

考生編號_____ 分數_____

2021 年第 32 屆國際生物奧林匹亞國手選拔營

細胞及植物生物技術 實作 A

材料及實驗設備：

A 實驗材料：	數量
(DNA1、DNA2) 血桐 DNA 樣本 1、2 (置於冰上)	各 1 管
A1、A2、B3、B4、C5、C6 PCR 產物 (置於冰上)	各 1 管
B 實驗器材：	數量
微量分注器 (P2/P20)	各 1 枝
微量吸管尖 (Tips) (0.2μL~2μL)	1 盒
微量吸管尖 (Tips) (2μL~200μL)	1 盒
200μl 微量離心管架	1 個
200μl 微量離心管	6 管
瓊脂膠(agarose gel)(內含 SYBR® Green)	1 片
石臘膜(Parafilm)	1 片
油性簽字筆	1 隻
剪刀	1 盒
釘書機	1 個
C 藥品溶液：	數量
(H ₂ O) 無菌水(置於冰上)	1 管
(10XPCR) 10 倍濃度 PCR 緩衝液(已含 MgCl ₂) (置於冰上)	1 管
(dNTP) 2 mM dNTP (置於冰上)	1 管
(Taq) Taq DNA polymerase (5U/μl) (置於冰上)	1 管
(A primer) A.Primer atpB89 (2 μM)+ rbcL188 (2 μM) (置於冰上)	1 管
(B primer) B.Primer trnL (2 μM)+ trnF (2 μM) (置於冰上)	1 管
(C primer) C.Primer SSR F592 (2 μM)+ R902 (2 μM) (置於冰上)	1 管
(dye)追蹤染劑(tracking dye) (置於冰上)	1 管
(oil) 礦物油 Mineral oil (置於冰上)	1 管
(100 bp DNA ladder) (置於冰上)	1 管
D 共用儀器	數量
桌上型微量離心機	5 台
水平電泳槽	5 台
循環控溫儀(Thermal Cycler)	3 台
照膠系統含 UV 燈箱	1 台

※ 請注意：

1. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷(含封面、試題卷)共 5 頁，於交卷時全部繳回。
3. 本試場含實作 A 及實作 B 作答時間共為 90 分鐘。
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

注意：操作時間有限，請善用等待實驗作用的時間。

第一部分 聚合酶鏈鎖反應擴增植物特定 DNA 片段。

*實驗過程全程戴乳膠手套

聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)是利用 DNA 聚合酶對特定基因做試管內的大量擴增合成，在短時間可將一段特定 DNA 片段複製為原來的一百億至一千億倍。

本次實作是以雙子葉植物血桐的全基因組 DNA 為材料，進行 2 葉綠體基因間片段和 1 微衛星體基因座進行 PCR，並藉由 PCR 結果，推斷 DNA 放大結果與微衛星體基因座在樣本間的差異。

實驗步驟：

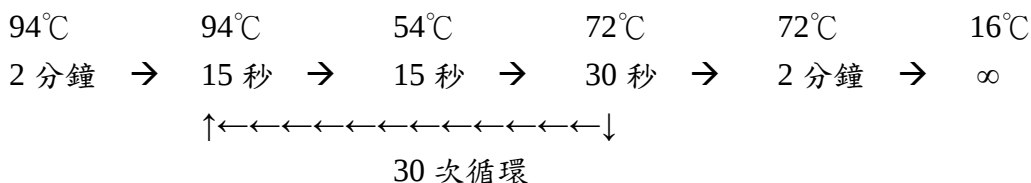
一、聚合酶鏈鎖反應配製與操作

1. 血桐 DNA 樣本 1 和 2 分別進行實驗，2 組葉綠體基因片段引子對和 1 組微衛星體 (SSR1) 基因座引子對，共計 6 管 PCR 反應溶液配製，於冰上操作實驗，配製完成後置於冰上並通知助教預備進行後續反應。
2. 依據下表配置 PCR 反應溶液：**(200 μ l 離心管頂請各標示”考號+A1, A2, B3, B4, C5, C6)**

PCR 反應溶液	考號 A1	考號 A2	考號 B3	考號 B4	考號 C5	考號 C6
無菌水(1.5ml 微量離心管)	10.5 μ l	10.5 μ l	10.5 μ l	10.5 μ l	10.5 μ l	10.5 μ l
10 倍濃度的 PCR 緩衝液	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
2 mM dNTP	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Taq DNA polymerase (5Units/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
A. Primer atpB89 (2 μ M)+ rbcL188 (2 μ M) 葉綠體基因片段	4 μ l	4 μ l				
B. Primer trnL (2 μ M)+ trnF (2 μ M) 葉綠體基因片段			4 μ l	4 μ l		
C. Primer SSR F652 (2 μ M)+ SSR R902 (2 μ M) 微衛星體基因座					4 μ l	4 μ l
血桐 DNA 樣本 1	1 μ l		1 μ l		1 μ l	
血桐 DNA 樣本 2		1 μ l		1 μ l		1 μ l
礦物油 Mineral oil	適量 覆蓋	適量 覆蓋	適量 覆蓋	適量 覆蓋	適量 覆蓋	適量 覆蓋
總體積	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

