

出國報告（出國類別：訓練）

英國 The Francis Crick 實驗室 短期進修計畫

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：張祐誠

派赴國家：英國

出國期間：114 年 1 月 14 日至 114 年 2 月 14 日

報告日期：114 年 3 月 14 日

摘要

本次短期進修，目標是學習分析CGRP（降鈣素基因相關肽）於肺癌相關技術，目前應用於小細胞肺癌（SCLC）領域的應用，未來希望擴展到其他肺癌組織。同時，學習實驗室技術如染色、影像學、神經電生理學及細胞培養。透過在弗朗西斯·克里克研究所（The Francis Crick Institute）的學習，希望強化自身對基礎研究的理解，並建立臨床與基礎研究的橋樑，為未來轉化醫學的發展奠定基礎。

進修期間，我參與了ELISA分析CGRP表達、細胞培養、PCR技術、組織透明化（iDISCO）、免疫螢光染色（IF）、石蠟切片脫蠟技術、老鼠腫瘤模型研究及影像分析等實驗技術的學習與操作。實際參與相關實驗，提升操作技術，並對腫瘤微環境與影像分析有更深入的理解。

克里克研究所(The Francis Crick Institute)所提供先進的研究環境與跨學科合作機會，使我能與國際頂尖研究人員交流，體驗國家重點實驗室的規模以及雄心。此次進修不僅增進實驗關，也為未來研究方向帶來啟發，期望未來有機會與臨床研究相結合，進一步提升應用於胸腔疾病治療效果。此外，我也希望能與國內團隊分享所學，促進相關領域的發展與合作。

目次

一、進修目的.....	1
二、機構介紹.....	1
三、環境建置.....	2
四、進修過程.....	4
五、實驗方式建立.....	6
五(一)、免疫螢光染色 (Immunofluorescence, IF) 實驗流程.....	6
五(二)、iDISCO 組織透明化 (Tissue Clearing) 實驗流程.....	9
五(三)、Dewaxing for Immunofluorescence (IF) 實驗流程.....	11
六、心得.....	15
七、建議事項.....	16
八、附錄.....	17
參考文獻.....	18

本文

一、本此進修目的

過去一年多，很幸運地，透過參與多次有關CGRP(calcitonin gene-related peptide,降鈣素基因相關肽)及其在小細胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)疾病中作用的研究會議與演講，為進修開啟了契機。了解到實驗室技術可能在未來，對此領域研究扮演至關重要的角色，期待有一天，可以進一步學習相關技術。因此計畫短期進修，希望能夠更深入體會並掌握此技術，期待在未來的影響取得先機。另外，如染色、影像學、神經電生理學及細胞培養的相關技術，也期許同時能夠觀摩，也許對未來的研究也多有幫助。

短期進修有助於將先前研究思考如何融入臨床實踐。理解CGRP在胸腔疾病中，尤其腫瘤神經學領域的角色，也許，將來可能會帶來新的治療方向。我計劃在回國，仍然繼續探索這一領域。因此，實驗室經驗或許將增加我在基礎研究的了解，也能夠有機會連結臨床與基礎研究，為轉化相關研究建立基礎，長遠的心願，是希望改善胸腔外科乃至於胸腔疾病的病患治療。

弗朗西斯·克里克研究所(The Francis Crick Institute)為英國在生物醫學研究領域的最大單一研究所而聞名，是我此次短期出國培訓的理想環境。其對於CGRP研究的前衛角色，應為世界頂尖，並在染色、影像學、神經電生理學和細胞培養方面的成熟完備，對我研究目標的實現高度相關。我預計將獲得研究所專業團隊的強力支持，並能夠嘗試使用先進的設備，熟稔其中關鍵步驟，這將對我成功完成培訓計劃並達成後續研究合作至關重要。

更進一步，在弗朗西斯·克里克研究所的指導老師，Leanne Lee,於世界頂尖的期刊Nature雜誌，刊登一篇屬於他們實驗室的文章：； Intrinsic electrical activity drives small-cell lung cancer progression。我相信，到世界頂尖實驗室看一看，與頂尖的研究人員互動，也是奠基未來研究生涯的重要基石。

二、進修機構介紹

弗朗西斯·克里克研究所(The Francis Crick Institute)是坐落於英國倫敦，英國首屈一指的生物醫學研究中心，致力於探索生命科學的基本機制，並推動疾病診斷與治療的創新。該研究所於2016年正式成立，同時，與六大機構共同合作，包括 Medical Research Council (MRC)、Cancer Research UK (CRUK)、Wellcome Trust、University College London (UCL)、Imperial College London 和 King's College London。於進修及間，不時遇到來自各個機構、學校的研究人員，與不同求學階段的學生。機構除了進行頂尖的研究，同時，也攜手帶領年輕研究人員的生涯，並且希望為莘莘學子種下追求尖端研究的火種。

Crick Institute 以跨學科研究聞名，研究項目同時涵蓋：神經科學、癌症、生物資訊學、免疫學和再生醫學等領域，強調基礎研究與臨床應用的結合。機構中，配備先進設備已經是基本條件，高解析成像、基因編輯與單細胞分析甚至擁有自己的核磁共振機器，全天候為研究服務，並與全球學術機構和產業合作，推動科學突破。

