

2. 實驗材料與方法

2.1 實驗材料

裂片石莖 (*Ulva fasciata*) 為片狀綠藻，採集自台灣台北縣石門鄉富基漁港與白沙灣之間潮間帶海岸。藻體由兩層細胞構成，寬約 2 公分，長 20 至 50 公分，常呈不規則的帶狀皺褶裂片，基部以盤狀固著器附著岩石上。

2.2 化學溶液配方

(1) 人工海水 (artificial sea water, ASW) :

在二次水加入 NaCl、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 Na_2SO_4 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、KCl、 $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 及 NaHCO_3 ，依實驗所需離子濃度調整各化學藥劑之份量，最終離子濃度於下一節 2.3 實驗方法 中詳細敘述。

(2) 碳酸溶液：

依莫耳數 1:2 混合 Na_2CO_3 溶液與 HCl 溶液，期間在冰上操作減少碳酸變成二氧化碳氣體逸失。

(3) 磷酸鈣粉末：

混合等量體積的 0.3M CaCl_2 溶液與 0.3M Na_2HPO_4 溶液得到磷酸鈣沈澱，再過濾後於 55°C 烘乾。

(4) 20mM 磷酸緩衝溶液 (phosphate buffer saline, PBS) :

在 400ml 二次水中加入 1.44g Na_2HPO_4 、0.12g KH_2PO_4 、4.0g NaCl 及 0.1g KCl，調整 pH 值為 7.2，再加入二次水至最終體積達 500ml。

(5) 固定海藻之混合溶液：

以 20mM PBS 溶液，將 25% 戊二醛 (glutaraldehyde) 與 16% 甲醛 (para-formaldehyde) 稀釋配製成 2% 戊二醛與 4% 甲醛的混合固定液。

(6) 載玻片覆膜之蛋白質膠配方 (coating solution) :

2.5g Gelatin 溶解在加熱至 50°C 的二次水中，冷卻後置入 2.5g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot$

12H₂O，加入二次水至最終體積達 500ml。

(7) 0.5%伊紅染劑 (Eosin-Y)：

將 2.5g Eosin-Y 溶解於 25ml 二次水中，再加入乙醇 (ethanol) 至最終體積為 500ml。

2.3 實驗方法

2.3.1 以尿素及溫度控制 pH 值引發磷酸鈣沈積

在 400ml 的人工海水中依序加入 0.03mole 的磷離子 (4.14g NaH₂PO₄ · H₂O)、0.06mole 的尿素 (Urea, CO(NH₂)₂) 及 0.03mole 的鈣離子 (7.08g Ca(NO₃)₂ 或 4.41g CaCl₂ · 2H₂O)，得到額外添加 0.15M 磷離子、0.15M 鈣離子及 0.3 M 尿素的人工海水溶液 400ml，此時溶液 pH 值在 4.4 到 4.7 之間。依照人工海水配方及外加鈣離子來源分為四個實驗組別：

ASW1 (模擬今日海水主要成分*)		ASW2 (模擬前寒武紀海水主要成分*)	
離子	濃度 (M)	離子	濃度 (M)
Na ⁺	0.529	Na ⁺	0.177 [#]
Mg ²⁺	0.053	Mg ²⁺	0.030
Ca ²⁺	0.010	Ca ²⁺	0.011
K ⁺	0.011	K ⁺	0.010
Sr ²⁺	0.012	Cl ⁻	0.550
Cl ⁻	0.556	HCO ₃ ⁻	0.009
SO ₄ ²⁻	0.028	外加磷離子來源	濃度 (M)
HCO ₃ ⁻	0.002	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.150
外加磷離子來源	濃度 (M)	外加鈣離子來源	濃度 (M)
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.150	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.150
外加鈣離子來源	濃度 (M)	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.150
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.150		
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.150		

*參考自 *The evolving earth* 一書 (Burton, 1981)。

[#]前寒武紀海水主要成分鈉離子濃度原為 0.474M，配製錯誤為 0.177M。

將石蓴分別置於裝有上述四組不同溶液的玻璃瓶中，瓶蓋旋至微緊 (finger-tight)，放入 70°C 的烘箱中 2 個星期，其間尿素因溫度上升，分解成二氧化碳及氨氣，造成 pH 值上升到 7.2-7.8 之間，沈積出磷酸鈣之後，取出石蓴觀察細胞內部沈積情形。

2.3.2 鎂、鈉離子比例不同的磷酸鈣沈積

配製含鎂離子及鈉離子的溶液，固定氯離子總量在 0.556M，此濃度接近人工海水。調整鎂、鈉離子的莫耳濃度比例，Na:Mg 分別為 1:16、1:8、1:4、1:2、1:1，加上只含鎂離子及不含鎂離子的溶液得到七個實驗組別如下。

Na ⁺ /Mg ²⁺	NaCl (M)	MgCl ₂ · 6H ₂ O (M)
—	0.556	0
16	0.495	0.031
8	0.445	0.056
4	0.371	0.093
2	0.278	0.139
1	0.186	0.186
0	0	0.278

