

## 2018 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

## 第 1 試場 實作 A

※ 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。

實驗器材與試劑：

器材	數量
微量分注器 (P20/P200)	1 支/1 支
微量吸管尖 (Tips) (2 $\mu$ L~200 $\mu$ L)	1 盒
96 孔微量盤	1 個
1.5 mL 微量離心管/微量離心管架 (盒)	20 支/1 個
計時器	1 個
簽字筆/白紙/直尺	1 支/1 張/1 把
簡易型計算機	1 台
試劑	數量
PBS	1 mL
BCA (Bicinchoninic acid) 蛋白質呈色劑	4 mL
Bovine serum albumin (BSA) 標準品 (1.0 mg/mL)	100 $\mu$ L
乙醛脫氫酶 (Acetaldehyde dehydrogenase; ALDH)	100 $\mu$ L
Buffer A: 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9, 0.1 M KCl, 10 mM $\beta$ -ME	0.5 mL
Buffer B: 50 mM Phosphate buffer, pH 7, 0.1 M KCl, 10 mM $\beta$ -ME	0.5 mL
Buffer C: 50 mM Acetate buffer, pH 5, 0.1 M KCl, 10 mM $\beta$ -ME	0.5 mL
1% 乙醛 (Acetaldehyde)	40 $\mu$ L
NAD <sup>+</sup> (20 mM)	100 $\mu$ L
ALDH 反應終止液 (1 mM EDTA)	0.5 mL
儀器	數量
微量盤分光光譜儀 (公用)	1 台
小型桌上離心機	1 台

※ 請注意：

1. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
2. 公用儀器運用請依照指示使用。
3. 本試卷(含封面、試題卷)共 4 頁，於交卷時全部繳回。
4. 作答時間(含實作 A 及 B)共 90 分鐘，請於本卷上作答。

## 實作 A (50 分)

### 一、實驗主題：乙醛脫氫酶之蛋白質濃度測定與酵素活性分析

在鹼性硫酸銅溶液中，蛋白質可使銅離子由二價還原成一價，再利用 BCA (Bicinchoninic acid) 與一價銅離子結合，可使溶液轉變為藍色，並且在 570 nm 有很強的吸光值。BCA 蛋白質濃度分析法的優點為，在鹼性溶液中 BCA 比雙尿素法 (Biuret method) 所使用之 Folin reagent 穩定，並且只需一個操作步驟。

酒精進入人體後，是由肝中的乙醇脫氫酶能乙醇氧化為乙醛，生成的乙醛再進一步由乙醛脫氫酶催化轉變為無害的乙酸。但是喝酒會臉紅的人是因為在飲酒後，只有前一個酶而後一個酶的活性不足或基因缺失，所以體內迅速累積乙醛而遲遲不能代謝，因此會長時間漲紅了臉，只能期待肝臟裡的 P450 (特異性比較低的一群氧化酶) 來慢慢將攝入的酒精代謝掉，而且乙醛毒性高於乙醇，也是造成宿醉的主要原因之一。乙醛脫氫酶 (Acetaldehyde dehydrogenase; 簡稱 ALDH) 能夠以菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸 ( $\text{NAD}^+$ ) 為輔酶，催化乙醛氧化為乙酸的反應，其催化反應式為  $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 。測定乙醇脫氫酶之酵素反應通常是使用光度計測定  $\text{NAD}^+$  轉變為  $\text{NADH}$  時 340 nm 之吸光值變化。

