

2010 年第廿一屆國際生物奧林匹亞競賽 -- 實驗試題(3)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

實驗三：遺傳學與細胞學

總分：50 分

可用時間：90 分鐘

第一大題 植物與昆蟲的共同演化 (35 分)

本試卷包含兩大題

第一部分 啟動子與基因表現之調控研究(20 分)

第二部分 描述並比較基因型與表現型的關係(15 分)

【材料與儀器】

個人設備列表

1. 螢光分光光度計
2. 9 支微量離心管，內含 50 μ L 分別已經標識不同植物來源之萃取液。每一種各有兩支。(2 \times 9=18 支)。透明的微量離心管適用於蛋白質濃度測定，深色的微量離心管適用於螢光測定。

標籤	處理	標籤	處理
WT-0	Plant WT + distilled water		
WT-1	Plant WT + 1 μ M hormone H 植物 (激素 H)	WT-100	Plant WT + 100 μ M hormone H
dA-1	Plant dA + 1 μ M hormone H	dA-100	Plant dA + 100 μ M hormone H
dAB-1	Plant dAB + 1 μ M hormone H	dAB-100	Plant dAB + 100 μ M hormone H
dABC-1	Plant dABC + 1 μ M hormone H	dABC-100	Plant dABC + 100 μ M hormone H

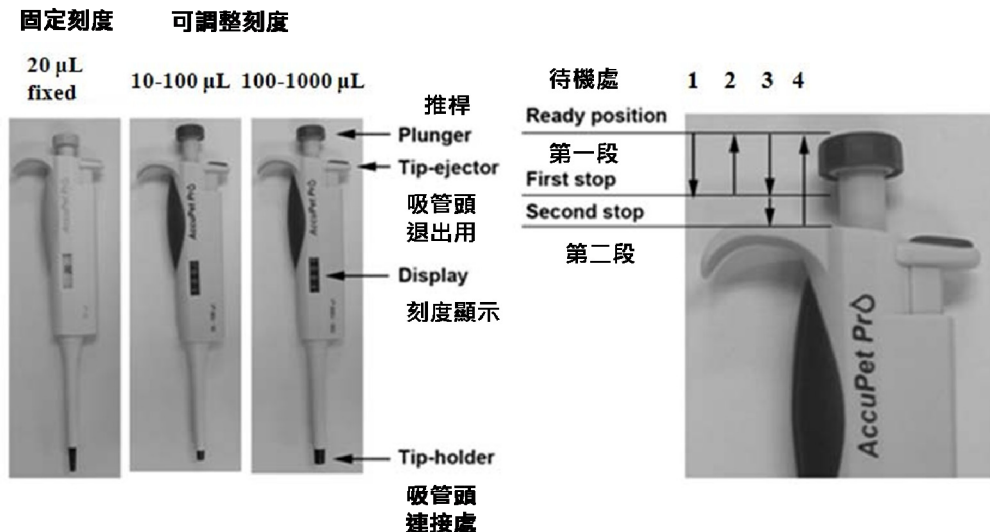
3. 一支 15 mL 塑膠管內裝 12 mL 的 Bardford 溶液 (Bardford 溶液可以用來測定蛋白質濃度)
4. 一支微量離心管內裝入 1 mL 的 1 mM MUG 溶液 (MUG 是一種螢光受質，可以用來測量 GUS 的活性)

5. 一支 15 mL 塑膠管內裝 12 mL 的 GUS 終止液 (GUS 是一種 glucuronidase 酵素，可將 MUG 轉化成 MU)
6. 2 支 DNA 片段大小標記管 (標記 M，各有 50 μ L)，8 支含有 EcoRI 處理過的 DNA 片段 (標記為 P1~P8，各有 50 μ L)
7. 有 2 支微量離心管分別標記為 GUS BL 與 Pro BL。
8. 三支微量吸管 (兩隻可調整刻度，分別為 10-100 μ L 與 100-1000 μ L。一支為固定刻度，20 μ L)
9. 黃色微量吸管頭 1 盒 (可供 10-100 μ L 與固定刻度 20 μ L 微量吸管使用)
10. 藍色微量吸管頭 1 盒 (可供 100-1000 μ L 微量吸管使用)
11. DNA 電泳設備。內含 1% 瓊脂膠體，與 1X TAE 電泳緩衝液。如果膠體有破裂不全，舉手告訴你的助教。
12. 微量吸管放置架。
13. 橡膠手套。
14. 25 支比色管用於 螢光分光光度計用。
15. 計算機、計時器、膠帶、裝有冰塊的冰桶、微量離心管管架、綠色卡片

