
2005 年第十六屆國際生物奧林匹亞競賽

-- 實驗試題(1)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

第 I 部份：

作業一：利用洋菜膠電泳法分離質體 DNA 的限制片段

儀器：

離心機、洋菜膠電泳裝置、螢光膠體顯像系統

注意：

當你需要使用電泳槽電源供應器時，請舉起桌上的藍牌。

說明：

質體是環狀雙股的 DNA 分子，它能存在於細菌細胞中，並獨立複製；限制酶可以將質體 DNA 切割成片段。本實驗提供一個質體和三種限制酶（BamHI、PstI 和 HindIII），你將用這三種限制酶去切割質體 DNA 並進行洋菜膠電泳。你須要決定限制酶的切割點；因為 DNA 片段長度的對數和此片段在膠體中移動距離成反比，所以根據 DNA 片段移動距離去計算位於切割點之間的限制片段的大小。

試劑：

1. 1×TAE 緩衝液
2. 5×DNA 染劑（內含 anthocyanin 和蔗糖）

3. 限制酶 BamHI
4. 限制酶 PstI
5. 限制酶 HindIII
6. 質體 DNA
7. DNA 大小標準樣本
8. 蒸餾水 (Distilled water)

器材：

1. 實驗用手套
2. 標記用的筆
3. 0.5 ml 離心管
4. 離心管架
5. 微量滴管
6. 離心機
7. 培養箱
8. 洋菜膠電泳裝置
9. 螢光膠體顯像系統(使用時由助教協助)

器材的操作步驟：

1. 微量滴管

實驗中提供一支 0-10 μ l 的微量滴管，藉由轉動設定環可以調節吸取的容量。在插上適當的 tip 後，大拇指壓下控制鈕至第一段，並將 tip 伸進液體中，慢慢放開控制鈕，直到樣本液體完全吸

入。接著，將含有液體的 tip 插入標的容器中，大拇指再次緩慢地壓下控制鈕至第二段，直到液體完全由 tip 排出。壓下推出器按鈕，推出並丟棄使用過的 tip。



2. 離心

壓下停止桿，打開離心機蓋子；將離心管放入轉盤中，並確認放下時保持平衡。穩固的蓋下蓋子，直到蓋子鎖上。當蓋子正確的蓋好後，轉盤將開始旋轉。持續離心 20 秒。壓下停止桿，等轉盤停止後，打開蓋子並取出離心管。

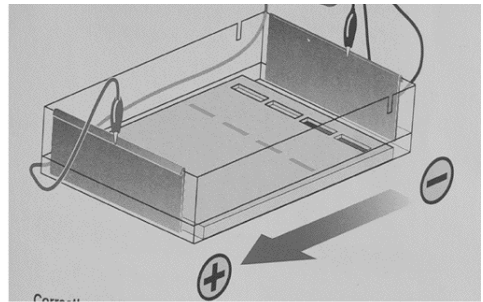
3. 限制酶的切割

Type II 限制酶可辨識特定的 DNA 序列，並在它的辨識位切割 DNA。提供給你的質體 DNA 將被三種不同的限制酶（BamHI, PstI 和 HindIII）切割。加入適量的酵素到含有質體 DNA 的離心管中，並蓋好蓋子。以輕敲離心管底部的方式，將其混合均勻後，離心管於 37°C 反應 15 分鐘。

4. 洋菜膠電泳裝置

實驗中，在樣本槽中已提供一個製備好的 0.8% 洋菜膠電泳膠。將 1×TAE 緩衝液注滿電泳槽，並蓋過膠體和超過膠體表面 3-4 mm。取 10 μ l 樣本注入膠

體的樣本槽中，此樣本包含 (1) 限制酶切割後的質體 DNA 和 (2) DNA 染劑。請注意，注入樣本時，tip 頂端應該放在離樣本槽底部之上 1-2 mm，使你能把全部樣本注入樣本槽中，而不致於刺穿樣本槽的底部，破壞膠體。注入樣本後，蓋上電泳槽的蓋子。請注意，紅色電線連結陽極，黑色電線則連結至陰極。舉起藍牌，請助教打開電源。以 100 伏特進行電泳 40 分鐘。電泳結束後，舉起藍牌，請助教關上電源。



(備註：每名選手將使用一個電泳槽，而每 2 名選手共用一部電源供應器。)

5. 螢光膠體顯像系統

此系統由助教操作。你的樣本中含有無毒性的染劑，此染劑可結合 DNA 片段便於觀查。

實驗步驟：

使用標記筆標記 8 支 0.5 ml 的離心管 1 至 8 號。每一管中加入以下的物質，如表一所示：(表一中未列出編號 8 離心管的資料，詳見步驟 4)

