

## 2019 年中華民國生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

### 第 1 試場 實作 A

#### I. 限制酶切位檢測建構質體組成

#### II. 基因功能推定

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)
馬克筆	1 支	p20 微量分注器吸管尖	30 支
計時器	1 個	微量離心管	6 個
剪刀	1 支	微量離心架	1 個
膠水	1 罐	以下藥品置於冰上	
迷你離心機	1 個	5X(倍)濃度限制酶反應緩衝液	1 管(18)
有編號的離心管水浴浮盤	1 個	EcoRI 限制酶	1 管(10)
有編號的培養皿(盛裝膠片用)	1 個	質體 A	1 管(4)
電泳槽 (含電泳膠片)	1 個	質體 B	1 管(4)
水浴槽(37°C)	公用	質體 C	1 管(4)
DNA 膠片照相系統	公用	DNA 加注染料(標示:Dye)	1 管(16)
		尺標 DNA(標示:M)	1 管(24)

※ 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. 本試場合實作 A 及實作 B，作答時間共為 90 分鐘。
6. 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。

## 實作A (50分)

### 背景介紹：

想要知道一個特定基因的功能，常用的方法之一是將這個基因剔除(knock-out)，然後檢視基因剔除後的突變體(mutant)有甚麼缺失，進而推定此基因可能的功用為何。然而基因剔除有時未必可行，例如：在某些生物中不易執行，或是想要剔除的基因是必需基因(essential gene)。將必需基因剔除，則生物體會死亡，得不到剔除基因的突變體，就無法對其進行功能分析。變通的方式是建構條件突變(conditional mutation)，在特定的時期或處理下，讓該基因不表現或讓表現的蛋白質失效，此時再檢視其表現型，如此一來便可得到突變體，又可觀察到關閉此基因所導致的缺失。例如：出芽酵母菌中的 *TEM1* 基因，是一個必需基因，其編碼蛋白質的功能在於確保有絲分裂時，當紡錘體的排列方向正確，使出芽子細胞得到一個細胞核後，才會進行細胞質分裂，和母細胞分開。科學家想要研究 *TEM1* 是否對減數分裂時也是必需的，便建構一個 *TEM1* 的條件突變，在 *TEM1* 的編碼區(coding region)前插入 *CLB2* 基因的啟動子(promoter，以「*pCLB2*」表示)。此一啟動子調控了 *CLB2* 基因的轉錄，讓 *CLB2* 只會在有絲分裂時表現，在減數分裂時則不會表現。所以建構完成的 *pCLB2-TEM1* 也只會在有絲分裂時表現，在減數分裂時則不會表現。將酵母菌細胞內原本的二個正常 *TEM1* 等位基因換成 *pCLB2-TEM1* 等位基因，可以維持此條件突變體的正常出芽生殖，而當誘發其進行減數分裂時，又可檢視關閉 *TEM1* 的表現對減數分裂和孢子形成是否有任何效應。

為了建構 *pCLB2-TEM1* 等位基因，先以 PCR 和限制酶將一個帶有 *TEM1* 基因的 2465 bp BamHI-PvuII 片段，選殖在質體 R904 (圖 1)上，得到質體 T770 (圖 1)。接下來以 PCR 和限制酶將一個帶有 *pCLB2* 的 1006 bp SalI-SalI 片段插入在質體 T770 上 *TEM1* 基因編碼區之前，得到質體 T771 (圖 1)。之後再將質體 T771 上的 *pCLB2-TEM1* 選殖到其他質體，並進行酵母菌細胞轉型實驗，將染色體上的 *TEM1* 等位基因基因置換為 *pCLB2-TEM1* 等位基因。最後誘發 *pCLB2-TEM1* 同型合子突變體進行減數分裂，並檢視其產生孢子的情形。