完成添加後的 PCR 小管，經短暫離心後，請移至公共儀器區，由助教放入循環控溫儀中。反應結束後，助教由收回。

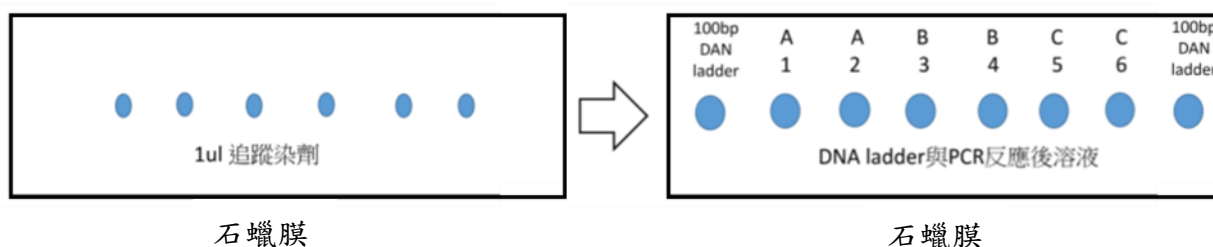
3. 置入循環控溫儀(Thermal Cycler)進行反應。



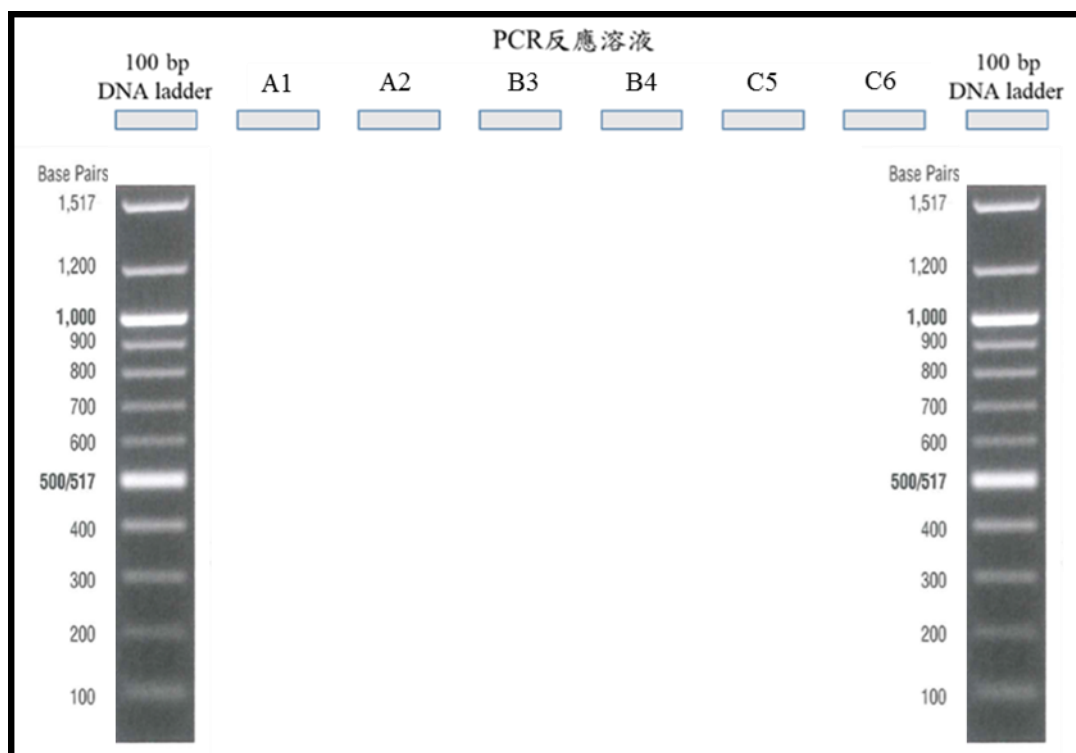
不用等 PCR 結果，請馬上做以下實驗！！

二、瓊脂膠電泳分析

1. 每次取 1μl 追蹤染劑(tracking dye)滴於石蠟膜上，共計 6 次，平均分布於石蠟膜上。
2. 各取 5μl 助教另製作好的(A1, A2, B3, B4, C5, C6)PCR 產物混合於 1μl 追蹤染劑(tracking dye)中。
3. 取 2 滴 3μl 100 bp DNA ladder(已含追蹤染劑)於石蠟膜指定位置上。