作為歐洲最大的生物醫學研究中心之一，The Francis Crick Institute 鼓勵開放合作，致力於培養未來的科研人才。為此，整個研究機構提供所有研究人員，一個專心致至的環境。舉凡基礎實驗器材，幾乎取之不盡，隨時補貨，另有專人清洗實驗器具，以及打掃環境；更有類似飯店的盥洗空間，讓需要整日工作甚至挑燈夜戰的人員，確保身體清潔及舒適，同時，隨時有沙發床與研究小間，鬧中取靜，在開放空間中，創造許多私人小空間。為的就是讓研究人員，全心全意放在頂尖、全新的研究構想。

橫向技術的支持，令人印象深刻。在機構裡面，有句話印象深刻：如果你不會DNA編輯，沒問題我們找專家幫你；如果你不會螢光染色，沒問題我們找專家幫你做；如果你不會做老鼠實驗，沒問題我們找專家幫你...。整個機構，提供絕佳的環境，幫助研究者免除許多瑣碎的小環節，致力於關鍵步驟的發展。

三、環境建置

建築與設施

研究所大樓主體是一座現代化的玻璃與鋼結構建築，內部設計開放，使不同實驗室人員能夠自由地敞開交流，促進不同研究團隊之間的合作與交流。大樓內部，地面上共有五樓層，配備最先進的實驗設備，包括細胞培養室、成像與顯微鏡核心設施、基因編輯技術實驗室，以及蛋白質結構與質譜分析實驗室。此外，地下室還設有動物實驗中心，有獨立的專業動物飼養團隊，以及數名專屬的獸醫團隊監控各研究動物(主要是老鼠)的狀況，以確保研究能夠安全與符合動物實驗規範進行。

工作環境與交流空間

研究所內部的空間規劃強調開放性與互動性，每個樓層，都設有開放式辦公區域與落地窗及玻璃門隔開的實驗區，一眼望去，就能找到哪位研究者在辦公桌，或者在實驗室辛勤地實驗，同時，每層樓都擁有自己的用膳空間，開放與簡潔的桌椅，隨手可得的白板以及白板筆，似乎在告訴人們：創新的想法趕快寫下來，以免忘記！

此外，大樓中央設有一個寬敞的共享空間，包括咖啡廳與休息區，供研究人員在非正式環境下進行討論。於一樓入口處，設有大型會議廳，還定期舉辦學術講座、研討會與合作會議，以促進國際間的學術交流。平時，會議廳隔間成兩半，每週都提供研究學者進度報告的空間；有大型會議需求時，間隔兩邊的隔板再移除，變成一個足夠寬敞的會議廳。

員工內網與數據中心

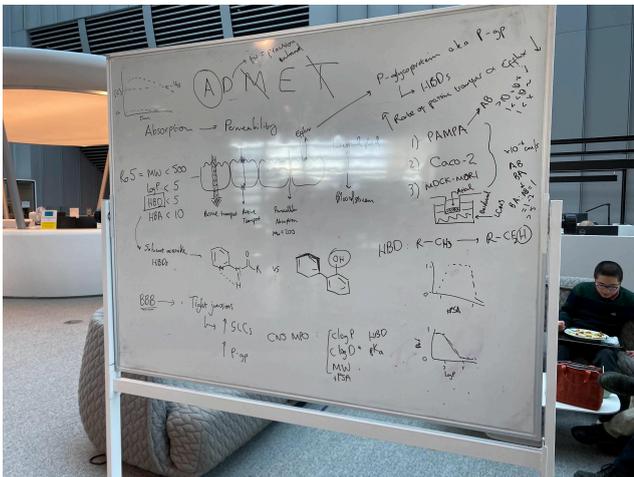
研究所內設有一個專業線上資源中心，提供最新的科學期刊與數據資源，並配備高效能計算中心，以支持生物資訊學與大數據分析研究；同時，機構內各項研究設施的使用時段，開放給所有人預定，以最佳化共同實驗儀器的使用效率。使用者付費，是歐洲人深植內心的觀念，因此，預定某時段的共同儀器，該實驗室是需要被紀錄費用的，並且從各實驗室的預算扣款，實驗使用與款項都公開讓所有人檢視。除了讓研究者方便分配時間，同時也確保使用者只取用需要的時間範圍，避免浪費。

整體而言，The Francis Crick Institute 的內部環境融合了先進的研究設施與人性化的工作空間，為科學家提供了一個理想的科研與合作環境。

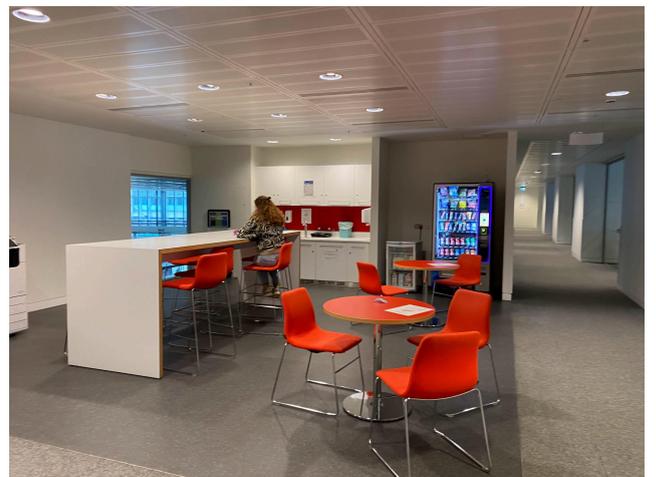
於此,提供一些機構內的照片



開放式的空間，提供研究者與鄰近團隊無界限的感覺，鼓勵各種討論，刺激新想法。



隨處可見白板，寫下想法，隨時討論；無盡的實驗室耗材補充，研究者無後顧之憂。



位於一樓入口大演講廳，以及教育中心，國家級研究機構也肩負重要教育責任。

四、進修過程

在這段學習歷程中，我接觸一些預期外的技術，有些技術在大學時跟的實驗室曾經做過，但是時日已久，本次接觸，讓我加深了某些記憶，也讓我在實驗操作的熟練度上獲得提升。同時，也有許多新的技術，百聞不如一見，終於親眼見到如何操作。