**試題 I:** 請妳(你)利用限制酶切位檢測去判定材料中的三管質體(A、B 和 C)，何者是質體 R904？何者是質體 T770？何者是質體 T771？

**試題 II:** 請妳(你)根據試題內提供的數據對 *TEM1* 基因在減數分裂中的功能進行分析和推論。

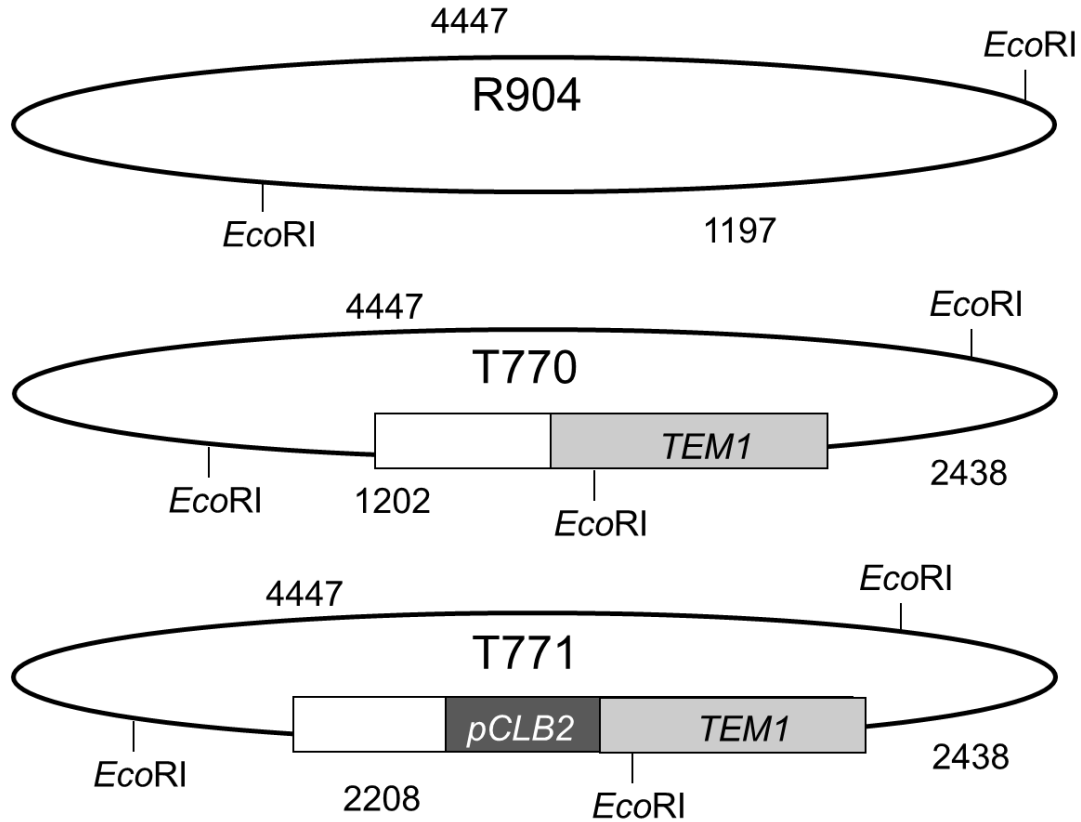


圖1. 質體 R904、T770、T771上 *EcoRI* 限制酶切位及各切位間距離(單位：bp)

試題 I：

實驗操作和結果：（操作 5 分）

**Q1** 分別對質體 A、B 和 C 以限制酶 *EcoRI* 切割。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；單一質體切割反應中，限制酶使用 8 unit，而實驗材料中的 *EcoRI* 的濃度是 4 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）。（6 分）

配製成分	質體 DNA	5X(倍)濃度限制酶 反應緩衝液	無菌水	<i>EcoRI</i>	總體積
使用量( $\mu\text{l}$ )	2				20

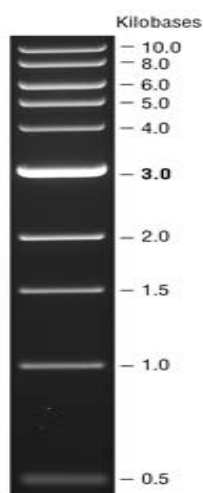
- 依 Q1 的設計配製可供三個質體進行限制酶反應的混合液：取一空微量離心管，按照無菌水、5X(倍)濃度反應緩衝液、限制酶 *EcoRI* 的順序，用微量分注器各加入 Q1 表中的 3.5 倍量於此微量離心管，吸取不同溶液時，要換新吸管尖，用微量分注器吸排混合。

