

考生編號_____

分數_____

2016 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 1 試場

分子生物學

本實作考試包括三部分

第 I 部分 限制酶切位檢測建構質體組成 (54分)

第 II 部分 純化電泳瓊脂膠中的DNA片段(28分)

第 III 部分 酵母菌雙雜合實驗(18分)

要完成全部三部分試題，你必須同時進行各部分試題，建議先進行第 I 部分，空檔時間，開始做第 II 部分，再利用空檔作第 III 部分。

實驗所需要的器材及藥品，都已放在桌上，請按照下面的清單清點。若有缺少請舉手告訴評審老師。實驗完畢後，請將用過的器材清洗乾淨並放置整齊。

實驗器材：

器 材 類	數量	藥品及材料類	數量(μl)
微量分注器 p20	1 支	無菌水	1 管 (100)
微量分注器 p1000	1 支	QG 溶液	1 管(800)
p20 微量分注器吸管尖	30 支	PE 溶液	1 管(1600)
p1000 微量分注器吸管尖	10 支	EB 溶液	1 管(45)
微量離心管	6 支		
DNA 純化離心管組	2 組	以下藥品置於冰上	
		5X(倍)濃度限制酶反應緩衝液	1 管(18)
馬克筆	1 支	PvuII 限制酶	1 管(9)
計時器	2 個	XhoI 限制酶	1 管(9)
膠水	1 支	XbaI 限制酶	1 管(9)
迷你離心機	1 個	質體 A	1 管(3)
有編號的離心管水浴浮盤	1 個	質體 B	1 管(3)
有編號的培養皿(盛裝膠片用)	1 個	質體 C	1 管(3)
電泳槽(含電泳膠片)	1 個	DNA 加注染料(標示:Dye)	1 管(24)
乾浴槽(50°C)	公用	尺標 DNA(標示:M)	1 管(24)
水浴槽(37°C)	公用	片段 1 膠體	1 管
高速離心機	公用	片段 2 膠體	1 管
DNA 膠片照相系統	公用		

※ 請注意：

1. 請確認考生編號是否正確；若有誤，請舉手請助教處理。
2. 桌上的藥品及器材用完後，將不再補充。
3. 公用儀器運用請依照指示使用。
4. 本試卷（含封面、試題卷）共 12 頁，於交卷時全部繳回。
5. 作答時間 80 分鐘，請於本卷上作答。試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。

第 I 部分 限制酶切位檢測建構質體組成

背景介紹：

在進行重組 DNA 實驗時，我們會利用適當的限制酶切割載體和要接入的 DNA，經純化後，再以 DNA 連接酶將其接合，得到預期的重組 DNA。我們希望在新載體 DNA (如圖 1) 的 XhoI 切位接入一個 DNA 片段 (如圖 2)，且插入片段的基因方向性和新載體上插入點所在區域的方向性相同(如圖 1、2 中箭頭標示)。實驗部分，已先將新載體 DNA (如圖 1) 以限制酶 XhoI 切開、純化，要插入的 DNA 片段也以 XhoI 從原來的載體上切下、純化。將此二純化的 DNA 混合，加入 DNA 連接酶反應後，轉殖入大腸桿菌中，得到三個轉殖菌株：A、B 和 C，從這三種轉殖菌中分別得到質體 A、質體 B 和質體 C。接下來我們要利用限制酶切割來檢測這些質體，藉由限制酶切出之 DNA 片段大小來判定這三種質體的建構組成，例如：同向插入、反向插入或是不含插入片段。

