

中華民國第 55 屆中小學科學展覽會 作品說明書

國中組 生物科

佳作

030304

步步驚心，玻玻驚喜

學校名稱：臺中市立大墩國民中學

作者： 國二 劉羽芯 國二 吳柏諭 國二 曾珮晶	指導老師： 馬智剛 童師薇
---	-----------------------------

關鍵詞：永久玻片、量產玻片、顯微鏡觀察

摘要：

從國中開始，玻片便是生物實驗中重要的一環。但是，永久玻片的取得不易，製作成本高昂；而且傳統的硬式玻片相當容易損壞，更令人膽顫心驚的是，破裂的玻片碎片相當危險，極有可能危害到學生進行實驗的安全，也讓校方對於玻片的使用戰戰兢兢。因此想製作出，一，低單價—以亮光模型漆代替不但昂貴又不易取得的封片膠；二，可量產—增加顯微鏡技術的效率，與更為廣泛的實用性；三，用軟式的方式封片—期待能大幅降低毀損率，以及提升實驗普遍性。

壹、研究動機

玻片對我們國中生而言並不陌生，但是課堂上不時會發生同學嬉鬧、不慎……等等，損壞玻片，進實驗室老師有時也會警告同學「某年某班剛剛打破玻片，做實驗的時候小心碎片」、「做實驗小心一點!已經有……班打破……片玻片了。」之後詢問老師才知道傳統永久玻片成本高昂，取得有時甚至有壟斷或瞞天喊價的情形。因此我們想要製作出，更低成本、安全、同時能更為普及的玻片。

貳、研究目的

- 一、各國中實驗室能用簡單方式製作永久玻片。
- 二、用大量的方式製作永久玻片，希望提升顯微鏡技術實驗的效率及實用性。
- 三、改進各種不同組織的封片流程，使此技術可廣泛運用在各種組織上。
- 四、驗證此種方式與傳統玻片的替代性。

參、研究設備及器材

使用的器材以國中實驗室以及教務、行政可以找到的物資為主，其餘的模型漆之類的用品來自於家中現有的模型材料、以及做模型的工具組，實驗中的增補耗材則於模型店家購買，皆屬可以輕易備齊的材料。最後，美觀用的藝術紙或是相關的資源來自於美術教室。

表一、設備、藥品及材料表

器具	護貝機 (溫度可調式)	模型工具組	簡易離心機
藥品	酒精 (75%及 100%) 染劑 (碘酒及亞甲藍)	X-20 溶劑 (田宮製)	X-22 亮光漆 (田宮製)
耗材	護貝膜	圖畫紙	西卡紙、藝術紙
樣本	植物組織	動物組織	

肆、研究過程或方法

永久玻片的原理概述如下，基於國中二年級下學期第五章有機化合物的原理，我們明白了在顯微鏡永久玻片製作時繁瑣的操作流程的原因在於保存組織必須要脫水乾燥，保持水分則會直接導致發霉與腐壞，然而水卻是細胞中最主要的物質，脫水將會直接導致細胞萎縮，這樣就失去了觀察的意義。因此將水置換成其他非水物質就是永久玻片的目標。

另外在國中一年級下學期第二章細胞學中，我們學習到細胞本身都是透明的，但是由細胞組成的生物卻不是透明的，經過資料搜查的結果，我們理解到原因出在於脂質與色素，光學顯微鏡必須要能透光才能觀察。因此，找尋容易透光的材質置換水就是本實驗的目的之一。

最後，完全脫水以及封片時的壓力都會導致細胞潰爛，潰爛就不能觀察了，所以必須要能凝固而提供支撐力的物質。仔細一想壓克力，就是這樣的東西，而液狀的壓克力市面上就有現成的壓克力系的模型漆。

然而將水性的細胞質液代換成油性的模型漆，我們想到了有機化學課中老師強調過的兩性溶劑，一端含碳鍊的親油端，一端含親水端，而且又要能輕易取得，這就跟生物顯微技術（參考資料）這本講義裡面說的一樣，先用酒精取代水，再用溶劑取代酒精，最後用溶劑將壓克力滲透到組織中完成固化，這樣就能完成永久玻片。

