

## 2017 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

### 第 1 試場 實作 B

#### 第 II 部分 限制酶切位檢測建構質體組成

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：

器 材 類	數量	藥品及材料類	數量(μl)
微量分注器 p20	1 支	無菌水	1 管 (100)
p20 微量分注器吸管尖	30 支		
微量離心管	4 支	以下藥品置於冰上	
馬克筆	1 支	5X(倍)濃度限制酶反應緩衝液	1 管(15)
計時器	1 個	EcoRI 限制酶	1 管(10)
膠水	1 支	XhoI 限制酶	1 管(10)
迷你離心機	1 個	質體 A	1 管(4)
有編號的離心管水浴浮盤	1 個	質體 B	1 管(4)
有編號的培養皿(盛裝膠片用)	1 個	質體 C	1 管(4)
電泳槽	1 個	DNA 加注染料(標示:Dye)	1 管(15)
水浴槽(37°C)	公用	尺標 DNA(標示:M)	1 管(20)
DNA 膠片照相系統	公用		

※ 請注意：

1. 請確認考生編號是否正確；若有誤，請舉手請助教處理。
2. 桌上的藥品及器材用完後，將不再補充。
3. 公用儀器運用請依照指示使用。
4. 本試卷（含封面、試題卷）共 6 頁，於交卷時全部繳回。
5. 作答時間 90 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。

## 第 II 部分 限制酶切位檢測建構質體組成(50分)

背景介紹：

細胞常會依據環境中的養分狀況來調控相關基因的表現，在出芽酵母菌中，與半乳糖 (galactose) 代謝相關的基因調控便是一個被深入研究的例子 (圖 1)。當環境中沒有葡萄糖 (glucose)，但有 galactose 時，會活化轉錄因子 Gal4，去增加相關基因(GAL genes)的表現，製造出參與 galactose 運輸和代謝相關的蛋白，包括 Gal2、Gal1、Gal7 和 Gal10 等。Gal2 將胞外的 galactose 運送至細胞質(cytoplasm)，Gal1 將細胞質中的 galactose 轉化為 galactose-1P，Gal7 和 Gal10 則參與 galactose-1P 轉化為 glucose-1P 的反應。而 Gal4 轉錄因子活性的調控則是整個系統的關鍵所在，沒有 galactose 時，Gal4 會附著於 GAL genes 啟動子的調控區域 (UAS<sub>GAL</sub>)，但其活性受到抑制蛋白 Gal80 的抑制；當環境中的 galactose 藉由原本已有的少量 Gal2 運送至胞內後，另一個調控蛋白 Gal3 會與 galactose 及 ATP 結合，並進入細胞核(nucleus)內，驅除 Gal80 而活化 Gal4，進而引發 GAL genes 的大量表現。