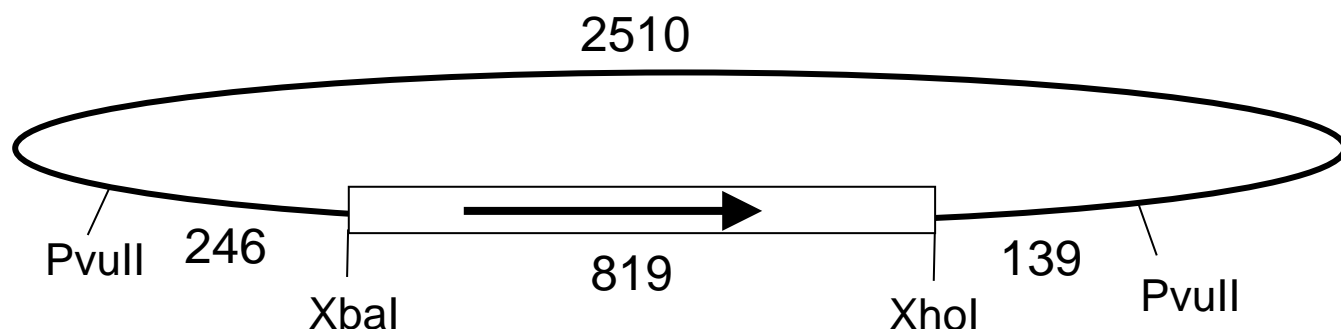


圖1. 新載體上相關限制酶切位及各切位間距離(單位：bp)，箭頭表示插入區方向性。

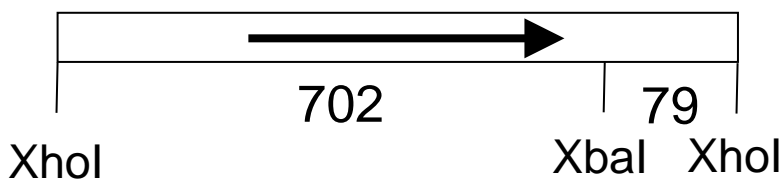


圖2. 插入片段上相關限制酶切位及各切位間距離(單位：bp)，箭頭表示插入片段方向性。

QI-1.想知道三種質體的建構組成，但只能進行一種切割方式，且只能使用 PvuII、XhoI、XbaI 三種限制酶中的一種(單切割，single digestion，例如 PvuII)，或是二種限制酶同時切割(雙切割，double digestion，例如 PvuII/XhoI)，妳(你)的選擇為何？請在下列選項中勾選妳(你)的切割方式：(8分)

切割方式	PvuII	XhoI	XbaI	PvuII/XhoI	PvuII/XbaI	XhoI/XbaI
答案勾選						

QI-2.根據妳(你)的選擇填寫限制酶切割反應設計(對單一質體切割的配製量)：(3分)

使用單切割，限制酶使用量為 2 μ l；使用雙切割，限制酶使用量為 4 μ l (每種各 2 μ l)

配製成分	質體 DNA	5X(倍)濃度限制酶 反應緩衝液	無菌水	限制酶	總體積
使用量(μ l)	2				20

提示：在進行限制酶反應時，反應混合液內應含 1X(一倍)濃度的限制酶反應緩衝液

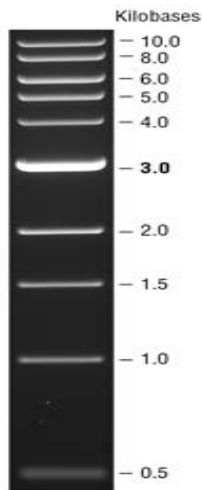
實驗步驟：(操作 6分)

- 依 QI-2 的設計配製限制酶反應的混合液：取一空微量離心管，用馬克筆標記 A，按照無菌水、5X(倍)濃度反應緩衝液、限制酶的順序各加入 QI-2 中填寫的三倍量於此微量離心管，吸取不同溶液時，要用乾淨未用過的吸管尖，用微量分注器吸排混合。
- 另取二空微量離心管，分別標記 B 和 C，用 P20 微量分注器將 A 管中的限制酶反應混合液各取 18 μ l，分別加入 B 和 C 管。
- 分別用 P20 微量分注器吸取 2 μ l 的質體 A、質體 B 和質體 C 的 DNA，對應加入已有限制酶反應混合液的 A、B 和 C 管中，用微量分注器吸排混合。每次吸取樣品時，要用乾淨未用過的吸管尖。
- 用迷你離心機將各管中混合液離心至管底部，離心時請平衡放置離心管於相對位置。
- 將反應混合液離心管放在有編號的水浴浮盤，置於 37 °C 水浴槽中反應 30 分鐘(以計時器計時)，利用等待時間回答問題，或進行第 II 部分實作題。
- 當 30 分鐘反應時間終了時，從水浴槽取回你的樣品。

