

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

發展流動注入分析法偵測酵母菌的細胞活性

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2113-M-040-002-
執行期間：103年08月01日至104年12月31日
執行單位：中山醫學大學醫學應用化學系(含碩士班)

計畫主持人：蔡惠燕

計畫參與人員：大專生-兼任助理人員：呂亦暄
大專生-兼任助理人員：廖奐瑄
大專生-兼任助理人員：謝誌中

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 105 年 02 月 19 日

中文摘要：本計畫雖是103年度 8月開始的計畫，但在102年12 撰寫完成送出即開始執行，幸運地在本研究室既有的細胞培養與電化學核心技術的整合，順利的完成既定目標，並在原有預算下完成另一細胞活性測試方法之探討。

Part I: 流動注射分析結合光學吸收與電化學氧化方法偵測酵母菌的細胞活性

近年來有越來越多的文獻，報導利用電化學方法偵測細胞活性，本研究利用雙介質(mediators)方法，親油性介質可進出細胞，當細胞進行呼吸作用時將其還原，被還原的親油性介質擴散到細胞外與親水性介質(如赤血鹽)反應，使赤血鹽還原成黃血鹽，再透過流動注射分析(FIA)結合光學吸收與電化學氧化方法同時偵測赤血鹽吸收度的減少及生成的黃血鹽氧化訊號的增加，以偵測酵母菌的細胞活性，二者訊號皮爾森相關係數(pearson correlation)為-0.99，表二者呈高度高度負相關。此系統之電化學偵測極限約為 7.9×10^6 yeasts/ml，光學偵測極限為 1.6×10^7 yeasts/ml。利用電化學方法及光學偵測所得結果計算醋酸對酵母菌活性的半抑制量(IC₅₀) 分別是8.32 g/L 及 8.89 g/L，此結果與Zhao等人所報告的 8.5 g/L 一致。此系統透過赤血鹽光學吸收度的減少驗證電化學氧化信號的增加是來自細胞轉化赤血鹽所生成的黃血鹽，避免本身具電化學活性或光學吸收之測試藥物造成單一信號變化而誤判藥物對細胞活性之影響。FIA系統所需樣品量少，介質與細胞反應時間短，可用來即時監測細胞活性。

Part II: 利用市售血糖儀快速檢測細胞活性

本研究探討使用一般糖尿病血糖儀來評估細胞生存力。以培養液中葡萄糖消耗量進行細胞存活率評估，並與MTT法測定結果比較。統計分析顯示，這兩種方法的結果是一致的。此方法適用於各種癌細胞系和上皮細胞系中的應用。血糖儀具有即時性分析、免校正曲線，免維護的特性。這個裝置檢測在培養基中的葡萄糖消耗，測試樣品為傳統細胞實驗的廢液，在藥物試驗過程可即時厚德藥物效能或毒性，細胞可用來進一步探討藥物作用機制。因此是一種簡便且具經濟效益之替代工具。

中文關鍵詞：細胞活性， 酵母菌， 電化學分析， 流動注射分析， 血糖儀

英文摘要：We have successfully completed the proposed goals, and explored other methods of cell activity tests under the existing budget. Two parts of research were summarized as followings:

First part of the study established a flow injection analysis system coupled with optical and electrochemical detectors for assessing yeast viabilities. The highly negative Pearson correlation (-0.99) of optical absorbance and oxidation currents confirmed that the cell metabolism

converted ferricyanide into ferrocyanide, thus the optical absorbance of ferricyanide decreased and the oxidation currents of ferrocyanide increased. Yeasts were cultured with the electrochemical mediators of 1.0 mM ferricyanide and 0.2 mM menadione for 10 min. The detection limits were 7.9×10^6 yeasts / ml and 1.6×10^7 yeasts / ml for electrochemical method and optical method, respectively. The IC₅₀ of cytotoxic effect of acetic acid on yeasts was 8.32 g / L and 8.89 g / L estimated from electrochemical and optical results. These results were comparable to 8.5 g / L reported by Zhao et. al. Screen printing carbon electrodes were used in this study, thus there is no need of polishing process. The reaction is fast compared to conventional MTT assay, thus the real-time monitoring of cell activity is possible. The FIA system required less amount of sample, provided two kinds of signals simultaneously and could avoid false interpretation.

Second part of the study explored to assess cell viability using a general diabetes blood glucose meter. Cell viabilities were assessed on the basis of glucose consumption and compared with those measured using a MTT assay. The statistical analysis showed the consistency of the results of two methods. Cell viability assessments on the basis of the glucose consumption in the culture medium are suitable for applications of various cancer cell lines and epithelial cell lines. The blood glucometer meets the needs of instant viability assessment during cell culture with calibration-free, and maintenance-free. This device detected the cell viability on the basis of the glucose consumption in the culture medium. It is economical and the cultured cells can be used for further mechanism study of drug effects.

英文關鍵詞：Flow injection analysis, optical detector, electrochemical detector, yeast viability, glucose analysis, cell viability, blood glucometer

本計畫雖是103年度8月開始的計畫，但在102年12月撰寫完成送出即開始執行，幸運地在本研究室既有的細胞培養與電化學核心技術的整合，順利的完成既定目標，並在原有預算下完成另一細胞活性測試之探討，

Part I: 流動注射分析結合光學吸收與電化學氧化方法偵測酵母菌的細胞活性

Part II: 利用市售血糖儀快速檢測細胞活性

二個主題成果均已順利發表出刊。此報告將依兩份論文分別呈現。

Part I 流動注射分析結合光學吸收與電化學氧化方法偵測酵母菌的細胞活性

一、前言

細胞實驗(cell-based assay) 是目前探討物質毒性或抗癌藥物篩選使用最廣泛的實驗模式(model)，釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)與同為真核生物的動物和植物細胞具有很多相同的結構及相似之轉譯後修飾作用¹⁻³，而且生長快速，容易繁殖，所以酵母菌常被用作研究真核生物的模式生物。在生化領域中，細胞活性偵測常用染劑與 adenosine-triphosphate(ATP)、Nicotiamide Adenine Dinucleotide(NADH)或粒腺體的脫氫酵素 (dehydrogenase) 作用將染劑轉換進而產生螢光或其它顏色，再以螢光顯微鏡或光譜儀偵測其吸收度，以評估細胞活性 (viability)。

細胞中的主要代謝途徑都涉及氧化還原反應，在代謝循環過程中氧化還原態間組成特定氧化還原對，這些代謝的產物濃度可藉由氧化還原對(如 NAD^+/NADH)的變化間接測得。 NADH 氧化酶控制眾多的生物過程，包括代謝、衰老、癌化和死亡，所以 NAD^+/NADH 的氧化還原狀態被認為是細胞新陳代謝的控制因子。而目前探討物質毒性或生物相容性 in-vitro 的實驗結果與 in-vivo 未必一致，導致錯誤結論的因素除了不可避免的動物體代謝與細胞培養代謝差異，尚有一些是實驗藥品交互作用的問題，如奈米物質可能干擾一般用來測細胞活性(cell viability) 或粒線體功能 (mitochondrial function)的染劑信號之讀取。

Monteiro-Riviere 等人的研究發現傳統使用之染劑如

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) 因奈米物質吸附此染劑或粒線體代謝之產物而造成錯誤之評估⁴。Laaksonen 等人則認為自發性的氧化還原反應使得 MTT 無法用來測 mesoporous silicon microparticles 的毒性，因在顆粒表面 MTT 會被還原⁵。

近年來越來越多的文獻報導，利用電化學方法偵測細胞活性，電化學方法主要是利用細胞進行呼吸作用時，電子傳遞可將電化學介質(mediator)氧化或還原，再利用電化學方法測其產物，其信號大小與細胞活性呈正相關，藉以評估細胞之存活率⁶⁻¹⁶。1990年 Mayer 等人以 2,6-dichlorophenolindophenol(DICP) 當介質，利用安培法測不同抑制劑(inhibitor)對細胞代謝之影響⁶。其原理是利用細胞進行呼吸作用時可把 DICP 還原，再利用安培法測還原態的 DCIP，間接比較細胞代謝速度，但在氧氣存在下，還原態的 DCIP 會被氧氣再度氧化，必須加入 KCN 抑制氧分子的電子傳遞，而 KCN 會危害實驗操作者的健康且目前是毒性管制藥品。所以近年來電化學分析方法主要是透過雙介質系統(親油性和親水性介質)檢測細胞內的氧化還原活性。親水性介質以赤血鹽為主，因為細胞膜為磷酸雙脂層，親水性的赤血鹽無法自由進出，所以實驗中常用脂溶性的甲萘醌

(menadione 又稱維生素 K₃)當作親油性介質，其可進出細胞膜傳遞細胞內電子到細胞外，還原赤血鹽，可能之作用機制及偵測原理如圖 1 所示⁷。因此利用電化學介質間接測定細胞活性是在電極施加電位將被細胞代謝過程間接還原生成的黃血鹽氧化，將所得電流信號推算細胞活性或藥物對細胞之毒性。