表一、以限制酶切割質體 DNA

No.	Plasmid DNA (μl)	<i>Bam</i> HI (μl)	<i>Pst</i> I (μl)	<i>Hind</i> III (μl)	ddH ₂ O (μl)
1	5	1			9
2	5		1		9
3	5			1	9
4	5	1	1		8
5	5	1		1	8
6	5	1	1	1	7
7	5				10

1. 均勻混合後，編號第 1-6 管置於 37°C 反應 15 分鐘，但將第 7 管置於試管架。如果發現在管壁內側有小水滴殘留，你可以用離心機將其離心約 20 秒，離至試管底部；離心機已放置於你的桌面以供使用。
2. 將你之前準備好的洋菜膠體放入電泳槽中，將 1×TAE 緩衝液倒入電泳槽內，並超過膠體表面 3-4 mm。此膠體具有 10 個樣本槽，供注入樣本之用。
4. 取 6μl DNA 大小的標準樣本加至編號第 8 的離心管。
5. 每一管中加入 3μl 的 5×DNA 染劑，均勻混合。
6. 將 DNA 大小標準樣本（編號第 8 的離心管）5 μl 注入膠體的**第一個**樣本槽中。根據表一，依序將你所有的質體樣本注入到第 2 至第 8 的樣本槽中。**請特別注意：**原先離心管的編號與膠體上樣本槽的編號不同。
蓋上電泳槽的蓋子後，舉起藍牌，請

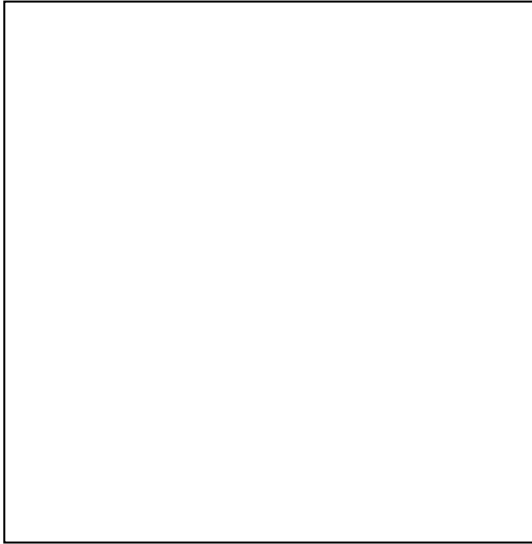
助教打開電源。以 100 伏特進行電泳 40 分鐘。（備註：等待電泳當中，請進行並完成**作業二**）

7. 電泳完成後，舉起藍牌，請助教關閉電源。戴上手套，取出膠體。
8. 將膠體放置在有你的編號的盒子中，關上盒蓋，將盒子放置於桌面。助教將會在取得膠體影像後，影印出此影像給你。

使用洋菜膠電泳分離質體 DNA 的限制片段（24 分：每一條的結果 3 分）。作業一的分數將由監試的教授評分。

每一條樣本的結果 3 分：沒有 DNA，零分；背景模糊但仍可辨識出清楚的條紋，扣一分；切割不完全，扣一分；微弱的條紋，扣一分。

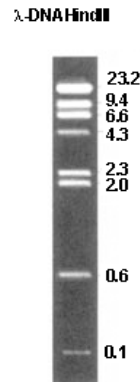
一旦助教將你的膠體影像列印出，將它貼至下列的表格中。



分別具有幾個切割點？（3分）

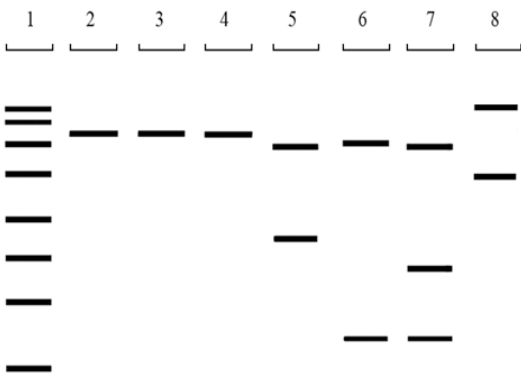
- A. PstI:1, BamHI : 0, HindIII : 2.
- B. PstI:2, BamHI : 0, HindIII : 2.
- C. PstI:2, BamHI : 1, HindIII : 0.
- D. PstI:1, BamHI : 1, HindIII : 1.

