

國立臺南大學 108 年度生物實驗安全委員會會議紀錄

時間：108 年 12 月 16 日(星期一)上午 9 時

地點：誠正大樓 309 會議室

主持人：陳總務長樹屏

出席者：生物科技學系程主任台生、生態暨環境資源學系黃家勤老師、生態暨環境資源學系黃文伯老師、生物科技學系鄧燕妮老師、生物科技學系張翠玲老師、生物科技學系吳慧珍老師、總務處環安組張碩文組長

列席者：

壹、主席致詞

各位委員、師長早安，生安委員會委員協助管理監控實驗室安全上的問題，如果沒有完善的管理將會有負面上的影響，感謝委員長久以來協助管理，那先進行工作報告後再進行提案討論。

貳、工作報告

一、108 年度申請本校生物實驗安全委員會計畫共 4 件，資料如下：

1.計畫編號：GR108001(P.3-P.12)

申請人：生物科技學系鄧燕妮老師

計畫名稱：MiR-320 和 LRWD1 在卵巢癌發展中的調控作用

2.計畫編號：GR108002(P.13-P.18)

申請人：生物科技學系張翠玲老師

計畫名稱：Mir-25-3p 與 Mir-17-5p 對泛素信號途徑之調控

3.計畫編號：GR108003(P.19-P.24)

申請人：生物科技學系張翠玲老師

計畫名稱：探討 Hyperoside 與 Isoliquiritigenin 對 USP8 於細胞訊息傳遞與免疫活化之調控

4.計畫編號：GR108004(P.25-P.30)

申請人：生物科技學系丁慧如老師

計畫名稱：探討維生素 D 調控前列腺癌分泌趨化因子影響間葉幹細胞促癌惡化的作用機轉

上述4件計畫，已全數審查完畢。

叁、提案討論

國立臺南大學108年度第1次「生物實驗安全委員會會議」案表

項次	提案事項	提案單位	頁數
一	有關計畫編號GR108001、GR108002、GR108003、GR108004 生物實驗安全申請案，是否同意進行？	總務處環安組	2

提案一

案由：有關計畫編號 GR108001、GR108002、GR108003、GR108004 生物實驗安全申請案，是否同意進行，提請討論？

說明：

- 一、上述計畫編號 GR108001、GR108002、GR108003、GR108004，已經 2 名審查委員審查，審查意見均為同意進行，詳細審核意見表如附件(P.3-P.30)。
- 二、上述申請案如經本委員會確定同意進行後，則於申請計畫「基因重組實驗申請同意書」加蓋本校生物實驗安全委員會查覈章。

決議：全數照案通過

肆、臨時動議：無

伍、散會(9:10)結束

國立臺南大學基因重組實驗申請同意書

附表一

凡進行基因重組實驗須由計畫主持人或實驗負責人填寫本表，送本校生物實驗安全委員會覈實同意並簽名後，發還申請人並保留影本。向有關機構申請研究計畫經費時，將影本隨附於計畫書備查。研究計畫核准後，所進行之基因重組實驗須與填寫內容相符，如實驗變更至更高安全等級，須再另填寫「申請同意書」報請生物實驗安全委員會同意。

研究計畫名稱：**MiR-320 和 LRWD1 在卵巢癌發展中的調控作用**

計畫主持人：_____ 職稱：教授 電話及傳真：06-2133111 #

執行機構、系所：生物科技系

- 1、實驗內容：
是否進行基因重組之實驗？ -----是
是否進行微生物培養的實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之動物實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之植物實驗？ -----是
是否為自交植物？ -----是
- 2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）
 - a. 重組基因來源名稱：OVCAR-3（原位卵巢癌細胞株）、SKOV-3（轉移卵巢癌細胞株）及 TOV-112D（stage IIIC human ovarian cancer）
第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群，動物，植物
 - b. 進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：E.coli
第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群
 - c. 進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：OVCAR-3（原位卵巢癌細胞株）、SKOV-3（轉移卵巢癌細胞株）及 TOV-112D（stage IIIC human ovarian cancer）
- 3、基因轉殖實驗設備及轉殖方法
 - a. 具備之基因轉殖之動物實驗設備：SPF 設備； IVC 設備；
其他〔名稱〕CO₂ 細胞培養箱
 - b. 具備之基因轉殖之植物實驗設備：生長箱； 溫室； 農場；
其他〔名稱〕_____
 - c. 基因轉殖方法：virus； microinjection； liposome； gene gun； Agrobacterium
其他〔名稱〕_____
- 4、進行本研究所需之安全等級：P1 P2 P3 P4
- 5、進行本研究之實驗室：國立臺南大學格致樓，其生物安全等級：P1 P2 P2+ P3
P4

6、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟

實驗目的:

