

第十三屆國際生物奧林匹亞競賽

里加 拉拖維亞

July 7-13, 2002

實驗部分

實驗三：分子生物學

本實作測驗時間為 60 分鐘：佔 40 分

工作目標：利用洋菜凝膠電泳分離質體 pX 的 DNA 片段，並建構出質體 pX 的限制酶圖譜（與圖）

對於嚴格遵守實驗室安全操作手則，以及能精確地把樣本放入凝膠的同學，助教將給予 5 分：

A-於整個實驗進行過程中，穿戴實驗手套—1 分

B-使用電源供應器前，先徵詢助教，以及正確地使用紫外線照明燈—1 分

C-正確地使用微量滴管—1 分

D-把全部數量的樣本，放入電泳膠孔槽中—1 分

E-不要損壞電泳凝膠—1 分

注意：每三～四位同學使用一台電源供應器，每二位同學使用一台紫外線照射燈

請於整個實驗進行過程中，穿戴實驗手套

助教有管理電源供應器的優先權

實驗技術解說：

原理

電泳是一種被廣泛使用的分析方法，可根據分子的電荷、分子量及體積，分離不同的分子。電泳分離最常進行於凝膠中，在凝膠中有相似電荷的分子，可根據其分子量及體積予以分離，用以形成凝膠的物質，被溶解於緩衝液溶液中

質體 DNA 圖譜的製作

質體是環狀，位於染體外的雙股 DNA 分子，在多種不同的細菌中均可發現，限制酶是一群核酸切割酵素，可於特定的部位切割 DNA 分子【特定的 4~6 個核苷酸（鹼基對）】，例如稱為 HaeIII 的限制酶，會於 GGCC 的序列處切割雙股 DNA，但稱為 EcoRI 的限制酶，則會於 GAATTC 序列處切割雙股 DNA。

質體 DNA 圖譜的製作，是標定出質體 DNA 分子上各限制酶切割位的相對位置，為達成此項目的，我們必需決定出，利用不同的限制酶所切割出的 DNA 片段的長度，質體分子可被一種或同時被多種限制酶所切割，被切割出來的 DNA 片段，會於電泳的過程中移動並形成多條集中的帶，利用特殊的染料對電泳凝膠進行染色後，便可在凝膠上觀察這些由 DNA 片段所形成的色帶。電泳過程中，DNA 片段在凝膠中移動的距離（自電泳開始時的位置算起，一直到帶的前緣，以公分為單位），與 DNA 片段的鹼基對長度呈現對數的反比關係。洋菜凝膠是最常用於製作電泳凝膠的物質之一，洋菜凝膠中的孔洞，足以分離分子量大於 100000（道耳頓）(Da)。

實驗設備

洋菜凝膠電泳槽

【(圖 1) 4】包括兩個電極，分別為陽極 (5) 及陰極 (6)，於電泳進行前，凝膠被放置於緩衝溶液中 (7)，包括需要被分析的樣本混合物裝填入凝膠孔槽中 (1)，凝膠孔槽是於凝膠載槽 (3) 上製備凝膠時 (2)，用孔槽梳 (comb) 所製造而成，電泳槽蓋上蓋子後 (8)，再連接到電源供應器上。

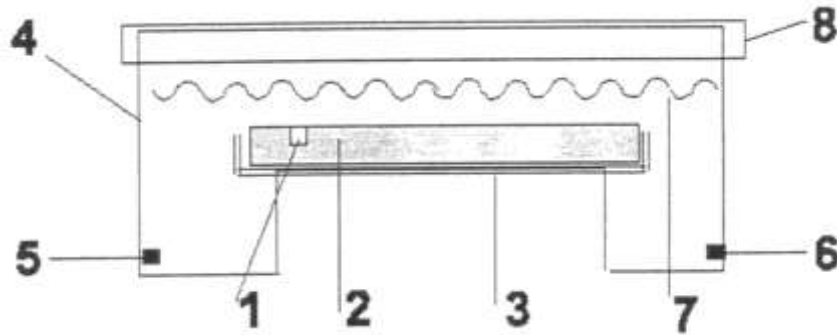


圖 1 電泳槽及一塊電泳凝膠

可調整體積的微量滴管，用於液體試劑的操作 (圖 2)

