

Country: 國家



實作測驗一：分子生物學

第一題 酵素活性的測試 時間 45 分鐘

第二題 利用層析法及電泳法進行蛋白質分離 時間 45 分鐘

45 分鐘後，將更換題目

選手必須按照指示更換題目

選手在測驗過程中不能互相討論也不能交換實驗材料

選手不能提前作答下一題

以下為第一題的提示

## 提示

選手必須於作答前詳閱題目內容

建議選手按照題目的配分分配作答時間

## 重要事項

所有的答案都必須寫在答案紙上

確認你三位數字的選手編號已劃記在答案紙上

使用所提供的鉛筆在答案卡上劃記圓圈

## 試題一

## 酵素活性之測定

## 指引

酒精去氫酶(ADH)可藉由下列反應，將酒精氧化為乙醛。



此反應中  $\text{NAD}^+$  是重要的輔酶，此項反應速率可經由計算在波長 340nm 中  $\text{NADH}$  的濃度變化推定出來。本測驗中你必須使用光度計來測定不同濃度酒精中此酵素之活性。

下列實驗材料及反應試劑將由大會提供

化學試劑

酒精溶液：0.5M, 0.25M, 0.125M, 0.063M

緩衝劑 2mM NAD<sup>+</sup> in 80mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 40mM KCl

酵素: 0.04 mg/ml alcohol dehydrogenase solution 酒精去氫酶溶液

裝置

- 光度計已設定在 340 nm 波長
- 可調式微量滴管及 tip: 1000 $\mu$ L, 100 $\mu$ L and 20 $\mu$ L, plus tips
- 收集 tip 的黃色廢物桶
- 1ml 塑膠測試瓶
- 白色的攪拌塑膠條
- 計時器
- 油性筆
- 安全眼鏡
- 拋棄式手套
- 方格紙
- 尺
- 黑色筆
- 粉紅色紙卡用來招喚現場評分者的注意
- 答案卷、鉛筆及橡皮擦

實驗步驟

在 1mL 的測試瓶中按照下表分別加入各項物質並注意要重複做此項實驗

Reaction No.	Reaction Buffer	Ethanol solution
1a	0.9 mL	0.1ml of 0.063M
1b	0.9 mL	0.1ml of 0.063M
2a	0.9 mL	0.1ml of 0.125M
2b	0.9 mL	0.1ml of 0.125M
3a	0.9 mL	0.1ml of 0.250M
3b	0.9 mL	0.1ml of 0.250M
4a	0.9 mL	0.1ml of 0.500M
4b	0.9 mL	0.1ml of 0.500M

每位參賽者將被提供一台光度計，有兩種型號的光度計，但使用結果會相同，且都已設定在

### 340 nm 的波長

請根據下列步驟進行酵素活性的測試  
若你是使用 Hitachi U-1100 型的光度計

- 將裝了反應混合物的測試瓶置放於位置 1 的測試孔中
- 關上蓋板

先將吸光值調整為零，按下標示為 100%T/0 ABS 的按鈕(有紅點標記)，此時吸光值顯示是 0.000.

若你是用 Hitachi U-1800 型號的光度計

- 將裝了反應混合物的測試瓶置放於位置 1 的測試孔中
- 蓋上蓋板

先將吸光值調整為零，按下“AUTO ZERO”的按鈕(有紅點的標誌)，此時吸光值顯示是 0.000.