先前研究顯示, LRWD1 是生殖細胞表現的重要之一, 主要表現在細胞質及中心體, 與細胞分裂及複製有關。先前研究顯示 LRWD1 與細胞抗氧化自由基有關, 阻斷 (knockdown) 細胞 LRWD1 會使細胞的轉移 (migration) 及侵入 (invasion) 能力增加, 推測 LRWD1 與癌症發展及轉移有關。除此之外具有避免細胞遭受到 DNA 雙股斷裂試劑 (ex. H_2O_2) 的威脅時, LRWD1 的表現增加, 以降低 DNA 及細胞的受損程度; 當細胞中的 LRWD1 表現被阻斷 (knockdown) 時, 細胞的複製明顯被抑制。反之細胞過度表現 LRWD1 時, 細胞增生明顯增加, 顯示 LRWD1 可能參與細胞的增生作用。在 mir320 對 LRWD1 的影響方面, 初步結果顯示 mir320 會藉由與 Ago2 及 FXR1 的結合, 正向調控 LRWD1 的表現, 在額外置入 mir320 mimic 時, 以 Luciferase assay 的分析顯示 LRWD1 轉錄活性表現增加。微小 RNA mir-320 一般被認為是癌症的標誌 (cancer marker), 與多癌症的發生有關, 外泌體 (exosome) 中表現的 mir320 與卵巢癌、結腸癌、膀胱癌等的癌變及轉移有關, 研究顯示外泌體 (exosome) 中表現的 mir320 會影響基因表現 (ex. TWIST1), 抑制癌細胞的轉移及侵入 (Li et al. 2017)。miR-320 具有調節卵巢癌細胞增殖和凋亡的作用, 在癌變的細胞中 mir-320 有較高的相對表現 (Pan et al. 2018)。總結微小 RNA mir-320 被認為是癌症的標誌 (cancer marker), 與多癌症的發生有關, 微小 RNA mir-320 與癌症的發生、轉移及侵入有關, 外泌體中的 mir-320 的表現高低與癌症的發展有相關性, mir320 會直接調控 LRWD1 基因表現, 因此本研究擬探討在卵巢癌細胞中 mir320 如何調控 LRWD1 的表現及在卵巢癌發生及轉移過程中的基因表現調控及扮演的角色。

本研究第一年主要探討 mir-320/Ago2/FXR1 如何調控 LRWD1 的表現及 ARE 所扮演的角色, 將藉由 site-direct mutagenesis 破壞 mir-320 在 LRWD1 3'UTR 的結合序列及 ARE site, 再以 Luciferase, 並且搭配細胞中 Ago2 及 FXR1 的過表達 (overexpression) 及阻斷 (knockdown) 作用並配合 mir-320 mimic 及 inhibitor 作用, 探討 ARE 在 mir320/Ago2 調控 LRWD1 表現中所變演的角色, 希望能深入探討 mir-320/Ago2/FXR1 如何 LRWD1 的表現, 減少 ROS 對於 DNA 及細胞的損傷。

第二年主要探討卵巢癌與 LRWD1 表現的關連性, 將分成二大部份, 第一部份將以卵巢癌的組織晶片 (tissue array) 及 cDNA 表現晶片 (cDNA array) 為研究材料, 以原位雜交技術 (In Situ Hybridization)、免疫螢光染色 (immunofluorescence staining) 及 Taqman QPCR 等方式進行不同卵巢癌階段的病人 LRWD1 及 mir320 的表現分析, 並予正常組織作比對, 了解卵巢癌與 LRWD1 及 mir320 的表現的相關性, 並且與 CA125 進行比較分析, 評估 LRWD1/mir320 作為早期卵巢癌篩檢指標的可行性。第二部份將以 OVCAR-3 (原位卵巢癌細胞株)、SKOV-3 (轉移卵巢癌細胞株) 及 TOV-112D (stage IIIc human ovarian cancer) 為主, 探討細胞質及外泌體 (exosome) mir-320 與 LRWD1 表現的相關性及與細胞侵入 (invasion) 及轉移 (migration) 的關連性, 進而探討 mir-320 與 LRWD1 表現對於細胞癌變及轉移的影響, 評估 mir-320 與 LRWD1 作為細胞癌變及轉移的可行性。

預計本研究的完成可以作為 LRWD1 及 mir320 作為早期卵巢癌篩檢可行性的先期研究, 未來將可能擴展及運用於臨床的樣品採樣分析, 期待能運用於開發卵巢癌早期檢測的試驗, 對於卵巢癌的評估、治療及癒後能有助益。

實驗步驟

第一年研究

1. 細胞培養

人類卵巢癌 OVCAR-3 (原位卵巢癌細胞株)、SKOV-3 (轉移卵巢癌細胞株) 及 TOV-112D (stage IIIc human ovarian cancer) 以培養液：90% Minimum essential medium (Eagle) with Earle's BSS, 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino acids, and 1.0 mM sodium pyruvate + 10% heat-inactivated fetal bovine serum 培養，提供作為後續實驗的分析。

2. 轉染轉殖質體使細胞大量表現 LRWD1 (overexpression LRWD1)

進行轉型作用 (transfection) 的前一天，將數目 1.0×10^5 的人類 OVCAR-3 (原位卵巢癌細胞株)、SKOV-3 (轉移卵巢癌細胞株) 及 TOV-112D (stage IIIc human ovarian cancer) 培養於 12-well 盤中，培養於 37°C 、5% CO_2 24 小時後，將質體 DNA 混合於 Lipofectamine® 3000 Reagent (Life Technologies, USA) 中，以 Vortex 震盪混和均勻，室溫下靜置 10 分鐘，加置 6-well plate 中平移搖晃混勻。將進行轉染作用的細胞培養於 5% CO_2 的 37°C 環境中 24 小時。

3. 真核細胞之基因阻斷 (gene knockdown) 試驗

前一天以 2×10^5 cell/ml 培養於 6-well plate，放入含有 5% CO_2 的 37°C 細胞培養箱培養 24 小時。待細胞長至 8 分滿，使用 Lipofectamine® 3000 Reagent 試劑進行轉型作用 (co-transfection)。以 Lipofectamine® 3000 Reagent (Life Technologies, USA) 進行 shRNA-LRWD1, shRNA-Ago2, shRNA-FXR1 (中央研究院 RNAi 核心設施購得) 的轉染作用後，於 5% CO_2 的 37°C 細胞培養箱中培養 24 小時後提供作為後續 Luciferase 活性或 QPCR 分析。

