

中華民國第四十五屆中小學科學展覽會  
作品說明書

---

高中組 生物(生命科學)科

第一名

040703

酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響

國立基隆女子高級中學

作者姓名：

高二 蔡旻臻 高二 朱育欣 高二 尤嘉倫

指導老師：

郭麗香 楊惠雯

# 酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響

## 摘要

生物胚胎的發育過程，如果接觸到某些外來的藥物，就有可能會增加胚胎異常的機率，導致某種器官畸形發育，甚至死亡。

本實驗利用斑馬魚胚胎為材料，將受精卵浸泡於不同濃度的酒精及尼古丁溶液，觀察其對胚胎發育的影響。結果顯示浸泡於酒精的胚胎，會造成軀幹彎曲、尾部扭曲、眼睛和頭顱變小，色素分佈異常，內耳的三半規管發育畸形，心包膜、卵黃囊和氣鰾有膨大等現象。利用頭骨染色、組織切片與定位雜交法，進一步了解酒精對胚胎頭骨及眼睛的發育的影響，發現頭骨縮短、鰓弧角度變大、篩板消失，另外眼睛的細胞型態也有分化異常的現象。而以尼古丁浸泡的胚胎，其卵黃囊膨大、色素變淡，且隨著尼古丁濃度上升胚胎死亡率有上升的趨勢。由此實驗結果證明酒精和尼古丁會對胚胎發育造成影響。

## 壹、研究動機

在一次社團活動生物科技應用的專題演講中，我們三人對於胚胎發育，產生了興趣，於是談到可利用線蟲、果蠅、斑馬魚和小白鼠等，作為研究胚胎發育的實驗對象，因而對實驗有了初步的構想。小白鼠是最理想的實驗動物，但其體內受精，觀察不易。斑馬魚產卵數多（一次 100~200 個）、卵透明易於觀察、飼養簡單、體積小、發育時間短（從受精到孵化只需 48 小時），因此我們選定牠為實驗材料。

青少年常見的濫用物質，以菸酒佔的比例最高，抽煙之所以會成癮是由於香菸中的尼古丁，醫學上亦認為尼古丁和酒精都算是一種藥物。但是酒精和尼古丁，到底對胚胎發育的影響有多大？又會造成哪些器官的發育畸形？我們希望藉由斑馬魚的受精卵為對象，能從中更加了解酒精及尼古丁對於胚胎的危害。

## 貳、研究目的

- 一、探討酒精對胚胎致死率的影響。
- 二、不同濃度的酒精對胚胎發育的影響。
- 三、探討尼古丁對胚胎致死率的影響。
- 四、不同濃度的尼古丁對胚胎發育的影響。

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗生物

斑馬魚

### 二、一般化學藥品

菸鹼酒石酸氫 (Nicotine hydrogen tartrate salt)、100% 絕對酒精 (absolute alcohol)、色素抑制劑 (PTU, 1-phenyl-2-thiourea)、聚甲醛 (Paraformaldehyde)、阿爾囊藍 (Alcian Blue)、甘油 (glycerol)、磷酸鹽緩衝液 (PBS, Phosphate Buffered Saline)、37%鹽酸 (Hydrochloric Acid)、二甲苯 (Xylene)、石蠟 (Wax)、甘油 (Glycerol)、蘇木紫溶液 (Gill-Hematoxyl)、伊紅 (Eosin)、甲醇 (Methanol)、甲醯胺 (Formamide)、肝素 (Heparin)、酵母菌 tRNA (Yeast tRNA)、順丁烯二酸 (Maleic acid)、阻滯劑 (blocking reagent)、氯化鈉 (NaCl)、氯化鎂 (MgCl<sub>2</sub>)、三羥甲基氨基甲烷 (Tris-HCl)、Tween20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium sal)、NBT (nitro blue tetrazolium)。

### 三、酵素試劑

胰蛋白酶 (2% trypsin-EDTA)

蛋白酶 (50ng/ml Proteinase K)

### 四、實驗藥品及配方

#### (一) 0.37%鹽酸

2.5ml 37%鹽酸

247.5ml 蒸餾水

#### (二) 酸性酒精

140ml 100%絕對酒精

60ml 0.37%鹽酸

#### (三) 0.1% 阿爾囊藍

酸性酒精 50ml

阿爾囊藍粉末 5g

(五) 0.015%酒精 0.075ml 100%絕對酒精加水稀釋到 500ml，

0.15%酒精 0.75ml 100%絕對酒精加水稀釋到 500ml，

1.5%酒精 7.5ml 100%絕對酒精加水稀釋到 500ml，

3%酒精 15 ml 100%絕對酒精加水稀釋到 500ml。

(六) 70% 甘油 35 ml 甘油加 15 ml 蒸餾水。

#### (七) 蛋白甘油

取蛋白清與等量之甘油混合，攪拌均勻後，加入少許麝香草腦 (Thymol)，當防腐劑，過濾後貯藏於冰箱內，可保存數月。

(十) 蘇木紫溶液 (Gill-Hematoxyl)

蒸餾水.....690 ml  
乙二醇 (Ethylene glycol) .....250 ml  
蘇木紫.....6mg  
碘酸鈉 (Sodium idoate) ..... 0.6mg  
硫酸鋁 (Aluminum Sulfate) .....52.8gm  
冰醋酸 (Glacial acetic acid) .....60ml

(十一) 伊紅 (Eosin)

伊紅 Y (Eosin Y) .....10gm  
橙 G (Orange G) .....2.5gm  
酸性復紅 (Acid fuchsin) .....1.26gm  
蒸餾水 .....300 ml  
無水酒精 .....700 ml  
冰醋酸 .....0.5ml

(十二) 磷酸鹽緩衝液 (PBS, Phosphate Buffered Saline)

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.88g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH7.4	0.48g
蒸餾水	1000 ml

(十三) 4%聚甲醛 4 g 聚甲醛加 100 ml PBS。

(十四) PBT

以 PBS 配製 0.1%Tween 20

(十五) 75%甲醇+25%PBT 75ml 甲醇加 25ml PBT，  
50%甲醇+50%PBT 50ml 甲醇加 50ml PBT，  
25%甲醇+75%PBT 25ml 甲醇加 75ml PBT。

(十六) 20×SSC

NaCl	87.64g
Na citrate	44.1g
蒸餾水	500ml

(十七) HYB<sup>-</sup>

50-70% Formamide  
5× SSC  
0.1% Tween20

(十八) HYB<sup>+</sup>

HYB<sup>-</sup> 內含有  
50 μg/ml Heparin  
500 μg/ml Yeast tRNA

(十九) 順丁烯二酸溶液 (Maleic acid buffer)

100mM Maleic acid

150mM NaCl

0.1% Tween20

(二十) 阻滯液 (blocking solution)

1g blocking reagent

100ml Maleic acid buffer

(二十一) NTMT

0.1M NaCl

0.1% Tween20

50mM MgCl<sub>2</sub>

0.1M Tris-HCl

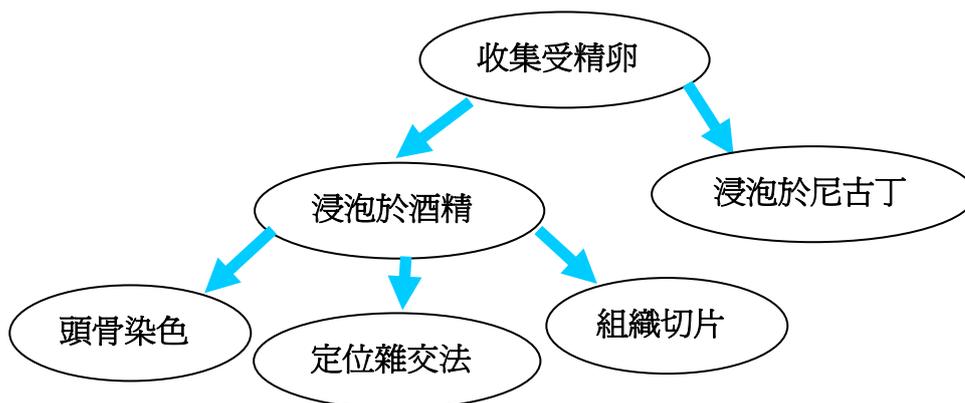
(二十二) 呈色劑 (BCIP/NBT)

每 1 ml NTMT 加	3.5 μl	BCIP
	4.5 μl	NBT

## 五、器材

魚缸、打氣馬達、打氣管、底砂、恆溫培養箱、培養皿、滴管、50ml 試管、1.5ml 微量試管、微量吸管 (micropipette)、微吸管頭 (Micro Pipettor tip)、血清瓶、微量天平、秤量紙、藥匙、解剖顯微鏡、複式顯微鏡、載玻片、蓋玻片、檯燈、石蠟切片機、包埋匣、包埋盒。

## 肆、研究過程及方法



在實驗進行的過程當中，若要進一步地觀察頭骨的形態和眼睛的構造，需要的實驗技術有頭骨染色、定位雜交法和組織切片。在和老師討論後，得知有關頭骨的構造、頭骨染色和定位雜交法的技術可以參考鍾欣怡 92 年的論文 (參一)，而組織切片的技術則可參考高銘都著病理組織切片技術一書 (參三)。另外在斑馬魚內耳的構造和發育的情形可參考楊惠雯 92 年的論文 (參二、附圖一)。

一、斑馬魚受精卵收集（參看照片 1~6）

雌魚 + 雄魚  $\xrightarrow[5\sim 10\text{分鐘}]{\text{追尾}}$  產生受精卵  $\xrightarrow{\text{收集2hpf內}}$  浸泡於不同濃度的酒精中  
 $\xrightarrow{\text{發育至14hpf}}$  加色素抑制劑  $\xrightarrow{\text{發育至120hpf}}$  加4%聚甲醛  $\xrightarrow{\text{固定}}$  在4°C冰箱14~16小時。

