

2009 年第廿屆國際生物奧林匹亞競賽

--實驗試題(2)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

實驗三：遺傳學(續)

第三部分 眼色素分離 (18 分)

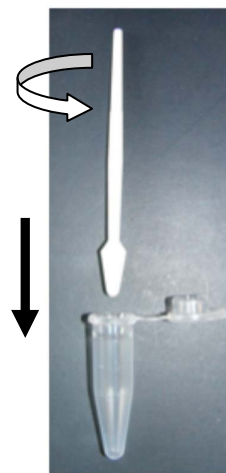
【材料與器材】

1. 1.5 ml 試管(8)及(9)，內含有果蠅眼色素的抽取液，1 組(1 備用)
2. 空的 1.5 ml 試管(10)及(11)，1 組(1 備用)
3. 研磨均質器(在 15ml 試管中)，2 支(1 備用)
4. 離心機，1 檯
5. 微量吸管(P20)，1 支
6. 微量吸管頭(P200 及 P20 用)，1 盒
7. 空的 1.5 ml 試管(蓋子上無標示)，2 個(2 備用)
8. 纖維/塑膠片，1 片(1 備用)
9. 微量吸管(P2)，1 支
10. 微量吸管頭(P2 用)，1 盒
11. 50 ml 試管內含溶劑，1 支
12. 50 ml 試管的試管架，1 支

【步驟】

1. 選取工作 2 中的紅眼果蠅及白眼果蠅各 5 隻(雌或雄均可)，用 2 支鑷子取下其頭部。
* 注意千萬不要壓壞了果蠅眼睛及腹部。

2. 用鑷子將紅眼果蠅頭部放置於試管(8)，將白眼果蠅頭部置於試管(9)，紅眼果蠅身體置於試管(10)，白眼果蠅身體置於試管(11)。試管(10)及(11)將會在工作 5 中使用。
3. 在試管(8)及(9)中各插 1 支研磨均質器，用均質器以反覆旋轉並壓擠方式研磨果蠅頭部，不同樣本應用不同均質器研磨。



4. 將試管(8)及(9)以 14,000 rpm 離心 3 分鐘(看本試卷最後所附「離心機使用規則」，若需要幫助時，可問助教。)
5. 將試管(8)及(9)上清液 5 μ l 移入新試管中。
6. 注意纖維/塑膠片的正反面，較短的邊

為頂端與底端，用塗有纖維素的毛面作實驗，以鉛筆在纖維面的頂端寫下你的學生編號。

7. 先用 1μl 紅眼果蠅頭部萃取液，點在左邊的 1/3、約距離膠片底端 2 cm 處，千萬不要用筆在纖維素那面畫線，那會破壞纖維素的膜。
8. 然後用 1μl 白眼果蠅頭部萃取液，點在右邊 1/3、約距離膠片底端 2 cm 處。
9. 當墨點一乾即將膠片放進 50 ml 試管中，讓膠片的底部能接觸到溶劑，但千萬不要讓墨點接觸到溶劑，將蓋子栓緊。開關蓋子要快以減少氣體的揮發。
10. 將試管放在試管架上保持直立，等待溶劑的展開，等待的時間可以先作其他部分，但繼續之前你應先讀步驟 11。
11. 當溶劑前緣開展到試管上 30 ml 的刻度時，將膠片取出放在擦手紙上等待被風乾，栓緊管蓋。膠片乾時請舉手(叫助教收膠片以評估結果) **(18 分)**

第四部分 色層分析判讀 (14 分)

【簡介】

果蠅複眼中的某些色素無法以人眼看見，但若在 UV 燈下就可被辨識出來。圖 1 的例子顯示眼色素經色層分析後在 UV 燈照下的記錄。注意樣本不只包括 WT (野生型) 及 *w* (白眼)，也包括 *se* (黃眼)、*bw* (棕眼) 及 *cn* (朱紅色眼)。

果蠅眼色素的產生有兩條路徑，*ommochrome* 及 *pteridin* 路徑。若所有二路徑形成的色素均能正常轉移到複眼中，即

造成野生型眼睛顏色。若 *ommochrome* 及 *pteridin* 的色素均缺乏則為白眼。兩路徑中只有 *pteridin* 路徑的色素及其中間產物能以本實驗中的色層分析分開。

色層分析時每種色素的移動決定於其化學特性、對溶劑中的溶解度及溶劑移動的距離。一特定色素移動的距離，決定於色層分析展開的時間，但每種色素的 Rf 值是一定的，可由下列公式計算：

$$Rf = \frac{\text{由基線到墨點中心的距離}}{\text{由基線到溶劑前緣的距離}}$$

表 1、總結果蠅複眼中各色素在 UV 燈下的顏色及 Rf 值。

Code 代碼	Name 名稱	Color under UV lamp UV 燈下的顏色	Rf value Rf 值
A	2-amino-4-hydroxypteridin	blue	0.57
B	biopterin	blue	0.61
C	drosoppterin	orange	0.21
D	sepiapterin	yellow	0.52
E	isoxanthopterin	yellow	0.69
F	xanthopterin	green-blue	0.38
G	isosepiapterin	violet-blue	0.25

