

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學科

佳作

052015

探討持續施加弱磁場對斑馬魚幼魚生理及行為
之影響

學校名稱：國立屏東女子高級中學

作者： 高二 方以佳	指導老師： 張素華
---------------	--------------

關鍵詞：斑馬魚幼魚、磁場、神經行為學

摘要

磁場是生活中常見的環境議題，近年來成為了熱門的研究主題，根據文獻探討資料，過去研究多以強磁場短時間暴露為實驗，在斑馬魚發育、生理以及行為模式上有初步的探索，並且與生化機制進行連結與解釋。

本實驗不同於以往的研究，利用受精後五日內（5dpf）的斑馬魚，在持續施加弱磁場後，進行不同磁場大小及分佈與單一磁場分析的兩大主軸實驗，觀察對斑馬魚幼魚造成的影響。根據實驗結果顯示，在生理表現上斑馬魚的心搏數會受到實驗設定之磁場影響，且胚胎孵化速度、幼魚身長及分佈偏好在較大磁場下會受到影響，但孵化總數及早期發育並沒有顯著差異；而在行為表現方面，短時間的弱磁場暴露會促進總移動距離和小活動力，但在長期處理下則導致數值下降。

壹、前言

一、研究動機

在高一的生物課中，學習到環境因子與生物存在著交互關係；而在物理課則對電與磁有了初步的認識，也了解了物理效應於環境中可能導致的各種效果，我開始聯想起互相作用的可能性，並著手搜集相關資料。

日常生活中，磁場（magnetic field）無所不在，根據經濟部標準檢驗局的數據顯示（如表一），磁場存在於人類各種生活環境中，綜觀目前的研究卻少見有磁場對於人類影響的相關內容，這樣的主題引起我的興趣。查詢相關文獻時，發現針對模式生物之一的斑馬魚已有初步探究，研究顯示斑馬魚會受磁場方向影響而改變游動，並且可能與遺傳有關（Akira Takebe et al, 2012），而在發育方面，則顯示高強度磁場會影響有絲分裂，減緩了受試動物的發育速度（Shuchao Ge et al, 2019）。然而，當今實驗條件多建立在將受試生物短期暴露於強磁場之環境中，尚缺少將受試生物暴露於弱磁場並觀察生理現象並進一步與行為表現連結之相關研究，因此本研究主題想探討持續施加弱磁場對斑馬魚幼魚可能形成生理及行為之影響。

表一、人類常接觸場所之磁場值（資料來源：經濟部標準檢驗局）

地點	磁場值（單位：微特斯拉）
辦公室、住家	0.01~1
電弧爐、電解、電鍍工廠	100~10000
電車內	0.5~5

二、文獻探討

（一） 斑馬魚 (*Danio rerio*)

斑馬魚屬於輻鰭魚綱鯉形目鯉科，是科研領域中研究發育生物學的有脊椎模式生物，常使用於基因轉殖和人工育種。斑馬魚身長通常少於 4 公分，壽命約 2~3 年，由於受精卵擁有透明特性使觀察較容易，且具飼育容易、多達 6,000 種遺傳突變種、與人體基因約 80%相似等優點，令斑馬魚方便科研人員做科學研究 (Michael B. Orger & Gonzalo G. de Polavieja, 2017)。

（二） 磁鐵與磁場 (magnetic field)

磁鐵是可以吸引鐵並於其外產生磁場的物體；而磁場是一種向量場，在空間的任意位置皆具有方向和大小，磁性物質和電流的四周均有磁場存在，當施加作用力於其它磁性物質或移動中的電荷，會顯示出磁場的特性。單位多以特斯拉 (T)、毫特斯拉 (mT)、微特斯拉 (μT)、高斯 (Gs)、毫高斯 (mGs) 表示。

高斯計 (Gauss meter) 為一種用於測量和顯示單位面積平均磁通密度或磁感應強度的精密儀器，由霍爾探頭和測量儀表構成，具有體積小、重量輕、方便攜帶、磁場極性識別作用等功能。（國家通訊傳播委員會，2015）

(三) 動物行為學 (Ethology)

動物行為學為研究動物與環境或其他生物交互關係的領域，內容包含溝通、社交、學習、繁衍等行為，研究通常與神經科學、心理學及教育學相關，為人類長期研究的重要領域。在動物行為學相關實驗中，「老鼠水迷宮」(Morris, R, 1984) 最具有代表性，根據老鼠脫離水中的時間比較，能夠判斷該老鼠的學習能力強弱，而後也有科學家依據此設計模式進行後續研究，並開啟了動物行為實驗的全盛時期。

在科學快速發展的同時，動物福祉的提倡和與時俱進的動物保護價值觀亦逐漸被重視，其中，由科學家所提出的動物實驗 3R 原則 (W. M. S. Russell & R. L. Burch, 1960) 更是實驗者遵守的指標，內容強調替代 (Replacement)、減少 (Reduction) 以及優化 (Refinement)。

隨著科技日新月異，生物之生存環境尚存在許多未定義的逆境，包含自然條件下以及通電過程產生的弱磁場，過去受限於實驗設備及手法，研究主要以短期暴露強磁場為主要方向，且由於磁場施加之設備相對龐大，無法於觀察時同步施加磁場，因此本研究提出與前人 (Ahne Myklatun et al, 2018) 較不相同的設計，利用模式生物斑馬魚，以帶有持續施加弱磁場的空間進行神經行為學及相關測量。

本研究僅使用受精後五日內 (5 dpf, day post-fertilization) 的斑馬魚胚胎，一般認為發育中的胚胎負責傳遞痛覺的神經結構相對不成熟，且斑馬魚在胚胎發育階段及幼魚呈現透明狀，得於在不犧牲魚體之實驗條件下觀察許多目標，而其一次產卵數目大，也得以使用同親代來源之同批實驗生物進行實驗，各種條件皆符合動物實驗 3R 的精神。

此外，由於動物行為學所探討的範疇與個體的基因遺傳有一定關係 (Gomez-Marín A et al, 2014)，在生理與行為觀察分析後，規劃後續以探討魚體內的相關分子機制為目標，找出脊椎動物在弱磁場環境下可能產生的影響。

三、實驗目的

本研究之目的在於觀察持續施加弱磁場是否會對斑馬魚胚胎發育以及幼魚的神經行為學表現產生影響，首先會以生理指標做表層現象的探索，並加以行為模式的分析，所列舉目的為下：

(一) 探討持續施加不同磁場大小及分布對斑馬魚生理及發育現象之影響

1. 對孵化率之影響
2. 對胚胎卵直徑及幼魚體長之影響
3. 對分佈偏好之影響
4. 對心率之影響

(二) 探討持續施加相同磁場對斑馬魚行為模式之影響

1. 對平均移動距離之影響
2. 對小活動力持續時間之影響

貳、研究設備及器材

一、實驗材料

(一) 實驗動物

斑馬魚胚胎 (*Danio rerio* embryo)：使用 3 至 6 月齡且全長 2 至 3 公分之 AB wild type 斑馬魚所產受精卵。



圖一、受精後五日 (5dpf) 之斑馬魚幼魚

(二) 飼養環境

維持溫度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ，週期 14 小時光照和 10 小時黑暗，食物為草履蟲及豐年蝦，公母分缸飼養。

二、實驗工具

名稱	規格及備註
試驗容器	塑膠材質之 24 孔培養盤 孔格直徑 1.8 公分，每孔容量 3 毫升
產卵容器	中間具可移除隔板之配對箱
溫度控制設備	恆溫控制箱
曝氣設備	打氣幫浦
光學顯微鏡	解剖及複式顯微鏡
微量滴管	Adjustable Volume Pipette
培養皿	每個直徑 9.0 公分
燒杯、錐形瓶、量筒	每個容量 100 毫升
圓形磁鐵	直徑 1.4 公分，約 1000 高斯
長型磁鐵	長 10.0 寬 1.0 高 0.5 公分，約 1000 高斯
高斯計	KANETEC TM-601
電子秤	最小刻度為 0.0001g
手術刀	用於切割 Agarose

三、實驗藥品

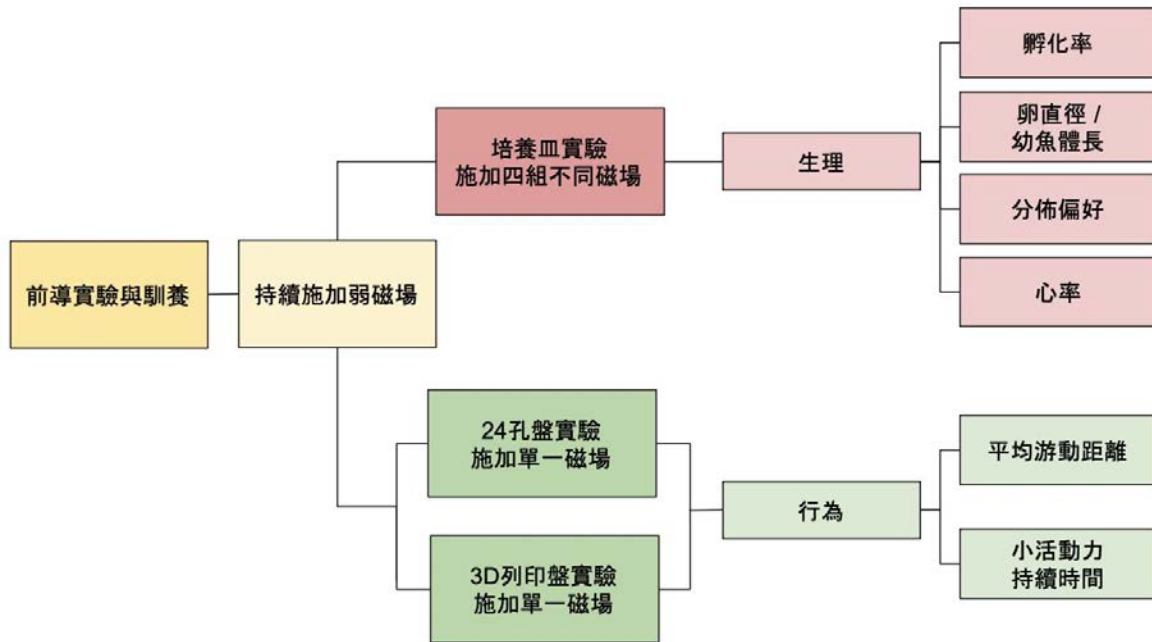
名稱	備註
亞甲藍液	濃度 0.3ppm
瓊脂糖 (Agarose)	重量百分濃度 1.2%
Tris base	242g 緩衝劑
Acetate (100% acetic acid)	57.1ml
EDTA	100ml 0.5M sodium EDTA (pH8.0)

四、儀器與軟體

名稱	備註
Viewpoint zebrafish lab	高通量斑馬魚行為觀察系統
RvVisualPulse heartbeat	心跳監測軟體
Excel	數據整理及圖表繪製
Sketchup	3D 模型繪製

參、研究過程或方法

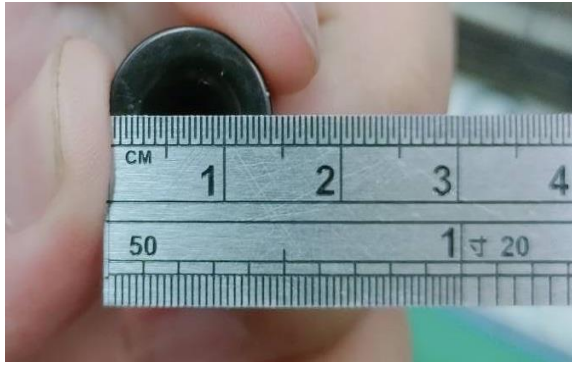
一、研究架構



二、實驗方法

(一) 實驗盤設計與磁場測定

本研究製造磁場時使用每個約 1500 高斯的圓形磁鐵（如圖二）及長型磁鐵，在進行實驗盤的組裝時，由於與磁鐵間的距離隔有塑膠材質，可能影響磁場大小，因此必須先以高斯計重新測量並校正（如圖三）。



圖二、磁鐵大小



圖三、測定狀況示意圖

研究主要分為兩大主軸，第一部分為培養皿實驗，將弱磁場分為相對大小及磁鐵分佈不同的數組進行測試，並在培養皿的五個位置分別進行測定，確認每一組的數據在誤差範圍內。內容共分為四組實驗組及一組對照組，除了平均大磁場及小磁場以外，也設計數值不平均的組別以觀察斑馬魚的生理表現差異，利用肉眼即可觀測的數據內容推斷對斑馬魚基本生理現象之影響，以下為實驗盤設計（如表二）及磁場測定結果（如表三）：

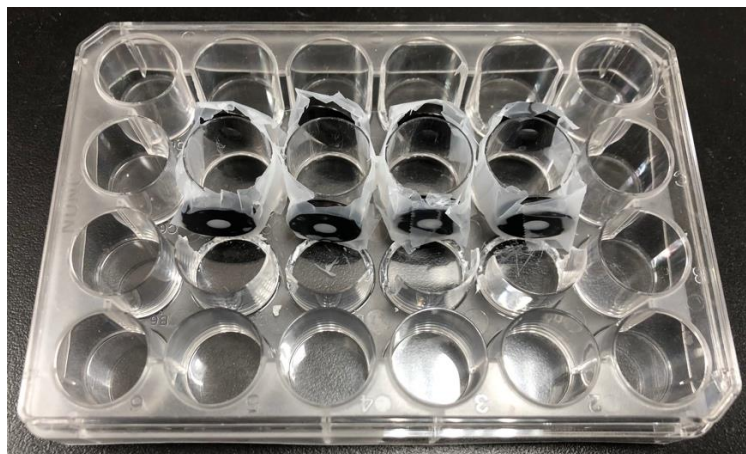
表二、培養皿實驗之實驗盤設計（圖示為俯視圖，第一組包含圖例）

組別	第一組 (對照組)	第二組 (平均小磁場)	第三組 (中央大磁場)	第四組 (兩邊大磁場)	第五組 (四邊大磁場)
意義	對照組，無施加任何磁場。	一磁鐵放置培養皿正中間，屬於平均小磁場。	各一磁鐵放置培養皿及蓋子正中間，屬於中央大磁場。	兩磁鐵放置培養皿，屬於兩邊大磁場。	四磁鐵放置培養皿，屬於四邊大磁場。
圖示					

