

# 國立臺南大學 113 年度生物實驗安全委員會會議紀錄

時間：113 年 12 月 03 日(星期二)上午 11 點 30 分

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一匡老師、生物科技學系曹哲嘉老師、總務處環安組丁慧如組長

列席者：

## 壹、主席致詞

目前已達到開會人數，那我們就來進行會議提案討論，計畫申請資料也都有先提供給委員參考，那就直接請業務單位進行工作報告。

## 貳、工作報告

一、113 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：GR113001(附件 P.1-P.27)

申請人：生物科技學系吳慧珍老師

計畫名稱：內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力

該申請案已於 113 年 9 月 13 日審查通過。

2.計畫編號：GR113002(附件 P.28-P.44)

申請人：生物科技學系鄧燕妮老師

計畫名稱：探討類固醇生合成轉錄因子促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演之角色(初審後修正題目為：探討類固醇生合成轉錄因子-1 在促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演的角色)

3.計畫編號：GR113003(附件 P.45-P.51)

申請人：生物科技學系張翠玲老師

計畫名稱：探討牛乳 miRNA 預防肺癌於蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制之影響

4.計畫編號：GR113004(附件 P.52-P.57)

申請人：生物科技學系丁慧如老師

計畫名稱：研究新型糖苷化天然衍生物於拮抗惡性癌細胞之效用與機轉

上述4件計畫，已全數審查完畢。

### 叁、提案討論

#### 國立臺南大學113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
	有關計畫編號GR113002、GR113003、GR113004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

#### 提案

案由：有關計畫編號 GR113002、GR113003、GR113004 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 GR113003、GR113004，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.45-P.57)。
- 二、計畫編號 GR113002，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.28-P.44)，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：上述 GR113002、GR113003 及 GR113004 申請案，經會議複審審查，照案通過。

肆、臨時動議：無

伍、散會(中午 12:15 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：\_\_\_\_\_內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力\_\_\_\_\_

計畫主持人：\_\_\_\_\_申請者\_\_\_\_\_職稱：\_\_\_\_\_電話及 E-mail：\_\_\_\_\_

06-2133111 轉\_\_\_\_\_

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\_\_\_\_\_

- 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：\_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株、植物、微生物或動物宿主名稱：\_阿拉伯芥, 白花三葉草\_\_\_\_\_

- 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 \_\_\_\_\_格致樓\_\_\_\_\_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

冷凍保存管之存放: 50%甘油作為抗凍劑, 保存在-80°C 冰櫃 (格致樓 C110 室)

##### b. 菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

以高溫滅菌 (Autoclaving): 使用高溫高壓蒸汽滅菌釜 (高壓鍋), 在 121°C, 15 psi (每平方英寸磅力) 下處理 20 分鐘。

銷毀程序步驟:

1. 穿戴適當的個人防護裝備, 如實驗服, 手套, 口罩和護目鏡。
2. 確認需要銷毀的菌株和培養基, 並做好記錄。
3. 收集和包裝: 將需要銷毀的菌株和培養基放入專門的生物危害廢棄物袋或容器中。確保容器密封良好, 防止洩漏。
4. 運輸到銷毀地點: 將包裝好的廢棄物小心運送到銷毀設施或指定的滅菌設備。
5. 銷毀處理: 將廢棄物放入高壓鍋中, 設定合適的溫度和壓力, 滅菌完成後, 等待冷卻再取出。
6. 記錄與報告: 詳細記錄銷毀過程, 包括日期、時間、負責人、處理方法和結果。

##### c. 上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

地點: 格致樓 \_\_\_\_\_、C112 室

設備: 高壓滅菌釜、無菌操作台

個人防護裝備: 包括實驗服、手套、口罩、護目鏡和面罩等。

廢棄物容器: 生物危害袋、堅固的密封容器, 用於收集和轉運菌株廢棄物。標明生物危害標識, 防止誤處理。

#### 7、與基因重組有關的實驗目的

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。



(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：

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(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% 瓊脂醣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

- 2024 年 8 月 6 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，計畫名稱內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力，遵照「國科會基因重組實驗守則」、「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

**申請者**

申請人：\_\_\_\_\_（親簽章）

中 華 民 國 113 年 8 月 6 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	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 150px;"><input type="checkbox"/> 修正後，複審決議</span>		
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;">本研究若能嚴格遵守本核基組重組實驗的規範， 應是可執行、可行的。</p>		
審查人簽章	<b>初審委員</b>	審畢日期	113 年 8 月 12 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)

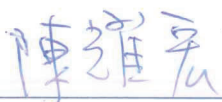
委員 2

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，複審決議</span>		
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>申請人提及兩個研究主題：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 內生微生物的篩選：欲自植物中分離出內生微生物，萃取核酸後，利用聚合酶連鎖反應擴增其核醣體核酸序列，並進行定序分析與比對。 此為常規的分子生物核酸實驗，依申請書所簡述之內容可採用純粹體外 <i>in vitro</i> 操作而不經由產製基因重組生物，並未涉及基因重組。</li> <li>2. 功能多樣性分析：本研究使用商業化之試劑套組測試微生物的碳源利用能力。該測試方法基於生化反應，與基因重組亦無直接明顯關聯。</li> </ol> <p>依申請人所提供之實驗內容為分離培養與分析植物中之細菌，不清楚是否進行基因重組；若無，且遵循生物材料保全與銷毀操作規範，應對人體與環境無明顯危害。</p>		
審查人簽章	<b>初審委員</b>	審畢日期	113 年 8 月 13 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 (複審)

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究；探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，補件審查</span>		
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="text-align: center;">與初審意見一致。 若依照申請人之切結，依本校生物安全實驗之相關規範執行， 應可執行。</p>		
審查人簽章	<b>複審委員簽章</b>	審畢日期	113 年 8 月 22 日
召集人簽章		核章日期	113 年 9 月 13 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 (複審)

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，補件審查</span>		
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="font-size: 2em; font-family: cursive;">無</div>		
審查人簽章	複審委員簽章		日期
			113年8月26日
召集人簽章	陳維宏	核章日期	
			113年9月13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 (複審)

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
審 查 意 見	1. 已經有菌株與植物保存與銷毀程序。 2. 計劃書上寫要銷毀動物細胞，請問有牽涉動物細胞？ 3. 建議說明避免菌株及植物組織逃逸與傳播之途徑，說明防止之安全程序。		
審查人簽章	<b>複審委員簽章</b>	審畢日期	113 年 9 月 11 日
召集人簽章	陳維宏	核章日期	113 年 9 月 13 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複審 審核意見回覆