2. 另取三個空的微量離心管，用馬克筆分別標記 A、B 和 C，用微量分注器將步驟 1 管中的限制酶反應混合液各取 18  $\mu\text{l}$ ，分別加入 A、B 和 C 管。此分裝步驟不須換吸管尖。
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。每次吸取不同樣品時，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  $^{\circ}\text{C}$  水浴槽中反應 35 分鐘(以計時器計時)，利用等待時間進行實作 B 或實作 A 的試題 II。
6. 當 35 分鐘反應時間終了時，從水浴槽取回自己的樣品。
7. 用微量分注器在各反應樣品中分別加入 4  $\mu\text{l}$  DNA 加注染料，以分注器混合。每次換新吸管尖。
8. 用微量分注器，分別取 20  $\mu\text{l}$  尺標 DNA 及 20  $\mu\text{l}$  已加有加注染料的反應樣品，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。每次換新吸管尖。
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 20 分鐘。
10. 待電泳結束後，關閉電源，小心取出膠片，放在標有編號的培養皿上，帶至膠片照相處，交給實驗助教拍照列印，取得結果圖片後，將圖貼在 Q2 空白處，並依照圖回答問題。

## Q2 限制酶反應和電泳結果 (12 分)

(鹼基對)

↓請將電泳結果圖裁剪後用膠水黏貼於此 ↓



**Q3** 根據電泳結果圖和尺標 DNA 分離模式的標準圖(上左圖，單位：kb)，判定質體 A、B 和 C 何者是 R904？何者是 T770？何者是 T771？ (9分)

質體 A：

質體 B：

質體 C：

**試題 2：**

**Q4** 在二倍體酵母菌中，只要有一個正常的 *TEM1* 等位基因就足以讓細胞進行出芽生殖和減數分裂並產生孢子，現有一異型合子，其基因型為 *TEM1/tem1Δ*，其中 *TEM1* 代表有功能的正常等位基因，而 *tem1Δ*代表無功能的剔除等位基因。若將此一異型合子誘發減數分裂並產生 4 個單倍體的孢子，在只考慮 *TEM1* 基因型的前提下，這 4 個孢子的存活率應該是多少？為什麼？ (6分)

**Q5** 若 *pCLB2-TEM1* 確實可在酵母菌行有絲分裂和出芽生殖時發揮正常功能，則將基因型為 *TEM1/pCLB2-TEM1* 的異型合子誘發減數分裂，並產生 4 個單倍體的孢子後，在只考慮 *TEM1* 基因型的前提下，這 4 個孢子的存活率又會是多少？為什麼？ (6分)

**Q6** 為了探討 *TEM1* 基因 (表現 Tem1 蛋白) 是否參與減數分裂和孢子形成過程，先建構完成基因型為 *pCLB2-TEM1/pCLB2-TEM1* 的同型合子突變體，再誘發其進行減數分裂，並以藥劑 benomyl 去干擾紡錘絲的形成，造成部分細胞產生較短或方向異常的紡錘體，最後檢視其產生孢子的情形。結果如下：

基因型 (處理條件)	孢子產生效率 (%)	孢子存活率 (%)
<i>TEM1/TEM1</i> (DMSO)	50.8	75.6
<i>TEM1/TEM1</i> (benomyl)	39.1	74.3
<i>pCLB2-TEM1/pCLB2-TEM1</i> (DMSO)	59.2	72.9
<i>pCLB2-TEM1/pCLB2-TEM1</i> (benomyl)	59.2	59.7

