

中華民國第四十六屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

第三名

040704

探討燈科魚對溫度變化的適應能力

學校名稱： 國立臺中女子高級中學

| | |
|-------------------------|--------------|
| 作者： 高二 彭佩晨 高二 黃于芳 | 指導老師： 邱伯勤 |
|-------------------------|--------------|

關鍵詞：紅蓮燈魚、日光燈魚、肌動蛋白

壹、摘要

原產於熱帶水域，同屬於燈科類的魚種中—紅蓮燈魚 (*Parachanna axelrodi*，圖一) 比日光燈魚 (*Parachanna innesi*，圖二) 更能適應 30°C ~ 37°C 的環境。這兩種魚在生物分類、體型及外表上皆十分相似，然而對溫度適應能力確有顯著的差異。我們認為被高溫誘導出的蛋白質啟動了潛在的保護機制，造成對的高溫耐受性。藉由萃取魚體蛋白，並以一維電泳及二維電泳分析蛋白質表現，可看出紅蓮燈魚與日光燈魚從正常溫度 (21°C) 到較高溫度 (30°C) 時皆誘導出蛋白質，但紅蓮燈魚的蛋白質表現量改變較顯著；在相同的溫度下，紅蓮燈魚的蛋白量也比日光燈魚高出許多。接著我們進一步以質譜儀分析，得知這些被誘導出的蛋白質皆與肌肉細胞的運作有關，這些蛋白質維持了魚基本的生命現象。



【圖一】紅蓮燈魚



【圖二】日光燈魚

貳、研究動機

紅蓮燈魚與日光燈魚為普遍的觀賞魚，皆屬脂鯉目、霓虹脂鯉科、辛加拉屬。這兩種魚的外形與顏色極為相似，體側都有上下兩條藍、紅二色橫紋，但日光燈腹部為白色，身體後半段才有紅色條紋；紅蓮燈腹部的紅色則由眼眶下一直延伸至尾柄。日光燈的體型較小，最大可達3~4公分，紅蓮燈為4~5公分。兩種魚皆由國外進口，原產於熱帶水域。其生活環境類似，較喜弱酸性軟水（pH5.5~pH6.5）水溫則介於20°C到26°C之間。

冬天時為避免低溫傷害，常將魚缸控溫棒調至26°C；在一次不小心下，將溫度錯調至35°C，不久發現魚缸裡的日光燈魚幾乎全部死亡，但紅蓮燈魚卻依然在游動，似乎沒有顯著影響；這個發現，讓我們有一探究竟的念頭。

生物學常識告訴我們，生物體為求體內恆定，多半只能在合適環境求生存，劇烈的環境變異可能形成嚴酷的生理考驗。當然，紅蓮燈魚及日光燈魚亦有所適應的溫度範圍；當溫度過高時就會破壞體內生理機能運作，這可能是蛋白質在高溫下變性或是其他因素所造成。

兩種極為相近、在分類上為同屬不同種的魚，對溫度的適應能力卻是天壤之別，是什麼因素在作祟？是生理構造還是最根本的蛋白質差異？這些問題值得我們深入研究。

參、研究目的

- 一、了解紅蓮燈魚及日光燈魚在外界環境改變衝擊之下的適應能力
- 二、觀察紅蓮燈魚及日光燈魚的蛋白質表現差異
- 三、探討紅蓮燈魚在高溫下誘發的蛋白質

肆、研究器材及設備

一、器材：

- (一)水族箱 (內含基礎生態系：水草、硝化細菌、大和藻蝦)
- (二)水循環系統
- (三)控溫棒 (300W)
- (四)溫度計
- (五)紅蓮燈魚 長度約 2.3 cm
- (六)日光燈魚 長度約 2.3 cm
- (七)組織均質機
- (八)分光光度計
- (九)蛋白質電泳槽
- (十)等電點聚焦膠體 (Bio-Rad 公司製造)
- (十一)等電點聚焦電泳槽 (IPG phor, Amersham 公司製造)
- (十二)飛行式質譜儀 (MALDI-TOF)

二、藥品：

- | | |
|---|--------|
| (一)ddH ₂ O (MILLIPORE 設備製造) | 二次水 |
| (二) PMSF (Phenyl methyl sulfonyl fluoride) | 苯甲基磺酰氟 |
| (三)NP40 (Nonidet P-40) | 界面活性劑 |
| (四)Deoxycholic acid | 去氧膽酸 |
| (五)EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) | 乙二胺四乙酸 |
| (六)SDS (Sodium dodecyl sulfate) | 十二基硫酸鈉 |
| (七)BSA (Bovine Serum Albumin) | 胎牛血清蛋白 |
| (八)TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine) | 四甲基乙二胺 |
| (九)AP (Ammonium Persulfate) | 過硫酸銨 |
| (十)Coomassie blue | 考馬斯藍 |
| (十一)BPB (Bromophenol Blue) | 四溴苯酚磺 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| (十二)Methanol | 甲醇 |
| (十三)Bromphenol | 溴酚紅 |
| (十四)Mineral oil | 礦物油 |
| (十五)Dye Bio-Rad | 蛋白質染劑 |
| (十六)Glycerol | 甘油 |
| (十七)IAA (Iodoacetamide) | 碘乙醯胺 |
| (十八)2-D Quant Kit | 二維電泳蛋白試劑盒 |
| (十九)Tris-HCl | 氯化氫緩衝液 |
| (二十)Acrylamide | 聚丙烯醯胺 |
| (二一)DTT (Dithiothreito) | 二硫蘇糖醇 |
| (二二)Tris-NaCl | 氯化鈉緩衝液 |
| (二三) Urea | 尿素 |
| (二四)Glycine | 甘氨酸 |
| (二五)CHAPS | 兩性離子去污劑 |
| (二六)Agarose | 洋菜膠 |
| (二七)Lysis buffer | 細胞溶解緩衝液 |
| (二八)Glacial acetic acid | 冰醋酸 |

註：

| 藥品編號 | 製造商 | 藥品編號 | 製造商 |
|-------|----------|-------|---------|
| 二至十一 | SIGMA | 十九至二十 | MDBio |
| 十二至十三 | MERCK | 二一至二四 | AMRESCO |
| 十四至十五 | Bio-Rad | 二五 | USB |
| 十六至十八 | Amersham | 二六至二八 | Seakem |

伍、研究過程及方法

一、觀察兩種燈魚對溫度改變的適應能力

(一) 每 5 分鐘升溫 1°C

1. 在水族箱內建構一基礎生態系內含紅蓮燈魚及日光燈魚各 15 隻
2. 打開循流系統，以控溫棒加溫，每升高 1°C 停留 5 分鐘

(二) 每 10 分鐘升溫 1°C

1. 實驗步驟同上，步驟 2 改為每升溫 1°C 停留 10 分鐘

二、一維電泳分析蛋白質

(一) 取樣

1. 重複每 10 分鐘升溫 1°C 的實驗步驟
2. 在 21°C、30°C、37°C 分別取紅蓮燈魚和日光燈魚各兩隻，冰入冷凍庫中

(二) 稱重

1. 將每隻魚稱重，去除尾鰭，控制每隻魚約 0.25 克重
2. 將魚放進 2 ml 的微量離心管中並置於碎冰上

(三) 打破細胞

1. 加入魚重 5 倍體積(ml / g)的 RIPA buffer(註一)
2. 加入魚重的 6 倍體積(ml / g)的 1mM PMSF
3. 以組織均質機均質
4. 15000 rpm、4°C，離心 15 分鐘

