

# 2014 年第廿五屆國際生物奧林匹亞競賽 --實作試題(1)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

## 實作試題一：細胞與分子生物學 CELL & MOLECULAR BIOLOGY

總分：64.5 分，時間：90 分鐘

### 【材料與儀器】

材料	數量	單位
限制酶 <b>FD EcoRI</b> (冰上)	1 (8 $\mu$ L)	管
限制酶 <b>FD HindIII</b> (冰上)	1 (8 $\mu$ L)	管
10X(倍)限制酶反應溶液(標示 <b>FD Buffe</b> ，在冰上)	1 (8 $\mu$ L)	管
質體 <b>1, 2 and 3</b> (冰上)	3 (5 $\mu$ L)	管
無菌水(標示 <b>Deion</b> 小管，在冰上夾鏈袋內)	1 (100 $\mu$ L)	管
DNA 注膠染劑(標示 <b>Gel Red</b> 的黑色小管，在冰上夾鏈袋內)	1 (200 $\mu$ L)	管
尺標 DNA (標示 <b>1 Kb Ladder</b> 小管，在冰上)	1 (20 $\mu$ L)	管
做好的電泳膠片	1	片
電泳溶液 (TAE)	1 (300 mL)	瓶

儀器	數量	單位
DNA 電泳槽(每人一組)	1	組
電源供應器(四人共用一個)	1	個
P10, p200 微量分注器及吸管尖	2	組
計時器	1	個
管架	1	個
無菌微量離心管(夾鏈袋內)	6	個
塑膠盒	1	個

儀器	數量	單位
保麗龍浮架	1	個
小離心機	1	臺
標示貼片	1	張
奇異筆	1	支
面紙	1	盒
手套	1	雙

注意：不提供額外材料，請小心使用

## Part A (40 分)

### 以限制酶切分析去辨識質體

#### 【背景介紹】

一科學家在冰櫃中發現 3 個未標示的管子，這些管子分別裝有質體 X, Y, 和 Z，但不知是哪一管，將此 3 個管子暫時標示為 plasmid 1、plasmid 2、plasmid 3。這些質體的大小都是 3750 bp，但以限制酶 *EcoRI* 及/或 *HindIII* 處理後之片段數目及長度不同(如圖 1)，你將進行限制酶切位分析去辨認這些質體各為何者。

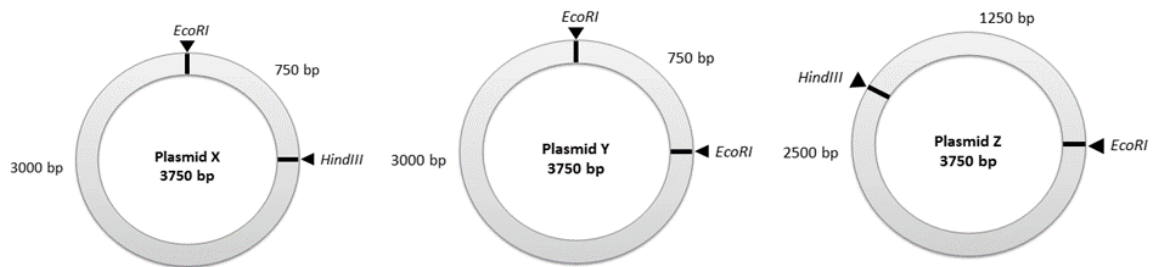


圖 1、質體 X, Y, Z 的限制酶切位圖

在答案卷的表 1 中寫出你規劃的實驗，實驗分為 Series 1 和 Series 2，同時進行。在同一 series 中，三種質體都以同樣一種（或同時二種）限制酶處理。

**問題 1.1. : (8 分)**根據圖 1 的訊息，先決定使用哪一種酵素(或同時二種酵素)處理時，可以用來區分這三種質體。

在**答案卷上的表 1**上完成你的實驗設計，將各酵素及溶液的使用量填入 (8 分)。在各 series 中，你必須使用一種(或同時二種酵素)；使用某酵素時，用量為  $1 \mu\text{L}$ ，填入 1。不用則填 0。

表 1、辨識質體實驗規劃，填入使用量 (8 分)

