中華民國第 57 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學學科

第一名

052004

「孑」戰關鍵

—台灣淡水渦蟲捕食蚊幼蟲機制及其黏液探討

學校名稱：新北市私立竹林高級中學

作者：	指導老師：
高二　王琳雅	顏嘉怡

關鍵詞：渦蟲、蚊幼蟲、黏液蛋白

得獎感言

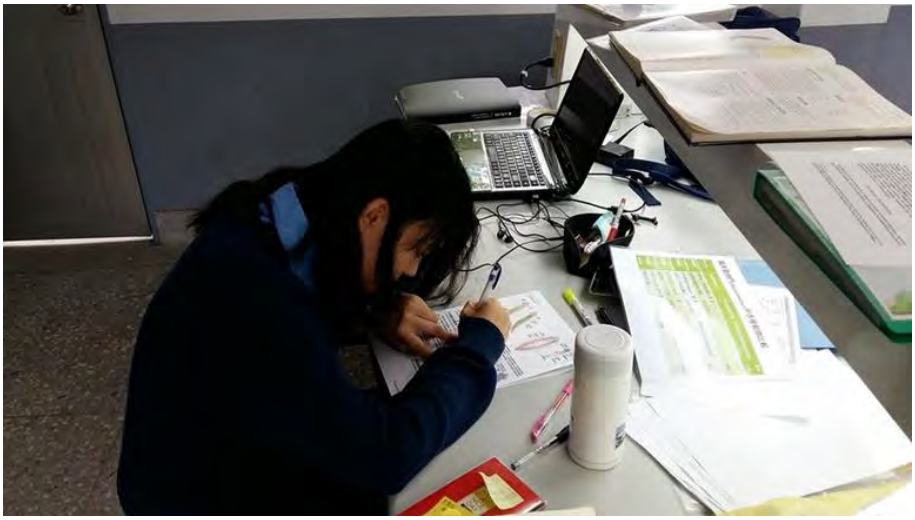
成功，是留給準備好的人，也是留給不怕累的人

今年是我參加全國科展第二年，但是這已經是我做科學專題研究第四年了。一切因緣都從國一開始，那時我的國中生物老師就在課堂上跟我們分享他以前做科展的過程和心得，當我一聽到這個活動就深深的著迷，迫不及待的想要嘗試，因此我從國二開始就進入了所謂的「科展坑」，那時我對很多事情都還懵懵懂懂的，不會論文寫作、不會重複實驗、甚至連最基本的統計軟體都不會使用，一切都得從頭開始學習，從只有在校內比賽科展，到後來參加縣市及全國科展。真的是一步一腳印才能有今天的成績，沒有偷吃步，全部都是用血汗堆積出來的。

在這次比賽中，最讓我印象深刻的是在第一天評審時，評審委員的問的問題。那時在他們看完我的實驗記錄本後，一位評委就問我：「你是不是都在翹課啊？實驗做這麼多要花很多時間吧？」「是阿，的確翹了不少課.....」我回答，之後所有評委跟我都不約而同地笑了，大家都很能體會那種廢寢忘食做實驗，只為了把手中的謎題解開的堅持。

在這次比賽中，遇到很多跟我一樣願意為了自己的興趣和好奇心，犧牲讀書甚至玩樂時間的「瘋子」，這讓我更確信自己沒有選錯道路，一切的努力都很值得。參加科展讓我在求學生涯中，有了和別人不一樣的經驗和成就，雖然辛苦，而且又面臨高三的升學壓力，常常躲起來哭泣，也很想要放棄，但是「如果能堅持下去，一切就會是你的。」，這也是我想要送給未來想要做科展同學的一句話，不要怕辛苦，成功，是留給準備好的人，也是留給不怕累的人，加油！

到大學實驗室做蛋白質電泳



閱讀並整理相關文獻

在這次全國科展比賽會場交到不少朋友

摘要

本研究探討台灣淡水渦蟲(*Girardia tigrina*)捕食蚊幼蟲機制、渦蟲功能黏液與成分分析，觀察得渦蟲會先以體外物理消化(以咽運動產生的負壓將食塊吸入體內)蚊幼蟲，再行化學分解，且偏好從蚊幼蟲腹部末端及肛攻擊；渦蟲爬行時分泌的黏液能將蚊幼蟲纏住，渦蟲黏液以染劑染色得知具多醣及蛋白質；渦蟲在有無蚊幼蟲環境不影響其黏液蛋白分泌量，至於黏液蛋白種類是否不同，需再證明；以 SDS-PAGE 分析得渦蟲黏液有 8 種以上蛋白質，主要為 15 kDa，經初步定序得渦蟲主要黏液蛋白可能為 titin 等。未來將以高速離心濃縮渦蟲黏液，提高樣本濃度提供定序使用，並進一步了解渦蟲黏液具酵素或抗菌等其他功能，也會進階評估黏液是否有應用於防治病媒蚊的可行性。

壹、研究動機

淡水渦蟲常被作為研究再生作用的實驗動物，在國中一年級下學期自然與生活科技課本中，也描述淡水渦蟲為一種行斷裂生殖的物種，並且是以動物屍體為食，因此淡水渦蟲也普遍被認為是一種腐食者。在上一屆全國科展時，我們團隊發現淡水渦蟲會捕食病媒蚊幼蟲，經評估得知台灣本土淡水渦蟲具有控制病媒蚊族群的發展潛能；台灣淡水渦蟲可捕食所有齡期白線斑蚊幼蟲，亦可以捕食埃及斑蚊與家蚊的幼蟲，因此未來台灣淡水渦蟲除了應用於登革熱病媒蚊之生物防治具有潛能外，對於其他蚊媒傳染病的抑制亦可能有幫助(王與郭，2016)。今年將淡水渦蟲對蚊幼蟲進行捕食攻擊的特殊現象做較深入的探討，此外，在實驗過程中，發現了淡水渦蟲所分泌的黏液有限制蚊幼蟲活動的功能(圖 1)，因此針對淡水渦蟲的黏液在捕食中扮演的角色做深入的了解，並收集淡水渦蟲的黏液做染色及蛋白質定量與定序分析。

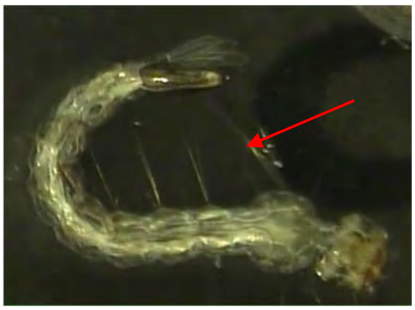


圖 1 渦蟲黏液黏住蚊幼蟲
紅色箭頭位置為渦蟲黏液，使用顯微錄影截圖。

貳、研究目的

一、 探討淡水渦蟲特殊捕食機制。

(一) 觀察淡水渦蟲捕食蚊幼蟲行為，並推測渦蟲消化食物方法及途徑。

(二) 探討淡水渦蟲攻擊蚊幼蟲部位偏好。

二、 了解淡水渦蟲黏液作用及成分分析。

(一) 探討淡水渦蟲黏液對蚊幼蟲的影響。

(二) 以簡易染色法了解淡水渦蟲黏液中可能含有的物質。

(三) 以 Bradford method 分析淡水渦蟲捕捉蚊幼蟲前後，黏液蛋白分泌量是否有差異。

(四) 利用 SDS-PAGE 及胺基酸定序，進階分析淡水渦蟲黏液蛋白。

參、研究設備及器材

一、 實驗動物

(一) 台灣本土淡水渦蟲：虎紋三角渦蟲(*Girardia tigrina*)(以下簡稱渦蟲)

1. 來源：台灣南部養蝦場。
2. 因不易以形態辨識鑑種，以基因分子標記分析確定渦蟲種類(王與郭，2016)。
3. 淡水渦蟲(圖 2、3)體細長扁平，長 5-15 mm；寬 1-4 mm。為淡水底棲生物，普遍生活於乾淨的溪流或養殖蝦子的水族箱中。渦蟲為負趨光性，行斷裂生殖。本實驗將渦蟲飼養於放有石頭的水族箱中，以外掛過濾器打氣，每天以冷凍蝦餵食一次。

圖 2 淡水渦蟲構造

圖 3 實驗使用之 *Girardia tigrina* 渦蟲

(二) 白線斑蚊(*Aedes albopictus*)

1. 由台大環衛所提供之白線斑蚊卵片孵出。將卵片放入缺氧水，均勻搖晃後，放入恆溫箱，將溫度設定在 30°C。待 1 齡幼蟲孵出後，以酵母粉餵食。
2. 白線斑蚊成蟲身體為黑色，腳上有白斑。雌蚊喜愛在乾淨且陰暗的水域產卵，如花瓶、廢輪胎等，一次產約 80-120 顆卵。斑蚊的成長歷程為卵→幼蟲(俗稱孑孓)→蛹→成蟲四個階段(圖 4)。在最適條件，從卵到成蟲約需一至兩週(疾管局，2015)。

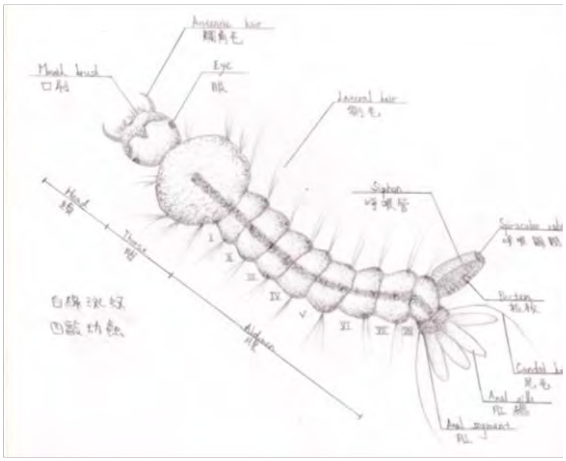


圖 4 白線斑蚊幼蟲(作者自行繪製)

(實驗動物的詳細介紹請看王與郭，2016)

二、 藥品、設備及器材

(一) 其他使用器材

名稱	備註
解剖顯微鏡	購自瑞光儀器
CCD 顯微數位攝影	
電子秤、碼表、量筒、酒精溫度計	
燒杯	購自瑞光儀器 容量：50 mL
培養皿(玻璃、塑膠)	購自 ExtraGene
玻片及蓋玻片	購自 DGS
曝氣水	靜置一天後之自來水
牙籤	使用前先滅菌

(二) 染色渦蟲黏液或白線斑蚊幼蟲用之染劑

染劑名稱	濃度	染色物質
Trypan Blue	0.4%	死細胞
Neutral Red	0.5%	活細胞
Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG250)	0.01%	蛋白質
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR250)	0.25%	蛋白質
Methylene Blue	1.5%	細胞核
Povidone-iodine	1%	細胞核、澱粉
Periodic Acid-Schiff	-	醣蛋白
Congo Red	0.05%	多醣

(三) Bradford method 使用器材、藥品及配方

名稱	備註
Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG250)	購自 CHONEYE
Bovine Serum Albumin (BSA)	購自 SIGMA
分光光度計	購自 WALTER

Coomassie Brilliant Blue G-250 reagent (CBG250)

藥品	備註
Coomassie Brilliant Blue G-250	0.01g
95% Ethanol	5 mL
85% phosphoric acid	10 mL
ddH_2O	100 mL

(四) SDS-PAGE 及 PVDF 膜轉印使用器材、藥品及配方

名稱	備註
ddH_2O	-
10X Running buffer	自行配置
CBR-250 Destain buffer	
2X Sample Loading Buffer	
1X Transfer buffer	
RIPA lysis buffer	
Methanol	購自聯工化學
Waver shaker	購自 Major Science
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR-250)	購自 BIO-RAD
4-15% Gradient gel	
Protein Marker(10–250 kDa)	
電泳轉印槽	
迷你垂直式電泳槽	
電源供應器	購自 Amersham
乾浴槽	購自 Thermo
冷光影像分析系統	購自 UVP
小玻璃瓶	購自 KIMBLE CHASE
磁石攪拌器	購自新光精機
Transfer Membrane(PVDF)	購自 MILLIPORE

10X Running buffer

藥品	備註
Tris base	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
ddH_2O	加至 1 L

2X Sample Loading Buffer

藥品	備註
Laemmli Sample Buffer	950 μL；購自 BIO-RAD
2-Mercaptoethanol	50 μL；購自 BIO-RAD

Coomassie Brilliant Blue R-250 reagent (CBR250)

藥品	備註
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR250)	0.25 g
Acetic acid	10 mL
Methanol	50 mL
ddH_2O	40 mL

Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain buffer

藥品	備註
Acetic acid	10 mL
Methanol	40 mL
ddH_2O	50 mL

RIPA lysis buffer

藥品
50 mM Tris, pH8.0
150 mM NaCl
10 mM EDTA
1% Triton X-100
0.1% SDS
0.5% Sodium deoxycholate

肆、研究過程或方法

一、 實驗架構圖

本實驗為評估台灣淡水渦蟲抑制蚊媒傳染病可行性研究的一環，去年我們已針對使用的渦蟲進行鑑種、分析渦蟲捕食蚊幼蟲的能力以及渦蟲對環境的容忍度進行相關的測試(王與郭，2016)；今年將對渦蟲捕食蚊幼蟲的特殊行為以及從捕食行為觀察中發現的渦蟲黏液能纏住蚊幼蟲情形為主軸作聚焦分析(圖 5)，此次實驗結果將有助於了解渦蟲黏液對於蚊幼蟲族群抑制的可能。