註一：RIPA buffer

| | | | |
|------------------|-------|------|--------|
| Tris-HCl | 50 mM | NaCl | 150 mM |
| NP40 | 1% | EDTA | 1 mM |
| Deoxycholic acid | 0.5 % | SDS | 0.1 % |

註二：所有步驟皆在冰上進行

(四) 蛋白質定量

1. 製作標準曲線

| | | | | | | | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 空白組 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| BSA (g/ml) | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 |
| DdH ₂ O (μl) | 800 | 796 | 792 | 788 | 784 | 780 | 776 |
| Dye(Bio-Rad) (μl) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |

2. 取離心後的蛋白質上清液 2μl + 二次水 8μl 在震盪器上搖盪數秒

3. 取 2. 的混和液 5 μl + 水 795 μl + Dye(Bio-Rad Protein Assay) 200 μl，放在震盪器上搖盪數秒，靜置 7 分鐘

4. 以分光光度計(波長 595nm)測吸光值，換算為蛋白質濃度(單位：μg / μl)

(五) 電泳

1. 配膠

(1) 下層膠成分

| | | | |
|------------------------------|---------|---------|--------|
| ddH ₂ O | 1900 μl | 10% SDS | 50 μl |
| 30% Acrylamide-bisacrylamide | 1700 μl | 10% AP | 500 μl |
| 1.5M Tris (pH 8.8) | 1300 μl | TEMED | 2 μl |

(2) 上層膠成分

| | | | |
|------------------------------|---------|---------|-------|
| ddH ₂ O | 1030 μl | 10% SDS | 20 μl |
| 30% Acrylamide-bisacrylamide | 250 μl | 10% AP | 10 μl |
| 1.5M Tris (pH 6.8) | 500 μl | TEMED | 3 μl |

(3) 注入下層膠待膠凝後，加入上層膠並插入樣品齒模槽，凝固後將齒模槽取出，並以清水沖洗槽內氣泡

2. 電泳分析

(1) 將含有蛋白質的上清液與 sample buffer(註三)以體積 3 : 1 混合

(2) 加熱 10 分鐘後離心

(3) 將膠片裝備置於電泳槽內，倒入緩衝液，並注入樣品，控制每個齒模槽內的蛋白量約 25 μg，以 120V 90 分鐘做電泳分析

(5)電泳結束後，將膠體取出染色（10%酒精、5%醋酸、0.5% Coomassie Blue）

(6)10 分鐘後褪染（10%glacial acetic acid，25%methanol）並乾膠

註三：4 倍 sample buffer 配方

| | | | |
|----------|--------|--------------------|-------|
| Tris-6.8 | 5 ml | glycerol | 5 ml |
| DTT | 0.48 g | ddH ₂ O | 30 ml |
| SDS | 10 ml | bromphenol blue | 小於一平匙 |

三、二維電泳分析蛋白質

（一）取樣

1.重複每 10 分鐘升溫 1°C的實驗步驟

2.在 21°C、30°C 分別取紅蓮燈魚及日光燈魚各一隻，冰入冷凍庫中

（二）打破細胞

1.將每隻魚秤重，去除尾鰭，控制每隻魚約 0.13 克重

2.加入 Glycine 1ml 去除雜質，以 16000 rpm 離心 10 秒後去除上清液，重複兩次

3.加入 lysis buffer（註四），等待 30 秒

4.以組織均質機均質

5. 14000 rpm 4°C 離心 20 分鐘

註四：lysis buffer

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| 8-9M Urea | 4.8-5.8g / 10ml |
| 1-4%CHAPS | 100-400 mg /10ml |
| 15-100mM DTT (Dithiothreitol) | 23-153 mg /10ml |
| 0.5-2%(w/v) IPG Buffer | 50-200 μ l /10ml |
| 0.002%BPB (Bromophrnpl Blue) | 適量 |

（三）蛋白質定量

1.製作標準曲線

| | | | | | | |
|--------------------|-----|----|----|----|----|------|
| | 空白組 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| BSA (2mg/ μ l) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 l |
| 蛋白質量 (mg/ μ l) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |

2.取樣品液 10 μ l 於離心管中，加入 500 μ l precipitant buffer（沉澱劑）與 500 μ l co-precipitant buffer 震盪，靜置 3 分鐘

3.以 10000rpm 離心 5 分鐘，移除上清液

4.加入 100 μ l Copper solution 震盪後，再加入 400 μ l 二次水，將沉澱完全溶解

5.加入 1ml working color reagent (color reagent A : color reagent B=1 : 100) 靜置 15 分鐘後，
以分光光度計(波長 480nm)測吸光值，換算為蛋白質濃度(單位： μ g / μ l)

(三) 膠體的復水(Rehydration)

1.取 125 μ l 的樣品液均勻的加入復水槽中

2.將膠體(pH 4- 7，7cm IPG—Immobilized pH gradient)放入復水槽中，pH = 4 的一端為正極，以適當的礦物油蓋過膠體

3.將復水槽放入等電點聚焦電泳槽的置膠平台上，在 20 $^{\circ}$ C 下 12 小時，以電壓 50V 電流 50 μ A 幫助緩衝液進入膠體中

(四) 等電點電泳(IEF)

1.跑 IEF 的條件：

| | | | |
|-----------|-------|----------|----------------------|
| 步驟 1 | 500V | 0.5hr | Rapid(step and hold) |
| 步驟 2 | 1000V | 0.5hr | Rapid(step and hold) |
| 步驟 3 | 4000V | 1hr | Linear(gradient) |
| 步驟 4 (註五) | 4000V | 12000Vhr | Rapid(step and hold) |

註五：Vhr 代表電壓和時間的乘積

(五) 膠體的平衡

1.將膠體從復水槽中取出，用二次水洗去礦物油

2.將膠體膠面朝上放入平衡膠槽中，先後加入 equilibration buffer I 2ml (註六) 及 equilibration buffer II 2 ml (註七)，分別在平面震盪器上搖動 15 分鐘

| 註六：equilibration buffer I | | 註七：equilibration buffer II | |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 6M Urea | 3.6g / 10ml | 6M Urea | 3.6g / 10ml |
| 2% SDS | 0.2g / 10ml | 2% SDS | 0.2g / 10ml |
| 50mM Tris-HCl pH 8.8 | 1.5M Tris-HCl 355 μ l / 10ml | 50mM Tris-HCl pH 8.8 | 1.5M Tris-HCl 355 μ l / 10ml |
| 30% Glycerol | 87% glycerol 3.45ml / 10ml | 30% Glycerol | 87% glycerol 3.45ml / 10ml |
| 1% DTT | 100mg / 10ml | 135mM IAA | 250mg / 10ml |

(六) 一維等電點電泳

1. 做 10% 的膠(註八)，將平衡完的膠體放到膠上，marker 滴在小片濾紙上，烘乾後放到膠體 pH=7 端旁
2. 加入 0.5% Agarose，凝固後加入 electrophoresis buffer 以 110V 2 小時做電泳分析，電泳結束後染色 10 分鐘，隨後褪染