註一：2hpf (hour post-fertilization)，表發育 2 個小時的受精卵。

		
<p>1. 將斑馬魚用鐵絲網隔開，避免受精卵被噬</p>	<p>2. 將斑馬魚移回原來的魚缸</p>	<p>3. 用魚網收集受精卵</p>
		
<p>4. 用清水將糞便清洗乾淨</p>	<p>5. 加入不同濃度的酒精</p>	<p>6. 放入恆溫培養箱培養</p>

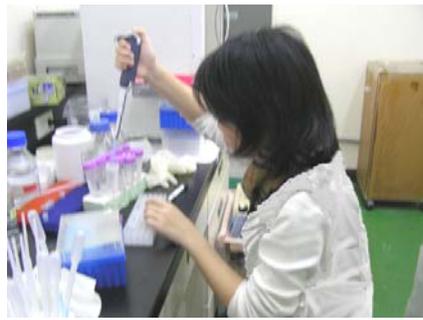
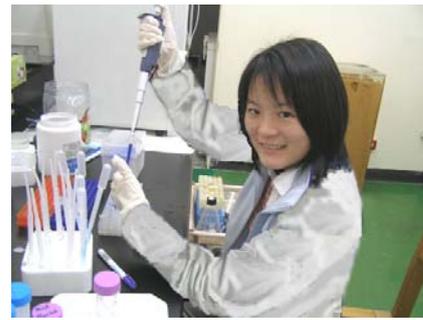
## 二、頭骨染色（參看照片 7~12）

### (一)骨頭染色—阿爾囊藍(Alcian Blue)

以 PBS 清洗  $\xrightarrow[\text{重複 3 次}]{5\text{min}}$  置換酸性酒精  $\xrightarrow{\text{浸潤}}$  置換 0.1% 阿爾囊藍  $\xrightarrow{\text{染色}}$  隔夜。

### (二)清洗

加酸性酒精清洗  $\xrightarrow[\text{重複 3 次}]{1\text{hr}}$  75%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  50%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  25%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  加 PBS 清洗  $\xrightarrow[\text{重複 3 次}]{5\text{min}}$  胰蛋白酶  $\xrightarrow{100\text{min}}$  加 PBS 清洗  $\xrightarrow[\text{重複 3 次}]{5\text{min}}$  加 70%甘油  $\rightarrow$  拍照。

		
7. 將 120hpf 斑馬魚胚胎固定	8. 以 PBS 反覆清洗	9. 加 0.1% 阿爾囊藍染色
		
10. 加酸性酒精反覆清洗	11. 照相	12. 以昆蟲針調整胚胎位置

### 三、石臘組織切片（參看照片 13~18）

#### (一)脫水

50%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  70%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  80%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  90%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  95%酒精  
 $\xrightarrow{5\text{min}}$  100%酒精  $\xrightarrow{5\text{min}}$  重複二次。

#### (二)浸潤（參看照片13~18）

加二甲苯  $\xrightarrow[重複\ 3\ 次]{20\text{min}}$  置換 65°C 石蠟  $\xrightarrow[重複\ 3\ 次]{1\text{hr}}$  浸潤至隔夜  $\rightarrow$  包埋  $\rightarrow$  切片  $\xrightarrow[32^\circ\text{C}]{\text{水浴槽}}$  展片  $\rightarrow$  32°C 風乾。

		
13. 將石蠟、包埋盒和包埋夾預熱於 65°C	14. 將樣本置於包埋盒中	15. 蓋上包埋夾，加石蠟填滿包埋盒
		
16. 連續切片	17. 將展片好的石蠟薄片附著於載玻片上	18. 風乾

(三)脫蠟 (參看照片 19~21)

二甲苯  $\xrightarrow[4次]{10min}$  100%酒精  $\rightarrow$  95%酒精  $\rightarrow$  70%酒精  $\rightarrow$  50%酒精  $\rightarrow$  蒸餾水  $\rightarrow$  重複清洗二次。

		
19. 將玻片放置於金屬籃中	20. 置入二甲苯脫除石蠟	21. 以蒸餾水清洗

(四)染色 (參看照片 22~24)

以蘇木紫染細胞核  $\xrightarrow{2min}$  蒸餾水清洗  $\xrightarrow[重複2次]$  浸潤 70%酒精  $\rightarrow$  以伊紅染細胞質  
 $\xrightarrow{25秒}$   $\rightarrow$  95%酒精  $\xrightarrow[重複2次]$   $\rightarrow$  100%酒精  $\xrightarrow[重複2次]$   $\rightarrow$  二甲苯  $\xrightarrow[重複3次]$   $\rightarrow$  風乾  
 $\xrightarrow{10 \sim 30min}$   $\rightarrow$  封片。

		
22. 封片	23. 將封片膠滴於蓋玻片中央	24. 以載玻片蓋蓋玻片

四、定位雜交 (參看照片 25~27)

(一)樣品保存

加4%聚甲醛  $\xrightarrow{固定}$   $\rightarrow$  在4°C冰箱, 14~16小時  $\rightarrow$  置換PBS清洗  $\xrightarrow[重複3次]{5min}$   $\rightarrow$  25%甲醇+75%PBT  
 $\xrightarrow{5min}$   $\rightarrow$  50%甲醇+50%PBT  $\xrightarrow{5min}$   $\rightarrow$  75%甲醇+25%PBT  $\xrightarrow{5min}$   $\rightarrow$  100%甲醇  $\xrightarrow{10min}$   $\rightarrow$  在  
 -20°C冰箱。  
 2次

(二)樣品覆水

75%甲醇+25%PBS  $\xrightarrow{5\text{min}}$  50%甲醇+50%PBS  $\xrightarrow{5\text{min}}$  25%甲醇+75%PBS  $\xrightarrow{5\text{min}}$  1×  
 PBS  $\xrightarrow{5\text{min}}$  4次。

### (三)蛋白酶處理

蛋白酶  $\xrightarrow{20\text{min}}$  PBT 清洗  $\xrightarrow{\text{重複2次}}$  4%聚甲醛固定  $\xrightarrow{20\text{min}}$  1×PBS  $\xrightarrow{5\text{min}}$  4次。

### (四)雜交反應

加HYB<sup>+</sup>  $\xrightarrow[65^{\circ}\text{C}]{2\text{hr}}$  加RNA探針(事先於68°C加熱10min,再置冰5min)  $\xrightarrow{65^{\circ}\text{C}}$  14~16hr。

### (五)探針偵測

75%HYB<sup>+</sup> + 25% 2×SSC  $\xrightarrow[65^{\circ}\text{C}]{10\text{min}}$  50% HYB<sup>+</sup> + 50% 2×SSC  $\xrightarrow[65^{\circ}\text{C}]{10\text{min}}$  25% HYB<sup>+</sup> + 75% 2×  
 SSC  $\xrightarrow[65^{\circ}\text{C}]{10\text{min}}$  2×SSC  $\xrightarrow[65^{\circ}\text{C}]{10\text{min}}$  0.2×SSC  $\xrightarrow[65^{\circ}\text{C}]{45\text{min}}$  2次 Maleic acid buffer  $\xrightarrow[\text{室溫}]{\text{清洗2次}}$  阻  
 滯液  $\xrightarrow[\text{室溫}]{3\text{hr}}$  抗-DIG抗體  $\xrightarrow[4^{\circ}\text{C 冰箱}]{}$  14~16hr。

### (六)呈色反應

置換 Maleic acid buffer 清洗  $\xrightarrow[4\text{次}]{30\text{min}}$  NTMT  $\xrightarrow[3\text{次}]{5\text{min}}$  加 BCIP/NBT 呈色  $\xrightarrow{2\sim 4\text{hr}}$   
 PBT 清洗  $\xrightarrow[3\text{次}]{5\text{min}}$  100%甲醇  $\xrightarrow[3\text{次}]{20\text{min}}$  70%glycerol  $\rightarrow 4^{\circ}\text{C 冰箱保存}$ 。



25. 覆水



26. 雜交反應

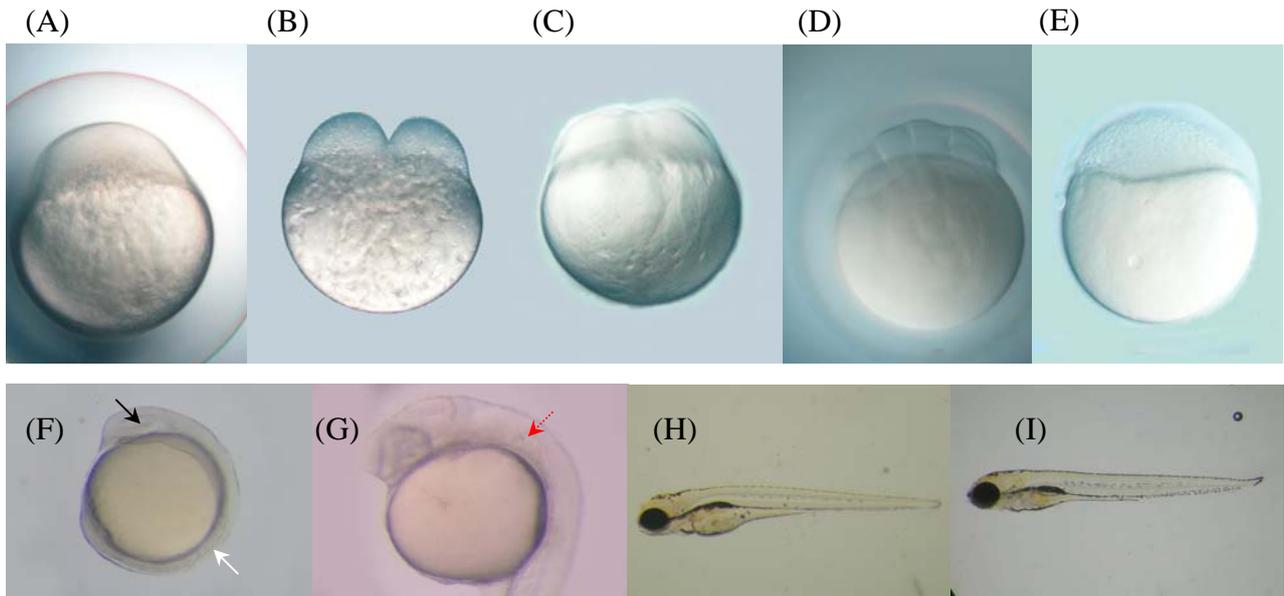


27. 呈色

## 伍、研究結果

## 一、斑馬魚的胚胎發育

一個細胞的受精卵（圖一，A），45 分鐘後分裂為兩個細胞（圖一，B），1 個小時後分裂為 4 個細胞（圖一，C），1 小時 30 分鐘後已經有八個細胞（圖一，D），受精後 4 個小時已經分裂出數以千計的細胞（圖一，E），在受精受分裂的過程當中，細胞並沒有增大，所以越分裂越小。發育至 12 小時，形成眼基板和六個體節（圖一，F）；24 小時形成視囊和耳囊（圖一，G）；72 小時胚胎已發育為完整的個體（圖一，H），耳囊發育成內耳形成三半規，頭骨以軟骨為主，發育為髓顱和咽弧兩部分。120 小時（圖一，I），各器官的發育更加成熟完備。