表三、培養皿實驗之磁場測定結果（單位：高斯）

	上	下	左	右	中
第一組	0	0	0	0	0
第二組	180	185	182	180	185
第三組	45	43	52	48	771
第四組	317	334	45	47	181
第五組	318	343	332	337	325

第二部分為 24 孔盤實驗，設計根據第一項實驗結果進行修正，以第五組模式作為實驗組，配合軟體的使用，考量到若直接將磁鐵放置於 24 孔盤下方，會造成磁力分布不均且在放入 zebrabox 測試時會影響影像輸出，因此改為拆除孔盤的其餘部分並將磁鐵黏貼在各孔的兩側，在實驗盤完成後進行磁場測定，數值皆為 495 ± 5 高斯。

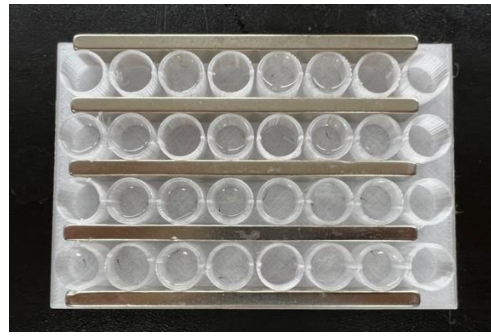


圖四、24 孔盤實驗示意圖

由於原本使用的 24 孔盤尺寸並不符合磁鐵大小，產生放置困難的問題，因此第二輪實驗將模型改為以 3D 列印製作，並同時更換長條形磁鐵，磁場測定數值皆為 625 ± 5 高斯。本研究使用 Sketchup 軟體進行模型建置，首先確定模型的正確邊長數據，並在 XYZ 三維中畫出帶有高度的長方形立體，接著在表面畫上數個圓形圖樣後，利用推/拉功能製作有深度的圓形槽，匯出檔案至備有透明耗材的 3D 列印機中即可進行列印，以下為設計圖（如圖五）及實際成品（如圖六）（參考附錄一）：



圖五、3D 列印盤設計圖



圖六、3D 列印盤實際成品

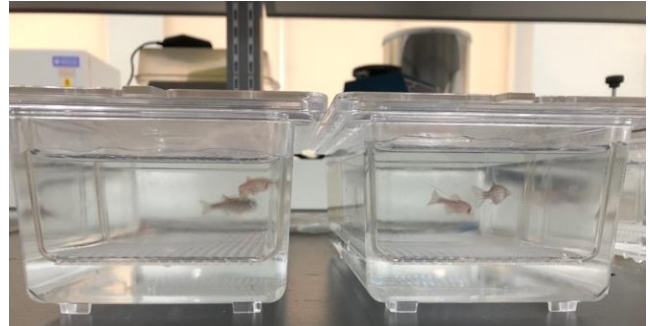
(二) 前置實驗：斑馬魚馴養

1. 受精卵收集

試驗前一日將雌魚與雄魚以 1:1 之比例移至繁殖箱，雌魚與雄魚須以隔板隔開並停止光照，試驗當日早上移除中間隔板，魚會在身體碰觸時同時排出精卵。斑馬魚卵直徑約 0.8 至 1.5mm，產卵容器中的含孔洞隔離板可使卵落入底層，將魚和卵隔開，以利受精卵之收集。接著以每 50 個卵分裝至培養皿並加入 0.3ppm 亞甲藍液，放入恆溫培養箱，連續五天每隔 24 小時換一次曝氣蒸餾水，同時計算且清除未孵化的胚胎（如圖七至十）。



圖七、繁殖箱



圖八、箱內雌雄魚試驗前一日情形



圖九、恆溫培養箱

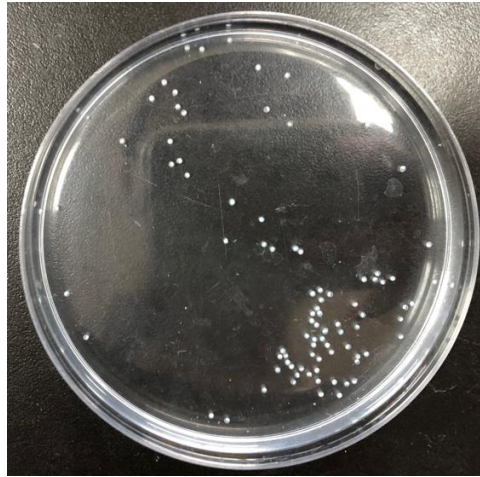


圖十、每日必須重新換水之培養皿

2. 孵化成功與否之判斷

出現下列情形之一者，即判定為失敗：

- (1) 胚胎凝結：凝結之胚胎呈現乳白色（如圖十一）。
- (2) 體節構造發育不全：48 小時仍未發育出體節，且沒有自主性運動。
- (3) 尾部從卵黃囊剝離不全：卵黃剝離不全，導致尾巴無法向胚體後部伸長。
- (4) 心臟無跳動：胚胎 1 分鐘心臟無跳動。



圖十一、胚胎凝結示意圖

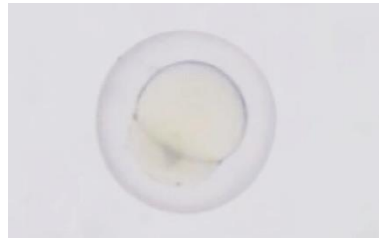
3. 受精後五日內生長狀況

首先進行正常情況下受精後五日（5 dpf, days post fertilization）斑馬魚胚胎生長情形觀察，在孵化後三小時（如圖十二）為正常卵，尚未有生長現象，第一天（如圖十三）開始分裂出尾部，到了第二天（如圖十四）頭尾皆已經長出，能夠大致觀測出幼魚雛形，第三天（如圖十五）魚體幾乎生長完成，培養皿內多數胚胎已經孵出，第四天（如圖十六）和第五天時為完整幼魚形式，已經可以放入大型水缸養殖。

由此前置實驗可知，斑馬魚在受精後五日內的形態變化快速，在後續進行實驗時，不僅能夠就胚胎進行觀察，也能進一步分析與幼魚有關之數據；另外，在正式實驗皆使用此批馴養斑馬魚所產之胚胎，以減少基因差異性，而前置實驗之觀察結果則作為正式實驗進行時的依據，以判斷斑馬魚生長之狀況。



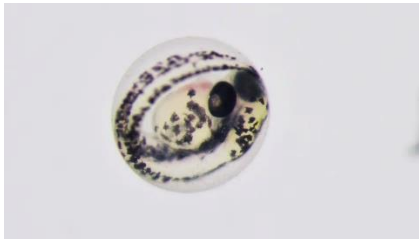
圖十二、斑馬魚（3dph）



圖十三、斑馬魚（1dpf）



圖十四、斑馬魚（2dpf）



圖十五、斑馬魚（3dpf）



圖十六、斑馬魚（4dpf）

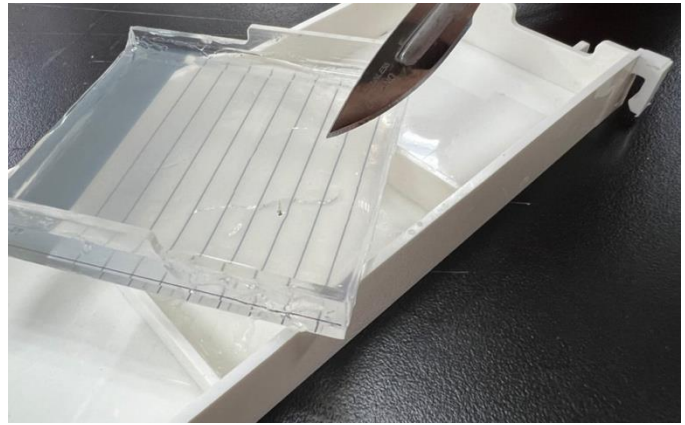
（三）瓊脂溶液（Agarose）的製備

瓊脂糖是一種有機物多醣，化學式為 $C_{24}H_{38}O_{19}$ ，該溶液在 $37-40^{\circ}C$ 保持液態，冷卻後會迅速硬化，當濃度夠大時膠體可協助固定，且在分子生物學中是 DNA 電泳時常使用之材料。在文獻資料（ZFIN，2022）提到利用瓊脂糖固定斑馬魚胚胎為進行測量之方式，因此本研究使用其進行心跳監測輔助，以下為將胚胎放置瓊脂中固定的裝設步驟：

1. 利用 Tris base 242g、Acetate 57.1ml 和 0.5M EDTA 100ml 配置出 50x TAE Buffer 後稀釋成 1x，加入 20ml 到錐形瓶中（如圖十七）
2. 與重量百分濃度 1.2% 的瓊脂溶液混合並放入微波爐中加熱 40 秒。
3. 將顯微鏡載物台上的玻璃板浸入水中，使其保持溫暖。
4. 將裝有瓊脂的錐形瓶取出，並倒至玻璃板上。
5. 利用滴管吸取胚胎放入其中，靜待其硬化。
6. 用手術刀切出一小塊含有胚胎的瓊脂，並滴上少許水分（如圖十八）。
7. 利用顯微設備進行觀察及記錄。



圖十七、配置原料

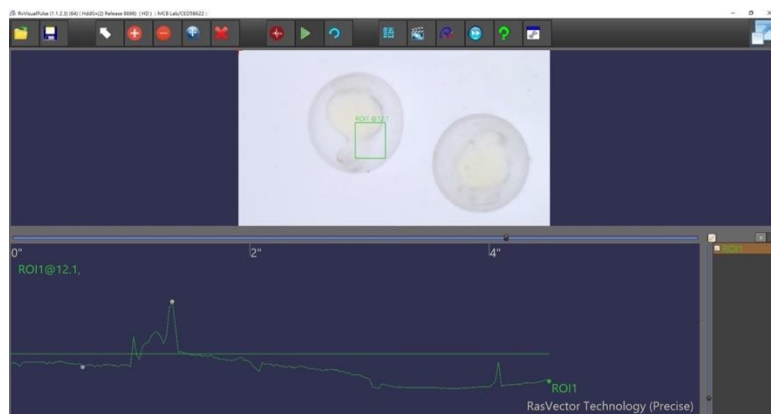


圖十八、操作過程示意圖

三、實驗步驟

(一) 持續施加不同磁場大小及分布對斑馬魚生理及發育現象之影響（培養皿實驗）：

1. 持續施加磁場於 5 個培養皿中。
2. 每盤放入 50 個斑馬魚受精卵並逐日紀錄孵化及白化數、卵直徑長、幼魚身長及游動偏好，總共重複兩次實驗。
3. 依照瓊脂溶液的製備方式進行前置工作，並且利用解剖顯微鏡觀測及錄影。
4. 導入心跳監測系統 RvVisualPulse heartbeat（如圖十九），於 5dpf 測量實驗及對照組，方法為將 ROI 定位框移至欲觀察的斑馬魚心臟處，可藉由調整影片長度，推算心臟每分鐘跳動頻率。



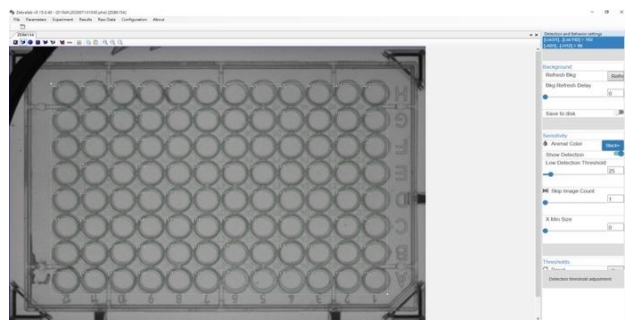
圖十九、RvVisualPulse 程式介面

(二) 持續施加相同磁場對斑馬魚行為模式之影響 (24 孔盤及 3D 列印盤實驗):

1. 持續施加磁場於 24 孔盤及 3D 列印盤中
2. 放入斑馬魚行為觀察系統 Viewpoint zebrabox (如圖二十及二十一), 每 24 小時測量一次, 可追蹤並分析斑馬魚的運動和行為, 每組測試 60 分鐘, 每 10 分鐘切換一次明暗, 總共三個循環, 實驗主要進行軌跡之總移動距離 (distance) 和小活動力持續時間 (Small duration) 分析, 可從游動的距離及活動力兩面向進行探討。
3. 用 excel 進行數據整理及圖表繪製。



