

# 2015 年第廿六屆國際生物奧林匹亞競賽

## --實作試題(3)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

### 實作試題

#### 9. 引子對選擇 (5分)

在這5對引子(Table 2.1)的PCR反應中，其中有2對引子的PCR實驗綜合結果可以讓你判定此突變株的哪1個基因發生突變。

指出可以使用哪2種引子對(從Table 2.1中選擇A、B、C、D或E)

	A	B	C	D	E
First Primer Pair	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Second Primer Pair	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

#### 實驗步驟

- 配製PCR反應混合液，取1.5ml小管，依序加入
  - 196  $\mu$ l 水、
  - 70  $\mu$ l DNA 聚合酶緩衝液(x5)、
  - 35  $\mu$ l dNTPs、
  - 7  $\mu$ l DNA 聚合酶。
- 將微量滴管設定至100  $\mu$ l，吸排5~10次混合均勻。
- 取一排0.2 ml的PCR反應小管，貼上你的ID號碼小標籤。
- 將小管編號1~6，注意不要折斷這排反應小管，如果斷了，將無法進行PCR。
- 在這6個PCR反應小管中，分別加入44  $\mu$ l PCR反應混合液。

- (6). 在編號1~3小管中，分別加入5  $\mu$ l你選擇的第一個引子對。
- (7). 在編號4~6小管中，分別加入5  $\mu$ l你選擇的第二個引子對。
- (8). 在編號1和4的小管中加入1  $\mu$ l正常型菌株的DNA，作為反應模板。
- (9). 在編號2和5的小管中加入1  $\mu$ l 突變菌株的DNA，作為反應模板。
- (10). 在編號3和6的小管中加1  $\mu$ l 的水。
- (11). 以微量滴管設定至45  $\mu$ l，吸排5~10次混合均勻。
- (12). 蓋緊管蓋。

**表2.2**：3種PCR反應程式(1-3)，存於10°C下

Program 1 PCR反應程式1	Program 2 PCR反應程式2	Program 3 PCR反應程式3
98°C for 1 min	98°C for 1 min	98°C for 1 min
25 times: 98°C for 15 sec 55°C for 5 sec 72°C for 20 sec	25 times: 72°C for 20 sec 55°C for 5 sec 98°C for 15 sec	25 times: 72°C for 10 sec 98°C for 15 sec 55°C for 5 sec
72°C for 1 min	72°C for 1 min	72°C for 1 min
Store at 10°C	Store at 10°C	Store at 10°C

**10. 選擇PCR反應程式 (2分)**

如果這些引子的熔點( $T_m$ ) 是 $60^\circ\text{C}$ ，DNA聚合酶可以在 $72^\circ\text{C}$ 時以25 bp/sec的速率合成DNA。在Table 2.2中的3種PCR反應程式，哪一種應該使用於本實驗？

1. PCR PROGRAM 1  
PCR反應程式1

2. PCR PROGRAM 2  
PCR反應程式2

3. PCR PROGRAM 3  
PCR反應程式3

**重要事項：**

(1). 確定問題9和10已回答：如果你滿意你的答案，點選”LOCKANSWER”。

**注意：**一但鎖定，你不能再更改。

(2). 鎖定答案後，舉起你的粉紅卡，試務人員會將你的樣品送至PCR處進行反應。PCR反應會在20分鐘後完成，此時按照背景介紹的時間表，進行第1和第3部分的實驗。

(3). 20分鐘後，舉起你的粉紅卡，試務人員將會送回你的PCR反應。

**注意：**除非你舉卡要求，否則不會取得你的PCR反應產物。

(4). 請確認試務人員送回的樣品，確實是你的PCR反應。

(5). 在每一PCR樣品中加入10  $\mu\text{l}$ 注膠緩衝液，以微量滴管吸排5~10次混合，避免氣泡。

(6). 將你的樣品加注到瓊脂電泳膠，如前電泳部分所述。

(7). 將此電泳膠結果拍照存證，此影像會被檢查評分，最高可得到22分此時試務人員會依照你選擇的引子對，給你一張標準電泳膠圖，你依此回答問題11和問題12。

### 11. DNA 條帶(bands)大小 (4分)

逐項回答是否得到特定大小的DNA 條帶，若有，選擇”+”。



	PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6
150 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
200 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
250 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
300 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
350 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
400 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
450 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
500 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
550 bp	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**12. 失效酵素作用步驟 (4分)**

根據你的選擇，回答Fig.2.1中的5個酵素作用步驟是正常、失效、或是你選擇使用的引子無法判定。

	FUNCTIONAL 有功能	DYSFUNCTIONAL 無功能	NOT POSSIBLE TO DETERMINE 無法判定
<i>TRP5</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<i>TYR1</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<i>PHA2</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<i>ARO7</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<i>ARO2</i>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**酵母菌胺基酸合成缺失突變株**

多年來，單倍體麵包酵母菌被用來做為解答真核生物主要代謝途徑的模式生物。正常酵母菌能自行合成所有20種胺基酸。利用紫外光(UV)突變誘導後，分離出各種不同胺基酸合成缺失突變株。

