

2009 年第廿屆國際生物奧林匹亞競賽

--實驗試題(1)

中華民國生物奧林匹亞競賽代表團

實驗一：動植物解剖

總分：100 分

總操作時間：90 分鐘

第一部分動物解剖（50 分）

【材料與器材】

- 瓶中裝有兩隻已經麻醉的蠶蛾幼蟲
- 瓶中裝有一隻未麻醉的蠶蛾幼蟲
- 解剖盤 1 個
- 鑷子 2 隻
- 剪刀 1 把
- 拋棄式滴管 1 支
- 有柄的解剖針 2 支
- 解剖用之固定針 20 支
- 具有光源的解剖顯微鏡 1 台
- 有色鉛筆一組：1 枝 “O”(橘色)，1 枝 “B”(藍色)和 1 枝 “G”(綠色)
- 一張已經解剖過的蠶蛾幼蟲照片(信封袋內)
- 一個存放棄置幼蟲的培養皿

【簡介】

雖然有些昆蟲的發育須經過完全變態的過程，但昆蟲的成體和幼體之間，身體的構造基本上是相通的，先仔細觀察一隻未麻醉的蠶蛾幼蟲，再觀察已經麻醉並

解剖的蠶蛾幼蟲後，請回答下列問題。當你解剖這些幼蟲時，請先在解剖盤中加水後再進行。解剖過程中請使用鑷子、剪刀、解剖針及固定針。

問題 1.1 (2 分)

昆蟲的身體由頭、胸及腹部三部份所組成，請用橘色“O”的筆劃線，將答案卷上幼蟲照片中的頭部和胸部區分出來。再用藍色“B”的筆劃線，將胸部和腹部區分出來。

問題 1.2 (2 分)

在幼蟲頭部的兩側，可見到一個眼斑，請你計算每一個眼斑中有多少小眼，並將數量填於答案卷上(例如 4,6,9)

問題 1.3 (3 分)

昆蟲藉由氣管系統來進行呼吸，氣管系統與外界相通的孔道稱為氣孔。請計算在你面前的幼蟲有多少對的氣孔，並將對數填於答案卷上(例如 4,6,9)

問題 1.4 (18 分)

信封袋中的相片顯示一隻已經解剖的蠶蛾幼蟲的背面觀。請解剖這隻已經麻醉的蠶蛾幼蟲如照片所示(解剖過程中如果不慎毀壞，可再用另一隻幼蟲)，當你完

成解剖時，請舉手通知監試人員，監試人員會照相將你的結果記錄下來，以供評分用。(6分)

(請記得確認監試人員所照的相片，是否能完全呈現你所完成的解剖結果)

仔細觀察蠶蛾幼蟲的內部構造，注意觀察三種管狀構造 A,B 及 C 出現的地方，依據下列所提供的名稱 1-10 及功能 a-j，回答此三種管狀構造 A,B 及 C 的名稱及功能。

名稱：

- | | |
|--------|---------|
| 1. 唾液腺 | 2. 輸卵管 |
| 3. 馬氏管 | 4. 盲腸 |
| 5. 氣管 | 6. 前胸腺 |
| 7. 絲線 | 8. 咽側腺 |
| 9. 脂肪體 | 10. 輸精管 |

功能：

- | | |
|------------|---------|
| a. 分泌年輕激素 | b. 幫助消化 |
| c. 呼吸 | d. 分泌絲 |
| e. 分泌前胸腺激素 | f. 儲存脂肪 |
| g. 排泄 | h. 輸送卵 |
| i. 輸送精子 | j. 分泌唾液 |

問題 1.5 (6分)

昆蟲的身體具有不同的器官系統，仔細觀察未麻醉和已經麻醉的幼蟲，觀察中樞神經系統，消化系統(消化管)及循環系統(心)所在的位置，並利用下列指定顏色的筆，將所觀察到的位置和範圍畫於答案卷的圖像上。

中樞神經系統以橘色“O”的筆畫出

消化系統以藍色“B”的筆畫出

循環系統以綠色“G”的筆畫出

注意：只需將各系統所在的位置和範圍畫出即可，不需畫出詳細形狀。但消化系統(消化管)例外，你必須將兩端清楚的畫出。

問題 1.6 (4分)

