國立臺南大學 112 年度生物實驗安全委員會會議紀錄

時間：112 年 12 月 12 日(星期二)下午 3 點

地點：誠正大樓 309 會議室

主持人：陳總務長耀宏

出席者：生物科技學系鄧主任燕妮、生態暨環境資源學系王主任一匡、生物科技學系張翠玲老師、生態暨環境資源學系黃文伯老師、總務處環安組丁慧如組長

列席者：

壹、主席致詞

委員人數已達半數，那我們就開始今天會議，藉由鄧燕妮老師說明，了解會議目的，老師們比較清楚計畫申請執行審查，那我們就照今天議程開始會議。

貳、工作報告

一、112 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：GR112001(附件 P.1-P.6)
申請人：生物科技學系吳慧珍老師
計畫名稱：以白花三葉草(Trifolum repens)為模式植物，探討內生菌對植物碳匯功能及逆境回應之作用

2.計畫編號：GR112002(附件 P.7-P.15)
申請人：生物科技學系鄧燕妮老師
計畫名稱：探討氯化鋇抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑

3.計畫編號：GR112003(附件 P.16-P.21)
申請人：生物科技學系張翠玲老師
計畫名稱：探討牛乳預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於蛋白質降解及潛在目標基因之影響

4.計畫編號：GR112004(附件 P.22-P.29)
申請人：生物科技學系丁慧如老師
計畫名稱：結合生物轉化與分子模擬工具於開發預防前列腺癌之新型糖苷化天然衍生物

上述4件計畫，已全數審查完畢。

叁、提案討論

國立臺南大學112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GR112001、GR112002、GR112003、GR112004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	修訂本校「國立臺南大學基因重組實驗申請同意書」，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 GR112001、GR112002、GR112003、GR112004 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 GR112001、GR112002、GR112003、GR112004，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.29)。

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驗章。

決議：照案通過。

提案二

案由：修訂本校「國立臺南大學基因重組實驗申請同意書」，如說明，提請討論。

說明：

一、為確保基因重組實驗中(感染性)生物材料使用之安全性及符合目前現況，擬修訂本校「國立臺南大學基因重組實驗申請同意書」，修正後申請同意書如附件 P.30-P.31。

二、決議通過後，擬於 113 年 1 月 1 日正式使用該同意書。

「國立臺南大學基因重組實驗申請同意書」修正對照表

修正內容	現行內容	修正說明
2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱(參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則) a.重組基因來源名稱：_____ □微生物(□第一級危險群，□第二級危險群,□第三級危險群，□第四級危險群)，□human，□動物，□植物	2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱(參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則) a.重組基因來源名稱：_____ □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	修正 a. 重組基因來源名稱，危險群註明為微生物，並新增 human。

2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則） c.進行重組基因之細胞株、植物、微生物或動物宿主名稱： □微生物(□第一級危險群，□第二級危險群,□第三級危險群，□第四級危險群)，□human，□動物，□植物	2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則） c.進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：_____	修正細胞為細胞株、增加微生物及細項說明：□微生物(□第一級危險群，□第二級危險群，□第三級危險群，□第四級危險□human，□動物，□植物。
4、進行本研究所需之安全等級：□BSL-1 □BSL-2 □BSL-3 □BSL-4 5、進行本研究之實驗室_____其生物安全等級：□BSL-1 **如進行實驗安全等級 BSL-2 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：□BSL-2□BSL-3□BSL-4**	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**	修正第 4、5 點實驗室安全等級防護等級 P1、P2、P3、P4 為生物安全等級 BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4，以符合現況。
6、生物材料保全及銷毀機制(菌株、動物細胞株等保全及銷毀) a.菌株或動物細胞株保存方式及地點 b.菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟 c.上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)		新增第 6 點生物材料保全及銷毀機制(菌株、動物細胞株等保全及銷毀)
7、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟	6、與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟	項次調整