1. ELISA 分析 CGRP

在此學習過程中，我首先接觸到 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)，用來檢測降鈣素基因相關肽 (CGRP) 的表達量。目標樣本為細胞培養液 (cell culture supernatant)，主要目的是分析細胞在不同條件下的 CGRP 釋放量。在此，紀錄幾項觀摩的實驗或者技術。

(1) ELISA 實驗流程

準備 96 孔板，進行抗體包被。

加入標準品與樣本，並反應適當時間。

使用適當的酶標次級抗體，透過顯色反應進行檢測。

讀取 OD 值，進行數據分析。

ELISA 數據的準確性取決於標準曲線的建立，因此每次實驗時，我都特別關注標準品稀釋、抗體反應時間以及洗滌步驟的最佳化。

(2) 細胞培養 (Cell Culture) 與 PCR 技術:

無菌操作、細胞傳代 (passaging)

細胞冷凍與復甦 (cryopreservation & thawing)

2. PCR 實驗步驟

RNA 抽取，使用 TRIzol 方法。

逆轉錄 (reverse transcription)，合成 cDNA。

qPCR 進行定量，分析基因表達變化。

PCR 是我學習過程中的重要環節，從引物設計、樣本處理到數據解讀，都需要細緻的規劃與反覆優化。

3. Tissue Clearing (組織透明化) 技術: iDISCO protocol(後詳述)

研究腫瘤模型的肺與胰臟組織，在學習了 iDISCO 組織透明化技術，主要步驟包括：組織固定與梯度脫水 (MeOH serial dehydration)。

免疫標記 (Primary & Secondary Antibody Incubation)。

透明化處理 (Dichloromethane & Dibenzyl Ether)。

光片顯微鏡 (Light Sheet Microscopy) 成像。

這部分的技術，能夠以 3D 方式觀察腫瘤在組織中的分佈，最後，使用 Fiji (ImageJ) 進行影像分析。

4. 免疫螢光染色 (Immunofluorescence Staining, IF)

(1) IF 實驗學習內容

學習玻片處理與抗體染色技術。

(2) 分析 DAPI、標定特定蛋白質 (如 CGRP、Tubulin3)。

(3) 共軛焦顯微鏡 (Confocal Microscopy) 成像與影像後處理。

這個過程讓我了解螢光標記技術的應用，也觀察到背景螢光干擾的分析以及調控。

5. 石蠟切片樣本的脫蠟技術 (Dewaxing) (後詳細敘述)

在學習 IF 染色的過程中，我也接觸了石蠟樣本的脫蠟技術 (Dewaxing)，未來，希望用於處理已經固定的腫瘤組織切片

主要步驟

二甲苯 (Xylene) 清洗去除石蠟。

梯度酒精復水 (100% → 95% → 70%)。

抗原修復 (Unmasking) **以提升抗體辨識能力。

這項技術對於後續的免疫染色至關重要，確保抗原可以有效暴露給抗體進行標定。

6. 老鼠腫瘤模型研究：肺與胰臟的觀察

實驗者建立肺與胰臟腫瘤模型，進行組織取樣。

直接將腫瘤細胞打入腹腔、胰臟

氣管內注射 (IT, intratracheal injection) 誘發老鼠肺臟腫瘤模型

透過免疫染色與透明化技術觀察腫瘤微環境。

7. 厚切切片機與組織切片學習

在學習 tissue clearing 過程中，同時觀察厚切切片 (thick sectioning) 的操作。

在總院病理部，一般病理實驗室沒有專用的厚切切片機。

應用厚切切片技術於光片顯微鏡成像。

這部分的學習拓展了我對病理組織學與影像技術的認識。

8. 成像與影像分析 (Image Processing & Analysis)

在所有實驗技術的最後，我學習了 Fiji (ImageJ) 影像分析，用來處理 IF 染色、透明化成像 (iDISCO) 的影像。

這部分需要比較多的時間累積經驗，僅觀摩實驗者的如何操作複雜參數。

小節

這段期間，我接觸了 ELISA、細胞培養、PCR、組織透明化、免疫螢光染色、脫蠟技術等技術，幸運地，帶領我的研究人員，讓我參與大約一半的實際實驗操作，有點像是醫院的實習生，他做一步，我做一步，亦步亦趨，越做越多。透過實際操作，理解這些方法在操作中可能遇到的問題。我特別喜歡 tissue clearing 成像與影像分析，因為當初，就是對產生的影像讚嘆不已。它們讓我能夠直觀地看到組織內部結構，對腫瘤結構的想像，以及更進一步各種呼吸道疾病的理解。這些技能不僅拓展了我的研究視野，希望對未來的研究奠定基礎。

五、實驗方式建立

接下來，我仿照在Crick Institute學習的實驗方式，實際操作實驗的情形以及實驗操作時可能會遇到的關卡、以及曾經被提醒的訣竅和經驗，當然，還有包括某些安全部分的考量，例如有幾段可能需要加熱，切記穿著隔熱手套，因為真實地發生過研究人員燙傷；以及因為不預期的快速熱脹冷縮，而導致實驗玻璃容器龜裂分離，雖然可能很微小，但見微知著，防範未然。希望再次執行實驗時，我們的人員可以依靠已知的經驗，避開許多不必要的嘗試，使操作更接近成功實行。

