

考生編號\_\_\_\_\_ 分數\_\_\_\_\_

## 二〇〇七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。

A.實驗器材：	B.實驗器材：
1. 已知濃度的樣本液 (DNA marker)	1.欲計數的細胞懸浮液
2. 未知濃度的樣本液	2.過氧化氫溶液
3. 含有溴化乙啶 (Ethidium Bromide ; EtBr) 的洋菜膠 (agarose) 6 mL (倒入 6 公分培養皿中，厚度約為 0.2 cm)	3. EGTA (O,O'-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid) 溶液
4. 2 $\mu$ L 的微量分注器	4.生理食鹽水
5. 2 $\mu$ L 尖頭吸管	5.染劑 Trypan Blue (0.4%)
6. 橡膠手套	6.pipetman & tips
7. 電泳凝膠影像系統	7.血球計數器 (hemocytometer)
8. 緩衝液 TBE (稀釋樣本用)	8.計數器 (counter)
9. 裝有清水的培養皿	9.封口膜 (parafilm)
10. 0.2 mL 微量離心管 5 個	10.蓋玻片 (coverglass, 22 mm $\times$ 22 mm)
11. 0.2 mL 微量離心管專用離心管架	11.拭鏡紙 (soft lint-free gauze)
12. 膠帶、雙面膠	12.顯微鏡
13. 垃圾袋	

#### ※ 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 7 頁，於交卷時全部繳回。
3. 作答時間 60 分鐘，請於本卷上作答。試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。
4. 請於本頁左上角「考生編號」處，填入個人編號。