最後，我們嘗試著驗證這樣的代換跟傳統的加拿大膠封片有無差異，至截止前還在努力中，目前完成的部分有從硬體的耐久度的測試，是直接摔落的方式來量化耐摔性；至於對紫外光的抵抗，則預計用紫外燈包裹鋁箔紙強制照射；以及用磚頭墊著修尖底部的巴爾紗木，利用國中二年級下學期理化第六章力與壓力的 $F=P/A$ 原理，直接用壓力擠壓玻片組織的測試。後續兩個測試還在製作中，預計在展覽當天能夠完成。

一、軟式永久玻片的製備

參照生物顯微技術標準的永久玻片流程，修改流程如下。

固定→復水→染色→退染→脫水→置換→滲漆→封片→後製

(一) **固定**：將切下的樣本以 75%的酒精浸泡 20 分鐘（附註:依組織厚度而定，此以洋蔥下表皮為準），快速殺死組織，期以讓組織保持最鮮活的狀態。標準使用 PFA 但顧慮到毒性的問題，改用酒精固定法。



圖一、以 75%酒精固定組織

(二) **復水**：多數生物染劑屬水溶性，因此必須將水還給組織。因此以蒸餾水浸泡二十分鐘，可斟酌浸泡時間，但避免發霉，不宜浸泡過久。



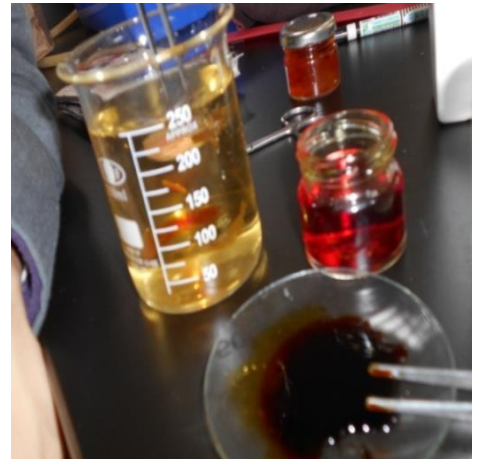
圖二、以蒸餾水復水

(三) **染色**：將組織浸於亞甲藍或是碘酒的染劑之中，單層細胞約二十秒，時間可隨組織厚度增加，但不宜過長，避免退染不易。



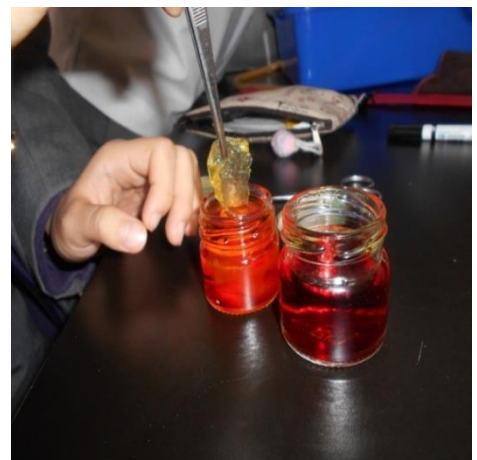
圖三、以亞甲藍或碘酒染色

(四) **退染與脫水**：將染色的組織以清水浸泡二十分鐘洗去染劑完成退染，為了把組織中的水置換成酒精，再以 75%的酒精酒精浸泡二十分鐘，接著換到 95%的酒精之中浸泡二十分鐘，最後放入 100%的酒精靜置。



圖四、將染劑以酒精退染脫水

(五) **置換**：將組織自 100%酒精之中，放到 X-20 田宮模型漆溶劑中洗淨，再換到小瓶的 X-20 田宮模型漆溶劑中，靜置三十分鐘以上，以確保將組織中的酒精完全置換成 X-20。