圖一、斑馬魚受精卵發育的過程。(A)12 分鐘；(B)45 分鐘；(C)1 小時；(D) 1 小時 30 分鐘；(E) 4 小時；(F) 12 小時；(G) 24 小時；(H) 72 小時；(I) 120 小時。黑色箭頭所指示處為眼基板。白色箭頭所指示處為體節。紅色箭頭所指示處為耳囊。

## 二、酒精對胚胎發育的影響

(一) 測試不同劑量對胚胎死亡率的影響

將受精後兩小時內的斑馬魚胚胎連續浸泡至第五天，酒精濃度分別為 0%、0.015%、0.15%、1.5%和 3%，當酒精濃度高達 3%時，在第二天以後即會完全死亡，死亡率達 100%（表一）。

而 0.015%、0.15%和 1.5%酒精處理的胚胎，在第一天和第二天的死亡體數最多，第三天和第四天逐漸變少，而到第五天的死亡率又明顯增加的現象（表一、圖二）。

表一、酒精處理後對胚胎死亡率的影響

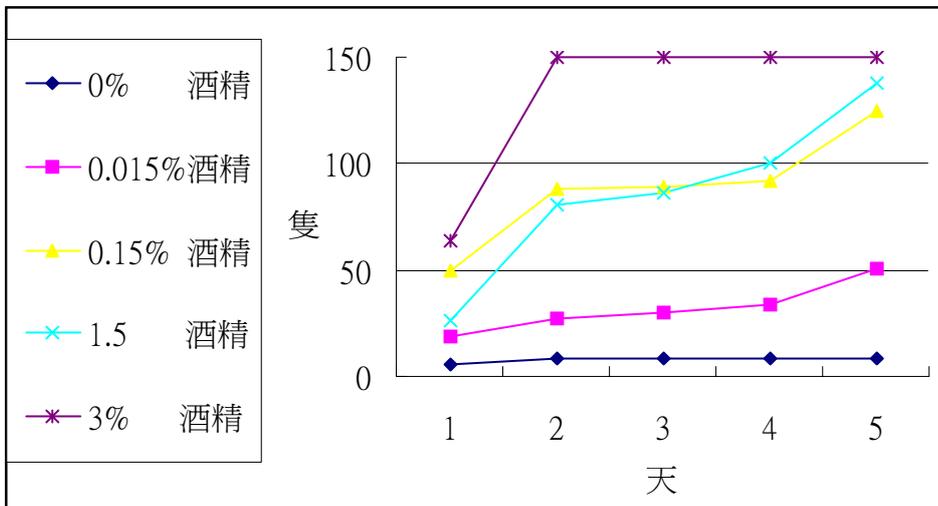
酒精濃度	每天死亡個體數(隻)					死亡率*
	第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日	
0%	6	2	0	0	0	5%
0.015%	19	8	3	4	17	34%
0.15%	50	38	1	3	33	83%
1.5%	26	55	5	14	38	92%
3%	64	86	/	/	/	100%

\*註一：死亡率計算 = (死亡的個體數) / 總數。

註二：每個濃度的總數皆為 150 隻。

註三：畫斜線方格表胚胎已全數死亡。

圖二、酒精處理後對胚胎死亡率的影響



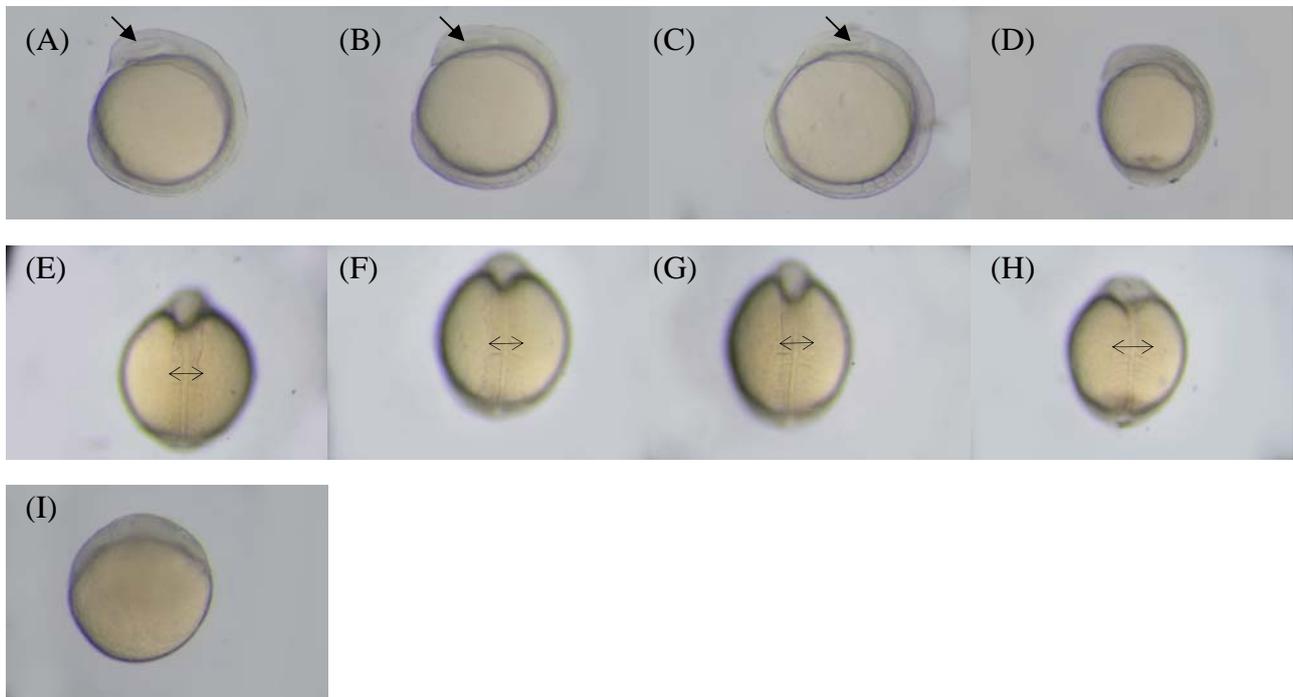
註一：橫座標為胚胎發育的天數，縱座標為死亡個體總數。

註二：第 2 天死亡個體總數 = 第 1 天死亡個體數 + 第 2 天死亡個體數。

第 3 天死亡個體總數 = 第 1 天死亡個體數 + 第 2 天死亡個體數 + 第 3 天死亡個體數。

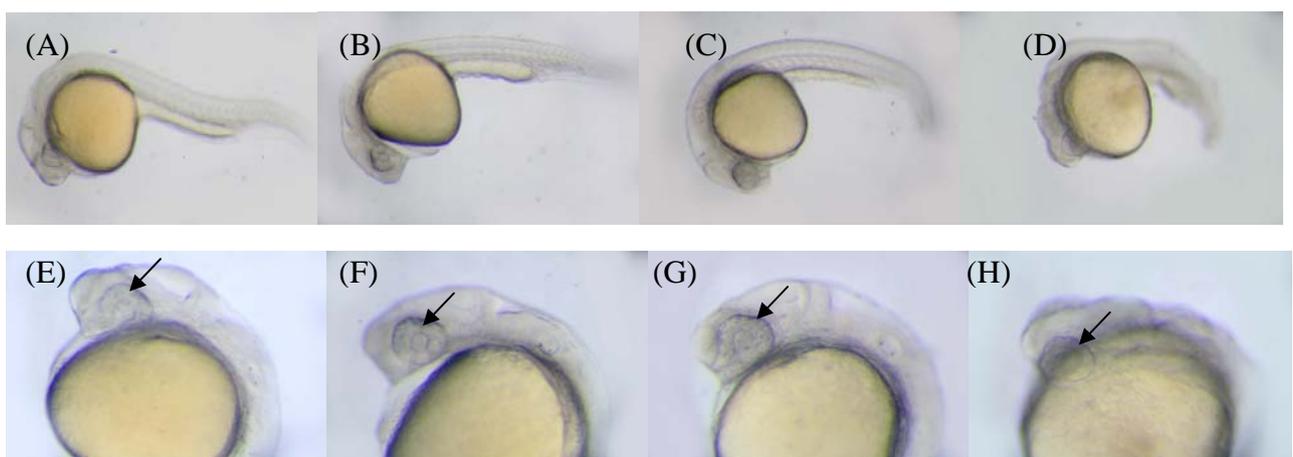
(二) 胚胎外型的觀察

1. 觀察 12hpf 胚胎外型，發育至 12hpf 胚胎，已分化出 6 個體節和眼基板。以 1.5% 酒精處理的胚胎，有發育延遲的現象，眼基板尚未發育（圖三，D），且體節（somite）較寬（圖三，H）。3% 酒精胚胎則是停留在約 5hpf（30%外包，30%epiboly）的胚胎發育階段（圖三，I）。以 0.015%和 0.15%酒精處理，對於胚胎的外型並沒有明顯的變化。



