
2011 年第廿二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：生物化學與細胞學

總分：100 分

考試時間：90 分鐘

【說明】

本實驗包含三個實作題目：

實作一：蛋白質電泳 (35 分)

實作二：蛋白質定量 (30 分)

實作三：蛋白質純化 (35 分)

【共用設備】

照相機，分光光度計，印表機

【設備與材料】

設備	數量
1 電源供應器	1
2 電泳槽(含膠體與緩衝液)	1
3 微量吸管 P20,P200	1each
4 80 孔微量離心管管架	1
5 不鏽鋼試管架包括 6 支黃蓋 15 mL 離心管	1
6 四面試管架	1
7 15 mL 離心管附塑膠滴管	2
8 微量吸管頭	1each
9 計時器	1
10 96 孔微量盤	1
11 奇異筆與貼紙	1each
12 600mL 燒杯(裝廢液)	1
13 剪刀	1
14 雙面膠(貼結果用)	1
15 學生編號貼紙	1
16 衛生紙	1
17 微量離心機(沉澱樣本用)	1

材料	數量
1 指示染料(微量試管-L)(粉紅色試管橙色標籤)	1
2 預染蛋白質分子量指示標記(微量試管-M)(粉紅色試管橙色標籤)	1
3 未知預染蛋白質樣本(微量試管-U1 與 U2)(粉紅色試管橙色標籤)	1
4 CBG 試劑裝在 50mL 離心管中	1
5 牛血清白蛋白(BSA)濃度測定標準樣本(0.5mg/ml)(綠色試管黃色標籤)	1
6 濃度 X 與 Y 的酵素 E (綠色試管黃色標籤)	1
7 蒸餾水(微量試管 dd H ₂ O) (綠色試管黃色標籤)	1
8 蛋白質樣本 (微量試管 C)(藍色試管藍色標籤)	1
9 15mL 離心管附陽離子交換色層分析管	1
10 陽離子緩衝溶液 A 與 B(各 5mL 分別裝於 15mL 綠色蓋子離心管)	1
11 Coomassie brilliant blue G-250 (CBG)試劑，分別裝於 15mL 紅色蓋子離心管，每管 1mL 並分別標記為 A1,A2,A3,B1,B2,B3)	1

實作一：蛋白質電泳 (35 分)

【簡介】

聚丙烯酰胺膠體電泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) 經常用於蛋白質研究。可以藉由蛋白質的電荷與分子量大小的差異進行蛋白質分離。一種稱為 SDS-PAGE 的技術，便是在進行電泳前在蛋白質樣本先添加一種帶負電的化學藥品，SDS。蛋白質所能結合 SDS 的量與蛋白質的大小成比例關係。因此，所有的蛋白質均具有相類似的荷質比 (charge-to-mass ratio)，因此可以忽略蛋白質本身所帶的電荷。所以，在進行 SDS-PAGE 的實驗時，影響蛋白質移動速率的最大因素便剩下蛋白質本身的分子量 (MW)。蛋白質相對移動速率 (Rf) 便可以藉由蛋白質移動距離與染料指示劑前緣的移動距離比值求出，而且 Rf 值與蛋白質分子量的對數值成比例關係。

【依序操作下列實驗並回答問題】

1. 一個已經確保可以進行實驗的 SDS-PAGE 電泳槽已經裝置完畢，同時已經添加完成電泳緩衝液。膠體中具有 10 個 well 供實驗所用。參考圖 1 所示位置，以 P20 的微量吸管吸取蛋白質樣本，置於 well 上端，並利用重力緩緩將樣本加入 well 中。
2. 如果需要練習，可以以 P20 微量吸管吸取 10 μ L 微量離心管 L(粉紅色試管橙色標籤)的指示染料於編號 1-3 或 7-10 的 well。
3. 利用 P20 微量吸管分別自含有 15 μ L 溶液的微量離心管中(粉紅色試管橙色標籤)吸取編號 M, U1, U2 的樣本各 10 μ L，分別添加到 4 - 6 號 well 中，如圖 1 所示。
4. 完成上述實驗步驟 3 時，**請舉牌**。助教會協助你將電源供應器的電壓調到 200V，