問題 4.1 (5 分)

由表 1 中選出對應於圖 1 色層分析中各墨點的色素，將代碼寫在答案卷的表中。突變型 *pteridin* 眼色素之組成與野生型有何不同？由圖 1 色層分析估計各

色素的大約含量多寡寫在答案卷表中，如果比野生型多出非常多的色素，用“++”表示，若色素含量與野生型相似，則用“+”表示；色素不存在者，用“-”表示。

問題 4.2 (9 分)

由圖 1 眼睛顏色及色層分析的結果判斷，*se*(黃眼)、*bw*(棕眼)及 *cn* (朱紅色眼) 各有何異常？將代碼寫在答案卷的表中。

- A. Ommochrome 色素絕不存在
- B. 所有 pteridin 色素均不存在、但 ommochrome 色素一定存在
- C. ommochrome 及 pteridin 色素均不存在
- D. pteridin 色素的組成與野生型的不同

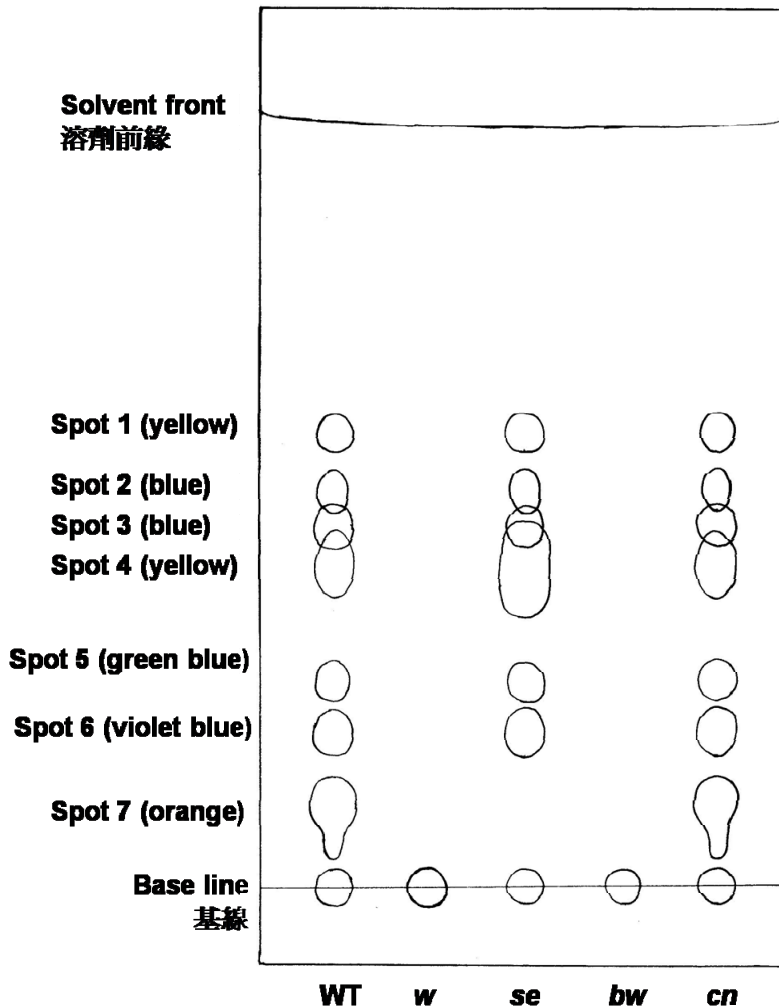


圖 1、野生型與突變型果蠅眼色素的色層分析

第五部分 白眼蛋白質分析 (24 分)

【材料與器材】

1. 1.5ml 試管 A：蛋白質萃取液，1 支
2. 1.5ml 試管(從工作 3(10)與(11)來源，各 2 支)
3. 研磨均質器(在 1.5ml 試管中)，2 支(1 備用)
4. 電泳設備，1 檯
5. 微量吸管 (P200)，1 支
6. 微量吸管 (P20)，1 支
7. 微量吸管頭(P200 及 P20 用)，1 盒
8. 1.5ml 試管架，1 個
9. 1.5ml 試管 C：蛋白質電泳標記，1 支

