

國立臺南大學 109 年度生物實驗安全委員會會議紀錄

時間：109 年 12 月 08 日(星期二)中午 12 時

地點：誠正大樓 309 會議室

主持人：陳總務長樹屏

出席者：生物科技學系程主任台生、生態暨環境資源學系謝宗欣老師、生態暨環境資源學系張原謀老師、生物科技學系鄧燕妮老師、生物科技學系張翠玲老師、生物科技學系黃銘志老師、總務處環安組張碩文組長

列席者：

壹、主席致詞

感謝委員們撥空中午來參加生物實驗安全委員會，那我們就直接進入提案討論。

貳、工作報告

一、109 年度申請本校生物實驗安全委員會計畫共 6 件，資料如下：

1.計畫編號：GR109001(P.3 -P.15)

申請人：生物科技學系曹哲嘉老師

計畫名稱：利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境污染物之耐受機制
此申請案已於 109 年 4 月 23 日申請通過

2.計畫編號：GR109002(P.16 -P.22)

申請人：生物科技學系張翠玲老師

計畫名稱：探討甘草經泛素蛋白酶體途徑及數據科學對疾病之關聯

3.計畫編號：GR109003(P. 23-P.28)

申請人：生物科技學系張翠玲老師

計畫名稱：開發泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統----偵測食品導致細胞自噬

4.計畫編號：GR109004(P.29 -P.36)

申請人：生物科技學系鄧燕妮老師

計畫名稱：男性不孕症患者 *LRWD1* 的 p53RE 分析及相關研究

5.計畫編號：GR109005(P.37 -P.44)

申請人：生物科技學系鄧燕妮老師

計畫名稱：探討氯化銾對於細胞複製及生殖的影響

6.計畫編號：GR109006(P. 45-P.50)

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6件計畫，已全數審查完畢。

參、提案討論

國立臺南大學109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GR109002、GR109003、GR109004、GR109005、GR109006生物實驗安全申請案，是否同意進行？	總務處環安組	2

提案一

案由：有關計畫編號 GR109002、GR109003、GR109004、GR109005、GR109006 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 GR109003、GR109004、GR109006，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.23-P.36、P.45-P.50)。
- 二、計畫編號 GR109002、GR109005，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.16-P.22、P.37-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：照案通過。

肆、臨時動議：無

伍、散會(12:30)結束

實驗目的及詳細實驗步驟：

實驗目的：

於微藻之單胞藻模式生物衣藻(*Chlamydomonas*)，以電穿孔法轉入鏈黴菌 Aph7⁺之抗藥基因構建突變株種庫。將突變種庫利用低劑量的環境新興污染物鄰苯二甲酸二乙酯(DEP)培養，篩選出對 DEP 耐受度異常之突變株 *dep2*。分析 *dep2* 突變株的 Aph7⁺轉殖插入位點為第一號染色體基因座代號 g040600。本研究中擬轉殖該基因片段與鏈黴菌 sh-Ble 篩選用標記基因至突變株進行挽救，在野生型細胞中異位表現，以驗證此基因對污染物耐受性之影響。

詳細實驗步驟：

1). Re-transformation of the *dep2* mutant strain with the wild-type gene to rescue the DEP-hypersensitive phenotype

Cells. The *dep2* mutant and the reference strain cc-4533 will be grown in TAP medium (10 mM Tris, pH 8.0; acetate; phosphate) until $\sim 2 \times 10^6$ cells/ml under the illumination cycle of 14-hr light and 10-hr dark at 22 °C.

Cotransformation. We will co-transform the genomic DNA into the *dep2* mutant with a drug-resistant marker DNA for selection. *Chlamydomonas* genomic DNA containing the disrupted gene g040600 will be subcloned from the BAC clones available from Clemson University Genomics, S. Carolina, USA, using appropriate restriction enzymes. Purified genomic subclones ~ 800 ng and PCR-amplified sh-*Ble* cassette ~ 10 ng will be mixed and electroporated into the mutant cell. For one transformation, $\sim 3 \times 10^7$ cells will be mixed in the 4-mm cuvette and pulsed with the voltage at 800 V, resistance at 600 Ohm, capacity at 50 uF, and time constant ~ 11 ms. The cells will be recovered for overnight and plated on the TAP-agar plate containing 2 ug/ml Zeocin and incubated under continuous light for 2 weeks. Colonies will be randomly chosen and streaked out for further analysis.