並連接電泳槽到電源供應器的連接線。電泳時間為 25 分鐘，助教會協助你操作計時器以利時間倒數。

5. 電泳完成後，**請舉牌**。助教會協助你卸下電泳槽，並取出膠體。用衛生紙擦拭膠體表面後，**貼上你的考生編號貼紙**，助教會拍下你的電泳膠體。將結果照片利用雙面膠帶貼在答案紙上(5 分)。



圖 1

【回答下列問題】

問題 1.1. (2 分)

圖 2 為 SDS-PAGE 的結果。起始點與指示劑前緣如標記所示。請問哪一端要接到電源供應器的陽極(+極)? 請在正確的答案處以 X 標記。

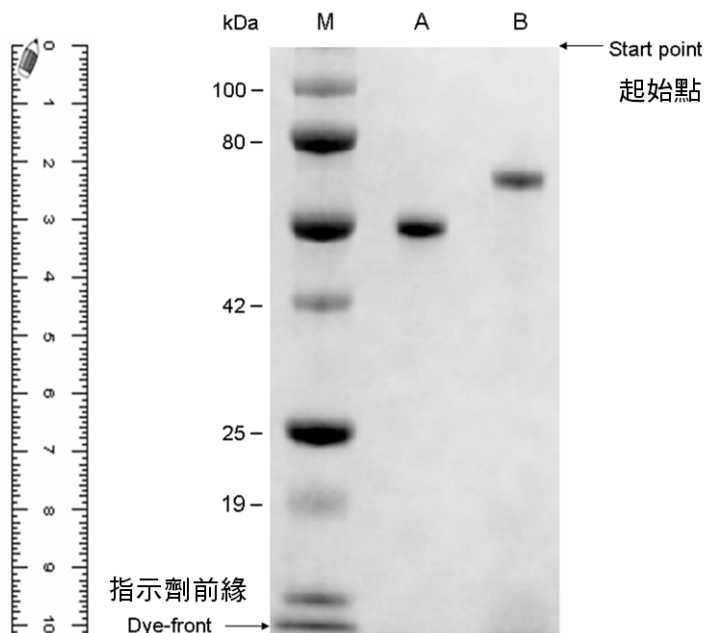


圖 2

問題 1.2. (8 分)

根據圖 2 所提供的資訊，將選取 5 個蛋白質分子量指示標記分子量的對數值與相對移動速率值(Rf)，在答案紙上所提供的方格紙上作圖。(4 分)

利用你所畫出來的圖形，對未知蛋白質 A 與 B 進行分子量的預測。(4 分)並將正確答案寫在答案紙上。

問題 1.3. (5 分)

一個分子量為 246kDa 的蛋白質複合物，該蛋白質由許多的次單元所構成，但都非共價鍵結合。經過 SDS-PAGE 分離後出現兩條分子量分別為 33kDa 與 57kDa 的蛋白質帶。該蛋白質複合物分別由多少個 33kDa 與 57kDa 的蛋白質單元所構成？請將正確答案寫在答案紙上。

問題 1.4. (5 分)

假設胺基酸的平均分子量為 110Da，請問一個 33kDa 的蛋白質分子由多少個胺基酸所構成？參與此蛋白質分子轉譯的 RNA 含有多少個核苷酸？請將正確答案寫在答案紙上。

問題 1.5. (5 分)

假設核苷酸的平均分子量為 330Da。排除內插子與終止密碼，請問轉錄一個 33kDa 的蛋白質分子的雙股 DNA(dsDNA)與蛋白質的質量比為何？請將正確答案寫在答案紙上。

問題 1.6. (5 分)

假設蛋白質 P 會與蛋白質 Q(分子量接近 1000Da)結合。結合測試可以藉由膠體移動轉移分析(gel-mobility shift assay)達成。現今有 200pmol 的蛋白質 P 與不同含量的蛋白質 Q(0 to 500 ng)混合。這些混合物利用 10% PAGE 進行分離後，以 Coomassie blue 染色後如圖 3 所示。請計算蛋白質 P 與蛋白質 Q 的莫耳比值(molar ratio)。

