

競賽編號：

# 105 學年度高級中學 全國生物科學科能力競賽

## 實驗 1~3 操作試題

得 分



本試卷滿分 150 分

**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。實驗時請自己根據實驗需要來安排時間及實驗順序。本試卷配分 150 分。

**材料及實驗設備：**

本試卷共分三個實驗題，所提供的材料及儀器設備列於各實驗題中，置於標示「實驗 1~3」之塑膠籃中，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。

**本試場之共用材料：**

材料名稱	數量
拭鏡紙、擦手紙	數包
水浴槽	1 台
標籤紙	2 包
蒸餾水	1 桶
分光光度計	3 台

## 實驗 1

### 【以微生物酵素轉化生產植化素】(50 分)

實驗材料：

一、 每位同學實驗材料

材料名稱	數量	材料名稱	數量
甲-1 菌、乙-1 菌、 甲-2 菌、乙-2 菌 (各 1.2 mL)	4 支離心管	丙液(2.0 mL)	1 支反應管
pNPG (1.2 mL)	1 支離心管	載玻片	1 片
終止液(0.5 mL)	1 支離心管	蓋玻片	2 片
空離心管	6 支	塑膠測光管	2 支
空反應管	4 支	微量 Tips	10 支
微量吸管(P1000)	1 支	金雀異黃酮素(標準液) 濃度 50 (mg/mL) (1.2 mL)	1 支離心管
尺	1 支	微量離心管架	1 個
低速離心機	1 台	廢液紙杯	1 個
離心管-蒸餾水(15 mL)	1 個		

二、 自備材料

材料名稱	數量
普通計算機	1 台

三、 公用講桌

材料名稱	數量	材料名稱	數量
拭鏡紙、擦手紙	數包	蒸餾水	1 桶
水浴槽	1 台	分光光度計	3 台
油性筆	數支	標籤紙	2 包

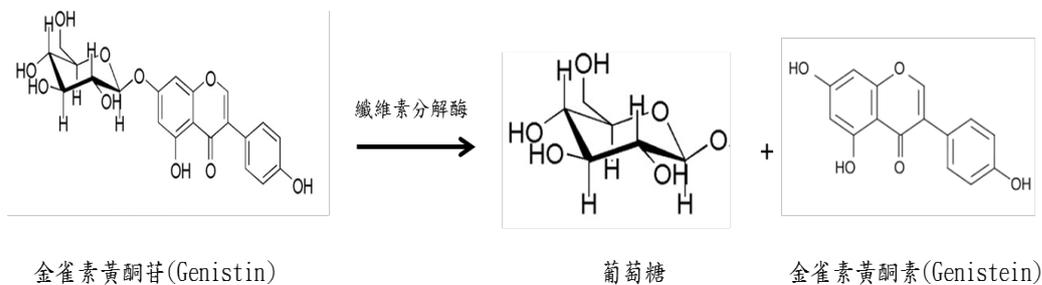
## 實驗操作與問題

有益微生物帶給人類的好處不勝枚舉，例如：我們利用酵母菌製作麵包和酒精飲料；應用蘇力菌防治病蟲害來減少農藥使用；使用食用優酪乳等富含有益腸道微生物（益生菌）促進身體健康。環境中菌相複雜，有益微生物通常需要在特定的地方經過一系列的篩選流程，即可以篩選到目的微生物。蔬菜與水果除富含維生素、礦物質及纖維質外，還有數千種不同的天然化合物，稱為植化素

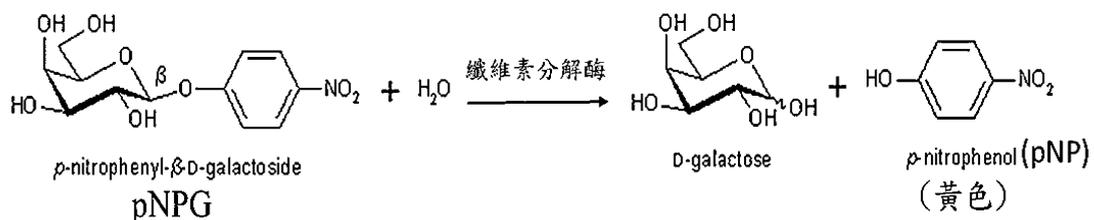
(phytochemicals)。它是植物生長的必要元素，也是植物五顏六色之天然色素和植物氣味之物質來源。植化素提供植物自我保護的功能，抵抗昆蟲、細菌、真菌、病毒的感染傷害，對紫外線，輻射線，空氣及土壤污染，化學藥物之種種傷害之保護作用。對人類而言，它雖屬「非必要性營養素」。但因人體本身無法製造植化素，必須從各種食物來攝取。

