

## 材料與方法

### (一)採集:

由於酒精浸泡的攀蜥標本無法用來製作核型，因此實驗所使用的標本，主要係參考文獻紀錄以及館藏標本，至全省各地採集活體標本，作為製作染色體之用。採集時選擇樹林的向陽面，徒步行走目視尋找攀蜥，並以徒手捕抓或利用綁有釣線活套的釣竿套頭捕抓。捕獲之蜥蜴，將置於洗衣網袋中攜回實驗室進行實驗。

採集樣點的選擇，原則上數量較多的種類，如斯氏攀蜥和黃口多稜攀蜥將在全省各縣市至少個選取一個以上樣點。至於族群數量較少的短肢攀蜥、牧氏攀蜥和呂氏攀蜥將各採集至少一個樣點。原則上各樣點的攀蜥每種擬捕抓雌雄各五隻以進行實驗。實驗後的殘骸將以10%福馬林固定，並置換於70%酒精中，保存於國立台灣師範大學生命科學系標本館，作為存證標本與供形質測量之用。

### (二)玻片製作:

#### 1、分裂細胞之取得:

將採集所得的蜥蜴活體帶回實驗室中，以麵包蟲飼養，直到進行本實驗為止。將攀蜥活體以腹腔注射以二次水(ddH<sub>2</sub>O)配製的0.4%秋水仙素(colchicines)(每公克體重注射0.1ml)，待約12~15小時後，以乙醚麻醉後解剖取出分裂旺盛之組織，如腸、骨髓及生殖腺等。剩餘殘

骸於編號後，以 10% 福馬林固定柔軟組織約一個星期，水洗並置換於 70%酒精中保存。

## 2、染色體之製備:

將取下的腸及生殖腺，以清水洗淨，再靜置於 0.035%KCl 溶液中低滲約 1 小時之後，將組織投入甲醇-冰醋酸(3:1 v/v)之-20°C 固定液，固定組織。固定後的組織暫保存於-20°C 冰箱中，隔夜，再置換一次新鮮-20°C 甲醇-冰醋酸(3:1 v/v)固定液，待滴片時使用。

骨髓的取得是將四肢的長骨取下，去除骨頭上的肉，並將骨頭的兩端各剪一小洞，利用 1ml 針筒裝滿 0.035% KCl 溶液從骨頭一端注入將骨髓全部沖洗在培養皿內，完成後將骨髓液以滴管吸取至 15ml 離心管中，並加入 0.035% KCl 溶液至 15 ml 為止，靜置低滲約 1 小時後，以離心機(Hsiangtai On-2060 型)，離心 10 分鐘(1000 rpm)；去上清液，再加入甲醇-冰醋酸(3:1 v/v)固定液，製成骨髓細胞懸浮液，固定後暫保存於-20°C 冰箱中，隔夜，再置換一次新鮮-20°C 甲醇-冰醋酸(3:1 v/v)固定液，待滴片時使用。

## 3、染色體玻片標本製備

腸組織與生殖腺組織: 將腸或生殖腺組織，從固定液取出後，切取一小部分浸泡於 40% 醋酸(acetic acid)溶液中，並以刀片和鑷子將組織刮下作成細胞懸浮液。再將此懸浮液滴於乾淨的玻片上，製成染色

體玻片標本。將乾燥玻片置於室溫下一天或 4°C 冰箱中保存，再進行染色。

骨髓細胞懸浮液:隔夜的骨髓細胞懸浮液先以離心機(Hsiangtai On-2060 型)，以 1000rpm 離心 10 分鐘；去上清液加入新配-20°C 固定液約 0.3ml，混勻製成細胞懸浮液，再將此懸浮液滴於乾淨的玻片上。將玻片置於室溫下一天，再進行染色。

### (三)染色:

#### 1、一般染色:

染色體玻片標本直接以 10% Giemsa 染 0.5 - 1 小時，水洗後風乾，作為基本核型觀察之用。

#### 2、銀染色:

改良 Howell and Black (1980)的 one-step method 法，將染色體玻片置入 0.1N HCl 溶液中靜置 10 分鐘後，以一次水漂洗風乾；再加上 4 滴 AgNO<sub>3</sub> 溶液(50%)和 2 滴 gelatin(2%)混合均勻後將蓋上蓋玻片，放入 70°C 的烤箱中烘烤 2 - 3 分鐘，再以一次水將藥劑洗淨，最後以 10% Giemsa 染 30~60 秒，以一次水漂洗後風乾。

#### 3、C-顯帶染色:

改良 Sumner (1972)的 BGS 法，將染色體玻片置於 0.1N HCl 溶液中靜置 10 分鐘後，以一次水漂洗風乾；再將玻片置入 50°C 飽和 Ba(OH)<sub>2</sub>

溶液中 1~2 分鐘，再以 65°C 的 2X SSC 浸置 1 小時後，以 10% Giemsa 染 10-15 分鐘，以一次水漂洗後風乾。

#### 4、G-顯帶染色:

根據慈濟醫院遺傳諮詢中心細胞遺傳組“G-banding 作業標準”法(Seabright 1972)，將染色體玻片置於 90°C 烘箱中，烘烤 45 - 50 分鐘，待玻片回溫後，將玻片放入 0.25% trypsin-EDTA 染缸中約 25 - 75 秒，再馬上將玻片放入 95%酒精中急止，以 ddH<sub>2</sub>O 清洗後，以 0.3% Wright's stain (pH 7.0)染 45 - 50 秒，水洗後以吹風機吹乾玻片。

