

# 2012 年第廿三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：細胞及分子生物學

總分：100 分

總操作時間：90 分鐘

### 【實驗材料與儀器】

實驗材料與儀器	數量	單位
限制酶 RE1 (NdeI) (置於冰上)	4 $\mu$ l	管
限制酶 RE2 (EcoRI) (置於冰上)	4 $\mu$ l	管
DNA 待測樣品溶於限制酶緩衝液中(標示：T) (置於冰上)	10 $\mu$ l x 4	管
miliQ 純水 (標示：W)	1	管
DNA 電泳槽和電源供應器	1	組
微量分注器和分注器吸管尖(p10, p100)	2	件
計時器	1	個
尺標 DNA (作為樣品大小參考標準，L1 適用於 100bp 差異； L2 適用於 1kbp 差異) (置於冰上)	2	管
DNA 加注染料(藍色)	1	管
預先已做好的電泳膠(已放在電泳緩衝液 running buffer 中)	1	片
大培養皿 (裝盛電泳膠片送去照相時使用)	1	個
標記有你的國家代號的卡片：招呼協助時使用	1	個
圓形浮水離心管座(標記有你的國家代號)	1	個
微量離心管	1	組
37 °C 水浴槽(使用指定的一個)	1	個
膠片照相裝置(使用指定的一個)	1	個

第一部分：以限制酶切割 DNA 片段後推定基因切位圖(100 分)

### 【背景介紹】

基因的限制酶切位圖常被使用於分析 DNA 片段的順序和內容。一個 DNA 片段經限制酶切割，並透過電泳分離後會顯示此 DNA 片段特有的模式。此技術在選殖基因、研究基因功能和調控、尋找疾病相關基因和疾病診斷，及法醫分析上均為有用的工具。

**A 部分：確認在一選殖質體上含有插入的人類 DNA 片段 (80 分)**

你要利用限制酶切位分析法去確認一個人類 DNA 片段“X”(長度大約是 760 base pairs)

是否已被插入到一個選殖質體“V”內 (V 是環狀 DNA，長度大約是 2570 base pairs)。你要先設計排定一個 DNA 的限制酶切割實驗去分析樣品 DNA “T”，並且遵循一般限制酶使用和電泳操作程序(詳述於後)去操作實驗。電泳完成後，電泳膠片將會有實驗室助理協助染色，請對實驗結果進行分析並作出解釋。

### 【實驗步驟】

1. 在答案卷上的表格內排定你的 DNA 限制酶切割實驗，每個切割項目的體積為 20  $\mu\text{l}$ ，你最多可以做 4 個切割項目。

#### 問題 1.1 (20 分)

寫下你計畫的每個項目中各種成分的用量，如 Tube 2 項下所示，所有的單位都是  $\mu\text{l}$ 。

2. 依你的實驗設計來標示微量離心管，小心吸取正確定量的各項成分，用微量分注器輕緩混合於各反應微量離心管內。要小心避免各項處理項目間的相互污染，每次吸取時要用乾淨未用過的吸管尖。注意：使用 p10 分注器 (白色頂)吸取 10  $\mu\text{l}$  以下的量。[注意：如果你要求額外的樣品，會被扣 20 分，請小心使用你的反應樣品]
3. 用迷你離心機將 4 管反應混合液離心至離心管底部(離心時請平衡放置離心管於相對位置)。準備反應混合液時及離心後，隨時將離心管放在冰上。
4. 當所有反應混合液都準備好後，將離心管置於標記好的浮水離心管座，放在指定 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中反應 20 分鐘(以計時器計時)。記得 20 分鐘後要取回你的實驗樣品。
5. 利用 20 分鐘的反應時間回答答案卷上的問題。

#### 問題 1.2 (10 分)

對下列各項敘述，正確的請打勾(✓)，錯誤的請打叉(✗)。

- a. 每一種限制酶在特定的序列上切斷 DNA
- b. 每一種限制酶只在 DNA 的 3'和 5'末端切 DNA.
- c. 限制酶切 DNA 的作用在 4 $^{\circ}\text{C}$ 時最有效
- d. 限制酶可以在室溫中保存數月不變質。
- e. 不同於外切酶，限制酶只能作用在 DNA 的內部序列。