昆蟲的中樞神經系統是神經元的細胞體的集合，或由神經結以及連接神經結的神經纖維束或神經纖維索所組成。觀察你所解剖的幼蟲具有多少對神經結？(請以阿拉伯數字表示有幾對)

問題 1.7 (12分)

利用 Q.1.5.所提供的圖，在圖上標示出最前面、次前面以及最後等 3 個神經結的位置，用黑筆以“A” 標示出最前面神經結的位置，“2” 標示出次前面神經結的位置，“P” 標示出最後神經結的位置。

問題 1.8 (2分)

請問在每一對的神經結之間有多少條神經索，請選擇 1 到 4 中正確的數字，填寫於答案卷中。

第二部分 植物解剖 (50分)

在此部分，將觀察花與果實的形態，並探討其發育過程。

A 部分：種子形態及儲存物質

【材料與器材】

- 裝有種子的培養皿四個，標示為 I - IV
- 解剖顯微鏡 (用於第 1 部分)
- 鑷子 (用於第 1 部分)
- 刀片

- 解剖刀
- 染料及沖洗劑 (IKI, IKI-R) 、(CBB, CBB-R) 、(OR, OR-R)
- 染色用的培養皿 12 個

【前言】

不同種類的植物，其形態及儲存物質不同，所儲存物質可藉染色來加以區分

問題 2.A.1 (27 分)

培養皿(I - IV)中分別裝有四種不同的種子，培養皿 IV 所裝的種子是一種稱為 *Vigna angularis* 的豆類種子，以此種子作為例子。此種子已浸泡 24 小時。其中有些種子的種皮已被剝除。使用刀片或解剖刀來解剖這些種子，分別以三種染料將種子及其切片染色，並在解剖顯微鏡下觀察染色結果(包括種子及其切片組織)，仔細觀察其染色程度，並在答案卷上的 Q.2.A.1 表格中填入不同的染色程度差異：“±”代表輕度染色；“+”代表中度染色；“++”代表強度染色；“-”代表無法染色；“N”代表種子中缺乏此組織。

注意：某些種子可能是過敏原，請戴上手套，勿直接以手觸碰。勿讓皮膚沾上染料，若不小心沾上，請用蒸餾水充分沖洗。

染料及沖洗劑

| 染料 | 沖洗劑 | 被染色的物質 | 顏色 | 性質 |
|-----|-------|--------|----|------------|
| IKI | IKI-R | 澱粉 | 紫色 | 水溶液 |
| CBB | CBB-R | 蛋白質 | 藍色 | 含有酒精及醋酸的溶液 |

| OR | OR-R | 脂質 | 紅色 | 含有酒精的溶液 |
|----|------|----|----|---------|
|----|------|----|----|---------|

染色方法

1. 使用小培養皿來作染色與沖洗
2. 在染料中浸染 5-10 分鐘
3. 再用沖洗劑充分沖洗染色後的材料

B 部分：果實的發育

【材料與器材】

- 番茄果實標示為(A) 3 個
- 蘋果果實標示為(B) 1 個
- 信封內有一張手繪圖：包括有兩種花(I and II)和草莓果實的圖形
- 鑷子(用於第 1 部分) 2 把
- 刀片 1 支
- 彩色鉛筆 3 枝：橘色(O)、藍色(B)、綠色(G)；(用於第 1 部分)
- 白色解剖盤 1 個

【簡介】

果實可能由單一花朵的某個部分發育而成，故果實的形態與其花的構造關係密切。

問題 2.B.1 (4 分)

在答案卷中的 Q.2.B.1 表格中，分別填入(A, B)果實是由相對應的何種花 (I or II)所發育而來。

問題 2.B.2 (11 分)

用黑色鉛筆在答案卷的 Q.2.B.2 果實縱切圖(A1 and B1)上畫出胚珠(或種子)、

心皮(或由心皮發育而成的組織)、以及萼片的形狀及位置,然後在此果實縱切圖(A1 and B1)上,用下列指定顏色的鉛筆將不同構造塗上不同的顏色。【參考手繪圖中草莓果實的作圖和著色方式】

胚珠(或種子): 橘色鉛筆 O

心皮(或由心皮發育而成的組織):

