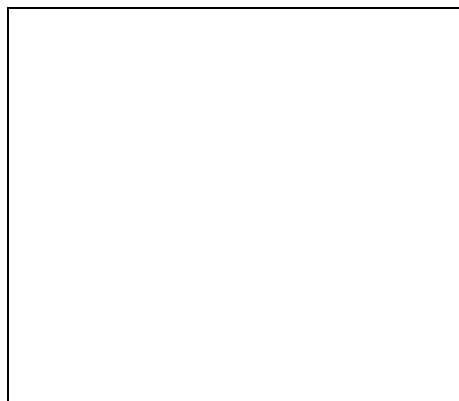


編號：

111 學年度高級中學 全國生物科學科能力競賽

實驗 1~4 操作試題

得 分



本試卷滿分 200 分

編號：

競賽說明：

請依所指定器材及藥品動手操作，並將答案填寫於答案卷的規定位置才計分。實驗 1 需要 35~40 分鐘核酸電泳時間和實驗 2 需要 10~15 分鐘觀察時間，請自行依據實驗需要安排時間及實驗順序。本試卷配分 200 分。

材料及實驗設備：

本試卷共 4 題實驗題，所提供的材料及儀器設備列於各實驗題中，置於標示「實驗 1~4」之塑膠盒中，請檢查個人器材，如有不符，請舉手聲明，各項器材必須節省使用，競賽開始後不再補發。

一、共用材料（教室前講桌）：

材料名稱	數量
拭鏡紙	數包
衛生紙	1 包
蒸餾水	2 桶
酒精	1 瓶
實驗手套	數盒

編號：

二、個人材料：

各題共用器材：

器材／材料名稱	數量	器材／材料名稱	數量
計時器(實驗 1、4)	1 個	蓋玻片(實驗 3、4)	7 片
光學顯微鏡	1 台	載玻片(實驗 3、4)	7 片
解剖顯微鏡	1 台	塑膠滴管(實驗 2、3、4)	11 支

實驗 1

(一) 個人桌面區

器材／材料名稱	數量
活體果蠅樣本 (分別標記 A、B、C 及 D)	4 管
細菌培養皿 (分別標記 Amp 及 Tet)	2 盤
計時器	1 個
解剖顯微鏡	1 台
1.5cc 微量離心管架	1 個

(二) 電泳操作區

器材／材料名稱	數量
20 μ l 或 10 μ l 微量吸管	足量
核酸樣本 (分別標記 1、2、3、4 及 M 代號之微量離心管)	4 管
電泳槽(已注入足量之 1X TAE 電泳緩衝溶液)及電源供應器	1 組
1.2%瓊脂糖凝膠電泳膠片(agarose gel)	足量
迷你微量離心機(俗稱小烏龜)	共用

實驗 2

一、個人器材

試劑	數量
1 M FeCl ₃ (莫爾質量 162.2 g)水溶液	1.8 ml
0.01 M sodium phenylpyruvate(莫爾質量 186.14 g)水溶液	1.8 ml
塑膠 96 孔盤	1 個
9 cm 直徑塑膠培養皿	3 個
1 ml 塑膠注射唧筒	3 個
10 ml 塑膠注射唧筒	1 個
塑膠滴管	3 支
100 ml 塑膠水杯	2 個

編號：

二、菌株

細菌培養	數量
接種 A 菌的 X 培養基	1 支
接種 A 菌的 Y 培養基	1 支
接種 B 菌的 X 培養基	1 支
接種 B 菌的 Y 培養基	1 支

實驗 3

一、共用材料（在教室前講桌）：

手套、蒸餾水(每位學生需要約 1 L)、衛生紙

二、個人材料：

器材／材料名稱	數量	器材／材料名稱	數量
試管架	1 個	麵包酵母菌	1 管
簽字筆	1 支	受質溶液	1 管
250 ml 燒杯	2 個	乳酸鈣溶液	1 管
50 ml 塑膠杯	9 個	2%海藻酸鈉溶液	2 管
廢液桶	1 個	針頭	1 支
100 ml 量筒	1 個	針筒	1 支
3 ml 有刻度的塑膠滴管	5 支	15 ml 塑膠管	6 支
載玻片	4 個	蓋玻片	4 個

實驗 4

一、共用材料（在教室前講桌）：

手套、蒸餾水

二、個人材料：

器材／材料名稱	數量	器材／材料名稱	數量
光學顯微鏡	1 台	固定後之魚標本 (裝於 5 mL 離心管 A 中)	1 尾
解剖顯微鏡	1 台	半成品透明魚標本 (裝於 5 mL 離心管 B 中)	1 尾
載玻片	3 片	完成品透明魚標本 (裝於 5 mL 離心管 C 中)	1 尾
蓋玻片	3 片	培養皿	4 個
計時器	1 台	15 mL 離心管 D (氫氧化鉀 與甘油混合液)	1 罐
塑膠滴管	3 支	15 mL 離心管 E (氫氧化鉀 與甘油混合液)	1 罐
彎頭鑷子	1 支		

實驗 1（50 分）

【遺傳表徵之觀察與基礎基因選殖實驗】

本實驗需 35~40 分鐘核酸電泳時間，請妥適安排時間

一、器材

(一) 個人桌面區

活體果蠅樣本 (分別標記 A、B、C 及 D)	4 管
細菌培養皿 (分別標記 Amp 及 Tet)	2 盤
計時器	1 個
解剖顯微鏡	1 台
1.5cc 微量離心管架	1 個

(二) 電泳操作區

20μl 或 10μl 微量吸管	足量
核酸樣本 (分別標記 1、2、3、4 及 M 代號之微量離心管)	4 管
電泳槽(已注入足量之 1X TAE 電泳緩衝溶液)及電源供應器	1 組
1.2%瓊脂糖凝膠電泳膠片(agarose gel)	足量
迷你微量離心機(俗稱小烏龜)	共用

請注意：

(1)若需觀察果蠅樣本時請在解剖顯微鏡下透過管壁觀察活體果蠅樣本，**切勿開啟棉塞**讓果蠅飛逸，若因開啟而導致樣本逃逸則不再補發。

(2)細菌培養皿均已生長大腸桿菌，非必要請勿撕去封皿之石臘膜，**若不慎碰觸細菌請務必至前方公用桌面取用 75%酒精消毒殺菌**。

(3)微量離心管內之 DNA 樣本均提供適量供實驗操作，每名考生僅另備有一組之纖維核酸樣本，若因備用供給後仍因操作失誤缺失將不再補發，若液體沾至管壁不易吸取可使用簡易型迷你微量離心機(俗稱小烏龜)適度離心後再吸取樣本。