#### 問題 1.3 (10 分)

對下列有關電泳分離 DNA 原理的敘述，正確的請打勾(✓)，錯誤的請打叉(✗)。

- a. 整體而言，DNA 片段是帶正電荷。
- b. 較小的 DNA 片段在電流下通過膠片的速度較快。
- c. 較小的 DNA 片段因為比較大的片段帶電荷為少，所以通過膠片較快。
- d. 膠體的相對密度影響分離 DNA 所需的時間。
- e. 依照注入膠片中 DNA 的量來決定電泳時使用的電壓。

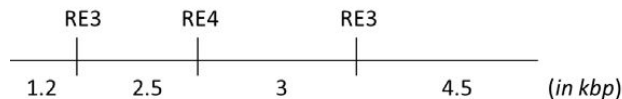
- 當 20 分鐘反應時間終了時，從水浴槽取回你的樣品。
- 在反應樣品中加入  $4 \mu\text{l}$  DNA 加注染料(藍色)，以分注器混合後，離心至離心管底部。
- 使用 p100 微量分注器(黃色頂)，分別取  $15 \mu\text{l}$  的反應樣品(混合加注染料)及尺標 DNA，依照下列順序，自左至右注入膠片的樣品槽中。注意輕緩加入樣品，千萬不要流出樣品槽外。

Marker L1	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Marker L2
-----------	--------	--------	--------	--------	-----------

- 蓋上電泳槽蓋，連接電源，以 100volts 進行電泳 20 分鐘，請小心不要碰觸電極和電源供應器。
- 留意樣品是否向正極方向移動。如果你需要協助去確認樣品是否正確移動，請將你的協助卡夾在實驗隔間的右側壁上。
- 進行電泳時，回答下列問題於答案卷上

#### **問題 1.4 (20 分)**

假設有一段線性的人類 DNA (1 kbp)，用特定限制酶 RE3 切時，得到二個片段，一個 650bp 和一個 350bp。若用特定限制酶 RE4 切時，得到一個 800bp 片段和一個 200 bp 片段。若同時用 RE3 和 RE4 切時，得到三個片段，分別是 650bp, 200bp 和 150 bp。按照下方的例圖模式，畫出一直線限制酶切位圖，並標出 RE3 和 RE4 的切位及切出的片段大小。



- 20 分鐘電泳結束後，關閉電源，打開電泳槽上蓋。小心取出膠片(仍然留在膠片板上)，放在培養皿上，帶至指定的膠片照相裝置處，實驗室助理會幫你將膠片照像。
- 取回你的膠片和照片，回到實驗隔間，使用你的協助卡通知監考人員將照片訂在答案卷上。

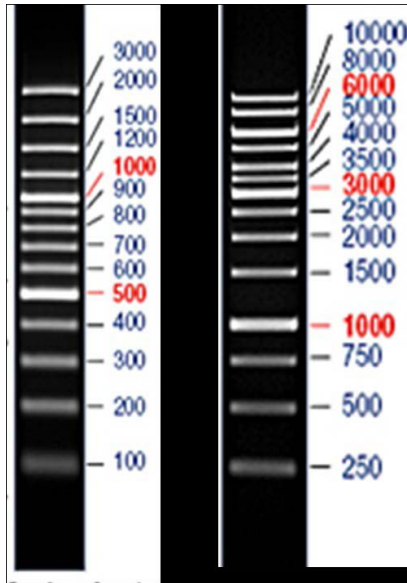
#### **問題 1.5 (10 分)**

你的實驗技術會由你的電泳結果來評定。

- 依據你的電泳膠結果，回答下列問題於答案卷上。

#### **問題 1.6 (5 分)**

根據下方尺標 DNA 分離模式的標準圖(以 basepair 顯示)，估計你的電泳結果中各片段的大小，你可以在你的膠片照片上的片段和尺標 DNA 間畫線來幫助估計。RE1 和 RE2 分別切出幾個片段？估計片段的大小分別是多少？