由反應 1a 開始依次進行酵素活性的測量

- (a) 將裝了反應混合物的測試瓶置放於光度計中，
- (b) 接著在光度計內的測試管中加入 10  $\mu\text{L}$ “酵素”
- (c) 接著利用白色的攪拌塑膠條快速但輕輕的攪拌，關上蓋板，將吸光值調整為零，並馬上

### 啟動計時器

- (d) 一分鐘後(計時要準確)紀錄吸光值，此時(T)等於一分鐘時的吸光值，此數值即為酵素反應速率(標記為“V”)，代表於波長 340nm 下經過一分鐘反應之吸光值( $\Delta A_{340}/\text{min}$ )，將數值填入實驗紀錄紙的表格中

### 數據分析和解釋

重複再做一次，計算兩次數值的平均值(Average  $\Delta A_{340}/\text{min}$ )填入實驗紀錄紙的表格中，接著再將上述實驗數值填入方格紙中，換算為  $1/V$  值後，再填入紀錄表中。 $1/S$  的數值已列於實驗紀錄紙中(單位為  $\text{mM}^{-1}$ )，其中 S 代表受質(酒精)的濃度( $\text{mM}$ )，例如反應 4a 及 4b 中的實際酒精濃度為 50  $\text{mM}$ ，則  $1/S = 0.02 \text{ mM}^{-1}$

	Column 1	Column 2
Reaction No.	V $A_{340}/\text{min}$	V (Average $\Delta A_{340}/\text{min}$ )
1a		
1b		
2a		
2b		

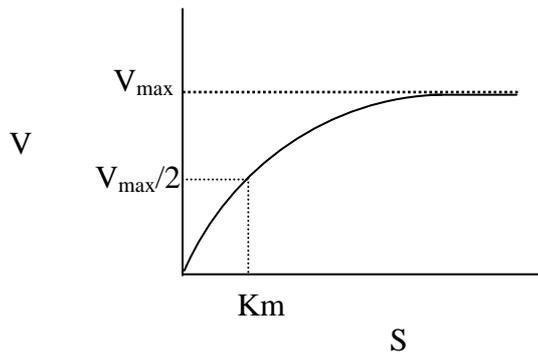
Data for plotting graph	
$1/V$	$1/S$ ( $\text{mM}^{-1}$ )
	0.160
	0.080

3a		
3b		
4a		
4b		

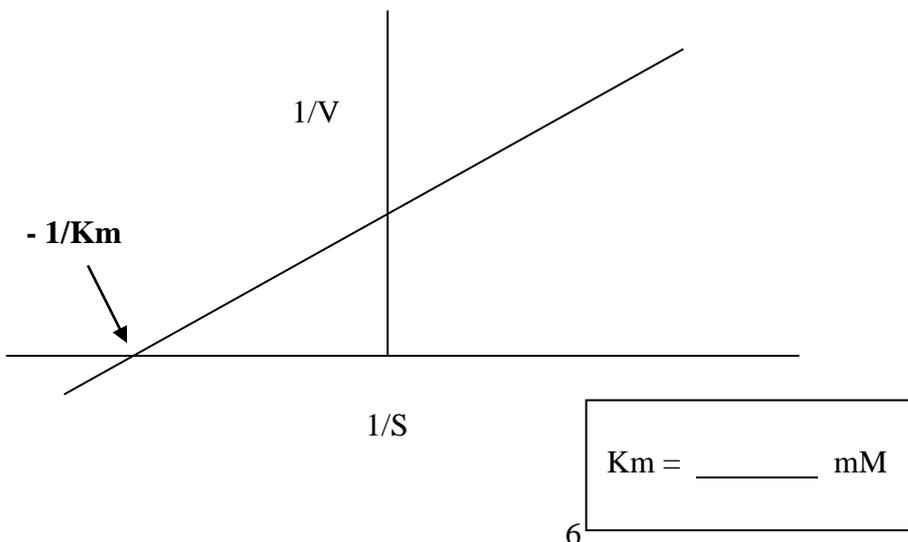
	0.040
	0.020

注意：要將此數值填入另一張答案紙中(Tasks P1.T1.1 – P1.T1.4)

將你實驗結果的數值以下述方式填寫在方格紙中，縱軸為酵素反應速率(V)，橫軸為受質的濃度(S)，你將會有一張如下的圖表，圖表中顯示出隨著受質濃度的增加，反應速率也會增加，直到達到最大反應速率為止( $V_{max}$ )，藉由此圖也可計算出  $K_m$  值，代表達到最大反應速率一半( $V_{max}/2$ )時受質的濃度