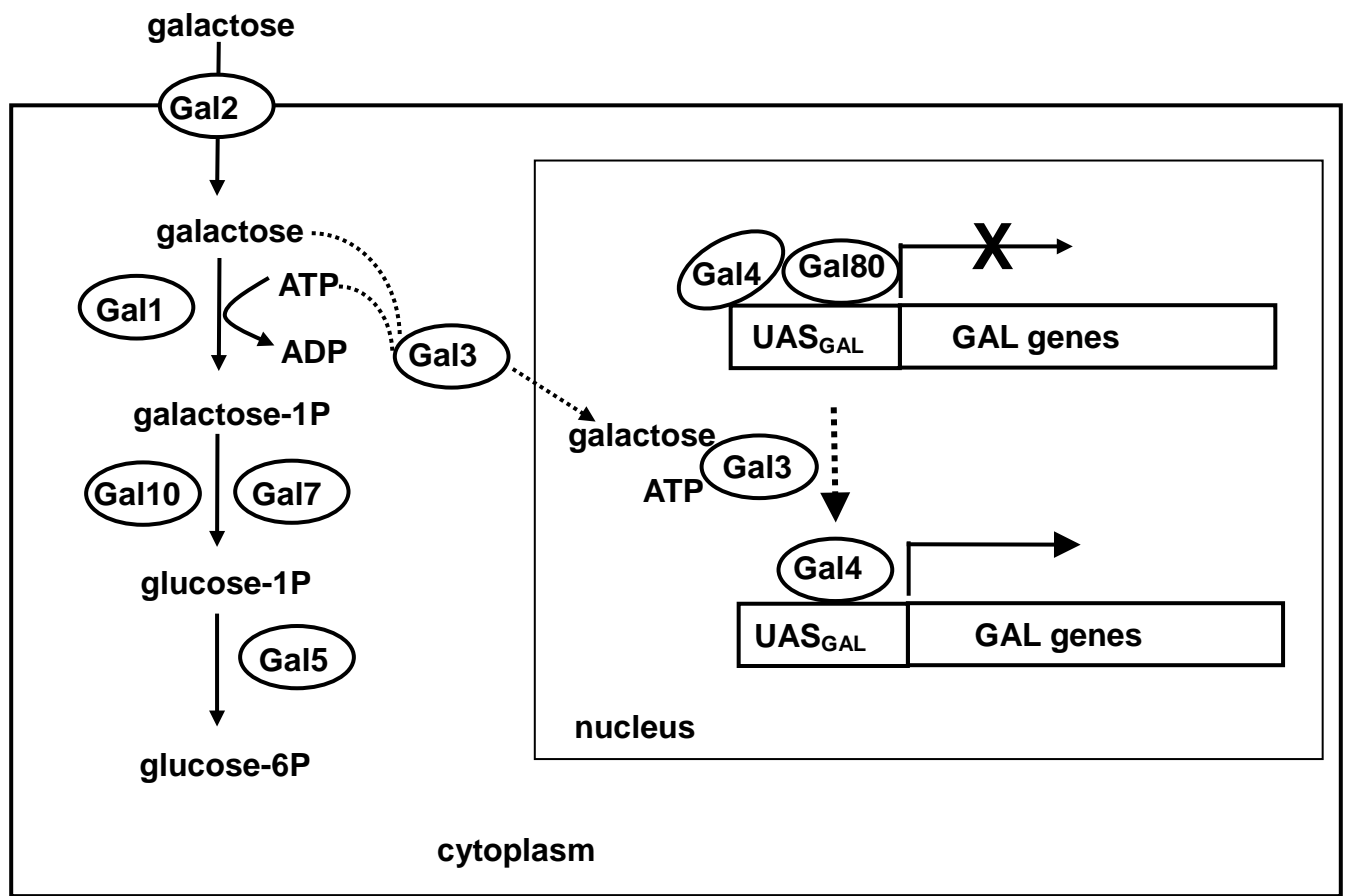


圖1. 酵母菌中galactose的代謝途徑以及相關基因調控機制

由於只要藉由 galactose 的添加或洗除，便可調控位於 UAS<sub>GAL</sub> 後之基因表現，這套 GAL 系統常被用來作為異位表現(ectopic expressing)特定基因的工具，只要把想要研究的基因接在 UAS<sub>GAL</sub> 之後，便可人為調控其表現。酵母菌 N80 蛋白原本只會在細胞進行減數分裂時才會表現，研究生孟宇使用此 GAL 系統研究 N80 蛋白對有絲分裂是否有效應。他建構了帶有 UAS<sub>GAL</sub>-N80 的菌株，在培養基中加入少量 galactose 後 2 小時，能夠偵測到大量 N80 蛋白存在於細胞內，但再經過 2 小時之後，細胞中卻只剩下微量的 N80。孟宇想要延長 N80 誘導表現的時間，但因為實驗限制，他不能再增加 galactose 的使用量，因此感到非常困擾，剛好這時有一位 GAL 系統的專家 Hopper 教授來訪，Hopper 教授建議他可以把圖 1 中的一個蛋白的編碼基因剔除，或許可以增加表現時間，但依然能透過 galactose 的添加和洗除去調控 GAL 系統的開關。孟宇根據 Hopper 教授的建議，先以 PCR 將這個基因(我們暫以 X 基因代表，Gene X)選殖在質體上，得到質體 T789 (圖 2)，並將質體 T789 上 Gene X 的一部分編碼區移除，並在移除後的空位插入一個標識基因(marker gene)以做為後續實驗的辨識之用，此一重組後的新質體為質體 T790 (圖 3)。

