

出國報告(出國類別：進修)

# 皮膚區域專一性及 HoxC 基因簇調控機制研究

服務機關：國防醫學院

姓名職稱：謝黎淑滿、少校教師

派赴國家/地區：美國洛杉磯

出國期間：107 年 8 月 3 日至 112 年 1 月 19 日

報告日期：112 年 2 月 8 日

## 摘要

「皮膚區域專一性」如何形成在發育生物學領域是一個很重要的問題，鍾正明院士實驗室利用具高度皮膚區域差異性之鳥類模型從事一系列相關研究。同源異形基因 (Hox genes) 在胚胎不同區域發育及體軸建立的過程中扮演重要的角色，但該基因於皮膚區域專一性之調控機制仍不清楚，故此次赴美之研究題目即為「皮膚區域專一性及 HoxC 基因簇調控機制」。

第一年主要測定 HoxC 基因於不同皮膚區域之內生性表現量；第二年即開始著重於功能性實驗，包括基因過度表現及負調控；第三年主要利用次世代基因定序進行轉錄組及基因組分析；第四年更進一步使用新穎 Micro-C 技術分析染色質之立體結構變化。經過近四年半之努力，最後順利通過博士論文口試，於規定時限內畢業返台。

# 目次

摘要.....	2
本文.....	4
一、目的.....	4
二、過程.....	5
三、心得及建議.....	9

# 本文

## 一、目的

此次赴美進修目的為培育科內所缺乏之系統生物學相關領域師資，期能為科內開創新的研究領域並引進新的課程方向，促進師資、研究、教學多元化發展。「皮膚區域專一性」之建立機制是一個很重要但尚未研究透徹之問題，倘若我們能解碼「區域專一性」的形成機制，我們便能引導皮膚幹細胞去分化成特定的皮膚型態並可轉譯應用於再生醫學。本次博士論文主題即為研究皮膚區域專一性之調控機制，透過學習各項新穎次世代基因定序方法，包括 RNA 定序(RNA-seq)、轉座酶可及的染色質定序(ATAC-seq)及染色質結構分析(Micro-C)，以在轉錄組、染色質開放程度及染色質立體結構等多項層面深入探討其機制。此次所學之各項體學(omics)研究，相信能幫助科內前瞻研究之發展。

## 二、過程

到美國的第一個月主要是盡快安頓並適應當地的食、衣、住、行，多虧先生一併赴美兩週以及同一實驗室學姊歐冠伶醫師的幫忙，讓我能順利快速地在異鄉安頓好起居生活。完成註冊、選課及體檢事宜後開始認識學校及實驗室環境。因公費出國進修有四至四年半之年限限制，為節省時間我沒有選三個實驗室分別去見習，而是直接加入鍾正明院士的實驗室。修課之餘參加每週兩次的實驗室會議，並參與實驗室的表觀基因學(epigenetics)相關實驗技術示範教學，像是染色質免疫沉澱(ChIP)、ATAC-seq、RNA-seq 等等。

修課兩個月已逐漸適應學校生活後，即開始規劃各項實驗技術學習，為了能夠在實驗室內操作實驗，須參加校內的「實驗室安全訓練」並通過考試、取得證書，證書收到後，鍾院士指導我研究「雞胚胎中 Hox 基因相關的調控(特別著重於表觀基因學層面)」，實驗技術方面則是向吳平副教授學習，如：用顯微鏡做雞胚胎解剖取樣，三聚甲醛固定樣品並以甲醇或乙醇脫水保存樣品，然後以分子克隆製備 Hox 基因的 RNA 探針來做全標本或切片原位雜交( in situ hybridization)實驗；還有抽組織 RNA 進行 RNA-seq 樣品製備，並用 Galaxy 軟體分析定序資料以尋找有興趣的基因表現趨勢和訊息傳遞路徑；亦將 Hox 基因嵌入 RCAS 病毒質體，並培養 DF-1 雞纖維母細胞株至適當細胞數量及狀態，然後將帶有目標基因之 RCAS 病毒質體轉染至 DF-1 細胞株，因 RCAS 載體上帶有 mcherry 基因會轉譯出紅色螢光蛋白，所以可用螢光顯微鏡觀察細胞被 RCAS 病毒感染的比率，待病毒感染率增高時可開始收集細胞培養基上清液，並高速離心濃縮 RCAS 病毒液，高效價病毒液被注射入雞胚胎進行基因過度表達之功能性研究。