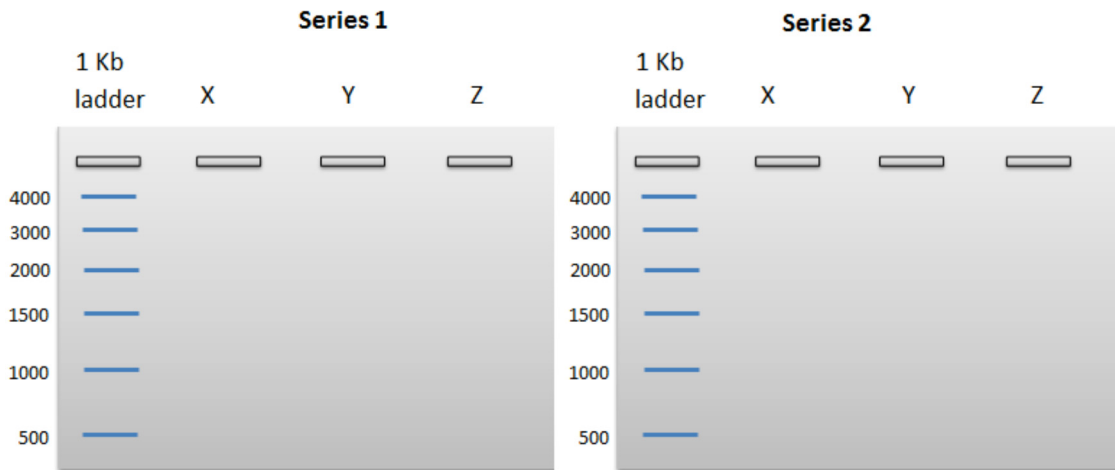
No.	Reagents	Series 1 (Volume in $\mu\text{L}$ )			Series 2 (Volume in $\mu\text{L}$ )		
		Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
1	無菌水						
2	10X(倍)限制酶反應溶液 3 DNA Plasmid						
3	DNA 質體						
4	<i>EcoRI</i> *						
5	<i>HindIII</i> *						
	總體積						

\*若使用此酵素，用量為  $1 \mu\text{L}$ ，填入 1，不用的填 0。

**問題 1.2. : (6 分)**請先勾選你在 Series 1 和 Series2 中使用的限制酶。根據你決定的二種 series 的實驗設計，若各質體 (X, Y 和 Z) 的限制酶處理皆完全作用時，推測應該得到的片段大小，按尺標位置，將預期觀測到的片段畫在答案卷的圖上。(每一樣品 1 分，本題共 6 分)

請在下表中空白欄位勾選(V) 使用的限制酶，未使用的限制酶則畫減號 (-)

Enzyme Used	Series 1	Series 2
<i>EcoRI</i>		
<i>HindIII</i>		



### 質體限制酶處理及 DNA 電泳操作

注意：電泳將在測驗開始後 50 分鐘時進行，過時則無法進行電泳。

注意：吸取各溶液前，先將管內溶液短暫離心至管底部，離心時確實將離心管放在相對位置，以維持平衡，即使只有一管離心時，也要放置另一管。

#### 問題 1.3.：(26 分)

1. 將 6 個微量離心管分別標示 S1~S6，並依答案卷的表 1 規劃去配製反應混合溶液，配好後短暫離心混合溶液至管底部 m。
2. 將完成混合之各反應小管放在已標示你的實驗桌號碼的保麗龍浮架中，在 37°C 水浴中至少反應 10 分鐘，水浴槽在箭頭標示方向的走道端。
3. 在尺標 DNA 管中(標示 1 Kb Ladder)加入 2  $\mu$ L 的 DNA 注膠染劑，混合，短暫離心。
4. 水浴反應時間到達時，舉起你的實驗桌號碼牌，有人會將反應管送回給你，在每一管中分別加入 1  $\mu$ L 的 DNA 注膠染劑，以微量分注器混合後，短暫離心。
5. 打開電泳膠片包裝，將膠片(含底盤)放入電泳槽中，將電泳溶液瓶中的 TAE 溶液全部倒入電泳槽內。