圖五、將酒精中換為 X-20

(六) **滲漆**：將置換的標本置於 X-22 田宮亮光漆中隔夜，以確定組織滲漆完全



圖六、將 X-20 換為 X-22

(七) 封片：將標本從 X-22 中取出後，整齊但間隔不宜太小的排列於護貝模夾層之上，將組織攤平，若組織少，排列完成後於最前沿以油漆筆沾 X-22 畫一橫線補充，輕壓捲入護貝機中封膜。



圖七、護貝機封片

二、測試何種溫度最適合封片：

研究中若護貝機溫度太高，則 X-22 會燒焦，若溫度太低，則封好的玻片之中會有氣泡，不利於觀察。護貝機最低溫度為一百度，因此從一百度開始，每十度為一個間隔逐步調高溫度，找出最適當的溫度。

三、測試可否將此技術廣泛運用，用各種不同的組織進行封片。

(一) 洋蔥表皮細胞：

如上述標準步驟所示，證明基本植物細胞可以使用。

(二) 全葉封片：

將葉先以酒精隔水加熱脫去色素，切成小塊後延長每一步驟時間至一節課的時間間隔，約四十五分鐘，之後依原本步驟封片。

(三) 花粉：

將花粉浸泡到 75%酒精之中。將花粉放入離心機之中離心。將花粉浸入 X-20 之中三十分鐘。放到護貝膜上端處攤平，夾入長條狀簍空圖畫紙，模擬抹片方式之後夾入護貝機護貝。

(四) 肌肉細胞：

從生雞翅取下一小塊肌肉並將雞肉撕碎。浸入 75%酒精中固定二十分鐘。再將雞肉取出後撕的更碎，浸入蒸餾水中二十分鐘，以結晶紫染色兩分鐘。取出後置入蒸餾水中 20 分鐘退染。將其換至 75%酒精靜置二十分鐘。換成 95%酒

精二十分鐘。換成 X-20 溶劑浸入洗淨。再放置於 X-20 三分鐘以上，接著換液置於 X-22 中隔夜靜置。取護貝膜以及挖洞的 A4 紙將小碎塊肌肉置於挖好洞的夾層中，並在前方一點點的地方滴上一滴 X-22，先將護貝膜蓋上，以手指或是藥匙末端輾壓標本的位置以求打散細胞，將護貝膜速入機器中壓制，修片與封入紙臺架。

(五) 雞血：

將雞血放入配有肝素的離心管中以離心機中離心，加入酒精(不能使用 PFA)固定，以花粉要領抹片護貝。

(六) 塵蹣：

將透明膠帶貼在許久未洗的棉被上再撕下，試著採集到塵蹣，再貼到護貝膜上，將膠帶撕下，送入護貝機中護貝。

四、玻片的耐摔的測試

拿傳統玻片與新式玻片從八十公分的高度開始，以五公分為一間隔遞增摔落到地面。並測量實驗桌與一般人拿玻片之高度，以量化玻片耐摔的能力與安全性。



五、紫外光耐久性能測試（製作中）

驗鈔燈一盞，將以加拿大膠封片的洋蔥表皮玻片、以 X-20 封片的洋蔥表皮玻片，以加拿大膠封片的洋蔥表皮護貝膜片、以 X-20 封片的洋蔥表皮護貝膜片，貼緊燈罩外側以鋁箔紙包裹，每天打開檢查變質狀況以及更換電池。

六、抗壓力測試（製作中）

以巴爾莎木軟質木材當作墊子避免壓壞蓋玻片，並將其切割成下小上大，底面約一個蓋玻片大小，將磚頭逐次添加直至玻片壓破或組織壓爛為止。

伍、研究結果

一、封片流程

由於 X-22 會溢出護貝膜外，造成護貝機故障，並且護貝膜捲入護貝機之中燒焦，護貝機冒出黑煙，並且發出喀吱、喀吱的怪聲。因此之後我們試著將簍空的圖畫紙(一百二十磅)，夾入護貝膜之中，可以吸收多出的 X-22，使 X-22 不會溢出，護貝膜也不會捲入護貝機中燒焦。結果成功，一如預期成功做出玻片。流程與一般永久玻片的製作其實並沒有太大的差異，主要是在封片方式不同，除了封片流程之外，其餘步驟並未修改。

