

2013 年第廿四屆國際生物奧林匹亞競賽 --實驗試題(I)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

實驗一：分子細胞生物學

總分：100 分，總操作時間：90 分鐘

【實驗材料】

實驗材料	實驗材料
37°C 水浴槽(共用)	1 隻馬克筆
1 支 P1000 微量吸管	1 個顯微鏡
1 支 P200 微量吸管	3 個細胞計數槽玻片組
1 支 P20 微量吸管	3 個載玻片
1 盒微量吸管的滴管尖(P1000 使用)	3 個蓋玻片
1 盒微量吸管的滴管尖(P200 和 P20 使用)	21 個微量離心管
1 個微量離心管架	1 個微量離心管磁力座
1 個試管架	空白紙
1 個固體廢棄物容器	1 個尋求協助旗
1 個液體廢棄物容器 [LW]	1 張標記有學生編號的黃色紙
1 個裝滿冰的冰桶	1 個計時器

【化學藥品】

化學藥品	化學藥品
1 個裝有磁珠的微量離心管[MB]	1 個裝有反應物緩衝液的微量離心管[SB]
1 個裝有磷酸基緩衝液的離心管[PBSB]	1 個裝有反應物(X-gluc)的微量離心管 [S]
1 個裝有固定緩衝液的微量離心管[FB]	

【錐蟲懸浮液】

- 1 個裝有品系 1 的微量離心管[T1]
- 1 個裝有品系 2 的微量離心管[T2]
- 1 個裝有品系 3 的微量離心管[T3]

【背景介紹】

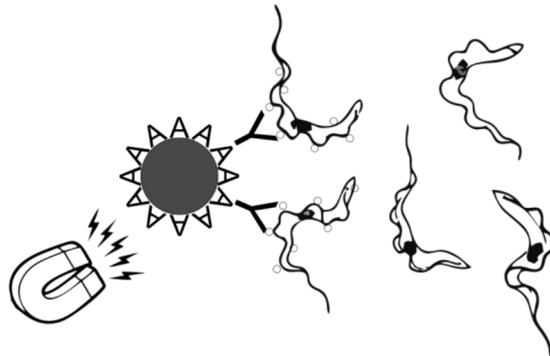
錐蟲 *Trypanosoma brucei* 是人類睡眠病和動物 nagana 病的致病寄生蟲，它藉采采蠅在個體間傳染，且幾乎只分佈於非洲撒哈拉以南地區。不同種類錐蟲的感染力各由不同的表面蛋白決定，例如表面蛋白 procyclin 被認為與感染途徑有關，且只存在 *T. brucei*，而不存在於其它種之錐蟲；而 *T. congolense* 的感染則依賴另一種表面蛋白 GARP。為了解

procyclin 在 *T. brucei* 生活史和傳染途徑的功能，研究目標為建構一剔除 procyclin 蛋白基因，並表現原本不應存在的 GARP 蛋白基因的 *T. brucei* 突變種。

本實作中，使用不同品系的 *T. brucei brucei* (亞種)，這些品系只會感染動物，對人類沒有危險性。首先，這些品系的細胞以一個同時帶有 GARP 和 β -glucuronidase 基因的 DNA 轉殖， β -glucuronidase 原本不存在於 *T. brucei* 中，它能切割 X-gluc 成肉眼可辨識的藍色產物，因此 β -glucuronidase 基因可作為檢定轉殖是否成功的報導基因，只要將這些品系培養於 X-gluc 中即可。

接著，這些品系將透過既定的方法將 procyclin 基因剔除，藉此可以探究 procyclin 對感染力的重要性，並可知 GARP 可否取代 procyclin。

由於此既定方法的基因剔除效率並非 100%，你的工作是將已剔除 procyclin 基因的細胞和未成功剔除者分離，為此，將已和能專一性辨識 procyclin 抗體混合的錐蟲，用表面帶有 protein A 的磁珠進行分離。protein A 會專一的吸附抗體的 Fc 部分，實驗原理如下圖所示：



