

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

040716

果蠅拼圖亮睛睛

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 黃麒瑋 高二 洪仲傑 高二 蔡尚育 高二 葉書偉	指導老師： 張瑜紋
---	------------------

關鍵詞：果蠅、小眼、形狀與排列

摘要

由於發現一些突變種的果蠅其複眼形狀與野生種不同，想找出造成不同種果蠅複眼形狀差異的原因。果蠅的複眼是由小眼所組成，所以假設小眼是以拼圖的概念組成複眼為前提設計實驗。選用四種複眼形狀不相同的果蠅，對照組 Wild type 及實驗組 B type、L type、Nemo type，進行兩個實驗。實驗一，取下成蟲複眼，利用電子顯微鏡拍照，分析小眼形狀及排列的差異；實驗二，分析幼蟲體內的眼碟，比較在幼蟲時期複眼發育的相異處。最後歸納出影響不同種複眼形狀的原因。再利用所整理的結果去支持本次研究的推論。

實驗說明，細胞間物理性的擠壓與數學上的排列會影響整個組織的架構，此為細胞溝通的一種方式。就如本次實驗的假設，這些因素影響果蠅的小眼以類似拼圖的方式構築出整個複眼。

壹、研究動機

關於果蠅的研究是從 19 到 20 世紀時，由莫根教授(Thomas Hunt Morgan)開創先河，至今已累積了大量的研究資料，科學家對果蠅的了解至臻完整。不過在一般人所了解的果蠅複眼差異僅止於紅眼及白眼，而在觀察果蠅的過程中，意外發現不同種的果蠅有些複眼形狀會不一樣：有的複眼面積較小，有的細長，或呈愛心形。對此一現象，產生疑問：什麼因素使得這些果蠅的眼睛形狀有所不同？在看了一些果蠅眼睛的圖片後，觀察到果蠅複眼中的每一個小眼的形狀不一定都相同，有四邊形、五邊形、六邊形等，大小也不一致。因此猜測這些不同形狀大小的小眼透過某種排列方式所形成的複眼將呈現不同形狀，這就好比在拼拼圖時，必須衡量整個形狀來選擇每塊不同的拼圖以及排列的方法。若是以不同大小形狀的拼圖藉由用不同的方式組合所形成的圖形就會不一樣。於是本次研究假設小眼以拼圖的方式建構出整個複眼，以此假設為作為前提進行分析，找出此四種果蠅複眼形狀不同的原因。

貳、研究目的

- 一、探討野生種與突變種的成蟲小眼排列方式以及數量的差異。
- 二、探討野生種與突變種的幼蟲小眼發育的差別。
- 三、綜合以上的結果分析造成不同基因型果蠅複眼形狀不一樣的原因。

參、名詞解釋與背景知識

一、果蠅幼蟲眼睛之介紹

(一) 眼碟(eye disc)

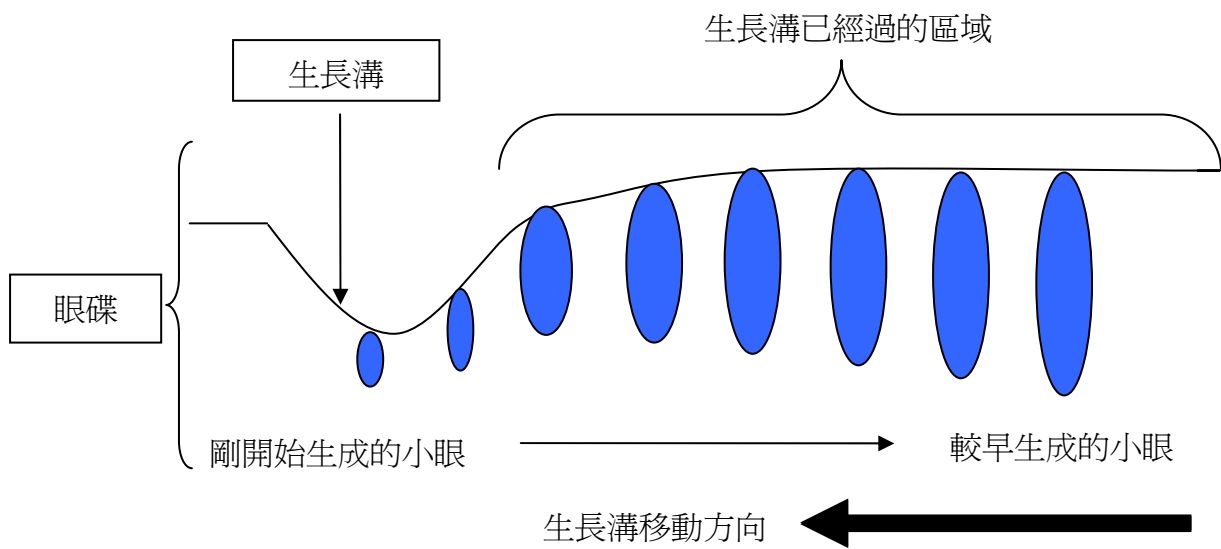
在果蠅幼蟲階段，其複眼尚未發育成形，以眼碟的型態存在於幼蟲體內，而眼碟是由許多未分化及分化中的小眼所構成。

將經染色後的眼碟放到雷射共軛焦顯微鏡下進行掃描，可以看出小眼的構

造，在幼蟲階段每個分化完全的小眼有八個感光細胞以及四個錐狀細胞，在雷射顯微鏡下可觀察到。

(二) 生長溝(furrow)

生長溝為在眼碟上向下凹陷的溝狀構造，其可觸發眼碟上小眼的分化及發育。生長溝會在眼碟上移動，生長溝所經過的區域，其下方的細胞才會開始分化(圖一)。因此，距離生長溝近的為年輕小眼，距離越遠的小眼年齡越大，且年齡越大的小眼細胞個數越多，分化完全的小眼共有十二個細胞(幼蟲階段)。故由一個眼碟即可觀察出各時期的小眼發育情形。



圖(一) 生長溝示意圖

二、所選用的果蠅之品系介紹

(一) Wild type

此實驗的對照組，一般的野生種，並沒有任何基因有異常。

(二) Nemo type

已有研究指出，此突變種為一稱為 Nemo 的基因產生突變。其成蟲的複眼與野生種比較，外型較為細長。目前已知此基因的功用與蛋白質的磷酸化有關。

(三) Lobe type(簡稱 L type)

為 Lobe 基因產生突變所產生，Lobe 基因在分子生物學上的功用仍然不明，就複眼外觀上來看，其形狀明顯較小，數量較少。

(四) Bar type(簡稱 B type)

為 Bar 基因產生突變造成，其功用仍然不明，其複眼外型非常像愛心形。

肆、研究器材

實驗一 觀察果蠅成蟲複眼外觀型態

一、實驗材料及用品

- (一) 果蠅品系：Wild type、Nemo type、B type、L type
- (二) 滴管
- (三) 離心管
- (四) 金屬桶

二、實驗藥品

- (一) 酒精(25%、50%、75%)
- (二) 丙酮(100%)

三、實驗儀器

- (一) 臨界點乾燥儀(Critical Point Dryer, CPD)
- (二) 離子覆膜機(ion coater)
- (三) 電子顯微鏡

實驗二 觀察果蠅幼蟲眼碟發育過程

一、實驗材料及用品

- (一) 果蠅幼蟲品系：Wild type、Nemo type、B type、L type
- (二) 鑷子
- (三) 九孔盤
- (四) 玻片
- (五) 加強圈
- (六) 微量滴管
- (七) 離心管