4. 以特定變異點試驗構築 pMIR-LRWD1-3'UTR Δ miR-320a 及 pMIR-LRWD1-3'UTR Δ ARE 轉殖質體
將依照 QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit; Cat. No.: AG-210518 (Agilent Tech.) 的建議步驟進行。取 400 ng pMIR-LRWD1-3'UTR 轉殖質體 DNA，加入 0.5 μl 突變特定變異點的引子對 (針對 LRWD1-3'UTR 上 miR-320a 結合位置 或 ARE 位置)，0.5 μl dNTP (10 mM)，2.5 μl 10X Rxn buffer，0.8 μl Pfu Turbo，10% DMSO，之後補二次水至 25 μl 。PCR 反應條件為： 95°C 作用 1 分鐘，使雙股 DNA 變性，再以循環式的裂解溫度 95°C 作用 30 秒、煉合溫度 55°C 作用 1 分鐘、延長溫度 68°C 作用 7 分 30 秒進行 24 個循環，最後以 68°C 處理 10 分鐘。將聚合酶連鎖反應產物置於冰上 2 分鐘，加入 1 μl DpnI (200 U)，3 μl Torngos (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit)，之後補二次水至 30 μl ，於 37°C 水浴培養 2 小時後，進行大腸桿菌轉型作用及 DNA 定序及確認完成 pMIR-LRWD1-3'UTR Δ miR-320a 及 pMIR-LRWD1-3'UTR Δ ARE 轉殖質體的構築。

5. 細胞 pMIR-LRWD1-3'UTR Δ miR-320a 及 pMIR-LRWD1-3'UTR Δ ARE 轉殖質體轉染及 3'UTR 活性分析 (Luciferase report assay)

實驗細胞轉染：人類 OVCAR-3 (原位卵巢癌細胞株)、SKOV-3 (轉移卵巢癌細胞株) 及 TOV-112D (stage IIIc human ovarian cancer) 為主要用來研究的細胞株。取 8×10^5 實驗細胞培養於 12-well 培養皿於 5% CO_2 的 37°C 細胞培養箱中培養 16~18 小時，當細胞覆蓋率約為 80% 時，以 Lipofectamine® 3000 Reagent (Life Technologies, USA) 進行 pMIR-LRWD1 3'UTR 轉殖質體及 pRL-TK 載體 (會表現 renilla luciferase 活性) 的轉染作用後，於 5% CO_2 的 37°C 細胞培養箱中培養 24 小時後開始進行 Luciferase 活性分析。

3'UTR 活性分析 (Luciferase report assay)：使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System，將已經在 12-well 培養皿轉染之細胞，以 1X PBS 清洗。加入 250 μl 1X Passive Lysis Buffer，室溫振

盪 15 分鐘。加入 50 μ l LAR II reagent 與含有 10 μ l transfection 的細胞液混合均勻後，取出置於分析用的白盤中反應 10 分鐘，以冷光分析儀偵測 firefly luciferase activity。在 renilla luciferase activity 偵測部分，加入新鮮配置的 50 μ l Dual-Glo Stop and Glo reagent (Dual-Glo Stop and Glo substrate : Dual-Glo Stop and Glo buffer 以 1 : 100 配置所需的量) 終止 firefly luciferase activity，待混合均勻後靜置 10 分鐘，測 renilla luciferase activity。以統計分析 3'UTR 活性，將冷光偵測的 firefly 和 renilla luciferases 活性扣除細胞背景值後，以 GraphPad Prism Version 4.0 軟體進行 firefly/renilla luciferases 計算及相對活性表現 (Relative Luciferase Activity)。

6. miR-320a/Ago2/FXR1 對於 *LRWD1* 表現的影響-miRNA 的模擬 (miRNA Mimics) 及抑制 (inhibitor)

將 8×10^5 實驗細胞培養於 12-well 培養皿置於 5% CO₂ 的 37°C 細胞培養箱中培養 16~18 小時隔天，當細胞覆蓋率約為 60-80% 時，以 Lipofectamine® 3000 Reagent (Life Technologies, USA) 進行 mimic-miRNA (*mirVana*TM miRNA Mimics Kit, miR-320a : MC11621, Life technologies) 或 miRNA inhibitor (*mirVana*® miRNA inhibitor, miR-320a : Mh11621, Life technologies) 及 Ago2 或 FXR1 轉殖載體的轉染作用後，於 5% CO₂ 的 37°C 細胞培養箱中培養 24 小時後，以 TaqMan RT-PCR 方式進行 miR-320a 及 *LRWD1* 的基因表現分析；加入 10 μ l 7-AAD 及 10 μ l FITC-Annexin V，避光反應 15 分鐘，以流式細胞儀 (Flow cytometry) 進行細胞週期分析及 Winmid V.2.9 套裝軟體進行結果判讀。

7. 全量 RNA 萃取及反轉錄聚合酶鏈連鎖反應 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

將培養 6 公分細胞培養皿的細胞以 1×PBS 清洗，加入 200 μ l 的 TRIzol RNA reagent (Invitrogen)，室溫靜置 5 分鐘，將溶液移至新的試管中，加入 150 μ l phenol/chloroform (25:24:1, Amresco)，劇烈搖晃，以 12000 rpm 離心 5 分鐘，取上層液至新的試管，加入等體積 Isopropanol 上下翻轉，以 12000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 1 ml 75% 酒精清洗管壁 2 次，以 12000 rpm 離心 5 分鐘，將試管的沉澱物風乾，最後加 20 μ l DEPC-H₂O 回溶，並利用核酸濃度測定儀 (ELISA Reader, Biotek)，測定 O.D 值應在 1.8 至 2.0 之間為佳，最後保存於 -80°C。之後使用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 將 RNA 反轉錄成 cDNA。PCR 反應條件：取 2 μ g RNA、2 μ l 10× RT buffer、2 μ l 10× Random primers、1 μ l MultiScribe reverse transcriptase、0.8 μ l 25× dNTP mix (100 mM)，最後用 DEPC-H₂O 將體積補至 20 μ l，經由熱循環機器 (Thermal cycler Biocycler TC-S, BioSan) 進行 RT-PCR 反應。RT-PCR 反應條件為：25°C 作用 10 分鐘、37°C 作用 120 分鐘、85°C 作用 5 分鐘，反應結束後，保存於 4°C。