注意：黑色接頭是(-)極，紅色接頭是(+)極。

6. 按照圖 2 的順序，將 10  $\mu$ L 的 S1 ~ S6 及尺標 DNA 分別加入電泳膠孔。

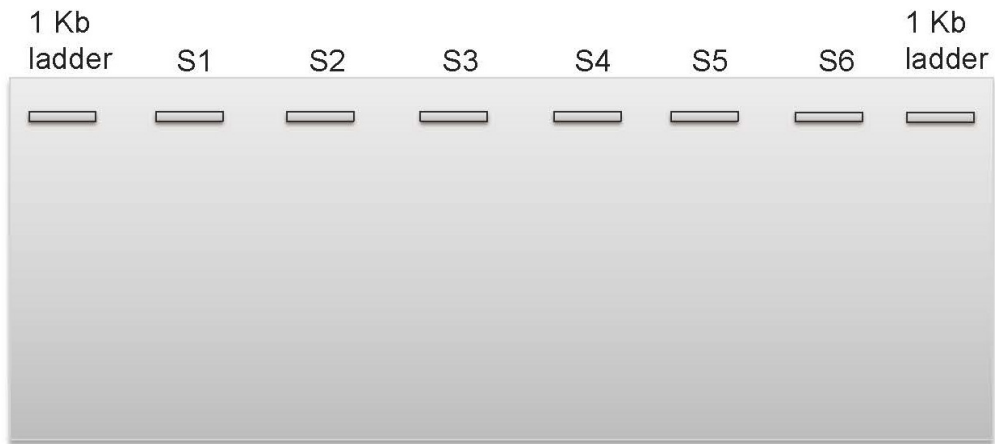
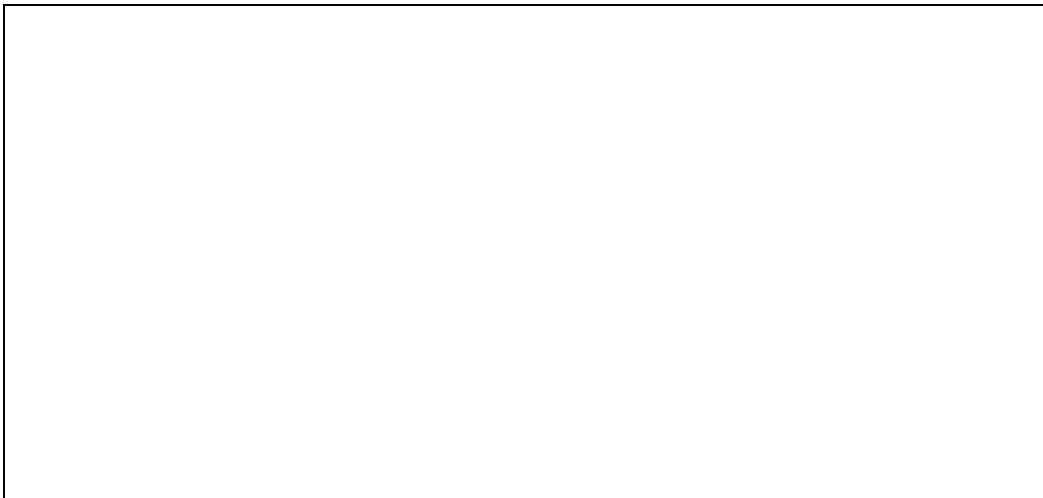


圖 2

7. 蓋上電泳槽上蓋，舉手通知助理你已準備好，助理會連接電源線至電源供應器。
8. 第三次鈴聲表示電泳完成，助理會關掉電源，請小心將膠片(含底盤)自電泳槽中取出，放入塑膠盒中，將電泳槽中的電泳溶液倒入同一塑膠盒，蓋上盒子，在標示貼片上寫下你的**學生編號**，貼在盒子側邊，將盒子留在實驗桌上。測驗後助理會將膠片拿去照相，並將照片貼在你的答案卷上。

電泳結果照片



**Part B (24.5 分)**

**草履蟲的細胞分裂與端粒分析**

草履蟲會有兩種分裂方式。其一、分裂生殖（無性生殖）；其二、接合生殖（有性生殖）。這些分裂方式會受到培養基中營養源的豐富度影響。圖 3、是在顯微鏡下觀察富源與寡源培養基生長所得之結果。

問題 2.1 : (2 分) 圖 3A 與 3B 分別觀察到何種生殖現象？

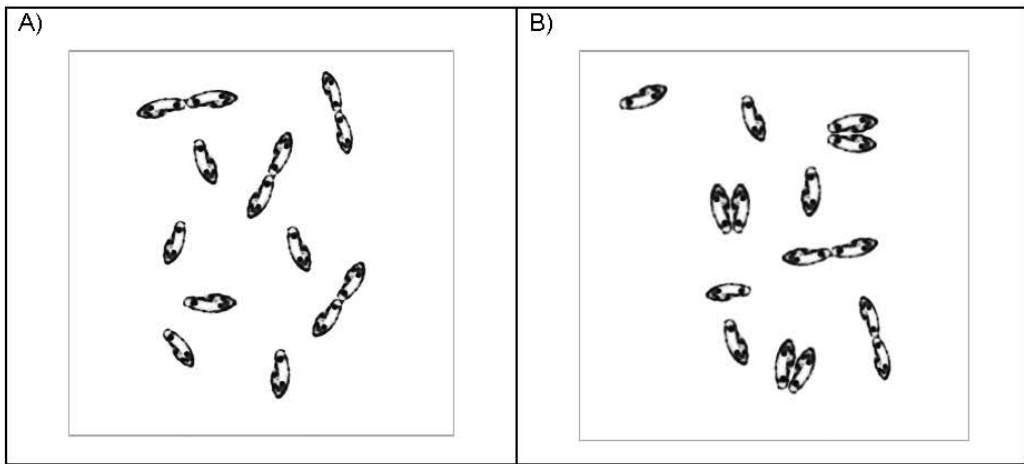


圖 3、草履蟲分別培養於富源(A)與寡源(B)培養基中的結果。

剛進行完接合生殖的草履蟲，會進入無性生殖階段。此時，處於對數期生長的草履蟲，會發生端粒縮短的現象。表 B-1 所顯示的是在培養四天過程中，三次重複計算草履蟲的數目結果。培養過程中，草履蟲的生長以及分裂速率，沒有顯著改變。