※ benomyl 須先溶於 DMSO 溶劑中，再施用於細胞

由此實驗結果，試討論酵母菌 Tem1 蛋白在減數分裂及孢子形成過程中可能的功能。(6分)

## 2019 年中華民國生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

## 第 1 試場實作 B

## 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	試驗與實驗材料	數量
微量分注器 P20	1 支	反應緩衝液 (0.1M Tris-HCl, 0.5 M MgCl <sub>2</sub> , 0.01 M CaCl <sub>2</sub> , pH 8)	2 管
微量分注器 P200	1 支		
微量分注器 P1000	1 支		
微量吸管尖 20~200 μL	1 盒	去離子水	1 管
微量吸管尖 200~1000 μL	1 盒	矽藻樣品 A	1 管
微量離心管	10 管	矽藻樣品 B	1 管
離心機	1 台	反應終止液 (0.25 M EDTA, 0.1 M Tris-HCl, pH 8)	1 管
微量比色盤	1 盤		
微量比色儀	共用	以下置於冰上	
油性筆	1 隻	鹼性磷解酶基質 (13.5 mM p-nitro-phenylphosphate)	1 管
廢液杯	1 個	控制組樣品 A	1 管
震盪混合機	1 台	控制組樣品 B	1 管
計時器	1 台		
釘書機	1 台		
離心管架	1 個		

※ 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：利用生化實驗來偵測海洋生態環境的變化

藻類是海洋環境中重要的初級生產者，而其中矽藻 (diatom) 更是海洋中最重要浮游植物，提供了超過 40% 的海洋初級生產力，更肩負了全球超過 20% 二氧化碳的固定。因此在海洋環境生態的研究領域中，矽藻在一個區域的豐度與生長狀態是十分重要的生態觀察項目，在經濟上也可以用來預測相關海域未來的漁業資源等等。

藻類的生長受到環境中的營養鹽的變化影響很大，而海洋環境中的營養分佈其實極度不平均。有時候在一個地區會突然充滿促進藻類生長的條件，而造成「藻華」這種藻類大量增生的現象。而如果形成藻華的藻類是會生產毒素的藻類，那麼很可能造成海洋生物的大量死亡，甚至造成食品安全的問題。相對來說，有時候海洋也會缺乏營養鹽，造成該區域的藻類數量下降。而海洋的營養鹽分佈隨時受到洋流、氣候、生態系內物種的興迭以及人為活動的影響。因此定期進行海洋生態的觀察可以幫助我們了解環境的變遷模式，尤其是人類的活動到底對海洋造成了什麼樣的干擾。

磷酸鹽是藻類生長所必需的一種重要營養成分，可以用來製造磷酯質、核酸等藻類細胞的主成分。當環境中的磷酸鹽不足時，藻類的生長就會受到抑制。此時大部分的藻類會開始製造「鹼性磷解酶」(Alkaline phosphatase)，利用這個酵素來分解環境中的有機磷 (源自其他細胞死亡釋出的成分)，然後將分解出來磷酸鹽再利用。在本實驗中，要請同學扮演海洋生態研究員，利用藻類缺磷會表現鹼性磷解酶的特性，以生化實驗的方法分析兩管海洋矽藻的樣品，偵測兩管其中的鹼性磷解酶酵素活性，然後請依照實驗結果判斷樣品中的藻類是否處在缺乏磷酸鹽的生長環境。



## 二、實驗操作：(10 分)

### 2-1 藻類樣品處理

※注意：實驗步驟為雙重複操作

1. 仔細觀察兩管藻類樣品 (A、B 管)，看看外觀上是否有不同。我們需要其中的 2 mL 進行後續的實驗，請思考一下如何取樣品。
2. 將兩管藻類樣品各取 1 mL 兩次，分別加到四個不同的微量離心管中，並依照表一組別標記為 1-1 ~ 2-2。
3. 將含有樣本的微量離心管對稱放置入桌上型離心機中，在室溫下離心 2 分鐘 (離心前請舉手給實驗助教檢查)。
4. 離心完成後，使用微量分注器吸除上清液至廢液杯中，只留下沉澱物 (矽藻細胞部分)，請思考一下如何吸除上清而不至於吸到細胞。

