

2. 實驗材料和方法

2.1 實驗材料

本實驗採用購於新竹極深水族館的小海葵(*Parazoanthus axinellae*)，它主要生活在強光、溫度 20-26°C 以及水流中等的淺海海域中。成體的長度約 2-3cm，體色呈現黃色，以群體方式附著於已死亡的珊瑚叢或是礁岩表面上。由於體積小方便於實驗操作，故選用之。

2.2 化學溶液配方

(1)人工海水：調配重量百分濃度為千分之 35 的人工海水，主要成份如下

離子	重量千分濃度(1/1000)	溶積莫耳濃度(M)
Na ⁺	10	0.55
Mg ²⁺	1.2	0.067
Ca ²⁺	0.41	0.021
K ⁺	0.39	0.021
Sr ²⁺	0.079	0.0041
Cl ⁻	19	0.99
SO ₄ ²⁻	2.7	0.14
HCO ₃ ⁻	0.14	0.0073
Br ⁻	0.067	0.0035
F ⁻	0.0013	0.00067
HBO ₃	0.025	0.0013

(2)礦化溶液 I：取人工海水 100ml，在人工海水中加入 4.41g CaCl₂ · 2H₂O、4.14g NaH₂PO₄ · H₂O、2g MgCl₂ · 6H₂O、1.8g Urea，使得溶液裡含有飽和的 Ca²⁺、H₂PO₄⁻離子濃度。

(3)礦化溶液 II：取人工海水 100ml，在人工海水中加入 4.41g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、4.14g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 使得溶液裡含有飽和的 Ca^{2+} 、 H_2PO_4^- 離子濃度。

(4)PBS(phosphate buffer saline)：將 2.88g Na_2HPO_4 、0.24g KH_2PO_4 、8.0g NaCl 、0.2g KCl 溶解在 800ml 的去離子水中，待溶解後加入去離子水到 1000ml，pH 值為 7.2。

(5)載玻片覆膜(coating solution)：取 2.5g Gelatin 置於 400ml 的去離子水，加熱到 55°C，待 Gelatin 溶解後，再加入 2.5g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 於溶液中，攪拌溶解後，加去離子水到 500ml。

(6)5%硝酸銀溶液：取 5.0g AgNO_3 加入 100g 的去離子水中

(7)5% $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ：取 5.0g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 加入 100g 的去離子水中

(8)伊紅(Eosin-Y)：取 2.5g Eosin-Y 溶解於 25ml 的去離子水中，再加入乙醇至 500ml。

(9)檸檬酸鉛：在 20ml 的去離子水中加入 1.33g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、1.76g Sodium Citrate，攪拌溶解後加去離子水到 30ml，置於 4°C 冰箱冷藏。

(10)脫水包埋使用的固定液：取 25% Glutaldehyde 2ml 加入 18ml 的 PBS 中，形成 2.5% Glutaldehyde 20ml。

(11)Spurr's resin：依序加入 26g n-Octenyl Succinic Anhydride、6g Vinyl Cyclohexene Dioxide、10g Diglycidyl ether of Poly、0.3g 2-Dimethyl aminoethanol 於離心管中，並且每加完一樣就適度地輕微搖晃讓它們均勻混合。

2.3 實驗方法：

(1)磷酸鈣沈積 I：將黃水螅珊瑚置放在礦化溶液 I 中，置入烘箱兩星期，為了讓 Urea 緩慢分解，我們將烘箱的溫度定為 70°C，Urea 遇熱(55 到 90°C)時會分解成氨和二氧化碳，氨會溶解在礦化溶液中，使得 pH 值上升導致磷酸鈣過飽和而沈積於黃水螅珊瑚細胞中。

(2)重覆礦化沈積：重覆(1)磷酸鈣沈積 I 的方法 1 到 4 次，去觀察重覆礦化的情形下會不會增加磷酸鈣在黃水螅珊瑚細胞中沈積的量。

(3) Mg^{2+} 對於磷酸鈣在黃水螅珊瑚細胞中沈積的影響：調整礦化溶液 I，於 100ml 的人工海水中添加不同濃度的 Mg^{2+} ，分別為 0.01M、0.05M、0.10M、0.15M、0.20M、0.25M，其他的化學成分和實驗方法皆相同，二星期後將黃水螅取出送 ICP-Mass(Inductively Coupled Plasms-Mass spectrometer)檢測 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 $H_2PO_4^-$ 的濃度。

(4)時間對於礦化的影響：同(1)法，改變不同的礦化的時間，分別為 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、7 日、14 日、30 日、60 日。

(5)利用 ICP-MASS 測量不同 pH 值， Ca^{2+} 以及 H_3PO_4 、 $H_2PO_4^-$ 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 的總和在礦化溶液中的濃度。