【蛋白質萃取與電泳】

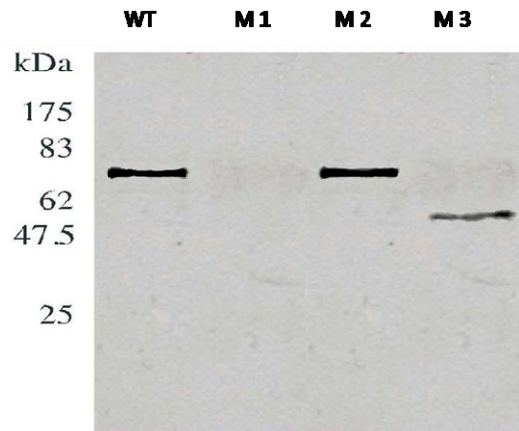
1. 分別將 50 μ l 蛋白質萃取液 (試管 A) 添加到來自工作 3 的(10)號試管(紅眼果蠅的身體)及 (11) 號試管 (白眼果蠅身體)中。用研磨均質器磨碎果蠅身體，但野生型與突變型不可混用。
2. 於 14,000 rpm 下 離心 3 分鐘，將上清液移到新的 1.5 ml 試管中。(使用方法參考本試題最後面的離心機使用法或請助教協助)
3. 助教已經幫你把膠體與電泳設備裝置完成。
4. 依照分子量標記、紅眼、白眼的順序(由左到右)，在膠體的中間處加入樣本。每個樣本添加 5 μ l。請在添加樣本完成時舉手。助教會協助你完成裝置並跑電泳。
5. 跑膠至少經 5 分鐘後，再舉手請助教

來協助膠體攝影以供評分(18分)。

請在照相機的視窗下與助教確認影像。

蛋白質電泳結果分析

M1, M2 與 M3 果蠅為不同眼睛顏色的突變種。當電泳完成後，膠體上的蛋白質被轉印到尼龍紙上，並以抗體免疫染色來進行白眼蛋白的辨識。結果如下圖所示：



問題 5.1 (3 分)

下列何種眼色素基因的缺陷引起 M1、M2、M3 電泳結果？在答案卷中填 A、B 或 C。

- A. *white* 基因 mRNA 啟動位置被刪除，基因無法表現。
- B. 白眼蛋白的編碼區出現終止碼突變，造成 C 端有 20 kDa 的氨基酸序列無法轉譯
- C. 雖有正常白眼蛋白合成，但合成 ommochrome 色素的基因有缺陷。

問題 5.2 (3 分)

在下列的 A、B、C 中，選擇會引起與 M1, M2 及 M3 相同外表型的另一種眼色素基因缺陷，填在答案卷中。

- 因染色體轉位使 *white* 基因的編碼序列與另一基因的編碼序列融合，造成帶有一異常序列的蛋白，保留了抗體活化位但分子量約低 30 %。
- 因 *white* 基因的蛋白質編碼區發生單一鹼基取代，造成一個氨基酸的不同，但以改變後蛋白質生成之抗體其免疫活性並未喪失。
- 染色體中出現包括 *white* 基因的整段刪除。

【離心機使用說明】

有需要時可向監考人員求助

- 壓下操作面板右上方之 OPEN 按鍵(圖 A-1)打開離心機的外蓋(圖 A-2)。
- 離心機的轉子上有一塑膠蓋子(圖 B-3)，先用一手固定塑膠蓋子，另一手以逆時鐘方向鬆開中間的黑色旋鈕(圖 B-4)以打開塑膠蓋子。
- 離心機的轉子內有 24 個插孔(圖 C)，將樣本以對稱方式放入插孔內，注意樣本間的平衡。
- 以順時方向轉動黑色旋鈕(圖 B-4)，將塑膠蓋子鎖緊在離心機的轉子上。
- 輕輕蓋上離心機的外蓋，當外蓋完全蓋上時，你會聽到「嗶」聲。
- 離心機的轉速(140×100 轉/每分鐘)及轉動時間(3 分鐘)已預先設好，按下 DISP/CE 按鍵，在視窗(圖 A-5)及(圖 A-7)上確認轉速及轉動時間，確認後按

下 START 按鍵開始離心。

- 當離心完成後，外蓋(圖 A-2)會自動解除鎖定，打開外蓋，一手固定塑膠蓋子，另一手以逆時鐘方向鬆開中間的黑色旋鈕(圖 B-4)以打開塑膠蓋子。
- 避免影響沈澱，小心取出樣本管並放在試管架上。
- 重新蓋上塑膠蓋子(圖 B-3)，以順時方向鎖緊黑色旋鈕(圖 B-4)，將外蓋蓋上。

