

考生編號_____分數_____

2023 年第 34 屆國際生物奧林匹亞國手選拔營

第 4 試場

植物組實作題

注意：操作時間有限，請善用等待實驗作用的時間。

本次實作將利用黑暗與遠紅光(far-red light)處理的野生型 Col-0，以及突變體 a 與 b 阿拉伯芥植物為材料，探討光照處理對於植物生長與基因表現的影響。

一、材料及實驗設備：

A 實驗植物材料：			數量
1. 阿拉伯芥 (野生型 Col-0、突變體 a 與突變體 b)生長在黑暗與遠紅光(光強度 $15 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)中 4 天的幼苗。			各 25 株 /每人
B 實驗器材：	數量	B 實驗器材：	數量
1. 小研磨棒	6 支	15. 計時器	1 台
2. 鑷子(細尖頭)	1 支	16. 計算機	1 台
3. 1.5 ml 微量離心管(eppendorf tube)	8 個	17. 振盪器 (公用)	3 台
4. 微量吸管 1000 μl 及 200 μl	各 1 把	18. 離心機 (公用)	2 台
5. 微量吸管尖 1000 μl 及 200 μl	各 1 盒	19. 分光光度計 (公用)	3 台
6. 離心管架	1 個	20. 手套	1 副
7. 分光比色液槽盒	1 個	21. 防爆夾	6 個
8.廢液杯	1 個		
9. 油性簽字筆	1 支		
10. 解剖顯微鏡	1 台	C 藥品溶液：	數量
11. 2mm 方格紙及 9 公分培養皿 (可墊在培養皿下以測量初生根長度)	1 組	1. 萃取液 (Methanol 含 1% HCl)	2 ml
12. 尺(15 公分)	1 把	2. 氯仿(Chloroform)	1 管
13. 分光比色液槽(Cuvette)(0.6ml)	6 個	3. 蒸餾水	2 ml
14. 微量天平	1 台	4. 液態氮 (保溫瓶)	一些

二、實驗方法、結果與討論：

實驗方法：

某生將野生型 Col-0，以及突變體 a 與 b 阿拉伯芥幼苗，分別生長在遠紅光($15 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)、黑暗中 4 天，然後利用下列的實驗步驟，進行花青素的萃取。

1. 將各 15 株生長在黑暗與遠紅光中的幼苗(野生型 Col-0、突變體 a 與突變體 b) 共 6 種處理之材料，分別放入 1.5 ml 的小離心管中，並且測量其鮮重，記錄之。

- 離心管須用簽字筆標示清楚

如下表：

標示	考號-1	考號-2	考號-3	考號-4	考號-5	考號-6
材料	黑暗組 Col-0	黑暗組 突變體 a	黑暗組 突變體 b	遠紅光 Col-0	遠紅光 突變體 a	遠紅光 突變體 b

2. 請將液態氮倒入保溫瓶”上蓋”，用鑷子夾起上步驟之 1.5ml 的小離心管放入液態氮中，浸泡幾秒中（請注意不要超過離心管蓋子），待幼苗組織完全冷凍、液態氮揮發後，以小研磨棒將幼苗組織研磨成粉末，然後加入 200 μl 萃取液，放置振盪器充分混合 10 分鐘。

提示：請一次做完 6 管小離心管，夾上防爆夾後，放置振盪器充分混合 10 分鐘。

3. 6 管請加入氯仿(Chloroform)及無菌水各 200 μl ，並且充分混合。

4. 將 6 管小離心管拿到公用區請助教進行離心，以 13000 rpm 4 °C 離心 5 分鐘。

5. 吸取上清液 400 μl 到分光比色液槽(Cuvette)中，拿到公用區分光光度計旁，請助教協助操作分別測量 OD₅₃₀ 與 OD₆₅₇ nm。請按照比色管盒上標示對應放入分光比色液槽。

6. 帶入公式計算花青素含量：

$$[\text{OD}_{530} - 0.25\text{OD}_{657}]/\text{幼苗鮮重} [\text{單位}:\mu\text{g}/\text{F.W. g}]$$

鮮重紀錄表 (5 分) 單位:克(g)

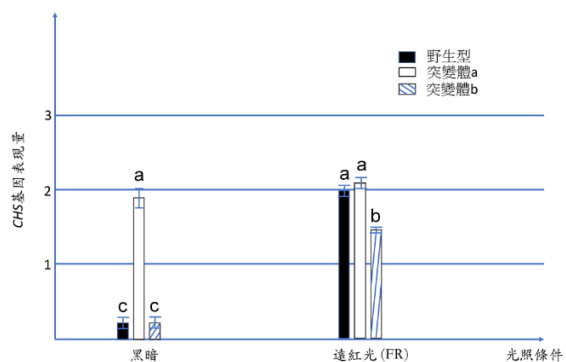
	黑暗	遠紅光
野生型 Col-0		
突變體 a		
突變體 b		

花青素含量(5 分)