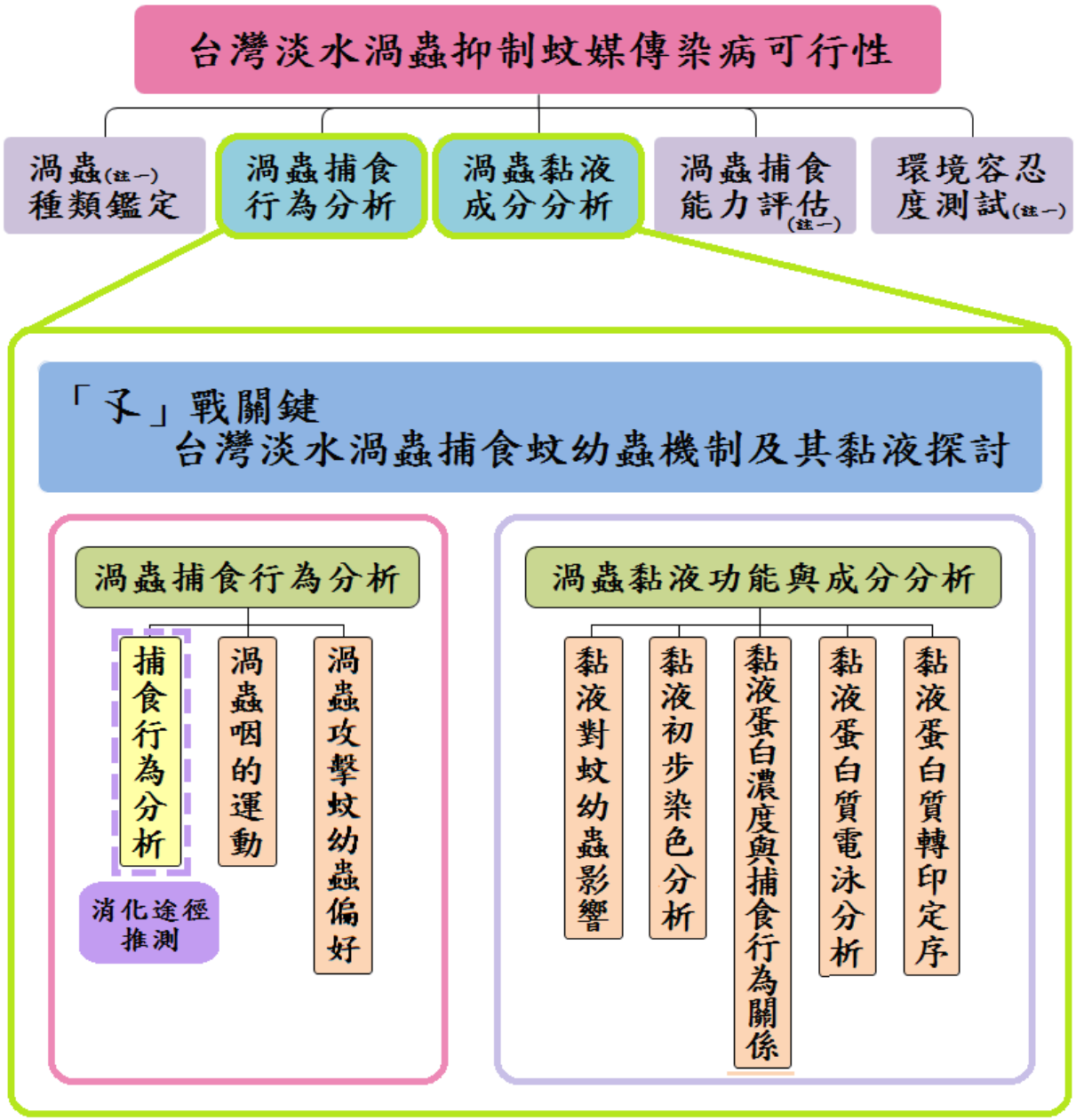


圖 5 實驗架構圖

註一：王與郭(2016)

二、 實驗步驟

(一) 渦蟲捕食蚊幼蟲行為分析

去年我們觀察渦蟲捕食蚊幼蟲之行為，並將捕食過程歸納成 4 個步驟：偵查(耳突受器感應)→固定(黏液限制獵物活動)→纏繞(避免獵物掙脫)→吸食(咽進入吸食)，捕食所花時間約 10 分鐘(王與郭，2016)，其中值得注意的是，渦蟲在捕食時，會先以所分泌的黏液限制住蚊幼蟲，以防止獵物逃脫；另外，在吸食食物時，以咽及口部特殊運動方式將食物送入體內消化，因此針對這部分進行以下的探討。

1. 渦蟲的咽與口部運動與食物流動方向關係

渦蟲吸食食物時，會將腹面的咽(圖 6)伸出進行吸食，因此藉由觀察渦蟲的咽在捕食時的運動方式，可使我們更深入了解渦蟲吸食食物時的狀況。將數隻渦蟲及 3 齡蚊幼蟲放入裝有曝氣水的培養皿，於解剖顯微鏡下，以 CCD 拍攝影片觀察渦蟲的咽及口部。並進一步與文獻相對照，以推測渦蟲的消化食物途徑。

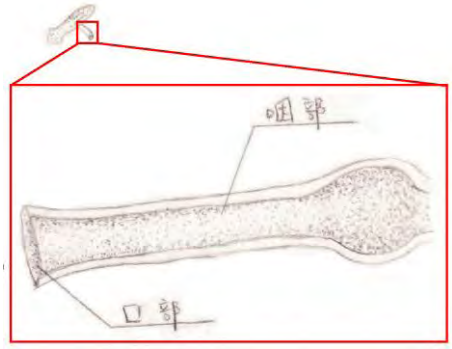


圖 6 渦蟲咽部構造示意圖 (作者自行繪製)
咽為的渦蟲攝食器官，為管狀位於腹面，咽的前端開口處稱為口部。

2. 渦蟲攻擊蚊幼蟲偏好

渦蟲在捕食體型較小的 1 齡蚊幼蟲時，會將整隻蟲體吸入咽部，最後把無法消化的部分從口部排出體外；而在捕食 2 齡以上蚊幼蟲時，則是以咽及口部在獵物的體壁破壞一個洞，再將咽伸入蟲體內吸食。本實驗探討渦蟲在捕食 2-4 齡蚊幼蟲時，選擇從蚊幼蟲蟲體何處進行攻擊。

受限於影片較不易觀察到渦蟲捕食蚊幼蟲確切的部位，因此將被渦蟲捕食後的蚊幼蟲空殼以複式顯微鏡進行觀察，由於蚊幼蟲幾丁質外殼呈半透明，因此使用蛋白質染劑 CBR250 進行染色作為背景以方便觀察，本實驗將蚊幼蟲蟲體部位分為三段(表 1、圖 7)進行討論，統計渦蟲攻擊蚊幼蟲之偏好部位(n=60)。

表 1 蚊幼蟲構造分段及其定義

渦蟲攻擊孑孓部位	定義
頭段	蚊幼蟲頭部到胸部(包含胸部連接腹部第一節)
中段	蚊幼蟲腹部第一節到第六節
尾段	蚊幼蟲腹部第七、八節(包含腹部第六節連接第七節處)、肛及呼吸管

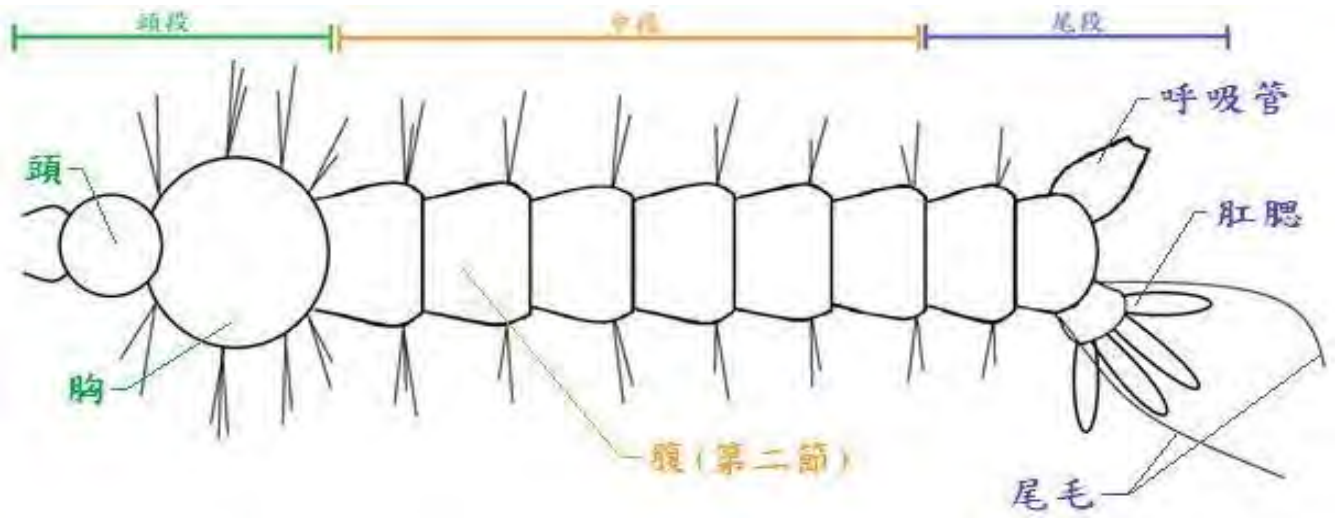


圖 7 蚊幼蟲構造分段示意圖(作者自行繪製)

(二) 渦蟲黏液功能與成份分析

1. 渦蟲黏液對蚊幼蟲影響

為了瞭解渦蟲黏液是否能纏住蚊幼蟲，因此收集渦蟲爬行時所分泌的黏液，以測試是否對蚊幼蟲造成影響。先將 30 隻渦蟲放入裝有 30 mL 曝氣水之 50 mL 的燒杯中，讓渦蟲在容器中爬行 6 天後取出，使燒杯內佈滿黏液，再放入 10 隻蚊幼蟲並開始計時，計數 5 分鐘內蚊幼蟲被黏住的隻數(圖 8)，並於複式顯微鏡觀察被黏住之蚊幼蟲。對照組中不放入渦蟲(n=3)。

圖 8 渦蟲黏液黏住蚊幼蟲
紅色圈中為 2 隻蚊幼蟲，因遭渦蟲黏液纏住而相互黏在一起。

2. 渦蟲黏液初步染色分析

為了要初步了解渦蟲黏液(圖 9)的主要成分，利用不同染劑 (Trypan Blue、Neutral Red、CBR250、CBG250、Methylene Blue、Povidone-Iodine、Periodic Acid-Schiff、Congo Red) 進行渦蟲黏液染色，希望能藉由各類染劑染色性質推測黏液之主要成分。取蒸餾水 20 μL 及一隻渦蟲放置於玻片上，5 分鐘後以牙籤將渦蟲挑出，待玻片上的水完全蒸發後，滴染劑於樣本上，蓋上蓋玻片，以濾紙將多餘染劑吸出後，觀察渦蟲黏液中被染色物質(n=6)。

圖 9 渦蟲分泌之黏液
紅色箭頭位置為渦蟲的黏液

3. 渦蟲黏液蛋白濃度與捕食行為關係

了解蚊幼蟲(獵物)的有無對渦蟲黏液蛋白分泌量影響，渦蟲是否因為要捕捉蚊幼蟲，而使黏液蛋白分泌量增加。

(1)Bradford method

將待測溶液與 CBG250 以 1∶5 混合，靜置於室溫 5 分鐘，測量並記錄 OD_{595} 數值，以牛血清蛋白(BSA)為標準品(表 3)繪出標準曲線(圖 10)，以內插法推算渦蟲黏液蛋白濃度。

表 3 蛋白質標準品 BSA 濃度配置

100 μg/ml BSA(μL)	0	40	80	120	160	200
ddH2O(μL)	200	160	120	80	40	0
Total Volume(μL)	200	200	200	200	200	200
Final concentration BSA (μg/ml)	0	20	40	60	80	100

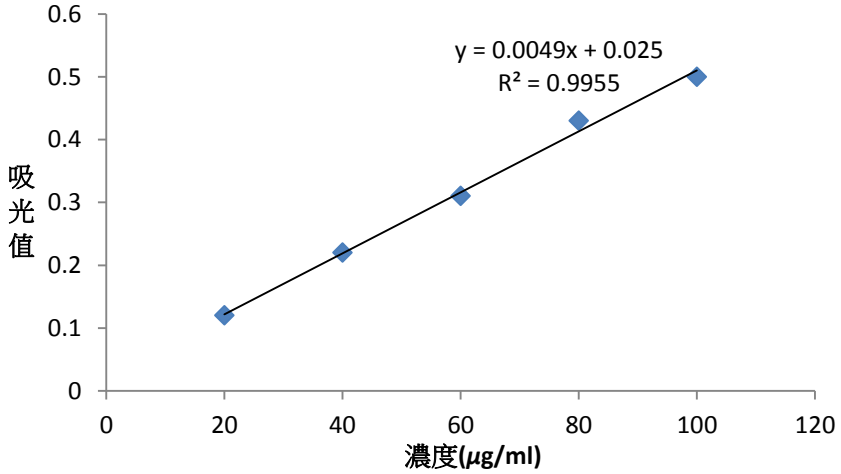


圖 10 BSA 蛋白質標準曲線

(2)樣本處理

將渦蟲及蚊幼蟲分別先放入裝有 ddH_2O 的培養皿中，約 10 分鍾後，清洗掉蟲體上的附著物，以免影響實驗結果，並使其先適應環境，各樣本處理方式如表 2，將黏液樣本以 Bradford method 測定，換算為渦蟲黏液蛋白濃度後進行比較(n=3)。

表 2 樣本配置及處理方法

樣本名稱	樣本處理方法
NC	對照組，確定蚊幼蟲正常生活代謝時是否會產生干擾判斷渦蟲黏液的蛋白。不放入渦蟲，放入 1 隻蚊幼蟲，1 天後取出。
PC	對照組。放入 6 隻渦蟲，使其爬行 1 天後以牙籤挑出。
P1	放入 6 隻渦蟲捕食 1 隻蚊幼蟲後，1 天後將蚊幼蟲屍體及渦蟲以牙籤挑出。
P2	分別放入 1 隻蚊幼蟲及 6 隻渦蟲，使渦蟲不吃掉蚊幼蟲，1 天後將蚊幼蟲及渦蟲以牙籤挑出。