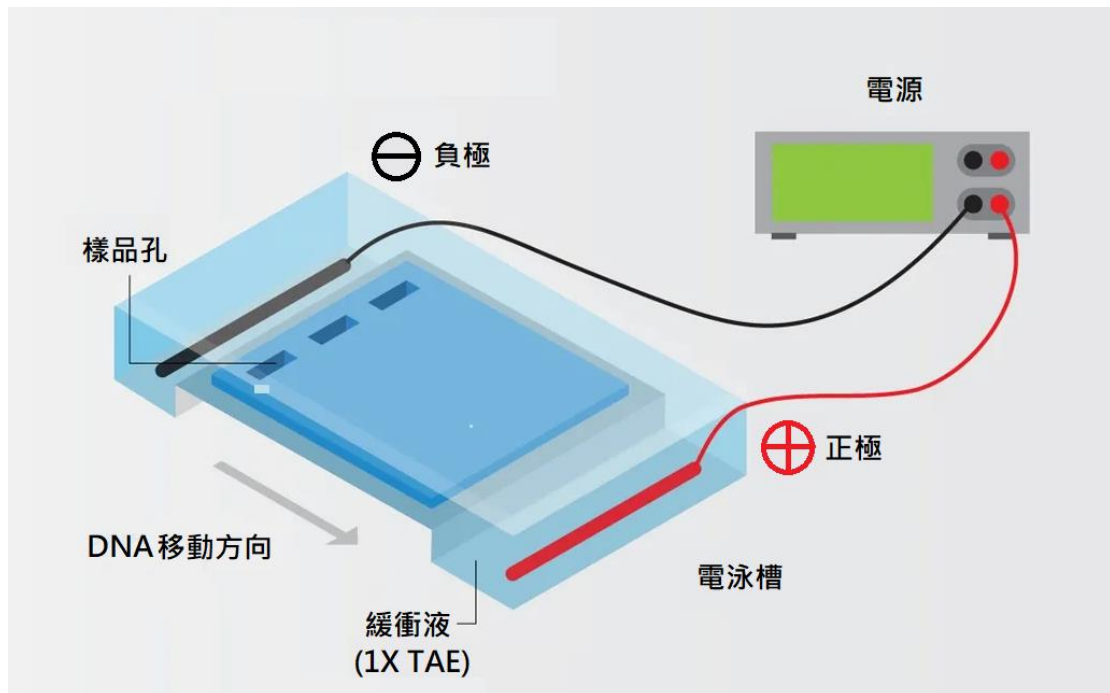
(4)核酸樣本的電泳操作請至考場兩側之指定位置進行，該處已設置電泳槽、電泳緩衝溶液及電泳膠片，**首次前往該處進行實驗時請舉手**，並等待試場人員協助引領至特定位置進行核酸電泳實驗操作電泳槽，相關說明如下圖，若不清楚電泳操作請依試場人員**有限度之安全指導**協助進行，每名考生僅另備有一片備用電泳膠片，注入樣本時請小心操作勿使其穿刺破損電泳膠片或使核酸樣本溢漏，電泳進行過程中請蓋上槽體保護蓋**切勿在通電過程中徒手深入電泳液中以防感電受傷**。

(5)電泳分離過程中請**務必留意**，勿因反應過時而使小片段核酸樣本跑出膠片而影響後續結果判讀，所有核酸樣本皆已經預先混合追蹤染劑及核酸安全染劑，電

編號：

泳過程中可用肉眼觀察到分別為桃紅色、深藍色及淺藍色之追蹤染劑在膠片上的移動，建議當深藍色染劑在跑出膠片前即可終止電泳則有較佳之分離結果，切勿使深藍色染劑跑出膠片，可使用計時器定時 **35 分鐘**後直接前往觀察追蹤染劑的位置以判斷是否需要繼續進行電泳分離，**切勿使深藍色染劑跑出膠片**。

(6)電泳完成後請**主動要求**電泳操作區之試場人員協助呈像拍照，並將所得結果輸出後以雙面膠黏貼於答案卷之正確答題空格，並以此結果進行後續答題。



題組配分：本題組共計 50 分，第(1)題共計有 4 小題，需寫出各管果蠅的**完整基因型**，每一小題完整回答即可得 4 分，共 **16 分**；第(2)題共計有 2 小題，需填寫培養皿中之細菌**編號**，各 3 分共 **6 分**；第(3)題占比 **12 分**，請粘貼電泳分離結果，**各道樣本需清楚分離且確實標記樣本代號**，否則不予計分；第(4)題共計有 4 小題填答，根據題(3)之結果分別繪製兩個**重組質體圖譜**並分別**陳述說明理由**，若無正確繪製圖譜或正確說明則各僅得 4 分，完整填答共可得 **16 分**。

