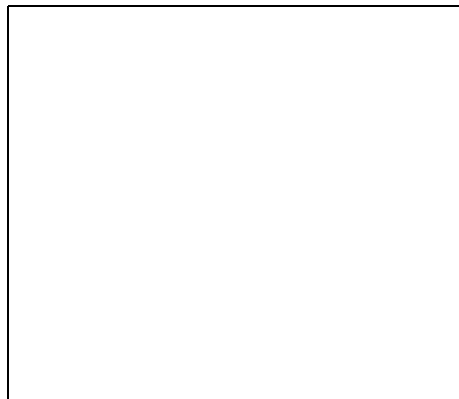


競賽編號：

104 學年度高級中學 全國生物科學科能力競賽

細胞分生組操作試題

得 分



本試卷滿分 100 分

競賽編號：

競賽說明：

請依所指定器材及藥品動手操作，並將答案填寫於答案卷的規定位置。實驗時請自己根據實驗需要來安排時間及實驗順序。本試卷配分 100 分。

材料及實驗設備：

本試卷共分二個實驗題，所提供的材料及儀器設備列於各實驗題中，置於標示「細胞分生組」之塑膠籃中，請檢查個人器材，如有不符，請舉手聲明，各項器材必須節省使用，競賽開始後不再補發。

實驗三

【質體 DNA 抽取】（共 50 分）

本試題須先進行實驗設計，完成後舉手繳交設計單，並領取實驗操作步驟一份，再開始進行實驗操作。

所需材料與器材：

實驗器材	規格	數量	備註
已離心沉澱之大腸桿菌菌液		1	放置於 1.5 mL 微量離心管內
Solution I		200 μ L	
Solution II		200 μ L	
Solution III		200 μ L	
Wash solution		600 μ L	
Elution solution		20 μ L	
含白色濾材的微量離心管		1	
乾淨的微量離心管		1	裝質體 DNA 用
微量分注器	P ₁₀₀₀ 或 P ₂₀₀	1 支	用來取 200 μ L 溶液
藍色微量吸管尖		10 支	
微量分注器與黃色微量吸管尖	P ₂₀	1 支	用來取 20 μ L 溶液，請到講桌前借用，用畢歸還
黑色細簽字筆		1 支	
離心機			公用
鑷子		1 支	公用

質體 DNA 抽取實驗設計：

請根據以下說明，進行質體 DNA 抽取實驗設計，並將所設計的實驗流程寫在”

質體 DNA 抽取實驗設計單”：

大腸桿菌的遺傳物質除了染色體外，也常含有質體 (plasmid)，質體是一種環狀 DNA，目前在生物技術應用中，常被用來選殖與表現重組蛋白質，1980 年代重組人類胰島素的生產，即是重組質體在大腸桿菌內製造所得，因此抽取質體進行重組 DNA 是生物技術的基礎技術。

有許多的方法可用來抽取大腸桿菌的質體，在此介紹其中一種常用的方法，稱為鹼裂小量抽取法 (Alkaline lysis miniprep)，所需使用的器材包括微量分注器，微量吸管，離心機等。所有步驟均在 1.5mL 微量離心管內完成，所需使用的藥品及其功能如表一所述：

表一：

藥品名稱	藥品功能
Potassium acetate	酸鹼中和，使質體 DNA 回復雙股 (reanneal)，使染色體與細菌蛋白質沉澱
Glucose/ Tris / EDTA (GTE)	使細菌均勻分布於溶液
NaOH	參與裂解細菌；使染色體與質體 DNA 雙股解離 (denature)
SDS	參與裂解細菌；使細菌蛋白質變性
TE buffer	回溶質體 DNA
95% EtOH	沉澱質體 DNA
70% EtOH	清洗質體 DNA

問題一：假若現在提供你 3 mL 大腸桿菌菌液，及表一內所有的藥品及所需器材，請根據上面所述，依照藥品功能進行正確排序，並設計一套實驗方法，以條列式詳細寫出實驗步驟，可用來成功的抽取大腸桿菌的質體 DNA，並將設計內容填入”質體 DNA 抽取實驗設計單”。(15 分)

競賽編號：

若實驗設計完成，請舉手，經檢查回收質體 DNA 抽取實驗設計單後，我們將會發一份實驗操作步驟給你，拿到操作步驟後，再根據步驟開始進行本實驗題操作，並回答相關問題。