因為是來自於筆記，以及實驗人員傳授給我的個人經驗，也許與方法有所差異，但相信只要能夠成功完成實驗，其實就是好的方法。

在此，我將三樣筆記留在這裡：免疫螢光染色；組織透明化技術；檢體脫蠟技術。

五(一)、免疫螢光染色 (Immunofluorescence, IF) 實驗流程

本實驗使用免疫螢光染色 (Immunofluorescence, IF) 技術，搭配冷凍切片 (cryosectioning)，透過共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 來觀察目標蛋白在組織內的表達與分佈。本技術可精確定位細胞內與細胞間的標靶蛋白，廣泛應用於生物醫學研究，如腫瘤學、神經科學與免疫學領域。

實驗流程可大致分為樣本準備 (sampling)、染色處理 (staining) 與顯微成像 (imaging) 三個部分。

1. 樣本處理 (Sampling)

(1) 樣本固定與冷凍切片

1. 組織取樣

- 取新鮮組織，立即放入 PBS (Phosphate Buffered Saline) 溶液內，以維持組織的生理狀態。
- 若需要長期保存，可直接將樣本包埋於 OCT (Optimal Cutting Temperature compound) 內，並於 -80°C 冷凍保存。

2. OCT 包埋與冷凍固定

- 將組織置於 OCT 中，使樣本完全浸沒並確保水平放置，避免傾斜影響切片效果。
- 調整樣本，使其最大平面朝下，確保切片時能獲得最佳視角。
- 樣本需維持在 2x2 cm 以內，以確保均勻冷凍與切片的穩定性。

3. 冷凍切片 (Cryosectioning)

- 設備：Leica CM3050 S 冷凍切片機，環境溫度設定為 -20°C。
- 切片厚度設定為 50 μ m，以確保足夠的結構完整性與螢光訊號強度。

- 修邊步驟：使用冷凍切片刀，先修整四周，形成八角形狀，減少不規則切割影響。
- 使用軟毛刷與鑷子（forceps）轉移切片至玻片，標記切片順序與位置，以便後續分析。

4. 切片乾燥

- 玻片置於室溫環境下乾燥至少 1 小時，確保組織固定良好，避免染色步驟時樣本脫落。

2. 免疫染色（Staining）

(1) 前處理步驟

1. PAP pen 標記區域

- 使用 PAP pen（免疫染色專用疏水筆）在玻片上標記樣本範圍，避免溶液擴散影響染色效果。
- 標記區域應保留適當距離，確保後續溶液能完全覆蓋樣本而不溢出。

2. Ammonium chloride (NH₄Cl) 處理

- 配製 0.133 g NH₄Cl 於 50 mL PBS，進行 10 分鐘 浸泡，以減少背景螢光干擾。
- 使用吸量管或吸水紙移除溶液，避免擦掉 PAP pen 標記區域。
- 為防止玻片乾燥，染色過程中可放置一杯水以維持濕度。

(2) Blocking（封閉非特異性結合）

1. 封閉溶液製備

- 15% donkey serum, 0.20% glycine, 2% BSA, 0.25% gelatine, 0.5% Triton X-100 in PBS。
- 計算所需體積，例如：8 片玻片 × 每片 300 μ L = 2400 μ L，預留少量餘裕配製 2500 μ L。

2. 反應條件

- 室溫反應 1 小時，確保密閉。

(3) Primary Antibody（初級抗體反應）

1. 抗體稀釋與反應條件

- 依據抗體 datasheet，通常使用 1:200 稀釋於 blocking solution 中。
- 4°C 過夜反應（overnight incubation），確保抗原抗體充分結合。
- 玻片應以鋁箔紙包覆，避免光照影響螢光標記穩定性。

(4) Secondary Antibody（次級抗體反應）

1. 清洗步驟
 - 進行 3 次 PBS 洗滌（每次 5-10 分鐘），確保移除未結合的初級抗體。
2. 次級抗體反應
 - 次級抗體通常 1:250 稀釋於 PBS，室溫浸泡 1 小時。
 - 選擇合適的螢光標記，例如：
 - Primary: Rabbit → Secondary: Goat Anti-Rabbit（589 nm, 橘色）。
 - 避免次級抗體沉澱，先以 15000 rpm 離心 5 分鐘，再取上清液使用。

(5) DAPI 染色

1. DAPI（細胞核染色）
 - 1:1000 稀釋於 PBS，反應 5 分鐘。
 - 過度染色可能導致螢光過亮，影響影像分析。
2. PBS 清洗
 - 進行 1 次 PBS 洗滌（10 分鐘），移除多餘 DAPI。

(6) Mounting 與封片

1. 在玻片上適量滴加 commercialized mounting medium，使用 coverslip 封裝。
2. 確保無氣泡產生，等待溶劑固定，即可進行成像。

3. 成像與影像分析（Imaging & Analysis）

(1) Confocal Microscopy 成像

- 選擇適當的螢光通道：
 - DAPI（細胞核）：405 nm（藍色）
 - Primary Antibody（Rabbit）：468 nm（紅色）
 - Secondary Antibody（Goat Anti-Rabbit）：589 nm（橘色）
- 設定 Z-stack 參數，獲取三維影像。