在開始操作實驗前，先回答以下是非題，以✓標示正確 (true)或錯誤(false) (2 分)

		true	false
Q1.	如果一品系培養於 X-gluc 中呈藍色，表示 β -glucuronidase 基因已轉殖成功		
	如果建構於同一 DNA 上的二個基因在轉殖時，只有單一基因插入染色體，則只藉 β -glucuronidase 基因的存在與否來判定 GARP 基因是否也同時轉入可能會造成誤判		
	轉殖基因插入染色體的位置會影響此基因的表現量		
	此一利用磁珠及專一抗體來分離表面蛋白之基因剔除細胞的方法也適用於分離細胞內部蛋白之基因剔除細胞		

實作 1： β -glucuronidase 的表現(12 分)

1.1：判定 β -glucuronidase 是否表現

為 3 種錐蟲品系 T1, T2 和 T3 分別製備反應溶液於 3 個微量離心管，在每一個離心

管標記：品系編號、你的國家代碼（如識別名牌所示的 3 個字母）

按下列順序吸取，以微量分注器混合均勻

1. 20 μ l 錐蟲懸浮液。因為錐蟲會沉降到管底，確定混合均勻後再吸取
2. 100 μ l 反應物緩衝溶液 (SB)
3. 10 μ l 反應物(S)

為 3 種錐蟲品系 T1, T2 和 T3 分別製備反應溶液於 3 個微量離心管，在每一個離心管標記品系編號和你的國家代碼（如識別名牌所示的 3 個字母）

按下列順序吸取，以微量分注器混合均勻

1. 20 μ l 錐蟲懸浮液。因為錐蟲會沉降到管底，確定混合均勻後再吸取
2. 100 μ l 反應物緩衝液 (SB)
3. 10 μ l 反應物(S)

將你的協助旗插在你的實驗隔板上，試場助理會來將你的反應管置於水浴中，在 37 °C 進行反應至少 1 小時；反應時間結束時，再次將你的協助旗插在你的實驗隔板上，試場助理會將你的反應管取回。在等待水浴時間先做其它題目。

將反應管放在標記有你的學生編號的黃色紙上，置於指定的盒子內，此結果會被拍照並評分

在以下表格內分別勾選(✓) 此 3 品系顏色變化的實驗結果。(12 分)

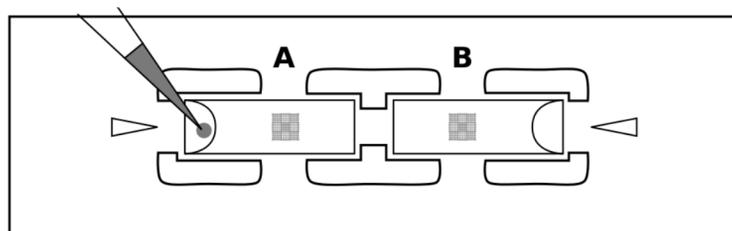
		Strain T1	Strain T1	Strain T1
Q2.	藍色			
	無色			

實作 2：procyclin 蛋白的表現(86 分)

2.1：如何使用細胞計數槽(1 分)

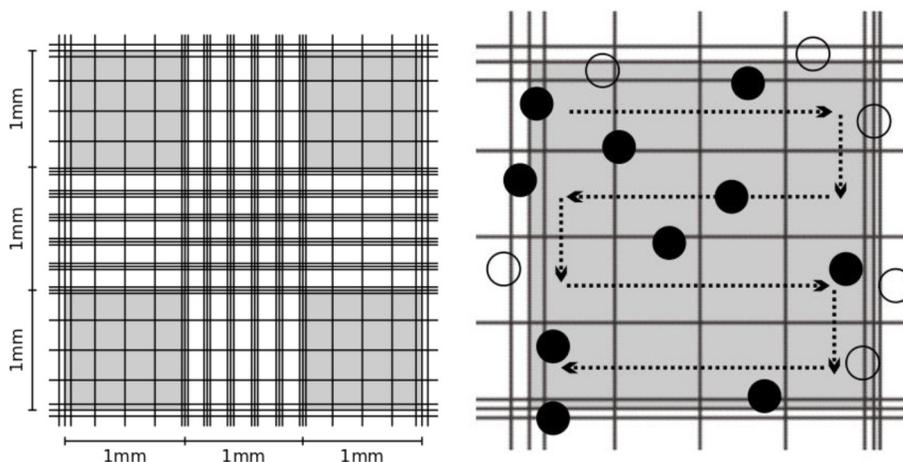
你要在試題 2.3 和 2.4 使用細胞計數槽去測定錐蟲的密度，每一個計數槽顯微玻片上有 2 個細胞計數槽可獨立使用(如下圖)

