

2. 生物材料之基本資料（附表三）

生物材料之基本資料

壹、生物材料之分類命名、符號

學名：(中文) 枯草桿菌

：(拉丁學名) *Bacillus subtilis*

申請人給予之號碼或符號：S123

貳、培養、保存及存活試驗條件

一、培養基 Nutrient agar

二、生長溫度 30 °C

三、通氣性 好氧

四、長期保存最適方法

冷凍

冷凍乾燥

其他

五、請另附頁詳細說明培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式等。(見附件二)

六、生物材料如為突變株時，請說明突變劑及分離方法。(請附頁說明)

七、質體、病毒或噬菌體請另外附頁說明使用之宿主、轉殖或感染方式及核酸純化方法，若以核酸型式寄存者，請註明濃度或力價。

參、對生物健康及環境危害之性質說明

一、寄存之生物材料具有危害生物健康或環境的性質

是，對 人類， 動物， 植物， 其他

說明如下 (可另頁詳細說明。勾選動物或植物者，請說明物種種類。)

申請人不認為寄存之生物材料對生物健康或環境具有危害。

二、寄存之生物材料屬於下列危險群： 第一級， 第二級， 第三級或更高。

(請參考科技部「基因重組實驗守則」及衛生福利部相關法規。)

肆、其他資料

一、生物材料其他名稱 納豆菌

二、相關宿主學名 無

參考例：生物材料之基本資料 - 細菌

附件一、*Bacillus subtilis* S123 分類學性質

1. 形態特徵：桿菌、具運動性、具內生孢子。
2. 生理性質：碳源利用性之產酸試驗

碳源	酸的生成
glycerol	+
erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
ribose	+
D-xylose	+
L-xylose	-
adonitol	-
galactose	-
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
rhamnose	-
mannitol	+

3. 16S rDNA 序列比對

分離株 S123 之 16S rDNA 序列分析結果，分離株 S123 最接近 *Bacillus subtilis*。可做為菌株鑑別用之 16SRNA 序列資料如下：(略)

附件二、微生物培養保存條件

1. 培養基配方：

Medium Title:	NUTRIENT AGAR (DIFCO 0001)	
Content / Amount:	Beef extract	3.0 g
	Peptone	5.0 g
	Agar	15.0 g
	Distilled water	1.0 L
Description:	Adjust pH to 7.0.	

2. 培養基殺菌條件：121°C、15 mins

3. 培養溫度：30°C

4. 氣體需求：Aerobic

5. 保存方法：

(1) 冷凍保存：

保護劑為 20% Glycerol：Nutrient broth = 1：1 混合

保護劑殺菌條件：121°C、15 mins

(2) 冷凍乾燥保存：保護劑為 20% Skim milk

保護劑殺菌條件：115°C、20 mins

生物材料之基本資料

壹、生物材料之分類命名、符號

學名：(中文) 將達梭狀桿菌

：(拉丁學名) Clostridium ljungdahlii

申請人給予之號碼或符號：C123

貳、培養、保存及存活試驗條件

一、培養基 Clostridium ljungdahlii medium

二、生長溫度 37 °C

三、通氣性 厭氧，使用厭氧缸培養

四、長期保存最適方法

冷凍

冷凍乾燥

其他

五、請另附頁詳細說明培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式等。(見附件二)

六、生物材料如為突變株時，請說明突變劑及分離方法。(請附頁說明)

七、質體、病毒或噬菌體請另外附頁說明使用之宿主、轉殖或感染方式及核酸純化方法，若以核酸型式寄存者，請註明濃度或力價。

參、對生物健康及環境危害之性質說明

一、寄存之生物材料具有危害生物健康或環境的性質

是，對 人類， 動物， 植物， 其他

說明如下 (可另頁詳細說明。勾選動物或植物者，請說明物種種類。)

申請人不認為寄存之生物材料對生物健康或環境具有危害。

二、寄存之生物材料屬於下列危險群： 第一級， 第二級， 第三級或更高。

(請參考科技部「基因重組實驗守則」及衛生福利部相關法規。)

肆、其他資料

一、生物材料其他名稱 無

二、相關宿主學名 無

參考例：生物材料之基本資料 - 厭氧菌

附件一、*Clostridium ljungdahlii* C123 分類學性質

1. 形態特徵：桿菌、具運動性。

(檢附光學顯微鏡下放大 1000 倍觀察之菌落相片)

2. 生理性質：acetogenic.