(2) 影像分析

- 使用 Fiji（Image）進行影像處理，如亮度調整、共定位分析等。

本實驗成功利用免疫螢光染色技術，標記目標蛋白並透過共軛焦顯微鏡進行高解析成像。此流程適用於生物醫學領域的蛋白質表達分析，為疾病機制研究提供有力工具。

五(二)、iDISCO 組織透明化 (Tissue Clearing) 實驗流程

iDISCO (Immunolabeling-enabled Three-Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs) 是一種基於溶劑透明化技術 (solvent-based tissue clearing) 的方法，適用於固定組織的透明化處理，並可搭配螢光免疫標記 (immunofluorescence labeling)，以光片顯微鏡 (light sheet microscopy) 進行高解析度三維影像分析。

本實驗主要應用於肺組織 (lung tissue) 的透明化處理，並透過抗體染色標記特定蛋白 (如 tubulin3) 來觀察其在組織內的分佈情況。整體流程涵蓋 組織前處理、抗體反應、透明化處理，最後進行 成像與影像分析。

1. 組織前處理 (Tissue Preparation)

(1) 組織採集與初步處理

1. 新鮮組織獲取：
 - 將新鮮肺組織放入 PBS (Phosphate Buffered Saline)，確保維持組織完整性與生理環境。
 - 樣本浸泡於 12 mL PBS (根據組織大小調整)，並放置於 Eppendorf 管內。
2. PBS 清洗 (去除血液與雜質)：
 - 每小時更換一次 PBS，總共 3 次 (共 3 小時)。
3. 水-甲醇 (MeOH) 系列脫水處理：
 - 按照不同濃度 MeOH-PBS 混合溶液 進行梯度處理：
 - 20% MeOH (10 mL MeOH + 40 mL PBS)
 - 40% MeOH (20 mL MeOH + 30 mL PBS)
 - 60% MeOH (30 mL MeOH + 20 mL PBS)
 - 80% MeOH (40 mL MeOH + 10 mL PBS)
 - 100% MeOH (純 MeOH)
 - 每個濃度反應 1 小時，最後在 100% MeOH 過夜反應 (overnight)。
4. 二氯甲烷 (DCM) 處理 (去除脂質，增加透明化效果)：
 - 新鮮 100% MeOH 替換 (1 小時)。
 - 66% DCM + 33% MeOH (30 mL DCM + 15 mL MeOH)，室溫下過夜旋轉浸泡 (overnight)。
 - 第二天檢查組織是否完全沉降，若浮起則可能有殘留氣泡影響透明度。

2. 組織漂白 (Bleaching)

1. 甲醇清洗（移除殘留 DCM）：
 - 2 次 100% MeOH 清洗（每次 1 小時），確保完全去除 DCM。
 - 第二次 MeOH 清洗後，樣本需存放於 4°C。
2. 過氧化氫（H₂O₂）漂白（降低自體螢光，提升染色對比度）：
 - 配製 5% H₂O₂ 溶液（10 mL 30% H₂O₂ + 50 mL MeOH）。
 - Eppendorf 管包鋁箔紙避光，4°C 恆溫反應 18~24 小時。
3. 梯度復水（甲醇-PBS 回復水合狀態）：
 - 依序更換 100% → 80% → 60% → 40% → 20% MeOH，每步驟 1 小時。
 - 最後置於 PBS 過夜（恢復水合狀態，準備進行抗體染色）。

3. 抗體標記（Immunolabeling）

(1) 通透處理（Permeabilization）

1. 初步通透溶液（PTx.2）處理（增加組織滲透性）：
 - 配製 PBS + 0.2% Triton X-100 + 0.02% NaN₃。
 - 室溫反應 1 小時 × 2 次（去除殘留雜質）。
2. 深度通透溶液（DMSO-Glycine）處理（增強抗體進入效率）：
 - 配製 80% PTx.2, 0.3M glycine, 20% DMSO。
 - 37°C 旋轉反應 2.5-3 天。

(2) 抗體反應

1. Blocking（封閉非特異性結合）：
 - 84% PTx.2, 6% donkey serum, 10% DMSO。
 - 37°C 旋轉浸泡 6 小時。
2. 初級抗體反應（Primary Antibody Incubation）：
 - PTwH + 5% DMSO + 3% donkey serum。
 - 1:200 稀釋 primary antibody，37°C 旋轉浸泡 3.5-4 天。
3. 次級抗體反應（Secondary Antibody Incubation）：
 - PTwH + 3% donkey serum（無 DMSO）。
 - 1:250 稀釋 secondary antibody，過濾（0.22 μm filter），37°C 旋轉浸泡 3.5-4 天。

4. 組織透明（Clearing）

(1) Embed in 0.9% Agarose

- Agarose 溶解於 100°C，冷卻至 40°C-45°C，將樣本置入其中，等待固化。

(2) MeOH-DCM-Dibenzyl Ether (DBE) 系列

1. 再次 MeOH 脫水 (20% → 40% → 60% → 80% → 100%)。
2. 66% DCM + 33% MeOH, 3 小時旋轉反應。
3. 100% DCM 洗滌 ×2 (30 分鐘)。
4. DBE 浸泡 (確保完全透明化), 此步驟需在通風櫃內進行 (因 DBE 氣味強烈)。

5. 成像與影像分析 (Imaging & Analysis)

1. 光片顯微鏡 (Light Sheet Microscopy) :
 - 可獲取完整 3D 組織影像, 類似 CT 影像重建。
2. 影像重組 (Imaris 軟體) :
 - 透過 tubulin3 染色, 可視化神經在肺組織內的分佈狀態。

本實驗透過 iDISCO 組織透明化技術, 成功實現肺組織的三維影像觀察, 提供高解析度的神經分佈分析。該技術適用於深層組織的螢光標記, 未來可應用於更多生物醫學研究領域, 如腫瘤微環境、神經迴路解析等。