二、實驗藥品

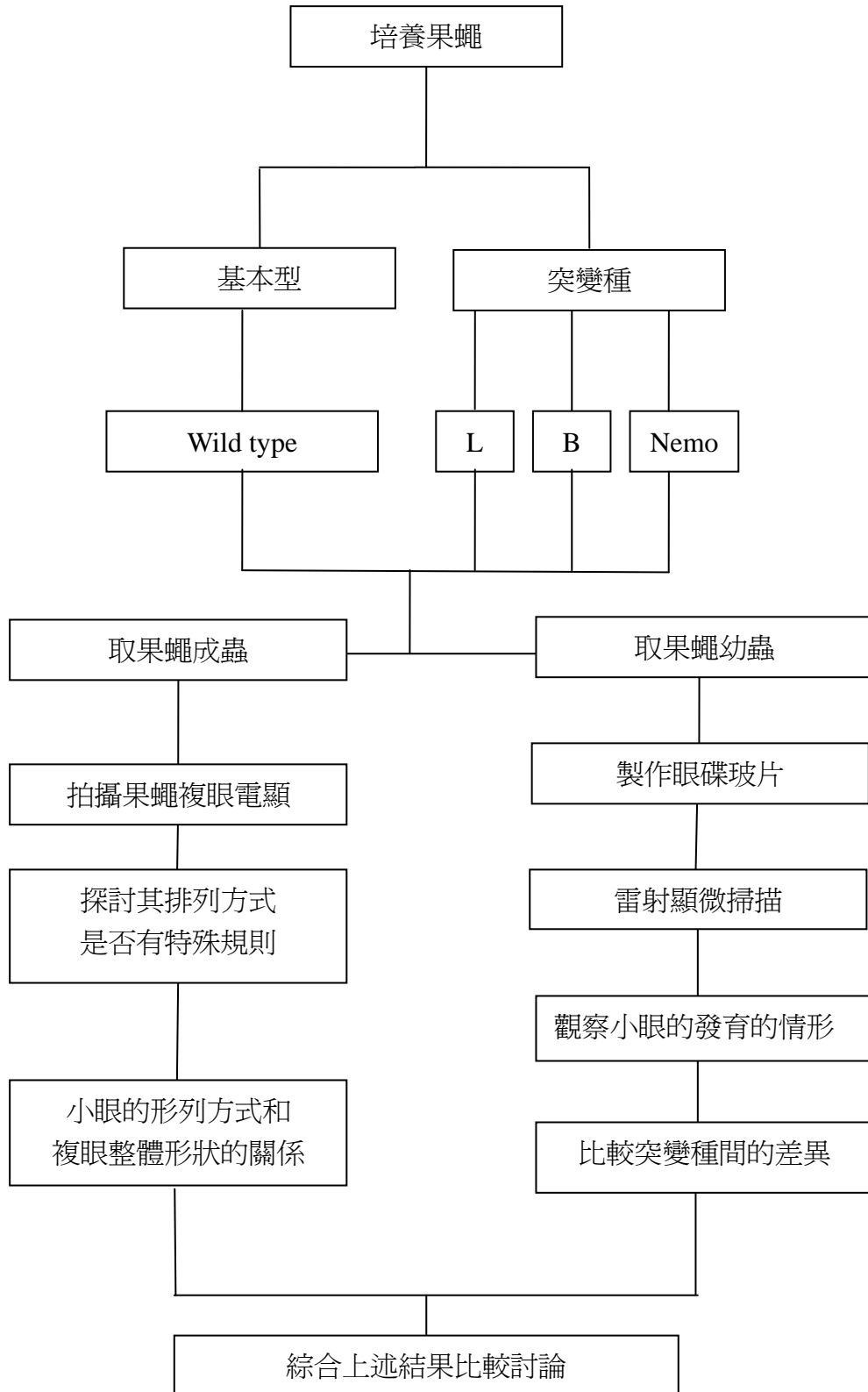
- (一) PBS
- (二) PBT(Triton 溶於 PBS)
- (三) 福馬林(formaldehyde 4%)
- (四) 紅色螢光染劑(phalloidin-TRITC)
- (五) mounting solution(防止玻片內水份蒸發的膠狀溶液)

三、實驗儀器

- (一) 解剖顯微鏡
- (二) 雷射掃描共軛焦點顯微鏡(Confocal Laser Scanning Microscope)

伍、實驗過程與方法

實驗流程圖



實驗一 觀察果蠅成蟲複眼外觀型態

這部份的實驗將果蠅的複眼做電顯照相，將照出來的照片拿來做觀察，想找出小眼排列的一些規律，及其小眼形狀和數目對複眼外型的影響。

一、臨界點乾燥

- (一) 將果蠅依次泡入濃度 25%、50%、75%酒精，每次 20 分鐘
- (二) 泡入 100%的丙酮 4°C 放置一個晚上
- (三) 使用 CPD 將果蠅體內的丙酮置換成液態 CO₂