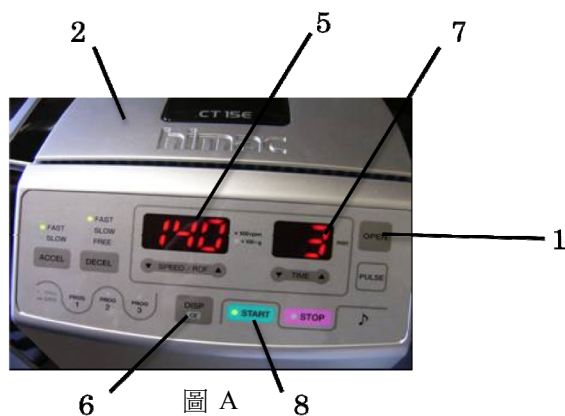


圖 A



圖 B



圖 C

實驗四：細胞生理學

總分：91 分

總操作時間：90 分鐘

第一部分 細胞週期的研究 (61 分)

【簡介】

在許多的單細胞，基因的複製與複製會受到細胞成長所控制。當外界環境改變時，例如不適細胞生長或緊迫發生時，遺傳物質的互換會藉由相同的細胞型態進行，如接合生殖(cell conjugation [mating])。這些生命的基本現象會受到細胞本身與細胞外條件所控制。為了瞭解這些現象，科學家會藉由許多模式生物的突變種來進行研究。細胞分裂的研究便藉由酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的突變種來進行。野生型的酵母菌，細胞分裂會藉由重複性的細胞增長而達成。另一方面，當細胞受到緊迫時，如飢餓，會讓細胞停留在週期的某個階段。或者是當接合生殖完成後會有孢子形成。

接下來有關細胞增殖的實驗，都以酵母菌 (*S. pombe*) 作為實驗材料。

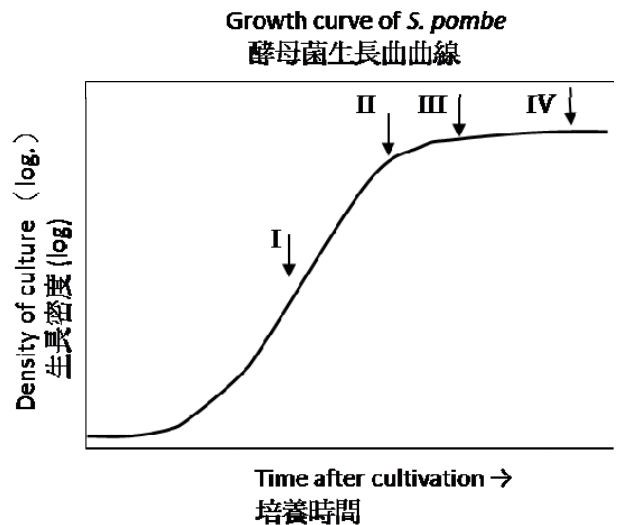
【材料與設備】

1. 固定過的野生種； a
2. 固定過的野生種； b
3. 固定過的野生種； c
4. 固定過的野生種； d
5. 微量試管架，1 個
6. 顯微鏡，1 檯
7. 細胞盤，1 個
8. 計數器，1 個

9. 1.5ml 微量吸管，3 支
10. 載玻片，1 盒
11. 蓋玻片，1 盒
12. 微量吸管 (2-20 μ l)，1 支
13. 微量吸管頭，1 盒
14. 固定過的 25°C 下野生種； W25
15. 固定過的 36°C 下野生種； W36
16. 固定過的 25°C 下 *cdc25* 突變種； M25
17. 固定過的 36°C 下 *cdc25* 突變種； M36
18. 染過 Calcofluor 與 DAPI 的細胞照片，1 張

【A 部分】

酵母菌野生型單倍體 ($n=1$) 在 25°C 下培養的生長曲線，如下圖。在箭頭所示的四個時間點，分別取出培養基。培養基 a, b, c 與 d，將分別與時間點 I, II, III 或 IV 進行配對，但並非培養基 a 一定對應時間點 I，以下雷同。利用顯微鏡觀察培養基，並回答下列各題。觀察前請將微量試管混合均勻。



問題 1.A.1 (2×2 分)

觀察並比較樣本 a 與 b。回答下列問題。(2x2=4 分)

