

考生編號_____

分數_____

2024 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 3 試場實作

生物化學實驗

※ 實驗所需器材及藥品已擺放在桌上，請依照下列清單進行清點。若有缺少，請舉手通知評審。實驗結束後，請清洗並整理使用過的器材。另外，實驗過程中將使用濃硫酸及苯酚溶液，這些物質對皮膚具有腐蝕性及刺激作用，請務必戴上防護手套、防護眼鏡及口罩。液體吸取過程請小心，安全操作也將列為評分標準。

※ 請注意，操作時間有限，請善用等待實驗進行的時間。

實驗器材與試劑：

器材	數量	試驗與實驗材料	數量
微量分注器 P20	1 支	葡萄糖溶液 (1 mg/mL)	1 mL
微量分注器 P200	1 支	矽藻樣品 A	1 mL
微量分注器 P1000	1 支	矽藻樣品 B	1 mL
微量吸管尖 20~200 μL	1 盒	苯酚溶液 (8% w/v)	200 μL
微量吸管尖 100~1000 μL	1 盒	濃硫酸(標示：S)	8 管(各 200 μL)
震盪混合機	1 台	1.5 mL 微量離心管	14 管
計時器	1 個	96 孔微量偵測盤	1 盤
碎冰桶	1 個	去離子水	1 管(5 mL)
1.5 毫升離心管架	1 個	Elisa reader	共用
防爆夾	10 個	高速離心機	共用
廢液杯	1 個	乾浴槽	共用
尺	1 支		
奇異筆	1 支		

※ 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)共 8 頁，於交卷時全部繳回。
3. 作答時間共為 90 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：

醣類又稱為碳水化合物，是生物體細胞組織的重要組成成分之一。與蛋白質跟核酸一樣，醣類可以從小分子的單體（單醣）鏈結形成大分子的聚合物（多醣）。在醣類所扮演的各種功能之中，最廣為人知的就是葡萄糖作為細胞內最重要的營養物質。葡萄糖在細胞內可以聚合成澱粉或是肝醣，在需要時可以被快速地代謝，提供細胞活動所需的化學能。然而醣類聚合物除了作為能量物質之外，也可以形成堅韌的結構，提供生物體保護，例如構成植物細胞壁的纖維素，以及形成節肢動物外骨骼的甲殼素等等。即便是單細胞生物如細菌與微藻類，也會分泌胞外多醣，這些多醣類會形成具有黏性的薄膜，幫助微生物附著以及提供保護。

在海洋中的微藻類與細菌彼此之間具有一定的生態依存性。微藻可進行光合作用提供有機能量物質，而細菌則可以幫助固氮作用以及合成一些微藻所需的維生素等物質。然而在茫茫大海之中，要找到能互利共生的夥伴並不是一件容易的事，因此許多微藻都會製造出具有黏性的特殊多醣類，在海浪的推波助瀾之下，將偶然相遇的微生物「黏」在一起，形成一個個凝絮的小團。在這種「生物絮團」中，就好像是一個微生物之間的小生態系統，它們彼此共生並逐漸擴張，最終可能成為海洋生物的食物，或是沉降到深海，構成地球生態系統的「碳幫浦」，最終把大氣中多餘的碳封存到深海中。

最新的研究顯示，海洋中的「矽藻」會分泌一種特殊的硫酸化岩藻多醣 (fucose-containing sulphated polysaccharide, FCSP)，這種多醣的黏性很高，而且不容易被海中微生物分解。根據科學家的調查發現，每當海洋某區域的矽藻大爆發（藻華），就會伴隨著大量的生物絮團形成，因而豐富了海洋的生態系統。

在本實驗中，我們將使用硫酸-苯酚法 (phenol-sulfuric acid) 來量測樣品中矽藻所分泌的硫酸化岩藻多醣。此實驗的原理是醣類分子碰到濃硫酸時會進行脫水反應而形成呋喃醣環結構 (furfural)，此時再碰到酚 (phenol) 之後，兩者會形成黃褐色的反應產物（圖 1）。當樣品中的醣類越多時，反應產生的顏色也會越深，因此可以用這個測量方式來推導出樣品中的醣類含量。

