

國立臺南大學 110 年度生物實驗安全委員會會議紀錄

時間：110 年 12 月 15 日(星期三)中午 12 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謝宗欣老師、生態暨環境資源學系張原謀老師、生物科技學系鄧燕妮老師、生物科技學系張翠玲老師、生物科技學系黃銘志老師、總務處環安組丁慧如組長

列席者：

壹、主席致詞

謝謝各位委員與會，那我們就直接進行議程討論。

貳、工作報告

一、110 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：GR110001(P.3-P.8)

申請人：生物科技學系張翠玲老師

計畫名稱：探討泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統作為偵測蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制的分析平台之可行性

2. 計畫編號：GR110002(P.9-P.25)

申請人：生物科技學系丁慧如老師

計畫名稱：探討天然物之新型糖苷衍生物於預防癌化的效用與機制

3. 計畫編號：GR110003(P.26-P.41)

申請人：生物科技學系鄧燕妮老師

計畫名稱：維生素 D3 對於睪丸細胞 LRWD1 的轉錄調控作用

4. 計畫編號：GR110004(P.42-P.48)

申請人：生物科技學系張德生老師

計畫名稱：建立能夠生產皂苷的基因轉殖靈芝之研究

上述4件計畫，已全數審查完畢。

參、提案討論

國立臺南大學110年度第1次「生物實驗安全委員會議」案表

項次	提案事項	提案單位	頁數
一	有關計畫編號GR110001、GR110002、GR110003、GR110004 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 GR110001、GR110002、GR110003、GR110004 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 GR110001、GR110004，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.7-P.8、P.47-P.48)。
- 二、計畫編號 GR110002、GR110003，初審委員審議「修正後，複審決議」，申請者提供相關資料說明，意見回覆資料如附件(P.13-P.25、P.32-P.41)，是否同意進行，提請討論？
- 三、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：照案通過

肆、臨時動議：無

伍、散會(12:25)

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：探討泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統作為偵測蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制的分析平台之可行性

計畫主持人： 職稱： 教授 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：

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〕

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

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

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 UbG76V-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 (0.12×10⁶ 或 1×10⁶ 個細胞) 培養在 24 或 6 孔微量滴定板中，每孔 500 或 1000μL 培養基中生長 24 小時。使用 PolyJet 用 1μg UbG76V-YFP plasmid DNA 轉染 A549, HepG2 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：

110 年 11 月 23 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 探討泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統作為偵測
蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制的分析平台之可行
性，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗場
所廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性及關注化學物質
與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 110 年 11 月 23 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表
(初審)

案件編號	GR110001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統作為偵測蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制的分析平台之可行性		
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 style="text-align: center;">(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="text-align: center; font-size: 1.2em;">1. 請確實遵守實驗室安全守則，實驗廢棄物要滅菌消毒。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	110年11月30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
(初審)

案件編號	GR110001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統作為偵測蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制的分析平台之可行性		
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 style="text-align: center;">(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="text-align: center;">請依照「科技部基因重組實驗守則」及本校相關規定進行相關實驗。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	110年11月30日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 21331111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

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 investigating the effect of glycosylated derivatives from natural products on DNA repair function.**

實驗步驟：

(1) For NHEJ assay, non-malignant cells (BPH-1 and RWPE-1) will be treated with vehicle or various concentration of glycosylated natural products for 24 h, then transfected with restriction enzyme HindIII digested GFP expression plasmids, pGFP-Pem1-Ad2 ($0.5 \mu\text{g}/10^5$ cells), and pDsRed-N1 ($0.5 \mu\text{g}/10^5$) for transfection control. Cells will be harvested two days after transfection. The efficiency of NHEJ repair will be analyzed using flow cytometry to quantify GFP positive cells, which represent successful NHEJ DNA repair, and normalized by DsRed positive cells.

(2) For HR assay, non-malignant cells (BPH-1 and RWPE-1) will be treated with vehicle or various concentration of glycosylated natural products for 24 h, then transfected with plasmids for HR assay (pDR-GFP and pC β ASce, both at $0.35 \mu\text{g}/10^5$ cells), and pDsRed-N1 ($0.3 \mu\text{g}/10^5$) for transfection control. Cells transfected with pDR-GFP plasmid will be selected by puromycin for two days then harvested at day 6 after transfection. Cells will be analyzed for GFP positive cells under flow cytometry. The efficiency of HR repair will be calculated as GFP positive cells/RFP positive cells.

實驗目的：**For investigating the anti-inflammatory mechanism of glycosylated derivatives from natural products.**

實驗步驟：RAW264.7 cells will be seeded on 24-well plates (5×10^4 cells/well). After cells attached for overnight, cells will be transfected with pNF- κ B-Luc reporter ($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$) and pRL-SV40 ($10 \text{ ng}/\text{well}$). After 24 h, cells will be treated with vehicle or various concentration of natural products' glycosylated derivatives for another 24 h. Luciferase activity will be analyzed by Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System according to the manufacturer's instruction (Promega). The NF- κ B transactivity will be calculated as Firefly luciferase activity/Renilla luciferase activity. The relative NF- κ B transactivity will be calculated by setting vehicle control as 1, and the mean \pm S.D. of triplicates plotted.

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 110 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 探討天然物之新型糖苷衍生物於預防癌化的效用與機制，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗場所廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性及關注化學物質與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 110 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
(初審)

案件編號	GR110002	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討天然物之新型糖苷衍生物於預防癌化的效用與機制		
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)		
	<p>研究員若能確實遵守"基因重組實驗守則"的規範， 科技部 應可同意進行。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	110年12月2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
(初審)

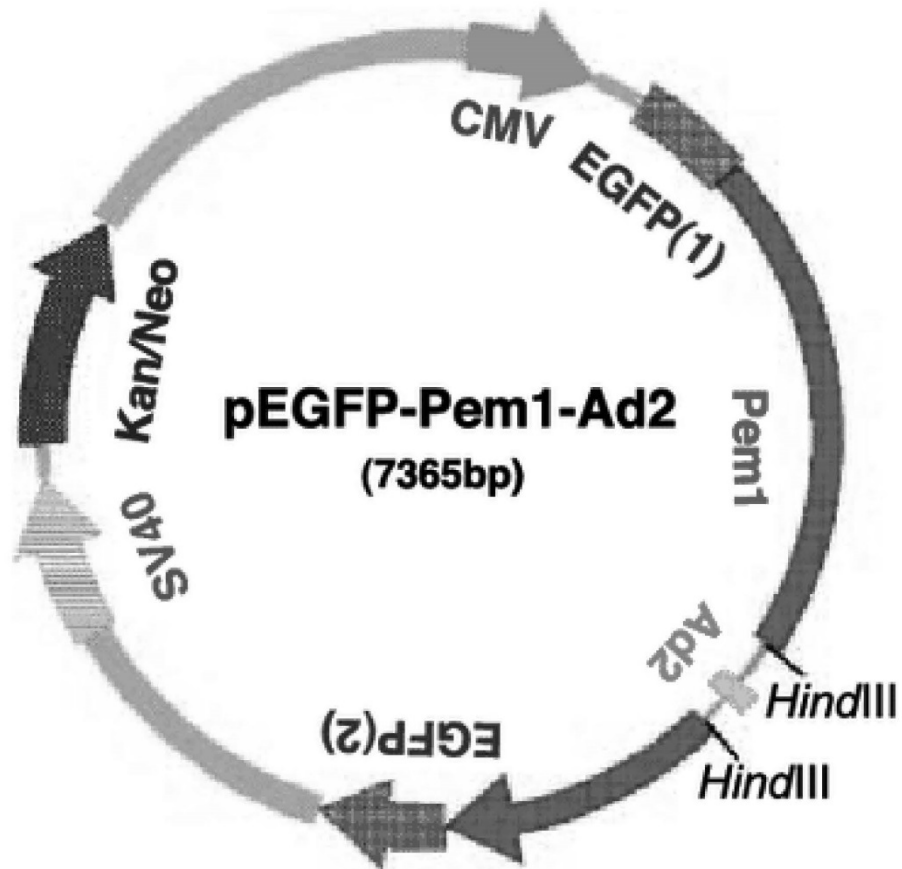
案件編號	GR110002	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討天然物之新型糖苷衍生物於預防癌化的效用與機制		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	<p>1. 本件“探討天然物之新型糖苷衍生物於預防癌化之效用與機制”計畫中，涉及基因轉殖部分之重組基因來源之載體有多種。應提供實驗中使用之各種載體結構作為書面審查依據。 (請參考文獻: Shahi, A., Lee, J. H., Kang, Y., Lee, S. H., Hyun, J. W., Chang, I. Y., ... & You, H. J. (2011). Mismatch-repair protein MSH6 is associated with Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. <i>Nucleic acids research</i>, 39(6), 2130-2143.)</p> <p>2. 此重組基因之細胞株已非自然細胞株，釋放於自然界有可能造成潛在危機，申請書中應敘明實驗完成後如何處理重組基因之細胞株。</p> <p>3. 公文系統中建議增加中文說明，英文縮寫應加註英文全名。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	2021年12月6日