3. 16S rDNA 序列比對：分離株 C123 之 16S rDNA 序列分析結果(參見 NCBI Accession No. XY123456)，最接近 *Clostridium ljungdahlii* BCRC 17797T，相似度為 99.5%。

附件二、微生物培養保存條件

1. 培養基配方：*Clostridium ljungdahlii* medium

Content /	NH ₄ Cl	1.00 g
Amount:	KCl	0.10 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.20 g
	NaCl	0.80 g
	KH ₂ PO ₄	0.10 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.02 g
	Yeast extract	1.00 g
	Resazurin	0.50 mg
	Trace element solution	10.00 mL
	Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0.20 mg
	Vitamin solution	10.00 mL
	NaHCO ₃	1.00 g
	Fructose	5.00 g
	Cysteine-HCl x H ₂ O	0.30 g
	Na ₂ S x 9 H ₂ O	0.30 g
	Distilled water	1000.00 mL

Trace element solution:

Nitrilotriacetic acid	1.50 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3.00 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0.50 g
NaCl	1.00 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.10 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.18 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.10 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.01 g

參考例：生物材料之基本資料 - 厭氧菌

KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0.02 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.03 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0.30 mg
Distilled water	1000.00 ml

First dissolve nitrilotriacetic acid and adjust pH to 6.5 with KOH, then add minerals. Final pH 7.0 (with KOH).

Vitamin solution:

Biotin	2.00 mg
Folic acid	2.00 mg
Pyridoxine-HCl	10.00 mg
Riboflavin	5.00 mg
Thiamine-HCl x 2 H ₂ O	5.00 mg
Nicotinic acid	5.00 mg
D-Ca-pantothenate	5.00 mg
Vitamin B ₁₂	0.10 mg
p-Aminobenzoic acid	5.00 mg
Lipoic acid	5.00 mg
Distilled water	1000.00 ml

Description: Prepare medium anoxically under 80% N₂ + 20% CO₂ gas mixture. Add ingredients (except bicarbonate, fructose and reducing agents), boil, cool under N₂+CO₂ and dispense anoxically under same gas atmosphere. Autoclave at 121°C for 15 min. Add fructose (N₂), bicarbonate (N₂ + CO₂), cysteine (N₂) and sulfide (N₂) from sterile, anoxic stock solutions. Adjust pH of completed medium to 5.9.

2. 培養基殺菌條件：121°C、15 mins

3. 保存方法：

(1) 冷凍保存：

保護劑為 20% Glycerol: Clostridium ljungdahlii medium = 1:1 混合；

保護劑殺菌條件：121°C、15 mins

(2) 冷凍乾燥保存：

保護劑為 20% Skim milk；保護劑殺菌條件：115°C、20 mins

肆、其他資料

一、生物材料其他名稱 無

二、相關宿主學名 *E. coli* DH5 α

三、生物材料歷史

(1)分離者 王小春 日期 2012.08.20

(2)分離來源：請勾選 人體， 動物， 植物， 其他質體之 DNA 供應體為 *Bacillus subtilis*

說明如下(勾選人體者，請說明是否源自本國人。勾選動物或植物者，請說明物種種類。)

採集地點 質體之 DNA 供應體 *Bacillus subtilis* 採集自臺灣新竹尖石山上

(3)鑑定者 陳大致 日期 2012.11.20

(4)本生物材料是否保存於其他菌種中心

否。

是，菌種中心名稱

該菌種中心給予之編號

(5)本生物材料是否經過人為之特殊處理？

否。

是(是否經過基因操作？ 否。 是。)，說明如下 此 DNA 為自 *Bacillus subtilis* 中分離出的 lipase 基因，其 DNA 長度為 6.5 kb，未含有常見的限制酵素切位，經 PCR 放大增幅後將其構築於 pGEM T Easy 載體(3,018 bp)上，總載體大小為 9,518 bp，並將此載體構築並轉形至 *E. coli* DH5 α 宿主中。