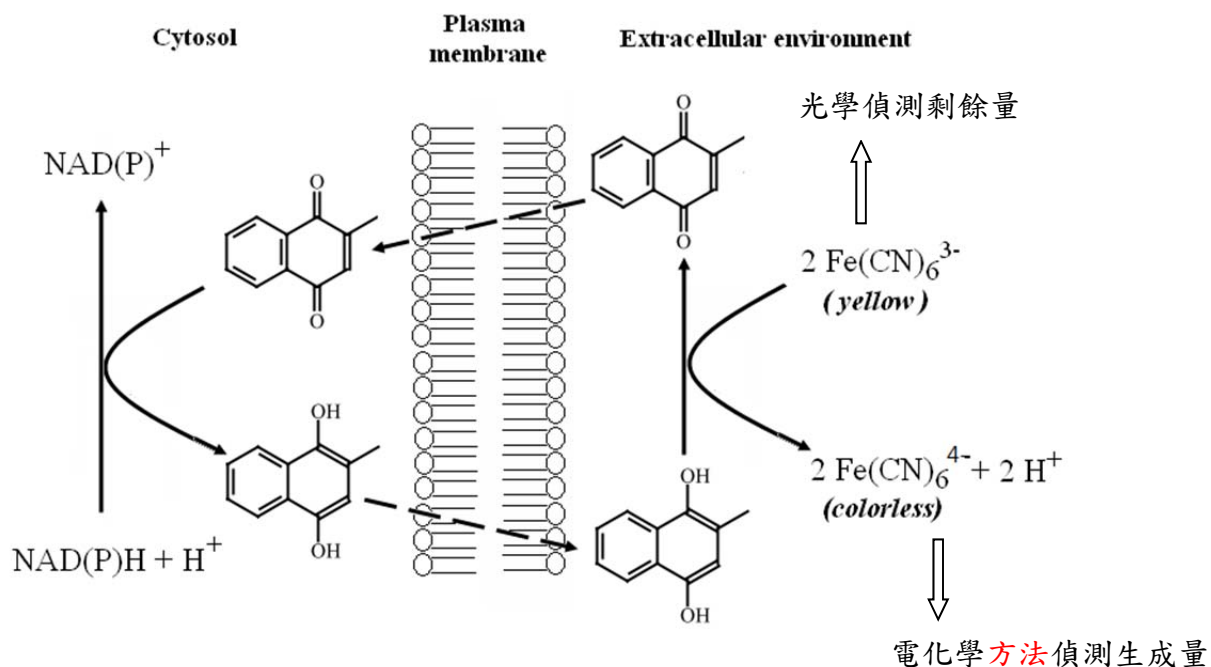


圖 1 利用親油性(menadione)和親水性(ferricyanide)雙介質電化學方法與光學偵測細胞活性原理示意圖

近幾年我們亦利用此原理開發電化學方法偵測癌細胞¹⁷及老鼠初代正常肝細胞¹⁸活性的測量，我們發現 menadione 在癌細胞實驗是一個很好的介質，但對正常初代肝細胞而言則會產生不可忽略的毒性，而不適合當介質。另一發現則是所要篩選之藥物(抑制癌細胞或藥物毒性測試之藥品)具備電化學活性且在偵測黃血鹽所使用的電位可被氧化，則會造成信號干擾，如探討 acetaminophen 對肝細胞之毒性，因 acetaminophen 本身氧化，濃度愈高，信號越大，會造成 acetaminophen 對肝細胞有促進活性之假象，對貼附性生長的動物細胞而言，可以先對細胞作清洗即可將測試藥品移除解除此干擾，但對懸浮性生長之酵母菌，清洗後需做離心才能完全移除清洗液，離心可能對酵母菌產生壓力(stress)¹⁹，而影響後續轉化赤血鹽之能力，進而影響活性偵測的正確性，因此本研究開發流動注射分析(flow injection analysis, FIA)系統串聯了光學和電化學分析偵測器，此方法可以快速分析樣品，在短時間內即可完成兩種偵測方法的定量實驗，可以快速、即時地偵測酵母菌細胞的活性及藥品(如醋酸、磁性奈米顆粒)對細胞活性的影響，透過赤血鹽光學吸收度的減少驗證電化學氧化信號的增加是來自細胞轉化赤血鹽所生成的黃血鹽，避免本身具電化學活性或光學吸收之測試藥物造成單一信號變化而誤判藥物對細胞活性之影響。

二、實驗方法與儀器設備

2.1 樣品與試劑

a. 酵母菌(天然酵母+乳化劑,Angel 安琪酵母股份有限公司)

- b. 麥芽萃取液(MALT EXTRACT R2 ; ST BIO)
- c. 赤血鹽(Potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$, SIGMA)
- d. 黃血鹽(Potassium hexacyanoferrate(II), $K_4Fe(CN)_6$, SIGMA)
- e. 維生素 K3 (Menadione, SIGMA)
- f. 磷酸二氫鉀 (Potassium *di*-Hydrogen Phosphate, KH_2PO_4 , Panreac)
- g. 氯化鈉 (Sodium chloride, NaCl, SIGMA)

2.2 儀器設備

- a. 網版印刷碳電極 (Zensor R&D Co., LTD, SE 100 Working Diameter/Area : 5 mm / $0.196cm^2$)
- b. Ag/AgCl 參考電極 (佳佑企業)
- c. 不銹鋼管當輔助電極
- d. 超微型電化學分析儀 (Emstat)
- e. 液相層析幫浦及光學偵測器(HP 1100)
- f. 電化學偵測流動槽(Flow cell of electrochemical detection (Zensor R&D Co., LTD)
- g. 微盤讀取儀(BIO-RAD Model 550)
- h. 顯微鏡(Nikon ECLIPSE E400)
- i. 細胞計數板(BOECO Germany , deep 1/10mm)

2.3 實驗方法

本實驗首先進行偵測條件最適化探討，然後探討醋酸對酵母菌生長之影響以驗證方法之可行性。圖 2 為分析系統儀器組裝示意圖。

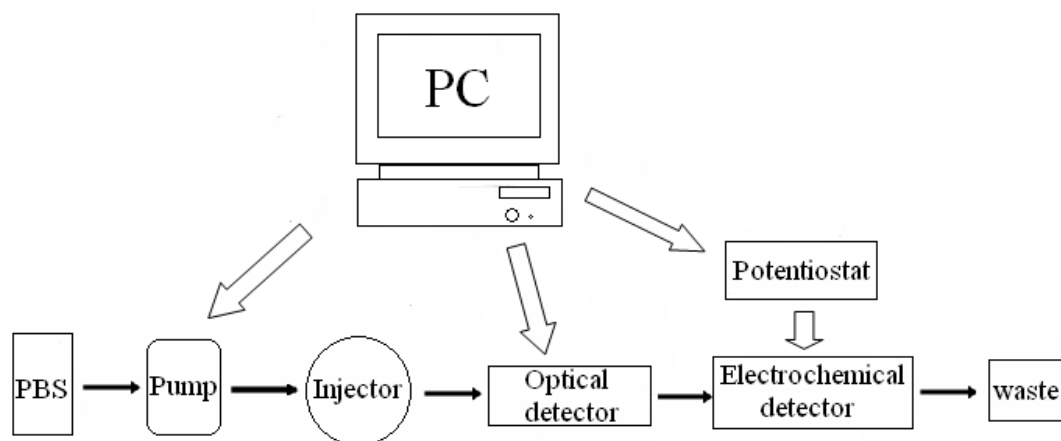


圖 2 實驗儀器組裝示意圖

2.4 細胞數計算

酵母菌在對數生長期(exponential phase)約 30-90 min 增生一次，為了避免計數法較耗時，且可能因細胞短時間內增生，於計數過程中產生總數上的誤差；我們在配製好酵母菌溶液馬上進行計數(此時酵母菌尚在延滯期，有關酵母菌生長詳見 3.3 酵母菌活性測試)，並利用顆粒可散光的原理測光線通過酵母菌溶液之後的吸收信號，儀器所讀之吸收值

並非真正的吸收而是散光度，一般用 optical density (OD) 來表示。此測量之波長只要顆粒粒徑比波長大即可產生散射(酵母菌細胞直徑大約 10 μ m)，但要避免培養液本身對光的吸收，本實驗所用培養液在 500 nm 以上即沒有明顯的吸收，配合本研究室微盤讀取儀的裝備，選擇 595 nm 測 OD 值。OD 值在 0.5 以下時，OD 與細胞濃有非常好的線性關係 ($R^2=0.9999$)。藉由「直接計數法」，在顯微鏡下計算九宮格內酵母菌細胞數，測定四種濃度 (OD 在 0.5~0.05 之間)之細胞數量，顯微鏡放大倍率為目鏡 10X、物鏡 40X，進一步換算求得細胞數目，與 OD 值作圖，其線性方程式為 $y=6.6 \times 10^8 \text{ OD} - 5.3 \times 10^6$ ， $R^2=0.9986$ ，本實驗之後的細胞數均是將酵母菌溶液利用微盤讀取器測其 OD，再帶入此公式換算所得。

2.5 細胞培養及偵測方式

取酵母菌分散於麥芽萃取液配製成 0.006 g/ml，放置 30°C 培養箱並以 200 rpm 平面震盪方式培養，當培養時間到則由 stock solution 抽出部分溶液，吸取 200 μ l 混合溶液至微盤中，以微盤讀取器(microplate reader)設定 595nm 波長測 OD 值及利用細胞計數器數細胞數(之後可由 OD 與細胞數關係曲線換算實驗細胞數)，細胞分管後添加電化學介質(赤血鹽及維生素 K3)，放置 30°C 培養箱再培養 10min，將培養液以 13mm 0.22 μ m Mixed cellulose(CA-CN)小飛碟過濾，注射 25 μ l 過濾液進 FIA 系統，先進行光學吸收(420nm)偵測，再至電化學的流動槽進行偵測 ($E=0.55\text{V vs. Ag/AgCl}$)。赤血鹽在 420 nm 有吸收峰，而黃血鹽在此波長並無明顯吸收，因此光學偵測器設定波長為 420 nm。

三、結果與討論

3.1 偵測條件最適化探討

3.1.1 電化學偵測(electrochemical detection) 最佳電位

本研究利用酵母菌呼吸作用將赤血鹽轉化成黃血鹽的量間接測定細胞活性，所以電化學偵測器目的測定黃血鹽的氧化訊號，首先利用 10 μ M 黃血鹽探討電化學偵測器最佳電位，圖 3 為黃血鹽之流體動力學伏安圖 (hydrodynamic voltammogram)，施加的電位須達一定值才能使大部分的黃血鹽氧化，每一個電位都注射三次樣品，重複用三支不同電極測試，所以每個電位為 9 個數據知平均值，結果顯示施加電位達 0.55V 後電流達到擴散控制 (diffusion control) 之極限電流，但如果電位值越大相對溶液中的雜質易被高電壓氧化，不僅提高雜訊訊號，而且會使再現性變差，故以最大電流值且再現性佳者為最佳化條件。t-test 顯示 0.55V 和 0.60V 的電流信號沒顯著差異 ($p > 0.05$)，故選擇 0.55V 最佳偵測電位。

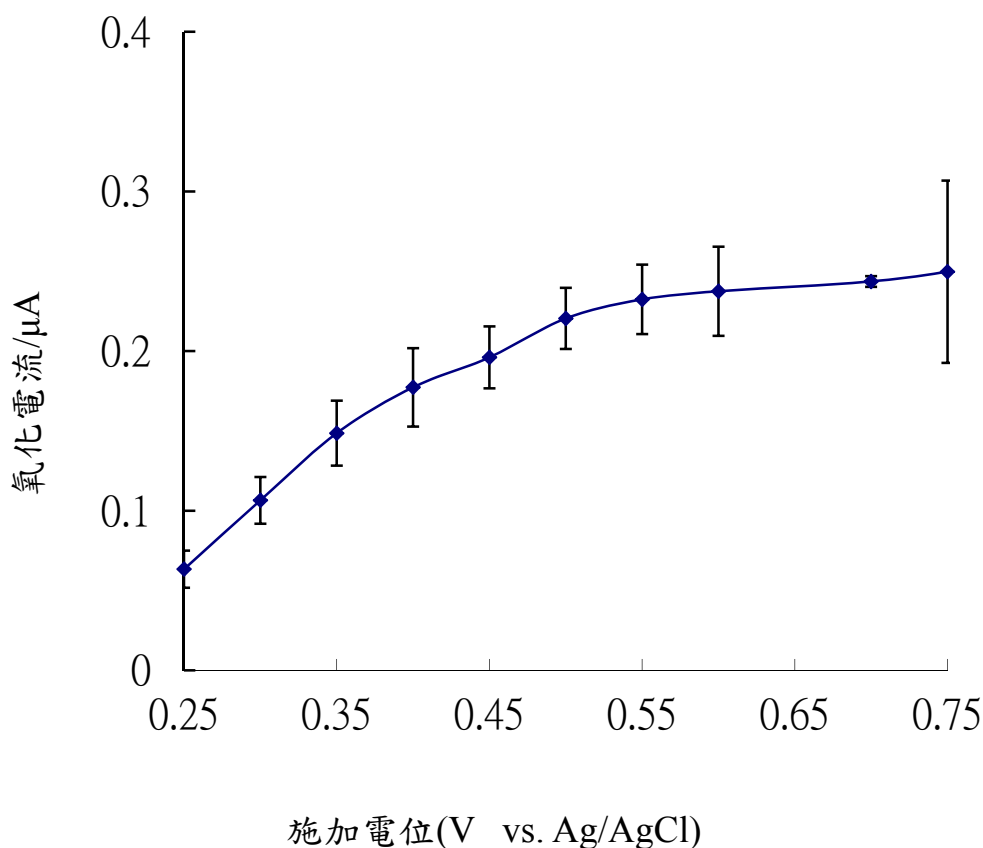


圖 3 黃血鹽之流體動力學伏安圖(hydrodynamic voltammogram)，流動相為 0.1 M 磷酸緩衝溶液(PB) pH=5.5，流速 1.0 ml/min，每一電位注射三次樣品(n=3)，重複做三支電極($N_{\text{electrode}}=3$)共 9 次信號之平均值與標準偏差。