聯絡窗口：

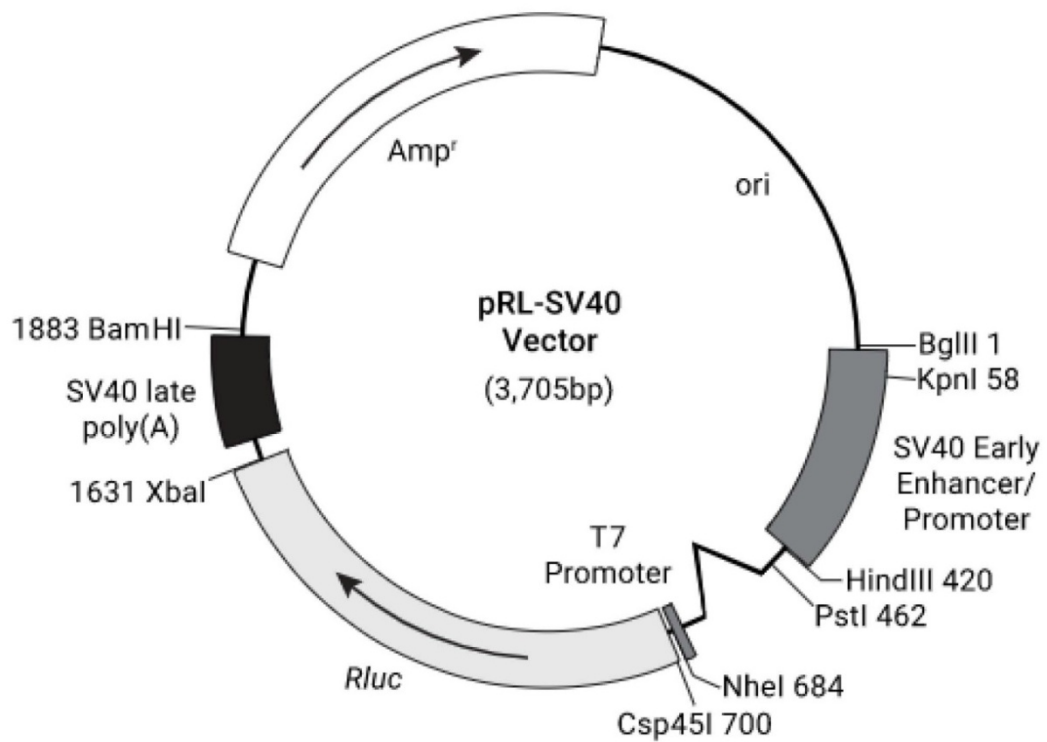
聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663
 E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會初審
審核意見回覆

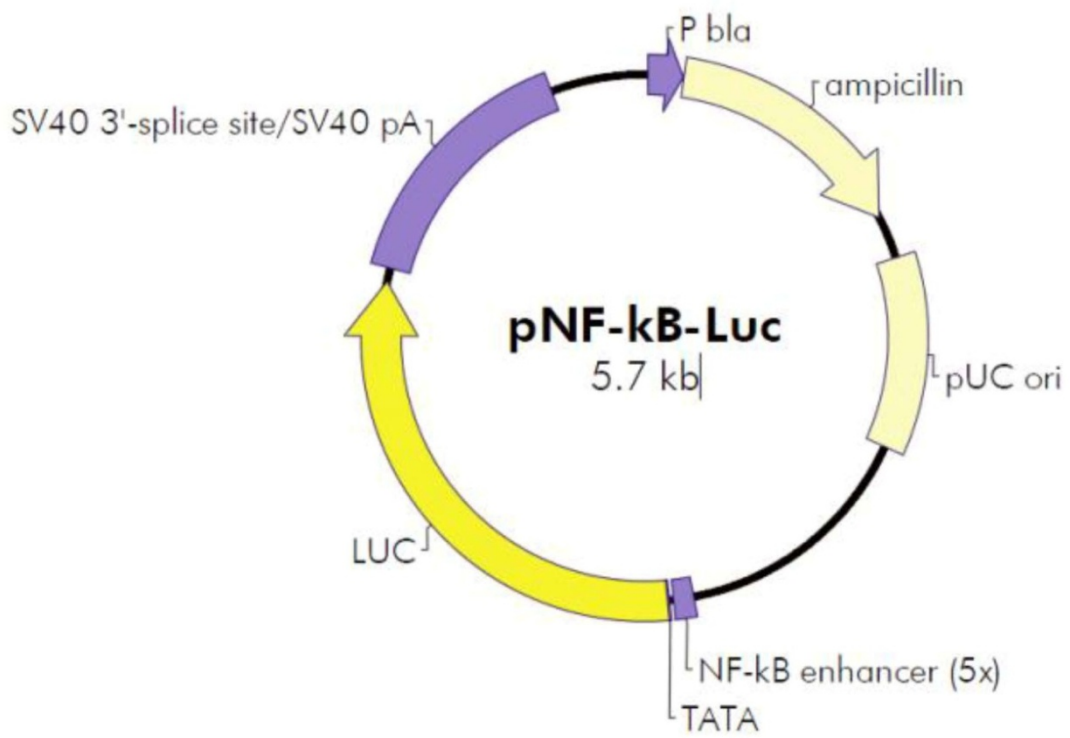
案件編號	GR110003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討天然物之新型糖苷衍生物於預防癌化的效用與機制		
審 查 意 見 登 中 請 者 回 覆	<p>委員審查意見</p> <p>1.本件“探討天然物之新型糖苷衍生物於預防癌化之效用與機制”計畫中，涉及基因轉殖部分之重組基因來源之載體有多種。應提供實驗中使用之各種載體結構作為書面審查依據。 (請參考文獻: Shahi, A., Lee, J. H., Kang, Y., Lee, S. H., Hyun, J. W., Chang, I. Y., ... & You, H. J. (2011). Mismatch-repair protein MSH6 is associated with Ku70 and regulates DNA double-strand break repair. <i>Nucleic acids research</i>, 39(6), 2130-2143.)</p> <p>2. 此重組基因之細胞株已非自然細胞株，釋放於自然界有可能造成潛在危機，申請書中應敘明實驗完成後如何處理重組基因之細胞株。</p> <p>3. 公文系統中建議增加中文說明，英文縮寫應加註英文全名。</p> <p>申請者回覆：</p> <p>1. 附上載體結構圖，供委員審查。</p> <p>2. 在申請書的實驗步驟加入以下敘述： After finishing assay, cells transfected with recombinant plasmids will be collected, treated with 10% bleach, sit overnight, then disposed via sink drain. Culture dishes, containers and materials that contact transfected cells will be disposed in biological hazardous waste bags.</p> <p>3. 加入中文說明，並將英文縮寫加註英文全名。</p>		
申請者簽章		回覆日期	110年 12 月 7 日



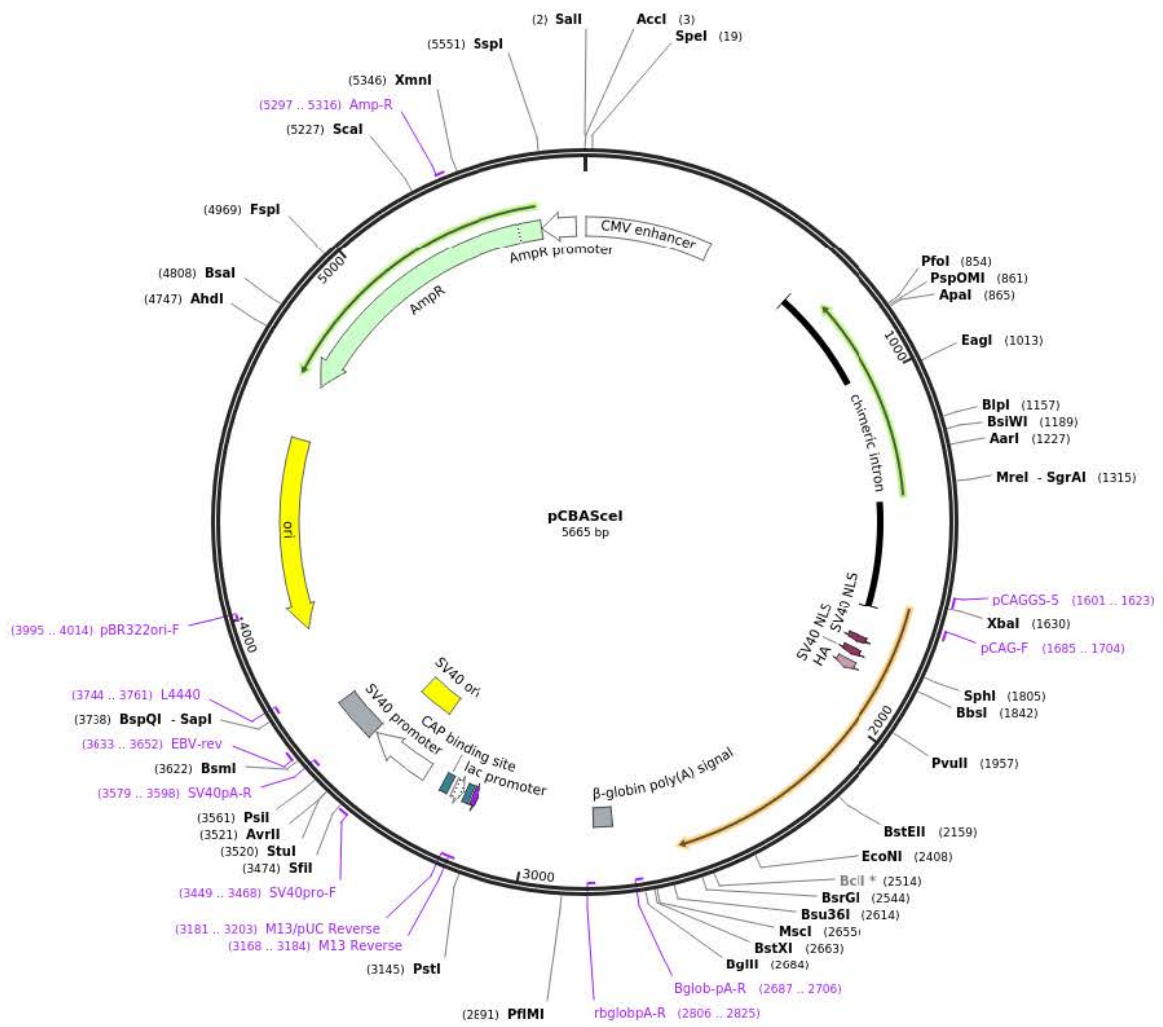
Wang H, Rosidi B, Perrault R, Wang M, Zhang L, Windhofer F, Iliakis G. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4020-30.



