

國立臺南大學 111 年度生物實驗安全委員會議程

時間：111 年 12 月 07 日(星期三)上午 10 點 30 分

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王一匡主任、生態暨環境資源學系黃文伯老師、生物科技學系張翠玲老師、總務處環安組丁慧如組長

列席者：

壹、主席致詞

感謝各位委員撥空參加這次會議，目前已達到開會法定人數，此次會議生物科技學系張翠玲老師請假無法出席，那我們就直接進行工作報告及提案討論。

貳、工作報告

一、111 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：GR111001(附件 P.1-P.7)

申請人：生物科技學系張德生老師

計畫名稱：靈芝皂苷生產之研究

2.計畫編號：GR111002(附件 P.8-P.13)

申請人：生物科技學系鄧燕妮老師

計畫名稱：探討氯化銻對於睪丸萊迪氏細胞生長之影響

3.計畫編號：GR111003(附件 P.14-P.19)

申請人：生物科技學系張翠玲老師

計畫名稱：探討乳汁預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於去泛素化機制的影響

4.計畫編號：GR111004(附件 P.20-P.25)

申請人：生物科技學系吳慧珍老師

計畫名稱：Plant cell wall enzyme-mediated immunity: the role of Arabidopsis pectin methylesterases reveals beneficial plant-microbiome interaction under stress responses

上述4件計畫，已全數審查完畢。

參、提案討論

國立臺南大學111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GR111001、GR111002、GR111003、GR111004 生物實驗安全申請案，是否同意進行，提請討論。 | 總務處環安組 | 2 |
| 二 | 修正本校「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」第三點條文，如說明，提請討論。 | 總務處環安組 | 2 |

提案一

案由：有關計畫編號 GR111001、GR111002、GR111003、GR111004 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 GR111001、GR111002、GR111003、GR111004，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.1-P.25)。
- 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：GR111002 申請案請申請者補充實驗目的及實驗步驟(補充資料如附件 P.27-P.29) 修正後通過，餘案照案通過。

提案二

案由：修正本校「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」第三點條文，如說明，提請討論。

說明：

- 一、為配合「科技部」於本年 7 月 27 日改制為「國家科學及技術委員會」，擬修正本校「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」單位名稱。
- 二、修正後「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」如附件(P.26)。

「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」修正草案對照表

| 修正內容 | 現行內容 | 修正說明 |
|--|--|--------------------------------------|
| 「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」 三、本校教師於提出生物基因重組實驗相關計畫在送校內外申 | 「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」 三、本校教師於提出生物基因重組實驗相關計畫在送校內外申 | 修正「國立臺南大學生物實驗安全委員會設置要點」第三點第二項設置單位名稱。 |

| | | |
|--|--|--|
| <p>請前，須檢附相關 實驗的目的及步驟方法乙份，連同「國立臺南大學基因重組實驗申請同意書」（如附表一），一併遞送本會審查。本會先行作下列研究計畫之實驗與所需之設備對環境及人類安全性之審查與核准：</p> <p>(一) 重組基因轉殖實驗</p> <p>(二) 國家科學及技術委員會基因重組實驗守則列管之生物實驗相關計畫</p> <p>(三) 其他機關要求送審之相關案件</p> | <p>請前，須檢附相關 實驗的目的及步驟方法乙份，連同「國立臺南大學基因重組實驗申請同意書」（如附表一），一併遞送本會審查。本會先行作下列研究計畫之實驗與所需之設備對環境及人類安全性之審查與核准：</p> <p>(一) 重組基因轉殖實驗</p> <p>(二) 國科會基因重組實驗守則列管之生物實驗相關計畫</p> <p>(三) 其他機關要求送審之相關案件</p> | |
|--|--|--|