除參加一些校內學術演講外，鍾院士也非常鼓勵參加一些重要的相關研討會，如：美國

細胞生物學學會研討會及加州大學爾灣分校的年度皮膚研討會等，其中「國際幹細胞研究研討會」最令我印象深刻，因其中一場演講是來自著名的 Denis Duboule 博士，他對 Hox 基因研究的演講激發了我對未來研究方向的靈感！

母校國防醫學院積極鼓勵大學部學生至海外實驗室學習、拓展視野，其中醫學系學生汪欣品及謝佳蓉暑假至鍾院士實驗室學習，由我從中溝通協調並負責分子克隆技術及 RCAS 病毒製備教學。

博士第二年，課業方面皆順利通過，課餘時間就在實驗室繼續工作。目前 HoxC 基因在雞胚胎的實驗已有初步結果，故鍾院士建議也可以開始使用不同年齡的成雞來做 HoxC 基因過度表現的實驗，觀察是否皮膚或羽毛會發生表現型改變。除了主要的研究計畫，同時也幫忙其他的合作實驗室做原位雜合實驗來驗證所預測基因表現的空間分布，增加研究多樣性。

新冠肺炎 (COVID-19) 疫情突然爆發，加州被列入重大災區，也發佈居家維護健康令，要求全州居民在家避疫。為維護學生健康、避免疫情在學校蔓延，南加州大學在 109 年 3 月 11 日開始用 Zoom 軟體進行遠距線上網路授課，並於 3 月 16 日宣布「研究室須於 3 月 20 日前關閉」，極其突然地生活及工作型態的變化讓大家措手不及，尚在進行中的實驗也只能無奈地被迫中斷，實驗規畫及進度也大受影響。實驗室改用 Zoom 軟體進行每週兩次的研究進度會議，另外每週新增一次文章閱讀分享活動，以增進文章閱讀量。6 月 24 日學校開始實施有限制的開放：可容納 30% 人員進入校園，進入人員須完成 COVID-19 預防訓練並完成考試得到證書，在校園內必須戴口罩、保持社交距離、每日需線上預約進入校園建築的時段並至大樓大廳接受健康評估，故實驗室人員排班輪流去實驗室工作。

疫情期間在實驗室工作的時間有限，故得以在家花更多時間學習及分析 RNA-seq 及

ChIP-seq 數據資料，也整理一些和其他實驗室合作的實驗結果並撰寫部份文章草稿，期在疫情影響下研究課題仍有所進展。日常生活方面，自學校實驗室關閉後，便一直待在家中以維健康，所有食物及生活日用品皆從網路訂購外送，運動模式也轉為室內運動。當時美國口罩幾乎斷貨，還好台灣國防部駐外單位每月會寄送台灣製造的口罩，讓口罩庫存不虞匱乏，助我順利度過最艱困的疫情時期。