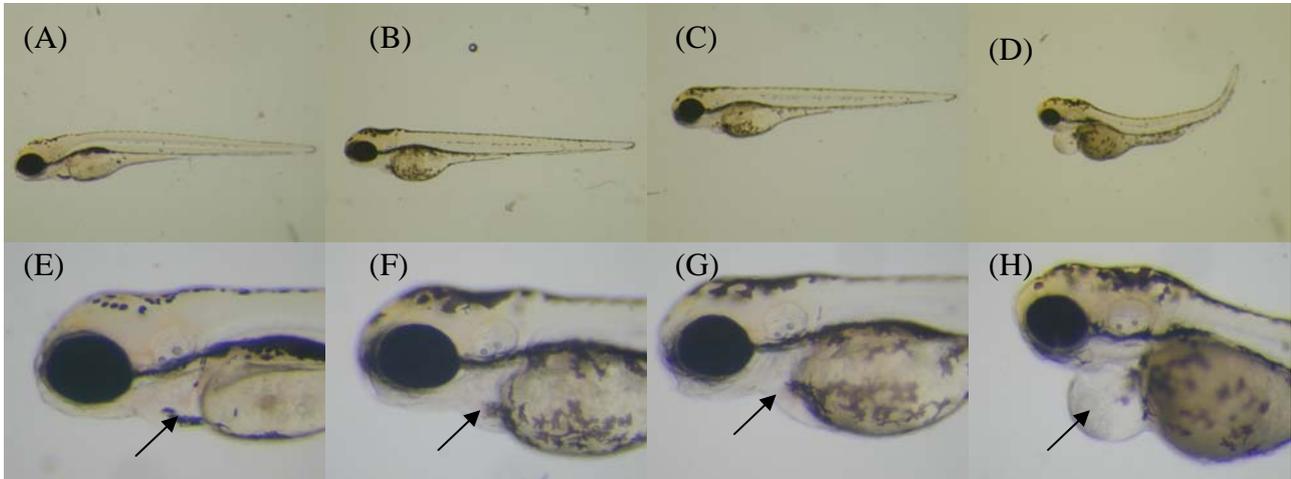
圖三、酒精處理後，對 12hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。(A, E) 對照組，未加酒精；(B, F) 0.015%酒精；(C, G) 0.15%酒精；(D, H) 1.5%酒精；(I) 3%酒精。A~D 是側視圖，頭部朝左，背部朝上。E~H 為背視圖。箭頭所指示處為眼基板。雙箭頭所指示處為體節。

2. 觀察 24hpf 胚胎外型，以 1.5%酒精處理後，軀幹有縮短的現象（圖四，D）。以 0.015%和 0.15%酒精處理，對於胚胎的外型並沒有明顯的變化（圖四，B、C）。



圖四、酒精處理後，對 24hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。(A, E) 對照組，未加酒精；(B, F) 0.015%酒精；(C, G) 0.15%酒精；(D, H) 1.5%酒精。側視圖，頭部朝左，背部朝上。箭頭所指示處為眼。

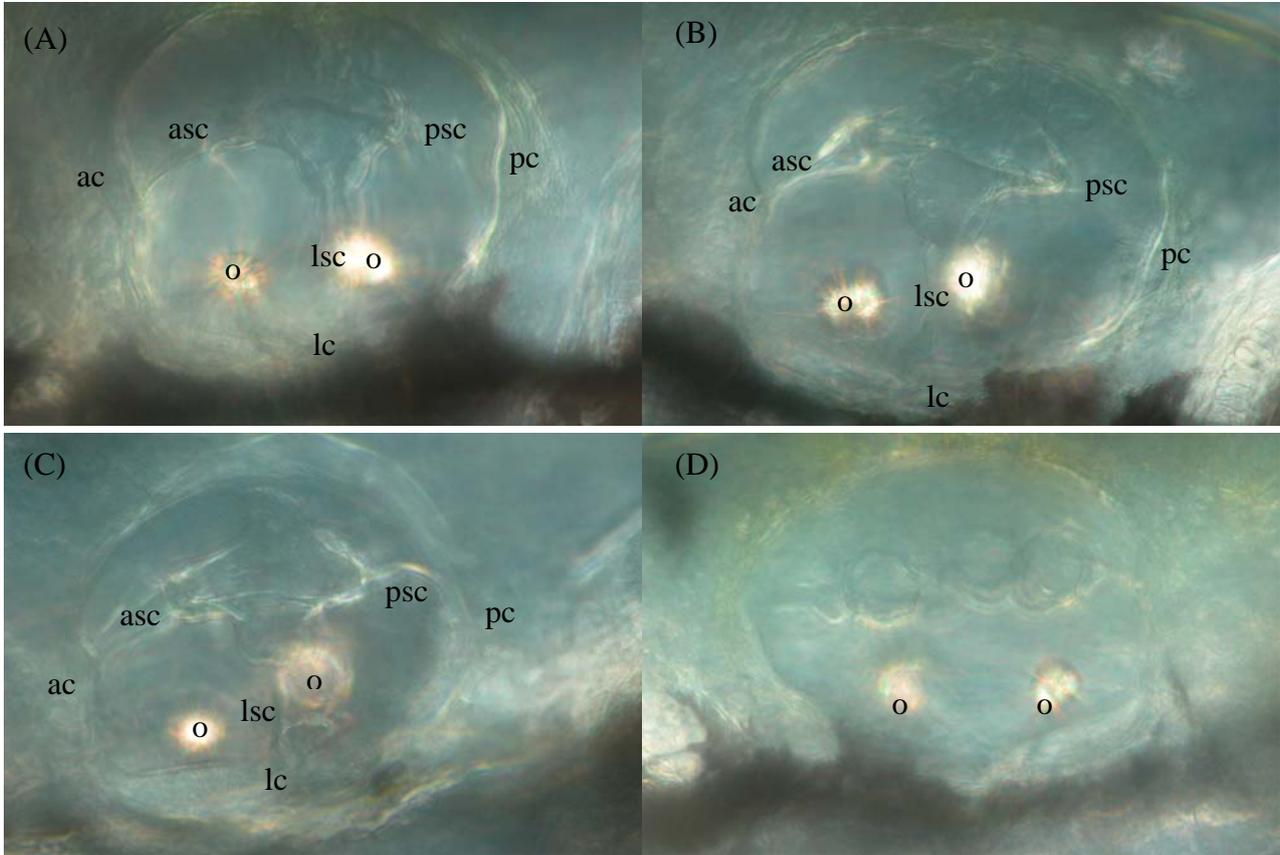
3. 觀察 72hpf 的胚胎外型，以 1.5%酒精處理後，造成胚胎的眼睛和頭顱變小，心包膜、卵黃囊膨大，軀幹呈彎曲狀，尾部扭曲，心臟雖然還在跳動，但心跳速率減慢（圖五，D、H）。



圖五、酒精處理後，對 72hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。(A, E) 對照組，未加酒精；(B, F) 0.015%酒精；(C, G) 0.15%酒精；(D, H) 1.5%酒精。A~H 為側視圖，頭部朝左，背部朝上。箭頭所指示處為心包膜。

4. 將 72hpf 的胚胎，由側視圖來觀察內耳發育的情形。在對照組可明顯看到內耳囊內的三半規管，由前、後和水平三個互相垂直的半規管組成（圖六，A、附圖一）。

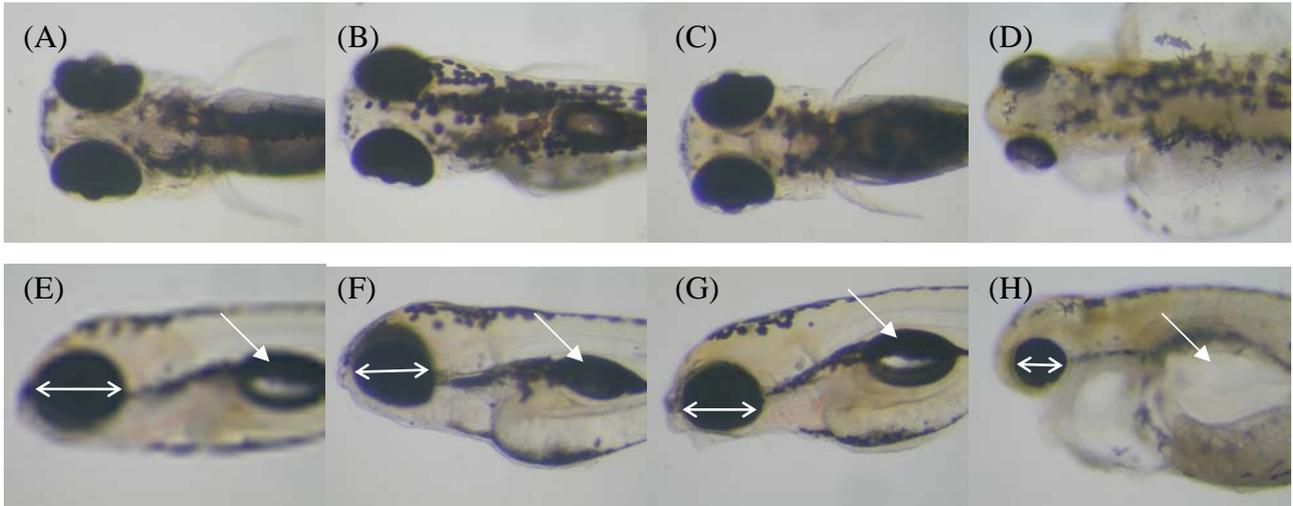
以 0.015%和 0.15%酒精處理的胚胎，其內耳的發育並沒有明顯的變化（圖六，B、C）。以 1.5%酒精處理的胚胎，內耳和對照組相較下，明顯地有發育異常的情形（圖六，D）。



圖六、酒精處理後，對 72 hpf 時期內耳形態的影響。(A) 對照組，未加酒精；(B) 0.015%酒精；(C) 0.15%酒精；(D) 1.5%酒精。側視圖，頭部朝左，背部朝上。  
縮寫：o，otolith 耳石；asc， anterior semicircular canal 前半規管；lsc， lateral semicircular canal 水平半規管； psc， posterior semicircular canal 後半規管；ac， anterior crista 前聽脊；lc， lateral crista 側聽脊；pc， posterior crista 後聽脊。

