

考生編號_____

分數_____

2024 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 4 試場

I. 限制酶切位檢測建構質體組成

II. 突變菌種鑑定

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)
顯微鏡	1 座	p20 微量分注器吸管尖	1 盒
馬克筆	1 支	微量離心管	4 個
計時器	1 個	載玻片	3 片
碎冰桶	1 個	蓋玻片	6 片
離心管架	1 個	以下藥品置於冰上	
廢液杯	1 個	5X(倍)濃度限制酶反應緩衝液 (標示: 5X)	1 管(16)
有編號的離心管水浴浮盤	1 個	限制酶 R(標示: R)	1 管(10)
迷你離心機	1 個	質體 A(標示:質體 A)	1 管(4)
電泳槽 (含 DNA 膠)	1 組	質體 B(標示:質體 B)	1 管(4)
DNA 膠片觀察系統	1 組	質體 C(標示:質體 C)	1 管(4)
尺	1 把	DNA 加注染料(標示: Dye)	1 管(20)
水浴槽(37°C)	公用	尺標 DNA(標示:M)	1 管(20)
		酵母菌 H(標示: H)	1 管(12)
		酵母菌 J(標示: J)	1 管(12)
		酵母菌 K(標示: K)	1 管(12)

※ 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）共 6 頁，於交卷時全部繳回。
5. 作答時間 90 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。

背景介紹：

出芽酵母菌 (budding yeast)，學名 *Saccharomyces cerevisiae*，又被稱為啤酒酵母或麵包酵母，除了是生產酒精和食品發酵不可缺少的微生物，也是分子生物學和細胞生物學研究中重要的模式生物之一。出芽酵母菌雖然是單細胞真核生物，但有完整的生活史，可以單倍體 (1n) 或二倍體 (2n) 存在，無論單倍體或二倍體在養分充足時，都會以出芽方式行無性生殖。而單倍體分為二種交配型，不同交配型的單倍體可以結合成為二倍體。二倍體在缺乏養分的環境下，可以進行減數分裂，並產生 4 個單倍體的孢子 (spore)，圍封在一個孢子囊 (ascus) 內，待環境變好時，孢子便萌發，繼續行出芽生殖。完成減數分裂後形成的孢子囊，大部分含有四個孢子，但有時因為觀察角度，看起來像三個，有時因為減數分裂或孢子形成過程中的缺失，只有三個或二個孢子 (圖 1)。缺失的發生可能只是不明的偶發問題，影響少數孢子囊；也可能是相關基因的突變造成，影響大多數，乃至全部孢子囊。



圖1. 各種孢子囊所含孢子數目不同，自左而右：

四孢子(錐形排列)、四孢子(菱形排列)、三孢子、二孢子。

為了找出與出芽酵母菌減數分裂和孢子形成相關的基因，王教授先找出只在減數分裂期特定表現 (meiosis-specific expressed) 的基因，再將這些基因個別剔除 (knock-out) 後，檢測其對孢子形成是否有效應。在這些基因剔除的實驗中，先以 PCR 自基因體 DNA 中將特定基因複製選殖後，再將選殖基因編碼區的全部或部分以限制酶切除，並插入一個標記基因 (marker gene) 做為之後剔除轉形實驗 (transformation) 篩選之用。

在這些減數分裂期特定表現的基因中，有一個代號 X 的基因，王教授的學生又佳先以 PCR 和限制酶反應將一個帶有 X 基因的 2087 bp BamHI-XhoI 片段，選殖在質體上，得到質體 T733 (圖 2)。接下來將質體 T733 上含 X 基因部分編碼區的 HindIII-HpaI 片段移除，並在移除後的空位插入一個含完整 LEU2 基因的 HindIII-HpaI 片段以做為剔除轉形實驗的標記基因。此一重組後的新質體為質體 T734 (圖 3)。又佳以 T734 進行酵母菌細胞剔除轉形實驗，將染色體上的 X 基因剔除後得到 x 突變體。最後將二倍體的 x 突變體和正常酵母菌誘發減數分裂，並比較各菌株產生孢子的情形。

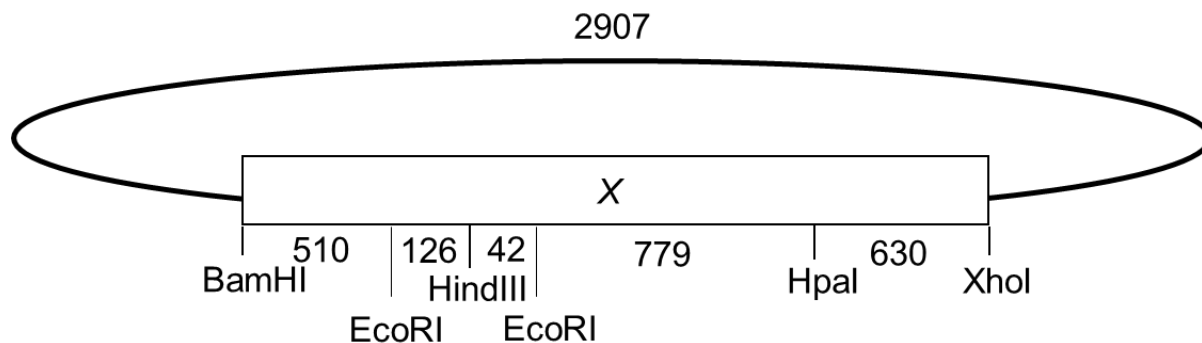


圖2. 質體T733相關限制酶切位及各切位間距離(單位：bp)