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系	
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力			
審 查 意 見 暨 申 請 者 回 覆	委員審查意見			
	<h2 style="margin: 0;">國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (複審)</h2>			
	案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
	研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
	查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，補件審查		
	1. 已經有菌株與植物保存與銷毀程序。 2. 計劃書上寫要銷毀動物細胞，請問有牽涉動物細胞？ 3. 建議說明避免菌株及植物組織逃逸與傳播之途徑，說明防止之安全程序。			
	申請者回覆： 1. 謝謝委員的審閱。 2. 無牽涉動物細胞。(參見申請書 2、重組基因來源) 3. 已補充說明在申請書 6. 生物材料保全及銷毀機制。 d. 針對避免菌株及植物組織逃逸與傳播途徑的防止安全程序 1. 隔離與物理屏障：在處理或培養植物組織和菌株時，應確保在受控環境（如隔離實驗室或密閉溫室）中進行操作，防止有害微生物或基因改造植物組織逃逸到外界環境。 標準操作流程（SOP）： 2. 制定並嚴格遵守標準操作流程，確保所有實驗步驟包括培養、操作、處理和廢棄物管理都遵循規範，最大程度地降低逃逸風險。			
申請者簽章	<h2 style="margin: 0;">申請者簽章</h2>	回覆日期	2024 年 9 月 13 日	



# 國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (複審)

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input checked="" type="checkbox"/> 修正後，補件審查</span>		
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> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 需敘述取用阿拉伯芥、三葉草的什麼基因，目的為何。實驗方法僅提到 PCR 放大內生菌的基因，然而重組基因來源為阿拉伯芥、三葉草基因？</li> <li>2. 需詳述如何在所列微生物中進行基因重組(將什麼基因如何轉入 E. coli, yeast, etc)</li> <li>3. 需詳述如何將基因引入宿主(怎麼取得重組基因，將什麼基因如何轉入阿拉伯芥、三葉草)</li> </ol>		
審查人簽章	<b>複審委員簽章</b>	審畢日期	113 年 8 月 26 日
召集人簽章	陳耀宏	核章日期	113 年 9 月 13 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複審 審核意見回覆

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
審 查 意 見	<p>委員審查意見</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 需敘述取用阿拉伯芥、三葉草的什麼基因，目的為何。實驗方法僅提到 PCR 放大內生菌的基因，然而重組基因來源為阿拉伯芥、三葉草基因？</li> <li>2. 需詳述如何在所列微生物中進行基因重組(將什麼基因如何轉入 <i>E. coli</i>, yeast, etc)</li> <li>3. 需詳述如何將基因引入宿主(怎麼取得重組基因，將什麼基因如何轉入阿拉伯芥、三葉草)</li> </ol>		
見 暨	<p>申請者回覆：</p> <p>感謝您對我研究計畫的審查並提供寶貴的意見。針對您所提出的幾點建議和疑問，在此做出詳細的回應和說明：</p>		
申 請 者 回 覆	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在我們之前的研究中(Liu et al., 2021)，白花三葉草過度表達水稻鈣調蛋白(OsCaM1-1)，其為關鍵的熱逆境調控因子(Wu et al., 2012)，有效地調節熱脅迫回應的強度，並增強植物內在的耐熱性。故將阿拉伯芥的抗熱基因包括熱休克蛋白質(HSP)，鈣調素(CaM)，抗氧化酵素如 superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT) 等，過度表達於三葉草中，期白花三葉草轉植株能夠抵禦熱脅迫。 Liu H.L., Lee, Z.X., Chuang TW. Wu H.C (2021) Effect of heat stress on oxidative damage and antioxidant defense system in white clover (<i>Trifolium repens</i> L.). <i>Planta</i> 254: 103. Wu, H.C., Luo, D.L., Vignols, F. and Jinn, T.L. (2012) Heat shock-induced biphasic Ca<sup>2+</sup> signature and OsCaM1-1 nuclear localization mediate downstream signalling in acquisition of thermotolerance in rice (<i>Oryza sativa</i> L.). <i>Plant, Cell &amp; Environment</i>, 35: 1543-1557.</li> <li>2. <i>E. coli</i> DH5α 品系的質體轉型(Transformation): 使用 <i>E. coli</i> DH5α 品系來大量複製質體，以及穩定的保存質體於細胞中。取 1μl 構築好的質體 DNA 與 40μl <i>E. coli</i> DH5α 勝任細胞混合均勻，冰浴 30 分鐘後，進行 42°C heat shock 處理 1 分 30 秒，隨即冰浴 5 分鐘，加入 1 毫升 LB (Luria-Bertani)培養液，於 37°C 培養一小時活化後，低速離心後去上清液，沉澱菌塊以 100μl LB 回溶，並將菌液均勻塗於含最終濃度 50 μg/ml Ampicillin 之 LB 洋菜培養基上，置於 37°C 培養箱隔夜培養約 16 小時。 酵母菌醋酸鋰(LiAc, lithium acetate)轉型實驗:取約 1μg 轉型之環狀 DNA，分別加入: 5μl 10 mg/ml 之單股鮭魚精子 (DNA/salmon sperm DNA)(此鮭魚卵精子使用前，以 95°C/10 分鐘，使其雙股 salmon sperm DNA 進行 denature 成單股形式，</li> </ol>		

# 國立臺南大學生物實驗安全委員會複審 審核意見回覆

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
審 查 意 見	<p>委員審查意見</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 需敘述取用阿拉伯芥、三葉草的什麼基因，目的為何。實驗方法僅提到 PCR 放大內生菌的基因，然而重組基因來源為阿拉伯芥、三葉草基因？</li> <li>2. 需詳述如何在所列微生物中進行基因重組(將什麼基因如何轉入 <i>E. coli</i>, yeast, etc)</li> <li>3. 需詳述如何將基因引入宿主(怎麼取得重組基因，將什麼基因如何轉入阿拉伯芥、三葉草)</li> </ol>		
見 暨	<p>申請者回覆：</p> <p>感謝您對我研究計畫的審查並提供寶貴的意見。針對您所提出的幾點建議和疑問，在此做出詳細的回應和說明：</p>		
申 請 者 回 覆	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在我們之前的研究中(Liu et al., 2021)，白花三葉草過度表達水稻鈣調蛋白(OsCaM1-1)，其為關鍵的熱逆境調控因子(Wu et al., 2012)，有效地調節熱脅迫回應的強度，並增強植物內在的耐熱性。故將阿拉伯芥的抗熱基因包括熱休克蛋白質(HSP)，鈣調素(CaM)，抗氧化酵素如 superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT) 等，過度表達於三葉草中，期白花三葉草轉植株能夠抵禦熱脅迫。 Liu H.L., Lee, Z.X., Chuang TW. Wu H.C (2021) Effect of heat stress on oxidative damage and antioxidant defense system in white clover (<i>Trifolium repens</i> L.). <i>Planta</i> 254: 103. Wu, H.C., Luo, D.L., Vignols, F. and Jinn, T.L. (2012) Heat shock-induced biphasic Ca<sup>2+</sup> signature and OsCaM1-1 nuclear localization mediate downstream signalling in acquisition of thermotolerance in rice (<i>Oryza sativa</i> L.). <i>Plant, Cell &amp; Environment</i>, 35: 1543-1557.</li> <li>2. <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math> 品系的質體轉型(Transformation): 使用 <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math> 品系來大量複製質體，以及穩定的保存質體於細胞中。取 1<math>\mu</math>l 構築好的質體 DNA 與 40<math>\mu</math>l <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math> 勝任細胞混合均勻，冰浴 30 分鐘後，進行 42°C heat shock 處理 1 分 30 秒，隨即冰浴 5 分鐘，加入 1 毫升 LB (Luria-Bertani)培養液，於 37°C 培養一小時活化後，低速離心後去上清液，沉澱菌塊以 100<math>\mu</math>l LB 回溶，並將菌液均勻塗於含最終濃度 50 <math>\mu</math>g/ml Ampicillin 之 LB 洋菜培養基上，置於 37°C 培養箱隔夜培養約 16 小時。</li> <li>酵母菌醋酸鋰(LiAc, lithium acetate)轉型實驗:取約 1<math>\mu</math>g 轉型之環狀 DNA，分別加入: 5<math>\mu</math>l 10 mg/ml 之單股鮭魚精子 (DNA/salmon sperm DNA)(此鮭魚卵精子使用前，以 95°C/10 分鐘，使其雙股 salmon sperm DNA 進行 denature 成單股形式，</li> </ol>		



