

出國報告（出國類別：研究）

規模化反芻動物溫室氣體排放減量技術研習

服務機關：農業部畜產試驗所

姓名職稱：謝怡慧助理研究員、洪兮雯助理研究員

派赴國家：日本北海道

出國期間：113 年 9 月 28 日至 113 年 10 月 7 日

報告日期：113 年 11 月 26 日

摘要

本計畫旨在前往北海道大學學習「牛隻口腔採樣瘤胃樣品技術」及「MinION 分析技術」，並拜訪帶廣大學福間直希副教授。由於生物防疫考量，我們無法現場學習口腔採樣實務，故小池教授透過影片介紹了從牛隻口腔中採集樣品的方法，並說明 MinION 技術的應用及其選用理由。介紹結束後，小池教授帶領我們認識實驗室學生和環境，並安排學生進一步教授從口腔樣品中萃取 DNA 的流程。

在 DNA 萃取過程中，吉宮先生細心指導了採樣的精確位置：牛隻臉頰與中後段牙齒間的區域，無需過深以避免棉籤脫落。他展示了實驗室自製的約 30 公分長的鋁製採樣棒，並詳細介紹其構造與製作方法。接著，他講解了樣品採集後的保存方式及後續 DNA 萃取步驟，以便進行 MinION 分析。

MinION 分析過程則由小池教授的另一位學生大脇小姐指導。因 DNA 濃度不足，樣品需經過 16S rRNA 技術進行增殖。首次 PCR 增殖後，確認濃度達到 1-10 ng/ μ L，隨後進行第二次 PCR，使濃度達到 6-24 ng/ μ L，若濃度過高需稀釋，過低則顯示樣品前處理品質不佳。經過兩次 PCR 增殖和清洗後，樣品進行 DNA repair 和 end-prep、adapter ligation 和 clean-up 等步驟，便可將樣品注入 MinION 晶片，並利用電腦讀取和分析資料。大脇小姐也詳細指導了分析後晶片的清理和數據讀取流程。數據分析由吉宮先生指導，他介紹了實驗室常用的分析軟體，並指出因數據量龐大，實驗室特別租用了伺服器協助分析，並以 R 進行統計分析。

在完成北海道大學的學習後，我們前往帶廣大學拜訪福間直希副教授。福間教授熱情介紹了其實驗室、設備及其他教授，並與其實驗室學生分享了天然物與海藻發酵物在牛隻上的應用，以及對牛隻瘤胃微生物群落和甲烷排放的影響。最後，應福間教授之邀，謝怡慧助理研究員向帶廣畜產大學學生介紹了畜試所概況及其營養組在反芻動物研究上的成就。

本次計畫能順利推進，感謝小池教授及福間教授的協助，不僅讓我們學習到先進技術，也增進了對兩位教授在反芻動物研究上的理解。與福間教授的交流是執行科發計畫並參加 AAAP 時建立的聯繫，此次拜訪更進一步延展了計畫的成果。此外，福間教授還引薦了帶廣大學的多位教授，涵蓋反芻動物以外的多元研究領域，回國後將與同事分享這些聯絡資訊，以促進未來與帶廣大學的合作機會。我們將持續保持與本次拜訪的教授們的聯繫，期待未來有更多合作的可能性。

目次

壹、 目的	1
貳、 過程	2
參、 研習內容.....	4
一、 學習如何從牛隻口腔採集瘤胃樣品	4
二、 學習如何從樣品中萃取出 DNA.....	5
三、 學習如何使用 MINION 進行分析	6
四、 學習如何分析數據	7
五、 參訪 EKORIN VILLAGE 牧場.....	8
六、 拜訪帶廣大學	9
七、 參訪渡邊農場	10
肆、 心得與建議.....	11