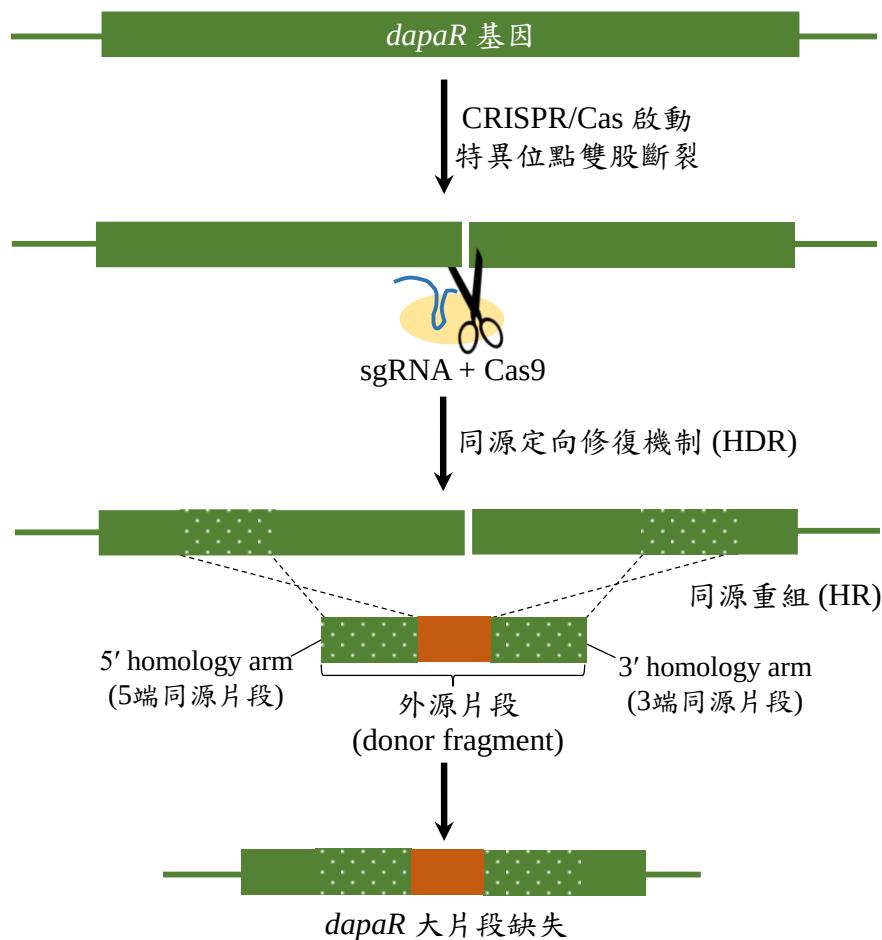
二、實驗背景與目的

細胞色素(cytochrome) P450 (CYP)是一類具有單加氧酶(monooxygenase)功能的酵素家族，參與氧化的對象包括類固醇、脂肪酸等內生或異生物質，對多種化合物的清除以及荷爾蒙激素的合成和分解都很重要。*teg* 基因編碼產生蛋白質 TEG119 為特定 CYP 組成之次單元，證據顯示 TEG119 所參與形成之 CYP 與荷爾蒙小分子 Apa 功能有重要的關係，當小鼠 *teg* 突變後將使得 Apa 失去活性。而 *apaR* 基因編碼產生一種核受體(nuclear receptor)蛋白質 ApaR，其配體(ligand)即是 Apa，當 Apa-ApaR 複合體(Apa-ApaR complex)形成後即能進入細胞核驅動特

定基因表現，實驗證實在小鼠胚胎時期與神經發育的發生至關重要。無論是 *teg* 或 *apaR* 無效等位基因(null allele)的同型合子突變體(homozygous mutant)，均可明顯發現胚胎死亡，但若與正常基因形成異型合子(heterozygous)時，除編碼蛋白的表現量明顯降低外仍能使小鼠發育成熟至出生，唯仍能觀察到成體壽命的顯著降低，是否 TEG119 或 ApaR 表現量的降低仍參與未知的生物程序(biological processing)須更進一步的釐清。

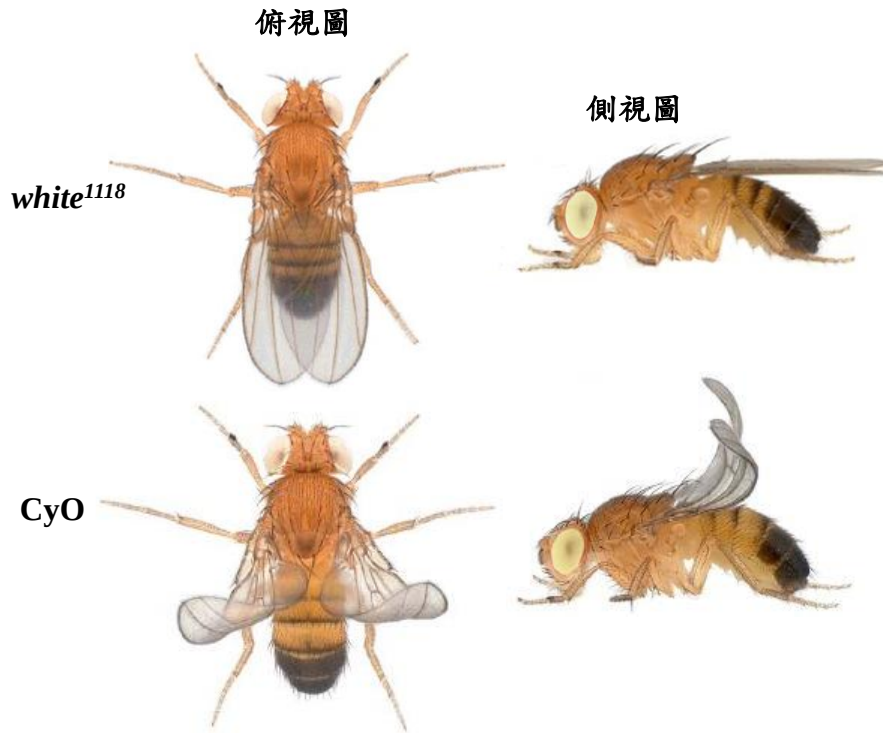
黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)是一種常被科學家使用的模式生物，除了體型小易於操作外，其生命週期短、繁殖力強因此非常容易飼養，並且它的遺傳物質結構簡單，被廣泛應用於基因遺傳、細胞生理、發育生物、與神經科學等生物學相關研究中。牠只有四對染色體其中包括與性別決定相關之第一對 X、Y 性染色體(sex chromosome)，進行基因定位與遺傳操作也極為有利，針對基因與突變表徵(phenotype)間的關係貢獻卓越，因運用發展歷程久遠業已建立了多樣便捷的遺傳操作工具，是研究遺傳學、發育生物學的重要模式生物。

科學家為了有效研究 TEG119 及 ApaR 的生物功能，希望在果蠅模式生物中建立 *teg* 及 *apaR* 異種同源基因(orthologous gene)的突變株，在果蠅生物中 *teg* 及 *apaR* 的異種同源基因分別為 *mdhr* 及 *dapaR*，其中 *mdhr* 在果蠅生物中已有一大片段轉基因插入後可表現紅眼特徵的插入突變株(insertion mutant)，且已被證實為無效等位基因突變；針對 *dapaR* 基因的規劃，科學家將用 CRISPR/Cas 基因編輯技術對果蠅 *dapaR* 基因進行大片段之刪除，確保在果蠅生物中獲得 *dapaR* 基因功能缺失之無效等位基因，以利後續相關研究工作進行。下面圖示經由 CRISPR/Cas 基因編輯技術於 *dapaR* 基因特異位置剪切，再透過兩側含有同源基因的外源片段啟動同源定向修復機制(homology directed repair; HDR)，使斷裂的 DNA 完成修復；過程中因同源重組(homologous recombination, HR)的發生將導致染色體上 *dapaR* 基因發生大片段的刪除。然而在小鼠的研究中已揭露，*apaR* 基因之功能完全缺失後將導致生物體在胚胎期死亡，若果蠅 *dapaR* 基因大片段之刪除也可能導致死亡，如何在果蠅生物中透過建立 *dapaR* 異型合子以確保該無效等位基因突變株得以保存是一個需先考量的重點。



平衡器染色體(balancer chromosome)是一種遺傳工具，用以避免同源染色體(homologous chromosome)在減數分裂過程中發生交叉互換(crossing over)的遺傳重組，以維持得來不易的突變株。在果蠅生物的研究中，平衡器染色體有三個重要的特質，除前述用來抑制同源染色體之間的遺傳重組外，多半均帶有可觀察的顯性標記特徵，同時當平衡器染色體以純合子(homozygote)存在時將對生殖功能產生明顯的負面影響終致無法產生後代。