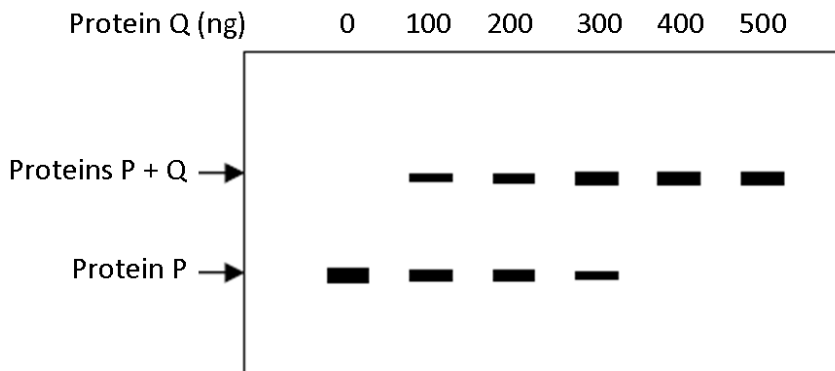


圖 3

實作二：蛋白質定量 (30 分)

【簡介】

Coomassie Brilliant Blue G-250(CBG)是一種蛋白質染劑。在不同的 pH 值下會呈現不同的顏色。酸性溶液中會呈現赭紅色，在中性或鹼性溶液中，則呈現藍色。由於蛋白質大多存在於中性環境下，同時 CBG 會轉變成藍色，當與蛋白質結合後，在 595nm 下會出現最大吸收值。樣本中，蛋白質含量越多，CBG 結合的越多，同時藍色顏色的強度愈強。換言之，595nm 吸收值會與蛋白質含量成比例。基於此原理，可以利用藍色顏色的強度來測量蛋白質濃度。

【依序操作下列實驗並回答問題】

1. 製作 BSA 濃度標準液(如表 1)，如圖 4 所示，在盤中的 A1 到 A6 的 well 中分別依序添加 0,2,4,6,8and10 μL 濃度為 0.5mg/mL 的 BSA(綠色試管黃色標籤)。重複上述實驗於盤中的 B1 到 B6 的 well 中。

如果不幸操作錯誤，可以在盤中的 A7 到 A12 well 中與 B7 到 B12 well 中重複此步驟。最後，分別利用蒸餾水調整每個 well 的 BSA 溶液體積，讓總體積為 10 μL 。

表 1

Materials 材料	Well of a microplate 微孔盤編號					
	A1&B1	A2&B2	A3&B3	A4&B4	A5&B5	A6&B6
0.5mg/mLBSA(μL)	0	2	4	6	8	10
H ₂ O (μL)	10	8	6	4	2	0
稀釋後 BSA 濃度(mg/mL)	0					