另一個更精確計算  $K_m$  值的方法，是畫出  $1/V$  與  $1/S$  的相對值，此線段與 X 軸相交處為  $-1/K_m$  根據此圖求出  $K_m$  值。



重複檢查你所求出的  $K_m$  值和單位，並舉起粉紅卡召喚現場評分者，他會將你的答案紀錄答案紙上(Task P1.T1.5) (6分)。

現場評分者將會提供另一張有  $1/V$  及  $1/S$  的數值圖，請根據提供的圖回答下列問題

酒精去氫酶測定法，可用來測定汽車燃料中的酒精含量。假設你是一位科學家在得到 10 mL 的原始燃料樣本後要測定其中所添加的酒精濃度，在移除其他的物質後，你得到了一瓶只含有酒精的溶液 100 mL。若使用先前所做過的光度計計算法測 0.1 mL 的樣本，得出酵素反應速率為 0.175，現場評分者所提供的數值圖，是使用不同濃度但體積相同的標準酒精溶液 (0.1 mL) 所測得的數值。請據以算出原始燃料樣本中酒精的莫耳濃度。

將答案填寫於答案紙(Task P1.T1.6)中

常用來表示原始燃料樣本中酒精濃度的方式是 a % (分子量百分比) 即 100mL 中所含酒精克數(g/100mL)，酒精的化學式為  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  各元素的原子量分別是 C = 12, H = 1, O = 16.

將答案填寫於答案紙(Task P1.T1.7)中

下圖為  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADH}$  的吸收光譜

下列(1-7)中的敘述哪些正確？答案選項在下一頁

1. 吸收高峰值在 340 nm
2. 只有  $\text{NAD}^+$  在 340 nm 波長吸光
3. (只有  $\text{NADH}$  在 340 nm 波長吸光)
4. ( $\text{NAD}^+$  可分別在 260 nm 和 340 nm 波長吸光)
5. ( $\text{NADH}$  可分別在 260 nm 和 340 nm 波長吸光)
6. 假如將光度計改設為 330 nm 則得出的酵素反應速率將會下降
7. 假如將光度計改設為 350 nm 則得出的酵素反應速率將會升高

下列哪一組是正確的組合

- A) 1, 2, 4, 6
- B) 1, 2, 5, 7
- C) 1, 3, 5, 6
- D) 1, 2, 5, 6
- E) 1, 3, 4, 7
- F) 2, 4, 5, 6
- G) 1, 2, 4, 7
- H) none of the above
- I) all of the above

將答案填寫於答案紙(Task P1.T1.8)

