

考生編號：_____ 分數_____

二〇〇九年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 A 試場

實驗所需要的器材及藥品，都已於在桌上，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：

器 材 類		藥 品 及 材 料 類	
微量吸管 1000 μ l	1 支	不同濃度 ATRA 作處理的 HL-60 血 癌細胞，編號 0-4 (0, 1, 2, 4, 與 8 μ M/ml)	5 管
微量吸管 200 μ l	1 支	Am 80 作處理的 HL-60 血癌細胞 編號 X	1 管
96 孔盤	1 個	NBT 溶液	1 管
試管架	1 個	DMSO	1 管
離心機(共用)	2 台		
ELISA 儀(共用)	1 台		
37°C 培養箱(共用)	1 台		
計算機	1 台		

※ 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 8 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. 請於第一頁右上角「考生編號」處，填入個人編號。

實驗題：

一、操作題：

根據流行病學統計我國癌症死亡率一直是位居十大死因之首，白血病俗稱血癌亦具有高居不下的死亡率，白血病可分為急性骨髓性白血病 (Acute Myelogenous Leukemia, AML)，慢性骨髓性白血病 (Chronic Myelogenous Leukemia, CML)，急性淋巴性白血病 (Acute Lymphocytic Leukemia, ALL)，慢性淋巴性白血病 (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL)。

近年來急性骨髓性白血病化學治療及幹細胞移植之進步，已有不錯的療效。雖然白血病的目前治療仍以毒殺細胞的化學治療法為主，但此種療法副作用極大且常因癌症種類而有不同之療效。許多證據顯示，當細胞進行分化時就不會分裂，因此能誘導癌細胞分化的藥物就能抑制癌細胞不斷的分裂，使癌細胞不會造成對身體的危害。

全反式維生素甲酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 等化合物可以使不成熟的白血球 (血癌) 細胞分化為成熟的正常白血球，因此為目前臨床上所使用的細胞分化誘導劑。HL-60 細胞源自急性骨髓性白血病患者，因此常作為體外研究細胞分化的系統。由於，全反式維甲酸是一種用於治療血癌的藥物。同時能促使血癌細胞 HL-60 分化成顆粒球的研究已經有很多年了。由於，全反式維生素甲酸是天然的維生素 A 的衍生物，可促使 HL-60 細胞分化。因此，利用該物質的結構進行新藥設計，變成為治療血癌新興藥物設計的參考。新興藥物 Am80 便是在這種背景下的產物。由於 Am80 是經過合成改良的藥物，因此在上市前，便必須通過誘導 HL-60 細胞分化的實驗。本次的實驗便是要比較新興藥物 Am80 與 ATRA 對於 HL-60 細胞分化率的比較實驗。

實驗材料：

1. 培養於含 10 % fetal calf serum 的 RPMI-1640 培養基的 HL-60 血癌細胞，預先利用不同濃度 ATRA (0, 1, 2, 4, 與 8 μ M/ml) 分化，並培養過 96 小時的 HL-60 血癌細胞。分別標示為 0, 1, 2, 3, 與 4。共 5 管。
2. 預先利用 Am 80 分化，並培養過 96 小時的 HL-60 血癌細胞。標示為 X。共 1 管。
3. 微量吸管。1000 μ l 與 200 μ l 各一支。
4. 96 孔盤。一個。
5. NBT 溶液。
6. DMSO。
7. 試管架。
8. 離心機。
9. ELISA 儀。
10. 37°C 培養箱。

實驗步驟：

1. 將編號 0 到 4 與 X 共 6 管的 HL-60 細胞，以 1500 rpm 離心 5 分鐘。倒掉上清液。
2. 在每支離心管中加入 1000 μ l 的 NBT 溶液，並將細胞完全懸浮於溶液中。
3. 將上述離心管置於 37°C 培養箱中，培養 30 分鐘。
4. 將細胞自培養箱中取出，以 3000 rpm 離心 5 分鐘。
5. 倒掉上清液。
6. 加入 600 μ l DMSO，混合均勻。
7. 分別取 100 μ l 於加入 96 孔盤中。每個檢體需重複 3 次。
8. 以波長 540 nm 的 ELISA 儀檢測吸光值。
9. 將讀出的數值分別求出平均值與標準偏差。填入於下頁答案一欄中。
10. 將編號 0 到 5 的數值作為 X 軸，讀數作為 Y 軸繪圖於下頁答案紙所附的方眼紙中。
11. 利用內插法，計算 Am80 藥物，編號 X，相對於 ATRA 的濃度。填入於下頁答案二欄中。
12. 如果 12. 中最高值視為 100% 的分化率，請問編號 X 的分化率為多少？填入於下頁答案三欄中。