### 二、實驗內容：

1. 建立 BSA 標準品之回歸線，並測出未知蛋白質濃度之 ALDH 濃度。
2. 測定 ALDH 之最適反應酸鹼值。

### 三、實驗操作：(10分)

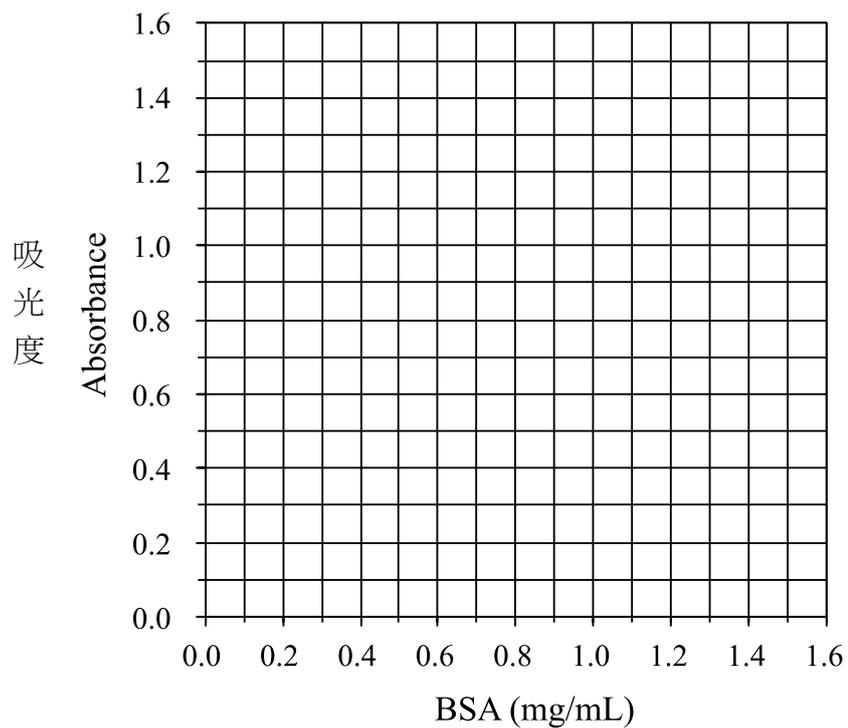
1. 請自行將 BSA 標準品以 PBS 進行稀釋，並製作出一條標準回歸線(請見下頁圖表)。使用小型桌上離心機將混合後之溶液離心時，務必要注意平衡及安全！
2. 請注意！PBS 空白組和每一個稀釋濃度之標準品都要進行雙重複的實驗。所提供之 BSA 標準品用完即不再提供，因此請先仔細計算用量再開始進行實驗。
3. BCA 蛋白質定量法之步驟為：取 10  $\mu\text{L}$  之 PBS、BSA 或 ALDH 至 96 孔微量盤中，之後加入 200  $\mu\text{L}$  之 BCA 溶液呈色。加完呈色劑後靜置 15 分鐘，即可利用微量盤分光光譜儀測量吸光值。30 分鐘內之呈色都極為穩定，請遵守微量盤分光光譜儀之使用規定及方法，勿急躁。測定之樣本中若有氣泡，將影響讀值之準確性。
  - 請儘量節省吸管尖，過度浪費，將予以扣分。
  - 加呈色劑時微量吸管尖勿與槽中溶液接觸，以避免污染。
  - 呈色劑很容易沉積在下方，請輕拍微量盤使添加的溶液混合均勻。
4. 請自行利用所提供之 pH 9、pH 7 與 pH 5 之緩衝溶液，配置 500  $\mu\text{L}$  的 ALDH 反應基質液。三種酸鹼值之 ALDH 反應基質液需含有 0.01% 乙醛及 1 mM  $\text{NAD}^+$ 。
5. 請注意！每一個酸鹼值的反應都要進行雙重複。所提供之酸鹼緩衝溶液和基質用完即不再提供，請仔細計算用量。
6. ALDH 之活性分析方法為：於 96 孔微量盤中分別加入 10  $\mu\text{L}$  ALDH 及 200  $\mu\text{L}$  自行配製之三種酸鹼值的反應基質液，於室溫反應 15 分鐘。之後加入 50  $\mu\text{L}$  反應終止液，即可利用微量盤分光光譜儀測量吸光值。

四、實驗結果與問題回答：

1. 請將蛋白質定量之吸光值填入下表空格中，並計算出各組之平均吸光值。(7分)

BSA濃度 (mg/mL)	反應#1	反應#2	平均吸光值
0			
0.2			
0.4			
0.6			
0.8			
1.0			
ALDH			

2. 承上題，請將平均吸光值以實心圓 (●) 標示於下圖中，並繪製出自行推估之線性迴歸線。(6分)



3. 利用上圖之線性迴歸線推估未知蛋白質濃度之 ALDH 的濃度約略為何？請將答案填入下面方框中。(5分)

推估之 ALDH 蛋白質濃度	
----------------	--

4. 將 ALDH 酵素活性分析所測得之吸光值結果填入下表中：(6 分)

pH	反應#1	反應#2	平均吸光值
9			
7			
5			

5. 請按實驗結果得出 ALDH 之最適反應酸鹼值為何？(請於下表打勾)(4 分)

pH 9	pH 7	pH5

6. 請推測 ALDH 所催化之酵素反應中， $\text{NAD}^+$  所扮演的角色為何？(4 分)

7. 請推測加入 ALDH 反應終止液可以終止其酵素反應之原因為何？(4 分)

8. 請推測 ALDH 反應基質液需加入  $\beta$ -ME ( $\beta$ -mercaptoethanol) 之原因為何？(4 分)

$\beta$ -mercaptoethanol 之結構如右所示：  