各種不同的植化素對人體有不同的功能，如它強力的抗氧化物質，可清除自由基，活化免疫機能，增強免疫力，輔助維生素發揮生理機能，激發體內酵素解毒活性，調節產生酵素，預防細胞受損，改善血流循環，抑制發炎及過敏，抵抗細菌及病毒感染，減少罹癌風險。

研究指出植化素—金雀異黃酮素(genistein)具有抑制癌症及愛滋病毒感染之潛力。因此有一製藥廠欲從黃豆與其他植物萃取金雀異黃酮素(genistein)，然而在黃豆與其他植物中金雀異黃酮素含量極少，大都以鍵結糖苷鍵形式的金雀異黃酮苷(genistin)存在。因此以纖維素分解酶水解切除金雀異黃酮苷之糖苷鍵(即葡萄糖的部分)可得金雀異黃酮素及葡萄糖(如下圖)。



製藥廠研發部門目前已從廢棄果皮堆中篩選到1株乳酸菌及1株酵母菌，由酵素活性分析得知它們共同具有內切型纖維素分解酶的特性，可將纖維素的β-1,4鍵，以非特異性(random)的方式予以水解，將纖維素水解成纖維糊精(cellodextrin)、纖維雙糖(cellobiose)或是葡萄糖(glucose)。此纖維素分解酶同樣具有水解切除金雀異黃酮苷糖苷鍵之能力。欲比較此2株菌之纖維素分解酶水解切除葡萄糖效力，會利用以下酵素活性原理來檢測(如下圖)



以有 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) 為基質，菌的纖維素分解酶會水解 pNPG，產生的 pNP 而呈黃色，可透過吸光值 400 nm 檢測得知其酵素活性。欲得腸道吸收活性較佳之金雀異黃酮素須與胺基酸反應後可以形成藍色複合物，即得到腸道吸收最佳劑型。

以下為此家藥廠研發人員所做實驗之流程，請你依照此流程操作並回答下列問題。

### 一、菌種之外觀判定(請將答案填入答案卷之空格中，每格 2.5 分)

1. 將培養好之甲-1、乙-1 菌種，以滴管取一小滴，置於載玻片上。
2. 以蓋玻片傾斜 45 度蓋上，勿有氣泡，並以 400X 顯微鏡觀察之。

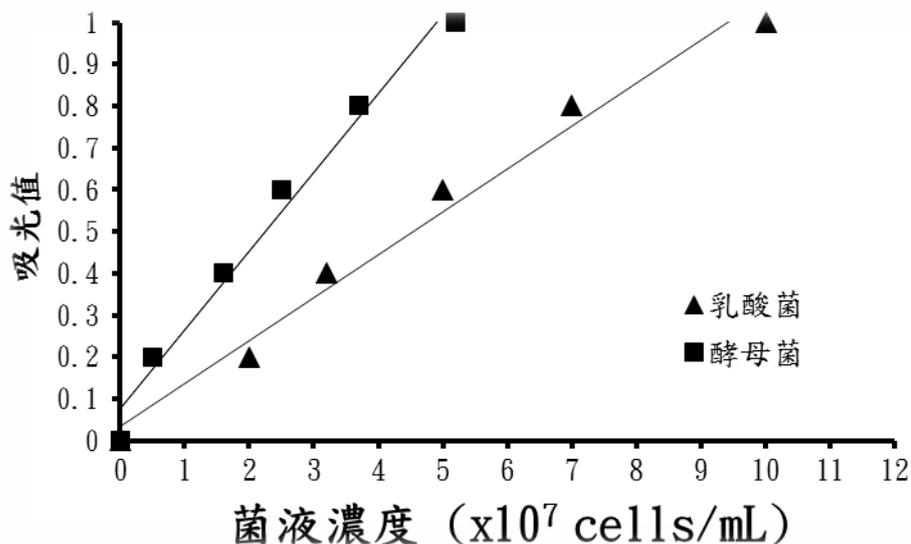
問題一、依其菌種之外觀判定甲-1 是     (1)     乙-1 是     (2)     (填入乳酸菌或酵母菌)，並畫出視野下之菌種之外觀形態甲-1     (3)     乙-1     (4)    。