照片冊中的8張照片呈現了5個單倍體酵母菌株(1~5)在8種培養基(A~H)上的生長情形：

第1區沒有培養酵母菌

第2區是1號菌株

第3區是2號菌株

第4區是3號菌株

第5區是4號菌株

第6區是5號菌株

培養基A~H的成分在Table 3.1

**注意：**不要在照片上做任何註記。

Table 3.1. Growth media

<b>MEDIA</b> 培養基	<b>COMPOSITION</b> 成份
A	Rich complex media (yeast extract + peptone + dextrose) 豐富培養基 (酵母菌抽出物 + 蛋白質 + 葡萄糖)
B	Minimal media without any amino acids 最少培養基，不含任何胺基酸
C	Minimal media + homocysteine 最少培養基 + 同半胱胺酸 (homocysteine)
D	Minimal media + isoleucine 最少培養基 + 異白胺酸 (isoleucine)
E	Minimal media + threonine 最少培養基 + 蘇胺酸 (threonine)
F	Minimal media + methionine + threonine 最少培養基 + 甲硫胺酸 (methionine) + 蘇胺酸 (threonine)
G	Minimal media + lysine 最少培養基 + 離胺酸 (lysine)
H	Minimal media + proline 最少培養基 + 脯胺酸 (proline)

## 13. 酵母菌生長或不生長 (10分)

記錄不同菌株的生長或不生長情形：“+”代表生長；“-”代表不生長。



	STRAIN 1 菌株 1	STRAIN 2 菌株 2	STRAIN 3 菌株 3	STRAIN 4 菌株 4	STRAIN 5 菌株 5
MEDIA A 培養基A	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDIA B 培養基B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDIA C 培養基C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDIA D 培養基D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDIA E 培養基E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDIA F 培養基F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDIA G 培養基G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MEDIA H 培養基H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

14. 沒有功能的酵素作用步驟 (5分)

根據記錄之菌株生長情形，推導出在這5個菌株中，分別可能是哪一個酵素作用步驟失效。  
 對每一個菌株，以數字”1~31” 表示失效酵素作用步驟，或”0” 代表沒有任何酵素作用步驟失效，酵素作用步驟”1~31” 請看實驗台牆上的生化合成路徑圖。

	STRAIN 1 菌株1 STRAIN 1	STRAIN 2 菌株2 STRAIN 2	STRAIN 3 菌株3 STRAIN 3	STRAIN 4 菌株4 STRAIN 4	STRAIN 5 菌株5 STRAIN 5
ENZYME STEP NO. in biochemical chart on the wall 酵素作用步驟	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

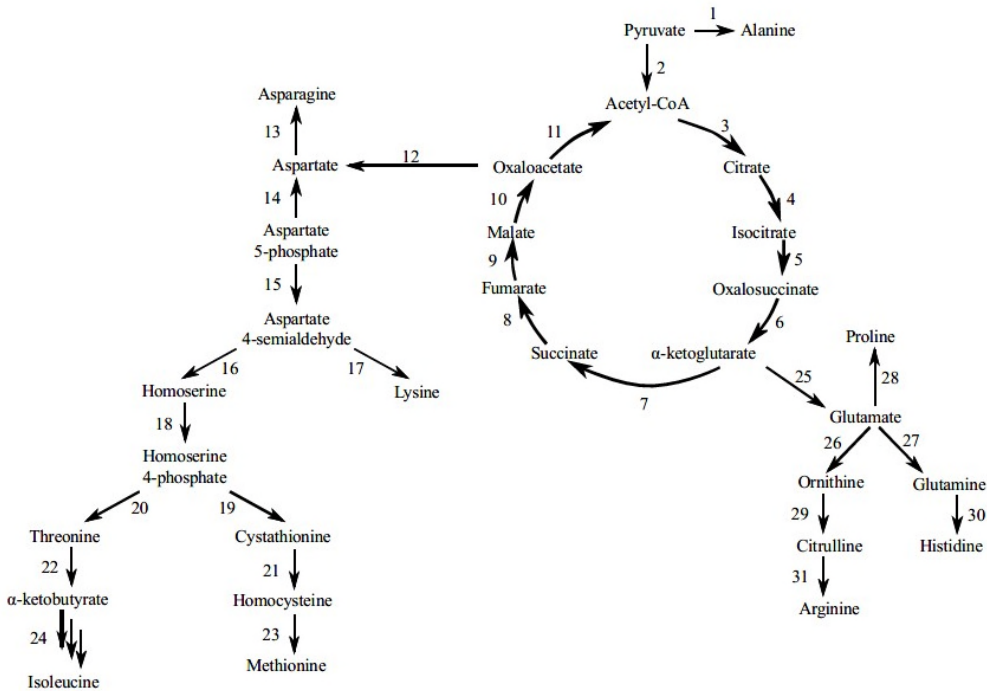


圖 3.1 : Simplified model for amino acid biosynthesis in yeast.

【完】