四、本生物材料特點(可附頁說明。寄存機構得要求寄存者另以附件方式提出說明。)

(1)宿主經質體轉殖後可抗 ampicillin。

(2)pCL1 重組載體圖譜如附件。pCL1 大小 9,518bp，以 EcoRI 切割後，可得 6.5kb 及 3.0kb 之 DNA 片段。

附件、

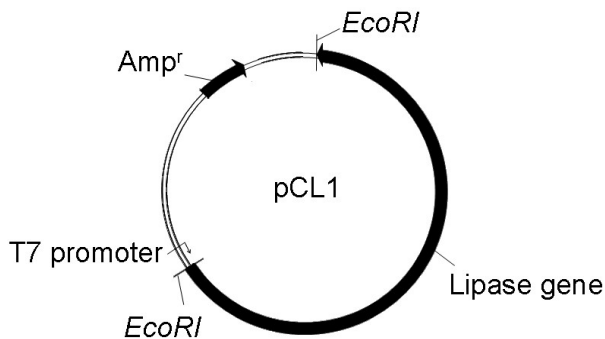
1. 培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式

- (1) 培養基配方: Luria-Bertani (LB) 培養基為 5.0 g 之 Yeast extract、10.0 g 之 Tryptone、10.0 g 之 NaCl，加無菌水混勻至 1.0 L 體積，調整 pH 至 7.0-7.5。
- (2) 冷凍保存時保護液配方: 20% Glycerol: LB=1:1 混合
- (3) 冷凍乾燥保存時保護液配方: 20% skim milk
- (4) 冷凍乾燥保存之降溫方式: 置於-80°C 冷凍庫中一小時->置於冷凍乾燥機中過夜冷凍乾燥(真空度小於 30 millitorr) ->室溫保存

2. 核酸純化方法

取適量菌種溶液劃菌於含 50g/l 之 ampicillin 的培養基上進行隔夜靜置培養,以獲得單一的菌株，再將此單一菌株於 5 ml 含 50g/l ampicillin 之 LB 培養液，於 37°C 下進行震盪隔夜培養，再以市售試劑組抽取其質體 DNA，隨後取適量質體溶液以 EcoRI 限制酵素(或質體圖譜中其他酵素切位)進行酵素切割以確認質體 DNA。

3. pCL1 重組載體圖譜:



生物材料之基本資料

壹、生物材料之分類命名、符號

學名：(中文) 質體 pCL1 _____

：(拉丁學名) _____

申請人給予之號碼或符號：_____

貳、培養、保存及存活試驗條件

一、培養基 LB medium with 50 µg/ml ampicillin _____

二、生長溫度 37°C _____

三、通氣性 兼氣性 _____

四、長期保存最適方法

冷凍

冷凍乾燥

其他 _____

五、請另附頁詳細說明培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式等。(見附件)

六、生物材料如為突變株時，請說明突變劑及分離方法。(請附頁說明)

七、質體、病毒或噬菌體請另外附頁說明使用之宿主、轉殖或感染方式及核酸純化方法，若以核酸型式寄存者，請註明濃度或力價。(見附件)

參、對生物健康及環境危害之性質說明

一、寄存之生物材料具有危害生物健康或環境的性質

是，對 人類， 動物， 植物， 其他 _____

說明如下 (可另頁詳細說明) _____

申請人不認為寄存之生物材料對生物健康或環境具有危害。

二、寄存之生物材料屬於下列危險群： 第一級， 第二級， 第三級或更高。
(請參考科技部「基因重組實驗守則」及衛生福利部相關法規。)

參考例：生物材料之基本資料 - 質體 (核酸型式)

附件、

1. 質體轉殖於轉形株後之培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式

(1) 培養基配方: Luria-Bertani (LB) 培養基為 5.0 g 之 Yeast extract、10.0 g 之 Tryptone、10.0 g 之 NaCl，加無菌水混勻至 1.0 L 體積，調整 pH 至 7.0-7.5。