共同儀器列表

1. 含有 UV 光的膠體分析設備

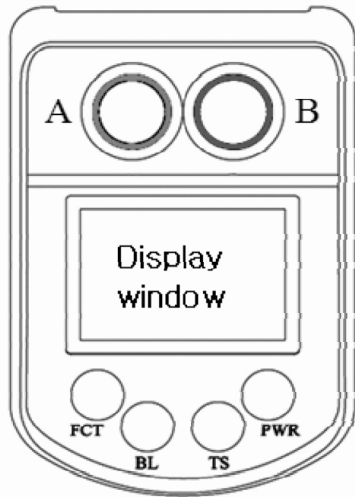
微量吸管使用法



調整模式：利用推桿順時針或逆時針旋轉調整所需要的體積。可於刻度顯示處看到所需刻度。每支微量吸管適用的體積被標記在刻度處顯示下方，請注意不要超過適用範圍。

- 使用方法：1) 確實將吸管頭與微量吸管連接緊密，將推桿壓到第一段處。
- 2) 將吸管頭移到液面下約 2~4mm 處。輕輕放開推桿，讓他回到待機處。
 - 3) 將吸管頭移到所要添加的試管中，先將推桿壓到第一段，再用力壓到第二段處，直到液體完全離開吸管頭為止。
 - 4) 將吸管頭移開，利用吸管退出用按鈕將吸管頭退出。

螢光分光光度計操作說明 (測量 MU 螢光與 蛋白質測量 [595 nm 吸光值])



A: Cuvette holder for protein measurement

蛋白質測量處

B: Cuvette holder for fluorescence of MU measurement

MU 螢光測量處

FCT: Function key

功能鍵

BL: Blank key

空白鍵

TS: Test sample key

測量鍵

PWR: Power key

開關

重要事項：不要觸碰到比色管的光路徑。

- 1) 壓下電源開關【PWR(⏻)】，啟動機器。顯示螢幕會在 嗶 聲後顯示。
- 2) 為了要進行歸零，要將 空白 的比色管插入正確的位置 (蛋白質濃度在左邊 A 處，GUS 活性測量在右邊 B 處)。使用比色管的狀態會顯示在螢幕上 (■為 A，▼為 B)

注意：歸零所使用的樣本分別放在不同的微量吸管中。GUS BL 為 GUS 活性測定歸零用，ProBL 為蛋白質濃度歸零用。

- 3) 壓下 空白鍵 (BL)，此時螢幕會顯示 [] 符號，耐心等待，直到數字出現為 0.0 為止。
- 4) 為了要測量樣本，移出 空白 的比色管，插入待測的 樣本 比色管。(蛋白質濃度在左邊 A 處，GUS 活性測量在右邊 B 處)。壓下 測量鍵 (TS)。此時螢幕會顯示 ■ 符號，耐心等待，直到數字出現為止。
- 5) 欲關機時，持續按下開關鍵 (PWR)，直到 嗶 聲出現即可。

DNA 膠體電泳操作說明

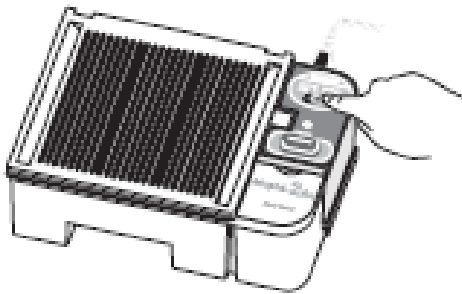
- 1) 使用 固定刻度 微量吸管 (20 μ L) 添加樣本。



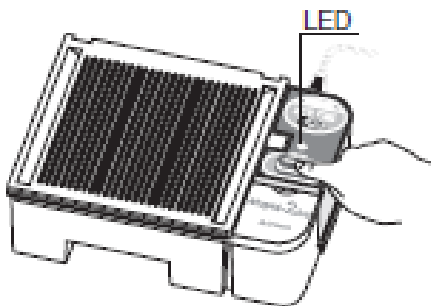
- 2) 確認開關(☐)是在 OFF，(如下圖) 後。關上蓋子。



- 3) 如下圖，將伏特 (VOLTAGE) 調整到 HALF (左邊)