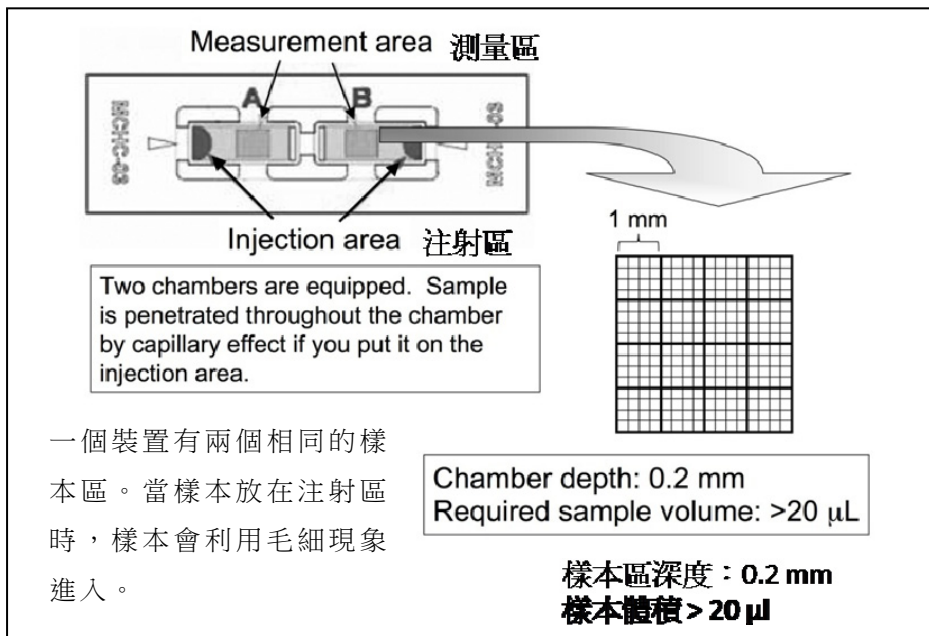
1. 何種樣本細胞較圓？
2. 何種樣本細胞有較高的細胞質分裂族群？

細胞質分裂的定義自隔壁(septa)出現開始到分成兩個子細胞為止的時間。

問題 1.A.2 (6 分)

依照下列的指示，計算樣本 a 中，每 ml 培養基中的細胞數目。未分裂完成的細胞只能計算為一個。將答案寫在答案紙上。

注意：一位學生只能有一個細胞計數盤，每個細胞計數盤有兩個樣本區，因此可以計算兩次。(6 分)



一個裝置有兩個相同的樣本區。當樣本放在注射區時，樣本會利用毛細現象進入。

問題 1.A.3 (5 分)

細胞質分裂的定義是隔壁 (septa) 出現開始到分成兩個子細胞為止的時間，計算樣本 a 的細胞質分裂百分率。在視野下，至少要計算超過 100 個細胞。並將計算的細胞總數與細胞質分裂的百分率寫在答案紙上。

問題 1.A.4 (4 分)

估算 樣本 a 在對數期時，完成一個細胞週期所需的時間。

若算隔壁 (septa) 形成開始到完全分裂成兩個子細胞所需的時間為 25 分鐘，請估算樣本 a 的細胞週期時間為何？請將計算公式與答案寫於答案紙上。

問題 1.A.5 (3 分)

樣本 c 為下列何種時期？

- A. 生長期
- B. 孢子形成期
- C. 接合生殖期
- D. 大多數的細胞已經死亡
- E. 進行減數分裂

問題 1.A.6 (8 分)

請將培養基 a, b, c 與 d，將分別與時間點 I, II, III 或 IV 進行配對。將正確的答案填於答案紙上。(8 分)

【B 部分】

分別將培養於 25°C 下對數期生長的野生型與 *cdc 25* 突變種移到 36°C 下培養 4 小時。

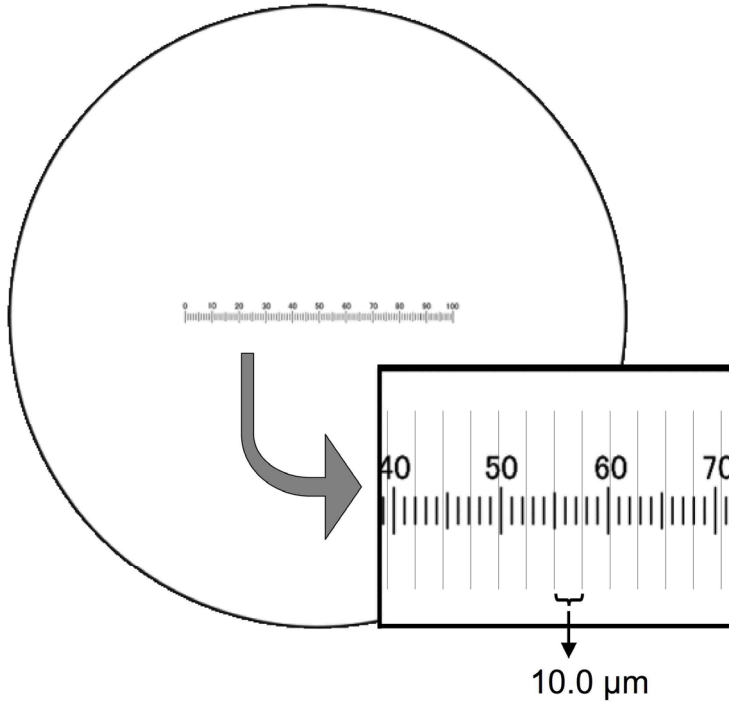
問題 1.B.1 (3 分)