(2) 冷凍保存時保護液配方: 20% Glycerol: LB=1:1 混合

(3) 冷凍乾燥保存時保護液配方: 20% skim milk

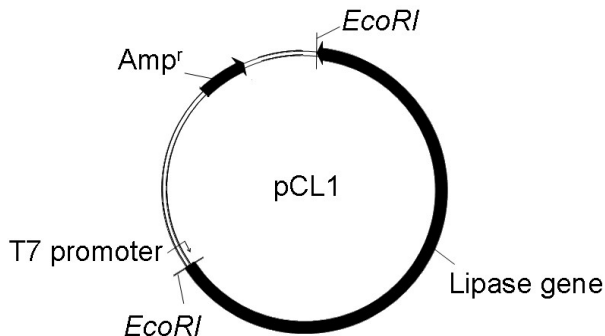
(4) 冷凍乾燥保存之降溫方式: 置於-80°C 冷凍庫中一小時->置於冷凍乾燥機中過夜冷凍乾燥(真空度小於 30 millitorr) -> 室溫保存

2. 核酸溶液濃度、轉殖方式及核酸純化方法

(1) 核酸溶液濃度: 100 ng/l (體積為 50l，溶於無菌水中)，此核酸溶液為 PCR 產物構築於 pGEM_T Easy 載體上。

(2) 轉殖及核酸純化方法: 取適量質體溶液(>200 ng) 轉形至大腸桿菌 DH5 α 宿主之勝任細胞中，取適量菌種溶液劃菌於含 50g/l 之 ampicillin 的培養基上進行隔夜靜置培養，以獲得單一的菌株，再將此單一菌株於 5 ml 含 50g/l ampicillin 之 LB 培養液，於 37°C 下進行震盪隔夜培養，再以市售試劑組抽取其質體 DNA，隨後取適量質體溶液以 NotI 與 EcoRI 限制酵素(或質體圖譜中其他酵素切位) 進行酵素切割以確認質體 DNA。

3. pCL1 重組載體圖譜:



生物材料之基本資料

壹、生物材料之分類命名、符號

學名：(中文) 小鼠融合瘤細胞株

：(拉丁學名) Mouse hybridoma Cell Line

申請人給予之號碼或符號：AAA-001

貳、培養、保存及存活試驗條件

一、培養基 85% DMEM (high glucose, Invitrogen, Cat. No. 11995-065), 添加 10% FBS、4mM L-glutamine、5% 初始融合瘤選殖因子 (Origen Hybridoma Cloning Factor(IGEN, Cat. No.FC210001)、1X MEM 必需氨基酸(Invitrogen, Cat. No.11140)、0.15mg/ml 草乙酸(Sigma, Cat. No.O-3375)、0.05 mg/ml 丙酮酸鹽(Sigma, Cat. No.S-8636)、0.2U/ml 胰島素(Sigma, Cat. No.I-5523)、1X penicillin-streptomycin(Invitrogen, Cat. No. 15140-122)

二、生長溫度：37°C

三、通氣性：5%CO₂

四、長期保存最適方法

冷凍

冷凍乾燥

其他

五、請另附頁詳細說明培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式等。(見附件)

六、生物材料如為突變株時，請說明突變劑及分離方法。(請附頁說明)

七、質體、病毒或噬菌體請另外附頁說明使用之宿主、轉殖或感染方式及核酸純化方法，若以核酸型式寄存者，請註明濃度或力價。

參、對生物健康及環境危害之性質說明

一、寄存之生物材料具有危害生物健康或環境的性質

是，對 人類， 動物， 植物， 其他

說明如下 (可另頁詳細說明。勾選動物或植物者，請說明物種種類。)

申請人不認為寄存之生物材料對生物健康或環境具有危害。

二、寄存之生物材料屬於下列危險群： 第一級， 第二級， 第三級或更高。

(請參考科技部「基因重組實驗守則」及衛生福利部相關法規。)

