

2007 年第十八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：細胞學／生物化學

總分：43 分

總操作時間：90 分鐘

【說明】

- 十字花科植物含有一種稱為 glucosinolate 的化合物。有些 glucosinolate 的化合物，例如 glucoraphanin 具有預防癌症發生的功能。但是有些 glucosinolate 的化合物，例如 glucosinalbin，則會在代謝過程中產生毒性物質。
- 具有毒性的 glucosinolate 分子主要是肇因於硫氰根離子 (SCN^-)。硫氰鹽類會干擾碘離子的代謝，進而造成甲狀腺素的不足。攝食十字花科植物，例如花椰菜的 glucosinalbin (來自 glucosinolates)，會導致少量的硫氰鹽類的生成。
- 這些 glucosinolate 類的 glucoraphanin 會經由代謝路徑生成 sulforaphane。這些 sulforaphane 分子屬於第二型蛋白的誘發者。這些第二型蛋白具有清除自由基 (free radicals) 與其他氧化劑 (oxidant) 的功能。當氧化劑濃度被降低後，會減緩發炎反應的

活化路徑。其中一種路徑便是活化蛋白質複合物，例如：NFkappaB。

Task A 環節動物解剖 (26 分)

主題：將一隻海洋及一隻陸生的環節動物特徵標出

【目的】

利用分光光度計法測定花椰菜所釋出的硫氰鹽類含量。此方法是利用在酸性的環境下，硫氰鹽類會與三價鐵離子 (Fe^{3+}) 反應，形成具有穩定的硫氰鐵分子 ($\text{Fe}^{2+}\text{-SCN}$) 之紅色複合物，此硫氰鐵分子在 447 nm 波長下具有最大的吸光值。

【材料】

- 微量滴管：將 20-200 ul 的微量滴管調整到 100 ul
- 微量滴管吸頭
- 分光光度管內含 900 uL 硝酸鐵溶液。說明如上，此溶液為強酸。
注意：此硝酸鐵溶液是用 1.0M 硝酸所製備。在實驗開始前必須配帶保護眼鏡並穿戴手套。
- 在試管中的硫氰鹽標準液的濃度分別為 0 uM/mL (本溶液為空白對照組)，0.1 uM/mL, 0.5 uM/mL, 1.0 uM/mL, 2.0

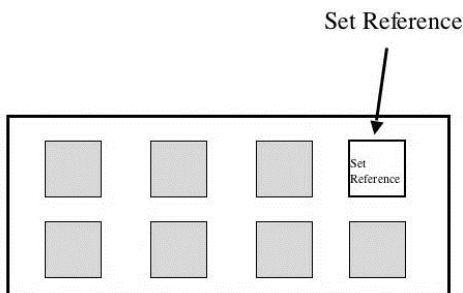
uM/mL 與 4.0 uM/mL

- 以馬克筆在分光光度管註記。
- 戴手套與保護鏡。
- 請注意你桌上的分光光度計是否是設定在 447 nm。

附註：在本問題開始前請注意是否你的材料與儀器是否完備，如果沒有，請舉手向監考人員提出需求。

【步驟】

1. 戴手套與保護鏡
2. 分別將濃度為 0, 0.5, 1.0, 2.0 與 4.0 M/mL 的硫氰鹽標準液各取 100ul，分別加入分光光度管中。此時，除了濃度為 0 的標準液外，其他會有呈色反應在分光光度管中進行。濃度為 0 的標準液為本實驗的空白對照組。請注意是否有在分光光度管磨砂面上做上註記。
3. 在剩下的 3 個分光光度管中分別加入各 100 uL 的花椰菜均質液。
4. 小心地移動分光光度管到分光光度計中，分光光度計的吸收值應該設在 447nm。打開蓋子，插入 0 uM/mL 標準液的分光光度管（本管為空白對照組）。分光光度計裡的箭號，註記的是光束的路徑。請注意光束通過的分光光



度管應該是透明的。關上蓋子，按下位於分光光度計操作面板右上方 “set reference” 按鍵，如上圖所示的位置。**不可觸碰其他的按鈕。**

5. 分別依序插入其他的標準液的分光光度管，並分別依序記錄下讀數。此時插入未知濃度的花椰菜均質液之分光光度管，並分別記錄讀數。當所有的分光光度管都分別記錄完成後，將分光光度管留置於該處，監考人員會收拾善後。

