

考生編號\_\_\_\_\_ 分數\_\_\_\_\_

## 二〇〇八年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

### 第 C 試場、C1 考題

實驗所需要的材料、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。

實驗器材：

塑膠盒	1 個
小淺盤	1 個
乳膠手套	1 雙
玻棒	1 支
鑷子	2 支
轉移溶液	500 ml/瓶
玻璃板	3 片
電泳膠體	1 個
長條濾紙(Whatman 3MM)	1 張
與電泳膠體大小相同之濾紙(Whatman 3MM)	2 張
與電泳膠體大小相同之尼龍膜	1 張
衛生紙	1 包
保鮮膜	1 盒
0.5-1 公斤的書本	1 本

\*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 2 頁，於交卷時全部繳回。
- 3.作答時間含 C2 試題共 60 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。
- 4.請於本頁左上角「考生編號」處，填入個人編號。

一、實作題(共 30 分)：

南方氏轉漬法(Southern blotting)是將 DNA 片段經由電泳膠體轉印至尼龍膜上的技術。請同學依下列步驟，完成南方氏轉漬之組裝工作：

1. 取一塑膠盒，注入適量的轉移溶液，上面架設一玻璃板，再取一長條 Whatman 3MM 濾紙橫跨此玻璃板，並使濾紙兩端浸於轉移溶液中。
2. 將置於小淺盤中之電泳膠體，移至另一玻璃板上。
3. 將玻璃板上之電泳膠體小心放置到步驟 1 之塑膠盒濾紙上，注意膠體與濾紙接觸面不能有任何氣泡，若有氣泡產生需用玻棒全部趕出。(完成後由教授檢查並做第一次評分)
4. 用鑷子將大小與膠體相當的尼龍膜置於轉移溶液內浸濕，然後鋪在電泳膠體上，膠體與尼龍膜接觸面如有氣泡，亦請將氣泡完全趕出，再鋪上兩層大小與膠體相當且浸濕的 Whatman 3MM 濾紙，以保鮮膜將除轉漬膠體外之塑膠盒四周完全封住，以防轉移溶液蒸發。(完成後由教授檢查並做第二次評分)
5. 最後再依序放上適量的衛生紙，一塊玻璃版，及重量約 0.5-1 公斤的書本，保持平衡，即完成此組裝工作。(完成後由教授檢查並做第三次評分)

二、問題(每題 5 分，共 20 分)：

1. 實作中第 3 和第 4 步驟為何需將氣泡全部趕出？
2. 利用膠體電泳分離 DNA，若 DNA 大小不同，則所使用的膠體濃度有何考量？
3. 若 DNA 大小差異很多，例如 1 kb 與 20 kb，則轉漬時間有何不同？
4. 若檢測之 DNA 片段拷貝數(copy number)不同，例如單一拷貝與一萬拷貝之 DNA，則轉漬時間有何不同？

考生編號\_\_\_\_\_ 分數\_\_\_\_\_

## 二〇〇八年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

### 第 C 試場、C2 考題

#### 實驗材料與藥品

材料與藥品	數量
過氧化酶反應試劑含： 0.01 mL(=10 $\mu$ l)癒創木醇 (guaiacol) 0.2 mL(=200 $\mu$ l)之 0.9%過氧化氫 9.79 ml 蒸餾水	15 ml
水稻酵素抽取液 <b>A 管</b> :蒸餾水處理 24 小時	1ml
水稻酵素抽取液 <b>B 管</b> :300mM 鹽水處理 24 小時	1ml
過氧化酶標準液	各 1ml 濃度分別為 0, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu$ g/ml
分光光度管及試管架	10 支及 1 個
(P1000)微量吸量器及吸管	各 1 支及 1 盒
分光光度機 (編號 1.2.3.4.5)	依監考人員指定使用
油性筆	1 支

\*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 6 頁，於交卷時全部繳回。
- 3.作答時間含 C1 試題共 60 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。
- 4.請於本頁左上角「考生編號」處，填入個人編號。

# 過氧化酶濃度測定

## 分析水稻遭受環境逆境下過氧化酶( Peroxidase)之濃度變化

### 背景資料:

植物過氧化酶(class III peroxidase)廣泛存在所有陸生植物，然而在單細胞的綠藻卻沒有此種酵素，因此一般人認為此類型酵素是植物為了適應陸地生活所發展出之酵素，近年來透過基因體學之研究發現水稻含有 138 個過氧化酶基因，並分佈在其 12 對染色體上，而另一種雙子葉模式植物 阿拉伯芥則有 73 個過氧化酶基因，植物過氧化酶在植物之生長發育扮演相當重要的角色，其中較重要的是植物生長激素 Auxin 之代謝、木質素(lignin) 之形成、細胞壁組成成分修飾、細胞延長，甚至是病原菌感染下之防禦反應。至於此酵素之生化功能在過去一直認為與清除細胞產生的過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 有關，但近年來發現植物細胞在將特殊狀況下可透過過氧化酶產生過氧化氫。因此研究人員對此酵素之功能產生相當大的興趣。

