

考生編號_____《考號》_____分數_____

2021 年第 32 屆中華民國生物奧林匹亞國手選拔營

動物生理學與海洋生物技術

實作 A

一、材料及實驗設備：

實驗器材	數量	藥品及材料	數量
1.照膠系統	公用	1. 瓊脂糖(Agarose)膠片(於電泳槽中)	1 片
2.迷你水平電泳系統	1 組	2. 有編號的培養皿(盛裝膠片用)	1 個
3.微量分注器 p10	1 支	3. 100bp 核酸標準品(M)(置於冰上)	1 管 (10 μ l)
4.10 μ l 微量吸管尖	20 支	4. DNA 螢光核酸染劑(dye) (置於冰上)	1 管 (10 μ l)
5.計時器	1 個	5. ARMS-PCR 產物 1 (1) (置於冰上)	1 管 (10 μ l)
6.剪刀	1 個	6. ARMS-PCR 產物 2 (2) (置於冰上)	1 管 (10 μ l)
7.膠水	1 個	7. ARMS-PCR 產物 3 (3) (置於冰上)	1 管 (10 μ l)

※ 請注意：

1. 本試場含實作 A 及實作 B 作答時間共為 90 分鐘。
2. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
3. 本試卷(含封面、試題卷)共 6 頁，於交卷時全部繳回。
4. 請於本卷上作答，試題答案可寫至背面，但請註明並標上題號

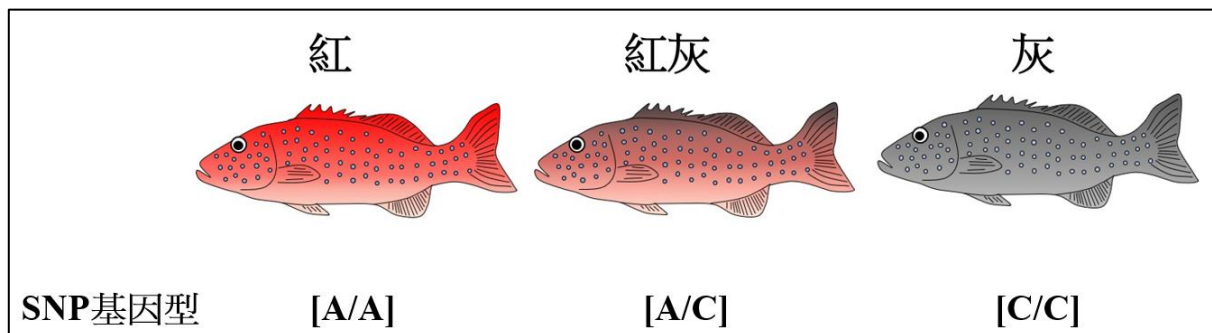
膠體電泳分析擴增受阻突變體系聚合酶鏈反應 (Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain, ARMS-PCR)產物