註八：10%膠的配方

| | |
|--------------------|-------------|
| Lower Tris | 1.5 ml |
| Acrylamide (40%) | 1.5 ml |
| ddH ₂ O | 3 ml |
| 10%APS | 42 μ l |
| TEMED | 4.2 μ l |

四、MALDI-TOF 飛行式質譜儀分析蛋白質

(一) 取蛋白質點及分析

1. 以 18 cm 二維電泳膠體展開 30°C 紅蓮燈魚的蛋白質
2. 將 tip 剪成適當大小，壓入膠體，取下含有欲確認之蛋白質點的膠體，並放入裝有二次水的微量離心管中
3. 以 MALDI-TOF 分析蛋白質胺基酸序列
4. 透過 NCBI 資料庫比對蛋白質

陸、研究結果

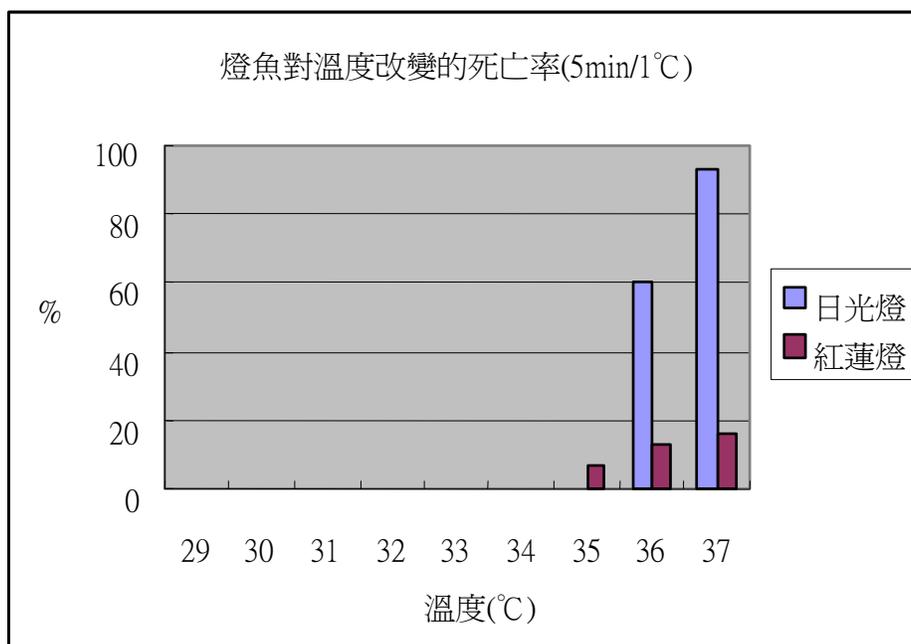
一、紅蓮燈魚與日光燈魚對溫度變化的適應能力

根據【表一】可發現有一隻紅蓮燈魚在 35°C 時便翻肚（我們對於翻肚與死亡的定義不同：實驗中有些魚在較高溫的環境中會浮到水面上一動也不動且翻肚，但再將這些魚放進適合他們生活溫度的水中，過一陣子後，魚可能會甦醒過來開始游動），在 36°C 時第一隻日光燈魚翻肚，到 37°C 時總共有 3 隻紅蓮燈、13 隻日光燈魚死亡。

根據【表三】看出紅蓮燈魚及日光燈魚在 36°C 時始出現死亡的個體，到 37°C 時，紅蓮燈魚總共有 3 隻死亡，日光燈魚則全數死亡。【表二】及【表四】為實驗過程中的行為紀錄。

【表一】5 分鐘/1°C，死亡數為累加

| 溫度 (°C) | 紅蓮燈魚死亡數 (隻) | 日光燈魚死亡數 (隻) |
|---------|-------------|-------------|
| 29 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 0 |
| 31 | 0 | 0 |
| 32 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 0 |
| 34 | 0 | 0 |
| 35 | 1 | 0 |
| 36 | 1 | 5 |
| 37 | 3 | 13 |

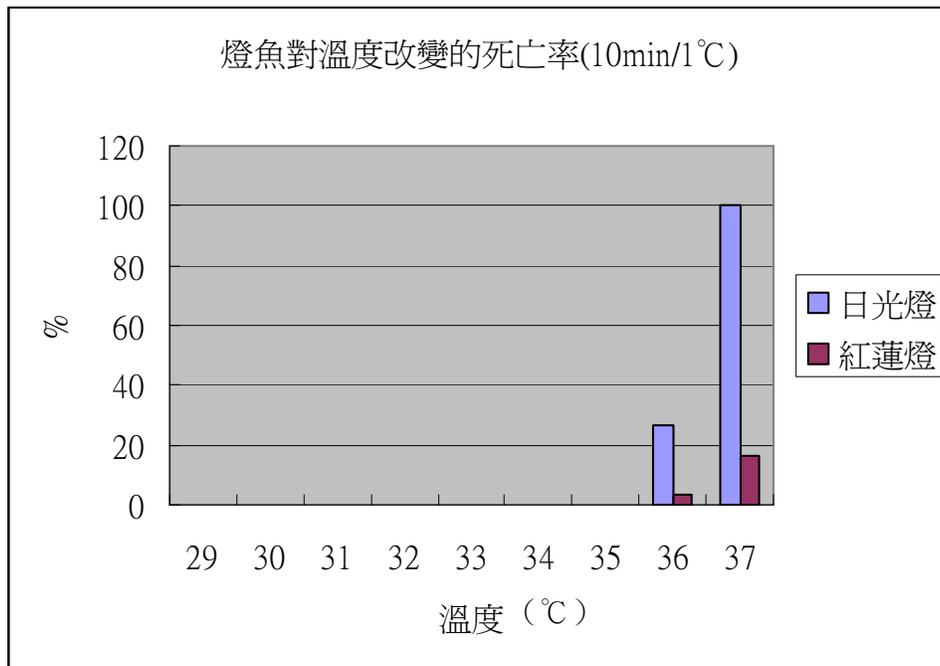


【表二】觀察紀錄：5分鐘/1°C，翻肚數目為累加

| 溫度 | 時間 | 紅蓮燈魚與日光燈魚的特殊行爲 |
|------|-------|-------------------------|
| 32°C | 4分50秒 | 魚群往上浮 |
| 33°C | 0分10秒 | 魚群開始焦躁 |
| | 2分20秒 | 魚群越游越高 |
| 34°C | 4分30秒 | 1隻日光燈魚往上衝，又掉下去；魚群游動速度加快 |
| 35°C | 1分30秒 | 魚群往玻璃衝 |
| | 2分00秒 | 魚群往循流器下游 |
| | 4分20秒 | 1隻紅蓮燈魚開始鑽沙子 |
| 37°C | 1分00秒 | 1隻日光燈魚及2隻紅蓮燈魚翻肚 |
| | 1分30秒 | 3隻日光燈魚及3隻紅蓮燈魚翻肚 |
| | 2分50秒 | 7隻日光燈魚翻肚 |
| | 4分30秒 | 13隻日光燈魚及3隻紅蓮燈魚翻肚 |