### 二、菌數測定

1. 甲-1、乙-1 兩菌管震盪後，分別取適量的菌液到小離心管中。
2. 以分光光度計波長 600 nm 來測其吸光值，以其混濁度來估算菌數。先以 1 mL 水作為空白校正，再測菌液的吸光值，菌液的吸光值範圍應該 0.1—1.0。

[註]：混濁度測定原理主要是以分光光度計來測量菌液在波長 600 nm 之吸光值 (即 OD<sub>600</sub>; Optical Density) 來代表菌體數目；亦即將細菌視為懸浮顆粒，這些顆粒可阻斷光線的通過(但其實它是細菌將光線散射掉)，因此細菌濃度愈高，通過的光線越少，其吸光值就越大，因此混濁度常被用來估算菌數。

3. 將不同菌數之菌液測其在 OD<sub>600</sub> 之吸光值，結果如下圖。



問題二、甲-1 菌液測到的吸光值為\_\_\_(5)\_\_\_；乙-1 菌液測到的吸光值為\_\_\_(6)\_\_\_。甲-1 的菌液濃度約為\_\_\_(7)\_\_\_ cells/mL；乙-1 的菌液濃度約為\_\_\_(8)\_\_\_ cells/mL。概述你(妳)如何得到甲-1 菌液菌液濃度?\_\_\_(9)\_\_\_；概述你(妳)如何得到乙-1 菌液濃度?\_\_\_(10)\_\_\_。

### 三、酵素活性測定

1. 甲-2 和乙-2 菌管各取 500  $\mu$ L 菌液到小離心管中。
  2. 加入 500  $\mu$ L pNPG 並均勻混合。
  3. 水浴 50°C 反應 30 分鐘變成黃色。
  4. 加 200  $\mu$ L 終止液。
  5. 離心至上清液呈現澄清透明之黃色。
  6. 先以 1 mL 水作為空白校正，再取上清液測其在波長 400 nm 之吸光值。
- \* 酵素活性公式

$$U/L = \frac{OD_{400} \times \text{總體積 (mL)} \times 1000}{0.057 \times \text{反應時間 (分鐘)} \times \text{菌液體積 (mL)}}$$

問題三、甲-2 菌液在波長 400 nm 之吸光值為\_\_\_(11)\_\_\_；乙-2 菌液之吸光值為\_\_\_(12)\_\_\_。甲-2 菌液酵素活性是\_\_\_(13)\_\_\_ U/L；乙-2 菌液酵素活性是\_\_\_(14)\_\_\_ U/L。

### 四、最佳劑型形成反應(為節省你們的時間，以下 1-4 步驟已幫你們完成)

1. 取甲-2 菌液 1 mL，置於 2 mL 反應管。
2. 加入 0.5 mL 金雀異黃酮苷和 0.5 mL 胺基酸。
3. 室溫下反應 40 分鐘。
4. 離心 2 分鐘 3000 rpm 後取上清液為丙液。