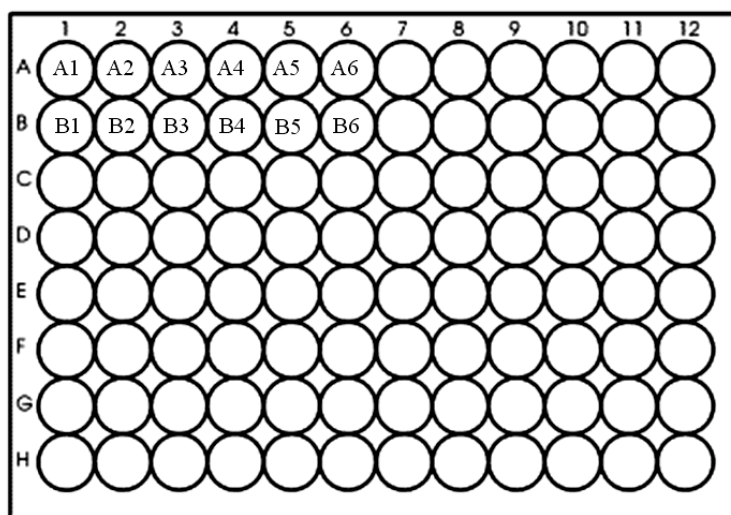


圖 4

2. 在盤中 A1 to A6 與 B1 to B6 的 well 分別添加 200 μL 體積的 CBG 試劑。混合後並觀察顏色變化。
3. 為了測量酵素 E 的兩種未知濃度，分別標記為 X 與 Y。在微孔盤中空的 well 處進行以下實驗。依序添加 0,2,4,6,8 and 10 μL 的酵素 E 未知濃度 X 與 Y。並用蒸餾水調整每個 well 體積，讓總體積為 10 μL 。重複上述實驗。
4. 在步驟 3 的 well 中分別添加 200 μL 體積的 CBG 試劑。混合後並觀察顏色變化。
5. 完成上述步驟後，**請舉牌**。助教會協助你完成使用分光光度計在 595nm 下的吸光值測量。用簽字筆在印出的結果上書寫你的考生編號。
6. 回到你的座位上，將結果利用雙面膠帶貼在答案紙上。

【回答下列問題】

問題 2.1. (10 分)

計算每一個 BSA 標準液中的濃度，並填入答案紙上的表中。(5 分)

利用所計算出來的蛋白質標準液濃度(X 軸)與兩次吸光值結果的平均值(Y 軸)在答案紙上繪出標準曲線圖。(5 分)

問題 2.2. (12 分)

挑選最佳的 X 與 Y 的稀釋倍率，並將結果落在 BSA 濃度標準液範圍內的濃度，分別填入答案紙中的表裡。

問題 2.3. (8 分)

根據你所選出的最佳樣本稀釋溶液，根據上述的標準曲線圖，推算酵素 E 的未知濃度溶液 X 與 Y 的原始濃度。蛋白質濃度單位為 mg/mL。並將答案填入答案紙中。

實作三：蛋白質純化 (35 分)

【簡介】

管柱色層分析常用在蛋白質純化的應用，管柱通常分為兩種相，一種為填充固態有孔物質(稱為固定相)，管柱中裝滿緩衝溶液(稱為移動相)。待分離的蛋白質溶液將會添加在管柱頂端，並讓其藉由過濾進入固態基質(即固定相)中。在管柱的頂端會有一個稱為貯存器(reservoir)的構造，其功能是可以保存洗脫緩衝溶液(elution buffer)以便通過基質到達管柱底端，此時收集的溶液稱為洗脫液(elution)。當蛋白質與基質產生不同程度的交互作用後，蛋白質會因為物質特性不同而產生快慢不一的移動速度。因此，在不同時間下，每種洗脫液可以純化一種蛋白質(圖 5)。

離子交換色層分析術的原理是利用在特定的 pH 值下，欲分離的蛋白質會有其各自

的電荷，而將其分離。陽離子交換色層分析中，帶負電的蛋白質會被吸附在帶正電的固定相上。

當帶有陽離子的溶液通過管柱時。此時，陽離子會與固定相競爭被吸附的蛋白質，因此蛋白質就會被洗脫出來。實驗進行會先用較低濃度的陽離子洗脫緩衝溶液，最後會換成較高濃度的陽離子洗脫緩衝溶液。因此，吸附在固定相上，分別帶有不同強度電荷的蛋白質，就會依序被不同強度的陽離子緩衝溶液洗脫出。