- 4) 按下操作開關開始遷移
5) 如下圖，按下開關，開始電泳。



- 6) 本實驗中，當電泳時間 達到 30 分鐘時，即可將電源關閉。

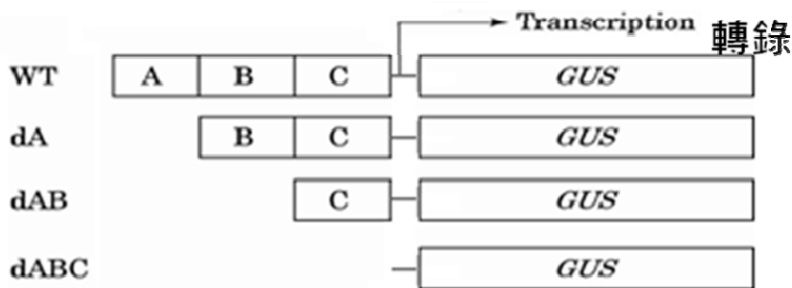
第一部分 使用已融合 GUS 報導基因之 X 基因進行 激素對基因表現的影響，並分析啟動子中激素反應單元的特性 (20 分)

植物對於激素的反應是依靠 激素反應基因 進行。在基因的啟動子位置，一段被稱為 cis - 單元的 DNA 序列會反應基因表現的調控時間與表現量。基因調控受制於該區

域是否受到 激素反應 轉錄因子 的活化或抑制。

本試題單元，將檢視阿拉伯芥中的激素，透過 基因反應途徑 對 X 基因的調控。為找出啟動子中激素反應之區域以了解 X 基因受激素調控之模式，吾人把 X 基因 的啟動子位置分別區分成 A~C 三種 (其中分別代表三種功能型式，增強者，沉默者與最少表現者的啟動子)

如下圖所示，能表現 GUS (β -glucuronidase) 報導基因之 X 基因 植入不同的基因轉植植物 阿拉伯芥中，來代表上述的三種不同功能。當 X 基因被活化時，GUS 便能被表現出來。而 GUS 又可以將 MUS 轉化成 MU，此時利用螢光分光光度計檢測 MU 的螢光量便可得知 X 基因的活性。



帶有四種不同方式構築之報導基因的基因轉植阿拉伯芥

問題 1 (3 分)

第一個實驗有兩種目的：(1) 找出含有 激素反應 *cis* - 單元的啟動子區域，(2) 研究不同濃度的激素 H 對 X 基因表現的影響。所有的轉植基因植物 (WT, dA, dAB 與 dABC) 已分別處理過濃度為 $1\mu\text{M}$ 或 $100\mu\text{M}$ 的激素 H。並萃取植物萃取物用以評估 GUS 的表現量，(萃取物處理方式參考材料與方法的表格)

利用下節敘述的方法，分別測量 $50\mu\text{L}$ 植物萃取物的 螢光吸光值 與 595 nm 的吸光值。根據測量的結果，分別計算每個萃取物中的 MU 的含量 (nmole MU/ $50\mu\text{L}$ 植物萃取液)，蛋白質濃度 ($\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ 植物萃取物) 與 GUS 活性 (nmole MU/ $\mu\text{g protein}/\text{min}$)。並將結果記錄於答案紙的 <表一> 中，並依序回答 Q1.1, Q1.2 與 Q1.3。

測量螢光與 MU 的含量

- 1)-1 打開螢光分光光度計開關，取出 $500\mu\text{L}$ 標記為 GUS BL 的樣本進行 螢光 歸零。
- 1)-2 各取一支新的微量離心管，依序分別加入 $50\mu\text{L}$ 標記為 WT-O 【WT-O 為第一管，其他管順序則依表中順序添加】與 材料表格中 所列經激素處理過