#### (四)核型製作:

將一般染色後的玻片標本置於光學顯微鏡下觀察，並計算染色體數目。挑選數目正確且染色體伸展良好的細胞，在油鏡下放大 1000 倍，照相存證。製作核型(karyotype)時，染色體先以相紙放大為實際大小 4000 倍以上，再將同源染色體剪下依染色體型態進行同源染色體配對，並由大至小依序排列。

#### (五)染色體之分析:

每一種攀蜥盡可能取伸展良好的核型雌雄各三十個以上，測量染色體長度，計算得各對染色體的平均相對長度，繪製每種攀蜥的核型柱狀圖(idiogram)。但若雌雄核型無顯著差異，則將雌雄染色體數據合併。並盡可能取得下列各種參數:

### 1、相對長度(Relative Total Length,RTL)

因染色體在各個時期的收縮程度不一，無法以一標準單位表示，故染色體長度以相對長度表示。以一整個細胞所有染色體的總長度當作 100，依比例計算每一對染色體的相對長度。若核型具有 ZW 型性染色體，則以每一個染色體的長度/一套正常的含有一個 Z 染色體的單倍體染色體總長度。

### 2、臂長比(Arm Ratio,AR)

爲了測定染色體中節位置，以描述染色體形態，用臂長比(長臂 / 短臂)的比值決定中節在染色體上位置。根據 Levan et al. (1964)定義如下：

Chromosome type	Abbreviation	Arm ratio
中著絲點 metacentric	m	1.00 - 1.67
亞中著絲點 submetacentric	sm	1.68 - 3.00
亞端著絲點 subtelocentric	st	3.01 - 7.00
端著絲點 telocentric	t	$\geq 7.01$

### 3、大染色體與小染色體(macrochromosome and microchromosome)

一般爬蟲類染色體可依染色體的相對長度分爲大染色體與小染色體(Gorman 1973, Paull et al. 1976, Bickham 1984)，多數的學者提出兩者長度爲不連續的兩個群，但沒有一明確的定義兩者相差多少爲不連

續。因此本研究的處理方式為:若攀蜥的核型可明顯分為大小二群染色體，且二群中相鄰的那一對染色體相對長度相差大於 2 倍以上，則將染色體分為大染色體與小染色體二組；如果相對長度未大於 2 倍以上，則將染色體依長度相對分為不同的群。在本研究中小染色體的相對長度約為 1% - 6%。

#### 4、NF 值(nombre fundamental)

NF 值為核型中染色體所有臂數的總和。其計算方式為大染色體依染色體的型態之不同 metacentric、submetacentric 與 subtelocentric 之臂數以 2 計數，telocentric 臂數以 1 計數；而小染色體因過於微小，不論染色體的類型，其臂數均以 1 計數。故

大染色體 NF 值(NF mac)= 2\*[2\*(m + sm + st)對數 + t 對數]。

小染色體 NF 值(NF mic)= 2\*(小染色體對數)。

所有染色體 NF 值= NF mac + NF mic。

#### 5、二次縊縮(secondary constriction, CON)及核仁形成區(nucleolar organizer regions, NORs)的位置

二次縊縮為染色體臂上的特殊區域，該區域無法以 Giemsa 染液染出顏色，故在顯微鏡下，可見染色體會呈現部分斷裂的現象。其寬度常隨染色體收縮程度而不同。NORs 為轉錄 18S、28S、5S rRNA 的 DNA 聚集之處，僅會在特定染色體上的二次縊縮出現。兩者位於染色體上

的位置的計算方法為：

CON：染色體中節至二次縊縮之長度/該臂長。

NORs：若與 CON 位置相同則計算方法同上；若 CON 不明顯，則計算方法為 NORs 的中點到染色體中節的距離/該臂長。

## 6、C-顯帶(C-banding)

以半數以上的細胞呈現相同的色帶為準，其位置計算方法為：  
色帶中點到染色體中節的距離/該臂長。

## 7、G-顯帶(G-banding)

以半數以上的細胞呈現相同的色帶為準，其位置計算方法為：  
色帶中點到染色體中節的距離/該臂長。

## 8、統計方法：

不同族群的染色體核型相對長度資料，以 Wilcoxon sign rank test 檢測( $p = 0.05$ )，若無顯著差異，則將各族群的資料合併。

染色體的排序以 Wilcoxon rank sum test 檢測( $p = 0.05$ )，以確保核型中各對染色體排列位置的正確性，即除了第 1 對及最後一對染色體外，第  $n$  對染色體的相對長度顯著大於第  $(n + 1)$  對染色體而小於第  $(n - 1)$  對染色體。

## 9、染色體相似度比較：

將各物種的染色體相對長度用 Eculidean Distance 軟體轉化為相異

度矩陣(dissimilarity matrix)，作群集分析(cluster analysis)，並繪成樹狀圖(Dendrogram) (高 1994)。

特殊染色的細胞先依染色體相對長度製作核型，再標出各種顯帶與 NORs 位置合併到種或族群之染色體柱狀圖上，並計算出上述參數值，比較各種間相似度。