五(三)、Dewaxing for Immunofluorescence (IF) 實驗流程

接著, 關乎檢體處理的前程的脫蠟技術

1. 實驗概述

石蠟包埋組織 (paraffin-embedded tissue) 需要先進行脫蠟 (dewaxing), 才能進一步進行免疫螢光染色 (immunofluorescence, IF)。本實驗描述了一種玻片上直接執行的脫蠟步驟, 使樣本能夠快速進入 IF 染色流程。本方法適用於薄切的組織切片 (通常厚度為 4-10 μm), 並透過化學試劑、加熱與抗原修復 (antigen retrieval) 來恢復目標抗原的可及性。

本流程涵蓋以下步驟:

1. 石蠟去除 (Dewaxing Step)
2. 梯度酒精脫水 (Rehydration Step)
3. 抗原修復 (Antigen Retrieval Step)
4. 冷卻與最終處理 (Cooling & Preparation for IF)

本實驗參考已發表的脫蠟方法，並根據設備條件進行調整，以優化樣本品質並提升 IF 染色的效果。

2. 石蠟去除 (Dewaxing Step)

(1) 主要試劑

- 二甲苯 (Xylene, C₈H₁₀)
- 二甲苯/酒精混合溶液 (Xylene/Ethanol, 1:1)
- 無水乙醇 (100% Ethanol)
- 95% 乙醇 (Ethanol)
- 70% 乙醇 (Ethanol)
- 蒸餾水 (d-H₂O)

(2) 操作步驟

1. 玻片放入二甲苯 (Xylene) 溶液
 - 三次 Xylene 洗滌，每次 15 分鐘，去除大部分石蠟。
 - 此步驟可在通風櫃 (fume hood) 內操作，以減少有機溶劑的影響。
2. 玻片轉入 Xylene/Ethanol (1:1) 溶液
 - 浸泡 5 分鐘，進一步去除殘留的石蠟。
3. 酒精梯度復水
 - 依照濃度遞減的方式，讓組織逐步恢復水合狀態：
 - 100% 乙醇，2 分鐘 x2 次
 - 95% 乙醇，2 分鐘 x2 次
 - 70% 乙醇，2 分鐘 x2 次
 - 蒸餾水 (d-H₂O)，2 分鐘 x2 次 (最多可泡 2 小時)

3. 抗原取回 (Antigen Retrieval Step)

目的：

石蠟處理與固定過程 (如福馬林固定) 可能導致抗原變性或被掩蔽，因此必須透過 抗原修復 (unmasking) 來提升抗體對目標抗原的辨識能力。

(1) 溶液配製

- Unmasking Solution (檸檬酸緩衝液，pH 6.0)
 - 3.6 mL 商業化抗原修復溶液
 - 400 mL 蒸餾水 (d-H₂O)
 - 調整 pH 至 6.0 (使用 pH 計測量並調整)

(2) 操作步驟

1. 玻片放入抗原修復溶液
 - 玻璃染色架（glass staining racks）內放入玻片，完全浸泡於 unmasking solution。
2. 微波加熱（Microwave Heating）
 - 置於微波爐內，以最大火力加熱 8 分鐘。
 - 關鍵觀察點：
 - 加熱至溶液沸騰後，持續 3 分鐘，確保抗原修復充分進行。
 - 若沸騰提前發生，可提前關閉微波爐。
3. 冷卻
 - 取出玻璃容器（注意戴隔熱手套，避免燙傷）。
 - 置於冰桶降溫，使溫度降至約 50°C（約 10-15 分鐘）。
 - 使用溫度計監測冷卻過程。
4. 二次加熱（Boiling Again）
 - 再次放入微波爐加熱至沸騰，維持 3 分鐘。
 - 確保抗原充分恢復，提高後續抗體辨識率。
5. 室溫冷卻（Cooling to Room Temperature）
 - 再次置於冰桶冷卻至室溫（約 30-45 分鐘）。
 - 玻片可繼續浸泡在 unmasking solution，最長不超過 2 小時。

4. 連接 IF 染色步驟（Connecting to IF Protocol）

(1) PBS 洗滌

- PBS 洗滌 ×2 次（每次 5-10 分鐘），移除殘留的抗原修復溶液。

(2) 進入免疫螢光染色（IF）

- 玻片經過完整脫蠟與抗原修復後，即可進入 IF 染色步驟（請參照 IF 染色實驗流程）。

5. 技術關鍵點與注意事項

(1) Xylene 處理的安全性

- Xylene 屬於有機溶劑，需在通風櫃內操作，避免吸入揮發氣體。
- 進行 Xylene 清洗時，可戴活性碳口罩以降低暴露風險。

(2) 抗原修復加熱的控制

- 微波加熱時間並非固定 8 分鐘，而是依據沸騰狀態來判斷。
- 避免過熱，否則可能會導致組織結構損壞。
- 玻璃容器可能因加熱膨脹破裂，務必小心搬運，並使用 耐高溫玻璃。

(3) 冷卻過程的穩定性

- 建議使用溫度計持續監測降溫狀況，確保溫度降至 50°C 或室溫。

(4) 玻片狀況監測

- 若玻片在 Xylene 清洗後仍有殘留石蠟，可能影響 IF 染色效果，可適當延長 Xylene 清洗時間。
- 若抗原修復後組織過度膨脹，可能代表修復時間過長，可適當縮短加熱時間。

