

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 D 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 實驗植物材料：		數量	
1. 玉米（兩週大、照光中生長）		5 株	
B 實驗器材：	數量	C 藥品溶液：	數量
1. 離心機(可控溫，4°C) (共用)	2 台	1. 緩衝液 A：100 mM Tris-HCl, pH7.6; 20% (V/V) glycerol; 1mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM MgCl ₂ ; 2% (W/V) insoluble polyvinylpolypyrrolidone-PVP	5ml
2. 光電比色計(共用)	5 台		
3. 電動天平(共用)	5 台		
4. 單面刀片(共用) (在植物旁邊)		2. 緩衝液 B：50 mM Hepes-KOH, pH8.0 (或 100 mM Tris-HCl, pH8.0); 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0.2 mM NADH; 10 mM NaHCO ₃ ; 2mM PEP 與 5 units of malate dehydrogenase	5ml
5. 秤藥盤	1 個		
6. 研鉢及研鉢棒	1 組	3. 緩衝液 C (不含 PEP)：50 mM Hepes-KOH, pH8.0 (或 100 mM Tris-HCl, pH8.0); 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0.2 mM NADH; 10 mM NaHCO ₃ 與 5 units of malate dehydrogenase	5ml
7. 紗布+漏斗	1 組		
8. 1.5 ml 離心管	7 個		
9. 2ml 離心管	2 個		
10. 比色管	7 個	4. 0.1 M PEP	0.3ml
11. 微量吸管及 tips (1 ml 與 200µl)	各 1 支	5. 碎冰(於小冰筒中)	1 桶

※ 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 5 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。

玉米葉片的磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(Phosphoenolpyruvate carboxylase 簡稱 PEP carboxylase)之活性(Vmax 與 Km)測定

一、實驗內容

植物中 PEP carboxylase (PEPC)是固定二氧化碳的重要酵素，可將 PEP 轉化成草醯乙酸 (oxaloacetate; OAA)。本實驗藉由酵素的萃取、酵素活性的分析及反應速率曲線的建立，來分析玉米植物的 PEPC 活性。

一、實驗步驟：

A. PEPC 的萃取

收取兩週大、照光中生長材料的葉子 0.5 克。

1. 放入置於冰上的研鉢中，加入 5 ml 的緩衝液 A，並以研鉢棒加以研磨。
2. 以一層的紗布過濾後，取 1.5 ml 濾液放入 2 ml 小離心管中，利用離心機在 4°C 離心 (20,000g)10 分鐘 (由助教協助)。
3. 收取上清液，即是含有 PEPC 的粗萃取物，並且立即置於冰上，供後續酵素活性分析。

B. 酵素活性的分析：

4. 取 0.9 ml 緩衝液 B，加入 0.1 ml 的 PEPC 粗萃取物，快速混合。
5. 置於常溫 3 分鐘，然後將液體移入比色管，利用光電比色計 (Spectrophotometer)，進行波長 340 nm 的 OD 值測定 (由助教協助)。並於一分鐘後再檢測 OD₃₄₀ 一次，並紀錄之。同時也要進行 OD blank 的檢測，即不含 PEPC 粗萃取物，以緩衝液 B 補充之。
6. 然後依據下列公式，計算 PEPC 的活性。

$$\text{酵素活性 (U/ml)} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{min} (\Delta\text{OD test} - \Delta\text{OD blank}) \times V_t \times df}{6.22 \times 1.0 \times V_s} = \Delta\text{OD}/\text{min} \times 4.98 \times df$$

ΔOD：吸光值的變化量

V_t：總體積

V_s：測試樣品體積 (0.1ml)

6.22：NADH 係數 (cm²/micromole)

1.0：光徑長度 (cm)

df：稀釋倍率

1 unit (U)定義：在適當反應條件下，每分鐘催化產生 1 μmoles 產物所需的酵素量。

C. 反應速率曲線的建立：

7.以 1 ml 的酵素分析的緩衝液中，含有固定量的 0.1 ml 的 PEPC 粗萃取物，按下列的體積組合，分別加入不同量的 PEP，然後進行同樣 OD₃₄₀ 的測定(步驟 5)，以決定 PEPC 的 V_{max} 與 K_m 值。

	<u>緩衝液C(不含PEP)</u>	<u>PEPC粗萃取液</u>	<u>0.1M PEP</u>
a.	900 μ l	0.1 ml	0
b.	880 μ l	0.1 ml	20 μ l
c.	860 μ l	0.1 ml	40 μ l
d.	840 μ l	0.1 ml	80 μ l
e.	800 μ l	0.1 ml	100 μ l