二、固定果蠅頭部

- (一) 加熱至 43°C 使液態 CO₂ 汽化
- (二) 在顯微鏡下使用小刀片將果蠅頭部切下並黏在金屬桶上
- (三) 置於 4°C 並放置一個晚上

三、使用離子覆膜機鍍金

將取下的果蠅頭部放入離子覆膜機鍍並抽成真空接下來鍍上一層薄金。

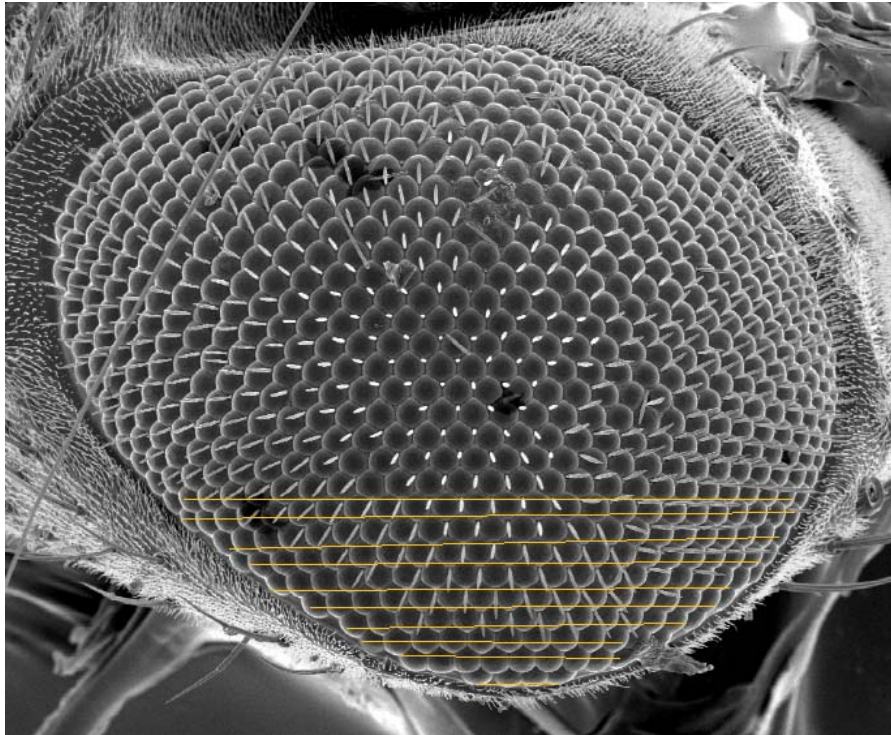
四、照電顯照片

將做好的樣本拿去拍攝電顯照片。

五、觀察小眼排列方式及形狀

觀察照片中小眼的形狀及排列方式，計算一個複眼有幾排小眼以及一排小眼的個數，並以我們所訂之小眼數法計算小眼總數。

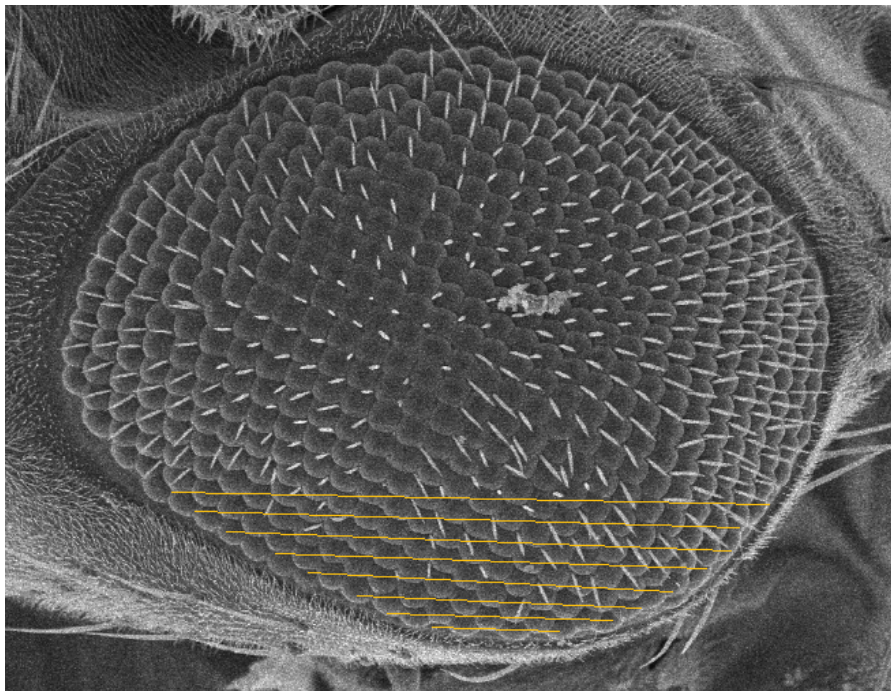
小眼數法



圖(二) Nemo type 與 Wild type 一般小眼數法

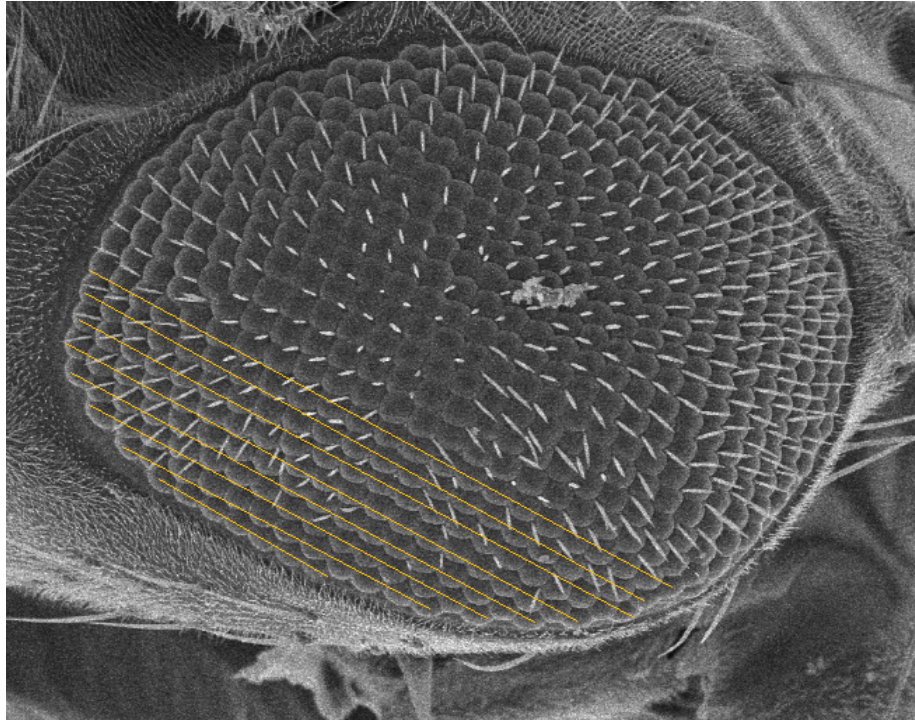
原則上，將照片的角度調整至上方為果蠅的口部，下方為果蠅的胸部及腹部，由下方一排一排往上數。Nemo type 與 Wild type 依照此方式解決。

L type 的數法



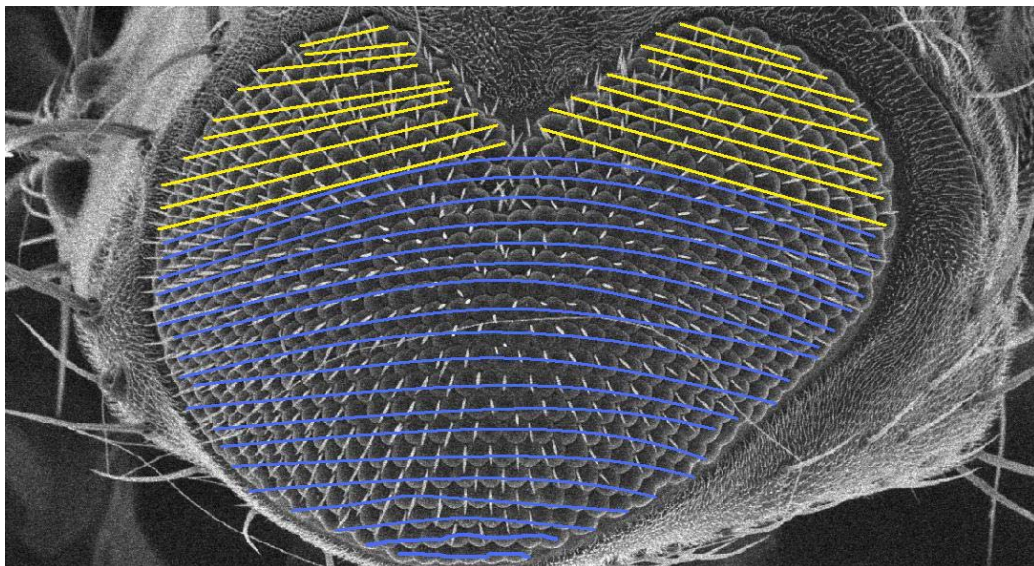
圖(三)L type 小眼數法

L type 的小眼若用一樣的數法，小眼排列會很不規則，無法計算。



圖(四)L type 新的小眼數法
發現若以斜向一排一排往上數，L type 的小眼會較規則的排列。

B type 的數法

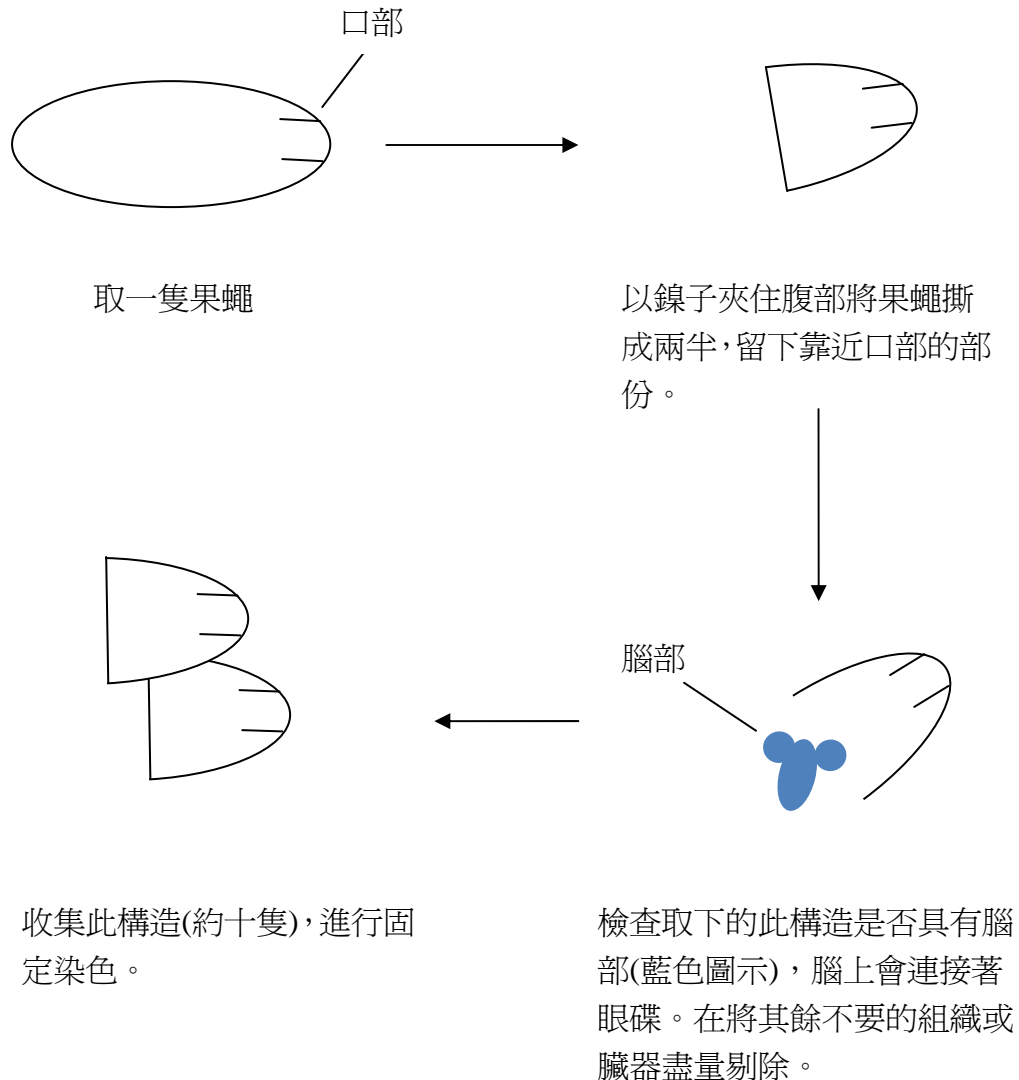


圖(五)B type 小眼數法
B type 的複眼因呈愛心形，所以上半部分叉的部份(黃色部分)原先是分開算的，但統計時，將其合併為一排。

實驗二 觀察果蠅眼碟發育過程

這部分的實驗先以解剖的方式取出幼蟲的眼碟，進行掃描後觀察。此實驗取了四種不同果蠅突變種進行觀察。

一、解剖

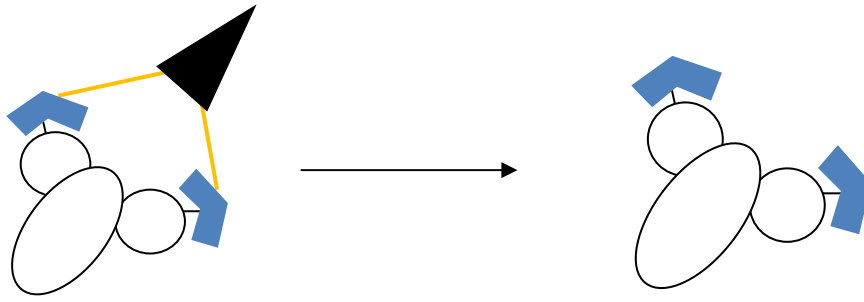


圖(六) 解剖過程

二、固定及染色(Fix，利用福馬林保存取下來構造)