綠色鉛筆 G

花萼: 藍色鉛筆 B

問題 2.B.3 (8 分)

請完成答案卷中 Q.2.B.3 的(A2 and B2)果實橫切圖(圓圈範圍),畫出果實內部不同構造的形狀及位置,再用下列指定顏色的鉛筆將不同構造塗上不同的顏色:

胚珠(或種子): 橘色鉛筆 O

心皮(或由心皮發育而成的組織):

綠色鉛筆 G

實驗二：生物化學

總分：100 分

總操作時間：90 分鐘

【光電比色計的使用方法】

1. 光電比色計的螢幕必須顯示 400 nm (如 Fig. 1 所示), 若否, 舉手通知監試人員。但螢幕上的吸光度(ABS 值)可以不是 0.000。
2. 在光電比色管中裝入蒸餾水(DW), 至少裝到 “shoulders” 處(如 Fig. 2 所示)。
3. 將光電比色管放入光電比色計中(如 Fig. 3 所示)的比色管放置處(cuvette holder), 透明面須朝向左右兩側。

4. 關上蓋子(如 Fig. 4 所示)。
5. 按下‘AUTO ZERO’的按鈕(如 Fig. 5 所示), 儀器將以此吸光值視為標準零值。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, 你將不須清洗光電比色管。

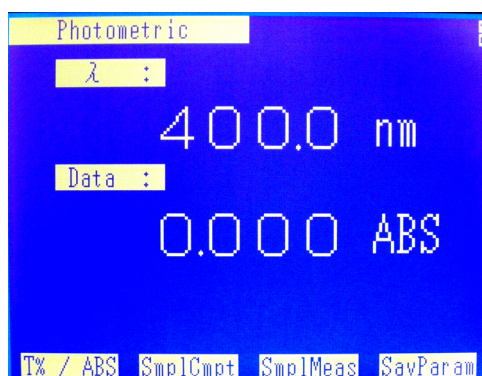


Fig. 1

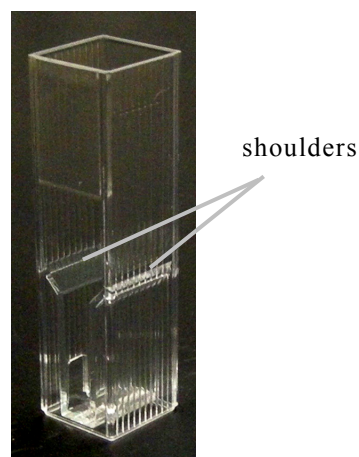


Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

【簡介】

酸性磷酸酶在酸性環境中，可以將磷酸根離子從磷酸化的分子中釋出。本實驗的目的在判定酸性磷酸酶的活性。在第 1

部分，你將利用馬鈴薯的粗萃液來測量酸性磷酸酶的活性；在第 2 部分，你將判定粗萃液中所含蛋白質的濃度。活性在此是指由第 1、2 部分所獲得之每單位時間、每單位量的蛋白質。此活性可作為酶純度的指標，當酶的活性愈高，則代表酶的純度愈高。

注意：

1. 你將會使用少量的有毒物質（*p*-nitrophenol and NaOH），如有需要，你可穿戴丟棄式手套及護目鏡。
2. 承上述的實驗結果來進行計算時，只要你計算公式正確，即使答案錯誤，仍可有部分得分。

【材料與器材】

- 光電比色計 1 個
- 微量吸管(P1000) 2 個
- 微量吸管(P200) 1 個
- 微量 Tips (one box each for P1000 and P200) 2 個
- 塑膠光電比色管 1 個
- 可容納六根試管(6-1 to 6-6) 的試管架 1 個

6-1. 酸性磷酸酶的粗萃液（4 ml，置於 15-ml 的塑膠試管中並標示 1 倍“1X”的酵素）

6-2. 0.5 M 醋酸鈉緩衝溶液(pH 5.6)（2 ml，置於 15-ml 的塑膠試管中）

6-3. 5 mM pNPP (4 ml in a 15-ml plastic tube)

6-4. 0.5 M NaOH (8 ml in a 15-ml plastic tube)