實驗三重複，樣本皆於低溫-20℃凍存。各樣本代號分別表示：NC 表 Negative Control；PC 表 Positive Control；P 為 Planarian 的縮寫；數字則為不同處理方法的編號。

4. 渦蟲黏液蛋白質電泳分析

為了瞭解渦蟲黏液蛋白的種類及分子量，使用 SDS-PAGE 進行電泳分析。在去年的研究中我們使渦蟲在燒杯上爬行一段時間後移除渦蟲，再撒入螢光粉，於 UV 燈下觀察，發現渦蟲黏液會殘留於玻璃表面(王與郭，2016)，因此本實驗將渦蟲放入小玻璃瓶內收集其黏液，渦蟲黏液的收集方式如表 4。

將樣本與 2X Sample Loading Buffer 以 1：1 混合，離心後以乾浴槽 100℃反應 5 分鐘，加溫後立即置於冰上，取 30 μL 注入膠體的小洞內(Protein Marker 取 3 μL)，以 150V 進行電泳約 1 小時。取下膠體於 CBR250 中低速(50rpm) 搖晃 15 分鐘後，取出膠體放入 Destain buffer 中退染至背景呈透明為止，最後放入冷光影像分析系統中照相。

表 **4** 樣本配置及處理方法

樣本名稱	樣本處理方法
protein marker (代號 M)	為分子量 10–250 kDa 之標準品。
渦蟲黏液蛋白(代號 MD) planarian mucus proteins	以牙籤挑起 6 隻渦蟲放入裝有 300 μL ddH_2O 之小玻璃瓶中，將玻璃瓶倒放讓渦蟲在瓶內爬行 overnight 後移除渦蟲，將瓶內水溶液吸到微量離心管中凍存。
渦蟲黏液蛋白(代號 ML) planarian mucus proteins	將在收集上述樣本(MD)時，將水溶液移除後的玻璃瓶中，加入 50 μL RIPA lysis buffer 均勻搖晃，將瓶壁上的殘留黏液洗下來後，將溶液吸到為量離心管中凍存。

將渦蟲先放入裝有 ddH_2O 的培養皿中約 30 分鐘，將其身上的物質清洗掉避免干擾實驗結果，並讓渦蟲適應環境，倒放玻璃瓶可以增加渦蟲爬行的表面積，以收集更多黏液。所有樣本皆於-20℃低溫凍存。實驗三重複，重複數編號為 A-C，例如：MDA 即為 MD 組之一重複。

5. PVDF 膜轉印及渦蟲黏液蛋白質定序

為進一步得知渦蟲黏液主要的蛋白質成分，將渦蟲黏液樣本先以 SDS-PAGE 讓蛋白質分開(步驟同 **4.**，但膠體不以 CBR250 染色)，轉印至 PVDF 膜上後，選擇最明顯(濃度最高)的蛋白質色帶進行定序。

(1)PVDF 膜轉印

取 PVDF 膜放入 Methanol 中浸溼，放入 ddH_2O 中以 50 rpm 搖晃清洗約 5 分鐘，將電泳過後的 SDS-PAGE 膠體及 PVDF 膜分別放置於 Transfer buffer 中以震盪器 50 rpm 搖晃 15 分鐘。將膠體、PVDF 膜、濾紙及泡棉依序裝入轉印裝置，放入轉印電泳槽內，放在 4℃中以 125V 跑 30 分鐘，反應時以磁石攪拌避免溫度過高或鹽類分布不均。轉印完成後取出 PVDF 放入 CBR250 搖晃(50rpm)10 分鐘後，以 Destain buffer 退染至看得到蛋白質為止。

(2)蛋白質定序

將要定序的蛋白質色帶剪下來放入微量離心管中，送至明欣生物科技有限公司使用 Applied Biosystems LC 494 Procise®Protein Sequencing System，依據 Edman Degradation 原理，進行胺基酸 N 端定序。

(三) 統計分析

以 T 檢驗(t-test)與單因子變異數 (One-Way ANOVA)進行分析，統計分析結果 $p > 0.05$ 為無顯著差異，$p < 0.05$ 為顯著差異，而 $p < 0.01$ 為極顯著差異。

伍、研究結果

一、 渦蟲捕食行為分析

(一) 渦蟲的咽與口部運動與食物流動方向關係

當渦蟲的口部擴張、咽部伸展時，在其咽內體積增大形成負壓，使食物被吸入咽內；口部舒張、咽部收縮時再將咽內的食物送入體內進行消化，而且在捕食時渦蟲的口部及咽部會不斷地運動(圖 11)，推測這樣有助於將食物咀嚼成小單位，以便吸食。

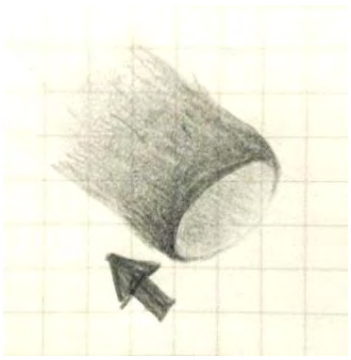
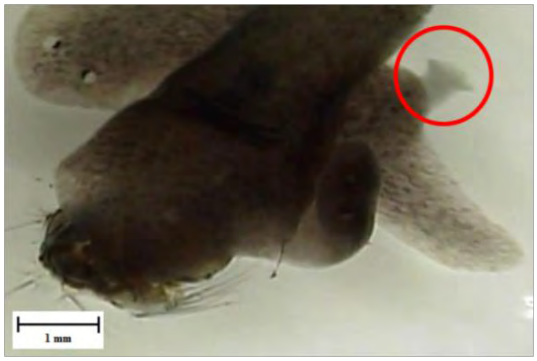
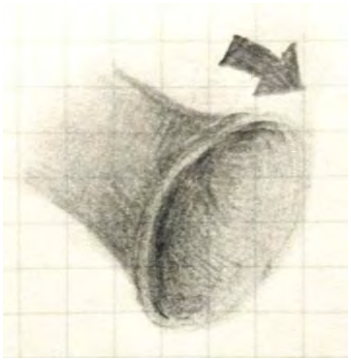
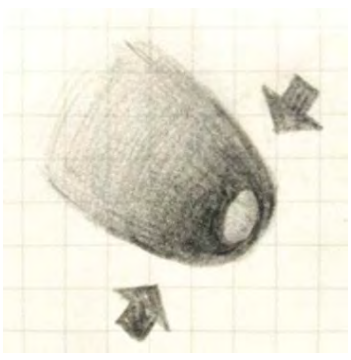
渦蟲咽的運動實際情況	渦蟲的咽手繪圖	說明
		口部舒張，咽向後收縮、擠壓。將上一次吸入之食物送入體內，一方面準備下一次的進食。
		口部向外擴張，咽向前伸展，使咽內體積增大產生負壓，此時產生的吸力可將食物吸入咽部。
		口部向內收縮。重複上述的順序進行運動。

圖 11 渦蟲捕食蚊幼蟲時，咽部與口部的運動方式分解說明

咽為的淡水渦蟲攝食器官，為管狀位於腹面，咽的前端開口處稱為口部。紅色圈中為渦蟲的咽，使用顯微錄影截圖。

【實驗討論】渦蟲在體外行物理消化(亦可能有化學分解參與)，吸入體內後行化學分解食物

渦蟲捕食(從咽伸出至吸食完獵物收回咽)蚊幼蟲所花時間僅約 10 分鐘，若是先將酵素注入獵物體內待其分解後再吸食，可能無法在 10 分鐘內完成捕食，因為酵素作用所需時間較長，因此初步推論渦蟲消化食物的過程是先藉由在體外物理消化，將嚼碎的食塊吸入體內後再行化學分解食物。在吸食前是否有化學分解酶參與仍待進一步分析。

本研究發現，對於捕食較大齡期的蚊幼蟲，渦蟲會先在體外進行物理消化，再以咽部伸長時產生的負壓，將食物吸入體內進行化學消化，最後將無法消化的食物殘渣送到咽部，再從口部排出體外，而根據 Miller & Harley(2001)，渦蟲會在體內行胞外及胞內消化，並以胞內消化為主(圖 12)。

圖 12 渦蟲消化食物途徑示意圖(作者自行製作)

渦蟲體外消化行為為本實驗之觀察結果，而渦蟲體內胞內及胞外消化則參考 Miller & Harley(2001)。

(二) 渦蟲攻擊蚊幼蟲部位偏好

渦蟲捕食時以攻擊 2-4 齡蚊幼蟲尾段為主；其次為從蚊幼蟲中段；少數渦蟲的則是由蚊幼蟲之頭段進攻(圖 13、14)。且在觀察時發現蚊幼蟲的呼吸管及頭部多數是完整無破損，推測因為蚊幼蟲的頭部及呼吸管的外殼相對較厚或堅硬，使渦蟲不易從此處進行吸食。

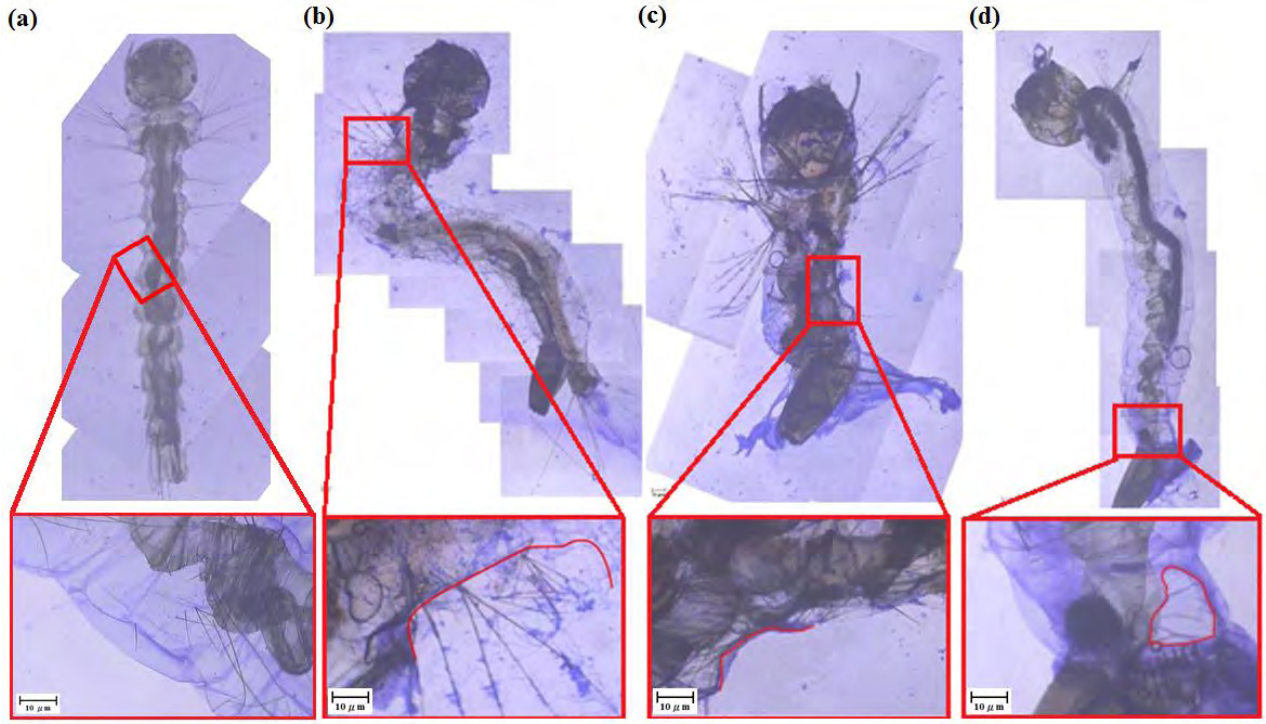


圖 13 渦蟲捕食後蚊幼蟲空殼染色比較

本實驗以渦蟲捕食 2-4 齡蚊幼蟲後的蟲體空殼進行觀察，使用 CBR250 染色作為背景，使幾丁硬殼輪廓變得更明顯以方便觀察。(a)為對照組，為未被捕食之蚊幼蟲；(b)-(d)為實驗組，為渦蟲從蚊幼蟲頭、中及尾段攻擊捕食後之蟲體空殼。下圖為上圖紅色框處之放大圖；下圖紅色線代表渦蟲攻擊造成之缺口部分。

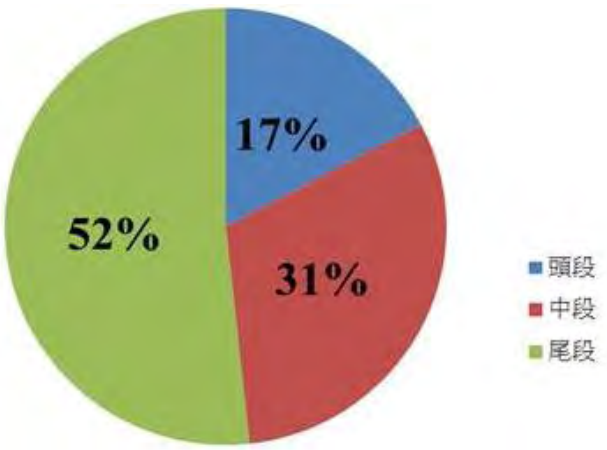


圖 14 渦蟲攻擊蚊幼蟲部位偏好比較

本實驗以渦蟲攻擊捕食 2-4 齡蚊幼蟲後，蟲體空殼進行染色觀察，共 60 重複。頭段為從蚊幼蟲之頭部或胸部(包含胸部連接腹部第一節)吸食；中段為從蚊幼蟲之腹部第一節到第六節間吸食；尾段為從蚊幼蟲之腹部第七節到第八節、呼吸管或肛(包含腹部第六節連接第七節處)吸食。

【實驗討論】

(1)渦蟲僅捕食蚊幼蟲體內組織

觀察渦蟲捕食完的蚊幼蟲空殼發現皆有腸道及呼吸管，因此推論渦蟲不偏好吸食蚊幼蟲的腸道及呼吸管，在顯微鏡下也觀察到，渦蟲若不小心將蚊幼蟲的部分腸道吸入體內會再將其吐出，因而導致捕食後之蚊幼蟲的腸及呼吸道並不完整(斷裂)(圖 15)。