4. 各取 3μl 100 bp DNA ladder 及各取 5μl 以上步驟混合後的 PCR 反應後溶液，由左至右緩慢注入電泳膠中的樣品凹槽內(如下圖)。



5. 完成後將電泳膠片拿到公用區，由助教放置入電泳槽中進行跑膠流程，並領取計時器，計時 25 分後，向助教取電泳膠。
跑膠條件：170V 電壓使 DNA 向正極移動至追蹤染劑距底部 1/3 處。
6. 跑膠完，請將電泳膠片請拿至公用區照膠系統請助教拍照，將結果列印出來。

結果與討論：

1. 請貼上電泳膠片圖，根據所觀察的結果，簡繪出 100 bp DNA ladder 和瓊脂膠，並標註各反應樣本名稱和推估反應的 DNA 片段大小，同時將所對應的照片電子檔案名稱清楚標示。(20%)

2. 微衛星體基因座專用引子組之正向 SSR F652 與 SSR R902 的數字代號所代表的意義為引子在標準樣本基因座上序列的起始位置，可以用來推估出此 PCR 產物的可能片段大小。

2.1. 推估標準樣本基因座 PCR 產物的可能片段大小？(5%)

2.2. 依據實驗二樣本微衛星體基因座所觀察的結果 DNA 片段條帶大小，來推斷此二樣本形成此 DNA 條帶的可能原因。(15%)

3. 依據下列原始各試劑溶液濃度，推估反應溶液中各成分濃度：(10%)

PCR 反應溶液	考號 A1	考號 A2	考號 B3	考號 B4	考號 C5	考號 C6
10 倍濃度的 PCR 緩衝液						
2 mM dNTP						
Taq DNA polymerase						
A. Primer atpB89 / rbcL188						
B. Primer trnL / trnF						
C. Primer SSRF652 / SSR R902						

考生編號_____ 分數_____

2021 年第 32 屆國際生物奧林匹亞國手選拔營

細胞及植物生物技術

實作 B

材料及實驗設備：

A 實驗植物材料：			數量
秋海棠植株、韭菜植株			各 1 株
蠶豆根尖經固定液後存放於 70%的酒精			1 包
B 實驗器材：	數量	11. 濾紙(1/4 大小)	8 片
1. 複式顯微鏡+電子目鏡+筆電	1 組	12. 廢液杯	1 個
2. 單面刀片	2 片	13. 垃圾桶	1 個
3. 雙面刀片	3 片	14. 擦手紙及衛生紙	1 組
4. 培養皿	2 個	15. 洗滌瓶	1 瓶
5. 鑷子	2 支	C 藥品溶液：	數量
6. 塑膠滴管	5 支	1. 混合染劑(Alcian blue、 Safranin O)	1 瓶
7. 載/蓋玻片	7 組	2. 1 mol/L-1 HCl	1 管
8. 剪刀	1 支	3. 乳酸地衣紅染劑	1 瓶
9. 解剖針	1 支	D 共用儀器	數量
10. 油性簽字筆	1 支	1. 60°C 乾浴槽	1 台

※ 請注意：

1. 本試場合實作 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

注意：操作時間有限，請善用等待實驗作用的時間。

第一部分 利用徒手切片法與染色觀察植物組織。

操作的刀片十分鋒利，進行徒手切片時請注意安全，若有受傷請立刻通知在場老師或助教。

徒手切片法是利用單面刀片，切取所欲觀察的薄切片，將切片置於裝水的培養皿中，用鑷子挑選適當的薄切片，置於載玻片上，使用光學顯微鏡觀察。為增加組織的對比度，可加以染色。本法的優點是簡單方便，但缺點則是品質歧異度較大(如切片材料的厚度通常是不均勻)，一般而言切片檢體厚度在 25 μ m 左右時較佳。

本次實作乃對屬於雙子葉植物的秋海棠及單子葉植物的韭菜進行葉與莖的徒手切片，並藉由組織染色，以瞭解不同類型植物間組織的差異。

實驗步驟：

1. 採秋海棠及韭菜的葉及莖。
2. 切片前，在培養皿中盛少許清水，準備好鑷子、滴管及單面刀片等用具和欲觀察的材料。
3. 將材料置於載玻片上，以單面刀片切取適當厚度之薄切片(圖一)。若無法直接以單面刀片取得理想薄切片，可使用並列的三片雙面刀片，將中間的刀片稍微提起並維持兩側刀片保持平行，藉由兩側刀片間形成的縫隙，獲取後續步驟所需之薄切片(圖二)。切片時動作要敏捷，材料要一次切下(整個過程中，應使用清水濕潤材料和刀面，使之滑潤，否則材料容易破損)。



