

## 109 學年度普通型高級中等學校數學及自然學科能力競賽決賽

## 生物科 試場二(D203 實驗室) 試題

## 實驗器材：

| 共用器材                             | 數量  |
|----------------------------------|-----|
| <b>I</b>                         |     |
| 分度吸量管唧筒                          | 1 支 |
| 鈍頭鑷子                             | 1 支 |
| 刻度尺                              | 1 支 |
| 免削鉛筆                             | 1 支 |
| 口紅膠                              | 1 支 |
| 廢物桶 (500 mL 燒杯套上小塑膠袋，裝廢棄吸管尖與溶液用) | 1 個 |
| <b>II</b>                        |     |
| 3 mL 刻度塑膠滴吸管                     | 1 支 |
| 計時器                              | 1 個 |
| 油性細字簽字筆                          | 1 支 |
| 1 cm 膠帶                          | 1 捲 |
| 一般用剪刀(解剖剪亦可)                     | 1 支 |

| 個人器材                     | 數量  |
|--------------------------|-----|
| <b>I</b>                 |     |
| 手套 (於門口領取)               | 1 雙 |
| 250 mL 燒杯 (作為展開槽使用)      | 2 個 |
| 10 mL 分度吸量管 (吸取石油醚)      | 1 支 |
| 5 mL 分度吸量管 (吸取丙酮)        | 1 支 |
| 鋁箔紙                      | 2 片 |
| 濾紙條 (1*9 cm)             | 2 枚 |
| 濾紙片 (2.5*10 cm)          | 2 枚 |
| 微量吸管尖 (Tips)             | 2 支 |
| 折疊紙巾                     | 1 張 |
| 菠菜葉丙酮萃取液                 | 1 管 |
| 石油醚 (30 mL)              | 1 管 |
| 丙酮 (10 mL)               | 1 管 |
| <b>II</b>                |     |
| 5 mL 塑膠小管(含螺旋蓋)          | 2 支 |
| 快篩檢驗試劑                   | 2 包 |
| 15 mL 塑膠離心管(已裝有 12 mL 水) | 1 支 |
| 標示甲、乙之樣本(包裝於秤藥紙內)        | 各 1 |

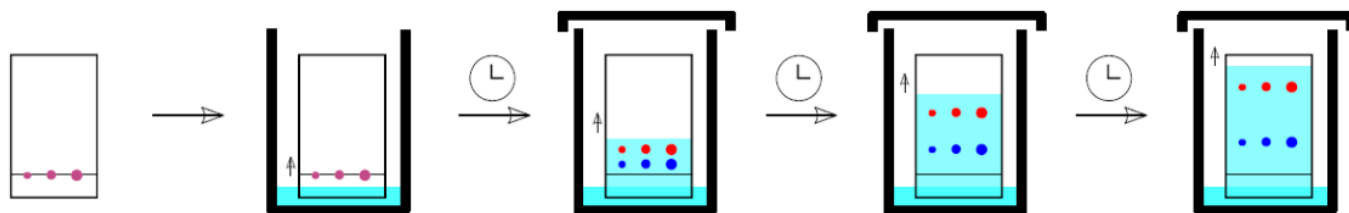
## ※請注意※

1. 本試場所需之器材與材料皆已置於桌上，請**確實核對**清單上所列各項物品。若有短缺，請立刻舉手向評審老師報告。
2. 所有器材與材料用完後，不再補發。
3. 作答時間共 **60 分鐘**。
4. 本試卷共 **7 頁**，交卷時全部繳回。
5. 每頁試卷均需填寫競賽編號，請勿於試卷上書寫任何與作答無關之記號或文字。

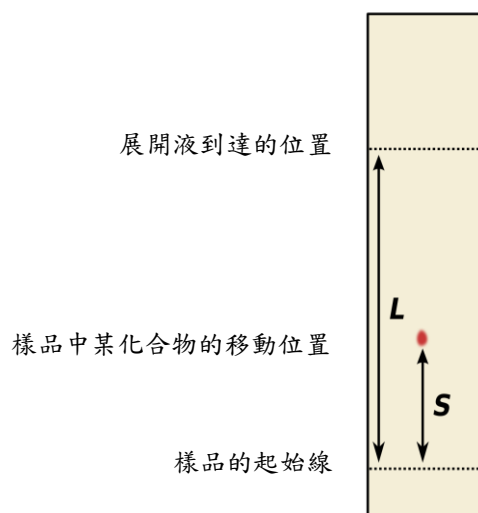
## I. 濾紙色層分析

### 1、 實驗說明：

**濾紙色層分析**是一種分離混合物樣品的層析技術，濾紙有吸附樣品的作用又稱為固定相，操作時先將待分離樣品用毛細管點於濾紙上(如下圖)，然後在密閉的層析缸中，利用溶劑作為流動相(或稱展開液)，溶劑在濾紙上藉由毛細作用緩慢地移動至濾紙頂端，因為樣品中各化合物對於固定相的吸附能力不同，對於流動相的溶解能力也不同，導致各化合物的上升速度有所差異，進而達到分離混合物中不同化合物的目的。