後的基因轉植植物萃取液，加入 50 μL 的 1 mM MUG 溶液。輕彈 離心管壁，均勻混合 上述兩種溶液。混合好的的樣本置於冰上保存，**直到所有樣本處理完畢後**，再進行下一步驟。

- 1)-3 在 室溫下 培養上述混合樣本，反應時間為 10 分鐘，必須 **精準**。
- 1)-4 加入 **900 μL** 的終止液 (1M 碳酸鈉 在 GUS 萃取液中) 【WT-O 為第一管，其他管順序則依表中順序添加】。輕彈 離心管壁，均勻混合 上述兩種溶液。
- 1)-5 分別自上述混合溶液中各取出 500 μL ，以螢光分光光度計測量 螢光含量。
- 1)-6 利用下列公式計算 MU 的含量。將螢光讀數記錄於答案紙中的 <表一>，並用它來計算 MU 的含量。每個數值分別代表 50 μL 植物萃取物所產生的 MU 量。

$$Y = 0.04 X + 2.5$$

Y: 植物萃取液中 MU 的產生量 (nmoles 50 μL 植物萃取液)

X: 步驟 1)-5 中所測得的螢光量。

以 595 nm 吸光值 測量蛋白質含量

- 2)-1 打開螢光分光光度計開關，取出 500 μL 標記為 Pro BL 的樣本進行 歸零。
- 2)-2 各取一支新的微量離心管，分別依序加入 50 μL 標記為 WT-O 或是 材料表格中 所列經激素處理過後的基因轉植植物萃取液，加入 950 μL 的 Bradford 溶液。輕彈 離心管壁，均勻混合 上述兩種溶液。將混合好的的樣本於室溫下反應 5 分鐘。
- 2)-3 分別自上述混合溶液種各取出 500 μL ，以螢光分光光度計測量 595 nm 的吸光值。
- 2)-4 利用下列公式計算 蛋白質 的含量。將 595 nm 吸光值記錄於答案紙中的 <表一>，並用它來計算 蛋白質 的含量。每個數值分別代表 50 μL 植物萃取物蛋白質含量。

$$Y = 98X + 2.8$$

Y: 混合物中 蛋白質 的含量 ($\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ 植物萃取液)

X: 步驟 2)-3 中所測得的 595 nm 吸光值。

GUS 活性計算

- 3)-1 此酵素反應時間為 10 分鐘 (參考步驟 1)-3)。利用 <表一> 中所記錄的結果，計算 GUS 活性，單位為 nmole MU/ μg protein/min。

注意：<表一> 分數為 9 分。

問題 1.1 (4 分)

根據 <表一> 的結果，在問題 1.1 的表格中，正確處打勾(✓)。

注意：刺激反應：X 基因表現量達 3 倍或以上。

無反應：X 基因表現量 3 倍以下。

問題 1.2 (6 分)

根據 問題 1.1 的結論，推論出 cis- 單元 (A~C)，分別隸屬於何種調控功能 (增強者，沉默者與最少表現者)。在問題 1.2 的表格中，正確處打勾 (✓)。

問題 1.3 (1 分)