<p>並放於 4°C 以保持其維持單股型態)、300µl 之 40% PEG4000/1xTE / 1xLiAc (240µl 50% PEG.4000 +30 µl 10x TE + 30µl 10x LiAc)。與菌液均勻混合後，置於 28°C 培養箱震盪培養 1 小時，將其置於 42°C 熱處理 20 分鐘後，熱休克作用完後，將菌液進行 2000 rpm 低速離心/1 分鐘，去除上清液，菌塊以 100µl 無菌 YNB (BD™ Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids，無任何胺基酸添加) 回溶，接著將菌液分別均勻塗抹於具篩選用，如缺乏 leucine (YNB-LEU) 或 tryptophan (YNB-TRP) 之 YNB 固態培養基上，置於 28 °C 培養箱進行培養 3-5 天。酵母菌培養時所使用之藥品，3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) 為抑制 histidine (His) 合成路徑中所必須之 imidazoleglycerol-phosphate dehydratase 酵素之化學物質。</p> <p>3. 將重組質體加入農桿菌((<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101) 勝任細胞中，置於冰上 30 分鐘後，37°C 熱處理 5 分鐘後，加入 1 ml 的 LB medium，置 28°C 恆溫生長箱 3 小時後，將菌液塗於含有抗生素之 LB 培養基上，置 28°C 恆溫生長箱 2-3 天後，挑選單一菌落。待阿拉伯芥培養至繁殖期的花莖抽高時，將帶有重組質體之農桿菌轉殖菌液 (5% Sucrose, 0.05% silwet L-77)，將植物花序浸泡於轉殖菌液中；然後，使植物靜置於黑暗中避光 1 天後，移至 22°C 長日照 (16 小時光照/8 小時黑暗) 生長箱內。待果莢全乾後，收集種子消毒並播種於含抗生素(種類依照載體上的抗生素篩選標記)之 1/2 MS 培養基，篩選可正常生長植株即為成功轉殖之植株。</p>			
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	2024 年 08 月 30 日

# 國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (複審補件審查-1)

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input checked="" type="checkbox"/> 修正後，補件審查</span>		
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>1. 實驗目的需修改為與<u>基因重組</u>有關的<u>實驗內容</u>一致。</p> <p>2. 回覆中第 1 點指出將阿拉伯芥基因轉入三葉草，然而第 3 點則將基因轉入阿拉伯芥，是否誤植？</p> <p>3. 申請書 2a 基因來源、2c 進行重組基因之宿主名稱需修正與實驗內容敘述相對應。</p>		
審查人簽章	<b>複審委員簽章</b>	審畢日期	113 年 9 月 2 日
召集人簽章	陳維宏	核章日期	113 年 9 月 13 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複審  
複審補件審查-1 意見回覆

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
審 查 意 見  申 請 者 回 覆	<p>委員審查意見</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>實驗目的</u>需修改為與<u>基因重組</u>有關的<u>實驗內容</u>一致。</li> <li>2. 回覆中第 1 點指出將阿拉伯芥基因轉入三葉草，然而第 3 點則將基因轉入阿拉伯芥，是否誤植？</li> <li>3. 申請書 2a 基因來源、2c 進行重組基因之宿主名稱需修正與實驗內容敘述相對應。</li> </ol> <p>申請者回覆：</p> <p>感謝您對我研究計畫的審查並提供寶貴的意見。針對您所提出的幾點建議和疑問，在此做出詳細的回應和說明：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 實驗目的已修改與基因重組相關內容。</li> <li>2. 感謝您的糾正，是將阿拉伯芥基因轉入三葉草中。</li> <li>3. 申請書已修改。</li> </ol>		
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	2024 年 09 月 02 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：\_\_\_\_\_內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力\_\_\_\_\_

計畫主持人：\_\_\_\_\_申請者\_\_\_\_\_職稱：\_\_\_\_\_電話及 E-mail：  
\_\_\_\_\_06-2133111 轉\_\_\_\_\_@mail.nutn.edu.tw\_\_\_\_\_

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\_\_\_\_\_
- 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：\_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株、植物、微生物或動物宿主名稱：\_白花三葉草\_\_\_\_\_
- 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\_格致樓\_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

冷凍保存管之存放: 50%甘油作為抗凍劑,保存在-80°C 冰櫃 (格致樓 C110 室)

##### b. 菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

以高溫滅菌 (Autoclaving): 使用高溫高壓蒸汽滅菌釜 (高壓鍋), 在 121°C, 15 psi (每平方英寸磅力) 下處理 20 分鐘。

銷毀程序步驟:

1. 穿戴適當的個人防護裝備, 如實驗服, 手套, 口罩和護目鏡。
2. 確認需要銷毀的菌株和培養基, 並做好記錄。
3. 收集和包裝: 將需要銷毀的菌株和培養基放入專門的生物危害廢棄物袋或容器中。確保容器密封良好, 防止洩漏。
4. 運輸到銷毀地點: 將包裝好的廢棄物小心運送到銷毀設施或指定的滅菌設備。
5. 銷毀處理: 將廢棄物放入高壓鍋中, 設定合適的溫度和壓力, 滅菌完成後, 等待冷卻再取出。
6. 記錄與報告: 詳細記錄銷毀過程, 包括日期、時間、負責人、處理方法和結果。

##### c. 上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

地點: 格致樓 室、C112 室

設備: 高壓滅菌釜、無菌操作台

個人防護裝備: 包括實驗服、手套、口罩、護目鏡和面罩等。

廢棄物容器: 生物危害袋、堅固的密封容器, 用於收集和轉運菌株廢棄物。標明生物危害標識, 防止誤處理。

#### 7、與基因重組有關的實驗目的

實驗目的:

在我們之前的研究中(Liu et al., 2021), 白花三葉草過度表達水稻鈣調蛋白(OsCaM1-1), 其為關鍵的熱逆境調控因子(Wu et al., 2012), 有效地調節熱脅迫回應的強度, 並增強植物內在的耐熱性。故將阿拉伯芥的抗熱基因包括熱休克蛋白質(HSP), 鈣調素(CaM), 抗氧化酵素如 superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT)等, 過度表達於三葉草中, 期白花三葉草轉植株能夠抵禦熱脅迫。