3.1.2 流動注射分析最佳流速

分析物流經電極表面，因施加的電位使分析物產生氧化，然而流速會決定分析物在電極表面的停留時間，進而影響氧化物質的擴散產生不同的濃度極化現象，使施加的電位必須先克服部分的過電位，才能有效的氧化分析物，所以實驗中不同流速的氧化電流也不一致，故需依不同實驗條件及儀器作最佳電流的探討，圖 5 表示在定電位 0.55V 下，10 μM 黃血鹽的氧化電流訊號與不同流速的關係圖。可以看到當流速從 0.2 ml/min 開始增加，電流訊號會隨流速增加而變大，直到 0.8 ml/min 電流訊號達到最大值，之後，隨著流速再增加電流不再增加，甚至有下降趨勢，所以我們選用流速為 0.8 ml/min。

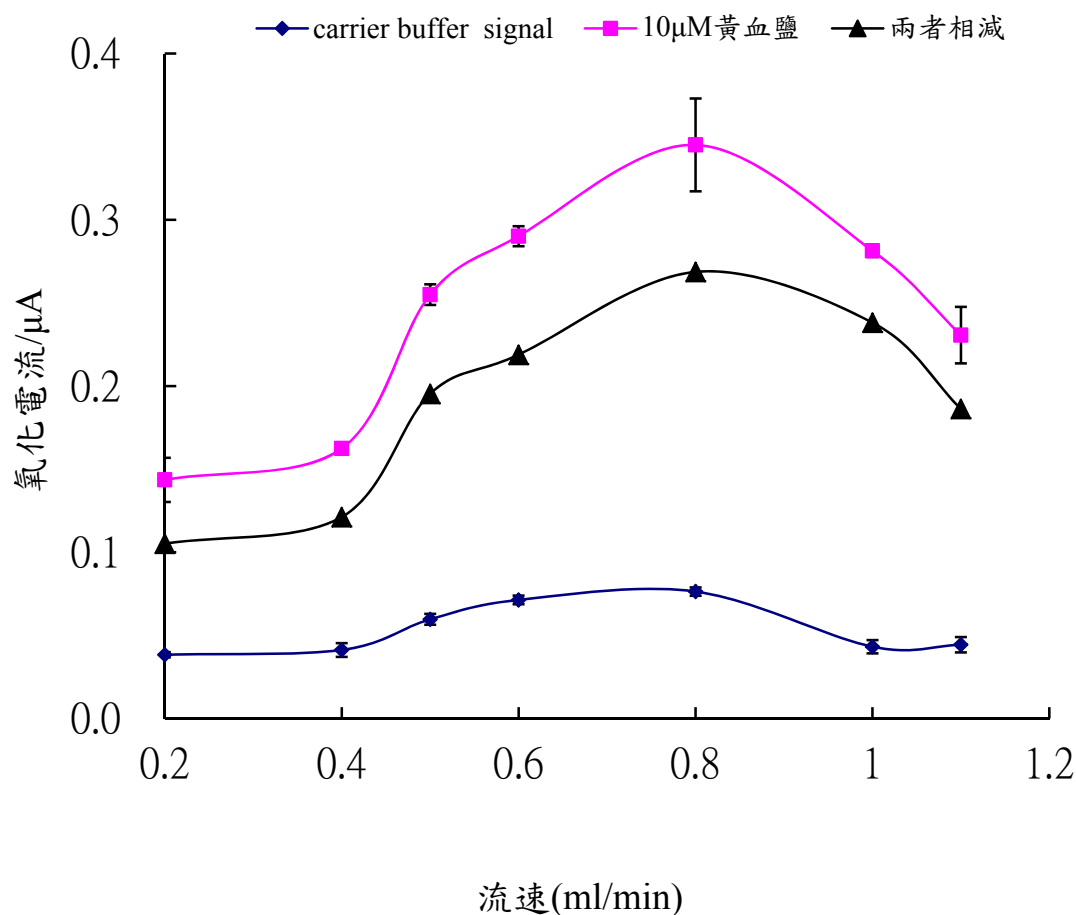


圖 4 不同流速對電流信號的影響(n=3)，流動相為 0.1 M PB，pH=5.5，電位為 0.55 V (vs. Ag/AgCl)

3.1.3 網版印刷碳電極(SPCE)在流動系統之持久性

流動式的電化學偵測槽，外接 Ag/AgCl 參考電極，並以不鏽鋼管直接當的輔助電極，工作電極是使用 SPCE，SPCE 的電極表面只利用碳膠刷製而成，在流動式系統下，可能會被沖刷掉或是附著分析物的情形，所以探討同 SPCE 電極在流動系統下的持久性，以確保信號的準確性是必要的。由上述結果流動式系統參數設定為流速 0.8 mL/min，電化學測定電位為 0.55 V，測試電極持續使用下對濃度範圍在 2.5-50.0 μM 黃血鹽的校正曲線之再現性及穩定性。

流動系統在提供電位後約 20 min 呈現穩定之基線 (baseline)，開始注入樣品，每一濃度之樣品三重複，不同濃度的樣品做完一循環其結果所得校正曲線稱為第一次，再重複循環一遍不同濃度之注射其結果所作校正曲線為第二次，圖 5 為三次循環之校正曲線，整個過程大約 1hr，單因子變異數分析結果顯示校正曲線無顯著差異(ANOVA, $P > 0.05$)，表示 SPCE 可在流動系統下連續偵測至少一個小

時，而且不同電極間的再現性佳。

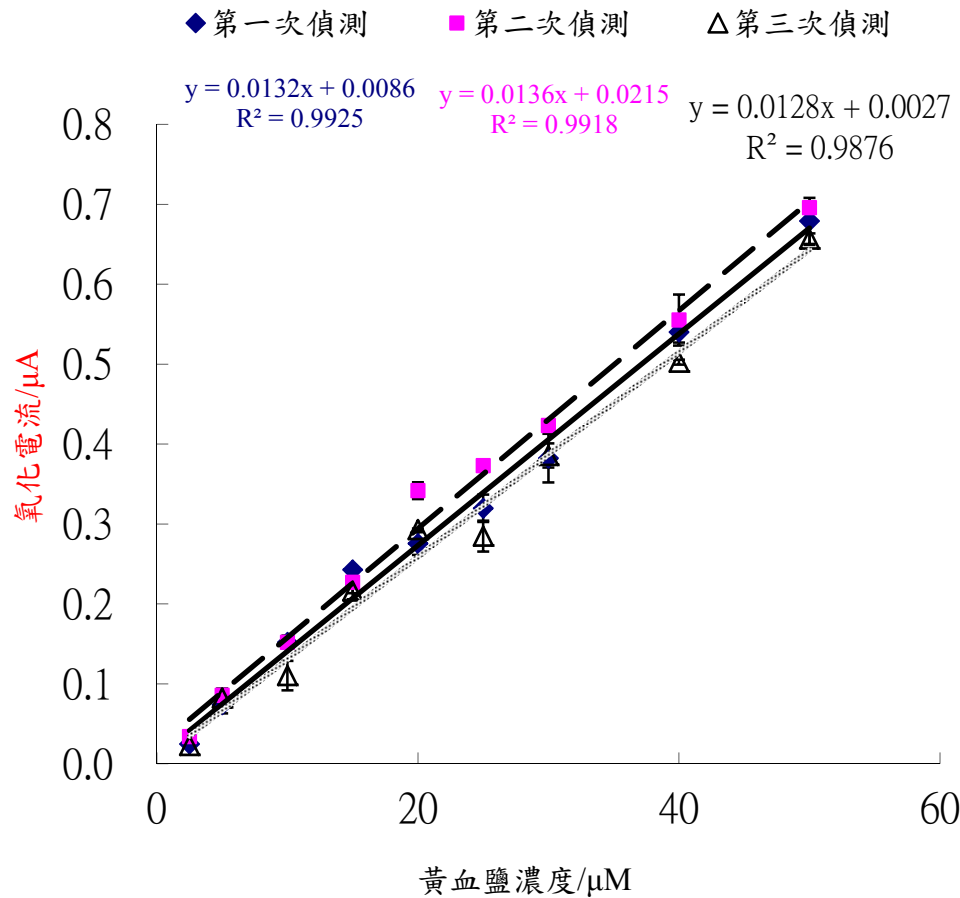


圖.5 網版印刷單電極持久性探討，流速 0.8 mL/min,電化學測定電位為 0.55 V，黃血鹽濃度範圍在 2.5-50.0 μM 。

3.2 模擬細胞將赤血鹽轉換成黃血鹽

根據先前本研究室開發電化學偵測細胞活性的結果，使用 5 mM 赤血鹽及 0.2 mM 維生素 K3 當介質，細胞呼吸作用將赤血鹽轉換成黃血鹽，故配製不同黃血鹽濃度代表不同細胞活性所生成的黃血鹽，每一溶液則維持其黃血鹽與赤血鹽濃度總合為 5mM，並添加 0.2 mM 維生素 K3，此實驗探討為確保在赤血鹽及黃血鹽混合的溶液中依然能準確偵測黃血鹽的氧化電流，並以光學偵測赤血鹽的減少量，圖 6 為黃血鹽與赤血鹽混合物之校正曲線。混合液中當黃血鹽濃度變大，赤血鹽濃度就小，所得之氧化電流與光學吸收信號與樣品中赤血鹽及黃血鹽含量一致。

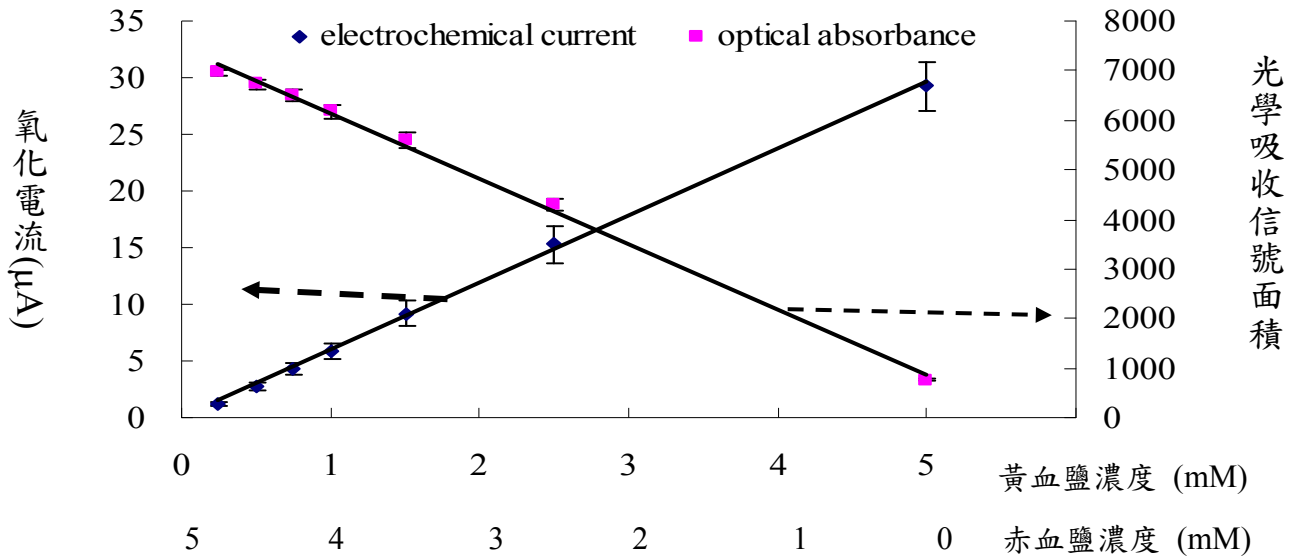


圖 6 模擬細胞轉換赤血鹽後培養液信號之變化，每一點信號為 18 次重複試驗之平均值與標準標差($N_{\text{electrode}}=6$ 、 $n=3$)，流動液(carrier) 為 pH5.5 PB，流速 0.8 mL/min，光學吸收波長為 420 nm，電化學偵測電位 0.55 V (vs. Ag/AgCl)