表二、修正後的封片方式

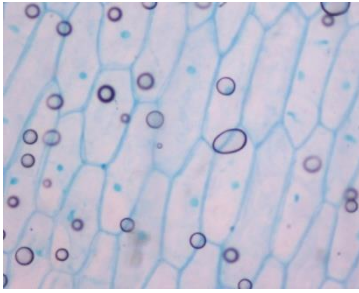
Before	After
將標本從 X-22 中取出後，整齊但間隔不宜太小的排列護貝模夾層之上，將組織攤平，若組織少，排列完成後於最前沿以油漆筆沾 X-22 畫一橫線補充，輕壓捲入護貝機中封膜。	取影印紙以邊緣莫約三公分的寬度簍夾於護貝膜夾層中，避免 X-22 滲出，並將標本從 X-22 中取出後，整齊但間隔不宜太小的排列護貝模夾層之上，若組織少，排列完成後於最前沿以油漆筆沾 X-22 畫一橫線補充，輕壓捲入護貝機中封膜。

二、適合封片之溫度

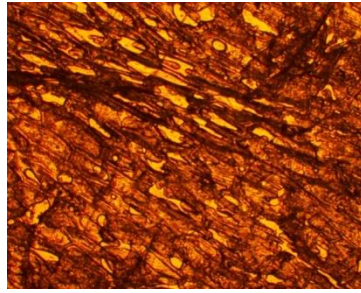
表三、洋蔥表皮細胞的封片溫度測定

	100°C	110°C	120°C	125°C	130°C
結果	氣泡較多	氣泡較 100°C 減少	氣泡較 110°C 減少	燒焦	燒焦

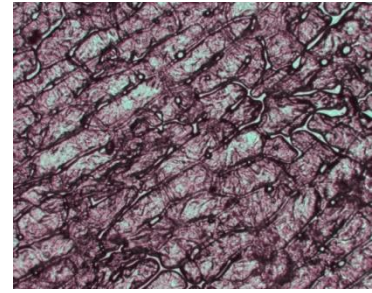
結果發現在不會燒焦的前提下，為一百二十度以下最為恰當，但是也發現，溫度越高，玻片變質機率越高，將溫度調高到一百二十五度，成功率並不高。雖然一百二十五度氣泡最少，但是氣泡只會稍稍影響觀察，比起整塊玻片變質燒焦，還是較低溫度適合薄組織封片。