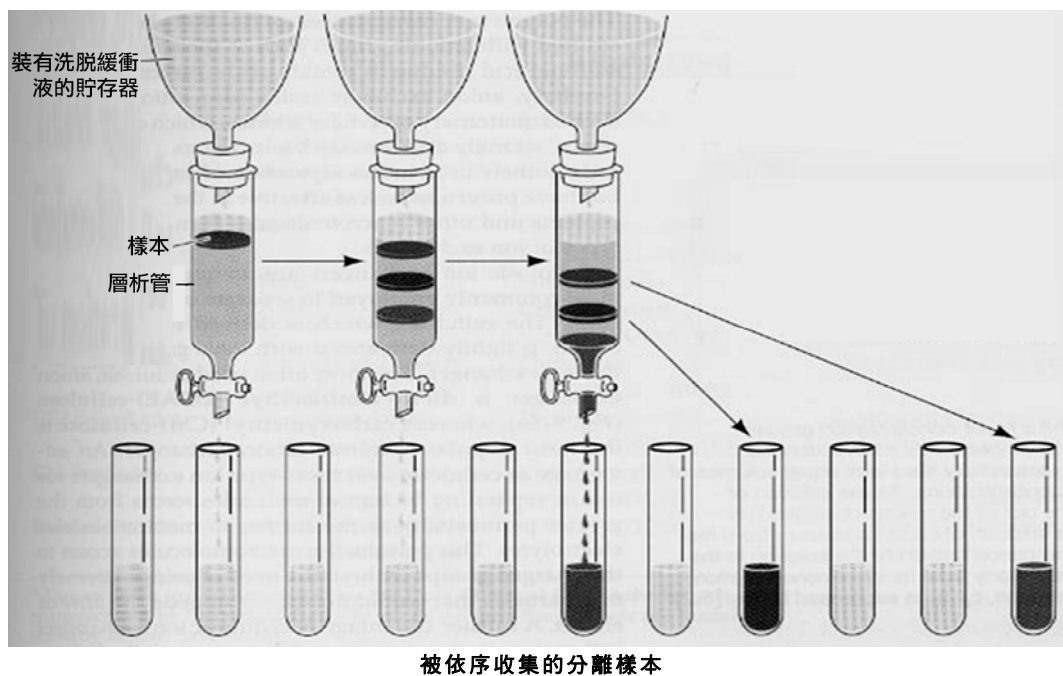


圖 5

【依序操作下列實驗並回答問題】(5分)

1. 取 6 支黃色蓋子的 15 ml 離心管，分別以奇異筆標誌 a1, a2, a3, b1, b2, b3。
2. 取一支陽離子交換色層分析管(如圖 6A)，打開管柱下方栓蓋，利用地心引力的作用，讓管柱內的溶液滴出。當液面到達管柱內碟形物(disk; 圖 6A，白色箭號處)的表面時，立刻將原栓蓋來的蓋上。如果膠體乾燥後，將會影響蛋白質的純化結果。
3. 使用 P200 的微量吸管，自微量離心管 C (藍色標記的藍色管子)中吸取 200 μL 蛋白質溶液。如圖 6B 所示，將上述蛋白質溶液沿著層析管柱管壁，緩慢注入管中。
4. 使用塑膠滴管，自藍蓋離心管中吸取 3 mL 的陽離子緩衝液 A (綠蓋)。旋開栓蓋，讓液體開始滴出。如圖 6C 所示，先將層析管置於 a1 黃色離心管中。再將陽離子緩衝液 A 沿著層析管柱管壁，緩慢注入管中。

5. 分別在標示有 a1, a2, a3 的黃色離心管中，依序收集約 1 mL 的分離洗脫樣本，每管約會耗時 2-3 分鐘。
6. 讓層析管中的緩衝液流盡。如圖 6C 所示，將層析管置於 b1 黃色離心管中。自另一支藍蓋離心管中吸取 3 mL 的陽離子緩衝液 B (綠蓋)，再將陽離子緩衝液 B 沿著層析管柱管壁，緩慢注入管中。
7. 分別在標示有 b1, b2, b3 的黃色離心管中，依序收集約 1 mL 的分離洗脫樣本，每管約會耗時 2-3 分鐘。
8. 分別自標誌 a1, a2, a3, b1, b2, b3 的黃色離心管中吸取 50 μL 的洗脫液，對應加入已添加 CBG (詳見 實作二) 並標誌 A1, A2, A3, B1, B2, B3 紅蓋離心管中，混合均勻，直到有藍色出現為止。最後觀察並比較顏色變化。
9. 當時驗完成後，**請舉牌**，助教將會協助你對實驗結果拍照，並在你的答案卷上做戳記。如果沒有戳記，Q.3.1.1.與 Q.3.1.2.將無法記分。