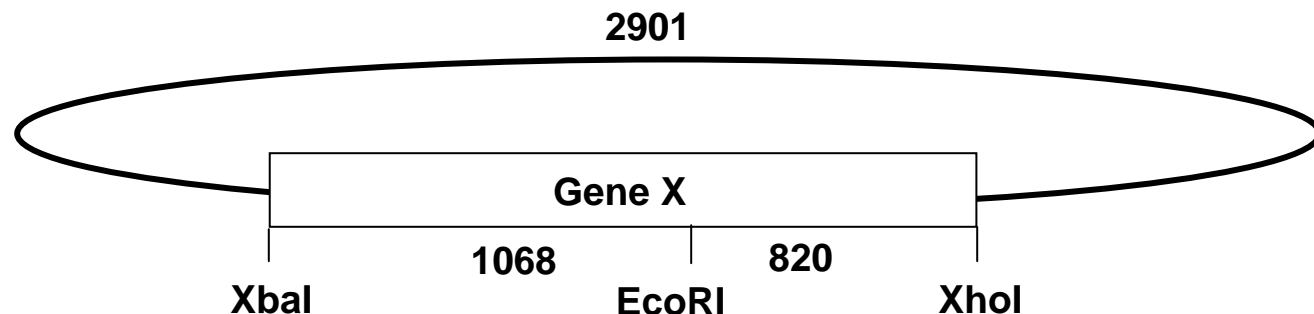


圖2. 質體T789相關限制酶切位及各切位間距離(單位：bp)

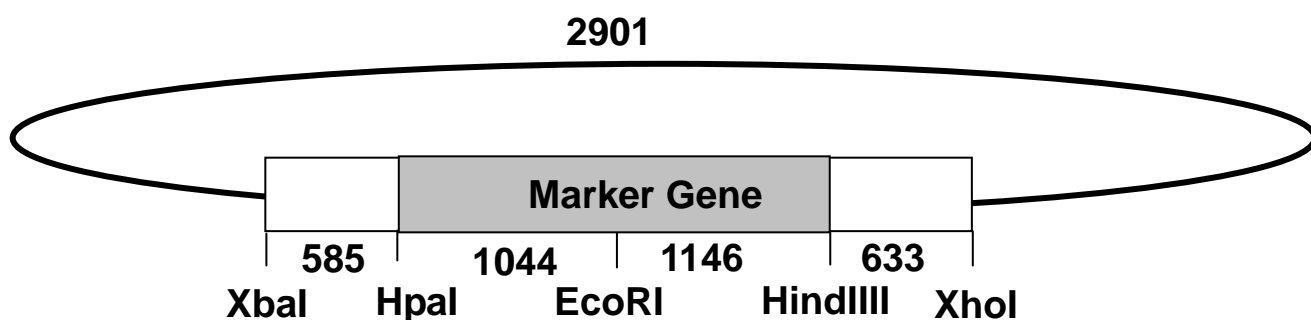


圖3. 質體T790相關限制酶切位及各切位間距離(單位：bp)

妳(你)的實驗任務就是利用限制酶切位檢測去辨識材料中的 3 管質體(A、B 和 C)，何者是質體 T789？何者是質體 T790？建議先進行實驗步驟，再用空檔回答問題

**Q1** 在孟宇原先的 GAL 系統中，N80 的蛋白的表現量從多到少的原因可能為何？ (8 分)

**Q2** 為了能透過 galactose 的添加和洗除去調控 GAL 系統的開關，又能延長添加 galactose 後引發 N80 基因表現的時間，Hopper 教授建議剔除的基因應該是哪一個？，為甚麼？ (8 分)

**實驗步驟：**

**Q3** 依據圖 2 和圖 3，計算同時以限制酶 EcoRI 和 XhoI 切割質體 T789 和質體 T790 後所得的所有片段大小分別是多少？ (4 分)

T789：

T790：

**Q4** 分別對質體 A、B 和 C 以限制酶 EcoRI 和 XhoI 同時切割。單一質體切割反應中，二種限制酶都各使用 4 unit，而實驗材料中的 EcoRI 和 XhoI 的濃度都是 2 unit /  $\mu\text{l}$ ，根據這些條件，在下表中填寫限制酶切割反應設計(對單一質體切割的配製量)，在進行限制酶反應時，反應混合液內應含 1X(倍)濃度的限制酶反應緩衝液。(4 分)