Assessment of rescue. From our study, *dep2* mutant could not survive in TAP containing DEP higher than 0.8 mM, but cc-4533 reference strain could still grow. We will use this condition to assess whether the re-transformed gene rescue the DEP hypersensitivity in the mutant. Several independently re-transformed strains, the *dep2* mutant, and cc-4533 reference strain will be grown to mid-log phase in TAP medium, and the cell density will be adjusted. Aliquot of cells will be inoculated to the 24-well plate. DEP will be added into triplicated wells to make a series of final concentrations containing 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.2 mM of DEP. Cells will be incubated under dark-light cycle for 72 hrs, and the cell density will be counted. The relative growth comparing to no-DEP treatment will be calculated.

2). Introduce the wild-type g040600 gene into the reference cc-4533 strain to test whether it enhance the DEP-tolerance

We will also introduce the wild-type allele of the g040600 gene into cc-4533 strain using co-transformation strategy mentioned above. We plan to use its native promoter to drive the transgene expression. Alternative, the AR promoter (containing the HSP70A and Rubisco promoter sequences) is a commonly used strong promoter for *Chlamydomonas* and will be fused in front of the coding sequence of the candidate DEP-response gene. We will test the expression of transgene using qPCR as

described above, and confirmed overexpressed strains will be chosen to test their DEP-sensitivity using a series of final concentrations containing 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.2 mM of DEP based on the relative growth after the 72 hr endpoint and growth curve for 7 days.

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 109 年 4 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

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表
(初審)

案件編號	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境汙染物之耐受機制		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	遵守安全守則		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年4月16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	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境汙染物之耐受機制		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	研究人員若能確實遵守“基因重組實驗守則” 那麼是安全可行的。		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年4月16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	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境污染物之耐受機制		
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	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
			
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年 4 月 23 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	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境污染物之耐受機制		
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	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議) <div style="text-align: center; font-size: 2em; color: blue;">  </div>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年4月17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	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境汙染物之耐受機制		
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	(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;">本研究以單胞藻衣藻進行基因重組相突實驗，研究人員若能確實遵守"基因重組實驗守則"相突規定，則應屬安全可行的。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	107年4月17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	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境污染物之耐受機制		
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	(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;">請主持人及實驗人員 遵守“基因重組安全 守則”。 同意本研究進行。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年 4月 17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	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境污染物之耐受機制		
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	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
	實驗步驟詳細，同意進行，實驗進行時，請遵照國科會基因重組實驗守則		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年4月21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	GR109001	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	利用遺傳學模式生物解析光自營生物對環境污染物之耐受機制		
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	<p>一、衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>cc-4533 品系非病原菌，鏈黴菌 <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>Aph7 基因也非毒素基因，安全上沒有太大問題。唯重組過後之生物體並非自然界生物，應確實遵守科技部「基因重組實驗守則」相關規範，防止基因重組生物釋放自然界引發不可預期之後果。</p> <p>二、由於此基因重組實驗之危險性較低，應屬於 P1 級。但科技部「基因重組實驗守則」中僅見對病原菌之列表，未見規範衣藻及鏈黴菌重組相關規定，為求謹慎，建議可與科技部主管單位略作確認較佳。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	2020 年 4 月 16 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

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：_____探討甘草經泛素蛋白酶體途徑及數據科學對疾病之關聯_____