100°C 洋蔥護貝片



125°C 洋蔥護貝片

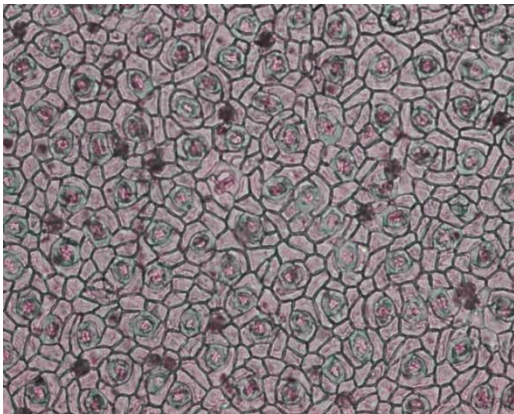


130°C 洋蔥護貝片

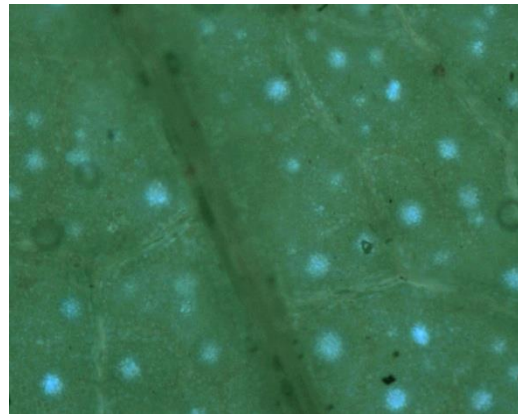
圖九、不同溫度下（取 100°C、125°C、130°C）的洋蔥表皮玻片比較

三、測試此技術可否廣泛運用在各式玻片

(一) 不同厚度的翠蘆荊，用於觀察氣孔與保衛細胞以及葉脈的需求



薄植物組織（翠蘆荊下表皮）

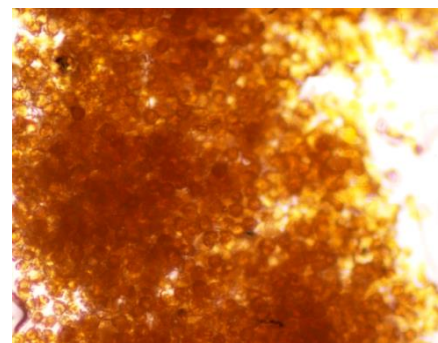


厚植物組織（翠蘆荊葉脈）

圖十、厚薄植物組織適用性測試

(二) 花粉

原本的封片方式花粉都擠在一起，太過密集，無法觀察，因此用傳統抹片方式確認是否是封片方式的問題。



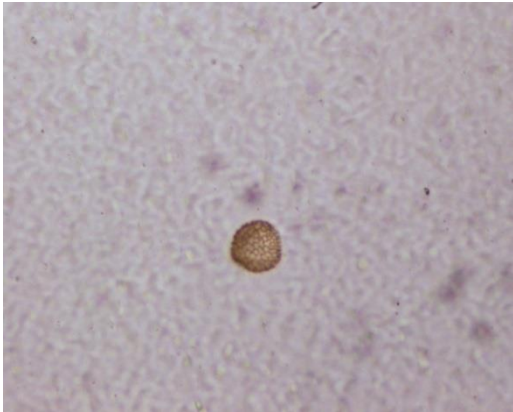
圖十一、過於密集的花粉抹片

傳統抹片方式：

將花粉浸在 95%酒精將細胞殺死，花粉離心之後，放到 X-20 中，把 X-22 放到玻片上進行抹片。結果相當成功，反而花粉不夠密集。但這，也可以確定不是

因為封片方式的問題。為了解決封片之後花粉太過密集的問題，修改封片方式，修改後的流程如下：

將花粉浸泡到 75%酒精之中二十分鐘。將花粉放入離心機之中離心。將花粉浸入 X-20 之中三十分鐘。放到護貝膜上，護貝膜剪成長條形，中間夾影印紙簍空成長條型，將花粉放置在前端。封片完之後，花粉疏密分佈從前段到後端分別由密到疏，取中段觀察。