問題四、取丙液(甲-2 菌生成劑型)測其在波長 595 nm 之吸光值是\_\_\_(15)\_\_\_；它們生成最佳劑型效價是\_\_\_(16)\_\_\_

\*最佳劑型效價  $E = OD_{595} \times 1000 / \text{反應時間 (分鐘)} \times 0.5 \text{ (mL)}$

### 問題五、

I. 現在有一已知濃度 50 (mg/mL) 之金雀異黃酮素(標準液)與胺基酸反應後，得吸光值\_\_\_(17)\_\_\_及效價\_\_\_(18)\_\_\_。

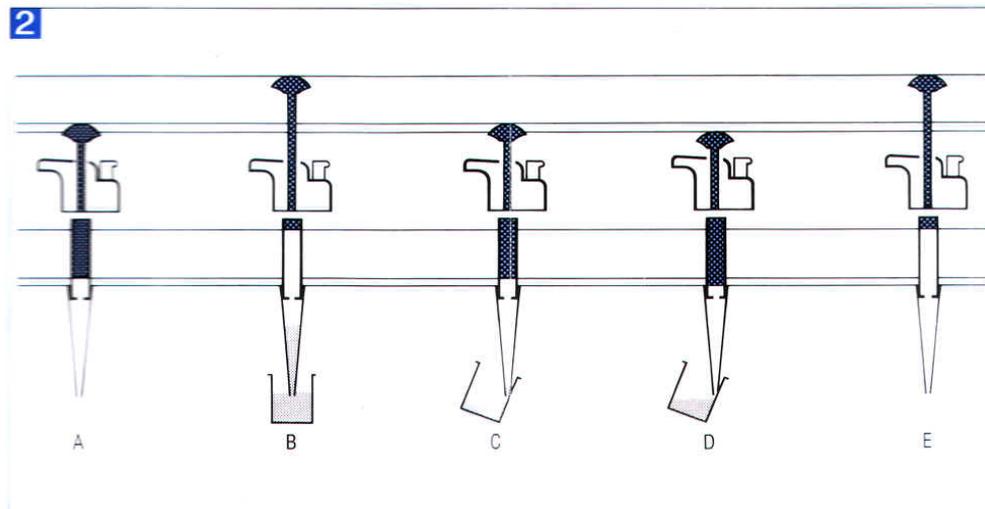
II. 請將標準液—50 (mg/mL) 之金雀異黃酮素作序列稀釋，並分別測其在波長 595 nm 之吸光值並換算效價且填入答案紙的表格中。

濃度 (mg/mL)	0	?	?	?	50	丙液(20)
吸光值	0	?	?	?	(17)	(15)
效價	0	?	?	?	(18)	(16)

III.將標準液個別濃度及吸光值，分別於答案卷方格紙中繪出對應點，並與各點最適之距離繪一直線，並於此直線中標出丙液之位置\_\_\_\_(19)\_\_\_\_，以找出丙液之對應濃度為\_\_\_\_(20)\_\_\_\_ (mg/mL)。

(1)微量吸管使用：

1. 由高旋至低值，小心直接旋至設定值。旋轉時避免超過設定值之最大與最小值。
2. 套上適當 Tip 並以下圖方式吸取溶液，盡可能將 Tip 與液面垂直，且小心緩慢地操作。

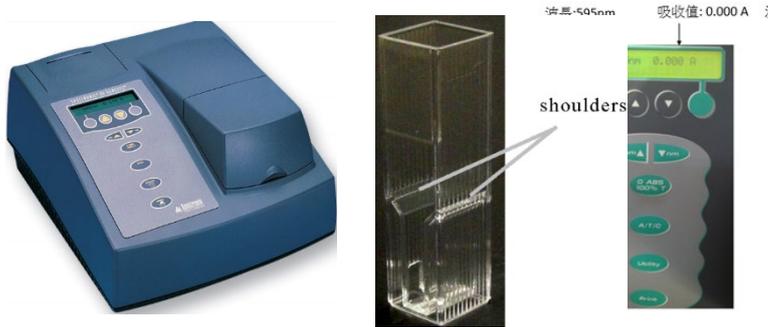


圖一 Pipet 使用方法

3. 釋放溶液時，將 Tip 接觸管壁，慢慢壓下按鈕至第一段，過 1~2 秒再壓下第二段。

注意事項：

- a. 勿將 Pipet 浸入溶液。
- b. 吸取酸液或具腐蝕性溶液後，請將微量吸管拆解開，各部位零件以蒸餾水沖洗乾淨，擦乾後再正確組合回復原狀。
- c. 微量吸管的任何部份切勿用火燒烤，亦不可吸取溫度高於 70°C 的溶液，避免蒸氣侵入腐蝕活塞。
- d. 吸取黏度高溶液，請先將微量吸管頭尖端以刀片或剪刀將出口切大，並先行預潤後再吸取。
- e. 微量吸管頭中有溶液時，不可平放。
- f. 用完 Pipet 後，將其調回量取範圍最大值，以避免彈簧彈性疲乏。



圖二 分光光度計、操作面板及測光管

### 【分光光度計的使用方法】

1. 分光光度計的螢幕必須顯示(1)600 nm、(2)400 nm 或(3)595 nm (如圖 2 所示)，若否，舉手通知監試人員。但螢幕上的吸光值(A值)可以不是0.000。
2. 在測光管中裝入蒸餾水(DW)，至少裝到shoulders處。
3. 將測光管放入分光光度計中(如圖2 所示)的測光管放置處(cuvette holder)，透明面須朝向前後兩側。
4. 關上蓋子。
5. 按下‘0 ABS 100% T’的按鈕(即歸零)，此時將儀器顯示吸光值為0.000值。本實驗將以此為標準零值(blank control)。
6. 接下來，你可以開始測量其他樣本的吸光值。
7. 將蒸餾水換成其中一種樣本溶液，操作同上，並讀取其吸光值。
8. 如果你的序列稀釋的樣本，是依濃度低往濃度高的樣本依序測量，則在每次測量後，你將不須清洗測光管。



