

2013 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 1 試場

- 請確認考生編號是否與您的考號相同。
- 本實作測驗包含植物生理與植物形態兩個部分，建議你先瀏覽兩部分的實驗操作內容，妥善規劃操作時間，以順利完成所有實作內容。
- 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。若有缺少者，請舉手告訴評審老師，桌上的器材及藥品用完後，將不再補充。
- 公用儀器運用，請依照實驗桌上指示使用。
- 本測驗兩個部分配分各占 50 分，總分 100 分。
- 本試卷（含封面、試題卷）共 6 頁，於交卷時全部繳回。
- 作答時間共 90 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。
- 實驗完畢後，請清理桌面。

第一部分：【C3 與 CAM 途徑的生理差異檢測】

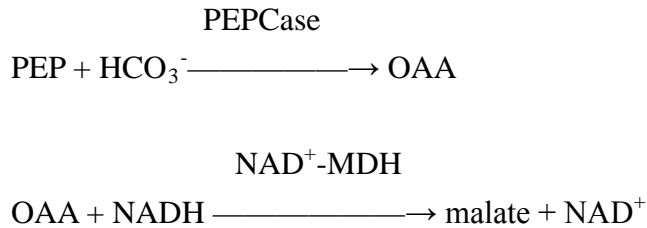
一、器材及藥品：

器材及藥品	數量	器材及藥品	數量
植物材料(A、B)	各些許	鑷子	一支
液態氮(低溫物質，操作時眼睛勿靠近)	一瓶	小試管(部分貼上標籤 A、B)	十個
研砵及杵	二組	小試管架	一個
緩衝液	3 ml	小試管(含浮船)	一個
反應液 A(不含 NADH)	4 ml	藥杓	二支
反應液 B(含 NADH)	4 ml	秤藥盤	二個
微量分注器(1000 μ l、200 μ l)	各一支	廢液杯	一個
微量吸管(1000 μ l、200 μ l)	各一盒	冰浴	一盒
單面刀片	一支	油性筆	一支
電動天平(共用)	二臺	手套(M)	一雙
UV 分光光度計(共用)	二臺	計時器	一個
蒸餾水	一瓶		

二、原理說明：

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)是判斷 C3 與 CAM 途徑的生理差異的檢測方法之一，其功能為固定二氧化碳。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCase)活性分析，是以磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate, PEP)為基質，產物為草醋酸(oxaloacetate, OAA)，草醋酸透過蘋果酸去氫酶(NAD⁺-MDH)進一步與NADH作用，形成蘋果酸(malate)與NAD⁺，NADH在波長 340 nm有吸收高峰，因此檢測波長 340 nm的吸光 (OD) 值之衰減現象可推估PEPCase的活性。



三、操作步驟：

PEPCase 活性檢測：(粗體字部分請務必遵守)

1. 托盤中放入單面刀片、鑷子以及植物材料 A、B 葉片樣品各少許，欲秤取植物樣品時請舉手，向助教領取天平之號碼牌，待輪到該號碼時助教會另行通知。(注意，A、B 葉片樣品各 0.2 g!!)
2. 液態氮(請舉手告知助教並由助教協助取得液態氮)充分研磨後(請記得戴手套操作)，以藥杓刮取研磨後之葉片樣品小心置入小試管中(貼有植物 A、植物 B 之小試管)，加入 1 mL 緩衝液混合均勻後請標示考生的編號避免混淆，在室溫條件下以 12000 rpm 離心 10 分鐘(等待其他考生一起離心)。
3. 取上清液至少 500 μ l 於小試管(標籤貼有試管 A、試管 B 之小試管，請注意植物 A 上清液加至試管 A；植物 B 上清液加至試管 B)備用，是為萃取液。
4. 取 200 μ l 萃取液 + 750 μ l 反應液A(不含NADH)或反應液B(含NADH)(請考生自行利用油性筆於小試管上標示反應組別)，於 30°C 水浴 5 分鐘(請計時，小試管請置於浮船上再進行水浴處理，若無計時工具可與助教領取計時器)。以加入反應液A(不含NADH)者為blank。
5. 取出置於 UV 分光光度計內(請舉手拿取號碼牌，並由助教協助叫號)，助教叫號後至測量處加入酵素受質 PEP 溶液 50 μ l 進行反應(此步驟由助教協助加入 PEP 反應並測量)，分別於 0 分鐘與 5 分鐘測讀 340 nm 的 OD 吸光數值(請交給現場監試人員代為測量)，測量值請填寫在第 1 題的表格內，求得 NADH 的衰減毫摩爾數及酵素活性。