圖二十、zebrabox 外觀及測試組別放置處



圖二十一、zebrabox 程式介面

肆、 研究結果

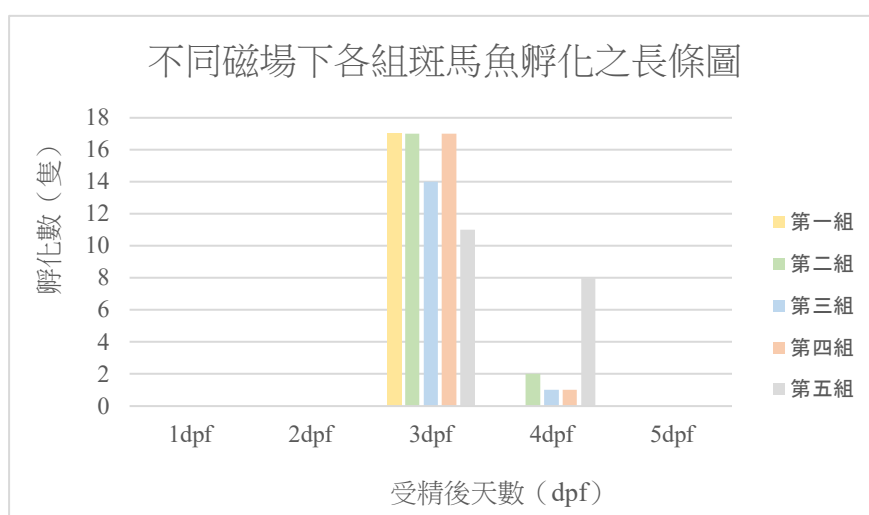
一、探討持續施加不同磁場大小及分布對斑馬魚生理及發育現象之影響

(一) 對孵化率之影響

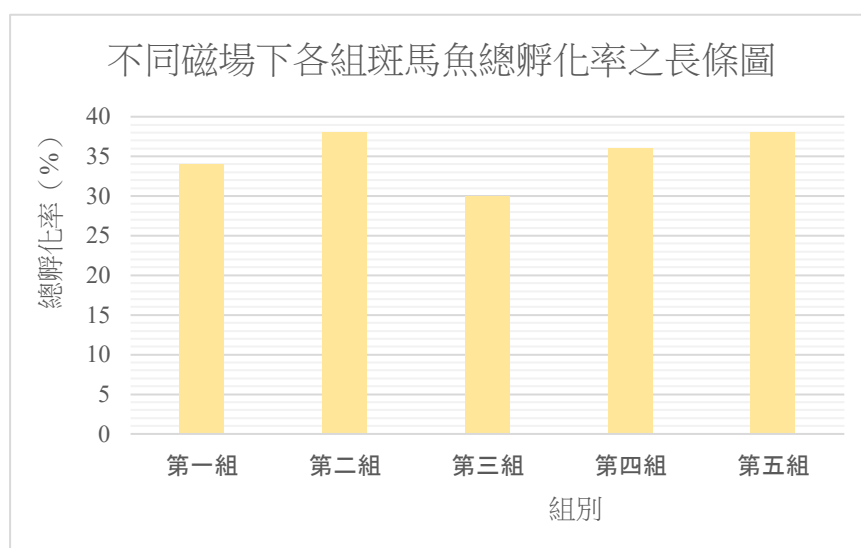
本結果使用肉眼觀察並逐日記錄 (如表四), 發現在受精後一日內白化現象較為嚴重, 但各組數量相差不多, 推測磁場的存在與否對胚胎白化數並沒有顯著影響; 但根據不同天數的各組的孵化狀況顯示 (如圖二十二), 在 3dpf 時第五組的孵化數明顯少於其他組別, 並在 4dpf 時才陸續孵化完成, 可推測較強的磁場會延遲胚胎的孵化速度; 而就總孵化率來看, 實驗組之間並沒有顯著差異 (如圖二十三)。由此推斷較大的磁場可能影響胚胎的孵化過程, 卻與孵化總數沒有直接關係。

表四、每組 50 個受精卵在不同磁場下各組斑馬魚孵化情況（成功/白化數）（單位：隻）

組別 天數	第一組 (對照組)	第二組 (平均小磁場)	第三組 (中央大磁場)	第四組 (兩邊大磁場)	第五組 (四邊大磁場)
1 dpf	0/33	0/31	0/35	0/32	0/31
2 dpf	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
3 dpf	17/0	17/0	14/0	17/0	11/0
4 dpf	0/0	2/0	1/0	1/0	8/0
5 dpf	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0



圖二十二、不同磁場下各組斑馬魚孵化之長條圖（已扣除白化數量）



圖二十三、不同磁場下各組斑馬魚總孵化率之長條圖

(二) 對胚胎卵直徑及幼魚體長之影響

本結果利用解剖顯微鏡進行觀察，主要比較 2dpf 卵直徑（如圖二十四）與 5dpf 幼魚身長（如圖二十五），實驗發現受精後兩日各組卵直徑差異並不明顯，均約為 0.24cm，推測磁場對於胚胎初期的發育並沒有顯著影響；而在受精後五日的數據則取各培養皿中五隻幼魚的長度平均值，並將單位由 px 換算成 cm（如表五），根據圖表（如圖二十六）顯示在磁場較大的環境下，斑馬魚幼魚的生長狀況最差。由此推斷斑馬魚在一定時間的磁場暴露下生長會受到影響，且磁場越大影響力越大。



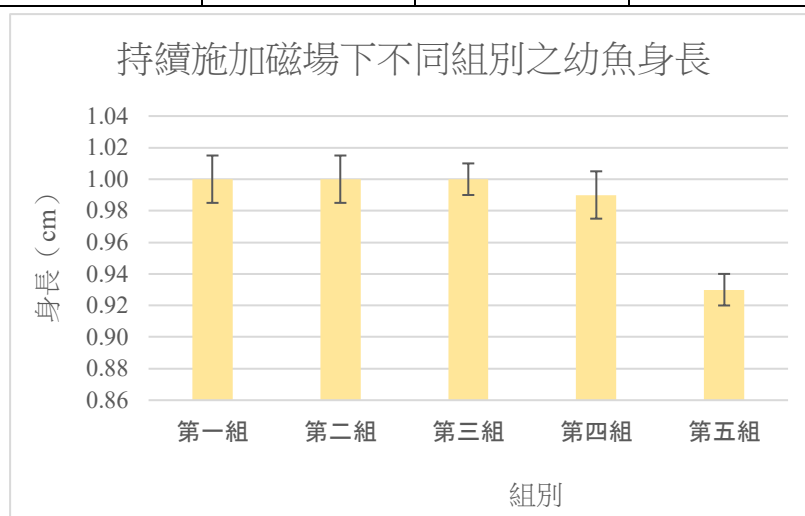
圖二十四、顯微鏡下觀察之卵直徑



圖二十五、顯微鏡下觀察之幼魚身長

表五、不同磁場下各組斑馬魚於 5dpf 之幼魚身長（單位：公分）

	第一組	第二組	第三組	第四組	第五組
身長	1.00	1.00	1.00	0.99	0.92
標準差	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02


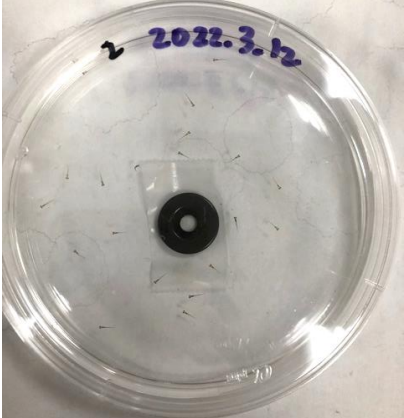
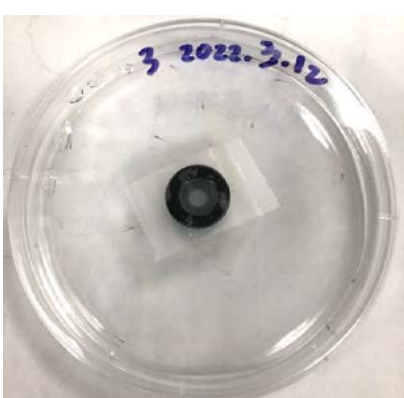


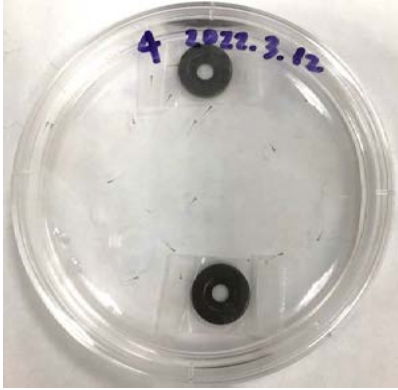
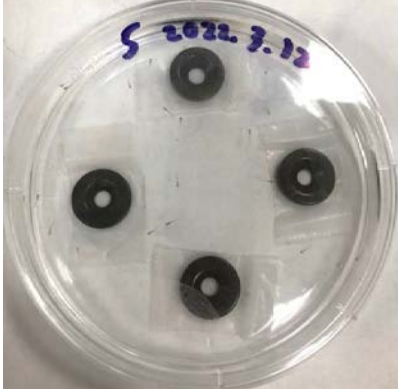
圖二十六、不同磁場下各組斑馬魚於 5dpf 之幼魚身長

(三) 對分佈偏好之影響

本結果在受精後五日進行觀察及拍攝，其中對照組的魚群會平均分散在各處，第二組（平均小磁場）與對照組狀況相近，分佈並沒有特定偏好，推測小磁場對幼魚沒有顯著影響；而在第三組（中央大磁場）、第四組（兩邊大磁場）及第五組（四邊大磁場）中，皆可以發現斑馬魚會往磁鐵所在位置（即磁場較大處）移動，推測一定大小的磁場會影響斑馬魚之分佈，以下為實驗結果歸納（如表六）：

表六、各組別斑馬魚幼魚分佈偏好

	觀察現象	照片
第一組 (對照組)	斑馬魚幼魚平均分散於培養皿中。	
第二組 (平均小磁場)	斑馬魚幼魚平均分散於培養皿中。	
第三組 (中央大磁場)	斑馬魚幼魚集中於中央（磁場較大處），極少數分布於培養皿邊緣。	

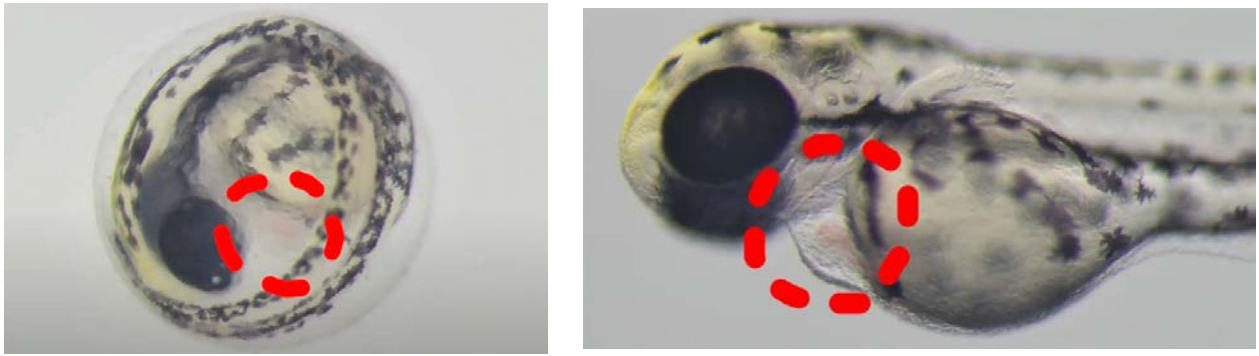
第四組 (兩邊大磁場)	斑馬魚幼魚往兩方有磁鐵處 (磁場較大) 移動。	
第五組 (四邊大磁場)	斑馬魚幼魚明顯分佈於四邊 (磁場較大)。	

(四) 對心率之影響

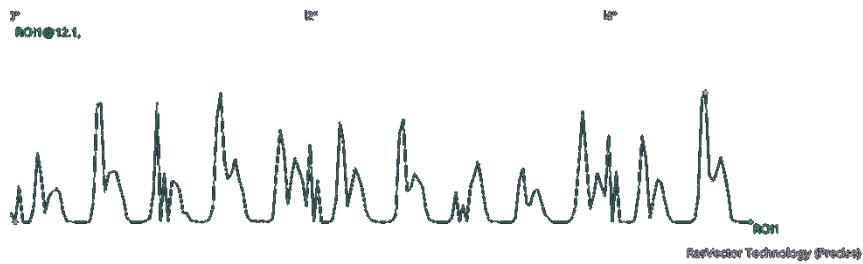
本結果利用 RvVisualPulse heartbeat 心跳監測系統進行分析，為了測量時斑馬魚保持側躺姿勢，以利系統偵測心臟搏動，因此先進行瓊脂溶液製備後錄影 (如圖二十七)，分析結果會以圖表及 excel 表格形式產出，本實驗分別以 3dpf 斑馬魚胚胎及 5dpf 斑馬魚幼魚進行無磁場 (如圖二十八、圖三十) 與有磁場 (第五組) (如圖二十九、三十一) 進行比較，在圖表分析上，可發現心率在實驗組與對照組呈現出差異性，顯示磁場會影響幼魚之心率；而在心搏數測量上，以五隻斑馬魚平均數為結果，在無磁場組 (對照組) 中 5dpf 較 3dpf 有加快趨勢，推測與胚胎發育相關，但在有磁場組 (實驗組) 中，5dpf 卻較 3dpf 下降比例甚高 (如表七)。

表七、3dpf 及 5dpf 有無磁場之心搏率 (單位：bpm)

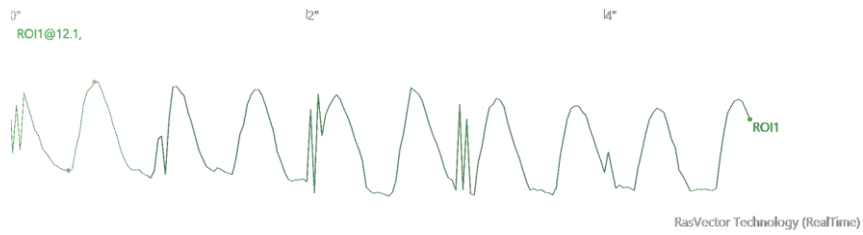
	3dpf 有磁場	3dpf 無磁場	5dpf 有磁場	5dpf 無磁場
心搏率	156	114	120	132



