

考生編號：_____ 分數：_____

二〇一一年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 A 試場

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。實驗完畢後，請將用過的器材清洗乾淨並放置整齊。

TASK1 實驗器材：

器 材 類		藥 品 及 材 料 類	
裝有展開液(醋酸:丁醇:水= 3:14:6)的 玻璃缸	1 個	濾紙 (Whatman#1 chromatography paper) 12 × 8 cm (長 × 寬) ，	1 張
裝有用 0.5% (W/V) Ninhydrin 的 酒精噴壺	一個	胺基酸標準樣品液：glycine、 phenylalanine、proline、aspartic acid、lysine	共 5 種
微量吸管與吸管頭		未知胺基酸混合液	1 種
試管架	1 座	直尺	
吹風機	1 台	膠台	

TASK2 實驗器材：

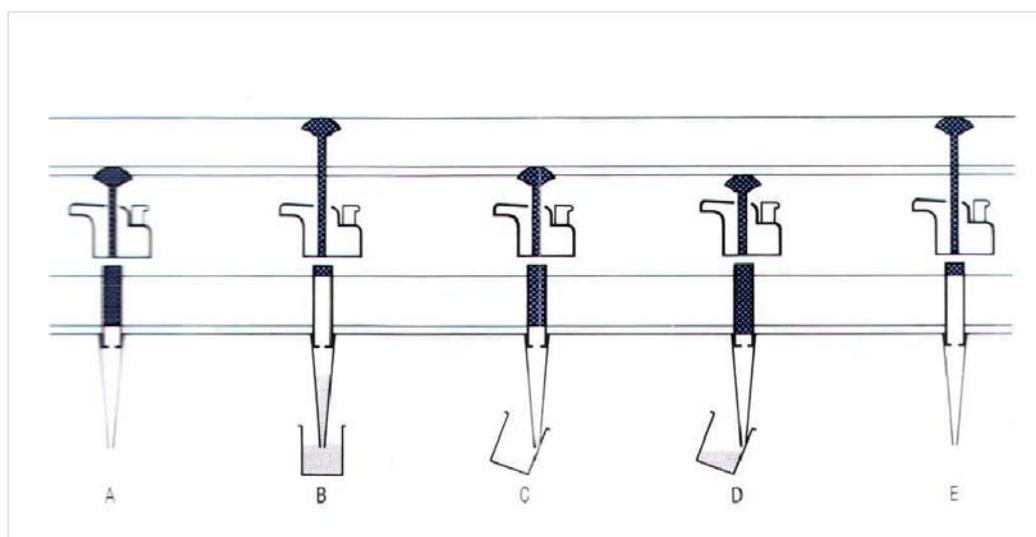
器 材 類		藥 品 及 材 料 類	
分光光度計	1 台	待測樣本液	6ml
測光管	2 支	歸零校正液	6ml
微量吸管與吸管頭			
試管架 (與 TASK 1 共用)	1 座		

※ 請注意：

1. 桌上的藥品及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷 (含封面、試題卷) 共 11 頁，於交卷時全部繳回。
3. 作答時間 80 分鐘，請於本卷上作答。試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。
4. 請核對本頁左上角「考生編號」是否和你的考號相同。

微量吸管基本使用方法

- 1) 選擇適當的微量吸管：不同型號的微量吸管，各有其吸取體積範圍，請依取用溶液體積取用適當的微量吸管。
- 2) 設定體積：設定體積時，由低旋轉至高值，須先超越所欲設定值至少三分之一轉後，再反轉至設定值；由高旋轉至低值，則直接轉至設定值即可。請勿將體積調整圈轉到超過最低或最高的使用範圍。
- 3) 套上微量吸管頭，吸取溶液：吸取溶液時，尖端請先套上微量吸管頭 (tip)，1000 μl 使用藍色微量吸管頭，20 μl 及 200 μl 使用黃色微量吸管頭。將按鈕壓至第一段，儘可能保持微量吸管垂直，將微量吸管頭尖端浸入溶液，再緩慢釋放按鈕 (圖1.2)。釋放按鈕不可太快，以免溶液衝入吸管柱內而腐蝕活塞。微量吸管頭尖端浸入溶液的程度隨吸取的體積及使用型號而定。
- 4) 釋放溶液：將微量吸管頭與容器壁接觸，慢慢壓下按鈕至第二段，停一兩秒再壓至第二段，把溶液完全壓出。