本實驗成功建立 玻片上直接執行的脫蠟（dewaxing）步驟，有效去除石蠟，並透過 抗原修復（unmasking）恢復抗體對抗原的辨識能力。此方法適用於薄切的 石蠟包埋組織（paraffin-embedded tissue），能夠快速進入 免疫螢光染色（IF）步驟，提升後續成像效果與數據可靠性。

此技術廣泛應用於 癌症研究、組織病理學與生物醫學影像分析，並可進一步搭配 共軛焦顯微鏡（confocal microscopy）進行高解析度螢光標記觀察。

六、心得

在大約一個月中，我接觸到完全不同於醫院生活的日子，也接觸到許多基礎實驗的研究者，彼此年紀相仿，其實除了實驗除了理論，偶爾也交換一些不同文化的見聞以及思考。甚至，因為成長路程迥異，其實各自分享生活，與閒聊一些經驗，成為休息時間許多有趣話題的來源。

回歸到研究，也許，下一個時代會開啟腫瘤神經學的時代。

除了這篇在《Nature》期刊發表的關於腫瘤神經學的研究” Intrinsic electrical activity drives small-cell lung cancer progression”，陸續有研究員思考類似觀點，或許只是在不在同階段的路。腫瘤神經學研究，揭示腫瘤微環境中神經作用，可能改變我們對於腫瘤與神經支配角色的觀點，特別是在癌症進展過程中神經系統如何影響腫瘤的生長、轉移，甚至是可能影響治療反應。僅僅可能改變對癌症生物學的認知，也提供重新思考癌症治療的策略。也許三十年前，腫瘤的血液供應，是炙手可熱的話題；從腫瘤血液供應觀點，開啟許多藥物治療的方向。今日，也許我們也正站在十字路口，腫瘤的神經支配。先前，有許多關注腫瘤細胞本身的變化和治療；但現在，神經系統的角色被發現不可忽視，對於開發新的治療方法帶有啟發意義，也許成為接下來研究關注的焦點。

其實，在自己染色神經系統，並且真實透明化以造影以後，深感感動。

雖然是老鼠的肺臟，但是基本結構，與人體無異，我想像人類的肺臟，也應當如此。呼吸器官，特別是肺部的神經分佈，佈研究也給我帶來了不少啟發。肺部不僅僅是一個氣體交換的場所，還應當是一個神經密集的区域。這些神經系統，不僅僅涉足呼吸，還可能與肺部疾病的發展息息相關。其實，稍微想像，肺部的神經對於氣道反應、炎症反應及免疫系統的調節，也許或多或少有著直接或者間接影響。

了解了呼吸器官—尤其是肺部的神經分佈結構，讓我對神經系統與肺部疾病之間的關聯有了更多的想像，也許，許多目前治療瓶頸的部分，可以嘗試由神經支配的關店思考。這個想法，也許是錯的，但是這塊深具潛力讓人思考。我認為，新的觀點不僅限於癌症的研究，它們的應用也可以擴展到其他類型的肺部疾病研究中。舉例來說，利用神經影像學技術研究肺部的神經分佈，可能會幫助我們揭示COPD或氣喘等疾病的發病機制，甚至可能為這些疾病提供新的治療靶點。此外，通過調控肺部的神經系統，或許能夠改善呼吸道的炎症反應，達到減輕病症的效果。

整體而言，觀摩學習新的研究技術，使我更加深刻體會跨領域合作和技術刺激創新重要性。未來，無論是腫瘤學還是肺部疾病的研究，都可以從這些前沿的神經學技術中汲取靈感，開創新的研究方向和治療策略，這對病患的療效改善具有巨大的潛力。

七、建議事項

The Crick Institute作為一個所有資源集合中心的複合體,建立起非常方便的橫向連結資源,使人們集中精神,在思考如何創新一個想法;創造一種新的技術;建立一套新的實驗方法;甚至是剛建立起來的理論基礎,加諸於複雜的實驗環境,實現理論的價值。因為有如此的背景資源,在Crick實驗室的時間,很多時候不需要擔心資源的可近性,尋求同儕之間的支援非常方便。

進修,是希望帶來更新的經驗,使我們進步。反思臺大醫院,雖然沒有如英國傾國之力堆砌的資源,但是分散在各處的實驗能量,跨科部資源結合,有機會集結出非常類似的研究能量。

以下是我實際走訪,與相關人員討論而得到的構想;而實驗推導的基礎,來自於Crick參與與觀摩實驗的經驗,也許可以嘗試建立類似的操作模型,於總院的也做出相同的實驗,進而運用到更多的領域。

在開始討論前,提綱契領而言,實驗主軸就分三大部分;獲取組織、組織處理、影像處理。組織的獲取,在我們外科部而言算是相對容易,然而想要建構全部的條件,就需要面對組織處理與影像處理。

前面詳細提到的三種技術,主要多著重於組織處理層次。其中,脫蠟(Dewax)玻片處理較為普遍,也許只有實驗操作上的差異,病理部的老師與同仁都表示這項操作不困難,因此較不具有討論性。

組織透明化(Tissue Clearing)實驗與免疫螢光染色(Immunofluorescence)的技術難度不高,在總院共同實驗室都有能力進行處理,然而,關鍵在於影像處理。組織透明化需要搭配層光螢光顯微鏡(Light Sheet Fluorescence Microscopy, LSFM)協助蒐集影像,然而,此等顯微鏡為臺幣千萬等級的顯微鏡,截至報告繕寫之日,總院與校總區查無此等級的顯微鏡,最靠近的顯微鏡在中研院;操作起來時間空間與儀器成本都很高。