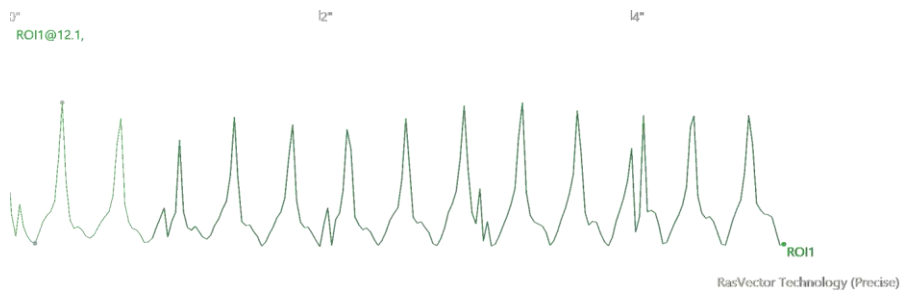
圖二十七、顯微鏡下的斑馬魚胚胎及幼魚（紅色虛線處為心臟）



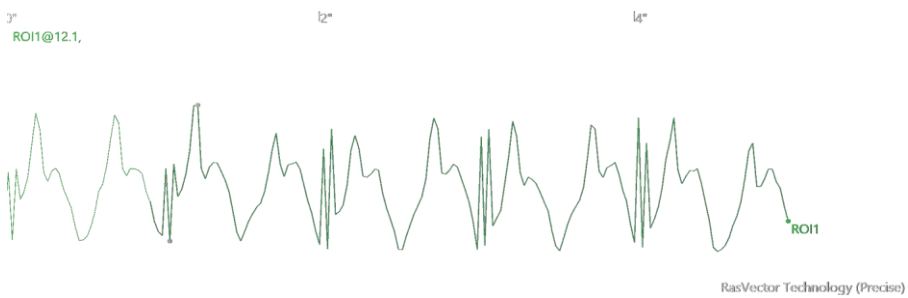
圖二十八、3dpf 有磁場組別心跳監測分析結果



圖二十九、3dpf 無磁場組別心跳監測分析結果



圖三十、5dpf 有磁場組別心跳監測分析結果



圖三十一、5dpf 無磁場組別心跳監測分析結果

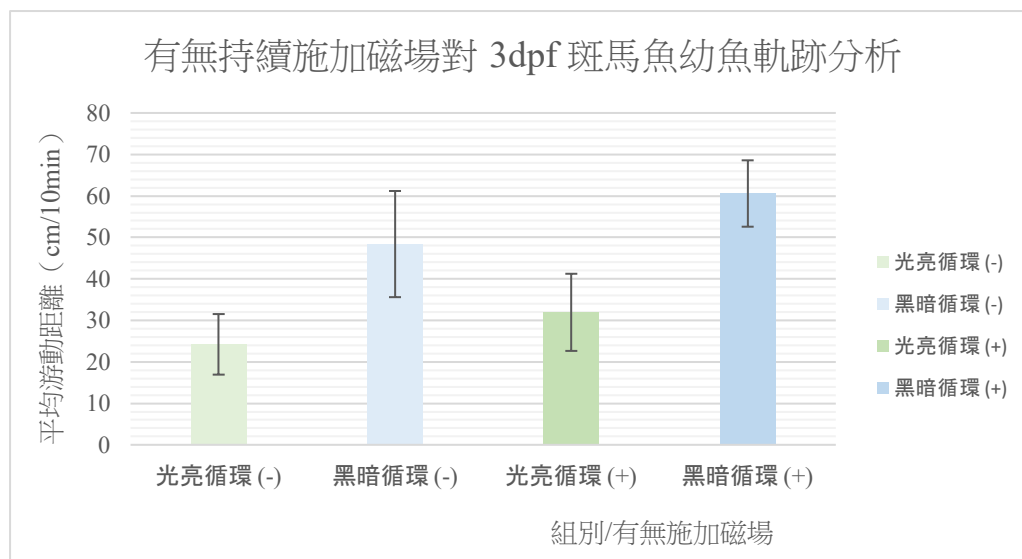
根據以上四項指標之結果，可得知當磁場達到一定大小時會導致斑馬魚胚胎孵化速度減慢、幼魚身長較短、分佈偏好改變以及心率變化，顯示持續施加之弱磁場會影響上述斑馬魚觀察指標，接下來實驗使用單一磁場，並利用軟體分析其行為模式，與生理現象做對比。

二、探討持續施加相同磁場對斑馬魚行為模式之影響

(一) 對平均移動距離 (distance) 之影響

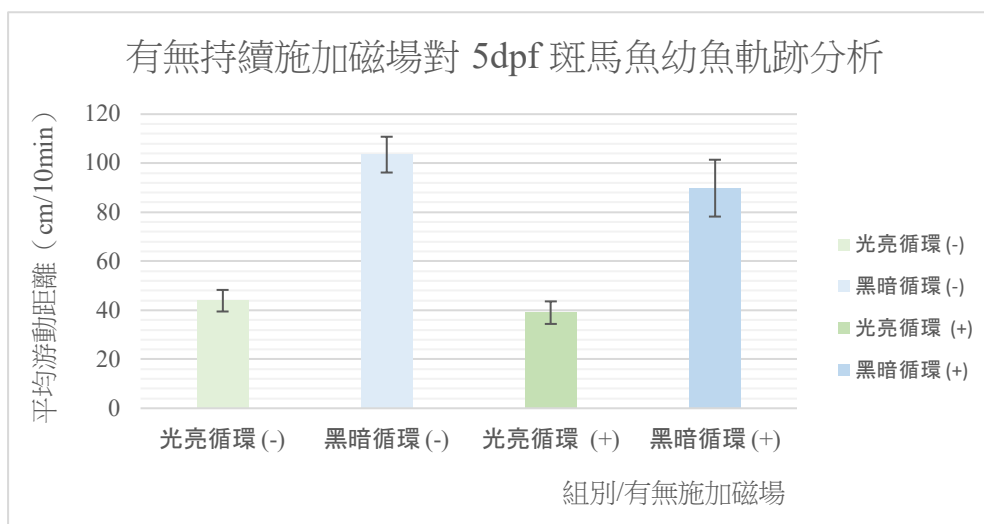
此實驗所紀錄之數據及幼魚實際活動軌跡圖 (參考附錄二)，由於在 3dpf 後幼魚幾乎孵化完成，因此主要利用 zebabox 的軌跡分析，以 3dpf 與 5dpf 兩天的平均移動距離作為比較，從 3dpf 的數據 (如圖三十二) 可見，在黑暗循環時斑馬魚幼魚之游動距離較大，符合斑馬魚屬於在夜間活動力較高的特質，且受到磁場暴露的組別移動軌跡明顯高於對照組，達到 60cm/10min；而在 5dpf 時 (如圖三十三)，黑暗循環同樣高於光亮循環的移動距離，另外，無論是否暴露於磁場 5dpf 皆高於 3dpf 的數據，但接收磁場的組別卻以 90cm/10min 落後對照組的 104cm/10min。

根據實驗結果，推測磁場初期會活化斑馬魚行動力，但持續的弱磁場施加導致運動能力下降，5dpf 與 3dpf 之實驗組對比對照組呈現總移動距離下降之趨勢。



圖三十二、有無持續施加磁場對 3dpf 斑馬魚幼魚軌跡分析

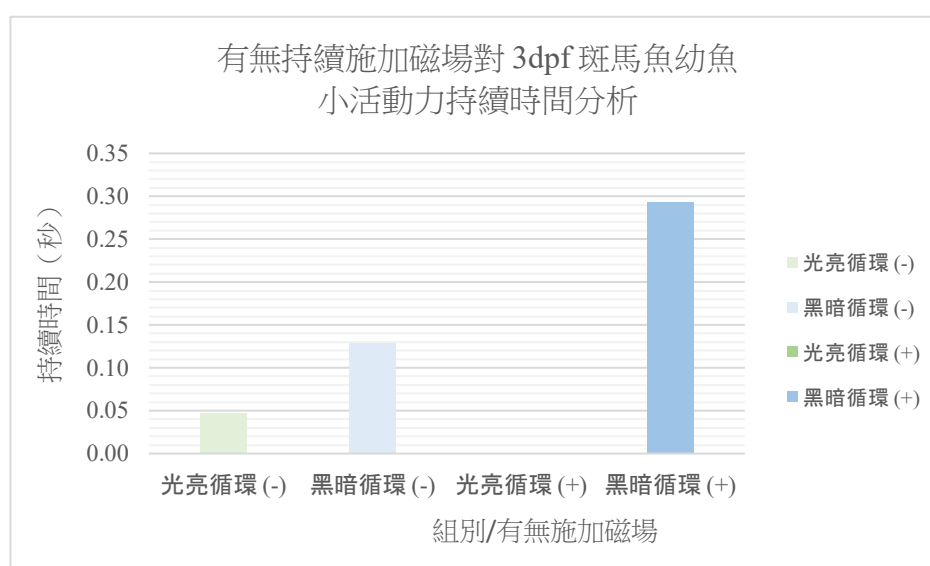
(-：無磁場；+：有磁場)



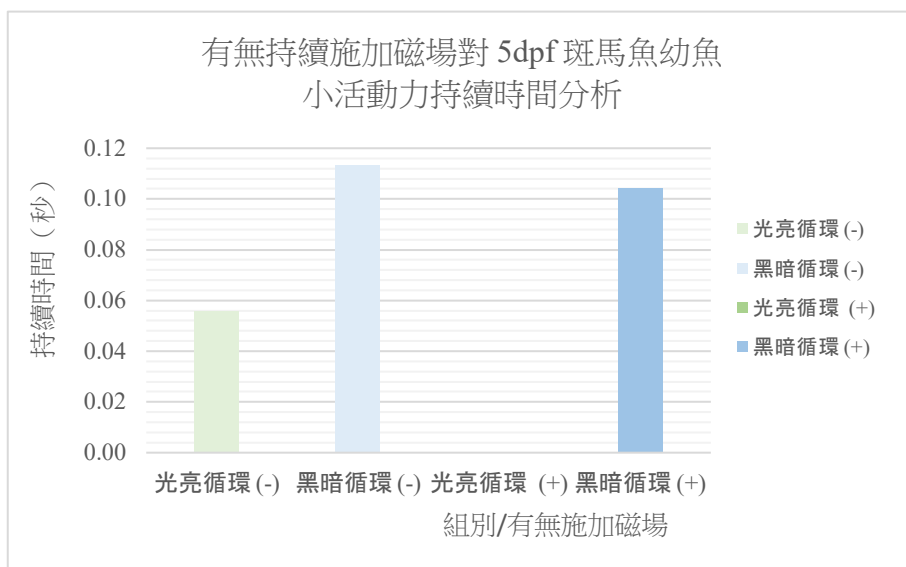
圖三十三、有無持續施加磁場對 5dpf 斑馬魚幼魚軌跡分析

(二) 對小活動力持續時間之影響

在本研究中，由於各組無活動力的持續時間差異性不大，而大活動力在其中佔比過少，因此選擇分析斑馬魚幼魚的小活動力（Small duration），在 zebrabox 系統中小活動力定義為游動速率在 4 至 8 cm/min 區間的持續時間，結果同樣以幾乎孵化完成的 3dpf 與 5dpf 幼魚作為分析對象，在 3dpf 時（如圖三十四），黑暗循環的小活動力持續時間皆大於光亮循環，且經過磁場作用的組別高達對照組的兩倍；而在 5dpf 時（如圖三十五），黑暗循環的活動力依舊較高，但有磁場組別的持續時間卻低於對照組。根據實驗結果，與平均游動距離的數據相互呼應，顯示在一定磁場短時間的促進下可能導致活動力提升，然而，在暴露時間過長後可能開始抑制。



圖三十四、有無持續施加磁場對 3dpf 斑馬魚幼魚小活動力持續時間分析



圖三十五、有無持續施加磁場對 5dpf 斑馬魚幼魚小活動力持續時間分析

根據以上實驗結果，顯示連續施加弱磁場下，斑馬魚幼魚行為在早期促進游動距離以及小活動力，但長期接觸則會造成反效果，數據呈現降低趨勢，此發現與過去的研究有所差異，可就此內容進行討論。

總結本研究所有實驗，以一表格整合並呈現所得到之結果（如表八）：

表八、總實驗成果之表格

	持續磁場施加	
	相對大	相對小
孵化率	無顯著差異	
孵化速度	延遲孵化	無顯著差異
平均卵直徑與幼魚體長	影響較大	影響較小
分佈偏好	聚集	無顯著影響
心率	先提高後降低	
平均移動距離	先提高後降低	
小活動力持續時間	先延長後縮減	

伍、討論

一、問題討論

(一) 磁場造成生理及行為改變的原因

根據前人研究 (Shuchao Ge et al, 2019) 顯示，實驗主要進行短期的強磁場暴露，利用 Real time PCR 以及螢光染劑將微管染色的方式，觀察磁場對生長發育產生的影響，結果發現強磁場的短期暴露延遲了斑馬魚的早期發育，根據 8 個指標基因的表現，發現發育確實受到磁場影響；而在行為表現方面則造成較小影響，並且在磁場移除後很快追趕上了控制組的表現。

本研究有別於過去研究角度，觀察持續施加弱磁場對生理現象及行為表現的相關影響，根據實驗結果，生理方面與前人研究成果相似，皆會有發育較為緩慢之現象，但因為沒有分生實驗的佐證，因此不能斷言斑馬魚體內作用的機制及分子生物學上的改變；而依照 zebraBox 的行為分析結果，短期暴露於磁場可造成活動力上升，卻會在持續的接觸後下降，與過去在行為表現造成較小影響的結論不同（如表九）。

表九、本研究與文獻資料之對比

	文獻資料	本次研究
磁場強弱	強磁場	弱磁場
施加時間	短期暴露	持續施加
發育面向分析	會降低微管的效率， 導致更長的細胞分裂週期	沒有分生實驗佐證
生理面向分析	孵化速度較慢 身體發育較遲緩 心率減緩	孵化速度較慢 身長較短 心率初期提高後期下降
行為面向分析	暴露時活動力減緩 移開磁場後追趕上對照組	初期活動力提高 長期活動力下降

（二）心率是否受到影響

根據早前對極低頻磁場的研究（Ying Li et al, 2014），心率在強磁場接觸後產生減弱，且最終作為生理反應數值，確立了該磁場條件對生物發育的影響。據世界衛生組織所發表的「環境衛生標準專論(WHO Environmental Health Criteria monograph)」，認為極低頻磁場即使尚無確切的健康疑慮，卻可能導致長或短期的潛在效應，因此可判斷此方向之研究具有可行性，且對將來定義持續弱磁場的影響具參考價值。