3.3 酵母菌活性測試

本實驗為避免蛋白質對 SPCE 吸附之毒害(electrode fouling),我們利用麥芽萃取液培養酵母菌，配製數管 0.006 g/ml 的酵母液培養在 30⁰C 的培養箱中，並做平面震盪，每小時取一管出來，測細胞數，然後加入電化學介質反應 10 min 後，進行 FIA 分析。酵母菌是真菌類(fungi)其生長週期可分為延滯期(lag)，對數生長期(exponential)，減慢與穩定期(decline and stationary) 及死亡與裂解期(cell death and lysis)²⁰，在最初延滯階段增長或細胞分裂的速度是很慢的，然後開始加速進入對數生長期，增長或細胞分裂例如在給定的時間內酵母菌的細胞 1 產生 2，2 產生 4，4 產生 8，8 產生 16 等；減慢及穩定期，其間細胞濃度或生物量沒有明顯變化，最後，死亡和裂解階段，細胞數量和/或生物量下降。我們所培養的酵母菌的生長曲線如圖 7 a 所示，在 1~5 小時屬延滯階段，6~12 小時屬對數生長期。圖 7b 為其代謝消耗赤血鹽及生成黃血鹽之關係圖。OD 乃測細胞濃度，其與電化學方法測得之黃血鹽生成量成高度正相關(pearson correlation=0.946)，而氧化電流與光學吸收信號成高度負相關(pearson correlation= -0.977)，表示電化學方法測得黃血鹽生成量是由赤血鹽所轉換而來的；而黃血鹽的生成與細胞量及活性有關。

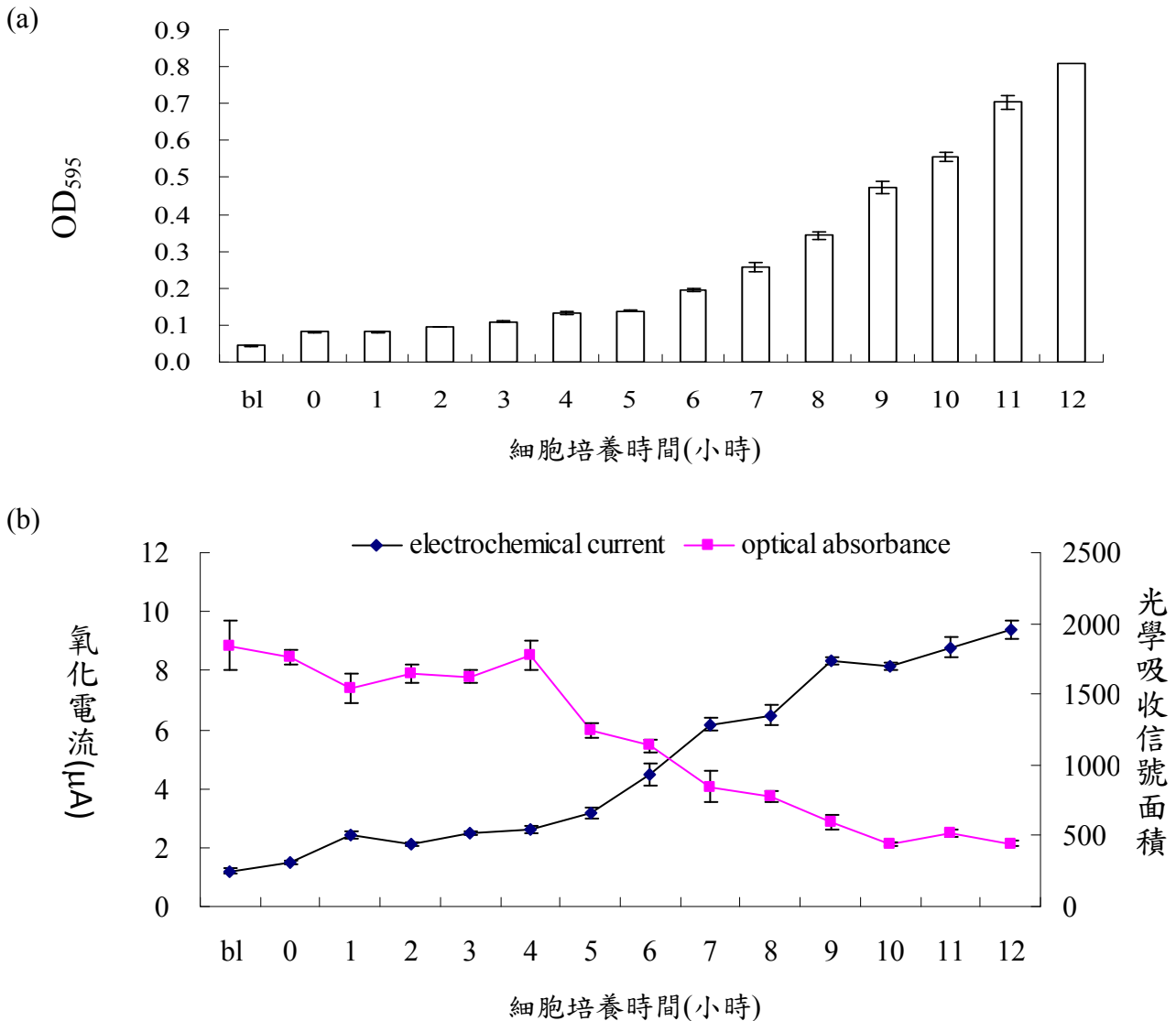


圖 7 (a) 細胞生長曲線—細胞濃度與培養時間關係圖 (b) 細胞代謝生成黃血鹽之氧化電流與消耗赤血鹽之光學吸收關係圖，偵測條件同圖 6。每一點的數據為細胞三重培養測得數據之平均值。

3.4 電化學介質最佳劑量探討

一開始我們嘗試只用赤血或赤血鹽加丁二酸(succinate)均無法獲得良好的信號，而赤血鹽加維生素 K3 (Vit K3) 則可提供良好的信號，此現象我們在先前的研究^{17,18}就已發現，因細胞膜(或細胞壁)組成不同，能穿透之介質會不同。進而探討 Vit K3 的最佳劑量，每管皆為 0.06mg/ml 的酵母菌，培養八小時後利用 OD 值換算其平均細胞數為 $(18.2 \pm 1.3) \times 10^7$ ，添加 5mM 赤血鹽及不同劑量的 Vit K3 反應 10 min 後，過濾培養液進行分析，圖 8 為氧化電流及光學吸收分析的結果，結果顯示 Vit K3 濃度越大，電流值增加，而吸收面積相對減少，直至 Vit K3 濃度為 0.2 mM 和 0.25mM 其結果利用 t-test 檢驗，無論是氧化信號或吸收信號均無顯著差異；利用 pearson 相關係數分析，光學吸收信號和電化學氧化信號有很好的負相關性(-0.99)，表示實驗結果於兩種方法的偵測是一致的，所以 Vit K3 之最佳劑量為 0.2 mM。

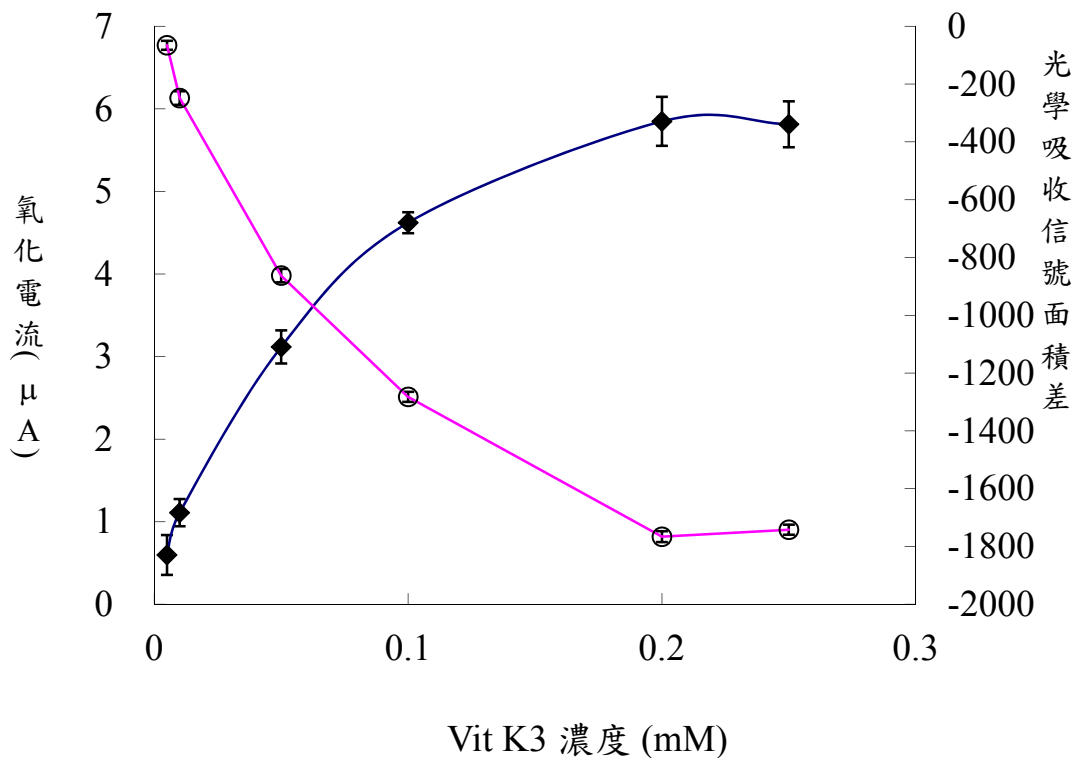


圖 8 維生素 K3 劑量與細胞對赤血鹽之轉換量關係圖，◆為氧化電流、○為光學吸收信號面積變化，所有信號均以維生素 K3 濃度為零的培養液為基礎，將其他濃度之信號減去維生素 K3 濃度為零的信號，每一點為三個樣品，每個樣品注射三重複之平均值。細胞培養八小時後加入 5 mM 赤血鹽及不同濃度的維生素 K3 培養 10min，過濾培養液。FIA 條件同圖 6。