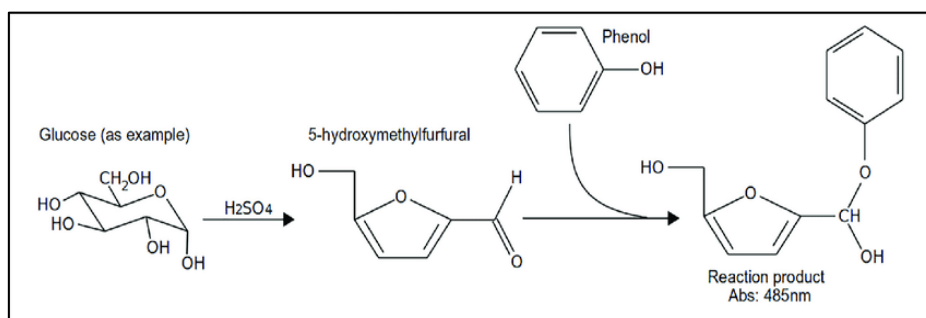


圖 1：硫酸-酚法 (phenol-sulfuric acid) 來量測樣品中的醣類原理。

今天的實驗，你將拿到兩管在同一天開始培養的矽藻樣品。兩者的差別僅在於其中一管是採用靜置的方式培養，而另一管則是使用轉盤培養，以模擬矽藻受到海浪拍打之下的狀態。我們將量測這兩個樣品中的硫酸化岩藻多醣含量。請仔細依照下列的指示進行實驗操作，特別注意濃硫酸與苯酚都具有腐蝕性，請全程戴好防護眼鏡、穿好實驗衣、戴好手套、小心吸取液體並且確實蓋好反應管。安全操作也是評分標準之一，請特別小心操作！

二、實驗操作 (共 20 分)

2-1 樣品前處理

1. 取出矽藻樣品 A 與矽藻樣品 B，仔細觀察外觀。可輕微搖晃，觀察兩個樣品藻類沉降是否有差異。在下方表格填入你的觀察結果。(10 分)

	樣品 A	樣品 B
請描述你觀察到的樣品外觀		

2. 將兩個樣品標示好你的考號，到助教處進行高速離心 5 分鐘。
3. 從助教處取回樣品，將上清液取出，移至兩個新的微量離心管中備用。

2-2 準備醣類標準品溶液

1. 我們將以已知濃度的葡萄糖溶液作為標準品來配製檢量線。已知所附之葡萄糖標準溶液濃度為 1 mg/mL。我們將需要配置 6 管葡萄糖濃度分別為 0、0.025、0.05、0.1、0.2 以及 0.4 mg/mL (編號如下表所示)，每一管至少 0.5 mL。

標準品編號	1	2	3	4	5	6
目標濃度 mg/mL	0	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4
葡萄糖液						
水						
總體積	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

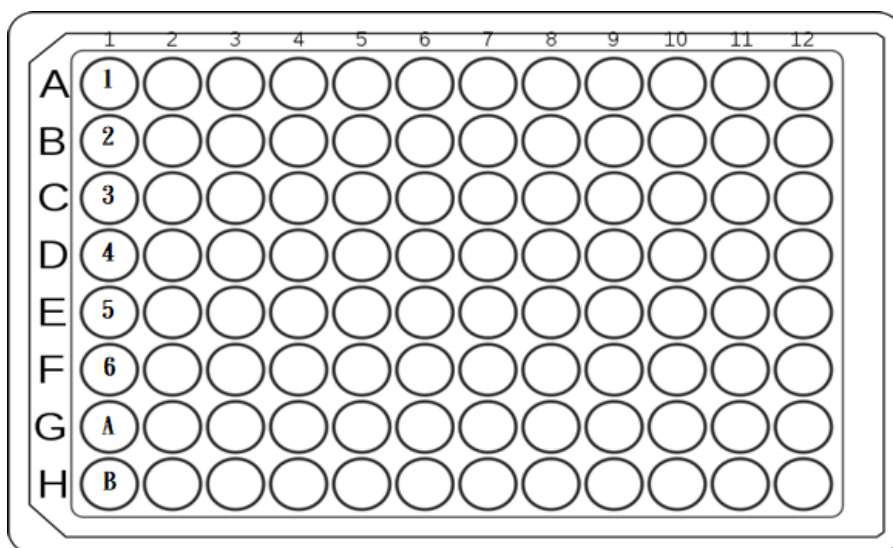
請在下方說明你用怎樣的方法配置這些標準品？(10分)

2-3 以硫酸-酚法測定醣類濃度

※吸取濃硫酸、苯酚時請小心，危險操作會被扣分。

- 將分裝好的 8 管濃硫酸從冰浴取出，標上考號-1、考號-2、考號-3、考號-4、考號-5、考號-6、考號-A 及考號-B 並置於 1.5 毫升離心管架上。
- 將 6 個葡萄糖標準品以及 2 個待測樣品-矽藻樣品 A 與矽藻樣品 B(共 8 組)，每個樣品取 130 μ L(矽藻樣品請取上清液測定)，分別加入濃硫酸溶液中。
- 然後再依序加入 20 μ L 的 8% 苯酚並套上防爆夾。震盪混勻(約 3 秒)後將所有樣品置於 90°C 的乾浴槽中加熱 5 分鐘。每 2 分鐘上下翻轉數次，以確保樣品受熱均勻。