一、實驗主旨：

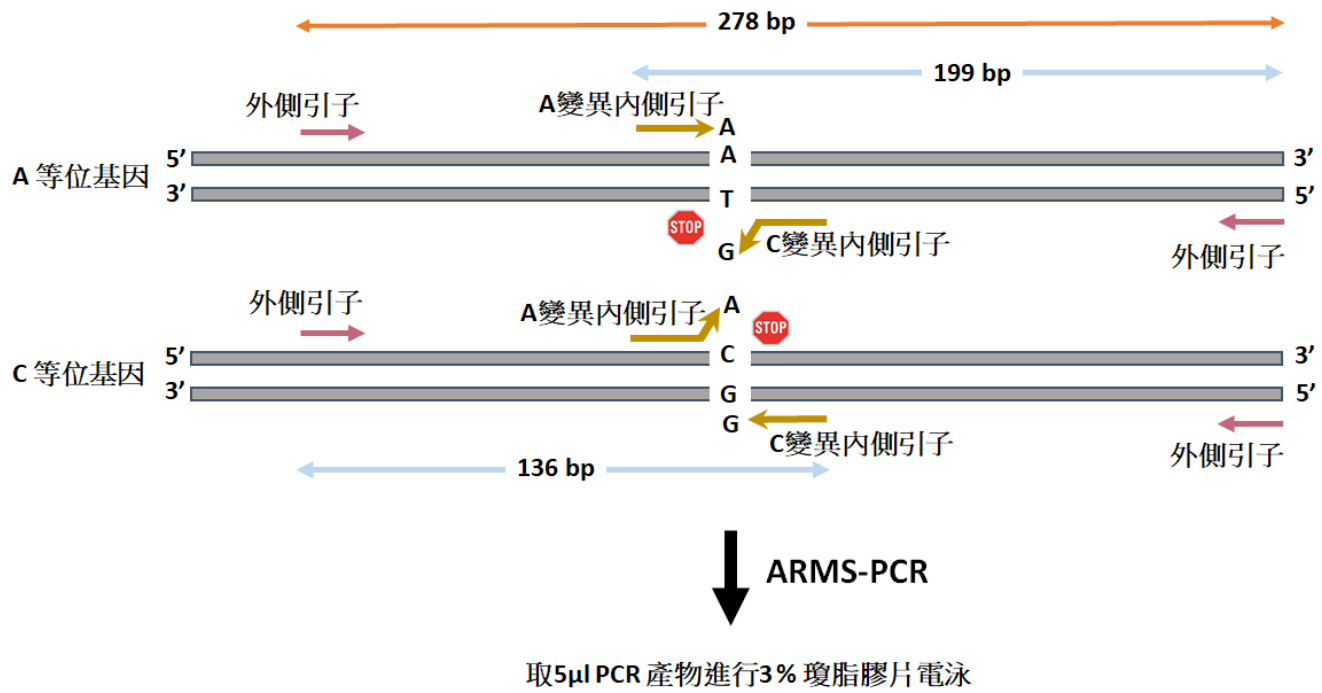
利用膠體電泳分析 ARMS-PCR 產物，以偵測單點核苷酸變異位點 (single nucleotide polymorphism, SNP) 基因型。

二、實驗背景介紹：

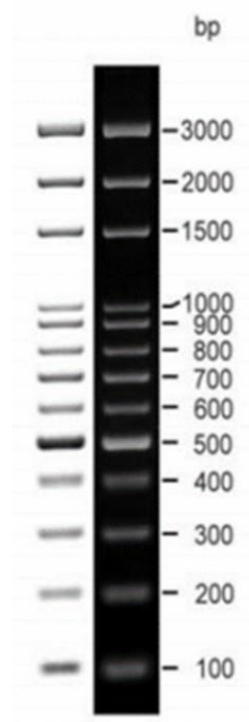
台灣珊瑚礁與沿海地區常出現多種不同體色的豹鰨 (*Plectropomus leopardus*)，研究人員參考文獻發現某一段調控魚皮體色變異之 DNA 序列所攜帶的 SNP 基因型與不同體色豹鰨具有高度關聯性。研究人員根據文獻，推測紅色皮膚豹鰨其 SNP 基因型應為[A/A]、紅灰色皮膚豹鰨 SNP 基因型應為[A/C]，且灰色皮膚豹鰨 SNP 基因型應為[C/C]。某日研究人員自台灣沿海地區採集到數尾不同體色的豹鰨，決定使用 ARMS-PCR 法進行體色相關的基因型檢定。ARMS-PCR 於 1989 年問世，為 SNP 基因型分析的一種方式。此法是利用 Taq DNA 聚合酶缺乏 3'至 5'端外切酵素 (exonuclease) 的活性，當鹼基發生配對錯誤時，會阻礙 DNA 產物擴增速度。ARMS-PCR 反應需加入四條引子，包含兩條外側引子及兩條內側引子，兩條內側引子含有 3' 端變異位，用來專一性擴增特異性產物，再經由膠體電泳進行分析，偵測 SNP 基因型。本實驗將針對不同皮膚顏色性狀相關 DNA 序列進行 ARMS-PCR，以利後續分析與不同體色性狀相關之 SNP 分子標記基因型。