附件

一、培養條件

1. 培養基(型號)：85% DMEM (high glucose, Invitrogen, Cat. No. 11995-065)，添加 10% FBS、4mM L-glutamine、5% 初始融合瘤選殖因子 (Origen Hybridoma Cloning Factor (IGEN, Cat. No.FC210001)、1X MEM 必需氨基酸 (Invitrogen, Cat. No.11140)、0.15mg/ml 草乙酸(Sigma, Cat. No.O-3375)、0.05 mg/ml 丙酮酸鹽(Sigma, Cat. No.S-8636)、0.2U/ml 胰島素(Sigma, Cat. No.I-5523)、1X penicillin-streptomycin(Invitrogen, Cat. No. 15140-122)
2. 繼代培養方式/比例：加培養基稀釋或離心更換培養基/濃度為 $10^5 \sim 10^6$ cells/ml³。細胞倍增時間 (doubling time) 為 36 小時。

二、保存條件(冷凍保護液配方/保存方式)

1. 使用 10% DMSO 和 90%胎牛血清將細胞冷凍於液態氮中長期保存。

三、培養方法

1. 細胞冷凍管置於 37°C 下解凍，將細胞重新懸浮於 10ml 培養液中，離心後以 $2-5 \times 10^5$ cells/ml 植於 T75 培養瓶中，當細胞數目達 1×10^6 cells/ml 時將之添加培養基稀釋或繼代培養。

四、細胞圖片如下(略)

生物材料之基本資料

壹、生物材料之分類命名、符號

學名：(中文) 貓病毒

：(拉丁學名) Feline calicivirus

申請人給予之號碼或符號：FC-AA

貳、培養、保存及存活試驗條件

一、培養基 宿主細胞培養基及 病毒感染培養基如附件

二、生長溫度：37°C

三、通氣性：5% CO₂

四、長期保存最適方法

冷凍

冷凍乾燥

其他

五、請另附頁詳細說明培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式等。

六、生物材料如為突變株時，請說明突變劑及分離方法。(請附頁說明)

七、質體、病毒或噬菌體請另外附頁說明使用之宿主、轉殖或感染方式及核酸純化方法，若以核酸型式寄存者，請註明濃度或力價。

參、對生物健康及環境危害之性質說明

一、寄存之生物材料具有危害生物健康或環境的性質

是，對 人類， 動物， 植物， 其他

說明如下(可另頁詳細說明。勾選動物或植物者，請說明物種種類。)

許多貓病毒株可感染貓且造成呼吸道疾病。本株自貓分離之貓病毒株已證實能夠感染貓，但未顯示會感染人類。

申請人不認為寄存之生物材料對生物健康或環境具有危害。

二、寄存之生物材料屬於下列危險群： 第一級， 第二級， 第三級或更高。

(請參考科技部「基因重組實驗守則」及衛生福利部相關法規。)

肆、其他資料

一、生物材料其他名稱：無

二、相關宿主學名：ABC 細胞 (BCRC 61234 = ATCC CRL-12345)

三、生物材料歷史

(1)分離者：王大同 日期：2012/8/20

(2)分離來源：請勾選 人體， 動物， 植物， 其他

說明如下(勾選人體者，請說明是否源自本國人。勾選動物或植物者，請說明物種種類。) 家貓喉部採樣棒

採集地點：美國加州

(3)鑑定者：黃小華 日期：2012/11/20

(4)本生物材料是否保存於其他菌種中心

否。

是，菌種中心名稱：American Type Culture Collection (ATCC)

該菌種中心給予之編號：ATCC VR-54321

(5)本生物材料是否經過人為之特殊處理？

否。

是(是否經過基因操作？ 否。 是。)，說明如下

四、本生物材料特點 (可附頁說明。寄存機構得要求寄存者另以附件方式提出說明。) 貓病毒；有感染性，當轉染至貓細胞株時可觀察到導致細胞病變作用 (CPE)，CPE 感染之細胞形態會有許多空泡，約 3-5 天產生。

附件

一、培養、保存及存活試驗條件

1. 宿主細胞培養基：98%DMEM (Invitrogen Cat. No. 11995-092)，添加 2% FBS (JRH Biosciences, Cat. No. 12107-1000M)、1X penicillin-streptomycin (GIBCO, Cat. No. 15240-062)