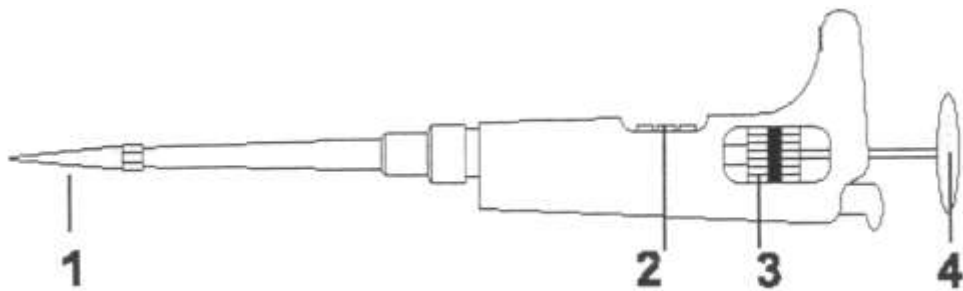


圖 2 可調整體積的微量滴管

微量滴管的使用：

1. 經由轉動調節輪 (3) 控制所選取的量 (2)！本實驗中你需要取用 $5\mu\text{l}$ 和 $10\mu\text{l}$ 的量。

圖 3 為取用 $5\mu\text{l}$ 和 $10\mu\text{l}$ 時面板的正確顯示。



圖 3 吸取 5ml 和 10ml 時微量吸管控制面板的正確顯示

2. 將黃色微量吸頭放在微量吸管前，請不要在未放 tip 之前沾取液體。
3. 將按鈕輕壓到第 1 階段，吸頭浸入液體 (樣本)。(圖 4A)
4. 慢慢放開按鈕吸取適量標本。(圖 4B)
5. 將吸頭處的液體帶入目標處 (其它液體或洋菜膠片的凹槽中)，然後壓下按鈕，將液體全部釋出。(圖 4C)

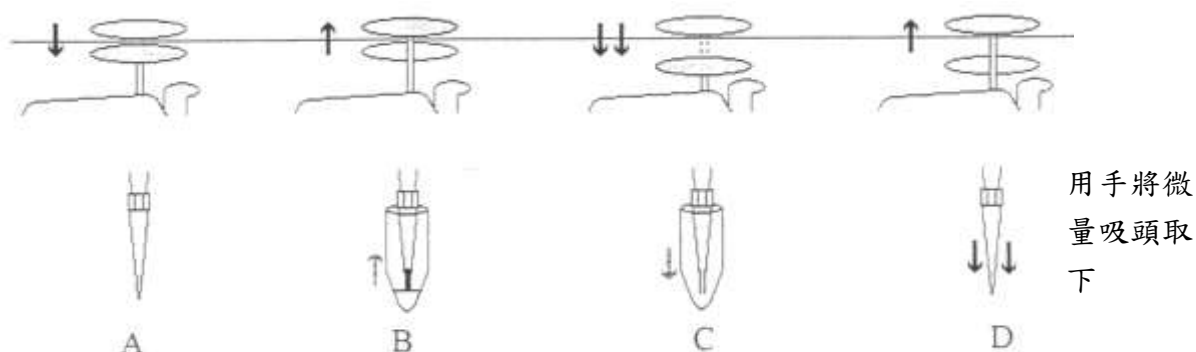


圖 4 取用液體的步驟

6. 取下微量吸管的吸頭 (用手) (圖 4D)，並將用過的微量吸頭丟置到垃圾桶。每一個液體或取樣時用一個新的微量吸頭！
在真正取用 DNA 樣本前，你可以試用 1 個微量吸頭吸取杯中的緩衝液，作數次的練習。

試劑和材料

1. 製備好的 0.8% 洋菜凝膠，放置於 0.5 X TAE 緩衝液中
2. 電泳裝置，內含 0.5 X TAE 緩衝液 (20mM Tris-醋酸, 0.5mM EDTA, pH=8.0)
3. 2 X GLB-gel loading 緩衝液，內含 0.05% bromophenol blue 於 10% 甘油。
4. St-DNA 長度標準液，事先已和 loading buffer 混合均勻 (以下有更詳盡說明)
5. B+C 和 B+D-質體 pXDNA5 μ l，分別被限制酶 B+C 和 B+D 處理 (詳細說明見 Q2 的說明)

DNA 樣本已加入 1:10000 比例的螢光染料 (Vistra Green)

所有使用的質體 pX 的長度為 4360 個鹽基對。

實驗（第一階段）

樣品裝填

1. （如圖 5）在膠片的 No. 2 和 No. 5 兩孔槽中各裝填 $10\mu\text{l}$ 的 DNA 長度標準液（St）
2. 在每個切過的質體 DNA 樣本中加入 $5\mu\text{l}$ 的 $2\times\text{GLB}$ （B+C 及 B+D），並將混合液（ $10\mu\text{l}$ ）裝填到膠片上（分別在 No. 3 槽中填入 B+D；在 No. 4 槽中填入 B+D）。
3. 將電泳組合的蓋子關上，舉手告訴助理人員

