

臺灣二〇〇六年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作 品 名 稱：單細胞浮游藻類對紫外線防禦機制之探討

學校 / 作者：臺北市立成功高級中學 林廷倫
臺北市立成功高級中學 石博文

作者簡介



我們兩個從高一就在同一個班級上，也同樣爭取到參加生物培訓營的機會。所以，我們從高一開始，就會互相討論一些有關生物的問題。而在高二時，在生物老師魏蜀芬老師的協助下，我們從尋找題目、設計實驗，一直到參加國際科展，整整花費了將近一年的時間，在研究期間，科學研究精神讓我們了解到對於時間的掌握及許多奧妙的道理，也都因此豐美了我們的生命，相信此記憶會永遠烙印於心中深處，即使國際科展落幕，但我們對科學熱情永遠不減，更希望以後還有機會可以從事相關研究。另外，在這段時間內也謝謝魏蜀芬老師、黃聲頻老師、鍾至青學長，和學校的配合，謝謝！

摘要

在先備知識中，我們知道在缺少營養鹽及紫外線傷害下，浮游藻類的葉綠體會因為過氧化物 (R.O.S.) 的增加而受到破壞，進而影響光合作用的進行，甚至導致死亡。所以確實了解常見浮游藻類生理狀態和環境的影響，以期待未來可利用大幅度提高浮游藻類生產力的方式有效降低溫室效應的影響為本實驗的主要目的。故實驗設計針對兩種常見的海洋種浮游藻類 (Tetra、Ske)，在不同紫外線光譜 (UV_{AB} 、 UV_C) 的照射下，觀察 R.O.S. 的產生量和 T-T dimer 的表現狀況，並對照兩者之間的關係。結果我們發現：綠藻 (Tetra) 和矽藻 (Ske) 在 UV_{AB} 、 UV_C 的照射下皆會產生 R.O.S.，且綠藻產生的量較少；但在 UV_C 照射下皆有 DNA 損傷 (產生 T-T dimer)。故推估並不是綠藻 (Tetra) 擁有紫外線的特殊防禦機制，而是能較有效地代謝 R.O.S.。

Abstract

As we know, under the condition of unorganized salt's shortage and the harm of the ultraviolet ray, the phytoplankton's chloroplast will be destroyed because of the increasing peroxide (R.O.S.). Furthermore, the ultraviolet ray will have an effect on the process of photosynthesis, and even result in the death of phytoplankton. So, we intend to promote the production of phytoplankton in order to lower the influence of greenhouse effect by probing into the environmental influence on the physiology of phytoplankton.

The experimental is designed to observe two common marine phytoplankton: Tetra and Ske. By close observing Tetra and Ske exposed to different wavelength of ultraviolet way (UV_{AB} and UV_C), we contrast the production of R.O.S. with the appearing of T-T dimer.

We observe that both Tetra and Ske will produce R.O.S. after being exposed to UV_{AB} and UV_C , but Tetra produce less than Ske, and that UV_C will do harm to both the DNA of Tetra and Ske (producing T-T dimer). Based on the result of the experiment we estimate that Tetra can catabolize R.O.S. efficiently instead of having a unique defensive mechanism against ultraviolet ray (UV_{AB} and UV_C under discussion in this experiment.)

一、前言

(一)、研究動機：

大自然中能直接利用光能而將此轉換為構成生物體所需有機物者即為生產者，而生產者的『光合作用』即是葉綠體利用光能將二氧化碳固定以合成醣類，再藉由各種食物鏈提供給其他消費者及分解者利用。

而在生產者的領域中，我們可輕易得知原生浮游藻類對於二氧化碳的固定，十分重要。在諾大的地球中，陸地的表面積僅佔了地球的 30%，再加上人類的開發及利用，生產者所能依存的環境甚至不到地球的 20%。我們是否能想想看：如果地球只依靠這剩餘的 20% 的生產者，其他的消費著是否會因食物匱乏而死？而地球的溫室效應是否會更加嚴重？再讓我們回頭來看看鮮為人注意的那 70% 的海洋，海洋表面的生產者可以說是隨處可見，而海洋裡的生產者又以浮游藻類為最大宗，不經使我們直覺反應到：是否能利用廣大的海洋來提升基礎生產力，使不良的環境因子減少呢？

浮游藻類對全球碳循環的影響是極為重要的！

地球的碳循環之所以強烈影響全球氣候，端賴「聚熱氣體」——二氧化碳（CO₂）移入與移出大氣與上層海水的相對量（見圖一），而氣體在大氣與海水間大約每六年可以完全交換一次。名為「浮游藻類」的植物性生物，在這個循環中擔負了非常重要任務。這些微小的海洋居民，每年納入自己細胞中的碳，大約有 500 億噸；這個過程藉由光合作用來達成，通常受到風中沙塵上的鐵質所激發。浮游植物也透過生物泵將二氧化碳暫時儲存於深海：它們所吸收的碳，大約有 15% 沉到深海，而當死亡細胞分解時，再以二氧化碳的形式釋放出來。過了數百年，湧升流把這些溶在水中的氣體與其他營養鹽帶回陽光照耀的表層水域。

一小部分的死亡細胞沒有參與前述的循環，而變成石油沉積物或海底的沉積岩。數百萬年間，地球內部發生隱沒及變質作用，這些與岩石連結的碳又以二氧化碳的形式，藉由火山噴發重新回到大氣中。另一方面，燃燒化石燃料會使二氧化碳回到大氣中的速度加快約 100 萬倍。海洋浮游植物與陸地森林自然吸納二氧化碳的速度不夠快，不足以減緩二氧化碳的增加；因此，全球的碳循環無法平衡，地球溫度隨之提高。有些人考慮以「人為施肥」來修正這個失衡現象，方法是在海中加入稀釋的鐵溶液，增強浮游植物的光合作用及生物泵作用。