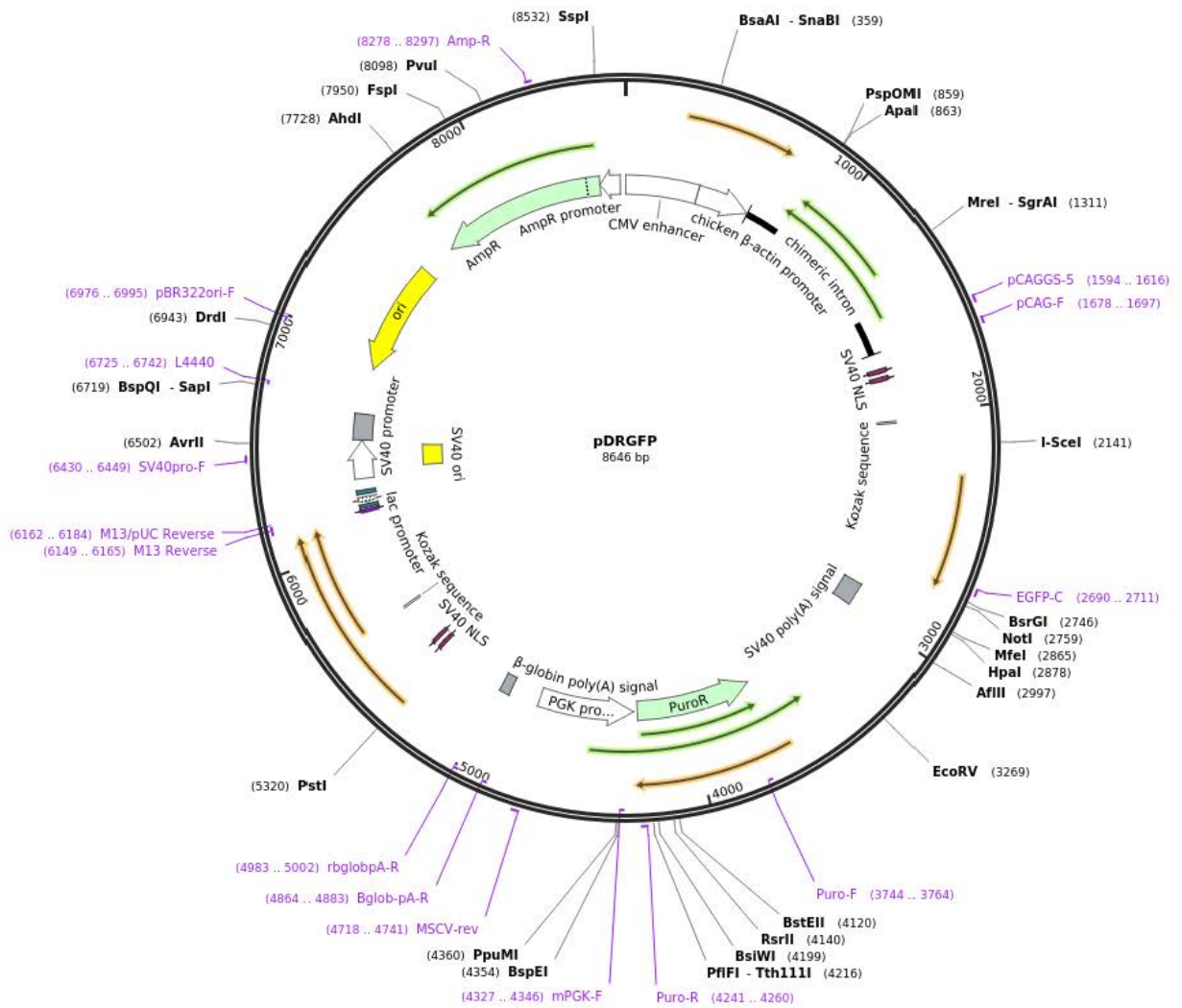
<https://worldwide.promega.com/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/?catNum=E2231>



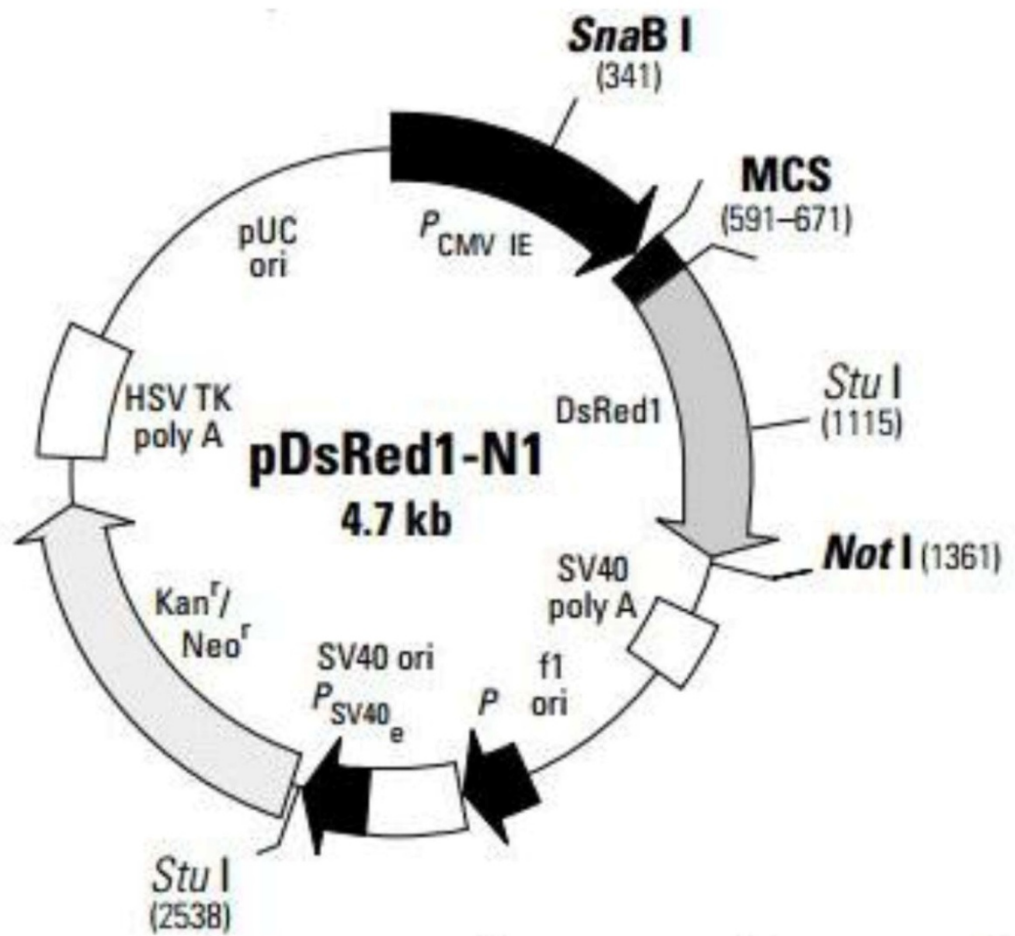
<http://www.biofeng.com/zaiti/dachang/pNF-%CE%BAB-Luc.html>



<https://www.addgene.org/26477/>



<https://www.addgene.org/26475/>



<http://www.geneppl.com/productinfo.php?id=808414>

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(一)：For investigating the effect of glycosylated derivatives from natural products on DNA repair function. 探討天然物之糖苷衍生物影響 DNA 修復功能的效用。

實驗步驟：

(1) For none-homologous end-joining (NHEJ) DNA repair assay, non-malignant cells (BPH-1 and RWPE-1) will be treated with vehicle or various concentration of glycosylated natural products for 24 h, then transfected with restriction enzyme HindIII digested green fluorescence protein (GFP) expression plasmids, pGFP-Pem1-Ad2 ($0.5 \mu\text{g}/10^5$ cells), and green fluorescence protein (RFP) expression plasmids pDsRed-N1 ($0.5 \mu\text{g}/10^5$) for transfection control. Cells will be harvested two days after transfection. The efficiency of NHEJ repair will be analyzed using flow cytometry to quantify GFP positive cells, which represent successful NHEJ DNA repair, and normalized by RFP positive cells.