化合物在固定相上分離情形可以比移值（又稱  $R_f$  值）來表示。 $R_f$  值定義如下圖： $R_f = S/L$ ，其中  $L$  表示展開液從起始線移動至層析結束時的位置距離； $S$  表示某化合物從起始線移動至層析結束時的位置前沿距離。



本實驗以濾紙做為固定相，濾紙為極性物質，樣品中極性較強的化合物對濾紙會有較強的吸附力，因此不易被展開液洗脫，故移動速度慢， $R_f$  值較小；相對的，極性較弱的化合物與濾紙的吸附力較弱，較容易移動，故具有較大的  $R_f$  值。此外，如果增強展開液的極性，這樣也會使極性較強的化合物在濾紙上移動的位置升高，增加該化合物的  $R_f$  值。因此，使用極性不同的展開液，或是使用幾種極性不同溶劑配成的混合展開液，皆可以改變化合物在濾紙上移動的速率，進而改進化合物的分離效果。

本操作題將以濾紙色層分析法來分離菠菜葉丙酮萃取液中的色素化合物，並自行設計不同的混合展開液，以便改進色素化合物分離的效果。

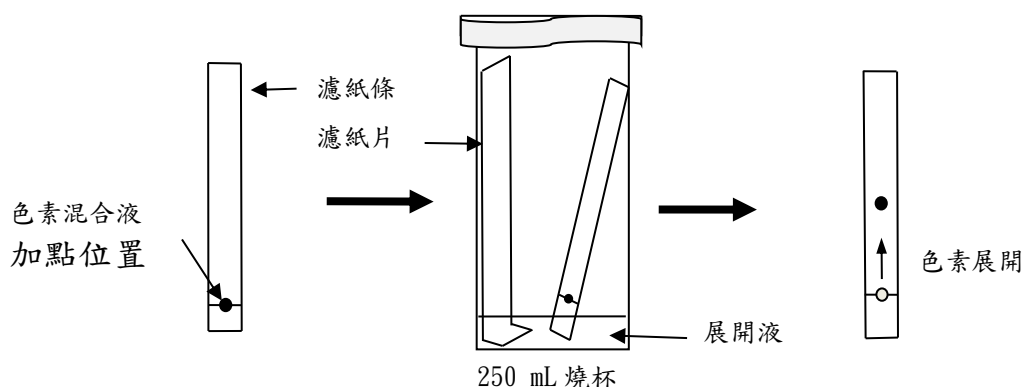
### 2、 實驗操作：

#### 1. 製備展開液

將分度吸量管與分度吸量管唧筒進行組裝，依照石油醚：丙酮=95：5的體積比例，分別吸取石油醚與丙酮溶劑，並釋放定量的溶劑於一個 250 mL 燒杯(層析缸)中，以配製 10 mL 的展開液，使展開液高度不超過 0.5 公分，並於以下三-1 表格中紀錄配製體積。並如圖一所示，在燒杯內放上一張濾紙片，讓濾紙底部浸沒於展開液中，並靠在燒杯內壁後，以鋁箔紙蓋住燒杯使展開液均勻蒸發在燒杯空間內，並達到飽和，以提升分離的效果。

## 2. 點樣

將微量吸管尖置入菠菜葉丙酮萃取液，利用毛細現象吸取丙酮萃取液，並點樣在濾紙條上距離底部約 1.0 公分的位置，如圖一所示。**注意！**為使點的面積愈小愈好，每吸取一次色素萃取液，應將該次微量吸管尖中的色素萃取液分次點在濾紙上，每次點加時應待濾紙吸收，且溶劑揮發後再點下一次。將微量吸管尖內的菠菜葉萃取液點樣完畢後，再一次吸取新的菠菜葉丙酮萃取液，重複上述步驟點樣在同一濾紙條上，以增加色素濃度，能在展開後足夠明顯以肉眼觀察。