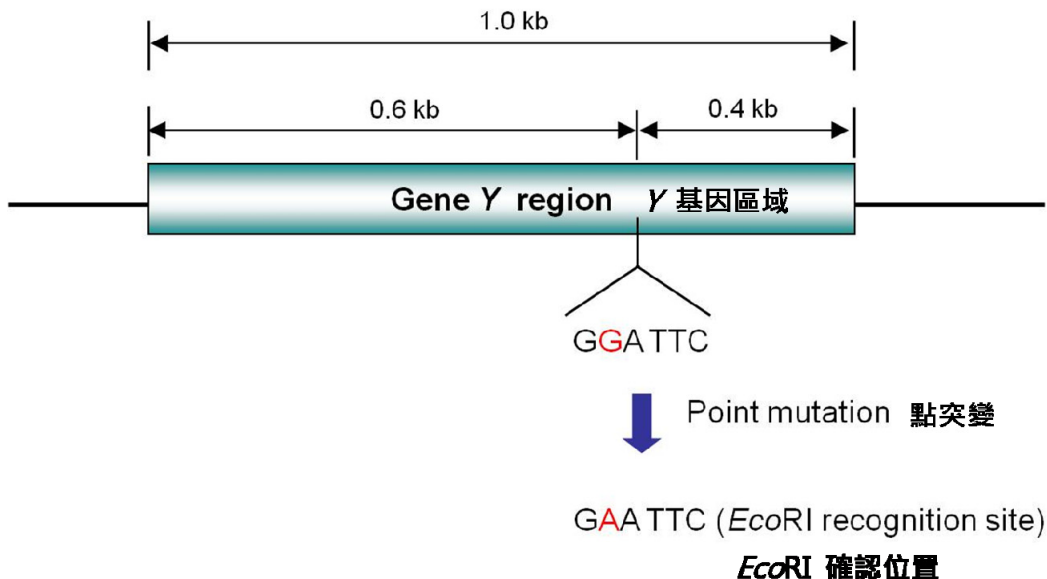
100 μM 濃度的 激素 H 處理下，X 基因的表現調控為何？根據 <表一> 的發現，決定 激素 H 的作用模式。在問題 1.3 的表格中，正確處打勾 (✓)。

第二部分 基因型與表現型相關分析，並利用哈溫定率計算基因池中的基因頻率。(15 分)

植物對於激素的反應是依靠 激素反應基因 進行。在基因的啟動子位置，一段被稱為 cis - 單元的 DNA 序列會反應基因表現的調控時間與表現量。基因調控受制於該區域是否受到 激素反應 轉錄因子 的活化或抑制。

問題 2

Y 基因會表現一轉蛋白調節植物生長。下圖為 基因體 DNA 中 Y 基因的區域，其中含有一個點突變。



現有 8 種可能為同型合子 (YY and yy) 或 異型合子 (Yy) 基因型之植物，分別表現出野生型與矮莖型之表型 (Y : 野生型對偶基因, y : 突變型對偶基因。並未特指出 Y 或 y 是顯性或隱性)。為了分析這些植物的基因型，利用 PCR 技術放大 Y 基因 1 kb 片段。這些片段分別以 $EcoRI$ 限制酶切割，因為 $EcoRI$ 會認識 GAATTC 序列並切割，且在此片段中並沒有起其它的 $EcoRI$ 切點。利用下列步驟，進行電泳並分析 $EcoRI$ 切割 PCR 產物的實驗。

利用電泳進行 Y 基因的基因型檢測

注意：全程都要戴上手套操作 !!!

- (1) 全部共有 10 支樣本，分別裝在微量離心管中。兩支 DNA 大小片段標記管 (M)，8 支分別來自不同植物，並含有 $EcoRI$ 處理過的 PCR 產物樣本 (分別標記為 P1~P8)。

由左邊開始，依序加入樣本 **M, P1~P8, M**。每個樣本各取出 20 μ L，利用固定刻度微量吸管，依照上面的順序，分別加入已經準備好的瓊脂膠體中的樣本槽中。注意每個樣本都要換新的微量吸管頭。

注意：DNA 大小片段標記分別為 0.4, 0.6 與 1.0 kb。DNA 注入緩衝液與 DNA 染料已經在每個微量試管中添加完畢。

- (2) 參考 DNA 電泳操作步驟，將蓋子裝上電泳槽，打開開關，開始進行電泳。
注意：電泳開始時，請注意輸出 (output) 的指示燈是亮的，同時要有氣泡在白金電極處生成。
- (3) 電泳時間為 30 分鐘，電壓為 HALF。
注意：電泳開始時，請注意輸出 (output) 的指示燈是亮的，同時要有氣泡在白金電極處生成。

注意：電泳進行時，請回答第二大題 !!!

