

考生編號_____ 分數_____

二〇一二年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 D 試場 D1 考題

實作一：脯氨酸濃度測定

實驗材料與藥品

材料與藥品	數量
試劑 Ninhydrin Acetic acid Toluene	10 mL 10mL 40mL
綠豆抽取液(A)	1 管
綠豆抽取液(B)	1 管
脯氨酸(proline)標準液	各 1mL濃度分別為 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 (μg)
分光光度管	8 支
試管架	1 個
冰浴	1 個
3 ml吸管	12 支
分光光度機	1 台
加熱器(水浴槽)	公用

*請注意：

- 1.請確認考生編號是否與您的考號相同。
- 2.請確認桌上的材料及器材，材料用完後，將不再補充。
- 3.本試卷占 50 分，試卷（含封面、試題卷）共 5 頁，於交卷時全部繳回。
- 4.作答時間含 D1、D2 試題共 70 分鐘，請於本卷上作答。
- 5.試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。

脯氨酸濃度測定

分析綠豆遭受環境逆境下脯氨酸(Proline)濃度的變化

背景資料:

脯氨酸(Proline)為生物體內 20 種蛋白胺基酸中的一種，於 1954 年科學家發現黑麥草在枯萎過程中會累積大量的脯氨酸在植株中，從此以後很多文獻陸續報導植物再遭受多種環境逆境如:缺水、高鹽、高光照、重金屬、氧化逆境下均會造成相同的脯氨酸累積現象。近年來研究人員發現在一些耐乾旱的水稻植株品系，有較高脯氨酸含量，而同時一些研究發現如果將植物細胞處理逆境同時加入脯氨酸可大幅提升細胞存活率。

由於氣候變遷的影響，造成全球暖化，以致於農作物經常處於高濕、乾旱、缺水逆境，如何提升植物在逆境下的存活率，是研究人員相當感興趣的議題。因此脯氨酸在植物體內之生合成及分解調控機制是目前重要的研究主題。

實驗材料與藥品

材料與藥品	數量
試劑 Ninhydrin Acetic acid Toluene	10 mL 10mL 40mL
綠豆抽取液(A)	1 管
綠豆抽取液(B)	1 管
脯氨酸(proline)標準液	各 1mL濃度分別為 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 (μg)
分光光度管	8 支
試管架	1 個
冰浴	1 個
3 ml吸管	12 支
分光光度機	1 台
加熱器(水浴槽)	公用

附註: 在本問題開始前請注意你的材料是否完備，如果沒有，請舉手向監考人員提出需求。

實驗步驟：

1. 脯氨酸標準曲線製作:

分別將濃度為 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 (μg)/mL 的脯氨酸標準溶液各 1mL (1~6 管)。

2. 綠豆抽取液

綠豆抽取液之製備：(已完成)