圖一

## 3. 分離菠菜葉萃取液中的色素

### (1) 第一次層析實驗：

將上述步驟 2. 點樣過的濾紙條置於燒杯內（**注意！**濾紙條之側邊不可碰到濾紙片與燒杯壁，如圖一所示），蓋上鋁箔讓展開液於濾紙上緩慢上升。展開液遇到樣品點時，會帶著樣品上升（**等待時間可以先進行其他操作或答題**）。當展開液上升至濾紙條離頂部 0.5 公分時（不要讓展開液爬升到濾紙的頂部），取出濾紙條，迅速以鉛筆畫記展開液之前沿位置，並量測展開液移動的距離(L)，靜置於乾淨桌面，待展開液揮發後，再以鉛筆畫記各種色素化合物移動到達的前沿位置，並量測各色素移動的距離(S)，以及計算出各種色素化合物的 Rf 值，並紀錄於以下三-2 表格中。

【以口紅膠將層析後的濾紙條黏貼於以下「三-2」表格中】

### (2) 第二次層析實驗：

菠菜葉色素中有兩種性質相近的色素，即葉綠素 a (藍綠色) 與葉綠素 b (綠色)，它們的 Rf 值也十分相近，依據你的第一次層析實驗結果，計算出葉綠素 a 與葉綠素 b 的 Rf 值差值，並填入三-2 表格中。為提升葉綠素 a 與葉綠素 b 的分離效果，亦即增加二者之間的 Rf 差值，依據第一次層析實驗結果與濾紙色層分析之原理進行判斷，變更展開液中**丙酮與石油醚**的比例，配製一種新的展開液，並重複上述步驟 1. 至 3.，以進行第二次菠菜葉萃取液的濾紙色層分析。

(注意事項：(1) 展開液中各溶劑之極性強弱為：丙酮強於石油醚；(2) 改變任何一種溶劑的體積百分比比例，均會影響色素分離效果，因本實驗提供之溶劑有限，並且體積百分比增加或減少 2 至 5%，就會使菠菜葉之色素分離效果產生顯著的改變，請於上述範圍內謹慎調整並配製你的展開液。)

## 3、 實驗紀錄、結果與問題：

### 1. 於下表記錄你如何配製展開液：(5 分)

|         | 石油醚：丙酮 | 石油醚 (mL) | 丙酮 (mL) | 展開液 (mL) |
|---------|--------|----------|---------|----------|
| 第一次層析實驗 | 95 : 5 |          |         | 10.0     |
| 第二次層析實驗 |        |          |         | 10.0     |

2. 於下表記錄濾紙層析結果：(26 分)

請依照 Rf 值(計算至小數點後第 2 位)由大而小順序，依序填寫為色素化合物 A、B、C、D、E。

|                          | 第一次層析實驗             |              | 第二次層析實驗             |              |
|--------------------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|
| 展開液移動之距離 (L) (公分)        |                     |              |                     |              |
|                          | 各色素移動的<br>距離(S)(公分) | 各色素之<br>Rf 值 | 各色素移動的<br>距離(S)(公分) | 各色素之<br>Rf 值 |
| 色素化合物 A                  |                     |              |                     |              |
| 色素化合物 B                  |                     |              |                     |              |
| 色素化合物 C                  |                     |              |                     |              |
| 色素化合物 D                  |                     |              |                     |              |
| 色素化合物 E                  |                     |              |                     |              |
| 葉綠素 a 與葉綠素 b 的<br>Rf 值差值 |                     |              |                     |              |
| 層析後濾紙條黏貼處                |                     |              |                     |              |

3. 依據第一次層析實驗的結果，判斷色素化合物 A、B、C、D、E 的極性強度，

何者為最強？\_\_\_\_\_ (2 分)；

判斷的理由為何？\_\_\_\_\_ (2 分)

4. 比較你的第一次與第二次層析實驗的結果，回答下列問題：

(1)葉綠素 a 與葉綠素 b 的 Rf 值差值有何改變(增加、減少、或不變)？\_\_\_\_\_ (2 分)

(2)試解釋改變的原因為何？

\_\_\_\_\_ (2 分)

5. 觀察層析結果，除了葉綠素 a 與葉綠素 b，菠菜葉色素中尚有胡蘿蔔素與葉黃素，這些色素皆參與菠菜葉細胞光合作用的光反應，稱為光合色素。回答下列問題：

(1) 這些光合色素存在於葉綠體的哪一部位?\_\_\_\_\_ (2 分)