決議：照案通過

肆、臨時動議

伍、散會

國立臺南大學基因重組實驗申請同意書

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： 靈芝皂苷生產之研究

計畫主持人： 申請者 職稱： 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 K-12 型

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

實驗目的及詳細實驗步驟：

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/ 滅菌含脫指棉花管柱/ 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. 將混合液通過含脫指棉花的管柱，去除細胞碎片，過濾液以離心法是收集原生質體 (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 μ L 原生質體與質體 15 μ L DNA (10 μ L 20mM ATA, 5 μ L 50mM spermidine and 100 μ g heparin) 與 50 μ L 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 μ L 20mM aurintricarboxylic acid (ATA, a nuclease inhibitor; Sigma, St Louis, MO), 5 μ L 50mM spermidine, 100 μ g heparin and 50 μ L of PTC buffer (40% PEG3350, 100mM CaCl₂, 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 °C, 5 min at 4,000 g) and resuspended in 500 μ L 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 °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 5mLMYG-selective medium (28 °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°C 培養 5-7 天觀察菌落生長型情形 (The plate was incubated at 28 °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： _____ 申請者 _____ 111 年 10 月 24 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 申請者 申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱 靈芝皂苷生產之研究，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：申請者 (親簽章)

中 華 民 國 111 年 10 月 24 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 | GR111001 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | 靈芝皂苷生產之研究 | | |
| 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) | | |
| | <p style="font-size: 1.2em;">本基因重組實驗申請, 已提出相關實驗 守則、廢棄物清理、與職安規範之 遵守, 予以同意進行, 並請實驗 期間慎防污染。</p> | | |
| 審查人簽章 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 111 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 | GR111001 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | 靈芝皂苷生產之研究 | | |
| 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 | <p>(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> | | |
| 審查人簽章 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 111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

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：

Our study aims to investigate the effects of indium chloride on testicular Leydig cell growth. We propose that Nrf2-LRWD1 axis induces ROS to activate autophagy and DNA damage response. Thus, to support our hypothesis, we will buy commercially synthesized siRNA against Nrf2, LRWD1, ATG5, ATM, ATR, and DNA-PK. All these siRNAs will be transfected into mouse Leydig cells by lipofectamine 2000 followed by examining the knockdown efficiency with immunoblotting assays.

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：_____申請者_____ 111 年 11 月 17 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 申請者 申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱 探討氯化銻對於畢丸萊迪氏細胞生長之影響，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：申請者 (親簽章)

中 華 民 國 111 年 11 月 17 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 | GR111002 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | 探討氯化銻對於畢九萊迪氏細胞生長之影響 | | |
| 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. 研究方法符合校內實驗設備、「基因重組實驗守則」等規範，如確實依照申請內容進行應是可行。 2. 產生之實驗廢棄物應依規定進行滅菌後，依生物醫療廢棄物規範進行處理。 | | |
| 審查人簽章 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 111 年 11 月 25 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 | GR111002 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | 探討氯化銻對於翠丸萊迪氏細胞生長之影響 | | |
| 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="color: red;">(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>同意進行，實驗進行時，請遵照國科會基因重組實驗守則</p> | | |
| 審查人簽章 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 111 年 11 月 29 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：_____探討乳汁預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於去泛素化機制的影響_____

計畫主持人：_____申請者_____ 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：_____UbG76V-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 K12 型_____

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

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。想了解乳汁預防肺癌---研究 miRNA 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'-GCTAGCACCCACCATGGCCT-3' and rp5'-TAGATCCGGTGGATCCCCGG-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 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。

Delivery of siRNA into the Cells

1×10^6 細胞在 60mm dish 中，培養在 10% FBS 的 DMEM 培養基中，培養過夜，隔天轉染前 15 分鐘至 60 分鐘，去除培養基，加入新鮮並含有 10% FBS 培養基。針對每個 dish 製備 siLenFect™ (7.5 μ L siLenFect™ 與 242.5 μ L 無血清培養基) 於 1.5m 的 eppendorf 裡，另外在新的 eppendorf 裡的 250 μ L 無血清培養基裡製備 120nM siRNA 溶液，將 siRNA 溶液加到稀釋的 siLenFect™ 溶液中，室溫復育 20 分鐘，針對每個 dish 加入 500 μ L 的混合液，均勻搖晃數次，培養 24~72 小時後收穫細胞。

