

考生編號_____ 分數_____

二〇一二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。

實驗器材與試劑：

| 器材 | 數量 |
|--|------------|
| 微量分注器 (P20) | 1 支 |
| 微量分注器 (P200) | 1 支 |
| 微量吸管尖 (Tips) (2 μ L~200 μ L) | 1 盒 |
| 96 孔微量盤 | 1 個 |
| 1.5 mL 微量離心管 | 10 支 |
| 微量離心管架 (盒) | 1 個 |
| 計時器 | 1 個 |
| 計算機 | 1 台 |
| 大頭針 | 1 支 |
| 簽字筆 | 1 支 |
| 直尺 | 1 把 |
| 試劑 | 數量 |
| Bradford dye-binding 蛋白質呈色劑 | 5 mL |
| Bovine serum albumin (BSA) 標準品 (1.0 mg/mL) | 50 μ L |
| 磷酸緩衝溶液 (phosphate buffered saline, PBS) | 10 mL |
| 未知濃度之蛋白質樣品 X | 30 μ L |
| 公用器材 | 數量 |
| 微量盤分光光譜儀 | 1 台 |
| 小型桌上離心機 | 9 台 |

※ 請注意：

1. 請確認考生編號是否與您的考號相同。
2. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
3. 本試卷(含封面、試題卷)共 6 頁，於交卷時全部繳回。
4. 作答時間為 70 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。

一、實驗主題：Bradford dye-binding method 蛋白質濃度測定法

Bradford dye-binding method 蛋白質濃度測定法是利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 (以下簡稱 CBG) 可與蛋白質結合而變色的特性來定量 (Bradford, 1976)；若樣品中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBG 也會隨之增多，因而呈色較深。本實驗所使用之 Bradford 呈色劑與蛋白質結合後可由茶色變成藍色。

二、實驗內容：

Bovine serum albumin (BSA) 標準品校正線之建立，與未知蛋白質濃度樣品之濃度測定。

三、實驗操作：(40分)

1. 分別將微量離心管按照【表一】進行標示，並進行BSA標準品之稀釋。

【表一】BSA標準品之稀釋法

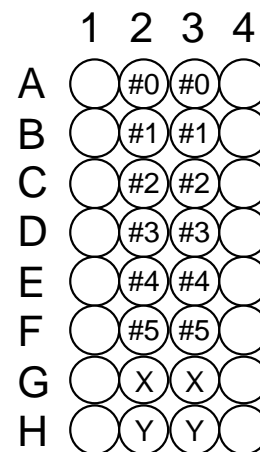
| 微量離心管標示 | BSA標準品 (1 mg/mL) | PBS | 濃度 |
|---------|------------------|------------|-----------|
| #0 | 0 μ L | 20 μ L | 0 mg/mL |
| #1 | 4 μ L | 16 μ L | 0.2 mg/mL |
| #2 | 8 μ L | 12 μ L | 0.4 mg/mL |
| #3 | 12 μ L | 8 μ L | 0.6 mg/mL |
| #4 | 16 μ L | 4 μ L | 0.8 mg/mL |
| #5 | 20 μ L | 0 μ L | 1.0 mg/mL |

◆溶液請混合均勻。請儘量節省吸管尖與微量離心管，過度浪費，將予以扣分。

2. 取一微量離心管標示為 Y。將 10 μ L 未知濃度之蛋白質樣品 X 與 20 μ L PBS 混合成為樣品 Y。

3. 按照右方【圖一】之配置，將#0~#5 標準品、樣品 X 與樣品 Y，以二重複加入對應之 96 孔微量盤中。每槽加 5 μ L。

◆樣品添加時，請由濃度低的樣品先取樣，這樣就不需更換吸管尖，可節省吸管尖使用量。過度浪費，將予以扣分。



【圖一】96 孔微量盤配置圖

4. 所有標準品添加完成後，每槽再加入 200 μ L Bradford dye-binding 呈色劑。

◆加呈色劑時，微量吸管尖請勿與槽中溶液接觸，以避免污染。並儘量避免氣泡產生。

◆呈色劑密度較大，很容易因沉積在下方而分層。請橫向輕拍微量盤數次，使添加的各溶液均勻混合。勿過度用力以避免溶液濺出。

5. 加完呈色劑後，請靜置室溫 5 分鐘，接著以微量盤分光光譜儀測量 595 nm 的吸光值。30 分鐘內之呈色都極為穩定。請耐心使用微量盤分光光譜儀，勿急躁。

◆測定之樣本中若有氣泡，將影響讀值之準確性。

6. 實驗完成後，請將 96 孔微量盤放置於實驗桌上，並將兩支微量分注器 P20 與 P200 分別歸零，亦即將刻度轉至比 20 μL 及 200 μL 之刻度多半圈處，並整理實驗桌面。