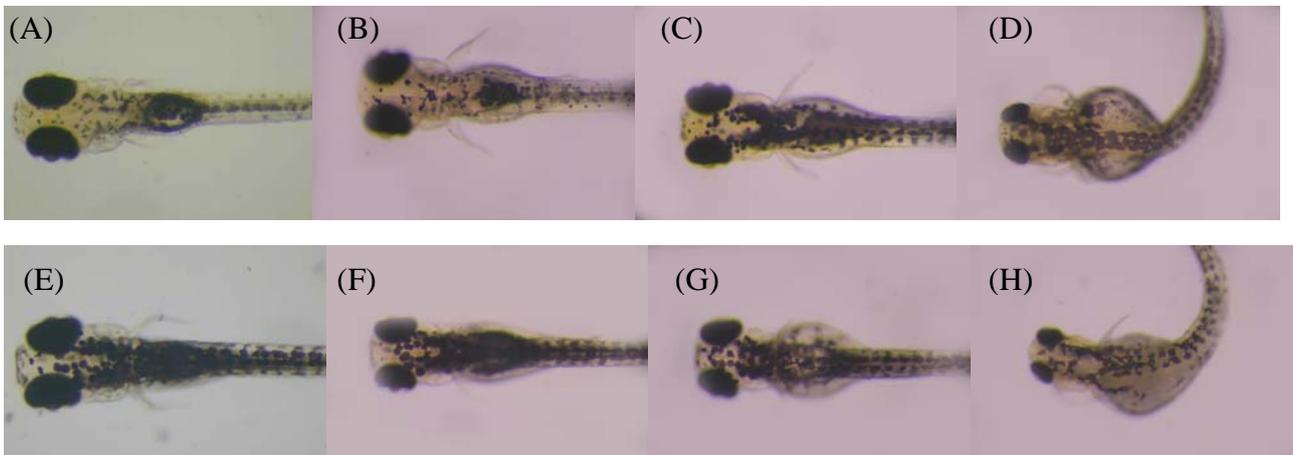
5. 發育至 120hpf 時期更為明顯，以 1.5%酒精處理後的胚胎，氣鰾膨脹，觸碰時無

反應，眼睛無法轉動，且色素分布和正常相異（圖七，D、H），0.015%和0.15%酒精處理，對於胚胎的外型並沒有明顯的變化（圖七，B、C、F、G）。



圖七、酒精處理後，對 120 hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。(A, E) 對照組，未加酒精；(B, F) 0.015%酒精；(C, G) 0.15%酒精；(D, H) 1.5%酒精。A~D 為背視圖，E~H 為側視圖。箭頭所指示處為氣鰾。雙箭頭所指示處為眼睛。

6. 不加酒精的對照組，飼養在黑暗的環境，進而身體色素細胞相對變暗形成保護色，相對的，在長期的光照下，色素自然就變淡，其色素分布明顯較黑暗組減少許多（圖八，A、E）。而以 0.015%酒精和對照組的結果相同，光照組色素顏色明顯變淡（圖八，B、F）。以 0.15%酒精和 1.5%酒精處理後，光照組和黑暗組的色素並無明顯的變化（圖八，C、G、D、H）。

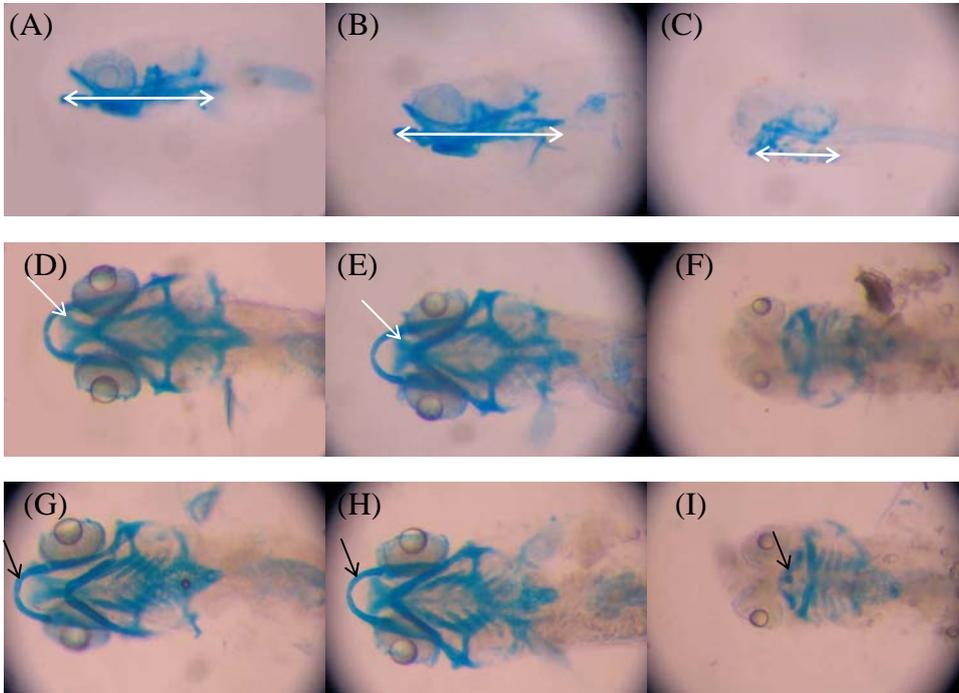


圖八、酒精處理後，對 120 hpf 時期色素形態的影響。A~D 為光照組；E~H 為黑暗組。(A, E) 對照組，未加酒精；(B, F) 0.015%酒精；(C, G) 0.15%酒精；(D, H) 1.5%酒精。背視圖。

7. 為了進一步觀察頭骨發育的情形，於 120hpf 時期，以阿爾囊藍進行軟骨組織染

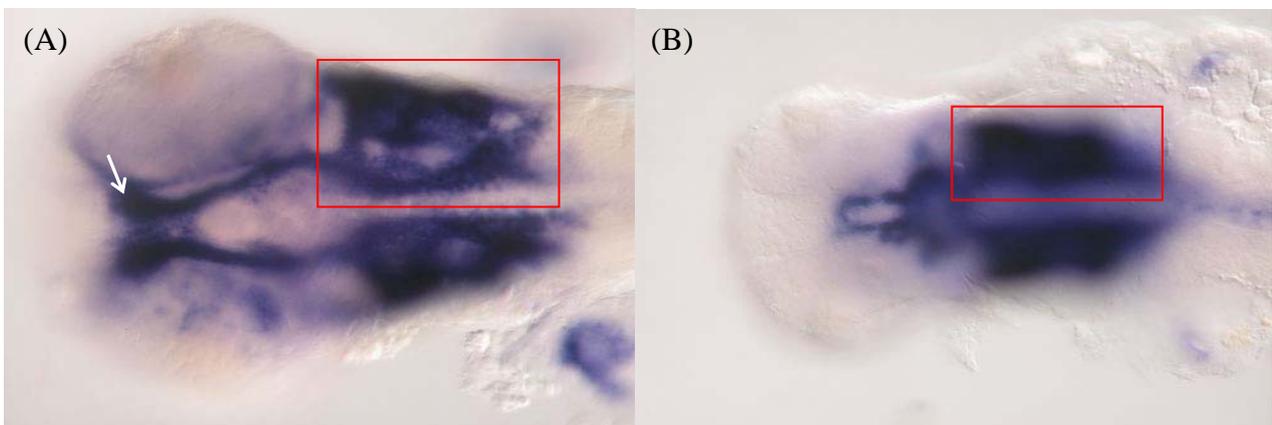
色，以觀察斑馬胚胎頭部軟骨發育情況。

以 1.5%酒精處理的胚胎，在 120 hpf 時期的側面看來頭骨明顯縮短(圖九，C)，由背視圖看來，篩板消失(圖九，F)，由腹面圖看來，第一對和第二對鰓弧角度變大，而三對到第七對鰓弧的角度也有變大的情形(圖九，I)。以 0.15%酒精處理的胚胎，頭骨的外型並沒有明顯的變化(圖九，B、E、H)。