競賽編號：

問題二：根據”質體 DNA 抽取實驗操作步驟”，請將含有質體 DNA 的微量離心管蓋緊，用黑色簽字筆在微量離心管上蓋寫下你的編號，交給監試人員，我們會協助進行質體 DNA 定量分析，此操作部分將根據你所抽取的 DNA 濃度進行評分。(15 分)

問題三：做完實驗後請描述第 1~3 三個步驟處理下，溶液的變化情形為何？請將答案寫在答案卷上。(6 分)

為了要分析所抽取的質體 DNA，限制酶圖譜是常用的方法之一，將限制酶切位標示在質體圖譜上，同時亦標示出切位間相距的大小（以鹼基對表示）；
假設當你所抽取的質體 DNA 採用四種限制酶，分別為 EcoRI、BamHI、HindIII、與 HaeII，經限制酶作用後以 DNA 電泳法分析，結果如表二所示：

表二：

限制酶	EcoRI	BamHI	HindIII	HaeII	EcoRI + HaeII	BamHI + HaeII	HindIII + HaeII	EcoRI + HindIII	EcoRI + BamHI	BamHI + HindIII
DNA 片 段大小 (kbp)	12.0	12.0	12.0	6.0 4.0 2.0 1.0	5.0 4.0 2.0 1.0	6.0 4.0 1.5 0.5	6.0 2.5 2.0 1.5	6.5 5.5	10.5 1.5	8.0 4.0

kbp: kilo base pair

問題四：根據表二的電泳結果，請問該質體的大小為多少鹼基對？請畫出該質體完整的限制酶圖譜。(14 分) 答案寫在答案卷上。

實驗四

【溶血及滲透壓試驗】（共 50 分）

一、實驗原理：

溶血是指紅血球細胞破裂溶解現象，溶血可由多種理化因素和毒素引起，在體外，物理性如低張溶液、機械性強力振盪、突然低溫冷凍、過酸或過鹼；化學性如酒精、乙醚、皂素、膽鹼鹽等均可引起溶血。臨床上的溶血試驗主要用於檢查注射劑中化學物質如膽酸鹽、皂素等對紅血球細胞膜的破壞溶解程度。

滲透是水分子經半透膜擴散的現象。細胞藉由滲透作用可能因此喪失水分或得到過多的水分，例如將細胞放入濃食鹽水即高張溶液中，由於濃食鹽水中水的含量比例較細胞質低，胞內的水會不斷的往胞外滲透，導致細胞脫水、萎縮；相反的，將細胞放入蒸餾水即低張溶液中，由於細胞內的水含量比例較蒸餾水低，外界的水分子會不斷往胞內滲透，導致細胞膨脹，甚至造成破裂。

劉氏染色（Liu's stain）：為一種簡單快速的方法，可在短時間將血球抹片染色，以提供醫師做快速確診。在血液學抹片上染色可用來區別各種白血球細胞分化等情形。在細胞學抹片，劉氏染色法所用的染液分成 LiuA 和 LiuB 兩部份。LiuA 含有 Eosin Y，可將細胞質和血紅素等染成紅色；LiuB 則含有 Azur I 和 methylene azure，可和細胞核以及白血球的嗜鹼性顆粒作用，染成藍紫色。結合 Liu's A 與 Liu's B 溶液染在細胞上，可觀察細胞型態的變化。

二、實驗目的：

今有某動物之紅血球，擬以溶血及滲透壓兩試驗來探討兩組溶液之溶血性及滲透壓反應，請依下列實驗過程操作並回答問題。

三、實驗步驟：

（一）、溶血試驗

今有一溶血毒素溶液，此溶液會導致紅血球破裂造成溶血，請你就此不同濃度的溶血毒素溶液甲、乙、丙依照以下試驗流程，檢驗觀察並回答問題

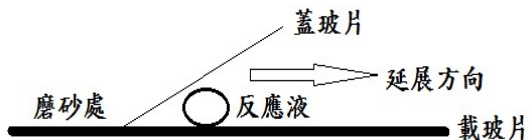
一、稀釋與溶血反應

1.取適量紅血球加入適量生理食鹽水做序列稀釋，將紅血球稀釋液滴至載玻片上，將蓋玻片以 45 度蓋上，勿產生氣泡，放置顯微鏡下觀察，調整至視野（400 倍）中約 30-120 個紅血球，以可清楚分辨單一紅血球為主。