決議：

依照委員建議修正後通過，修正之申請同意書(如附件 P.32-P33.)。

委員建議：

1. 修正申請同意書中重組基因來源、宿主之安全等級及名稱選項 human 一詞為人類，統一以中文表示。
2. 修正第 7 點與基因重組有關的實驗目的及詳細實驗步驟為第 7 點與基因重組有關的實驗目的及第 8 點與基因重組有關的詳細實驗步驟。

肆、臨時動議：無

伍、散會：下午 3 點 30 分結束。

附件

GR11200

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：以白花三葉草（Trifolium repens）為模式植物，探討內生菌對植物碳匯功能及逆境回應之作用

計畫主持人：申請者 職稱：副教授 電話及傳真：06-2133111 轉

執行機構、系所：國立台南大學生物科技系

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（參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則）

a.重組基因來源名稱：阿拉伯芥, 白花三葉草

□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)*, yeast, Agrobacterium

■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：阿拉伯芥, 白花三葉草

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 生科系格致樓 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：

實驗目的:

研究植物、微生物和逆境環境之間的相互作用關係，對於生態環境的基礎至關重要。由於急速惡化的溫室效應導致全球氣候變暖和氣候變化，破壞了生態平衡，例如由高溫引發的熱逆境和不斷增加的二氧化碳排放，已經成為廣泛存在的農業和生態問題，對生態系統造成了巨大的衝擊。此外，人類的農業活動和土壤鹽鹼化也使環境逆境和氣候異常變得日益嚴峻，全球變暖帶來的高溫逆境已經成為廣泛存在的農業問題，也是可持續經營的主要障礙，導致農產品產量和品質大幅下降。通過研究植物與微生物之間的相互作用，不僅可以促進宿主植物的生長和發育，還可以增強宿主植物對環境逆境的適應能力，對於維護生物多樣性和有效利用自然資源具有重要意義。

實驗步驟:

內生微生物的篩選: 以核醣體核酸定序分析，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醣體核酸之增幅擴大，利用微生物染色體核酸分離套組(UltracleanTM 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% 瓊脂醣膠體電永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 2023年 11 月 14 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，計畫名稱以白花三葉草（Trifolium repens）為模式植物，探討內生菌對植物碳匯功能及逆境回應之作用，遵照「國家科學及技術委員會-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 112 年 11 月 14 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表
(初審)

委員1

案件編號	GR112001	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	以白花三葉草(Trifolum repens)為模式植物，探討內生菌對植物碳匯功能及逆境回應之作用		
查驗結果	☑同意進行	☐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）

本研究若能確實遵守基因重組實驗守則的規範，應是可行的。

審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112 年 11 月 20 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)

委員2

案件編號	GR112001	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	以白花三葉草(Trifolum repens)為模式植物，探討內生菌對植物碳匯功能及逆境回應之作用		
查驗結果	■同意進行　□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） 請遵守國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則		
審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112年11月22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

GR112002

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：探討氯化鋇抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑

計畫主持人：申請者　職稱：教授　電話及傳真：06-2133111#分機

執行機構、系所：國立臺南大學 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（參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則）

a.重組基因來源名稱：commercial synthesized siRNA against Nrf2, LRWD1, ATG5, ATM, ATR, and DNA-PK

■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：_____

□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：TM3 mouse Leydig cell line

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 格致樓　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：

實驗目的及詳細實驗步驟：

實驗目的

(中文)

本研究擬探討氯化銦對於抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及細胞訊息路徑，由先期的研究顯示氯化銦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 細胞內，以便深入探討氯化銦對於抑制睪丸萊迪氏細胞生長的分子機制及細胞訊息路徑，可以提供作為後續氯化銦相關運用產業的環境影響評估的參考。

(英文)

In our previous study found that $InCl_3$ inhibited Leydig cell growth by inducing centrosome amplification in vitro. The putative underlying molecular mechanisms might be contributed by DNA damage responses and autophagy. To further confirm our hypothesis, we will test our hypothesis by using mice model. Previous study showed that administration of $InCl_3$ in mature rat led to sperm DNA damage and the testicular interstitial cells show severe vacuolization.