7. 用 P20 微量分注器在各反應樣品中分別加入 4 μ l DNA 加注染料，以分注器吸排混合。
8. 使用 P20 微量分注器，分別將尺標 DNA 及已加注染料的反應樣品(各 20 μ l)，依照尺標 DNA、管 A、管 B、管 C 的順序，由左至右注入電泳膠片的樣品凹槽中。空一個凹槽後加入第 II 部分實作試題的樣品。注意輕緩加入樣品，不要溢出槽外。**(與第 II 部分樣品一起進行)**
9. 舉手示意實驗助教，按照實驗助教指示設定連接電源，進行電泳 25 分鐘，請小心不要碰觸電極。**(與第 II 部分樣品一起進行)**
10. 開始電泳後，助教會依照妳(你)在 QI-1 勾選的限制酶切割方式提供標準電泳結果圖，將圖貼在下方空白處，並依照此圖回答以下問題。
11. 待電泳結束後，關閉電源，小心取出完整膠片，放在標有編號的培養皿上，帶至膠片照相處，交給實驗助教後直接回自己的實驗桌，電泳結果會由評分老師給分。

實驗結果：（16分）

請將標準電泳結果圖黏貼於此↓



QI-3. 按照妳(你)在 QI-1 選擇的限制酶切割方式，當質體中有插入圖 2 的片段，且插入片段的方
向與插入區方向相同時，此質體在限制酶切割後，產生的 DNA 各片段長度(bp)應該是多少？
請依片段長度，由小到大列出 (6 分)

QI-4. 依據 QI-1 的選擇以及拿到的標準電泳結果圖和上方尺標 DNA 分離模式的標準圖(單位:kb)，
判定這三種質體的建構組成，在下表中勾選正確的選項 (10 分)

	質體 A	質體 B	質體 C
有插入圖 2 的片段			
沒有插入圖 2 的片段			
無法判定是否有插入圖 2 的片段			
插入圖 2 的片段與圖 1 插入區方向相同			
插入圖 2 的片段與圖 1 插入區方向相反			
無法判定插入片段的的方向 (如果有插入片段)			

QI-5. 妳(你)知道在建構質體時，是否有增加插入成功機率的方法嗎？(5 分)

第 II 部分 純化電泳瓊脂膠中的 DNA 片段

背景介紹：

進行重組 DNA 實驗時，在以限制酶切割原有質體或 PCR 產物後，需經瓊脂膠電泳分離所需的 DNA 片段，將含這些片段的區塊由電泳瓊脂膠中切下，再將 DNA 自切下的膠塊中純化。純化的過程包括：溶膠、DNA 片段吸附於矽膠膜(silica-gel membrane)、清洗、DNA 片段回溶和收集。本實驗要從二個 DNA 膠塊中將 DNA 片段純化(片段 1 和片段 2)，再和第一部分實驗的限制酶切割片段一起進行電泳分析，確認純化是否成功。

實驗步驟：（操作 6 分）

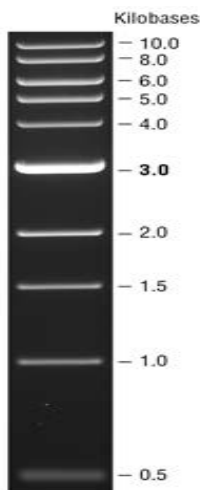
1. 用 P1000 微量分注器各吸取 360 μl 的 QG 溶液分別加入裝有片段 1 和片段 2 膠體的離心管中，在管上註明你的考號。
2. 將步驟 1 離心管置於 50 $^{\circ}\text{C}$ 乾浴槽中溶解膠體，每隔 2 分鐘以手指輕彈離心管促進膠體溶解，直到膠體完全溶解（通常會在 5 分鐘以內完全溶解）。
3. 另取二組空 DNA 純化離心管組（如圖 A），不要拆開，用馬克筆在上管(淡紫色)管蓋分別上標記 1 和 2。
4. 用 P1000 微量分注器將步驟 2 溶解後的片段 1 和片段 2 膠體溶液分別加入標記 1 和 2 的 DNA 純化離心管組上管內，蓋緊上蓋，下管請註明你的考號。
5. 將步驟 4 的 DNA 純化離心管組 1 和 2 放入公用離心機，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘。將離心管組下管內溶液倒在廢液杯後，上管再套回下管。
6. 用 P1000 微量分注器在步驟 5 的 DNA 純化離心管組 1 和 2 的上管內，分別加入 750 μl 的 PE 溶液，蓋緊上蓋，靜置 5 分鐘後，放入公用離心機，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘。
7. 將步驟 6 離心管組下管內溶液倒在廢液杯後，上管再套回下管。再以公用離心機 12,000 rpm 離心 1 分鐘。
8. 另取二空微量離心管，分別標記 1 和 2 及考號，將步驟 7 離心管組上管 1 和 2 分別置於空微量離心管 1 和 2 內（如圖 B），下管丟棄。
9. 用 P20 微量分注器在步驟 8 離心管組上管 1 和 2 內分別加入 20 μl 的 EB 溶液，注意要完全覆蓋管內的白色膜。蓋緊上蓋，靜置 3 分鐘後，以公用離心機 12,000 rpm 離心 1 分鐘，保留微量離心管內純化的 DNA 溶液。