CyO 帶有 Curly (Cy)的表現型(phenotype)，下圖分別為白色眼色之野生型(wild-type) *white*¹¹¹⁸ 果蠅及 CyO 果蠅的俯視及側視圖，可明顯觀察到野生型的平翅及 CyO 果蠅的捲翅特徵(注意：CyO 與眼色的表現特徵無關)，而 CyO 即是一個位於第二對染色體的平衡器染色體，在純合子(CyO/CyO)基因型(genotype)下是致死的。因 *mdhr* 及 *dapaR* 基因均位於果蠅的第二對染色體，因此，若分別將 *mdhr* 及 *dapaR* 的無效等位基因與 CyO 形成異型合子(基因型：*dapaR*/CyO 或 *mdhr*/CyO)，則將能有效使該生物體存活並留下此突變等位基因。有趣的是，科學家也發現，若以 *mdhr* 及 *dapaR* 無效等位基因形成反式異型合子(transheterozygote)，即 *mdhr/dapaR* 基因型之生物體仍能正常羽化存活。

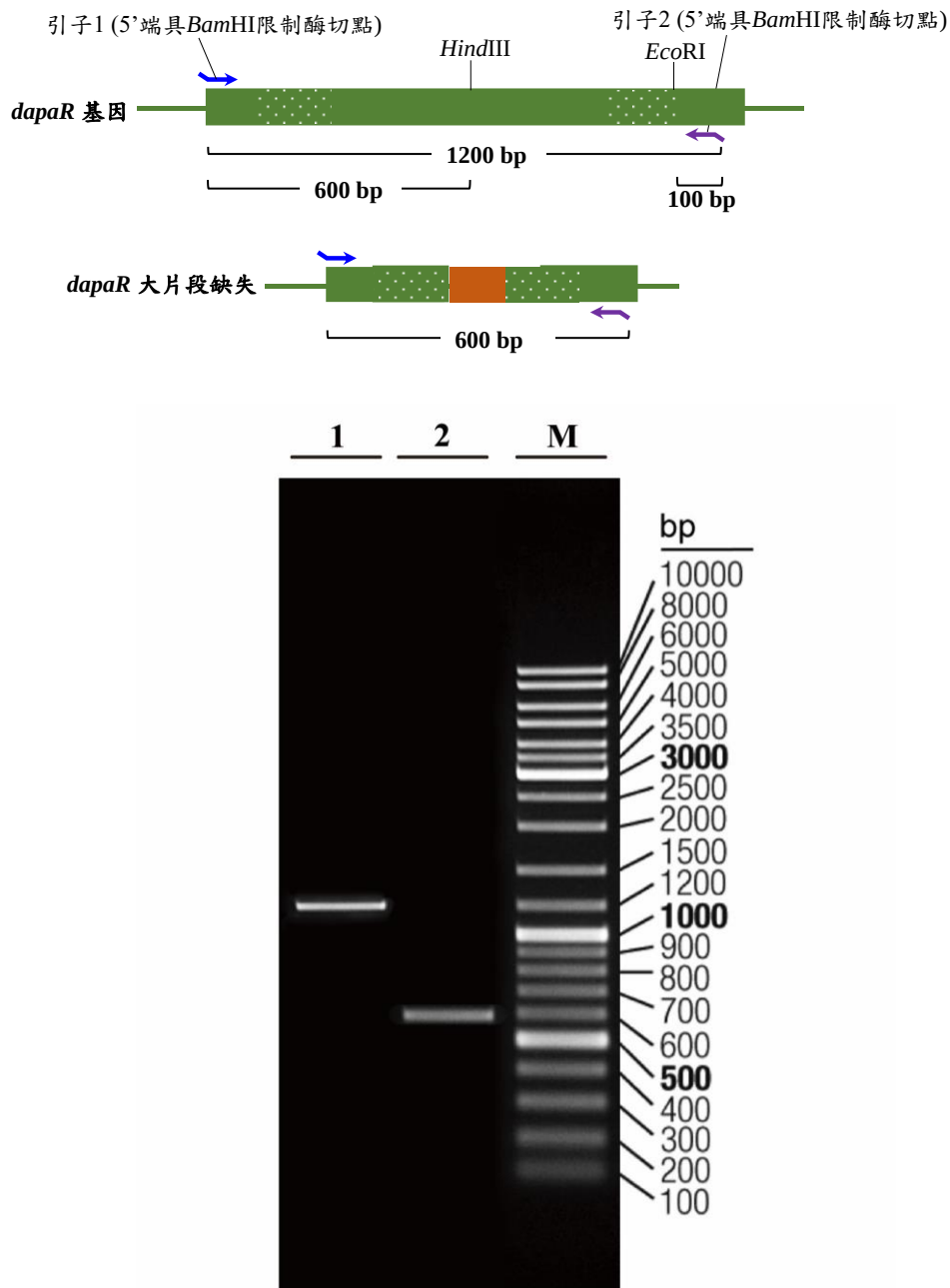


三、操作與作答說明

- (1) 桌面共放置有 4 管果蠅樣本，標示著 A、B、C 及 D 符號，分別有基因型 *mdhr/dapaR*、*mdhr/CyO*、*dapaR/CyO*、以及 *white*¹¹¹⁸ 野生型果蠅 (注意：此處 *mdhr* 或 *dapaR* 皆表示為無效等位基因)，透過觀察管內果蠅之表現型特徵推斷 A、B、C 及 D 管的基因型為何？若判斷為野生型果蠅請填寫 *white*¹¹¹⁸ 即可。

為了確認 *dapaR* 確實為大片段刪除之突變，學者將野生型 *white*¹¹¹⁸ 果蠅及 *dapaR/CyO* 果蠅染色體 DNA 分離後，分別以它們為模板(template)透過聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)擴增該基因之特定片段，如下圖所示，圖中的箭號標示 PCR 反應所需之成對引子(primer)於該基因之相對位置，同時也標示了擴增片段內可能的限制酶位切點(包括於 *Hind*III、*Eco*RI)以及相對應之鹼基對(base pairs; bp)距離。擴增反應後的產物以瓊脂糖凝膠電泳(agarose gel electrophoresis)進行分離，M 標示為核酸標準試劑(marker)，不同片段的大小以數字標記於右側，單位為千鹼基對(kilobase pairs; Kbp)，lane 1 及 lane 2 分別以野生型 *white*¹¹¹⁸ 果蠅染色體 DNA 及 *dapaR/CyO* 果蠅染色體 DNA 為模板進行 PCR 反應擴增後的片段，lane 1 可清楚觀察到一個約 1.2K bp 大小的擴增片段，而 lane 2 可發現 0.6Kbp 及 1.2Kbp 兩種不同大小的擴增片段，分別為 *dapaR/CyO* 果蠅同源染色體(homologous chromosomes)上經由引子擴增 *dapaR* 基因片段的差異所致，較小的片段即為 *dapaR* 基因經由 CRISPR/Cas 基因編輯技術刪除大片段區域後擴增的結果。