In this study, we will focus on the molecular mechanisms and regulatory pathways of indium (III) chloride for growth inhibition in testicular Leydig cells. 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. The result will provide a reference for environmental assessments of indium chloride-related industries.

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% CO_2、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% 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% CO_2 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% CO_2 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 µl 0.05% Trypsin-EDTA 於 37°C 靜置 2 分鐘，加入 500 µl 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% CO_2 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% CO_2 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 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 2µl 總蛋白質液加入 198µl 的 Bio-Rad protein assay dye reagent，混合均勻後，以分光光譜儀 OD_{595} 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°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）進行影像掃瞄及 ImageJ 軟體進行定量分析。

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

將 $2x10^5$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 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-H_2O 回溶，進行 65°C作用 15 分鐘，其完全溶於 DEPC-H_2O 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) 反轉錄聚合酶鏈連鎖反應(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-H_2O 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℃作用 10 分鐘、37℃作用 120 分鐘、85℃作用 5 分鐘，反應結束後，保存於 4℃。

6) 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 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 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℃ 30 秒，95℃ 30 秒、59℃ 30 秒、72℃ 30 秒，進行 35 個循環，最後以 72℃ 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 $2X10^5$ 的 TM3 細胞培養在 6 孔盤中 24 小時後，加入氯化鋇進行細胞培養 24 及 48'小時後，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：申請者 112年 11 月 20 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**探討氯化鋇抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑**，遵照「國家科學及技術委員會-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

申請者

申請人 _____（簽章）

中　華　民　國　112　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
(初審)

委員 1

案件編號	GR112002	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討氯化鋇抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑		
查驗結果	☑同意進行　　□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） 請遵守國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則		
審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112 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

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表
(初審)

委員 2

案件編號	GR112002	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討氯化鋇抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑		
查覈結果	☑同意進行　　□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） 實驗目的與方法步驟之詳細羅列. 但生物安全的措施與、廢棄物處 理尚須補充。 並於實驗期間.請依生安應注意 之事項操作實驗		
審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112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初審
審核意見回覆

案件編號	GR112002	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討氯化鋇抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑		

審查意見暨申請者回覆

委員審查意見

研究計畫名稱	探討氯化鋇抑制睪丸萊迪氏細胞生長之分子機制及調控路徑
查覈結果	☑同意進行　□修正後，複審決議
審查	（請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議） 實驗目的與方法步驟之詳細羅列，但生物安全的措施與廢棄物處理尚須補充。 並於實驗期間，請依生安應注意之事項操作實驗

申請者回覆：

本研究所使用基因重組步驟、相關物品、廢棄物處理，均會依照「國家科學及技術委員會-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(詳見國立臺南大學基因重組實驗切結書)。

申請者簽章	申請者	回覆日期	112年 11 月 30 日

GR/12003

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：探討牛乳預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於蛋白質降解及潛在目標基因之影響

計畫主持人：申請者　職稱：教授　電話及傳真：06-申請者電話

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（參考國家科學及技術委員會-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. colli* 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 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℃→52.5℃→72℃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. colli* 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. colli 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 1000μL 培養基中生長 24 小時。使用 PolyJet 用 1μg 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 μL siLenFect™與 242.5 μL 無血清培養基）於 1.5m 的 eppendrof 裡，另外在新的 eppendrof 裡的 250uL 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 500uL 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　　112 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 探討牛乳預防肺癌---運用數據庫輔助研究miRNA於蛋白質降解及潛在目標基因之影響，遵照「國家科學及技術委員會-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　112　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)

委員1

案件編號	GR112003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討牛乳預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於蛋白質降解及潛在目標基因之影響		
查覈結果	☑同 進行	□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） 本研究者能確實遵守"基因重組實驗守則"，應是安全、可行的		
審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112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)