4. 完成反應後，將樣品置於冰上 3 分鐘冷卻。然後，每個樣品取 200 μL ，依照下表的順序加入 96 孔微量偵測盤。交由助教使用分光光度計在 490 nm 波長下測量各樣品的吸光值(反應完成要測吸光值時，請舉手助教會來協助)。



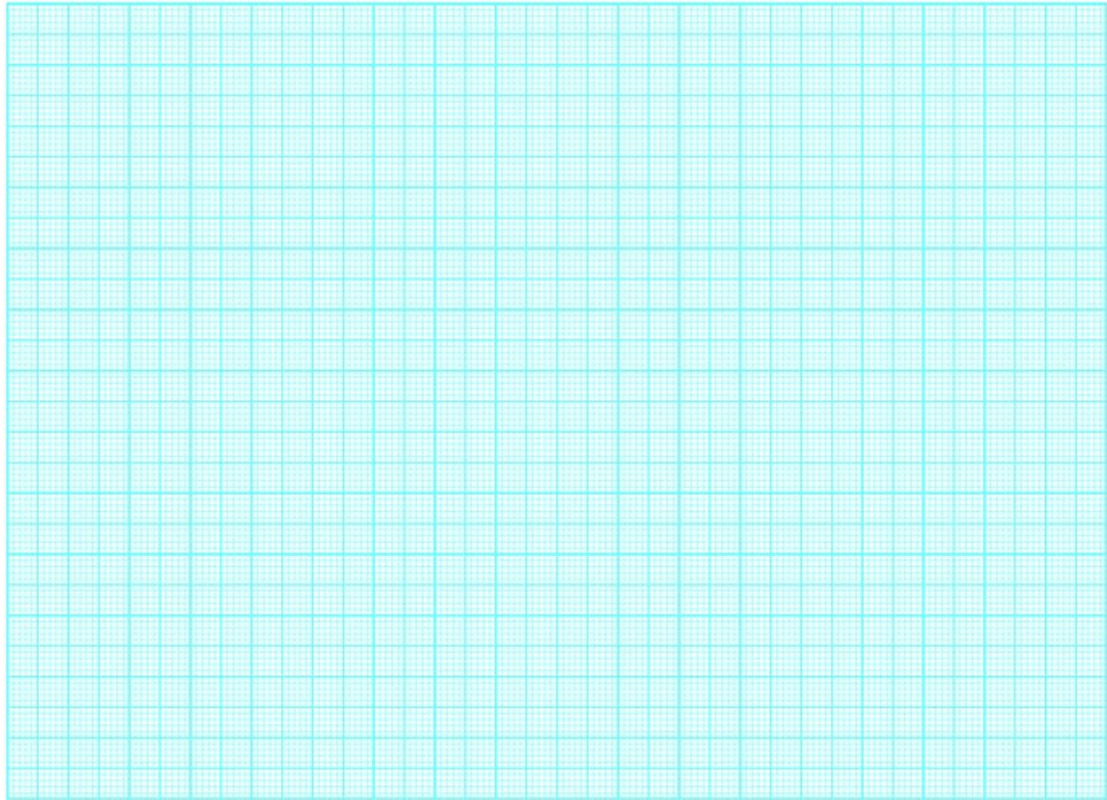
三、實驗結果 (共 40 分)

1. 將各組樣品吸光值填入下表。(16 分)

※助教給的讀值結果將作為評分標準之一，將與考卷一同收回。

	標準品 1	標準品 2	標準品 3	標準品 4	標準品 5	標準品 6	矽藻樣品 A	矽藻樣品 B
吸光值								

2. 以吸光值為 Y 軸、糖類濃度為 X 軸，將標準品的數值標定在方格紙上。畫出此反應的檢量線，並以此估算兩個矽藻樣品 A 及 B 中的多醣濃度。標準品數據請用實心圓表示，樣品 A、B 請用空心方塊，並在旁邊標示。(24 分)



樣品 A 濃度：

樣品 B 濃度：

四、問題討論 (共 40 分)

1. 請問樣品 A 與 B，哪一個是模擬海浪拍擊下培養的矽藻樣品？你的推論依據是什麼？(10 分)
2. 樣品 A 與 B 的藻類是在同一天開始培養的，培養基的成分也完全相同。為什麼其中一個樣品的可溶性多醣類含量明顯較少，請給出你的解釋！(10 分)
3. 本實驗中的標準品是使用已知濃度的葡萄糖，這是一種單醣。你認為這裡使用的硫酸-苯酚反應有辦法用來偵測矽藻分泌的硫酸化岩藻多醣嗎？如果可以，你認為是什麼原因讓這個方法可以偵測多醣的含量？(10 分)

4. 如果矽藻的培養液中同時存在單醣與多醣，而我們想要分別知道培養液中的單醣與多醣的含量各是多少？請設計一個可以達到這個目的的實驗操作流程！(10 分)