【表三】 10分鐘/1℃，死亡數為累加

| 溫度 (°C) | 紅蓮燈魚死亡數 (隻) | 日光燈魚死亡數 (隻) |
|---------|-------------|-------------|
| 29 | 0 | 0 |
| 30 | 0 | 0 |
| 31 | 0 | 0 |
| 32 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 0 |
| 34 | 0 | 0 |
| 35 | 0 | 0 |
| 36 | 1 | 4 |
| 37 | 3 | 15 |



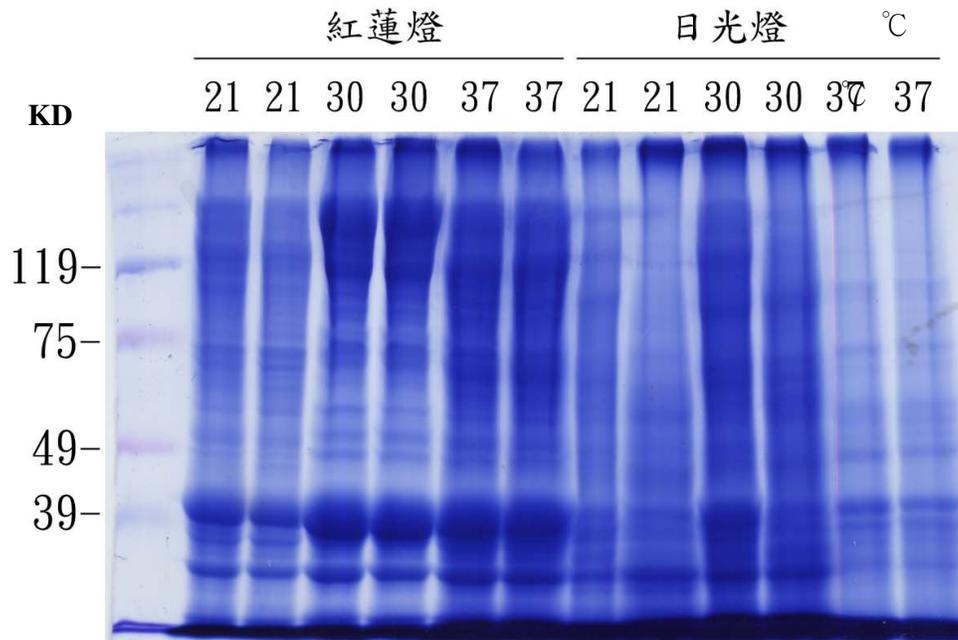
【表四】觀察紀錄：10分鐘/1℃，翻肚數目為累加

| 溫度 | 時間 | 紅蓮燈魚與日光燈魚的特殊行爲 |
|-----|-------|------------------------------|
| 34℃ | 2分30秒 | 魚群游動速度加快，衝向玻璃壁 |
| | 3分04秒 | 紅蓮燈魚開始挖沙子 |
| 35℃ | 5分00秒 | 游動速度更快，魚擠到角落及水草邊，日光燈魚往水面衝又落下 |
| | 9分00秒 | 1隻日光燈魚瀕臨死亡，嘴巴迅速張闔 |
| 36℃ | 1分00秒 | 2隻日光燈魚翻到水面上掙扎 |
| | 3分10秒 | 2隻日光燈魚卡在循環器與魚缸壁之間的縫隙 |
| | 8分10秒 | 7隻日光燈魚翻肚 |
| 37℃ | 1分30秒 | 紅蓮燈魚不斷挖沙子 |
| | 3分00秒 | 循環器與水草間有7隻紅蓮燈魚及4隻日光燈魚卡住 |
| | 3分20秒 | 紅蓮燈魚的頭開始變黑，更加劇烈地往上游動 |
| | 5分10秒 | 14隻日光燈魚翻肚 |
| | 7分00秒 | 日光燈魚全數翻肚 |
| | 9分00秒 | 紅蓮燈魚3隻翻肚 |

二、一維電泳

(一) 紅蓮燈魚和日光燈魚的蛋白質表現

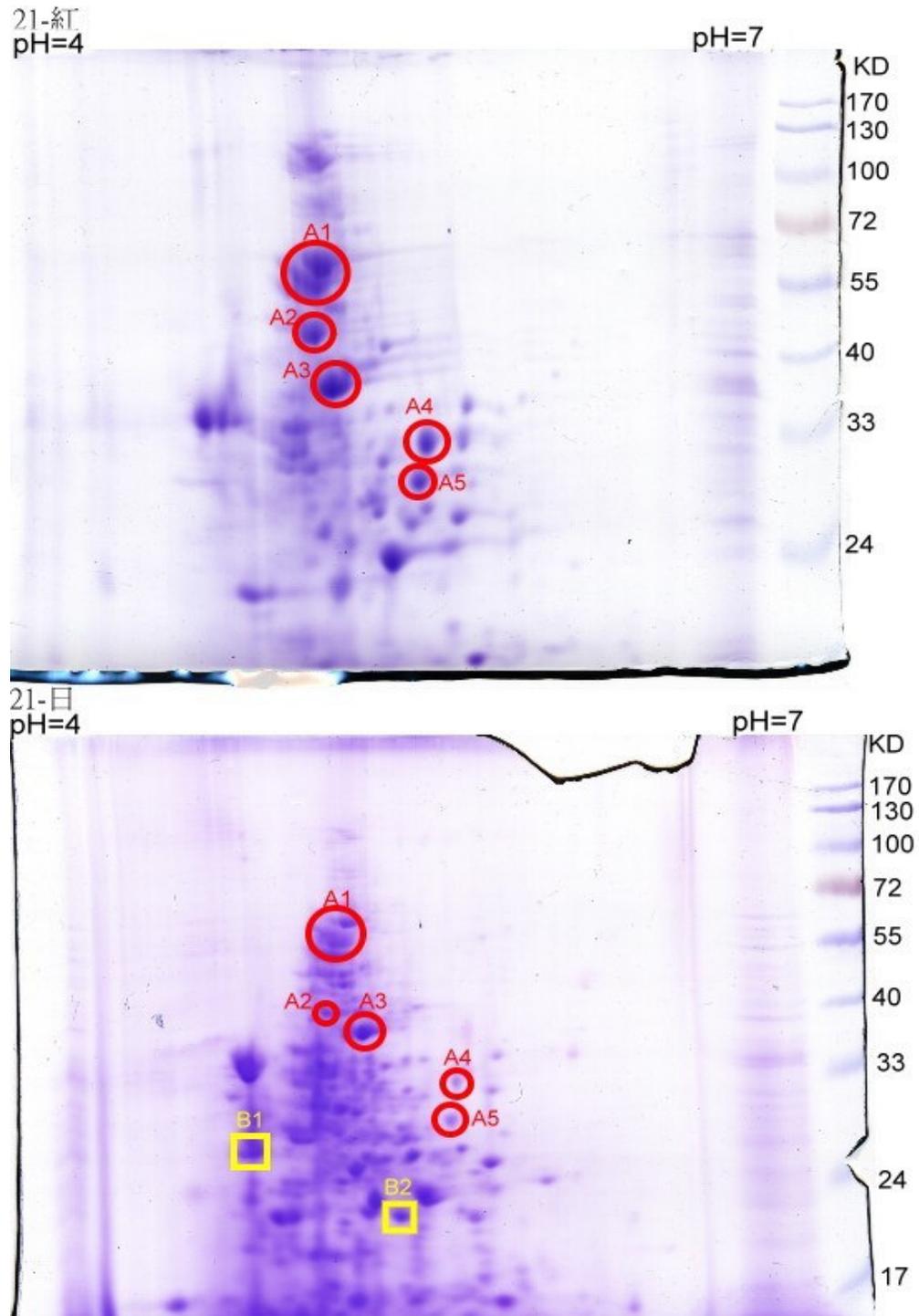
【圖三】為紅蓮魚及日光燈魚在 21°C、30°C、37°C 的蛋白質表現，在 39KD 及 119KD 處，紅蓮燈魚的蛋白量隨溫度上升而增加，日光燈魚則沒有明顯改變。