對於非同源末端連接 (non-homologous end joining, NHEJ) DNA 修復檢測，非惡性細胞 (BPH-1 和 RWPE-1) 將用溶劑或不同濃度的天然物之糖苷衍生物處理 24 小時，然後轉染用限制性內切酶 HindIII 消化的綠色螢光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 表達質體、pGFP-Pem1-Ad2 ($0.5 \mu\text{g}/10^5$ 個細胞) 和紅色螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 表達質體 pDsRed-N1 ($0.5 \mu\text{g}/10^5$) 作為轉染控制。轉染兩天後收穫細胞，以流式細胞儀分析量化 GFP 陽性細胞，這代表成功的 NHEJ DNA 修復，並以 RFP 陽性細胞標準化後計算 NHEJ DNA 修復的效率。

(2) For homologous recombination (HR) DNA repair assay, non-malignant cells (BPH-1 and RWPE-1) will be treated with vehicle or various concentration of glycosylated natural products for 24 h, then transfected with plasmids for HR assay (pDR-GFP and pC β ASce, both at $0.35 \mu\text{g}/10^5$ cells), and pDsRed-N1 ($0.3 \mu\text{g}/10^5$) for transfection control. Cells transfected with pDR-GFP plasmid will be selected by puromycin for two days then harvested at day 6 after transfection. Cells will be analyzed for GFP positive cells under flow cytometry. The efficiency of HR repair will be calculated as GFP positive cells/RFP positive cells.

對於同源重組 (homologous recombination, HR) DNA 修復分析，非惡性細胞 (BPH-1 和 RWPE-1) 將用溶劑或不同濃度的天然物之糖苷衍生物處理 24 小時，然後轉染用於 HR 分析的質體 (pDR-GFP 和 pC β ASce，均以 $0.35 \mu\text{g}/10^5$ 個細胞) 和 pDsRed-N1 ($0.3 \mu\text{g}/10^5$) 作為轉染控制。轉染的細胞將通過嘌呤黴素篩選兩天，然後在轉染後第 6 天收集細胞，以流式細胞儀分析 GFP 及 RFP 陽性細胞數。以計算 GFP 陽性細胞數/RFP 陽性細胞數作為 HR 修復的效率。

實驗目的(二)：For investigating the anti-inflammatory mechanism of glycosylated derivatives from natural products. 探討天然物之糖苷衍生物的抗發炎機轉。

實驗步驟: RAW264.7 cells will be seeded on 24-well plates (5×10^4 cells/well). After cells attached for overnight, cells will be transfected with pNF- κ B-Luc reporter (0.5 μ g/well) and pRL-SV40 (10 ng/well) as transfection control. After 24 h, cells will be treated with vehicle or various concentration of natural products' glycosylated derivatives for another 24 h. Luciferase activity will be analyzed by Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System according to the manufacturer's instruction (Promega). The NF- κ B transactivity will be calculated as Firefly luciferase activity/Renilla luciferase activity. The relative NF- κ B transactivity will be calculated by setting vehicle control as 1, and the mean \pm S.D. of triplicates plotted.

RAW264.7 細胞將接種在 24 孔板 (5×10^4 個細胞/孔) 上。細胞貼壁隔夜後，將 pNF- κ B-Luc 報告基因質體 (0.5 μ g/孔) 和 作為轉染效率的 pRL-SV40 質體 (10 ng/孔) 轉染細胞。24 小時後，細胞將用溶劑或不同濃度的天然物之糖苷衍生物再處理 24 小時。冷光酶活性將根據製造商的說明 (Promega) 通過 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 進行分析。將計算螢火蟲冷光酶活性/海腎冷光酶活性作為 NF- κ B 的轉錄活性，將控制組的數值設置為 1，計算相對值，以三重複的平均值 \pm S.D. 作圖。

After finishing assay, cells transfected with recombinant plasmids will be collected, treated with 10% bleach, sit overnight, then disposed via sink drain. Culture dishes, containers and materials that contact transfected cells will be disposed in biological hazardous waste bags.

以上檢測完成後，將收集轉染重組質體的細胞，用 10% 漂白劑處理，靜置過夜，然後棄置於排水槽。接觸轉染細胞的培養皿、容器和材料將收集在生物危險廢棄物袋中做後續處理。

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 110 年 12 月 7 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

6、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟

1) 細胞培養

人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma), 培養液: 90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% fetal bovine serum, pH 值 7.2-7.4) 及人類正常睪丸 Hs 181.Tes 細胞 (human normal testis), 培養液: 90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% fetal bovine serum, pH 值 7.2-7.4) 培養於 37°C、5% CO₂、相對飽和濕度 95% 的細胞培養箱, 作為後續實驗的分析。

2) pGL3 basic-LRWD1 promoter (含 p53 結合區) 轉殖質體構築

將 LRWD1 基因上游區域含有 p53RE 位置的轉錄起始點附近約 0.6 kb (-515 至 +53) 片段, 以生物資訊軟體 Vector NTI 分析限制酵素切點 (Restriction Enzyme Map Analysis), 挑選 NheI 及 HindIII 作為轉殖質體構築的限制酵素。於正向引子 (Forward primer) 接上 NheI 限制酵素辨識位置 (CTA-G↓CTAGC) 和反向引子 (Reverse primer) 接上 HindIII 限制酵素辨識位置 (A↓AGCTT-GGG), 經 PCR 反應所得的產物與 pGL3-Basic vector 正向相接, 完成 pGL3 basic-LRWD1 promoter 轉殖質體構築。(本研究團隊已經在先期研究已完成 pGL3 Basic-LRWD1 promoter 的構築)

3) 轉殖質體使細胞大量表現 (overexpression)

進行轉染作用 (transfection) 的前一天, 將細胞數 1.0×10^5 的人類正常睪丸人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma) 培養於 12 孔盤 (12-well plate) 盤中, 放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱培養 24 小時後, 配置每 well 含有總量為 1μg 的 plasmid DNA、30μl H-DMEM (Gibco, 12800-017) 及 0.6μl TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, R0531), Vortex 5 秒, 混合均勻後, 在室溫下靜置 15min。將 TurboFect Transfection Reagent Mix 加入 96 孔盤 (96-well plate) 中, 放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱培養 24 小時。

4) 真核細胞之基因阻斷 (gene knockdown) 試驗

前一天以 2×10^5 cells 培養 6 孔盤 (6-well plate), 放入含有 5% CO₂ 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 試劑進行共轉染作用 (co-transfection)。配製所需的 Lipofectamine® 3000 Reagent: 將從中央研究院 RNAi 核心設施 (National RNAi Core Facility) 購得的 shRNA-p53, shRNA-NRF2, 及利用 p53 及 NRF2 基因所構築的質體混合於 Lipofectamine® 3000 Reagent 中, 以 Vortex 震盪混合均勻, 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% CO₂ 的 37°C 環境中 24 小時。隔天加入 25 mg/ml puromycine 置 6-well plate 中, 再於 5% CO₂ 的 37°C 培養箱內培養 4 天, 進行細胞篩選。去除培養液, 以 1X PBS 清洗後, 加入 500μl 0.05% Trypsin-EDTA 於 37°C 靜置 2 分鐘, 加入 500μl 培養液將細胞蒐集進 1.5ml 微量離心管中, 取出新的 10 公分培養盤, 加入 7ml 培養液, 再將 1ml 細胞懸浮液全部培養至 10 公分培養盤中, 細胞置於 5% CO₂ 37°C 細胞培養箱內培養。細胞約兩至三天長滿, 長滿後將 10 公分培養盤取出, 去除舊的培養液, 以 10ml 1XPBS 潤洗後, 加入 1.5ml 0.05% Trypsin-EDTA 於 37°C 靜置 2 分鐘後, 去除 Trypsin-EDTA solution 後放入 5% CO₂ 37°C 的細胞培養箱繼續作用 3 分鐘使細胞呈懸浮狀。加入 3ml 含有 7% DMSO (作為抗凍劑) 之培養液, 將細胞由培養盤上沖下並充分混合均勻, 各取 1ml 至抗凍管並插入以預冷為 4°C 的漸凍盒中, 放置於 -80°C 中作用 16-18 小時, 再放入液態氮中保存。

5) 啟動子活性分析 (又稱 dual-Luciferase Report Assay)

將依照 Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) 的建議步驟進行分析。同時測得 Firefly 和