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名： 申請者

111 年 11 月 22 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 申請者 申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」
案件，計畫名稱 探討乳汁預防肺癌---運用數據庫輔助研究
miRNA 於去泛素化機制的影響，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：申請者 (親簽章)

中 華 民 國 111 年 11 月 22 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 | GR111003 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | 探討乳汁預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於去泛素化機制的影響 | | |
| 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. 實驗方法符合校內實驗設備(P1 等級)、「基因重組實驗守則」規範，請確實依照申請內容進行。 2. 實驗廢棄物應依規定進行滅菌後，以生物醫療廢棄物進行處理。 | | |
| 審查人簽章 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 114 年 11 月 25 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 | GR111003 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | 探討乳汁預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於去泛素化機制的影響 | | |
| 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 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 111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

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：

We highlight critical role of Arabidopsis Pectin methylesterases (PMEs; EC 3.1.1.11) which mediated pectin methyl de-esterification in turn elicits a defense response. Additionally, an important role of interaction between plant and microbiome under stress response is emerging, in particularly, this project has aim to elucidate the mechanism of Arabidopsis PME genes response to environmental stimulus among which the elevated microbiome involving the plant defense against pathogens. Here, we aim to study the role of PME genes with the selected *pme* mutants may reveal the restructure of plant-microbiome interaction that may contribute to plant immunity. We anticipate this research will bring a significant and still poorly documented piece of knowledge regarding the adaptation of plant cell wall proteins to various environmental constraints. The aim of the project will highlight the urgent to bring the better knowledge in plant-pathogen interactions and the interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses (climate properties), which can be viable strategies for applying in agricultural sustainability.

實驗步驟：

內生微生物的篩選：以核糖體核酸定序分析，為瞭解各因子處理，對其微生物族群多樣性的影響。固分析分離株之分類地位，萃取分離株之核酸並進行核糖體核酸之增幅擴大，利用微生物染色體核酸分離套組(Ultraclean™ Microbial genomic DNA isolation Kit, MO BIO Lab. Inc. USA)，萃取各分離株之核酸，再進行序列分析。使用廣泛性 16S ribosomal RNA(rRNA)為引子(universal primer) (Fw: 5' -GAG TTT GAT CCT GGC TCA-3' ; Rv - 5' -AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA-3')，進行 16S rRNA 片段之聚合酶連鎖(PCR)反應，將所得的 PCR 產物，以 1% 瓊脂糖膠體電泳分析確定目標片段大小，並將目標片段切下並純化送定序，定序結果與美國生物資訊中心(NCBI)及基因庫(GenBank)，進行比對分析。

碳源利用功能多樣性分析：為了篩選可促進作物生長之有益微生物，利用 Biolog GN plate 分析 (analysis of Biolog GN substrate utilization patterns)，此方法基於微生物利用碳源能力的不同，來分析微生物群落水平的生理特性。Biolog GN plate 微盤上每一微孔各含有一種碳源及四氮唑(Tetrazoles, TTZ)染料。基於四氮唑化合物氧化還原顏色變化情形進行評估，將微生物懸浮液接種於微孔中後，將滴定板於 30 保溫於合適的時間，通過測定伴隨的四氮唑染料的還原，檢測底物的氧化情形，來分析微生物群落的潛在功能，及碳源的利用模式等。

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：

申請者

2022

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 申請者 申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱 Plant cell wall enzyme-mediated immunity: the role of Arabidopsis pectin methylesterases reveals beneficial plant-microbiome interaction under stress responses，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：申請者 (親簽章)

中華民國 111 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 (初審)

| | | | |
|------------------|--|------|-----------------|
| 案件編號 | GR111004 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | Plant cell wall enzyme-mediated immunity: the role of Arabidopsis pectin methylesterases reveals beneficial plant-microbiome interaction under stress responses | | |
| 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) | | |
| | <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin: 10px 0;"> <ol style="list-style-type: none"> 1. 研究方法符合校內實驗設備(P1 等級)、「基因重組實驗守則」規範，請確實依照申請內容進行。 2. 實驗廢棄物應依規定進行滅菌後作為生物醫療廢棄物進行處理。 </div> | | |
| 審查人簽章 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 111 年 11 月 28 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 | GR111004 | 單位 | 生物科技學系 |
| 研究計畫 名稱 | Plant cell wall enzyme-mediated immunity: the role of Arabidopsis pectin methylesterases reveals beneficial plant-microbiome interaction under stress responses | | |
| 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="color: red;">(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>實驗進行時，請遵照國科會基因重組實驗守則</p> | | |
| 審查人簽章 | 初審委員核章 | 審畢日期 | 111年11月29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設置要點