10. 用 P20 微量分注器在步驟 9 微量離心管 1 和 2 溶液中分別加入 4 μ l DNA 加注染料，以分注器吸排混合，待第 I 部分試題樣品完成限制酶反應後，一起進行電泳。
11. 使用 P20 微量分注器將步驟 10 的微量離心管 1 和 2 溶液（各 20 μ l），接續尺標 DNA、管 A、管 B、管 C 之後，跳過一個樣品凹槽，再依照片段 1、片段 2 的順序，分別加入樣品凹槽中。注意輕緩加入樣品，不要溢出槽外。
12. 舉手示意實驗助教，按照實驗助教指示設定連接電源，進行電泳 25 分鐘，請小心不要碰觸電極。（與第 I 部分樣品一起進行）
13. 開始電泳後，助教會提供標準電泳結果圖，將圖貼在下方空白處，並依照此圖回答以下問題。
14. 待電泳結束後，關閉電源，小心取出完整膠片，放在標有編號的培養皿上，帶至膠片照相處，交給實驗助教後直接回自己的實驗桌，電泳結果會由評分老師給分。

實驗結果：（12分）

請將標準電泳結果圖黏貼於此↓



QII-1. 根據上方尺標 DNA 分離模式的標準圖(單位: kb), 推估此二 DNA 片段長度分別是多少?
以 kb 為單位, 推估至一位小數。 (4 分)

片段 1:

片段 2:

QII-2. 在步驟 1 以 QG 溶液去溶解膠體, 而在步驟 9 使用 EB 溶液去回收 DNA, 妳(你)可否推測這二種溶液對 DNA 和 silica-gel membrane 之間的關係有何效應? (6 分)

第 III 部分 酵母菌雙雜合實驗

背景介紹：

一個轉錄因子蛋白包含二個功能區，一為 DNA 附著區(DNA binding domain，簡稱 BD)；另一為轉錄活化區(activation domain，簡稱 AD)，這二個功能區可彼此分開，各自發揮功能。1989 年 Stanley Fields 利用酵母菌中的 Gal4 轉錄因子的二個功能區，提出”酵母菌雙雜合實驗”(The yeast two hybrid system)來檢測二個蛋白質之間是否會發生實質交互作用。他利用重組 DNA 技術將 Gal4 的 BD 和特定蛋白質 X 雜合在一起(BD-X)，將 Gal4 的 AD 和特定蛋白質 Y 雜合在一起(AD-Y)。將這二個雜合蛋白同時在酵母菌中表現，BD-X 會附著於 Gal4 辨認的啟動子(promoter)，若蛋白 X 和蛋白 Y 會發生實質交互作用，則可將 AD-Y 帶到 Gal4 辨認的啟動子，因此引發啟動子後的報導基因(reporter gene)的表現，藉由報導基因表現後對酵母菌生長或外表型的效應，可以讓實驗者 ”觀察” 到蛋白 X 和蛋白 Y 的交互作用。現有二個酵母菌蛋白質 H 和 T，我們想利用”酵母菌雙雜合實驗”來檢測 H 和 T 之間是否會發生交互作用，我們建構了二組雜合系統：第一組(如圖 3 中的 a~d)將 T 與 AD 雜合(AD-T)，H 與 BD 雜合(BD-H)，搭配必要的控制對照組；第二組(如圖 3 中的 e~h)將 H 與 AD 雜合(AD-H)，T 與 BD 雜合(BD-T)，搭配必要的控制對照組，圖 3 中各方格內的標示表示 a~h 各菌株內表現的相關蛋白。這二組系統使用同樣的酵母菌菌種進行檢測，所有的菌株都能生長在提供必要養分的培養基上(圖 4)，唯有當報導基因表現時才會使細胞生長在缺乏特定養分 adenine 的培養基上(圖 5)。請依據圖 3~5 的訊息和實驗結果回答以下問題：