計畫主持人：_____ 職稱：_____教授_____ 電話及傳真：_____

執行機構、系所：_____國立台南大學生物科技學系_____

1、實驗內容： 是否進行基因重組之實驗？ -----是

是否進行微生物培養的實驗？ -----是

是否進行基因轉殖之動物實驗？ -----是

是否進行基因轉殖之植物實驗？ -----是

是否為自交植物？ -----是

2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）

a.重組基因來源名稱：_____Ub^{G76V}-YFP_____

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群，動物，植物

b.進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：_____E. coli_____

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群

c.進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：_____

3、基因轉殖實驗設備及轉殖方法

a.具備之基因轉殖之動物實驗設備：SPF 設備； IVC 設備；

其他〔名稱〕_____

b.具備之基因轉殖之植物實驗設備：生長箱； 溫室； 農場；

其他〔名稱〕_____

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

其他〔名稱〕_____

4、進行本研究所需之安全等級：P1 P2 P3 P4

5、進行本研究之實驗室 _____ E _____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：

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

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

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

將細胞 (0.12×10^6 或 1×10^6 個細胞) 培養在 24 或 6 孔微量滴定板中，每孔 500 或 1000 μ L 培養基中生長 24 小時。使用 PolyJet 用 1 μ g Ub^{G76V}-YFP plasmid DNA 轉染 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。

實驗完成後的 DH5a 細胞與 *E. coli* 以高壓蒸氣滅菌釜(autoclave) 來進行滅菌，其條件設定為溫度 121°C

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：_

109 年 12 月 3 日

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

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」
案件，計畫名稱探討甘草經泛素蛋白酶體途徑及數據科學對疾病
之關聯，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學
實驗場所廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性及關注化
學物質與有害廢棄物管理要點」及「國立臺南大學職業安全衛生
工作守則」等相關規範辦理及執行。特立此切結為憑，如有不實，
願自負一切法律責任。

此致

國立臺南大學

申請人：_

〔親簽章〕

中 華 民 國 109 年 11 月 27 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	GR109002	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討甘草經泛素蛋白酶體途徑及數據科學對疾病之關聯		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	<p>(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)</p> <p>本實驗在微生物細胞中進行細胞轉植實驗，請主持人及實驗人員在實驗完成後依規定完成高壓滅菌銷毀事宜。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109 年 12 月 02 日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀

聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663

E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

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	GR109002	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討甘草經泛素蛋白酶體途徑及數據科學對疾病之關聯		
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	<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"> 1. 未陳述實驗完成後的 DH5a 細胞與 <i>E. coli</i> 要如何進行處理，請補充。 2. 實驗目的及詳細實驗步驟倒數第 4 行的 <i>colli</i>→<i>coli</i> 		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	2020 年 12 月 3 日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀

聯絡電話： (06) 21331111 分機 237、663

E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會初審
審核意見回覆

案件編號	GR109002	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討甘草經泛素蛋白酶體途徑及數據科學對疾病之關聯		
審查意見暨申請者回覆	<p>委員審查意見：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 未陳述實驗完成後的 DH5a 細胞與 <i>E. coli</i> 要如何進行處理，請補充。 2. 實驗目的及詳細實驗步驟倒數第 4 行的 <i>colli</i>→<i>coli</i> <p>申請者回覆：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 實驗完成後的 DH5a 細胞與 <i>E. coli</i> 以高壓蒸氣滅菌釜(<i>autoclave</i>) 來進行滅菌，其條件設定為溫度 121℃ 2. 已修正 <i>coli</i> 		
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	109 年 12 月 3 日

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：_____開發泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統 ---- 偵測食品導致細胞自噬_____