圖一

今天，隨著工業革命和後工業時代的來臨，地球的負面污染也越來越嚴重，而最重視的不外乎是溫室效應和臭氧層破洞，雖然人們訂定了許多法律來設法保護這個地球，但傷害已經造成，所以對於如何減少大氣中二氧化碳的含量，以減緩溫室效應對全球氣候的影響，已成為重要課題。地球的人口日益增加，能利用的土地面積逐漸減少，由於地球資源有限，人口密度飽和，30%的陸地已無法大規模栽種有效固定二氧化碳的生產者，因此 70%的海洋值得我們去開發，提高海洋基礎生產力將有助於減緩溫室效應。

在廣闊的海洋中，浮游植物為主要的生產者，然而其分布並不均勻，由於光合作用先決條件就是光能，故僅在有光層才能生長，再則浮游植物對無機鹽類的攝取是絕對必要的，這些無機鹽類包括銨鹽 (NH_4^+)、亞硝酸鹽 (NO_2^-) 或硝酸鹽 (NO_3^-) 等等，營養鹽充足浮游植物的生長速度才可提升。甚至其他微量元素也影響基礎生產力，由文獻中得知，已故的美國加州莫斯蘭丁海洋實驗室化學家馬丁 (John Martin)，在 1980 年代中期提出的「鐵假說」(iron hypothesis)，提出大洋中主要生產者藍綠藻之所以生長受到限制主要即為缺鐵；而在近年來的研究中發現當藻類缺乏營養鹽時，在光合作用的反應中將會產生一些不穩定的過氧化物(R.O.S.)來破壞細胞結構，這個發現除了對於鐵假說產生一個支持的證據，也提供我們一個想法，適時的為浮游藻類「施肥」，增加其生長的時間，進而促使它們多吸收一點二氧化碳，是否能解決溫室效應的問題呢？

然而”臭氧層破洞”對於我們提升基礎生產力到底存在著什麼關係呢？

在前面的敘述中，我們得知了地球上的生產者主要是海洋中的浮游藻類；也得知了這些

生產者賴以維生的環境是所謂的光層：也就是海平面以下約 200 公尺。而大家都知道，太陽光中包括了許多的射線，其大部分對生物有害的射線已經被臭氧層吸收或反射出去了。但現在，臭氧層變稀薄，甚至破洞。就舉我們生活中最常見也最常提到的紫外線(UV)，根據科學研究，臭氧減少 10%，紫外線可能增加 20%，同時皮膚癌患者可能增加 30%。其強大的破壞力，不僅令我們想到，這是否也有可能是影響生產者生存的負面條件之一呢？所以我們在實驗中在加入紫外線的控制組，以期待有更完善的實驗設計和完整的實驗數據。

(二)、研究目的：

綜合以上文獻，我們先設計了一個實驗為探討各種營養鹽缺乏及紫外線損傷下，過氧化物的表現狀況，在以常見綠藻(Tetra)作為材料下，分別給予缺氮、缺磷、缺鐵、UV_C、UV_{AB}的不同環境，測試其过氧化物的表現量中，我們有了奇特的發現。綠藻在紫外線下並未如文獻中所提紫外線會造成生物細胞產生過氧化物而攻擊自我細胞。在翻閱海洋學中，我們得知大型藻類確實綠藻多分布於高潮線上，而褐藻及紅藻則分布於低潮線下，似乎顯示綠藻較不怕強光或其所含之其他射線，所以我們大膽假設，綠藻對紫外線的防禦具有特殊機制！

因此我們希望設計實驗來證實我們的假設，我們便利用兩種藻類作為實驗材料，其一為綠藻(Tetra)，另一個選用台灣沿岸常見矽藻——骨藻(Ske)作為對照組，期望從實驗中證實綠藻對紫外線有較強之防禦機制，進而可以研究其防禦機制與何種蛋白質表現有關，以作為日後更有運用價值的發展。

最後，因為在文獻中，我們知道紫外線的照射會造成 DNA 序列產生 T-T dimer 的現象，所以我們加上了兩個附加的實驗：1.證實綠藻對於紫外線照射後產生 R.O.S.及 T-T dimer 彼此之關係。2.證實市面上化妝品所含之維他命 C 的抗氧化功能。

二、研究方法與過程

(一)、研究設備及器材：

溶液配製：

(f/2 medium)：

Major nutrition

NaNO ₃	75mg(883μM)
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5mg(36.3μM)
Na ₂ SiO ₃ · H ₂ O	15—30mg(1.5—3mg Si or 54—107μM)

Trace metals:

Na ₂ · EDTA**	4.36mg(ca. 11.7μM)
FeCl ₃ · 6H ₂ O**	3.15mg(0.65mg Fe or ca. 11.7μM)
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01mg(2.5μg Cu or ca. 0.04μM)
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022mg(5μg Zn or ca. 0.05μM)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01mg(2.5μg Co or ca. 0.05μM)
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18mg(0.05mg Mn or ca. 0.9μM)
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.006mg(2.5μg Mo or ca. 0.03μM)

Vitamins:

Thiamin · HCl	0.1mg
Biotin	0.5mg
B ₁₂	0.5μg

實驗一：

1、材料：

- (1). 綠藻 *Tetraselmis chui* (Tetra)
- (2). 骨藻 *Skeletonema costatum* (Ske)
- (3). f/2 培養液
- (4). 螢光染劑(DHR123)
- (5). H₂O₂(aq)(30%)

2、器材：

- (1). 螢光顯微鏡
- (2). UV_C 、 UV_{AB} 燈管

實驗二：

1、材料：

- (1). 綠藻 *Tetraselmis chui* (Tetra)
- (2). 骨藻 *Skeletonema costatum* (Ske)
- (3). f/2 培養液(註 1)
- (4). 螢光染劑(DHR123)
- (5). $H_2O_2(aq)$ (30%)