8. 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Q-PCR)

以 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 進行反應試劑的準備，並以 StepOnePlus system (Applied Biosystems) 進行反應，反應條件：取 1 μ l 100 ng cDNA、5 μ l 2×SYBR green、0.5 μ l 10 μ M Forward primer、0.5 μ l 10 μ M Reverse primer、3 μ l MQ。選擇 SYBR-green protocol，反應條件為：95°C 作用 10 分鐘，95°C 作用 15 秒、60°C 作用 60 秒進行 40 個循環，最後再利用 StepOne Software v2.1 軟體 (Applied Biosystems) 分析進行數據分析。

9. TaqMan RT-PCR 檢測 miRNA 表現

取 1-10 ng total RNA 與 7 μ l master mix 與 3 μ l primer 均勻混勻，放置於冰上 5 分鐘，以反轉錄反應

(reverse transcription)進行cDNA製備，反應條件如下：holding stage, 16°C 反應30分鐘，42°C 反應30分鐘，85°C 反應5分鐘。cDNA製備後，取100 ng cDNA, 以TaqMan RT-PCR偵測特定miR-320

(TaqMan MicroRNA Assay Kit, Applied Biosystems) 及相關路徑基因的表現分析，並以RNU6B為內生性控制基因。real time-PCR定量分析反應於20 µl反應體積下進行，包含10 µl 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、1.33 µl 100 ng/µl cDNA、1 µl 20X TaqMan miRNA Assay (primer with TaqMan label) 及7.67 µl Nuclease-free water，反應條件如下： holding stage, 50°C 反應2分鐘，95°C 反應10分鐘；Cycling stage, 95°C 反應15秒鐘，60°C 反應1分鐘，40個循環，結果以GraphPad Prism Version 5.0 Software進行統計分析。

10. MTT assay 細胞存活率試驗

經處理後的實驗細胞(濃度 1×10^5 cells/mL)，去除培養液後，加入 10 µl MTT (5 mg/mL) 於 37°C 作用 4 小時後，去除上清液，最後加入 100 µl DMSO 靜置 10 分鐘後，以 ELISA reader 測定波長 570 nm 下之吸光值。結果數據以平均值±標準差 (Mean ± SD) 之行式表示。統計分析以 one way ANOVA 方式分析實驗數據之統計學意義，統計結果之 P 值 < 0.05 視為具備統計學上之意義。

11. 細胞 LRWD1 的免疫螢光染色

先將實驗細胞培養於已 coating 0.5% Poly-L-lysine 的玻片上，37°C 烘乾，以冰甲醇固定細胞於 -20°C 泡置 10 分鐘，用 TBS 清洗 2 次各 5 分鐘；免疫筆劃出區塊，用 0.3% Triton x-100/PBS 覆蓋區塊 1 小時，使膜通透性變好，用 TBS 清洗 2 次各 5 分鐘，以 3% BSA blocking buffer 來 blocking，室溫 1 小時；再以 1% BSA 來稀釋 LRWD1 抗體 (1:100)，先於室溫作用 1 小時後，在置於 4°C overnight。隔天以 0.05% 的 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘；以 Alex 488 的螢光二級抗體來作用 1 小時 (此步驟後都需避光)，用 0.05% 的 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘；以 5 µg/ml 的 DAPI (Sigma) 來染核酸，4 分鐘反應後，用 TBS rinse 一下；使用 MitoTracker (Invitrogen) 來染 mitochondrion 位置 20 分鐘後，以 TBS 清洗 2 次，每次 5 分鐘，風乾封片後，以螢光顯微鏡觀察。

12. LRWD1 蛋白表現分析 (Western blot)

培養於 6-well 培養皿的實驗細胞以 1X PBS 清洗後，分別加入 100 µL 的 lysis buffer，用細胞刮杓將細胞刮下，將細胞移至 1.5 ml eppendorf 中，置於冰上作用 30 分鐘，每 10 分鐘 vortex 一次。於 4°C 10000 rpm 離心 25 分鐘，取上清液置新的 1.5 ml eppendorf，此為總蛋白質液。取 2 µL 總蛋白質液加入 198 µL 的 Bio-Rad protein assay dye reagent，混合均勻後，以分光光譜儀 OD₅₉₅ 測量定量。將蛋白質液以 10% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)，以電壓 100 伏特 1.5 小時，進行蛋白質電泳分析後，將分離的蛋白質以電壓 100 伏特 2 小時，轉漬到 PVDF 膜上。將轉漬好的 PVDF membrane 以 0.1% TBST (0.1% Tween 20/1X TBS) 清洗兩次，以 blocking buffer (5% non-fat milk/0.05% TBST) 進行 blocking，置於 shaker 上搖晃 50 rpm、室溫 1 小時，阻隔非特异性結合。將 rabbit anti-LRWD1 抗體 (Cell Signaling) 以 1:2000 稀釋，將稀釋後的抗體覆蓋於 PVDF membrane 上，放置 shaker 上搖晃 50 rpm、4°C 冰箱 16 小時。以 0.1% TBST 清洗 15 分鐘，清洗後加入以 1:2000 稀釋的 goat anti-rabbit HRP，置於 shaker 上搖晃 50 rpm、室溫 1 小時，以 0.1% TBST 清洗 15 分鐘。接著使用 Enhanced-chemiluminescence (HRP substrate luminal reagent; HRP substrate peroxide solution = 1:1) 混合，並且以沾著方式使 ECL 附著於 PVDF membrane 正面，將 PVDF membrane 置於透明投影片，去除多餘的 ECL 與氣泡，以 MultiGel-21 (TOP BIO) 進行影像掃描及 ImageJ 軟體進行定量分析。