接著探討赤血鹽之最佳劑量，將酵母菌培養八小時後分管稀釋，並測 OD 換算其細胞數（細胞數介於 $3 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^8$ ），各管添加 0.2 mM 維生素 K3，及不同濃度的赤血鹽。圖 9(a) 為不同赤血鹽濃度當介質，所得的氧化信號與細胞數之校正曲線，在 0.5 mM 赤血鹽的條件下細胞數大於 1×10^8 時，赤血鹽成為限量試劑 (limit reagent)，所以信號趨平。在赤血鹽濃度為 1.0 mM 和 5.0 mM 的條件下都有很好的線性 ($R^2 > 0.998$)；圖 9(b) 為光學信號之校正曲線，結果顯示於赤血鹽濃度為 1.0 mM 的條件下線性 ($R^2 = 0.9955$) 及再現性均較佳。

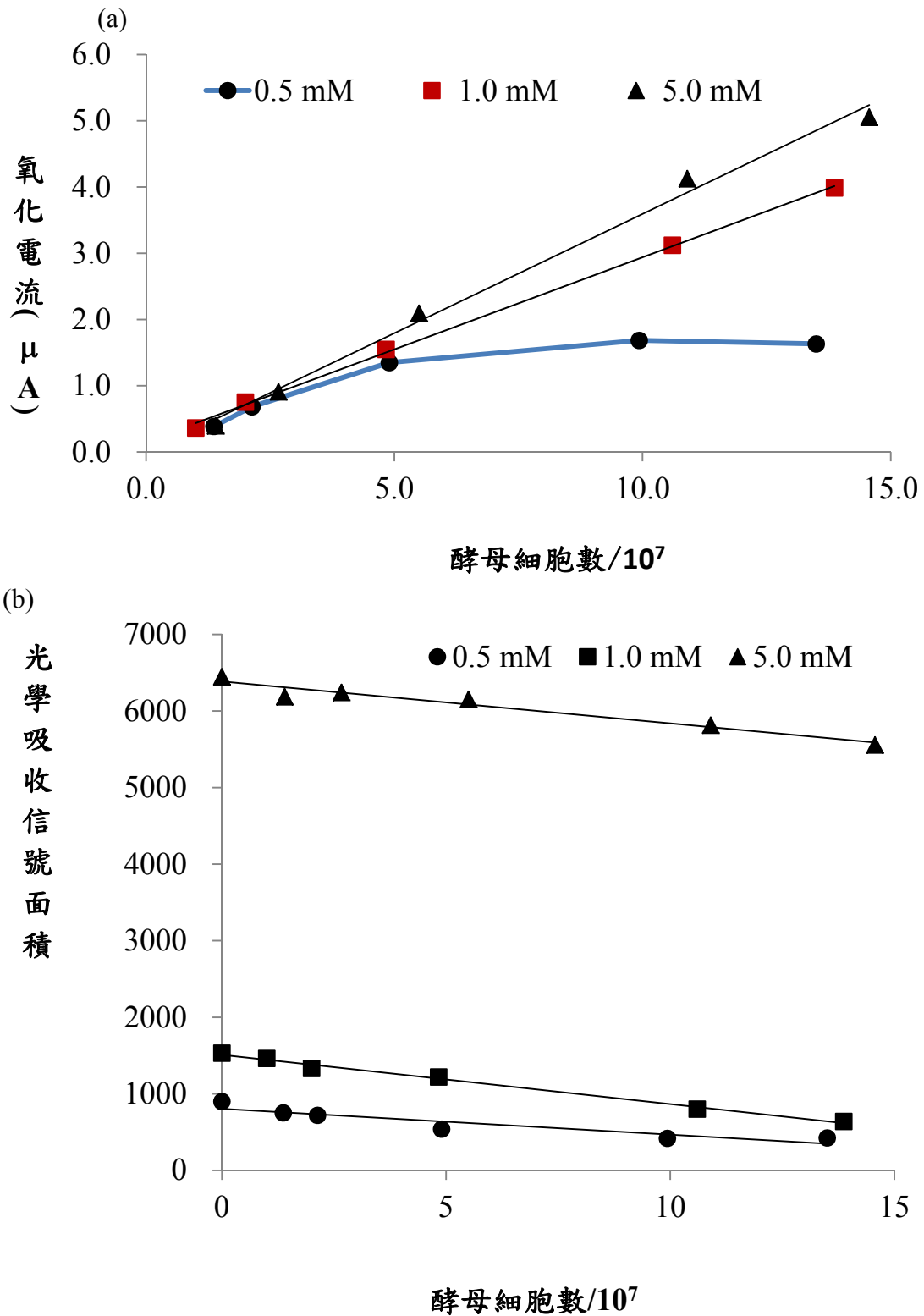


圖 9 不同赤血鹽濃度當介質的 (a)氧化信號及 (b)光學信號之細胞數校正曲線。酵母菌培養八小時後分管稀釋，並測 OD 換算其細胞數(細胞數介於 $3 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^8$)，各管添加 0.2 mM 維生素 K3，及不同劑量的赤血鹽濃度培養 10min，過濾培養液。FIA 條件同圖 6。氧化電流以含電化學介質但無細胞之培養為基準 (blank)，所有點的數據均減去 blank 信號。

3.5 細胞數偵測極限

圖 10 為偵測信號與細胞數之校正曲線，每一點數據為每濃度的樣品配製三重複，且用三支電極重複偵測之平均值與標準偏差($N_{\text{電極}}=3, n=3$)，根據 $S/N=3$ ， N 為 blank (無細胞之培養液加電化學介質) 之信號的標準偏差， S 為單位濃度偵測信號即校正曲線之斜率，此系統之電化學偵測極限約為 7.9×10^6 yeasts/ml，校正曲線為 $y=0.1638x + 0.0679$ ($R^2=0.9979$)；光學偵測極限為 1.6×10^7 yeasts/ml，校正曲線為 $y=-64.223x + 1622$ ($R^2=0.9829$)。

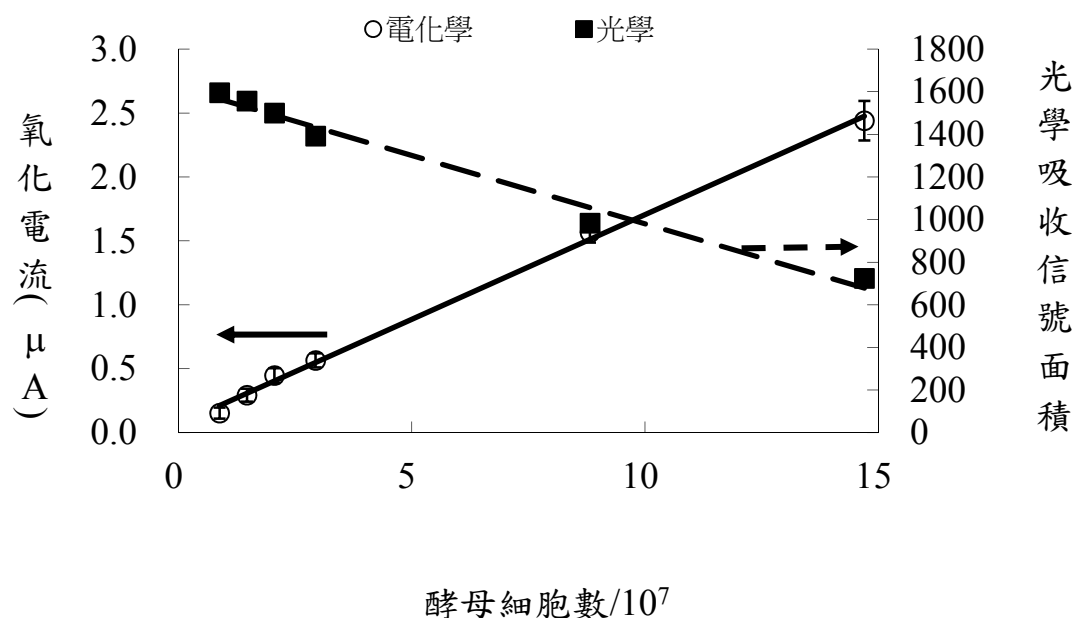


圖 10 酵母菌數與細胞代謝能力之校正曲線，偵測條件為添加 0.2 mM VitK3 及 1 mM 赤血鹽於酵母菌培養管中，繼續培養 10 min，然後過濾培養液，以 FIA 分析，流速 0.8 mL/min，電位設定 0.55 V (vs. Ag/AgCl)，光學偵測設定波長 420 nm。

3.6 應用可行性探討--醋酸對 yeast 的抑制效果

在自然界中，弱酸常存在水果和蔬菜中，使環境 pH 為 5.0 甚至更低來抑制細菌生長。最近弱酸如醋酸，丙酸，乳酸和山梨酸已被廣泛用作食品防腐劑，Jinsheng Zhao 等人所發表的論文中¹⁶，利用添加雙介質的氧化還原反應以微電極探討醋酸對細胞的抑制作用，並用螢光試劑驗證電化學測量結果的準確性。螢光物質是細胞活性測試常用的標示物，但藥品較為昂貴且不穩定，本研究希望透過光學信號證明電化學信號確實由細胞代謝轉化赤血鹽而來，因此探討醋酸對 yeast 的抑制效果，並與相關文獻做比對以驗證方法之可行性。將酵母菌培養 6 小時以後，分管加入不同劑量的醋酸 (另有一控制組不加醋酸)，繼續培養 5 小時，然後加入電化學介質再培養 10 min 後，過濾培養液做 FIA 分析。圖 11 為不同醋酸濃度對細胞活性之影響，縱軸為細胞相對活性，其計算方式如下

$$\text{Relative viability} = \frac{I - I_b}{I_c - I_b} \times 100\%$$

I 為實驗組電流信號， I_b 為空白試驗信號， I_c 為控制組電流信號， $I_c - I_b$ 或 $I - I_b$ 即為酵母菌轉化赤血鹽生成黃血鹽的量，控制組的轉化量視為 100% 活性。

$$\text{Relative viability} = \frac{A_b - A}{A_b - A_c} \times 100\%$$

A_b 為空白試驗信號，即電化學介質中赤血鹽之吸收度， A_c 為控制組吸收度，

A 為實驗組吸收度，Ab-Ac 或 Ab-A 即為酵母菌轉化赤血鹽所減少的吸收度，控制組的轉化量視為 100% 活性。實驗結果顯示兩種測量方法所得的活性 pearson 相關係數為 0.984，利用電化學及光學所得結果計算醋酸對酵母菌活性的半抑制量(IC_{50}) 分別是 8.32 g/L 及 8.89 g/L，此結果與 Zhao 等人所發表的結果 (8.5 g/L) 一致。