觀察 W25, W36, M25 與 M36 型態後，可以得到下列何種結論。(3 分)

	條件	大部分的 <i>cdc 25</i> 突變種	野生型
A	25°C	未進行細胞質分裂	進行細胞質分裂
B	25°C	進行細胞質分裂	未進行細胞質分裂
C	36°C	未進行細胞質分裂	進行細胞質分裂
D	36°C	進行細胞質分裂	未進行細胞質分裂
E	25°C and 36°C	兩者無明顯差異	

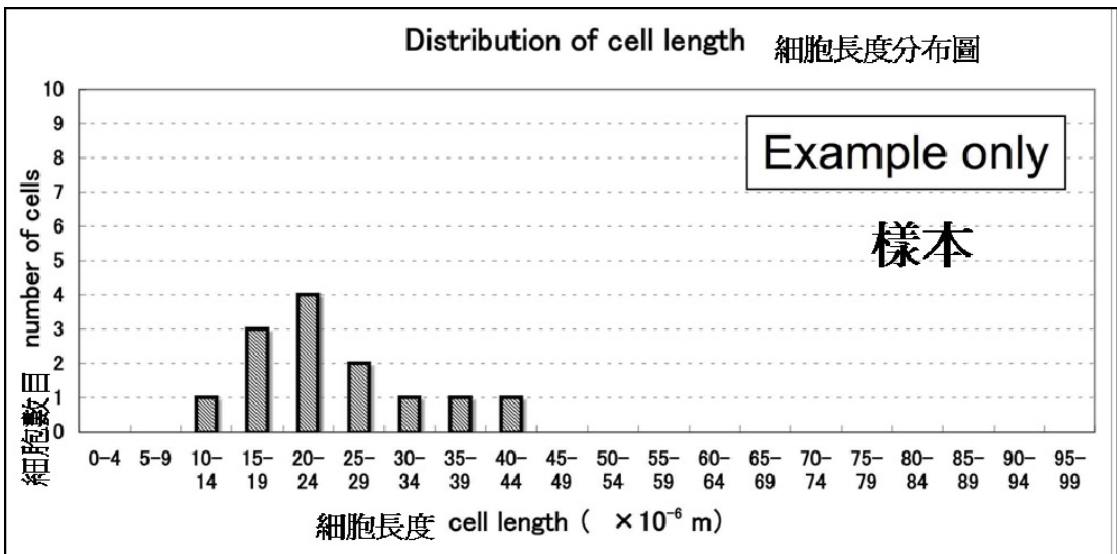
問題 1.B.2 (4 分)

為了測量細胞長度，目鏡中已被置入目鏡測微器 (micrometer)。為了要校正目鏡測微器，須將載物台測微器放在載物台上，載物台測微器每小格的距離為 10 μm。當兩種測微器的線條相重疊後，便能知道目鏡測微器的每格長度。參考下圖的量測結果。請以 μm 為單位，進行目鏡測微器的校正，計算目鏡測微器每小個的長度到小數點後兩位。



問題 1.B.3 (12 分)

量測 M36 中細胞長度，至少要超過 10 個。依照下列樣本繪圖於答案紙中。目鏡中的微尺的距離單位為 4μm。記得要標記單位。(12 分)



問題 1.B.4 (2 分)

在觀察完所有樣本後，*cdc25* 突變種的細胞較野生型細胞為長，會出現於下列何種情形？(2 分)

- A. both 25°C and 36°C
- B. 36°C but not 25°C
- C. 25°C but not 36°C
- D. 36°C. 無顯著差異存在

【C 部分】

以下的實驗將使用野生型與 5 種突變種 (A-E) 進行。所有的突變種均可生長於 25°C，並且與野生型無差異，但是無法生長於 36°C。所有的細胞都先培養於 25°C 下達到對數期生長，再移到 36°C 下培養 4 小時後，進行固定。固定後的細胞，將以 Calcofluor (染色對象為隔壁 [septa]) 與 DAPI (染色對象為 DNA)，並經由螢光顯微鏡觀察後，拍照如實驗中上的圖所示。

問題 1.C.1 (10 分)

有關突變種在 36°C 下培養後的型態描述，請將下列的描述與突變種 A-E 進行配對。(10 分)

- 1. 細胞質分裂重複且獨立進行中
- 2. 細胞週期持續但缺乏細胞質分裂
- 3. 細胞週期被限制在間期
- 4. 缺少核分裂
- 5. 細胞質分裂受阻

第二部分 單細胞藻類運動機制的研究 (30 分)