計畫主持人：_____ 職稱：_____教授_____ 電話及傳真：_____

執行機構、系所：_____國立台南大學生物科技學系_____

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

2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）

a.重組基因來源名稱：_____Ub^{G76V}-YFP_____

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群，動物，植物

b.進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：_____E. coli_____

第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群

c.進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：_____

3、基因轉殖實驗設備及轉殖方法

a.具備之基因轉殖之動物實驗設備：SPF 設備； IVC 設備；

其他〔名稱〕_____

b.具備之基因轉殖之植物實驗設備：生長箱； 溫室； 農場；

其他〔名稱〕_____

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

其他〔名稱〕_____

4、進行本研究所需之安全等級：P1 P2 P3 P4

5、進行本研究之實驗室 _____ E _____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：

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

二、**實驗詳細步驟**：將一段含有泛素的DNA序列，利用設計出的引子 synthetic forward and reverse oligonucleotides fp 5'-GCTAGCACCCACCATGGCCT-3' and rp5'-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 (0.12×10⁶ 或 1×10⁶ 個細胞) 培養在 24 或 6 孔微量滴定板中，每孔 500 或 1000μL 培養基中生長 24 小時。使用 PolyJet 用 1μg 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。

(表格請自行延伸)

計畫主持人(申請人)簽名：

109 年 11 月 27 日

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

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」
案件，計畫名稱開發泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統----偵
測食品導致細胞自噬，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國
立臺南大學實驗場所廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒
性及關注化學物質與有害廢棄物管理要點」及「國立臺南大學職
業安全衛生工作守則」等相關規範辦理及執行。特立此切結為憑，
如有不實，願自負一切法律責任。

此致

國立臺南大學

申請人：_____（親簽章）

中 華 民 國 109 年 11 月 27 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	GR109003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	開發泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統----偵測食品導致細胞自噬		
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)		
	若能確實遵守"基因重組實驗守則"应是可行的		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109 年 12 月 / 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	GR109003	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	開發泛素化螢光蛋白質之流式細胞系統——偵測食品導致細胞自噬		
查覈結果	<input checked="" type="checkbox"/> 同意進行 <input type="checkbox"/> 修正後，複審決議		
審 查 意 見	(請針對實驗目的及詳細實驗步驟提出具體審查建議)		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年12月 6日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀

聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663

E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學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：男性不孕症患者 *LRWD1* 的 p53RE 分析及相關研究

計畫主持人：_____ 職稱：_____ 教授 _____ 電話及傳真：06-2133111# _____

執行機構、系所：_____ 生物科技系 _____

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

2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）

a. 重組基因來源名稱：人類正常睪丸 Hs 181.Tes 細胞 (human normal testis)、人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma) 細胞株、卵巢癌細胞株 A2780s (p53 wild-type), OVCAR-3 (p53 mutant), SKOV3 (p53 wild-type, loss of p53 function)

第一級危險群, 第二級危險群, 第三級危險群, 第四級危險群, 動物, 植物

b. 進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：*E.coli*

第一級危險群, 第二級危險群, 第三級危險群, 第四級危險群

c. 進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：人類正常睪丸細胞 Hs 181.Tes、人類睪丸癌細胞株 NTERA-2 cl.D1、卵巢癌細胞株 A2780s (p53 wild-type), OVCAR-3 (p53 mutant), SKOV3 (p53 wild-type, loss of p53 function)

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：

本研究團隊先前的研究成果顯示LRWD1的基因啟動子上的p53轉錄因子結合位置(p53 response element, p53RE)區域在精蟲活動力差的病人，具有較高的變異現象(-208 C>A 位點)，P53在生殖細胞早期減數分裂前及減數分裂中的DNA damage及 DNA repair中扮演重要角色，P53是精蟲的DNA damage後維持DNA完整性的關鍵之一，因此P53被認為是人類精蟲DNA damage的新指標(indicator)。睪丸的p53中藉由調控apoptosis以去除多餘的spermatogonia，以維持生殖細胞的恆定(germline homeostasis)(1-4)。