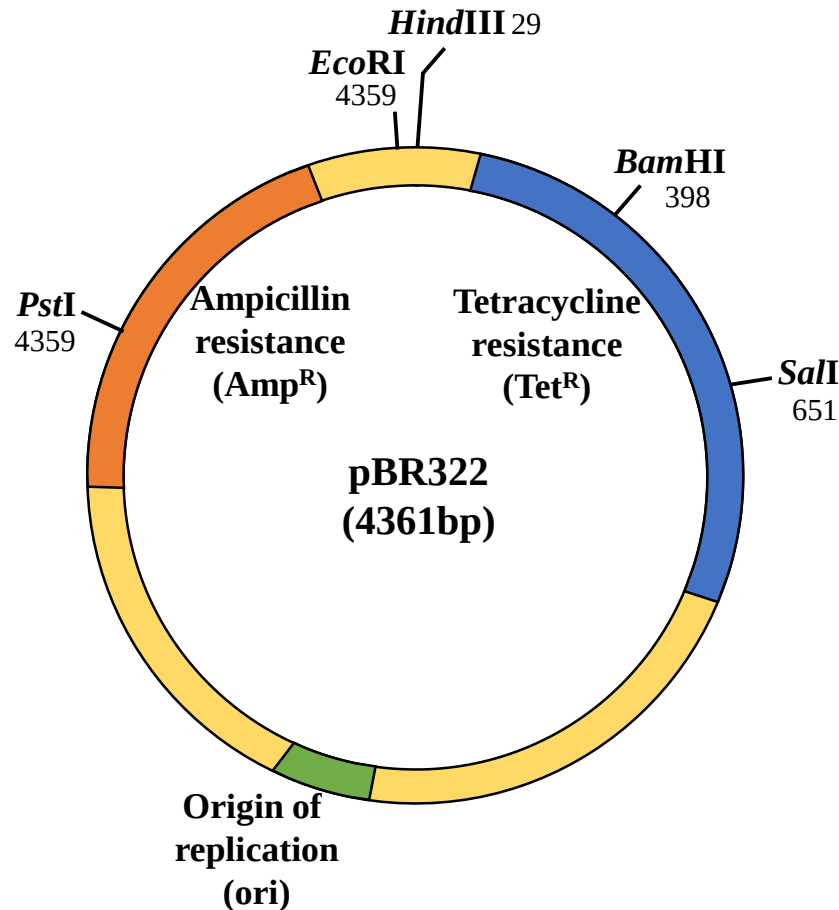
編號：



因 PCR 反應所使用之成對引子於 5'端皆設計帶有一 *Bam*HI 限制酶切位點，因此反應擴增後的片段的兩側均將帶有 *Bam*HI 限制酶的切位點，若再以 *Bam*HI 限制酶進行反應將可進行後續的選殖(cloning)工作，與同樣經 *Bam*HI 限制酶反應後之 pBR322 質體(plasmid)透過連接酶(ligase)進行黏接反應(ligation)形成 DNA 重組質體(recombinant plasmid)，完成後的 DNA 重組質體可透過轉形作用(transformation)送入大腸桿菌(*Escherichia coli*)細胞內，透過菌株保存長期留存此擴增片段，或純化此重組質體後進行 DNA 測序確定 *dapaR* 確實為大片段刪除之突變。前述所使用的 pBR322 質體圖譜如下頁所示，是一個具有 4361bp 的環形 DNA 結構，圖中清楚標示兩個氨苄青黴素(ampicillin;又稱安比西林)及四環黴素(tetracycline)抗生素抗藥基因(antibiotic resistance gene)，一個標示為 ori (即 origin)

編號：

的固定複製起始點，以及數個單一限制酵素位切點(包括 *EcoRI*、*SalI*、*PstI*、*HindIII* 及 *BamHI*)，並以不同的數字清楚標示位置以示其相對距離。因 pBR322 質體具有 *ori* 序列，當 pBR322 質體送入大腸桿菌後可以獨立於染色體之外 (extrachromosomal) 自行複製，而持續存在於分裂後的細菌中。由於該質體具有兩個抗藥基因，因此當 pBR322 質體送入細菌後該細菌可以生長存活於適當濃度的 ampicillin 或 tetracycline 的培養基。



如同前述的方法若以 *dapaR/CyO* 果蠅染色體 DNA 為模板進行 PCR 反應擴增後將較小的片段接入 pBR322 質體的 *BamHI* 切位點形成 DNA 重組質體後，經由轉形作用將其送入大腸桿菌並塗佈於包含 ampicillin 的固體培養基，隔夜生長後以無菌接種針分別挑選 12 個菌落並以畫線方式將同一菌落再分別畫於含有 ampicillin 及 tetracycline 的培養基中。

- (2) 桌面共放置有兩片培養皿，標註 **Amp** 及 **Tet** 表示為含有 ampicillin 或 tetracycline 抗生素的培養基，數字編號標記為不同菌落，同一號碼的菌落皆同時的接種於兩片培養基上，此為接種菌落隔夜後之生長狀況，請任意選擇兩個編號的菌落可能包含有選殖成功的重組質體或未選殖成功之原始質體？
- (3) 將兩株確實帶有重組質體的大腸桿菌接種培養於含有 ampicillin 的培養液，隔夜生長後將各自細胞內的所分離純化之重組質體 DNA 分別以 **A** 及 **B** 標示，

編號：

接續再將 A、B 重組質體 DNA 以 *HindIII* 限制酶進行反應(分別標示為 1 及 2 編號之微量離心管)或以 *EcoRI* 限制酶進行反應(分別標示為 3 及 4 編號之微量離心管)，經由足量時間反應後之 4 管產物分別提供置於考場側邊指定位置的電泳操作區，請將這些反應產物以及 M 標示之核酸標準試劑透過瓊脂糖凝膠電泳分離，於膠片各齒槽(well)內分別注入 10 μ l 不同之核酸樣本，順序不拘但務必於輸出結果之各道清楚標示編號(如 1、2、3、4 及 M)以示為何種樣本所分離之結果？

- (4) 依前題之電泳分離結果，解釋同樣是重組的 DNA 質體為何有不同的電泳分離結果，以 pBR322 原始質體圖譜為骨架繪製重組質體 A、B 的圖譜，並根據電泳分離後的結果分別解釋繪製此重組質體圖譜的理由。

實驗 2 (50 分)