壹、目的

我國農業部門溫室氣體排放約占全國溫室氣體排放 1.11%，其中畜禽腸胃發酵占(20.60%)，主要是由於飼料的厭氧腸道發酵。而反芻動物是農業生產過程產生溫室氣體 (greenhouse gas, GHG) 的最大來源，佔全球甲烷排放量的 37- 44% (IPCC 2007)，甲烷潛在全球暖化效應是二氧化碳的 28 倍，不僅是加速溫室氣體的原因之一，同時也是反芻動物能量損失的主要來源。甲烷等溫室氣體的排放主要來自於瘤胃微生物代謝，因此了解瘤胃微生物菌相是調節反芻動物溫室氣體產量的必要技術。目前僅能以開窗牛或以食道胃管等傳統方式取得瘤胃液。開窗牛頭數少且無法兼顧動物福祉。食道胃管也有造成動物緊迫與傷害的風險。而高通量定序技術雖可對複雜微生物生態系統進行探索解析，但定序材料大部分僅針對 16S rRNA 部分區域基因進行擴增分析，被認為有鑑別度較低的問題。近年來雖然有針對 16S rRNA 全長進行分析的定序系統 (如 Miseq 或 PacBio)，但分析方式繁瑣且儀器設備昂貴，雖然提高微生物群研究中分類學鑑定的分辨率，但因經費限制無法進行大規模分析，或僅能以委外試驗進行分析，對試驗資料分析之掌握度較低。

北海道大學動物機能營養學研究室已具備先進的反芻動物溫室氣體減量技術開發，並已建立系列之規模化試驗採樣與分析方法，包括以口腔拭紙取得反芻食團或反芻胃液，該技術已證實與瘤胃液菌相有最高相似性，從口腔取樣可減少動物插管及開窗，即有機會進行較大規模的實驗，取得大量瘤胃樣品。該實驗室亦利用第三代定序技術 (MinION) 分析菌相，了解菌相與甲烷排放的關聯，故透由前往北海道大學研習相關技術，可提升國內反芻動物溫室氣體減量研究的效益並提升試驗參考價值。此外，趁此行也前往帶廣大學拜訪今年在 AAAP 所認識的福間直希副教授，了解其在開發降甲烷排放的飼料添加劑的開發成果。

貳、過程

計畫行程

日期	行程	說明
9月28日	啟程	搭乘星宇航空 JX0850 班機由桃園飛往札幌
9月29日	準備參訪資料	勘查北海道大學位置以及準備參訪資料
9月30日	拜訪北海道大學小池教授	學習如何使用口腔拭子法採集瘤胃菌相以及如何萃取 DNA
10月1日		學習如何使用 MinION 進行菌相分析
10月2日		學習如何分析所得數據
10月3日	參訪 Ekorin Village 牧場	從札幌移動到帶廣路途上參訪 Ekorin Village 牧場
10月4日	拜訪帶廣大學	拜訪帶廣大學福間直希教授並與分享最近研究內容
10月5日	參訪渡邊牧場	參訪位於北海道弟子屈渡邊牧場
10月6日	移動日	由帶廣移動至札幌
10月7日	返程	搭乘星宇航空 JX0851 班機由札幌飛往桃園



圖 1. 本次參訪地點之地理位置

參、研習內容

一、學習如何從牛隻口腔採集瘤胃樣品

由於生物安全防疫的要求，我們無法親自參與現場學習如何從口腔中採集樣品。為了彌補這一限制，小池教授特別播放了實驗室先前的樣品採集過程影片，並詳細講解了從牛隻口腔中取得樣品的操作流程。此外，教授還解釋了 MinION 技術的原理及其在該應用中的優勢。介紹過程結束後，教授帶領我們參觀了實驗室，並介紹了其學生及實驗室環境。為進一步加深我們的實務技能，他安排我們由實驗室學生指導，學習如何從口腔樣品中萃取 DNA。



圖 2. 北海道大學大門



圖 3. 北海道大學農學院



圖 4. 北海道大學舊農學院



圖 5. 小池老師簡介採集技術及 MinION 技術

二、學習如何從樣品中萃取出 DNA

DNA 萃取過程由小池教授的學生吉宮先生負責指導，他細心地解說了採樣的精確部位：位於牛隻臉頰和中後段牙齒之間，無需深入以避免棉籤掉落。吉宮先生展示了他們實驗室自製的約 30 公分長的鋁製採樣棒，並且在我們詢問後，慷慨地分享了製作方法的基本結構。隨後，吉宮先生詳細說明了採樣回來後的樣本保存步驟，以及 DNA 萃取的流程，以便為接下來的 MinION 分析做好準備。



