

考生編號_____

分數_____

2023 年國際生物奧林匹亞國手選拔營實作試題

第 1 試場實作

生物化學實驗

注意：操作時間有限，請善用等待實驗作用的時間。

※ 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(標示)與實驗材料	數量
微量分注器 P10	1 支	樣品 A (考號-A)	1 管
微量分注器 P20	1 支	樣品 B (考號-B)	1 管
微量分注器 P200	1 支	PMA 試劑 (PMA)	1 管
微量分注器 P1000	1 支	細胞分解液 (L)	1 管
10 μ L 微量吸管尖	1 盒	去離子水 (ddH ₂ O)	2 管
200 μ L 微量吸管尖	1 盒	反應引子 (P)	1 管
1000 μ L 微量吸管尖	1 盒	2xDirect Go 反應酵素 (Go)	1 管
桌上型離心機	1 台	0.2 mL PCR 微量離心管	2 管
震盪混合機	1 台		
油性筆	1 隻	共用儀器	
廢液杯	1 杯	高速離心機	共用
冰桶	1 個	鹵素燈 (500 W)	共用
剪刀	1 個	聚合酶鏈鎖反應儀 PCR 機	共用
膠帶	1 個	照膠系統/電泳槽/電源供應器(助教用)	共用

※ 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 6 頁，於交卷時全部繳回。
3. 操作與作答時間共為 95 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：你的益生菌吃對了嗎？

益生菌 (Probiotic)，根據世界衛生組織在 2001 年的一份文件中定義，是指可以食用的「活微生物」，而且當攝入足夠的劑量時會給宿主帶來健康益處。而人類使用益生菌的經驗，其實最早可以追溯到古代希臘人與羅馬人。當時就已經知道乳類食材進行發酵，製作乳酪與優格等食品的技術。只不過當年主要是利用這些微生物來達到延長食物保存期限的目的。益生菌理論一直到二十世紀初，才開始與促進健康的目的開始連結。

首先是諾貝爾獎得主俄國科學家埃利·梅奇尼科夫 (Élie Metchnikoff) 在 1907 年提出益生菌假說。他認為可以藉由飲食攝入某些細菌，改變腸道微生物群來達到積極改善健康的目的。他也親身實踐，每日食用由一種「保加利亞芽孢桿菌」(*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) 發酵製作的優格，而這樣的飲食文化也開始慢慢開始流行。

在抗生素還未大量應用的時代，細菌性疾病是人類健康的嚴重威脅。科學家開始發現，似乎有更多的細菌可以用來治療某些致病性細菌。例如在 1917 年爆發志賀氏菌大流行，德國科學家 Alfred Nissle 從一名未受疾病影響的士兵糞便中分離出一種大腸桿菌 (*Escherichia coli* Nissle 1917 strain)，然後將這種細菌用來治療急性腸胃道感染性沙門氏菌病與志賀氏菌病的患者，獲得一定程度的效果。

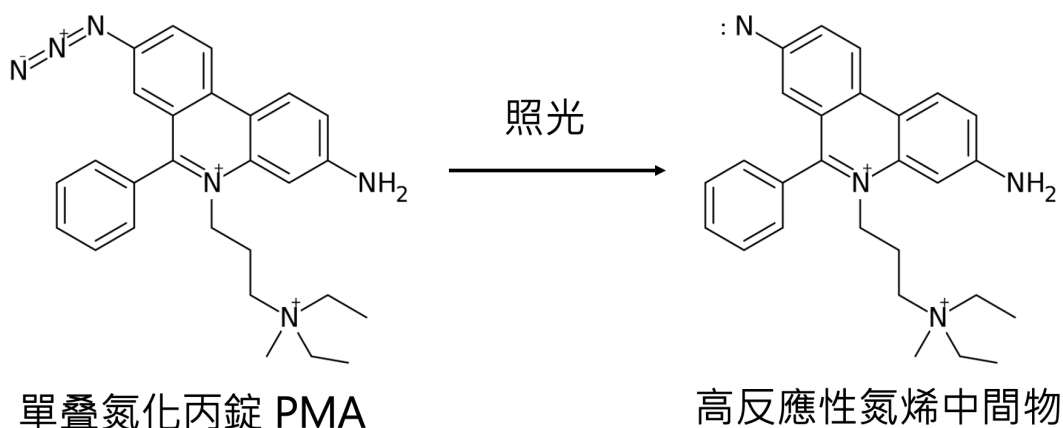
之後數十年的時間，越來越多的有益細菌被科學家發現。包括從母乳中分離出的雙歧桿菌屬 (*Bacillus bifidus communis*)，可以在嬰兒的腸道微生物群中佔主導地位，並且改善嬰兒腹瀉症狀。而嗜酸乳桿菌也被發現在食用後可以在人類腸道中存活，並實際減少致病性大腸桿菌以及產氣細菌。一直到 1990 年代，有關益生菌的定義漸趨明朗，而益生菌產業也開始蓬勃發展。