圖一、徒手



圖二、3 片刀片

4. 如此連續動作，切下許多薄片後，用鑷子將這些薄切片輕輕移入盛水培養皿中備用(徒手切片時最重要的是切下一小片平而薄的組織)。
5. 在培養皿中選擇三片最好的橫切切片，將切片置於另一個空培養皿中，加一滴混合染劑染色十秒鐘。
6. 使用洗滌瓶中的蒸餾水洗去多餘的混合染劑。
7. 用鑷子挑選滿意的切片置於載玻片上，滴上一滴水後，蓋上蓋玻片，用濾紙拭去多餘水分，置於顯微鏡下觀察。
8. 使用電子目鏡拍攝照片供評分使用。

(1) 存檔於桌面：考號資料夾。(2)檔名:考號+(棠葉、棠莖、韭葉、韭莖)各代表之。(3)同部位多張照片請加數字，例:考號+棠葉 1、考號+棠葉 2。

9. 取另一材料重複上述步驟。

結果與討論：

1. 根據所觀察的結果，簡繪秋海棠與韭菜的葉、莖組織切片並標註組織名稱及其切片所對應的照片檔名。

A. 秋海棠-葉(7%) (繪圖 5 分、電子目鏡 2 分)

請簡繪 秋海棠—葉—組織切片	電子目鏡評分
	由老師填寫

B. 秋海棠-莖(7%) (繪圖 5 分、電子目鏡 2 分)

請簡繪 秋海棠—莖—組織切片	電子目鏡評分
	由老師填寫

C. 韭菜-葉(7%)(繪圖 5 分、電子目鏡 2 分)

請簡繪 韭菜－葉－組織切片	電子目鏡評分
	由老師填寫

D. 韭菜-莖(7%)(繪圖 5 分、電子目鏡 2 分)

請簡繪 韭菜－莖－組織切片	電子目鏡評分
	由老師填寫

2. 根據所觀察的結果，說明雙子葉與單子葉植物之葉與莖組織間的不同。
(10%)

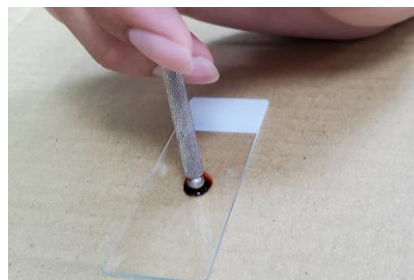
第二部分 蠶豆根尖細胞分裂觀察。：

有絲分裂是真核細胞繁殖的主要方式，真核細胞會細胞核中染色體平均分配到兩個子核中。稱為有絲分裂的原因是，因為在細胞分裂過程中會出現紡錘絲和染色體等一系列變化，然後才出現細胞的真正分裂為二。有絲分裂是細胞核分裂後通常伴隨著細胞質分裂，將細胞質、細胞器與細胞膜等細胞結構均等分配至子細胞中。是一連續的複雜動態過程，為敘述方便，根據形態學上的變化，按這些過程的先後順序分為分裂間期(即不分裂的階段)和分裂期(即正在進行分裂的階段)。

本實作旨在藉由快速生長的蠶豆根尖，搭配組織染色，以辨識處於不同有絲分裂時期的蠶豆根尖細胞。

實驗步驟：

1. 將標考號的已固定蠶豆樣品內之酒精用滴管吸出，換滴入 1mL 的 HCl 放入 60°C 公共乾浴槽/5 分鐘(軟化細胞)，最後用洗滌瓶的蒸餾水保存。
2. 用鑷子將根尖取出置於乾淨載玻片上，將 1 滴乳酸地衣紅染劑滴於根尖上。
3. 以解剖針的粗端上下垂直地輕擊材料（提高粗端至載玻片上方 1 公分，然後任其自由落下，重複 20 次），以產生懸浮的單細胞(圖三)。



圖三、以解剖針粗端輕擊材料

4. 用鑷子將肉眼可以看見的固體顆粒及殘渣去除。
5. 補 1 滴乳酸地衣紅染劑蓋上蓋玻片後以擦手紙覆蓋玻片上，以大拇指垂直施壓一下而讓細胞展平。
6. 在顯微鏡下觀察有絲分裂各時期，並使用電子目鏡拍照記錄。

(存檔:考號資料夾。檔名:考號+根尖 1、根尖 2 代表之)

染色時間越久，染色越深，但若時間太久則染色體和背景不易區分；若乳酸地衣紅染劑濃度不夠時，可將衛生紙放在蓋玻片邊緣吸出液體，同時於另一邊滴下染劑以重複染色。

結果與討論

1. 簡繪觀察到的不同有絲分裂階段的蠶豆根尖細胞，並在圖中標示有絲分裂之分期及其所對應的照片檔名。(12%) (繪圖 7 分、電子目鏡 5 分)
(存檔:考號資料夾。檔名:考號+根尖 1、根尖 2 代表之)

請簡繪觀察到的不同有絲分裂階段的蠶豆根尖細胞	電子目鏡評分
	由老師填寫