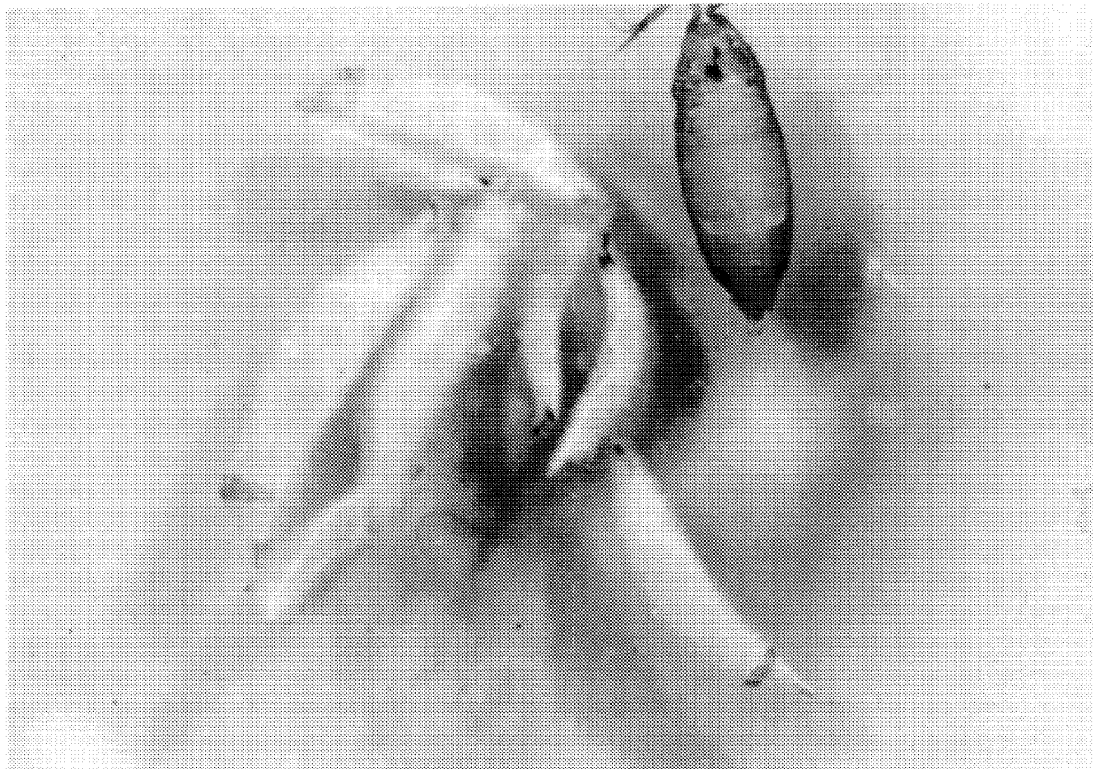


地理分隔與物種演化

高中組生物科第二名

臺北市立第一女子高級中學

作者、朱美娟、林佩如、趙振瑞
何怡澄、何秉真、汪嘉懿
何佳靜
指導人員：林英子



一、動 機

生物課本上提到把青蛙、蟾蜍的卵放在同一環境中培養，結果仍發育成不同的個體，這是由於DNA控制了生物的遺傳，使異種生物間因基因的不同而產生不同的子代。但是同種的生物間是否會因地理環境的不同而有所差異呢？如果地理環境會對其發生影響，是僅限於外表的性狀呢？還是在遺傳組成亦有所改變呢？爲了尋求此一答案，

我們收集了烏來、鳳林、埔里、墾丁等處的紅果蠅，分別代表臺灣北、東、中、南部不同的地理環境，來研究地理環境與物種演化的關係。

二、原 理

蛋白質為具有種別特異性的有機物，酶是蛋白質，故在酶的分析中，可利用其種別性，判斷不同地區之紅果蠅是否具有遺傳組成上的差異。

三、實驗材料與方法

1. 紅果蠅的培養：

(1) 培養基的製備：將玉米粉 100 g，酵母粉 30 g，紅糖 40 g，洋菜粉 10 g，加水 1000 ml 於火上煮，待煮沸後約 10 分鐘即可停火，稍微冷卻後，加入酒精（95%）5 ml，丙酸 5 ml 煮的過程中要隨時攪動，以免沾鍋。再分別裝入已滅菌好的培養紅果蠅的玻璃管中，約 2.5 cm 高，備用。

(2) 紅果蠅的培養：紅果蠅的品系由中研院動物研究所林飛棧先生提供。取烏來、鳳林、埔里、墾丁四個地方的紅果蠅數對，分別裝入四個已有培養基的管中，以棉花塞塞好，使其產卵。

(3) 紅果蠅的移殖：約經過 5~10 天，將原裝在管中之紅果蠅移殖到一新的管中（內有培養基），操作過程一將兩管口相接，新的管子在上，讓紅果蠅自動爬上去，而移殖到新培養基的玻璃管中。