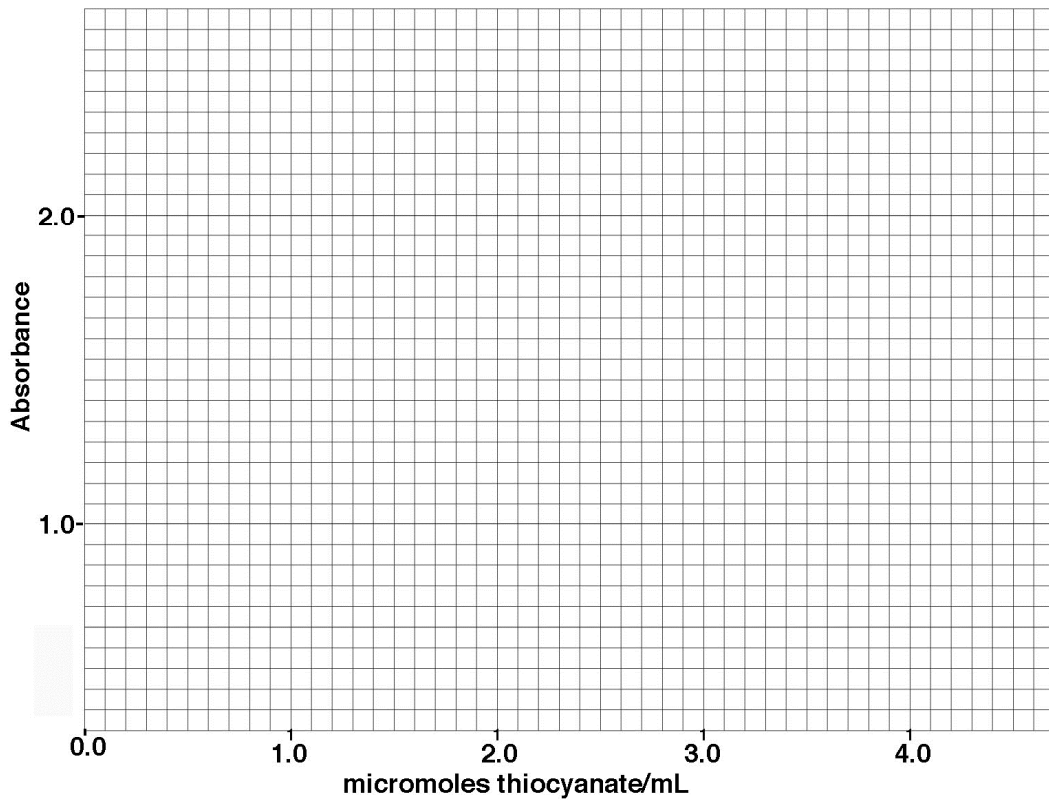
標準液的分光光度計讀數（吸光值）
這個部分有 10 分。

0.5 mM/mL 硫氰鹽溶液 _____
1.0 mM/mL 硫氰鹽溶液 _____
2.0 mM/mL 硫氰鹽溶液 _____
4.0 mM/mL 硫氰鹽溶液 _____

分別記錄三個未知濃度的花椰菜均質液之吸光值，此題 3 分。

1. _____ 2. _____ 3. _____

6. 在下一頁作圖，橫軸為硫氰鹽離子濃度，縱軸為分光光度計讀數（吸光值）。**此題 6 分。**
7. 利用前一題所畫出來的圖，將所有的花椰菜均質液的分光光度計讀數（吸光值）平均，並計算花椰菜均質液中硫氰鹽的濃度。**此題 5 分。**
8. 花椰菜均質液中硫氰鹽的濃度為何？（請標出單位；3 分）
9. 花椰菜均質液中硫氰鹽的濃度的標準差為何，**此題 2 分。**



Task B 測定花椰菜中硫氰鹽的致死劑量 (LD₅₀) (5 分)

【說明】

LD₅₀ 為毒物學中用來計算化合物能殺死 50% 實驗動物的劑量 (mM/kg)，可稱為 50% 致死劑量。在大鼠的實驗報告指出，硫氰鈉的 LD₅₀ 為 9 mM/kg。利用問題 A 的實驗結果，請推算體重 500g 的大鼠在短時間內要攝食多少的花椰菜才能達到硫氰鹽的 LD₅₀。

