

考生編號_____分數_____

2016 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 2 試場 實作 B

生物化學

※ 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。

實驗器材與試劑：

器材	數量	試劑與實驗材料	數量
微量分注器 (P20, P200, P1000)	各 1 支	綠色螢光蛋白 GFP (1 mg/mL) (置於冰上)	8 μ L
微量吸管尖 20~200 μ L	20 支	PBS	2 mL
微量吸管尖 1000 μ L	15 支	PBST (0.1% Tween-20)	30 mL
96 孔微量盤	1 個	Gelatin-PBST (明膠-PBST) (置於冰上)	2 mL
1.5 mL 微量離心管	20 支	抗 GFP 之抗體 (已連接山葵過氧化氫酶 HRP) 稀釋倍率為 1:1000 (置於冰上)	200 μ L
2 mL 微量離心管	2 支	TMB-A 呈色劑	1 mL
微量離心管架	1 個	TMB-B 呈色劑	1 mL
計時器	2 個	6 N HCl	2 mL
小型桌上型微量離心機	公用	Unknown #1 (置於冰上)	220 μ L
簽字筆	1 支	Unknown #2 (已事先與 8 M 尿素於室溫反應 10 分鐘) (置於冰上)	220 μ L
A4 紙張	1 張	Unknown #3 (已事先與 5% SDS 於室溫反應 10 分鐘) (置於冰上)	220 μ L
廢液杯	1 個		

※ 請注意：

1. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷(含封面、試題卷)共 4 頁，於交卷時全部繳回。
3. 本試場合實作 A 及實作 B，作答時間共為 80 分鐘
4. 請於本卷上作答。試題答案可寫在試卷背面，但請註明並標上題號。

一、實驗主題： 酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是利用抗體能專一性辨認及結合上特定抗原的特性，再配合酵素呈色反應，來對樣本進行檢測的分析方法，實驗原理與西方墨點分析法相似。ELISA 是一個已經被廣泛使用的生化檢測技術，並可利用呈色之深淺來進行特定抗原或抗體的定量分析。

二、實驗操作：(10分)

1. 以PBS稀釋抗原GFP蛋白質濃度至2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，共配製1.8 mL。
2. 請在96孔盤槽中加入100 μL 稀釋後的GFP溶液，於室溫反應10 min。
3. 由於實驗需要進行雙重複，所以共需於16個反應槽中加入100 μL 稀釋後的GFP溶液。
4. 反應後吸去GFP抗原，並加入0.2 mL的PBST清洗並且立即吸去溶液（此清洗步驟需重複3次）。
5. 吸去PBST，每槽加入200 μL 的Gelatin-PBST，於室溫反應10 min。
6. 吸去Gelatin-PBST，再加入0.2 mL的PBST清洗後立即吸去溶液。
7. 抗體以Gelatin-PBST稀釋至指定濃度【如表一所示】。
8. 按照表一於反應槽中加入100 μL 的Gelatin-PBST或不同稀釋濃度的抗體，以及未知稀釋濃度的抗體溶液 (Unknown #1~3)，於室溫反應20 min。請進行雙重複！
9. 取TMB-A液及TMB-B液各1 mL充分混合，並在室溫下靜止反應15 min。
10. 反應後吸去抗體等溶液，以0.2 mL的PBST清洗3次，每次清洗時，加入PBST後應靜置2 min再吸去溶液（溶液必須徹底吸除乾淨），以避免呈色後背景值偏高造成實驗誤差。
11. 每槽加入100 μL TMB呈色基質液，室溫下反應3分鐘。
12. 時間到時，請迅速於反應槽中加入100 μL 的6 N HCl終止反應，反應液顏色將會從藍色轉為黃色。
13. 注意！加呈色劑時請避免產生氣泡，因為氣泡會影響分光光度計之讀值的準確性。
14. 請由助教協助讀取450 nm的吸光值。
15. 請將讀值填入【表一】中，並將平均吸光值於【圖一】中畫出回歸曲線。
16. 實驗完成後請將96孔盤放置於實驗桌上，三支微量分注器P20、P200與P1000分別轉至20 μL 、200 μL 及1 mL之刻度處，並整理實驗桌面。