四、實驗結果：

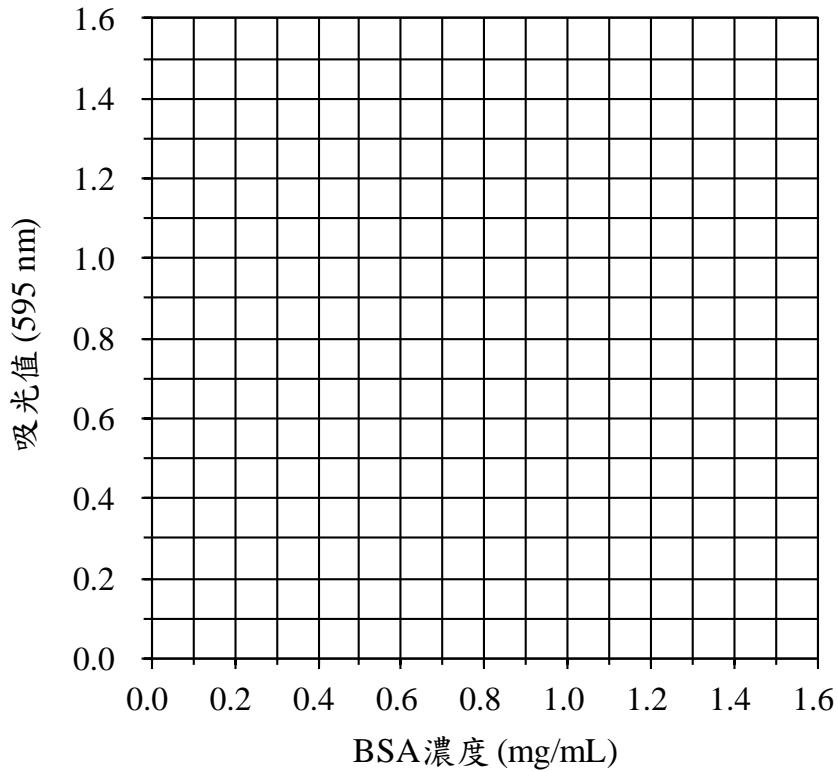
1. 將儀器測得之吸光值填入【表二】之相對應空格中，並計算出各組之平均吸光值。

◆吸光值請四捨五入取至小數點以下兩位數填入下表 (例如：0.58)。

【表二】595 nm 吸光值 (8分)

| 96孔微量盤欄位 | 2 | 3 | 樣本 | 平均吸光值 |
|----------|---|---|----|-------|
| A | | | #0 | |
| B | | | #1 | |
| C | | | #2 | |
| D | | | #3 | |
| E | | | #4 | |
| F | | | #5 | |
| G | | | X | |
| H | | | Y | |

2. 將【表二】#0 ~ #5的平均吸光值以實心圓 (●) 標示於【圖二】標準品校正線中，並以直尺繪製自行推估之線性迴歸線。(12分)



【圖二】標準品校正線

3. 請利用【圖二】推估樣品 X 與 Y 之蛋白質濃度。(10 分)

| | |
|--------|--------|
| 計算式： | 計算式： |
| X 之濃度： | Y 之濃度： |

◆ 請將計算出之濃度數值四捨五入取至小數點以下兩位數後，再填入 X 與 Y 之濃度。

五、討論與問題回答：

1. 本實驗之樣品 Y 是將樣品 X 稀釋 3 倍所得之蛋白質溶液，因此將 Y 之數值乘以 3 (以下以 3Y 表示) 應與 X 之數值極為相近。若您經計算之後 $(X-3Y)/X$ 或 $(3Y-X)/X$ 之數值大於 5% 時，X 與 3Y 之濃度何者較能代表本實驗未知蛋白質濃度樣品之實際濃度？理由為何？ (6 分)

2. 某學生以免疫球蛋白當作標準品，進行Bradford dye-binding method後，得到的結果如下【表三】所示。請以空心圓 (○) 將【表三】之數值標示於【圖二】中，並畫出推估之線性迴歸線 (2 分)。很顯然地，將樣品X與樣品Y之吸光值帶入免疫球蛋白標準品之校正線時，所得到之蛋白質濃度與利用BSA為標準品時之結果極為不同，請推論可能的原因為何？(6 分)

【表三】免疫球蛋白標準品之 Bradford dye-binding method 蛋白質濃度測定

| 免疫球蛋白標準品濃度 | 595 nm吸光值 |
|------------|-----------|
| 0 mg/mL | 0.30 |
| 0.4 mg/mL | 0.40 |
| 0.8 mg/mL | 0.50 |
| 1.2 mg/mL | 0.60 |
| 1.6 mg/mL | 0.70 |

3. 以免疫球蛋白當作蛋白質濃度校正線之標準品時，X與 3Y之數值何者較能代表本實驗未知蛋白質濃度樣品之實際濃度？理由為何？(4 分)

4. 含有苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸的蛋白質，均可採用 UV 吸光法來測定其濃度。因此實驗室中，亦常利用 UV 280 nm 來測定蛋白質之濃度。請比較 Bradford dye-binding 法與 UV 吸光法之優缺點 (4 分)；本實驗是否可以改成不需使用 Bradford dye-binding 呈色劑，而直接將 96 孔盤每槽之溶液體積以 PBS 加至 200 μ L 之後，測定 UV 280 nm 之吸光值來製作標準品校正線？理由為何？(2 分)。

5. 某蛋白質需要用含有 0.1% Triton X-100 (其為一種界面活性劑，或稱為洗滌劑，英文稱 detergent) 的 PBS 來做溶入劑，才得以進行蛋白質純化的工作，因此所有純化用的緩衝溶液都含有 Triton X-100。當利用 Bradford dye-binding 法來測定樣本之蛋白質濃度時，發現不管樣本中有無此蛋白質，都呈現很高的呈色反應，請問是發生了何種問題？為了要得知此蛋白質之實際濃度，您要如何解決這樣的困境呢？ (6 分)