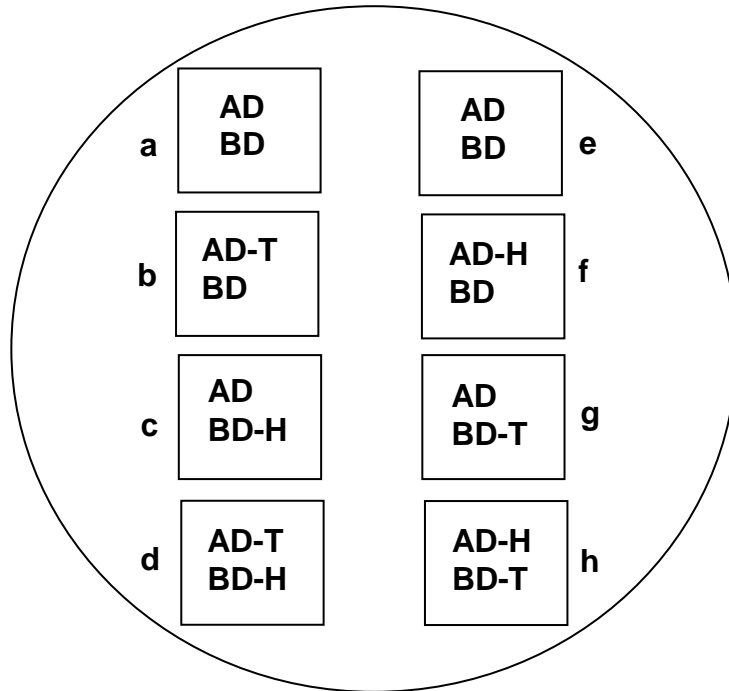


圖3. 表現不同蛋白質的酵母菌株 a~h 在培養基上的排列位置。
方格內標記 各菌株所表現的”酵母菌雙雜合實驗”相關蛋白。

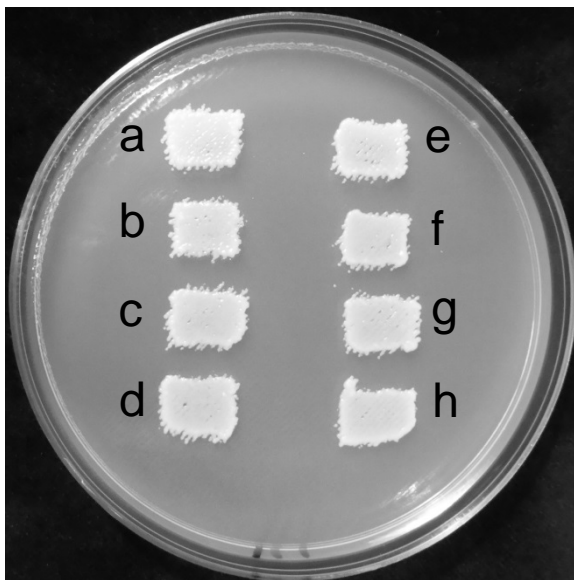


圖4. 表現不同蛋白質的酵母菌株 a~h 在提供必要養分培養基。

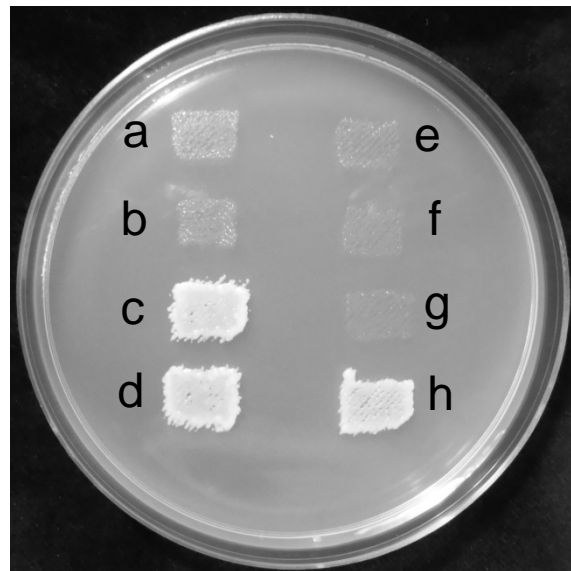


圖5. 表現不同蛋白質的酵母菌株 a~h 在缺乏特定養分adenine培養基。

QIII-1. 第一組的實驗結果(a~d)是否支持 H 和 T 之間會發生交互作用，為甚麼？ (6分)

QIII-2. 第二組的實驗結果(e~h)是否支持 H 和 T 之間會發生交互作用，為甚麼？(6分)

QIII-3. 是否可推測此實驗中的報導基因，其表現出的蛋白質參與何種細胞功能？(6分)