### 實驗材料與藥品

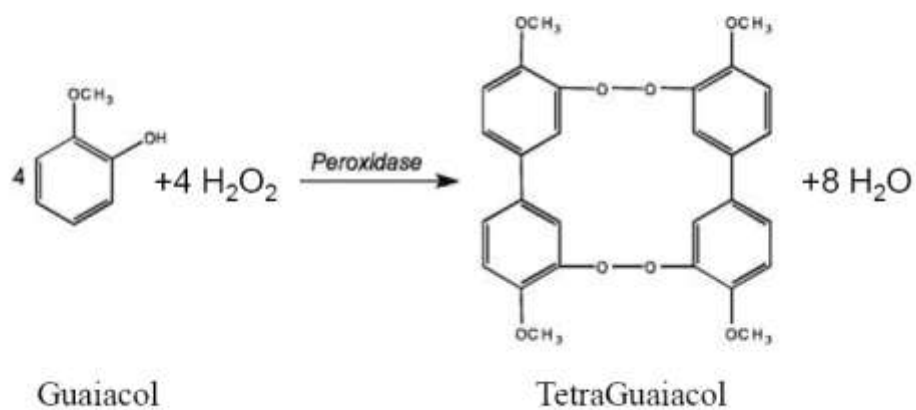
材料與藥品	數量
過氧化酶反應試劑含： 0.01 mL(=10 μl)癒創木醇 (guaiacol) 0.2 mL(=200 μl)之 0.9%過氧化氫 9.79 ml 蒸餾水	15 ml
水稻酵素抽取液 <b>A 管:</b> 蒸餾水處理 24 小時	1ml
水稻酵素抽取液 <b>B 管:</b> 300mM 鹽水處理 24 小時	1ml
過氧化酶標準液	各 1ml 濃度分別為 0, 2, 4, 8, 16, 32 μg/ml
分光光度管及試管架	10 支及 1 個
(P1000)微量吸量器及吸管	各 1 支及 1 盒
分光光度機 (編號 1.2.3.4.5)	依監考人員指定使用
油性筆	1 支

附註: 在本問題開始前請注意你的材料與儀器是否完備，如果沒有，請舉手向監考人員提出需求。

### 原理:

呼吸作用基本上是一系列的氧化和還原反應。其中將氫自一化合物轉移至另一化合物的酵素稱為去氫酶 (dehydrogenase)。去氫酶中，以氧為氫的接受者 (hydrogen acceptor) 的稱為氧化酶 (oxidase)。氧化酶將氫自基質 (substrate) 轉移給氧的過程中經常會形成有毒的過氧化氫 ( $H_2O_2$ )。一般組織通常會以過氧化酶 (peroxidase) 和接觸酶 (catalase) 來處理過氧化氫。愈創木醇 (guaiacol) 在過氧化酶作用下會被  $H_2O_2$  氧化成有色物質；愈創木醇可用吸光度來定量，進而可估算氧化作用的量。

### Peroxidase 所催化之反應:



### 步驟

1. 過氧化酶標準曲線製作：分別將濃度為 0, 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{g/ml}$  的過氧化酶標準溶液 0.5ml (1~6 管) 及 0.5 ml 過氧化酶反應試劑溶液，分別加入分光光度管中，快速混合後  $\Rightarrow$  各反應 5 分鐘；濃度為 0 的標準溶液為本實驗的空白對照組。

2. 微量試管中裝有已抽取之水稻酵素抽取液

**A管**: 蒸餾水溶液處理 24 小時之水稻酵素抽取液 1 ml。

**B管**: 在 300mM 鹽水處理 24 小時之水稻酵素抽取液 1 ml。

附註：兩種水稻酵素抽取液：本次實驗之水稻分別在蒸餾水溶液培養五天後以 (A) 蒸餾水處理 24 小時及 (B) 在 300mM 鹽水處理 24 小時。分別剪下水稻根尖 0.5 cm 之部份，於含有 1ml 磷酸緩衝液之微量研磨試管中研磨，離心 13000rpm 10 分鐘，取上清液即為水稻酵素抽取液。

3. 由 2 之 A 管、B 管分別取 0.5 ml 水稻酵素抽取液及 0.5 ml 反應試劑溶液，分別加入分光光度管中，快速混合後  $\Rightarrow$  各反應 5 分鐘。
4. 反應 5 分鐘後，將步驟 1 及 3 之分光光度管，小心地移動到分光光度計，以設於 470nm 分光光度計測定吸收值。