病毒感染培養基：98%DMEM (Invitrogen Cat. No. 11995-092)，添加 2% FBS (JRH Biosciences, Cat. No. 12107-1000M)、1X penicillin-streptomycin (GIBCO, Cat. No. 15240-062)

2. 保存用培養基：宿主細胞培養基

3. 冷凍模式：-80°C

二、感染方法及病毒樣品之製備方法：

1. ABC 細胞 (BCRC 61234)，在 37°C，5% CO₂ 之下培養於宿主細胞培養基。

2. 當 ABC 細胞在 90% 滿盤 (confluency) 時，以 0.1 至 0.01 之 MOI 劑量的貓病毒感染，持續在 37°C 培養 24-48 小時。一般而言，可在 24 小時內見到細胞空泡和溶解之現象 (CPE)。

3. 收集受感染 48 小時之細胞上層培養液，以 1500 rpm 離心 5 分鐘。

4. 所得上清液即為病毒樣品(保存物)，將其冷凍於-80°C。

三、病毒力價及其測試方法

1. 病毒力價：1.5x10⁶ pfu/ml

2. 測試方法(病毒空斑試驗)：同一般病毒空斑試驗方法，不同之處為：病毒吸附步驟所需時間為 90 分鐘，培養基使用前先以 47mm diameter membrane filter 過濾，培養時間為 16-18 小時。

四、病毒感染細胞圖片，如下圖：(略)

生物材料之基本資料

壹、生物材料之分類命名、符號

學名：(中文)螺旋藻

：(拉丁學名) *Spirulina platensis*

申請人給予之號碼或符號:BC18001

貳、培養、保存及存活試驗條件

一、培養基:C medium

二、生長溫度:20°C

三、通氣性:好氣性

四、長期保存最適方法

冷凍

冷凍乾燥

其他：_____

五、請另附頁詳細說明培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式等。

六、生物材料如為突變株時，請說明突變劑及分離方法。(請附頁說明)

七、質體、病毒或噬菌體請另外附頁說明使用之宿主、轉殖或感染方式及核酸純化方法，若以核酸型式寄存者，請註明濃度或力價。

參、對生物健康及環境危害之性質說明

一、寄存之生物材料具有危害生物健康或環境的性質

是，對 人類， 動物， 植物， 其他 _____

說明如下(可另頁詳細說明。勾選動物或植物者，請說明物種種類。)

申請人不認為寄存之生物材料對生物健康或環境具有危害。

二、寄存之生物材料屬於下列危險群： 第一級， 第二級， 第三級或更高。

(請參考科技部「基因重組實驗守則」及衛生福利部相關法規。)

參考例：生物材料之基本資料 - 單細胞藻類

附件、

1. 照光需求:12L:12D

2. 培養基配方，保存時保護液配方，降溫方式

(1) 培養基配方:

C medium :

	Component	Amount
1	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	15 mg
2	KNO ₃	10 mg
3	β-Na ₂ glycerophosphate · 5H ₂ O	5 mg
4	MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 mg
5	Vitamin B ₁₂	0.01 µg
6	Biotin	0.01 µg
7	Thiamine HCl	1 µg
8	PIV metals	0.3 mL
9	Tris (hydroxymethyl) aminomethane	50 mg
10	Distilled water	99.7 mL

pH 7.5. Add 1.5 g agar to 100 mL of medium to give a solid medium

PIV metals

	Component	Amount
1	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	100 mg
2	FeCl ₃ · 6H ₂ O	19.6 mg
3	MnCl ₂ · 4H ₂ O	3.6 mg
4	ZnCl ₂	1.04 mg
5	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.4 mg
6	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg
7	Distilled water	100 mL

(2) 保護液配方為此培養基中含 8%DMSO。

(3) 降溫方式：利用等速降溫機以 -1 ~ -3 °C/分鐘之速度由室溫降至 -80°C 後，迅速移入液氮統中保存。

(4) 冷凍管活化方式：冷凍管以 37°C 水浴回溶 2 分鐘，接種於適當培養基中培養。

3. 藻種顯微照片：(略)