圖三 低速離心機

### 【低速離心機的使用方法】

1. 將等重(或等體積)離心管以對稱的方式兩兩放入孔洞內。
2. 蓋上並以手部按住蓋子，此時離心機會自動離心。
3. 要停止離心時，手部離開蓋子，離心機會慢慢停止。
4. 打開蓋子，取出樣品，即完成離心操作。

## 實驗 2

### 【細菌的染色與分子鑑定】(共 50 分)

#### 競賽說明：

大多數細胞內的構造是無色的，必須經由染色並依微生物型態、特徵與細胞構造等來鑑別。本次實驗以革蘭氏染色來輔助細菌的鑑定。革蘭氏染色依照細菌細胞壁的結構之不同，將細菌分成兩大類，即革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌。相對於容易導致人類疾病的革蘭氏陰性菌，革蘭氏陽性菌通常是益生菌；在臨床上革蘭氏陽性細菌和革蘭氏陰性細菌對抗生素的反應並不一樣。通過抽取樣品，如果醫生可以在很短的時間內確定細菌的革蘭氏性質，及細菌對抗生素的反應，醫生就可以迅速的給病人抗生素治療，而不需要等待通過細菌培植得到的化驗結果。

#### (一) 細菌的染色

(1) 實驗目的：製作細菌檢體抹片，透過革蘭氏染色法配合顯微鏡觀察以鑑定陰性菌與陽性菌的不同。

(2) 實驗原理：革蘭氏陽性細菌之細胞壁含有較多的肽聚糖(peptidoglycan)，因此可以用革蘭氏染劑(結晶紫)染色成深藍色或是紫色。而革蘭氏陰性菌則不能被結晶紫染色，而呈現複染劑顏色紅色(番紅)。染色後的細菌可在顯微鏡下有更好的觀察，是常用來辨別革蘭氏陰性或是陽性的主要方法之一。

(3) 實驗材料：

材料與試劑：		器材：
1. 玻片樣本：玻片① 枯草桿菌( <i>Bacillus subtilis</i> )；玻片② 大腸桿菌( <i>Escherichia coli</i> ) 2. 未知菌③	4. 染劑： ① 結晶紫 2% crystal violet (初染劑) ② 碘液 Gram Iodine (媒染劑) ③ 酒精 (脫色劑) ④ 番紅 3.6% safranin (複染劑)	1. 載玻片、蓋玻片 2. 光學顯微鏡 3. 拭鏡紙 4. 塑膠吸管 5. 250 ml 燒杯 (取蒸餾水用) 6. Tip 或牙籤 7. 濾紙 8. 紙杯 (染色及收集廢液使用)

(4) 實驗步驟:

1. 取一乾淨載玻片，以 Tip 或牙籤取出未知菌，塗抹於乾淨玻片中央，再均勻分散之。
2. 塗抹之玻片為半透明、白色的一層膜狀物，風乾後，讓菌體固定於玻片上。
3. 將此玻片瓶放在染色架上，先以結晶紫染液作用 1 分鐘，再以蒸餾水將剩餘染料沖洗去除（見下圖步驟①），於顯微鏡下仔細觀察並紀錄細胞之顏色（實驗結果 5-1）。
4. 加入碘液，作用 1 分鐘，用水沖洗（見下圖步驟②），於顯微鏡下仔細觀察並紀錄細胞之顏色（實驗結果 5-1）。
5. 再以 95%酒精進行脫色作用。將玻片斜置於染色架上，由上往下滴入酒精溶液，直到流出的酒精變成無色後，再用水沖洗（見下圖步驟③），於顯微鏡下仔細觀察並紀錄細胞之顏色（實驗結果 5-1）。
6. 加入複染劑番紅 3.6%之 Safranin，繼續作用 1 分鐘後，用水沖掉多餘之染料，以濾紙吸去玻片上之水分（見下圖步驟④），於顯微鏡下仔細觀察並紀錄細胞之顏色（實驗結果 5-1）。
7. 取玻片樣本 ①和 ②於顯微鏡下仔細觀察並紀錄於實驗結果 5-2。