現在，益生菌的應用從保健食品、清潔用品、飼料甚至洗髮精等等，日常生活中充滿鋪天蓋地的商品廣告，大肆宣傳益生菌的好處。歐美等國的監管機構也開始注意到這樣的亂象。歐洲食品安全局 (The European Food Safety Authority) 在 2019 就提出，大多數益生菌產品都缺乏明確科學證據，能證明真的會對於健康帶來好處。因此，益生菌產品的監管與品質確保，已經是目前產業發展與社會上很重要的需求了。

請記得在定義上，益生菌必須是活的微生物才具有效果。因此產品製作過程中必須確保活菌的數量有達到標準，同時也必須避免有雜菌的污染。不然食用之後，輕則沒有達到保健效果；重則吃到壞菌，越吃越糟。

那麼，我們該如何確保益生菌產品的菌種以及活菌含量呢？一般來說，最簡單的方法就是使用微生物培養法。但是這種方法需要的時間比較長，而且，如果要確定微生物的菌種，需要更長的時間與繁複的生化反應驗證。使用聚合酶連鎖反應 (PCR) 的方法，可以放大特定菌種的 DNA 片段，而且只需 1~2 小時就可以知道結果。這提供了另一種快速驗證益生菌產品的技術選擇。然而，不論樣品裡的益生菌是死是活，理論上其中的 DNA 都可以作為模板而被 PCR 放大。那麼，我們要如何利用 PCR 來分辨死菌與活菌呢？

單疊氮化丙錠 (Propidium Monoazide, PMA) 在照光之後會形成高反應性的氮烯 (nitrene) 中間物，可以很快與 DNA 反應。被修飾後的 DNA 分子將無法作為 PCR 的模板。接下來的實驗，你將會拿到兩管益生菌的樣品。其中一管的益生菌經過熱處理過，而另一管則是活菌。請仔細依照下列實驗步驟操作、觀察、完成所有實驗操作、判斷哪一管是活的益生菌，並回答所有問題。



二、實驗操作：(20 分)

2-1 樣品前處理

1. 取出樣品 A (考號-A) 與樣品 B (考號-B)(已標示考號)，觀察兩者外觀是否有差異，並作紀錄於下頁。
2. 在兩組樣品中各自加入 10 μL PMA 試劑，然後再以震盪混合機震盪 10 秒。
3. 將兩組樣品交至共儀區，由助教以鹵素燈 (500 W) 光照 5 分鐘。
4. 由共儀區助教協助使用高速離心 10000 g，離心時間 1 分鐘。
5. 離心完後由助教歸還考生樣品 A 及 B 後，再使用微量分注器 P1000，將上清液移除到廢液杯，留下菌體沉澱。
6. 觀察此時兩個樣品的菌體外觀，並作紀錄於下頁。

2-2 細胞破碎

1. 在兩組樣品菌體沉澱各加入 100 μL 的細胞分解液(L)，並使用微量分注器 P200 混合均勻。
2. 在兩組樣品各加入 900 μL 去離子水(ddH₂O)，再以震盪混合機震盪 5 秒。**此樣品即為 PCR 反應之模板 A 及 B。**

2-3 PCR 反應與分析

1. 請取 2 管 PCR 小管，標示(考號-A)及(考號-B)，例如:(A1- A)及(A1- B)。
2. 請依下表，依序配置樣品 A 及樣品 B 的 PCR 反應液於 0.2 mL PCR 微量離心管。

試劑(標示)	樣品 A (考號-A)	樣品 B (考號-B)
去離子水 (ddH ₂ O)	8.5 μL	8.5 μL
反應引子 (P)	2 μL	2 μL
2xDirect Go 反應酵素 (Go)	12.5 μL	12.5 μL
模板 A 及 B	(模板 A) 2 μL	(模板 B) 2 μL
總體積	25 μL	25 μL

3. 將兩個微量離心管對稱放置入桌上型離心機中，在室溫下離心 5 秒。
4. 交至共儀區由助教進行 PCR 反應。
5. 由助教於共儀區統一跑膠及照膠。
6. 電泳結果將由助教送給考生。

三、實驗結果 (40 分)

3-1 樣品前處理 (10 分)

	樣品 A	樣品 B
操作前外觀		
PMA 處理後菌體外觀		

3-2 PCR 結果 (30 分)

請將電泳照片貼在下方

四、問題回答 (40 分)

1. 請判斷樣品 A 與樣品 B 的益生菌，在開始實驗時何者為活菌何者為死菌？並請說明判斷依據以及背後實驗原理。(10 分)
2. 除了看是否有 PCR 產物出現之外，如何確定 PCR 的結果一定是正確的？如果碰到其他種類的益生菌，我們的實驗哪個部分需要修改？請盡可能詳細說明應該如何去修改？(10 分)
3. 如果樣品中有部分活菌有部分死菌，請設計一個實驗，描述如何利用本實驗的原理，使用 PCR 的方式去定量樣品中的活菌與死菌的實際數量。(20 分)