## 一、偵測核酸濃度

目的：學習以相對定量的方式來偵測核酸的濃度

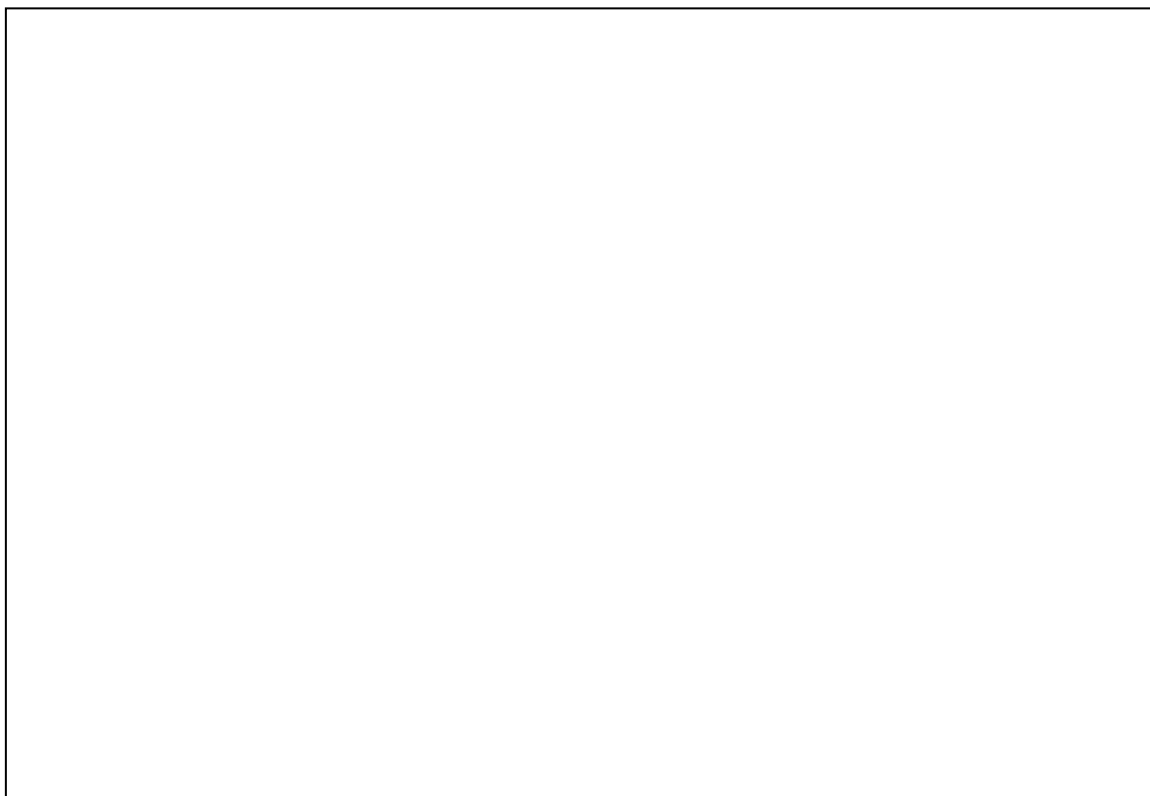
材料：

1. 已知濃度的樣本液 (DNA marker)
2. 未知濃度的樣本液
3. 含有溴化乙啶 (Ethidium Bromide ; EtBr) 的洋菜膠 (agarose) 6 mL (倒入 6 公分培養皿中，厚度約為 0.2 cm)
4. 2  $\mu$ L 的微量分注器
5. 2  $\mu$ L 尖頭吸管
6. 橡膠手套
7. 電泳凝膠影像系統
8. 緩衝液 TBE (稀釋樣本用)
9. 裝有清水的培養皿
10. 0.2 mL 微量離心管 5 個
11. 0.2 mL 微量離心管專用離心管架
12. 膠帶、雙面膠
13. 垃圾袋

步驟：

1. 取已知濃度的樣本液以緩衝液進行連續對倍稀釋至  $2^5$ ，作為對照組樣本。
2. 分別取不同稀釋度的對照組樣本液 1  $\mu$ L，滴至含有溴化乙啶的洋菜膠上。
3. 取 1  $\mu$ L 的未知濃度樣本液滴在上述洋菜膠上。
4. 放置 15 分鐘，待樣本滲入洋菜膠內。
5. 將膠體取下，置於含有清水的培養皿中，退染 10 分鐘。
6. 將膠體放置電泳凝膠影像系統中，觀察不同樣本的亮度後，拍照。

題目一、請將相片用雙面膠黏在下方空格中。(20 分)



題目二、利用已知濃度樣本與未知濃度的亮度作比較，推測未知樣本的濃度。(15 分)

題目三、請說明溴化乙啶染色的原理。(15 分)

## 二、過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)對原生動物細胞毒殺的影響

目的：瞭解過氧化氫對細胞的毒殺機轉，細胞活體染色的基本原理與方法，觀察並判斷細胞的形態與大小，顯微鏡各種鏡頭的交換操作。

### 簡介：

許多細胞在生理過程或逆境中會形成 ROS (reactive oxygen species)。所謂的 ROS 指的是「化學性質活潑的含氧原子或原子團」，大致上包含了超氧化物陰離子 (superoxide anion O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、氫氧自由基 (hydroxyl radical ·OH)、單重態氧 (singlet oxygen <sup>1</sup>O<sub>2</sub>)、過氧化脂質(lipid peroxide LOO<sup>·</sup>) 等等。其中為自由基的是『超氧化物陰離子 (superoxide anion O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、氫氧自由基 (hydroxyl radical ·OH)、過氧化脂質(lipid peroxide LOO<sup>·</sup>)』，非自由基的是『過氧化氫 及單重態氧 (singlet oxygen <sup>1</sup>O<sub>2</sub>)』。

這些物質性質活潑，具有氧化其他物質，造成細胞損傷的能力，因而造成了體內的氧化壓力 (oxidative stress)。過氧化氫是一種 ROS 的形式，能經由細胞膜上水的孔到擴散進入細胞內，並導致蛋白質氧化的修飾作用。

有許多證據指出 過氧化氫在植物中的功能為信號分子，可以媒介許多的防禦反應，如使防禦基因的誘導、植物抗毒素的形成、感染部位的計畫性細胞死亡。在阿拉伯芥中，過氧化氫可誘導蛋白質激酶(protein kinase)的活化及胞內鈣離子濃度上升。所以過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)可能調節蛋白質激酶及鈣離子濃度的路徑來媒介多種逆境導致細胞死亡。