圖一、研究人員根據文獻推測豹鰨 (*Plectropomus leopardus*) 不同魚皮顏色所攜帶的 SNP 基因型。



圖二、ARMS-PCR 原理示意圖顯示內側與外側引子所可夾出之目標 DNA 序列長度。



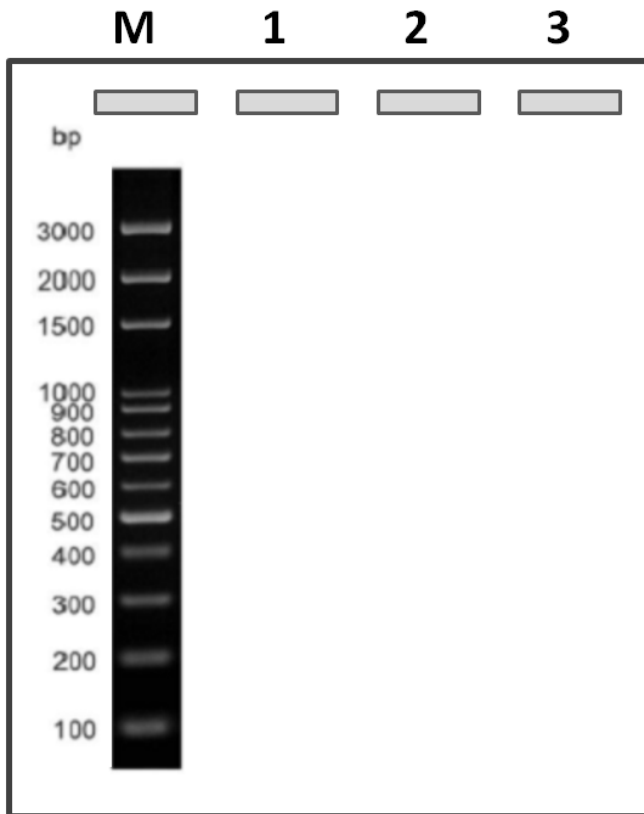
圖三、本實驗所使用之 DNA 分離模式標準圖。

四、實驗步驟：

1. 請加入 2 μ l DNA 螢光染劑(dye)至三管 ARMS-PCR 產物(1、2、3)與核酸標準品(M)，並以微量分注器混合均勻，靜置 1 分鐘。
2. 利用微量分注器，取 10 μ l 已混有 DNA 螢光染劑的 ARMS-PCR 產物樣品與核酸標準品，由左至右依序注入核酸標準品、1 號樣品、2 號樣品、3 號樣品，至電泳膠片的樣品槽中。
3. 蓋上電泳槽蓋子，並使電線與電泳槽結合(紅(+))極、黑(-)極)，開啟開關，以 100 伏特電壓進行電泳，約 40 分鐘後，可見黃色染劑移動至電泳膠(gel)底部，此時可關閉電源。
4. 取出電泳膠片，放在有編號的培養皿，拿到公用區請助教用照膠系統進行照相，將結果列印出。
5. 請將電泳結果剪下，黏貼於下方：

五、試題：

(1) 請於下方膠圖畫上 1 號樣品、2 號樣品及 3 號樣品 PCR 產物對應的位置？(9%)



(2) 試問 1 號樣品、2 號樣品及 3 號樣品的魚體分別可能為何種顏色？(9%)

(3) 承問題二、請說明您判斷 3 種魚皮顏色的理由。(5%)

考生編號_____ 分數_____

2021 年第 32 屆中華民國生物奧林匹亞國手選拔營

動物生理學與海洋生物技術

實作 B

材料及實驗設備：

器材及數量	數量	器材及數量	數量
1.「爪蟾蝌蚪」置放於培養皿內 (貼考號)	5 隻	9.3mL 滴管 (需重複使用)	1 支
2.「牛蛙蝌蚪」置放於培養皿內 (貼考號)	5 隻	10.爪蟾蝌蚪用麻醉液	1 盤
3. 透明內盒 (含適量水)	1 個	11.牛蛙蝌蚪用麻醉液	1 盤
4.黑/白外盒	1 個	12. P10 pipette (微量吸管) (實作 A 共用)	1 枝
5. 無塵紙	1 盒	13. P10 吸管尖 (實作 A 共用)	1 盒
6. 極細針頭	1 支	14.計時器(計時用勿按)	1 個
7.15 公分直尺	1 支	15.解剖顯微鏡	1 台
8.鑷子	1 支		