第一題結束

請將答案紙放在你的工作桌上所有紙張的最上面

1

Country: 國家



實作測驗一：分子生物學

實驗時間為兩個 45 分鐘

第一題 酵素活性的測試 時間 45 分鐘

第二題 利用層析法及電泳法進行蛋白質分離 時間 45 分鐘

45 分鐘後，將更換題目

選手必須按照指示更換題目

選手在測驗過程中不能互相討論也不能交換實驗材料

選手必須接受指示後才能作答

以下為第二題的提示

### 提示

選手必須於作答前詳閱題目內容。

建議選手按照題目的配分來分配作答的時間

### 重要事項

所有的答案都必須寫在答案紙上

確認你三位數字的選手編號已劃記在答案紙上

使用所提供的鉛筆在答案卡上劃記圓圈

### 第二題

利用層析法及電泳法進行蛋白質分離

重要事項：本題包含兩部分

作答前請先閱讀 A 部分再進行時間分配

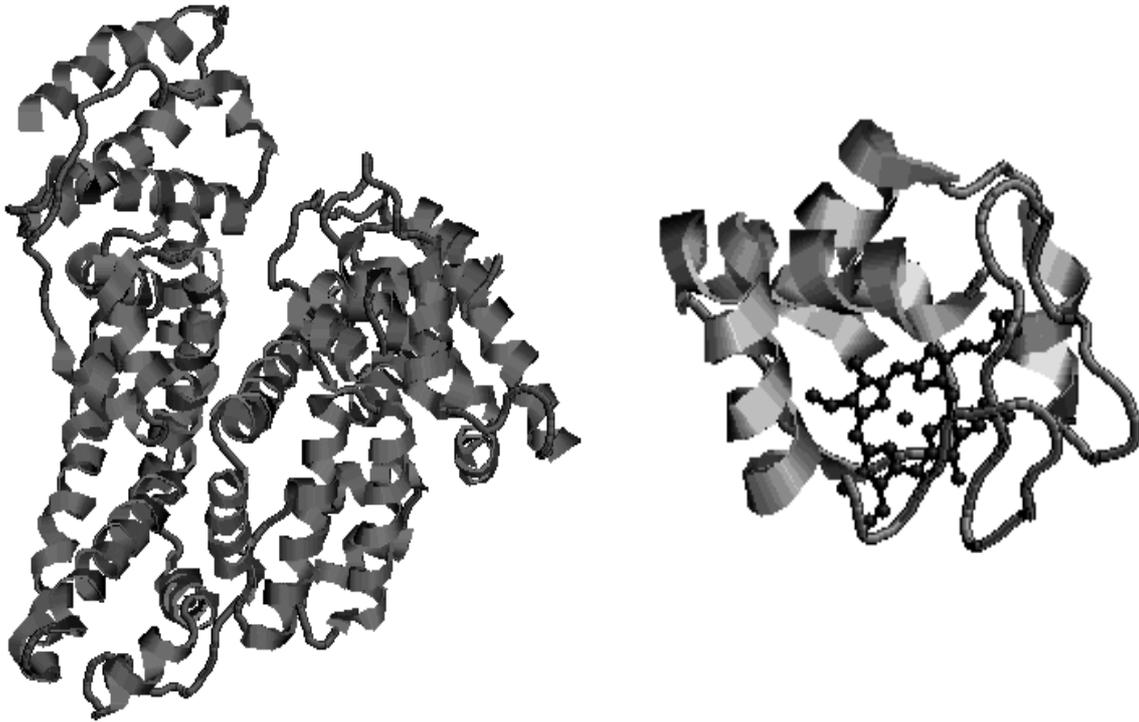
### A 部分

#### 離子交換層析法

#### 指示

**離子交換層析法**為利用蛋白質電荷特性進行蛋白質分離的一種實驗技術，此技術主要利用蛋白質在酸鹼度不同的溶液中會帶有不同電性的特性，再藉由層析柱進行分離，由於蛋白質所帶的淨電荷和 pH 值有關，因此只有在 pH 值為 8.0 的陽離子交換柱中才能進行蛋白質分離，例如“SP”的層析柱帶有負電荷因此可結合帶正電荷的蛋白質，在溶液中與蛋白質有相同電荷的離子，會與蛋白質競爭與層析柱的結合，因此透過調整離子的濃度可使得與層析柱結合的蛋白質被沖洗出來。

本實驗中將分析兩種蛋白質樣本，分別為白蛋白及細胞色素 C，白蛋白為血漿中主要的蛋白質其分子量為 68,000 道爾頓，包含一條胺基酸鏈。細胞色素 C 是在粒線體中的電子傳遞物質，它包含一條胺基酸鏈與一個含鐵的血基質，他可吸收波長 410 nm 的可見光，其分子量為 12,400 道爾頓，下圖為這兩種蛋白質的結構圖：白蛋白(左邊)細胞色素 C(右邊)



本實作單元中你將使用離子交換層析法分離白蛋白及細胞色素 C

下列實驗材料及反應試劑將由大會提供  
化學試劑

蛋白質樣本：4 mg/mL 白蛋白和 4 mg/ mL 細胞色素 C

緩衝液 1: 50mM Tris-HCl, pH 8.0 buffer.