L1: 100 bp DNA Ladder    L2: 1 kb DNA Ladder

**問題 1.7 (1 分)**

估計 DNA 樣品(T)的大小是多少？

**問題 1.8 (1 分)**

根據你的實驗結果，DNA 樣品(T) 與空的載體(vector)相比，是較大？較小？還是一樣大？在正確的答案空格內打勾(✓)。

**問題 1.9 (1 分)**

DNA 樣品(T) 是否攜帶插入的 DNA 片段？若有攜帶打勾(✓)，沒有則打叉(✗)。

**問題 1.10 (2 分)**

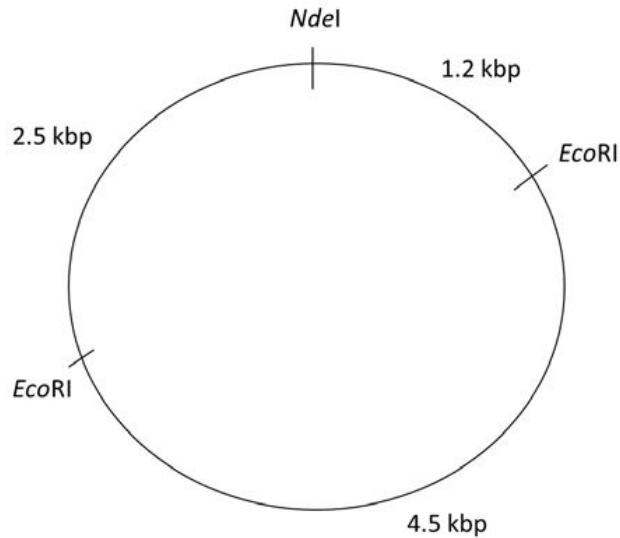
沒有切的 DNA 質體在電泳時移動的比 RE2 切出的片段都要快，原因是甚麼？在正確的答案空格內打勾(✓)。

- a. 因為沒有切的 DNA 被分解成為較小的片段。
- b. 因為沒有切的 DNA 構形較緊密，所以在膠片上移動較快。
- c. 因為 RE2 依然附在 DNA 片段上，所以被 RE2 切的片段移動較慢。

**B 部分：請決定插入 DNA 片段的排列方向。(20 分)**

**問題 1.11 (20 分)**

按照下方的例圖模式，在答案卷上畫出 DNA “T” 所有可能的限制酶切位圖，標出 RE1 和 RE2 的相關切位，以及各切位間的距離。



## 實驗二：微生物學 & 生化學

任務一：噬菌體：一個有效的媒介用於殺死細菌

### 【實驗材料與儀器】

材料和器材	數量	單位
micropipette tips 10 $\mu$ l 微量滴管尖	1	盒
micropipette tips 200 $\mu$ l 微量滴管尖	1	盒
micropipette tips 1000 $\mu$ l 微量滴管尖	1	盒
micropipette 1 - 10 $\mu$ l 微量滴管	1	支
micropipette 2 - 20 $\mu$ l 微量滴管	1	支
micropipette 20 - 200 $\mu$ l 微量滴管	1	支
micropipette 100 - 1000 $\mu$ l 微量滴管	1	支
微量離心管盒	1	個
比色管盒	1	個
微量離心管（放於燒杯內）	很多	管
以 LB 培養液培養的大腸桿菌原液（濃度 $1 \times 10^7$ 個細胞/毫升）	1	管
LB 培養基（放在一個 50 毫升的離心管）	1	管
滅過菌的去離子水（放在微量離心管中）	1	管
溶解於去離子水的 ampicillin 抗生素原液（1mg/ml）	1	管
溶於去離子水的噬菌體原液（濃度為 $10^8$ pfu/ml）	1	管
比色管（放在一個燒杯內）	4	個
碼錶計時器	1	個
可漂浮的圓形微量離心管架（已經標示了你的國碼）	1	個
37 °C 的水浴槽（有指定一個讓你使用）	1	組
UV 至可見光的分光光度計（有指定一個讓你使用）	1	組
大腸桿菌培養盤的照片（標示 A 到 H）	1	組

## A 部分 噬菌體和抗生素對殺死具抗藥性之大腸桿菌的影響

### 【背景知識】

噬菌體 (bacteriophage) 是一種可以感染細菌的病毒。某些噬菌體可以透過溶解細菌來殺死細菌。噬菌體目前被認為是一種有效的媒介用於殺死致病的細菌。如此可以作為抗生素之替代方案，來對抗對傳統抗生素具抗藥性之致病細菌。