各組分別依序加入 0.03mole 的磷離子 (4.14g NaH₂PO₄ · H₂O)、0.06mole 的尿素 (Urea, CO(NH₂)₂) 及 0.03mole 的鈣離子 (4.41g CaCl₂ · 2H₂O)，得到 7 組額外添加 0.15M 磷離子、0.15M 鈣離子及 0.3 M 尿素的溶液 400ml，此時溶液 pH 值在 4.4 到 4.7 之間。將石蓴置於裝有上述 7 組不同溶液的玻璃瓶中，瓶蓋旋至微緊 (finger-tight)，放入 70°C 的烘箱中 2 個星期，期間尿素因溫度上升分解，生成二氧化碳及氨氣，造成 pH 值上升到 7.2-7.8 之間，沈積出磷酸鈣之後，取出石蓴觀察細胞內部沈積情形。

2.3.3 以碳酸及溫度控制 pH 的磷酸鈣沈積

將二倍濃度的人工海水 100ml 加入 100ml 碳酸溶液得到酸化人工海水。此時人工海水組成如下：

酸化人工海水

離子	濃度 (M)
Na ⁺	0.628
Mg ²⁺	0.053
Ca ²⁺	0.010
K ⁺	0.011
Sr ²⁺	0.012
Cl ⁻	0.656
SO ₄ ²⁻	0.028
HCO ₃ ⁻	0.002
額外添加 H ₂ CO ₃	0.050

取 1g 磷酸鈣粉末，加入酸化的人工海水中，置入 4℃ 冰箱，等待 16 小時後磷酸鈣粉末部分溶解。加入少量石蓴，此時酸化人工海水溫度為 6℃，pH 值在 5.5-6.0 之間，之後將瓶蓋旋至微緊 (finger-tight)，置入 70℃ 烘箱中 1 個星期。期間溫度上升，二氧化碳溶解度因溫度上升變低，溶液 pH 值上升，沈積出磷酸鈣。在放入烘箱前，溶液皆儲存於 4℃ 冰箱中或於冰上操作，避免實驗過程中碳酸變成二氧化碳逸失。

2.4 觀察前樣品製備

2.4.1 石蠟 (paraffin) 切片及染色

(1) 石蠟包埋：

將樣品浸泡於混合固定溶液中放置 50 分鐘，以磷酸緩衝溶液清洗後，再以乙醇系列脫水，每步驟 30 分鐘，依序為 20%、30%、50%、70%、80%、95%、100%、100%。將 100% 乙醇置換為二甲苯 (Xylene)，每次 20 分鐘，置換二次，最後置換到熔融狀態的石蠟中進行包埋。將石蠟置於冰上使組織包埋成塊，以

刀片修整，於迴轉式切片機 (rotary microtome) 切下約 6 μ m 的薄片，以水彩筆撈至攝氏 45 度的水浴中使切片展開，再以覆有蛋白質膠的玻璃片撈起，烘乾後即可染色。

(2)切片染色：

將黏有切片的玻片置於二甲苯中 10 分鐘二次，使石蠟完全溶解脫除，再以乙醇系列置換二甲苯，每次浸泡 1 分鐘，濃度依次為 100%、95%、80%、70%。接著置於二次水中洗滌 10 分鐘。再接著將玻片置於蘇木精染劑中染色 3 分鐘，經二次水洗滌一分鐘，接著以伊紅染劑染色 30 秒，以 95% 乙醇洗去多餘伊紅染劑後，依次置於 95%、100% 乙醇各 1 分鐘，再將切片玻片置於二甲苯中浸泡十分鐘以取代酒精。待玻片風乾後以加拿大封片膠將組織切片封上蓋玻片，封膠乾燥凝固後即可置於光學顯微鏡下觀察。

2.4.2 穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy, TEM)：

將樣品以人工海水清洗後，於混合固定溶液中浸泡 50 分鐘，接著用磷酸緩衝溶液清洗，並以乙醇系列脫水，每步驟 30 分鐘，依序為 20%、30%、50%、70%、80%、95%、100%、100% 脫水，再混入 Spurr's resin，依序為 50% 與 75%，每次放置 30 分鐘逐步置換後，以 100% Spurr's resin 置換二次，每次 40 分鐘，再置換一次 100% Spurr's resin 後置入 70 $^{\circ}$ C 烘箱中聚合 15 小時。將聚合好的樣品塑塊修整成小於 1mm² 的梯形後，用鑽石刀在超薄切片機 (Reichert-Ultracut) 切出 90 或 95nm 的梯形薄片，再以覆有弗氏膜 (Formvar) 的鎳網撈起，待鎳網乾燥後即可上機觀察。

2.4.3 掃描式電子顯微鏡 (Scanning Electron Microscopy, SEM)：

將製備穿透式電子顯微鏡樣品中，超薄切片後的梯形塑塊表面，直接用於掃描式電子顯微鏡的觀察。將梯形塑塊黏至 SEM 載台 (stub) 上，以真空鍍碳機 (sputter) 在樣品表面鍍上一層厚約 300-400 \AA 的碳膜後即可上機觀察。

2.4.4 外加能量分散光譜儀 (energy dispersive X-ray spectrometer, EDS) :

在掃描式電子顯微鏡，電壓 15kV 下，觀察樣品切面，選取特定範圍對磷、鈣的分佈進行元素成分分析，取得元素成分的相關分佈圖 (mapping)。