委員 2

案件編號	GR112003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討牛乳預防肺癌---運用數據庫輔助研究 miRNA 於蛋白質降解及潛在目標基因之影響		
查驗結果	☑同意進行　　☐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. 請問委員會如何確認基改生物全部收集及銷毀?		
審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112年12月4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

GR112004

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：結合生物轉化與分子模擬工具於開發預防前列腺癌之新型糖苷化天然衍生物

計畫主持人：申請者　職稱：副教授　電話及傳真：分機 申請者聯絡電話

執行機構、系所：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：pGFP-Pem1-Ad2, pDsRed-N1, pDR-GFP, pCβASce, pNF-κB-Luc, pRL-SV40

■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：BPH-1 cell line

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〕CO_2 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〕electroporation

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：□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(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 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 μg/10^5 cells), and green fluorescence protein (RFP) expression plasmids pDsRed-N1 (0.5 μg/10^5 cells) 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 μg/10^5 個細胞) 和紅色螢光蛋白 (red fluorescence protein, RFP) 表達質體 pDsRed-N1 (0.5 μg/10^5 個細胞) 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 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 pCβASce, both at 0.35 μg/10^5 cells), and pDsRed-N1 (0.3 μg/10^5 cells) 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 pCβASce ，均以 0.35 μg/10^5 個細胞）和 pDsRed-N1 (0.3 μg/10^5 個細胞) 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：Cells will be seeded on 24-well plates (5×10^4 cells/well). After cells attached for overnight, cells will be transfected with pNF-κB-Luc reporter (0.5 μg/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-κB transactivity will be calculated as Firefly luciferase activity/Renilla luciferase activity. The relative NF-κB transactivity will be calculated by setting vehicle control as 1, and the mean ± S.D. of triplicates plotted.

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-κB-Luc 報告基因質體 (0.5 μg/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-κB 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± 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：申請者 112 年 11 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，計畫名稱結合生物轉化與分子模擬工具於開發預防前列腺癌之新型糖苷化天然衍生物，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　112　年　11　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)

委員 1

案件編號	GR112004	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合生物轉化與分子模擬工具於開發預防前列腺癌之新型糖苷化天然衍生物		
查驗結果	☑同意進行　　□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） 本研究者能確實遵守"基因重組實驗守則"，應是安全、可行的		
審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112 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)

委員2

案件編號	GR112004	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合生物轉化與分子模擬工具於開發預防前列腺癌之新型糖苷化天然衍生物		
查覈結果	☑同意進行　　☐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）

實驗目的与步驟皆詳細呈現
唯生安相關過程之措施尚須補充
並請依生安應注意事項進行.

審查人簽章	審查人簽名	審畢日期	112 年 11 月 30 日

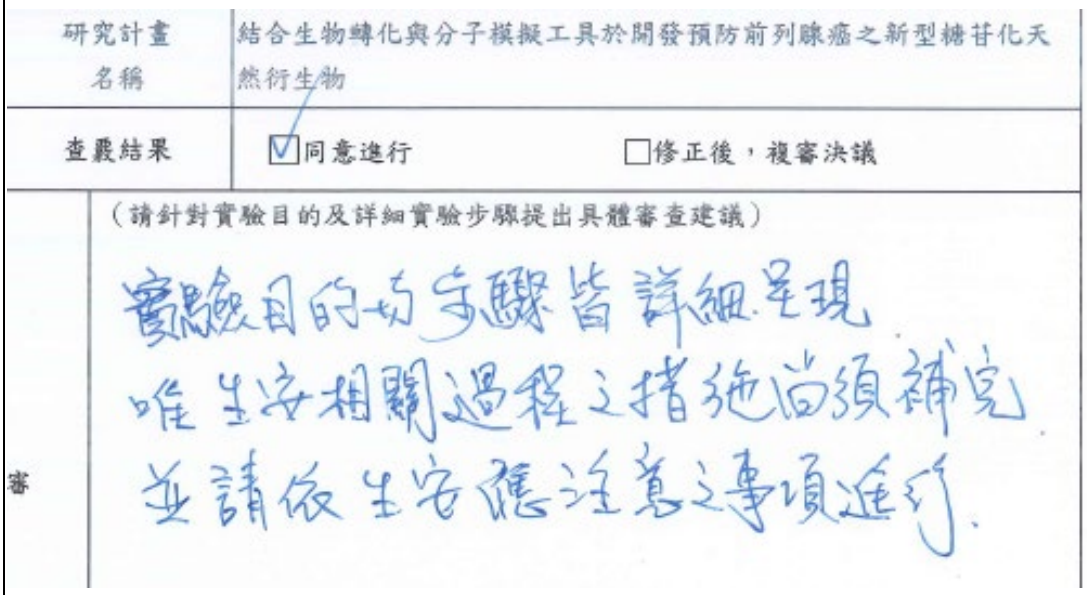
聯絡窗口：
聯絡人：　李芳儀
聯絡電話：(06) 2133111 分機 237、663
E-mail：　bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會初審
審核意見回覆