【圖三】紅蓮燈魚及日光燈魚在 21°C、30°C、37°C 的蛋白質表現

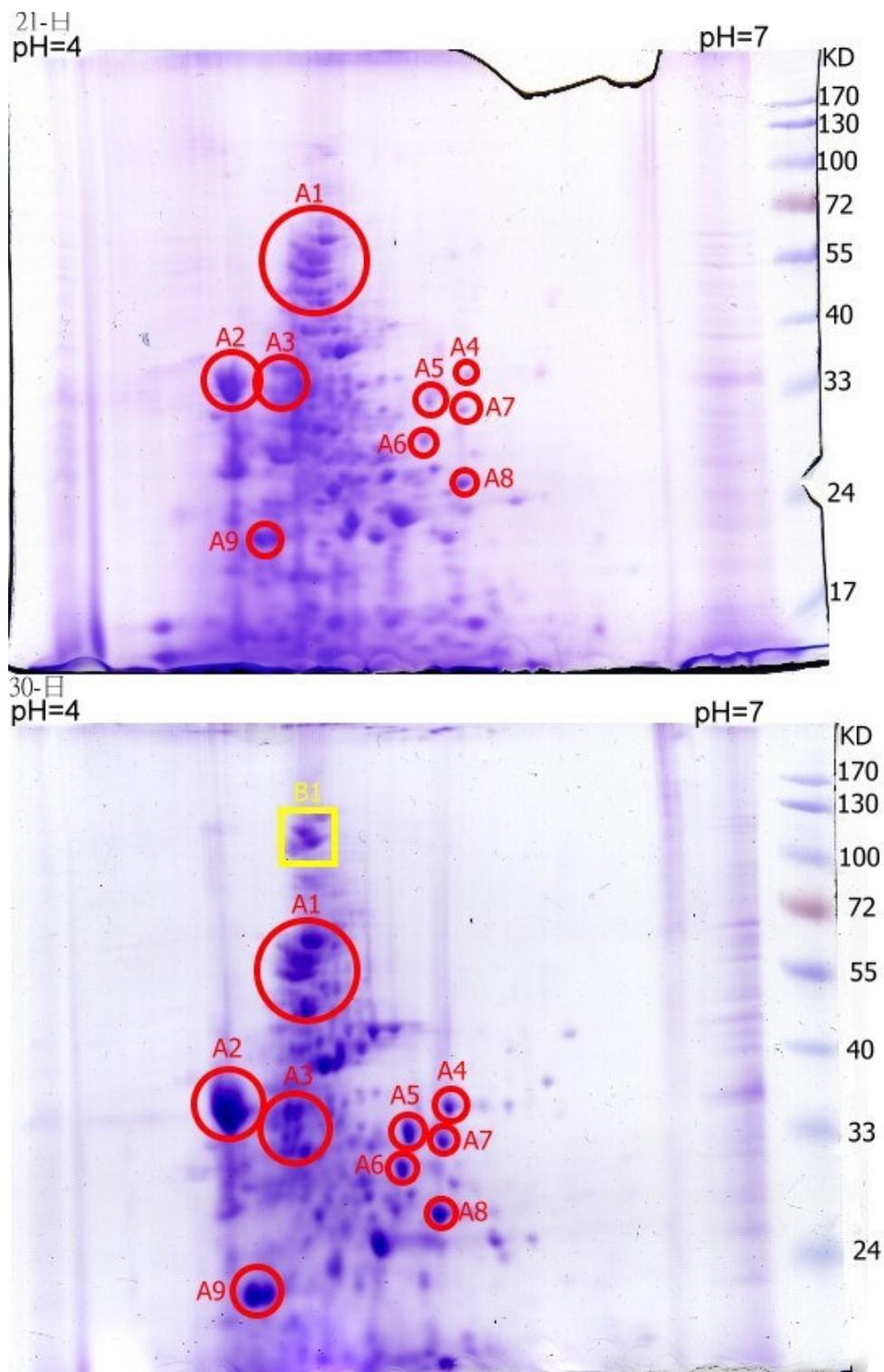
三、二維電泳

(一)A1 ~ A5 的區域兩種燈魚皆有相同的蛋白質表現，但紅蓮燈魚所呈現的蛋白量較多。B1 ~ B2 的區域內日光燈魚表現出紅蓮燈魚所沒有蛋白質



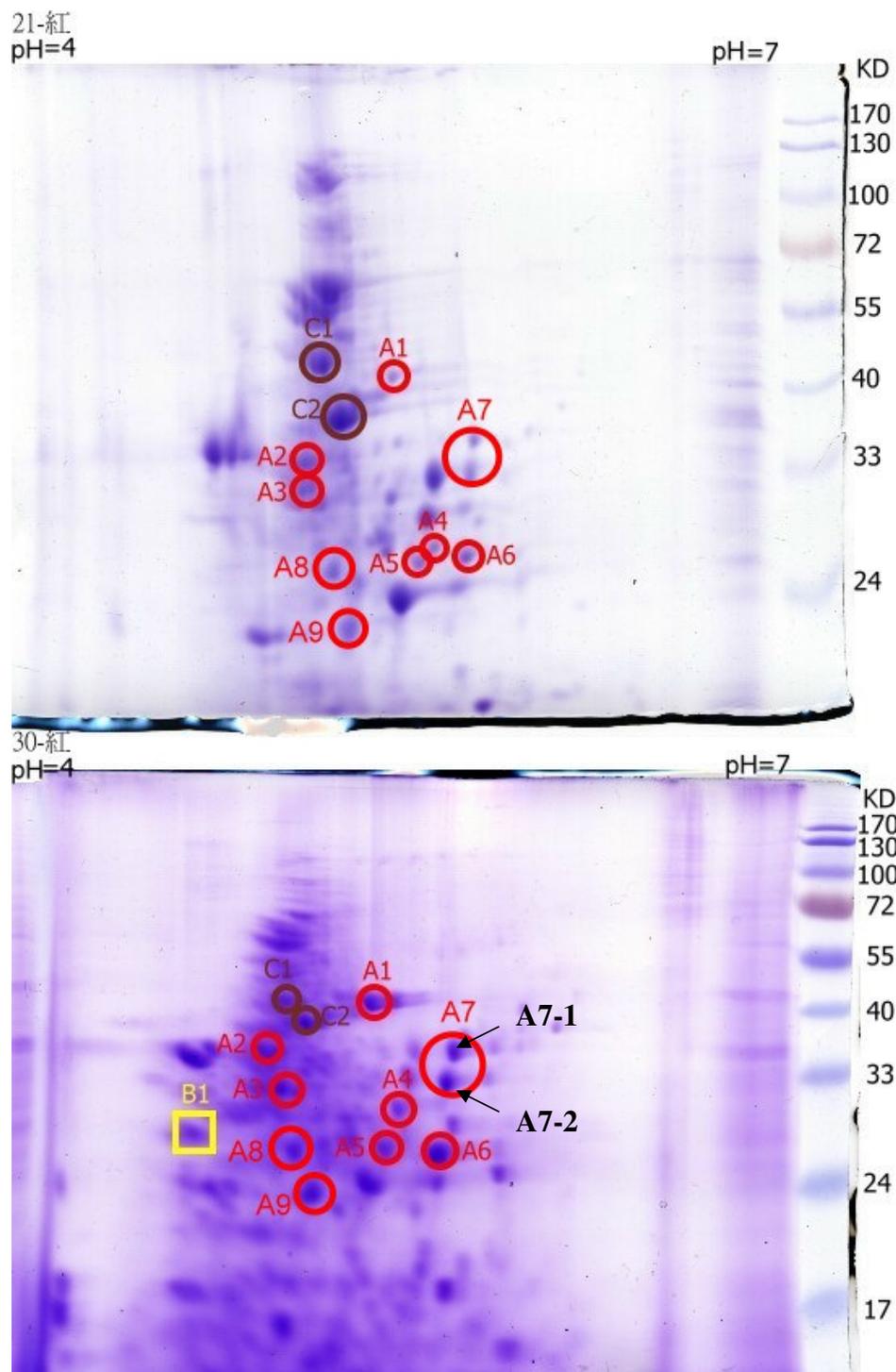
【圖四】 21°C紅蓮燈魚和 21°C日光燈魚的比較圖。

(二)A1 ~ A9 區域有相同的蛋白質表現，但 30°C 日光燈魚所呈現的蛋白量較多。B1 區域內日光燈魚在 30°C 時表現出 21°C 時所沒有蛋白質。



【圖六】21°C 日光燈魚和 30°C 日光燈魚的比較圖。