(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：

1. *E. coli* DH5 $\alpha$  品系的質體轉型(Transformation): 使用 *E. coli* DH5 $\alpha$  品系來大量複製質體，以及穩定的保存質體於細胞中。取 1  $\mu$ l 構築好的質體 DNA 與 40  $\mu$ l *E. coli* DH5 $\alpha$  勝任細胞混合均勻，冰浴 30 分鐘後，進行 42°C heat shock 處理 1 分 30 秒，隨即冰浴 5 分鐘，加入 1 毫升 LB (Luria - Bertani) 培養液，於 37°C 培養一小時活化後，低速離心後去上清液，沉澱菌塊以 100  $\mu$ l LB 回溶，並將菌液均勻塗於含最終濃度 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 之 LB 洋菜培養基上，置於 37°C 培養箱隔夜培養約 16 小時。

2. 酵母菌醋酸鋰(LiAc, lithium acetate)轉型實驗: 取約 1  $\mu$ g 轉型之環狀 DNA，分別加入: 5  $\mu$ l 10 mg/ml 之單股鮭魚精子 (DNA/salmon sperm DNA) (此鮭魚卵精子使用前，以 95°C/10 分鐘，使其雙股 salmon sperm DNA 進行 denature 成單股形式，並放於 4°C 以保持其維持單股型態)、300  $\mu$ l 之 40% PEG4000/1xTE / 1xLiAc (240  $\mu$ l 50% PEG. 4000 +30  $\mu$ l 10x TE + 30  $\mu$ l 10x LiAc)。與菌液均勻混合後，置於 28°C 培養箱震盪培養 1 小時，將其置於 42°C 熱處理 20 分鐘後，熱休克作用完後，將菌液進行 2000 rpm 低速離心/1 分鐘，去除上清液，菌塊以 100  $\mu$ l 無菌 YNB (BD™ Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 無任何胺基酸添加) 回溶，接著將菌液分別均勻塗抹於具篩選用，如缺乏 leucine (YNB-LEU) 或 tryptophan (YNB-TRP) 之 YNB 固態培養基上，置於 28 °C 培養箱進行培養 3-5 天。酵母菌培養時所使用之藥品，3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) 為抑制 histidine (His) 合成路徑中所必須之 imidazoleglycerol-phosphate dehydratase 酵素之化學物質。

3. 將重組質體加入農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101) 勝任細胞中，置於冰上 30 分鐘後，37°C 熱處理 5 分鐘後，加入 1 ml 的 LB medium，置 28°C 恆溫生長箱 3 小時後，將菌液塗於含有抗生素之 LB 培養基上，置 28°C 恆溫生長箱 2-3 天後，挑選單一菌落。待阿拉伯芥培養至繁殖期的花莖抽高時，將帶有重組質體之農桿菌轉殖菌液 (5% Sucrose, 0.05% silwet L-77)，將植物花序浸泡於轉殖菌液中；然後，使植物靜置於黑暗中避光 1 天後，移至 22°C 長日照 (16 小時光照/8 小時黑暗) 生長箱內。待果莢全乾後，收集種子消毒並播種於含抗生素(種類依照載體上的抗生素篩選標記) 之 1/2 MS 培養基，篩選可正常生長植株即為成功轉殖之植株。

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：\_\_\_\_\_ 2024 年 09 月 02 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

# 國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (複審補件審查-2)

案件編號	GR113001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/>修正後，補件審查</span>		
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)		
	詳細實驗步驟 3 應將阿拉伯芥改成三葉草。 其它已依意見修正。		
審查人簽章	<b>複審委員簽章</b>	審畢日期	113年 9 月 3 日
召集人簽章	陳耀宏	核章日期	113年 9 月 13 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：\_\_\_\_\_內生菌對植物碳儲存功能及逆境適應性之研究：探討其在應對全球暖化中的角色與潛力\_\_\_\_\_

計畫主持人：\_\_\_\_\_申請者\_\_\_\_\_職稱：\_\_\_\_\_副教授\_\_\_\_\_電話及 E-mail：  
\_\_\_\_\_06-2133111 轉申請者分機、信箱\_\_\_\_\_@mail.nutn.edu.tw\_\_\_\_\_

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\_\_\_\_\_
- 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：\_\_\_\_\_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株、植物、微生物或動物宿主名稱：\_\_\_\_\_白花三葉草\_\_\_\_\_
- 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 \_\_\_\_\_申請者實驗室\_\_\_\_\_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. 菌株或細胞株保存方式及地點

冷凍保存管之存放: 50%甘油作為抗凍劑,保存在-80°C 冰櫃 (格致樓 C110 室)

##### b. 菌株或細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

以高溫滅菌 (Autoclaving): 使用高溫高壓蒸汽滅菌釜 (高壓鍋), 在 121°C, 15 psi (每平方英寸磅力) 下處理 20 分鐘。

銷毀程序步驟:

1. 穿戴適當的個人防護裝備, 如實驗服, 手套, 口罩和護目鏡。
2. 確認需要銷毀的菌株和培養基, 並做好記錄。
3. 收集和包裝: 將需要銷毀的菌株和培養基放入專門的生物危害廢棄物袋或容器中。確保容器密封良好, 防止洩漏。
4. 運輸到銷毀地點: 將包裝好的廢棄物小心運送到銷毀設施或指定的滅菌設備。
5. 銷毀處理: 將廢棄物放入高壓鍋中, 設定合適的溫度和壓力, 滅菌完成後, 等待冷卻再取出。
6. 記錄與報告: 詳細記錄銷毀過程, 包括日期、時間、負責人、處理方法和結果。

##### c. 上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

地點: 申請者實驗室、C112 室

設備: 高壓滅菌釜、無菌操作台

個人防護裝備: 包括實驗服、手套、口罩、護目鏡和面罩等。

廢棄物容器: 生物危害袋、堅固的密封容器, 用於收集和轉運菌株廢棄物。標明生物危害標識, 防止誤處理。

##### d. 針對避免菌株及植物組織逃逸與傳播途徑的防止安全程序

1. 隔離與物理屏障: 在處理或培養植物組織和菌株時, 應確保在受控環境 (如隔離實驗室或密閉溫室) 中進行操作, 防止有害微生物或基因改造植物組織逃逸到外界環境。

標準操作流程 (SOP):

2. 制定並嚴格遵守標準操作流程, 確保所有實驗步驟包括培養、操作、處理和廢棄物管理都遵循規範, 最大程度地降低逃逸風險。

#### 7、與基因重組有關的實驗目的

實驗目的：

在我們之前的研究中(Liu et al., 2021)，白花三葉草過度表達水稻鈣調蛋白(OsCaM1-1)，其為關鍵的熱逆境調控因子(Wu et al., 2012)，有效地調節熱脅迫回應的強度，並增強植物內在的耐熱性。故將阿拉伯芥的抗熱基因包括熱休克蛋白質(HSP)，鈣調素(CaM)，抗氧化酵素如 superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT)等，過度表達於三葉草中，期白花三葉草轉植株能夠抵禦熱脅迫。