【步驟】

請圈出最適當的答案。並於試卷中寫出你的

計算式。如不敷使用，可以使用本頁背面。

- (a) 1 gm to 5 gm
- (b) 50 gm to 250 gm
- (c) 500 gm to 1 kg
- (d) 1.5 kg to 14 kg
- (e) 15 kg to 25 kg

Task C 說明基因表達的調控 (12 分)

【說明】

- 這些 glucosinolate 類的 glucoraphanin 會經由代謝路徑生成 sulforaphane。這些 sulforaphane 分子屬於第二型蛋白

的誘發者。這些第二型蛋白為具有清除自由基 (free radicals) 與其他氧化劑 (oxidant) 的功能。當氧化劑濃度被降低後，會減緩發炎反應的活化路徑。其中一種路徑便是活化蛋白質複合物，例如：NFkappaB。

- NFkappaB 為轉錄因子複合體的一種，本身能與兩種蛋白質 (p50 與 p65) 結合。當結合兩種蛋白質後能與存在細胞質中的第三種蛋白質 IkappaB 結合。一般狀況下，NFkappaB 能與 p50 蛋白與 p65 結合，再與 IkappaB 結合。活化的 NFkappaB 會參與 IkappaB 的降解，結果會導致 NFkappaB p50/p65 蛋白質複合體轉位到細胞核。在細胞核中，NFkappaB p50/p65 蛋白質複合體會與啟動子單元結合，進而增加前發炎反應基因 (pro-inflammatory gene)，(如誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS)) 的轉錄。因此，p65 與 IkappaB 的比值可以做為 NFkappaB 的活化指標。

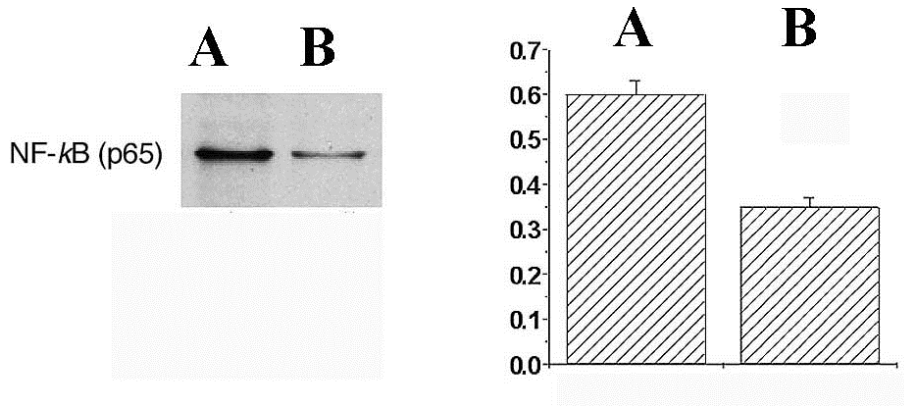
- 當 iNOS 的活性增加，一氧化氮的自由基 (NO[·]) 的產量也隨著增加。一氧化氮與超氧分子 (O₂⁻) 作用後會形成過氧硝酸 (peroxynitrous acid)，而過氧硝酸便是一種很強的氧化劑。
- NFkappaB 活化後，會導致氧化劑濃度上升。然而，當氧化劑濃度降低後，NFkappaB 也會降低活化程度，間接降低前發炎反應基因 (pro-inflammatory gene) 表現。

【步驟】

1. 仔細檢查以下各問題小節所提供的圖。
2. 利用以下的資料，圈選出何者適合作為高單位 glucoraphanin 動物飼料，並以此做為回答問題的基礎。

SECTION A.

