

考生編號：_____ 分數：_____

2015 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 1 試場 TASK1

※ 實驗所需之器材及藥品，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：

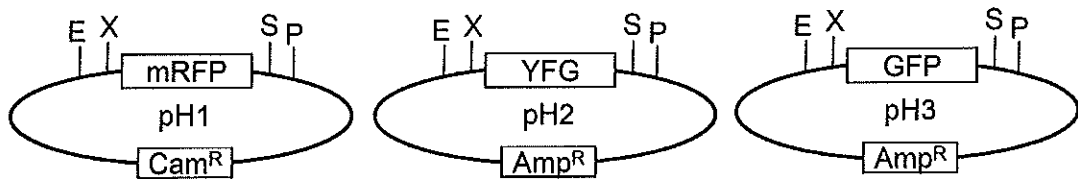
器 材 類	數 量	藥 品 及 材 料 類	數 量
微量分注器 p20	1 支	DNA 樣品 A，置於冰上 請注意考生編號是否與您的考號相同	1 管
微量分注器吸管尖	10 支	DNA 樣品 B，置於冰上 請注意考生編號是否與您的考號相同	1 管
計時器	1 個	<i>Eco</i> RI 和 <i>Pst</i> I 限制酶反應液 (標示:RE)，置於冰上	1 管
迷你離心機	1 個	DNA 加注染料(標示:D)， 置於冰上	1 管
水浴浮盤	1 個	尺標 DNA(標示:M)， 置於冰上	1 管
電泳槽	1 個	電泳膠片	1 片
水浴槽	公用	有編號的培養皿 (盛裝膠片用)	1 個
DNA 膠片照相系統	公用	手套	1 雙
		膠帶台	1 個
		剪刀	1 支

※ 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(含封面、試題卷)共 5 頁，於交卷時全部繳回。
4. 本試場含 TASK1 及 TASK2，作答時間共為 80 分鐘
5. 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、背景介紹：

質體 pH1(如圖 1)帶有抗氯黴素 chloramphenicol 基因(Cam^R)和紅色螢光蛋白基因(mRFP)，mRFP 表現極強，不需 UV 光就可看出紅色。因科展實驗所需，要將 pH1 上的 mRFP 基因以質體 pH2(如圖 1)上的 YFG 基因置換取代，質體 pH2 上帶有抗 ampicillin 基因(Amp^R)，你(妳)的合作夥伴將 pH1 和 pH2 質體 DNA 等量混合，加入 *EcoRI* 和 *PstI* 兩種限制酶進行切割處理，以黏合酶進行 DNA 黏合反應，再轉殖入大腸桿菌中，並以氯黴素篩選轉殖成功的菌株，結果得到 A 和 B 二類轉殖菌株(如圖 2)，合作夥伴將確認是否轉殖成功之工作交給你(妳)。



Cam^R : 抗chloramphenicol 基因

Amp^R : 抗ampicillin 基因

E: *EcoRI* 切位

X: *XbaI* 切位

S: *SpeI* 切位

P: *PstI* 切位

圖1. 質體上相關限制酶切位

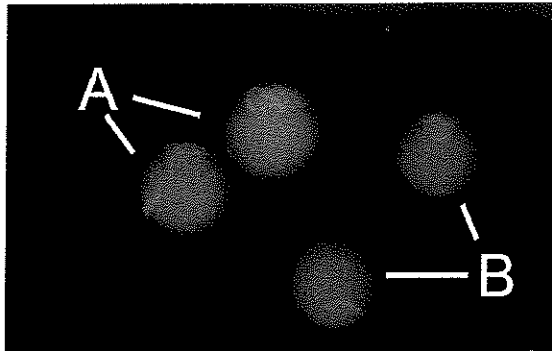


圖2. 轉殖菌株

問題 1). 圖 2 中的 A、B 二類菌株，哪一種可能帶有正確建構質體？為甚麼？(6 分)

二、限制酶切割和膠體電泳分析

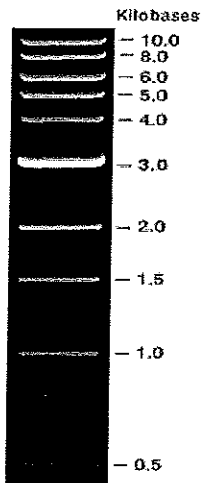
為確認質體是否正確，須以限制酶切割質體 DNA，並檢視所得片段是否與預估長度相符，這是你(妳)要負責的部分。合作伙伴已將 A、B 二類菌株中的質體 DNA 純化出，並分別標示為 A 和 B，並告訴你(妳) pHI 質體 DNA 以 *EcoRI* 和 *PstI* 移除 mRFP 後的載體 DNA 長度為 2.0 kb。你(妳)要進行限制酶切割和膠體電泳分析，去估算這二種質體 DNA 中去除載體之外的插入片段大小，並依你(妳)在問題 1 中的答案分別推估插入片段的長度。