(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：

1. *E. coli* DH5 $\alpha$  品系的質體轉型(Transformation): 使用 *E. coli* DH5 $\alpha$  品系來大量複製質體，以及穩定的保存質體於細胞中。取 1  $\mu$ l 構築好的質體 DNA 與 40  $\mu$ l *E. coli* DH5 $\alpha$  勝任細胞混合均勻，冰浴 30 分鐘後，進行 42°C heat shock 處理 1 分 30 秒，隨即冰浴 5 分鐘，加入 1 毫升 LB (Luria - Bertani)培養液，於 37°C 培養一小時活化後，低速離心後去上清液，沉澱菌塊以 100  $\mu$ l LB 回溶，並將菌液均勻塗於含最終濃度 50  $\mu$ g/ml Ampicillin 之 LB 洋菜培養基上，置於 37°C 培養箱隔夜培養約 16 小時。

2. 酵母菌醋酸鋰(LiAc, lithium acetate)轉型實驗:取約 1 $\mu$ g 轉型之環狀 DNA，分別加入: 5 $\mu$ l 10 mg/ml 之單股鮭魚精子 (DNA/salmon sperm DNA) (此鮭魚卵精子使用前，以 95°C/10 分鐘，使其雙股 salmon sperm DNA 進行 denature 成單股形式，並放於 4°C 以保持其維持單股型態)、300 $\mu$ l 之 40% PEG4000/1xTE / 1xLiAc (240 $\mu$ l 50% PEG. 4000 +30  $\mu$ l 10x TE + 30 $\mu$ l 10x LiAc)。與菌液均勻混合後，置於 28°C 培養箱震盪培養 1 小時，將其置於 42°C 熱處理 20 分鐘後，熱休克作用完後，將菌液進行 2000 rpm 低速離心/1 分鐘，去除上清液，菌塊以 100 $\mu$ l 無菌 YNB (BD™ Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids，無任何胺基酸添加)回溶，接著將菌液分別均勻塗抹於具篩選用，如缺乏 leucine (YNB-LEU)或 tryptophan(YNB-TRP)之 YNB 固態培養基上，置於 28 °C 培養箱進行培養 3-5 天。酵母菌培養時所使用之藥品，3-amino-1,2,4-triazole (3-AT)為抑制 histidine (His)合成路徑中所必須之 imidazoleglycerol-phosphate dehydratase 酵素之化學物質。

3. 將重組質體加入農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)勝任細胞中，置於冰上 30 分鐘後，37°C 熱處理 5 分鐘後，加入 1 ml 的 LB medium，置 28°C 恆溫生長箱 3 小時後，將菌液塗於含有抗生素之 LB 培養基上，置 28°C 恆溫生長箱 2-3 天後，挑選單一菌落。將帶有重組質體之農桿菌轉殖菌液 (5% Sucrose, 0.05% silwet L-77)轉入白花三葉草；將轉植株種於含抗生素(種類依照載體上的抗生素篩選標記)之 1/2 MS 培養基，篩選可正常生長植株即為成功轉殖之植株。

(表格請自行延伸)

申請者簽章

計畫主持人(申請人)簽名：\_\_\_\_\_ 2024 年 09 月 13 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：探討類固醇生合成轉錄因子促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演之角色

Title: Investigating the role of steroidogenic factor -1 in promoting testicular Leydig cell tumour progression.

計畫主持人：申請者 職稱：教授 電話及傳真：06-2133111# 申請者分機

E-mail：申請者@gmail.com

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：Nrf2、ATG5、ATM、ATR 及 DNA-PK 等基因及 siRNAs

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：大腸桿菌 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株、植物、微生物或動物宿主名稱：人類睪丸癌細胞 NTERA-2 cl.D1(NT2D1)

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 申請者實驗室 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

1. 實驗菌株加入抗凍劑及培養基於抗凍管中，保存於-80°C 冰箱。
2. 動物細胞株加入抗凍劑及培養基於抗凍管中，冷凍保存於液態氮(-196°C)桶。

##### b. 菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

菌株或動物細胞株以巴斯德滅菌法處理(121°C，1.5 大氣壓，15 分鐘)滅菌處理後，交給本校環安組做生物廢棄物集中處理銷毀。

##### c. 上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

動物細胞株(申請者實驗室)及細菌菌株(格致樓 C112) 的無菌操作台中進行實驗，無菌操作台內有本生燈做為滅菌用、真空抽氣幫浦抽取廢棄菌液到集中瓶(集中瓶廢液實驗後進行滅菌處理)，無菌操作台委託廠商定期檢測風向、抽氣及滅菌燈等，以維護操作者及研究空間的環境安全。

#### 7、與基因重組有關的實驗目的

實驗目的：

##### 探討類固醇生合成轉錄因子在睪丸癌發生所扮演之角色

(表格請自行延伸)

本研究擬探討類固醇生合成轉錄因子(steroidogenic factor 1)在睪丸癌發生所扮演之角色，由先期的研究顯示類固醇生合成有關的轉錄因子參與睪丸癌發生的過程，進而影響細胞氧化壓力的調控及細胞內與自由基相關的機制的啟動，包括 Nrf2 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)將上述機制有關的類固醇生合成轉錄因子及氧化壓力調控因子 Nrf2、ATG5、ATM、ATR 及 DNA-PK 等基因的 siRNAs 送到到人類睪丸癌細胞 NTERA-2 cl.D1(NT2D1)內，以便深入探討類固醇生合成轉錄因子對於細胞癌變及癌細胞生長的分子機制及細胞訊息路徑，可以提供作為睪丸癌治療的評估及參考。

#### 8、與基因重組有關的詳細實驗步驟



詳細實驗步驟：

### 細胞培養

本實驗所使用的細胞株購自食品工業研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫，人類睪丸癌細胞 NTERA-2 cl.D1 (NT2D1)，此細胞株屬於貼附型細胞 (adherent-type cell)。培養方式選用高葡萄糖含量之 D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養基，內含 10% fetal bovine serum (FBS) 及 1,000 I.U Penicillin、1,000 μg/mL Streptomycin、2.5 μg/mL Amphotericin，細胞培養 10 公分培養盤並培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱。細胞貼附於培養盤底部生長，當細胞長滿時，將培養液去除並以 1x PBS 潤洗，加入 700 μL Trypsin-EDTA solution/1x PBS 使細胞呈懸浮狀，加入 1 mL 培養液將細胞沖提下來，並以  $1.5 \times 10^6$  的細胞數作為繼代培養，約兩天長滿。培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub>、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  $2 \times 10^5$  NT2D1 細胞培養 6 孔盤 (6-well plate)，放入含有 5% CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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 1.5 ml 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 1 ml 細胞懸浮液全部培養至 10 公分培養盤中，細胞置於 5% CO<sub>2</sub> 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 1X PBS 潤洗後，加入 1.5 ml 0.05% Trypsin-EDTA 於 37°C 靜置 2 分鐘後，去除 Trypsin-EDTA solution 後放入 5% CO<sub>2</sub> 37°C 的細胞培養箱繼續作用 3 分鐘使細胞呈懸浮狀。加入 3 ml 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 1 ml 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 NT2D1 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°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 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 OD<sub>595</sub> 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 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。