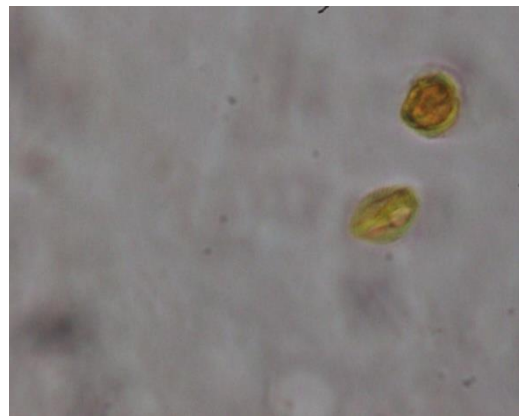
100X 香水百合花粉粒



200X 香水百合花粉粒



400X 香水百合花粉粒



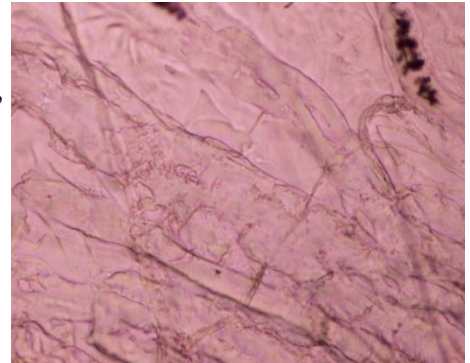
400X 咸豐草花粉粒

圖十二、護貝封片可以適用於花粉抹片製作

(三) 雞肉細胞：

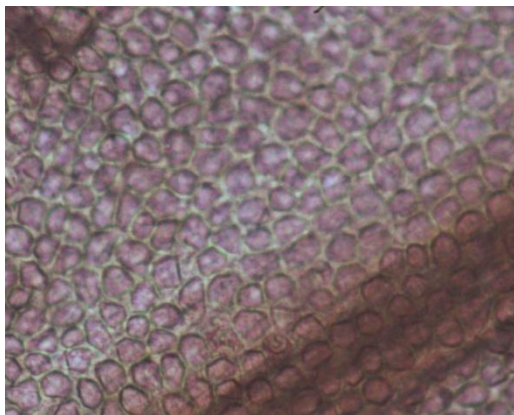
初次試作並不成功，雞肉壓的不夠散，染色也染得不夠透徹，下次修改流程為增長浸泡酒精與染劑的時間。從生雞翅取下一小塊肌肉並將雞肉撕碎。浸入 75%酒精中固定一晚。再將雞肉取出後撕的更碎，並浸入蒸餾水中兩小時，

再以結晶紫染色 1 分鐘。取出後置入蒸餾水中 20 分鐘退染。將其換至 75%酒精靜置半小時兩次。換成 95%酒精一小時。換成 X-20 溶劑靜置一小時。再放置 X-20 一小時以上，再換液置 X-22 中隔夜靜置。取護貝膜以及挖洞的 A4 紙將小碎塊雞肉置於挖好洞的夾層中，並在前方一點點的地方滴上一滴 X-22，先將護貝膜蓋上，以手指或是藥匙末端輾壓標本的位置以求打散細胞，將護貝膜速入機器中壓制，修片與封入紙臺。