陽離子色層分析管柱

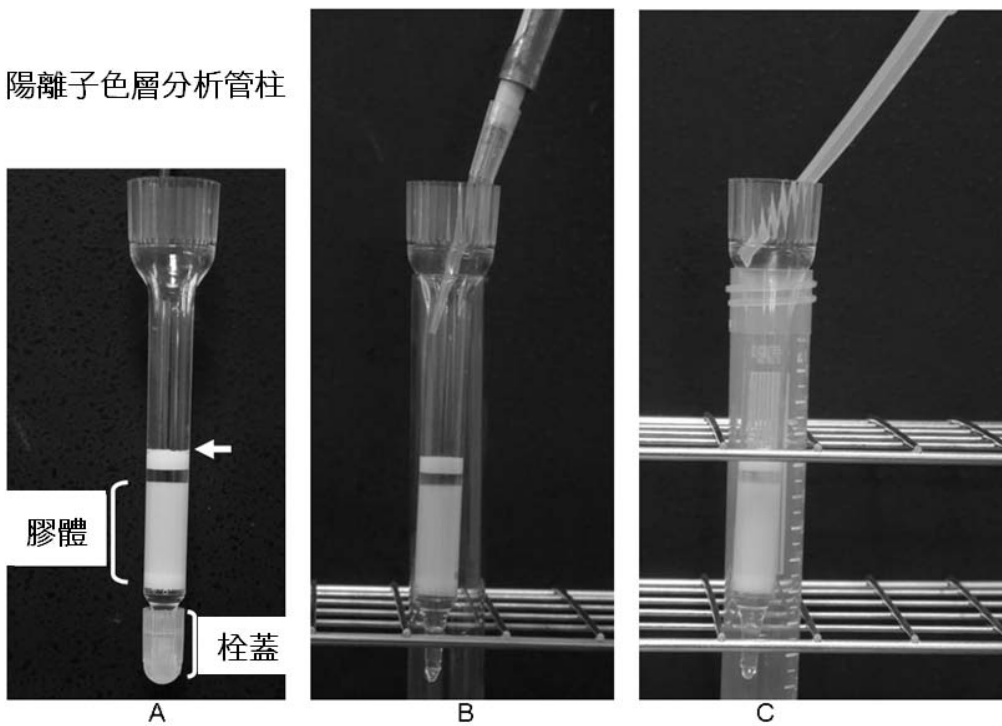


圖 6

問題 3.1 (7 分)

找出顏色最深色的離心管，將上面所標示的編號，對應到答案紙 Q.3.1.1 處，並以 X 標記 (5 分)。

何種陽離子緩衝液(A 或 B)可用來洗脫蛋白質？對應到答案紙 Q.3.1.2.處，並以 X 標記 (2 分)。

問題 3.2 (5 分)

酵素 A 是一種表面佈滿電荷的蛋白質。假設，酵素 A 能被高濃度的陽離子洗脫緩衝溶液純化出來。試問，下列有關酵素 A 電荷的敘述，何者正確？請在正確的答案處以 X 標記。

- (A) 高負電荷
- (B) 低負電荷
- (C) 零電荷
- (D) 低正電荷
- (E) 高正電荷

問題 3.3(4 分)

胺基酸的化學特性來自 R 基(側鏈)。圖 7 中有四種胺基酸，圖中 R 基以反白表示。R 基所帶電荷情形為該分子於 pH7.2 的結果。圖 7 中何種胺基酸的電荷特性最像酵素 A？請在正確的答案處以 X 標記。