本研究結果顯示，若將心搏數及行為觀察合併分析，可發現兩者呈現正相關，斑馬魚幼魚於 3dpf 心率較高、平均游動距離較長且活動力較強，而在 5dpf 心率較低、平均游動距離較短、活動力較弱，兩者在磁場暴露初期呈現促進，後期卻出現抑制情形，但目前尚無進一步證據解釋此成因。

二、未來展望

未來希望能繼續以弱磁場影響斑馬魚為主題，探討磁場作用於斑馬魚幼魚的真正機轉，並找出磁場誘發之候選基因（candidate gene）。

動物行為模式改變多受到基因影響，因此未來想了解持續施加弱磁場，將如何造成本次實驗中觀察到心率及運動能力的改變，並且以電生理及神經傳遞面向或基因是否受到磁場改變之分子機制為探討方向，利用合成引子、神經發育與螢光染劑等方式，繼續找出可能機轉。

三、應用

磁場與動物行為相關之研究屬於近年來較熱門之方向，有鑒於斑馬魚的基因與人類存在高達 80%相似度，並且在動物實驗 3R 原則下，以其為材料的實驗較過去興盛，故若以斑馬魚為模式生物，其相關數據可作為未來環境安全指標之參考值，能讓研究者們更了解磁場的存在與生物的關聯，若能找出作用機制，對未來與人類相關的研究有較為直接的參考價值。

陸、結論

本研究以持續弱磁場進行實驗，包含不同磁場對生理現象之影響及單一磁場行為分析，所得到結論如下：

- 一、較大的磁場會影響胚胎的孵化速度，但與孵化總數沒有直接關係。
- 二、磁場作用初期並不會對胚胎大小造成影響，但持續暴露後將影響幼魚身長，尤其磁場較大的環境下，斑馬魚幼魚的生長狀況最差。
- 三、當磁場達到一定大小，會影響斑馬魚之分佈偏好。
- 四、磁場施加初期會造成幼魚心率提高，到後期卻有下降之趨勢。
- 五、行為上，斑馬魚在黑暗循環的活動力皆高於光亮循環，且短時間的暴露可能促進斑馬魚活動力上升，但在持續弱磁場的影響下逐漸降低。

柒、參考資料及其他

一、期刊與論文

1. Akira Takebe¹, & Toshiki Furutani¹. (2012). Zebrafish respond to the geomagnetic field by bimodal and group-dependent orientation. *SCIENTIFIC REPORTS*, 2, 727.
2. Shuchao Ge, & Jingchen Li. (2019). Strong static magnetic field delayed the early development of zebrafish. *Open Biol*, 9(10), 190137.
3. Michael B. Orger, & Gonzalo G. de Polavieja. (2017). Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 125-147.
4. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47–60.
5. W. M. S. Russell, & R. L. Burch. *The Principles of Humane Experimental Technique*. (1960). *Medical Journal of Australia*, 1(13), 500.
6. Ahne Myklatun, Antonella Lauri, Stephan H.K. Eder, Michele Cappetta, Denis Shcherbakov, Wolfgang Wurst, Michael Winklhofer, Gil G. Westmeyer. (2018). Zebrafish and medaka offer insights into the neurobehavioral correlates of vertebrate

magnetoreception. NATURE COMMUNICATIONS, 9:802.

7. Gomez-Marin A, Paton JJ, Kampff AR, Costa RM, Mainen ZF. (2014). Big behavioral data: psychology, ethology and the foundations of neuroscience. *Neurosci.* 17:1455–62.
8. Ying Li, Xingfa Liu, Keran Liu, Wei Miao, Cheng Zhou, Yang Li, Hongjuan Wu. (2014). Extremely low-frequency magnetic fields induce developmental toxicity and apoptosis in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biol Trace Elem Res*, 162(1-3):324-32.

二、網站

1. 「3R 原則」維基百科。2021 年 12 月 28 日，取自
https://zh.wikipedia.org/wiki/3R_原則
2. 「動物行為學」維基百科。2021 年 12 月 28 日，取自
<https://zh.wikipedia.org/wiki/動物行為學>
3. 「實驗鼠的水迷宮」國家實驗研究院。2021 年 12 月 28 日，取自
<https://www.narlabs.org.tw/xscience/cont?xsmsid=01148638629329404252&sid=01250654641468867257>
4. 「行動電話基地臺電磁波問答集」國家通訊傳播委員。2015 年 5 月，取自
https://www.ncc.gov.tw/chinese/faq_detail.aspx?is_history=1&pages=0&sn_f=322&faq_code=0&keyword
5. 「Agarose 瓊脂糖」維基百科。2022 年 5 月 23 日，取自
<https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose>
6. 「CHAPTER 4 - MICROSCOPIC OBSERVATIONS – AGAR MOUNTING」
ZFIN (The Zebrafish Information Network)。2022 年 5 月 23 日，取自
https://zfin.org/zf_info/zfbook/chapt4/4.3.html

捌、 附錄

附錄一、3D 列印模型製作

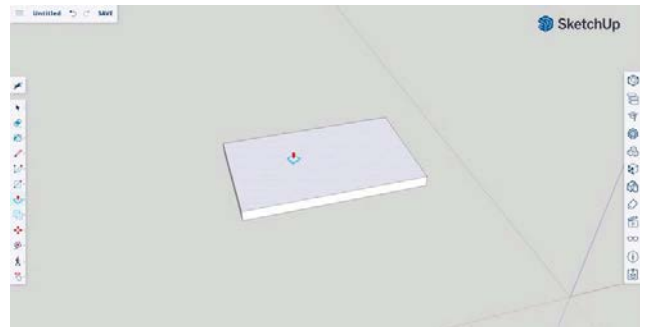
本實驗利用 3D 建模軟體 Sketchup 連接 3D 列印機（如圖三十六）製作實驗器材，首先設計底面積為 12cm x 8cm 的長方形基座（如圖三十七），接著推出 2cm 高度形成長方體（如圖三十八），並在物體表面畫上等直徑的圓形作為實驗的孔洞（如圖三十九），最後計算其厚度再進行一次推高形成凹槽（如圖四十），重複此步驟直到孔盤完全完成；實體產出部分則使用熱熔融層積技術（FDM）之列印機，通過加熱裝置將透明耗材融化，以噴頭將材料塗敷於工作台，最終產出成品。