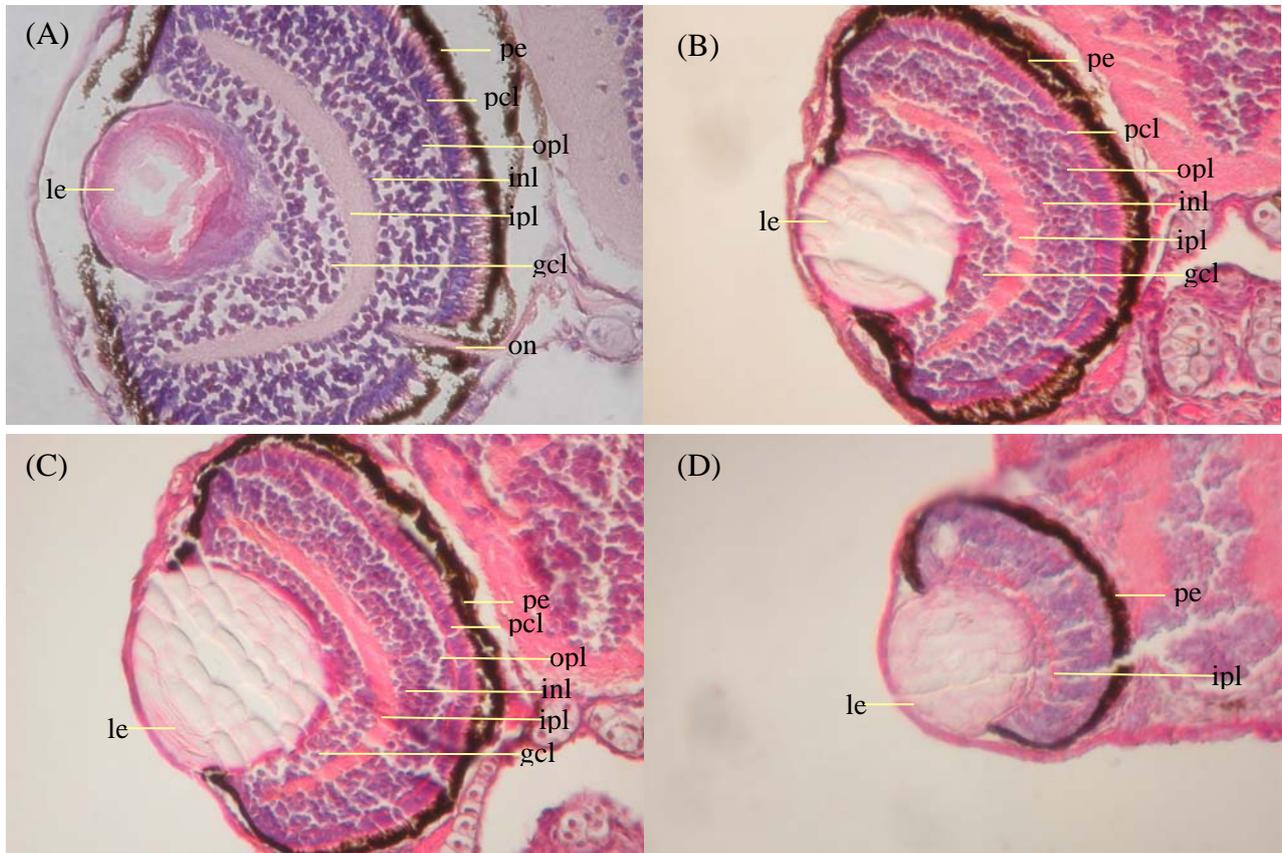
圖九、酒精處理後，對 120 hpf 時期頭骨形態的影響。(A, D, G) 對照組，未加酒精；(B, E, H) 0.15%酒精；(C, F, I) 1.5%酒精。A~C 為側視圖，頭部朝左，背部朝上。D~F 為背視圖。G~I 為腹視圖。雙箭頭所指示處為頭骨，白色箭頭所指示處為篩板，黑色箭頭所指示處為第一對鰓弧。

8. 利用定位雜交法，以 *Co2a1* 為指標基因，觀察軟骨細胞的分化情形。對照組 *Co2a1* 強烈地表現在頭部軟骨細胞。浸泡於 1.5%酒精的胚胎，也許定位發生問題，導致鰓弧軟骨細胞之分布發生異常 (紅色方框)，且位於篩板的位置 *Co2a1* 表現消失(圖十)。



圖十、酒精處理後，72hpf 時期對 *Co2a1* 的影響。(A) 對照組，未加酒精；(B) 1.5%酒精。A、B 為背視圖。白色箭頭所指處為篩板。紅色方框處為鰓弧軟骨細胞

9. 以組織切片觀察眼睛在視網膜的部份，細胞成層狀排列。浸泡於 1.5%酒精的胚胎，眼睛分化的不是很好，而且比較小，細胞雖成層狀排列，但細胞形態不太像正常胚胎般有明顯的各種分化完全的細胞。以 0.15%和 0.015%酒精處理的胚胎和對照組相比，細胞成層狀排列和對照組並沒有明顯的的差異(圖十一，B、C)。



圖十一、酒精處理後，120hpf 組織切片圖。(A) 對照組，未加酒精；(B) 0.015%酒精；(C) 0.15%酒精；(D) 1.5%酒精。le, lens (晶體)、pe, pigment epithelium (網膜色素上皮細胞)、pcl, photoreceptor cell layer (光受器細胞層)、opl, outerplexiform layer (外神經叢層)、inl, inner nuclear layer (內核層)、ipl, interplexiform layer (間神經叢層)、gcl, ganglion cell layer (神經節細胞層)、on, optic nerve (視神經)。

### 三、尼古丁對胚胎發育的影響

#### (一) 死亡率的觀察

將受精後兩小時內的斑馬魚胚胎連續浸泡於不同濃度的尼古丁溶液，隨著尼古丁濃度的增加，胚胎的死亡率逐漸增加的情形（圖十二），當濃度高達 200  $\mu\text{M}$  以上時，死亡率增加至 100%（表二）。

表二、尼古丁處理後對胚胎死亡率的影響

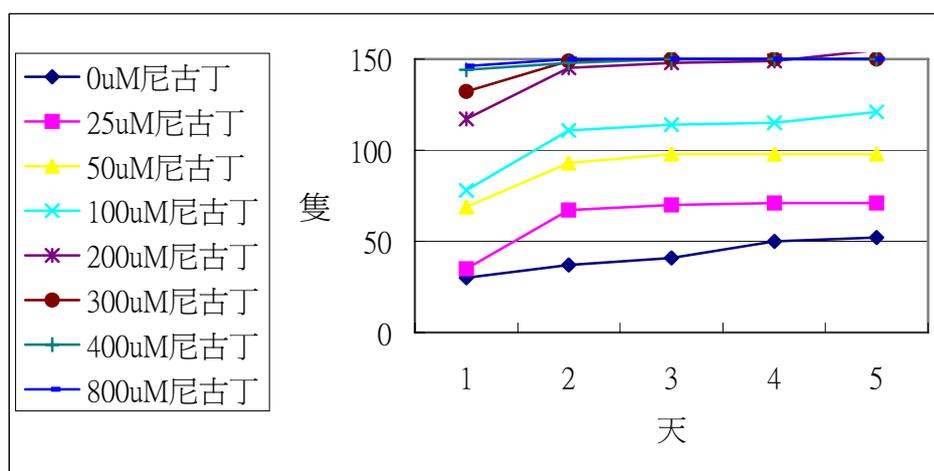
尼古丁濃度	每天死亡個體數(隻)					*死亡率
	第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	第 5 日	
0 $\mu\text{M}$	30	7	4	9	2	35%
25 $\mu\text{M}$	35	32	3	1	0	47%
50 $\mu\text{M}$	69	24	5	0	0	65%
100 $\mu\text{M}$	78	33	3	1	6	81%
200 $\mu\text{M}$	117	28	5			100%
300 $\mu\text{M}$	132	17	1			100%
400 $\mu\text{M}$	144	4	2			100%
800 $\mu\text{M}$	146	4				100%

\* 註一：死亡率計算 = (死亡的個體數) / 總數。

註二：每個濃度的總數皆為 150 隻。

註三：畫斜線方格表胚胎已全數死亡。

圖十二、尼古丁處理後對胚胎死亡率的影響



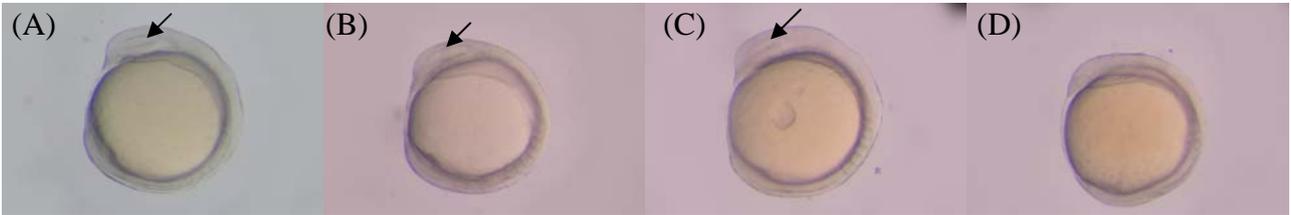
註一：橫座標為胚胎發育的天數，縱座標為死亡個體總數。

註二：第 2 天死亡個體總數 = 第 1 天死亡個體數 + 第 2 天死亡個體數。

第 3 天死亡個體總數 = 第 1 天死亡個體數 + 第 2 天死亡個體數 + 第 3 天死亡個體數。

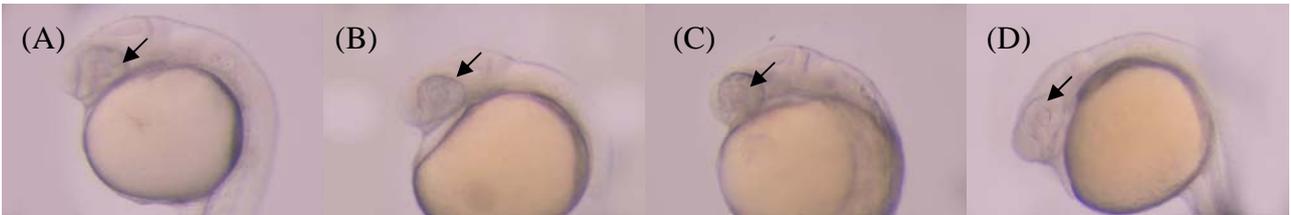
## (二) 胚胎外型的觀察

1. 發育至 12hpf 的胚胎，對照組、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$  此時已長出眼基板和 6 個體節（圖十三）。以  $100\mu\text{M}$  尼古丁處理後，有發育遲緩的現象，眼基板尚未發育完全，且只有 4 個體節。