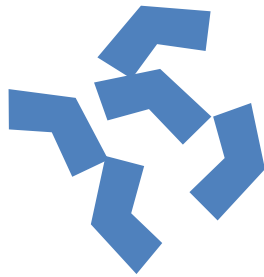
- (一) 將解剖好的腦部放入裝有福馬林 4% 的離心管內(十隻)
- (二) 搖晃 20 分鐘後將液體盡可能吸乾
- (三) 加入 PBT 沖洗掉福馬林後，將廢液吸出
- (四) 在加入一次 PBT，搖晃 15 分鐘，重複此步驟三次(PBT 內的 Triton 可在細胞膜製造小孔，以利染劑深入內層)
- (五) 加入 phalloidin-TRITC 染色，搖晃 15 分鐘

三、取下眼碟

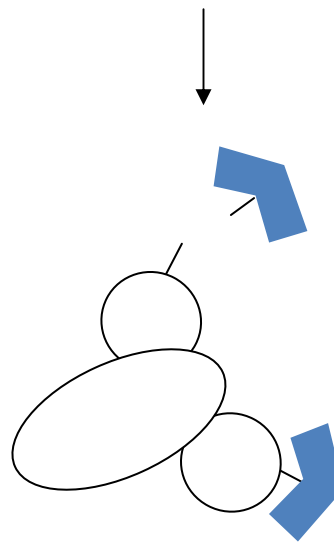


在固定好的果蠅頭部內找到此腦部附近的構造，黑色為口部，藍色為眼碟。

剪斷神經(橘色線條)後，剔除口部。



妥善保存眼碟，封入玻片中。



剪斷眼碟與腦部間的神經，取下眼碟。

圖(七) 取下眼碟

四、封片(mounting)

- (一) 使用加強圈墊高防止蓋玻片將眼碟壓壞
- (二) 滴上一滴 PBS，將眼碟放置進去
- (三) 調整眼碟方向，使凸面朝上
- (四) 蓋上蓋玻片
- (五) 吸出多餘液體
- (六) 加入 mounting solution 在蓋玻片中間，可防止樣品乾燥
- (七) 在蓋玻片邊上塗上指甲油防止乾燥

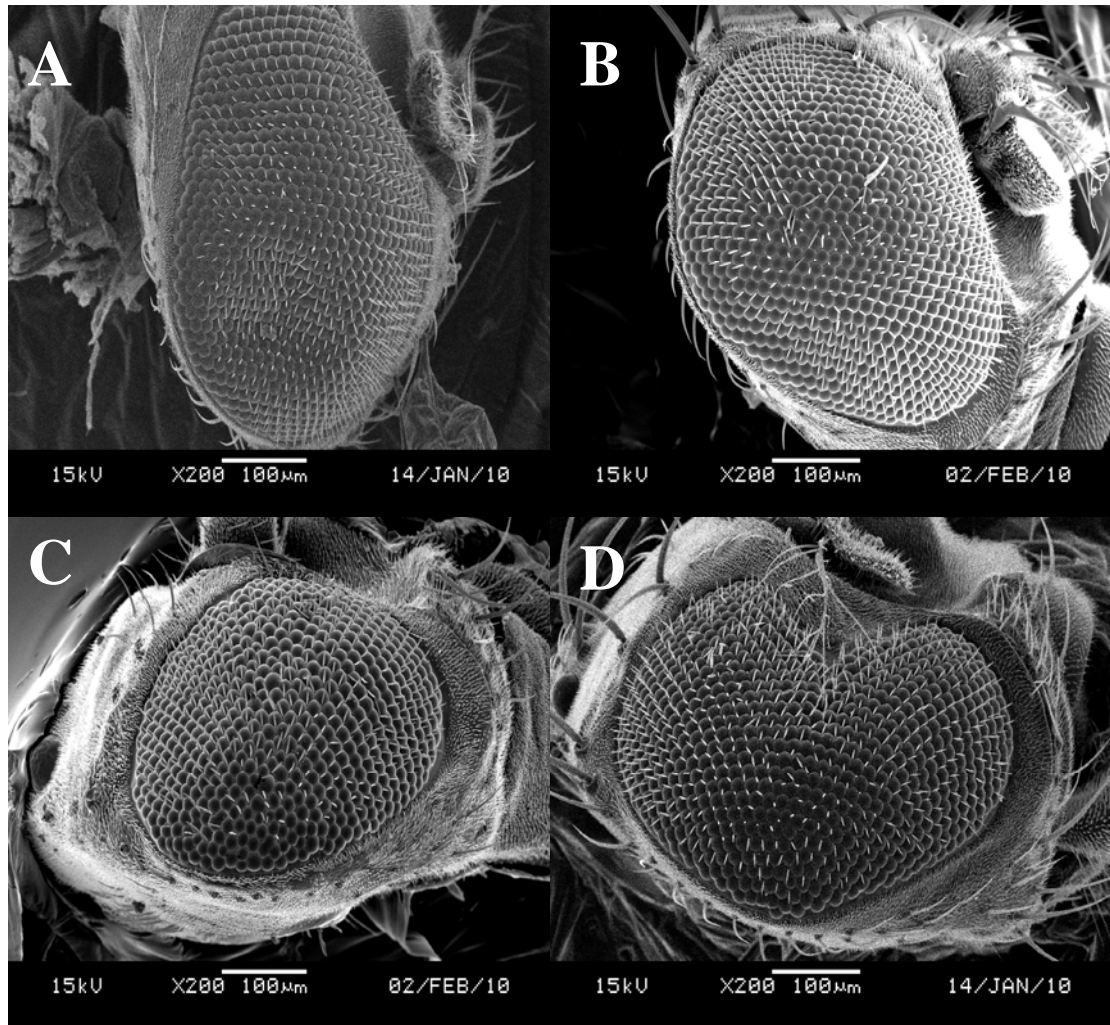
五、雷射共軛焦顯微掃描(Confocal)