(A)(B)綠豆分別培養 7 天並處理。

剪下(A)(B)綠豆之葉片後加入Sulfosalicylic acid研磨。

離心 5000 rpm 20 分鐘，取上清液即為綠豆抽取液 **(A)(B)**。

A管: 綠豆抽取液 1 mL。

B管: 綠豆抽取液 1 mL。

3. 脯氨酸標準溶液各 1mL (1~6 管)及綠豆抽取液之(A) (B)管，分別加入 1mL

Ninhydrin試劑混合均勻後，再加入 1mL Acetic acid 混合均勻。

4. 將於所有混合均勻之試管放入 100°C 水浴種反應 20 分鐘，後急速放入冰浴冷卻。

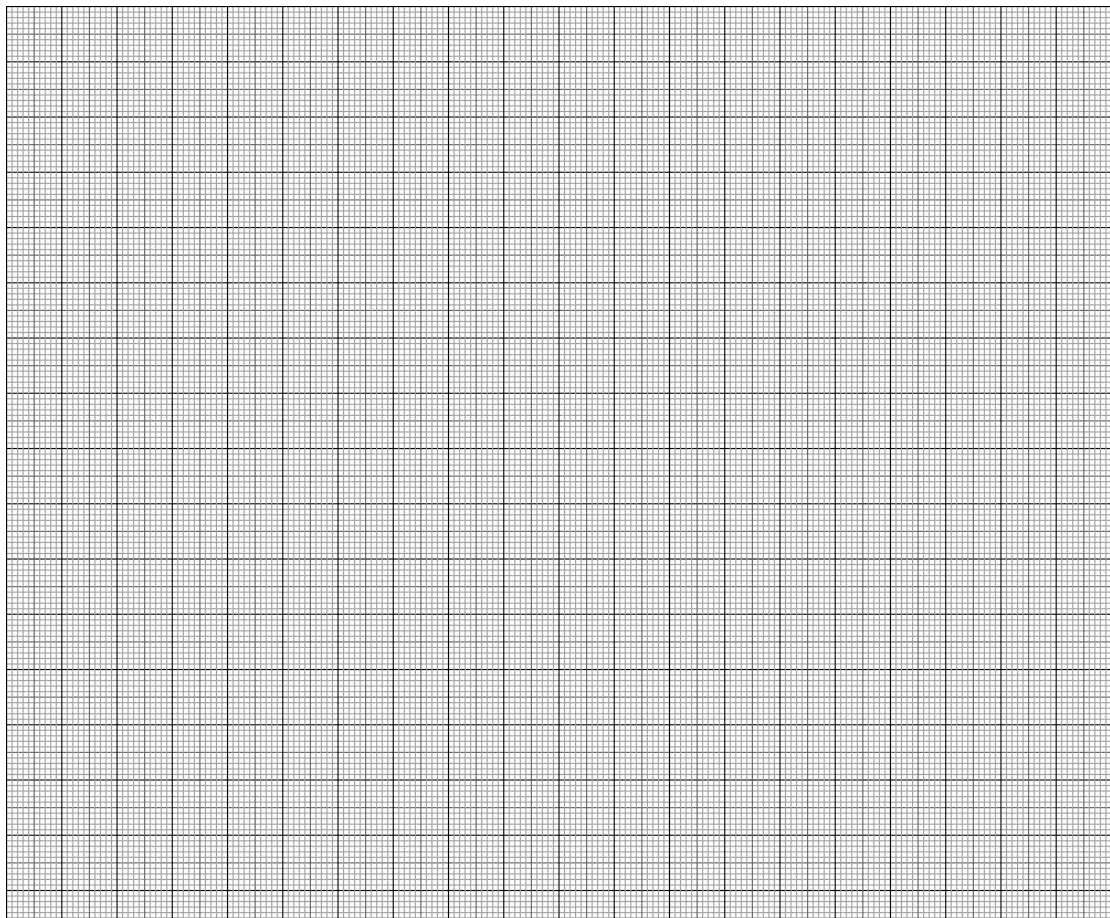
5. 各試管加入 4 mL Toluene (甲苯)快速混合 15 秒，靜置 5 分鐘吸取出 3 mL之甲苯層，用分光光度機測讀取 520nm的吸光值(A_{520})。

選拔營實驗題 (共 50 分)

1. 脯氨酸標準溶液的分光光度計讀數(吸光值) 此題 18 分。每格 3 分

脯氨酸標準溶液(單位： $\mu\text{g/mL}$)	吸光值
0	
2.5 μg 的脯氨酸標準溶液	
5 μg 的脯氨酸標準溶液	
10 μg 的脯氨酸標準溶液	
15 μg 的脯氨酸標準溶液	
20 μg 的脯氨酸標準溶液	

請將上述脯氨酸標準溶液之結果,以橫軸為脯氨酸($\mu\text{g/mL}$)，縱軸為分光光度計讀數(吸光值)，作圖之。(10 分)



2. 測量綠豆抽取液之(A)(B)管之脯氨酸濃度。此題 10 分。

a).分別紀錄二個綠豆抽取液之吸光值(2 分)

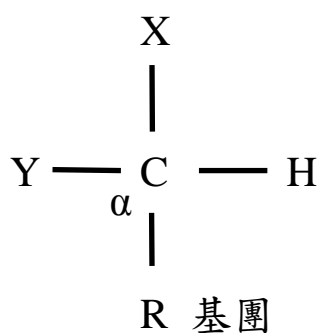
(1) (A)之綠豆抽取液 _____

(2) (B)之綠豆抽取液 _____

b).利用脯氨酸標準溶液，計算(A)(B)綠豆抽取液的脯氨酸濃度 ($\mu\text{g/mL}$) (4 分)

c).就你的實驗結果，(A)(B)綠豆抽取液的脯氨酸濃度是否有差異並說明理由?
(4 分)