緩衝液 2: 50mM Tris-HCl, pH 8.0 buffer containing 0.5M NaCl

蛋白質濃度測定試劑

## 裝置

- 陽離子交換層析柱
- 固定層析柱的鐵夾子
- 兩支可拋棄式 5 mL 針筒分別標示為“緩衝液 1”及“緩衝液 2”
- 1 支可拋棄式 1 mL 針筒標示為“蛋白質樣本”
- 可調式微量滴管及tip
- 收集tip的黃色廢物桶
- 96 孔細胞培養皿
- 塑膠燒杯(標示為廢液)
- 安全眼鏡
- 拋棄式手套
- 油性筆
- 藍色紙卡用來招喚現場評分者的注意
- 答案卷、鉛筆及橡皮擦

## 實驗流程

1. 請於細胞培養皿上貼膠帶之處標上實驗桌號碼和你的選手編號。(例如：你的桌號為 5，選手編號為 14-3 時，於培養皿上標示 5/14-3)
2. 離子交換層析柱已預先利用緩衝液 1 進行緩衝處理

3. 在標示為緩衝液 1 之針筒內加入 5mL 的“緩衝液 1”
4. 移除位於層析管底部輸出端的黑色蓋子
5. 將針管輕輕推入位於層析管頂端的黑色連接器中
  
6. 利用針筒由頂端加入 1mL 的緩衝液，將廢液收集至塑膠廢棄瓶中
7. 將 0.2mL 的蛋白質樣本加入 1mL 的針筒中  
將針筒中的蛋白質樣本慢慢的加入層析柱，並開始收集滴出的液體，於培養皿中的 A 排 (Row A) 在每個孔中分別收集四滴液體
8. 當注入所有蛋白質樣本後，更換另一支載有緩衝液 1 針筒
  
9. 繼續於 A 排中收集滴出的液體，在每個孔中分別收集四滴液體
  
10. 當 A 排收集完成後(包含了樣本 1~12)，將黑色蓋子重新放回層析柱底部的輸出端，  
並將頂端的針管移除
  
11. 將緩衝液 2 裝入新的 5mL 針筒中，
12. 將新針筒接上層析柱，並打開層析柱輸出端的蓋子，繼續收集滴出的液體，於培養皿  
中的 C 排 (Row C) 在每個孔中分別收集四滴液體
13. 當 C 排收集完成後(包含了樣本 13~24)，將黑色蓋子重新放回層析柱底部的輸出端
14. 使用可調式微量滴管，將 A 排中的樣本 1~12 轉移至 B 排對應的孔中
15. 同樣的，使用可調式微量滴管，將 C 排中的樣本 13~24 轉移至 D 排對應的孔中
16. 使用可調式微量滴管於 B 排及 D 排每一個孔中，分別加入 200 $\mu$ L 蛋白質濃度測定試劑，此試劑會與蛋白質作用變成藍色，可經由波長設定為 595 nm 的光度計中進行測量
17. 請小心檢查並移除孔中樣本的氣泡(可利用黃色的滴管尖 tip 小心剔除氣泡)
18. 舉起藍色卡紙召喚現場評分者