將做好的玻片拿到雷射掃描式共軛焦顯微鏡下做掃描，可掃出整個眼碟的垂直分層和水平構造，也就是整個複眼的立體結構，整理數據比較各突變種差異。

陸、研究結果

實驗一 觀察果蠅成蟲複眼外觀型態

一、複眼電顯相片



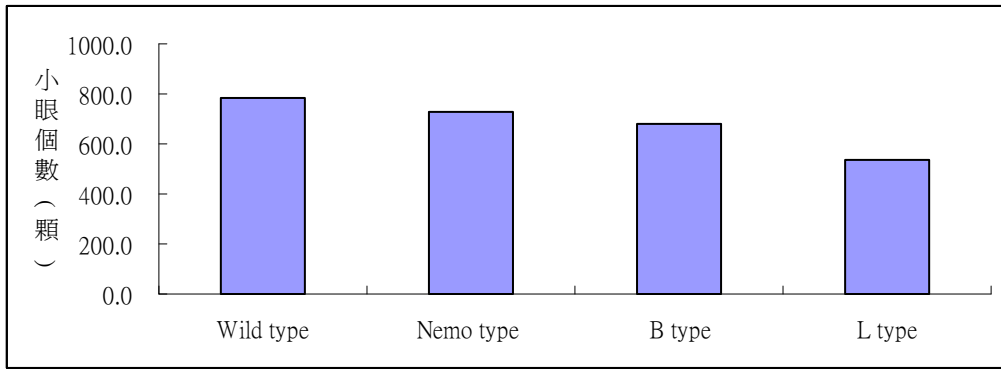
圖(八)果蠅複眼電顯照片

- A) Wild type
- B) Nemo type
- C) L type
- D) B type

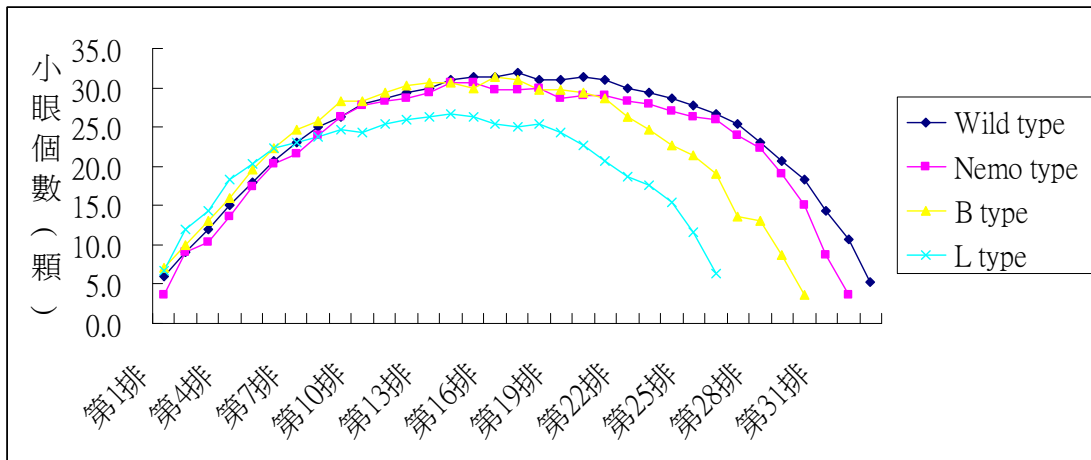
二、各基因型的成蟲的小眼排列情形。

	Wild type	Nemo type	B type	L type
第 1 排	6.0	3.7	7.0	6.7
第 2 排	9.0	9.0	10.0	12.0
第 3 排	12.0	10.3	13.0	14.3
第 4 排	15.0	13.7	16.0	18.3
第 5 排	18.0	17.3	19.7	20.3
第 6 排	20.7	20.3	22.3	22.3
第 7 排	23.0	21.7	24.7	23.0
第 8 排	25.0	24.0	25.7	23.7
第 9 排	26.3	26.3	28.3	24.7
第 10 排	28.0	27.7	28.3	24.3
第 11 排	28.7	28.3	29.3	25.3
第 12 排	29.3	28.7	30.3	26.0
第 13 排	30.0	29.3	30.7	26.3
第 14 排	31.0	30.7	30.7	26.7
第 15 排	31.3	30.7	30.0	26.3
第 16 排	31.3	29.7	31.3	25.3
第 17 排	32.0	29.7	31.0	25.0
第 18 排	31.0	30.0	29.7	25.3
第 19 排	31.0	28.7	29.7	24.3
第 20 排	31.3	29.0	29.3	22.7
第 21 排	31.0	29.0	28.7	20.7
第 22 排	30.0	28.3	26.3	18.7
第 23 排	29.3	28.0	24.7	17.7
第 24 排	28.7	27.0	22.7	15.3
第 25 排	27.7	26.3	21.3	11.7
第 26 排	26.7	26.0	19.0	6.3
第 27 排	25.3	24.0	13.7	
第 28 排	23.0	22.3	13.0	
第 29 排	20.7	19.0	8.7	
第 30 排	18.3	15.0	3.7	
第 31 排	14.3	8.7		
第 32 排	10.7	3.7		
第 33 排	5.3			
總數	781.0	726.0	678.7	533.3

表 (一) 各基因型果蠅成蟲小眼數



表(二) 小眼總數柱狀圖

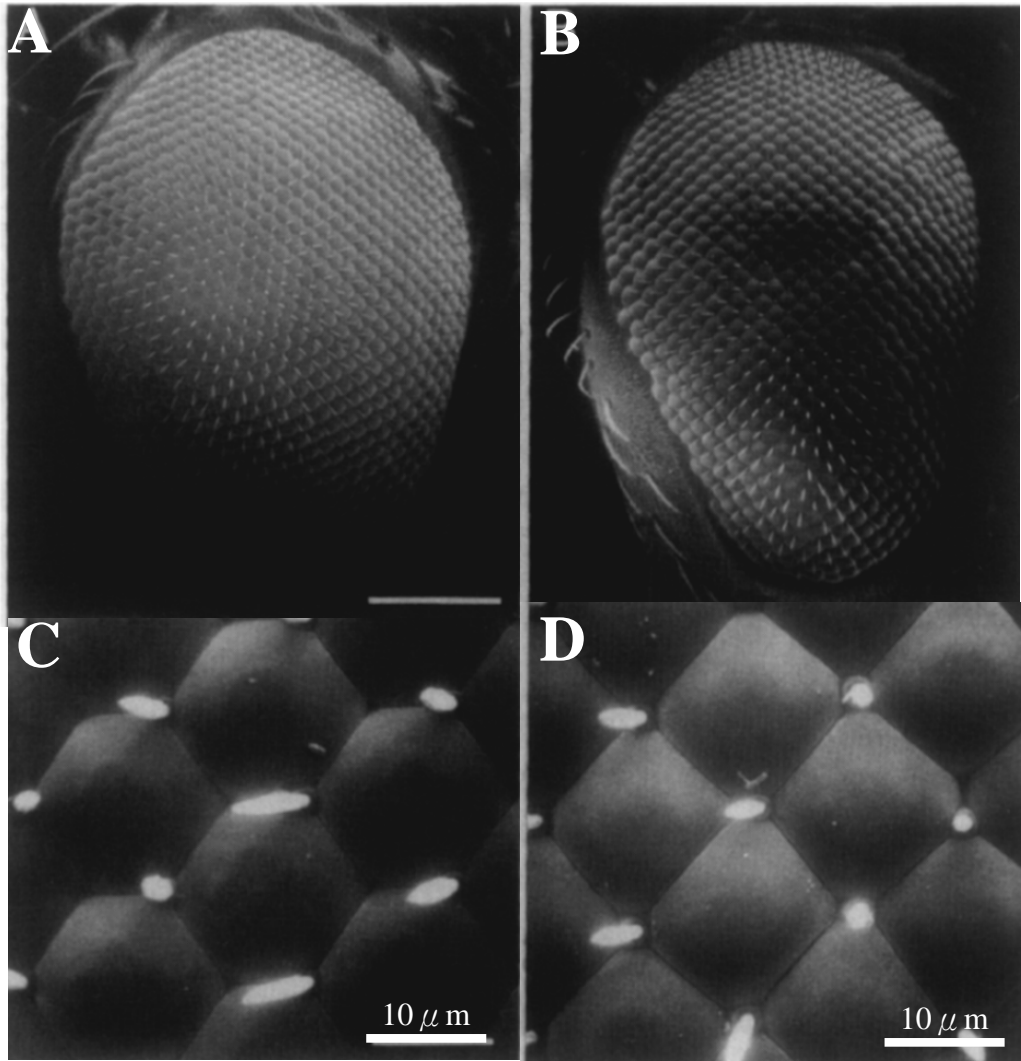


表(三) 各基因型果蠅成蟲各排小眼個數趨勢圖

三、各基因型果蠅成蟲的小眼形狀。

Wild type	呈現規律的六邊形
Nemo type	呈現規律的四邊形
L type	不規則，四邊形、五邊形、六邊形均有。
B type	愛心的下半部與 Wild type 相似，呈現六邊形，上半部則不規則

表(四) 各基因型成蟲小眼形狀比較



圖(九) 果蠅複眼及小眼放大圖

A) Wild type 複眼

B) Nemo type 複眼

C) Wild type 小眼放大圖

D) Nemo type 小眼放大圖

引用自參考資料四

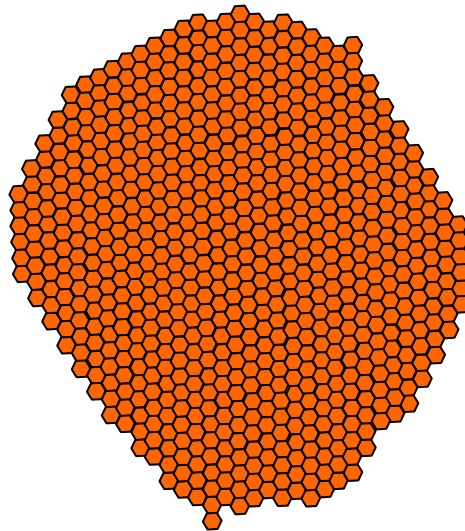
根據圖(八)測量小眼的長寬大小，製成表(五)

	一顆小眼長	一顆小眼寬
Wild type	16 μ m	17.5 μ m
Nemo type	19 μ m	16.5 μ m

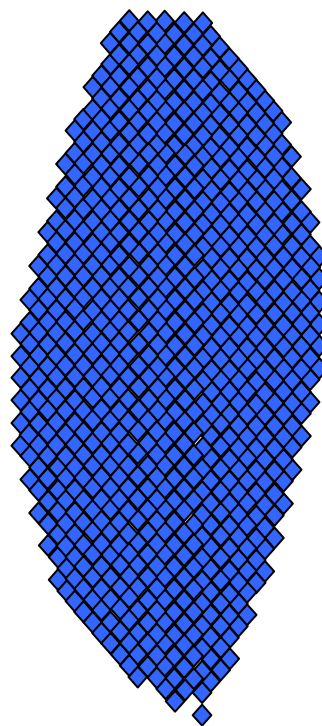
表(五) Wild type 與 Nemo type 小眼長寬比較

四、利用小眼個數的資料、小眼角型與小眼長寬比排出下列簡圖。

根據表四中 Wild type 的小眼形狀及 Nemo type 的小眼形狀，以及表五的小眼長寬資料繪出單一小眼，再以表一中 Wild type 的小眼排列方式重組出 Wild type 及 Nemo type 的複眼形狀(圖十、圖十一)。