圖一、微量吸管的使用

A, 保持微量吸管垂直，將按鈕壓至第一段；B, 微量吸管頭尖端浸入溶液，緩慢釋放按鈕；C, 保持微量吸管垂直，將微量吸管頭與容器壁接觸，慢慢壓下按鈕至第一段；D, 壓至第二段把溶液完全釋放出；E, 釋放按鈕回原狀。

TASK ONE

原理說明

色層分析法 (chromatography) 主要原理為利用固定相 (stationary phase) 及移動相 (mobile phase) 在介質中運動速率不同而來進行物質分離。待分析物質加入後，會藉著移動相流經固定相，且由於不同的遷移速率而分離出各成分。

濾紙層色層分析法，移動相與固定相均為液體，移動相為有機溶劑，具適當極性，固定相為附著在多孔濾紙上的水。濾紙由纖維素 (cellulose) 及 β -D-glucose 的聚合物所製成的由於 glucose 具有 4 個 OH 基，對水的親和力較大。當濾紙侵入有機溶劑，會藉著毛細作用而沿濾紙上升、下降或擴散。在濾紙色層分析法中，濾紙吸收水分後會構成固定相，由展開液系統 (developing solvent system) 構成流動相。此時代分離務會在兩種相間產生不同比例的分配結果。當兩相平衡時，可以依分配係數 K 來表示。

$$K = \frac{C_s}{C_m} = \frac{\text{溶質在固定相中濃度}}{\text{溶質在移動相中濃度}}$$

濾紙的中心用微量滴管吸取待分離物滴在上面形成圓點，當圓點乾燥後便放進含有移動相飽和蒸氣之密閉容器內進行展開，展開時即能帶動圓點內的待測物質依據各自的分配係數停留在特定位置，當移動相爬升至預定部位便可拿出濾紙，待溶劑揮發後測出物質與移動相所行距離比即為 R_f 值。

$$R_f = \frac{\text{濾紙上物質移動距離}}{\text{濾紙上移動相移動距離}}$$

R_f 依物質特性不同而有變異。惟在相同條件下，同種物質其 R_f 值必定相同。

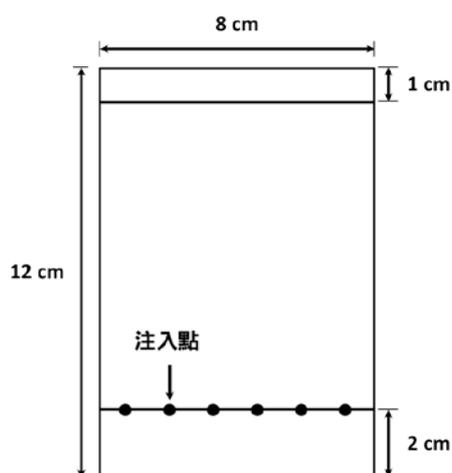
材料與方法：

1. 濾紙 (Whatman#1 chromatography paper) 12 × 8 cm (長 × 寬), 1 張。
2. 胺基酸標準樣品液：glycine、phenylalanine、proline、Alanine、lysine 共 5 種。
3. 待測樣品液：未知胺基酸混合液, 1 種。
4. 裝有展開液 (醋酸：丁醇：水= 3:14:6) 的玻璃缸, 1 個。
5. 裝有用 0.5% (W/V) Ninhydrin 的酒精液噴壺, 一個。
6. 微量吸管與吸管頭。
7. 試管架。
8. 吹風機。
9. 直尺。
10. 膠台。

實驗步驟：

(一) 樣品處理：點液 (Spotting)

1. 將已經做好記號的濾紙 (如下圖所示), 在右上角用鉛筆寫上組別。



2. 分別將 1 μ l 的胺基酸標準品液點在注入點 (原點) 上, 靜置風乾後, 可以再沾點下一次。
3. 使用過後的吸管頭必須保留, 以便下一步的操作。
4. 重複上述步驟一次。
5. 風乾 5 分鐘後備用。