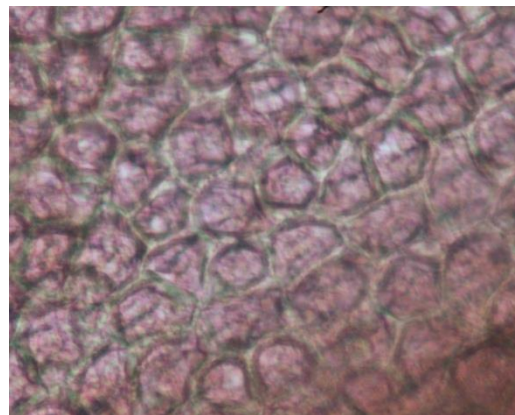


(四) 聖誕紅全葉封片表皮細胞

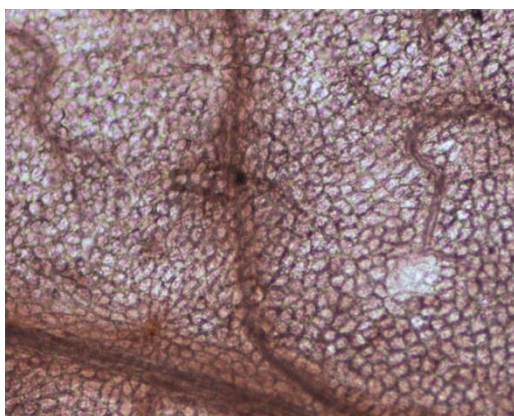
圖十三、雞肉細胞壓片護貝



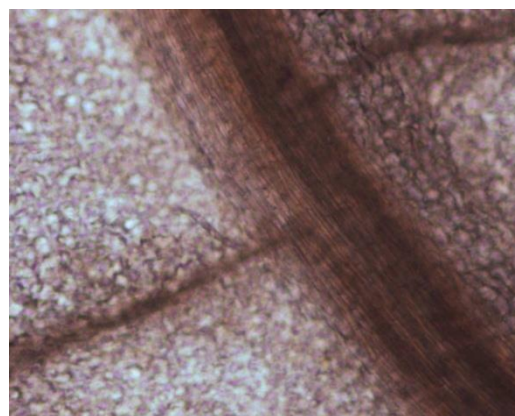
200X 110°C 聖誕紅全葉封片表皮細胞



400X 110°C 聖誕紅全葉封片表皮細胞



100X 120°C 聖誕紅全葉封片表皮細胞



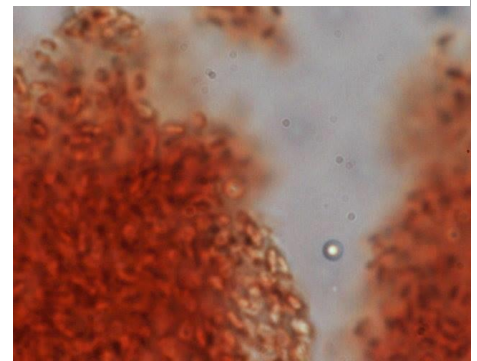
200X 120°C 聖誕紅全葉封片表皮細胞

圖十四、護貝封片可以適用於較厚的聖誕紅全葉封片製作

為了理解護貝封片是否可以操作較厚的全葉表皮封片，我們測試了聖誕紅葉片，除了用酒精隔水加熱脫色後，未經染色，但是增長所有的流程至一節課，約四十五分鐘，滲漆的步驟還是隔夜，如此做出來的效果顯示較厚的葉片也能做到全葉封片。

(五) 動物細胞的抹片

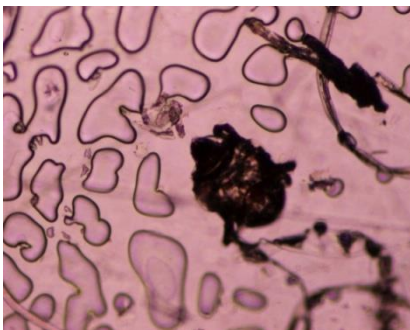
既然植物細胞可以抹片，我們就試著使用動物細胞抹片觀察。雞血來自東海大學的實驗用養雞場，雖然在取得的時候有使用肝素，但是由於在固定的過程中，只使用了 75%酒精，而離心機的取得也是在此之後的事。因此結塊嚴重，動物抹片基本上並沒抹勻，而在 1000X 的視野下尚可清楚見到細胞核的所在，依舊可見其封片的功效。



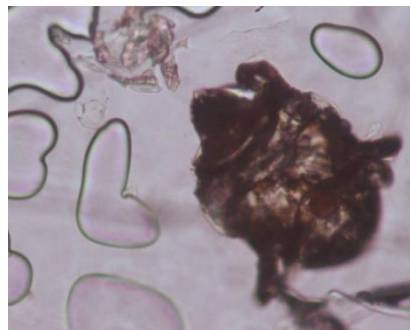
圖十六、雞紅血球細細胞抹片

(六) 塵蹣

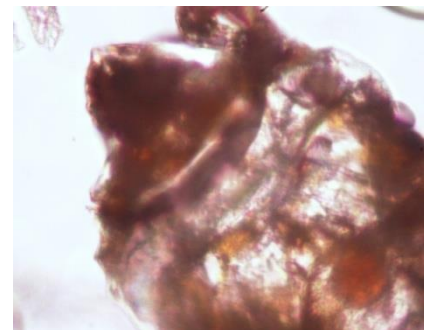
由於節肢動物只有要乾燥就易於保存的特性，我們嘗試著以節肢動物為研究目標，利用簡易的膠帶採集法，直接封片護貝的結果，也是相當令人振奮的，之後將要進一步開發這樣的方向，或者可以搜尋土壤中的微小節肢動物。