四、結果與問題回答：

1. 請依下表填寫 PEPCase 吸光值檢測結果(340 nm 吸光值, OD)。(20 分)

材料	加 PEP(0 分鐘)	加 PEP(5 分鐘)	差距值
A			
B			
A1	0.673	0.666	
B1	0.673	0.642	

實驗中提供由助教前一天夜間萃取植物材料 A1、B1 的分析結果，就你實驗結果與所提供夜間萃取之數據比較簡述其差異，並回答問題 2、3。

差異簡述: _____

2. 請依上表計算單位鮮重量每分鐘 NADH 的消耗量(即酵素活性)：材料

A: _____; B: _____; C: _____; D: _____ (10 分)

註：酵素活性的計算公式如下

(先計算 NADH 的消耗 mmol 數，再計算 PEPCase 酵素活性)

NADH 的消耗 mmol(X)與 OD 值每分鐘變化量(Y)的關係式: $Y=0.87X-0.02$

PEPCase 酵素活性 = NADH 的消耗 mmol 數 × 酵素萃取液總體積(ml)與酵素萃取液分析體積(ml)比值 / 樣品鮮重量，活性單位為 mmol/gFW·min

3. 在這 2 種植物(A、B)中，推測何者採用 CAM 途徑？(10 分)

CAM 途徑之植物為： _____

理由為： _____

4. 根據前一晚植物萃取液與今日妳/你自行萃取之液體 OD 值差異結果說明

其差異的生理意義為何？(10 分)

答案： _____

第二部分：植物構造的比較

一、器材

器材	數量
植物葉片:(同第一部分之 A、B)	各些許
光學顯微鏡(內裝有目鏡測微器)	1 台
物鏡測微器	兩組共用一片
載玻片/蓋玻片	數片
單面刀片(同第一部份實驗)	1 支
塑膠滴管	1 支
尖頭鑷子	2 支
計算機(簡單型)	1 台
指甲油	1 罐

二、操作與記錄結果：(結果另記錄於下頁表格中)

1. 以尖頭鑷子小心撕下植物的上下表皮，先以滴管吸取蒸餾水並滴一滴在載玻片上，再各別將表皮放在此玻片上，最後小心蓋上蓋玻片(避免有氣泡)，製成玻片樣本，在顯微鏡下進行觀察比較上下表皮的氣孔密度(單位面積下的氣孔數)，以及測量下表皮的保衛細胞及氣孔大小(分別量測長與寬，重複測量 5 次，再以平均值(M) ± 標準差(S)表示之；【標準差(S)，其公式如下】)。(36 分)

註：植物的上下表皮亦可用印模法：將指甲油均勻塗佈在表皮上，待指甲油乾燥後會在植物表面上形成薄膜，以代替實際表皮，再以尖頭鑷子小心撕下薄膜，再同上操作成玻片樣本，進行觀測。

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

2. 用單面刀片將各植物的葉片橫切薄片，將橫切面各別放置載玻片上，而後以滴管吸取蒸餾水並滴一滴至橫切面上，最後小心蓋上蓋玻片(避免有氣泡)，在顯微鏡下進行觀察繪圖記錄。

注意：繪圖須含上下表皮及其間之葉脈、葉肉等組成；應呈現出細胞相對比例，但不須測量大小(8 分)

比較此 2 種植物表皮及葉橫切面構造，並將觀察結果填入下表。

植物	結果與繪圖或測量值		
A	氣孔密度，材料取得方式為： 上表皮： 下表皮：		
	下表皮(擇一樣品繪圖)	保衛細胞 (長/寬) (μm)	氣孔 (長/寬) (μm)
		1 : _____	1 : _____
		2 : _____	2 : _____
3 : _____	3 : _____		
4 : _____	4 : _____		
5 : _____	5 : _____		
M ± S :	M ± S :		
長: _____	長: _____		
寬: _____	寬: _____		
B	氣孔密度，材料取得方式為： 上表皮： 下表皮：		
	下表皮(擇一樣品繪圖)	保衛細胞 (長/寬) (μm)	氣孔 (長/寬) (μm)
		1 : _____	1 : _____
		2 : _____	2 : _____
3 : _____	3 : _____		
4 : _____	4 : _____		
5 : _____	5 : _____		
M ± S :	M ± S :		
長: _____	長: _____		
寬: _____	寬: _____		

A	葉橫切
B	葉橫切

三、根據上表之形態比較，此兩種植物有哪些特徵相似或相異？(6分)

相似：_____

相異：_____