圖三十六、3D 列印機



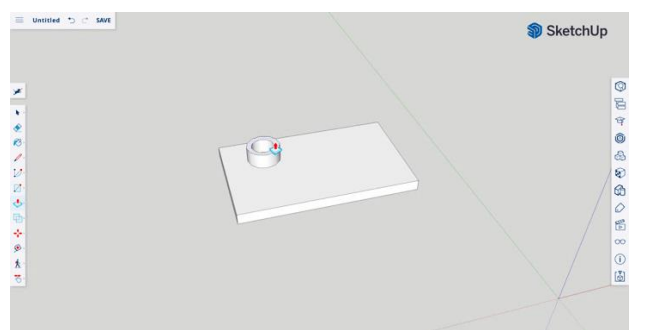
圖三十七、長方形基座示意圖



圖三十八、推出一定高度示意圖



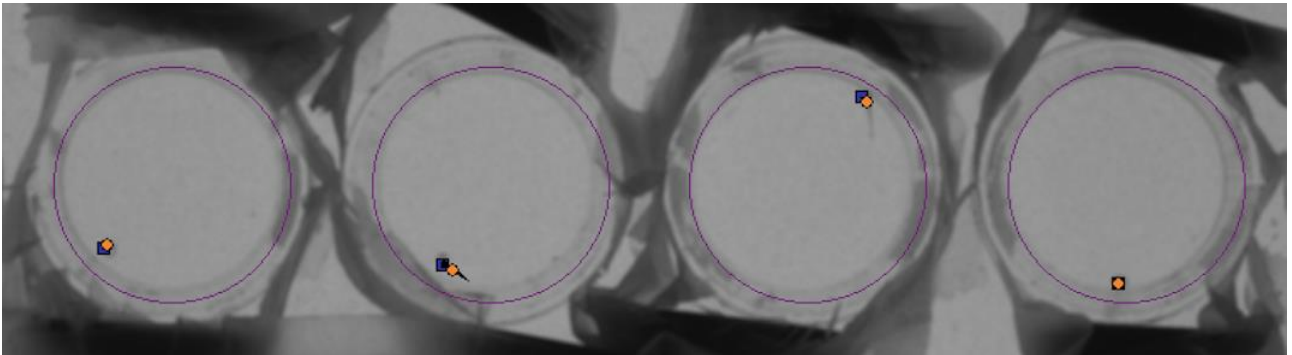
圖三十九、表面畫出圓形示意圖



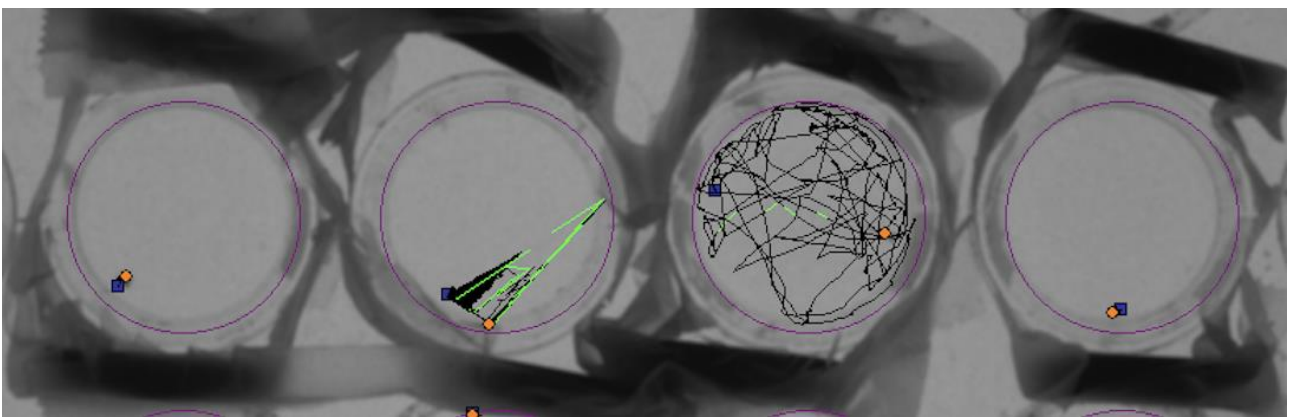
圖四十、將外圈推高示意圖

附錄二、軌跡分析之幼魚實際活動軌跡圖

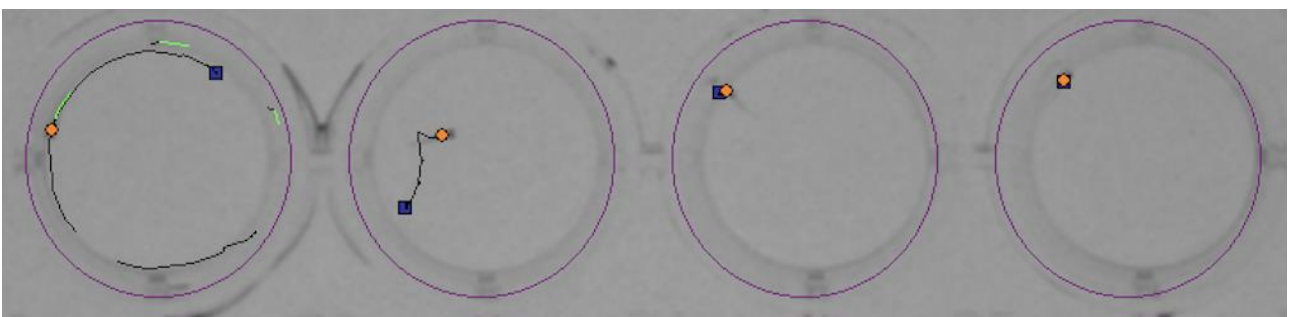
(一) 3dpf時斑馬魚幼魚活動軌跡



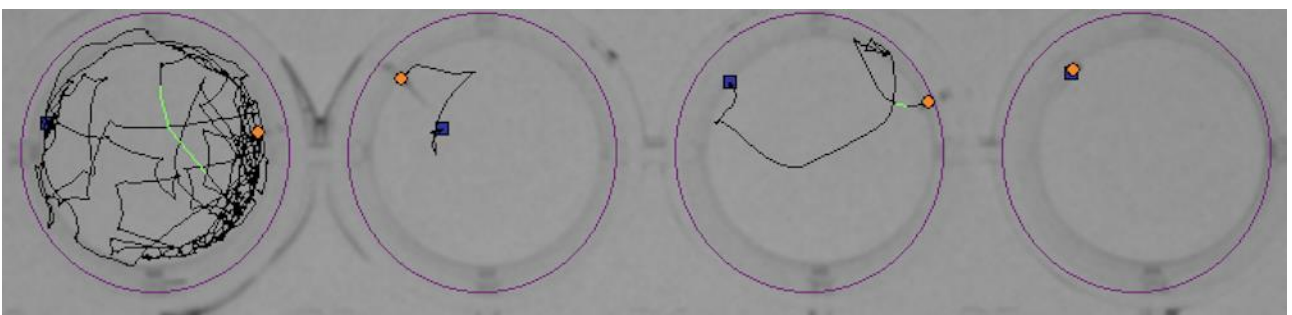
圖四十一、3dpf有磁場組別（光亮循環）



圖四十二、3dpf有磁場組別（黑暗循環）

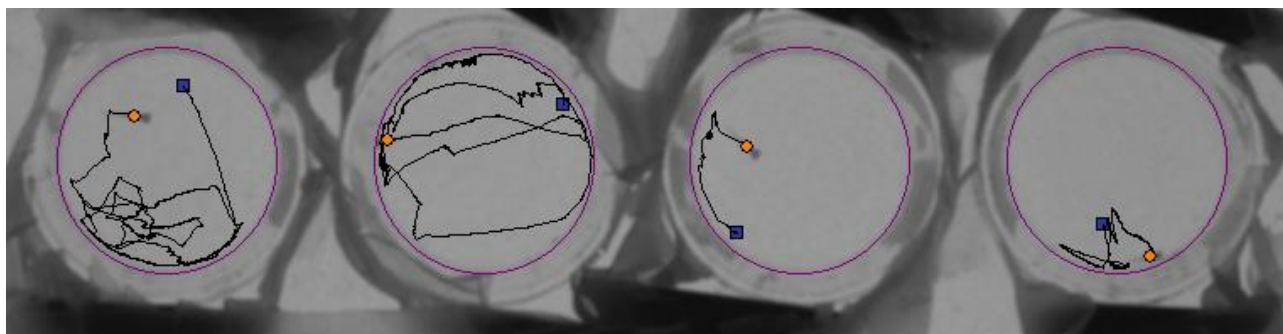


圖四十三、3dpf無磁場（光亮循環）

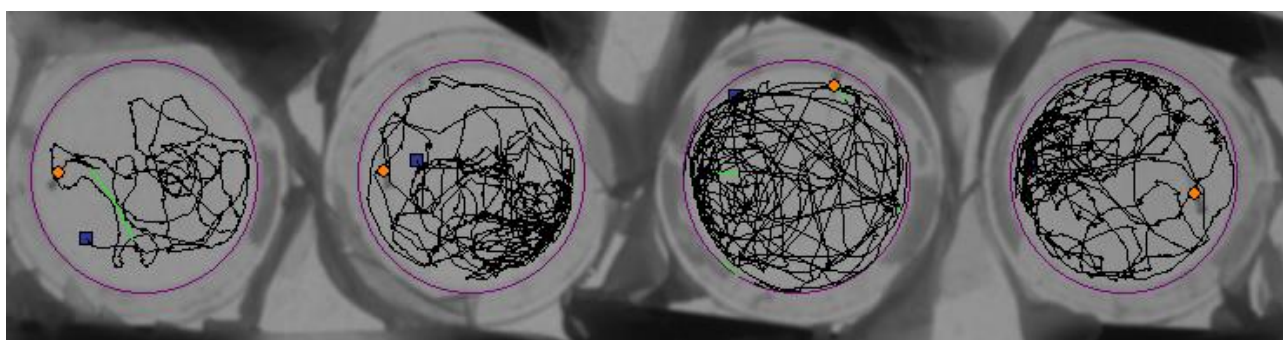


圖四十四、3dpf無磁場（黑暗循環）

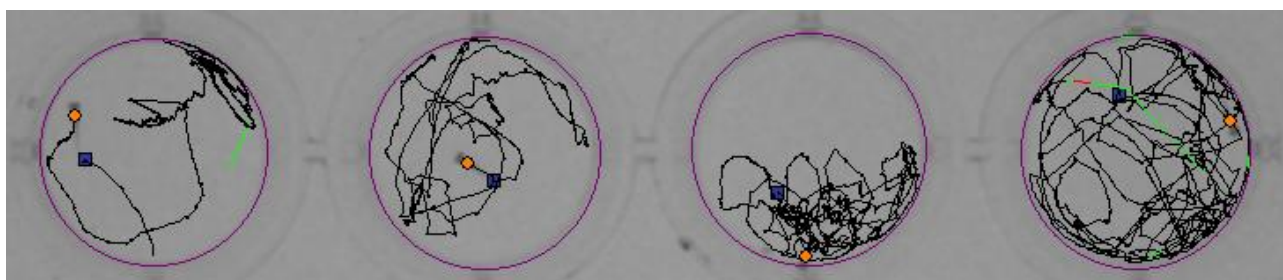
(二) 5dpf時斑馬魚幼魚活動軌跡



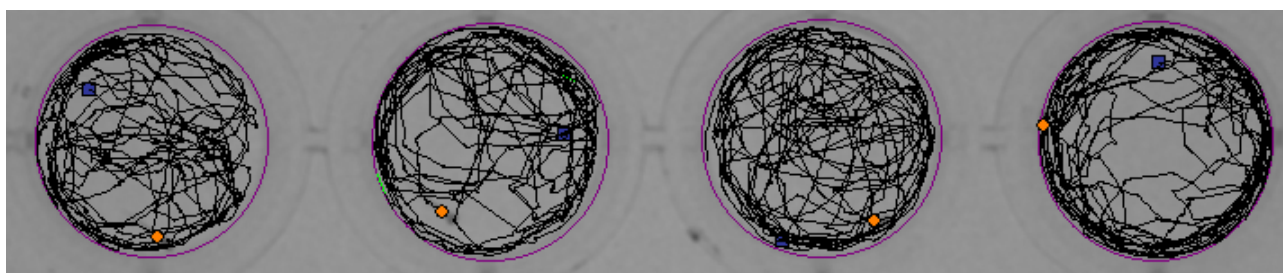
圖四十五、5dpf 有磁場（光亮循環）



圖四十六、5dpf 有磁場（黑暗循環）



圖四十七、5dpf 無磁場（光亮循環）



圖四十八、5dpf 無磁場（黑暗循環）

【評語】 052015

1. 本科展主題係探討受精後五日內斑馬魚胚胎在持續施加弱磁場後，觀察對斑馬幼魚造成的生理及行為影響。實驗結果顯示，在上斑馬幼魚的心搏數及部分生理表現會受到實驗設定之磁場影響。
2. 研究作品的主題清楚且聚焦，適時參考前人的文獻資料，實驗方法能妥善運用上課所學與生活知識結合，學以致用並詳加觀察和試驗。
3. 作品說明書第 11 頁的圖十二~十四，斑馬胚胎發育圖與受精後日期疑有錯置。作品說明書描述各組實驗的重複試驗宜有獨立三次以上重複，在呈現的圖中宜適切地應用簡單的科學性統計方法分析，例如圖二十三不同磁場下各組斑馬魚總孵化率、圖三十四有無持續施加磁場對 3dpf 斑馬魚幼魚小活動力持續時間分析、圖三十五有無持續施加磁場對 5dpf 斑馬魚幼魚小活動力持續時間分析等。
4. 部分實驗觀察結果不明顯，有受磁場影響之觀察結果宜再加以探討其分子機制，如此才與人類相關的研究有較為直接的參考價值。本實驗所用之磁場強度可再與現實環境做關聯，例如高壓電塔附近之磁場強度，如此實驗結果較有可能與實際生活結合探討。

作品簡報



探討持續施加弱磁場對 斑馬魚幼魚生理及行為之影響

高級中等學校組 動物與醫學學科

前言

■ 研究動機

高一課程
生物 環境因子
物理 電與磁場



短時間高強度

持續弱強度



■ 實驗目的

一、探討持續施加**不同磁場大小及分布**對斑馬魚**生理及發育**現象之影響

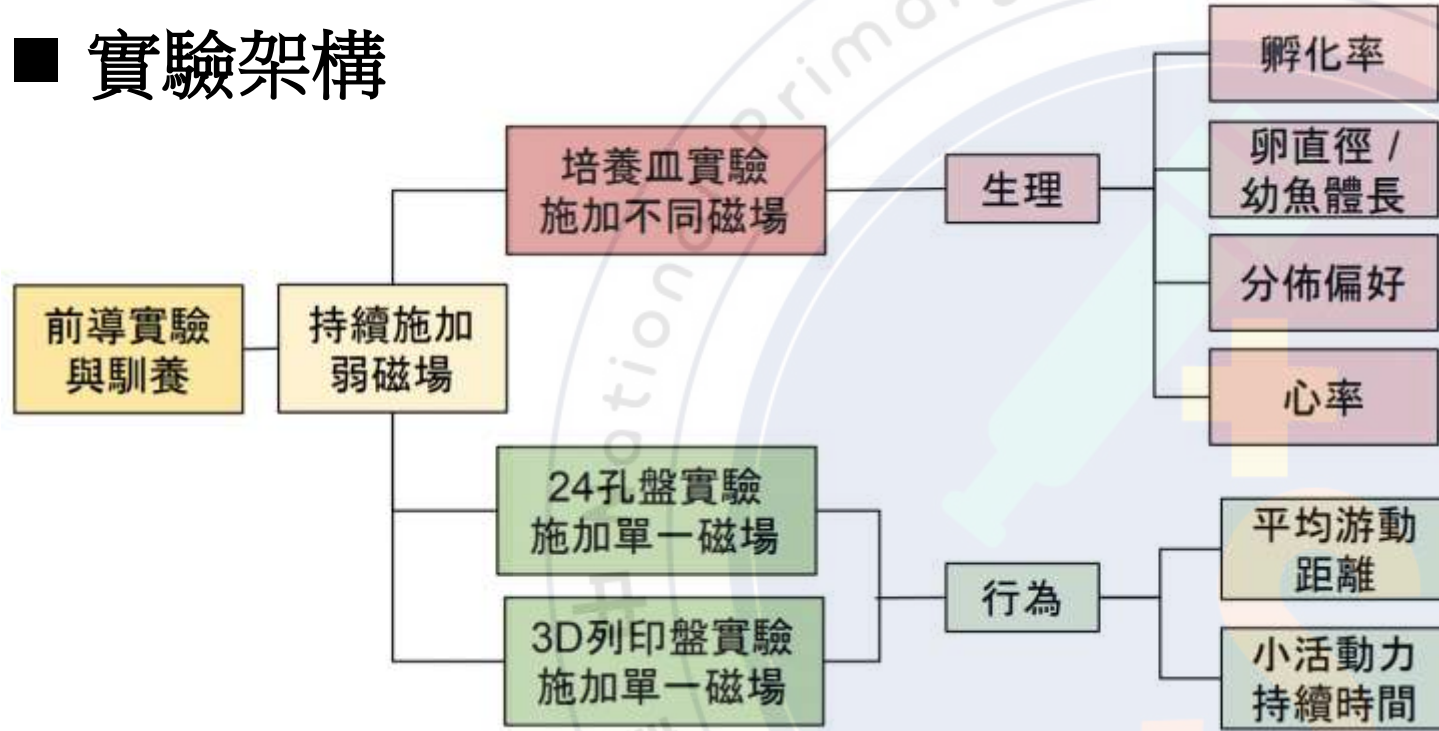
(一) 孵化率 (二) 卵直徑及體長 (三) 分佈偏好 (四) 心率

二、探討持續施加**相同磁場**對斑馬魚**行為**模式之影響

(一) 平均移動距離 (二) 小活動力持續時間

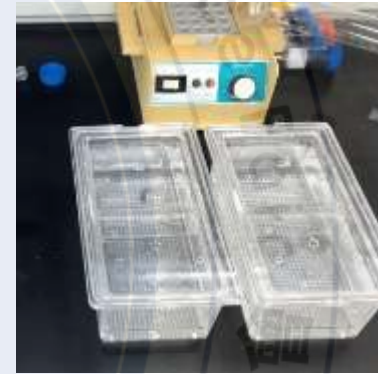
研究過程或方法

■ 實驗架構

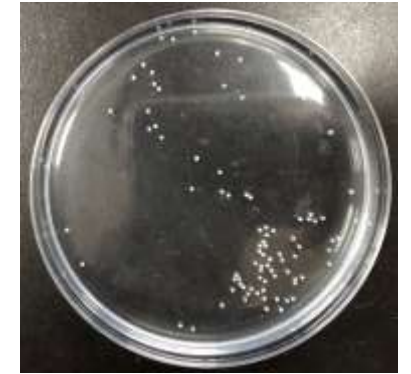


(一) 前導實驗：斑馬魚馴養

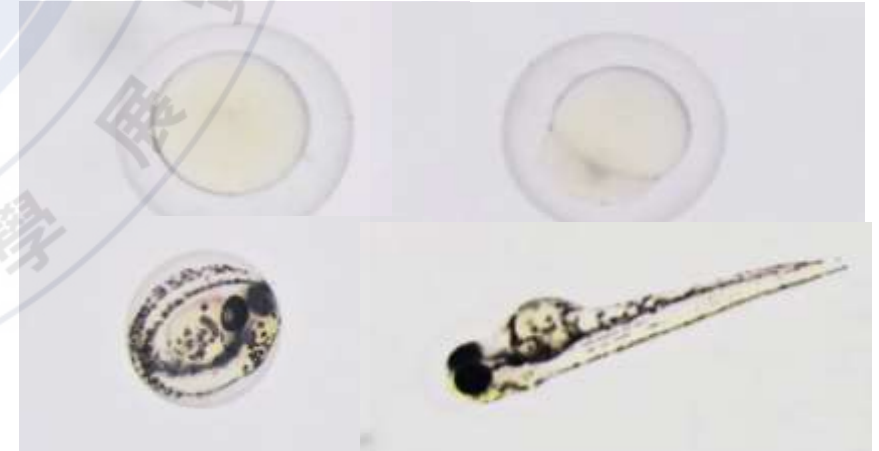
受精卵收集



胚胎凝結



受精後五日生長情形



(二) 瓊脂溶液 (Agarose) 製備



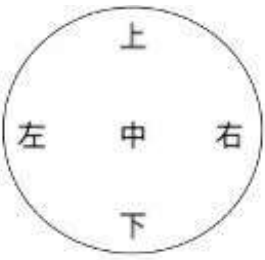
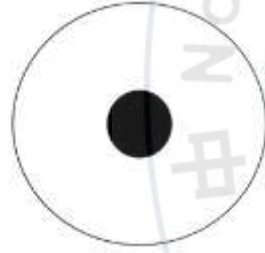
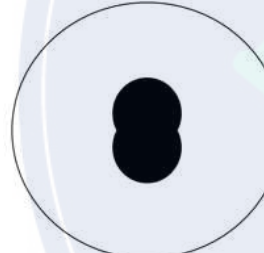
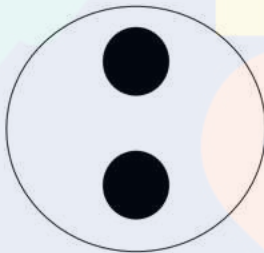