- 下圖為 NFkappaB 活化程度，實驗來自雄性原發性高血壓中風大鼠。一組為對照組飲食，另一組為實驗組飲食 (添加 glucoraphanin)。在本實驗中，glucoraphanin 添加量為 10ug/kg。



➤ 經過數月的 glucoraphanin 添加飲食的飼養，實驗動物經安樂死處理。腎臟細胞的細胞核被分離出來，並經由 SDS-PAGE 電泳分離。蛋白質會在膠體中被分開，這些蛋白質會被轉印到硝化纖維紙上，並經由抗體辨識 NFkappaB p65 蛋白。

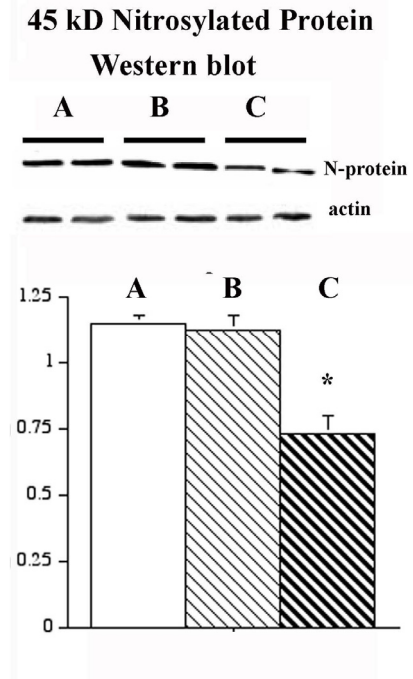
回答下列問題：

1. 上述 A 與 B 兩組實驗動物，何者的飲食中有添加 glucoraphanin？**本題 1 分**
2. 請圈出下列何者為最適合本實驗的說明。**本題 4 分**
 - (a) 較低的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化降低，因此降低 p65 在細胞核的表現。
 - (b) 較低的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化降低，因此升高 p65 在細胞核的表現。
 - (c) 較高的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化降低，因此降低 p65 在細胞核的表現。
 - (d) 較高的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化降低，因此升高 p65 在細胞核的表現。
 - (e) 較高的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化增加，因此升高 p65 在細胞核的表現。

SECTION B.

➤ 下圖為一個 45kD 亞硝醯化蛋白 (N-蛋白) 的實驗結果。實驗來自雄性原發

性高血壓中風大鼠。實驗動物被設計成三種不同的飲食，一組添加 glucoraphanin，其他兩組為不同的對照組飲食。



回答下列問題：

1. 上述 A, B, C 三組實驗動物，何者的飲食中有添加 glucoraphanin？**本題 1 分**。
2. 在經由 Glucoraphanin 處理之後，請圈出下列何者最適合本實驗所得的結果。**本題 4 分**。
 - (a) 較高的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化增加，因此導致較高的 iNOS 表現與較高的過氧化硝酸生成，於是蛋白質的亞硝醯化增加。

- (b) 較高的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化增加，因此導致較高的 iNOS 表現與較高的過氧化硝酸生成，於是蛋白質的亞硝醯化降低。
- (c) 較低的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化增加，因此導致較高的 iNOS 表現與降低的過氧化硝酸生成，於是蛋白質的亞硝醯化降低。
- (d) 較高的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化降低，因此導致較低的 iNOS 表現與降低的過氧化硝酸生成，於是蛋白質的亞硝醯化降低。
- (e) 較低的氧化壓力會導致 NFkappaB 的活化降低，因此導致較低的 iNOS 表現與降低的過氧化硝酸生成，於是蛋白質的亞硝醯化降低。

實驗四：遺傳學

總分：43 分

總操作時間：90 分鐘

Task A 一段 cDNA 序列的組成 (23 分)

【目的】

分離一段含有待研究之 cDNA 的質體 DNA，並決定此 cDNA 的序列

【介紹】

要過度表現植物或動物有待研究的一個基因，你必須先以 cDNA 的形式分離出這段基因；若你已完成分離，要放大這段 DNA 並 clone 在 pBluescript SK 質體的載體中，

接著用這載體來轉形細菌；你必須快速進行質體製備，以分離質體並確定此 cDNA 插入段的序列。

【材料】

- | | 【數量】 |
|------------------------------|-------|
| ➤ 細菌培養液 | 4ml |
| ➤ 1.5 mL 微離心管 | 5 |
| ➤ 微離心管架 | 1 |
| ➤ P1000 微吸管 | 1 |
| ➤ 200-1000 uL 吸管尖盒 | 1 |
| ➤ GET 緩衝液(1.5 mL 小離心管) | 0.5ml |
| ➤ 10% SDS (1.5 mL 小離心管) | 0.5ml |
| ➤ 2 N NaOH (1.5 mL 小離心管) | 0.5ml |
| ➤ 3 M 鉀 5 M 醋酸 (1.5 mL 小離心管) | 0.5ml |
| ➤ 95% 乙醇 (試管) | 3ml |
| ➤ 蒸餾水 (試管) | 3ml |
| ➤ 計時器 | 1 |
| ➤ 試管標籤 | 2 |
| ➤ 簽字筆 | 1 |
| ➤ 紅卡片 | 1 |
| ➤ 垃圾袋 | 1 |
| ➤ 微離心機 | |
| ➤ 震盪機 | |