博士第三年，因疫情趨緩實驗室改成可接受 50%人員進入。八門必/選修課皆已完成，除實驗工作外亦開始準備博士學位資格考，首先須邀請 5 位資格考委員組成委員會，委員會成員包括鍾院士、南加大牙醫學院教授 Dr. Michael L. Paine 及副教授 Dr. Amy Merrill-Brugger、南加大醫學院副教授 Dr. Denis Evseenko 及副教授 Dr. Ping Wu。然後，書寫一頁具體的研究目標計畫並於第一次指導委員會會議說明之，委員們判斷該計畫可行，故給予相關意見讓我得以撰寫更完整的六頁研究計畫(按照美國國家衛生院 F31 計畫格式)。第一次委員會通過後，便開始準備資格考筆試，筆試方式為 5 位委員各會出 3 到 5 個題目，然後須在一週內完成作答，每份答卷為 1,500 至 4,000 字不等，答卷交給各委員後，委員會判定通過或仍需修改，順利通過筆試後，便可跟各委員約資格考口試時間，口試一週前須將完整的研究計畫寄給委員們審查，然後口試當天委員們判斷該計畫之邏輯性、初步的實驗結果及未來工作規劃可行，故順利通過口試成為博士候選人。另兩篇作為共同作者之文章也順利刊登。歷經 1 年 3 個月的疫情管控，南加州大學終於自 110 年 6 月 16 日起完全開放。

博士第四年，實驗室要申請 1 個美國國家衛生院(NIH) R01 五年期計畫，其中第一個次研究目標和 3 張圖由我負責，在 5 至 7 月期間頻繁與鍾院士進行相關討論、撰寫及修改計畫內容，7 月初完成計畫提交，再於 9 月上傳計畫補充資料，並於 11 月獲五年計畫經費核准。

實驗方面，進行了 ATAC-seq 實驗以研究全基因組染色質開放程度、Micro-C 實驗以研究全基因組染色質三維立體結構。於最後口試前，須先組好博士論文委員會，召開論文前委員會會議，委員會審查通過後則依照委員意見補做一些實驗外也同時撰寫文章草稿及博士論文，最終順利通過博士畢業口試。

### 三、心得及建議

1. 分析次世代基因定序數據之工具有多種選項，例如：自己打程式編碼、使用 RStudio 軟體、Galaxy 分析平台、Partek Flow 分析平台等，對於生物學家而言程式編碼和 RStudio 要花很多時間學習才能用得順手，相反地 Galaxy 和 Partek Flow 分析平台較容易學習，尤其 Partek Flow 在使用上更為直覺、方便。另外，BioRender 專業學術繪圖軟體也非常好用，非常適合繪製文章內之各種示意圖、流程圖及圖像摘要。強烈建議本校購買上述 Partek Flow 分析平台及 BioRender 繪圖軟體，以促進次世代基因定序數據之分析能力和科學製圖之專業性、美觀性。
2. 美國教育廣度大，鼓勵跨領域學習，例如博士後研究員通常會選擇與博士論文不同之領域。鍾院士常說要知道天下大事，故非常鼓勵實驗室同仁參加研究領域內重要的國際研討會以擴大視野、汲取新知，參加研討會時常令人驚嘆研究成果及技術發展之快速！另外，鍾院士也與許多其他實驗室跨領域合作，展示跨領域合作之重要性。
3. 建立系統生物學實驗室，包括次世代基因定序技術及分析(RNA-seq、ATAC-seq、Micro-C 等)、慢病毒調節基因表達之功能性測試實驗、RNA 探針製備及全標本(或切片)原位雜交實驗等，以補足科內系統生物學領域師資，促進多元研究發展。
4. 最後一年有幸參與 NIH R01「皮膚區域專一性」研究計畫撰寫，這是難能可貴的經驗，雖然壓力山大、每天被催稿，但也幫之後博士論文打好架構及基礎，相信亦應有助於未來返台研究計畫申請，很開心能有此經歷，且自身實驗數據能夠有所貢獻也讓我獲得不少成就感。因人類皮膚檢體不易取得，鍾院士實驗室以鳥類皮膚模型進行「皮膚區域專一性」研究，但我們已討論過若能和本院及三軍總醫院合作取得所需人類檢體，將能與鍾