### 3) 評估阻斷(knockdown) Nrf2, LRWD1, ATG5, ATM, ATR, and DNA-PK 對細胞複製的影響

將  $2 \times 10^5$  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  $\mu$ 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  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O 回溶，進行 65°C 作用 15 分鐘，其完全溶於 DEPC-H<sub>2</sub>O 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  $\mu$ g RNA、2  $\mu$ l 10X RT buffer、2  $\mu$ l 10X Random primers、1  $\mu$ l MultiScribe reverse transcriptase、0.8  $\mu$ l 25X dNTP mix (100 mM)，最後用 DEPC-H<sub>2</sub>O 將體積補至 20  $\mu$ 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  $\mu$ l 中在含有 4 mM 的 MgCl<sub>2</sub> 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： *$\gamma$ -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  $\mu$ l 100 ng cDNA、5  $\mu$ l 2 $\times$ Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、0.5  $\mu$ l 10  $\mu$ M Forward primer、0.5  $\mu$ l 10  $\mu$ M Reverse primer、3  $\mu$ l DDH<sub>2</sub>O。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) $\gamma$ -H2AX 分析細胞 DNA 損傷

將  $2 \times 10^5$  的 NT2D1 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  $\mu$ l 0.25 % trypsin 作用及離心收集細胞，加入 500  $\mu$ 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  $\mu$ l Anti- $\gamma$ -H2AX 混合作用 1hr 後，加入 1ml BSA-Tris-1X PBS，室溫下離心，3000rpm 5min，加入 100  $\mu$ 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  $\mu$ l 7AAD (1  $\mu$ g/ml) 溶液 (含 RNase, 20  $\mu$ g/ml) 30min 後，以流式細胞儀 (Flow Cytometer) 進行分析。

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)

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：

申請者簽章

113年 11月 12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：探討類固醇生合成轉錄因子促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演之角色，遵照「國科會基因重組實驗守則」、「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

申請者簽章

申請人：

(親簽章)

中 華 民 國 113 年 11 月 12 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	GR113002	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討類固醇合成轉錄因子促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演之角色		
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. 實驗步驟中基因阻斷試驗中敘述將 knockdown p53, 然而 2.a 重組基因來源名稱並未提及 p53。基於 p53 為抑癌基因, 阻斷其表現可能增加癌化風險, 請考量其風險預防。</p> <p>2. 同上此 shRNA 可用 puromycin 篩選 stable cell 應是於質體中建構入基因重組相關基因, 方法中應有將 E. coli 轉入此質體進行複製敘述, 菌株的相關操作與安全措施也需列出。</p>		
審查人簽章	審查委員簽章	審畢日期	113 年 11 月 19 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	GR113002	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討類固醇生合成轉錄因子促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演之角色		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，複審決議</span>		
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 gray; padding: 10px;"> <p>1. 該研究涉及基因重組的部分為建立多種類固醇生合成轉錄因子之 siRNA 構建物，利用微脂體載具以轉殖人類睪丸癌細胞株，來靜默各自基因標的，再進行 RNA 與蛋白質表現與細胞學的分析。</p> <p>2. 此實驗構建物之分子選殖技術屬常規的核酸技術；本研究轉殖人類細胞株所用載具為微脂體商業試劑，不具毒性與離體感染力，安全性應無疑慮。</p> <p>本計畫若依一般生物材料保全規定操作與銷毀處理廢棄物，安全性應無疑慮。</p> </div>		
審查人簽章	<b>審查委員簽章</b>	審畢日期	113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初審

## 審核意見回覆

說明：因進行初審建議，修正申請書內容及計畫名稱

案件編號	GR113002	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討類固醇生合成轉錄因子促進墨丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演之角色 <span style="margin-left: 150px;">-1在</span> <span style="float: right;">的</span>		
審查意見暨申請者回覆	<p>委員審查意見</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 實驗步驟 1) 基因阻斷試驗中敘述將 knockdown p53，然而 2. a 重組基因來源名稱並未提及 p53。基於 p53 為抑癌基因，阻斷其表現可能增加癌化風險，請考量其風險預防。</li> <li>2. 同上此 shRNA 可用 puromycin 篩選 stable cell 應是於質體中建構入基因重組相關基因，方法中應有將 E. Coli 轉入此質體進行複製放大的敘述，菌株的相關操作與安全措施也需列出。</li> </ol> <p>申請者回覆：</p>		
申請者簽章	申請者簽章	回覆日期	113 年 11 月 22 日

## 基因生物實驗安全審查意見回覆:

計畫名稱:探討類固醇生合成轉錄因子-1 在促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演的角色

1.已將阻斷的對象基因改成類固醇生合成轉錄因子-1(SF-1)及纖毛結構有關的 IFT88 and CEP164, CP110 等基因，基因阻斷用的 shRNA 可以從中央研究院 RNAi 核心中心購買。本研究藉由此些基因的阻斷，希望能更深入了解此些基因在睪丸萊迪氏細胞瘤中所扮演的腳色，未來能對於此癌症的發生的了解及治療有所助益。

2.本研究策略已經修正轉殖質體在細胞中作暫時表現(transient expression)，不進行 stable cell 培養，有關 E coli 的轉殖遺作步驟已經附在步驟中，有關菌株菌在 level 1 無菌操作台中進行，實驗的運作及操作將遵照「國科會基因重組實驗守則」，實驗後廢棄物也會依據「國立臺南大學實驗室廢棄物清除處理要點」內的規範進行(詳見切結書簽據)。

申請者簽章

113.11.22





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 申請者實驗室 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

1. 實驗菌株加入抗凍劑及培養基於抗凍管中，保存於-80°C冰箱。
2. 動物細胞株加入抗凍劑及培養基於抗凍管中，冷凍保存於液態氮(-196°C)桶。

##### b. 菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

菌株或動物細胞株以巴斯德滅菌法處理(121°C, 1.5 大氣壓, 15 分鐘)滅菌處理後，交給本校環安組做生物廢棄物集中處理銷毀。

##### c. 上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

動物細胞株 申請者實驗室 及細菌菌株(格致樓 C112) 的無菌操作台中進行實驗，無菌操作台內有本生燈做為滅菌用、真空抽氣幫浦抽取廢棄菌液到集中瓶(集中瓶廢液實驗後進行滅菌處理)，無菌操作台委託廠商定期檢測風向、抽氣及滅菌燈等，以維護操作者及研究空間的環境安全。

#### 7、與基因重組有關的實驗目的

實驗目的：

探討類固醇生合成轉錄因子-1 在睪丸癌發生所扮演之角色

(表格請自行延伸)