答案紙：

一、(20 分)

編號	0	1	2	3	4	X
平均值 \bar{x}						
標準偏差 σ						

計算到小數點後第二位。

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad \sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

二、(10 分)

編號	Am80
濃度	

須註明單位

三、(10 分)

編號	Am80
分化率	

須註明單位

四、請繪於方眼紙 (10 分)

二、理論題：

TASK A (16 分)

子揚在清理實驗室時發現下列 8 種化合物。其結構式分別如下

(A)	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{COOH}$
(B)	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{OH}$
(C)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}}{\text{C}}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
(D)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{SH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
(E)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
(F)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
(G)	
(H)	

請依據上述化學式的結構回答下列各題：(請填答於下頁方格中)

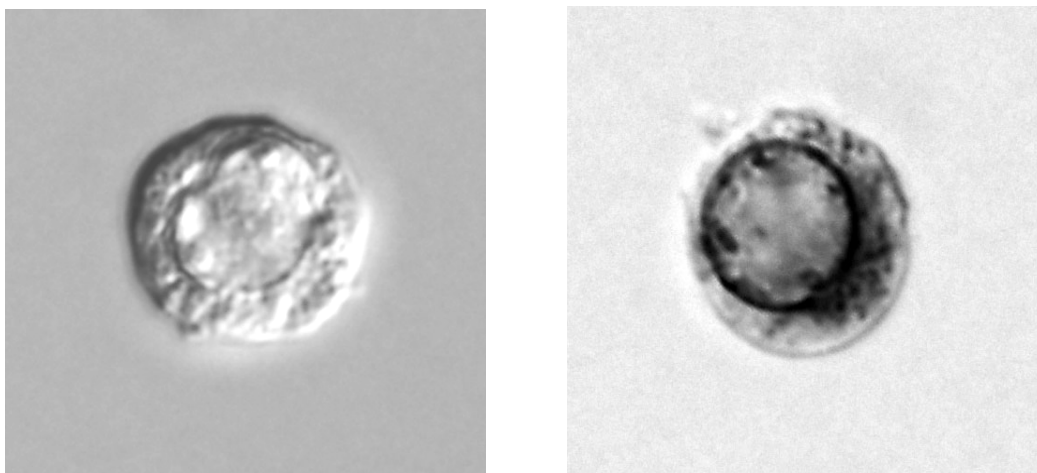
1. 上述何種化合物進出細胞的速率最快？
2. 上述何種化合物能做為構成蛋白質的基本原料？
3. 上述何種化合物適合組成蛋白質後作為定量依據的基本原料？

4. 蛋白質體為細胞或組織所表現的全部蛋白質圖譜，可以分析出同一物種在不同環境下所表現蛋白質的差異，其方法為先將細胞中總蛋白質利用二維膠體電泳分析，再以質譜儀配合資料庫比對做蛋白質的鑑定。有一種新穎的蛋白質體學方法 - 雙管道影像技術 (dual channel imaging technique)，是藉由標定放射線同位素化合物進行細胞型態與蛋白質圖譜觀察分析；請問上述何種化合物最適合作為蛋白質標定追蹤之用？

題號	1	2	3	4
答案				

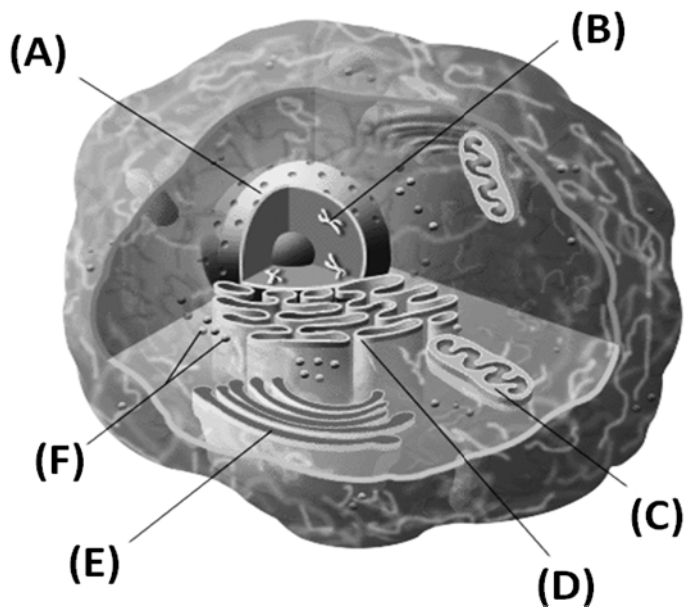
TASK B (12 分)