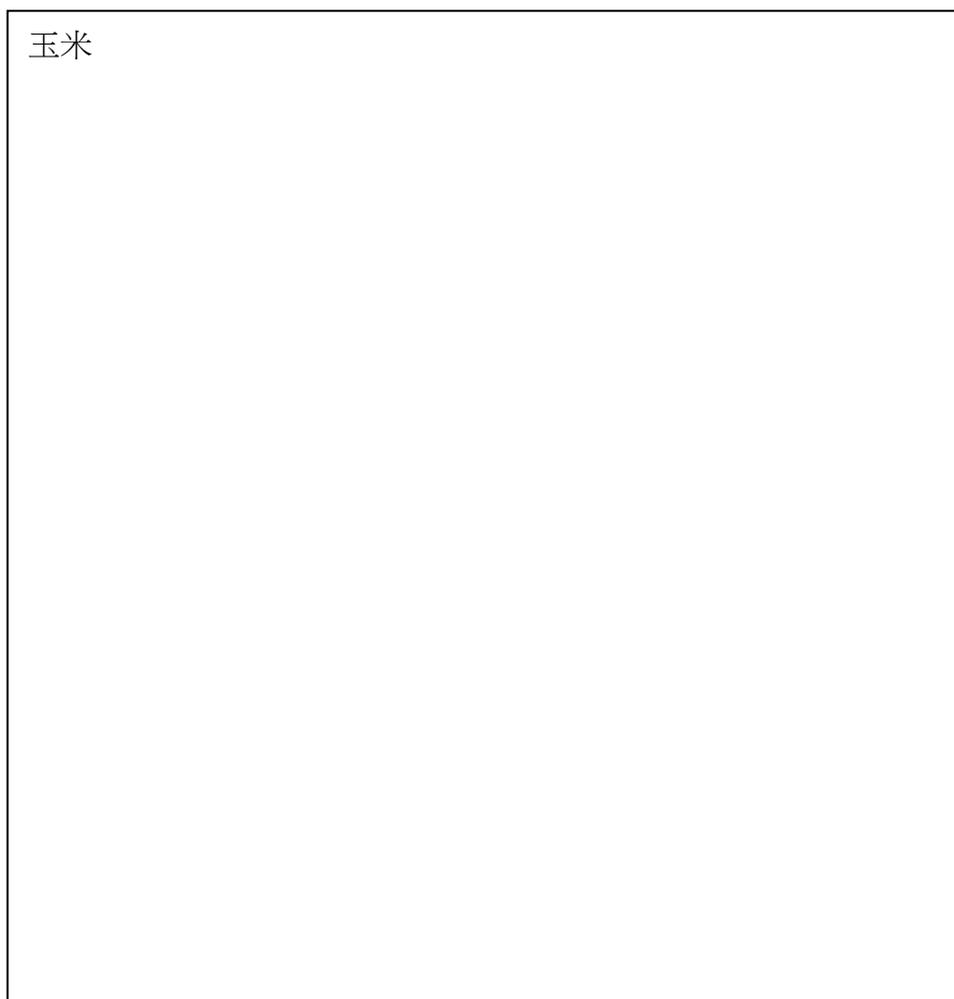
四、實驗結果與討論：

1. 請依照步驟 5 和 6 將測定的結果，計算玉米葉片中 PEPC 的酵素活性，以 units/ml 表示；以及它的反應速率，以 $\mu\text{moles}/\text{min}$ 表示。 (20 分)

玉米酵素活性: _____

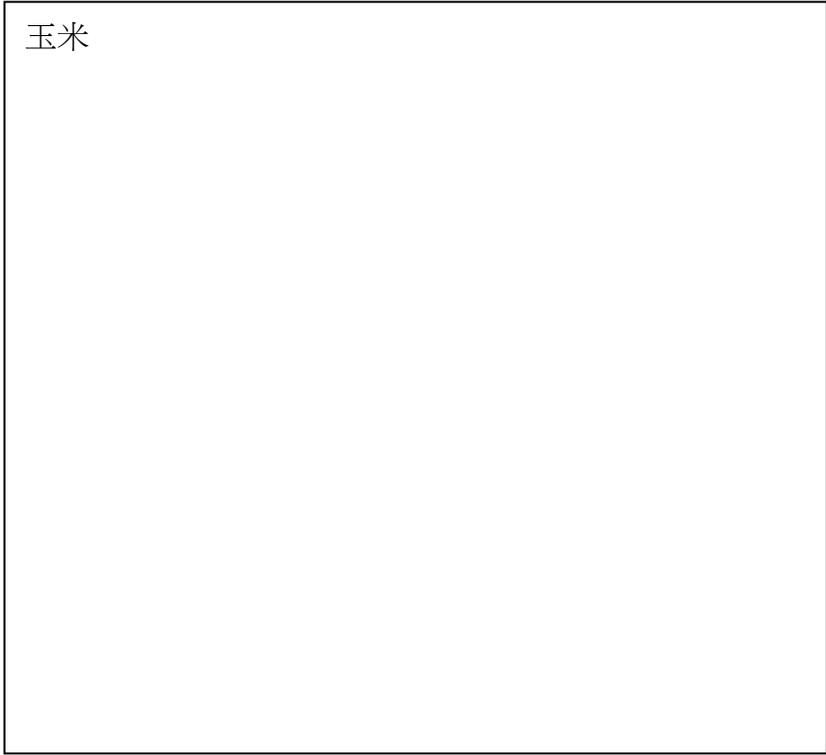
反應速率: _____

2. 請依照步驟 7 測定的結果，將玉米葉片中 PEPC 的反應速率為 Y 軸及 PEP 受質為 X 軸的關係繪成曲線圖。 (20 分)



3. 根據上述的玉米葉片中 PEPC 活性的曲線圖，轉繪為 PEPC 活性直線圖，以決定它的 V_{max} 與 K_m 值。(20 分)

玉米



4. 玉米葉中 PEPC 的 K_m 值大小，在生理上有何意義？解釋之。(10 分)

5. 若此酵素反應中加入某一物質後 K_m 值降低，其生化意義為：(10 分)

6. 若此酵素反應中加入某一物質後 K_m 值不變，而 V_{max} 值改變，其生化意義為：(10 分)

7. 在此項實驗中，你認為有那些因子會影響 PEPC 的酵素活性？(10 分)