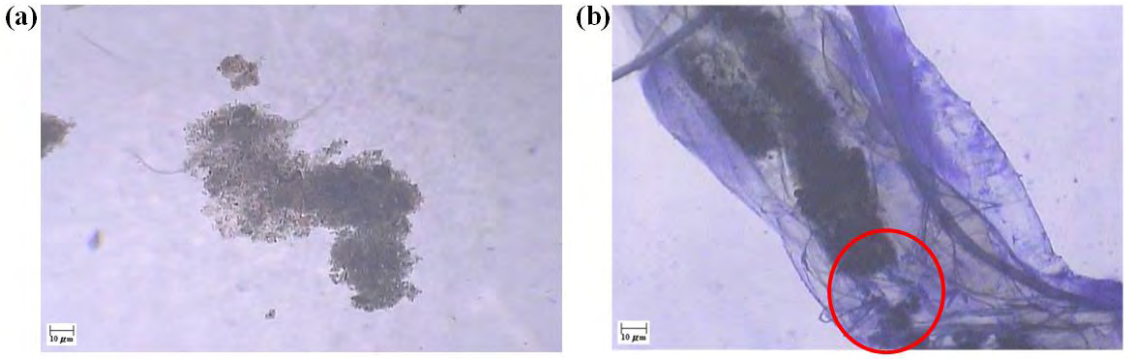


圖 15 蚊幼蟲的腸道完整度觀察

(a)為蚊幼蟲被渦蟲吸食消化後，吐出之食物殘渣(推測應是蚊幼蟲腸道碎片)；(b)為蚊幼蟲腸道被渦蟲吸斷，使用 CBR250 作背景染色以便觀察，圖中紅圈為腸道斷裂。

(2)渦蟲咽的吸力足以破壞蚊幼蟲的幾丁質硬殼

蚊幼蟲的表面有幾丁質外殼保護，但殼與殼之間，是以硬化程度不高、具可塑性的節間膜連接，因為節間膜為薄膜，此為蚊幼蟲較脆弱的地方(Miller & Harley，2001)，因此預測渦蟲攻擊蚊幼蟲時，會以節間膜為目標進行攻擊，但經過統計後發現，渦蟲並不會針對蚊幼蟲的節間膜處進行攻擊，而是直接破壞幾丁質硬殼進行吸食，所以推測渦蟲咽部的吸力足以將蚊幼蟲的外殼破壞。

(3)少部分渦蟲捕食蚊幼蟲後死亡，尚未確定死因

在渦蟲捕食白線斑蚊實驗中，經常觀察到會有少數的渦蟲(約 5%)在捕食白線斑蚊幼蟲之後，有死亡並且自我分解(渦蟲會整隻被分解呈現粉末狀)情況產生(圖 16)。目前尚無法得知渦蟲死亡的確切原因，推測可能渦蟲被蚊幼蟲的側毛(lateral hair)刺傷導致死亡，也不排除可能因為白線斑蚊幼蟲為了自我防衛所分泌的物質或少數帶特殊基因的蚊幼蟲體內具可導致渦蟲死亡的物質。

圖 16 少數渦蟲捕食蚊幼蟲後死亡

白色物質為渦蟲自我分解時釋出的體內物質。咖啡色碎片為身體殘骸。

二、 渦蟲黏液功能與成份分析

(一) 渦蟲黏液對蚊幼蟲影響

實驗組中蚊幼蟲有半數被渦蟲黏液纏住的現象，從圖 17 中觀察到實驗組中的蚊幼蟲之尾部及頭部因黏液而黏在一起，使用 CBR250 染色觀察，可看到尾端及頭部間有藍色帶狀黏液相連；對照組中並無蚊幼蟲被黏住的情況，因此證明渦蟲爬行時所分泌的黏液具限制蚊幼蟲游動的功能。進一步統計得 10 隻蚊幼蟲內有 7±1 隻被渦蟲黏液纏住，經 t-test 進行分析，對照組與實驗組 p=0.017，有顯著差異(圖 18)。

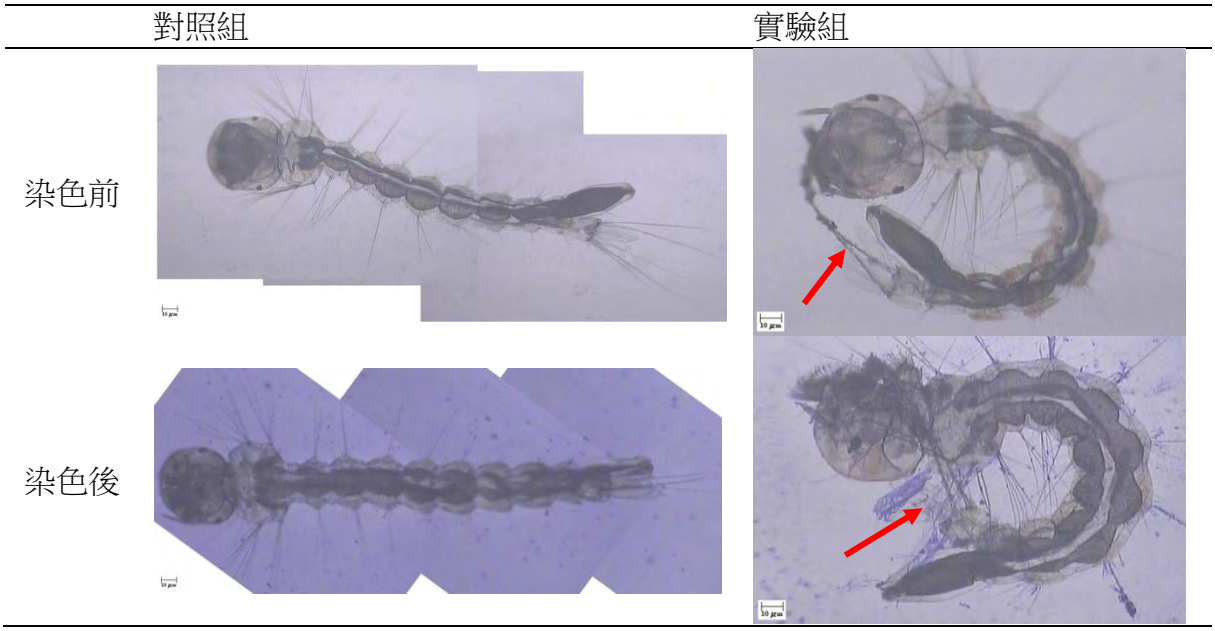


圖 17 渦蟲黏液對蚊幼蟲活動的影響比較

對照組僅曝氣水無渦蟲黏液，實驗組收集以 30 隻渦蟲爬行 6 天之黏液後，移除渦蟲，分別放入 10 隻蚊幼蟲進行實驗，並以 CBR250 染色各組別之蚊幼蟲觀察，各組實驗 3 重複。

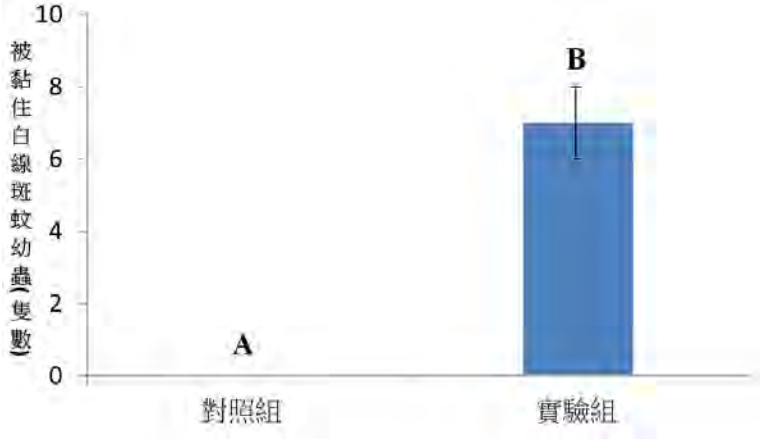


圖 18 渦蟲黏液黏住蚊幼蟲的隻數

對照組僅曝氣水無渦蟲黏液，實驗組收集以 30 隻渦蟲爬行 6 天之黏液後，移除渦蟲，分別放入 10 隻蚊幼蟲進行實驗，記錄 5 分鐘以內，被黏住之蚊幼蟲隻數，並以 CBR250 染色各組別之蚊幼蟲觀察，各組實驗 3 重複。利用 t-test 進行分析，若上方英文代號不同，則代表有顯著差異。

【實驗討論】渦蟲隻數越多，黏液蛋白濃度越高

此外將 1 隻、3 隻和 6 隻渦蟲放入微量離心管中爬行收集黏液，以 Bradford method(操作方法於肆-二-(二)-3-(1)中有詳細說明)測出 OD_{595} 後換算為蛋白質濃度，經 ANOVA 分析，三組間有極顯著差異(p=0.0001)，發現渦蟲分泌的黏液蛋白量與渦蟲隻數成正相關($r^2 = 0.978$)，因此可推知單位水體中渦蟲隻數越多，所能黏住的蚊幼蟲就也會越多(圖 19)。

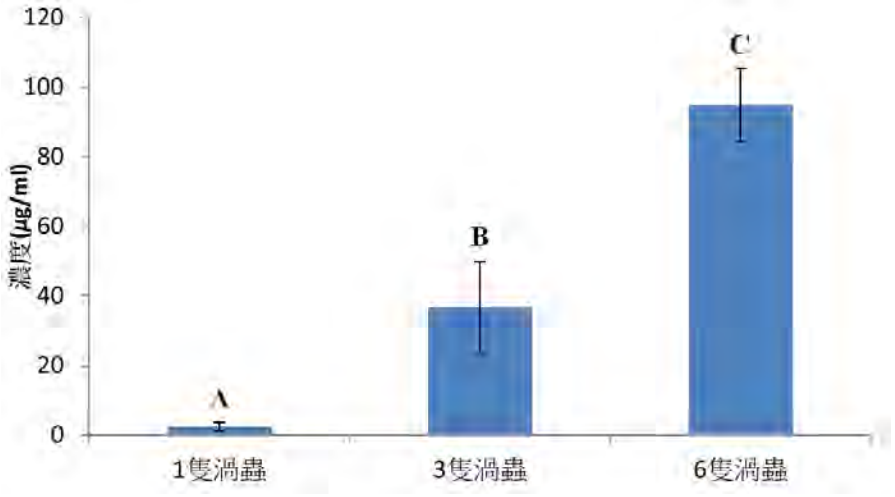


圖 19 渦蟲隻數與黏液蛋白濃度的關係圖(n=3)
利用 ANOVA 進行分析，$p < 0.01$ 有極顯著差異，若上方英文代號不同，則代表有顯著差異。

(二) 渦蟲黏液初步染色分析

在渦蟲黏液染色實驗中，在 Trypan Blue 染色下，並沒有染到任何細胞，可確定未染到細胞，而藉可進入活細胞的 Neutral Red 染色，也可證明所染到的物質非細胞，以此兩種染劑先行做檢驗避免觀察到非渦蟲黏液的物質；使用蛋白質染劑 CBR250 和 CBG-250 染色，可觀察到渦蟲的黏液中含蛋白質，且黏液為纖維狀及球狀；在 Methylene Blue 染色中，具有大量大小不一的顆粒狀物質，於 Povidone-iodine 中也有纖維狀物質於黏液中；進一步使用 Periodic Acid-Schiff 染色，顯示渦蟲黏液中含有醣蛋白，最後於 Congo Red 染色(可染色大分子多醣)下發現有物質呈色，因此可知渦蟲黏液中也含有多醣(圖 20)。

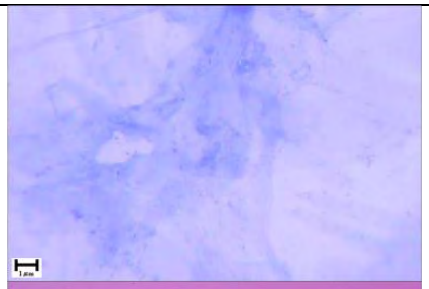
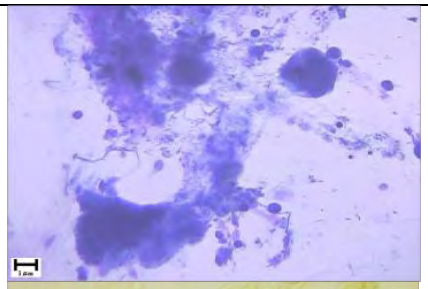
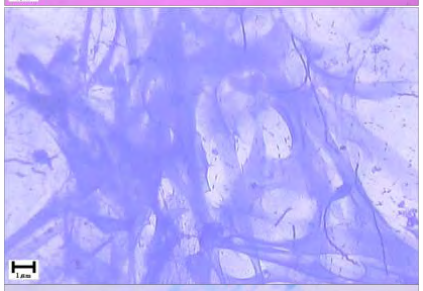
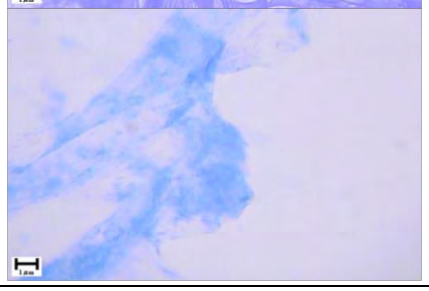
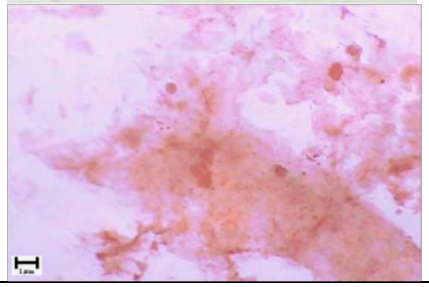
染劑	渦蟲黏液	染劑	渦蟲黏液
Trypan		Methylene Blue	
Neutral Red		Povidone-iodine	
CBR250		Periodic Acid-Schiff	
CBG250		Congo Red	