(2) 這些光合色素在光反應中的功能為何?\_\_\_\_\_ (2 分)

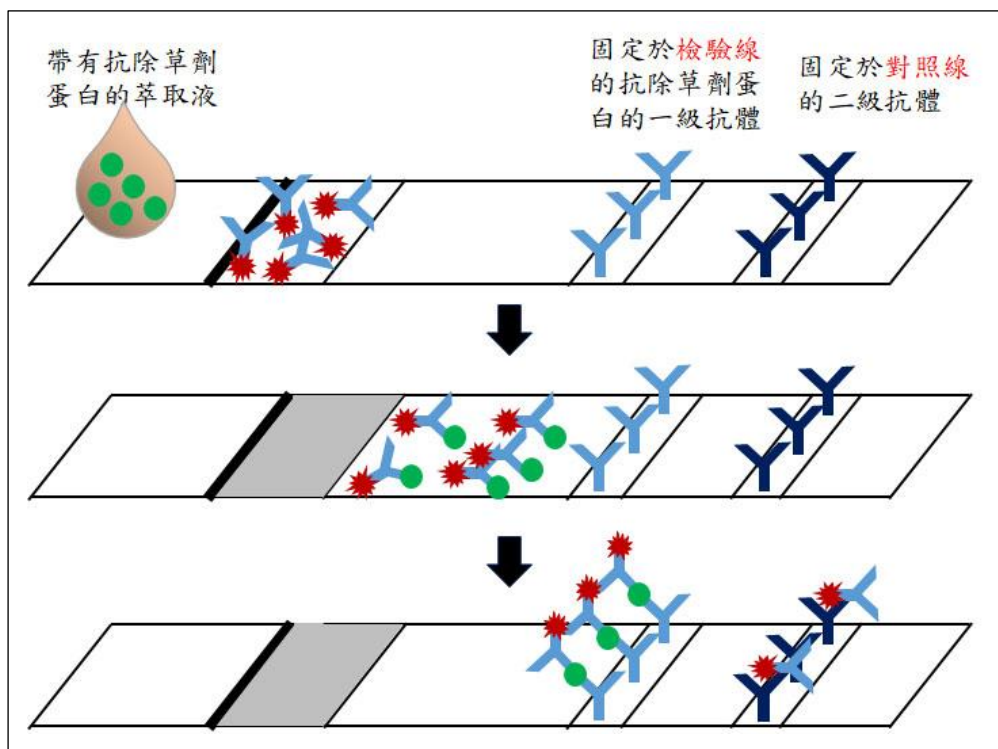
(3) 為何絕大多數的綠色植物都具有葉綠素 a，其他光合色素的組成則不盡相同?

\_\_\_\_\_ (2 分)

## II：基因改良(基改)作物與檢驗

生物技術在農業方面的應用最典型的例子莫過於基因改良(基改)的大豆、玉米等等，基改作物最常使用的策略就是將可以對抗蟲蛋白、固殺草(一種除草劑)、或是嘉磷塞(另一種除草劑)等的基因利用改良的農桿菌載體系統嵌入作物的基因組(genome)中，因為農桿菌的誘癌質體(tumour inducing, Ti)序列中有一段稱之為 T-DNA(Transferring DNA)，此菌在自然界感染植株後，可將 T-DNA 插入到植物基因組中，並且可以經過減數分裂穩定地遺傳給子代。科學家利用此現象，將想改造的基因先插入到經過修改的 T-DNA 區，使之感染植株的細胞，這些外源的基因在作物中經過轉錄、轉譯後，產生對應的蛋白質，這使得農民種植這些基改作物、噴灑除草劑時，可以殺死雜草但不會造成經濟作物死亡。在衛福部核准進口的基改產品中，以上這三個基因的品系就佔了 91% 左右。有關基改作物的檢驗則分蛋白質與基因兩個面向。

利用蛋白質加以檢驗時其原理如下圖，以檢驗是否帶有抗除草劑蛋白為例，將帶有抗除草劑蛋白萃取液滴於試紙條左側，此萃取液經由層析作用往右移動，抗除草劑蛋白與固定於檢驗線專一的抗體結合後，配合生化反應而呈現紅色條帶，之後萃取液會繼續往右移動，與固定於對照線的抗體結合，配合生化反應再呈現另一個紅色條帶。呈現一條紅色/粉紅條紋者表示為非基改作物，呈現兩條紅色/粉紅條紋者表示為基改作物。