A. 實驗步驟：（操作 6 分）

1. 用微量分注器各吸取 12 μl 已配好的 *EcoRI/PstI* 限制酶反應液(標示 RE) 分別加入 DNA 樣品 A 管和 DNA 樣品 B 管，用微量分注器吸排混合。每次吸取樣品時，要用乾淨未用過的吸管尖。
2. 用迷你離心機將二管反應混合液離心至管底部，離心時請平衡放置離心管於相對位置。
3. 將反應混合液離心管放在已編號的水浴浮盤中，然後放置到 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽，反應 30 分鐘(以計時器計時)，利用等待時間回答問題 3~5，或進行另一實作題。
4. 當 30 分鐘反應時間終了時，從水浴槽取回你的樣品。
5. 在反應樣品中各加入 3 μl DNA 加注染料，以分注器混合。
6. 至電泳實驗臺，使用微量分注器，分別將已加注染料的反應樣品及 18 μl 尺標 DNA，依照尺標 DNA、管 A、管 B 的順序，由左至右依序將樣品注入樣品凹槽中。注意輕緩加入樣品，不要溢出槽外。
7. 連接電源，按照實驗助理指示設定，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，小心取出膠片，放在培養皿上，帶至膠片照相儀器系統，請實驗助理幫你膠片照相。
9. 並於照相完成後，取回你的電泳結果照片。

B. 實驗結果：將電泳結果照片以膠帶貼在下方空白處。(10分)

問題 2). 根據下方尺標 DNA 分離模式的標準圖(單位: kb), 依照你(妳)在問題 1 中的答案推估各插入基因的片段長度分別是多少 kb? 請以基因名稱回答。(8分)



問題 3). 在這個質體建構實驗中, pH1 上的 mRFP 基因對篩選轉殖株提供了何種功用?(6分)

問題 4). 請按照圖 1 中質體的模式圖畫出本實驗中建構質體的組成。(6 分)

問題 5). 在另一個實驗中需要將質體 pH1 上的 mRFP 基因移除，並且將質體 pH2 上的 YFG 基因和質體 pH3 (如圖 1) 上的 GFP 基因同時插入移除 mRFP 後的 pH1 載體上，若只能使用質體 pH1、pH2 和 pH3 來進行限制酶切割、電泳純化和黏合反應，且僅有一次的細菌轉殖。你(妳)會如何設計限制酶切割、電泳純化和黏合反應？請以圖示說明。圖 3 是這些質體上相關限制酶的辨識序列和切位。(8 分)

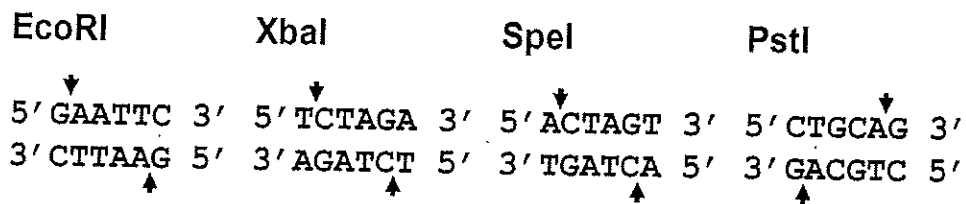


圖3. 限制酶辨識序列及切位(↓和↑)

考生編號：_____ 分數：_____

2015 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 1 試場 TASK2

※ 實驗所需之器材及藥品，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, P200, P1000)	各 1 支
微量吸管尖 (20~200 μL & 1000 μL)	各 1 盒
96 孔微量盤	1 個
1.5 mL 微量離心管	15 支
微量離心管架	1 個
計時器	1 個
小型桌上型微量離心機	1 部
簽字筆	1 支
A4 紙張	1 張
試劑與實驗材料	數量
磷酸酶 (phosphatase)	200 μL
2 mM BCIP 基質液	0.6 mL
H ₂ O	1 mL
0.2 M Acetate buffer, pH 4	100 μL
0.2 M Tris buffer, pH 9.3	100 μL
Urea	100 μL
SDS	100 μL
EDTA	100 μL
E64 (為含半胱氨酸 Cysteine 之酵素的抑制劑)	100 μL
PMSF (為含絲氨酸 Serine 之酵素的抑制劑)	100 μL
10 mM 磷酸根標準溶液	1 mL
呈色劑	6 mL

※ 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(含封面、試題卷)共 5 頁，於交卷時全部繳回。
4. 本試場含 TASK1 及 TASK2，作答時間共為 80 分鐘。
5. 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：磷酸酶 (phosphatase) 活性分析實驗

磷酸酶為一種酵素，在許多生物體中都普遍存在，此酵素可以藉由水解磷脂鍵的作用機制，來移除其基質上之磷酸根基團，並且產生出一個帶有氫氧基的產物。磷酸酶的作用與激酶的作用正好相反，激酶是磷酸化酶，可以利用能量分子，如 ATP，將磷酸基團加到對應的基質分子上。磷酸酶參與許多蛋白質的功能調控及細胞內重要的代謝反應。

二、實驗操作：(10分)