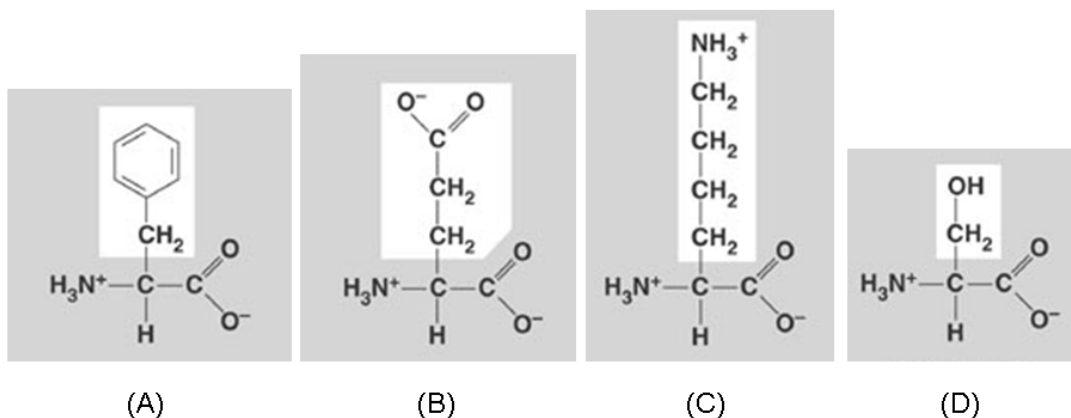


圖 7

問題 3.4(5 分)

疏水性作用力色層分析(Hydrophobic interaction chromatography)可以是利用蛋白質疏水性的特性進行蛋白質分離。在進行層析前，蛋白質樣本會先以高濃度的鹽類溶液，例如硫酸銨『(NH₄)₂SO₄』進行處理，目的在於去除蛋白質表面的水分子，此時蛋白質的疏水區域便會裸露出來。層析過程中，此種被高濃度鹽類處理過的蛋白質在通過固定相時，便會跟固定相產生疏水性作用力。疏水性作用力越強者，與固定相的吸附力越強。由於鹽類的濃度會影響蛋白質與固定相間的疏水性作用力。因此，不同濃度的鹽類溶液便可以應用於蛋白質分離。假設，酵素 A 具有強烈的疏水性，下列何種緩衝液可以應用於酵素 A 與其他蛋白質的分離？請在正確的答案處以 X 標記。

- (A) 低濃度鹽類的緩衝液
- (B) 高濃度鹽類的緩衝液
- (C) 無鹽類的緩衝液
- (D) 先使用低濃度的鹽類緩衝液再置換成高濃度的鹽類緩衝液
- (E) 先使用高濃度的鹽類緩衝液再置換成低濃度的鹽類緩衝液

問題 3.5(4 分)

假設，酵素 A 具強烈的疏水性，圖 7 中何種胺基酸在酵素 A 中比例最高？請在正確的答案處以 X 標記。

問題 3.6(5 分)

膠體過濾色層分析(Gel filtration chromatography)的原理是利用蛋白質的分子大小達到分離的效果。固定相(膠體)是利用能以鏈結模式而產生許多不同孔徑大小的聚合物所構成。小分子的蛋白質必須經過較長的路徑才能離開膠體，因此較為費時。由於大分子蛋白質無法穿過小孔徑，相對地通過膠體的時間較短。表 2 列出為各式膠體所適用分離蛋白質分子大小的範圍。酵素 A(分子量為 22kDa)與蛋白質 B(分子量為 44kDa)均為單元體蛋白(single-subunit protein)。今天想要將自含有酵素 A 與蛋白質 B 的混和液中，利用膠體過濾色層分析法將酵素 A 分離出來。請問下列何種固定相最適宜進行實驗？請在正確的答案處以 X 標記。

表 2

固定相種類	分離蛋白質分子大小的範圍 (分子量單位 Da)
G-10	<700
G-15	<1500
G-25	1,000-6,000
G-50	1,500-30,000
G-75	3,000-70,000
G-100	4,000-150,000
G-150	5,000-400,000
G-200	5,000-800,000

問題 3.7(5 分)

假設，原始樣本總蛋白質濃度為 1 mg/mL，酵素 A 活性為 0.5 單位/ mL。酵素 A 經過純化並濃縮後，總蛋白質濃度為 0.1 mg/mL，酵素 A 活性為 1 單位/ mL。請計算酵素 A 純化因子(purification factor)「純度增進倍數」，並將正確答案寫在答案紙上。

(待續)