

分數_____

考生編號_____

二〇〇四年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

(第 D 試場)

實驗所需要的器材及藥品，都已放在桌上，請按照下面的清單清點。若有缺少請舉手告訴評審老師。實驗完畢後，請將用過的器材清洗乾淨並放置整齊。

器 材 類		藥 品 及 材 料 類	
瓊脂凝膠及電泳設備	1 套	質體 pX DNA (編號 1-5)	5 管
油性筆	1 支	限制酶 N	1 管
微量分注器 P10	1 支	限制酶 H	1 管
白色吸管尖	1 盒	限制酶 E	1 管
微量離心管	1 盒	緩衝液	1 管
微量試管架	1 個	無菌水	1 管
微量離心機	1 台	電泳染劑	1 管
浮板	1 個	DNA 分子標記	1 管
廢棄物收集杯	1 個	碎冰	1 杯
水浴槽 (37°C, 共用)			

註：製備好之 0.8%瓊脂凝膠(內含 DNA 染劑)放置於電泳槽內之 1x TAE (含 40mM Tris-醋酸, 1mM EDTA, pH=8.0) 緩衝液中。

※請注意：

1. 桌上的藥品及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷(含封面、試題卷)共 4 頁，於交卷時全部繳回。
3. 作答時間 60 分鐘，請於本卷上作答。
4. 請於本頁右上角「考生編號」處，填入個人編號。

題目：以限制酶切割質體 DNA，並以膠體電泳分析結果來繪製限制酶圖譜

一、DNA 經限制酶切割及膠體電泳分析，可辨識切割 DNA 之大小，並據以繪製限制酶在質體 DNA 上切割位點之圖譜。編號 1-5 號離心管內各含有 1 μ g 之質體 DNA(pX)，請依照下列步驟完成質體 pX 之限制酶切割作用及膠體電泳分析，並將結果拍照繳交(此部分實驗操作佔 30 分，由評審老師現場評分，相片佔 30 分)，並利用實驗之空閒時間回答問題 I、II、III 及 IV(此部分佔 40 分)。

1. 於裝有質體 pX 之微量離心管上分別標上考生編號。
2. 於 1 號管中加入 6 μ l 無菌水、2 μ l 緩衝液。
於 2 號管中加入 5 μ l 無菌水、2 μ l 緩衝液及 1 μ l 之限制酵素 N。
於 3 號管中加入 4 μ l 無菌水、2 μ l 緩衝液及限制酶 N 及 H 各 1 μ l。
於 4 號管中加入 3 μ l 無菌水、2 μ l 緩衝液及限制酶 N、H、E 各 1 μ l。
於 5 號管中加入 5 μ l 無菌水、2 μ l 緩衝液及 1 μ l 之限制酶 E。
3. 將樣品混勻、短暫離心後置於浮板上，於 37°C 水浴中作用 15 分鐘。
4. 反應完畢後取出樣品，經短暫離心後，各加入 2 μ l 電泳染劑。
5. 將樣品混勻後，短暫離心。
6. 先於瓊脂膠體的第一個樣品槽(如下圖之樣品槽 M)內置入 10 μ l 之 DNA 分子標記(含有分別為 1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000 及 10000 鹽基對之 DNA 片段)。
7. 各取 10 μ l 之各號樣品，依序置入瓊脂膠體之其它樣品槽內。
8. 以 100V 電壓進行電泳 25 分鐘。
9. 電泳完畢，關掉電源並取出瓊脂膠體，置於紫外光下照相，獲得實驗結果，並於相片背面寫上編號與試卷一同交回。