本研究擬探討類固醇生合成轉錄因子-1(steroidogenic factor -1, SF-1)在睪丸癌發生所扮演之角色，由先期的研究顯示類固醇生合成有關的轉錄因子參與睪丸癌發生的過程。研究顯示 SF-1 的過度表現促進睪丸萊迪氏細胞瘤( Testicular Leydig cell tumors, LCTs)細胞增生。相反，抑制 SF-1 的表現則 LCT 細胞增殖降低。研究顯示初級纖毛可以防止許多癌症類型的腫瘤增生，我們發現 SF-1 抑制 Leydig 細胞中的初級纖毛。SF-1 促進糖解基因的表達，為 LCT 細胞增殖產生能量。因此，我們假設 SF-1 透過基因組和非基因組功能促進間質細胞腫瘤 (LCT) 進展。本研究擬分成以下部分探討：1) 確認 SF-1 促進睪丸間質細胞腫瘤 (LCT) 進展； 2) 破解 SF-1 調節初級纖毛的機制； 3) 檢查 SF-1 是否調節糖解模組以促進 LCT 進展。本研究將藉由脂質體技術(lipofectamine 3000)將上述機制有關的類固醇生合成轉錄因子-1(SF-1)及纖毛有關的基因(ciliary genes) IFT88、CEP164、CP110 及其 siRNAs 送到到 MA-10 cells(老鼠間質細胞 Leydig cell 腫瘤細胞系) 及 TM-3 cells(小鼠睪丸間質細胞)內，以便深入探討類固醇生合成轉錄因子-1 對於細胞癌遍及癌細胞生長的分子機制及細胞訊息路徑，期望對於睪丸癌的發生及控制有更深入的了解。

#### 8、與基因重組有關的詳細實驗步驟



詳細實驗步驟：

### 大腸桿菌之轉型作用

取50ng之轉殖植體與200 $\mu$ L之大腸桿菌(*E. coli*)的勝任細胞(Competent cell)溫和混勻，至於冰上作用30分鐘後，以42 $^{\circ}$ C進行熱休克(Heat shock) 45秒後，馬上放置於冰上冷卻1~2分鐘，加入800 $\mu$ L之LB medium，放入37 $^{\circ}$ C培養箱以250rpm震盪培養1小時後，以L型無菌玻璃棒塗抹在有抗生素(Ampicilin或Puromycin，依照培養的質體種類決定)的LB培養盤中，將培養盤放置於37 $^{\circ}$ C培養箱中避光培養12~16小時。

### 轉殖質體萃取與濃度測定

將抗生素篩選及確認後的轉殖大腸桿菌菌株經16~18小時培養的菌液，取100mL 菌液倒入高速離心管中，以2700 xg離心10分鐘，離心完後將上清液去除(確定有將菌體完全離下，上清液務必去除乾淨)，以Fast Ion Plasmid Midi Kit (RBC, YPI25 / YPM10)進行質體萃取，方法如下：加入4mL PM1 buffer(含RNase A) 以Vortex打散混合，在加入4mL PM2 Buffer打破細胞(Alkaline lysis)，溫和翻轉混和均勻並於室溫靜置5~10分鐘，使菌液呈現濃稠勾芡狀，最後加入4mL PM3 Buffer中和鹼性，溫和混和均勻，再以12000rpm離心30分鐘。待離心快完成時，把plasmid-Midi column放到50mL的離心管上，在管柱(column) 中放入5mL的PEQ buffer，待buffer滴乾淨後加入離心後的上清液至管柱中進行DNA結合(binding)。過濾後，再加入12mL PW Buffer進行潤洗。待PW Buffer滴乾後，將管柱移至乾淨的高速離心管上，加入8mL 的PEL Buffer(DNA Elution) 到管柱中讓液體隨地心引力流入乾淨的離心管中；加入6 mL的異丙醇(isopropanol) 作酒精沈澱，於是溫作用5分鐘再以12000rpm、4 $^{\circ}$ C離心30分鐘。離心後將上清液小心去除，加入5mL 75% 酒精將鹽類洗去，再次以12000rpm、4 $^{\circ}$ C離心15分鐘。離心後小心的移除酒精，將離心管放置無菌操作內風乾。最後加入100~200 $\mu$ L PEL Buffer將pellet回溶，再以Nanodrop Spectrophotometer (Epoch, BioTek) 進行定量。將定量後的質體(plasmid) 以無菌的MQ水稀釋成100ng/ $\mu$ L再以限制酵素進行確認：100ng之質體、0.1 $\mu$ L限制酵素、1 $\mu$ L 10x NEB buffer再以無菌水補置總體積為10 $\mu$ L，最後將反應管放入37 $^{\circ}$ C作用2小時。反應後再以1.0%瓊脂膠體進行電泳分析，確認限制酵素作用後之片段大小是否符合預期。

### 細胞培養

本實驗所使用的細胞株購自食品工業研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫，包括MA-10 cells(老鼠間質細胞Leydig cell腫瘤細胞系)及TM-3 cells(小鼠睪丸間質細胞)，此細胞株屬於貼附型細胞(adherent-type cell)。培養方式選用高葡萄糖含量之D-MEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 培養基，內含10% fetal bovine serum(FBS) 及1,000 I.U Penicillin、1,000 $\mu$ g/mL Streptomycin、2.5 $\mu$ g/mL Amphotericin，細胞培養10公分培養盤並培養於37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的細胞培養箱。細胞貼附於培養盤底部生長，當細胞長滿時，將培養液去除並以1x PBS潤洗，加入700 $\mu$ L Trypsin-EDTA solution/1x PBS使細胞呈懸浮狀，加入1mL 培養液將細胞沖提下來，並以1.5 $\times 10^6$ 的細胞數作為繼代培養，約兩天長滿。培養於37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、相對飽和濕度95%的細胞培養箱，作為後續實驗的分析。

### 真核細胞之基因阻斷 (gene knockdown) 試驗

前一天以2 $\times 10^5$ 細胞數的TM3或MA-10細胞培養6孔盤(6-well plate)，放入含有5% CO<sub>2</sub>的37 $^{\circ}$ C細胞培養箱培養24小時。待細胞長至8分滿，使用Lipofectamine® 3000 Reagent試劑進行轉染作用(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-SF-1、IFT88、CEP164、CP110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<sub>2</sub>的37 $^{\circ}$ C環境中24小時。隔天加入Puromycin (25 mg/ml)置6-well plate中(shRNA轉質質體上有抗Puromycin的基因，藉此做為協助篩選有轉殖成功的細胞)，再於5% CO<sub>2</sub>的37 $^{\circ}$ C培養箱內培養，提供做為後續分析試驗所需。

### 真核細胞中類固醇生合成轉錄因子-1 (SF-1)過度表現試驗

前一天以  $2 \times 10^5$  細胞數的 TM3 或 MA-10 細胞培養 6 孔盤(6-well plate), 放入含有 5% CO<sub>2</sub> 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 試劑進行轉染作用 (transfection)。配製所需的 Lipofectamine® 3000 Reagent 將 SF1 過度表現的轉殖質體 His-tagged-SF1 (From Addgene, Plasmid #28182) 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<sub>2</sub> 的 37°C 環境中 24 小時。隔天加入 Ampicillin (100 µg/mL) 置 6-well plate 中 (His-tagged-SF1 轉殖質體上有抗 Ampicillin 的基因, 藉此做為協助篩選有轉殖成功的細胞), 再於 5% CO<sub>2</sub> 的 37°C 培養箱內培養, 提供做為後續分析試驗所需。