Renilla luciferases的活性，藉由酵素活性 (Luciferases) 表現可反應啟動子活性的強弱。實驗中所用到的pRL-TK vector會表現Renilla luciferases的活性，其目的為將含有不同分析片段的pGL3-basic vector之Firefly luciferases的活性標準化 (normalize)，故其pRL-TK vector當作一內部控制組 (Internal control)；並使用pGL3-promoter vector具有SV40 promoter的活性，當作positive control。重覆進行三次活性分析。

實驗步驟：將前一天轉染好的細胞取出，以1xPBS wash後，加入20 μ l 1x passive lysis buffer，室溫shaker 15分鐘後，將96-well孔盤短暫離心 (Spin down)，將20 μ l的Sample加入96-well白盤中，接著加入50 μ l Dual-Glo luciferase reagent (LAR II)，分析Firefly luciferase activity，隨後加入50 μ l Stop and Glo reagent分析Renilla luciferase activity。將分析結果所測得的Firefly和Renilla luciferases活性相除 (firefly/renilla luciferases)，求得其相對活性表現值 (Relative Luciferase Activity)。以GraphPad Prism Version 2.01軟體，以One Way ANOVA統計方式，鑑定不同的啟動子分析片段於不同細胞株中的luciferases相對活性表現情形。

6) 染色質免疫沉澱 (Chromatin Immunoprecipitation Assay, ChIP)

將實驗細胞 (1.0 \times 10⁷ cell) 培養於10公分培養皿，隔天約9成滿後，除去細胞培養液，以1xPBS wash後進行染色質免疫沉澱分析實驗，將依照ChIP-IT[®] Express Chromatin Immunoprecipitation Kit (Active Motif) 的建議步驟進行。加入20ml Fixation solution 到10公分培養皿，室溫shaker 10分鐘。10分鐘後，移除fixation solution，以10ml預冷的1xPBS wash一次，移除PBS，加入10ml Glycine Stop-fix solution，室溫shaker 5分鐘。移除stop-fix solution，以10ml預冷的1xPBS wash一次。加入30 μ l 100mM PMSF到預冷的Cell Scraping Solution，混勻後加5ml到10公分培養皿，用刮刀把細胞刮下，收於1.5ml eppendorf。以4 $^{\circ}$ C 離心2500rpm 10分鐘，移除上清液。Pellet以加入1ml預冷的Lysis Buffer (內含5 μ l PIC + 5 μ l PMSF)懸浮，置冰上作用30分鐘。30分鐘後，4 $^{\circ}$ C離心5000rpm 10分鐘，去上清液。加入500 μ l digestion buffer(2 μ l PIC and 2 μ l PMSF/ 1ml digestion buffer)作用於37 $^{\circ}$ C作用5分鐘後，加入Enzymatic Shearing Cocktail (200 U/ml) 於37 $^{\circ}$ C作用10分鐘。作用結束後，sample DNA加入7 μ l 0.5M EDTA，冰上作用10分鐘，進行4 $^{\circ}$ C離心12000rpm 10分鐘，取上清液至新管。測核酸濃度，並預留一些做為Input DNA，依組別配置後混合均勻，於4 $^{\circ}$ C shaker overnight。隔天，將離心管spin down後，放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，去除上清液。加入800 μ l ChIP Buffer 1清洗，shaker 5分鐘後，將離心管放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，去除上清液。加入800 μ l ChIP Buffer 2 清洗2次，每次shaker 5分鐘，同樣將離心管放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，去除上清液。加入50 μ l Elution Buffer AM2，室溫shaker 15分鐘後，spin down並加50 μ l Reverse Cross-linking buffer，pipetting mix，將離心管放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，取上清液，至新離心管。10 μ l Input DNA Sample + 88 μ l ChIP buffer 2 + 2 μ l 5M NaCl，volumn 100 μ l。ChIP sample 與 Input Sample置95 $^{\circ}$ C加熱15min，置室溫回溫後，spin down，加入2 μ l Proteinase K，37 $^{\circ}$ C水浴作用1hr，將tube置室溫回溫後，加入Proteinase K Stop Solution，室溫作用30min，存放置-20 $^{\circ}$ C。將ChIP所得到的DNA，以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 放大p53結合位置，PCR放大反應條件：取4 μ l DNA、0.5 μ l 10 μ M Forward primer、0.5 μ l 10 μ M Reverse primer及5 μ l 2x Master Mix 均勻混合後，Spin down，加入2 μ l mineral oil，經由熱循環機器進行PCR放大反應。PCR反應條件為：95 $^{\circ}$ C作用2分鐘，使雙股DNA變性，再以循環式的Denaturation溫度95 $^{\circ}$ C作用20秒，Annealing溫度60 $^{\circ}$ C作用10秒，Extension溫度68 $^{\circ}$ C作用3分鐘，進行30個循環，最後以68 $^{\circ}$ C作用5分鐘。反應結束後，以1%瓊脂膠體進行電泳分析，並將PCR產物送定序，定序結果以BioEdit進行比對分析。

7) DNA 親和性沉澱分析法(DNA affinity precipitation assay, DAPA)

Biotinylated sample反應樣品的準備:Nuclear protein (50 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) + p53-Probe或其他control probe (50 nM/ μl) + Reaction buffer (10x Binding buffer + Poly (dI · dC) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) +50% Glycerol +100 mM MgCl₂ + 1% NP-40 + DDH₂O) 在1.5 ml eppendorf充分混合，室溫反應20 min。

LRWD1 啟動子上的蛋白質親和沉澱反應與分析:取出100 μl 已經用washing buffer(1x PBS pH 7.4)清洗過的Streptavidin MagBeads加入上述biotinylated sample，輕輕的上下翻轉，與beads作用，使用parafilm封蓋並固定於Intelli-Mixer RM-2，培養於室溫下50 rpm、1 hr，完成後將1.5ml eppendorf放上Magdorf磁座上，等磁珠被吸取至管壁，去除為結合上的biotinylated sample，再加入1 ml Wash Buffer (事先回溫於37°C or可放置室溫下)，混合均勻，在去除上清液，重複清洗4次，最後加入30 μl Protein Loading Dye，使用乾浴機加熱95°C、5 min，後續實驗以p53、NRF2、VDR及LRWD1抗體以西方墨點法 (Western Blot)分析結合在LRWD1 啟動子(promoter)上的蛋白質複合體內容。

8) LRWD1 蛋白表現分析 (Western Blot)

培養於6-well培養盤的實驗細胞以1X PBS清洗後，分別加入100 μl 的 lysis buffer，用細胞刮杓將細胞刮下，將細胞吸取至1.5 ml eppendorf中，置於冰上作用30分鐘，每10分鐘vortex一次。以4°C10000 rpm離心25分鐘，取上清液至新的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吸光測量蛋白質定量。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50rpm、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。

9) 阻斷(knockdown) p53、NRF2 或 VDR 對 LRWD1 表現及細胞複製的影響

將 2×10^5 cell分別被knockdown p53、NRF2或VDR的細胞培養於22mm x 22mm蓋玻片培養24小時後，進行西方墨點法(Western Blot)及流式細胞儀分析分別被knockdown p53、NRF2或VDR的細胞對於LRWD1表現及細胞複製的影響。

10) 全量 RNA 抽取

將培養於12-well的細胞液吸掉後，以1xPBS清洗加入0.5 ml RareRNA (GenePure, GPR02)，將lysate移至eppendorf中，室溫靜置5分鐘，加入150 μl Phenol-choroform-isoamyl alcohol mixture(25:24:1, Amresco)，劇烈搖晃，呈現乳白色，以4°C12000 rpm離心5分鐘，取上層液至新的eppendorf，加入等體積Isopropanol上下翻轉，以4°C12000 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4°C12000 rpm離心5分鐘，將eppendorf倒掛，使沉澱物自然風乾，最後加20 μl DEPC-H₂O回溶，進行65°C作用15分鐘，其完全溶於DEPC-H₂O中，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。

11) 反轉錄聚合酶鏈鎖反應(Reverse Transcription-PCR)

使用High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4387406)將RNA反轉錄成cDNA。PCR反應條件:取2 μg RNA、2 μl 10X RT buffer、2 μl 10X Random primers、1 μl MultiScribe reverse transcriptase、0.8 μl 25X dNTP mix (100 mM)，最後用DEPC-H₂O將體積補至20 μl ，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。

12) 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real-time PCR)

取 100 ng cDNA 溶液作為 Q-PCR 反應的模版，總反應體積 10 μ l 中在含有 4 mM 的 $MgCl_2$ 的 PCR 緩衝溶液進行 40-45 循環數 (cycles) 反應，偵測基因對象包括：*LRWD1*、細胞 DNA 損傷的標的基因： *γ -H2AX*、*p53* 抑制及啟動有關的基因：*p53*、*MDM2*、*Akt*、*p-Akt*；細胞週期相關：*cyclin D*、*cyclin E*、*BCL-2*、*CDK*；細胞凋亡相關：*p21*、*Fas*、*caspase 3* 及 *BCL-2* 等基因的表現情形。Real-time PCR 反應條件：取 1 μ l 100 ng cDNA、5 μ l 2 \times Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、0.5 μ l 10 μ M Forward primer、0.5 μ l 10 μ M Reverse primer、3 μ l DDH_2O 。以 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 快速型同步定量偵測系統 (Applied Biosystems) 進行聚合酶連鎖反應，選擇 SYBR-green protocol，反應條件為：95°C 30 秒、95°C 30 秒、59°C 30 秒、72°C 30 秒，進行 35 個循環，最後以 72°C 5 分鐘，反應結束後，回到 Main Menu 畫面，點選 Collect Results 儲存數據後，利用 StepOne Software v2.1 軟體分析進行數據分析。