打開分光光度計蓋子，插入濃度為 0 的標準溶液之分光光度管(本管為空白對照組)。分光光度計裡的箭號，註記的是光束的路徑。請注意光束通過的分光光度管應該是透明的。

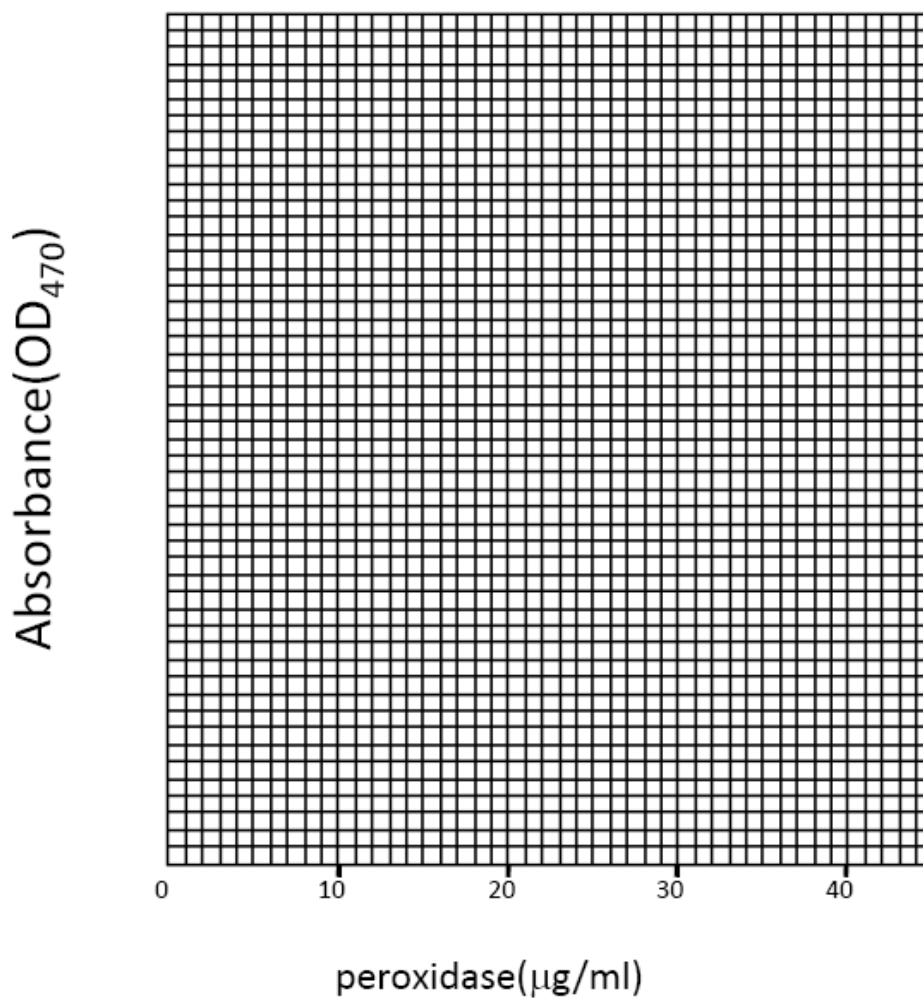
5. 所有的分光光度管都分別紀錄完成後，回到自己的位置，繼續完成以下之問題。
6. 過氧化酶酵素濃度以  $\mu\text{g/ml}$  單位表示。

選拔營實驗題 (共 50 分)

1. 標準溶液的分光光度計讀數(吸光值) 。此題 20 分。

- 2  $\mu\text{g/ml}$  的過氧化酶標準溶液 \_\_\_\_\_
- 4  $\mu\text{g/ml}$  的過氧化酶標準溶液 \_\_\_\_\_
- 8  $\mu\text{g/ml}$  的過氧化酶標準溶液 \_\_\_\_\_
- 16  $\mu\text{g/ml}$  的過氧化酶標準溶液 \_\_\_\_\_
- 32  $\mu\text{g/ml}$  的過氧化酶標準溶液 \_\_\_\_\_

請將上述過氧化酶標準溶液之結果,以橫軸為過氧化酶濃度( $\mu\text{g/ml}$ )，縱軸為分光光度計讀數(吸光值)，作圖之。



2. 測量水稻根部在蒸餾水溶液處理 24 小時及在 300mM 鹽水處理 24 小時之後之過氧化酶(oxidase) 濃度。此題 10 分。

分別紀錄二個未知的酵素抽取液之吸光值

(1) 蒸餾水溶液處理 24 小時之水稻酵素抽取液\_\_\_\_\_

(2) 在 300mM 鹽水處理 24 小時之水稻酵素抽取液\_\_\_\_\_

利用前一題所畫出來的圖，推論二個未知的酵素抽取液的過氧化酶濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

3. 試述水稻在遭受鹽害逆境後，可藉由何種分子機制之作用，進而造成根部所測得之過氧化酶濃度改變？(請由基因層次提出二個可能解釋) 此題 10 分。

4. 題目中提及之阿拉伯芥是科學研究中多數植物科學家喜歡之植物材料，請提出科學家用模式生物作研究之優點(請舉出兩個可能優點)。此題 10 分。