圖(十)Wild type 複眼重組繪製圖

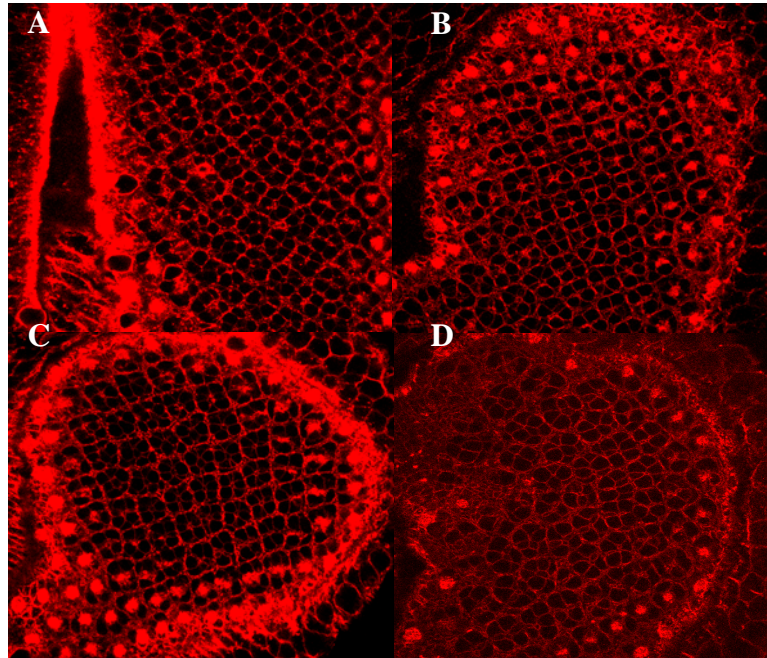


圖(十一)Nemo type 複眼重組繪製圖

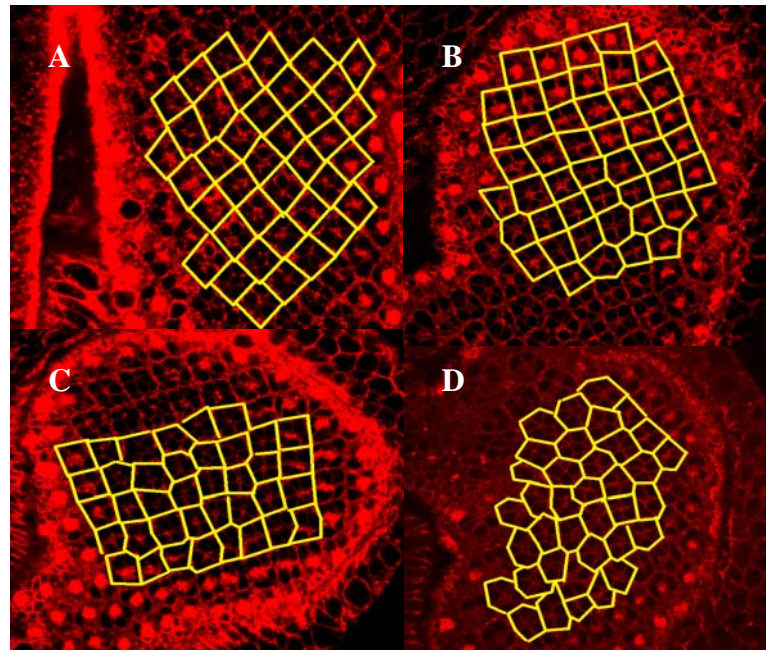
實驗二 觀察果蠅眼碟發育過程

一、將各基因型果蠅的幼蟲時期小眼結構進行分析。

由圖十二可見，在幼蟲時期，唯 B type 的小眼排列非常的凌亂，由此可見，B type 的小眼在發育過程中出現了問題，使其小眼排列不規則，造成複眼的凹陷，形成愛心形前端凹陷部分