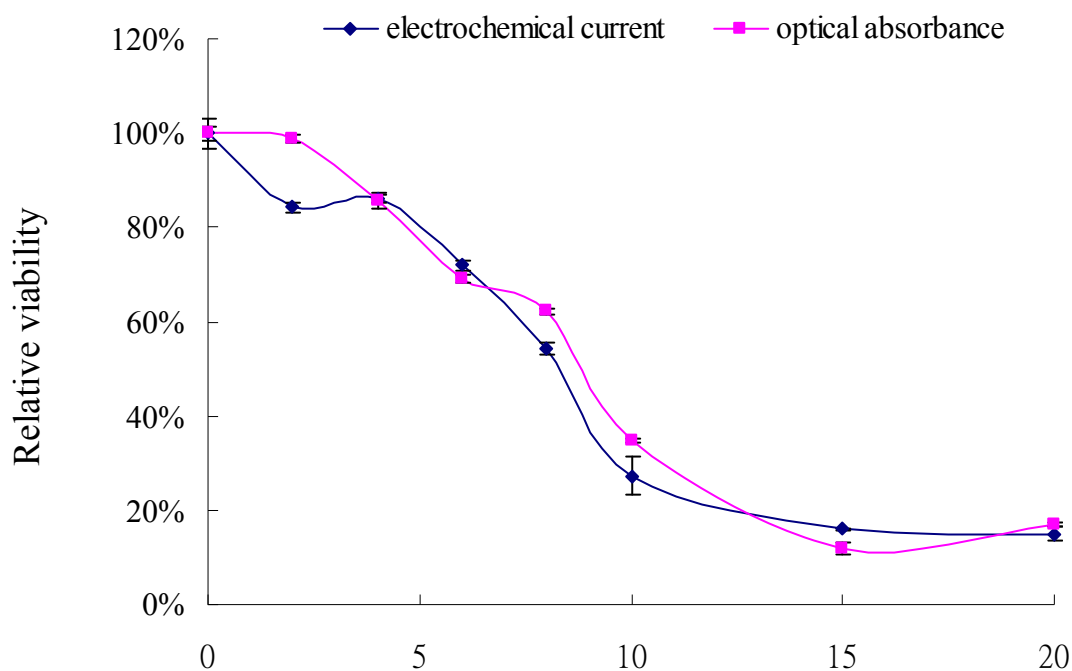


圖 11 醋酸對酵母菌活性之抑制效果

四、結論

本研究使用網版印刷電極，使用上較傳統電極便利，實驗過程沒有繁雜拋光的處理；電化學介質與細胞反應時間短，可做即時監測細胞活性；電化學介質相較於螢光試劑也較便宜，FIA 系統所需樣品量少，並可同時快速監測兩種信號，兩種信號可相互驗證，可提高電化學偵測的可信度。

參考文獻

1. Bhatia-Kiššová, I.; Camougrand, N., *FEMS Yeast Research* 2010, 10, 1023.
2. Gelinas, P., *Inventions on Baker's Yeast Strains and Specialty Ingredients* Vol. 1, 104-132.
3. Tenreiro, S.; Outeiro, T. F., *FEMS Yeast Research* 2010, 10, 970.
4. Monteiro-Riviere, N. A.; Inman, A. O.; Zhang, L. W., *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 234, 222.
5. Laaksonen, T.; Santos, H.; Vihola, H.; Salonen, J.; Riikonen, J.; Heikkilä, T.; Peltonen, L.; Kumar, N.; Murzin, D.Y.; Lehto, V-P.; and Hirvonen, J., *Chemical Research in Toxicology* 2007, 20, 1913.
6. Mayer, D.; Naumann, R.; Edler, L.; Bannasch, P., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1990, 1015, 258.

7. Heiskanen, A.; Spéjel, C.; Kostesha, N.; Lindahl, S.; Ruzgas, T.; Emnéus, J., *Analytical Biochemistry* 2009, 384, 11.
8. Adami, A.; Ress, C.; Collini, C.; Pedrotti, S.; Lorenzelli, L., *Biosensors and Bioelectronics* 2013, 40, 315.
9. Filipovic-Kovacevic, Z.; Miksaj, M.; Bercuk, N.; Jukic, M., *Food Technology and Biotechnology* 2002, 40, 111.
10. Yamashoji, S.; Kajimoto, G., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1986, 849, 223.
11. Yashiki, Y.; Yamashoji, S., *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1996, 82 , 319.
12. Zhao, J.; Wang, M.; Yang, Z.; Yang, Z., *Enzyme and Microbial Technology* 2005, 37, 246.
13. Zhao, J.; Wang, Z.; Fu, C.; Wang, M.; He, Q., *Electroanalysis* 2008, 20, 1587.
14. Zhao, J.; Wang, M.; Yang, Z.; Wang, Z.; Wang, H.; Yang, Z., *Analytica Chimica Acta* 2007, 597, 67.
15. Zhao, J.; Wang, Z.; Wang, M.; Wang, H.; He, Q.; Zhang, H., *Talanta* 2008, 74, 1686.
16. Zhao, J.; Yang, Z.; Wang, M.; Lu, Y.; Yang, Z., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 7246.
17. Tsai, H.; Tsai, S. H.; Deng, H. W.; Fuh, C.B., *Electroanalysis* 2013, 25, 1005.
18. Tsai, H.; Tsai, S.H.; Ting, W.J.; Hu, C.C.; Fuh, C.B., *Analyst*, 2014, 139, 2476.
19. Bauer, E.F.; Pretorius, L.S., *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 2000, 21, 27.
20. Baker's yeast and its life cycle, <http://www.phys.ksu.edu/gene/a1.html> (2011/7/26)

Rapid assessment of cell viability based on glucose consumption measurement using a diabetes blood glucometer

1. Introduction

Cell culture assays are among of the most widely used models for anticancer drug screening, and cytotoxicity assays of chemicals. Monitoring cell viability *in vitro* is critical in many areas of biomedical research. Biomedical researchers incubate cancer cells with chemicals and then assess cell viability to identify potential drugs for further study. Many commercially available assays are used for assessing cell viability. Assay kits targeting on adenosine-triphosphate (ATP), nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), or mitochondrial dehydrogenase commonly involve using a fluorescent or absorption spectrometer to assess the cell viability (Haugland et al. 2010). Most of these reagents are water insoluble, and the equipment is expensive. We previously developed an electrochemical detection system with double electrochemical mediators for the quick and less expensive measurement of cell viability (Tsai et al. 2013, Tsai et al. 2014). In general, when the results show that the drugs effectively inhibited cell viability, additional culture assays are necessary to study the mechanism of the drug effects. Only a few studies have assessed cell viability on the basis of direct measurements of cell metabolic intermediates or products (Hassan and Bilitewski 2013, Qin et al. 2013), because separating complex compositions is difficult in a culture medium. It is important to monitor blood glucose in diabetics and glucose metabolism in culture cells. Over the last decade, the contribution of various kinds of glucose sensors has been tremendous. Jung et. al. developed a self-referencing glucose microsensor for measurement of glucose consumption by pancreatic β -cells (Jung et al. 2001). Woedtke et. al. combined a perfusion cell culture with an enzyme glucose biosensor to continuously monitor the glucose consumption of the cell culture (von Woedtke et al. 2002). Pemberton et. al. developed a system on the basis of screen-printed microband biosensors for end-point measurements of glucose and cell numbers in HepG2 cell cultures (Pemberton et al. 2009). These systems were complex and were not commonly used in biological research laboratories.

General diabetes glucose meters are widely used in testing patients' blood glucose level. Their designs are safe, convenient, and user-friendly. They selectively measure glucose in human blood without sample pretreatment (Hsu et al. 2009, Johnson and Baker 1998) and are economical. Therefore, we explored to measure the glucose consumption in a culture medium for assessing cell viability using a diabetes blood glucometer. Cell viabilities based on glucose consumption were compared with those from an established tetrazolium-based assay (MTT assay) (Twentyman and Luscombe 1987, Sieuwerts et al. 1995). A generic blood glucometer for rapidly assessing cell viability was demonstrated for the study of anticancer efficacy and cytotoxicity in this work.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,

5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phosphate buffered saline (PBS), 2-methoxyestradiol (2-ME) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), an antibiotics mixture (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of penicillin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin, and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of neomycin), glutamine, and nonessential amino acids (NEAA) were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA), and fetal bovine serum (FBS) was purchased from Biological Industries Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Culture dishes and microplates were obtained from Nunc (Roskilde, Denmark).

2.2 Apparatus

A Spec384 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) was used for measuring absorbance in the MTT assay. The Rightest[®] GM300 blood glucose meter that measures blood glucose based on glucose oxidase and amperometric electrochemistry with a gold electrode strip (Bionime, Taichung, Taiwan) was used for measuring glucose in the culture medium.

2.3 Cell counts assessed on the basis of glucose consumption

The hepatocellular carcinoma cell line HepG2, and lung carcinoma cell line A549 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). The hepatocellular carcinoma cell line, HA22T/VGH, was obtained from Asia Bioscience (Taipei, Taiwan). Cancer cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic mixture at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cells were incubated in 24-well culture plates at densities of 1-5×10⁴ cells/well. After the cells adhered overnight, the culture supernatants were removed, and then a fresh medium was supplemented. After a period, we withdrew the culture medium and applied a drop of it on the sample entry of the electrode strip.

2.4 Cell viability assessments according to glucose consumption

HeLa cells were incubated in 96-well plates at a density of 1×10⁴ cells/well. After the cells adhered overnight, the culture supernatants were removed, and then a 200 μL of fresh medium with various concentrations of 2-ME was supplemented for 48 h. We withdrew the culture medium and applied a drop of it on the sample entry of the electrode strip. The viability results according to glucose consumption were compared with those using a MTT assay to assure that the blood glucometer is suitable for anticancer drug screening.

The relative viability from the glucose level was calculated using Equation (1):

$$\text{viability}\% = \frac{G_{\text{blank}} - G_{\text{test}}}{G_{\text{blank}} - G_{\text{control}}} \times 100\% \quad (1)$$

where G_{blank} is the glucose level of the cultured well containing the medium only, G_{control} is the glucose level of cells without the test drug, and G_{test} is the glucose level of the cells cultured with the drug.

2.5 Cell viability assessments using a MTT assay

The culture medium was withdrawn and the cultured cells were washed with PBS at the end of the culture periods. The cells were then incubated with a fresh medium supplemented with MTT (0.5 mg mL^{-1}) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 h. After removing the MTT medium, DMSO was added to dissolve the formazan crystals. The absorbance of formazan was measured at 550 nm. The relative viability from the MTT assay was calculated using Equation (2):

$$\text{viability}\% = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100\% \quad (2)$$

where A_{blank} is the absorbance of the cultured well containing the medium only, A_{control} is the absorbance of cells cultured without the test drug; and A_{test} is the absorbance of the cells cultured with the drug.

2.6 Statistical analysis

All described experiments were performed in triplicate. Data in the figures were expressed as the mean \pm standard deviation. Statistical significance of the data was determined using ANOVA, paired t-test, and Pearson correlation by Microsoft Excel[®]. Differences were considered significant at the level of $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Feasibility of using diabetes blood glucometer to measure the glucose level in the culture medium

Figure 1 shows the glucose levels of the series dilution of DMEM with PBS and different concentrations of glucose prepared in PBS. The slopes were respectively $1.24 (\pm 0.08)$ and $1.24 (\pm 0.05)$ for DMEM and glucose in PBS. There was no significant difference between the two types of solutions, showing that other components in the DMEM and FBS did not interfere with the glucose measurements. Ionic strength and solution viscosity can affect an electrochemical signal, and a blood glucometer is designed for human whole blood; thus, the responses of the apparatus to the culture medium were more sensitive than those of its original setting.

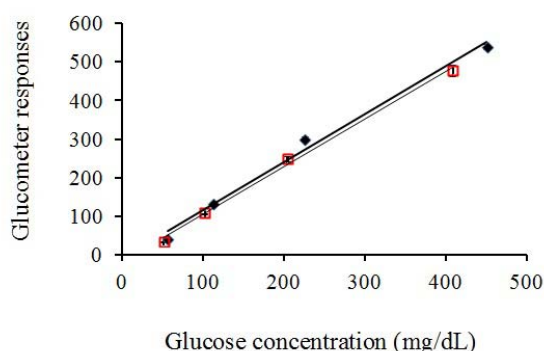


Fig. 1 Glucose levels of the series dilution of the DMEM medium with PBS (\blacklozenge) and different concentrations of glucose prepared in PBS (\square). The DMEM medium comprised a powder mixture dissolved in PBS with 10% FBS. The glucose level of DMEM was 4.5 g L^{-1} . The glucose prepared in PBS was 4.08 g L^{-1} , the series diluted with PBS.