※ 請注意：

1. 本試場含實作 A 及實作 B 作答時間共為 90 分鐘。
2. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
3. 本試卷(含封面、試題卷)共 7 頁，於交卷時全部繳回。
4. 請於本卷上作答，試題答案可寫至背面，但請註明並標上題號

蝌蚪對環境明亮度反應與視覺角色之探討

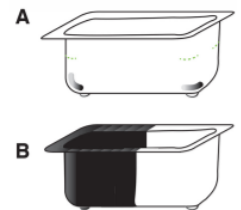
(A simple behavioral assay for testing visual function in tadpoles)

一、前言

生態學(Ecology)為研究生物與環境互動的一門學科，其中環境泛指特定生物所遭遇到的非生物因素(溫度、溼度、酸鹼度、重金屬汙染物質等)及生物因素(攝食者、食物、競爭者等)；本實驗以分別以出生後第 12 天牛蛙(*Rana catesbeiana*)及出生後地 14 天爪蟾(*Xenopus laevis*)的蝌蚪幼體為材料,探討其應對環境明亮度喜好的行為改變。由於蝌蚪也可用來研究視覺神經系統不同時期發育與視覺形成之關聯性，因此本實驗將探討蝌蚪的視覺對外界光線反應之間的關聯性。

材料與器材

1. 5 隻「爪蟾蝌蚪」置放於培養皿內(貼考號)
2. 5 隻「牛蛙蝌蚪」置放於培養皿內(貼考號)
3. 透明內盒 (含適量水) 1 個, 如右圖 A
4. 黑/白外盒 1 個(黑色代表暗環境, 白色代表明亮環境, 如右圖 B)
5. 無塵紙 1 盒
6. 極細針頭



★(極為尖銳請小心使用，使用後蓋上蓋子保留原處，請勿丟棄，否貼扣分)

7. 15 公分直尺
8. 鑷子 1 支
9. 3 mL 滴管 1 支 (需重複使用)
10. 爪蟾蝌蚪用麻醉液
11. 牛蛙蝌蚪用麻醉液
12. P10 pipette (微量吸管)
13. P10 吸管尖
14. 計時器 1 個 (計時用勿按)
15. 解剖顯微鏡 1 台

第一部份 觀察

問題一：請繪圖比較爪蟾與牛蛙蝌蚪型態外觀差異(5%)

第二部份 進行實驗

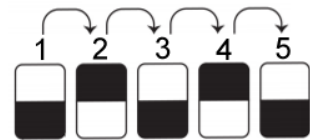
實驗步驟

[甲.控制組]

1. 請將 5 隻爪蟾蝌蚪放入透明盒內，再將透明盒放入黑白外盒中，放置 10 秒後觀察並記錄蝌蚪在黑與白環境的分布數量填入表格一。

[此為控制組一重複]

2. 將透明盒取出前後左右搖晃，攪亂蝌蚪分布，將透明盒放入上下對調的黑白盒中，靜置 10 秒後觀察並記錄蝌蚪在黑與白環境下的分布數量並填入表格一。[此為控制組二重複]



3. 重複步驟 2，做到五重複(如右圖所示)。
4. 紀錄完成後小心將蝌蚪以 3mL 滴管吸起放回原培養皿中並蓋上蓋子備用。
5. 換取 5 隻牛蛙蝌蚪進行以上所有步驟。

控制組表格一

(每重複填入位於白或黑色環境蝌蚪隻數，最後再予以統計百分比):

爪蟾蝌蚪	白色	黑色
一重複		
二重複		
三重複		
四重複		
五重複		
數量比例 平均%		

牛蛙蝌蚪	白色	黑色
一重複		
二重複		
三重複		
四重複		
五重複		
數量比例 平均%		

問題二：請以柱狀圖設計製作爪蟾與牛蛙蝌蚪對明亮度反應之統計圖，並以 Y 軸為%表示(佔分 10%)

[乙. 眼球剔除組]

#本剔除組實驗著重手術技巧以及手術成功率 (20%)

1. 打開培養皿分別吸取 5 隻爪蟾蝌蚪，將滴管中多餘的液體瀝乾 (圖 1.)之後轉移放入含有麻醉液培養皿中，待個體麻醉昏迷不動之後再等待 5 秒，再將蝌蚪吸出瀝乾，置於原培養皿之上蓋中，並於每隻蝌蚪身上以鑷子夾取一小塊無塵紙覆蓋固定(圖 2.)。[請以背面朝上腹部朝下的姿勢放置]