注意：此計數槽無法清洗再使用，用完後不會再補發，這種計數槽不需使用蓋玻片



當計算細胞密度時，按以下步驟操作

1. 吸取 10 μl 細胞懸浮液，如上圖加注於計數槽內
2. 至少等待 2 分鐘，讓細胞沉降於底部
3. 將計數槽顯微玻片置於顯微鏡下，在下左圖所示的 4 個灰色方格區塊中選 3 區，分別計算其中所含的錐蟲數目



你可以依個人喜好使用 10x 或 40x 物鏡，建議採取蛇行法計數(如上圖右)，依序計算各小格內的細胞數。為避免可能的偏差，只有方格內以及方格左邊界線和下邊界線上的細胞列入計算(如上圖右實心圓)，方格外以及右邊界線和上邊界線上的細胞不列入計算(如上圖右空心圓)

計算錐蟲細胞密度，首先要計算每一灰色方格區塊的容積，細胞計數槽的空間高度是 0.1 mm，而每一灰色方格區塊的邊長是 1 mm(如上圖左)，將計算所得容積填入下方表中(1 分)

Q3.

單一方格區塊容積

單一方格區塊容積

2.2：清洗磁珠

依以下步驟(1-3)清洗磁珠 2 次

1. 在磁珠管中加入 1 ml 磷酸基緩衝液(PBSB)，用微量吸管混合
2. 將此磁珠離心管放入微量離心管磁力座內，至少等待 1 分鐘讓磁珠落至離心管底部
3. 用微量吸管吸取上清液，排棄於液體廢棄物容器

最後，加入 35 μl 磷酸基緩衝液(PBSB)，使磁珠懸浮，並放在冰上

2.3：不被磁珠吸附的錐蟲密度(37.5 分)

在品系 T1、T2 和 T3 中，收集表現 procyclin 的錐蟲步驟如下：

1. 均勻混合錐蟲懸浮液後，吸取 190 μl 懸浮液，放入新的離心管中
2. 先均勻混合磁珠懸浮液後，取 10 μl 加入 190 μl 錐蟲懸浮液中
3. 放在冰上 30 分鐘，每 3-5 分鐘倒置並輕彈離心管以維持磁珠之懸浮，等候時先做其他部分
4. 時間終了時，用微量離心管磁力座將磁珠吸至管底
5. 將離心管留在磁力座上，用微量吸管吸取所有上清液，放入新離心管中，並放在冰上
6. 吸完立即在此一磁珠離心管中加入 50 μl 磷酸基緩衝溶液(PBSB)，溫柔地用微量吸管器讓磁珠懸浮，放在冰上
7. 取一新離心管，製備 100 μl 以磷酸基緩衝液(PBSB) 作成之 1:10 稀釋的上清液
8. 取 36 μl 的稀釋上清液，加入一新的離心管中，再加入 4 μl 的固定緩衝液 (FB)，用微量吸管混合
9. 用 2.1 的方法計算錐蟲數目，將所得結果填入下表中
10. 計算各品系單一方格區塊的平均錐蟲數目至小數點後第三位，你將在試題 2.5 使用到此平均值(37.5 分)

		Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q4.	區塊 1			
	區塊 2			
	區塊 3			
	平均數目(小數點後第三位)			

2.4：錐蟲總密度(25.5 分)