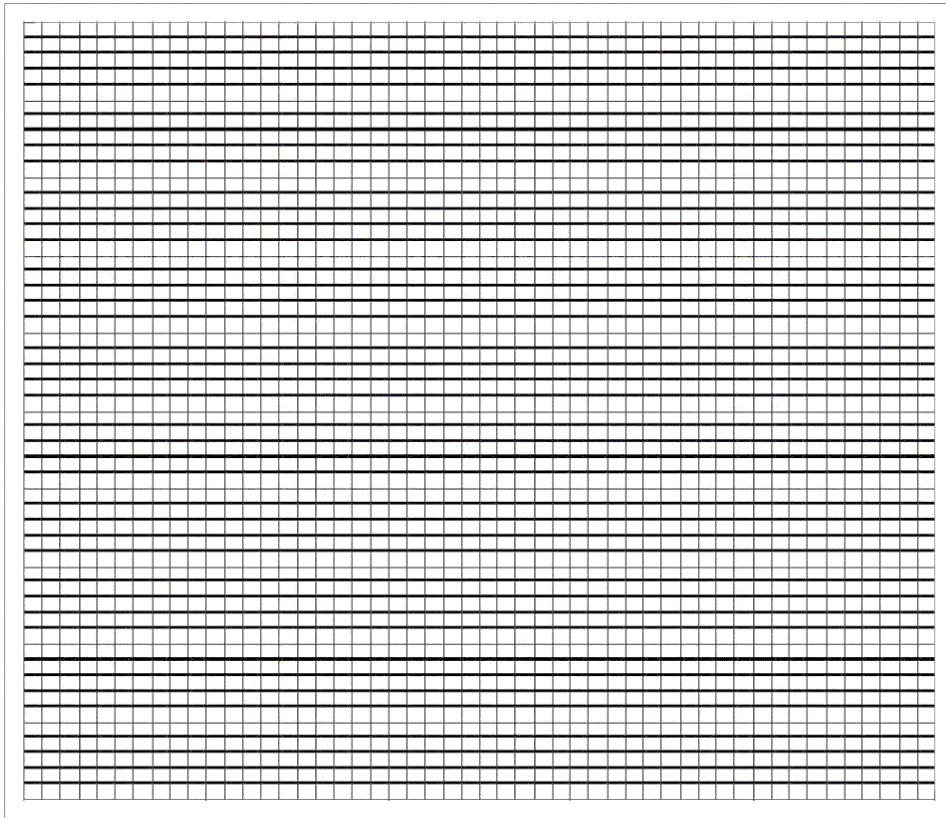
表 B-1、草履蟲在四天中的培養結果

Day	Cell Concentration (Cell/mL)		
	A	B	C
0	1	1	1
1	8	10	16
2	80	120	128
3	640	960	1024
4	5760	7680	10240

有觀察到請打勾(V)，沒有觀察到則以減號(-)標示

Culture	現象	
	分裂生殖	接合生殖
A		
B		

問題 2.2. (2.5 + 8 分): 分別計算第 0~4 天中平均細胞濃度，並以其對數值在答案卷所提供的空白方格圖上，畫出生長曲線。(以整數表示)



空白方格圖

圖 4 表示的是培養到第 30 個同步世代草履蟲端粒的南方墨點結果。草履蟲的端粒開始部位經過酵素切割，並被轉漬到膜上，再經由端粒探針進行雜合。端粒雜合結果呈現塗暈狀，塗暈狀的中間點所對到的分子量，即代表端粒的平均長度。

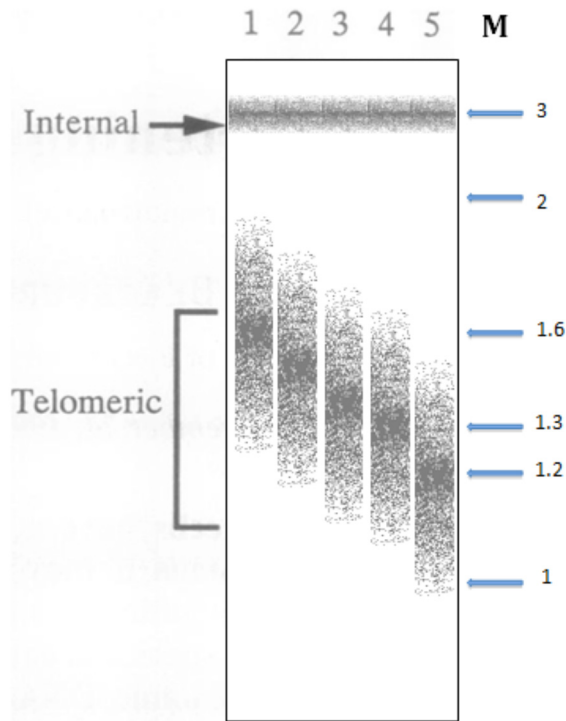


圖 4、草履蟲端粒的南方墨點結果。第 1 ~ 5 行，分別代表第 4, 7, 17, 23 與 30 世代的結果。M 為 DNA 分子量尺標，其大小顯示于第 5 行的右側，單位為 kbp。