【簡介】

許多單細胞藻類與多細胞藻類的合子都具有游泳的能力。這種行為對於移動到適當的環境生長與有性生殖是很重要的。*Chlamydomonas reinhardtii* 為一種單細胞綠藻，會利用鞭毛進行游泳。鞭毛會因為某些刺激而掉落，有時會在特定的細胞週期時縮入細胞內。

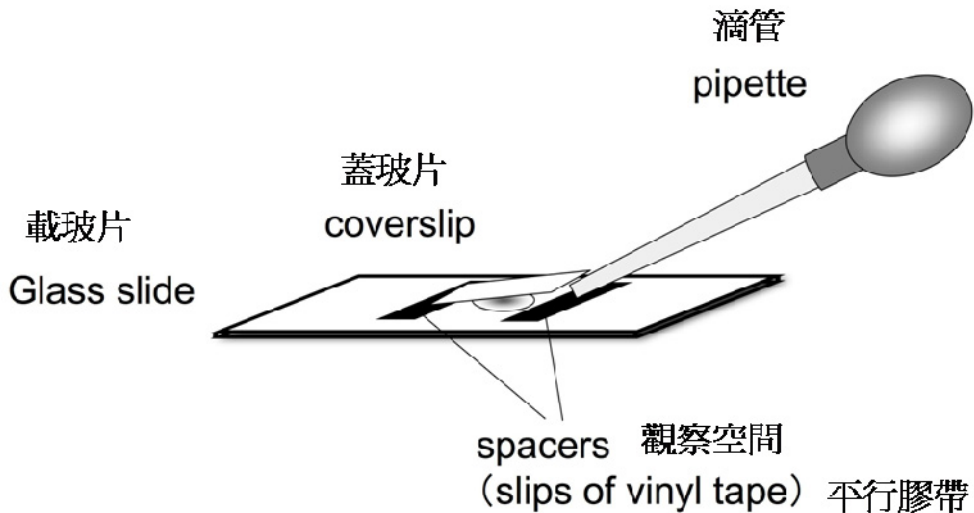
本實驗將利用 *C. reinhardtii* 為材料進行鞭毛運動與再生的機轉研究。

【材料與設備】

- 1. 野生種 (wt)
- 2. *odal* 突變種 (oda)
- 3. *pf17* 突變種 (pf)
- 4. 顯微鏡，1 檯
- 5. 載玻片，1 盒
- 6. 蓋玻片，1 盒
- 7. 醋酸溶液 (A)
- 8. 中和溶液 (N)
- 9. 拋棄式滴管 (1 ml)，10 支
- 10. 微量試管，5 支
- 11. 膠帶，1 卷
- 12. 剪刀，1 把

【注意】

C. reinhardtii 的鞭毛很容易黏在載玻片，這樣就很容易影響到游泳能力的觀察。因此，在載玻片上無法運動的細胞應該不列入計算。因此建議在此製造一個觀察室 (如下圖) 進行實驗。作法是將一小片的膠帶平行地貼在載玻片上，蓋玻片可以在添加樣本後，再蓋在膠帶上。因此將會創造出一個空間進行游泳行為觀察。



【A 部分】

在顯微鏡下比較觀察野生型 (wt) 與 *pf17* 突變種 (pf) 的細胞，突變種細胞具有正常的形狀與細胞構造，唯獨在鞭毛上缺乏環狀幅射頭 (radial spoke head)。

問題 2.A.1 (6 分)

與野生型比較，*pf17* 突變種具有：

- A. 相同的游泳模式
- B. 游的比較慢
- C. 游的比較快
- D. 根本不會游泳

問題 2.A.2 (4 分)

請問環狀幅射頭 (radial spoke head) 的功能為何？

- A. 與鞭毛的運動相關
- B. 與鞭毛的運動無關
- C. 抑制鞭毛的運動
- D. 協調鞭毛的運動

【B 部分】

在顯微鏡下比較觀察野生型 (wt) 與 *oda1* 突變種 (od)，突變種具有正的外型與細胞構造，唯獨缺乏鞭毛上的一種動力蛋白 (dynein)。

問題 2.B.1 (6 分)

與野生型比較，*oda1* 突變種的游泳模式為：

- A. 與野生型相同
- B. 較緩慢且平順
- C. 較緩慢且抽動
- D. 較快速且平順
- E. 快速且抽動

問題 2.B.2 (4 分)