本研究擬探討p53轉錄因子結合位置(p53 response element, p53RE)對於LRWD1的轉錄調控及如何因環境對於細胞的壓迫來調控LRWD1的表現，以維護細胞基因體的完整性。首先將藉由Chip及EMSA等實驗，確認p53在p53RE的結合，並且利用螢光蟲冷光報導基因luciferase的表現進行啟動子活性的分析，藉由細胞給予H₂O₂及Camptothecin (CPT)等造成細胞壓迫的壓力，以釐清在外界逆境的壓迫下，LRWD1與p53的表現及p53對於LRWD1的轉錄調控。將藉由site-direct mutagenesis方法將LRWD1基因啟動子上的p53RE破壞以進一步證實p53RE對於LRWD1基因啟動及對抗環境壓力的重要性。也將藉助免疫螢光分析(immunofluorescence assay)或蛋白質分析(western blot)，可以幫助瞭解LRWD1受p53轉錄因子調控及表現情形，有助於不孕症肇因的了解。

實驗步驟

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

進行轉型作用 (transfection) 的前一天, 將數目 1.0×10^5 的人類正常睪丸 Hs 181.Tes 細胞 (human normal testis)、人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma) 或卵巢癌細胞株 A2780s (p53 wild-type), OVCAR-3 (p53 mutant), SKOV3 (p53 wild-type, loss of p53 function) 培養於 12-well 盤中, 培養於 37°C 、5% CO_2 24 小時後, 配置每 well 含有總量為 $1\mu\text{g}$ 的 plasmid DNA、 $30\mu\text{l}$ H-DMEM (Gibco, 12800-017) 及 $0.6\mu\text{l}$ TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, R0531), Vortex 5 秒, 混合均勻後室溫靜置 15min。將 TurboFect Transfection Reagent Mix 加入 96-well 盤中, 培養於 37°C 、5% CO_2 24 小時。

2. 真核細胞之基因阻斷 (gene knockdown) 試驗

前一天以 2×10^5 cell/ml 培養於 6-well plate, 放入含有 5% CO_2 的 37°C 細胞培養箱培養 24 小時。待細胞長至 8 分滿, 使用 Lipofectamine® 3000 Reagent 試劑進行轉型作用 (co-transfection)。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-LRWD1, shRNA-NRF2, 及利用 LRWD1 及 NRF2 基因所構築的質體混合於 Lipofectamine® 3000 Reagent 中, 以 Vortex 震盪混和均勻, 室溫下靜置 10 分鐘, 加置 6-well plate 中平移搖晃混勻。將進行轉染作用的細胞培養於 5% CO_2 的 37°C 環境中 24 小時。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 $500\mu\text{l}$ 0.05% Trypsin-EDTA 於 37°C 靜置 2 分鐘, 加入 $500\mu\text{l}$ 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% CO_2 的 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 37°C 、5% CO_2 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和均勻, 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。

3. 含 p53RE 的 LRWD1 啟動子構築完成 pGL3 basic-LRWD1 promoter 轉殖質體構築

將 LRWD1 基因上游區域含有 p53RE 位置的轉錄起始點附近約 0.6 kb (-515 至 +53) 片段, 以生物資訊軟體 Vector NTI 分析其具有的限制酵素切點 (Restriction Enzyme Map Analysis), 挑選 *NheI* 及 *HindIII* 作為轉殖質體構築的限制酵素。於正向引子 (forward primer) 接上 *NheI* 限制酵素辨識位置 (CTA-G[↓]CTAGC) 和反向引子 (reverse primer) 接上 *HindIII* 限制酵素辨識位置

(A[↓]AGCTT-GGG), 經 PCR 反應所得的產物與 pGL3-basic vector 正向相接, 完成 pGL3 basic-LRWD1 promoter 轉殖質體構築。

4. 特定變異點試驗 (site-directed mutagenesis) 完成 pGL3 basic-LRWD1 promoter^{Δp53} 轉殖質體構築