- (4) 電泳完成後，關掉開關。舉起 綠色卡片 請求協助進行膠體拍照。
注意：助教會帶來一個膠體移轉盒，要確認你的 學生編號 要在盒子上。
- (5) 當你收到你的膠體照片，利用膠帶將它貼在 答案紙 Q2.1 位置上。並將 P1~P8 的位置標示清楚。
- (6) 在答案紙 問題 2.2 有出現與 DNA 大小片段標記相同位置正確處打勾(✓)

問題 2.1 (3 分)

在答案紙問題 2.1 處貼上電泳照片。並標示出 P1~P8 的位置。

問題 2.2 (4 分)

分別確認每種植物 基因 Y 的 DNA 片段大小，與基因型 (YY, Yy 或 yy)。在答案紙 問題 2.2 中正確處打勾 (✓)。

問題 2.3 (2 分)

根據 問題 2.2 基因型與表現型的說明，推論突變的特性。答案紙 問題 2.3 中正確處打勾 (✓)。

問題 2.4 (2 分)

將 植物 1 與 植物 3 進行雜交 (根據 問題 2.2)，子代中矮莖的比例為若干？將正確答案填入答案紙中。

問題 2.5 (3 分)

問題 2.2 中的 8 種植物代表一種族群，如果這個族群產生 10,000 子代，則異型合子而且是矮莖的子代比例為若干？(前題是這個族群是在哈溫平衡狀態)

第二大題 觀察固定過的裸麥花粉囊中減數分裂細胞 (15 分)

【材料，器械與工具】

1. 光學顯微鏡，物鏡倍率分別為 4X, 10X, 40X, 與 100X 各 1
2. 裝有固定過的裸麥花粉囊小瓶 2 個
3. 探針 1 組
4. 載玻片與蓋玻片各 5 個
5. 直徑 7 公分濾紙 3 張
6. 鑷子 1 支、磁磚 1 個、6 公分培養皿 1 個、醋酸洋紅溶液附滴管 1 支、鉛筆 1 支、橡皮擦 1 個、拋棄式塑膠滴管 1 支、紅色卡片 1 張

【背景說明】


利用光學顯微鏡觀察裸麥花粉囊中的減數分裂細胞。花粉囊是減數分裂中的特定階段。花粉囊已經保存在 70% 酒精中。


【必需品 - 回顧】


利用顯微鏡觀察減數分裂中的花粉細胞。利用 問題 3.2 的範圍內，繪出在 **400X** 放大倍率下的減數分裂細胞。

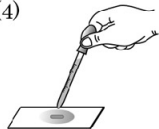
【步驟】

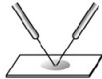
- 1) 實驗進行前，先確認瓶中裝有 **2 個** 花粉囊檢體。
- 2) 自托盤中取出磁磚，將 載玻片 放在上方。
- 3) 在 100X 的放大倍率下，找到**至少 1 個** 正在進行減數分裂的細胞。將倍率換到 **400X**，觀察並繪製 **1 個** 減數分裂細胞，確認該細胞在視野的 **正中央**，觀察結果並繪製在 問題 3.2 的範圍內。當你繪製完成後，舉起你的 **紅色卡片**，助教會過來幫你拍照。

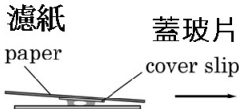
(1)  Invert the vial containing two preserved anthers 2-3 times. Then, gently pour the vial into a small petri dish.
來回翻轉 2-3 次含有花粉囊的小瓶，之後將它們倒入培養皿中


(2)  Take one anther out of petridish with forceps and put it on a slide glass.
取出 1 個花粉囊，放在載玻片上


(3)  載玻片
slide glass
Put one drop of acetocarmine solution onto the anther.
吸取 1 滴醋酸洋紅，滴在花粉囊上

(4) 

(5)  Squash the anther with dissecting needles for 1-2 min. Take out debris (such as anther wall cells) with forceps by touching it onto the filter paper.
利用探針來回擠壓花粉囊約 1-2 分鐘。移除雜質(利用鑷子夾出，並置於濾紙上)

(6)  濾紙
filter paper
蓋玻片
cover slip
Cover the squashed cells with a cover slip. Put a filter paper covered with a cover slip.
蓋上蓋玻片後，再放上濾紙。濾紙要蓋過蓋玻片