Internal: 染色體 DNA 樣本，其中含端粒序列

問題 2.3 (12 分): 關於以下敘述，請在答案卷上的正確或錯誤欄位處以打勾(V)標示正確判斷。

No.	敘述
a	培養基能提供草履蟲生長到大於 $10^4$ cells/mL
b	用於南方墨點法的端粒探針，對於端粒序列的專一性不足
c	根據南方墨點法的結果，同一世代的端粒具有相同的長度
d	如果營養源供應充足，草履蟲能在三天內從 $10^5$ 長到 $10^7$
e	根據第 4 與 5 行的端粒資料，每個世代的端粒會縮短約 20-25 base pairs
f	在實驗開始進行前 (親代)，端粒長度約在 1500 - 1700 base pairs



No.	True	False
a		
b		
c		
d		
e		
f		

## 實作試題二：植物解剖及生理學 PLANT ANATOMY AND PHYSIOLOGY

總分：69 分，時間：90 分鐘

### 【材料及器材】

#### 第一大題

植物材料
2 種 500 $\mu$ L 葉的酒精萃取液，分別置於標示 A 及 B 的 1.5 mL 小試管中
2 種 1000 $\mu$ L 葉的酒精萃取液，分別置於標示 C 及 D 的 1.5 mL 小試管中

溶液及試劑
200 mL of hexane:acetone 色層分析展開液
25 mL of 酒精 (EtOH)

器材	
薄層色層分析缸 1 個	20-200 $\mu$ L 微量分注器及黃色吸管尖 1 盒
100-1000 $\mu$ 微量分注器及藍色吸管尖 1 盒	光電比色計小管 2 支
光電比色計小管架 1 個	15 mL 小試管 2 支
計時器 1 個	薄層色層分析板(10 x 20 cm <sup>2</sup> ) 1 個
濾紙(20 x 20 cm <sup>2</sup> ) 1	鑷子 1 支
鉛筆及削鉛筆機 1 組	尺 1 支
計算機 1 台	手套 1 雙

護目鏡 1 個	口罩 1 個
光電比色計小管用的標籤紙 2 個	

## 第二大題

<b>植物材料</b>
2 種 1000 $\mu$ L 根萃取液，分別置於標示 C7 及 C8 的 1.5 mL 小試管中

<b>溶液及試劑</b>
250 ppm 澱粉濃縮溶液 1500 $\mu$ L
一瓶碘液
一瓶水

<b>器材</b>	
100-1000 $\mu$ L 微量分注器及藍色吸管尖 1 盒	光電比色小管 4 支
15 mL 小試管 2 支	計時器 1 個
手套 1 雙	計算機 1 台
光電比色小管用的標籤紙 4 個	

## 第三大題

<b>植物材料</b>
三種植物分別置於標示為 X, Y and Z 的小試管中

<b>溶液及試劑</b>
一瓶水
一瓶 Aniline Sulphate 試劑 (將木質素染成黃色)
一瓶蘇丹三號試劑 (將脂質染成紅色)