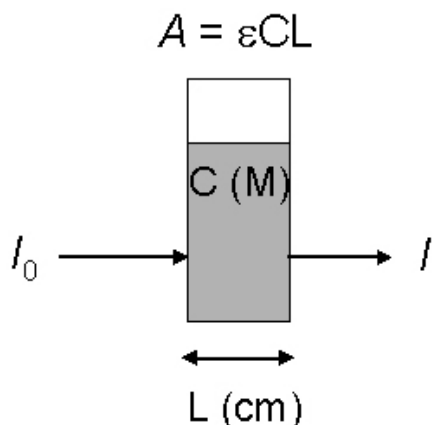
6-5. 3% NaCl (10 ml in a 15-ml plastic tube)

6-6. Test tubes (Glass)

第一部分 酸性磷酸酶活性的測量 (70分)

酸性磷酸酶活性的測定原理，在於此酶可催化將 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP)轉化成 *p*-nitrophenol (pNP)的酵素反應過程。此反應會釋出磷酸根，且其產物 pNP 在極度鹼性的環境中，於 400 nm 的吸收光譜下的吸光係數 (absorption coefficient* ($\epsilon_{400 \text{ nm}}$)) 為 $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。進行酸性磷酸酶的反應時，其反應混合液具有微酸性，故若需量化 pNP，必須將混合液轉成鹼性。在實驗 1，你將測量加入 1 ml 的粗萃液後之反應的時間歷程及每分鐘所得之吸光值改變。利用 $\epsilon_{400 \text{ nm}}$ 可將此吸光值改變換算成濃度改變的數值，然後，再將換算得的濃度數值乘以你當初測定的樣本體積，即可計算出反應中 pNP 分子的莫耳數。

【什麼是吸光係數？】



A , absorbance 吸光值

ϵ , absorption coefficient ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)吸光係數

C , concentration ($\text{M}=\text{mol litre}^{-1}$) 濃度

L , light path length (cm) 比色管中，光所經過的路徑長度

I_0 , intensity of incident light 入射光之強度

I , intensity of transmission light 透射光之強度

吸光值是溶液的一種物理-化學特性，其顯示溶劑在某種特定光波長下所能吸收光的程度。吸光值與濃度(C)及比色管中光所經過的路徑長度(L)成比例。公式中的常數(ϵ)代表溶劑的特性，稱為吸光係數(ϵ)。因此，以此 $A = \epsilon C (\text{M}=\text{mol litre}^{-1}) L$ (cm)公式表示這些因子之間的關係。由於 ϵ 是已知值，且 L 在此實驗中是 1 cm，故吸光值可轉換成濃度。 ϵ 的單位為 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ，因為吸光值是沒有單位的絕對值。

在實驗 1，有兩種不同濃度的酶被檢測，選取標示 1 倍(1X)酶的試管，其內為含有酸性磷酸酶的粗萃液。而後，從含有 3% NaCl 溶液的 15-ml 試管中取出 1 ml，此時試管中只剩 9 ml 的 3% NaCl，接著以微量吸管量取 1 ml 的 1 倍 (1X) 酶加入試管中，而得到 0.1 倍(0.1X)酶，標示此試管為 0.1 倍(0.1X)。接下來，取 6 個空試管，標示每個試管之酶濃度與反應時間如下：

0.1X, 20 min

1X, 20 min

0.1X, 10 min

1X, 10 min

0.1X, 1 min

1X, 1 min

問題 1.1 (10 分)

首先規劃一個可以一次完成所有反應的實驗設計，在答案卷上針對每個反應，將你的實驗設計填入答案卷上 **Q.1.1.** 的表格中，以(○)表示反應開始，(●)表示反應停止，實驗設計時，在各反應作用之間至少要有 1 分鐘的間隔，以方便操作。注意！答案卷 **Q.1.1.**表格中有一個範例，是反應‘0.1x, 20 min’的實驗設計方式，請依此範例，完成其他反應的實驗設計。

問題 1.2 (10 分)

