

考生編號_____ 分數_____

2013 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 3 試場

實作 1：脂質過氧化反應測定

實驗器材		藥品及材料	
1. 分光光度計(公用)	二 台	1. 綠豆幼苗分別處理:蒸餾水,100, 200(μ M)銅溶液	各一盤
2. 熱水浴(公用)	一 台	2. TCA (Trichloroaceticacid)	15 ml
3. 試管架	一 組	3. TBA (Thiobarbituric acid)	15 ml
4. 比色管	三 管	4. 緩衝液	5 ml
5. 天平(公用)	二 台	5. 拖盤	1 個
6. 秤盤	三 個		
7. 1 mL 微量分注器	一 支		
8. 1 mL 微量吸管	一 盒		
9. 鑷子	一 支		
10. 手套	一 組		
11. 油性筆	一 支		
12. 研鉢	三 組		
13. 解剖剪刀	一 支		
14. 15 mL 螺旋試管	六 隻		
15. 冰浴	一 盒		
16. 離心機(公用)	一 台		

*請注意：

- 1.請確認考生編號是否與您的考號相同。
- 2.請確認桌上的材料及器材，材料用完後，將不再補充。
- 3.本試卷占 50 分，試卷（含封面、試題卷）共 4 頁，於交卷時全部繳回。
- 4.作答時間含實作一、實作二試題共 90 分鐘，請於本卷上作答。
- 5.試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。
- 6.實驗完畢後，請清理桌面。

脂質過氧化反應測定

分析綠豆遭受環境逆境下脂質過氧化反應(lipid peroxidation)的變化

過去數十年間，台灣從傳統的農業社會逐漸蛻變轉型，邁入經濟發達的現代化工商業社會。雖然台灣人民創造了舉世稱羨的經濟奇蹟，卻也使得生態保育面臨空前的大浩劫。世界上大部分的工業國家，包括台灣地區，有許多農地及河川下游土地都受到嚴重的重金屬污染，所謂重金屬是指一群密度超過每立方公分五克的元素。台灣南部以二仁溪為例，不論其下游或支流，河水本身及底泥都有嚴重的重金屬污染，其中又以銅、鋅、鉛、鎳及鎘為主要污染源。以台灣地區最著名的土壤受重金屬污染是桃園縣觀音鄉大潭村及蘆竹鄉中福村的鎘米污染事件，這兩個案例都是化學工廠不當排放含鉛及鎘的廢水，造成下游約一百一十公頃的農田受污染。農田土壤一旦遭受重金屬污染，會嚴重危害作物的生長，如生長在含有鎘污染土壤中的水稻秧苗，其生長明顯受到抑制；除此之外，還會使稻米累積過量重金屬，危害人體健康。因此政府不得不採取強制休耕，以進行土壤復育。

當水稻秧苗暴露於自由基之環境下時，自由基會直接或間接的攻擊水稻分子而造成傷害。其中脂質過氧化反應是一種自由基的連鎖反應，這種連鎖反應是使脂質不斷氧化，生成過氧化脂質。且可引起丙二醛 (Malonaldehyde, MDA) 和 4-羥基壬烯酸 (4-hydroxynonenal, HNE) 的產生，進一步使細胞膜的流動性和通透性發生改變，影響到細胞結構和功能。因此研究人員對此脂質過氧化反應之功能產生相當大的興趣。

實驗步驟：

1. 於秤盤上標示蒸餾水、100 及 200 (μM)，加入 1 mL 緩衝液，分別剪下以蒸餾水、100 及 200 (μM) 溶液處理的綠豆根部，放置於標示並含有緩衝液之秤盤中；並將三個(自行標示)之研鉢分別放入 2 mL TCA (Trichloroacetic acid)、解剖剪刀、鑷子放入托盤中，待秤重。**(此時請舉手，向助教領取天平之號碼牌)**
2. 秤重前請將緩衝液完全移除，再以天平秤取約 300 mg 並記錄下**確實重量**後，立即將秤好的綠豆根部放入含有 2 mL TCA 標示的研鉢中。
3. 回到座位後，將秤重後三種不同濃度處理的綠豆根部分別研磨，補足至 4 mL TCA (Trichloroacetic acid) 再繼續研磨。
4. 待充分研磨之後，將 15 mL 螺旋試管分別標示上 0、100 及 200 (μM) 與考生編號，再將 3 種分別研磨後之溶液移入以上所標示的 15 mL 螺旋試管中，再交給助教以 3500 rpm 離心 5 分鐘。
5. 離心後分別取 1 mL 上清液於**新標示**好的 15 mL 螺旋試管並加入 4 mL TBA (Thiobarbituric acid) 試劑，充分與上清液混合均勻，再放入 95°C 熱水浴反應 30 分鐘後。

6. 待熱水浴反應完成後，急速放入冰浴冷卻約 1 分鐘，再交給助教以 3000 rpm 離心 5 分鐘，分別將 2 mL 混合液放入比色管中，利用分光光度計測取 532 nm(A_{532})與 600 nm(A_{600})的吸光值。(此時請舉手，向助教領取分光光度計之號碼牌)