### 2-2 配製各組反應

1. 使用微量分注器取 290  $\mu\text{L}$  的「反應緩衝液」分別加入上述 2-1 步驟 4 的矽藻細胞沈澱微量離心管中，將矽藻沉澱物震盪混勻後靜置。
2. 控制組準備：為了確定實驗中所使用的藥品沒有問題，做實驗需要設計控制組。在本實驗中，擬使用購買來的「蝦鹼性磷解酶」(SAP) 作為正控制組，然後以「反應緩衝液」作為負控制組 (空白組)。但因為實驗室配製時的失誤，正、負控制組的樣品標籤遺失，不過我們確定兩管中各有一管正、負控制組，因此只好隨機把兩管標示成控制組 A 與控制組 B。請依表一，另取四個新的微量離心管，配置標準品及控制組樣品，混勻靜置。

表一、實驗樣本配置

反應管 添加成分	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2
藻類樣品	沈澱細 胞 A	沈澱細 胞 A	沈澱細 胞 B	沈澱細 胞 B	-	-	-	-
控制組樣 品	0	0	0	0	控制組 A 10	控制組 A 10	控制組 B 10	控制組 B 10
反應緩衝 液	290	290	290	290	280	280	280	280
total ( $\mu\text{L}$ )	290	290	290	290	290	290	290	290

### 2-3 進行磷解酶活性測試

1. 使用微量分注器取 10  $\mu\text{L}$  鹼性磷解酶基質，分別加入已配置完成的各組反應樣品中，混勻後靜置於室溫反應 20 分鐘。請思考一下如何混合會比較好。
2. 反應結束後，每管添加 30  $\mu\text{L}$  反應終止劑。
3. 使用離心機離心 2 分鐘（離心前請舉手給實驗助教檢查）。
4. 取回樣品後，拿出微量比色盤，在第一格中加入 200  $\mu\text{L}$  去離子水做為空白組，然後依序加入步驟 2-2 的反應樣品 1-1~4-2 號。比色盤邊緣寫上個人考號後，統一交給實驗助教測定 410 nm 吸光值並記錄於實驗結果。

### 三、實驗結果 (20 分)

1. 觀察藻類樣品 A 與 B，以外觀來看，兩管樣品有何差異？

2. 將 410 nm 吸收值記錄於下方表格中

反應管	去離子水	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2	4-1	4-2
OD <sub>410</sub>									

請將助教列印出來的 410 nm 吸收值，用釘書機釘在題目後面。

3. 依照實驗結果判斷，生長於較缺磷環境的藻類是哪一組？

4. 依照實驗結果判斷，正控制組是哪一組？

#### 四、問題回答 (20 分)

1. 如果這項實驗工作是由海洋研究船團隊代為採集指定地點的海水，經過三週的航程後，帶回陸地上的實驗室進行上述生化實驗分析酵素活性。你會建議樣品在採集後採用下列何種方法保存帶回？(A) 添加福馬林後室溫保存 (B) 高溫滅菌後冷凍保存 (C) 直接放 4 度冰箱。(4 分) 你做出這樣的建議的理由是什麼？(4 分)
2. 如果想要確定採集來的藻類樣品 A 與 B 裡面各有多少個矽藻細胞，你會使用什麼方法來量測，會需要什麼樣的設備？(4 分)
3. 如果依照上述的實驗步驟，結果兩個樣品測出來的  $OD_{410}$  分別是 A 組 0.4 與 B 組 0.5。在數值十分接近的時候，可以斷定 B 組的藻類所處的環境比較缺磷嗎？請解釋原因 (4 分)
4. 以下哪一個地點採集到的藻類樣品比較容易測出高鹼性磷解酶活性？(A) 淡水河口 (B) 馬祖藍眼淚出現的海域 (C) 沒有洋流經過的遠洋海域 (4 分)