根據下列所敘述的步驟，並配合你在上題(Q.1.1.)所列的實驗流程，在每次操作中，請用新的微量吸管頭(tip)；在每次加入藥品後，立即輕彈試管以混合溶液。當你進行所有的反應後，測定各樣本之 A_{400} (400 nm 光源下的吸光值)，將所得的結果填於答案卷的表格中，並根據此數據作圖。請注意：由於本實驗採用水當作標準零值(blank)，所以作圖所得的直線將不會通過 Y 軸的 0 點。

【酸性磷酸酶活性之測定方法】

1. 在試管中加入 0.12 ml 的 0.5 M 醋酸鈉以及 0.24 ml 的 5 mM pNPP，混合後，再加入 0.24 ml 的酶溶液，開始反應。
2. 開始作用後，分別在 1, 10, 及 20 分鐘時，加入 0.6 ml 的 0.5 M NaOH 來終止酵素反應，NaOH 除了可終止反應外，並可將產物 pNP 轉變成黃色，此

黃色物質在 400 nm 的光照下具吸光能力 (A_{400} -absorbing)。

3. 當反應終止後，測量樣本的 A_{400}

馬鈴薯之酸性磷酸酶測定

| | | |
|---------------------------------|------|----|
| 0.5 M Na acetate buffer(pH 5.6) | 0.12 | ml |
| 5 mM pNPP | 0.24 | ml |
| Enzyme | 0.24 | ml |
| 0.5 M NaOH | 0.6 | ml |
| Sum | 1.2 | ml |

問題 1.3 (15 分)

在時間與 A_{400} (400nm 光源下的吸光值)的關係圖中，酶的何種濃度(1X 或 0.1X)下反應顯示較佳的線性關係？在答案卷上圈選出正確答案，並從上題作圖中計算出該直線的斜率。

問題 1.4 (5 分)

利用由上題中所得的斜率，計算酶的活性。方法是以其在 1 倍“1X”的酶濃度每分鐘每 ml，對 A_{400} 吸光值所造成的改變為準，且比色管中，光所經過的路徑長度(L)為 1cm。在答案卷上，你所寫的答案需有單位，並要有計算過程。

問題 1.5 (5 分)

假設所得的 pNP 的吸光係數 ϵ_{400} 是 $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ，將上題所得的吸光值變化換算成濃度變化的數值。在答案卷上，所寫的答案需以每 ml 每分鐘的 1 倍“1X”酶濃度為單位，並需有計算過程。

問題 1.6 (5 分)

將上題所得之 pNP 濃度變化換算出

pNP 的莫耳數變化。在答案卷上，所寫的答案需以每 ml 每分鐘的 1 倍“1X”濃度的酶溶液反應下為單位，並需有計算過程。

問題 1.6 (5 分)

將上題所得之 pNP 濃度變化換算出 pNP 的莫耳數變化。在答案卷上，所寫的答案需以每 ml 每分鐘的 1 倍“1X”濃度的酶溶液反應下為單位，並需有計算過程。

問題 1.7 (5 分)

計算最初所提供的 4ml 之 1 倍“1X”酶溶液的總活性(單位為 mol per min；每分鐘多少莫耳)。

第二部分 蛋白質測定 (30 分)

蛋白質濃度的測定常藉由使用標準蛋白質(例如：小牛血清蛋白(BSA))來進行。在第二部分中，你將利用 Bradford 法來測定，一個與 BSA 相等濃度的 1 倍“1X”酶溶液的蛋白質的含量。此法係藉著染劑 Coomassie Brilliant Blue 與蛋白質結合時，Coomassie Brilliant Blue 染劑在 595 nm 光源下，其吸光度的增加，以進行蛋白質濃度的定量。

利用 3% NaCl 溶液稀釋濃縮的 BSA 溶液(0.4 mg protein ml⁻¹)，造成四種不同濃度的序列稀釋之 BSA 溶液(分別為 0.4, 0.2, 0.1, and 0.05 mg protein ml⁻¹)。此 BSA 序列稀釋溶液及其第 1 部分中所用的 0.1 倍“0.1X”酶溶液，皆以相同的 Coomassie Brilliant Blue 染劑處理。這些樣本在 595 nm 的吸光度(OD₅₉₅)之測量值記錄如下表中。

| Sample | [BSA] (mg · ml ⁻¹) | OD ₅₉₅ |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | 0.05 | 0.470 |
| | 0.1 | 0.543 |
| | 0.2 | 0.661 |
| | 0.4 | 0.921 |
| 0.1x enzyme solution | | 0.580 |