案件編號	GR112004	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	結合生物轉化與分子模擬工具於開發預防前列腺癌之新型糖苷化天然衍生物		

審查意見暨申請者回覆

委員審查意見



研究計畫名稱	結合生物轉化與分子模擬工具於開發預防前列腺癌之新型糖苷化天然衍生物
查覈結果	☑同意進行　□修正後，複審決議
審	（請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議） 實驗目的及步驟皆詳細呈現 唯生安相關過程之措施尚須補充 並請依生安應注意之事項進行.

申請者回覆：

本研究所使用生物實驗與基因重組相關操作步驟與物品，均會依照切結書內所列相關守則、要點等規範執行與處理。

申請者簽章	申請者簽名	回覆日期	112 年 12 月 4 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：_____

計畫主持人：_____職稱：_____電話及 E-mail：_____

執行機構、系所：_____

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（參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則）

a.重組基因來源名稱：_____

□微生物(□第一級危險群，□第二級危險群，□第三級危險群，□第四級危險群)，

□human，□動物，□植物

b.進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：_____

□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株、植物、微生物或動物宿主名稱：_____

□微生物(□第一級危險群，□第二級危險群，□第三級危險群，□第四級危險群)，

□human，□動物，□植物

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：□BSL-1　□BSL-2　□BSL-3　□BSL-4

5、進行本研究之實驗室 _____其生物安全等級：□BSL-1

如進行實驗安全等級 BSL-2 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：□BSL-2　□BSL-3　□BSL-4

6、生物材料保全及銷毀機制(菌株、動物細胞株等保全及銷毀)

a.菌株或動物細胞株保存方式及地點

b.菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

c.上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

7、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：

（表格請自行延伸）

計畫主持人(申請人)簽名：_____　　年　　月　　日

修正後資料

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：_____

計畫主持人：_____職稱：_____電話及 E-mail：_____

執行機構、系所：_____

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（參考國家科學及技術委員會-基因重組實驗守則）

a.重組基因來源名稱：_____

□微生物(□第一級危險群，□第二級危險群，□第三級危險群，□第四級危險群)，

□人類，□動物，□植物

b.進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：_____

□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**細胞株**、植物、**微生物**或動物宿主名稱：_____

□微生物(□第一級危險群，□第二級危險群，□第三級危險群，□第四級危險群)，

□人類，□動物，□植物

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：□BSL-1 □BSL-2 □BSL-3 □BSL-4

5、進行本研究之實驗室 _____其生物安全等級：□BSL-1

如進行實驗安全等級 BSL-2 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：□BSL-2 □BSL-3 □BSL-4

6、生物材料保全及銷毀機制(菌株、動物細胞株等保全及銷毀)

a.菌株或動物細胞株保存方式及地點

b.菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

c.上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

7、與基因重組有關的實驗目的

實驗目的：

（表格請自行延伸）

8、與基因重組有關的詳細實驗步驟

詳細實驗步驟：

（表格請自行延伸）

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 年 月 日