【注意】

開始動手前，先確定你有上述所有材料，若有缺少，舉起紅卡片請監考人員來幫忙

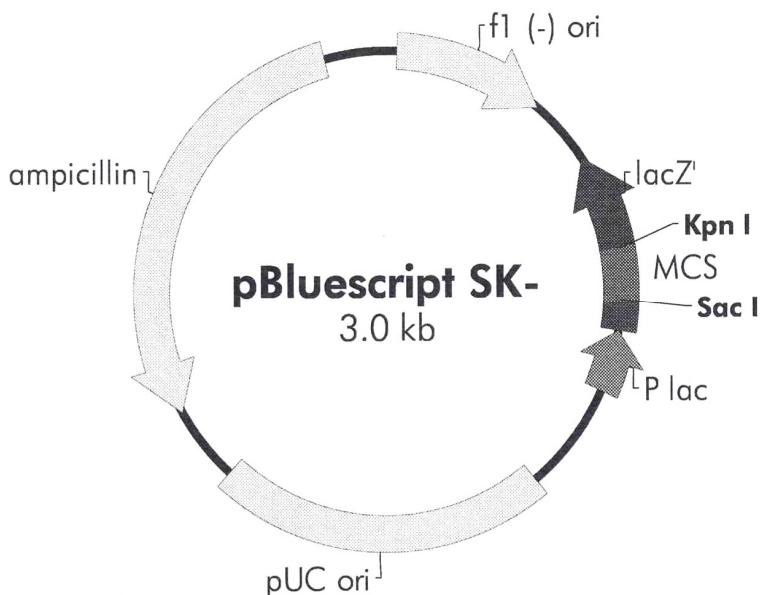
【步驟】

1. 兩支 1.5 mL 微離心管中各加入 1.5 mL 細菌培養液
2. 用微離心機離心 1 分鐘，離心前要確定

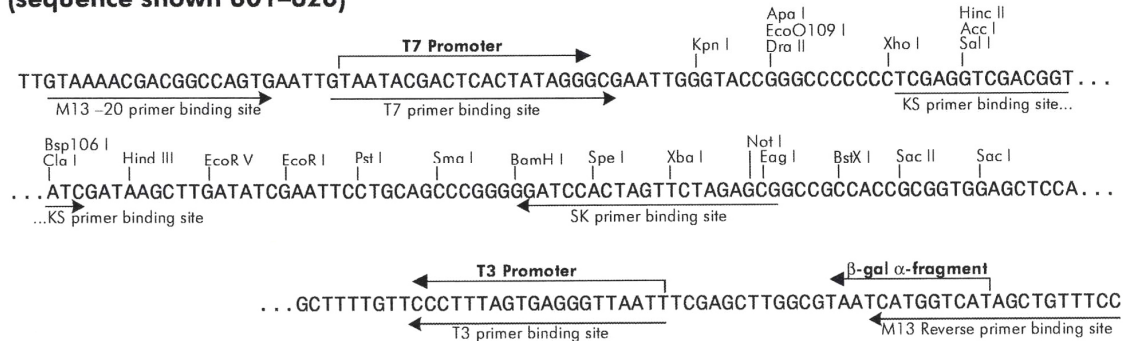
離心轉子(rotor)的平衡

3. 將兩管中的上清液完全移除
4. 在細胞沈澱中加入 100 uL pH 7.9 的 GET (Glucose-EDTA-Tris)緩衝液(不需蓋上蓋子)，激烈震盪 5 分鐘以懸浮細胞的沈澱，置於室溫 5 分鐘
5. 在另一支 1.5 mL 微離心管中，混合 1% SDS 及 0.2 N NaOH 到水中，使最後體積成為 1 mL
6. 在上述步驟 4 的每支 1.5 mL 微離心管中，加入新配的 200 uL 1% SDS 及 0.2 N NaOH 混合液，蓋上蓋子並倒置、正置 4-5 次
7. 在室溫培養 3 分鐘
8. 在每支小管中加入 150 uL 5M KOAc (3 M 鉀與 5 M 醋酸)，蓋上蓋子用手搖混合
9. 在室溫培養 3 分鐘
10. 用微離心機全速離心 3 分鐘 - **記得離心前要先平衡**
11. 將你的 4 碼學生代碼標記在乾淨的 2 支微離心管上
12. 將每支微離心管中的上清液吸出，置於新的微離心管中，棄置原管，該管中的白色沈澱即為細菌染色體 DNA
13. 在各管中加入 800 uL 95%乙醇，蓋上蓋子用手搖混合 10 秒，靜置 10 分鐘
14. 用微離心機全速離心 5 分鐘
15. 倒出各管中的上清液，蓋上蓋子並**舉起你的紅卡片**
16. 讓監考人員檢查你的沈澱 (白色沈澱得 10 分)
17. 監考人員會給你質體及 cDNA 序列標記，此 cDNA 將由 T3 的起動子開始定序
18. 以 pBluescript 載體(由第 21 核苷酸起)檢視你的序列，並回答第 5 頁的問題

pBLUESCRIPT 的質體輿圖及多選殖位(multiple cloning site)序列



**pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 601-826)**



【問題】(13 分)

1. 用以選殖你 DNA 片段序列的酵素切位為何

注意：酵素名稱的第一字母是在其所辨識序列的第一個核苷酸上面(5 分)

2. 寫出你那段 DNA 最前面的 20 個核苷酸的序列 (不包括限制位的序列) (2 分)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
核 苷 酸																				

3. 找出第一個起始密碼子，用所提供的遺傳密碼表，由起始密碼子開始將頭 21 個核苷酸譯成對應的氨基酸序列(4 分)

氨基酸																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
核 苷 酸																					

4. (a) 如果核苷酸第 13 個位置突變成為 “A”，將會對應成為何種氨基酸 (1 分)