不要自行操控電源開關

讓樣本跑 20 分鐘，注意時間，否則你將失去 DNA 片段，利用這段時間來回答下列問題。

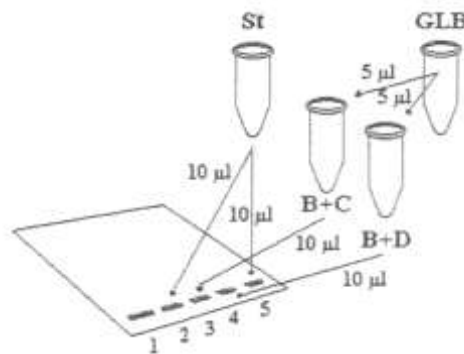


圖 5 樣本裝填

問題（第一組，在跑電泳的時間時回答）

問題 1. 吾人知道當電泳緩衝液是 pH8.0 時，DNA 分子會由陰極向陽極移動。

在答案紙 Q1 處選擇正確的答案。

—DNA 分子具有何種電性？

- A. 負電性
- B. 中性
- C. 正電性
- D. 不能決定

在提到過的各種組成成份中，什麼是決定 DNA 分子電荷最主要的因子：

- E. 嘌呤
- F. 嘧啶
- G. 去氧核糖
- H. 磷酸基
- I. DNA 二股之間的氫鍵
- J. 以上皆非

（2 分）

問題 2. DNA 片段大小的計算

給予的參考資料：

1. 電泳凝膠的照片顯示，質體 pX 利用限制酶 A，B，C，D 切割後，利用電泳分離所得的 DNA 片段（圖 6）
2. 質體 pX 的大小為 4360 個鹽基對，每一種限制酶只對質體 pX 的 DNA 序列的一個特定部位進行一次切割。
3. 限制酶 A 的切割位置被當作此質體限制酶圖譜的起始點。
4. 限制酶 A 及限制酶 B 的混合切割作用中，DNA 被切割成兩個片段，較短的 DNA 片段為 380 個鹽基對。
5. DNA 大小標準（圖 6 中的 Lane 1），其 DNA 片段的大小分別為：
3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100（鹽基對）相對於鄰近的色帶，500 個鹽基對的色帶較寬，顏色也較深。較短的 DNA 色帶（少於 500 個鹽基對），可能會顏色太淺甚至自凝膠上漏失。

估計

Q2A. 圖 6 中，Lane 1 以羅馬數字 (I 到 VI) 標示的 DNA 長度標準，其大小分別為多少鹽基對 (bp)？將答案分別填入答案卷的表 Q2A 適當的格子 (I - VI) 中。
(3 分)

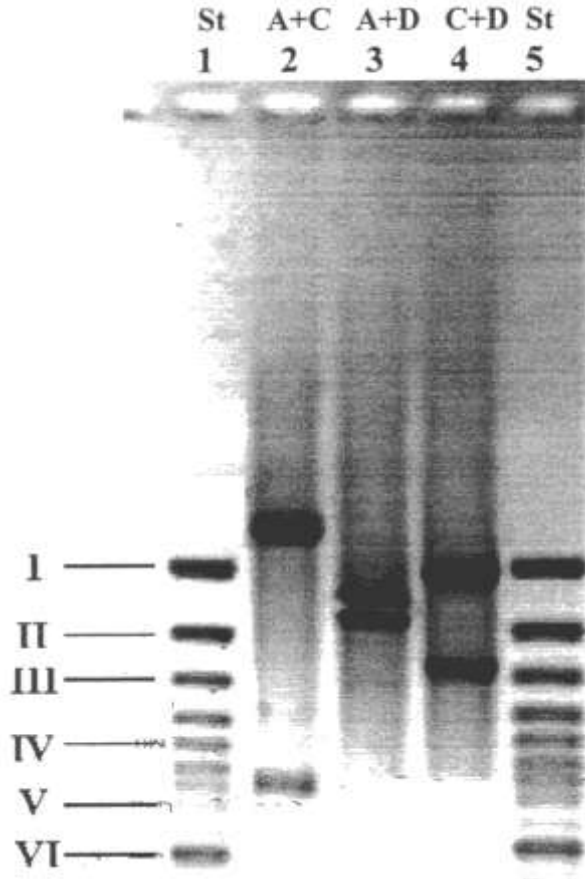


圖 6 pX 質體的切割片段的電泳分離
各 Lane 的數字標示在膠片下，孔槽
部分可見於上方

Lane1 DNA 片段長度標準

Lane2 以酵素 A+C 切過的 pX 質體

Lane3 以酵素 A+D 切過的 pX 質體

Lane4 以酵素 C+D 切過的 pX 質體

Lane5 DNA 片段長度標準

Q2B. 利用答案卷 Q2B 上的座標作圖，標示出在圖 6 中 DNA 長度標準，各羅馬數字代表的片段所移動的距離 (以 cm 為單位)，以及你在 Q2A 中所得到的 DNA 片段長度 (bp)，要利用所得到各點的數值來作圖。