圖 6. 吉宮先生解釋萃取 DNA 步驟



圖 7. 自製樣品採集棒



圖 8. 自製樣品採集棒前端



圖 9. 採集棒前端為棉籤

三、學習如何使用 MinION 進行分析

接下來，MinION 分析的操作由小池教授的另一位學生大脇小姐進行指導。由於萃取後的 DNA 濃度不足以直接進行 MinION 分析，因此需先通過 16S rRNA 技術進行樣品擴增。初步的 PCR 增殖後，需確認樣品濃度達到 1-10 ng/ μ L。接著進行第二次 PCR，目標將樣品濃度提升至 6-24 ng/ μ L。若濃度過高則需稀釋，若過低則可能反映樣品前處理品質不佳。樣品經過兩次 PCR 增殖及清洗後，進一步進行 DNA repair 和 end-prep，以及 adapter ligation 和清理等步驟，之後即可將樣品注入 MinION 晶片，並通過電腦進行數據讀取和分析。大脇小姐還詳細教導了我們分析後的晶片清潔方法及數據檔案的讀取流程。

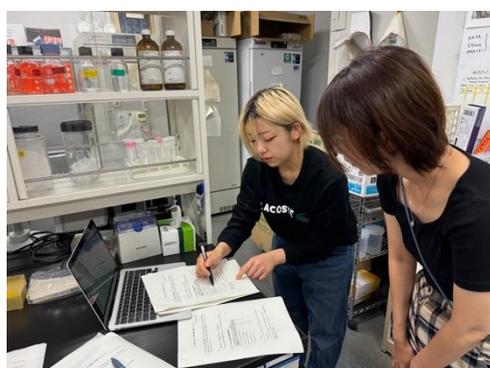


圖 10. 大脇小姐說明 PCR 增殖步驟



圖 11. 解釋如何使用 MinION 晶片



圖 12. MinION 晶片



圖 13. MinION 晶片讀取器

四、學習如何分析數據

數據分析則由吉宮先生進行指導。他介紹了實驗室中常用的一些分析軟體，並說明由於數據量龐大，小池教授的實驗室特別租用伺服器以協助數據處理。分析結果產出後，再使用 R 軟體進行進一步的統計分析，以確保數據解釋的精確性和全面性。



圖 14. 吉宮先生說明分析步驟



圖 15. 說明如何讀取數據

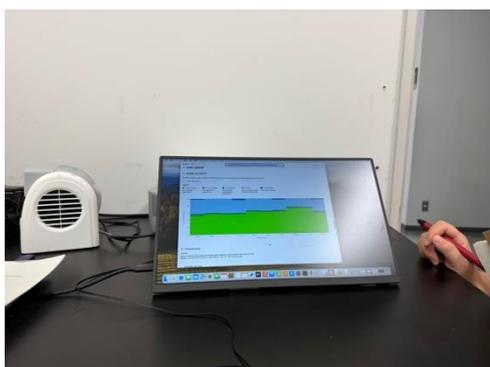


圖 16. 分析數據結果

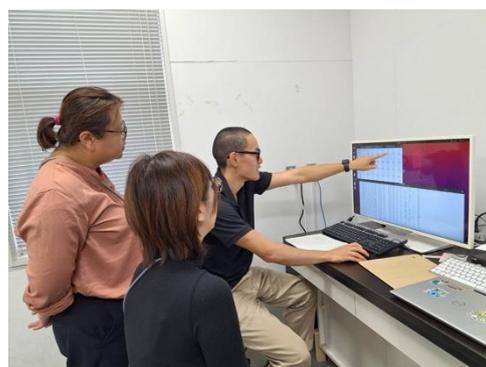


圖 17. 利用 R 進行統計分析



圖 18. 與小池老師合影

五、參訪 Ekorin Village 牧場

Ecorin village 是一個位於北海道惠庭市的一家觀光牧場。創立的宗旨為「為永續社會的建設做貢獻，從動植物開始感受自然環境的珍貴」。其利用廢材來建造園區並將餐廳的餐飲垃圾和牲畜糞便回收製成有機肥料，以及開發減少二氧化碳排放的技術。