將依照 QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit ; Cat. No.: AG-210518 (Agilent Tech.) 的建議步驟進行。取 400 ng plasmid DNA，加入 0.5 μl 突變特定變異點 (p53RE) 的引子對 (primer set, 10 μm)，0.5 μl dNTP (10 mM)，2.5 μl 10X Rxn buffer，0.8 μl Pfu Turbo，10% DMSO，之後補二次水至 25 μl。PCR 反應條件為：95°C 作用 1 分鐘，使雙股 DNA 變性，再以循環式的裂解溫度 95°C 30 秒、煉合溫度 55°C 1 分鐘、延長溫度 68°C 7 分 30 秒進行 24 個循環，最後以 68°C 處理 10 分鐘。將聚合酵素連鎖反應產物置於冰上 2 分鐘，加入 1 μl DpnI (200 U)，3 μl Torngos (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit)，之後補二次水至 30 μl，於 37°C 水浴培養 2 小時後，進行大腸桿菌轉型作用及質體萃取確認是否基因改造成功，完成 pGL3 basic-LRWD1 promoter^{Δp53} 轉殖質體構築。

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 年 月 日

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

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人 申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱男性不孕症患者*LRWD1*的p53RE分析及相關研究，遵照「科技部基因重組實驗守則」、「國立臺南大學實驗場所廢棄物清除處理要點」、「國立臺南大學毒性及關注化學物質與有害廢棄物管理要點」及「國立臺南大學職業安全衛生工作守則」等相關規範辦理及執行。特立此切結為憑，如有不實，願自負一切法律責任。

此致

國立臺南大學

申請人：_____（親簽章）

中 華 民 國 年 月 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (初審)

案件編號	GR109004	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	男性不孕症患者 <i>LRWD1</i> 的 p53RE 分析及相關研究		
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)		
	實驗步驟詳細，同意進行		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109 年 12 月 3 日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀

聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663

E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (初審)

案件編號	GR109004	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	男性不孕症患者 <i>LRWD1</i> 的 p53RE 分析及相關研究		
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)		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109年12月01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：探討氯化鈾對於細胞複製及生殖的影響

計畫主持人： _____ 職稱： 教授 電話及傳真： 06-2133111#

執行機構、系所： 生物科技系

- 1、實驗內容： 是否進行基因重組之實驗？ -----是
是否進行微生物培養的實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之動物實驗？ -----是
是否進行基因轉殖之植物實驗？ -----是
是否為自交植物？ -----是
- 2、重組基因來源、宿主之安全等級及名稱（參考國科會基因重組實驗守則）
 - a.重組基因來源名稱：衣藻、人類正常睪丸 Hs 181.Tes 細胞 (human normal testis)、人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma) 細胞株
第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群，動物，植物
 - b.進行重組基因之微生物或病毒宿主名稱：E.coli
第一級危險群，第二級危險群，第三級危險群，第四級危險群
 - c.進行重組基因之細胞、植物或動物宿主名稱：人類正常睪丸細胞 Hs 181.Tes、人類睪丸癌細胞株 NTERA-2 cl.D1
- 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：

氯化銦 (InCl_3) 是液晶面板主要成分之一，其對於生物影響的研究極少，因此本研究擬以衣藻、斑馬魚及人類的生殖細胞株為研究對象，探討氯化銦對於細胞複製及生殖的影響，將針對氯化銦在細胞或生物體的殘留量、對於細胞存活、DNA複製及損傷及氧化壓力等面向，探討及評估氯化銦對於生態環境及生物生殖的影響。

實驗步驟

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

進行轉型作用 (transfection) 的前一天，將數目 1.0×10^5 的人類正常睪丸 Hs 181.Tes 細胞 (human normal testis)、人類睪丸癌 NTERA-2 cl.D1 細胞 (pluripotent human testicular embryonal carcinoma) 或卵巢癌細胞株 A2780s (p53 wild-type), OVCAR-3 (p53 mutant), SKOV3 (p53 wild-type, loss of p53 function) 培養於 12-well 盤中，培養於 37°C 、5% CO_2 24 小時後，配置每 well 含有總量為 $1\mu\text{g}$ 的 plasmid DNA、 $30\mu\text{l}$ H-DMEM (Gibco, 12800-017) 及 $0.6\mu\text{l}$ TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, R0531)，Vortex 5 秒，混合均勻後室溫靜置 15min。將 TurboFect Transfection Reagent Mix 加入 96-well 盤中，培養於 37°C 、5% CO_2 24 小時。