免疫螢光染色(Immunofluorescence)則是最適合應用於總院檢體的實驗方式。組織處理的困難度不大,在共同實驗室的儀器能夠處理所有步驟,然而,某些溶劑與藥劑是否具備,則是需要一一核對,或者採購,這部分技術上相對不困難。而影像處理所需要的共軛焦顯微(Confocal microscopy)成像技術,在總院二樓的第二共同研究室裡面,有完整的人員與儀器,會按照操作時間收取費用;雖然玻片的處理原則有所出入,採用玻片單次處理的檢體數量較少,但是增加使用玻片數量就能克服,影像的後續處理第二共研的人員也表示他們會協助。我們的構想是針對神經進行免疫螢光染色,對於組織裡面的神經分布有無進行觀察,或許可能建立不同腫瘤都充滿神經支配的證據。綜觀所有要素,免疫螢光染色的實驗能量,可以在總院湊齊。實際上執行起來的成效如何,需要一些機會操做與磨練。也許最後不一定會是完全依照別人的實驗方式,而是慢慢建立在總院能夠實現的研究方法。

最後,想像將上述兩項實驗組合起來;脫蠟與免疫螢光染色。兩種技術都可以在總院完成。而我們擁有龐大的病理蠟塊檢體,蘊藏了各種器官與各種癌症的檢體。原本的蠟塊檢體,無法進行免疫染色;經由脫蠟,可賦予檢體庫重新免疫染色的契機,大幅提升我們檢視在各種腫瘤神經支配的角色,搭配上免疫染色技術以及分析,可能

創建一大片研究題目的藍海。然而，因為需要橫跨不同科部，甚至可能跨院區支援研究資源，如何使得研究資源流動更順暢也將會是一項課題。

八、附錄

iDISCO 原protocol

iDISCO protocol

Week 1		Week 2		Week 3	
Monday	Wash 3x in PBS, at least 1 h each time, start water-MeOH series (20%-40%-60%...), leave in water-MeOH solution O/N	Monday	Transfer samples into the blocking solution (84% PTx-2, 6% donkey serum; 10% DMSO) and incubate at 37 °C while slowly rotating for 6 h; start incubation with primary antibodies in PTWH/5% DMSO/3% donkey serum at 37 °C while slowly rotating for ~3.5-4 days	Monday	cont.
Tuesday	Finish water-MeOH series (80%-100%-100%), chill the sample at 4 °C after the last 100% MeOH; incubate O/N with pre-chilled 66% DCM/33% MeOH at RT in Eppendorf tubes or glass vials	Tuesday	cont.	Tuesday	Wash for 24 h in PTWH at 37 °C in 5 mL Eppendorf tubes, making three or four solution changes, embed samples in 1% agarose and leave in PTWH O/N.
Wednesday	Check if samples sank; wash twice in 100% methanol at RT (x1 h); chill the sample at 4 °C after the last wash; bleach tissue with 5% H2O2 (1 volume of 30% H2O2 for 5 volumes of methanol, ice cold) at 4 °C in the dark until next morning (18-24 h)	Wednesday	cont.	Wednesday	Transfer samples to glass vials; start MeOH-water series (20%-40%-60%-80%-100%-100%) for 1 h each; leave O/N
Thursday	Start MeOH-water series (80%-60%-40%-20%), beginning from 80% MeOH at 4 °C and continue at RT; transfer to PBS and leave O/N	Thursday	cont.	Thursday	Finish PBS-MeOH series, if necessary (80%-100%-100%); incubate for 3 h 66% DCM/33% MeOH at RT in glass vials on a shaker; change the solution ~half-way through this period; incubate with 100% DCM 2x 30 min at RT on a shaker; transfer tissue to clean tubes and fill them to the rim with dibenzyl ether (change the solution once after 1 h); keep in dibenzyl ether until imaging
Friday	Wash in PBS/0.2% Triton X-100/0.02% Na3PTx-2 for 1 h twice at RT; transfer samples to the permeabilisation solution (80% PTx-2, 0.3 M glycine, 20% DMSO in PBS) and incubate at 37 °C while slowly rotating for ~2.5-3 days	Friday	Wash samples in PTWH at 37 °C while slowly rotating for 6 h; prepare secondary Ab solution in PTWH/3% donkey serum (no DMSO) and filter it through a 0.22 µm filter; start incubation with secondary antibodies at 37 °C while slowly rotating for ~3.5-4 days	Friday	
Saturday	cont.	Saturday	cont.	Saturday	
Sunday	cont.	Sunday	cont.	Sunday	

Centrifuge
Down 5,000 rpm
8.15 min

PTx
100 ml PBS 0.1% Triton X-100
2.82 g
2.5 ml of PTx-2
1 ml of 1:1000 (avoid growth)

參考資料:

1. <https://www.crick.ac.uk>
2. Peinado, P., Stazi, M., Ballabio, C. *et al.* Intrinsic electrical activity drives small-cell lung cancer progression. *Nature* (2025). <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08575-7>
3. Almagro, J., Messal, H.A., Zaw Thin, M. *et al.* Tissue clearing to examine tumour complexity in three dimensions. *Nat Rev Cancer* 21, 718–730 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00382-w>
4. Vieites-Prado A, Renier N. Tissue clearing and 3D imaging in developmental biology. *Development*. 2021 Sep 15;148(18):dev199369. doi: 10.1242/dev.199369. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34596666; PMCID: PMC8497915.
5. iScript™ cDNA Synthesis Kit <https://www.bio-rad.com/en-tw/product/iscrypt-cdna-synthesis-kit?ID=M87EWZESH>
6. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:299-311. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_26. PMID: 30539454; PMCID: PMC6918834.