(三)A1 ~ A6 區域有相同的蛋白質表現，但 30°C 紅蓮燈魚所呈現的蛋白量較多。B1 區域內紅蓮燈魚在 30°C 表現出 21°C 所沒有蛋白質。C1~C2 區域內有相同的蛋白質表現，但 21°C 時呈現的蛋白量較多

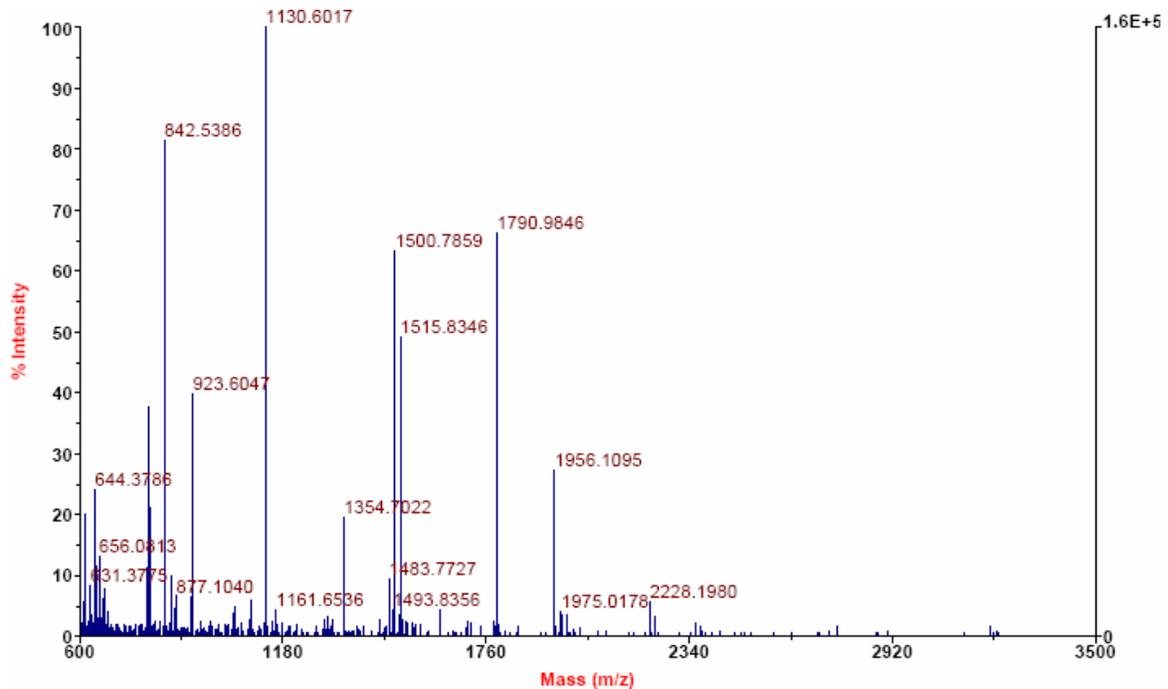


【圖五】21°C 紅蓮燈魚和 30°C 紅蓮燈魚比較圖。

三、MALDI-TOF 分析

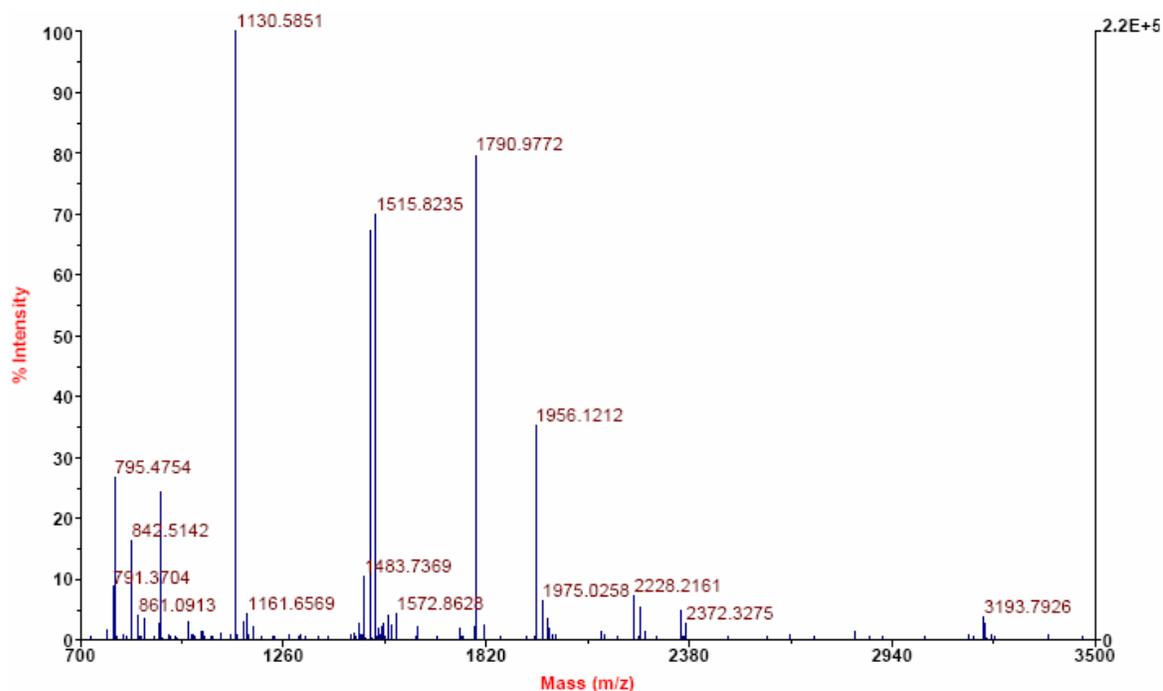
我們選取【圖五】中 30°C 紅蓮燈魚 A1~A9 共 10 個蛋白質點，用 MALDI-TOF 分析後，到 NCBI 資料庫比對被誘導出的蛋白質為何。所分析的 10 個蛋白質點中，A6 及 A7-2 為骨骼肌肌動蛋白（Actin, alpha, skeletal muscle），其餘皆為心肌肌動蛋白（Actin, alpha, cardiac muscle）由於蛋白質相似度高，以下選取 A5、A7-1、A7-2 為代表。