2、器材：

- (1). 螢光顯微鏡
- (2). UV_C 、 UV_{AB} 燈管

實驗三：

1、材料：

- (1). 綠藻 *Tetraselmis chui* (Tetra)
- (2). 骨藻 *Skeletonema costatum* (Ske)
- (3). f/2 培養液(註 1)
- (4). 螢光染劑(DHR123)
- (5). $H_2O_2(aq)$ (30%)
- (6). 維他命 C

2、器材：

- (1). 螢光顯微鏡
- (2). UV_C 、 UV_{AB} 燈管

實驗四：

1、材料：

- (1). T-T dimer 的抗體
- (2). 5% NaCl
- (3). 10%PBST
- (4). 脫脂奶粉
- (5). 呈色劑
- (6). 底片

2、器材：

- (1). 洗片機
- (2). 震盪器
- (3). 分光光度計

(三)、實驗過程：

實驗一：

一、實驗設計：

◎實驗組：共分為五組分別為缺各種營養鹽及不同波長紫外線損傷

實驗組	處理方式
實驗組一	f/2 medium 中缺氮肥(N)
實驗組二	f/2 medium 中缺磷肥(P)
實驗組三	f/2 medium 中缺鐵肥(Fe)
實驗組四	正常 f/2 medium 培養後 UV _C 照 5min
實驗組五	正常 f/2 medium 培養後 UV _{AB} 照 5min

◎對照組：分為兩種 Negative 及 Positive

對照組	處理
正對照組	正常 f/2 medium 培養後加入 H ₂ O ₂
負對照組	正常 f/2 medium 培養

若加入 DHR-123 時，正常 f/2 medium 培養應無 R.O.S.，故為紅色

加入 H₂O₂ 則其本身即為 R.O.S.，故為綠色

◎將實驗組的結果與對照組比對既可得知何種處理會產生 R.O.S.，表示浮游植物在此環境下會限制其生長速率，甚至導致死亡。

二、實驗步驟：

1.藻種的培養和不同離子濃度培養液的配製：

取 2000ml 海水經濾液器處理，除去浮游生物和其雜質，並分裝至四瓶 500ml 之燒瓶。將 FeCl₃(aq)、H₃PO₄(aq)各取 500μl 至一瓶 500ml 之海水中(缺 N)。再將 FeCl₃(aq)、NaNO₃(aq)各取 500μl 至一瓶 500ml 之海水中(缺 P)。再將 H₃PO₄(aq)、NaNO₃(aq)各取 500μl 至一瓶 500ml 之海水中(缺 Fe)。最後將 FeCl₃(aq)、H₃PO₄(aq)、NaNO₃(aq)取各 500μl 至一瓶 500ml 之海水中(Normal)。並以高溫高壓滅菌法滅菌(121℃、1.1kg/cm²)

取藻種(Tetra)3ml 至 f/2 medium 中培養(20℃、全光照、2 days)。

2.培養不同離子成分下的綠藻：

將不同的離子溶液(各 3ml)分裝於 7 個培養試管中(—N、—P、—Fe、Normal($\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$)、Normal (UV_C)、Normal(UV_AB))。取培養 2 天之綠藻(2ml)至微量離心管中，共 7 管，並離心(3000rpm、 20°C 、5mins)後除去上清液。將離心的綠藻分別放進各 3ml 之—N、—P、—Fe、Normal($\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$)、Normal (UV_C)、Normal(UV_AB)之培養試管中(20°C 、全光照、1 day)。並將 Normal (UV_C)、Normal(UV_AB)的綠藻分別用 UV_C 、 UV_AB 照射 5 mins。同時將 $\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$ (3%) 加入至 Normal($\text{H}_2\text{O}_2(\text{aq})$)中，再培養 30 mins。加入 DHR123(3 μl)至各培養試管中，混合均勻後，再培養 15 mins。最後分別取 12 μl 之各試管綠藻，並製作成玻片。使用螢光顯微鏡(450nm~500nm)觀察各樣品的螢光變化。並分別在玻片上隨機取 9 個區塊，並計算其發綠色或橘色螢光之綠藻數目。(綠色螢光：有產生 R.O.S.、紅色螢光：葉綠素、橘色螢光：綠色螢光+紅色螢光)

實驗二：將綠藻(Tetra)及矽藻(Ske)分別照射紫外光，觀察其結果

◎實驗組：共分為兩組分別為照射不同波長紫外線的損傷

實驗組 (Tetra)	處理方式	實驗組 (Ske)	處理方式
實驗組 1-1	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min	實驗組 2-1	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min
實驗組 1-2	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min	實驗組 2-2	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min

◎對照組：分為兩種 Negative 及 Positive

對照組 (Tetra)	處理	對照組 (Ske)	處理
正對照組 1-P	正常 f/2 medium 培養後 加入 H ₂ O ₂	正對照組 2-P	正常 f/2 medium 培養後加入 H ₂ O ₂
負對照組 1-N	正常 f/2 medium 培養	正對照組 2-N	正常 f/2 medium 培養

實驗步驟：

取藻種(Tetra 及 Ske)各 3ml 分別放至 f/2 medium 中培養(20℃、全光照、2 days)。之後各取 3ml 分別分至標有 Normal、H₂O₂、UV_{AB}、UV_C之試管中。將 H₂O₂(aq)(3%)加入至標有 H₂O₂的管中，再培養 30 mins。同時將標有 UV_C、UV_{AB}的 Tetra 及 Ske 分別用 UV_C、UV_{AB}照射 5 mins 後一同放入 20℃之冰箱中培養 10min。加入 DHR123(3μl)至各培養試管中，混合均勻後，再培養 15 mins。最後分別取 12μl 之各試管綠藻，並製作成玻片。使用螢光顯微鏡(450nm~500nm)觀察各樣品的螢光變化且分別在玻片上隨機取 9 個區塊，並計算其發綠色或橘色螢光之綠藻數目。正常情況 Tetra(圖.1)(圖.2)、Ske(圖.3)(圖.4)，R.O.S.量過多 Tetra(圖.5) Ske(圖.6)，Ske 死亡(圖.7)