請問動力蛋白 (dynein) 的功能為何？

- A. 對鞭毛的運動非常重要
- B. 與鞭毛的運動無關
- C. 增加鞭毛的運動
- D. 協調鞭毛的運動

【C 部分】

醋酸對鞭毛影響的研究操作步驟

- (i) 對鞭毛的運動非常重要
- (ii) 與鞭毛的運動無關
- (iii) 增加鞭毛的運動
- (iv) 協調鞭毛的運動

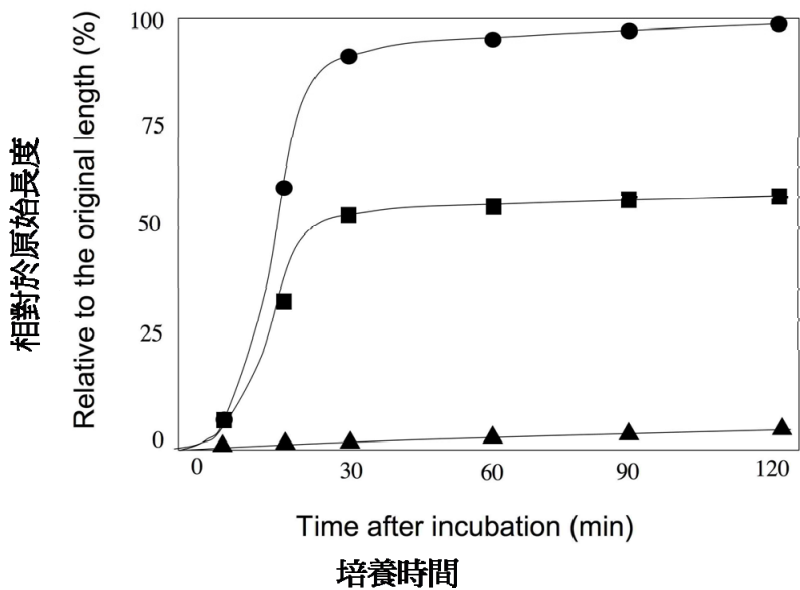
問題 2.C.1 (12 分)

計算處理前之樣本(A)及處理後之樣本(B)，其中所含具有鞭毛的細胞百分率。

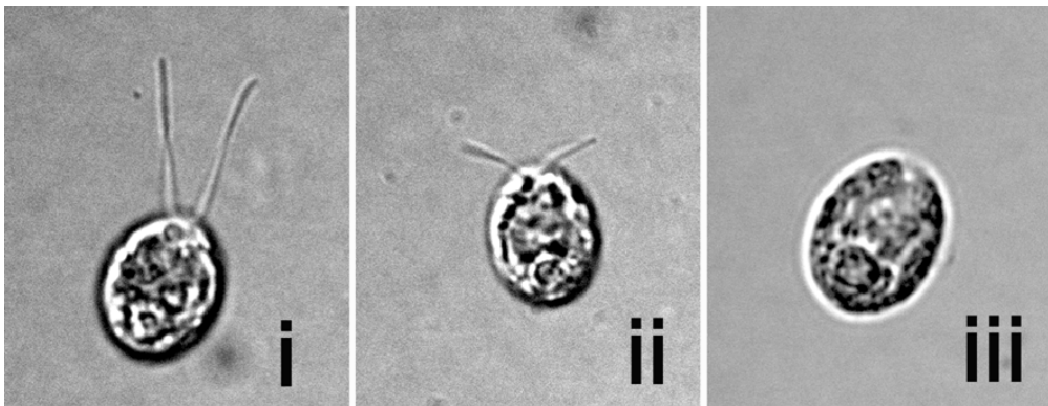
【D 部分】

去除鞭毛後的野生型細胞培養於不同環境 (i, ii 或 iii) 中。下圖為不同條件下，不同時間，相對於原始鞭毛長度的百分率圖。

- (i) 對照組 (未添加抑制劑) (●)
- (ii) 添加放線菌酮 (cycloheximide) (一種蛋白質合成抑制劑) (■)
- (iii) 添加秋水仙素 (colchicine) (一種阻止微小管形成藥物) (▲)



經過 120 分鐘培養後，分別拍攝細胞型態如下圖：



問題 2.D.1 (4 分)

下列答案何者為培養於放線菌酮 (cycloheximide) 中的結果。請在 適當 的答案處打『X』

1. 所有參與鞭毛再生的蛋白質均為重新合成 (*de novo*)
2. 所有再生的鞭毛均不具運動能力, 因為缺乏動力蛋白 (dynein)
3. 組成鞭毛的蛋白質成分在鞭毛去除前均已貯存完畢
4. 蛋白質重新合成對於鞭毛的再生是必須的
5. 蛋白質重新合成對於形成鞭毛的基體 (basal body) 是必須的

問題 2.D.2 (2 分)

根據你的觀察, 培養在秋水仙素 (colchicines) 中的細胞, 下列何者與鞭毛再生有關?

- A. 微管蛋白的聚合作用
- B. 肌動蛋白的聚合作用
- C. 角蛋白的聚合作用
- D. 微管蛋白的去聚合作用
- E. 肌動蛋白的去聚合作用
- F. 肌動蛋白的去聚合作用

(完)