Agarose	重量百分濃度1.2%
TAE buffer	50x 稀釋為 1x

- 將胚胎放入瓊脂後待其**硬化**，以**手術刀**切割並滴上少許水，利用**顯微設備**觀察及記錄。

研究過程或方法

(三) 實驗盤設計與磁場測定

1. 培養皿實驗

組別	第一組 (對照組)	第二組 (平均小磁場)	第三組 (中央大磁場)	第四組 (兩邊大磁場)	第五組 (四邊大磁場)
圖示					

2. 多孔盤實驗

第一次
(495 G)
24 孔盤

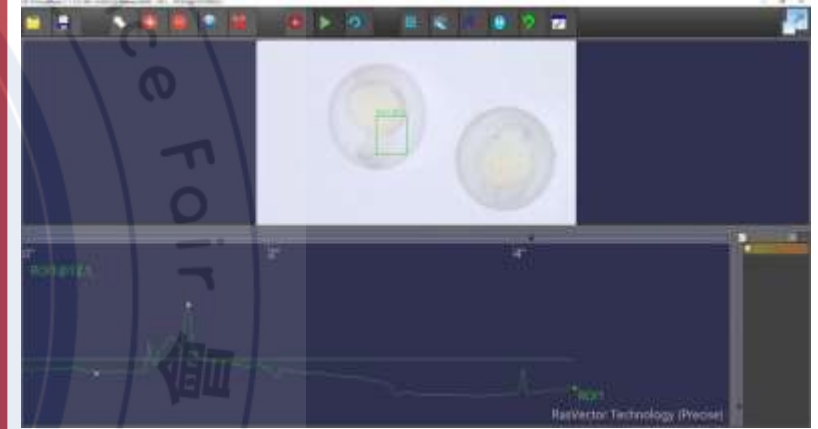


第二次
(625 G)
3D 孔盤



(四) 檢測儀器及方式

RvVisualPulse heartbeat
心跳監測軟體



zebrafish lab

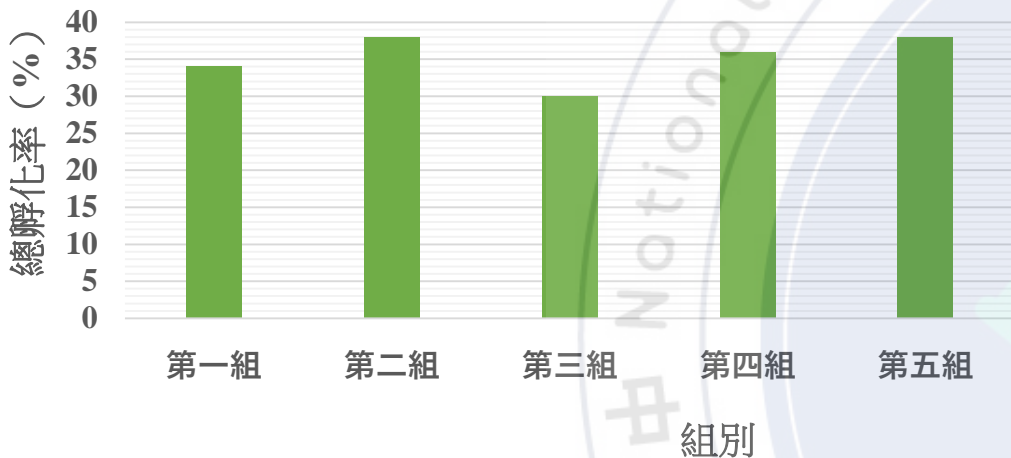
高通量斑馬魚行為觀察系統



研究結果 (一)

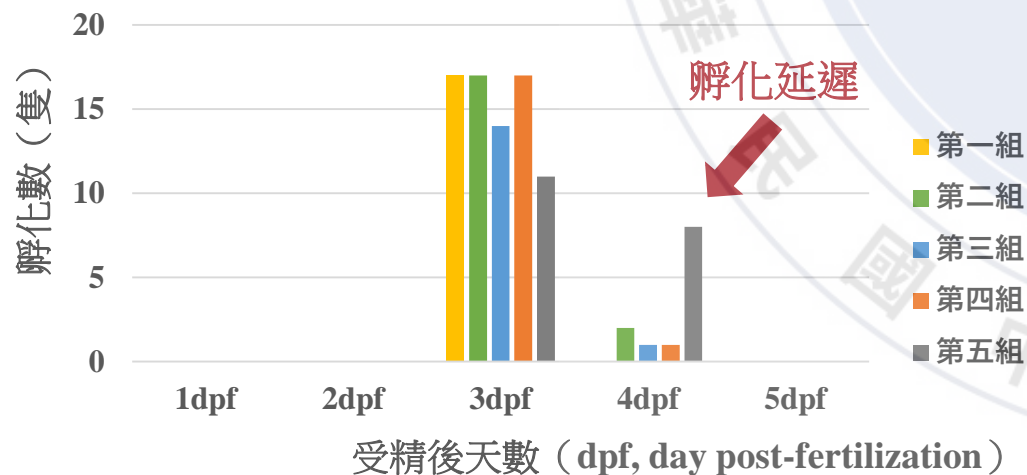
對孵化率之影響

不同磁場下各組斑馬魚總孵化率之長條圖



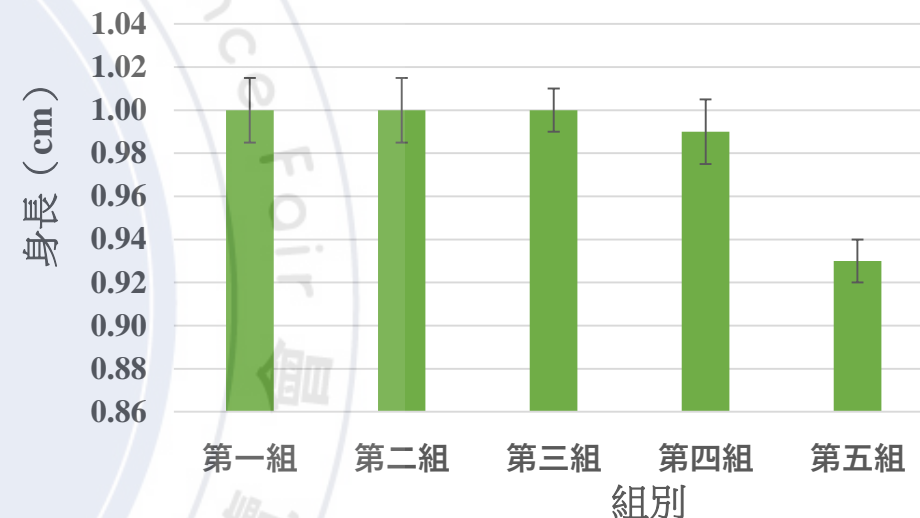
➤ 較大磁場可能影響胚胎孵化過程

不同磁場下各組斑馬魚孵化之長條圖

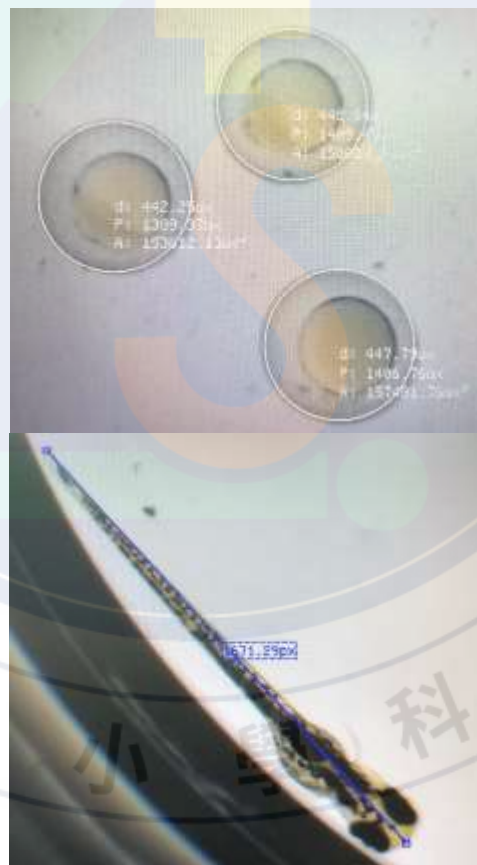


對卵直徑與體長之影響

持續施加磁場下不同組別之幼魚身長

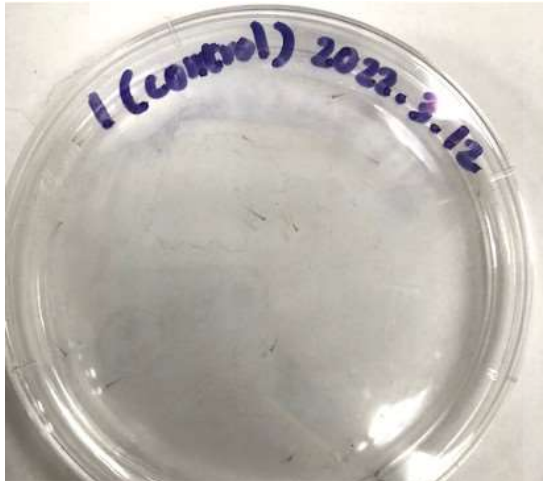


- 胚胎時期卵直徑差異較不顯著
- 斑馬魚在一定時間磁場暴露生長會受影響，磁場越大影響力越大
- 左圖為胚胎及幼魚觀察示意圖

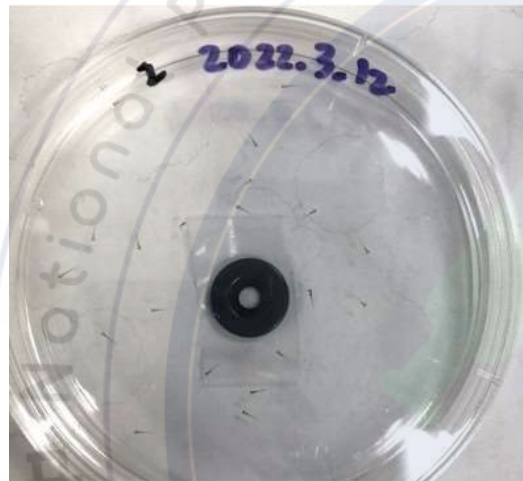


研究結果 (一)

■ 對分佈偏好之影響



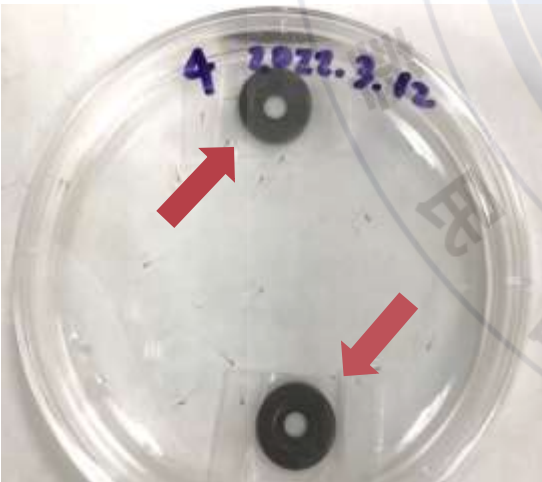
平均分散於培養皿



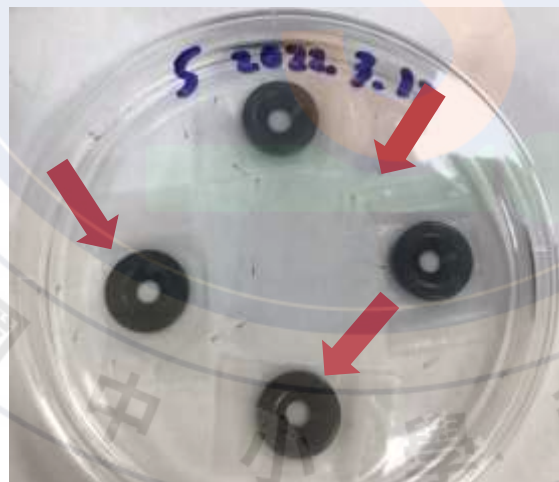
平均分散於培養皿



聚集中央 (磁場較大)



聚集兩側 (磁場較大)



聚集四方 (磁場較大)

➤ 斑馬魚往**磁鐵所在處** (磁場較大) 移動，顯示一定大小磁場會影響**分佈偏好**



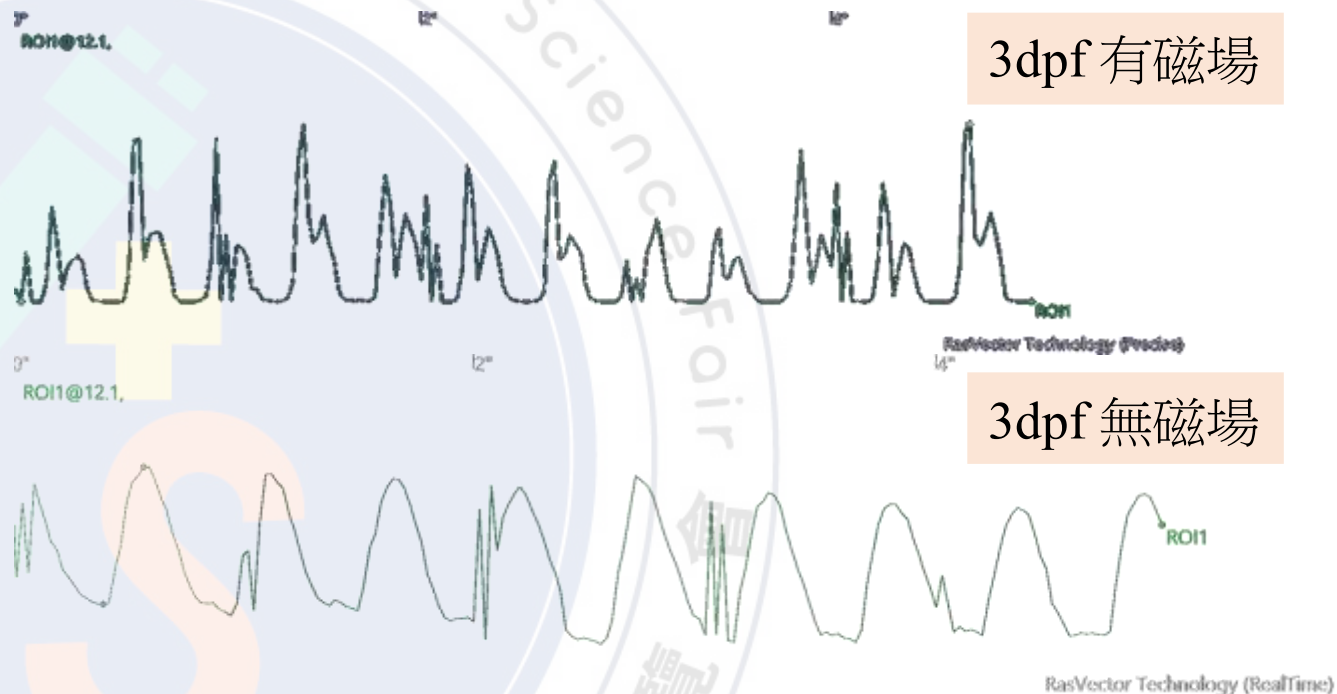
放置環境：恆溫培養箱

研究結果 (一)