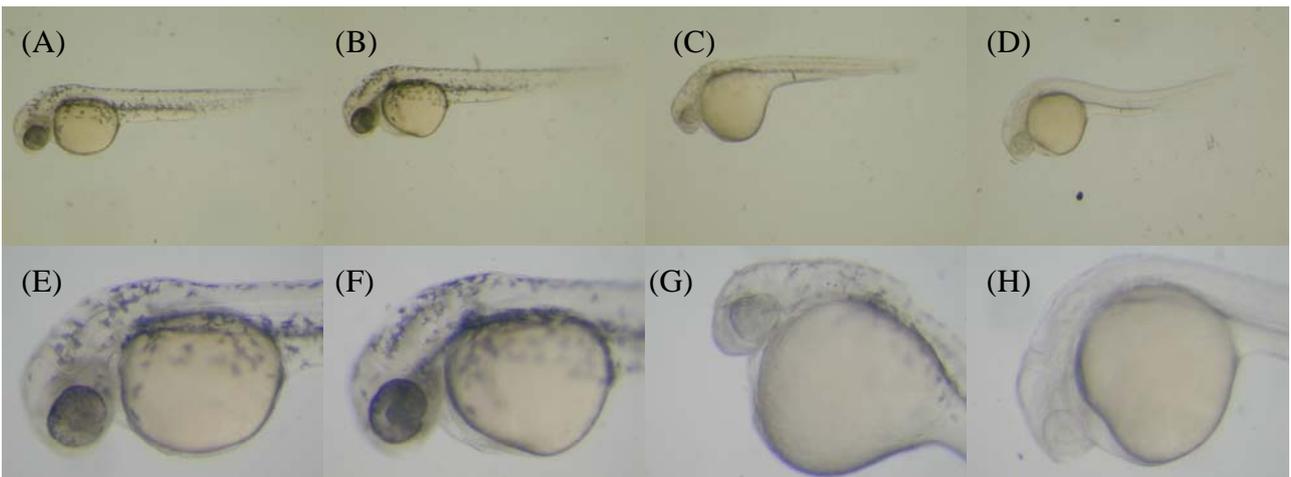
圖十三、尼古丁處理後，對 12hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。A、對照組，未加尼古丁；B、 $25\mu\text{M}$  尼古丁；C、 $50\mu\text{M}$  尼古丁；D、 $100\mu\text{M}$  尼古丁。側視圖。箭頭所指示處為眼基板。

2. 發育至 24hpf 的胚胎，並沒有明顯的差異（圖十四）。



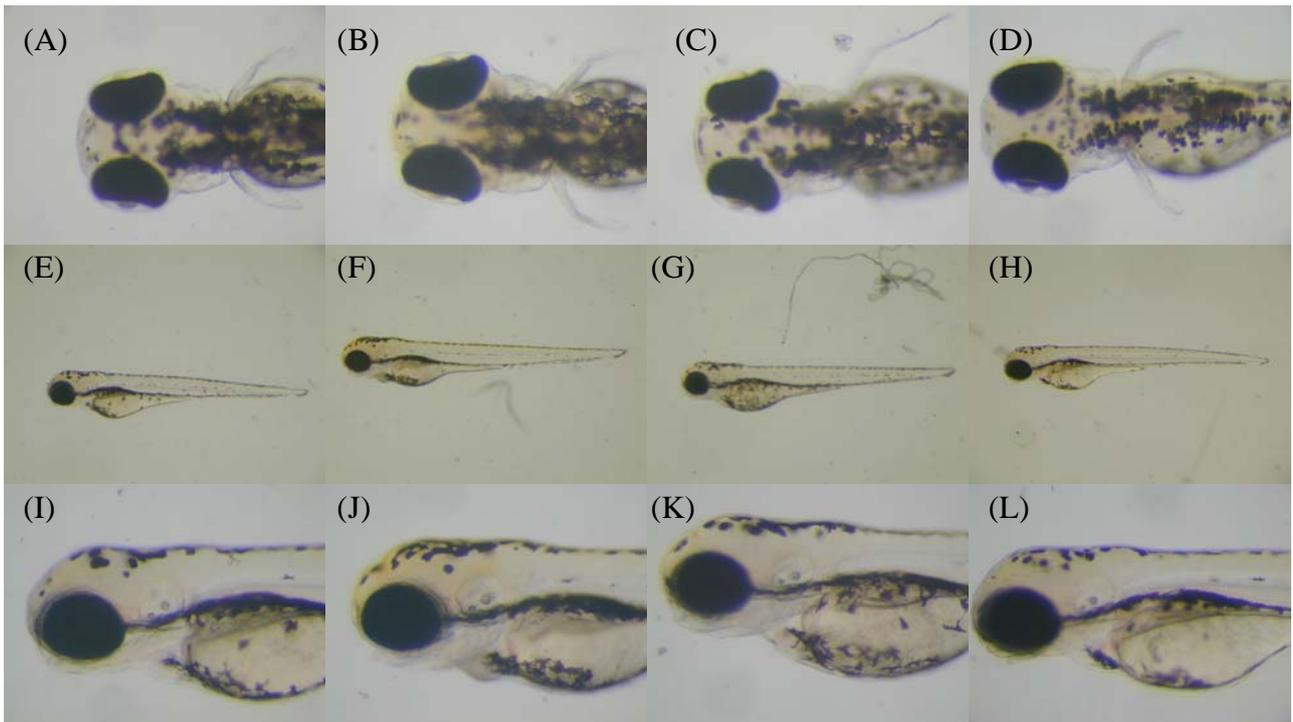
圖十四、尼古丁處理後，對 24hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。A、對照組，未加尼古丁；B、 $25\mu\text{M}$  尼古丁；C、 $50\mu\text{M}$  尼古丁；D、 $100\mu\text{M}$  尼古丁。A~D 是側視圖。箭頭所指示處為眼。

3. 發育至 36hpf，以  $50\mu\text{M}$  和  $100\mu\text{M}$  尼古丁處理的胚胎，其眼睛和身體的色素較淡，且卵黃囊有膨大的現象（圖十五，G、H）。



圖十五、尼古丁處理後，對 36hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。(A, E) 對照組，未加尼古丁；(B, F)  $25\mu\text{M}$  尼古丁；(C, G)  $50\mu\text{M}$  尼古丁；(D, H)  $100\mu\text{M}$  尼古丁。A~H 是側視圖。

4. 發育至 72hpf，對照組、 $25\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$  和  $100\mu\text{M}$  尼古丁處理的胚胎，其外型並沒有太大差別。但以  $100\mu\text{M}$  尼古丁處理的胚胎，其身體色素有較淡的情形（圖十六，D）。



圖十六、尼古丁處理後，對 72hpf 時期胚胎發育外部形態的影響。

(A, E, I) 對照組，未加尼古丁；(B, F, J)  $25\mu\text{M}$  尼古丁；(C, G, K)  $50\mu\text{M}$  尼古丁；(D, H, L)  $100\mu\text{M}$  尼古丁。A~D 是背視圖。E~L 是側視圖。

## 陸、結論

## 一、酒精對胚胎發育的影響

(一) 隨著酒精濃度的增加，胚胎死亡率有逐漸增加的現象（表一）。

(二) 胚胎發育速率延遲

發育至 12hpf 胚胎，以 3%酒精胚胎約停留在 5hpf 的胚胎發育階段（圖三，I），以 1.5%酒精處理的胚胎，眼基板尚未發育（圖三，D），24hpf 則已由眼基板發為視囊，推測可能為發育延遲的現象。

(三) 胚胎外部形態的異常

以 1.5%酒精浸泡的胚胎，心包膜、卵黃囊有逐漸膨大的情形。且造成軀幹彎曲，尾部扭曲，胚胎的眼睛和頭顱變小，色素分佈出現異常的現象（圖五，圖七）。

以 0.15%酒精和 1.5%酒精處理的胚胎，光照組和黑暗組的色素細胞沒有明顯的變化（圖八，C、G、D、H）。

(四) 造成頭骨發育的畸形

1. 頭骨縮小

由上述的實驗結果發現，隨著胚胎在 1.5%酒精浸泡的時間越久，頭顱縮小有越明顯的情形（圖五、H，圖七、H）。

2. 鰓弧角度變大，篩板消失

以 1.5%酒精處理的胚胎，最前端的兩對鰓弧角度明顯地變大（圖九、I），篩板消失（圖十、B）。浸泡在 0.15%酒精的胚胎頭骨並沒有明顯的改變，由上述的結果發現，酒精的劑量與頭骨發育的影響程度有正相關的關係。

(五) 造成眼睛發育的異常

1. 眼睛變小、無法轉動

在外觀上以 1.5%酒精處理的胚胎眼睛縮小，且眼睛無法轉動。當以昆蟲針去觸碰時也沒有反應。

2. 眼睛細胞形態的異常

從組織切片觀察眼睛的細胞型態，不太像正常胚胎般有明顯的各種分化完全的細胞（圖十一，D）。

(六) 造成內耳三半規管發育異常

以 1.5%酒精處理的胚胎，明顯地有發育異常的情形，可能是內耳的三半規管有發育延遲或失敗的現象（圖六，D）。

## 二、尼古丁對胚胎發育的影響

(一) 隨著尼古丁濃度的增加，胚胎死亡率有逐漸增加的現象（圖十二、表二）。

(二) 胚胎發育速率延遲

發育至 12hpf 以 100  $\mu$ M 尼古丁處理的胚胎，眼基板尚未發育完全，且只有 4 個體節，有發育遲緩的現象（圖十三，D）。

(三) 胚胎外部形態的改變

發育至 36hpf 以 50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M 尼古丁處理的斑馬魚胚胎，卵黃囊有膨大的現象，並且色素形態的分布有異於對照組，有較淡的情形（圖十五，G、H）。

## 柒、討論

## 一、酒精對胚胎頭骨發育的影響

魚類頭骨的發育和其它脊椎動物頭骨發育一樣，其頭骨細胞分化與形態發生的過程非常相似。...在本實驗中，經由 1.5%酒精處理後，斑馬魚胚胎形成頭骨縮小的表現型(圖九，C)，篩板消失，第一對和第二對鰓弧角度因受酒精影響而變大，且第三對鰓弧到第七對鰓弧也有變寬的情形。

頭骨染色的實驗中，阿爾囊藍易與骨細胞外層多醣類結合。以 1.5%酒精處理後的胚胎，篩板雖然消失，但可能只是篩板上的多醣類分布出現問題，因此以頭骨生長有關的指標基因 *Co2a1*，進一步的證實篩板是否消失。

軟骨細胞會被蛋白多糖軟骨膠以及膠原纖維包裹，*Co2a1* 為膠原纖維中第二型的膠原蛋白，是軟骨細胞外基質中最豐富的蛋白質，因此常被用來當軟骨細胞的標識基因。在斑馬魚胚胎發育後期，*Co2a1* 會表現在軟骨與頭骨包括髓顱以及咽弧(參一)。利用定位雜交法來觀察頭骨上 *Co2a1* 基因的表現情形，進一步的證實篩板消失，可見酒精會影響胚胎頭骨的發育。而酒精對頭骨發育機制所造的影響，將有待進一步的探討。