(b) 如果核苷酸第 14 個位置突變成為 “A”，將會對應成為何種胺基酸 (1 分)

遺傳密碼表

本表顯示 64 個密碼子及其所對應的氨基酸，方向是 5' to 3'

		2nd base			
		U	C	A	G
1st base	U	UUU (Phe/F)Phenylalanine	UCU (Ser/S)Serine	UAU (Tyr/Y)Tyrosine	UGU (Cys/C)Cysteine
		UUC (Phe/F)Phenylalanine	UCC (Ser/S)Serine	UAC (Tyr/Y)Tyrosine	UGC (Cys/C)Cysteine
		UUA (Leu/L)Leucine	UCA (Ser/S)Serine	UAA Ochre (<i>Stop</i>)	UGA Opal (<i>Stop</i>)
		UUG (Leu/L)Leucine	UCG (Ser/S)Serine	UAG Amber (<i>Stop</i>)	UGG (Trp/W)Tryptophan
	C	CUU (Leu/L)Leucine	CCU (Pro/P)Proline	CAU (His/H)Histidine	CGU (Arg/R)Arginine
		CUC (Leu/L)Leucine	CCC (Pro/P)Proline	CAC (His/H)Histidine	CGC (Arg/R)Arginine
		CUA (Leu/L)Leucine	CCA (Pro/P)Proline	CAA (Gln/Q)Glutamine	CGA (Arg/R)Arginine
		CUG (Leu/L)Leucine	CCG (Pro/P)Proline	CAG (Gln/Q)Glutamine	CGG (Arg/R)Arginine
	A	AUU (Ile/I)Isoleucine	ACU (Thr/T)Threonine	AAU (Asn/N)Asparagine	AGU (Ser/S)Serine
		AUC (Ile/I)Isoleucine	ACC (Thr/T)Threonine	AAC (Asn/N)Asparagine	AGC (Ser/S)Serine
		AUA (Ile/I)Isoleucine	ACA (Thr/T)Threonine	AAA (Lys/K)Lysine	AGA (Arg/R)Arginine
		AUG (Met/M)Methionine	ACG (Thr/T)Threonine	AAG (Lys/K)Lysine	AGG (Arg/R)Arginine
	G	GUU (Val/V)Valine	GCU (Ala/A)Alanine	GAU (Asp/D)Aspartic acid	GGU (Gly/G)Glycine
		GUC (Val/V)Valine	GCC (Ala/A)Alanine	GAC (Asp/D)Aspartic acid	GGC (Gly/G)Glycine
		GUA (Val/V)Valine	GCA (Ala/A)Alanine	GAA (Glu/E)Glutamic acid	GGA (Gly/G)Glycine
		GUG (Val/V)Valine	GCG (Ala/A)Alanine	GAG (Glu/E)Glutamic acid	GGG (Gly/G)Glycine