## 一、實驗操作：

- (1) 樣品是兩包分別標示有甲、乙的大豆研磨顆粒，各有 1.5 公克且包裝於秤藥紙內，小心打開包裝且分別倒入 5 mL 塑膠小管中，勿濺灑出，標示好塑膠小管，直立於桌面，先不須旋上蓋子。
- (2) 以塑膠滴管吸取塑膠離心管中約 4-5 mL 的水進入上述的塑膠小管中，勿交叉汙染，旋上蓋子，上下均勻搖晃 10 秒後，靜置於桌面約 5 分鐘。
- (3) 計時時間一到，打開檢驗試劑( 抗嘉磷塞 )的包裝取出試紙條，可以用手指握住試紙條一端印有英文"CP4 EPSP"處，但切勿碰觸試紙條中央短短白色膜面處。將其另一端( 下端 )插入塑膠小管大豆研磨顆粒的萃取液中，使試紙條上的黑色標示線剛好浸泡於萃取液面高度左右，先固定此姿勢不動，使液體向上流經整支試紙條，約 10-30 秒即可判讀結果。
- (4) 確定結果後即可將試紙條取下放置於桌面，或繼續進行下面的步驟。勿超過 10 分鐘才判讀。

## 二、回答問題：

1. 將結果(試紙條)黏貼於下方。(10 分)

|                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <p style="text-align: center;">甲</p> | <p style="text-align: center;">乙</p> |
|--------------------------------------|--------------------------------------|

2. 根據檢驗結果，下列何項是這次檢驗出的嘉磷塞基改作物? (5 分)

☐ 只有甲     
 ☐ 只有乙     
 ☐ 甲乙皆是     
 ☐ 甲乙皆非

3. 根據圖示中抗原抗體結合、免疫色層分析等的作用，使得帶有基改的特殊蛋白會在檢驗線中呈色，而除了檢驗線外，在試紙條上設計對照線的用意為何? (5 分)

答：

4. 假設現有一個別於上述樣本甲/樣本乙的基改作物，暫且稱它為樣本丙，當你利用上面的試劑檢驗後，發現試紙條中的檢驗線不會呈色，只有對照線呈色，所以你下了結論是「樣本丙是一個非基改作物」時，你可能犯了那些錯誤，請列舉兩種且說明。(10 分)

答：

5. 是否為基改作物的另一個檢驗層面就是基因，首先就是將作物的基因組萃取出，利用聚合酶鏈鎖反應( Polymerase Chain Reaction, PCR )檢驗作物的基因組中是否帶有被轉殖入的外源基因，又因為絕大多數的外源基因會以農桿菌載體系統嵌入，故利用檢驗是否具有農桿菌的載體序列，譬如檢驗啟動子( promoter )區域、配合終止子( terminator )區域，就可檢測大多數的作物是否為基改作物。

利用聚合酶鏈鎖反應檢驗的話，則需要以上述獨特的啟動子區、終止子區的序列作為模板，設計一對引子，將此段序列經聚合酶鏈鎖反應放大後，進行電泳加以分析。假設現有農桿菌載體的啟動子至終止子區域共 500 鹼基對之序列如下，請就這些已知的序列設計欲進行聚合酶鏈鎖反應所要使用的一對引子之序列。(10 分)

5' ATA ATT ATC ATG GAA GAT .....TCA TCT TCC TCG GCA GCT 3'

(相對應股為 3' TAT TAA TAG TAC CTT CTA.....AGT AGA AGG AGC GCT GCA 5')

請注意，兩個引子的答案皆從 5'→3'寫起，且每一個引子設計 18 個鹼基。(10 分)

答：5'端的引子序列:\_\_\_\_\_

3'端的引子序列:\_\_\_\_\_

6. 假若有一個經過農桿菌的技術進行的基改作物，上述 500 鹼基對的啟動子至終止子序列確實嵌入此作物的基因組中，但在你執行上述 PCR 的檢驗方法後，以電泳分析時卻沒有 500 鹼基對的條狀帶出現，意即呈現偽陰性的狀態，你認為可能是什麼原因？並請設計實驗加以驗證你的推論。(5 分)

答：

7. 如上所述，農作物進行基改的步驟中，外源基因會先嵌入農桿菌的載體系統，所以市面上發展一種針對轉殖基因的啟動子和終止子設計引子進行 PCR 的檢驗方法，利用此策略可檢驗出絕大多數的基改作物。然而當一個樣本經此試劑檢驗得到 PCR 產物而被宣稱為基改作物時，這樣的結論可能犯何種錯誤？請解釋。(5 分)

答：