【檢測細菌的苯丙胺酸脫胺酶】

本實驗需 10~15 分鐘觀察時間，請妥適安排時間

一、器材

1. 公用材料：蒸餾水

2. 個人器材：

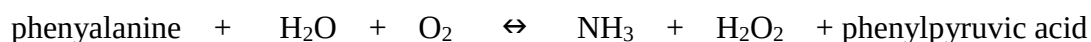
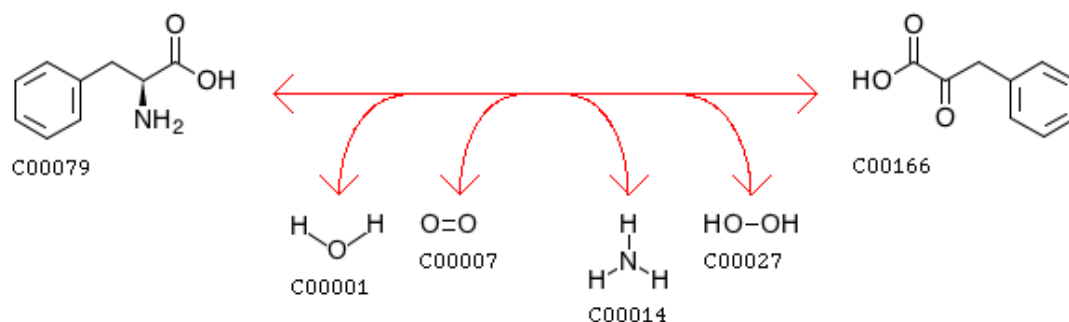
試劑	數量
1 M FeCl ₃ (莫爾質量 162.2 g)水溶液	1.8 ml
0.01 M sodium phenylpyruvate(莫爾質量 186.14 g)水溶液	1.8 ml
塑膠 96 孔盤	1 個
9 cm 直徑塑膠培養皿	3 個
1 ml 塑膠注射唧筒	3 個
10 ml 塑膠注射唧筒	1 個
塑膠滴管	3 支
100 ml 塑膠水杯	2 個

菌株

細菌培養	數量
接種 A 菌的 X 培養基	1 支
接種 A 菌的 Y 培養基	1 支
接種 B 菌的 X 培養基	1 支
接種 B 菌的 Y 培養基	1 支

二、實驗背景與目的

苯丙胺酸脫胺酶(phenylalanine deaminase, EC 1.4.3.2)檢測是常用於細菌鑑定的一種方法，特別是用來區別與鑑定腸內細菌科(*Enterobacteriaceae*)的物種。腸內細菌科包含了許多常見的人類共生與病原細菌，例如大腸桿菌(*Escherichia coli*)、沙門氏菌(*Salmonella enterica*)、赤痢志賀桿菌(*Shigella dysenteriae*)、鼠疫耶氏桿菌(*Yersinia pestis*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、奇異變形桿菌(*Proteus mirabilis*)...等，苯丙胺酸脫胺酶是其中 *Proteus*、*Providencia*、*Morganella* 三個屬的重要鑑定特徵，這一些細菌的細胞表面具有苯丙胺酸脫胺酶，可以催化培養液中苯丙胺酸(phenylalanine)的氧化脫胺反應(圖一)，使之轉化為苯丙酮酸(phenylpyruvic acid)：



圖一、苯丙胺酸脫胺酶催化的反應(圖片取自 <https://www.genome.jp/kegg/>)

苯丙酮酸在水溶液中很容易和鐵離子(ferric ion, Fe³⁺)形成錯合物，因此早期的細菌學家推測細菌利用苯丙酮酸吸收鐵離子，但是隨後的許多代謝與遺傳研究結果都不支持這個假說。雖然如此，因為苯丙酮酸和鐵離子的錯合物帶有鮮豔的顏色，鐵離子的水溶液(例如氯化鐵 FeCl₃ 溶液)可以作為檢測苯丙酮酸的試劑。本實驗的目的為：

1. 決定檢測苯丙酮酸的最佳 FeCl₃ 溶液濃度。
2. 測定 FeCl₃ 溶液所能偵測的最低苯丙酮酸濃度。
3. 以 FeCl₃ 溶液檢測 4 個未知的細菌培養。

三、操作與作答說明

- (1) FeCl₃ 溶液與苯丙酮酸溶液混合後呈現甚麼樣的顏色變化(1 分)？混合後經過多少時間最適合判斷溶液中是否含有苯丙酮酸(4 分)？
- (2) 將材料中提供的 FeCl₃ 溶液適當地稀釋後，決定檢測苯丙酮酸的最佳 FeCl₃ 濃度。請簡要說明實驗的步驟，說明中必須包含操作過程出現的每一個數字，例如稀釋的倍數、使用的體積、反應的時間...等。並解釋你認為該濃度為最佳的理由(20 分)。請注意材料有限且用完不再補充，應仔細規劃小心使用。用注射唧筒稀釋與混合溶液很困難，可先以水為材料作練習，確定你已掌握操作要領之後再進行實驗，以減少不必要的藥品消耗。
- (3) 將材料中提供的 sodium phenylpyruvate 溶液適當地稀釋後，決定可被檢測出的最低濃度。請簡要說明實驗的步驟，但說明中必須包含操作過程出現的每一個數字，例如稀釋的倍數、使用的體積、反應的時間...等(15 分)。
- (4) 檢測細菌的苯丙胺酸脫胺酶時應將細菌先接種在 phenylalanine deaminase agar 培養基上，這個培養基可以縮寫為 PDA，主要成分為 phenylalanine、酵母萃取物、NaCl、Na₂HPO₄ 與洋菜膠。另有一種培養真菌的培養基 potato dextrose agar，縮寫也可以是 PDA，主要成分為馬鈴薯萃取物、葡萄糖與洋

編號：

菜膠。一個糊塗的研究人員製作了這兩種培養基，均標示為 PDA，事後無法區別何者才是 phenylalanine deaminase agar，因此將兩者暫時稱為培養基 X 與 Y，再另取了兩個菌種作為測試：大腸桿菌(*E. coli*)為苯丙胺酸脫胺酶陰性(不產生苯丙胺酸脫胺酶)，奇異變形桿菌(*P. mirabilis*)為苯丙胺酸脫胺酶陽性(產生苯丙胺酸脫胺酶)。將兩菌分別接種在培養基 X 與 Y 上，但為了省事沒有將菌種名稱寫在試管上，只寫上了 A 與 B，卻因為沒有在實驗筆記上做清楚的紀錄，事後又無法確定哪一種菌為 A 菌、哪一種菌為 B 菌。請利用 FeCl_3 溶液找出 X 與 Y 培養基中何者為 phenylalanine deaminase agar，A 與 B 菌中何者為奇異變形桿菌(*P. mirabilis*)，並簡單說明如何得到此結論(10 分)。