2. 平板膠體電泳法：

(1) 平板膠體的製備：

(a) 膠體緩衝液（5x gel buffer）：75 mM Tris 5 mM 檸檬酸（citric acid）（取 9.2 g Tris，citric acid 1.05 g，加水至 200 ml，pH 值約 8.65）。

(b) 膠體溶液（30%）：取 Acrylamide（ C_3H_5NO ）30 g 和 NN' -Methylenebis-acrylamide [$(CH_2 : CHCONH)_2CH_2$] 0.8 g 再加水至 100 ml。

(c) Ammoniumpersulfate 溶液（1.6%）：取 1.6 g 加水

至 100 ml 。

(d)電泳膠體的製備：取 A : B : H₂O = 24 : 28 : 65 之比例配製，混合抽氣後先加入 TEMED 0.1 % ，再加入 C (體積約為總體積的 1 / 40) 全部混合後，再倒入平板槽內約半小時後就可取出備用，膠體濃度約 7 % 。

(2)電泳緩衝液 (electrode buffer) : 300 mM boric acid (硼酸) 和 60 mM NaOH (取 37.09 克硼酸，NaOH 4.8 克，加水至 2 公升，pH 值約等於 8.25) 。

(3)酯解酶 (Esterase) 的製備：在顯微鏡下分辨出雄、雌紅果蠅 (圖一為雌果蠅，圖二為雄果蠅) 將雌果蠅用乙醚麻醉後，放在滴有少許蒸餾水 (0.013 ml) 之小塑膠槽內，用玻棒搗碎，分別用濾紙 (0.45 mm × 0.8 mm) 吸其汁液。

(4)放入酶及開電源：將做好的平板膠體放入電泳裝置上，在左右電泳槽內放入電泳緩衝液，通電，再將處理過的濾紙 (內含酶) 放入小樣品槽內，電泳時所使用的電流為膠體板長度，每 1 cm 需 15 V 之電壓，通電約 5 小時，指示色帶移動約 15 公分。

(5)染色及褪色：

(a)改變 pH 值：將平板膠體浸在預先配好的硼酸中 (15g 之硼酸加水至 500 ml) 約經 30 分鐘，並時時搖動，使膠體的 pH 值改變為約 6.5 。

(b)染色：取 α - NAPHTHYL ACETATE 60 mg 先用丙酮數滴溶解和 FAST GARNET GBC SALT 120 mg 和緩衝液 (0.2 M Na₂HPO₄ 31.5 ml + 0.2 M NaH₂PO₄ 68.5 ml + H₂O 100 ml) 0.1 M 200 ml 完全攪勻後，再將平板膠體浸入約 1 小時。

(c)褪色：用 7 % 之醋酸褪色，直到色帶清晰為止。

(6)畫圖。

四、實驗結果與討論

1 紅果蠅培養結果：

(1)雌雄紅果蠅移殖到新培養基後，即可開始產卵。

(2)卵約經一天半後孵化成幼蟲。

(3)約 7 天後成蛹。

(4)約 10 或 12 天即為成蟲。

2. 電泳實驗結果：

(1)電泳膠體染色後：

A 膠體內的酶 pH 值約為 8.5 故帶負電，所以通電時會由負極向正極方向移動。

B Est—1 為大分子酶活動的位置，Est—C 為小份子酶活動的位置。

(2)由電泳實驗後膠體上所呈褐帶分布的情況，算出比例來，方法是：以鳳林為例，Est—C 中對偶子為 1.05 的有 4 條，而 Est—C 共有 26 條 $\therefore 4 / 26 \div 0.1538$ ，依次即可逐一算出其結果，如表一。

(3)依表一所算出的比例數值我們代入公式，而求得遺傳相似度與遺傳距離。

$$\text{公式： } I (\text{遺傳相似度}) = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}}$$

$$D (\text{遺傳距離}) = -\log_e I = -\ln I$$

a. 計算方法：

例如：以烏來(1)與鳳林來作比較，可由表一的數據算出遺傳相似度及遺傳距離。

(a) Est—1 的比較 (X 代表鳳林，Y 代表烏來)

$$\begin{array}{r} 0.1714 \times 0.4800 = 0.0823 \\ \Sigma X_i Y_i \implies 0.5429 \times 0.3600 = 0.1954 \\ +) 0.2857 \times 0.1600 = 0.0457 \\ \hline 0.3234 \end{array}$$

$$\sqrt{\Sigma X_i^2 \Sigma Y_i^2} \implies \sqrt{\left[\begin{array}{c} 0.1714^2 \\ 0.5429^2 \\ + 0.2857^2 \\ \hline 0.4057 \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} 0.4800^2 \\ 0.3600^2 \\ + 0.1600^2 \\ \hline 0.3856 \end{array} \right]} = \sqrt{0.1564} = 0.3955$$