100X 棉被上的塵蹣



200X 棉被上的塵蹣



400X 棉被上的塵蹣

圖十七、棉被上的塵蹣膠帶採樣封片

四、硬體的耐摔性的測試

基於我們測試的結果，軟式的玻片基本上無法損壞，甚至失手自三樓飄下依然完好如初。因此，我們可以認為軟式玻片對此一項目而言，擁有壓倒性的優勢，因為它甚至可以撓曲也依舊保有玻片標本的性質。

表四、從不同高度摔落兩種玻片的測試

高度	80cm	85cm	90cm	95cm	100cm	105cm	110cm
軟式玻片	完好	完好	完好	完好	完好	完好	完好
傳統玻片	完好	破	破	破	破	破	破

陸、討論

我們以國中小學實驗室在設備不足的條件下完成幾乎所有的實驗，除了顯微照相保存紀錄外，幾乎全能完成。但，對於細小的花粉樣本而言，沒有離心機確是很大的遺憾，因此要製作花粉的玻片，就必須商借其他設備較為齊全的實驗室。無法當下採集，立即處理，延誤了數天的時間，以致部分花粉出乎預期之外的長出花粉管並且互相纏繞，使得實驗變得更加複雜，甚至有些花粉樣本還發霉，甚至結塊（圖十一），造成損失，而更要求新鮮度的血液樣本（圖十六）亦是如此。討論之後認為，起因還是因為保存時沒有處理好，才會發霉，應該更注意實驗前保存的部分，也許對植物細胞而言，冷凍會是一個方法，或者希望科展能開放使用福馬林（PFA）這類標準的固定用藥劑。

此外，進行何種溫度較適合封片的實驗的時候，同樣的溫度，有時卻會有不同的結果，甚至是 120°C 和 100°C 相比，100°C 卻氣泡比較少，出現與實驗預期結果不符的狀況。經過討論之後，認為是因為製作玻片的組織不同，不同的組織需要不同的溫度，另外在將組織從 X-22 中移到護貝膜上攤平的時候，攤平的熟練度也是很重要的，取出之後花太久時間整片才進行封片，可能導致 X-22 乾掉後，封片造成氣泡，或許可以用降低 X-22 濃度的方式改善。我們必須找出這個相對上寬裕的模型膠濃度條件，以期使本技法能廣泛的被使用。

最後，我們將進一步的對顯微鏡技術加以鑽研，確實的比對出傳統封片膠與模型漆的實

質差異，我們對此抱持著相當樂觀的看法，因為田宮(TAMIYA)模型社製作的亮光漆是行銷數十年的老牌產品，對其硬化後的支撐度，以及抗紫外線的能力或者是保護被其包覆物的效果上面，雖然不一定是業界最好，但是卻經過了時間的考驗，筆者的父輩也使用過此一品牌二十年以上，因此開發這樣的保存標本方式，我們保有相當樂觀的看法認為 X-22 模型漆能挑戰傳統封片膠的地位。因此，我們認為，這個研究對生物領域方面而言具有強大的潛在貢獻的可能性，希望能推廣。

柒、結論

傳統永久玻片，與我們新式玻片的標本處理過程相同，最大的不同在於最後一個步驟一封片，也因此我們站在前人的經驗上進一步的開發出更有效率、可量產、材料隨手可得、製作簡易連國中生也能夠輕易製作的方式，以及不慎從高樓落下也不會損壞，可以對折彎折的安全性標本玻片，期待能夠大幅降低毀損率，提升實驗普遍性，以及對增進生物研究的發展性，做出貢獻。

捌、參考資料及其他

生物顯微技術 國立中興大學教授 林金和/編著

【評語】 030304

1. 本作品研發護貝膜取代玻片，用於顯微鏡觀察上，並製作了一定數量的樣品來支持，作者的目的是是一個分工合作的作品，值得鼓勵。
2. 作品的發明要完全取代玻片還是有很多問題要克服的，尤其是細胞之類的樣品。
3. 如果所呈現的標本照片與玻片的成品一起呈現，將更有比較優劣的說服力。