Task B 刪除

Task C 豆子種皮顏色及種子性狀遺傳的控制 (20 分)

【材料】

- 1 塑膠袋裝有扁平紅色的親代豆子-- 不可打開
- 1 塑膠袋裝有圓厚紅色的親代豆子-- 不可打開
- 1 塑膠袋裝有上述親代交配後所產生的第一子代豆子(扁平黃色)--不可打開
- 1 塑膠袋裝有用以代表 250 個第二子代植株每株一顆的豆子--此袋可以打開

為了幫助你回答下列問題，請填寫下列空格

Generation 世代	Seed shape 種子形狀 (round or flat) (圓厚或扁平)	Seed coat colour 種皮顏色 (yellow or red) (黃色或紅色)
Parent 1 (親代 1)		
Parent 2 (親代 2)		
F ₁ from a cross between these two parents (第一子代，來自於上述親代互交)		

【問題】

- 種皮顏色受到何種方式調控 (圈選一個答案) (1 分)
 - 單一基因
 - 超過一個基因
- (a) 紅色種皮是何種性狀 (圈選一個答案) (1 分)
 - 顯性
 - 部份顯性
 - 隱性

(b) 圓厚種子是何種性狀 (圈選一個答案) (1 分)

 - 顯性
 - 部份顯性
 - 隱性
- F₂ 種子有四種外表型，將這些種子依外表型分開並將每種的數目寫在下表中 (2 分)

Phenotype 外表型 (seed colour/ seed shape) (種子顏色/種子形狀)	Number of seeds 種子數 (= number of F ₂ plants) (= F ₂ 植株數目)
round, red 圓厚紅色	
flat, red 扁平紅色	
round, yellow 圓厚黃色	
flat, yellow 扁平黃色	
Total 總數	

用這些 F₂ 分離的資料回答下列問題：

4. (a) 從你的資料來看，多少基因可能控制種子形狀？ (1 分)
- (b) 在這樣大小的族群中，你期待會有多少圓厚的豆子？多少扁平的豆子？(2 分)
- 圓厚 _____ 扁平 _____ (2 分)
- (c) 這分離的比率與觀察到的比率差別是否有意義 (圈選一個答案)
- YES _____ NO _____ (1 分)
- 機率是多少？ _____ (3 分)
5. (a) 從你的資料來看，多少基因可控制種皮的顏色？ (1 分)
- (b) 在這樣大小的族群中，你期待會有多少紅色的豆子？多少黃色的豆子？
- 紅色 _____ 黃色 _____ (3 分)
- (c) 這分離的比率與觀察到的比率差別是否有意義 (圈選一個答案)
- YES _____ NO _____ (1 分)
- 機率是多少？ _____ (3 分)

Chi-square Distribution 卡方分佈

df	Probability 機率										
	0.95	0.90	0.80	0.70	0.50	0.30	0.20	0.10	0.05	0.01	0.001
1	0.004	0.02	0.06	0.15	0.46	1.07	1.64	2.71	3.84	6.64	10.83
2	0.10	0.21	0.45	0.71	1.39	2.41	3.22	4.60	5.99	9.21	13.82
3	0.35	0.58	1.01	1.42	2.37	3.66	4.64	6.25	7.82	11.34	16.27
4	0.71	1.06	1.65	2.20	3.36	4.88	5.99	7.78	9.49	13.28	18.47

(完)

轉載自：中華民國生物奧林匹亞委員會網站 National Biology Olympiad, Taiwan, R.O.C

<http://www.ibo.nsysu.edu.tw/>