dolder, J., Bancroft, G. N., Sikavitsas, V. I., Spauwen, P. H., Mikos, A. G., & Jansen, J. A. (2003). Effect of fibronectin-and collagen I-coated titanium fiber mesh on proliferation and differentiation of osteogenic cells. *Tissue engineering*, 9(3), 505-515.

註六、Li, M., Cui, T., Mills, D. K., Lvov, Y. M., & McShane, M. J. (2005). Comparison of selective attachment and growth of smooth muscle cells on gelatin-and fibronectin-coated micropatterns. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 5(11), 1809-1815.

註七、Courtenay, V. D., Selby, P. J., Smith, I. E., Mills, J., & Peckham, M. J. (1978). Growth of human tumour cell colonies from biopsies using two soft-agar techniques. *British journal of cancer*, 38(1), 77-81.