2.取稀釋好之紅血球溶液 0.1 mL 分別與甲、乙、丙溶血毒素溶液各 0.1 mL 均勻混合後，反應 1 分鐘。

二、抹片製作（如下圖所示）

分別取上述步驟一、2 之反應液各一滴至三個乾淨載玻片前端，每個載玻片皆用蓋玻片以斜 20 度~30 度壓在載玻片的前端，使反應液在載玻片上延展，緩慢穩定的將溶血反應液由載玻片前端推至載玻片後端，使其完全展開，均勻塗覆載玻片後風乾。



三、劉氏染劑反應

取 1~2 滴劉氏染劑 A，滴在上述每個風乾的載玻片，用蓋玻片使劉氏染劑 A 在載玻片上延展，完全覆蓋溶血反應液，反應 30 秒，再滴入 1~2 滴劉氏染劑 B，用蓋玻片使劉氏染劑 B 在載玻片上延展，反應 1 分鐘後，蓋上蓋玻片。

四、顯微鏡觀察

將與劉氏染劑反應後之抹片，置於顯微鏡下，觀察視野（400 倍）中紅血球溶血的情形。

（二）、滲透壓試驗

今另有兩溶液會造成紅血球的滲透壓反應，請你就此不同滲透壓試液 I、II 分別與紅血球反應，請依照以下試驗流程，檢驗觀察並回答問題

一、稀釋與滲透壓反應

1.取適量紅血球加入適量生理食鹽水做序列稀釋，將紅血球稀釋液滴至載玻片上，將蓋玻片以 45 度蓋上，勿產生氣泡，放置顯微鏡下觀察，調整至視野（400 倍）中約 30-120 個紅血球，以可清楚分辨單一紅血球為主。

2.取稀釋好之紅血球溶液各 0.1 mL 分別與滲透壓試液 I、II 各 0.1 mL 均勻混合後，反應 1 分鐘。

二、抹片製作

同上

三、劉氏染劑反應

同上

四、顯微鏡觀察

同上

四、實驗器材：

實驗器材	數量	實驗器材	數量
生理食鹽水-（褐色瓶 5 ml）	1 瓶	劉氏染色液（A 1.0 ml）	1 瓶
溶血試液-（甲、乙、丙各 1 ml）	各 1 瓶	劉氏染色液（B 1.0 ml）	1 瓶
載玻片	8 片	血液樣本（0.5 ml）	1 瓶
蓋玻片	8 片	微量分注器（1000 μ L 或 200 μ L）	1 支
離心管	10 支	微量吸管（Tip）	20 支
滲透壓試液-（I、II 各 1ml）	各 1 瓶	光學顯微鏡	1 台

五、實驗問題：

1.由 400 倍率顯微鏡下觀察視野中紅血球溶血的情形，就甲、乙、丙三種溶血毒素溶液於視野中紅血球之溶血情形，繪入空格 A1、A2、A3（僅繪 15-20 個紅血球即可）；將最嚴重者（甲、乙或丙）填入空格 A4，及最輕者（甲、乙或丙）填入空格 A5。（每格 5 分）

2.請就所觀察之染色後紅血球有無細胞核，推測此種型態紅血球在演化中可能出現於下列哪些物種（複選）填入空格 B（每格 5 分）

甲 *Homo sapiens* 人

乙 *Oreochromis mossambicus* 吳郭魚

丙 *Champsocephalus gunnari* 南極冰魚

丁 *Ornithorhynchus anatinus* 鴨嘴獸

戊 *Gallus gallus* 雞

己 *Hoplobatrachus rugulosus* 虎皮蛙

3.由 400 倍率顯微鏡下觀察視野中紅血球滲透壓情形，I、II 何者為低張溶液，填入空格 C，何者為高張溶液，填入空格 D（每格 5 分）

4. 由 400 倍率顯微鏡下觀察視野中紅血球大小之變化情形，就 I、II 兩種滲透壓溶液於視野中紅血球大小之變化情形，繪入空格 E1、E2（僅繪 15-20 個紅血球即可）。（每格 5 分）