圖 20 以各式染劑分析渦蟲黏液成份

取渦蟲及 ddH_2O 於玻片爬行約 5 分鐘後移除渦蟲，待水蒸發後使用不同染劑染色，實驗 6 重複。

(三) 渦蟲黏液蛋白濃度與捕食行為關係

收集渦蟲黏液樣本後，以 Bradford method 進行蛋白質定量，並以 BSA 繪製出標準曲線，套入公式後算出各樣本之濃度如圖 21，P1、P2 及 P3 之蛋白質含量經 ANOVA 分析，得結果為渦蟲不管在有無捕食白線蚊幼蟲情況下，所分泌的黏液量皆無顯著差異 $p > 0.05$(p =0.82)。

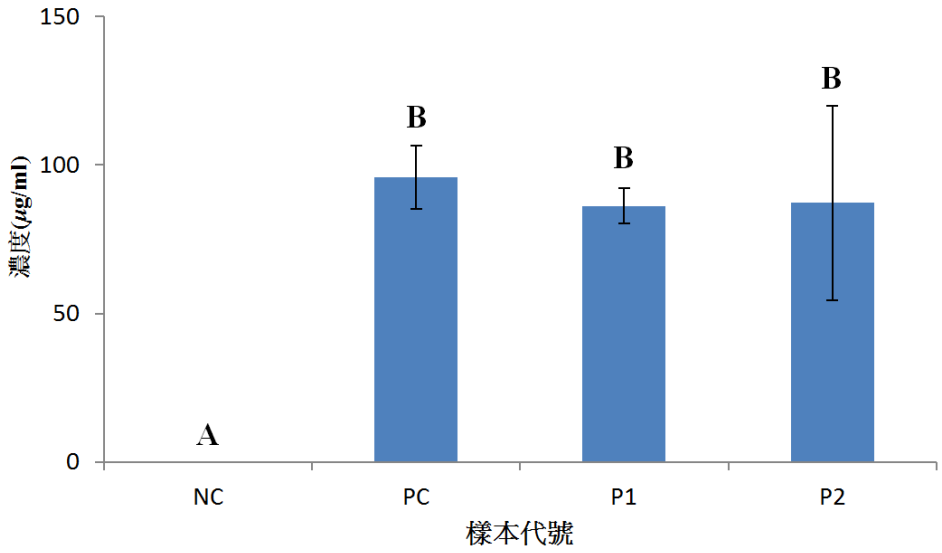


圖 21 渦蟲在有無白線蚊幼蟲時分泌黏液蛋白濃度差異比較

NC 表示只有放入蚊幼蟲的對照組；PC 為僅渦蟲黏液的對照組；P1 為渦蟲捕食蚊幼蟲時分泌之黏液；P2 為渦蟲與蚊幼蟲共存時分泌的黏液。除 NC 組以外的組別皆為 6 隻渦蟲黏液的濃度，每組 3 重複。利用 ANOVA 分析，若上方英文代號不同，則代表有顯著差異。

【實驗討論】渦蟲黏液蛋白濃度無顯著差異的原因

(1)渦蟲在攝食後會黏在壁上休憩，所以分泌黏液蛋白量沒有增加

在黏液實驗中發現渦蟲分泌的黏液蛋白量，並沒有因為捕捉蚊幼蟲而有明顯的上升狀況，而且在平常餵食渦蟲時，也發現渦蟲攝食後會停下來休息，所以不需要分泌太多黏液蛋白，本研究發現如果以人為方式刺激渦蟲，會促使其分泌黏液，因此推測渦蟲是因為捕食後，停下休息所以分泌黏液蛋白量下降。

(2)渦蟲捕食蚊幼蟲前後也有可能分泌不同黏液，仍有待證明

渦蟲捕食前後的黏液蛋白質濃度雖然無顯著差異，但單從吸光值的結果，還不足以了解渦蟲捕食前後，所分泌的黏液中是否含有的相同的蛋白質有種類，因此初步利用 SDS-PAGE 進行初步分析，從圖 22 可以看到，NC 對照組中無明顯色帶；PC 樣本在 180 kDa 以上有一條色帶；P1 樣本可能因為蛋白質含量不夠高，所以無明顯色帶；P2 樣本在約 70 kDa 處有一條色帶，比較 PC 及 P2 可以初步推測渦蟲在有無蚊幼蟲的狀況下，所分泌的黏液蛋白可能有種類上的差異，未來將會針對此部分做進一步釐清。

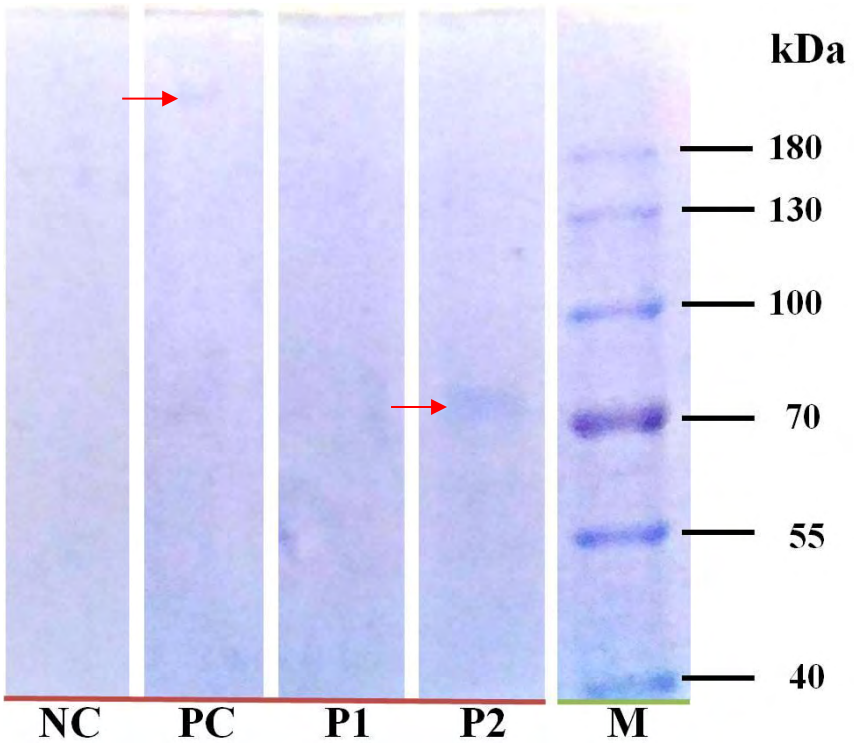


圖 22 不同環境改變下渦蟲分泌之黏液蛋白電泳圖

樣本處理方式同蛋白值定量分析實驗。樣本收集以在微量離心管加入 300 μL ddH_2O 後，各樣本配置為：NC 表示放入 1 隻蚊幼蟲的對照組；PC 為 6 隻渦蟲黏液的對照組；P1 為放入 6 隻渦蟲捕食 1 隻蚊幼蟲時分泌之黏液；P2 為 6 隻渦蟲與 1 隻蚊幼蟲共存時分泌的黏液；黏液樣本皆以 ddH2O 回溶再使用使用 7.5% SDS-PAGE 膠片進行分離；M為 40-180 kDa protein marker，使用濃度為 7.5%的梯度膠片進行分析。

(四) 渦蟲黏液蛋白質電泳分析

在 SDS-PAGE 電泳的結果中，可以看到所有樣本在 250 kDa 以上有一條明顯色帶，但由於在 250 kDa 以上的可能為分子量較大的蛋白質或者一些聚合物，目前尚無法處理所以暫不討論。ML 組在 20 kDa-75 kDa 及 10 kDa-15 kDa 範圍間則分別有約六條蛋白質色帶及兩條明顯蛋白質色帶，而在 15 kDa 位置有一最明顯的色帶(圖 23)，推測此即為渦蟲黏液中主要的蛋白質成分。MD 組則無法看到明顯蛋白色帶。

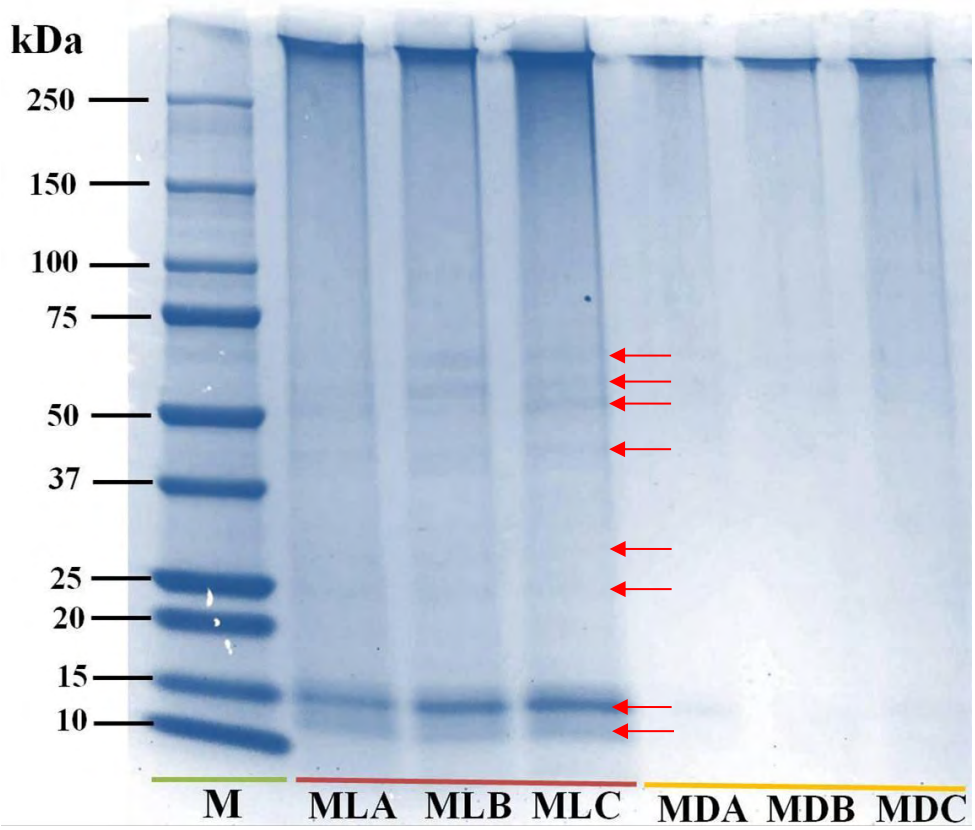


圖 23 以 SDS-PAGE 分析渦蟲黏液蛋白質電泳圖

樣本收集以在玻璃瓶加入 300 μL ddH_2O，放入 6 隻渦蟲爬行一天後取出後，先後以 ddH_2O 及 RIPA lysis buffer 回溶玻璃瓶中的黏液，並使用濃度為 4%-15%的梯度膠片進行分析。M 表示 10-250 kDa Protein Marker；ML 表示以 RIPA lysis buffer 回溶渦蟲黏液；MD 表示以 ddH_2O 回溶渦蟲黏液。重複數編號即為 A-C，例如：MDA 即為 MD 組之一重複。

【實驗討論】

(1)本研究首次針對台灣渦蟲(*G. tigrina*)黏液蛋白質進行分析

在 Bocchinfuso, *et al.*於 2012 年的報導中，有提到對渦蟲(*Schmidtea mediterranea*)蟲體及分泌物的成分分析，但報告中僅針對與人類分泌物相關的成分做討論(如 Actin、Superoxide Dismutase 等皆是渦蟲與人類分泌物中共同有的成分)，與本研究探討的目的不同，本研究是首次針對淡水渦蟲黏液蛋白質進行探討，未來將嘗試找出黏液中具黏性之蛋白質成分，並評估以黏液黏住蚊幼蟲使其窒息死亡的特性，做為防治蚊幼蟲的方法的可行性。

(2)渦蟲黏液中有親水性蛋白也有疏水性蛋白

在 SDS-PAGE 中，發現以 ddH_2O 當溶劑的 MD 組中，並沒有明顯的色帶(蛋白質濃度低)呈現，但是以 RIPA lysis buffer 為溶劑的 ML 組卻可以看到色帶(蛋白質濃度較高)，因此推測渦蟲黏液可能大多為疏水性蛋白，而無法溶於水中，所以才造成 MD 組的色帶不明顯，因此得出結果渦蟲黏液不適合以 ddH_2O 作為溶劑收集，但可以使用 RIPA lysis buffer 為溶劑回溶渦蟲黏液。

(3)黏液含多醣，未來將嘗試以 **PAS** 染色了解渦蟲黏液中是否含有醣蛋白

在黏液染色實驗中，以 Congo Red 染色黏液，發現黏液中具有多醣，因此未來將嘗試使用用於檢測樣本中是否含有醣蛋白的 Periodic Acid-Schiff stain(PAS)染色膠片，以了解渦蟲黏液中是否有醣蛋白。

(4)渦蟲黏液蛋白可能有不同的功能與其他應用價值

本實驗結果中發現渦蟲黏液中含有 8 種以上的蛋白質，目前因為時間限制，只能定出渦蟲黏液中最主要成分的蛋白質，未來可以針對各種不同黏液蛋白進行分析，一方面可以進一步了解渦蟲黏液蛋白是否還有其他未知的功能，一方面也可以了解其是否具有其他的應用價值。

(五) P VDF 膜轉印及渦蟲黏液蛋白質定序

將渦蟲黏液蛋白(分子量 15 kDa)以 HPLC 分析，黏液蛋白樣本於滯留時間(Retention time)5.43、5.38、6.29、7.99 及 12.80 分鐘處，均有明顯波峰產生，以胺基酸分析儀鑑定得黏液蛋白胺基酸為 QGEAV(Gln、Gly、Glu、Ala、Val)(圖 24)，初步與 NCBI 資料庫中序列比對，得知渦蟲黏液蛋白主要成分可能為 Titin 等蛋白質(表 5)(詳細請看附件)。