實驗 3 （50 分）

【固定化的酵母菌】

一、器材

1.共用材料（在教室前講桌）：手套、蒸餾水(每位學生需要約 1 L)、衛生紙

2.個人材料：

器材／材料名稱	數量	器材／材料名稱	數量
試管架	1 個	麵包酵母菌	1 管
簽字筆	1 支	受質溶液	1 管
250 ml 燒杯	2 個	乳酸鈣溶液	1 管
50 ml 塑膠杯	9 個	2%海藻酸鈉溶液	2 管
廢液桶	1 個	針頭	1 支
100 ml 量筒	1 個	針筒	1 支
3 ml 有刻度的塑膠滴管	5 支	15 ml 塑膠管	6 支
載玻片	4 個	蓋玻片	4 個

二、實驗原理說明

利用微生物進行催化反應是一種對環境友善的化學製程，然而微生物的體積小，在反應完成後很難完全地去除，特別是在反應槽的體積很大的時候，微生物殘留的污染情形會更加地嚴重。微生物固定化是指將微生物附著在固體的表面或是包埋在可通透性的材料中，這些固體或包埋體的體積相較於單一個微生物的體積大了許多，因此，在反應完成後，可以利用簡單的過濾步驟將其去除，達到無微生物殘留的目地。

海藻酸鈉是將碳酸鈉與萃取自藻類的海藻酸進行反應而得。海藻酸鈉是高分子聚合物，因其含有大量的羧基，溶於水後具有黏性。如果將海藻酸鈉與鈣離子水溶液混合，此時溶液中的鈣離子會取代鈉離子，產生凝膠狀的海藻酸鈣聚合物，並將溶液中的物質包埋在凝膠結構中。

本實驗使用市售的食品用麵包酵母菌，你將製做出「海藻酸鈣+酵母菌」小球，並與受質溶液進行反應，觀察是否有氣體產物產生。

三、操作與作答說明

(一)、實驗開始前：

1. 請清點材料單內器材與藥品，小心配製溶液。不提供額外的藥品。
2. 請戴手套操作實驗，手套在講台上。

(二)、實驗流程：

1. 先將麵包酵母菌水溶液與不同濃度的海藻酸鈉溶液混合。
2. 再將「海藻酸鈉+酵母菌」溶液滴入乳酸鈣溶液中，製做出「海藻酸鈣+酵母菌」小球。
3. 最後，將「海藻酸鈣+酵母菌」小球放入受質溶液中，觀察「海藻酸鈣+酵母菌」是否能進行催化反應，產生氣體分子產物。

(三)、開始進行實驗：

1. 配製麵包酵母菌水溶液：將 40 ml 蒸餾水加入裝有麵包酵母菌粉末的 50 ml 塑膠管，搖晃塑膠管，讓粉末溶解在水中。
2. 配製不同濃度海藻酸鈉溶液(2， 1， 0.5%)：你有兩管 2%海藻酸鈉溶液，將其中一管加入 5 ml 水，用力搖晃均勻，配製成 1%海藻酸鈉溶液。吸取 5 ml 的 1%海藻酸鈉溶液放入一個空的 15 ml 塑膠離心管，加入 5 ml 水用力搖晃均勻，配製成 0.5%海藻酸鈉溶液。
3. 配製乳酸鈣稀釋液：將 15 ml 乳酸鈣溶液倒入燒杯中，加水稀釋至 150 ml。
4. 配製受質溶液：將 10 ml 受質溶液倒入燒杯中，加水稀釋至 100 ml。

問題 1：請設計一個實驗，證明海藻酸鈉與乳酸鈣不會影響酵母菌的催化活性。

- (1) 請使用少量的溶液進行實驗，例如 1 ml。
- (2) 請使用 1%海藻酸鈉進行實驗，因為 2%海藻酸鈉的黏度高，很難吸取。
- (3) 請將實驗步驟與結果寫在作答區。

5. 製做「海藻酸鈣+酵母菌」小球：

- 5.1 使用塑膠滴管吸取適量的酵母菌水溶液，分別加入裝有不同濃度的海藻酸鈉溶液的塑膠管，搖晃均勻，配製成 1， 0.5， 0.25%的「海藻酸鈉+酵母菌」溶液。
- 5.2 取出 3 個 50 ml 燒杯分別加入 30 ml 的乳酸鈣稀釋液。
- 5.3 用針筒吸取約 0.6 ml 的「海藻酸鈉+酵母菌」溶液，小心地滴入裝有乳酸鈣稀釋液的燒杯中。此時可以在稀釋液中可以看見滴入的海藻酸鈉與鈣離子作用後形成了小球。針筒中的液體完全滴完後，可製作約 10~15 個白色小球。

編號：

6. 清洗「海藻酸鈣+酵母菌」小球：

6.1 取出 3 個新的 50 ml 燒杯。將一個塑膠滴管切短，使其開口變大，使用這個開口較大的塑膠滴管將在乳酸鈣稀釋液中的白色小球吸取出，分別放入新的燒杯中，吸除殘餘的乳酸鈣稀釋液。

6.2 再加入 50 ml 蒸餾水浸泡清洗小球。

7. 活性測試：

7.1 將清洗後的不同濃度的「海藻酸鈣+酵母菌」小球各 5 顆，分別放入 15 ml 塑膠管中，吸除管內殘餘的液體後。再加入 5 ml 的受質溶液，反應 30 秒後，觀察是否有氣體產物生成。

7.2 將小球從受質溶液中吸出，放入燒杯中，吸除殘餘的受質溶液，再加入蒸餾水浸泡清洗 10 秒。

7.3 將小球吸出，放在桌上，對半切開後，放入裝有新的蒸餾水的燒杯中，觀察切開的小球是否仍會浮起。

問題 2：關於「海藻酸鈣+酵母菌」催化能力測試的相關問題。

2.1 由實驗結果得知，不同濃度的「海藻酸鈣+酵母菌」小球是否具有催化能力？(6 分)

2.2 是什麼原因造成「海藻酸鈣+酵母菌」小球在受質溶液中浮起來？(4 分)

2.3 哪一種濃度的「海藻酸鈣+酵母菌」小球的質地最硬 (1.0%，0.5% 或 0.25%)？(4 分)

2.4 在受質溶液中浮起來的小球，清洗後，對半切開，再放入新的蒸餾水中，是否仍會浮起？(3 分) 你認為造成這個現象的原因為何？(3 分)

8. 檢驗酵母菌是否會從小球中逃逸：

使用固定化酵母菌進行催化反應的最大優點是不會有菌體殘留在反應溶液中。請使用清單內的材料設計一個實驗，檢驗酵母菌是否會從你做的小球中逃逸。

問題 3：請使用清單內的材料設計一個實驗，檢驗酵母菌是否會從你做的小球中逃逸。(10 分)請將你的實驗步驟與結果寫在答案卷之作答區。

問題 4：從你的實驗結果可以得知，除了需要時間與藥品製作「海藻酸鈣+酵母菌」小球，你認為利用「海藻酸鈣+酵母菌」小球進行催化反應可能存在什麼缺點？請寫出 2 個缺點 (10 分)