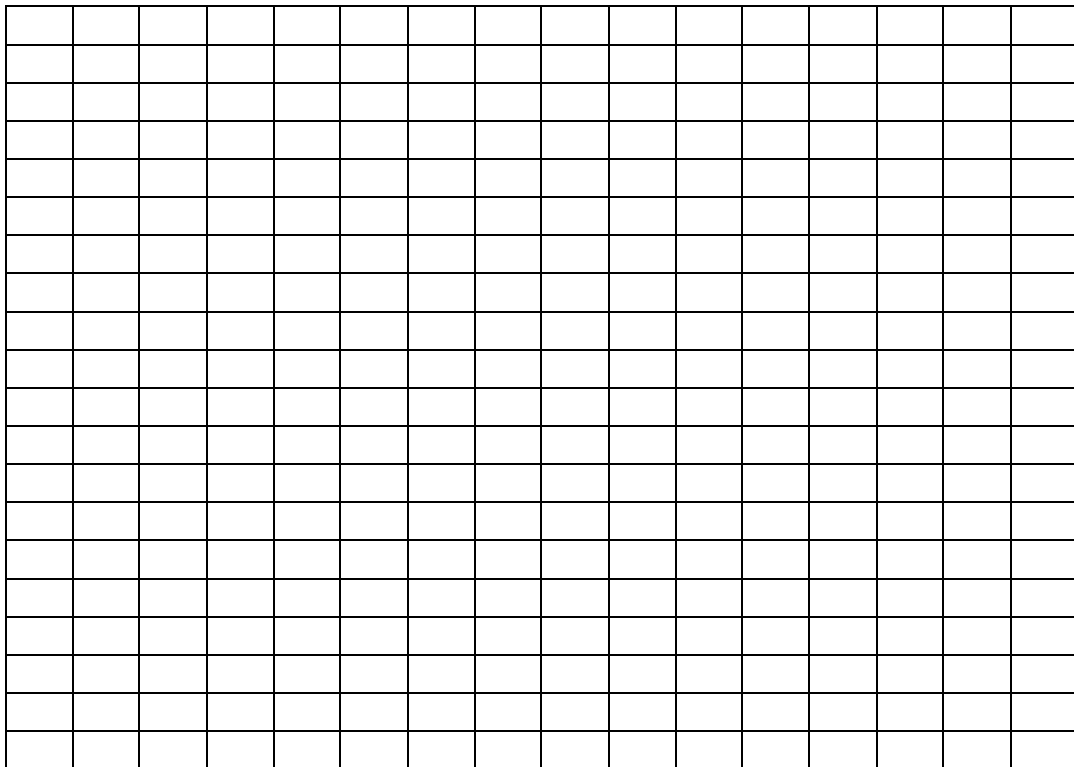
三、實驗結果：

1. 將450 nm的吸光值填入【表一】中並作圖。(8分)

【表一】抗體稀釋濃度與ELISA呈色吸光值

	抗體稀釋濃度	實驗 1	實驗 2	平均值
A	Gelatin-PBST			
B	1:16,000			
C	1:8,000			
D	1:4,000			
E	1:2,000			
F	Unknown #1			
G	Unknown #2			
H	Unknown #3			

2. 抗體濃度與吸光值之回歸曲線【圖一】。(請自行設定XY軸的刻度)(8分)



四、問題回答：

1. 抗體稀釋濃度與吸光值作圖後之迴歸線為直線或曲線? (2分)
2. 請估計若吸光值為1時的抗體稀釋濃度約為多少? (2分)
3. 未知抗體Unknown #1之稀釋濃度為何? (4分)
4. 未知抗體Unknown #2與Unknown #3並未測得吸光值，請推測其原因為何? (4分)
5. 本實驗中，Gelatin-PBST (明膠-PBST) 的功用為何? 附註:明膠是一種從動物的骨頭或結締組織提煉出來，帶淺黃色透明，無味的膠質，主要成分為蛋白質。(4分)
6. 本實驗中，山葵過氧化氫酶HRP的功用為何? (4分)
7. ELISA 酵素連結免疫吸附分析法是一個靈敏度極高的生化分析方法。本實驗所使用之 GFP 抗體原液的濃度為 0.2 mg/mL，請計算出當抗體稀釋 1:16,000 時，GFP 抗原用量與抗體用量約相差幾倍? (4分)

2016 年第 27 屆國際生物奧林匹亞國手選拔營

第 2 試場 實作 A 微生物學

說明：細菌菌種的鑑定可藉由染色反應、細胞形態、以及一些生化反應的差異來加以判定。現有五種細菌菌種，分別標示為菌種 A、B、C、D、E。請先將之分別進行革蘭氏染色，用顯微鏡觀察其革蘭氏染色反應與細胞形態；然後觀察觸酶(catalase)反應以及氧化酶(oxidase)反應。填答下列表格，並利用下列檢索表來判定各個菌種的學名。

實驗器材與試劑：

試劑與實驗材料	數量	器材	數量
五株細菌：分別標示為 A、B、C、D、E	1 皿	計時器	1 個
結晶紫染劑 (crystal violet)	1 管	載玻片	5 片
革蘭氏碘液 (Gram's iodine)	1 管	接種環	1 支
95% 乙醇 (95 % ethyl alcohol)	1 管	酒精燈	1 台
番紅染劑 (safranin)	1 管	塑膠手套	1 雙
觸酶反應試劑 (3% H ₂ O ₂) (置於冰上)	1 管	夾子	1 支
氧化酶反應試劑 (1% TMPD) (置於冰上)	1 管	拭鏡紙	3 張
顯微鏡油鏡油 (immersion oil)	1 管	顯微鏡	1 台
無菌蒸餾水	1 瓶	吸水紙(用培養皿裝)	1 份
		塑膠滴管	1 支
		油鏡油滴管	1 支
		打火機	1 個
		廢液杯	1 個
		吸水紙	5 張
		洗滌瓶	1 瓶
		氧化酶反應試劑滴管	1 支
		口罩	1 個
		培養皿	1 個