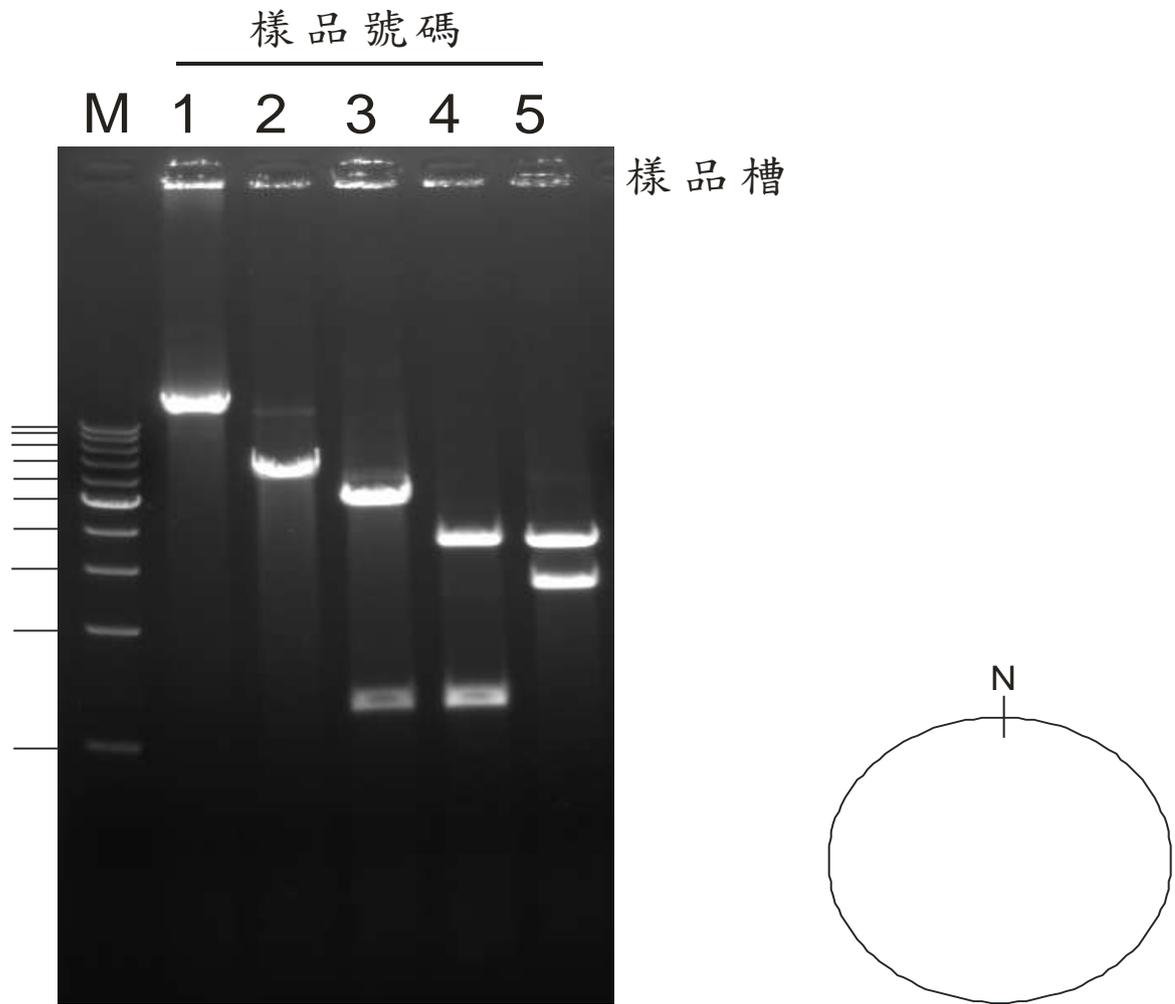
假設下方電泳圖為本實驗之結果，請回答以下問題:

問題 I：請在圖左方橫線處，寫出各橫線所標示 DNA 片段之鹼基對，並於電泳圖之右邊以 + 及 - 分別標示電泳時正負電極之方位。(5 分)

問題 II：請依據下方電泳圖，大約估計質體 pX DNA 之大小？(5 分)

問題 III：依據下方電泳圖，樣品 1 號與樣品 2 號有何不同？何者之電泳圖可用以估算質體 pX DNA 之大小？為什麼？(10 分)

問題 IV : 下圖為某科學家從事上述實驗後所得之電泳圖，假設結果正確，請依據此結果於右下方之圓圈上繪製質體 pX DNA 上 N、H、E 三種限制酶之切割位置圖譜(請以時鐘 12 點處為限制酶 N 之切割位)。(20 分)



閱卷教授簽章 _____

實驗原理解說：

膠體電泳：

生物分子在電場中之移動性與其分子之體積、分子量及其所帶之電荷之多寡有關，直線 DNA 片段在凝膠中移動的距離，與 DNA 片段的鹼基對長度呈現對數的反比關係，因此生物學家常以膠體電泳方法分離不同的生物分子，瓊脂凝膠最常被用於製作電泳凝膠以分離 DNA 分子。

質體 DNA 限制酶圖譜：

在許多細菌中帶有環狀質體 DNA，為染色體外之雙股 DNA，常被用來做為基因選殖之載體。限制酶是一群核酸切割酶，可辨認並切割特定 DNA 序列，質體 DNA 及欲選殖之 DNA 以相同之限制酶進行切割後，再用 DNA 連接酶加以連接形成重組質體 DNA，選殖成功之重組質體 DNA，可介由相同限制酶切割後，進行電泳分析所得之 DNA 片段之大小加以判別。限制酶切割圖譜的製作，是標定出 DNA 分子上各限制酶切割位的相對位置，我們可以利用不同的限制酶所切割出的 DNA 片段的長度，並配合一種或同時被多種限制酶所切割後，切割產物經瓊脂凝膠電泳分析，再以特殊的 DNA 染料染色後，便可在凝膠上觀察這些切割後 DNA 片段，經與已知分子量之 DNA 分子標記比對後，可知道這些切割後 DNA 片段之大小，並可據以推估出所使用之限制酶在重組質體 DNA 上的切割位點，以建構質體 DNA 之限制酶切割圖譜。