(二) 展開與呈色

1. 在廣口玻璃瓶內事先置入約 200 ml 展開液蓋妥瓶蓋，讓瓶內的展開液的蒸氣達飽和。
2. 將濾紙固定在迴紋針上（如下圖所示），置入裝有展開液的玻璃缸中（注意不可以讓濾紙接觸到玻璃缸壁），液面必須達到注入點下端 0.5 cm 處。之後便可開始展開。



3. 迅速密合瓶口，以免展開液的蒸氣揮發流失。便開始進行展開。待溶劑升高至濾紙中段處後便可取出。
4. 放到化學抽風櫃中，等待乾燥，約 5 分鐘。
5. 將風乾完後的濾紙，至於試管架上。用噴壺將濾紙以 0.5% (W/V) Ninhydrin 的酒精液均勻噴灑。
6. 以吹風機熱風吹乾濾紙，直到濾紙完全乾燥。
7. 將完成後的結果以膠帶貼在答案紙上。

(三) R_f 值的計算和鑑定

1. 呈色後將各胺基酸的位置以鉛筆標示，並以尺量出距離原點（最初所畫的鉛筆橫線為起點）的距離。
2. 分別紀錄並計算各胺基酸標準品的 R_f 值，填於表一中。
3. 計算待測樣品液的胺基酸 R_f 值，判斷待測樣品液內所含有胺基酸種類。

實驗紀錄

(1) 實驗結果 (16 分)

(2) Rf 值計算 (24 分)

表一

樣品	移動的距離	Rf 值
溶劑		
Glycine		
Phenylalanine		
Proline		
Aspartic acid		
Lysine		
待測樣品液		

(3) 比對待測樣品液的 Rf 值，並推測待測樣品液中胺基酸的種類？

(10 分)

--

TASK TWO

原理說明

利用可見光及紫外光之燈管做為光源，通過濾光鏡調整色調後，經聚焦後通過單色光分光稜鏡，再經過狹縫選擇波長，使其成為單一且具特定波長之光線。當此光束通過樣品管內的樣本後，最後會射入光電管中。此時，光能會轉換為電子訊號。因此，藉由待測樣本及空白樣本間所吸收之光能量差，與標準液之能量吸收值進行比較，便可得知待測樣本中待測物的濃度。

使用分光光度計可以繪製物質吸收光譜曲線。方法是利用各種波長不同的單色光分別通過某一濃度的溶液，測定此溶液對每一種單色光的吸光值。以波長為 X 軸，吸光值為 Y 軸繪製『吸光值—波長曲線圖』，此曲線即吸收光譜曲線。各種物質有它自己一定的吸收光譜曲線，因此用吸收光譜曲線圖可以進行物質種類的鑒定。

材料與方法：

1. 分光光度計。
2. 測光管，2 支。
3. 待測樣本液。
4. 歸零校正液。
5. 微量吸管與吸管頭。
6. 試管架（與 TASK 1 共用）。

實驗步驟：

(一) 分光光度計使用說明



1. 先確定目前使用為 Transmittance 模式，如果不是請立刻舉手。
2. 利用波長調整鈕將波長 (wave length) 設定為 350 nm。
3. 轉動歸零調整鈕讓數值穩定在 0 %T。
4. 在測光管中加入 6 ml 的歸零校正液。
5. 將上述測光管插入測光管槽中。
6. 轉動歸零調整鈕讓數值穩定在 100 %T；此為透光滿點〔100% T，即100% transmittance〕，此時之吸光度 (absorbance, Abs 或吸光密度 optical density, OD) 為 0.0。
7. 按下模式調整鍵 (MODE)，讓模式轉為 "Absorbance"；此時之讀值應為 0.0。
8. 取出測光管。
9. 在測光管中加入 6 ml 的待測樣本液，並記錄其吸光度。
10. 轉動波長調整鈕調整波長，每次增加10 nm，重複空白校正及樣本測讀從波長 350 nm 到 550 nm 為止。
11. 將結果分別記錄於表二中，並參考原理說明繪製『吸光值—波長曲線圖』，並推測蛋白質最大吸光值。