問題 2：在洋菜膠電泳中，以限制酶切割的線狀 lambda DNA 經常作為分子標準樣本。下圖是經由 HindIII 切割後的 lambda DNA 片段圖譜，右側是膠體中的 DNA 片段大小 (kb)。



作業二：決定限制酶的切點和限制片段的 DNA 片段大小體 DNA 的限制片段（16分）

由於時間有限，你將無法使用自己的膠體進行大小的分析。下列 DNA 片段的膠體圖譜與**作業 1 的實驗中**所有的實驗質體及酵素種類、步驟與結果完全相同。根據此圖譜回答下列 1 至 5 題：



問題 1： PstI、 BamHI 和 HindIII 對質體

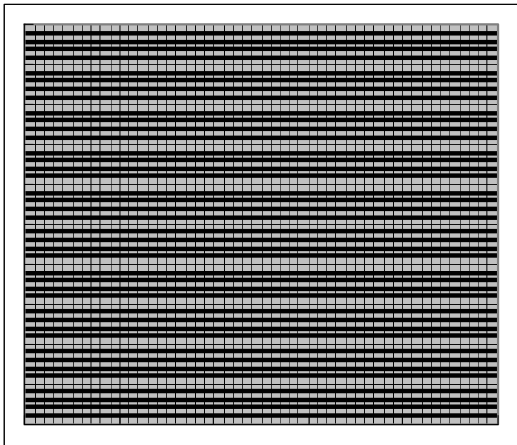
下列敘述何者正確？（3分）

- ① lambda DNA 具有 8 個 HindIII 的切割點
 - ② 因為 lambda DNA 可以被 HindIII 切割，所以整個 lambda DNA 的分子一定是雙股的
 - ③ 以上顯示的圖譜似乎是由染劑結合到 DNA 片段的螢光顯像
- A. ①
 - B. ①, ②, ③
 - C. ②, ③
 - D. ③

問題 3 至 5：

在實驗的膠體圖譜中， lane 1 是 DNA 大小的標準樣本，內含 8 條 DNA 片段，它們的大小 (bp) 分別為 200, 500, 800, 1200, 2000, 3000, 4500, 7000。已知 DNA 片段在膠體中移動的距離與它長度的對數呈反比。

請以 DNA 片段大小(bp)的對數對移動距離(cm)作圖於所附的作標圖中，並計算 DNA 片段的大小。



問題 3：位於 PstI 切割點和 HindIII 切割點之間的較小之限制片段的大小為何？

- A. 2.5
- B. 0.8
- C. 1.1
- D. 0.6

問題 4：位於 HindIII 切割點和 BamHI 切割點之間較小的限制酶片段的大小為何？

- A. 0.8
- B. 0.4

- C. 0.5
- D. 0.6

問題 5：質體的長度為何？

- A. 5.2
- B. 6.9
- C. 4.8
- D. 4.3

第 II 部份：

作業一：顯微鏡使用及胞器辨識(15分)

作答要件：

本實驗操作中，你將獲得藉由不同種類顯微鏡所拍攝之細胞影像，你必須完成以下項目：

- (1) 辨識這些細胞影像並指出該影像是使用何種技術所拍攝。
- (2) 根據特定實驗要求，選取一項適用的技術。
- (3) 在一張細胞影像圖片中辨識各種胞器並回答問題。

實驗流程：

有兩張細胞影像圖片分別為**影像圖片 1**、**影像圖片 2**，在**影像圖片 1**中有七張細胞或生物體的影像(編號 1-7)，這些圖片分別是使用不同的顯微鏡技術所拍攝，包括：

- A. 光學顯微鏡
- B. 螢光顯微鏡
- C. 掃描式電子顯微鏡
- D. 超薄切片穿透式電子顯微鏡

- E. 免疫染色電子顯微鏡
- F. 負染電子顯微鏡
- G. 冷凍切片電子顯微鏡

- B. 高基氏體
- C. 粒線體
- D. 微管
- E. 內質網
- F. 質體

請根據下列描述回答問題：

1. 影像 1 最可能是使用何種方法取得？
2. 影像 2 最可能是使用何種方法取得？
3. 影像 3 最可能是使用何種方法取得？
4. 影像 4 是使用何種方法取得？
5. 影像 5 最可能是使用何種方法取得？
6. 影像 6 最可能是使用何種方法取得？
7. 影像 7 最可能是使用何種方法取得？
13. 羅馬數字 I 所標示的構造為_____ (請填入正確的英文標號)
14. 羅馬數字 II 所標示的構造為_____ (請填入正確的英文標號)
15. 羅馬數字 III 所標示的構造為_____ (請填入正確的英文標號)

請針對不同顯微鏡技術的特性回答下列問題：

8. _____選出最適合用於觀察特定分子在細胞或組織中位置的技術。
9. _____選出最適合用於觀察細胞表面或組織表面構造的技術
10. _____選出最適合用於分析細胞膜內部構造的技術
11. _____選出最適合用於觀察細微的細胞構造的技術
12. _____選出最適合用於標定觀察細胞內特定分子(或巨型構造區位)的技術。