實驗三：加入維他命C測試其復育之能力

◎實驗組：共分為五組分別為缺各種營養鹽及不同波長紫外線損傷

實驗組 (Tetra)	處理方式	實驗組 (Ske)	處理方式
實驗組 1-1	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min	實驗組 2-1	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min
實驗組 1-2	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min 並以 VitC 做復育的工作	實驗組 2-2	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min 並以 VitC 做復 育的工作
實驗組 1-3	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min	實驗組 2-3	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min
實驗組 1-4	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min 並以 VitC 做復育的工作	實驗組 2-4	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min 並以 VitC 做 復育的工作

◎對照組：分為兩種 Negative 及 Positive

對照組 (Tetra)	處理	對照組 (Ske)	處理
正對照組 1-P	正常 f/2 medium 培養後 加入 H ₂ O ₂	正對照組 2-P	正常 f/2 medium 培養後加入 H ₂ O ₂
負對照組 1-N	正常 f/2 medium 培養	正對照組 2-N	正常 f/2 medium 培養

實驗步驟：

取藻種(Tetra 及 Ske)各 3ml 分別放至 f/2 medium 中培養(20℃、全光照、2 days)。各取 3ml 分別分至標有 Normal、H₂O₂、UV_{AB}、UV_C、UV_{AB}+VitC、UV_C+VitC 之試管中。將 H₂O₂(aq)(3%) 加入至標有 H₂O₂ 的管中，再培養 30 mins。同時將標有 UV_{AB}、UV_C、UV_{AB}+VitC、UV_C+VitC 的 Tetra 及 Ske 分別用 UV_C、UV_{AB} 照射 5 mins。將 VitC 溶液添加於標有 UV_{AB}+VitC、UV_C+VitC 的試管中。加入 DHR123(3μl)至各培養試管中，混合均勻後，再培養 15 mins。一同放入 20℃ 之冰箱中培養 10min。分別取 12μl 之各試管綠藻，並製作成玻片。最後使用螢光顯微鏡(450nm ~500nm)觀察各樣品的螢光變化且分別在玻片上隨機取 9 個區塊，並計算其發綠色或橘色螢光之綠藻數目。

實驗四：測試產生 T-T dimer 的結果是否與 R.O.S.有關係

◎實驗組：共分為五組分別為缺各種營養鹽及不同波長紫外線損傷

實驗組 (Tetra)	處理方式	實驗組 (Ske)	處理方式
實驗組 1-1	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min	實驗組 2-1	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min
實驗組 1-2	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min 並以 VitC 做復育的工作	實驗組 2-2	正常 f/2 medium 培養後 UVC 照 5min 並以 VitC 做復 育的工作
實驗組 1-3	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min	實驗組 2-3	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min
實驗組 1-4	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min 並以 VitC 做復育的工作	實驗組 2-4	正常 f/2 medium 培養後 UVAB 照 5min 並以 VitC 做 復育的工作

◎對照組：分為兩種 Negative 及 Positive

對照組 (Tetra)	處理	對照組 (Ske)	處理
正對照組 1-P	正常 f/2 medium 培養後 加入 H ₂ O ₂	正對照組 2-P	正常 f/2 medium 培養後加入 H ₂ O ₂
負對照組 1-N	正常 f/2 medium 培養	正對照組 2-N	正常 f/2 medium 培養

實驗步驟：

a.抽取 genomic DNA：

離心收集不同處理的藻類細胞，留下藻類細胞的 pellet，每 100μg 分別加入所配置的 Lysis buffer(0.5M EDTA、1M Tris(pH 8.0)、10% SDS、proteinase K(10mg/ml))約 500μl，培養於 55℃ 水浴槽中三小時且振動幫助其釋出 gDNA，加入 5M NaCl 約 65μl，使其濃度為 0.7M NaCl，再加入 10% CTBA(cetyltri-methyl ammonium bromide)(在 0.7M NaCl 中)約 60μl，使其為 1% CTAB，並培養於 65℃ 水浴中 15 分鐘，離心 14K rpm 10 分鐘後萃取，再以等體積 Chloroform/isoamyl-alcohol 提取 DNA，離心 14K rpm 10 分鐘，取其上清液(若中間成的白色物質多，可重複此程序)，並轉入另一離心管中加入 Phenol/Chloroform/isoamyl alcohol(25：24：1)萃取後加入 2.5 倍 100%酒精於冰上 30 分鐘，沉澱後再利用 70%的酒精清洗，以去除鹽分及 phenol，吸乾酒精後於 37℃ 烘乾。最後至各液於 50μl TE 中，並且以分光光度計在剝長 260nm/280nm 下測定其吸光值，判斷其 gDNA 的濃度。

b.定量 DNA 固著於尼隆膜上：

將不同處理下所得之 gDNA 定量後，各取相同含量 DNA 並滴於尼隆膜上，放置於 80°C 烘箱中烘乾。

c.T-T dimer 的偵測：

將以烘乾且 gDNA 固著後的尼龍膜先浸泡於 10% PBST 中 30 分鐘，再以 PBST10%non-fat milk 稀釋之 primary antibody(anti-human T-T dimer 單株抗體，，1：1000)至於室溫中反應 30 分鐘，接著以 PBST10% non-fat milk 清洗，再加入以 PBST10% non-fat milk 稀釋之 secondary antibody(anti-mouse IgG-AP，1：7000 稀釋)，置於室溫中反應 30 分鐘，再以 PBST10% non-fat milk 清洗。完成後，將尼龍膜浸泡於 ECL-plus 中 5 分鐘，壓片和沖洗底片後，即可得到顯影。