3. 胺基酸之基本結構如下圖請只出 X 及 Y 為何種基(group) (3 分)?並劃出
Proline 之化學結構(5 分)。



4.植物在受到鹽害逆境後可藉由何種分子機制之作用造成 Proline 大量累積(請由
分子層次提出二個可能的解釋)。此題 6 分。

考生編號_____ 分數_____

二〇一二年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 D 試場、D2 考題

實作二：微生物實作

實驗材料與藥品

材料與藥品	數量
顯微鏡 (1000 X)	1 台
載玻片	5 片
油鏡油	1 mL
拭鏡紙	3 張
擦手紙	1 包
洗滌瓶	一個
廢液大燒杯	一個
細菌菌種 A、B、C、D、E	各 1 盤
蒸餾水	1 mL
接種環	1 支
酒精燈	1 台
結晶紫染劑	10 mL
3% H ₂ O ₂	10 mL
滴管	3 mL 2 支 (染劑與 H ₂ O ₂ 專用) 1 mL 1 支 (油鏡油專用)
油性筆	1 支

*請注意：

- 1.請確認考生編號是否與您的考號相同。
- 2.請確認桌上的材料及器材，材料用完後，將不再補充。
- 3.本試卷占 50 分，試卷 (含封面、試題卷) 共 5 頁，於交卷時全部繳回。
- 4.作答時間含 D1、D2 試題共 70 分鐘，請於本卷上作答。
- 5.試題答案可寫至題目背面，但請註明並標上題號。

細菌的鑑種除了利用分子生物技術以外，通常還可以依細胞形態、細胞構造、染色反應、以及一些生化酵素反應來加以判定。本實驗提供了五種細菌（A、B、C、D、E），請分別進行以下幾種測試，將反應結果填入附表中，然後依據所附的檢索圖加以判定各菌種的名稱。本實驗操作佔 15 分（由監考老師現場觀察評分），填答附表與菌種鑑定佔 35 分。

1. 細胞形態觀察：可以利用顯微鏡觀察簡單染色後的細菌抹片（1,000X 油鏡觀察），判定細胞的形態為桿菌、球菌、或是螺旋菌。

細菌抹片標本製作：(1) 以接種環取一環蒸餾水置於載玻片上；(2) 用酒精燈加熱接種環線圈，直至紅熱為止；(3) 接種環冷卻後，用接種環勾取少許細菌塗抹在玻片上，抹片面積約五元硬幣大小；(4) 重新加熱接種環線圈滅菌後放在桌上；(5) 將抹片放在室溫中乾燥；(5) 在酒精燈上稍稍加熱乾燥後的抹片玻片背面約 1-2 秒（勿過熱以免細菌燒焦），冷卻後即完成抹片的製備。

簡單染色步驟：(1) 滴一滴結晶紫染劑到抹片上染色約 30 秒；(2) 用洗滌瓶沖去多餘的染劑至廢液大燒杯中；(3) 用擦手紙輕壓吸乾水分；(4) 放在室溫中自然乾燥後即完成簡單染色。

油鏡操作步驟：(1) 直接滴一滴油鏡油在染好的細菌抹片標本正中央（不需要放蓋玻片）；(2) 將 100X 接物鏡直接浸入油中（小心緩慢操作，避免接物鏡撞擊到載玻片）；(3) 緩緩轉動細調節輪對焦，直到影像清晰出現。

2. 細胞內孢子（endospore）觀察：可以利用顯微鏡觀察簡單染色後的細菌抹片（1,000X 油鏡觀察）判定細菌是否具有內孢子的構造。內孢子由於不易被染料染上顏色，因此通常會在被染色的細胞內呈現出透明的圓形或橢圓形區域。
3. 觸酶（catalase）反應：一般好氧性細菌（aerobes）以及兼性厭氧細菌（facultative anaerobes）具有觸酶，可以將呼吸代謝之副產物 H_2O_2 加以分解成為 H_2O 和 O_2 ，而絕對厭氧菌則因為缺乏觸酶而無法分解 H_2O_2 。請將本實驗提供之雙氧水（3% H_2O_2 ）滴到細菌菌落上，觀察是否有氣泡（ O_2 ）產生，來加以判定該菌是否具有觸酶活性。

附表

	A	B	C	D	E
細胞形態（球菌、桿菌、螺旋菌）					
內孢子（有、無）					
觸酶反應（+、-）					
菌種鑑定名稱					

檢索圖