7. 計算 MDA 的含量

公式：

$$\text{MDA (nmol g}^{-1}\text{)} = (A_{532} - A_{600}) \div 155 \times 5 \times 4 \times 1000 \div \text{FW(g)}$$

實驗結束後請回答以下問題

一、問答題：

1. 測量綠豆根部在蒸餾水溶液處理及在 100 和 200 μM 銅處理 3 小時之後之脂質過氧化反應 (lipid peroxidation) 的變化 (12 分)。並以一段約 100~200 之文字敘述實驗結果並說明實驗數據之意義 (3 分)。

2. 日本岡山大學松本教授對鋁抑制碗豆根部生長很感興趣，他發現碗豆在含鋁(10uM)的培養基中生長將造成根部脂質氧化相當嚴重，且使得植物根部生長受抑制。請設計一實驗探討碗豆根部受鋁抑制生長之現象是否是根部細胞脂質氧化所造成。(15分)

二、單選題

- _____ 1. 脂肪酸(fatty acids)會在下列何種情形下進行合成？
- (A) 脂肪酸含量充裕時
 - (B) 碳水化合物(carbohydrate)含量充裕時
 - (C) 碳水化合物與能量均充裕時
 - (D) 以上皆非
- _____ 2. 磷脂質(phospholipid)包含下列何者？
- (A) 親水性的頭部以及親油性的末端
 - (B) 水溶性的長碳鏈
 - (C) 帶正電的官能基
 - (D) B、C 皆正確
- _____ 3. 脂肪酸之合成發生在細胞何處？
- (A) 粒線體
 - (B) 細胞膜
 - (C) 細胞質
 - (D) 內質網
- _____ 4. 為何動物無法將脂肪酸轉換成葡萄糖？
- (A) 無法將乙醯輔酶轉(acetyl CoA) 轉換成丙酮酸(pyruvate)
 - (B) 缺乏蘋果酸合成酶(malate synthase)
 - (C) 缺乏脫氫酶(dehydrogenase)
 - (D) 缺乏 α -酮戊二酸脫氫酶 (α -ketoglutarate dehydrogenase)

2013 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 3 試場

實作 2

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：

項 目	數量	品 項	數量
微量分注器 p20	1 支	微量離心管	2 支
計時器	1 個	微量分注器吸管尖	15 支
顯微鏡	1 台	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I 限制酶反應液 (標示:RE)，置於冰上	1 管
細字奇異筆	1 支	DNA 樣品 A，置於冰上	1 管
手套	1 雙	DNA 樣品 B，置於冰上	1 管
培養皿	1 個	有編號的離心管水浴浮盤	1 個
迷你離心機	公用	DNA 加注染料(標示:染劑)	1 管
水浴槽	公用	尺標 DNA(標示:marker)，置於冰上	1 管
電泳槽	公用	27°C 培養之突變菌種細胞 (標示:27)	1 管
DNA 膠片染色盤	公用	33°C 處理 3 小時之突變菌種細胞 (標示:33)	1 管
DNA 膠片照相系統	公用	載玻片	2 片
計數器	公用	蓋玻片	4 片

※ 請注意：

1. 請確認考生編號是否與您的考號相同。
2. 請確認桌上的材料及器材，材料用完後，將不再補充。
3. 公用儀器運用起依照實驗桌上指示使用。
4. 本試卷占 50 分，試卷（含封面、試題卷）共 4 頁，於交卷時全部繳回。
5. 作答時間含實作 1、實作 2 試題共 90 分鐘，請於本卷上作答。
6. 試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。

一、背景介紹：

曾用功研究出芽酵母菌的細胞週期調控，他發現了一個對高溫敏感的突變菌種，一般正常酵母菌在 23~37°C 的環境下都可以生長，但此突變菌種在超過 30°C 的環境下就停止生長，而且他發現停止生長的突變菌種細胞會停滯在細胞週期中的一個特定時期。曾用功認為在這個突變菌種內發生突變的基因可能就是諾貝爾獎得主 L. Hartwell 研究的 *CDC* 基因。為了驗證他的推測，他寫信給 Dr. Hartwell 希望能得到帶有正常 *CDC* 基因的選殖質體。Dr. Hartwell 很快就將可以攜帶並能表現正常 *CDC* 基因的選殖質體 p*CDC* 和一個不帶 *CDC* 的對照質體 p*Vector* 寄來，只不過在運送過程中，二管質體 DNA 的包裝標示毀損，無法辨別內容物為何，曾用功暫時將這二管質體 DNA 標示為 A 和 B。Dr. Hartwell 提供的資料中指出 p*Vector* 全長 6 kbp (6000 bp)，而 p*CDC* 則是將一段含 *CDC* 基因，二端為限制酶 *Bam*HI 和 *Sal*I 切位的 DNA 片段插入到 p*Vector* 上相距 45 bp 的限制酶切位 *Bam*HI 和 *Sal*I 之間。曾用功請你協助他的研究計畫：首先你要利用限制酶切割和膠體電泳分析去區分這二管 DNA 何者是 p*CDC*，何者是 p*Vector*。同時，你要用顯微鏡觀察曾用功發現的突變菌種細胞的形態，再次確認在高溫下細胞停滯的細胞週期特定時期。