圖 19. 放牧綿羊



圖 20. 厭氧發酵槽

六、拜訪帶廣大學

此次拜訪了今年在 AAAP 會議上認識的福間直希副教授。福間教授熱情地介紹了其實驗室的設備與研究領域，並引見了其他教授。接著，他與實驗室學生分享了天然物和海藻發酵物應用於牛隻的研究，並討論其對牛隻瘤胃微生物群落的影響以及在降低甲烷排放方面的潛力。最後，應福間教授的邀請，謝怡慧助理研究員向帶廣畜產大學的學生介紹了畜試所的概況及營養組在反芻動物研究上的成果。



圖 21. 帶廣大學正門



圖 22. 福間老師介紹萃取設備

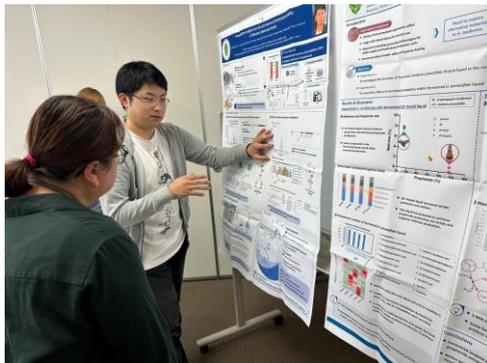


圖 23. 福間老師學生分享研究成果



圖 24. 謝怡慧助理研究員
分享研究成果



圖 25. 與福間老師合影



圖 26. 帶廣大學釀酒廠

七、參訪渡邊農場

渡邊農場是日本位於北海道弟子屈非常有名的觀光農場。其場區為 70 公頃，飼養約 120 頭泌乳牛。是日本全國酪農教育農園認定的牧場。有餵牛、榨乳、製作奶油及冰淇淋等體驗項目。牧場主人希望透過這些體驗活動，讓參觀民眾可充分感受到生命的溫暖、食物的重要性以及學會人和自然的共存。



圖 27. 渡邊牧場正門



圖 28. 觀光遊園車



圖 29. 放牧牛群



圖 30. 乾草



圖 31. 體驗擠乳場地



圖 32. 青貯窖

肆、心得與建議

- 一、本出國計畫之規劃，起初，由於小池教授行程繁忙，未能及時回信，導致原定於 6 月底前往日本學習相關技術的計畫延宕。幸運的是，小池教授在 7 月回信，並表示他將於 9 月 30 日至 10 月 11 日有空，使得後續行程得以順利安排與執行。
- 二、小池教授熱心安排其學生協助我們學習採樣與分析技術，但因時間有限且受生物安全限制，無法進行現場操作。雖然教授提供了日文版操作流程，但無法完全掌握所有細節。計畫回國後，將依據小池教授的方法進行採樣，並向具 MinION 經驗的同事學習，持續提升相關技能。
- 三、小池教授指出，雖然口腔拭子採樣法操作簡便，但需要建立大量的數據庫，以確認最佳採樣時間並排除原始口腔菌相的干擾。他建議若採用此方法，應同步取得瘤胃液樣品和口腔樣品，進行比較以掌握差異。此外，當我們詢問該技術是否可應用於其他反芻動物時，小池教授表示目前其研究專注於牛隻菌相，尚未應用於其他動物，但認為反芻動物之間相似度高，此技術具可行性，但同樣需要先建立資料庫，以確保樣品能代表瘤胃菌相。後續可以在 2-3 年陸續建立羊隻資料庫。
- 四、此次行程中，除了感謝小池教授，也感謝福間直希副教授的協助。透過在今年 AAAP 上的相識，我們得以進行後續學術交流。此外，福間教授也引薦了帶廣畜產大學的其他教授，這些教授研究領域不局限於反芻動物。回國後，將分享這些教授的聯絡方式，期盼未來有機會促進雙方合作。
- 五、在此次行程中，我們還有幸與帶廣畜產大學的師生進行研究分享。福間教授在我們出發前兩週詢問是否能為其實驗室學生進行簡報，並邀請多位師生參與，甚至安排了正式教室作為場地。面對這樣正式的場合，我不免緊張，雖然順利完成報告，但因緊張而遺漏了部分資料，令人遺憾。這是我第一次在外國人面前以英語進行簡報，雖然表現尚有進步空間，卻也為自己勇敢接下這項挑戰感到驕傲。期許自己在研究和英語能力上持續提升，以迎接未來更多的機會。