第二年研究

1. 免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry, IHC)

以切片機切成 5 µm 的薄片，平鋪在載玻片上經乾燥後使用或保存。以切片好的睪丸組織置

於70°C烤箱烘烤30分鐘，使睪丸組織更貼附於玻片，將睪丸組織脫臘復水則分別浸至100% xylene 3分鐘共2次、100%酒精30秒、90%酒精30秒、80%酒精30秒、70%酒精30秒，以流水沖10分鐘，接著以3% hydrogen peroxide /methanol中作用15分鐘，利用1X TBS清洗2次5分鐘，於0.01M citrate buffer (pH6.0)以微波爐微波加熱2次每次3分鐘，使組織的抗原決定位裸露，以1X TBS清洗2次每次5分鐘，在以免疫筆圈出組織範圍，並以DAKO antibody diluent and with background reducing components blacking於室溫進行blocking共60分鐘後，一級抗體以DAKO antibody diluent and with background reducing components blacking稀釋，並置於4°C反應一個晚上。第二天以1X TBS清洗3次每次5分鐘，將Biotinlated link anti-mouse and anti-rabbit Ig以1:10稀釋後加入組織中室溫作用1小時，之後以0.02% TBST清洗3次每次5分鐘，再加入Streptavidin-HRP於室溫作用30分鐘，以1X TBS清洗3次每次5分鐘，將DAB substrate以1:10稀釋後加入組織中在室溫作用，呈色完畢後以ddH₂O停止DAB作用，以Hematoxylin染細胞核，染色完成後分別以70%酒精30秒、80%酒精30秒、90%酒精30秒、100%酒精30秒、100% Xylene 3分鐘共2次使組織脫水，以Entellan封片，並將玻片放在溫度60°C下、烤乾30分鐘，最後在光學顯微鏡下觀察組織中Septin12的表現情況，並拍照紀錄。並以光學顯微鏡觀察結果。

2. 從細胞中分離總外泌體

收集細胞的培養液後離心 3000 g for 5 min，所得的上清液以 ExoQuick (BioCat, Heidelberg, Germany)萃取所有總外泌體(total exosomes)。5 mL 上清液與 1mL ExoQuick exosome precipitation solution 在 4 °C 作用 30 min 離心 1500 g for 30 min，去除上清液，再過 5 分鐘以去除殘留的液體後，將沈澱物以 PBS (phosphate-buffered saline) (Life Technologies, Darmstadt, Germany) 溶液回溶，此即外泌體萃取液(Pan et al. 2018)。

3. CA125 定量分析

細胞培養液以離心 1000xg, 10mins 後取出上清液，以 ELISA-Kit-for-Carbohydrate-Antigen-125-(CA125) (cloud-clone, SEA154Hu) 進行 CA125 的定量分析。

4. 細胞遷移分析 (Wound Healing Assay)

細胞培養於 4 well 培養盤約細胞密度為 70%-90%，以 lipofectamine 3000 Reagent 進行 miR-320a mimic 及 inhibitor 的細胞轉型作用，放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱進行轉染 24 小時。取出 4 well plate 觀察細胞的生長狀態。進行 Wound Healing Assay，使用直尺及 1000 µl tip 進行細胞劃痕，用直尺量測細胞劃痕的位置，再使用 1000 µl tip 對準 well 所劃痕的位置進行劃痕，之後在 well 內加入 200 µl 1x PBS 清洗細胞一次，之後去除 1x PBS，再加入 500 µl H-DMEM Medium (5% Fetal Bovine serum (FBS)、5% Bovine Calf Serum (BCS)、1% Antibiotic-Antimycotic Solution、1% L-Glutamine Solution)，放置顯微鏡下觀察細胞劃痕後的狀況。分別於 12 小時及 24 小時觀察並測量細胞移動的情況，並且以 Nikon(DS-Ri2)正立顯微鏡進行細胞劃傷後的拍攝。使用 NIS-Elements D.50.0064bit 軟體進行拍攝後影像的編輯與存取。細胞劃痕面積公式:細胞原始劃痕面積-細胞劃痕後爬行面積/細胞原始劃痕面積 x100%進行計算與統計。以 GraphPad Prism 5 軟體進行數值。

5. 細胞侵入分析 (Cell invasion assay)

細胞培養於 4 well 培養盤約細胞密度為 70%-90%，以 lipofectamine 3000 Reagent 進行 miR-320a mimic 及 inhibitor 的細胞轉型作用，放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱進行轉染 24 小時後，取出 4 well plate 觀察細胞的生長狀態。使用不含血清的 H-DMEM Medium 配製 0.1% Matrigel, Transwell 中加入 100 µl 0.1% Matrigel Mixer，放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱 2 小時。細胞計數後，以 H-DMEM medium (不含血清)將細胞液調為 2.5×10⁵ cell/ml，取 200 µl 細胞液加到 Transwell 中。將裝有 Transwell 的 24 well plate 放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱，進行細胞侵襲反應 24 小時後，洗後將 Transwell 夾放至外用的 24 well plate 中，加入 1 ml 3.7% Formetaldehyde，放置室溫下靜置 10 分鐘，目的是為了固定細胞(整個 Transwell 需完全浸泡)。將 3.7% Formetaldehyde 去除回收至 15 ml tube 中，先用 1x PBS 清洗 Transwell，加入 1 ml 99.9% Methanol，放置室溫下靜置 20