你被要求設計一個簡單的實驗與適當的控制組，來檢驗噬菌體殺死具 ampicillin 抗藥性之大腸桿菌的效率。請按照以下的說明與指引，來回答答案卷上的問題。

#### 問題 1.1 (1 分)

為了稀釋大腸桿菌溶液從  $1 \times 10^7$  cells/ml 至  $2 \times 10^5$  cells/ml，你要稀釋多少倍？

#### 問題 1.2 (1 分)

ampicillin 溶液，於 1ml 之大腸桿菌培養液中(最終濃度為  $2 \times 10^5$  cells/ml)？

#### 問題 1.3 (1 分)

請問你必須使用多少體積之噬菌體原液( $10^8$  pfu/ml)，來配製最終效價為  $10^5$  pfu/ml 的噬菌體溶液，於 1 ml 的大腸桿菌培養液中 (最終濃度為  $2 \times 10^5$  cells/ml)？

#### 問題 1.4 (15 分)

按照上述所計算出之稀釋倍率，將你的實驗設計填入答案卷上之表格。1 號管 (Tube 1) 的例子已經幫你填入表格中了。所有填入之數字的單位都以  $\mu$ l 表示。執行你的實驗設計來配製這四個管子。並且將這四個管子 (放在有標示的圓形微量離心管架)，漂浮於 37 °C 的水浴槽中培養 40 分鐘 (有提供碼錶)。將插上這四個管子的可漂浮圓形微量離心管架交給水浴槽前的助理人員。

經過 40 分鐘培養之後，將樣品轉移至標示好 1 到 4 的比色管中。為了觀察殺死細菌的效果，請測量 595 nm 的吸光值。帶著你的樣品至你附近的分光光度計，並且交給助理人員。但是！你必須自己記錄每一個樣品的讀值。

#### 問題 1.5

填入每一個樣品之 595 nm 的吸光值於答案卷上。595 nm 之吸光值為 1 時的大腸桿菌濃度為  $1 \times 10^7$  cells/ml。請計算每一個管子之大腸桿菌濃度分別為多少？

#### 問題 1.6

下列問題的敘述正確者請打勾(✓)；錯誤者請打叉(✗)

- A. 由於對 ampicillin (抗生素) 的抗藥性，細菌細胞壁可以避免抗生素輕易的穿透。
- B. 大腸桿菌之 ampicillin 抗藥性無法防止噬菌體吸附在細菌上的能力。

- C. 噬菌體似乎約有 20 至 30 分鐘之溶菌生活史，因此可以在短短的實驗中觀察到大腸桿菌的溶解。
- D. 37 °C 不是 ampicillin 抗生素殺死大腸桿菌的正確溫度。
- E. 噬菌體與大腸桿菌競爭 LB 培養基內的養分，並且細菌會被溶解是因為養分不夠了所造成的。

### B 部分：噬菌體效價和感染的多樣性（19 分）

下表秀出大腸桿菌塗佈培養之照片的圖說：分別為未處理和經噬菌體感染的照片。本實驗所使用之大腸桿菌的起始細胞濃度為  $0.5 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ ，並用 0.5ml 的噬菌體來感染大腸桿菌細胞。按照表中之系列稀釋的噬菌體培養液用在此感染實驗。（本實驗任務所提供之照片標示為 A 至 H）

$A = 10^{-5}$ dilution 稀釋	$B = 10^{-5}$ dilution 稀釋
$C = 10^{-4}$ dilution 稀釋	$D = 10^{-3}$ dilution 稀釋
$E = 10^{-2}$ dilution 稀釋	$F = 10^{-1}$ dilution 稀釋
G = neat phage 僅有噬菌體	H = E. coli lawn uninfected by phage 無噬菌體感染之大腸桿菌的塗佈培養

#### 問題 1.7

根據照片中所觀察到的溶菌斑，請計算當使用未稀釋的噬菌體溶液時，可以觀察到的溶菌斑的數目為何？

#### 問題 1.8 (3 分)

為了估計噬菌體培養液的效價，照片 A 至 H 的系列稀釋是被正確進行的。按照溶菌斑的數目，勾選(✓) 能確認噬菌體效價之最好的稀釋倍率。

#### 問題 1.9

使用所提供的資訊和你上述的答案，得出：

- A. 所使用之噬菌體為多少 pfu/ml。(4 分)
- B. 問題 1.8 所得到之最佳稀釋濃度下之感染多樣性的數值為多少？(感染多樣性的定義為噬菌體濃度除以大腸桿菌濃度的比值)(4 分)

(待續)