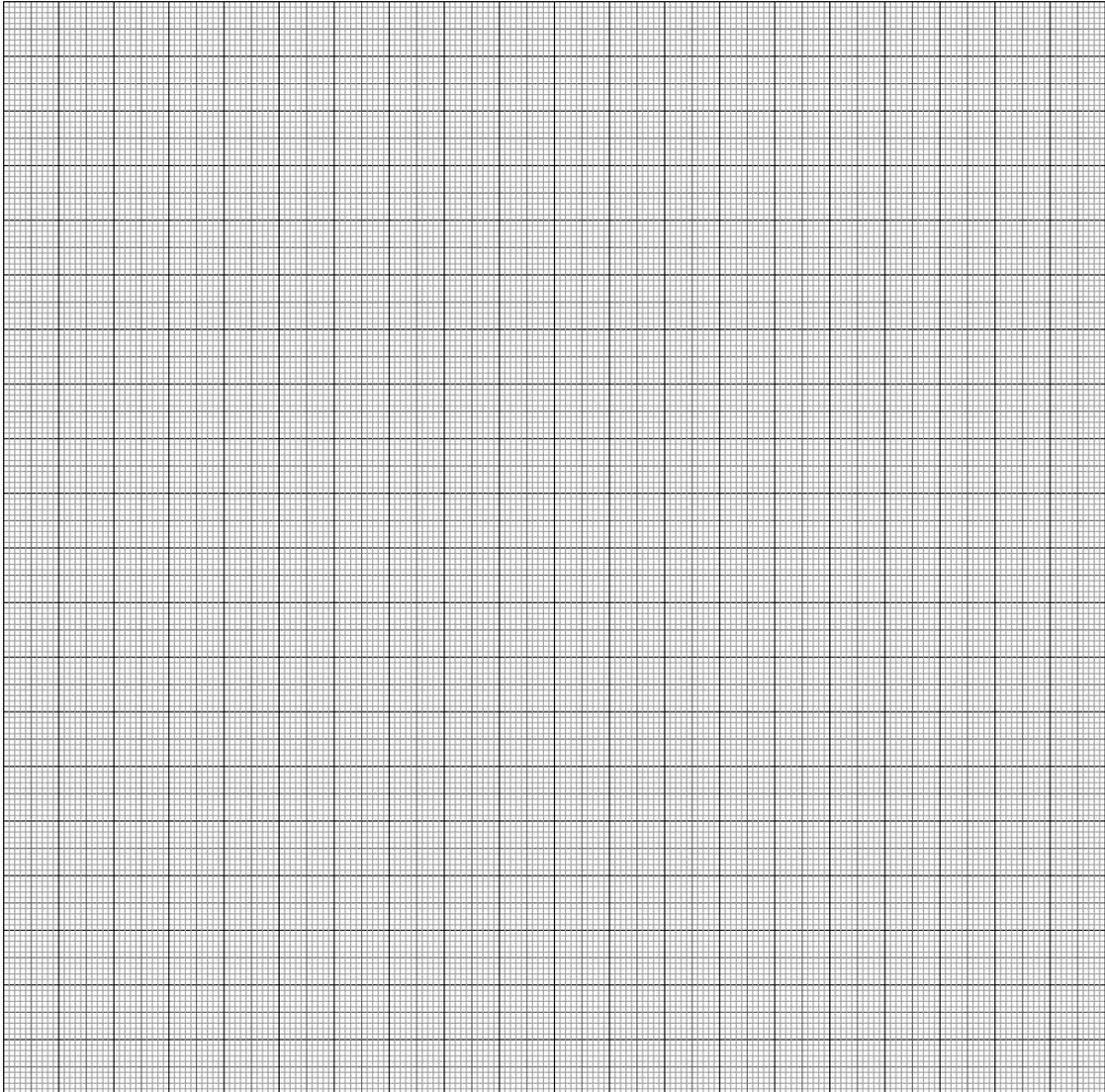
實驗紀錄

(1) 實驗結果 (33 分)

表二

波長 (nm)	吸光值	波長 (nm)	吸光值
350		460	
360		470	
370		480	
380		490	
390		500	
400		510	
410		520	
420		530	
430		540	
440		550	
450		560	

(2) 吸光值—波長曲線圖 (10 分)



(3) 蛋白質最大吸光值 (7 分)