<b>器材</b>	
顯微鏡 1 台	刀片 2 支
載玻片 6 片	蓋玻片 12 片
鑷子 1 支	解剖針 1 支

衛生紙	
-----	--

注意：適度使用材料，用完後不再提供！

## 第一大題：植物色素分析

許多植物可藉由不同的生理或形態防禦機制來抵抗淹水逆境。長期處於水逆境會導致許多會造成死亡的生理徵狀。

本大題中，植物在 12/12 小時光/暗之光週期下生長 2 週，實驗組給予淹水處理、對照組則正常澆水。

為分析其生理狀況，分別取下逆境及正常生長的植物葉片，萃取其色素，以薄層色層分析法來分辨色素種類(定性)、以光電比色計來量測其色素量(定量)。

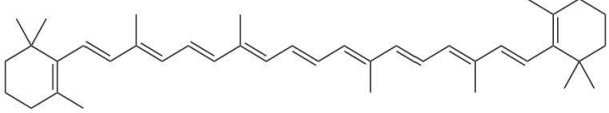
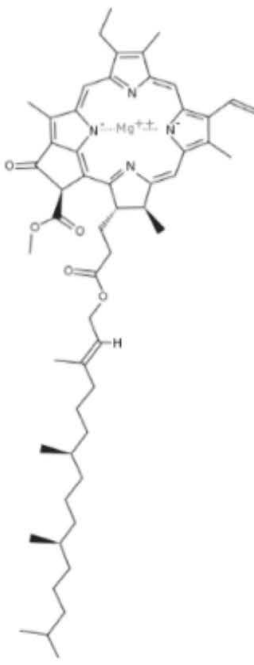
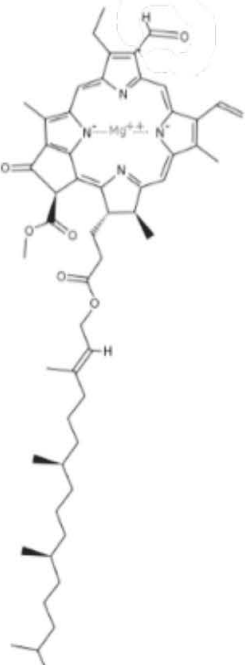
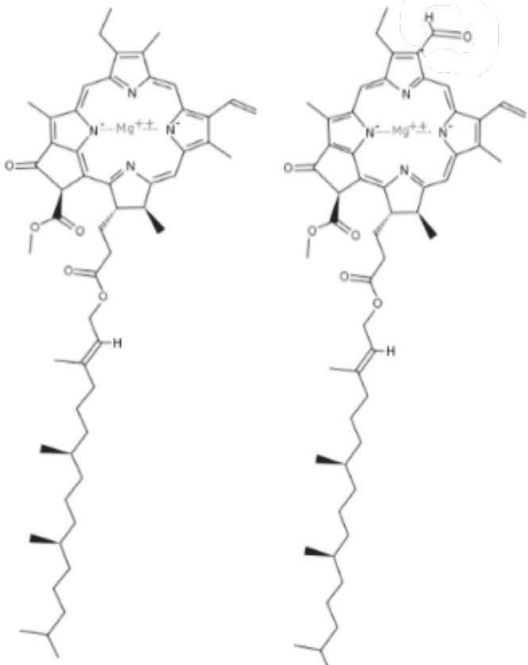
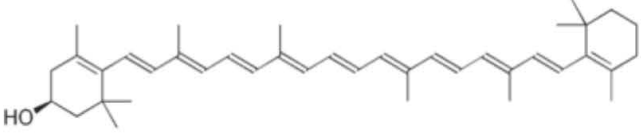
### Part A：以薄層色層分析判斷色素的種類(定性) (20 分)

將所提供的實驗組及對照組葉片萃取液(分別標示為 A and B)同時進行色層分析，操作方法如下。

- 將濾紙緊靠在薄層色層分析缸的一側。
- 在薄層色層分析缸加入 200 mL of hexane:acetone 色層分析展開液，並蓋上蓋子。
- 用鉛筆在薄層色層分析板的上、下、左、右四邊分別輕輕畫上 2 公分邊界。並在下底線上標上 A、B 兩點。
- 以微量分注器取 100  $\mu$ L 的 A 萃取液，緩慢點在下底線的 A 點上，並盡量集中在一點上；重複操作 B 萃取液於 B 點上。
- 色層分析板風乾 5 分鐘，然後放入色層分析缸中。
- 當移動最快的色素到達上方邊線時，立刻取出薄層色層分析板，並標記展開液到達的位置。
- 將薄層色層分析板放在寫有你的學生代碼的紙上，舉手請監試人員將拍照以便打分數(4 分)。

**問題 1.1** 計算每個色素點的  $R_f$  值(色素移動距離/展開液移動距離)，其中色素點距離是自色素原點量測至色素帶的最高點。利用表 1. 來判斷色素種類。(12 分)

表 1、四種主要色素

No.	Pigment 色素	Chemical structure 化學結構
1	β-carotene β-胡蘿蔔素	
2	chlorophyll a 葉綠素 a	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>chlorophyll a</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>chlorophyll b</p>  </div> </div>
3	chlorophyll b 葉綠素 b	
4	xanthophylls 葉黃素	

Spot	四種主要色素的 R <sub>f</sub> 值 (寫至小數點下兩位)(每格 2 分)	對應表 1 的色素編號(每格 1 分)
1		
2		
3		
4		

問題 1.2 判斷下列敘述之真偽，在適當空格中打勾(V)。(4 分)

- A. 葉綠素 a 及 b 的 Rf 值不相同，是因為其分子量不同。
- B. 葉綠素 a 及胡蘿蔔素的 Rf 值不相同，是因為其極性不同。
- C. 淹水逆境會影響葉綠素 b 的濃度。
- D. 生長在淹水逆境下的是植物 A。