由於渦蟲黏液蛋白樣本濃度不夠高，HPLC 的結果訊號並不夠強，因此僅測定出 5 個胺基酸，未來將嘗試使用 Centrifugal Filter 以高速離心過濾方式，濃縮渦蟲黏液樣本，以提高黏液蛋白濃度，再進行定序以確認渦蟲黏液蛋白質的種類。

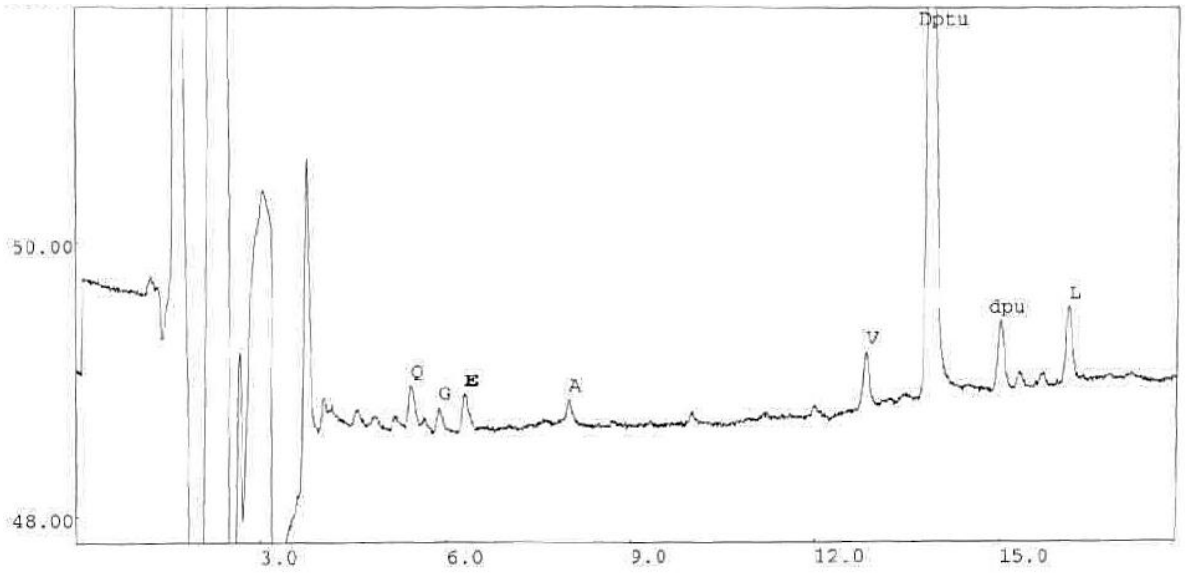


圖 24 渦蟲黏液蛋白(分子量 15 kDa)HPLC 分析色譜圖譜

將黏液蛋白樣本送交明欣生物科技有限公司進行 HPLC 分析。

表 5 渦蟲黏液蛋白(分子量 15 kDa)序列與 NCBI 比對結果

Description	Accession
Titin [*Trichinella pseudospiralis*]	KRZ39469.1
Myosin light chain kinase, smooth muscle [*Daphnia magna*]	JAN44449.1
hypothetical protein [*Amycolatopsis taiwanensis*]	WP_043840807.1
Neurogenic locus notch-like protein 3 [*Exaiptasia pallida*]	KXJ26620.1
uncharacterized protein LOC110239999 [*Exaiptasia pallida*]	XP_020901426.1
Uncharacterized protein APZ42_027627 [*Daphnia magna*]	KZS08360.1
putative immunoglobulin I-set domain protein [*Trichinella spiralis*]	XP_003372045.1
CARDB protein [*Pseudacidovorax* sp. RU35E]	SIP90331.1
AMP-binding enzyme [*Colletotrichum tofieldiae*]	KZL76007.1
calcium binding hemolysin protein, putative [*Oceanicola granulosus* HTCC2516]	EAR51648.1
Enniatin synthase-like protein [*Acremonium chrysogenum* ATCC 11550]	KFH48491.1
non-ribosomal peptide synthetase [*Rhodococcus tukisamuensis*]	WP_072844761.1

經定序得渦蟲黏液蛋白胺基酸(分子量 15 kDa)序列為 Gln、Gly、Glu、Ala、Val

陸、研究討論

一、台灣淡水渦蟲捕食時並不會分泌麻醉性物質

比較台灣本土淡水渦蟲(*G. tigrina*)、*Mesostoma* 屬淡水渦蟲及陸生渦蟲 *Artiopothia triangulata* 三者的捕食行為差異，發現 *Mesostoma* 屬淡水渦蟲會釋放毒素到水中或注入獵物體內使其麻痺(Case & Washino, 1979; Blaustein & Dumont, 1990)；*Artiopothia* 屬的陸生渦蟲會以身體纏住獵物，同時以黏液中的毒素及酵素麻痺並消化；而本實驗使用的台灣淡水渦蟲以黏液固定獵物，但獵物仍會持續掙扎，並無被麻痺的情況。由此推論 *Girardia* 屬渦蟲並無分泌毒素捕食的行為(表 6)。

表 6 不同種渦蟲捕食方式比較

渦蟲種	***G. tigrina*** (淡水渦蟲)	***Mesostoma* spp.** (淡水渦蟲)	***Artiopothia triangulata*** (陸生渦蟲)
固定獵物方式	分泌黏液並纏繞獵物	釋放毒素麻痺獵物	分泌具毒素黏液纏繞固定獵物
說明	會將獵物黏住且纏繞防止逃脫，蚊幼蟲仍會掙扎，推論不用毒素麻痺獵物	在捕食並沒有纏繞獵物的行為	體表黏液具毒素及消化酶，可麻痺並軟化獵物角質層
參考資料	This study	Case & Washino(1979) Blaustein & Dumont (1990)	McGee, *et al.*(1998)

二、扁形動物門中不同分支類群的動物比較

扁形動物門中，口與咽的構造屬於同源，但為了適應不同環境而演化出不同的型態，在實驗中發現渦蟲的咽為管狀，且在攝食時會伸出體外，而根據 Miller & Harley 與其他扁形動物門中的單殖綱、吸蟲綱及絛蟲綱的咽已演化為體內構造，並不會在捕食時伸出體外，推測口與咽的構造變化，可能跟其演化成寄生性動物有關。

扁形動物門中的單殖綱、吸蟲綱及絛蟲綱之物種大多數是寄生性，與宿主建立寄生關係，導致宿主罹患疾病或甚至死亡，而渦蟲綱為扁形動物門中唯一非寄生動物的一群，且目前也沒有相關文獻指出渦蟲會導致人類罹患疾病，因此未來可以不用擔心渦蟲會致病(表 7)。

表 7 扁形動物門(Platyhelminthes)中各種動物比較

綱 Class	口及咽部差異	是否為寄生動物	寄生對象及對其造成之病變	參考文獻
渦蟲綱 *Turbellaria*	管狀咽，平時縮在體內，捕食時時從腹面伸出體外	非 (腐食及掠食者)	—	This study
單殖綱 *Monogenea*	具前吸著器(Prohaptor)，咽在體內，不會伸出體外	是 (多為外寄生)	多寄生於淡水及海生魚類	Miller & Harley (2001)
吸蟲綱 *Trematoda*	口部具吸盤(Oral sucker)，咽在體內，無法伸出體外	是 (多為內寄生)	不同生命階段寄生於脊椎動物等。中華肝吸蟲症。	
絛蟲綱 *Cestoda*	不具口及消化道，直接以體壁吸收宿主養分。	是 (皆為內寄生)	脊椎動物消化系統。囊尾幼蟲病。	

三、不同動物黏液功能比較

將本實驗研究之台灣淡水渦蟲 *G. tigrina*、陸生渦蟲 *A. triangulata*、蝸牛及魚類所分泌的黏液進行比較，牠們的黏液皆演化出幫助爬行運動(游泳)、協助附著及保護身體防止乾燥等功能。另外在實驗中發現 *G. tigrina* 所分泌的黏液還具有幫助捕食獵物的功能，其他動物黏液則分別具有麻痺、消化獵物及抗菌的效果(表 8)，為了瞭解本實驗使用之渦蟲所分泌的黏液是否還有尚未發現的功能，未來將嘗試以抑菌環實驗測試淡水渦蟲黏液是否具抗菌能力，另外也將嘗試以 Api Zym Kit 分析淡水渦蟲黏液中是否有酵素，以了解淡水渦蟲是否有其他的應用價值。

表 8 不同物種之表皮分泌黏液之功能

動物名	黏液功能類似處	黏液功能差異處	參考文獻
G. tigrina (淡水渦蟲)	1.幫助爬行運動及附著於物體上 2.保護身體防乾燥 3.避免被天敵捕食	1.幫助捕捉獵物	This study Miller & Harley(2001)
Artiopothia triangulata (陸生渦蟲)	1.幫助爬行運動及附著於物體上 2.保護身體防乾燥 3.避免被天敵捕食	1.具神經毒素可麻痺蚯蚓 2.具消化酶可將蚯蚓角質層軟化	McGee, *et al.*(1998)
陸生蝸牛	1.幫助爬行運動及附著於物體上 2.保護身體防乾燥 3.避免被天敵捕食	1.抗病菌侵襲 2.促進皮膚再生與癒合 3.保持皮膚彈性 4.防止紫外線傷害	Iguchi, *et al.*(1982) 戎(2015)
大多數魚類 (包含淡水生及海生)	1.幫助游泳 2.調節滲透壓	1.抗病菌及寄生物等的侵襲	黃等(2009)

四、**Bradford method 可以較準確測出淡水渦蟲黏液中蛋白質的濃度**

在黏液濃度測定實驗中，嘗試使用 Biuret method、Bradford method 及 UV absorbance 測試渦蟲黏液中的蛋白質濃度，但因為所收集的黏液量不多，所以在靈敏度較低的 Biuret method 中無法被偵測出來，因此不適用於本實驗；而 Bradford method 及 UV absorbance 靈敏度較高，所以可測出淡水渦蟲黏液蛋白之吸光值，但在測試中，發現同樣本在 UV absorbance 中測得的吸光值，皆比在 Bradford method 中測得的吸光值高出 10 倍以上，推測可能是因為淡水渦蟲黏液蛋白中含芳香族的胺基酸(苯丙胺酸 phenylanine、酪胺酸 tyrosine 及色胺酸 tryptophan)量較多，所以使樣本在紫外光中的吸光值偏高(但實際蛋白質量沒有那麼多)，也有可能是因為樣本中的鹽類干擾導致(表 9)。

表 9 不同蛋白質定量法比較

蛋白質定量法	吸光波長	吸光位置	優點	缺點
Bradford method	595nm	與蛋白質中鹼性胺基酸(主要為精氨酸)及芳香族殘基結合	反應速度快，靈敏度高，準確度偏高	染劑較難清除，蛋白質會被破壞
Biuret method	540nm	在鹼性下，同離子與胺基酸結合呈色	準確度高，不易因蛋白質種類不同而干擾	靈敏度低，蛋白質會被破壞
UV absorbance	280nm	胺基酸上含苯環殘基之苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸	靈敏度高，蛋白質可回收，操作方便	準確度低，濃度受芳香族殘跡量影響

靈敏度低表示蛋白質需較高濃度才能被偵測；準確度低表示易受其他物質干擾。參考陸與李(2008)。

五、研究貢獻及未來應用

(一) 台灣淡水渦蟲捕食蚊幼蟲行為研究，可提供學生以簡易方式觀察動物捕食行為

將本實驗與去年的初步捕食行為研究結果進行整合(王與郭，2016)，將淡水渦蟲捕食蚊幼蟲的過程歸納出捕食步驟，並且詳細觀察渦蟲攻擊蚊幼蟲部位以及如何以咽吸食之。而在現行的國中生物、高中基礎及選修生物中皆有收錄與渦蟲相關的內容，由於實驗器材及動物對於國高中實驗室來說取得較方便，未來可以將本實驗對於淡水渦蟲捕食蚊幼蟲的研究結果納入實驗課程，提供學生一個簡易的方法，觀察掠食者與被捕食者的互動關係，一方面也可培養學生的思考邏輯及觀察力。

(二) 提供淡水渦蟲黏液樣本收集方法

淡水渦蟲體型相對比大部分陸生渦蟲、蝸牛等會分泌黏液的動物小，所以黏液分泌量也相對比其他動物少。本實驗嘗試了改變許多條件收集淡水渦蟲黏液，最後找出以玻璃容器、少量的水、提高淡水渦蟲密度，可以收集到較多的黏液，也發現淡水渦蟲黏液多不溶於水，但可溶於 RIPA Lysis Buffer 中進行保存，未來可以利用這個方式取得淡水渦蟲的黏液，有利於進一步的研究分析。

(三) 初步實驗推測淡水渦蟲分泌之黏液具有防治蚊幼蟲的潛能

淡水渦蟲爬行與捕食蚊幼蟲時會分泌黏液，在去年的實驗中觀察到淡水渦蟲黏液將蚊幼蟲黏住後，會使蚊幼蟲在掙扎時造成傷害，而無法成功化蛹(王與郭，2016)，在本研究中，進一步設計實驗證明淡水渦蟲黏液的確會使蚊幼蟲黏住，目前經實驗得知淡水渦蟲黏液中含多醣和蛋白質，並且已將淡水渦蟲黏液中主要蛋白質初步進行定序。未來還需詳細評估包括淡水渦蟲黏液對其他水中生物的影響等項目，以了解淡水渦蟲黏液加入防治的可行性。

(四) 渦蟲黏液蛋白具開發防水性黏著劑的潛能

市面上的膠帶若沾到水會失去黏性，常造成使用上的不便，然而淡水渦蟲所分泌的黏液在水中仍能保持黏性，因此未來如果可分析出淡水渦蟲黏液中帶黏性的蛋白質種類，則可以做為開發防水性黏著劑的材料。