配製成分	質體 DNA	5X(倍)濃度限制酶反應緩衝液	無菌水	EcoRI	XhoI	總體積
使用量( $\mu\text{l}$ )	2					15

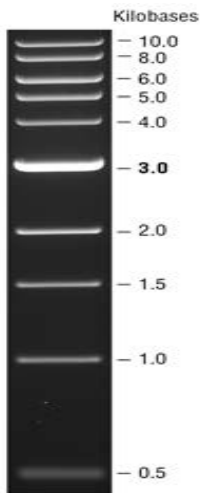
1. 依 Q4 的設計配製可供三個限制酶反應的混合液：取一空微量離心管，用馬克筆標記 A，按照無菌水、5X(倍)濃度反應緩衝液、限制酶 EcoRI 和 XhoI 的順序，用微量分注器各加入 Q4 表中的三倍量於此微量離心管，吸取不同溶液時，要用乾淨未用過的吸管尖，用微量分注器吸排混合。
2. 另取二個空的微量離心管，分別標記 B 和 C，用微量分注器將 A 管中的限制酶反應混合液各取 13  $\mu\text{l}$ ，分別加入 B 和 C 管。
3. 用微量分注器分別吸取 2  $\mu\text{l}$  的質體 A、質體 B 和質體 C 的 DNA，對應加入已有限制酶反應混合液的 A、B 和 C 管中，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。
4. 用迷你離心機將各管中混合液離心至管底部，離心時請注意平衡放置離心管於離心機中。
5. 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 40 分鐘(以計時器計時)，利用等待時間回答問題，或進行第 I 部分實作題。
6. 當 40 分鐘反應時間終了時，從水浴槽取回你的樣品。
7. 用微量分注器在各反應樣品中分別加入 3  $\mu\text{l}$  DNA 加注染料，以分注器吸排混合。

8. 用微量分注器，分別將已加有加注染料的反應樣品及 18  $\mu$ l 尺標 DNA，依照尺標 DNA、管 A、管 B、管 C 的順序，由左至右注入電泳膠片的樣品凹槽中。注意輕緩加入樣品，不要溢出槽外。
9. 舉手示意實驗助教，按照實驗助教指示設定連接電源，進行電泳 25 分鐘，請小心不要碰觸電極。
10. 開始電泳後，助教會提供標準電泳結果圖，將圖貼在 Q5 空白處，並依照此圖回答問題。
11. 待電泳結束後，關閉電源，小心取出完整膠片，放在標有編號的培養皿上，帶至膠片照相處，交給實驗助教後直接回自己的實驗桌，電泳結果會由評分老師給分。