將上圖中每顆小眼的形狀圈(黃框)出來以觀察小眼的排列



圖(十二)幼蟲時期小眼排列圖

A)Wild type

B)Nemo type

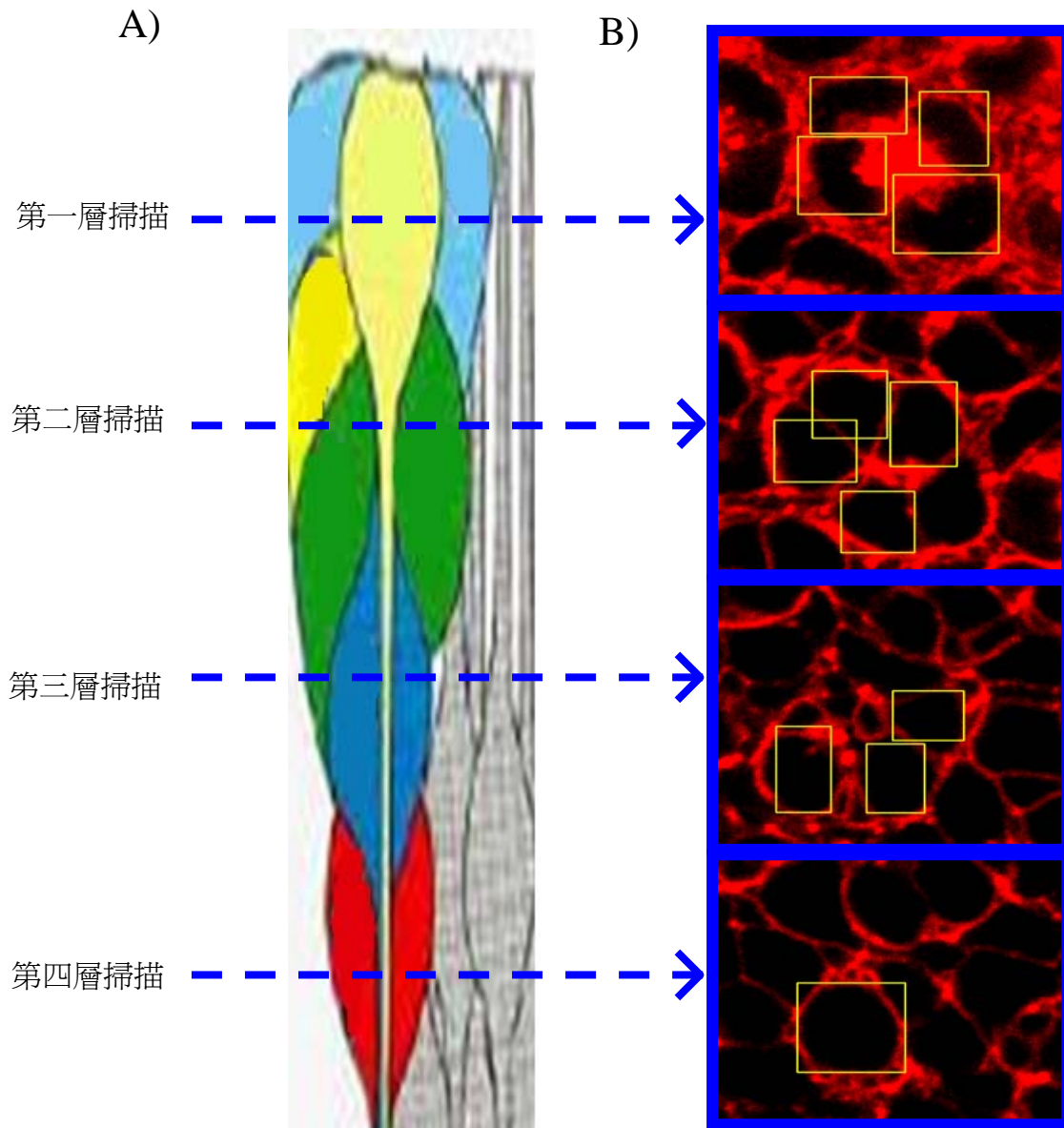
C)L type

D)B type

二、單顆小眼具有細胞數的數法

利用雷射掃描的特性將組織層層作掃描，由此可看出每一層小眼所具有的細胞個數。

圖十三中，由上至下，依序為將小眼分層掃描，若將小眼側視圖(A 圖)橫向掃描後為小眼俯視圖(B 圖)。



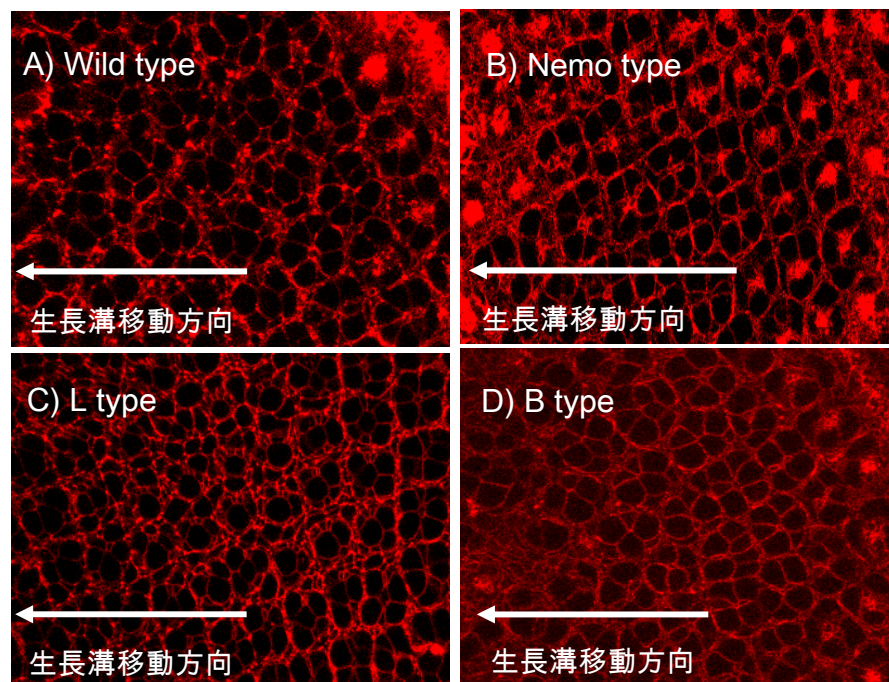
圖（十三） 幼蟲小眼示意圖

A)單顆小眼側視圖

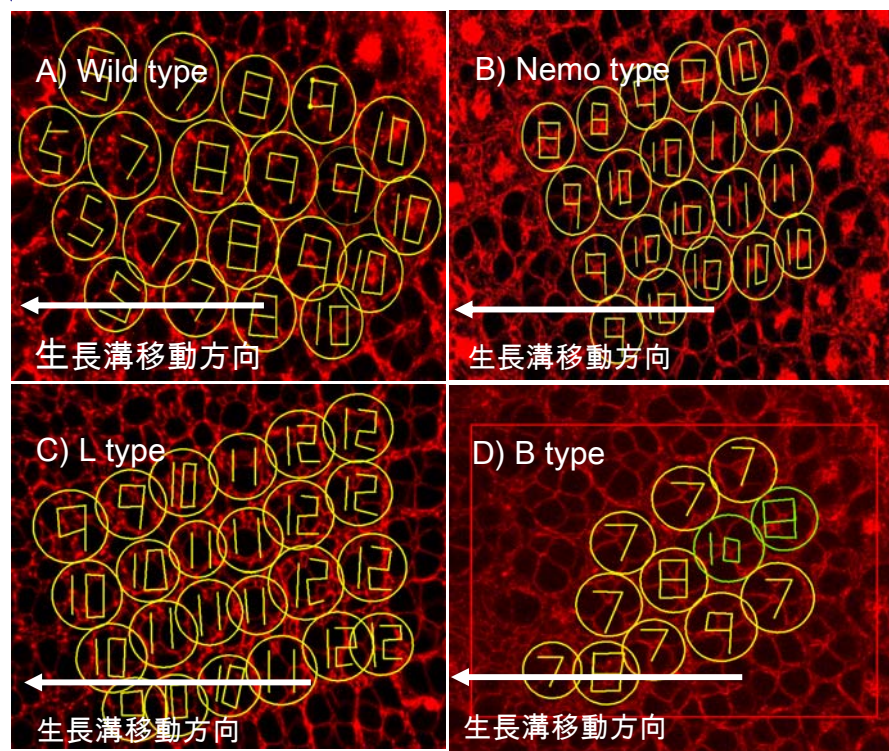
B)單顆小眼俯視圖

三、單顆小眼所具有的細胞數與離生長溝遠近之關係

圖十四中每一個圓圈框起來的部分代表一個小眼，而其中的數字代表圓圈中小眼的細胞數量。



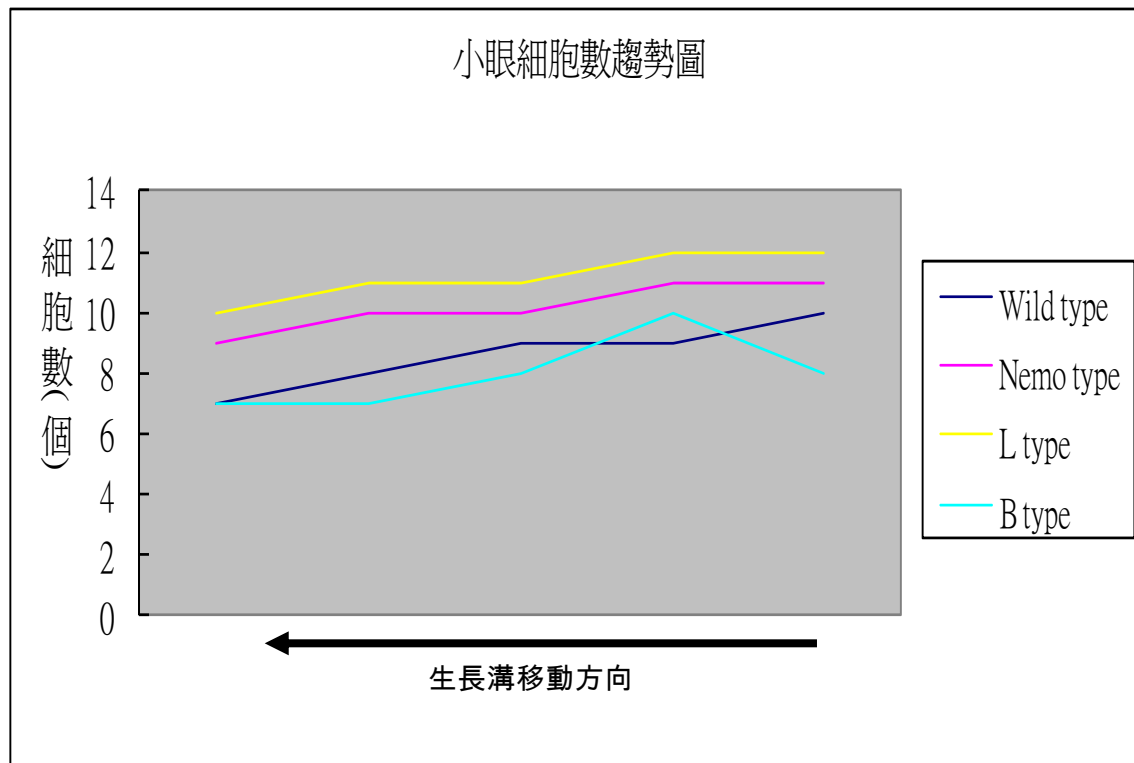
將上圖中每顆小眼圈出，並算出該小眼具有的細胞數，並標記於圖上



圖（十四）各基因型果蠅幼蟲時期小眼生長趨勢

將圖十四每顆小眼依照離生長溝的距離排列，並計算出每排小眼所具有的平均細胞數，再將之繪製成趨勢圖。

正常的小眼發育為離生長溝越遠的小眼，所具有的細胞個數越多，但由表六可看出，唯 B type 並無照此規則，意即 B type 小眼為不正常發育。



表(六) 各基因型小眼細胞數趨勢圖

柒、討論

一、分析 Wild type

- (一) 以小眼排列來看，其排列很整齊，也較規律，呈現 6、9、12…的數列，而小眼的形狀均為六角形。
- (二) 根據小眼形狀排列的結果，各樣本的小眼排列方式幾乎完全相同，故小眼的排列方式不會因個體的差異而有太大的變動。
- (三) 在幼蟲時期，正常小眼分化的趨勢為：距離生長溝越遠的小眼，也就是較早分化的小眼，所具有細胞數越多(圖十四、表六)。

二、分析 Nemo type

- (一) 以總個數來看，Nemo type 與 Wild type 個數最為接近(表一、表二)，排列方式也與 Wild type 最為接近(表三)，但是就外觀上來說，Nemo type 複眼形狀較狹長(圖九)。
- (二) 參考文獻資料中的電顯圖片(圖九)發現 Nemo type 小眼形狀是四邊形，而以表五的結果可知 Nemo type 的單一小眼較 Wild type 狹長，因此認為 Nemo type 複眼形狀較狹長是因為四邊形小眼的形狀較細長。
- (三) 為了證明複眼形狀較 Wild type 狹長是因為四邊形小眼的形狀為較細長，參考表八的長寬比例畫出小眼，再用 Wild type 的小眼列方式重組出 Wild type 與 Nemo type 的複眼簡圖。比較後，Nemo type 的複眼形狀也較 Wild type 狹長(圖十、圖十一)。由此得證：Nemo type 複眼較狹長的原因為 Nemo type 的小眼是四邊形所造成。
- (四) 在幼蟲階段，其小眼生長趨勢與 Wild type 相同，並沒有出現異常(圖十四、表六)。

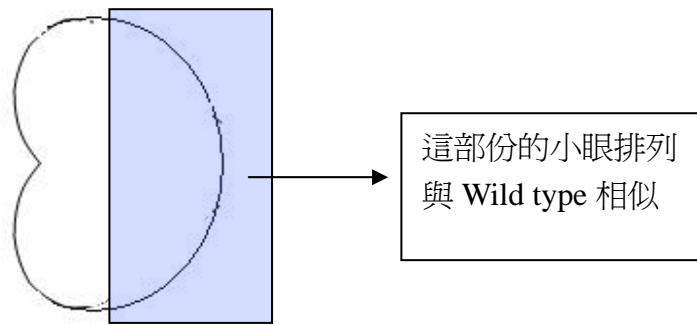
三、分析 L type

- (一) L type 小眼個數明顯少很多(表二)。
- (二) 在做雷射掃描時發現 L type 的眼碟較小，也就是其可生長成為小眼的細胞數目較少。此外，根據圖十二，眼碟上的小眼排列正常，因此推測生長溝有掃過整個眼碟。又由圖十四得知其小眼分化趨勢與 Wild type 相同，並沒有出現異常，故認為造成小眼數目較少的原因不是生長溝掃眼碟的階段小眼分化出現問題，而是在形成眼碟的階段出現問題。
- (三) 發現若由斜的方向數小眼，其排列較為規則，推測 L type 複眼有可能是以斜向方式排列，而造成斜向排列的因素認為是在小眼分化完成後眼碟形成複眼時發生傾斜的現象。
- (四) 小眼數量明顯較 Wild type 少，使 L type 的小眼的排列較為鬆散，以致小眼形狀也較為不規則。