柒、研究結論

一、淡水渦蟲會在體外行物理消化，再將小單位食塊吸入體內化學消化分解吸收。

二、淡水渦蟲捕食時，多從蚊幼蟲腹部末端或肛進行攻擊，並以口部的收縮及舒張破壞蚊幼蟲幾丁質外殼，再以咽內的體積變化產生負壓將食物吸入。

三、淡水渦蟲黏液中含有多醣和蛋白質。

四、有無蚊幼蟲環境並不影響淡水渦蟲黏液分泌量，但淡水渦蟲在捕捉蚊幼蟲時可能有分泌不同的蛋白質，未來須進一步實驗。

五、淡水渦蟲黏液中的蛋白質有 8 種以上，其中以分子量 15 kDa 之黏液蛋白為主要成分，將此蛋白質經初步定序發現可能為 titin 等。

捌、未來展望

一、將淡水渦蟲黏液蛋白以高速離心過濾法進行濃縮，再進行胺基酸定序。

二、進階評估淡水渦蟲黏液應用於防治蚊幼蟲的可行性。

三、分析淡水渦蟲黏液蛋白是否具有抗菌及酵素分解等功能及是否還有其他應用價值。

四、進一步探討淡水渦蟲在捕食蚊幼蟲及爬行時所分泌的黏液是否有差異。

五、評估淡水渦蟲黏液是否可以應用於防水性黏著劑及抗菌材料研發。

玖、參考資料及其他

一、書籍

(一) Miller, S. A. & Harley, J. P. (2001)。動物學(下冊)，藝軒圖書出版社。

(二) 翰林教科書編輯團隊。自然與生活科技課本(1 下)。翰林出版社。

二、科展報告、小論文與期刊

(一) 王琳雅、郭應廷(2016)。中華民國第56屆中小學科學展覽會作品說明書：「孑」地任務－渦蟲捕食白線斑蚊幼蟲之生物防治評估。

(二) 戎茜(2015)。動物黏液的功能與利用概述。*生物學教學*第40卷第11期。

(三) 黃智慧、馬愛軍、汪岷(2009)。魚類體表黏液分泌功能與作用研究進展。*海洋科學*第33卷第1期。

(四) 陸光予、李淑蘭(2008)。普通生物化學實驗手冊。東吳大學微生物系。

(五) Blaustein, L., & Dumont, H.J. (1990). Typhloplanid flatworms *(Mesostoma* and related genera): Mechanisms of predation and evidence that they structure aquatic invertebrate communities. *Hydrobiologia* 198: 61-77.

(六) Bocchinfuso, D.G., Taylor, P., Ross, E., Ignatchenko, A., Ignatchenko, V., Kislinger, T., Pearson, B.J., & Moran, M.F. (2012). Proteomic profiling of the planarian *Schmidtea mediterranea* and its mucous reveals similarities with human secretions and those predicted for parasitic flatworms. *Molecular & Cellular Proteomics* 11:681-691.

(七) Case, T. J., & Washino, R. K. (1979). Flatworm Control of Mosquito Larvae in Rice Fields. *Science New Series* 206: 1412-1414.

(八) McGee, C., Wisdom, G. B., Fairweather, I., Blackshaw, R. P., Mcllroy, J., & Walker, B. (1998). Characterization of the Proteins Present in the Mucus of the Flatworm *Artioposthia triangulata* (Dendy). *Comparative Biochemistry and Physiology* 119B: 293-298.

(九) Iguchi, S. M. M., Aikawa, T., & Matsumoto, J. J. (1982). Antibaerial activity of snail mucus mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 72: 571-574.

三、網站

(一) 衛生福利部疾病管制署專業版。2015年2月18日，取自 http://www.cdc.gov.tw/professional/index.8aspx

(二) National Center for Biotechnology Information。2017年4月24日，取自 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

【評語】052004

本研究探討淡水渦蟲捕食蚊幼蟲之機制及其黏液探討。發現渦蟲爬行時分泌黏液從蚊幼蟲腹部末端及肛攻擊纏住，其黏液為多醣及蛋白質以 SDS-PAG 分析結果顯示含有 8 種以上蛋白質，其分子量大小為 15KDa，其黏液蛋白質可能為 titin。研究動機清楚且具邏輯性，論文撰寫也完整，研究題材貼近生活，富有應用性。除此，作者在未來展望中，衍生了許多渦蟲黏液蛋白可運用的展望，例如：抗菌、防水黏著劑之開發與防治病媒之可行性等，創意與應用相結合的想法，值得鼓勵。

作品海報

摘 要

本研究探討台灣淡水渦蟲(*Girardia tigrina*)捕食蚊幼蟲機制、渦蟲黏液功能與成分分析，觀察得渦蟲會以體外物理消化(以咽運動產生的負壓將食塊吸入體內)蚊幼蟲，再行化學分解，且偏好從蚊幼蟲腹部末端及肛攻擊；渦蟲爬行時分泌的黏液能將蚊幼蟲纏住，黏液以染劑染色得知具多醣及蛋白質；渦蟲在有無蚊幼蟲環境不影響其黏液蛋白分泌量，至於黏液蛋白種類是否不同需再證明；以 SDS-PAGE 分析得渦蟲黏液有 8 種以上蛋白質，主要為 15 kDa，初步定序得渦蟲主要黏液蛋白可能為 titin 等。未來將以高速離心濃縮渦蟲黏液，提高濃度提供定序使用，並進階了解渦蟲黏液具酵素或抗菌等其他功能，也會進階評估黏液是否有應用於防治病媒蚊的可行性。

壹、研究動機

淡水渦蟲常被作為研究再生作用的實驗動物，在國中生物課本中，描述渦蟲為行斷裂生殖的物種，並以動物屍體為食，但在上一屆全國科展時我們發現渦蟲會捕食白線、埃及斑蚊與家蚊等病媒蚊幼蟲，因此針對淡水渦蟲直接投放在環境中是否可以達防治效果做評估(王與郭，2016)，**而今年將主軸放在對渦蟲對蚊幼蟲進行捕食攻擊的特殊現象做深入探討，及針對渦蟲的黏液在捕食中扮演的角色做進一步的了解，並**收集渦蟲的黏液進行各式分析。

圖 1 虎紋三角渦蟲(*Girardia tigrina*)

貳、研究目的

探討台灣淡水渦蟲特殊捕食機制、渦蟲黏液功能與成分分析。

參、研究設備及器材

虎紋三角渦蟲(***Girardia tigrina***)(圖 1)、白線斑蚊(*Aedes albopictus*)、CCD 顯微攝影、各式生物染色劑、蛋白質定量、SDS-PAGE 及 PVDF 轉印相關器材與藥品。

肆、研究過程或方法(圖 2)

一、渦蟲捕食蚊幼蟲行為分析

(一)渦蟲的咽與口部運動與食物流動方向關係

以顯微鏡觀察渦蟲的咽在捕食時的運動方式，了解渦蟲吸食食物時的狀況。

(二)選擇攻擊蚊幼蟲部位觀測

以 Coomassie Blue R-250 染色統計被攻擊的蚊幼蟲部位(圖 3)推論渦蟲捕食機制(n=60)。

二、渦蟲黏液功能與成份分析

(一)黏液對蚊幼蟲影響

將蚊幼蟲放入佈滿渦蟲黏液的燒杯中，觀測渦蟲黏液是否能纏住蚊幼蟲(n=3)。

(二)初步黏液染色分析

以各染劑染色初步了解渦蟲黏液的主要成分(n=6)。

(三)黏液蛋白濃度與捕食行為關係(蛋白質定量分析)

以 Bradford method 測定不同環境中渦蟲分泌黏液蛋白的濃度(表 1)，以了解蚊幼蟲的有無是否影響蛋白質含量，以牛血清蛋白(BSA)為標準品(n=3)。

(四)黏液蛋白質電泳分析

以 SDS-PAGE 分析渦蟲黏液蛋白，實驗配置如表 2。

(五)PVDF 膜轉印及蛋白質定序

為得知渦蟲黏液蛋白中，主要成分的蛋白質種類，以 SDS-PAGE 分析渦蟲黏液蛋白，轉印至 PVDF 膜上後，選擇濃度最高蛋白質色帶送至明欣生物科技有限公司進行胺基酸定序。

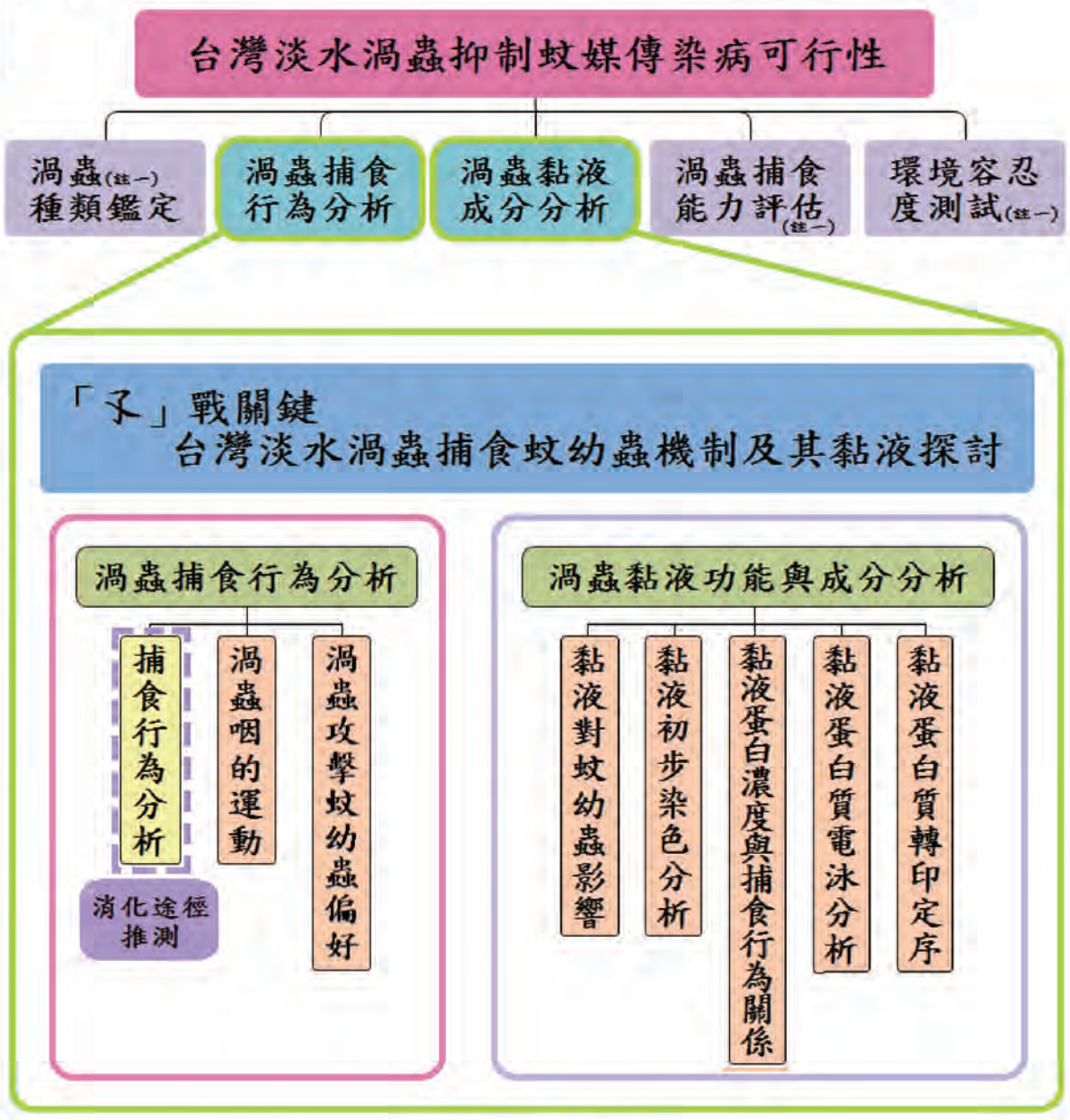


圖 2 實驗架構圖

註一：王與郭（2016）

圖 3 蚊幼蟲構造分段示意圖(作者自行繪製)

表 1 蛋白質定量分析樣本配置及處理方法

樣本名稱	樣本處理方法
NC	對照組，確定蚊幼蟲正常生活代謝時，是否產生干擾判斷渦蟲黏液蛋白量。不放入渦蟲，放入 1 隻蚊幼蟲，1 天後取出。
PC	對照組。放入 6 隻渦蟲，使其爬行 1 天後以牙籤挑出。
P1	放入 6 隻渦蟲捕食 1 隻蚊幼蟲後，1 天後將蚊幼蟲屍體及渦蟲以牙籤挑出。
P2	分別放入 1 隻蚊幼蟲及 6 隻渦蟲，使渦蟲不吃掉蚊幼蟲，1 天後將蚊幼蟲及渦蟲以牙籤挑出。

實驗三重複，樣本皆於低溫-20℃凍存。各樣本代號分別表示：NC 表 Negative Control ； PC 表 Positive Control ； P 為 Planarian 的縮寫；數字則為不同處理方法的編號。

表 2 SDS-PAGE 樣本配置及處理方法

樣本名稱	樣本處理方法
protein marker (代號 M)	為分子量 10–250 kDa 之標準品。
渦蟲黏液蛋白 mucus proteins (代號 MD)	以牙籤挑起 6 隻渦蟲放入裝有 300 μL ddH_2O 之小玻璃瓶中，將玻璃瓶倒放讓渦蟲在瓶內爬行 overnight 後移除渦蟲，將瓶內水溶液吸到微量離心管中凍存。
渦蟲黏液蛋白 mucus proteins (代號 ML)	將在收集上述樣本(MD)時，將水溶液移除後的玻璃瓶中，加入 50 μL RIPA lysis buffer 搖晃，將瓶壁上的殘留黏液洗下來後，將溶液吸到微量離心管中凍存。

將渦蟲先放入裝有 ddH_2O 的培養皿中，將其身上的物質洗掉避免干擾實驗結果，並讓渦蟲適應環境，倒放玻璃瓶以增加渦蟲爬行表面積，以收集更多黏液。所有樣本皆於-20℃低溫凍存。實驗三重複，重複數編號為 A-C，例如： MDA 即為 MD 組之一重複。