敘述	真	偽
A		
B		
C		
D		

**Part B：利用光電比色器量測色素的量(定量) (16 分)**

對照組及淹水植物(實驗組)的色素定量須利用光電比色器來測量。本大題則提供葉片萃取液任意標示為 C 及 D。

1. 分別取 1 mL 的萃取液至兩個 15 mL 小試管。
2. 每管再以酒精稀釋為 10 mL，並混合均勻。
3. 吸取稀釋後的萃取液 C 至標示為 C 的光電比色小管中，重複操作萃取液 D。
4. 舉手提示監試人員前來將你的兩管拿去測量兩種波長的吸光值(A) ( $\lambda = 649$  and  $665$  nm)，他會給你數據。
5. 利用以下的公式來計算葉綠素 a, b 的個別濃度及總濃度。

$$\text{Total chlorophyll (mg/L)} = 20.0 (A_{649}) + 6.1 (A_{665})$$

$$\text{Chlorophyll a} = -5.76 (A_{649}) + 13.7 (A_{665})$$

$$\text{Chlorophyll b} = 25.8 (A_{649}) - 7.7 (A_{665})$$

問題 1.3. 在答案紙上寫下各吸光值，計算葉綠素總濃度以及葉綠素 a, b 的個別濃度至小數點後兩位。(10 分)

萃取液	A 吸光值		葉綠素總濃度 (mg/L)	葉綠素 a 濃度 (mg/L)	葉綠素 b 濃度 (mg/L)
	649(nm)	665(nm)			
C					
D					

**問題 1.4.** 分別計算萃取液 C 及 D 的葉綠素 a,b 比值(a/b 的數值)至小數點後兩位。(2 分)

萃取液	葉綠素比值
C	
D	

**問題 1.5.** 判斷下列敘述之真偽，在適當空格中打勾(V)。(4 分)

- A. 在淹水逆境下，葉綠素 b 的降解較葉綠素 a 多。
- B. 植物 C 的光合作用速率較植物 D 高。
- C. 淹水逆境植物對氮的吸收能力較正常狀態下的植物低。
- D. 植物 C 生長在淹水逆境下。

敘述	真	偽
A		
B		
C		
D		

## 第二大題：植物根部萃取物的澱粉含量

在淹水逆境下，根及微生物的呼吸會快速用完土壤中的氧氣。導致淹水的組織將大量依賴無氧呼吸代謝路徑。本大題中，你將利用光電比色器來測量淹水及對照植物之萃取液(任意標示為 C7 及 C8)，來量化植物在缺氧時，將澱粉轉換為可利用之碳水化合物中的作用。

### Part 2.1 測量

為使用光電比色器來量化澱粉含量，你將植物萃取液以碘液(Lugol-stain) 染色後的吸光值，分別與 250 ppm and 100 ppm 的澱粉溶液染色後的吸光值做比較。

**問題 2.1** 由所提供的 250 ppm 澱粉濃縮溶液，製備稀釋為 100 ppm 的澱粉溶液 1000  $\mu$ L，在答案紙上填入稀釋時所需的 250 ppm 原液的量以及需加入的水量。(1 分)

澱粉溶液最終濃度[ppm]	100
澱粉溶液( $\mu\text{L}$ )	
H <sub>2</sub> O 水( $\mu\text{L}$ )	

製備四個光電比色小管之樣本：250 ppm 澱粉溶液(標示為 C4)、100 ppm 澱粉溶液(標示為 C6)、兩種植物萃取液(標示為 C7 and C8)。

1. 在光電比色小管貼上標籤
2. 吸取 900  $\mu\text{L}$  的樣本至光電比色小管中
3. 加入 100  $\mu\text{L}$  碘液於管中，混合均勻
4. 在室溫下作用 4 分鐘

當你的樣本處理好了，舉手通知監試人員，他會將你的樣本拿去測量，然後把數據列印給你。

**問題 2.2** 在答案紙的表格中填入吸光值。(8 分)

樣本	吸光值(580nm)
Starch 250 ppm (C4)	
Starch 100 ppm (C6)	
Sample C7	
Sample C8	

## Part 2.2 數據分析

$$y = ax$$

假設吸光值與澱粉濃度呈線性關係，且當澱粉濃度為 0 時，其吸光值為 0；其關係式如上所示，其中  $x$  為澱粉濃度， $y$  為吸光值。

**問題 2.3** 以線性相關法來估算上面公式的斜率( $a$ )，如下：

$$a = \frac{\sum xy}{\sum x^2}$$

然後計算數值至小數點後兩位，填入答案紙中。(4 分)

**問題 2.4** 利用你估算的斜率(a)來計算 C7 及 C8 兩樣本的澱粉濃度(ppm)，取整數。(4 分)

樣本	濃度(ppm)
C7	
C8	

**問題 2.5** 根據你的觀察，判斷下列敘述的真偽，並在答案紙的適當空格中打勾(V)。(4 分)

- A. 淹水之後，根中的蔗糖及其他可溶性糖類的濃度上升。
- B. 碳水化合物的運輸作用受損有助於澱粉在淹水植物根中的累積。
- C. 根中的酒精發酵會因淹水而增加。
- D. C7 植物是生長在淹水情況下。