(請將實驗中的各個問題的答案，寫在作答區，未寫在作答區者，不予計分。)

實驗 4（50 分）

【透明魚標本的製作與用途】

本題需穿戴實驗手套且本實驗標本均需要回收，請小心操作

一、器材

1. 共用材料（在教室前講桌）：清水、手套(講桌自取)
2. 個人材料：

器材／材料名稱	數量	器材／材料名稱	數量
光學顯微鏡	1 台	固定後之魚標本 (裝於 5 mL 離心管 A 中)	1 尾
解剖顯微鏡	1 台	半成品透明魚標本 (裝於 5 mL 離心管 B 中)	1 尾
載玻片	3 片	完成品透明魚標本 (裝於 5 mL 離心管 C 中)	1 尾
蓋玻片	3 片	培養皿	4 個
計時器	1 台	15 mL 離心管 D (氫氧化鉀 與甘油混合液)	1 罐
塑膠滴管	3 支	15 mL 離心管 E (氫氧化鉀 與甘油混合液)	1 罐
彎頭鑷子	1 支		

二、實驗背景與目的

透明魚標本製作為一常見的動物標本製作方式，其利用藥品使細胞中的蛋白質透明化，並配合染色的方式，可以清楚染到動物身體內的不同部位。製作過程可以約略區分為五個步驟：防腐、脫水、透明化、染色、保存，其中染色步驟根據染劑的特性，會考慮調整順序或是增加染色部位，以及配合染色過程需求而增加脫水或是復水的流程。例如本次操作題之標本便是先進行亞里西安藍之染色再進行透明化，最後再染茜素紅。

步驟中，防腐主要是使用甲醛（formaldehyde）水溶液（俗稱福馬林）進行浸泡，甲醛化學式為 CH_2O ，是最簡單的醛類（aldehyde），是一種有刺鼻氣味的無色氣體，易溶於水。蛋白質由各種不同的氨基酸所組成，並依靠各種鍵結連接，甲醛可以和蛋白質的氨基部分進行結合，與甲醛反應後的這些分子會被甲醛交聯成網狀結構進而不易被分解，使蛋白質變性，故具有防腐、消毒以及些微漂白的功用，但是也會影響生物體的代謝，容易對活細胞造成極大的破壞效果。

透明化主要利用特定的反應作用去改變蛋白質性質，使蛋白質不會吸收或反射光線，讓光線可以穿過細胞中的蛋白質，進而使整個生物看起來像是透明的。

染色最常見的是使用藍色的亞里西安藍以及紅色的茜素紅，前者需要溶解在酒精跟冰醋酸的混合溶液中，後者則是可溶解於 0.5 % 的氫氧化鉀水溶液中。

目前最常使用於透明魚標本的保存液是甘油，甘油很常運用在細胞或組織保存，特別是作為抗凍劑使用。由於存在細胞中的分子會降低水的凝固點，在緩慢降溫的情況下，細胞外的水將較細胞內的水早凝固，而抗凍劑可使細胞外形成的水結晶不致於過大而刺破細胞膜；然而，當細胞外的水逐漸結晶時，細胞內的液體也會透過細胞膜而滲透流失，細胞因失水而萎縮成扁平狀，如果條件正確，細

編號：

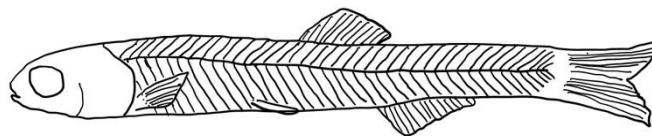
胞內的水在冷到足以形成大結晶而刺破細胞內膜之前，都已離開了細胞。而利用高濃度的甘油存放標本時，可以讓細胞不至於萎縮，甚至保有一定程度原本的形狀，進而減少標本的變形與傷害。

三、操作與作答說明(答案請填寫於答案卷才計分)

1. 甲醛可以使蛋白質變性，請依據離心管 A 與其他離心管中之魚類標本進行觀察。根據你的觀察，試推測甲醛浸泡之後是利用何種方式去改變蛋白質結構而可以達到透明化的效果？(5 分)
(觀察完畢後請將離心管 A 中的標本收回離心管 A 之中，液體以滴管吸回。)
2. 將離心管 B 與 C 中的透明魚標本分別倒出至培養皿上，並使用顯微鏡進行觀察，觀察個別染色的情況，可以看到 B 之標本本身都是呈現藍色，而 C 的標本則是有染成不同的顏色。請依照觀察結果回答下列題目：
 - A. 本次標本製作過程中，離心管 B 的魚已先進行亞里西安藍染色後，再進行透明化，試推測為什麼要先在透明化前先進行亞里西安藍染色？(5 分)
 - B. 離心管 C 的標本有進行茜素紅染色，試依照 B、C 標本染色情況推測茜素紅染色的應為標本的何種成分？(3 分)為什麼做此判斷？(7 分)
 - C. 從離心管 C 的標本上可看到很多不同部位，都分別被亞里西安藍與茜素紅染色，請比較 B 與 C 的標本，在答案卷上的魚外型圖中，畫出兩個分別被亞里西安藍與茜素紅染色且彼此相連接的構造，並請標示出各自的顏色。(10 分)

注意：接下來的步驟將會為標本進行保存液置換，**建議小心操作，避免保存液噴濺到你的設備或考卷上**，也小心計時。

- i. 將離心管 B 之透明魚標本倒至培養皿並以鑷子小心撈取，放置於離心管 D 中，將離心管 D 倒置，可看到標本浮起，等待並記錄標本沈降的時間。
 - ii. 待離心管 D 中的標本沈降之後，將標本自離心管 D 中倒入培養皿中，重新以鑷子放置於離心管 E 後，再度倒置，記錄與觀察其沈降的時間。
3. 製作透明魚標本的最後過程中會使用不同比例的 5% 氫氧化鉀(KOH)與甘油的混合水溶液，通常會依序使用 KOH：甘油=3：1，1：1，1：3，最後才置換到純甘油，離心管 D 中的液體為 3：1，離心管 E 中的水溶液均為 1：1，請根據你的觀察結果，(1)製作圖表比較沉降的時間(5 分)，(2)並推測為什麼要依序置換的原因。(5 分)
 4. 通常在判斷幼魚種類的時候，我們會依據各種身體特徵，如體節總數目以及魚鰭特徵（如下圖魚之背鰭位於第 16 至 23 體(肌)節以及臀鰭起點在背鰭基底之後，或是 O O 鰭之鰭條(骨)有幾條之類的特徵）進行分類判斷。



請在顯微鏡下分別觀察 B 與 C 標本，推測這兩隻魚是不是同一種魚，須寫出判斷依據。(10 分)

(本題完成後，請將離心管 C 的標本裝回去離心管當中，液體也需回收。)