## 二、酒精對胚胎眼睛發育的影響

魚類在飼養環境變暗後，透過眼球的神經傳達至大腦，進而身體色素細胞相對變暗形成保護色，相對的，在長期的光照下，色素自然就變淡。因此透過光照組和黑暗組色素的變化，是一種非常便利的方法，篩選是否為眼睛發育異常的突變種。

在 0.15%和 1.5%的酒精濃度下，光照組和黑暗組沒有什麼差異，由此可知，高濃度的酒精可能破壞了神經細胞或色素細胞，使其不能控制色素顆粒的聚散。因此我們推測，高濃度的酒精，可能使眼睛在發育的過程中出現缺陷，進而引起眼睛感光過成中出現缺陷，使得色素細胞無法順利聚散。

在晶體發育的部分，以 0.015%、0.15%和 1.5%酒精處理的胚胎，發現其形態與正常胚胎相異，顯示晶體在發育上可能也有問題產生。因此未來可用和晶體發育的指標基因 *crystallin* 基因，進一步追蹤是否是晶體分化出了問題。

## 三、酒精對胚胎內耳發育的影響

在以 1.5%酒精的的斑馬魚胚胎，造成三半規管發育異常的情形。半規管由前、後、外三個互相垂直的半規管組成，具感受身體體位在三度空間的變化，控制身體的平衡作用。而連結半規管的聽脊，是否也發生異常，可進一步用內耳發育的指標基因 *bmp4*，作進一步的探討聽脊是否也受到影響。

## 四、酒精對胚胎胸鰭發育的影響

在觀察胚胎的過程當中，發現了以 1.5%酒精的的斑馬魚胚胎不會游動，魚鰭也較小，但酒精是否造成泳鰭發育上的不完全，仍有待進一步的證實。

## 五、酒精對胚胎不同時期發育的影響

本次的實驗將斑馬魚胚浸泡於酒精五天，以至於以 1.5%酒精濃度處理的胚胎到第五天以後全數死亡。斑馬魚從受精到胚胎發育孵化完成只需要 48 小時，而酒精對於胚胎不同時期所造成的影響，例如：1~12hpf、12~ 24hpf、24~36hpf 和 36~ 48hpf 何者影響較大？可以做進一步的探討。

## 六、酒精濃度的調整

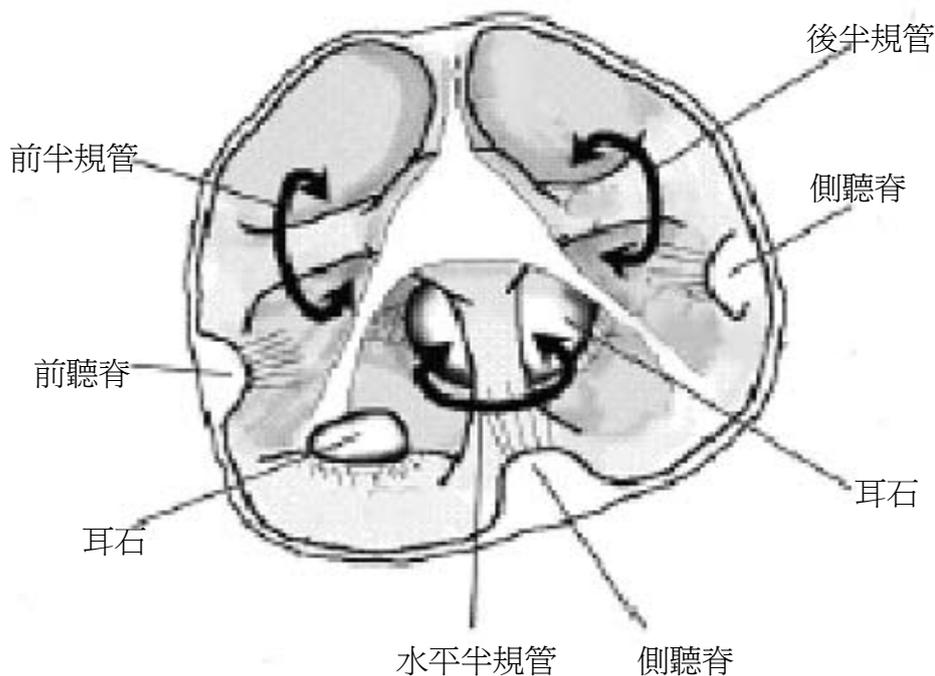
以 1.5%酒精濃度處理的胚胎外觀上雖然有明顯的變化，但死亡率太高，不易收集足夠的樣本來做進一步的實驗。試著以低濃度酒精處理，例如：1.2%或 1%酒精…等，找出能有明顯的外觀異常且死亡率又不會太高的酒精濃度。

## 捌、參考資料及其他

### 一、參考資料

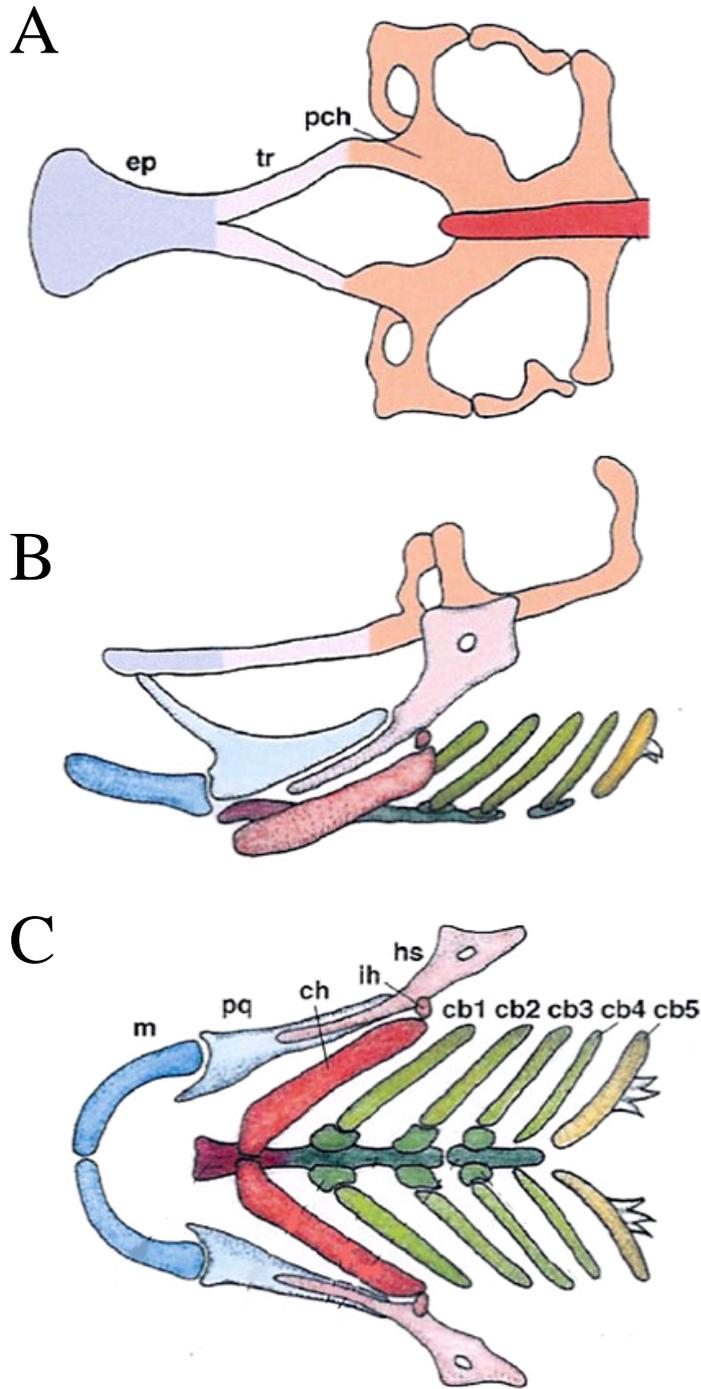
- (一) 鍾欣怡 (民 92)。斑馬魚低氧誘發因子 *hif* 基因對胚胎頭骨發育的影響。國立台灣海洋大學生物科技研究所碩士學位論文，未出版。P7~P12；P27-28。
- (二) 楊惠雯 (民 92)。斑馬魚低氧誘發因子 *hif1 $\alpha$*  和 *hif3 $\alpha$*  基因對胚胎內耳和血管發育的影響。國立台灣海洋大學生物科技研究所碩士學位論文，未出版。P9~P13；P72。
- (三) 高銘都、黃義祿著。病理組織切片技術~切片標本製作及各種染色法。初版，南山堂出版社 (民 85)。P11-19；P29-35。

### 二、附錄



附圖 1：斑馬魚內耳的感覺區和構造。

此圖為 72hpf 時期對照組耳囊的構造。半規管分別形成前、水平和後半規管，分別和前、側和後聽脊相連。耳囊內有二個耳石位於其感覺區 (參二)。



附圖 2：斑馬魚髓顱和咽弧的圖示。

斑馬魚胚胎軟骨性的頭骨分為：髓顱 (neurocranium) 和咽弧 (pharyngeal skeleton) 兩部分。髓顱可區分為三個區域：篩板 (ep, ethmoid plate)、顱桁 (tr, trabecula) 和索旁 (pch, parachordal) 軟骨。咽弧可區分為：頷弧 (mandibular)、舌弧 (hyoid) 以及五對鰓弧 (cb, ceratobranchial)。頷弧包括：m, meckel' s 和 pq, palatoquadrate。舌弧包括：ch, ceratohyal、ih, interhyal 和 hs, hyosymplectic。A 是背視圖。B 是側視圖。C 是腹視圖。(參一)

中華民國第四十五屆中小學科學展覽會  
評 語

---

高中組 生物(生命科學)科

第一名

040703

酒精和尼古丁對斑馬魚胚胎發育的影響

國立基隆女子高級中學

評語：

1. 主題明確，能觀察到胚胎發育之變化。
2. 鼓勵進行更深入的研究。