分鐘，目的是為了染色時能通透細胞。去除 99.9% Methanol 回收至 15 ml tube 中，用 1x PBS 清洗 Transwell 後，再加入 1 ml 1% crystal violet，並用鋁箔紙或遮蓋物進行避光，並放置室溫下染色 15 分鐘，之後將 1% crystal violet 去除回收至 15 ml tube 中，用 1xPBS 清洗 Transwell 2 次，使用滅菌過的棉花棒，刮除 Transwell 內未通過的細胞，染色後將 Transwell 放至正立顯微鏡下，進行鏡檢確認染色後的狀況。使用 NIS-Elements D.50.0064bit 軟體進行拍攝後影像的編輯與存取。細胞圖檔利用 image J 進行細胞計數，以計算倍率 10x 細胞圖，將所測得的細胞數目進行統計分析，使用 GraphPad Prism 5 軟體進行數值上的分析。

*其他與第一年研究類似的研究方法，例如：細胞中 miRNA 的萃取、TaqMan Real-Time PCR 檢測 miR-320a 及 LRWD1 基因表現、細胞 LRWD1 的免疫螢光染色及 LRWD1 蛋白表現分析 (Western blot) 及細胞內過氧化氫和超氧陰離子含量測定 (O₂·、H₂O₂) 等，則會參考第一年的研究方法與成果加以修正及運用，不再贅述。

計畫主持人(申請人)簽名

108 年 11 月 21 日

生物實驗安全委員會查覈欄 (以上基因重組實驗資料，由生物實驗安全委員會覈實同意並核章後，發還申請人並保留影本。任一項目不合適或不完備，則退還請申請人改善或更正。)

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱 MiR-320 和 LRWD1 在卵巢癌發展中的調控作用，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗室廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性化學物質及有害廢棄物管理要點」及「國立臺南大學職業安全衛生工作守則」等相關規範辦理及執行。特立此切結為憑，如有不實，願自負一切法律責任。

此致

國立臺南大學

申請人：

(親簽章)

中 華 民 國 108 年 11 月 20 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	MiR-320 和 LRWD1 在卵巢癌發展中的調控作用		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 符合基因重組實驗相關規範，請確實依照規範進行實驗。 2. 實驗產生之廢棄物請遵照生物廢棄物清運標準進行後續處理。 		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	108年12月05日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	MiR-320 和 LRWD1 在卵巢癌發展中的調控作用		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	實驗步驟詳細，同意進行		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	108年 11月 26日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學基因重組實驗申請同意書

附表一

凡進行基因重組實驗須由計畫主持人或實驗負責人填寫本表，送本校生物實驗安全委員會覈實同意並簽名後，發還申請人並保留影本。向有關機構申請研究計畫經費時，將影本隨附於計畫書備查。研究計畫核准後，所進行之基因重組實驗須與填寫內容相符，如實驗變更至更高安全等級，須再另填寫「申請同意書」報請生物實驗安全委員會同意。

研究計畫名稱：Mir-25-3p 與 Mir-17-5p 對泛素信號途徑之調控

計畫主持人：_____ 職稱：_____ 電話及傳真：_____

執行機構、系所：_____國立台南大學生物科技學系_____

- 1、實驗內容： 是否進行基因重組之實驗？ -----是
是否進行微生物培養的實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之動物實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之植物實驗？ -----是
是否為自交植物？ -----是

2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）

a.重組基因來源名稱：_____ Ub^{G76V}-YFP _____

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群，動物，植物

b.進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：_____ *E. coli* _____

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群

c.進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：_____ A549, HepG2 細胞 _____

3、基因轉殖實驗設備及轉殖方法

a.具備之基因轉殖之動物實驗設備：SPF 設備； IVC 設備；

其他〔名稱〕_____ 細胞培養箱 _____

b.具備之基因轉殖之植物實驗設備：生長箱； 溫室； 農場；

其他〔名稱〕_____

c.基因轉殖方法：virus； microinjection； liposome； gene gun； Agrobacterium

其他〔名稱〕_____

4、進行本研究所需之安全等級：P1 P2 P3 P4

5、進行本研究之實驗室 _____ 其生物安全等級：P1

如進行實驗安全等級 P2 以上之實驗研究，請提供共同計劃基因重組實驗申請同意書，以供查證。

進行本研究之實驗室 _____ 其生物安全等級：P2 P2+ P3 P4

6、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟

實驗目的及詳細實驗步驟：

一、實驗目的：泛素化降解途徑廣泛存在每個細胞中。想了解多酚類化合物對去泛素化酵素作用機轉，因此製造 mRFP-Ub 或 Ub^{G76V}-YFP 重組蛋白，以利於研究。

二、實驗詳細步驟：將一段含有泛素的DNA序列，利用設計出的引子synthetic forward and reverse oligonucleotides fp 5'-GCTAGCACCCACCATGGCCT-3' and rp5'-TAGATCCGGTGGATCCCGG-3'，以聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction；PCR）增幅片段。PCR機器(Thermo, Massachusetts)設定94°C→52.5°C→72°C循環後，藉由Clean and Gel Extraction Kit (BioKit, Taiwan) 將PCR產物中的雜質去除。接著PCR產物與T&A cloning vector (Yeastern, Taipei, Taiwan)接合並以heat shock方式送入勝任細胞中(DH5a)。接著送Gemomics 公司定序。