(一) A5 Actin, alpha, cardiac muscle



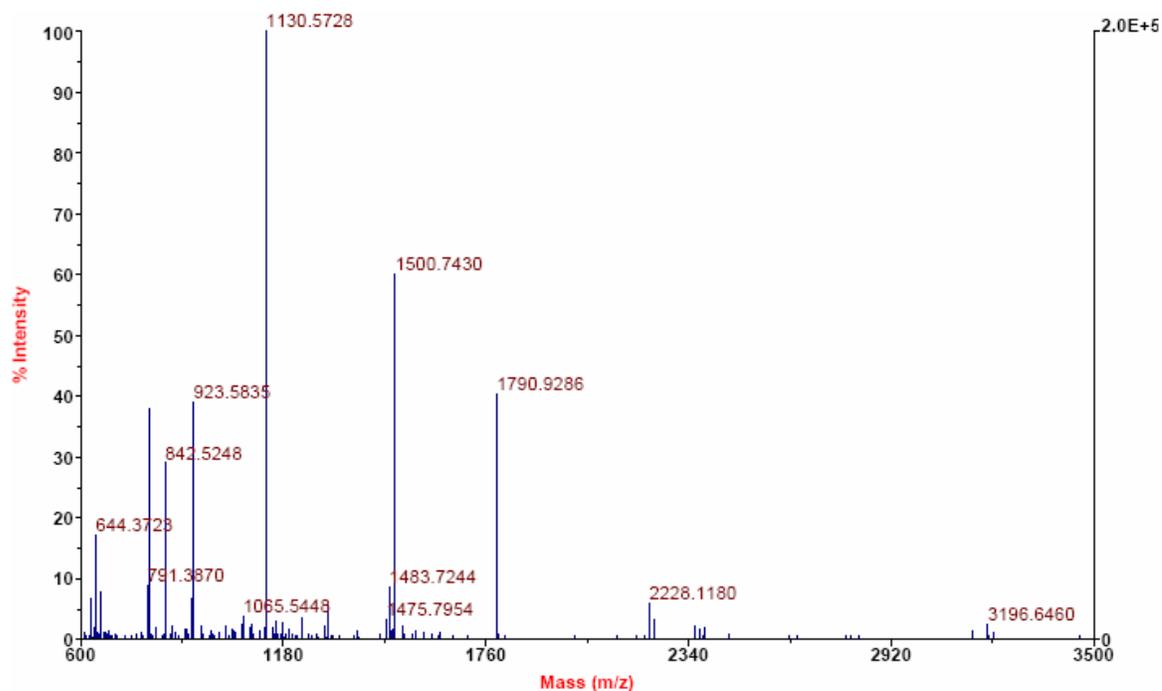
```
1  MCDDDETTAL VCDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGVMVGMG
51  QKDSYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGIITN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP
101 EEHPTLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQ A VLSLYASGRT
151 TGIVLDSDGD VSHNVPIYEG YALPHAIMRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY
201 SFVTTAEREI VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLGK SYELPDGQVI
251 TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETA YNSIMKCDID IRKDLYANNV
301 LSGGTTMYPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS VWIGGSILAS
351 PSTFQQMWIT KQEYDEAGPS IVHRKCF
```

(二) A7-1 Actin, alpha 1, skeletal muscle



1 MCDDEETTAL VCDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGVVMVGMG
51 QKDSYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGIITN WDDMEK**IWHH TFYNELRVAP**
101 **EEHPTLLTEA PLNPK**ANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQV VLSLYASGRT
151 TGIVLDAGDG VTHNVPVYEG YALPHAIMRL DLAGR**DLTDY LMKILTERGY**
201 **SFVTTAEREI** VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLEK **SYELPDGQVI**
251 **TIGNER**FRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETA YNSIMK**CDID IRKDLYANNV**
301 **LSGGTTMYPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS** VWIGGSILAS
351 LSTFQQMWIT K**QEYDEAGPS IVHRKCF**

(三)A7-2 Actin, alpha, cardiac muscle



1 MCDDDETTAL VCDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGMVGMG
51 QKDSYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGIITN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP
101 EEHPTLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQV VLSLYASGRT
151 TGIVLDSDGD VSHNVPIYEG YALPHAIMRL **DLAGRDLTDY LMKILTERGY**
201 **SFVTTAEREI** VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLGK **SYELPDGQVI**
251 **TIGNERFRCP** ETLFQPSFIG MESAGIHETA YNSIMKCDID IRK**DLYANNV**
301 **LSGGTTMYPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS** VWIGGSILAS
351 PSTFQQMWIT K**QEYDEAGPS IVHRKCF**

柒、討論

一、紅蓮燈魚和日光燈魚對於溫度變化的適應能力

生物新陳代謝多賴酵素催化，而酵素活性受溫度影響甚大。在酵素尚未變性前，細胞的呼吸速率隨溫度上升成正比；我們在實驗中可發現：兩種魚在溫度升高的過程中，鰓擺動的頻率逐漸增加，由此我們推測：**「隨著水溫升高，魚類的需氧量也會增加」**

體溫調節包括生理上與行為上的調整，我們主要著眼於行為上的觀察。為避免因溫度升高造成水中溶氧量減少，在實驗中以循流系統持續不斷地將空氣打入水中。

在溫度提高 2~3°C 後，可發現紅蓮燈魚不斷往沙子裡鑽，這是因為我們將加熱器放在較靠近水面處，而造成水底沙子溫度較水面低，紅蓮燈魚游向溫度低的地方來保護自己，日光燈則沒有此行為，因此我們認為紅蓮燈的行為適應較日光燈魚佳。

在溫度升高至 36°C 時，日光燈魚死亡數目逐漸增加。至 37°C 時，日光燈魚幾乎全數死亡，紅蓮燈魚死亡數目約三隻，由此可看出，紅蓮燈魚對於溫度提高的適應能力較日光燈魚強。此外，由升高 1°C 停留 5 分鐘及 10 分鐘的兩個實驗結果，我們發現：**「加熱時間的長短並未對燈魚的適應能力造成顯著差異」**