13) γ -H2AX 分析細胞 DNA 損傷

將 2×10^5 的 NT2D1 細胞培養在 6 孔盤中 48 小時後，加入處理藥劑 (Vit. D3、200 μ M H_2O_2 或 NAC) 培養，加入 500 μ l 0.25 % trypsin 作用及離心收集細胞，加入 500 μ l 99% ETOH (細胞穿孔固定)，3000rpm 5min，去上清液及加入 1ml BSA-Tris-1X PBS 離心及清洗細胞，加入 100 μ l Anti- γ -H2AX 混合作用 1hr 後，加入 1ml BSA-Tris-1X PBS，室溫下離心，3000rpm 5min，加入 100 μ l Rabbit-FITC (二抗) 與細胞作用後，加入 1ml BSA-Tris-1X PBS，上下翻轉約 5 次左右，靜置 2min，進行室溫下離心，3000rpm 5min。加入 300 μ l 7AAD (1 μ g/ml) 溶液 (含 RNase，20 μ g/ml) 30min 後，以流式細胞儀 (Flow Cytometer) 進行分析。

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 年 月 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：維生素 D3 對於睪丸細胞 LRWD1 的轉錄調控作用，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗場所廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性及關注化學物質與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 年 月 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (初審)

案件編號	GR110003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	維生素 D3 對於睪丸細胞 LRWD1 的轉錄調控作用		
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	110 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
(初審)

案件編號	GR110003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	維生素 D3 對於睪丸細胞 LRWD1 的轉錄調控作用		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <input checked="" 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) (1) 申請人於實驗步驟撰寫完整 (2) 然而有關實驗目的著墨較少，宜增加。 建議修正後，複審決議		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	2021年11月30日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 21331111 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初審
審核意見回覆

案件編號	GR110003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	維生素 D3 對於睪丸細胞 LRWD1 的轉錄調控作用		
審 查 意 見	<p>委員審查意見</p> <p> 1. 申請人於實驗步驟撰寫完整 2. 然而有關實驗目的著墨較少，宜增加。 建議修正後，複審決議 </p> <p>申請者回覆：</p>		
暨 申 請 者 回 覆	<p>本研究擬確認 Vit. D3 對 LRWD1 表現的影響及如何與 NRF2 及 Vit. D3 共同調控 LRWD1 的表現，將在不同濃度的 Vit. D3 後處理下，以 ChIP 實驗確認 p53 與 NRF2 結合在 LRWD1 啟動子上，釐清在 Vit. D3 的影響下，p53 與 NRF2 對於 LRWD1 表現的影響及細胞中 ROS 的調控情形；藉由 p53 或 NRF2 抗體進行蛋白質免疫共沉澱作用 (co-immunoprecipitation)，再以 p53、NRF2 及 VDR 抗體進行沉澱產物的蛋白質電泳分析 (Western blot)，了解 VDR 是否有與 p53 或 NRF2 共沉澱，VDR 與 p53 或 NRF2 的結合關係；以 LRWD1 promoter 的 biotin 的探針進行 DNA 親和性沉澱分析 (DNA affinity purification assay, DAPA)，將此結合在 LRWD1 promoter 的蛋白質沉澱物進行蛋白質電泳，以 VDR、p53 及 NRF2 等抗體進行 Western blot，以證明 VDR 會與 p53 及 NRF2 結合在 LRWD1 promoter 上；在 Vit. D3 的影響下，藉由細胞 pGL3-basic-LRWD1 promoter 及 Luciferase 分析，可以了解 Vit. D 對於 LRWD1 promoter 的轉錄活性影響；細胞中分別過表現 (overexpression) 或阻斷 (knockdown) p53、NRF2 及 VDR 等基因表現，將有助於釐清這些基因在 LRWD1 調控的角色及如何協助 LRWD1 表現。</p>		
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	110 年 12 月 3 日

6、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟

本研究擬確認 Vit. D3 對 LRWD1 表現的影響及如何與 NRF2 及 Vit. D3 共同調控 LRWD1 的表現，將在不同濃度的 Vit. D3 後處理下，以 ChIP 實驗確認 p53 與 NRF2 結合在 LRWD1 啟動子上，釐清在 Vit. D3 的影響下，p53 與 NRF2 對於 LRWD1 表現的影響及細胞中 ROS 的調控情形；藉由 p53 或 NRF2 抗體進行蛋白質免疫共沉澱作用 (co-immunoprecipitation)，再以 p53、NRF2 及 VDR 抗體進行沉澱產物的蛋白質電泳分析 (Western blot)，了解 VDR 是否有與 p53 或 NRF2 共沉澱，VDR 與 p53 或 NRF2 的結合關係；以 LRWD1 promoter 的 biotin 的探針進行 DNA 親和性沉澱分析 (DNA affinity purification assay, DAPA)，將此結合在 LRWD1 promoter 的蛋白質沉澱物進行蛋白質電泳，以 VDR、p53 及 NRF2 等抗體進行 Western blot，以證明 VDR 會與 p53 及 NRF2 結合在 LRWD1 promoter 上；在 Vit. D3 的影響下，藉由細胞 pGL3-basic-LRWD1 promoter 及 Luciferase 分析，可以了解 Vit. D 對於 LRWD1 promoter 的轉錄活性影響；細胞中分別過表現 (overexpression) 或阻斷 (knockdown) p53、NRF2 及 VDR 等基因表現，將有助於釐清這些基因在 LRWD1 調控的角色及如何協助 LRWD1 表現。

細胞培養

人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma)，培養液：90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% fetal bovine serum, pH 值 7.2-7.4) 及人類正常睪丸 Hs 181.Tes 細胞 (human normal testis)，培養液：90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% fetal bovine serum, pH 值 7.2-7.4) 培養於 37°C、5% CO₂、相對飽和濕度 95% 的細胞培養箱，作為後續實驗的分析。

1) pGL3 basic-LRWD1 promoter (含 p53 結合區) 轉殖質體構築

將 LRWD1 基因上游區域含有 p53RE 位置的轉錄起始點附近約 0.6 kb (-515 至 +53) 片段，以生物資訊軟體 Vector NTI 分析限制酵素切點 (Restriction Enzyme Map Analysis)，挑選 NheI 及 HindIII 作為轉殖質體構築的限制酵素。於正向引子 (Forward primer) 接上 NheI 限制酵素辨識位置 (CTA-G↓CTAGC) 和反向引子 (Reverse primer) 接上 HindIII 限制酵素辨識位置 (A↓AGCTT-GGG)，經 PCR 反應所得的產物與 pGL3-Basic vector 正向相接，完成 pGL3 basic-LRWD1 promoter 轉殖質體構築。(本研究團隊已經在先期研究已完成 pGL3 Basic-LRWD1 promoter 的構築)

2) 轉殖質體使細胞大量表現 (overexpression)

進行轉染作用 (transfection) 的前一天，將細胞數 1.0×10^5 的人類正常睪丸人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma) 培養於 12 孔盤 (12-well plate) 盤中，放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱培養 24 小時後，配置每 well 含有總量為 1μg 的 plasmid DNA、30μl H-DMEM (Gibco, 12800-017) 及 0.6μl TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, R0531)，Vortex 5 秒，混合均勻後，在室溫下靜置 15min。將 TurboFect Transfection Reagent Mix 加入 96 孔盤 (96-well plate) 中，放置 37°C、5% CO₂ 細胞培養箱培養 24 小時。

3) 真核細胞之基因阻斷 (gene knockdown) 試驗

前一天以 2×10^5 cells 培養 6 孔盤 (6-well plate)，放入含有 5% CO₂ 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 試劑進行共轉染作用 (co-transfection)。配製所需的 Lipofectamine® 3000 Reagent：將從中央研究院 RNAi 核心設施 (National RNAi Core Facility) 購得的 shRNA-p53, shRNA-NRF2，及利用 p53 及 NRF2 基因所構築的質體混合於 Lipofectamine® 3000 Reagent 中，以 Vortex 震盪混合均勻，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% CO₂ 的 37°C 環境中 24 小時。隔天加入 25 mg/ml puromycin 置 6-well plate 中，再於 5% CO₂ 的 37°C 培養箱內培養 4 天，進行細胞篩選。去除培養液，