告知評分者你的樣本可進行下一步的光度計分析，評分者會將你的樣本分析後之結果列印一份交給你

**重要事項：在等待結果的同時，作答 B 部分的題目**

問題

將答案填入答案卷中

Q1. 樣本 1-24 中哪一個包含第一個 A<sub>595</sub> 的高峰值

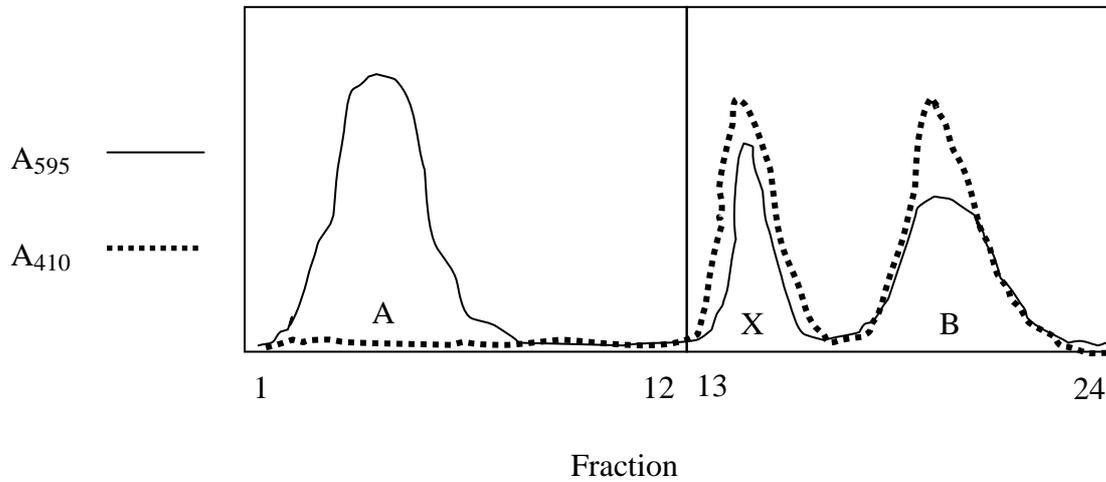
- Q2. 樣本 1-24 中哪一個包含第二個  $A_{595}$  的高峰值
- Q3. 樣本 1-24 中哪一個包含  $A_{410}$  的高峰值
- Q4. 將答案 2.2 的值減去答案 2.1 的值，將所得之數值填寫於答案中
- Q5. 樣本 1-24 中哪一個是細胞色素 c 的高峰值
- Q6. I 在你的實驗中可觀察到其中一種蛋白質會直接通過層析柱，而另一種蛋白質需在緩衝液中增加離子濃度後，方可自層析柱中移出。請參閱下列敘述，判斷哪些正確？
1. 在第二種蛋白質的移出過程中，鹽分可中和蛋白質及層析柱間的離子交互作用
  2. 第一種蛋白質較第二種蛋白質帶有較多的正電荷
  3. 第一種蛋白質較第二種蛋白質帶有較多的負正電荷
  4. 第一種蛋白質因體積較大故最先被移出
  5. 第一種蛋白質因體積較小故最先被移出

下列何者為正確敘述的組合？

- A. 1, 2
- B. 1, 3
- C. 2, 3, 4
- D. 1, 3, 4
- E. 2, 3, 4
- F. 1, 3, 5
- G. 2, 3, 5

將答案填入答案卷中

Q7. 假設你在另一個實驗中的蛋白質樣本含有第三種蛋白質 X，其他兩種蛋白質同樣為白蛋白和細胞色素 C，你重複前述的蛋白質分離及分析工作，得出如下圖的實驗結果，蛋白質 X 的高峰值以 X 標示，其他兩種蛋白質分別以 A 及 B 表示，請據此回答下列問題：



下列哪些敘述可正確解釋實驗的結果

- (a) 蛋白質 X 較蛋白質 B 帶有較少的正電荷
- (b) 蛋白質 X 較蛋白質 B 帶有較多的正電荷
- (c) 蛋白質 X 含有一個非多肽鏈的成分
- (d) 蛋白質 X 是 100% 的多肽鏈
- (e) 蛋白質 X 比蛋白質 A 體積大故較慢被移出
- (f) 蛋白質 X 比蛋白質 A 體積小故較慢被移出