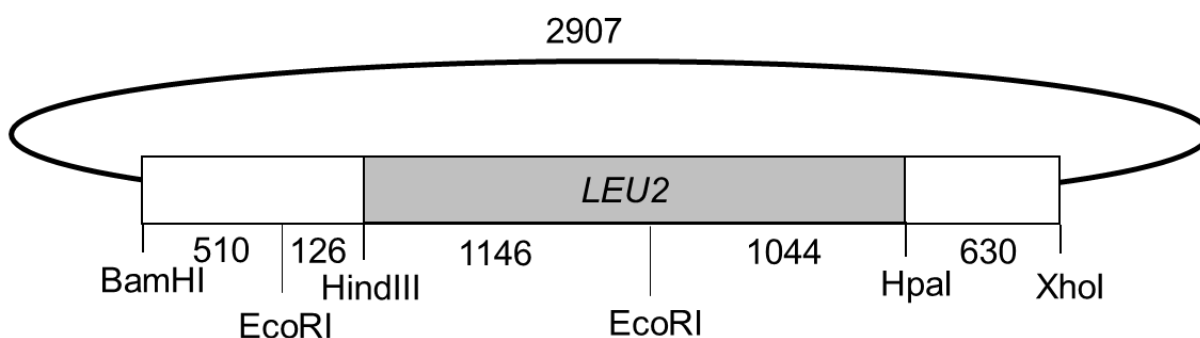


圖3. 質體T734相關限制酶切位及各切位間距離(單位：bp)

實驗 I. 限制酶切位檢測建構質體組成：請妳(你)確認質體建構是否正確。利用限制酶切位檢測去判定材料中的三管質體(A、B 和 C)，何者是質體 T733？何者是質體 T734？

實驗 II. 突變菌種鑑定：請妳(你)對又佳的得到的 x 突變體和正常酵母菌進行孢子分析。實驗材料 H、J、K 三個微量離心管中分別裝有酵母菌不同菌株經誘發減數分裂後，經過固定處理的細胞。請在顯微鏡下觀察，並根據背景介紹的資訊，做出結論。H、J、K 三管中，何者是 x 突變體？何者是正常酵母菌？建議先進行**實驗 I**步驟，再用空檔進行**實驗 II**及回答問題。

實驗操作和結果：（操作 12 分）**實驗 I：**

Q1 分別對質體 A、B 和 C 以限制酶 R 切割。單一質體切割反應中，使用 8 unit 限制酶，而實驗材料中的限制酶 R 的濃度是 4 unit / μl ，根據這些條件，在下表中填寫限制酶切割反應設計（對單一質體切割的配製量），在進行限制酶反應時，反應混合液內應含 1X (倍)濃度的限制酶反應緩衝液。（6 分）