三、研究結果與討論

(一)、結果：

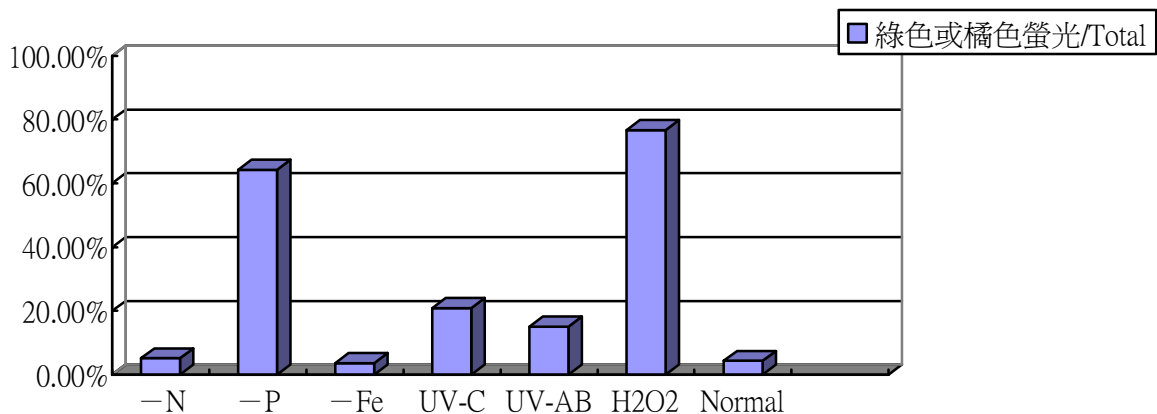
實驗一：

(一.)實驗數據：

	缺 N	缺 P	缺 Fe	UV _C	UV _{AB}	H ₂ O ₂	Normal
Area1	1/4	1/3	0/3	1/4	1/4	18/20	1/5
Area2	1/10	1/2	0/4	1/5	0/4	22/25	0/3
Area3	0/4	3/5	0/8	2/4	1/10	16/20	0/3
Area4	0/3	3/4	0/5	1/6	1/5	10/13	0/2
Area5	0/4	5/8	0/6	1/4	1/5	8/10	0/1
Area6	0/3	3/5	1/2	1/5	2/10	12/18	0/3
Area7	0/5	4/6	0/2	2/10	1/5	9/14	0/4
Area8	0/3	4/5	0/12	1/5	0/5	3/5	0/1
Area9	0/3	3/4	1/12	0/5	1/5	7/12	0/1
平均值	5.13%	64.29%	3.70%	20.83%	15.09%	76.64%	4.34%

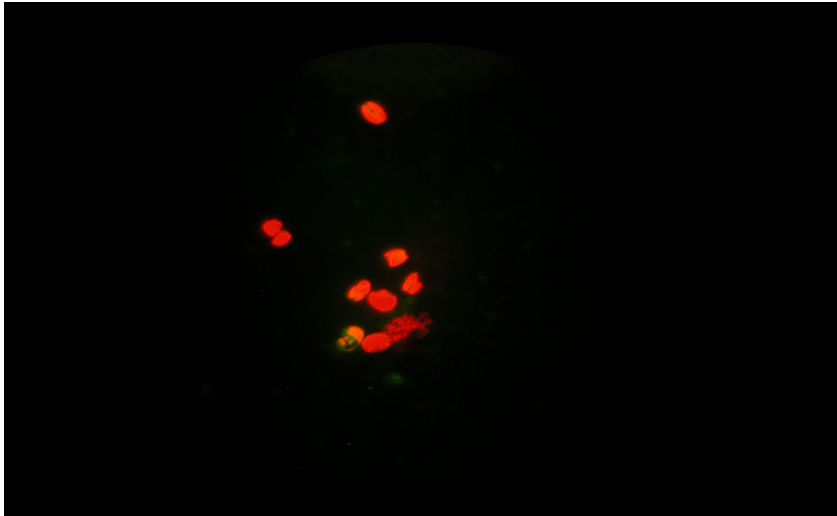
橘紅螢光細胞數/單純面積細胞數

(二.)圖表(平均值)：

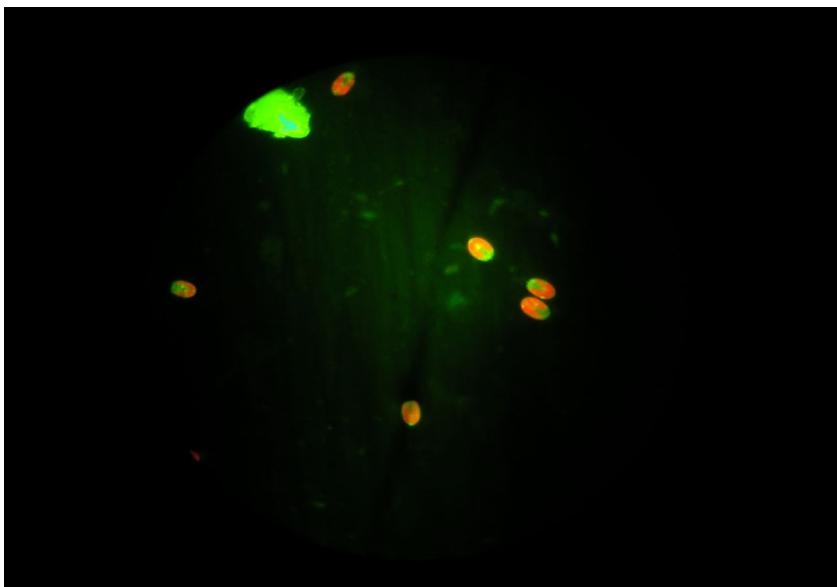


(三)螢光顯微鏡下圖示：

A.正常 f/2 medium 培養下：



B.H₂O₂ 處理下：



實驗二：以紫外光分別照射綠藻(Tetra)及骨藻(Ske)，觀察其 R.O.S.的結果：

在紫外線 UV_C 照射下，Tetra 產生綠色螢光的數目佔全體的 23%，Ske 產生綠色螢光的數目佔全體的 67%；在紫外線 UV_{AB} 照射下，Tetra 產生綠色螢光的數目佔全體的 24%，Ske 產生綠色螢光的數目佔全體的 30%，因此我們可以得知 Ske 相對 Tetra 在紫外線 UV_C 的傷害下，產生 R.O.S.的量有顯著的差異。〈如附圖.8〉