接著將轉型成功的 *E. coli* 以萃取質體，再以限制酶切，與也用相同限制酶切的載體 p3XFLAG-CMV-14 進行接合並以 heat shock 方式送入勝任細胞中(DH5a)。或將轉型成功的 *E. coli* 萃取質體，再送入 cell 中。

將細胞 (0.12×10^6 或 1×10^6 個細胞) 培養在 24 或 6 孔微量滴定板中，每孔 500 或 1000 μ L 培養基中生長 24 小時。使用 PolyJet 用 1 μ g Ub^{G76V}-YFP plasmid DNA 轉染細胞。轉染後 18 小時，將轉染細胞的培養基更換為 0.5mg / mL G418 二硫酸鹽。

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：_

108年 11 月 26 日

生物實驗安全委員會查覈欄 (以上基因重組實驗資料，由生物實驗安全委員會覈實同意並核章後，發還申請人並保留影本。任一項目不合適或不完備，則退還請申請人改善或更正。)

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱 Mir-25-3p 與 Mir-17-5p 對泛素信號途徑之調控，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗室廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性化學物質及有害廢棄物管理要點」及「國立臺南大學職業安全衛生工作守則」等相關規範辦理及執行。特立此切結為憑，如有不實，願自負一切法律責任。

此致

國立臺南大學

申請人：

(親簽章)

中 華 民 國 108 年 11 月 26 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108002	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	Mir-25-3p 與 Mir-17-5p 對泛素信號途徑之調控		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 符合基因重組實驗相關規範，請確實依照規範進行實驗。 2. 廢棄物請遵照生物廢棄物清運標準進行後續處理。 		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	108年12月05日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108002	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	Mir-25-3p 與 Mir-17-5p 對泛素信號途徑之調控		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	2019 年 12 月 11 日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學基因重組實驗申請同意書

附表一

凡進行基因重組實驗須由計畫主持人或實驗負責人填寫本表，送本校生物實驗安全委員會覈實同意並簽名後，發還申請人並保留影本。向有關機構申請研究計畫經費時，將影本隨附於計畫書備查。研究計畫核准後，所進行之基因重組實驗須與填寫內容相符，如實驗變更至更高安全等級，須再另填寫「申請同意書」報請生物實驗安全委員會同意。

研究計畫名稱：探討 Hyperoside 與 Isoliquiritigenin 對 USP8 於細胞訊息傳遞與免疫活化之調控

計畫主持人：_____ 職稱：_____ 電話及傳真：_____

執行機構、系所：_____國立台南大學生物科技學系_____

- 1、實驗內容：是否進行基因重組之實驗？ -----是
是否進行微生物培養的實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之動物實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之植物實驗？ -----是
是否為自交植物？ -----是

2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）

a. 重組基因來源名稱： Ub^{G76V}-YFP

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群，動物，植物

b. 進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱： E. coli

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群

c. 進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱： A549, HepG2 細胞

3、基因轉殖實驗設備及轉殖方法

a. 具備之基因轉殖之動物實驗設備：SPF 設備； IVC 設備；

其他〔名稱〕 細胞培養箱

b. 具備之基因轉殖之植物實驗設備：生長箱； 溫室； 農場；

其他〔名稱〕 _____

c. 基因轉殖方法：virus； microinjection； liposome； gene gun； Agrobacterium

其他〔名稱〕 _____

4、進行本研究所需之安全等級：P1 P2 P3 P4

5、進行本研究之實驗室 _____ 其生物安全等級：P1

如進行實驗安全等級 P2 以上之實驗研究，請提供共同計劃基因重組實驗申請同意書，以供查證。

進行本研究之實驗室 _____ 其生物安全等級：P2 P2+ P3 P4

6、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟

實驗目的及詳細實驗步驟：

一、實驗目的：泛素化降解途徑廣泛存在每個細胞中。想了解多酚類化合物對去泛素化酵素作用機轉，因此製造 mRFP-Ub 或 Ub^{G76V}-YFP 重組蛋白，以利於研究。

二、實驗詳細步驟：將一段含有泛素的DNA序列，利用設計出的引子synthetic forward and reverse oligonucleotides fp 5'-GCTAGCACCACCATGGCCT-3' and rp5'-TAGATCCGGTGGATCCCGG-3'，以聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction；PCR）增幅片段。PCR機器(Thermo, Massachusetts)設定94°C→52.5°C→72°C循環後，藉由Clean and Gel Extraction Kit (BioKit, Taiwan) 將PCR產物中的雜質去除。接著PCR產物與T&A cloning vector (Yeastern, Taipei, Taiwan)接合並以heat shock方式送入勝任細胞中(DH5a)。接著送Gemomics 公司定序。

接著將轉型成功的 *E. coli* 以萃取質體，再以限制酶切，與也用相同限制酶切的載體 p3XFLAG-CMV-14 進行接合並以 heat shock 方式送入勝任細胞中(DH5a)。或將轉型成功的 *E. coli* 萃取質體，再送入 cell 中。

將細胞 (0.12×10^6 或 1×10^6 個細胞) 培養在 24 或 6 孔微量滴定板中，每孔 500 或 1000 μ L 培養基中生長 24 小時。使用 PolyJet 用 1 μ g Ub^{G76V}-YFP plasmid DNA 轉染細胞。轉染後 18 小時，將轉染細胞的培養基更換為 0.5mg / mL G418 二硫酸鹽。