100年10月19日第2次行政會議通過
102年1月9日第4次行政會議修正通過
104年12月16日生物實驗安全委員會會議通過
111年12月6日生物實驗安全委員會提案

- 一、為確保國立臺南大學(以下簡稱本校)生物基因重組安全，並維護民眾及生存環境的永續發展，特設置「國立臺南大學生物實驗安全委員會」(以下簡稱本會)，並訂定本要點。
- 二、本會置委員5~9人，總務長、生物科技學系主任及總務處環安組組長為當然委員，總務長兼任召集人，其餘委員由召集人推薦經校長同意後聘任。當然委員的任期依職務異動而調整，其餘委員任期為兩年，本會委員為無給職。
- 三、本校教師於提出生物基因重組實驗相關計畫在送校內外申請前，須檢附相關實驗的目的及步驟方法乙份，連同「國立臺南大學基因重組實驗申請同意書」(如附表一)，一併遞送本會審查。本會先行作下列研究計畫之實驗與所需之設備對環境及人類安全性之審查與核准：
 - (一)重組基因轉殖實驗
 - (二)國家科學及技術委員會基因重組實驗守則列管之生物實驗相關計畫
 - (三)其他機關要求送審之相關案件
- 四、本會每學年至少召開會議一次，必要時得召開臨時會議。
- 五、本會開會時，得邀請相關行政人員或專家列席。
- 六、本要點經行政會議通過，陳請校長核定後實施，修正時亦同。

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

本研究擬探討氯化銻對於睪丸萊迪氏細胞生長之影響及機制，由先期的研究顯示氯化銻造成睪丸萊迪氏細胞的氧化自由基增加，造成細胞氧化壓力升高，進而影響睪丸細胞內與自由基相關的機制的啟動，包括 Nrf2-LRWD1 等抗氧化機制的啟動及 DNA 損傷及修補的啟動與活化，因此本研究將藉由脂質體技術(lipofectamine 2000)將上述機制有關的 Nrf2、LRWD1、ATG5、ATM、ATR 及 DNA-PK 等基因的 siRNAs 送到到老鼠萊迪氏 TM3 細胞株中影響相對基因的表現，以便深入探討氯化銻對睪丸萊迪氏細胞生長的影響，可以提供作為後續氯化銻相關運用產業的環境影響評估的參考。

實驗步驟

細胞培養

老鼠萊迪氏 TM3 細胞株，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) 真核細胞之基因阻斷 (gene knockdown) 試驗

前一天以 2×10^5 TM3 細胞培養 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* 基因所構建的質體混合於 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 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 7 ml 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 10 ml 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。

2) LRWD1 蛋白表現分析 (Western Blot)

培養於 6-well 培養盤的實驗 TM3 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°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。

3) 評估氯化銻處理下，阻斷(knockdown) Nrf2, LRWD1, ATG5, ATM, ATR, and DNA-PK 對細胞複製的影響

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。

4) 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 μ l 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。

5) 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 μ g RNA、2 μ l 10X RT buffer、2 μ l 10X Random primers、1 μ l MultiScribe reverse transcriptase、0.8 μ l 25X 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。

6) 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 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 DDH₂O。以 StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems 快速型同步定量偵測系統 (Applied Biosystems) 進行聚合酶鏈鎖反應，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 Mean 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。

7) γ -H2AX 分析細胞 DNA 損傷

將 2×10^5 的 TM3 細胞培養在 6 孔盤中 24 小時後，加入氯化銻進行細胞培養 24 及 48 小時後，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：

申請者簽章

111 年 12 月 9 日