實驗三：以紫外光分別照射綠藻(Tetra)及矽藻(Ske)後加入維他命 C 做復育後，觀察其 R.O.S. 的結果：

在紫外線 UV_C 照射下，有加入維他命 C 做復育的 Tetra 產生綠色螢光的數目佔全體的 7.2%，而有加入維他命 C 做復育的 Ske 產生綠色螢光的數目佔全體的 11%；在紫外線 UV_{AB} 照射下，有加入維他命 C 做復育的 Tetra 產生綠色螢光的數目佔全體的 4.5%，而有加入維他命 C 做復育的 Ske 產生綠色螢光的數目佔全體的 17.9%，故在與未加入維他命 C 的對照組中，可以得知維他命 C 確實有抗氧化的效果。〈如附圖.9〉

實驗四：產生 T-T dimer 的結果：

以紫外線 UV_C 及 UV_{AB} 分別照射綠藻(Tetra)及矽藻(Ske)後，分別抽取 DNA 進行 T-T dimer 的檢測中，在 UV_C 的處理下，無論綠藻及矽藻均有產生 T-T dimer 的現象，而以紫外線 UV_C 分別照射綠藻(Tetra)及矽藻(Ske)後再加以維他命 C 做復育之後，並不會影響 T-T dimer 的形成。〈如附圖.10〉

(二)、討論：

- 一、在實驗綠藻(Tetra)中，我們發現大型浮游植物的生長限制因子中，與馬丁(John Martin)，、在 1980 年代中期提出的「鐵假說」(iron hypothesis) 並不相同，但是由於其所提出的條件是大洋中的主要生產者—藍綠藻，我們的實驗材料為常見的綠藻，所以在參考文獻中，確實也有提到小型浮游植物的限制因子為鐵離子。而大型浮游植物的限制因子為磷酸鹽，所以排放家庭廢水中含有大量磷酸鹽，故意形成藻華現象，與我們的實驗相符合。
- 二、在我們實驗中，可以得知兩點：其一是，經由數據可得知，在螢光顯微鏡的光源刺激下，綠藻(Tetra)相對於矽藻(Ske).而言，產生了較少且較不明顯的綠色螢光，故 Tetra 經過紫外線照射後所產生的 R.O.S.量確實比較少，此原因我們認為綠藻確實較矽藻能夠抗紫外線造成的傷害。其二是維他命 C 的確具有抗氧化的能力，能將 R.O.S.代謝，藉以降低過氧化物對於細胞體的損害，故在加入維他命 C 的復育實驗中，確實可以觀察到綠藻與矽藻所產生的 R.O.S.均有顯著的減少。此結果與現行沿岸生態中，大型綠藻大致分布於高潮線上，而其他紅藻及褐藻分布在低潮線附近是否相關值得討論。
- 三、在實驗中我們觀察到 UV_C對藻類細胞的傷害十分嚴重，無論綠藻(Tetra)及矽藻(ske)的 DNA 都受到損傷產生 T-Tdimer，而且在 UV_C的照射下，矽藻(ske)的細胞死亡率特別高，這也更使我們了解臭氧層的破壞對地球上的生物影響及傷害會愈來愈嚴重，雖然維生素具有抗氧化的功能，但是對 DNA 層次的傷害，並沒有功能，若是只是一昧重視工業發展而忽略環保議題，人類終將自食惡果。
- 四、我們在檢測 R.O.S.的實驗中，雖然 Tetra 所產生的 R.O.S.量較 Ske.為少；但在 DNA 的層次的傷害下(T-T dimer 的實驗中)，Tetra 所產生的 T-T dimer 量和 Ske.相似，藉由這兩個實驗中，可以推知綠藻在照射紫外線下，並非具有特殊的防禦構造，以抵抗紫外線的傷害，而 R.O.S.的生成量之所以較少，主要是因為綠藻在代謝过氧化物的能力較一般藻類強，所以接下來，可以由生理的研究下著手，利用偵測超氧歧化酶(SOD)的活性來確定綠藻的特殊防禦機制。
- 五、在這未來的展望中，一方面我們可以將此實驗改良，以期得到更精準的數據和實驗結果。另一方面為了證實我們前兩個論點所提出的看法，我們可以再設計一個實驗，用來檢測 Tetra 和 Ske.的 S.O.D.的活性和數量，並試著找出其不同之因素，應用於生活上，降低我們患得皮膚癌的機會。