吸光值是指測定某種物質透光的程度，或懸浮溶液中的顆粒之吸光程度。

問題 2.1 (10 分)

將測量 OD₅₉₅ 所得的數據結果對應於 BSA 的濃度，在答案卷所提供的方格紙上進行繪圖，並取其最接近的直線表示其趨勢。

問題 2.2 (10 分)

從圖中來估算 0.1 倍“0.1X”酶溶液之蛋白質濃度，並由此換算出 1 倍“1X”酶溶液之蛋白質濃度。

問題 2.3 (10 分)

計算 1 倍“1X”酶溶液之活性(每 mg 蛋白質每分鐘的活性)，在答案卷上，你的作答必須有計算過程，及以每 mg 蛋白質每分鐘的活性為單位(per min per mg protein)。

實驗三：遺傳學

總分：98 分

總操作時間：90 分鐘

第一部分 突變果蠅的外表型觀察 (9 分)

【材料與器材】

- 培養皿(1)-(4)內有活果蠅 1 組
- 鏡座放大鏡(放大鏡) 2 檯

【簡介】

果蠅是遺傳上常用的材料，培養皿(1)內有野生型果蠅，培養皿(2) - (4) 內則有不同突變型的果蠅。用放大鏡小心觀察但不可打開培養皿的上蓋，可調整放大鏡架的高度及角度以便觀察。

問題 1.1 (9 分)

每種突變型果蠅的哪一種性狀與野生型不同？由下列選項中選出突變型表現出的性狀特徵。

- A. 眼睛顏色
- B. 眼睛形狀
- C. 翅形狀
- D. 剛毛長度
- E. 觸角形狀
- F. 剛毛形狀
- G. 腿形狀
- H. 吻部形狀
- I. 身體顏色
- J. 腹部長度

第二部分 白眼突變的遺傳 (35 分)

【材料與設備】

- 1.5 ml 試管標示(5a)及(5b)、(6a)及(6b)、(7)，內有被麻醉的果蠅 1 組
- 空的培養皿 5 個
- 白色板 (置於培養皿下方，為方便觀察用) 1 個

- 鑷子 2 支
- 鏡座放大鏡(工作 1 中用的) 1 檯
- 1.5 ml 試管架 1 支

【簡介】

野生型果蠅(WT)為紅眼，突變型果蠅(w)具有白眼，w 為位於 X 染色體上的隱性突變。(5a)及(5b)、(6a)及(6b)分別裝有由二不同雜交所得之雄蠅及雌蠅；第(7)管裝有另一雜交所得的雄與雌蠅。注意果蠅的雌雄可用腹部背面色帶的型式來區別。



Female



Male

問題 2.1 (8 分)

將試管(5a) 及(5b)中的果蠅移到不同的培養皿中，用放大鏡觀察，檢查其性別及眼睛顏色，在答案卷之表格中記錄果蠅的數目，包括 0 也要記在表中。

問題 2.2 (8 分)

將試管(6a) 及(6b)中的果蠅移到不同的培養皿中，用放大鏡觀察，檢查其性別及眼睛顏色，將果蠅的數目分別記錄在答案卷表格中，包括 0 也要記在表中。

問題 2.3 (8 分)

將試管(7)中的果蠅移到不同的培養皿中，用放大鏡觀察，檢查其性別及眼睛顏色，將果蠅的數目分別記錄在表格中，包括 0 也要記在表中。

問題 2.6 (9 分)

下列何種組合的配對會產生試管 (5a) 及 (5b)、(6a) 及(6b)、(7)之果蠅，選擇所有可能情況並填入字母代號。

- A. 同基因合子紅眼雌蠅與半基因合子紅眼雄蠅
- B. 同基因合子白眼雌蠅與半基因合子白眼雄蠅
- C. 同基因合子紅眼雌蠅與半基因合子白眼雄蠅
- D. 同基因合子白眼雌蠅與半基因合子紅眼雄蠅
- E. 異基因合子雌蠅與半基因合子紅眼雄蠅
- F. 異基因合子雌蠅與半基因合子白眼雄蠅

(待續)