	黑暗	遠紅光
野生型 Col-0		
突變體 a		
突變體 b		

OD 值紀錄單黏貼處

另外，某生利用上述的材料，進行花青素合成基因 *CHS* (Chalcone Synthase) 表達量的檢測，如下圖所示：



左圖中條狀圖上方的不同小寫英文字母代表樣品間 *CHS* 基因表現具有顯著性差異，相同者則無差異。

結果與討論：根據上述實驗及相關結果圖，回答下列問題：

1.請利用解剖顯微鏡、方格紙及尺，觀察並試描繪野生型 Col-0，以及突變體 a 與 b 阿拉伯芥幼苗在黑暗、與遠紅光中培養四天後的外表型(如根長、下胚軸長、子葉閉合情況、花青素分佈或含量)。(10 分)

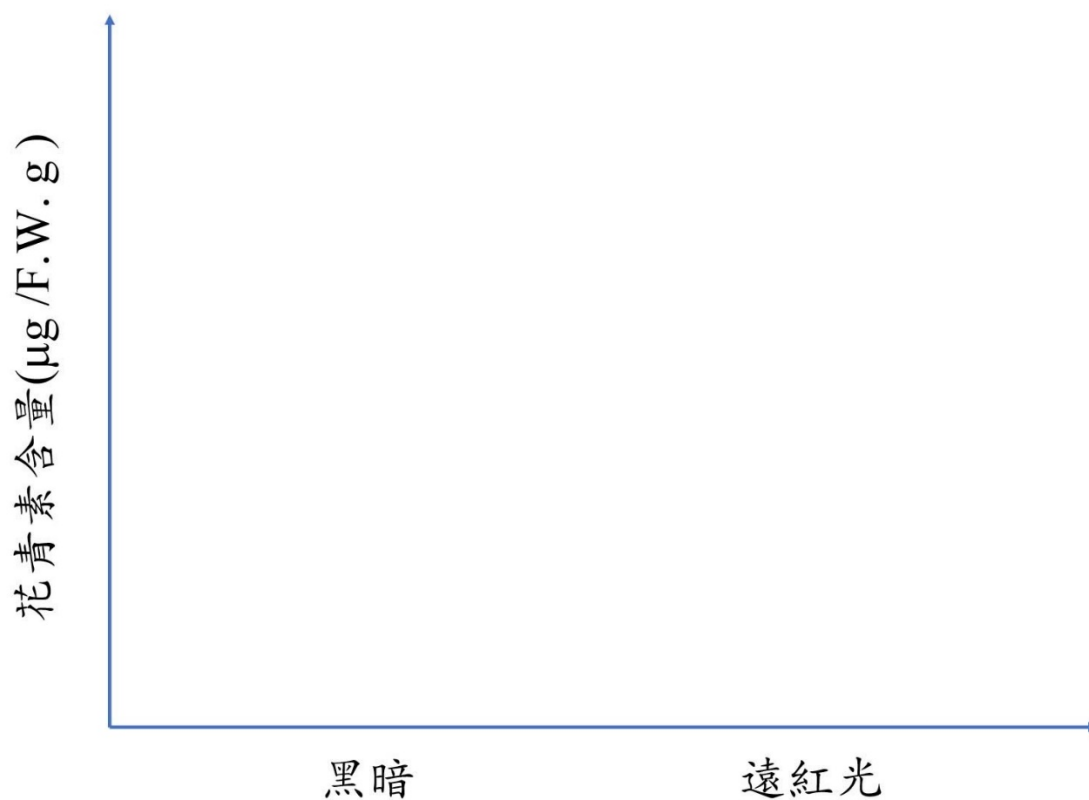
(1). 黑暗中

--	--	--

(2). 遠紅光中

--	--	--

2. 請在下圖中畫出野生型 Col-0，以及突變體 a 與 b 阿拉伯芥幼苗在黑暗、與遠紅光中培養四天的花青素含量。(20 分)



3. 根據 *CHS* 基因在野生型 Col-0，以及突變體中表現的結果圖，說明 A 基因與 B 基因如何調控 *CHS* 基因的表現。(10 分)

4. 解釋何謂 *CHS* 基因？它與花青素的關係如何？(10 分)

5. 綜合野生型 Col-0，以及突變體 a 與 b 阿拉伯芥幼苗在黑暗、與遠紅光中的外表型、花青素的含量，與 *CHS* 基因的表現，說明 A 基因與 B 基因如何調控幼苗光型態發生(正調控、或是負調控?)，解釋之。並且說明為何突變體 a 在黑暗中 *CHS* 基因的表現量特別高。 (20 分)

6. 除了光會影響花青素的累積外，列出 2 種會影響花青素累積的荷爾蒙。(10 分)

7. 假設 C 基因是光型態發生的正調控者，但是此基因的突變體在黑暗與遠紅光中生長 4 天後，檢測其所含花青素含量，結果如下圖：

根據此結果解釋 C 基因在黑暗中調控花青素產生的可能機制。(10 分)

解釋：