■ 對心率之影響



斑馬魚心臟顯微鏡拍攝成果



	3dpf 有磁場	3dpf 無磁場	5dpf 有磁場	5dpf 無磁場
心搏率	156	114	120	132

➤ 有磁場相對無磁場組之心率在 **3dpf** 加快而 **5dpf** 減緩，呈現先促進後抑制趨勢

研究結果 (二)

對平均移動距離 (distance) 之影響

黑暗循環下斑馬魚游動軌跡圖

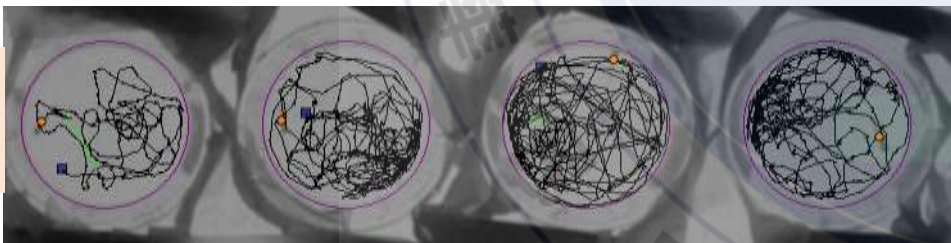
3dpf
有磁場



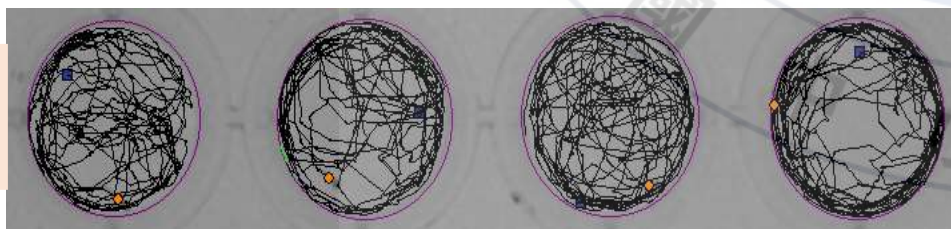
3dpf
無磁場



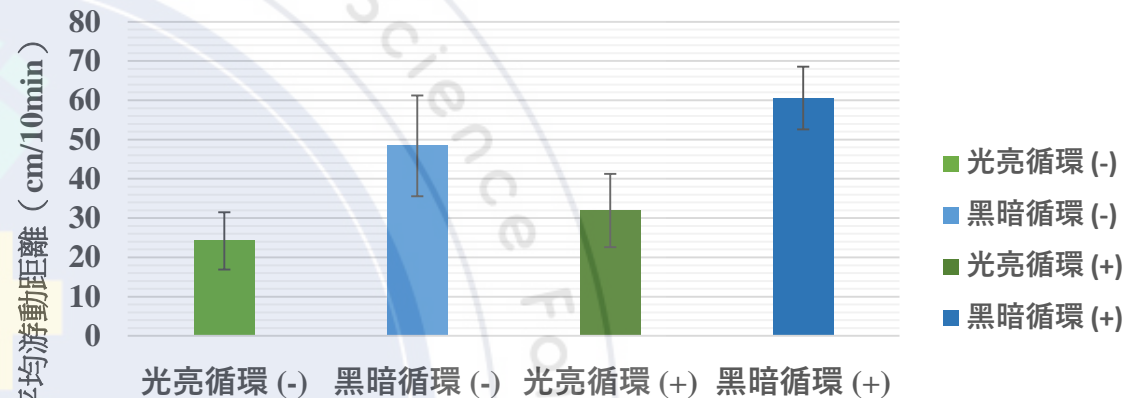
5dpf
有磁場



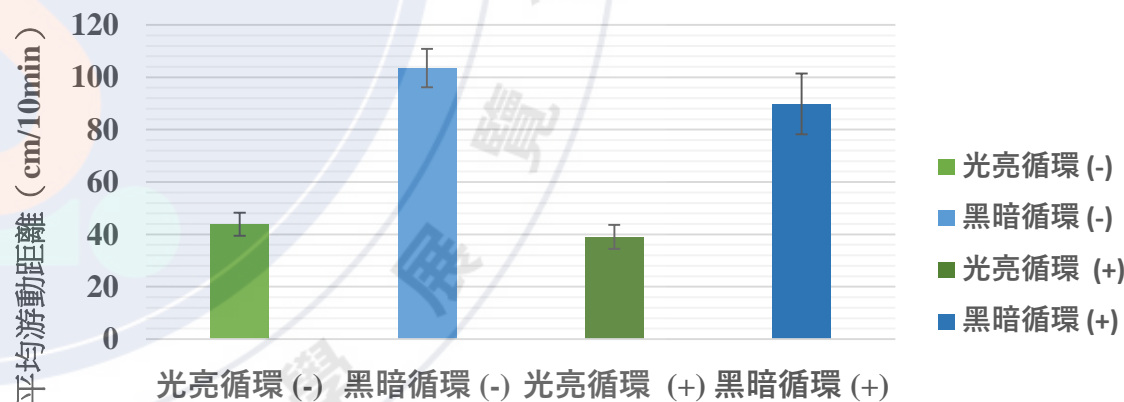
5dpf
無磁場



有無持續施加磁場對 3dpf 斑馬魚幼魚軌跡分析



有無持續施加磁場對 5dpf 斑馬魚幼魚軌跡分析

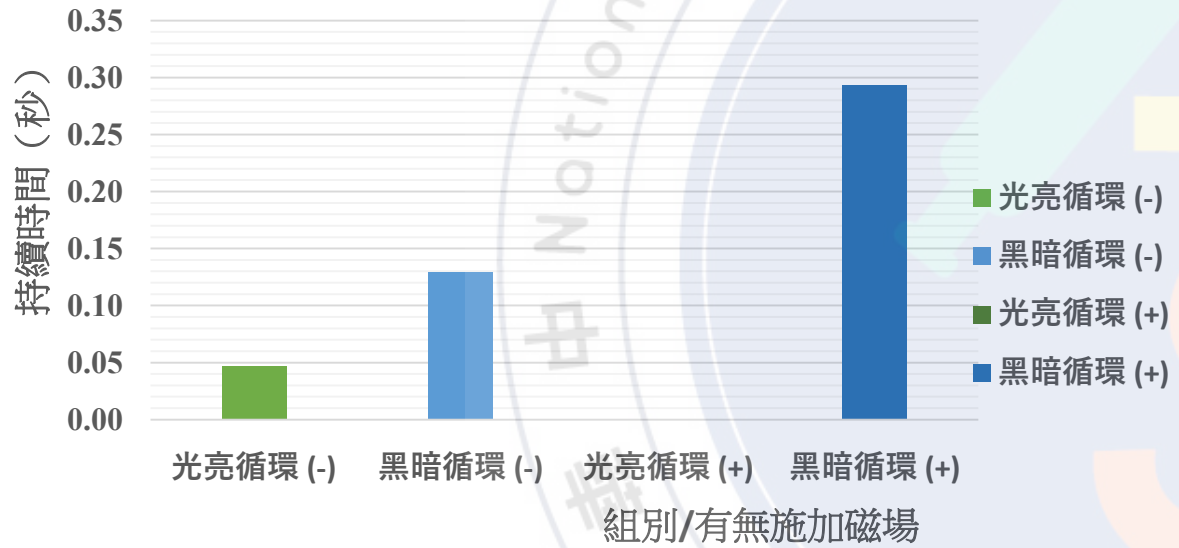


➤ 一定磁場暴露初期會活化斑馬魚行動力，但持續的弱磁場施加導致運動能力下降

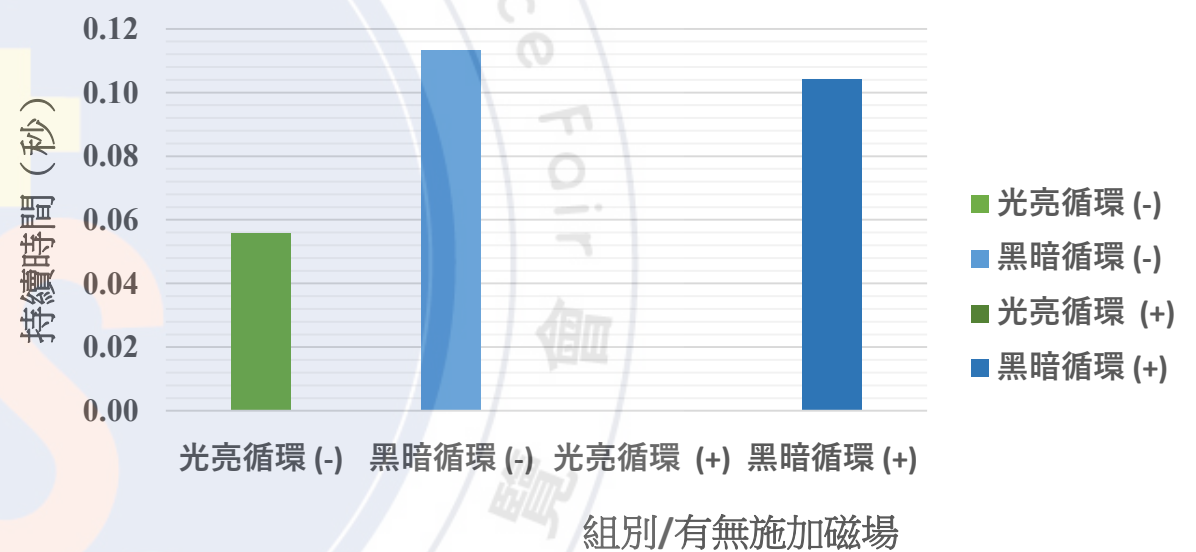
研究結果 (二)

■ 對小活動力持續時間 (small duration) 之影響

有無持續施加磁場對 3dpf 斑馬魚幼魚
小活動力持續時間分析



有無持續施加磁場對 5dpf 斑馬魚幼魚
小活動力持續時間分析



小活動力定義



➤ 一定磁場暴露短時間可導致活動力提升，時間過長後卻開始抑制

討論

■ 磁場造成生理及行為改變的原因

- 前人研究針對**短期強磁場**，本實驗則為**長期弱磁場**暴露
- 發育未以分生實驗做進一步分析
- 行為出現較不相同之分析結果，過去在磁場移除後很快追趕上對照組表現，本次則發現**短期**暴露可造成活動力上升，卻在**持續**接觸後下降
- 右表為兩研究比較表格

	文獻資料	本次研究
磁場強弱	強磁場 (9.0T)	弱磁場
施加時間	短期暴露 (1dpf)	持續施加 (5dpf)
發育面向分析	會降低微管的效率， 導致更長的細胞分裂週期	沒有分生實驗佐證
生理面向分析	孵化速度較慢 身體發育較遲緩 心率減緩	孵化速度較慢 身長較短 心率先提高後下降
行為面向分析	暴露時活動力減緩 移開磁場後追趕上對照組	初期活動力提高 長期活動力下降

結論

將總結果整理成以下表格：

	持續磁場施加	
	相對大	相對小
孵化率	無顯著差異	
孵化速度	延遲孵化	無顯著差異
平均卵直徑與幼魚體長	影響較大	影響較小
分佈偏好	聚集	無顯著影響
心率	先提高後降低	
平均移動距離	先提高後降低	
小活動力持續時間	先延長後縮減	

未來展望及應用

■ 探討磁場誘發之候選基因 (candidate gene)

未來將以**電生理**及**神經傳遞**面向或基因是否受到磁場改變之**分子機制**探討為方向，利用合成引子、神經發育與螢光染劑等方式，繼續找出磁場作用於斑馬魚幼魚的真正機轉與其**候選基因**，並連結本次實驗中觀察到**心率及運動能力的改變**。

有鑒於斑馬魚的基因與人類存在高達**80%**相似度，並在動物實驗**3R**原則下，以斑馬魚作為模式生物，其相關數據可作為未來**環境安全指標**之參考值，讓研究者們更了解磁場的存在與生物的關聯，對未來與人類相關的研究有較為直接的參考價值。

參考資料及其他

1. Shuchao Ge, & Jingchen Li. (2019). Strong static magnetic field delayed the early development of zebrafish. *Open Biol*, 9(10), 190137.
2. Ahne Myklatun, Antonella Lauri, Stephan H.K. Eder, Michele Cappetta, Denis Shcherbakov, Wolfgang Wurst, Michael Winklhofer, Gil G. Westmeyer. (2018). Zebrafish and medaka offer insights into the neurobehavioral correlates of vertebrate magnetoreception. *NATURE COMMUNICATIONS*, 9:802.
3. Ying Li, Xingfa Liu, Keran Liu, Wei Miao, Cheng Zhou, Yang Li, Hongjuan Wu. (2014). Extremely low-frequency magnetic fields induce developmental toxicity and apoptosis in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biol Trace Elem Res*, 162(1-3):324-32.