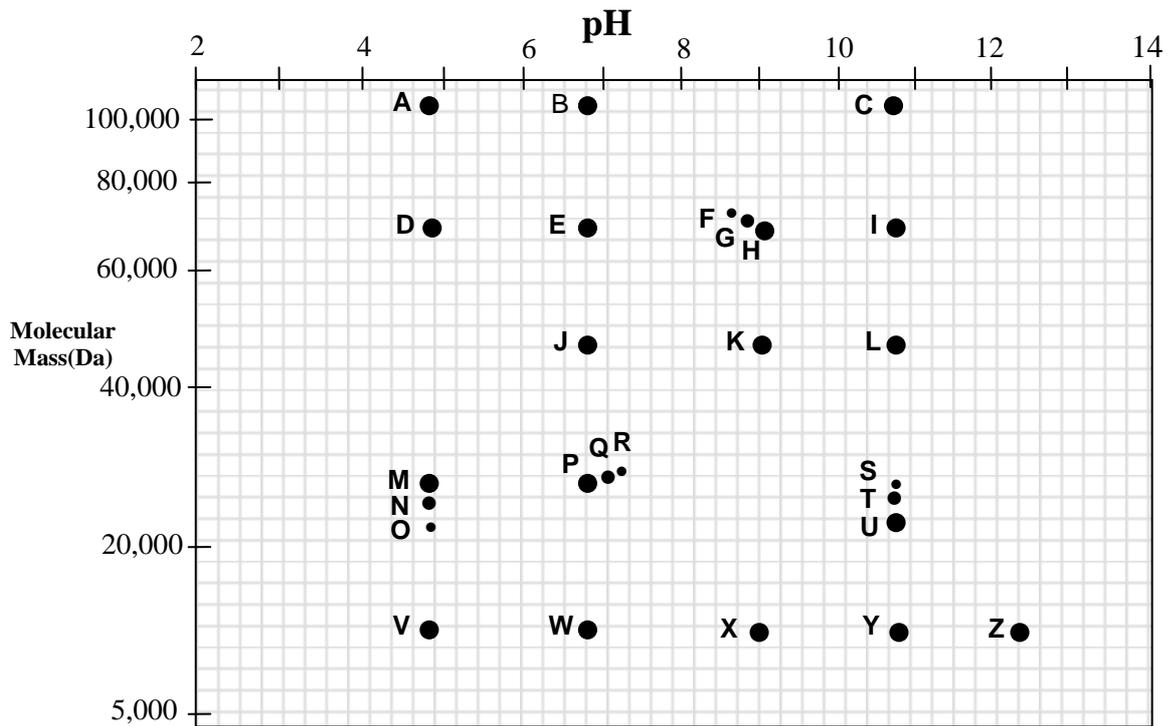
下列何者為正確敘述的組合？

- A. 1, 3
- B. 2, 3
- C. 1, 3, 5
- D. 2, 3, 6
- E. 2, 3, 5
- F. 1, 3, 6

將答案填入答案卷中

二維膠體電泳

下圖是利用二維膠體電泳進行蛋白質分離的實驗結果，蛋白質樣本中包括白蛋白、細胞色素 C 及其他未知的蛋白質。此項技術是先利用蛋白質的等電點進行一維的分離，再利用蛋白質的分子量進行二維分離，等電點(pI)為蛋白質所帶之淨電荷為零時之 pH 值。白蛋白及細胞色素 C 之等電點依次分別為 4.9 和 10.7，每一種蛋白質於二維膠體電泳實驗染色後分別以不同的英文字母給予標示，如下圖所示



請回答下列問題

將答案填入答案卷中

Q8. 膠體中哪一個點為白蛋白？**D**

Q9. 膠體中哪一個點為細胞色素C？**Y**

Q10. 蛋白質合成後最常見的修飾方式是磷酸化作用，蛋白質會接上不同數量帶有負電磷酸根，使得蛋白質的分子量會有微量的增加。請根據上圖的實驗結果選出其中一組蛋白質，此組蛋白質是表示某一蛋白質自非磷酸化變成磷酸化所形成的圖象變化，而且經磷酸化後的蛋白質與原來的蛋白質相比其數量較少。某一蛋白質經過不同程度的磷酸化作用後，請按照其磷酸化的程度判斷圖中的哪一組正確？(答案必須按照非磷酸化-部分磷酸化-更多磷酸的次序填寫)**H-G-F**

**END OF TASK 2 第二題結束**

請將答案紙放在你的工作桌上所有紙張的最上面