院士持續合作該研究計畫。

5. 國防部公費進修博士年限為 4 年(可再延長半年)，但一般生物方面美國博士學程平均畢業時間為 5-6 年，連母語人士都須花費 5-6 年時間畢業，對非母語人士的我要提早於 4 年內畢業更是艱困的挑戰。為了節省進修時間，在選擇學校時即不考慮須要實驗室見習及當教學助理的學程，在選擇指導教授時也會先了解該實驗室的研究計畫是否充足以免做實驗時有捉襟見肘之狀況，經過綜合考量最後決定直接加入鍾院士實驗室，但前兩年仍需花時間修課，故自己的研究課題進度在前兩年難免會比較慢。相較於課業成績，自己的研究實驗數據更為畢業之關鍵，故第一個學期我只修一門 4 學分的必修課，如此便有時間開始學習各項實驗技術及生產實驗數據。
6. 一週兩次實驗室會議及不定期與指導教授單獨會議，讓實驗數據能夠定期且即時的整理，有助於每年在系所的研究進度報告，及博士候選人研究計畫撰寫。雖然頻繁的會議比較費時，但也能更了解其他實驗室同事的研究主題、方法、經驗及資料呈現，可從中學習並應用於自己的研究主題，另外也提供很多英文口頭報告及回答問題的練習機會，對最後的畢業論文口試助益良多。
7. 美國和台灣的上課氛圍不太一樣，美國學生上課都滿認真的、不太會上課睡覺，可能是學費很貴更加珍惜的緣故，美國確實是比較自由且鼓勵式的，縱使學生問的問題老師已於課堂說明過，老師也會尊重地、耐心地再說明一遍，當學生報告時，老師也不會一副想把學生問倒的樣子，而是想幫助學生理解或想幫助學生研究課題能夠順利進行，當我感受到老師的立場是想幫助學生時，對於口頭報告的緊張程度便減少許多。另外，美國的考試題目都是偏大方向、不考枝微末節，因太細微的資訊會查詢即可，且大部分老師

會說明考試重點及形式，故修課成績都不至於太差。美國教授的上課時數不多，可能一學期只上一、兩堂課，所以其教學及研究品質得以保障。

8. 預定於 112 年 2 月 15 日 1200 時於本院幼師分享會報告進修心得。
9. 誠摯感謝國防醫學院、軍醫局及三軍衛材供應處各位師長、長官和同仁給予我的幫助與鼓勵，多虧各位貴人的相助才讓我得以順利赴美獲得博士學位。特別感謝生物化學科黃世明教授從我碩士班開始就不斷鼓勵我赴美讀博士，也特別用心地訓練我的科學邏輯思考及實驗技術，這些能力在攻讀博士的過程中都非常受用。由衷感謝我的指導教授鍾正明院士總是充滿熱情地指導我的研究課題，提供一個多元化且友善合作的學習環境，讓我能茁壯地成長，也很榮幸有緣與所有實驗室同仁共事。感謝在博士學程中一路幫助我的委員會成員：Dr. Michael Paine、Dr. Amy Merrill-Brugger、Dr. Denis Evseenko 和 Dr. Ping Wu。感謝歐冠伶博士介紹我給鍾院士認識，也很感謝在我剛到美國時給予我許多生活上、課業上及實驗上的幫助與建議。感恩家人無私的支持，尤其是我的老公林書儀還一起到南加大就讀博士班，不管是生活上還是研究上都給我偌大的幫助和依靠！



Fig.1 與指導老師鍾正明院士及實驗室同仁合影。



Fig.2 口試通過後與博士論文委員會合影。由左至右依序為 Dr. Ping Wu、畢業生、鍾正明院士、Dr. Amy Merrill-Brugger 及 Dr. Michael Paine；Dr. Denis Evseenko 以線上方式參加會議，故於投影幕上亮相。



Fig.3 畢業典禮當天與院長 Dr. Avishai Sadan（左一）、鍾正明院士（左二）、畢業同學（右二）及親友（右一）合影。