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

將衣藻塗畫在含 1.5% 洋菜之 TAP-固態培養基，於 16 小時光照/8 小時黑暗的 25°C 培養箱中培養三天，再將衣藻接種於含 150ml TAP250 ml 的錐形瓶中，培養三天後計數細胞。調整濃度至約為 2×10^6 cells/ml，加入 DEP 進行藥劑處理，每種濃度均設置三重複、各 50ml 細胞，再放回 16 小時光照/8 小時黑暗的 25°C 再放回培養箱中繼續培養，以 90 rpm 旋轉式震盪器震盪培養 72 小時，以離心收集衣藻並溶解在含有 pCrGFP 質體的電穿孔 (electroporation) 溶液中，進行電穿孔將質體送入衣藻中。

計畫主持人(申請人)簽名：_____ 年 月 日

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

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱探討氯化銻對於細胞複製及生殖的影響，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：_____（親簽章）

中 華 民 國 年 月 日

國立臺南大學生物實驗安全委員會審核意見表 (初審)

案件編號	GR109005	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討氯化銻對於細胞複製及生殖的影響		
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	委員核章	審畢日期	109年12月07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	GR109005	單位	生物科技學系
研究計畫 名稱	探討氯化銻對於細胞複製及生殖的影響		
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	<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>1. 未陳述實驗完成後的細胞與 <i>E. coli</i> 要如何進行處理，請補充。</p>		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	2020 年 12 月 3 日

聯絡窗口：

聯絡人： 李芳儀

聯絡電話： (06) 2133111 分機 237、663

E-mail： bluebear@mail.nutn.edu.tw

國立臺南大學生物實驗安全委員會初審
審核意見回覆

案件編號	GR109005	單位	生物科技學系
研究計畫名稱	探討氯化鈾對於細胞複製及生殖的影響		
審查意見暨申請者回覆	<p>委員審查意見：</p> <p>1. 未陳述實驗完成後的細胞與 <i>E. coli</i> 要如何進行處理，請補充。</p> <p>申請者回覆：</p> <p style="color: blue;">實驗完成後的細胞或 <i>E. coli</i> 會依據"基因重組實驗守則"的要求，以高溫高壓滅菌(121°C, (巴斯德滅菌法) 1.5 大氣壓, 15 min) 滅菌處理。 以上</p>		
申請者簽章	申請者核章	回覆日期	2020/12/13

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

計畫主持人： _____ 職稱： 助理教授 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（參考國科會基因重組實驗守則）

- a.重組基因來源名稱： 阿拉伯芥
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, 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

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 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：

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 particular, 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：

實驗將進行生物性因子(biotic factors)之分析，植物種類的選擇，目前以野生型阿拉伯芥、阿拉伯芥轉植株(轉 PME 基因)；分別收集受試植物之幼苗，及成株階段之分泌物及萃取物。以活體外進行液態震盪培養法(in vitro plant culture on rotatory shaker)，分離根部分泌物化合物並以質譜鑑定；非生物性因子(biotic factors，包括 CO₂ 濃度與土壤溫度)之分析，分離並鑑定根部分泌物化合物(compound characterization)，及鑑定微生物種類(microbial identification)。

根圈或內生微生物的篩選：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，來分析土壤微生物群落的潛在功能，及碳源的利用模式等。

計畫主持人(申請人)簽名：_____

109 年 11 月 27 日

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

本項基因重組實驗查覈結果：同意進行 不同意進行

附註意見(無者免填)：

國立臺南大學生物實驗安全委員會核章：_____ 年 月 日

國立臺南大學基因重組實驗

切結書

本人_____申請「國立臺南大學生物實驗安全委員會」案件，計畫名稱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：_____ (親簽章)

中 華 民 國 109 年 11 月 27 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	GR109006	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)		
	若能確實遵守"基因重組實驗守則"應是可行的。		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109 年 12 月 1 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	GR109006	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)		
審查人簽章	委員核章	審畢日期	109 年 12 月 07 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