### 實驗結果：

**Q5** 根據標準電泳結果圖和尺標 DNA 分離模式的標準圖(下左圖，單位：kb)，判定質體 A、B 和 C 分別是 T789 或是 T790，或者都不是。(6 分)

請將標準電泳結果圖黏貼於此↓



質體 A：

質體 B：

質體 C：

**Q6** 電泳結果由評分老師依據電泳膠片影像給分 (15 分)

**Q7** 如果想要讓 N80 不需以 galactose 引發，即可持續表現，則應該剔除哪個基因？(5 分)

考生編號\_\_\_\_\_

分數\_\_\_\_\_

## 2017 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

### 第 1 試場 實作 A

### 生物化學實驗

**注意：操作時間有限，請善用等待實驗作用的時間。**

※ 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：

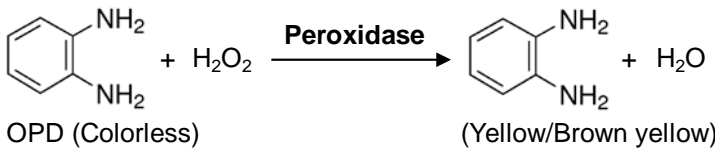
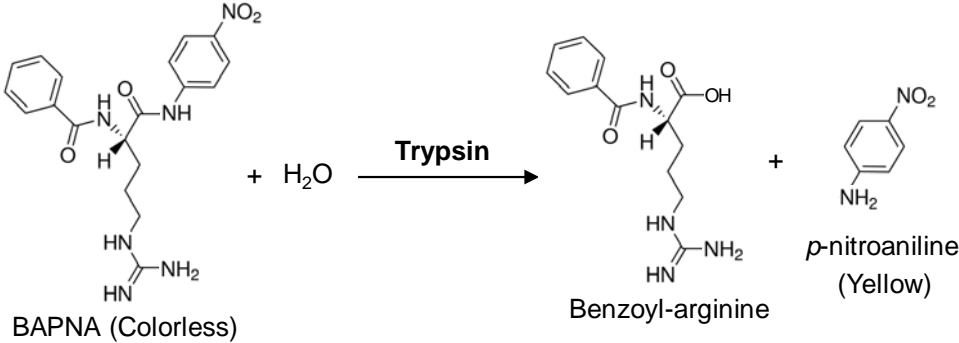
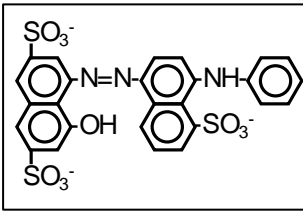
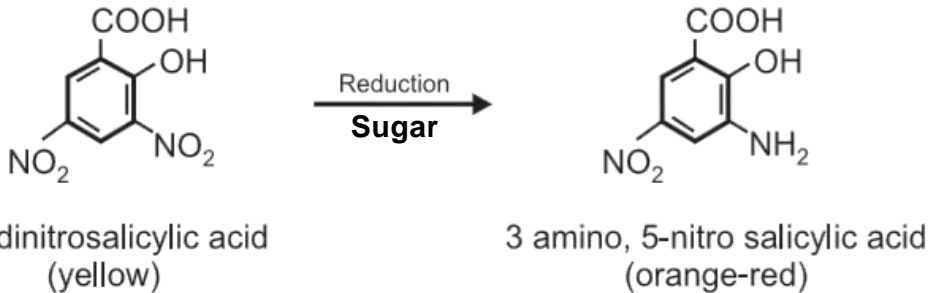
器材	數量	試劑與實驗材料	數量
微量分注器 P20 (與實作 B 共用)	1 支	Unknown X1	120 $\mu$ L
微量分注器 P200	1 支	Unknown X2	120 $\mu$ L
微量分注器 P1000	1 支	Unknown X3	120 $\mu$ L
微量吸管尖 20~200 $\mu$ L	一盒	Unknown X4	120 $\mu$ L
微量吸管尖 1000 $\mu$ L	一盒	Unknown X5	120 $\mu$ L
96 孔微量盤	1 個	Bradford dye	1.2 mL
1.5 mL 空的微量離心管	5 支	Benzoyl-arginine <i>p</i> -nitroanilide (BAPNA) in 50 mM Tris, pH 7.8	0.6 mL
微量離心管架	1 個	<i>o</i> -Phenylenediamine (OPD) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 50 mM MES, pH 6	0.6 mL
加熱板 (100°C，使用時請注意!!)	共用	Ammonium molybdate + Malachite green (MG)	1.2 mL
簽字筆	1 支	3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)	1.2 mL
廢液杯	1 個	2 N HCl	1.2 mL
計時器	1 個	H <sub>2</sub> O	1.2 mL
防爆夾	1 個		
浮盤(藍色)	1 個		
手套	1 雙		

※ 請注意：

1. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷(含封面、試題卷)共 4 頁，於交卷時全部繳回。
3. 本試場含實作 A 及實作 B，作答時間共為 90 分鐘
4. 請於本卷上作答。試題答案可寫在試卷背面，但請註明並標上題號。

## 一、實驗主題： 生物化學實驗

某助教不慎將擬進行生化實驗所需的五種酵素或藥品試劑弄混了，這些樣品不僅都尚未貼上標籤而且每個樣本的體積也都剛好是 60  $\mu\text{L}$ ，眼看著 30 分鐘之後就要開始進行實驗課了，該怎麼辦呢？不過他知道樣品有過氧化氫酶、胰蛋白酶、葡萄糖、BSA 和 PBS。請參照以下的實驗原理協助他進行樣品的身分鑑定。