$$I (\text{遺傳相似度}) = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}} = \frac{0.3234}{0.3955} = 0.8177$$

$$D (\text{遺傳距離}) = -\log_e I = -\ln I = -\ln 0.8177 = 0.2013$$

(b) Est—C 的比較

$$\begin{array}{r} \sum X_i Y_i \Rightarrow \\ 0.2692 \times 0.3750 = 0.1009 \\ 0.5769 \times 0.6250 = 0.3606 \\ +) 0.1538 \times 0.0000 = 0.0000 \\ \hline 0.4615 \end{array}$$

$$\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2} \Rightarrow \sqrt{\left[\begin{array}{c} 0.2692^2 \\ 0.5769^2 \\ + 0.1538^2 \\ \hline 0.1228 \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} 0.3750^2 \\ 0.6250^2 \\ + 0.0000^2 \\ \hline 0.5312 \end{array} \right]} = \sqrt{0.2278} = 0.4773$$

$$I (\text{遺傳相似度}) = \frac{\sum X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}} = \frac{0.4615}{0.4773} = 0.9668$$

$$D (\text{遺傳距離}) = -\log_e I = -\ln I = -\ln 0.9668 = 0.0338$$

(c) 以 Est—1 與 Est—C 所求得 I、D 值之平均值，為鳳林與烏來(1)之總比較

$$I (\text{遺傳相似度}) = (0.8177 + 0.9668) \div 2 = 0.8923$$

$$D (\text{遺傳距離}) = (0.2013 + 0.0338) \div 2 = 0.1176$$

(d) 其餘者依此方法逐一算出(例 2: 若要算烏來(1)與烏來(2)之比較，則 X 表烏來(1)，Y 表烏來(2)之表一數值再代入公式求出)

b. 由公式計算所得，可知每兩地方之紅果蠅的遺傳相似度與遺傳距離，列表如表二。(右上方為遺傳相似度，左下方為遺傳距離)。

(4) 比較四個地方(五片膠體)果蠅的相似度，又遺傳距離乃指基因的相異程度(遺傳距離)，而遺傳距離愈小者，則遺傳相似度愈大，故圖 9 我們即單以遺傳相似度之數據比較之。

(a) 各個地方的紅果蠅由於地理分隔的差異，已使其基因變異的頻度產生不同，利用分類方法上的雙分法(dichotomy)，將各地

區之紅果蠅族群之酯解酶的頻度，而建立此系統網，亦即種內之遺傳分化（物種演化）之程度的不同。

(b)實驗中我們取二片膠體同作烏來的紅果蠅實驗，結果二者的相似度最大，可見同一地理環境內同種生物間遺傳組成之差異是極小的。

五、結 論

1. 由以上實驗可獲得一結論，原為同種的生物，由於地理環境不同，以至於影響體內基因的改變，本實驗所得的結果，即酯解酶頻度的改變，表示了各種不同族群之間的遺傳組成產生了變化，因此地理分隔影響了物種的演化。

2. 紅果蠅身上常有紅蜘蛛寄生，吸食牠的血液，實驗時易引起誤差，防治的方法是要時常移殖。移殖時，僅取那些爬速快的果蠅。（有紅蜘蛛寄生的果蠅，身體弱，爬速慢）

3. 膠體配製時，要注意適當的濃度，最好是 7%，若大於 7% 則大分子的酶跑電泳的情形不夠理想。

4. 雌果蠅之性染色體為 X X，雄果蠅為 X Y，而我們需要的酯解酶可能存在於 X 染色體上，故取雌果蠅來分析酶的效果比用雄果蠅來分析更好。

5. 判別雌雄紅果蠅的方法：雌蠅的產卵器在尾巴背面，且體形較長，腹部長而尖，雄蠅的交尾器在尾巴的腹面，體形較短，且腹部成圓筒狀。又雄蠅的胸部側面有一縱褐色帶，而雌的紅果蠅則無。