敘述	真	偽
A		
B		
C		
D		

### 第三大題：植物適應構造之觀察

植物在適應淹水的土壤時，通常在根與莖的解剖構造及形態上發生改變。某些耐淹水的植物在淹水缺氧時，會有通氣組織的形成，此現象通常發生在根、根瘤、根莖、莖及沉水的葉片中。

在小試管 X, Y, and Z 中，共有三種標本，他們是來自兩種土壤狀況。

- a. 分別將標本作徒手切片，取得橫切面並以所提供的染料來染色。
- b. 用光學顯微鏡觀察染色後的標本切片。

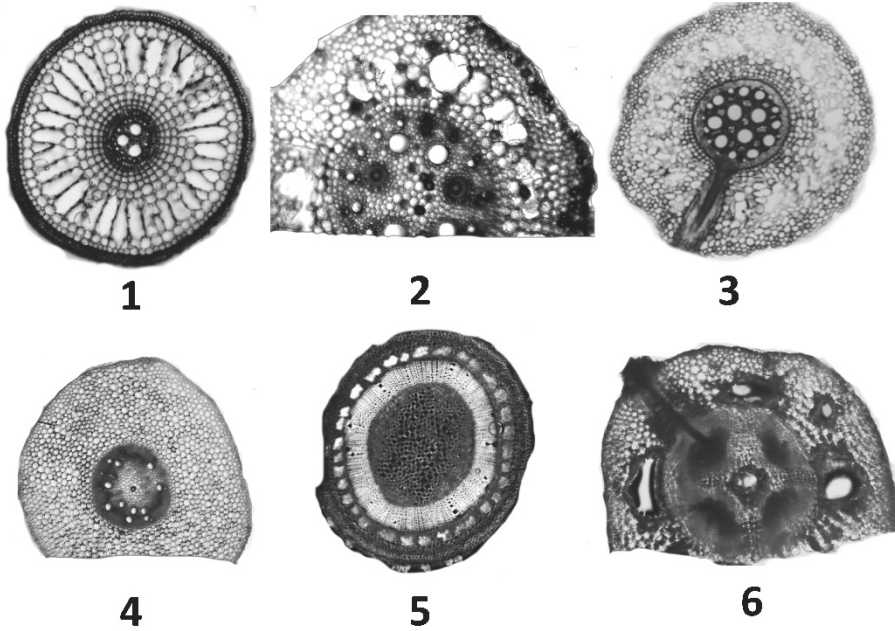
**問題 3.1** 仔細觀察切片並在答案紙的表格中以“+”表示“有”；“-”表示“無”。(6 分，每小格 0.5 分)

組織類型	有/無		
	X	Y	Z
樣本			
皮層			



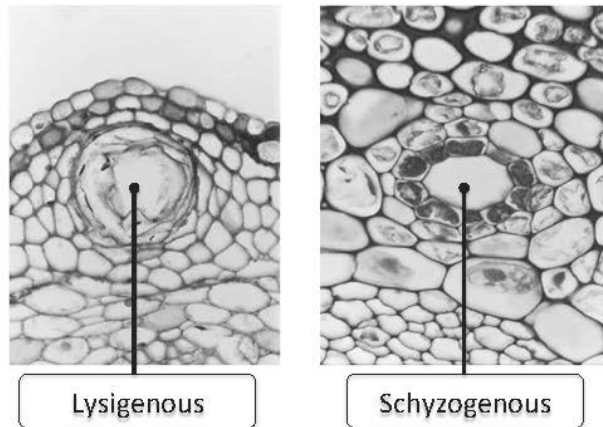
a.厚壁組織			
內皮			
本質部			
a.初生木質部			
b.次生木質部			

問題 3.2 由以下所提供之圖示代號來標示所對應的標本。(9 分)



樣本	圖示代號
X	
Y	
Z	

問題 3.3 標出每個標本的通氣組織類型。下圖所示: Lysigenous (溶解型); Schyzogenous(離生型)(9 分)



樣本	沒有通氣組織	溶解型	離生型
X			
Y			
Z			

\* 溶解型是藉由將該空間的所有細胞溶解而成之細間隙

\*\* 離生型是藉由將細胞壁分開並擴增空間而成之細胞間隙

**問題 3.4** 標示出每個標本所對應的特定器官，並在適當空格中打勾(V)。(9 分)

器官	單子葉植物			雙子葉植物		
	根	莖	葉	根	莖	葉
X						
Y						
Z						

**問題 3.5** 標示出每個標本所對應的生長狀況，並在適當空格中打勾(V)。(6 分)

樣本	對照組	淹水
X		
Y		
Z		

(待續)