影像圖片 2 為一個細胞的超微結構，分別以羅馬數字(I-IV)標示不同的胞器或細胞組成分子。下列表格為細胞胞器及組成成分，分別以英文(A 至 G)標號。請將正確的英文標號填入答案欄中

- A. 溶小體

作業二：藉由植物葉片的組織切片
辨識植物種類(15 分)

實驗材料及方法：

- (1) 5 個培養皿 (編號 1-5) 各有植物葉片的樣本
- (2) 顯微鏡的物鏡分別為 10x, 20x, 40x
- (3) 鑷子、刀片、試管架、載玻片、蓋玻片、濾紙

背景介紹：

植物界中有 C3、C4 及 CAM 三類行光合作用的植物，它們的主要差別為由不同的細胞負責二氧化碳的固定及糖分的合成，可藉由葉片中不同的構造來判別負責上述作用的細胞。請據以判別哪些植物為 C3 或 C4 植物。

實驗操作：

桌上有五個培養皿，各有一種植物的葉片

樣本，你需要判別其為 C3 或 C4 植物。

實驗流程：

請根據下述實驗流程進行操作：

- (1) 請於每一培養皿中取出一片葉片樣本並作成切片
- (2) 使用數滴水將黏附在刀片上的切片沖洗至載玻片上
- (3) 載玻片上的樣本需浸置於適量的水中，可使用濾紙吸除過多的水分
- (4) 蓋上蓋玻片，吸除過多水分，用顯微鏡觀察

請回答下列問題：

18. 培養皿 1 中的植物為何種植物
 - A. C3 type.
 - B. C4 type.
19. 培養皿 2 中的植物為何種植物
 - A. C3 type.
 - B. C4 type.
20. 培養皿 3 中的植物為何種植物
 - A. C3 type.
 - B. C4 type.
21. 培養皿 4 中的植物為何種植物
 - A. C3 type.
 - B. C4 type.
22. 培養皿 5 中的植物為何種植物
 - A. C3 type.
 - B. C4 type.

作業三：核型分析(10分)

作答須知：

本次操作，你需進行核型分析。實驗材料為某一植物的根尖，使用顯微鏡觀察根尖的分生組織並找出哪些細胞正處於有絲分裂。

實驗材料及方法：

- (1) 放置於 1.5ml 離心管中的根尖
- (2) 顯微鏡目鏡分別為 10x, 20x, 40x
- (3) 放置於 1.5ml 離心管中的 CF 染料 (Carbol Fuchsin)
- (4) 鑷子、刀片、試管架、載玻片、蓋玻片、濾紙
- (5) 有 1N 鹽酸的 1.5ml 離心管

重要事項：

請佩帶手套及護目鏡，使用鹽酸處理樣本，若不慎碰觸，請馬上向現場指導員報告。

實驗流程：

有三個根尖樣本，你必須仔細進行下述實驗流程，方可觀察到有絲分裂細胞的染色體。

- (1) 用鑷子將一或兩個植物根尖樣本置放於含有鹽酸的小瓶子中。
- (2) 在指導員的桌子上有多台已調好水溫的水浴可供使用，將瓶子置放於 60°C 水浴中 8 分鐘，請確認水浴的溫度。
- (3) 根尖樣本非常脆弱，需非常小心的用鑷子將浸置於鹽酸中的樣本，移至裝有蒸餾水的燒杯中，輕輕地搖動燒杯 1 分鐘。

- (4) 將根尖自蒸餾水中取出移置載玻片上，因根尖非常易碎，所以建議你用鑷子取出時，勿碰觸到根尖，注意你只有三個根尖樣本。
- (5) 距根尖 1mm 處的組織富含分裂中的細胞，取此部分放置於載玻片上，可去除其他部分。
- (6) 加一滴 CF 染料於樣本上染色 7 分鐘，可用鑷子輕壓使樣本完全染色。
- (7) 蓋上蓋玻片，使用鉛筆或鑷子輕壓玻片，使組織完全分離
- (8) 在一平整的桌面上，將玻片夾入兩張濾紙中間，輕輕的在最上層的濾紙上施加壓力，使得組織進一步分離，此時過多的染料將會被濾紙吸收。
- (9) 將玻片放置於顯微鏡下觀察，注意你可能使用到各種倍數的物鏡
- 注意：你只有三個根尖樣本，假如失敗可重做，請把握時間。

回答下列問題：

23. 此植物在有絲分裂中期，細胞內有幾對染色體？(6 分)
- A. 3
B. 4
C. 5
D. 6
E. 7
F. 8
G. 9
24. 假如發現不同的細胞內有不同的染色體，你如何決定染色體數目？
- A. 使用平均數方式推算染色體數目
B. 用最大的數值表示染色體數目
C. 計算處於中期的細胞染色體數目，用出現頻率最高的數目代表染色體的數目

(待續)