**(5) 實驗結果： (請於答案卷中填寫答案)**

**5-1 記錄你用革蘭氏染色後所觀察到的結果。 (染色與觀察結果 8 分)**

染色步驟	顏色
初染	
媒染	
脫色	
複染	

**5-2 玻片樣本之觀察結果。(6 分)**

玻片樣本	顏色	革蘭氏 (陰性或陽性)	形狀 (找出可清楚呈現 的視野後，舉手請 評審老師來評分)
Ⓐ 枯草桿菌			
Ⓑ 大腸桿菌			

**5-3 觀察枯草桿菌與大腸桿菌的玻片，並根據 5-1 的結果，你對未知菌 ③ 做的鑑定為何？未知菌 ③ 是革蘭氏\_\_\_\_\_細菌。(2 分)**

**5-4 請解釋為何革蘭氏陽性或陰性菌會染出不同顏色?(6 分)**

**(二) 細菌的抗藥性分子鑑定 (本題不需做實驗操作)**

在醫學上，抗生素(antibiotics)的發現及使用得以控制細菌性疾病的威脅，但也因為廣泛的使用抗生素，細菌藉由突變或是由其他細菌得到抗藥基因，衍生出越來越多的抗藥性細菌。四環黴素(tetracycline)是一種廣效性的抗生素，它是青黴素(penicillin)外使用最多的處方抗生素，四環黴素的抑菌作用機轉在於抑制細菌的蛋白質合成；它能與細菌 30S 核糖體(ribosome)的 16S 核糖體核糖核酸(rRNA)結合，進一步抑制 aminoacyl 轉運核糖核酸(tRNA) 進入核糖體，以阻止或干擾細菌合成蛋白質。

傳統細菌的抗藥性鑑定方法需要不少人力與時間才能正確的鑑定。近年來以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction ; PCR) 方式複製 DNA 標的(target)，可以在短時間內偵測細菌體內是否有抗藥性之 DNA 存在，以提供更完

善的訊息予醫師來有效治療。*tetM* 基因是四環黴素抗藥基因(tetracycline resistance gene; *tet*)中最常被發現的代表性基因，其抗藥機制是以異位調控(allosteric)的方式，阻止四環黴素與核糖體結合，藉此保護細菌體內蛋白質合成的正常運轉。

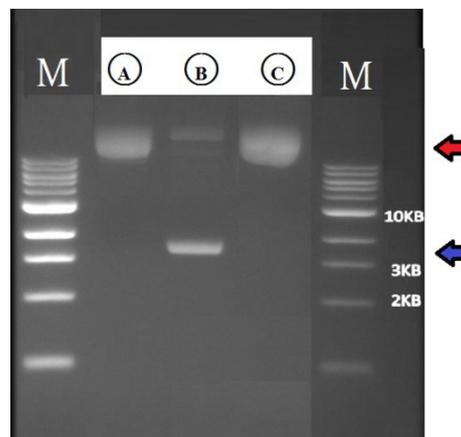
(1) 實驗目的: 用 PCR 來偵測細菌體內是否有攜帶 *tetM* 基因。

(2) 實驗原理與步驟:

- 2-1. 分離並純化 3 株細菌體內之 DNA，純化後的 DNA 以瓊脂糖膠體電泳法(agarose gel electrophoresis, 電泳) 確認 DNA 純度(實驗結果 3-1)，以作為 PCR 模板。
- 2-2. 以 PCR 進行 *tetM* 基因之增幅;將 DNA 加入 PCR 反應混合液中，再利用 PCR 溫度循環機進行 PCR 反應。
- 2-3. PCR 反應結束後，取出樣品進行電泳分析(實驗結果 3-2)

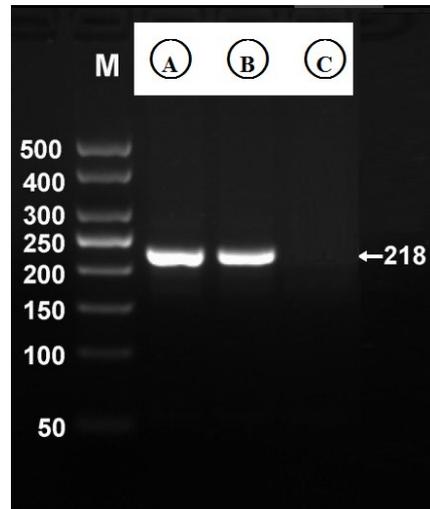
(3) 實驗結果:

- 3-1. 細菌體內 DNA (3 株各自編號為 ①, ②和 ③) 純化後以 0.8% 瓊脂糖膠體電泳分析的結果。紅色箭頭為: 染色體全部基因的 DNA (genomic DNA) 的大小; 藍色箭頭為: 質體 DNA (plasmid DNA) 的大小。M= Marker, DNA 在 0.8%膠體電泳上的標準大小。



競賽編號：

3-2. PCR 反應後以 2% 瓊脂糖膠體電泳進行 *tetM* 基因分析。箭頭為 PCR *tetM* 基因的產物大小 (218 bp, 218 個鹼基對長度); M= Marker, DNA 在 2% 膠體電泳上的標準大小。



(4) 實驗結果討論與分析： (請於答案卷中填寫答案)

4-1. PCR 的原理是利用 DNA 聚合反應 (DNA polymerization) 重複進行 DNA 的合成，請於下表說明 PCR 反應過程中必須有的三個程序的主要作用為何? (18 分)

PCR 程序		作用
1		
2		
3		

4-2. 三株細菌體內誰攜帶了 *tetM* 基因? \_\_\_\_\_ (2 分)

4-3. 請說明為何細菌株 ① 和細菌株 ② 體內之 DNA 不同但是 PCR 反應後結果相同? (4 分)

4-4. 請說明為何細菌株抗藥性基因可能之傳遞途徑? (4 分)

## 實驗 3

### 【植物養分運輸分析實驗】(共 50 分)

#### 一、實驗目的

由植物莖部維管束構造的觀察，了解植物養分運輸的途徑。

#### 二、實驗原理

植物莖的主要功能之一為養分運輸。其中水分與無機鹽類主要經由維管束的木質部(xylem)輸送，而有機養分，如醣類主要是經由韌皮部(phloem)運輸。欲了解植物養分運輸的途徑，最簡單的方法是讓植物吸收染劑，之後觀察染劑在維管束分布之位置與單位時間之運移，分析植物養分運輸之機轉。在此介紹兩種螢光染劑，trisodium 3-hydroxy-5, 8, 10-pyrene trisulfonate (PTS)為水溶性染劑，在非共質體(apoplastic)區域移動；另外，carboxyfluorescein diacetate (CFDA)染劑可穿過細胞膜，在共質體(symplastic)區域移動並產生螢光。

#### 三、實驗試劑與材料：

實驗器材	數量
光學顯微鏡	1 台
番茄植物幼苗	1 株
TBO 染劑	1 瓶
滴管	2 支
蓋、載玻片	1 組
雙面刀片(使用時請注意安全!! 請戴手套操作) 若不慎受傷請舉手，請試務人員進行護理	1 個
9 cm 培養皿	1 個

#### 四、實驗問題

1. 請橫切番茄幼苗莖部後，先以 TBO 染劑染色約 1 分鐘內，再用水退染後，製成玻片樣本，在光學顯微鏡視野下觀察維管束的構造，並於答案卷中描繪與標示出木質部與韌皮部的位置。(30 分)(完成切片後，找出一個可清楚呈現木質部與韌皮部的視野後，舉手請評審老師來評分)(老師審查 20 分，繪圖 10 分)

#### 【題組】

請推論下列第 2 與 3 題，假若將莖部用棉花包裹，再以熱開水處理棉花包裹處(下圖 A 處)，造成局部燙傷(下圖 B 處)。若分別將 PTS 與 CFDA 注射於下圖 C 處，經過一小時後，在局部燙傷處(下圖 D 處)之上方，將莖部切片(下圖 E 處)於螢光顯微鏡下觀察。閱讀完以上描述後，試推論問題 2.與 3.答案，並解釋可能之原因。

2. 若未經局部燙傷處理時，PTS 螢光會出現在維管束何處? CFDA 螢光會出現在維管束何處? 請解釋原因。(10 分)

3. 經局部燙傷處理後，PTS 螢光會出現在維管束何處? CFDA 螢光會出現在維管束何處? 請解釋原因。(10 分)