四、分析 B type

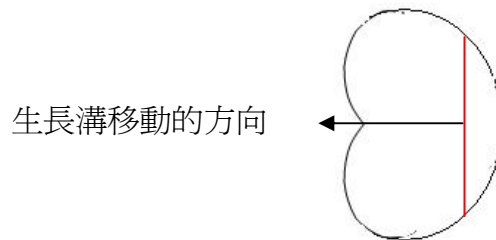
- (一) 就小眼排列來看，愛心型的尖端(圖五藍色部分)排列與 Wild type 十分類似(表一、表三)，到了心的上半段分叉部分(圖五黃色部分)，似乎中間的小

眼有少了一些造成類似愛心型的形狀(圖十五)。



圖(十五) B type 電顯示意簡圖

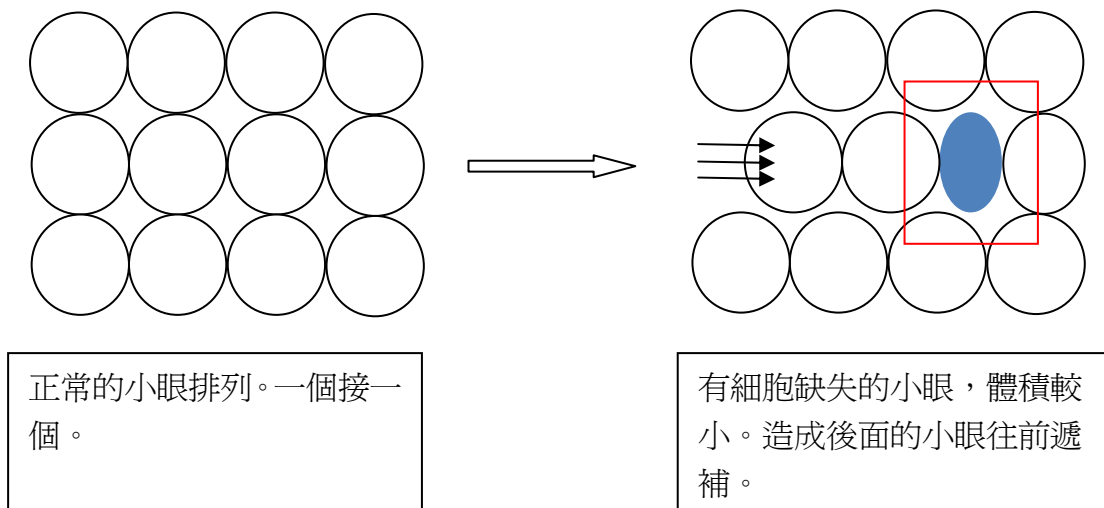
(二) 根據研究資料，生長溝是由愛心尖端開始移動(圖十六)，由此可知混亂的上半部細胞，是較晚生成的部分。



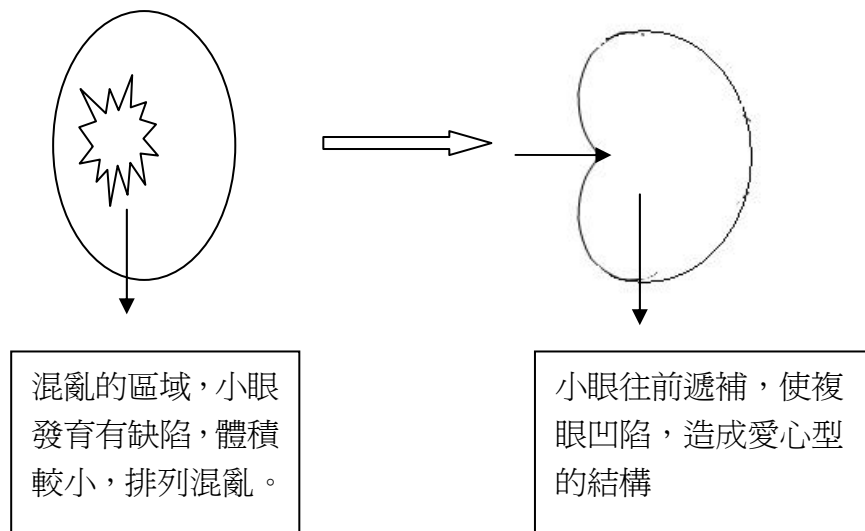
圖(十六)生長溝移動圖

(三) 就正常的情形來看，較早分化的小眼，細胞數應當比較晚分化的小眼來的多，然而根據圖十四和表六，B type 一些較早分化的小眼相對於較晚分化的小眼，其細胞數較少，此可證明其小眼發育有細胞缺失。

(四) 在此，做一簡單的推論，小眼內細胞的大小會影響小眼的體積。而 B type 小眼發育的缺陷，造成細胞的缺失，也就造成部份小眼體積較小，進而造成小眼結構混亂。由圖十二的比較結果，B type 小眼混亂的區域集中在複眼的中間，此區小眼體積的減少，造成的後面的小眼往前遞補空缺，最後造成複眼凹陷，形成愛心型。



圖(十七)異常的小眼堆疊



圖(十八)愛心形複眼成因示意圖

捌、結論

- 一、Nemo type 複眼形狀之所以較狹長是因為單一小眼形狀為四邊形，且這種四邊形的小眼相對於 Wild type 六邊形小眼而言較細長，而 Nemo type 小眼個數與排列方式也與 Wild type 幾乎相同，所以狹長形並不是因為小眼排列與數目造成，而是小眼形狀為四邊形造成。
- 二、L type 本身小眼數目就較少，因此複眼的面積較小。小眼數約有五百多個，大約是 Wild type 小眼總數的三分之二倍，其小眼為以類似 Wild type 排列方式斜向排列但總數又再變少。而產生此異常的原因應該是在發育形成眼碟的過程，以及眼碟上的小眼分化完成後要形成複眼的過程發生問題，而不是在眼碟形成後小眼分化異常所造成，近一步的證據要藉由深入研究雷射掃描的結果中取得。
- 三、B type 根據雷射掃描和電顯的結果，發現小眼發育有缺陷，中間區域的混亂造成凹陷的部分，推測是形成愛心形複眼原因，至於其詳細的發育過程，必須要再更深入分析雷射掃描，進而找到其缺少的是哪些小眼、哪些感光細胞。
- 四、細胞能互相溝通，是它們細胞有一定的生長及發育方式，最後形成一個組織。本實驗可說明，除了一些化學物質的釋放，細胞間物理性的擠壓及數學的排列方式，也是一種溝通的表現。再本次實驗中，這些皆為造成複眼形狀差異的成因，而這些因素會影響一個器官組織的發育，並影響其形狀。

玖、參考資料及其他

一、果蠅雌雄辨別與外表型態：

<http://grassland.agron.ntu.edu.tw/genelab/FlyStocks.htm>

二、果蠅基因之介紹：<http://flybase.org>

三、布魯克斯(2003)。果蠅－閃亮的生命科學研究先驅 (陳雅茜譯)。台灣: 天下文化

四、Kwang-Wook Choi,& Seymour Benzer.(1994). *Rotation of photoreceptor clusters in the developing drosophila eye requires the nemo gene*

五、Demerec, M. (2008). *Biology Of Drosophila*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

拾、未來展望

一、B type 可更深入分析雷射掃描的資料，詳細找出其小眼發育的過程，並利用不同染劑對各個感光細胞染色，找到未正常發育的小眼和感光細胞，也可為果蠅複眼的發育提供更為完整的資料。

二、也可考慮做 B type 蛹時期的眼碟的 confocal，認為在蛹階段有使愛心形複眼定型的關鍵。

三、已知有另一種突變種，其複眼的形狀為倒愛心形，若進一步研究此種果蠅，將能提供更多數據，能對 B type 的研究有所幫助。

四、本實驗結果在未來可應用於於探討細胞間的溝通。舉例來說，為何人類的眼睛會發育成橢圓形？為何人類的肝臟是三角形？我們認為這都是由一個個細胞在器官生成時排列出來的。在第一個細胞長出後，第二個細胞是如何被確定要長在哪裡，這便與細胞與細胞間的溝通有關，而小眼與小眼間擠壓的現象亦為一種細胞溝通的表現。此外，人類體內許多蛋白質與果蠅相同，因此探討果蠅的細胞溝通，希望對建構人類體內器官等研究有所助益。

【評語】 040716

此作品對果蠅小眼細胞排列方式及數量造成複眼形狀不同有詳細的觀察，亦討論三個基因突變與小眼細胞之生長與發育的關聯。除了探討物理性的擠壓及排列方式之外，若能多探討此三個基因的作用或與人類基因的相似或相關性及其功能則更有意義。