※ 請注意：

1. 桌上的材料及器材用完後，將不再補充。
2. 本試卷(含封面、試題卷)共 4 頁，於交卷時全部繳回。
3. 本試卷含實作 A 及實作 B，作答時間共為 80 分鐘
4. 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。

實驗方法：

1. 革蘭氏染色：請依據個人經驗與所學自行染色，或參考桌面上提供之染色步驟。
2. 觸酶反應：請於培養皿內操作，用接種環從培養基上取下少量細菌，滴上一滴 3% H_2O_2 ，觀察有無氣泡產生。若細菌具有觸酶，則會將 H_2O_2 分解，產生 O_2 氣泡，此即陽性反應；若無觸酶，則無法產生氣泡，此即陰性反應。
3. 氧化酶反應：取已放好吸水紙的培養皿，在吸水紙中央滴上一滴 1% TMPD (N,N,N',N' tetramethyl-phenylene-diamine) 反應試劑，然後用接種環從培養基上取下少量細菌，塗抹到濕潤的吸水紙上。若菌種在 10 秒內變成藍色，此即氧化酶陽性反應；若菌種無法在 10 秒內變成藍色，則為陰性反應。此反應之原理為氧化酶可將原本無色（或輕微淡藍色）的 TMPD 氧化成深藍色反應物。。

提示 1：進行革蘭氏染色時，可在同一片載玻片上分別塗抹 2-3 個細菌的抹片標本，同步進行染色，可以節省許多時間。

提示 2：細菌的內孢子非常不易被染料染上顏色，細菌細胞經革蘭氏染色之後，用顯微鏡觀察時，細胞營養體部分會顯示正常的一般革蘭氏反應顏色，但在內孢子之區域，則因染料無法進入，而出現澄清透明的圓形或橢圓形區域（此即內孢子）。

提示 3：使用顯微鏡時，請先滴油鏡油，物鏡請轉至最高倍率(100 倍)觀察。

細菌菌種 A、B、C、D、E

本實驗菌種判定檢索表

1. 革蘭氏染色
 - 甲、 陽性 → 請接續 2
 - 乙、 陰性 → 請跳到 5
2. 細胞形狀
 - 甲、 桿菌 → 請接續 3
 - 乙、 球菌 → 請跳到 4
3. 內孢子有無
 - 甲、 具有內孢子 → *Bacillus cereus*
 - 乙、 無內孢子 → *Lactobacillus casei*
4. 觸酶 (catalase) 反應
 - 甲、 陽性 → *Staphylococcus aureus*
 - 乙、 陰性 → *Streptococcus thermophilus*
5. 細胞形態
 - 甲、 桿菌 → 請接續 6
 - 乙、 球菌 → *Neisseria mucosa*
6. 氧化酶 (oxidase) 反應
 - 甲、 陽性 → *Pseudomonas aeruginosa*
 - 乙、 陰性 → *Escherichia coli*

填答下列空格 (陽性：+, 陰性：-) (共 40 分)

菌種	革蘭氏反應 (每格 1 分)	觸酶反應 (每格 1 分)	氧化酶反應 (每格 1 分)	菌種鑑定名稱 (每一菌種答對 5 分)
A				
B				
C				
D				
E				

參考資料 – 革蘭氏染色步驟

一、細菌抹片製作

- 1、塗抹：以滴管吸取無菌水滴 1 滴於載玻片上，用接種環從固體培養基取少量之菌落與無菌水均勻混合並塗抹展開約 5 元硬幣大面積
- 2、乾燥：在室溫下讓此抹片自然乾燥

(提示：進行革蘭氏染色時，可在同一片載玻片上分別塗抹 2-3 個細菌的抹片標本，同步進行染色，可以節省許多時間。)

二、抹片加熱固定：

將抹片迅速通過火焰 4 次，然後於室溫下使其自然冷卻

三、革蘭氏染色步驟：

1. 將前述抹片覆以結晶紫，靜置一分鐘
2. 以洗滌瓶沖洗，沖洗後倒入廢液杯中
3. 覆以革蘭氏碘液，靜置一分鐘
4. 以洗滌瓶沖洗，沖洗後倒置廢液桶
5. 斜拿玻片(約 45 度角度)，逐滴滴下 95% 乙醇，至結晶紫不再自抹片中釋出為度，勿過度脫色
6. 以洗滌瓶沖洗，沖洗後倒入廢液杯中
7. 覆以番紅染劑，靜置一分鐘
8. 以洗滌瓶沖洗，沖洗後倒入廢液杯中
9. 以吸水紙吸乾，或靜置使抹片完全乾燥為止，即可開始用油鏡觀察
10. 使用顯微鏡時，請先滴油鏡油，物鏡轉至最高倍率(100 倍)觀察。