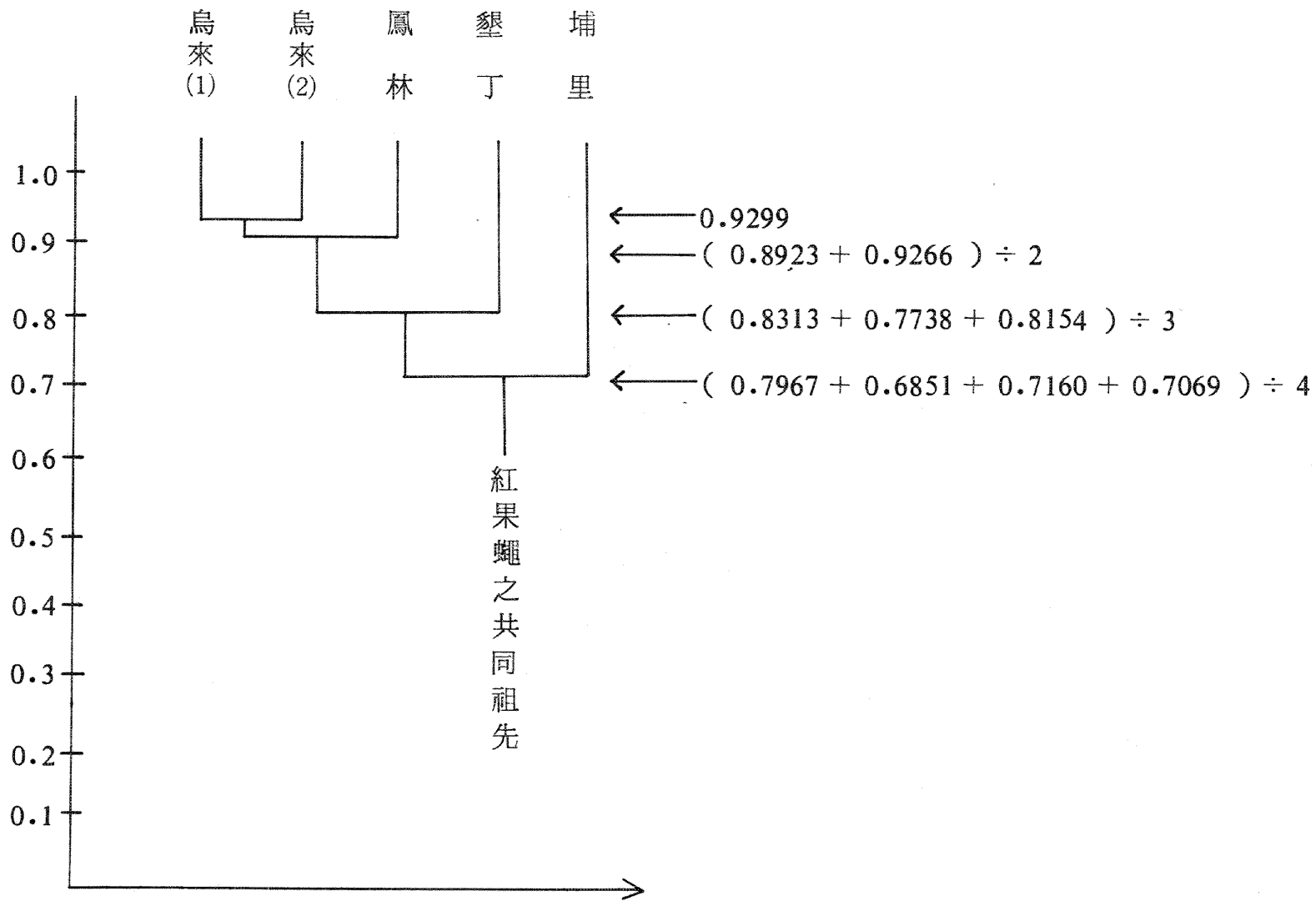
6. 藍色之指示劑（B.P.B）在電泳中跑的速度比酶還快，所以可藉指示劑的位置得知酶的約略位置。

7. 膠體之 pH 值原為 8.6，使酶帶負電，故在染色前，先以硼酸改變膠體的 pH 值。

8. 酶在膠體上之位置原看不見，酶與受酶質作用後加染劑，即可看到有酶的位置成褐帶。

9. 剛孵化出來的紅果蠅成蟲，約經 12 小時後即可交配。

10. 同一地理環境內，同種生物間的差異很小。



六、參考資料

1 染色：Ayala , F . J . , Powell , J . R . , Tracey , M . L . , Mourao , C . A . and Perez-Salas , S . , 1972 . Enzyme Variability in the Drosophila Willistoni Group IV . Genic Variation in Natural Populations of Drosophila Willistoni Genetics 70 : 113 - 139 (承指導老師說明)

2 公式：Nei , M 1972 Genetic distance between populations . American Naturalist , 106 : 283 - 291

族群與族群之間的遺傳距離

3 對偶子：Yang , S . Y . , L . L . Wheeler and I . R . Book 1972 Isozyme variations and phylogenetic relationships in the Drosophila hipectinata species Complex . University of Texas Publication , Studies in Genetics VII . 7213 : 213-227

雙性梳果蠅種群之酯解酶的變異與其進化分歧的關係

4 平板膠體製作：

林英子 1979 溶菌酶大量存在於蛋白內的生理意義 生物科學第 14 期。

評語：(一)本作品內容豐富，數據整理甚佳，研究方法正確。

(二)實驗結果，應展示電冰膠經染色後之相片圖，以提高其正確性。