(7)  Gently press the filter paper down with your thumb.
利用拇指輕壓蓋玻片

(8)  Observe your slide specimen under the microscope.
於顯微鏡下觀察結果

觀察固定過的裸麥花粉囊中減數分裂細胞之實驗流程

【注意事項】

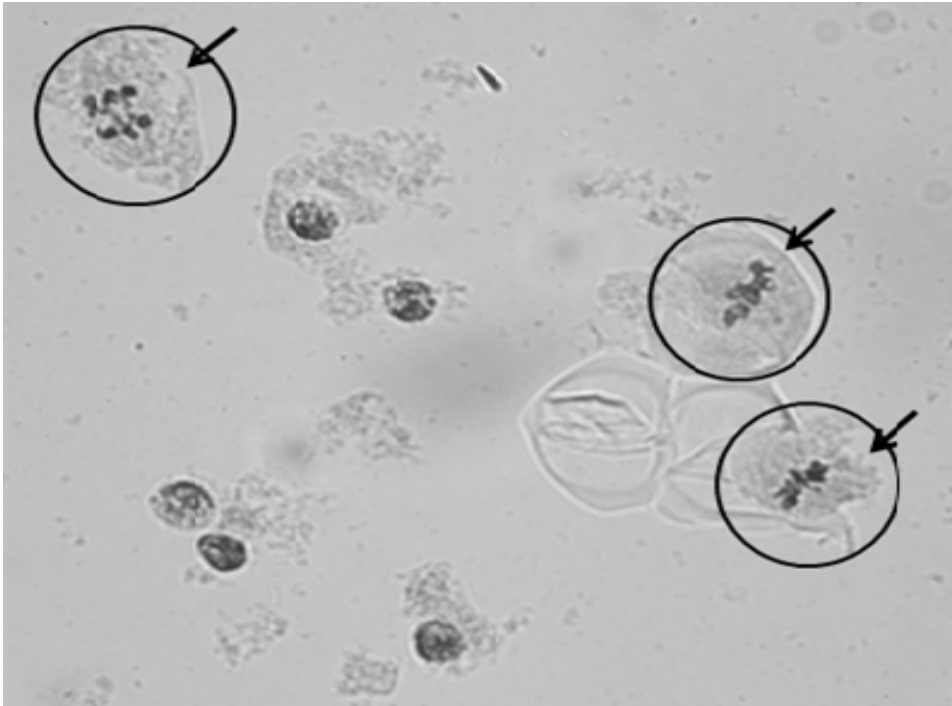
1. 步驟 (1) 中，如果花粉囊沒有倒出來，將溶液裝回瓶中，利用拋棄式塑膠滴管將花粉囊吸出。
2. 注意，不要在步驟 (2) 時將花粉囊捏破。
3. 步驟 (3) 時可以使用濾紙將過多的 70% 酒精吸除。
4. 步驟 (7) 時，不要壓得太猛，不然會將細胞壓破，不然就是壓破蓋玻片。

5. 每個人有兩個花粉囊，如果第一個沒有做的很好，得到好的影像，重複上述步驟再操作一次。注意，你的實驗有時間限制。

問題 3 (2 分)

回答下列問題。

- * 特別注意：你將會在顯微鏡下看到兩種細胞型態，圈起來的是減數分裂細胞，其他的是花粉囊壁細胞。



400X

圖 問題 3：顯微鏡下觀察到的減數分裂細胞範例。

問題 3.1 (1 分)

在花粉囊中哪些細胞會進行減數分裂？在答案紙中正確處打勾 (✓)。

問題 3.2 (8 分)

將倍率換到 400X，觀察並繪製 1 個減數分裂細胞，圖上不要做任何的標記。

重要事項：拍照時，必須確認該細胞在視野的正中央。

問題 3.3 (4 分)

你觀察到的細胞位於減數分裂週期的哪個階段？在答案紙中正確處打勾(✓)。

問題 3.4 (2 分)

你觀察到的細胞在減數分裂週期中，DNA 含量為若干？花粉囊壁細胞的 DNA 含量為若干？在答案紙中正確處打勾(✓)。

(待續)