附圖：

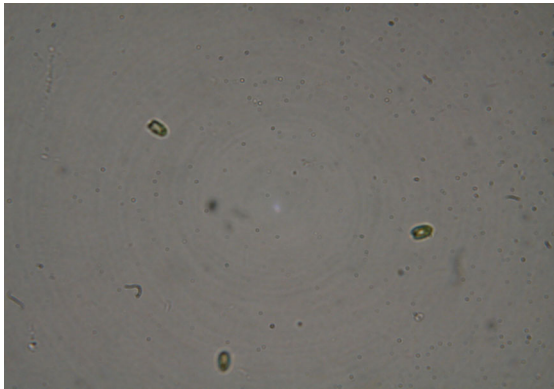


圖 1 光學顯微鏡下 Tetra

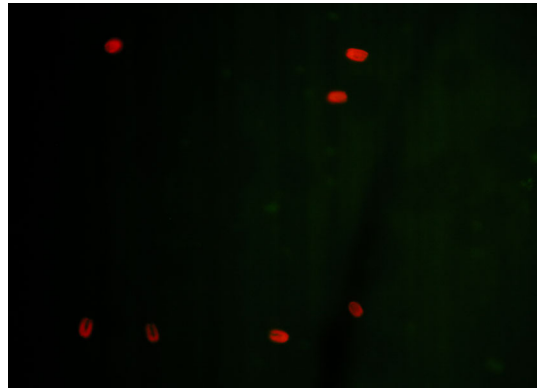


圖 2 螢光顯微鏡下正常 Tetra

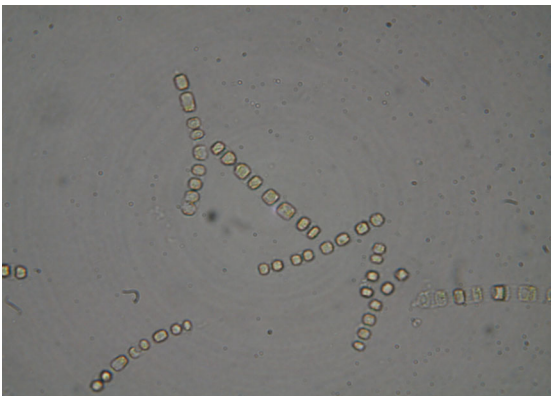


圖 3 光學顯微鏡下 Ske

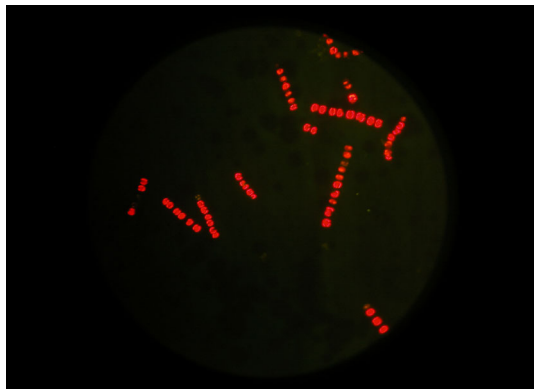


圖 4 螢光顯微鏡下正常 Ske

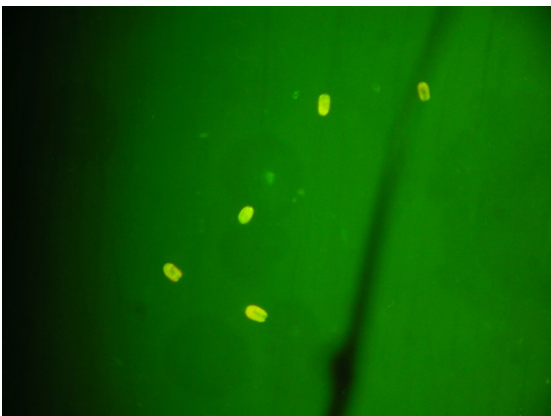


圖 5 螢光顯微鏡下具有 R.O.S.的 Tetra

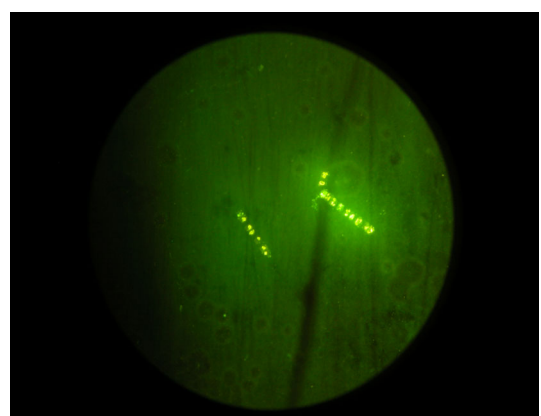


圖 6 螢光顯微鏡下具有 R.O.S.的 Ske

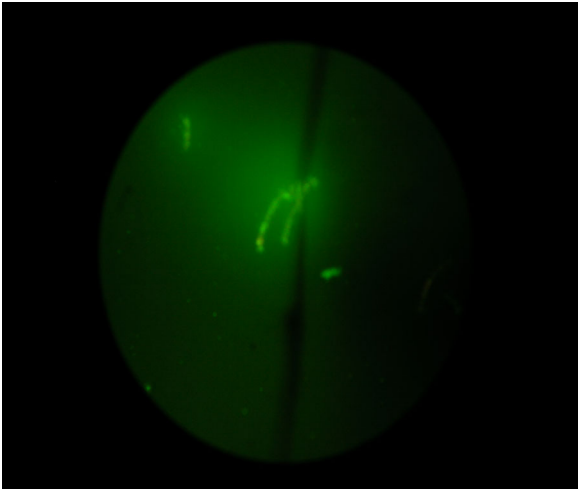


圖 7 螢光顯微鏡下死亡的 Ske

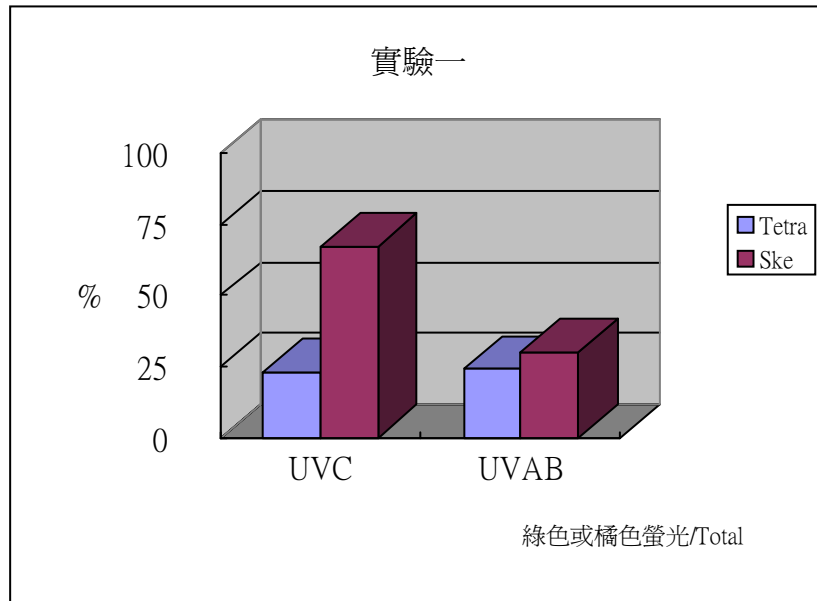


圖.8 以紫外光分別照射綠藻(Tetra)及骨藻(Ske)產生綠色螢光的結果

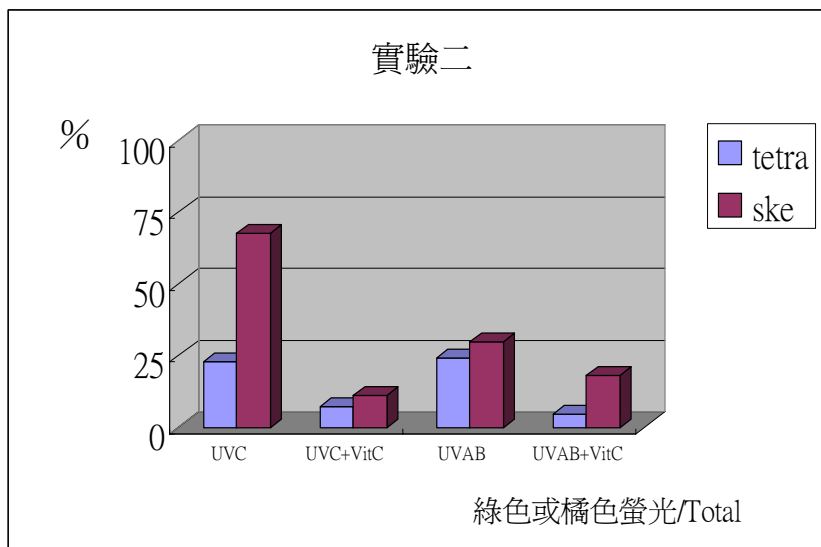
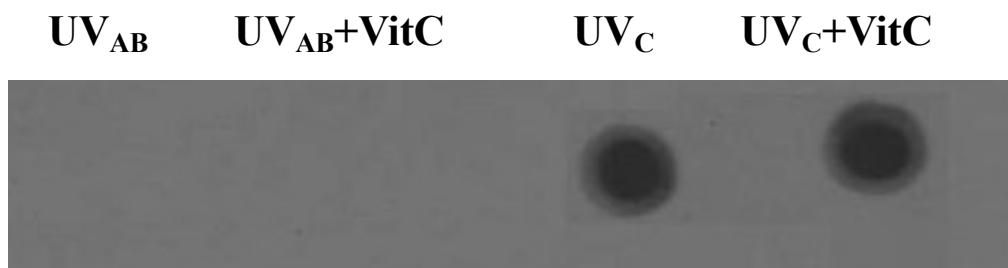


圖.9 以紫外光分別照射綠藻(Tetra)及矽藻(Ske)後加入維他命C做復育後產生綠色螢光的結

Tetra



Ske

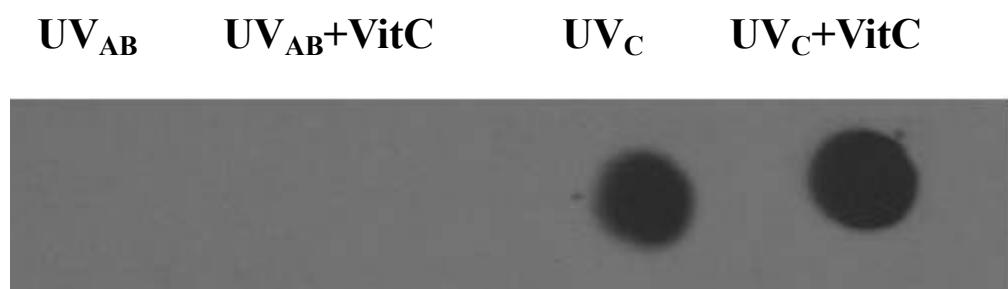


圖.10 產生 T-T dimer 的結果

將綠藻和骨藻作紫外線和維他命 c 的處理後，抽取其 gDNA 作 T-T dimer antibody 的雜合，產生黑點表示其 DNA 中有 T-T dimer 的生成。

四、參考文獻

1. Christine Parmentier, Maria Wellman, Alain Nicolas, Gerard Siest and Pierre Leroy, "Simultaneous measurement of reactive oxygen species and reduced glutathione using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection in cultured cell lines" (Electrophoresis 1999,20,2938-2944)
2. K.-P. Michel and E. K. Pistorius, "Adaptation of the photosynthetic electron transport chain in cyanobacteria to iron deficiency: The function of IdiA and IsiA"(PHYSIOLOGIA PLANTARUM 2004,120,36-50)
3. Robert R. L. Guillard, "CULTURE OF PHYTOPLANKTON FOR FEEDING MARINE INVERTEBRATES" (Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbor, Maine)
4. 科學人雜誌 2002 年 10 月號，大海中的隱形森林，撰文/佛高斯基 翻譯/姚若潔 審訂/張正

評語

本研究探討兩種浮游藻類對紫外線傷害之防禦機制。原始構想不錯，但太早偏重 ROS 及 T-T Dimer 實驗流程設計連接性不理想，殊為可惜。