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：__

108 年 11 月 26 日

生物實驗安全委員會查覈欄 (以上基因重組實驗資料，由生物實驗安全委員會覈實同意並核章後，發還申請人並保留影本。任一項目不合適或不完備，則退還請申請人改善或更正。)

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱 探討 Hyperoside 與 Isoliquiritigenin 對 USP8 於細胞訊息傳遞與免疫活化之調控，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗室廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性化學物質及有害廢棄物管理要點」及「國立臺南大學職業安全衛生工作守則」等相關規範辦理及執行。特立此切結為憑，如有不實，願自負一切法律責任。

此致

國立臺南大學

申請人：_____

親簽章)

中 華 民 國 108 年 11 月 26 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討 Hyperoside 與 Isoliquiritigenin 對 USP8 於細胞訊息傳遞與免疫活化之調控		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 符合基因重組實驗相關規範，請確實依照規範進行實驗。 2. 實驗之廢棄物請遵照生物廢棄物清運標準處理。 		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	108年12月05日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237・663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討 Hyperoside 與 Isoliquiritigenin 對 USP8 於細胞訊息傳遞與免疫活化之調控		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	研究員若能確實遵守“基因重組實驗守則” 应是安全可行的。		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	108年12月5日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學基因重組實驗申請同意書

附表一

凡進行基因重組實驗須由計畫主持人或實驗負責人填寫本表，送本校生物實驗安全委員會覈實同意並簽名後，發還申請人並保留影本。向有關機構申請研究計畫經費時，將影本隨附於計畫書備查。研究計畫核准後，所進行之基因重組實驗須與填寫內容相符，如實驗變更至更高安全等級，須再另填寫「申請同意書」報請生物實驗安全委員會同意。

研究計畫名稱：探討維生素D調控前列腺癌分泌趨化因子影響間葉幹細胞促癌惡化的作用機轉

計畫主持人： 職稱： 電話及傳真：

執行機構、系所：國立臺南大學生物科技學系

- 1、實驗內容：是否進行基因重組之實驗？-----是
是否進行微生物培養的實驗？-----是
是否進行基因轉殖之動物實驗？-----是
是否進行基因轉殖之植物實驗？-----是
是否為自交植物？-----是

2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）

a. 重組基因來源名稱：human prostate cancer cells, pGL3-p-LUC, pRL-SV40, prCYP24-LUC

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群，動物，植物

b. 進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：E. Coli (DH5α)

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群

c. 進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：人類細胞株(PC-3, LNCaP)

3、基因轉殖實驗設備及轉殖方法

a. 具備之基因轉殖之動物實驗設備：SPF設備； IVC設備；

其他〔名稱〕CO2細胞培養箱

b. 具備之基因轉殖之植物實驗設備：生長箱； 溫室； 農場；

其他〔名稱〕

c. 基因轉殖方法：virus； microinjection； liposome； gene gun； Agrobacterium

其他〔名稱〕

4、進行本研究所需之安全等級：P1 P2 P3 P4

5、進行本研究之實驗室：

國立臺南大學榮譽校區 其生物安全等級：P1

如進行實驗安全等級 P2 以上之實驗研究，請提供共同計劃基因重組實驗申請同意書，以供查證。

進行本研究之實驗室 其生物安全等級：P1 P2 P2+ P3 P4

6、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟

實驗目的及詳細實驗步驟：

實驗目的：**For identification of the vitamin D directly regulated chemokines**

實驗步驟：

- (1) The promoters of candidate chemokines containing potential vitamin D response elements will be amplified by PCR reaction from genomic DNA of human prostate cancer cells, PC-3.
- (2) PCR products will be cloned into pGEM®-T easy vector using kit from Promega.
- (3) Constructed pGEM®-T plasmids will be transformed into DH5 α competent cells and selected.
- (4) The inserts will be released by restriction enzymes from pGEM®-T plasmids and sub-cloned into pGL3-p-LUC vector.
- (5) Constructed pGL3-p-LUC plasmids will be transformed into DH5 α competent cells and selected.
- (6) The pGL3-p-LUC plasmids containing promoters of candidate chemokines will be transfected into human cell lines (LNCaP and PC-3) together with pRL-SV40 using liposome. Meanwhile, the plasmids prCYP24-LUC containing promoter of rat *CYP24*, which is served as the positive control of vitamin D, will be transfected into cells as described in the above.
- (7) After transfection and treatment with vitamin D or vehicle controls, cells will be harvested for measurement of luciferase activity.

計畫主持人(申請人)簽名：_____

_____ 108年 11月 25日

生物實驗安全委員會查覈欄 (以上基因重組實驗資料，由生物實驗安全委員會覈實同意並核章後，發還申請人並保留影本。任一項目不合適或不完備，則退還請申請人改善或更正。)

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱探討維生素D調控前列腺癌分泌趨化因子對間葉幹細胞促癌惡化作用的影響，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗室廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性化學物質及有害廢棄物管理要點」及「國立臺南大學職業安全衛生工作守則」等相關規範辦理及執行。特立此切結為憑，如有不實，願自負一切法律責任。

此致

國立臺南大學

申請人：_____（親簽章）

中 華 民 國 108 年 11 月 25 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108004	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討維生素 D 調控前列腺癌分泌趨化因子影響間葉幹細胞促癌惡化的作用機轉		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	<p>(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p style="font-size: 1.2em;">研究人員若能確實遵守“基因重組實驗守則” 應是可行的。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	108年12月3日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表

案件編號	GR108004	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討維生素 D 調控前列腺癌分泌趨化因子影響間葉幹細胞促癌惡化的作用機轉		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) 請遵照國科會基因重組實驗守則		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	108年 12月 5日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