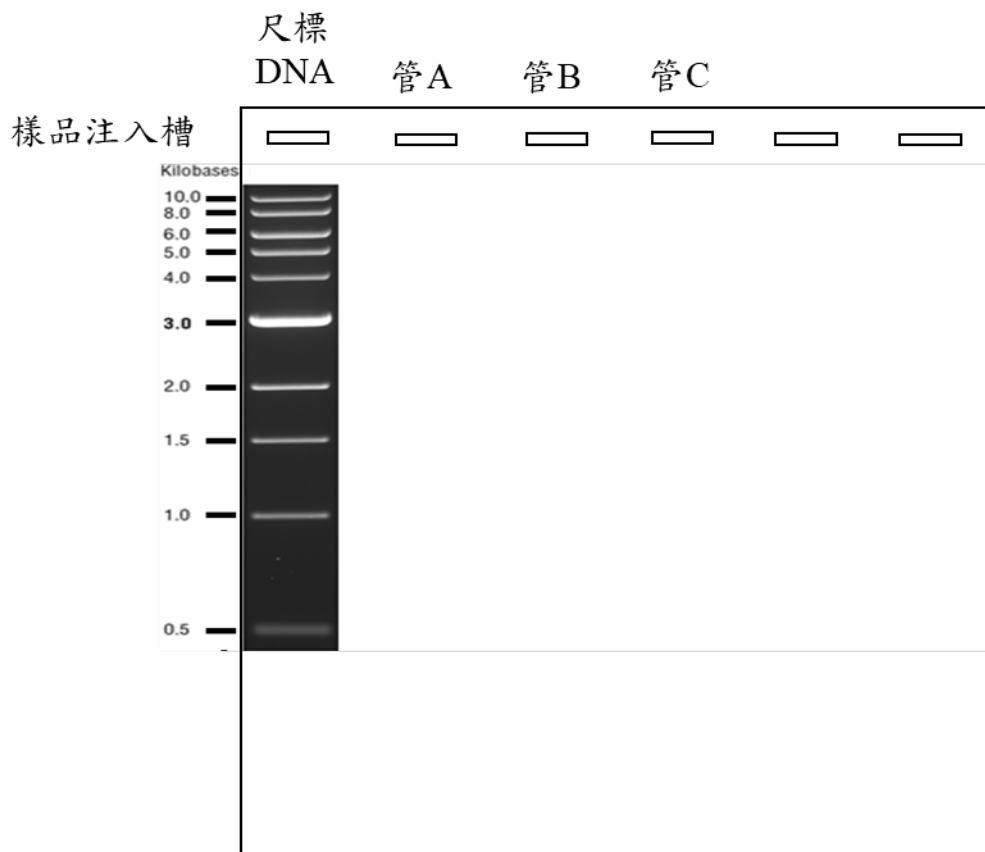
配製成分	質體 DNA	5X(倍)濃度限制酶 反應緩衝液	無菌水	限制酶 R	總體積
使用量(μl)	2				20

- 依 Q1 的設計配製可供三個質體進行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 R 的順序，用微量分注器各加入 Q1 表中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。
- 另取二個空的微量離心管，分別標記 B 和 C，用微量分注器將 A 管中的限制酶反應混合液各取 18 μl ，分別加入 B 和 C 管。
- 用微量分注器分別吸取 2 μl 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，離心時請注意平衡放置離心管於離心機中。
- 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 35 分鐘(以計時器計時)，利用等待時間進行**實驗 II**。
- 當 35 分鐘反應時間終了時，從水浴槽取回自己的樣品。
- 用微量分注器在管 A、管 B、管 C 及尺標 DNA (M) 中分別加入 4 μl DNA 加注射料 (Dye)，以分注器混合。
- 用微量分注器，分別取 20 μl 已加有加注射料的尺標 DNA (M) 及管 A、管 B、管 C，依照尺標 DNA (M)、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。每次換新吸管尖，注意輕緩加入樣品，不要溢出槽外。
- 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 20 分鐘。

10. 待電泳結束後，關閉電源，舉手示意實驗助教，由助教拍照留存結果後，自行透過觀察孔觀察，並在 Q2 方框中用筆標示所觀察到的結果，並依照此圖回答問題。

Q2 限制酶反應和電泳結果 (15 分)

↓請將管 A、B、C 的電泳結果以尺標 DNA 為基準，用筆標示於下圖中 ↓



Q3 根據電泳結果圖，判定此次使用的限制酶 R 是圖 2 和圖 3 中的哪一種限制酶？ (9 分)

T733 和 T734 以限制酶 R 切割後所得片段長度分別應該是多少？

Q4 根據電泳結果和尺標 DNA 的標準圖(上圖左側，單位：kb)，判定質體 A、B 和 C 分別是 T733 或是 T734？ (9 分)

質體 A：

質體 B：

質體 C：

實驗 II：

Q5 本實作題的出芽酵母菌在分類系統中是屬於哪一界？哪一門？(10 分)

Q6 分別對實驗材料中的 H、J、K 三出芽酵母菌株的孢子生成特性進行觀察和分析。

1. 用手指輕彈離心管 H，使管中細胞懸浮，取一載玻片，用微量分注器吸取 6 μ l 細胞懸浮液，置於載玻片上（一片載玻片可分 3 區塊使用）。
2. 取一蓋玻片蓋在載玻片上的細胞樣本上，儘量避免氣泡產生。
3. 將此樣本玻片置於顯微鏡之載物臺上，先以 10 倍物鏡觀察，轉動調節輪至看見清晰之細胞影像後，再以 40 倍物鏡觀察。
4. 對離心管 J 和 K 的細胞，重複步驟 1~3。
5. 在以下空白處描述對 H、J、K 三出芽酵母菌株孢子生成特性的觀察結果。(15 分)

Q7 依據 Q6 的觀察，推定 H、J 和 K 三個菌株，何者是正常酵母菌？何者是 x 突變體？ (9 分)

正常酵母菌： x 突變體：

Q8 遺傳學的研究策略可大致分為傳統的正向遺傳學 (forward genetics) 和後基因體世代的反向遺傳學 (reverse genetics) 二種，請比較這二種研究策略的不同。(10 分) 王教授對 X 基因的研究策略是哪一種？(5 分)