以 1X PBS 清洗後，加入 500 μ l 0.05% Trypsin-EDTA 於 37°C 靜置 2 分鐘，加入 500 μ l 培養液將細胞蒐集進 1.5ml 微量離心管中，取出新的 10 公分培養盤，加入 7ml 培養液，再將 1ml 細胞懸浮液全部培養至 10 公分培養盤中，細胞置於 5% CO₂ 37°C 細胞培養箱內培養。細胞約兩至三天長滿，長滿後將 10 公分培養盤取出，去除舊的培養液，以 10ml 1XPBS 潤洗後，加入 1.5ml 0.05% Trypsin-EDTA 於 37°C 靜置 2 分鐘後，去除 Trypsin-EDTA solution 後放入 5% CO₂ 37°C 的細胞培養箱繼續作用 3 分鐘使細胞呈懸浮狀。加入 3ml 含有 7% DMSO(作為抗凍劑) 之培養液，將細胞由培養盤上沖下並充分混合均勻，各取 1ml 至抗凍管並插入以預冷為 4°C 的漸凍盒中，放置於 -80°C 中作用 16-18 小時，再放入液態氮中保存。

4) 啟動子活性分析 (又稱 dual-Luciferase Report Assay)

將依照 Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) 的建議步驟進行分析。同時測得 Firefly 和 Renilla luciferases 的活性，藉由酵素活性 (Luciferases) 表現可反應啟動子活性的強弱。實驗中所用到的 pRL-TK vector 會表現 Renilla luciferases 的活性，其目的為將含有不同分析片段的 pGL3-basic vector 之 Firefly luciferases 的活性標準化 (normalize)，故其 pRL-TK vector 當作一內部控制組 (Internal control)；並使用 pGL3-promoter vector 具有 SV40 promoter 的活性，當作 positive control。重覆進行三次活性分析。

實驗步驟：將前一天轉染好的細胞取出，以 1xPBS wash 後，加入 20 μ l 1x passive lysis buffer，室溫 shaker 15 分鐘後，將 96-well 孔盤短暫離心 (Spin down)，將 20 μ l 的 Sample 加入 96-well 白盤中，接著加入 50 μ l Dual-Glo luciferase reagent (LAR II)，分析 Firefly luciferase activity，隨後加入 50 μ l Stop and Glo reagent 分析 Renilla luciferase activity。將分析結果所測得的 Firefly 和 Renilla luciferases 活性相除 (firefly/renilla luciferases)，求得其相對活性表現值 (Relative Luciferase Activity)。以 GraphPad Prism Version 2.01 軟體，以 One Way ANOVA 統計方式，鑑定不同的啟動子分析片段於不同細胞株中的 luciferases 相對活性表現情形。

5) 染色質免疫沉澱 (Chromatin Immunoprecipitation Assay, ChIP)

將實驗細胞 (1.0x10⁷ cell) 培養於 10 公分培養皿，隔天約 9 成滿後，除去細胞培養液，以 1xPBS wash 後進行染色質免疫沉澱分析實驗，將依照 ChIP-IT® Express Chromatin Immunoprecipitation Kit (Active Motif) 的建議步驟進行。加入 20ml Fixation solution 到 10 公分培養皿，室溫 shaker 10 分鐘。10 分鐘後，移除 fixation solution，以 10ml 預冷的 1xPBS wash 一次，移除 PBS，加入 10ml Glycine Stop-fix solution，室溫 shaker 5 分鐘。移除 stop-fix solution，以 10ml 預冷的 1xPBS wash 一次。加入 30 μ l 100mM PMSF 到預冷的 Cell Scraping Solution，混勻後加 5ml 到 10 公分培養皿，用刮刀把細胞刮下，收於 1.5ml eppendorf。以 4°C 離心 2500rpm 10 分鐘，移除上清液。Pellet 以加入 1ml 預冷的 Lysis Buffer (內含 5 μ l PIC + 5 μ l PMSF) 懸浮，置冰上作用 30 分鐘。30 分鐘後，4°C 離心 5000rpm 10 分鐘，去上清液。加入 500 μ l digestion buffer (2 μ l PIC and 2 μ l PMSF/ 1ml digestion buffer) 作用於 37°C 作用 5 分鐘後，加入 Enzymatic Shearing Cocktail (200 U/ml) 於 37°C 作用 10 分鐘。作用結束後，sample DNA 加入 7 μ l 0.5M EDTA，冰上作用 10 分鐘，進行 4°C 離心 12000rpm 10 分鐘，取上清液至新管。測核酸濃度，並預留一些做為 Input DNA，依組別配置後混合均勻，於 4°C shaker overnight。隔天，將離心管 spin down 後，放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，去除上清液。加入 800 μ l ChIP Buffer 1 清洗，shaker 5 分鐘後，將離心管放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，去除上清液。加入 800 μ l ChIP Buffer 2 清洗 2 次，每次 shaker 5 分鐘，同樣將離心管放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，去除上清液。加入 50 μ l Elution Buffer AM2，室溫 shaker 15 分鐘後，spin down 並加 50 μ l Reverse Cross-linking buffer，pipetting mix，將離心管放置磁鐵旁邊，待液體澄清時，

取上清液，至新離心管。10 μ l Input DNA Sample + 88 μ l ChIP buffer 2 + 2 μ l 5M NaCl, volumn 100 μ l。ChIP sample 與 Input Sample置95 $^{\circ}$ C加熱15min, 置室溫回溫後, spin down, 加入2 μ l Proteinase K, 37 $^{\circ}$ C水浴作用1hr, 將tube置室溫回溫後, 加入Proteinase K Stop Solution, 室溫作用30min, 存放置-20 $^{\circ}$ C。將ChIP所得到的DNA, 以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 放大p53結合位置, PCR放大反應條件: 取4 μ l DNA、0.5 μ l 10 μ M Forward primer、0.5 μ l 10 μ M Reverse primer及5 μ l 2x Master Mix 均勻混合後, Spin down, 加入2 μ l mineral oil, 經由熱循環機器進行PCR放大反應。PCR反應條件為: 95 $^{\circ}$ C作用2分鐘, 使雙股DNA變性, 再以循環式的Denaturation溫度95 $^{\circ}$ C作用20秒, Annealing溫度60 $^{\circ}$ C作用10秒, Extension溫度68 $^{\circ}$ C作用3分鐘, 進行30個循環, 最後以68 $^{\circ}$ C作用5分鐘。反應結束後, 以1%瓊脂膠體進行電泳分析, 並將PCR產物送定序, 定序結果以BioEdit進行比對分析。

6) DNA 親和性沉澱分析法(DNA affinity precipitation assay, DAPA)

Biotinylated sample反應樣品的準備:Nuclear protein (50 μ g/1 μ l) + p53-Probe或其他control probe (50 nM/ μ l) + Reaction buffer (10x Binding buffer + Poly (dI · dC) (1 μ g/ μ l) +50% Glycerol +100 mM MgCl₂ + 1% NP-40 + DDH₂O) 在1.5 ml eppendorf充分混合, 室溫反應20 min。

LRWD1 啟動子上的蛋白質親和沉澱反應與分析:取出100 μ l已經用washing buffer(1x PBS pH 7.4)清洗過的Streptavidin MagBeads加入上述biotinylated sample, 輕輕的上下翻轉, 與beads作用, 使用parafilm封蓋並固定於Intelli-Mixer RM-2, 培養於室溫下50 rpm、1 hr, 完成後將1.5ml eppendorf放上Magdorf磁座上, 等磁珠被吸取至管壁, 去除為結合上的biotinylated sample, 再加入1 ml Wash Buffer (事先回溫於37 $^{\circ}$ C or可放置室溫下), 混合均勻, 在去除上清液, 重複清洗4次, 最後加入30 μ l Protein Loading Dye, 使用乾浴機加熱95 $^{\circ}$ C、5 min, 後續實驗以p53、NRF2、VDR及LRWD1抗體以西方墨點法 (Western Blot) 分析結合在LRWD1 啟動子(promoter)上的蛋白質複合體內容。

7) LRWD1 蛋白表現分析 (Western Blot)

培養於6-well 培養盤的實驗細胞以1X PBS 清洗後, 分別加入100 μ l 的 lysis buffer, 用細胞刮杓將細胞刮下, 將細胞吸取至1.5 ml eppendorf 中, 置於冰上作用30分鐘, 每10分鐘vortex一次。以4 $^{\circ}$ C 10000 rpm 離心25分鐘, 取上清液至新的1.5 ml eppendorf, 此為總蛋白質液。取2 μ l 總蛋白質液加入198 μ l 的 Bio-Rad protein assay dye reagent, 混合均勻後, 以分光光譜儀OD₅₉₅吸光測量蛋白質定量。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, 阻隔非特異性結合。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 $^{\circ}$ 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50rpm、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。

8) 阻斷(knockdown) p53、NRF2 或 VDR 對 LRWD1 表現及細胞複製的影響

將2x10⁵cell 分別被knockdown p53、NRF2 或 VDR 的細胞培養於22mm x 22mm 蓋玻片培養24小時後, 進行西方墨點法 (Western Blot) 及流式細胞儀分析分別被knockdown p53、NRF2 或 VDR 的細胞對於LRWD1 表現及細胞複製的影響。

9) 全量 RNA 抽取

將培養於12-well 的細胞液吸掉後, 以1xPBS 清洗加入0.5 ml RareRNA (GenePure, GPR02), 將lysate移至eppendorf中, 室溫靜置5分鐘, 加入150 μ l Phenol-choroform-isoamyl alcohol mixture(25:24:1,

