二、實驗材料與方法

2-1、實驗材料：

(1)卵細胞：

實驗所使用的材料為負子蟾(*Xenopus laevis*)的卵細胞(oocyte)，來自清華大學生命科學院周姳媛老師的實驗室。

(2)化學溶液配方(以實驗觀察中出現的順序排列)：

a. PBS(phosphate buffer saline)溶液：

每升含有 2.88g Na_2HPO_4、0.24g KH_2PO_4、8.0g NaCl、0.2g KCl，pH7.2。

b. 混和固定液：

以 PBS 溶液將 25%戊二醛(glutaraldehyde)與 16%甲醛(para-formaldehyde)稀釋成 2%戊二醛與 4%甲醛的混和液。

c. 蛋白質膠(coating solution)配方：

2.5g gelatin 加熱至 50℃使其溶解在 400ml 的二次水中，冷卻後加入 2.5g $KCr(SO_4)_2$，使最終體積達 500ml。

d. 5%硝酸銀($AgNO_3$)溶液：

此為重量百分比，即 5 克硝酸銀溶解於 95 克的二次水形成 100 克溶液。

e. 5%$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液：

此為重量百分比，即 5 克 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶解於 95 克的二次水形成 100 克溶液。

f. 伊紅(Eosin-Y)染劑：

取 2.5g Eosin-Y 溶解於 25ml 的二次水，再加入乙醇使最終體積為 500ml。

2-2、 實驗方法：

(1)磷酸鈣沈積：

將卵細胞置於海水中(海水主要成分於下表)，先提供鈣離子，也就是加入 0.15M 的 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 與 NH_4OH，放在 55℃的烘箱中一個星期，使鈣離子滲入卵內。之後再提供過量的磷離子，也就是再加入 0.3M 的$(NH_4)_2HPO_4$，同樣放置於 55℃的烘箱中一個星期，使其依據化學反應方程式 (如下)沈積出磷酸鈣：

$$10Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O + 8NH_4OH + 6(NH_4)_2HPO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20NH_4NO_3 + 6H_2O$$

海水主要成分	濃度(g Kg^{-1})，S=35‰
Na+	10.765
Mg+	1.294
Ca+	0.412
K+	0.399
Sr^{2}+	0.0079
Cl^{-}	19.353
SO_4^{2-}	2.712
HCO_3^{-}	0.142
Br^{-}	0.0674
F^{-}	0.0013
H_3BO_3	0.0256

TSING HUA UNIVERSITY

(2)增加細胞膜通透性：

先將卵細胞浸於 70%的乙醇中，並冰在-20℃overnight。之後再置換到含 8% Triton X-100(化學式為 t-Oct-C_6H_4-$(OCH_2CH_2)_xOH$，x：9-10)的 PBS 溶液，於冰浴中靜置 100 分鐘。然後以 PBS 溶液清洗卵細胞約五次直到乾淨，再以上述方法進行沈積。

(3)磷酸鈣重複沈積：

將卵細胞置於海水中，先提供鈣離子，也就是加入 0.15M 的 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 與 NH_4OH，放在 55℃的烘箱中兩天，使鈣離子滲入卵內。之後再提供過量的磷離子，也就是再加入 0.3M 的$(NH_4)_2HPO_4$，同樣放置於 55℃的烘箱中兩天。沈積後

將溶液倒掉並重複上述步驟，共三次。

2-3、 實驗觀察：

(1)掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope，SEM)：

a. 樣品固定與脫水：

沈積後的卵細胞浸於混合固定液中一個小時，以 PBS 溶液清洗乾淨，之後再用乙醇系列脫水，依序為 20%、30%、50%、70%、80%、95%、100%、100%，各 30 分鐘。

b. 樹脂(resin)包埋：

繼乙醇系列脫水後，以 50%(用 100%乙醇稀釋)、75%(用 100%乙醇稀釋)、100%、100%的 Spurr’s resin 逐步置換，各 40 分鐘。最後再置換一次 100%的 Spurr’s resin，並將卵細胞逐顆分別放置於矽膠包埋版內，在 70℃烘箱中聚合 12 個半小時。

c. 研磨拋光：

將聚合好並包埋著卵細胞的樹脂樣品以熱熔膠固定於玻片上，在旋轉研磨機上以 1200 號的水砂紙小心將樣品磨至欲觀察的切面，最後用絨布與拋光液將切面拋光。

d. 鍍碳覆膜(coating)：

拋光好的樣品用二次水清洗掉表面殘留的拋光液後，以銀膠將之黏到 SEM 載台 (stub) 上，利用清華大學材料系之真空鍍碳機(sputter)鍍上一層碳，厚度 300~400Å。

e. 元素分析(EDS)與分佈(mapping)：

利用 Hitachi H-700H SEM 在電壓 15kV 下觀察卵細胞的研磨切面，於一個範圍作元素分析後，針對鈣與磷做出元素的分佈圖。

(2)穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscope，TEM)：

樣品之固定脫水與樹脂包埋同掃瞄式電子顯微鏡之樣品處理。

a. 超薄切片：

將聚合好並包埋著卵細胞的樹脂樣品修整成小於 $1mm^2$的梯形，用超薄切片機以鑽石刀切出 90~95nm 的薄片，再以覆有 formvar 膜的鎳網撈起。

b. 切片觀察：

利用 Hitachi H-7500 TEM 在加速電壓 100kV 下觀察切片，可觀察卵細胞內磷酸鈣的晶體沈積情形。

(3)石蠟(paraffin)切片染色：

a. 樣品固定與脫水同掃描式電子顯微鏡之樣品處理。

b. 石蠟包埋：

繼乙醇系列脫水後，浸入二甲苯(Xylene)中置換出乙醇，一次 30 分鐘，共三次。然後以熔融狀態的石蠟置換二甲苯約五次，最後使石蠟凝固完成包埋。

c. 石蠟切片：

將包埋著 oocyte 的石蠟塊修整成梯形，利用迴轉式切片機切出厚度為 4μm 的薄片，將切片放在約 45℃的水浴中使之展開，並以覆有蛋白質膠的玻片撈起並烘乾。

d. 切片染色：

將烘乾後的玻片浸於二甲苯中 10 分鐘，共兩次，使石蠟溶解脫除，再以乙醇系列置換二甲苯，依序為 100%、95%、80%、70%，各一分鐘，接著放在二次水中洗滌 10 分鐘。然後以 5%的硝酸銀($AgNO_3$)溶液照光染色 60 分鐘，之後水洗數次，再浸入 5%的 $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 溶液 5 分鐘，以洗去多餘的銀離子，水洗數次。接著以伊紅（Eosin-Y）染劑染色 3 分鐘，再以 95%、100%的乙醇各洗滌一分鐘，後置換至二甲苯中 10 分鐘，共兩次。風乾後蓋上蓋玻片並以阿拉伯膠封片，凝固後即可在顯微鏡下觀察。

(4)感應耦合電漿質譜分析(inductively coupled plasma-mass spectrometer，ICP-MS)：

沈積後的卵細胞先以二次水洗淨表面殘留的磷酸鈣，冰於-70℃中至少一個小時，經過冷凍乾燥後，浸在 65%的硝酸 100μl 中待溶解，再加二次水稀釋至 1ml，送件分析。

TSING HUA UNIVERSITY