分別計算 T1、T2 和 T3 三品系錐蟲原始的懸浮液總密度，步驟如下：

1. 取一新的離心管，製備以磷酸基緩衝液(PBSB) 做 1:10 稀釋的原始錐蟲懸浮液 100 μl ，注意要先混合均勻再吸取
2. 取 36 μl 的稀釋原始懸浮液，加入一新的離心管中，再加入 4 μl 的固定緩衝液 (FB)，用微量吸管混合
3. 用 2.1 的方法計算錐蟲數目，將數目填入下表中
4. 計算各品系的平均錐蟲數目與標準差至小數點後第三位，你將在試題 2.5 中用到此平均值(25.5 分)

標準差(SD)的計算公式如下， n 是重複數， x_i 是各計數值， \bar{x} 是平均值

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q5. 區塊 1			
區塊 2			
區塊 3			
單一區塊的平均數目			
標準差			

2.5 : procyclin 基因之成功剔除(9 分)

最終目標是計算並比較不會吸附於磁珠上的細胞平均密度與原始總細胞平均密度，但首先你要計算平均值標準偏差(SE_{mean})，並決定有效數字的位數。假設計數值是常態分佈，則

$$SE_{mean} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

自試題 2.4 中，用你所觀測到各品系中最大標準差值來計算平均值標準偏差(SE_{mean})，並將結果填入下表中(準確至小數點後第三位) (0.6 分)

Q6. SE_{mean} 平均值標準偏差	
-------------------------	--

平均值標準偏差(SE_{mean})可以告訴你估算平均值的正確度，藉由比較“估算平均值加上 SE_{mean} ”與“估算平均值減去 SE_{mean} ”，以決定有效數字之位數(含一位不確定值)，例如：估計平均值是 1234.567， SE_{mean} 是 98.765，你要比較 $1234.567 + 98.765 = 1333.332$ 和 $1234.567 - 98.765 = 1135.802$ ，在此例子中，有效數字是二位，平均值應以 1.2×10^3 表示。決定你應採用的有效數字位數，並填於下表中(1.5 分)

Q7. 有效數字位數	
------------	--

依照你所決定的有效數字位數，將不會吸附磁珠的細胞平均數目與原始總細胞平均數目重新表示於下表中(0.6 分)

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q8. 不會吸附磁珠的細胞平均數目(源自試題 2.3)			
原始總細胞平均數目(源自試題 2.4)			

現在使用這些數值去估算稀釋後的細胞密度，以相同位數的有效數字表示於下表中(3.7 分)

	Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q9. 不會吸附磁珠的細胞密度/ml (源自試題 2.3)			
原始總細胞平均密度/ml (源自試題 2.4)			

最後計算稀釋前的細胞密度，以相同位數的有效數字表示於下表中 (1.1 分)

		Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q10.	不會吸附磁珠的細胞密度/ml (源自試題 2.3)			
	原始總細胞平均密度/ml (源自試題 2.4)			

為估算此剔除實驗的成功率，使用稀釋前的原始細胞密度來計算各品系不會吸附於磁珠的細胞比例，以整數百分比表示於下表中(1.5 分)

		Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q11.	不會吸附磁珠的細胞百分比			

2.6：確認吸附於磁珠(9 分)

接下來，你要確認經過磁珠吸附步驟後，細胞數目的減少確是因為錐蟲被磁珠吸附。為達成上述目的，分別對三品系進行下列步驟

1. 自試題 2.3 最後的磁珠懸浮液中吸取 10 μ l，滴於載玻片上
2. 加上蓋玻片

約略估計被磁珠吸附的錐蟲所佔比例，判別錐蟲被磁珠吸附的一個好方法是錐蟲的運動會使磁珠也跟著擺動

在下表中勾選(✓)對各品系最適切的描述 (9 分)

		Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q12.	幾乎沒有不被磁珠吸附的錐蟲			
	<50%的錐蟲被磁珠吸附			
	>50%的錐蟲被磁珠吸附			

2.7：說明你的實驗結果(4 分)

在下表中勾選(✓)最能說明上清液中錐蟲數目減少的敘述 (3 分)

		Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q13.	錐蟲數目的減少，至少有部分原因是因為被磁珠吸附			
	沒有改變或只是隨機結果			

在下表中勾選(✓)剔除最有效的品系 (1 分)

		Strain T1	Strain T2	Strain T3
Q14.	剔除效率最高的品系			

(待續)