二、限制酶切割和膠體電泳分析

A. 實驗步驟：（操作 8 分）

1. 取二個空的微量離心管，分別標記 **1** 和 **2**，用微量分注器吸取 13 μ l 已配好的 *Bam*HI/*Sal*I 限制酶反應液(標示 RE)分別加入管 **1** 和管 **2**。
2. 用微量分注器在 A 管中吸取 2 μ l 的 DNA，加入管 **1** 中，以微量分注器吸排混合；在 B 管中吸取 2 μ l 的 DNA，加入管 **2** 中，吸排混合。用迷你離心機將二管反應混合液離心至離心管底部（離心時請平衡放置離心管於相對位置）。每次吸取樣品時，切記要用乾淨未用過的吸管尖，且在準備反應混合液時及樣品離心後，隨時都要將樣品放置在冰上。
3. 將反應混合液離心管放在有編號的水浴浮盤，置於 37 °C 水浴槽中反應 35 分鐘(以計時器計時)，利用等待時間進行細胞觀察實驗。
4. 當 35 分鐘反應時間終了時，從水浴槽取回你的樣品。
5. 在反應樣品中加入 2 μ l DNA 加注染料(標示:染劑)，以分注器混合。
6. 至電泳實驗臺，使用微量分注器，分別取 15 μ l 已加注染料的反應樣品及尺標 DNA，依照尺標 DNA、管 **1**、管 **2** 的順序，由左至右注入指定編號膠片的樣品凹槽中。注意輕緩加入樣品，不要溢出槽外。

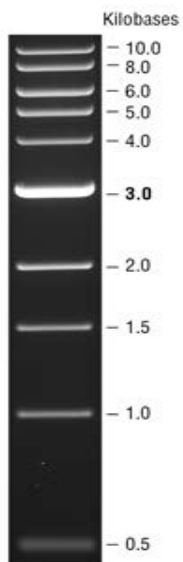
7. 連接電源，以 100 volts 進行電泳 30 分鐘，請小心不要碰觸電極。
8. 待電泳結束後，關閉電源，戴手套，小心取出膠片，放在培養皿上，帶至膠片照相儀器系統處，請實驗助理幫你將膠片染色及照相。
9. 並於照相完成後，取回你的電泳結果照片。

B. 實驗結果

1. 將電泳結果照片以膠帶貼在下方空白處。(6分)

2. A 管 DNA 和 B 管 DNA，何者是 pCDC，何者是 pVector? (5分)

3. 根據下方尺標 DNA 分離模式的標準圖(單位：kb)，pCDC 上插入的 CDC 基因片段大約是多少 kbp?。(5分)



三、突變菌種細胞觀察

A. 實驗步驟：（操作 8 分）

1. 取一載玻片，用微量分注器吸取 6 μl 在 27°C 培養之突變菌種細胞（吸取前先以分注器均勻混合細胞），置於載玻片上。
2. 取一蓋玻片蓋在載玻片上的細胞樣本上，儘量避免氣泡產生。
3. 將此樣本玻片置於顯微鏡之載物臺上，先以 10 倍物鏡觀察，轉動調節輪至看見清晰之細胞影像後，再以 40 倍物鏡觀察，用計數器估算在細胞週期各時期細胞所佔比例(%)。計數器使用前要轉動二側轉輪，將數字歸零。
4. 重複步驟 1~3，但細胞樣品改為在 33°C 處理 3 小時之突變菌種細胞。

B. 實驗結果

出芽酵母菌的外部細胞形態可以反映細胞週期的不同時期：



1. 請觀察在 27°C 培養之突變菌種及 33°C 處理 3 小時之突變菌種的各種細胞形態並估算各時期所佔百分比，因 G2 和 M 較不易區分，將此二時期合併計算為 G2/M 期。(6 分)

27°C 培養：G1 _____ %，S _____ %，G2/M _____ %

33°C 處理 3 小時：G1 _____ %，S _____ %，G2/M _____ %

2. 此突變菌種細胞在高溫下會停滯在細胞週期的哪一個時期 (S、G1、還是 G2/M)? (6 分)
3. 若這個突變菌種發生突變的基因就是諾貝爾獎得主 L. Hartwell 研究的 *CDC* 基因，將樣品 A 及樣品 B 的 DNA 分別轉殖入此突變菌種細胞後，則各轉殖菌株在 27°C 和 33°C 時的生長情形應該會如何？請在下表空格中填入“+”代表生長；“-”代表不長。(6 分)

轉殖菌株 \ 生長溫度	27°C	33°C
樣品 A 轉殖菌株		
樣品 B 轉殖菌株		