Amresco)，劇烈搖晃，呈現乳白色，以 4°C 12000 rpm 離心 5 分鐘，取上層液至新的 eppendorf，加入等體積 Isopropanol 上下翻轉，以 4°C 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 4°C 12000 rpm 離心 5 分鐘，將 eppendorf 倒掛，使沉澱物自然風乾，最後加 20 µl DEPC-H₂O 回溶，進行 65°C 作用 15 分鐘，其完全溶於 DEPC-H₂O 中，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。

10) 反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription-PCR)

使用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4387406) 將 RNA 反轉錄成 cDNA。PCR 反應條件：取 2 µg RNA、2 µl 10X RT buffer、2 µl 10X Random primers、1 µl MultiScribe reverse transcriptase、0.8 µl 25X dNTP mix (100 mM)，最後用 DEPC-H₂O 將體積補至 20 µl，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。

11) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative real-time PCR)

取 100 ng cDNA 溶液作為 Q-PCR 反應的模版，總反應體積 10 µl 中含有 4 mM 的 MgCl₂ 的 PCR 緩衝液進行 40-45 循環數 (cycles) 反應，偵測基因對象包括：LRWD1、細胞 DNA 損傷的標的基因： γ -H2AX、p53 抑制及啟動有關的基因：p53, MDM2、Akt, p-Akt；細胞週期相關：cyclin D, cyclin E, BCL-2、CDK；細胞凋亡相關：p21、Fas、caspase 3 及 BCL-2 等基因的表現情形。Real-time PCR 反應條件：取 1 µl 100 ng cDNA、5 µl 2×Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、0.5 µl 10 µM Forward primer、0.5 µl 10 µM Reverse primer、3 µl DDH₂O。以 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 快速型同步定量偵測系統 (Applied Biosystems) 進行聚合酶連鎖反應，選擇 SYBR-green protocol，反應條件為：95°C 30 秒、95°C 30 秒、59°C 30 秒、72°C 30 秒，進行 35 個循環，最後以 72°C 5 分鐘，反應結束後，回到 Main Menu 畫面，點選 Collect Results 儲存數據後，利用 StepOne Software v2.1 軟體分析進行數據分析。

12) γ -H2AX 分析細胞 DNA 損傷

將 2X10⁵ 的 NT2D1 細胞培養在 6 孔盤中 48 小時後，加入處理藥劑 (Vit. D3、200µM H₂O₂ 或 NAC) 培養，加入 500 µl 0.25 % trypsin 作用及離心收集細胞，加入 500µl 99% ETOH (細胞穿孔固定)，3000rpm 5min，去上清液及加入 1ml BSA-Tris-1X PBS 離心及清洗細胞，加入 100µl Anti- γ -H2AX 混合作用 1hr 後，加入 1ml BSA-Tris-1X PBS，室溫下離心，3000rpm 5min，加入 100µl Rabbit-FITC (二抗) 與細胞作用後，加入 1ml BSA-Tris-1X PBS，上下翻轉約 5 次左右，靜置 2min，進行室溫下離心，3000rpm 5min。加入 300µl 7AAD (1µg/ml) 溶液 (含 RNase, 20µg/ml) 30min 後，以流式細胞儀 (Flow Cytometer) 進行分析。

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 年 月 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：__建立能夠生產皂苷的基因轉殖靈芝之研究__

計畫主持人： 職稱：__教授__ 電話及傳真：

執行機構、系所： __生科系__

- 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： 靈芝

- 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： 大腸桿菌

- 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： 靈芝

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) _____

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) _PMT (polyethyleneglycol-mediated transformation)基因轉殖_

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

詳細步驟條列如下：

1. 靈芝原生質體生成

準備溶液

- 滅菌後置於冰上 0.6 M mannitol 100 ml
- GPM 培養基(20 ml): 2% glucose/0.1% peptone/2% malt extract
- 滅菌 homogenizer/ 滅菌含脫脂棉花管柱/ 滅菌離心管 50 ml tube x2
- 細胞壁分解酶 lysing enzyme powder (30 mg) Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma L1412)
- 滅菌後置於冰上 MTC buffer (0.6M mannitol, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM CaCl₂)

實驗步驟

1. 培養 20 ml of 靈芝 *Ganoderma lucidum* 在 GPM 培養基 5-7 天 (28°C and 150 rpm)。
2. 離心收集菌絲體 (Harvest the mycelia at 3,000 rpm for 5 min at 4°C.)
3. 清洗菌絲體 (Wash the mycelia once with 20 ml 0.6 M mannitol.)
4. 回溶菌絲體 (Resuspend the mycelia in 2 ml 0.6 M mannitol)
5. 利用 homogenizer 將菌絲體分散 (Homogenize the mycelia 10-20 times.)
6. 加入細胞壁分解酶進行分解 (Add Lysing enzyme to 1.5% (w/v) and incubate at for 2 h at 30°C and 150 rpm.)
7. 反應完成後稀釋反應液 (Dilute the enzyme reaction 20-fold (38 ml) with 0.6 M mannitol.)
8. 將混合液通過含脫脂棉花的管柱，去除細胞碎片，過濾液以離心分離收集原生質體 (Flow the dilute through an absorbent-cotton column and collect the protoplast by centrifugation at 3,000 rpm for 5 min at 4°C.)
9. 以 MTC 清洗原生質體二次 (Wash once the collected protoplast with 20 ml 0.6 MTC buffer)
10. 以顯微鏡計算產生之原生質體數目與濃度 (Count the concentration of protoplast by optical microscopy and used for PMT experiments.)

2. PMT 基因轉殖

準備溶液

- 滅菌後置於冰上 MTC buffer (0.6M mannitol, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM CaCl₂)
- PTC buffer (40% PEG3350, 100mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl (pH7.4))
- MYG 培養基: (1% maltose, 0.4% glucose, 0.4% yeast extract and 0.6M mannitol)
- 含有 1% low-melting point (LMP) agarose 之 MYG

實驗步驟

1. 將濃度 1×10^8 在 MTC 溶液中之 160 μL 原生質體與質體 15 μL DNA (10 μL 20mM ATA, 5 μL 50mM spermidine and 100 μg heparin) 與 50 μL PTC 溶液混合置於冰上 45 分鐘。(about 1×10^8 protoplast in 160 mL MTC buffer) were mixed thoroughly with pAN7-1 (10 ug), 10 μL 20mM aurintricarboxylic acid (ATA, a nuclease inhibitor; Sigma, St Louis, MO), 5 μL 50mM spermidine, 100 μg heparin and 50 μL of PTC buffer (40% PEG3350, 100mM CaCl_2 , 10mM Tris-HCl (pH7.4)), then incubated on ice for 45 min.)
2. 加入 1 mL MTC 置於室溫 25 分鐘 (One milliliter of MTC buffer was added and the mixture incubated for an additional 25 min at room temperature.)
3. 離心收集原生質體並回溶於 0.5 mL MTC 中 (Protoplasts were recovered by centrifugation (4 $^\circ\text{C}$, 5 min at 4,000 g) and resuspended in 500 μL MTC buffer.)
4. 離心收集原生質體並回溶於 1 mL MYG 培養基中 (Then protoplasts were centrifuged (4 $^\circ\text{C}$, 5 min at 1,500 g) and resuspended in 1mL MYG regeneration medium)
5. 置於室溫 18-24 小時，讓細胞在不含抗生素的培養基中回復 (Subsequently, protoplasts were allowed to regenerate for 18–24 h in 1mL MYG regeneration medium)
6. 加入 5 mL 含有 1% 低溶點洋菜膠與 4 ppm 抗生素 carboxin 之 MYG 培養基，混合均勻後倒入含有 4 ppm 抗生素 carboxin 之 MYG 固態培養基中培養(then mixed with 5mL MYG-selective medium (28 $^\circ\text{C}$) containing 0.6M mannitol, 1% low-melting point (LMP) agarose and 4 ppm carboxin. The mixture was poured onto an MYG plate containing 0.6M mannitol, 1.5% agar and 4 ppm carboxin)
7. 在 28 $^\circ\text{C}$ 培養 5-7 天觀察菌落生長型情形 (The plate was incubated at 28 $^\circ\text{C}$ for 5–7 days. Colonies were subcultured individually onto fresh MYG plates containing carboxin.)

計畫主持人(申請人)簽名：



2021 年 12 月 2 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 建立能夠生產皂苷的基因轉殖靈芝之研究，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗場所廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性及關注化學物質與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 110 年 12 月 2 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表
(初審)

案件編號	GR110004	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	建立能夠生產皂苷的基因轉殖靈芝之研究		
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)		
	研究人員若能確實遵守科技部基因重組實驗守則， 此研究可同意進行。		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	110年 10月 2日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀
 聯絡電話： (06) 21331111 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
(初審)

案件編號	GR110004	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	建立能夠生產皂苷的基因轉殖靈芝之研究		
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) 請依照「科技部基因重組實驗守則」及本校相關規定進行相關實驗。		
	審查人簽章	委員核章	審畢日期
		110年12月02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