3.2 Cell counts assessed on the basis of glucose consumption

In order to investigate the feasibility of the proposed method, culture media of various cancer cells were measured. The results of glucose consumption were compared with those from an established MTT assay. Figure 2 shows the consumed glucose in the culture medium and absorbance from a MTT assay versus cultured densities of HepG2 cells. The Pearson correlation between consumed glucose and absorbance was 0.9669. Therefore, the more cells there are, the more glucose that is consumed and the more formazan that is formed. Table 1 shows the glucose consumption rates and MTT conversion for various cancer cell lines. The glucose consumed rates were calculated as S divided time of cell culture. S is the slope of plot from the glucose consumption versus cell densities. The Pearson correlation between the glucose consumed and the MTT conversion was 0.9318 for three cell lines. The MTT assay measures the activity of mitochondrial respiration and metabolism, which reduce MTT to purple formazan in living cells. This shows that the glucose consumption rate is highly relative to the mitochondrial respiration and metabolism.

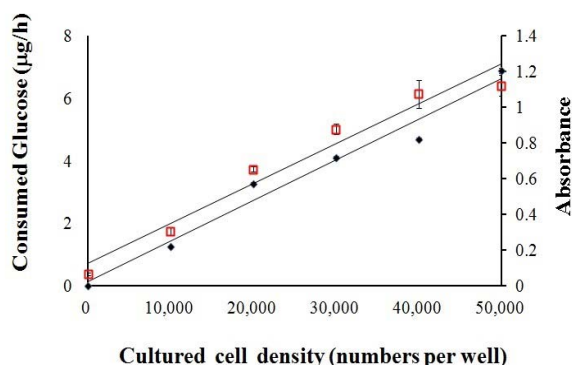


Fig 2 Consumed glucose (◆) in the culture medium and absorbance (□) from formazan formation versus cultured cell densities of HepG2 cells. Various amounts of cells were cultured in 24- well plates for 24 h; the glucose in the cultured medium was measured using glucometer and the cells were then incubated with a fresh medium supplemented with MTT (0.5 mg mL^{-1}) at 37°C for 4 h. After removing the MTT medium, DMSO was added to dissolve the formazan crystals. The absorbance of formazan was measured at 550 nm.

Table 1 Glucose consumption rates and MTT conversion for a variety of cancer cell lines.

Cell lines	Glucose consumed rate (mg/cell/h) ($\pm\%$ CV)	Absorbance changed per cell ($\pm\%$ CV)
HepG2	$1.3 \times 10^{-7} (\pm 8.7)$	$2.6 \times 10^{-5} (\pm 4.2)$
HA22T	$8.40 \times 10^{-8} (\pm 25)$	$2.31 \times 10^{-6} (\pm 4.4)$
A549	$1.2 \times 10^{-7} (\pm 17)$	$1.3 \times 10^{-5} (\pm 19)$

3.3 Application for Anticancer efficacy study

The change of the glucose level in the medium and a MTT assay were used to evaluate the anticancer efficacy of 2-ME according to the viability changes of HeLa cells. Figure 3 shows the relative viability of cells cultured with 2-ME at a concentration ranging from 0 to 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results were compared using a paired *t* test on Microsoft Excel[®]. The statistical results showed no significant difference between the two methods.

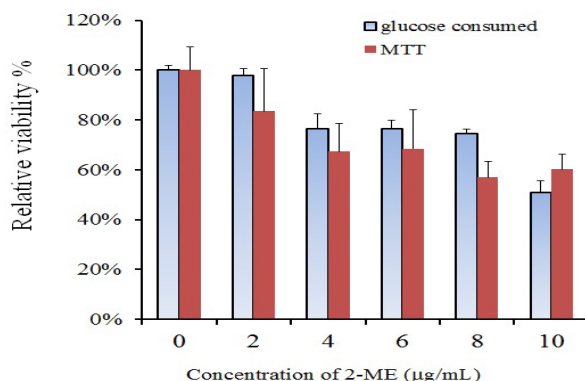


Fig 3 Anticancer efficacy of 2-ME assessed by glucose consumption and MTT assay

3.4 Application for cytotoxicity study

The change of the glucose level in the medium and MTT assay were used to evaluate the cytotoxicity of crude plant extraction (JCo) according to the viability changes of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. Figure 4a shows the glucose levels in the medium with various amounts of plant extraction. The statistical results of ANOVA showed no significant difference between the groups, meaning that there was no interference from the plant extraction in the glucose measurements. Figure 4b shows the relative viability of cells cultured with JCo at a concentration ranging from 0 to 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The MDCK cells were cultured at a density of 1×10^4 cells/well in 96-well culture plates with 100 μL of DMEM and various concentrations of JCo for 48 h. The relative viability results were compared using a paired *t* test. The statistical results showed no significant difference between the two methods, except that with 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The cells with 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of JCo were disrupted at the end of the culture period. We suspected that the glucose inside the cells was released; thus, the glucose level in the medium was higher than that of the medium only. Therefore, the glucose consumption was negative and resulted in a negative relative viability.

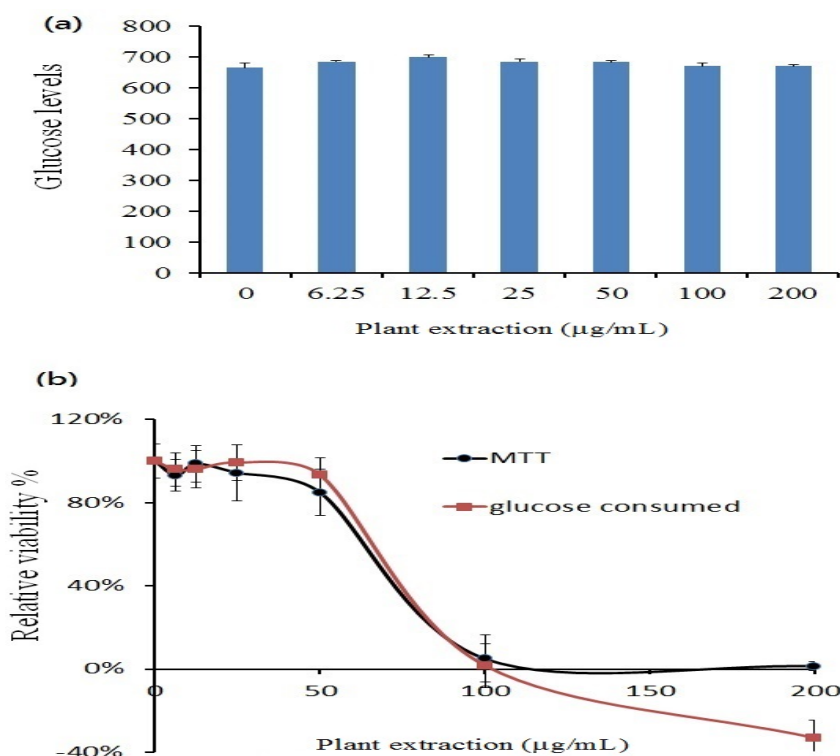


Fig. 4 (a) Glucose levels in medium with various amounts of plant extraction (JCo). (b) Relative viability of MDCK cells treated with various amounts of JCo. The medium with the batch of FBS resulted in high glucose level; the culture medium was half diluted before measurement.

4. Conclusion

A general diabetes blood glucose meter with gold electrode strip was demonstrated as a generic device for rapidly assessing cell viability, and its results were comparable to those of the MTT assay. The device is suitable for applications of various cancer cell lines and epithelial cell lines. It meets the needs of instant viability assessment during cell culture with calibration-free, and maintenance-free. This device detected the cell viability on the basis of the glucose consumption in the culture medium. It is economical and the cultured cells can be used for further mechanism study of drug effects.

References

- Hassan, R. Y. A. and Bilitewski, U. (2013) 'Direct electrochemical determination of *Candida albicans* activity', *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 192-198.
- Haugland, R. P., Spence, M. T. Z., Johnson, I. and Basey, A. (2010) *The handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 10th ed., Invitrogen, life technologies.
- Hsu, C.-T., Hsiao, H.-C., Lee, M.-S., Chang, S.-F., Lee, T.-C., Tsai, Y.-S. and Zen, J.-M. (2009) 'Assessing the quality of Bionime self-monitoring blood glucose system Rightest GM110: A critical evaluation of interference and ambient

- circumstances', *Clinica Chimica Acta*, 402(1–2), 119-123.
- Johnson, R. N. and Baker, J. R. (1998) 'Accuracy of devices used for self-monitoring of blood glucose', *Annals of Clinical Biochemistry*, 35 (Pt 1), 68-74.
- Jung, S.-K., Trimarchi, J. R., Sanger, R. H. and Smith, P. J. S. (2001) 'Development and Application of a Self-Referencing Glucose Microsensor for the Measurement of Glucose Consumption by Pancreatic β -Cells', *Analytical Chemistry*, 73(15), 3759-3767.
- Pemberton, R. M., Xu, J., Pittson, R., Biddle, N., Drago, G. A., Jackson, S. K. and Hart, J. P. (2009) 'Application of screen-printed microband biosensors to end-point measurements of glucose and cell numbers in HepG2 cell culture', *Analytical Biochemistry*, 385(2), 334-341.
- Qin, H., Gao, Q., Niu, H., Wang, Z., Zhu, X., Li, J., Yuan, X. and Wu, D. (2013) 'An in situ electrochemical detection method of cell viability', *Analyst*, 138(12), 3372-3375.
- Sieuwerts, A. M., Klijn, J. G., Peters, H. A. and Foekens, J. A. (1995) 'The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival', *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*, 33(11), 813-823.
- Tsai, H., Tsai, S.-h., Ting, W.-J., Hu, C.-C. and Fuh, C. B. (2014) 'Electrochemical sensing of hepatocyte viability', *Analyst*, 139(10), 2476-2481.
- Tsai, H., Tsai, S. H., Deng, H. W. and BorFuh, C. (2013) 'Assessment of Cell Viability Using the Chronoamperometric Method Based on Screen-Printed Electrodes', *Electroanalysis*, 25(4), 1005-1009.
- Twentyman, P. R. and Luscombe, M. (1987) 'A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity', *Br J Cancer.* , 56(3), 279-285.
- von Woedtke, T., Jülich, W. D., Alhitari, N., Hanschke, R. and Abel, P. U. (2002) 'Biosensor-controlled perfusion culture to estimate the viability of cells', *Medical and Biological Engineering and Computing*, 40(6), 704-711.