### 實驗材料：

1. 欲計數的細胞懸浮液
2. 血球計數器 (hemocytometer)
3. 過氧化氫溶液
4. 生理食鹽水
5. EGTA (O,O'-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid) 溶液
6. 染劑 trypan blue (0.4%)
7. pipetman & tips
8. 計數器 (counter)
9. 蓋玻片 (coverglass, 22 mm × 22 mm)
10. 拭鏡紙 (soft lint-free gauze)
11. 封口膜 (parafilm)
12. 顯微鏡

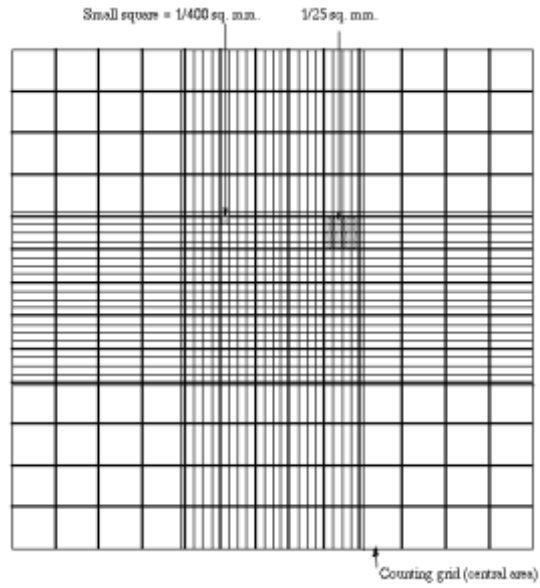
### 實驗方法：

- (1)先分別取 1ml 之細胞裝入 3 個小管，編為(1~3 號).
- (2) 1 號及 2 號之小管分別加入 50  $\mu l$  的生理食鹽水，而 3 號之小管則加入 50  $\mu l$  EGTA 溶液混合。
- (3)靜置培養 10 分鐘。
- (4)分別在 2 號及 3 號小管中分別加入 20  $\mu l$  過氧化氫溶液，而 1 號小管則加入 20  $\mu l$  生理食鹽水。
- (5)混合均勻
- (6)進行細胞計數，方法簡述於後

### 細胞計數與存活測試

#### 一、原理：

- (1) 計算細胞數目可用血球計數盤計數。
- (2) 血球計數盤一般有兩個 chambers，每個 chamber 中細刻 9 個 1 mm<sup>2</sup> 大小的正方形，其中 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格，深度均為 0.1 mm (參考圖一)。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個正方形之體積為 1 mm<sup>2</sup> × 0.1 mm = 1.0 × 10<sup>-4</sup> ml。
- (3) 使用時，計數每個正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 10<sup>4</sup>，即為每 ml 中之細胞數目。
- (4) 一般使用藍色之 trypan blue 染料進行存活測試。計數應在 trypan blue 染色後數分鐘內完成，隨時間延長，部分活細胞也開始攝取染料。計算細胞活率的公式：活細胞數 / (活細胞數 + 死細胞數) × 100%。
- (5) 取 50  $\mu l$  細胞懸浮液與等體積的 trypan blue 置於 1.5 ml 小離心管中，混合均勻。
- (6) 取少許混合液 (15  $\mu l$ ) 自血球計數盤上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。應先將蓋玻片置於 chamber 上後再取混合液於凹槽處加入
- (7) 計數四個大方格之細胞總數，再除 4，乘以 2 (因與 trypan blue 等體積混合)，再乘以稀釋倍數，最後乘以 10<sup>4</sup>，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。若細胞位於線上，只計上線與右線之細胞 (或計下線與左線之細胞)。



圖一 細胞計數盤於顯微下觀察到的九個正方形及其內的 16 小格

題目一：在前處理(A)生理食鹽水或(B)EGTA 溶液再以過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)處理後細胞存活率分別為何？ (20 分)

生理食鹽水	EGTA 溶液

題目二：加入生理食鹽水目的為何？(10 分)

題目三：EGTA 的功能為將胞外鈣離子清除，請由你的實驗結果畫一張簡圖，推論過氧化氫( $H_2O_2$ )造成細胞死亡的分子機制為何？(10 分)

題目四：除了 trypan blue 可以作存活測試外，請再舉出一種可以測量細胞存活率之方法。(10 分)