(6)磷酸鈣沈積 II：將黃水螅珊瑚置放在礦化溶液 II 中，滴入 5ml 的鹽酸溶液，靜置一天，一天後逐日添加 1.5g 的碳酸鈣於礦化溶液中，逐日添加碳酸的目的在於緩慢地提升溶液的 pH 值，使得磷酸鈣過飽和而沈積在黃水螅珊瑚細胞中。

2.4 實驗觀察

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

- a. 固定：沈積後的珊瑚置入固定液中 1 小時，其間不斷地搖晃。
- b. 脫水：將珊瑚自固定液取出，置入 20%酒精溶液中 30 分鐘，然後再取出置入 30%的酒精溶液中 30 分鐘，依此法依序放入 50%、70%、80%、95%、100%(兩次)的酒精溶液中各 30 分鐘。
- c. 滲透：將 100%Spurr's resin 與 100%酒精互溶，調配成 50%、75%的 Spurr's resin，然後將脫完水的珊瑚置入 50%的 Spurr's resin 中 30 分鐘並且加以搖晃增加滲透的效率。30 分鐘後同上法將珊瑚取出置入 75% Spurr's resin 中，最後同上法將珊瑚置入 100%

Spurr's resin 中三次各 30、45、60 分鐘。

- d. 包埋：將滲透完的珊瑚連同樹脂放入矽膠材質的包埋板凹槽中，放入 70°C 的烘箱加熱 16 個小時。
- e. 研磨與拋光：將包埋著珊瑚的樹脂塊用砂輪機研磨至珊瑚的身體，然後使用 0.05 μ m 的鋁粉拋光。
- f. 鍍碳：將處理好的珊瑚樹脂塊清洗乾淨後，利用銀膠黏到 SEM 載台(stub)上，然後送到清大材料所之真空鍍碳機鍍(sputter)上 3000~4000 奈米厚度的碳膜。
- g. EDX&Mapping：利用 Hitachi H-700H SEM 在電壓 15kv 下觀察珊瑚體上各個元素的分佈情形。

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

- a. 固定、脫水、滲透、包埋法同 SEM
- b. 超薄切片：包埋完成後，將樣品的表面修整成大小寬度約 1mm 的梯形面，然後使用超薄切片機切下厚度約 80nm 的薄片，然後以覆有 formvar 膜的鎳網將薄片撈起。
- c. 切片觀察：利用 Hitachi H7500 TEM 在加速電壓 100kv 的情況下觀察磷酸鈣顆粒的分佈情形。

(3) 石蠟切片：

- a. 固定、脫水：同 SEM
- b. 置換：將珊瑚自 100% 的酒精中取出，放入二甲苯有機溶劑中 30 分鐘，重覆兩次，置換期間要均勻搖晃以增加其效率。
- c. 浸潤：將珊瑚自二甲苯有機溶劑中取出，放入 60°C 熔化的石蠟中浸潤 30 分鐘兩次後，放入冰箱讓石蠟迅速的凝固。
- d. 修片：將石蠟塊自冰箱取出，使用刀片切成長寬約 1cm 的梯形

e. 切片：使用迴轉式切片機(rotary microtome)切下厚度約 $6\mu\text{m}$ 的薄片後，用水彩筆撈至 45°C 的水浴中展開，再以覆有蛋白質膠膜的玻片撈起，並加以烘乾。

f. 切片染色：將烘乾的切片放入二甲苯有機溶劑中 10 分鐘兩次使石蠟溶解脫除，然後依序放入 100%、95%、80%、70% 酒精中各一分鐘。接下來將玻片放入去離子水中洗滌，然後再將它放入 5% 的硝酸銀水溶液中 30 分鐘，染二價鹼土族元素。30 分鐘後，將玻片取出並以去離子水洗滌後，放入 5% 的硫代硫酸鈉溶液中 5 分鐘洗去殘餘的銀離子。接著將玻片取出置於蘇木精染劑中染色 3 分鐘，3 分鐘後將玻片取出並以去離子水洗滌乾淨。接下來再放入伊紅染劑染色 30 秒鐘，再以酒精洗去玻片上多餘的伊紅，依序為 95%、100% 的酒精各一分鐘。最後再浸入二甲苯溶液中 10 分鐘，取出後以阿拉伯膠和蓋玻片封片。

(4) 感應耦合電漿質譜分析(Inductively Coupled Plasms-Mass spectrometer, ICP-Mass)：將礦化反應完的珊瑚洗去表面的磷酸鈣沈積後，置於 -80°C 冰箱 1 小時，自冰箱取出後冷凍乾燥一整個晚上，然後溶解在 10% 硝酸水溶液中(以去離子水稀釋濃硝酸)，待磷酸鈣溶解後送原科館 ICP-Mass, (SCIEX ELAN 5000) 檢測。