二、一維電泳

蛋白質直接影響魚類的生理，所以我們透過蛋白質探討兩種燈魚在溫度適應上差異。

由於這兩種魚的體型小，環境變異對其而言所受的刺激相對較大，可能須在短的時間內適應環境。一般水族箱用的加熱器功率為 300 瓦，可使一尺的水族箱在 3 分鐘內升溫 1°C，所以我們選取升高 1°C 停留 5 分鐘及升高 1°C 停留 10 分鐘讓魚類適應。

我們所取樣的溫度是 21°C、30°C、37°C，21°C 為台灣地區秋冬時的平均水溫，37°C 是日光燈魚全數死亡的溫度，30°C 則是 21°C 及 37°C 的中間值。我們以這些溫度下所取得的蛋白質做分析。

由【圖三】可清楚看見在分子量 39KD 及 119KD 處，紅蓮燈魚的蛋白量在 30°C 時明顯增加了許多，不僅顏色變深且色帶也變粗；在 37°C 也有增加，但沒有像 21°C 與 30°C 之間差異那麼大，因此我們推斷：保護紅蓮燈魚的蛋白質會在 30°C 左右誘導出。在 49KD 到

75KD 之間，紅蓮燈魚有明顯的蛋白質色帶，日光燈魚則沒有，可推知紅蓮燈魚的蛋白質種類較日光燈魚多。

三、二維電泳

由一維電泳的蛋白質分析中，燈魚在 21°C 和 30°C 時的蛋白量有較顯著變化，因此我們推斷：當外界溫度從 21°C 開始升高至 30°C 的期間內，燈魚已感受到了溫度變化，並啟動保護機制。因此我們取了 21°C 和 30°C 兩種溫度下的燈魚，進行二維電泳分析。

在二維電泳分析中，蛋白質的變化主要都集中在 24 至 72KD 以及 pH5 至 6 之間，可以看出：紅蓮燈魚在 30°C 時部份蛋白質的含量較 21°C 多，且誘導出在 24KD 與 40KD 之間的蛋白質。日光燈魚的蛋白量也隨溫度上升而增加，亦產生 21°C 所沒有的蛋白質，但改變量沒有紅蓮燈魚顯著；這顯示外界環境溫度的變化，對兩種燈魚造成了影響。因此我們推斷：當溫度升高時，燈魚會誘導蛋白保護個體；然而，因日光燈魚啟動保護機制的速度較慢，高溫對個體造成傷害。因此，日光燈的死亡率較高，相反的，紅蓮燈魚則適時的誘發保護蛋白而降低了死亡率。

根據文獻得知：生物體在正常的生理狀態下，若受到熱、重金屬、藥物等環境逆境下會合成特定的蛋白質，均統稱為熱休克蛋白（Heat Shock Protein，HSP）。HSP 可保護細胞抵抗壓力，一旦細胞面臨緊急狀態或病原感染等壓力時，HSP 便會大量表現，阻止細胞內變性蛋白的累積並修補損壞蛋白，增加細胞抵抗力以保護細胞。因此我們推論：高溫逆境時誘發出的保護性蛋白可能是 HSP40。

四、MALDI-TOF 蛋白質分析

在質譜儀分析中，我們發現部分蛋白質點如 A7-2 之分子量和二維電泳分析的結果中的分子量不符，在二維電泳的結果中，我們將 Marker 的分子量取 LOG 值後求出線性函數，並求出 pI 值的線性函數，代入蛋白質點位置，求出 A7-2 分子量為 24827，pI 值為 5.4。而質譜儀的結果中，其分子量為 41860，pI 值為 5.3。我們進一步發現：這些蛋白質點對應到的序列集中在前段或後段，因此我們推測：蛋白質在我們處理的過程中被截斷了，分子量在二維電泳分析時降低。

在燈魚對溫度變化的實驗中，觀察到燈魚鰓擺動的頻率隨溫度升高而更加頻繁，這是因為細胞需氧量增加而必須加快其呼吸及代謝速率，因此心臟的跳動頻率增加。我們分析 30°C 紅蓮燈魚的 10 個蛋白質點中，除了 A5 及 A7-1 骨骼肌肌動蛋白，其他皆為心肌肌動蛋白；並非原先推測的 HSP40。

成熟的心肌細胞含有大量的肌原纖維，這些肌原纖維是肌細胞收縮時產生力量的主要來源。肌原纖維是由許多肌小節連接而成，組成肌小節的構造單位為肌絲—包括肌動蛋白（Actin）、肌凝蛋白（Myosin）。而由質譜儀分析發現：紅蓮燈魚在溫度升高後，心肌肌動蛋白被大量誘導出，以增加心臟跳動的頻率，將充足的血液運送至全身，維持細胞運作。

除了心肌的運作外，骨骼肌的收縮及舒張也調節血液的流動。骨骼肌收縮時，週期性地對血管進行擠壓使血液流動速度加快；舒張時，則使血管擴張，調節血液流量，進而散熱維持體內溫度平衡。所以骨骼肌肌動蛋白的增加可使骨骼肌運作正常，保護細胞避免熱及缺氧的危害。

捌、結論

紅蓮燈魚在高溫下比日光燈魚有更好的耐受力，常溫下紅蓮燈魚的某些蛋白量亦較日光燈魚多。溫度升高後，紅蓮燈魚會立即誘導蛋白質產生保護功能，阻止熱對細胞造成的傷害；然而，日光燈魚並未立即誘導出蛋白質，導致細胞死亡，因此日光燈魚在高溫下的死亡率較紅蓮燈魚高。由質譜儀分析及資料庫比對後，我發現這些被誘導出的蛋白質為心肌及骨骼肌的肌動蛋白，他們維持了紅蓮燈魚正常的生理運作，避免高溫所造成的死亡。

玖、參考資料

- 一、Kumar M., and Mitra D. (2005) Heat shock protein 40 is necessary for human immunodeficiency virus-1 Nef-mediated enhancement of viral gene expression and replication. J Biol. Chem. 280(48):40041-50.
- 二、中山醫學大學醫學研究所碩士論文 洪建仁 Hala 細胞與小鼠腦中精胺酸甲基接受蛋白之蛋白質體研究
- 三、Neil A.Campbell 著 李家維等人譯 生物學 第四版 台灣 偉明
p.923- p.937 民 88
- 四、李建武等合編 生物化學實驗原理和方法 台灣 藝軒圖書
出版 p.155- p.163 民 88
- 五、楊冠政主編 高中基礎生物（全） 第三版 台灣 龍騰文化
p.122- p.127 民 89
- 六、鄭湧涇主編 高中生命科學（上冊）第四版 台灣 康熙圖書
p.8 民 93
- 七、台灣魚類資料庫
<http://fishdb.sinica.edu.tw/>
- 八、莊榮輝網站
<http://juang.bst.ntu.edu.tw/>
- 九、輔仁大學理工學院-蛋白質教學網站
<http://brc.se.fju.edu.tw/protein/index.htm>
- 十、科學人雜誌網站
<http://www.sciam.com.tw/>

評 語

040704 探討燈科魚對溫度變化的適應能力

1. 能選擇適當材料設計實驗。
2. 研究中發現新穎之蛋白質變化。
3. 建議深入探討相關蛋白質的明確生物功能。
4. 建議使用 Cyt3 及 Cyt5 標蛋白質再分析兩種魚類對耐溫之
差異。