科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：104 年 8 月 18 日

計畫編號	NSC 103-2113-M-040-002-		
計畫名稱	發展流動注入分析系統偵測酵母菌細胞活性		
出國人員姓名	蔡惠燕	服務機構及職稱	中山醫學大學 (教授)
會議時間	104 年 07 月 20 日至 104 年 07 月 22 日	會議地點	Hokkaido, Japa 日本北海道札幌
會議名稱	(中文) (英文) 2015 The 2nd International Biotechnology, Chemical Engineering and Life Science Conference (IBCELC)		
發表題目	(中文) Integration of ELISA and homemade magnetic microplate for efficient biomarker detection (英文)		

一、參加會議經過

會議是在三四月就開始使 call paper, abstract/full paper submission deadline 2015/04/10, acceptance notification 2015/04/25 and registration deadline 是 2015/05/15 起初認為 **International Biotechnology, Chemical Engineering and Life Science Conference** 應該可以與來自世界各地的 **biotechnology 及 life science 相關的科學家交流** 所以參與此研討會, 但正式議程公告出來, 發現是一個大雜會, 會議當初報名是 2015 The 2nd International Biotechnology, Chemical Engineering and Life Science Conference (IBCELC), 但實際上是整個議程涵蓋領域非常廣, 第一天只有半天, 主要是土木工程, 電子/電腦/電機 工程類的, 與 Biotechnology, Chemical Engineering and Life Science 相關的只有 下午 15:45~17:15 的 session, 4 位來自東南亞的學者報告, 所以七月二十日當天才出發。早上第一班高鐵 6:30 由台中輾轉到桃園機場, 日本北海道新千歲機場, 再轉機場 bus 到會議飯店。
第二天除了 Biotechnology, Chemical Engineering and Life Science 以外, 甚至還有商科、管理類的(Business and social science)。

Oral Sessions

Time	Information	Venue
13:00-17:00	Registration	
14:00-15:30	Civil Engineering 1	Michaelangelo
	Computer and Information Sciences 1	Davinci
15:30-15:45	Tea Break & Networking	
15:45-17:15	Life Science 1	Raffaeollo
	Electrical and Electronic Engineering 1	Michaelangelo
	Environmental Sciences 1	Davinci

Tuesday, July 21, 2015
Oral Sessions

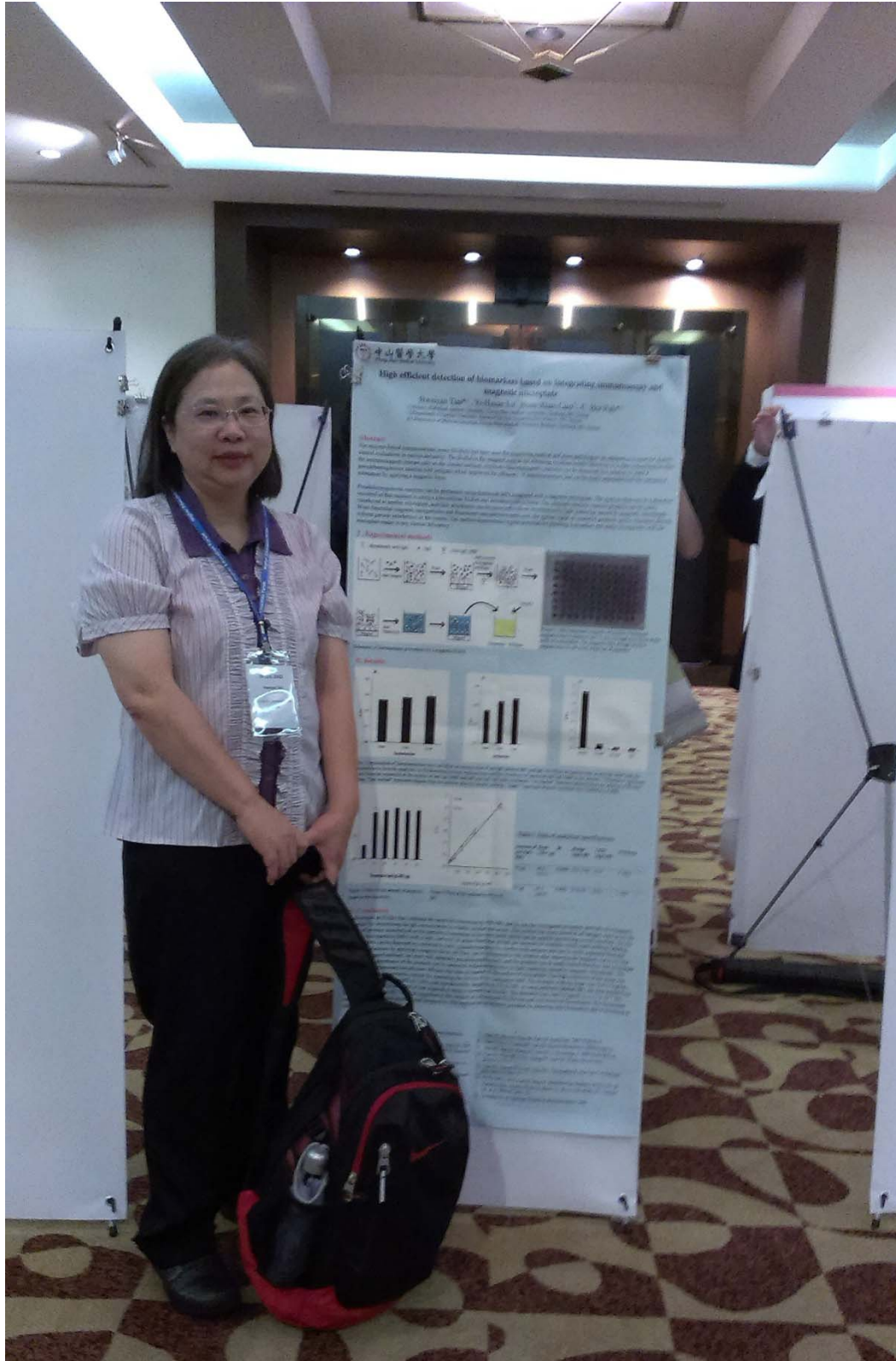
Time	Information	Venue
08:00-18:00	Registration	
09:00-10:30	Nature Science Keynote Speech Keynote Speaker: Kwun Nam Hui Paper title: <i>Strategic Potential Use of Layered Double Hydroxides as Electrode Materials for Supercapacitors</i>	Raffaeollo
10:30-10:45	Tea Break & Networking	
10:45-12:15	Chemical Engineering	Roma
	Electrical and Electronic Engineering 2	Venezia
	Biotechnology Engineering 1	Michaelangelo
	Computer and Information Sciences 2	Davinci
12:15-13:30	Lunch Time	
13:30-15:00	Biomedical Engineering	Michaelangelo
	Civil Engineering 2	Davinci
15:00-15:15	Tea Break & Networking	
15:15-16:45	Fundamental and Applied Sciences 1	Raffaeollo
	Mechanical Engineering 1	Michaelangelo
	Computer and Information Sciences 3	Davinci
16:45-17:00	Tea Break & Networking	
17:00-18:00	System and Naval Mechatronic Engineering	Michaelangelo
	Computer and Information Sciences 4	Davinci

Tuesday, July 21, 2015	
Poster Sessions	
B1, Renaissance Sapporo Hotel	
Time	Information
11:00-12:00	Poster Session (3) Electrical and Electronic Engineering 1 / Biotechnology Engineering
13:30-14:30	Poster Session (4) Biomedical Engineering 1 / Chemical Engineering 1 / Geosciences and Petroleum Engineering
15:00-16:00	Poster Session (5) Computer and Information Sciences 1 / Life Science 2 / Fundamental and Applied Sciences / System and Naval Mechatronics Engineering
16:30-17:30	Poster Session (6) Environmental Sciences / Material Science and Engineering

第二天一早報到



然後聽大會 **Keynote Speech**，由韓國釜山大學(School of Materials Science and Engineering, Pusan National University)的 **K.N. Hui** 副教授
主講 **Potential use of Layered Double Hydroxides as Electrode Materials for Supercapacitors**，是一個頗年輕的學者，一個 keynote 講了 90 min，就像上一堂環保電池發展史。
之後是我自己的 poster presentation，也利用時間看了其他人的 poster，有食品研究，也有台灣師範大學體育系的 poster，很 surprised!



中午午餐時間由 Professor Michiko Miyamoto, Akita prefectural University, Japan 給了 Welcome speech 後，大會請來北海道傳統大鼓表演，讓與會者可以了解當地傳統文化。



二、與會心得

此次會議雖有近兩百人參加，但領域差別太多，poster presentation 時必須從基礎原理開始說明，是一個很不一樣的經驗。在 oral presentation 時與此次參加議題相關的人並不多，第二天早上有四位，其中三位來自台灣，兩位是科大研究所的學生，研究奈米金 cellular uptake，有一位韓國醫生報告利用 near IR 探討人腦在接受語言、算數刺激及休息時，腦部的變化，發現當給予算數刺激時，左腦相對於右腦有較明顯的變化。下午在 biomedical engineering session 僅三位，一位是日本 Tokushima university, department of Engineering, professor minoru Fukumi 研究室博班學生 Daiki Hiraoka 報告 Hand motion discrimination by support vector maxhine based on electromyography，另兩位則是來自文化大學與元智大學的學生。第三天 Material Science and engineering 有幾個不錯的 presentation,如 university of science and technology of china 的 Dr. Ju 報告 Ionic conductivity of impregnated samaria doped ceria for solid oxide fuel cells，Chubu university, Dept. of Biomedical Sciences 的 professor Hiroaki Takadama 報告 effect of NaOH and KOH on the formation of nano-porous structure on the surface of titanium electrode by chemical and heat treatments，對本人電化學分析研究均有所啟發。

四、建議

國內學術研討會，是否可以改掉中場休息大吃大喝的陋習，簡單的茶水即可，讓與會者充分交流。或者到一幽靜的環境開會，會後有一天或半天知識之旅(參觀學習)，除了科學交流也可增進人文素養。此研討會是由 high education forum 主辦，可能為節省成本，或參加人數不踴躍，排不滿三天的行程，最後將 4 個原來是獨立的會混再一起辦，雖然可認識不同領域的人，但學識領域差太多，整體而言 CP 值不高，不值得參加。

五、攜回資料名稱及內容

會議論文摘要 USB 一支

六、其他:

大會報名時，即有一個會後的參訪(**Furano Nature Tour**)，因此自費參加，參訪行程完全是看自然景觀及花園。實在佩服日本人可以把一大片花海，尤其是薰衣草變成一個地方的特色，讓大部分旅客一想到北海道就想到那一望無際的薰衣草，及一系列的薰衣草相關產品。反觀台灣每次有什麼活動就一窩蜂的辦，讓人搞不清出那裡是特色。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/02/01

科技部補助計畫	計畫名稱: 發展流動注入分析法偵測酵母菌的細胞活性
	計畫主持人: 蔡惠燕
	計畫編號: 103-2113-M-040-002- 學門領域: 分析化學
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：蔡惠燕		計畫編號：103-2113-M-040-002-					
計畫名稱：發展流動注入分析法偵測酵母菌的細胞活性							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明： 如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	APCE2015 發表，並獲 APCE2015 壁報論文佳作獎。
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
其他成果 （無法以量化表達之 成果如辦理學術活動、 獲得獎項、重要國際 合作、研究成果國際 影響力及其他協助		獲APCE2015壁報論文佳作獎。					

產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)			
	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以100字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

本研究目的在發展簡易快速的細胞活性測試,除了計畫原有目標開發檢測酵母菌活性外, 並利用計畫所產生之能量繼續開發利用簡易的血糖儀偵測癌細胞及上皮細胞之活性。可以即時監測細胞對葡萄糖代謝情形, 間接推測細胞活性, 且因為使用細胞培養液監測其中葡萄糖含量, 一旦發現藥物具有細胞毒性或抗癌藥效, 細胞可直接做 lysis 進一步探討細胞內部蛋白質的表現以了解藥物作用機制, 對藥物細胞實驗而言可節省再次培養細胞的時間與成本。且血糖儀相較其他光學儀器便宜、操作簡便。