樣本	反應式
過氧化氫酶 Peroxidase	 <p>OPD (Colorless) + <math>\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}}</math> (Yellow/Brown yellow) + <math>\text{H}_2\text{O}</math></p>
胰蛋白酶 Trypsin	 <p>BAPNA (Colorless) + <math>\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Trypsin}}</math> Benzoyl-arginine + <i>p</i>-nitroaniline (Yellow)</p>
BSA	 <p>BSA + (Bradford dye), 顏色會從茶色轉為藍色。 蛋白質濃度愈高，藍色愈深。</p>
PBS	$\text{P}_i + (\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \xrightarrow{\text{H}^+} \text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} + \text{HMG}^{2+} \xrightarrow{\text{H}^+} (\text{MG}^+)(\text{H}_2\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}) + 2\text{H}^+$ <p>(yellow) (malachite green) (yellow, <math>\lambda_{\text{max}}</math> 446 nm) (green, <math>\lambda_{\text{max}}</math> 640 nm)</p>
葡萄糖 Glucose	 <p>3,5-dinitrosalicylic acid (yellow) <math>\xrightarrow[\text{Sugar}]{\text{Reduction}}</math> 3 amino, 5-nitrosalicylic acid (orange-red)</p>



## 二、實驗操作：(10分)

以下的第1~4個實驗單元皆在96孔微量盤中進行，實驗的排列方式與實驗步驟如下：

### 1. 橫向第一行為過氧化氫酶活性分析

取各種未知樣本20  $\mu\text{L}$ 置入相對應的96孔微量盤中，之後再加入100  $\mu\text{L}$  OPD/  $\text{H}_2\text{O}_2$ 基質液，於室溫反應10分鐘，之後再加入10  $\mu\text{L}$ 的2 N HCl終止反應。

### 2. 橫向第二行為胰蛋白酶活性分析

取各種未知樣本20  $\mu\text{L}$ 置入相對應的96孔微量盤中，之後再加入100  $\mu\text{L}$  BAPNA基質液，於室溫反應10分鐘，之後再加入10  $\mu\text{L}$ 的2 N HCl終止反應。

### 3. 橫向第三行為Bradford dye binding蛋白質定量

取各種未知樣本20  $\mu\text{L}$ 置入相對應的96孔微量盤中，之後再加入200  $\mu\text{L}$  Bradford呈色劑。

### 4. 橫向第四行為Malachite green phosphate assay

取各種未知樣本20  $\mu\text{L}$ 置入相對應的96孔微量盤中，之後再加入200  $\mu\text{L}$  Ammonium molybdate/Malachite green呈色劑。

以下的第5個實驗單元先在微量離心管中進行，實驗完成後再從離心管中取出200  $\mu\text{L}$ 的樣本至96孔微量盤之橫向第五行的相對位置中。

### 5. Reduction sugar assay 還原糖定量

取各種未知樣本20  $\mu\text{L}$ 置入微量離心管中，之後再加入200  $\mu\text{L}$  DNS反應液，於100°C加熱五分鐘。反應完成後請將微量離心管移至室溫冷卻3分鐘，接著再加入200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ 於各微量離心管中，混合均勻後，各管取出200  $\mu\text{L}$ 置入96孔微量盤之橫向第五行的相對位置中。

三、實驗結果與問題回答：實驗皆完成且成功始得計分，無實驗結果可用以推論或佐證未知樣本之身分時，亦不予計分。

1. 請按照你的96孔微量盤中之呈色，將實驗結果填入以下之96孔微量盤的空格中，黃色請標示Y，深藍色請標示B，深綠色請標示G，橘紅色請標示R，其餘顏色請不用標示。(20分)

	X1	X2	X3	X4	X5
OPD					
BAPNA					
Bradford					
Malachite					
DNS					

2. 請寫出未知樣本之身分 (10分)

未知樣本	真實身分
X1	
X2	
X3	
X4	
X5	

3. 若以蔗糖來進行第5個實驗單元，反應後之顏色為何？並且其原因為何？(6分)

4. 胰蛋白酶可以水解BAPNA的原因為何？(4分)