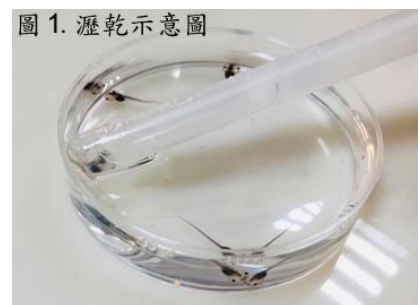


圖 1. 瀝乾示意圖

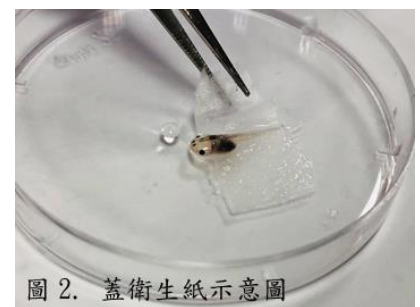


圖 2. 蓋衛生紙示意圖

2. **眼球剔除：**將放有 5 隻已麻醉蝌蚪之培養皿蓋子置於顯微鏡下，並以針頭自眼球邊緣上方探入(圖 3.)，挑斷眼球後方之視神經後沿著眼球周圍劃開，摘除雙側眼球。

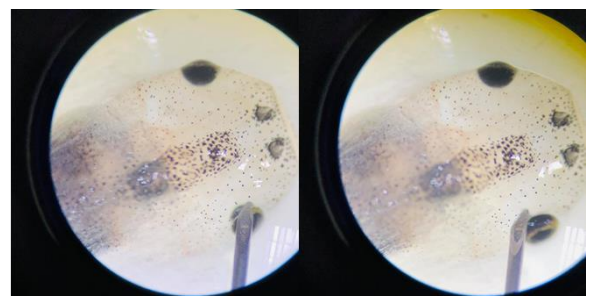


圖 3. 針頭自眼球邊緣上方探入

3. **眼球剔除：**將放有 5 隻已麻醉蝌蚪之培養皿蓋子置於顯微鏡下，先以針尖在眼球周圍環繞切割一圈，再以 P10 微量吸管吸取以剔除眼球(圖 4.)。

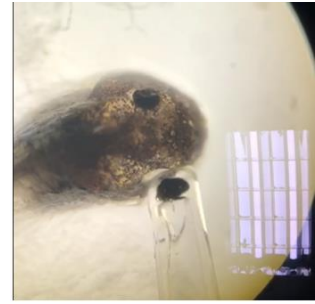


圖 4. 吸取眼球。

4. 手術處理後將蝌蚪身上無塵紙移除並加入適量自來水，等待其清醒。
5. 等蝌蚪清醒並**正常活動**後，將蝌蚪放入透明內盒中，再將透明盒放入黑白外盒中，放置 10 秒後觀察並記錄(表二)蝌蚪在黑與白環境下的分布數量。**[此為眼球剔除組一重複]**
6. 將透明盒取出前後左右搖晃，攪亂蝌蚪分布，並將透明盒放入上下對調的黑白外盒中，放置 10 秒後觀察並記錄蝌蚪在黑與白環境下的分佈數量。**[此為眼球剔除組二重複]**
7. 重複步驟 6，做到**五重複**。
8. 紀錄完成後將蝌蚪放回原培養皿中並蓋上蓋子待考試完畢繳回以評估實驗技巧與手術成功率。
9. 另換取 5 隻牛蛙蝌蚪再進行以上所有步驟。

眼球剔除組(表二)

(每重複填入位於白或黑色環境蝌蚪隻數，最後再予以統計百分比):

爪蟾蝌蚪	白色	黑色
一重複		
二重複		
三重複		
四重複		
五重複		
數量比例 平均%		

牛蛙蝌蚪	白色	黑色
一重複		
二重複		
三重複		
四重複		
五重複		
數量比例 平均%		

問題三：請以柱狀圖設計製作爪蟾與牛蛙蝌蚪對明亮度反應之統計圖，並以 Y 軸為%表示(佔分 10%).

問題四：請比較兩者對光線反應之差異性並提出可能形成差異的原因(5%).