世軒在進行培養的人類血癌細胞 (HL-60) 時，添加上述標定過的化合物。在經過固定後，於X 光片下進行顯影後得到下圖一。深色顯影的部分為發現放射線同位素存在的地方。



圖一：(左) 處理前，(右) 處理後。

請依據下圖二回答以下問題。



圖二

5. 圖一中，深色陰影的蛋白質最初在圖二中何處合成？
6. 合成後在圖二中何處加工修飾？
7. 加工時需要大量的能量，請問在圖二中何處產生？

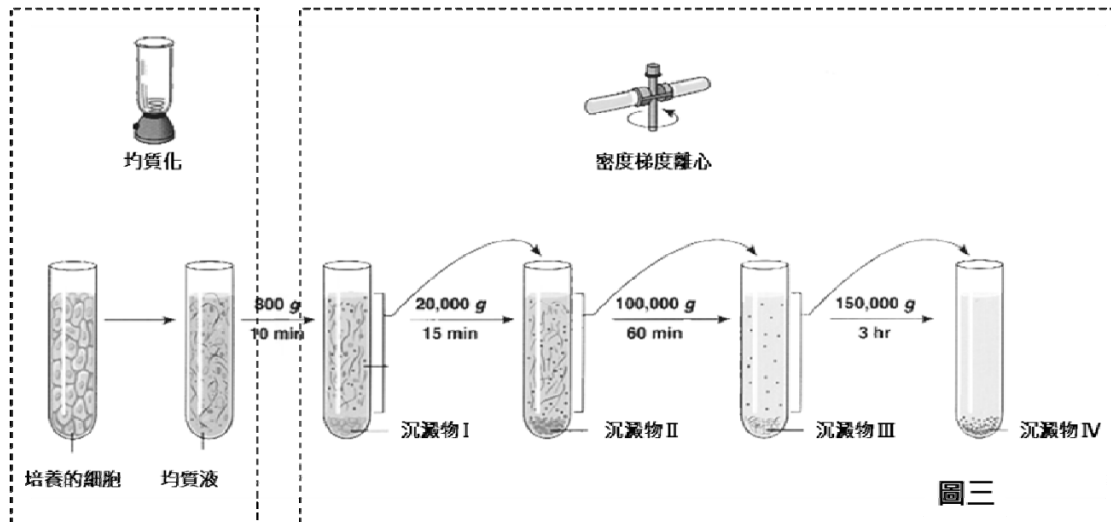
題號	5	6	7
答案			

TASK C

永載想將該蛋白質自細胞中取出。於是將細胞均質 (homogenized) 後，經由一連串離心劃分方法，操作步驟如下圖三所示。

操作原理：不同胞器其大小密度不同，所以可利用逐漸增加離心速度的方式將不同胞器分別分群地分離出來。

操作步驟：細胞均質化後，先以過濾或低速離心的方式，除去未破碎的細胞或細胞破片。而後再以約 600g (約 500 rpm) 的轉速離心 10 分鐘。取上清液，得到沉澱物 I。加快離心速度至 20,000 g，15 分鐘後，得到沉澱物 II。在將轉速增至 100,000 g，60 分鐘後，得到沉澱物 III。轉速在增至 150,000 g，2 小時後，將上清液到掉，留下沉澱物 IV。



請依據圖二、三回答以下問題。

8.~11.請將圖三沉澱物劃分與圖二中胞器代號做正確的配對。(16 分)

題號	沉澱物	答案
8	I	
9	II	
10	III	
11	IV	

12. 請問圖一中，深色陰影的蛋白質會出現於哪一個沉澱物劃分中？(6 分)

題號	12
答案	