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)

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名:

申請者簽章

113 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：探討類固醇生合成轉錄因子-1 在促進睪丸萊迪氏細胞瘤發生所扮演的角色，遵照「國科會基因重組實驗守則」、「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：申請者簽章 (親簽章)

中 華 民 國 113 年 11 月 22 日





## 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

保存:-80 度低溫冷凍櫃。

地點: 冷凍櫃位於榮譽校區 E 棟 3 樓走廊盡頭

### b. 菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

銷毀方式: 高溫高壓滅菌、生物廢棄。

銷毀程序步驟: 1 將待銷毀細胞株於滅菌釜滅菌。

2 丟置生物廢棄。

3 由廠商回收。

### c. 上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

地點: 榮譽校區 ZE105-1 及 申請者實驗室 中操作。

相關設備: 高壓滅菌釜。

## 7、與基因重組有關的實驗目的

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<sup>G76V</sup>-YFP 重組蛋白，以利於研究。

(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：

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 ( $0.12 \times 10^6$  或  $1 \times 10^6$  個細胞) 培養在 24 或 6 孔微量滴定板中，每孔 500 或 1000 $\mu$ L 培養基中生長 24 小時。使用 PolyJet 用 1 $\mu$ g Ub<sup>G76V</sup>-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

$1 \times 10^6$  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  $\mu$ L siLenFect™ 與 242.5  $\mu$ L 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：\_\_\_\_\_

申請者簽名

113 年 10 月 31 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 miRNA 預防肺癌於蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制之影響，遵照「國科會基因重組實驗守則」、「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

申請者簽名

申請人：\_\_\_\_\_ (親簽章)

中華民國 113 年 10 月 31 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	GR113003	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討牛乳 miRNA 預防肺癌於蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡機制之影響		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，複審決議</span>		
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; color: blue;">建議說明 <del>實驗</del> 如何追蹤學生每一批的實驗細胞 <del>流向</del> 流向。</p>		
審查人簽章	審查委員簽章	審畢日期	113 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)

委員 2

案件編號	GR113003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討牛乳 miRNA 預防肺癌於蛋白質降解、去泛素化及細胞程序性死亡 機制之影響		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，複審決議</span>		
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;">若能確實遵守基因重組實驗切結的相同規範， 則應是可行。</p>		
審查人簽章	<b>審查委員簽章</b>	審畢日期	113年11月14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：研究新型糖苷化天然衍生物於拮抗惡性癌細胞之效用與機轉

計畫主持人：申請者 職稱：副教授 電話及 E-mail：分機申請者@mail.nutn.edu.tw

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：PC-3 人類前列腺癌細胞株，B16 小鼠黑色素瘤細胞株

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：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株、植物、微生物或動物宿主名稱：PC-3 人類前列腺癌細胞株，A2058、B16 黑色素瘤細胞株

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〕CO<sub>2</sub>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：BSL-1 BSL-2 BSL-3 BSL-4

5、進行本研究之實驗室 國立臺南大學榮譽校區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

The cell lines and DH5alpha bacteria transformed with reporter plasmids will be stored in the -80 °C freezer located in ZE105 or in the liquid nitrogen tank located in 實驗室

b. 菌株或動物細胞株銷毀方式及銷毀程序步驟

Once the experiment is completed, materials will be treated with 500 ppm sodium hypochlorite solution and then disposed of as biohazardous waste.

c. 上述操作環境簡述(地點、相關設備等描述)

The operation location is at 實驗室 It is equipped with PCR instruments, electrophoresis tanks, 300 ~12000 ×g centrifuges, a 4°C refrigerator and a -20°C freezer, luminescence meters, and constant-temperature shaking incubators. There is a cell culture room equipped with a Laminar flow hood, microscope, liquid nitrogen tank, and CO<sub>2</sub> cell culture incubator.

7、與基因重組有關的實驗目的

實驗目的：

To determine the mechanism via which the glycosylated natural products (gNPs) inhibit cancer growth and metastasis, the regulatory effect of anti-cancer gNPs on the downstream genes of candidate oncogenic proteins will be measured by reporter gene assay.

8、與基因重組有關的詳細實驗步驟

詳細實驗步驟：

The promoter or 3'-UTR of genes regulated by oncogenic proteins (PIM1, MEK1, CDK2, PDK1 etc.) will be amplified by PCR using designed primers. The plasmids, pGL3-promoter-LUC and pmiR-Reporter, will be inserted with the promoter or 3'-UTR of candidate molecules. *E. Coli* strain (DH5alpha) will be the bacteria host amplifying these recombinant plasmids. Transfections of these plasmids and pRL-SV40 into the human prostate cancer cell line (PC-3) or melanoma cell lines (A2058, B16) will be performed using lipofectamine. Reporter gene assays will be performed to measure the regulatory effects of anti-cancer gNPs on candidate oncogenic proteins.

計畫主持人(申請人)簽名： 申請者簽章 113 年 11 月 15 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，計畫名稱研究新型糖苷化天然衍生物於拮抗惡性癌細胞之效用與機轉，遵照「國科會基因重組實驗守則」、「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：申請者簽名 (親簽章)

中 華 民 國 113 年 11 月 15 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	GR113004	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	研究新型糖苷化天然衍生物於拮抗惡性癌細胞之效用與機轉		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，複審決議</span>		
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;">本研究若能確實遵守，本報基因重組實驗 地結事內之規範，應予行</p>		
審查人簽章	審查委員簽章	審畢日期	113年11月18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	GR113004	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	研究新型糖苷化天然衍生物於拮抗惡性癌細胞之效用與機轉		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <span style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> 修正後，複審決議</span>		
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 gray; padding: 10px;"> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 該研究欲重組 DNA 技術，建立冷光酶 LUC 為報導基因之各種構建物，再利用微脂粒轉殖送入人類前列腺癌細胞株與小鼠黑色素瘤細胞株中表現，以探討新型糖苷化天然衍生物之處理對此類細胞之拮抗效用。</li> <li>2. 此實驗使用之分子選殖技術為常規的核酸技術，利用大腸桿菌 DH5a 進行基因選殖，已廣用於各項實驗。</li> <li>3. 本研究轉殖細胞株所用載具為微脂體商業試劑，不具毒性與離體感染力，安全性應無疑慮。</li> <li>4. 本研究使用冷光酶報導基因，此基因亦已廣為利用在各種細胞生物學研究作為檢測報告基因，安全性無虞。</li> </ol> <p>本計畫若依一般生物材料保全規定操作與銷毀處理廢棄物，安全性應無疑慮。</p> </div>		
審查人簽章	<b>審查委員簽章</b>	審畢日期	113 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