X 軸：代表由孔槽到色帶前 (遠) 端的距離 (cm)；Y 軸：代表 DNA 片段的長度 (bp)

Q2C. 利用 Q2B 所得到的座標圖來決定在圖 6 中的 Lane2, 3 及 4 代表 DNA 片段的長度 (bp)，將答案填入答案卷表 Q2C 的第 2, 3, 及 4 欄中分別代表電泳膠體的 2, 3 及 4 條 Lane。

(容許有準確值 $\pm 10\%$ 的準確率)

(6 分)

Q2D. 在樣品 A+C (圖 6, Lane 2) 中, 在與膠片裝填緩衝液混合後, 其濃度為 $150\text{ng}/\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$ 的樣本被放入凝膠中。

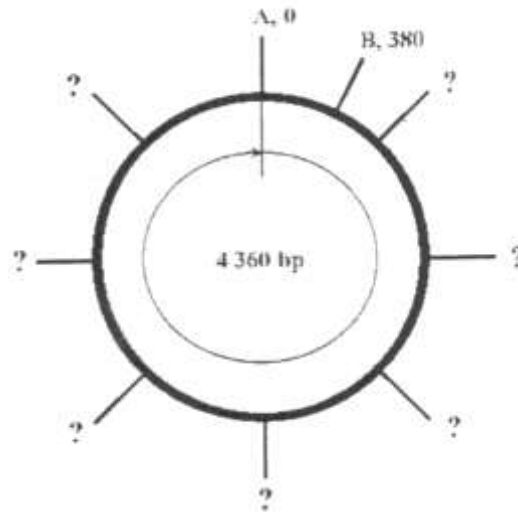
多少數量的 DNA (以 ng 為單位表示) 被放入凝膠中? 把答案填寫在答案紙表 Q2D 的欄 1 中。

多少數量的 DNA (以 ng 為單位) 包含於 lane 2 的兩條色帶中, 【圖 6 (A+C)】 (假設所有載入的 DNA 片段均分佈於兩條色帶間)? 把答案填寫於欄 2 (最大的 DNA 片段的色帶), 以及欄 3 (最小的 DNA 片段色帶)

上述的欄 1 及欄 2 位於答案紙中問題 2D 的表中。

(6 分)

如果在電泳跑完之前, 你仍有時間, 你可以開始考慮在質體圖 (圖 7) 中, 限制酶 C 及 D 切割的可能位置, 利用從 Q2C 所得的結果。



圖七

實驗（第二階段）

電泳開始 20 分鐘之後，助理人員會切掉你的電泳槽的電源，提醒實驗助理人員，有關電泳實驗的時間（不要感到不好意思）

所以：

1. 把電泳凝膠及凝膠載盤集中於一個托盤中，然後帶到紫外線照明燈處，所使用的紫外線照明燈的編號已標示在你的工作區中。
2. 打開紫外線照明燈的保護蓋。
3. 把電泳凝膠放置於紫外線照明燈上。
4. 關上照明燈的保護蓋，並開啟紫外燈。

注意：當保護蓋打開時，不可開啟紫外線燈。

注意：當紫外線燈處於開啟狀態時，不可以打開保護蓋。

5. 觀察 DNA 帶的影像，並把 DNA 帶的圖像繪於第三題答案紙所附的圖表紙上，在你所繪的圖中的 DNA 色帶，必需與你的凝膠中 DNA 標準的色帶，呈現精確的相對位置。

（4 分）

6. 關閉紫外線燈，把電泳凝膠及載盤一併留置於紫外線照明燈上。
7. 用紙巾清潔雙手，繼續準備作答。

問題（第二組問題，請於記錄凝膠上的 DNA 片段後，再進行作答）

Q4A. 決定出切割出來的 DNA 片段的大概長度，把樣本的色帶與 DNA 大小標準的色帶相互比較，把答案填寫於答案表 Q4A 處，欄 3 和欄 4 分別對應於 Lane 3 和 Lane 4。（可接受的精確度為 $\pm 20\%$ ）

（4 分）

Q4B. 同時考慮圖 6 中所描過的凝膠分析，以及你自己凝膠所得的數據，在質體圖譜（答案紙中的 Q4B）標示出限制酶 C 和 D 大概的切割位，利用 [C, D] 分別代表限制酶 C 及 D，並填寫入合適的空格中。

（6 分）