1. 實驗開始時，請先配置 1 mM、2 mM、4 mM、6 mM、8 mM 之磷酸根標準溶液各 200 μL 。
2. 請將 60 μL 的 BCIP 基質液分別與 60 μL 的 H_2O 、Acetate buffer、Tris buffer、Urea、SDS、EDTA、E64、PMSF 等溶液於微量離心管中充分混和，輕拍管壁後將混和液離心。
3. 將 50 μL 之各混和液分別加入對應的 96 孔微量盤中，並將每個實驗進行雙重複。

H_2O	Acetate	Tris	Urea	SDS	EDTA	E64	PMSF
H_2O	Acetate	Tris	Urea	SDS	EDTA	E64	PMSF

4. 於每槽中加入 10 μL 之磷酸酶酵素液，於室溫中反應十分鐘。
5. 加入 200 μL 呈色劑於各槽中，終止反應並呈色。
6. 將 60 μL 之磷酸根標準溶液 (1 mM、2 mM、4 mM、6 mM、8 mM) 分別加入對應的 96 孔微量盤中，並以 200 μL 呈色劑呈色。每個磷酸根標準溶液的實驗亦必須進行雙重複。

H_2O	1 mM	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM
H_2O	1 mM	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM

7. 注意！加呈色劑時請避免產生氣泡，因為氣泡會影響分光光度計之讀值的準確性。
8. 靜置 2 分鐘之後，即可請助教協助以微量盤分光光譜儀測定 620 nm 的吸光值。請將讀值填入【表一】與【表二】中。並將【表二】之平均吸光值於【圖一】中畫出磷酸根標準溶液之回歸線。

9. 實驗完成後請將96孔微量盤放置於實驗桌上，三支微量分注器P20、P200與P1000分別轉至20 μL 、200 μL 及1 mL之刻度處，並整理實驗桌面。

三、實驗結果：(21分)

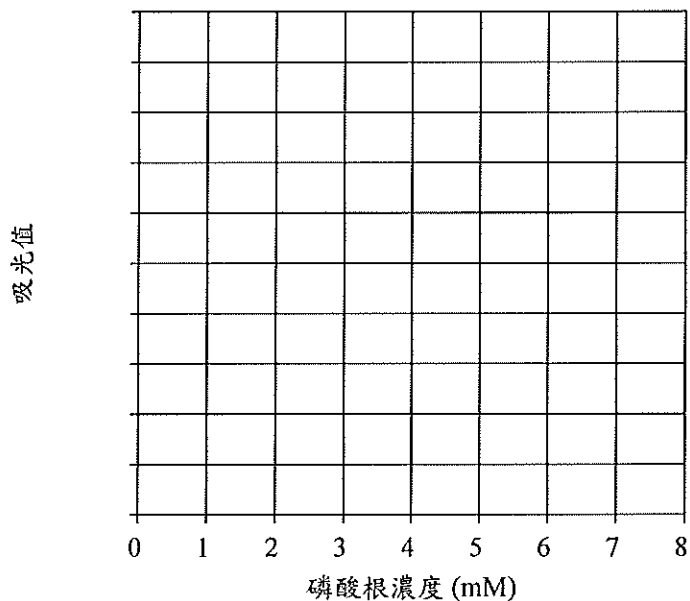
1. 酵素反應呈色後之吸光值測定結果。【表一】(8分)

實驗組別	620 nm 吸光值1	620 nm 吸光值2	平均吸光值
BCIP + H ₂ O			
BCIP + Acetate			
BCIP + Tris			
BCIP + Urea			
BCIP + SDS			
BCIP + EDTA			
BCIP + E64			
BCIP + PMSF			

2. 磷酸根標準品呈色後之吸光值測定結果。【表二】(6分)

磷酸根濃度 (mM)	620 nm 吸光值1	620 nm 吸光值2	平均吸光值
0			
1			
2			
4			
6			
8			

3. 磷酸根標準曲線 (請自行設定Y軸的刻度)。【圖一】(7分)



四、問題回答：(19分)

1. 請問下列敘述何者正確？(A) 此酵素為酸性磷酸酶；(B) 此酵素為鹼性磷酸酶；(C) 此酵素為中性磷酸酶；(D) 此酵素反應與溶液酸鹼值無關。(2分)
2. Urea 對於此磷酸酶之酵素反應的影響為何？造成此現象的原因為何？(3分)
3. SDS 對於此磷酸酶之酵素反應的影響為何？造成此現象的原因為何？(3分)
4. 此酵素的活性區是否含有半胱胺酸？你做此推論的理由為何？(2分)
5. 此酵素的活性區是否含有絲胺酸？你做此推論的理由為何？(2分)
6. 此酵素反應是否需要二價的金屬離子？你做此推論的理由為何？(2分)
7. 請將磷酸酶與 (BCIP + H₂O) 反應之組別的吸光值填入【圖一】中 (請以 Δ 表示) (1分)。
此磷酸酶於室溫中所測得的反應速率為何？請寫出推導過程。(4分)