(三)統計分析

以 T 檢驗(t-test)與單因子變異數分析(One-Way ANOVA)進行分析，統計分析結果 $p > 0.05$ 為無顯著差異，$p < 0.05$ 為顯著差異，而 $p < 0.01$ 為極顯著差異。

伍、研究結果

一、渦蟲捕食行為分析

(一)渦蟲的咽與口部運動與食物流動方向關係及消化途徑推測(圖 4、5)

圖 4 渦蟲捕食蚊幼蟲時，咽部與口部的運動方式分解說明

咽為的淡水渦蟲攝食器官，為管狀位於腹面，咽的前端開口處稱為口部。紅色圈中為渦蟲的咽，使用顯微錄影截圖。

圖 5 渦蟲消化食物途徑示意圖(作者自行製作)

渦蟲體外消化行為為本實驗之觀察結果，而渦蟲體內胞內及胞外消化則參考 Miller & Harley(2001) 。

(二)選擇攻擊蚊幼蟲部位觀測

蚊幼蟲被渦蟲吸食的部位以尾段最多(52%)。且蚊幼蟲的呼吸管及頭部多完整無損，推測因為蚊幼蟲的頭部及呼吸管的外殼相對較厚而堅硬使渦蟲不易從此處吸食(圖 6、7)。

二、渦蟲黏液功能與成份分析

(一)黏液對蚊幼蟲影響

10 隻蚊幼蟲有 7±1 隻被渦蟲黏液黏住($p = 0.0001$)。且渦蟲隻數與分泌的黏液蛋白量成正相關($r^2 = 0.978$) 。

(二)染色初步黏液分析

渦蟲黏液染色結果如圖 8，由染色作用結果可初步判斷黏液中含有多醣、蛋白質。

(三)黏液蛋白濃度與捕食行為關係(蛋白質定量分析)

渦蟲不管在有無捕食白線蚊幼蟲情況下，所分泌的黏液蛋白量皆無顯著差異($p = 0.82$)(圖 9)。

(四)黏液蛋白質電泳分析

渦蟲黏液中有八種以上的蛋白質(ML 組在 10 – 75kDa範圍)，且推測最明顯的色帶(15 kDa)黏液主要的蛋白質成分(圖 10)。

(五)PVDF 模轉印及蛋白質定序

定序結果初步與 NCBI 中序列比對得知渦蟲黏液蛋白主要成分可能為 Titin 等蛋白質(表3)。

圖 6 渦蟲捕食後蚊幼蟲空殼染色比較(n=3)

使用 CBR250染色作為背景，使幾丁硬殼輪廓變得更明顯以方便觀察下圖為上圖紅色框處之放大圖；下圖紅色線代表渦蟲攻擊造成之缺口部分。

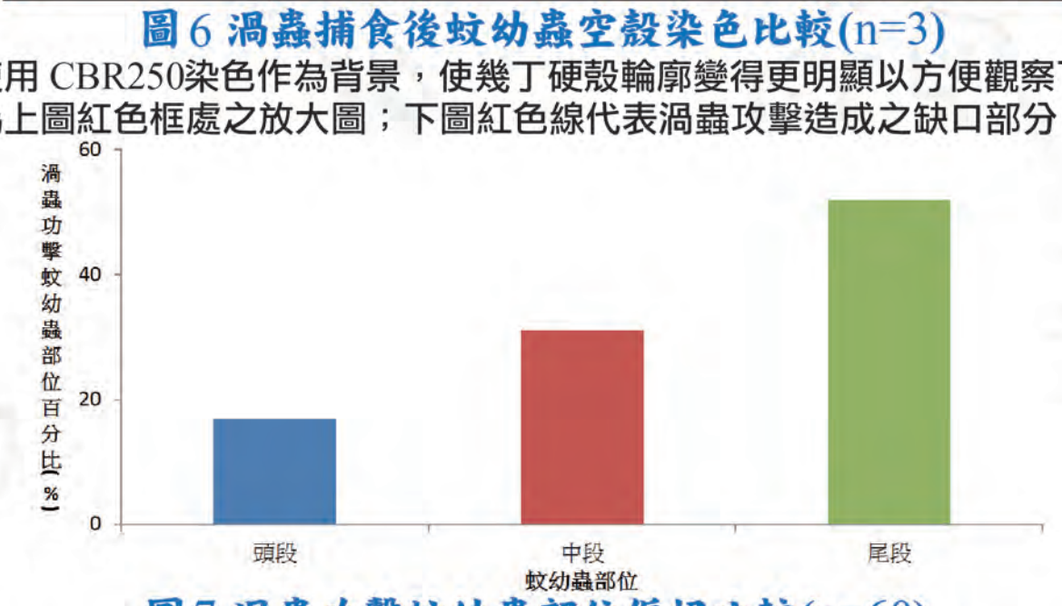


圖 7 渦蟲攻擊蚊幼蟲部位偏好比較(n=60)

頭段為蚊幼蟲之頭部或胸部；中段為蚊幼蟲之腹部第一節到第六節；尾段為蚊幼蟲之腹部第七節到第八節、呼吸管及肛。

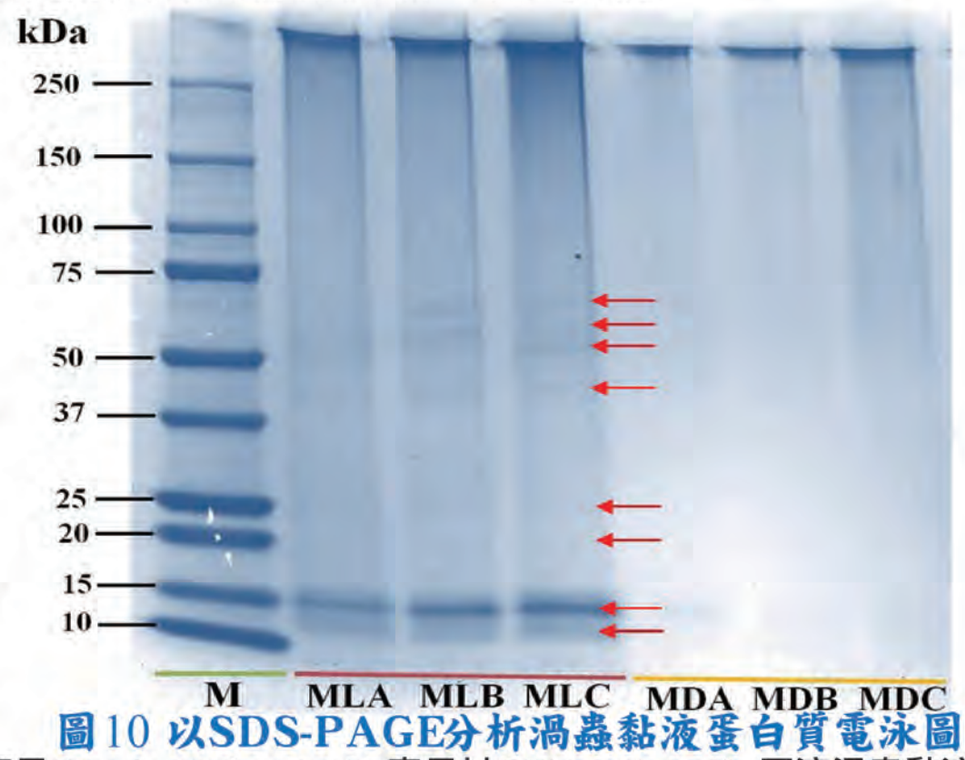


圖10 以SDS-PAGE分析渦蟲黏液蛋白質電泳圖

M 表示 Protein Marker ； ML 表示以 RIPA lysis buffer回溶渦蟲黏液； MD 表示以 ddH_2O 回溶渦蟲黏液。重複數編號為 A-C，MDA 即為 MD 組之一重複。

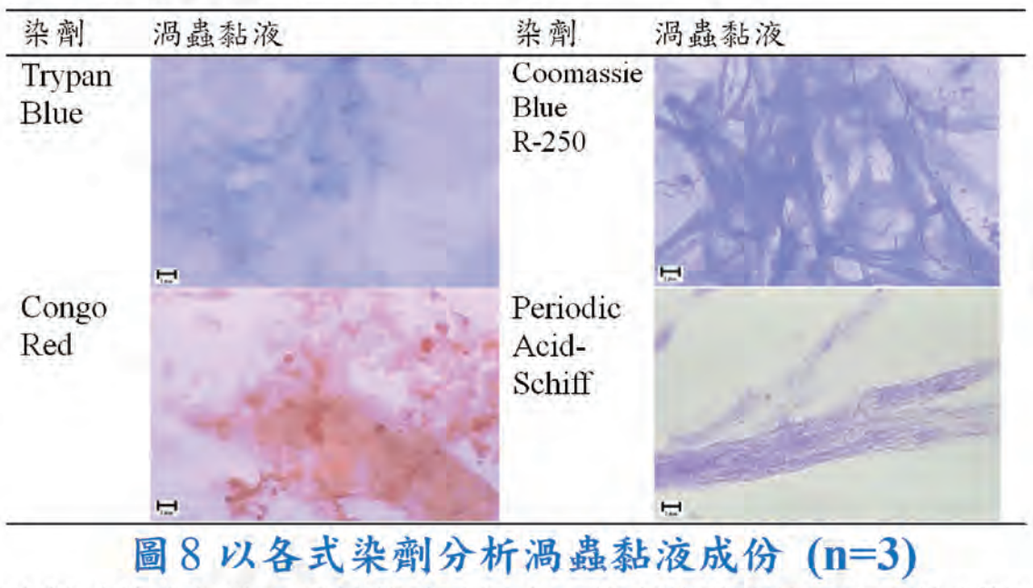


圖 8 以各式染劑分析渦蟲黏液成份 (n=3)

取渦蟲於玻片爬行約 5 分鐘後移除渦蟲，待水蒸發後使用不同染劑染色。

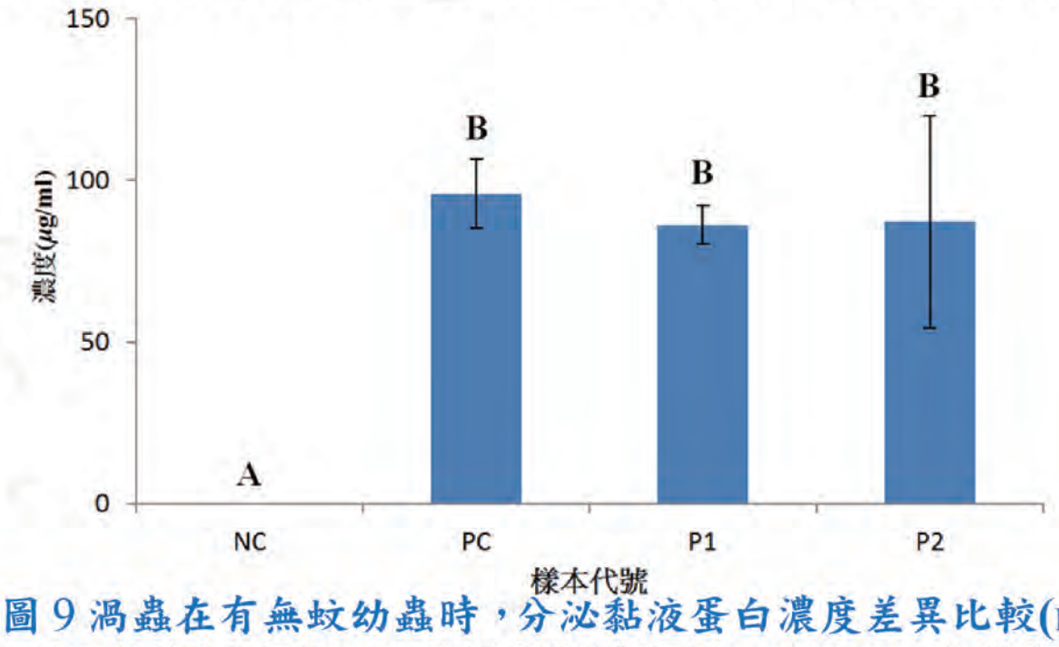


圖 9 渦蟲在有無蚊幼蟲時，分泌黏液蛋白濃度差異比較(n=3)

NC 表示蚊幼蟲對照組； PC 為渦蟲黏液對照組； P1 及 P2 為渦蟲捕食蚊幼蟲及與其共存時分泌之黏液。上方英文代號不同代表有顯著差異。

表 3 渦蟲黏液蛋白(分子量15 kDa) 序列與 NCBI比對結果

Description	Accession
Titin [*Trichinella pseudospiralis*]	KRZ39469.1
Myosin light chain kinase, smooth muscle [*Daphnia magna*]	JAN44449.1
hypothetical protein [*Anycolatopsis taiwanensis*]	WP_043840807.1
Neurogenic locus notch-like protein 3 [*Exaiptasia pallida*]	KXJ26620.1
uncharacterized protein LOC110239999 [*Exaiptasia pallida*]	XP_020901426.1
Uncharacterized protein APZ42_027627 [*Daphnia magna*]	KZS08360.1
putative immunoglobulin I-set domain protein [*Trichinella spiralis*]	XP_003372045.1
CARDB protein [*Pseudacidovorax* sp. RU35E]	SIP90331.1
AMP-binding enzyme [*Colletotrichum tofieldiae*]	KZL76007.1
calcium binding hemolysin protein, putative [*Oceanicola granulosus* HTCC2516]	EAR51648.1
Enniatin synthase-like protein [*Acremonium chrysogenum* ATCC 11550]	KFH48491.1
non-ribosomal peptide synthetase [*Rhodococcus tukisamuensis*]	WP_072844761.1

經定序得渦蟲黏液蛋白胺基酸(分子量 15 kDa)序列為 QGEAV

陸、研究討論

一、台灣淡水渦蟲捕食時所分泌的黏液不含麻醉性物質

本實驗使用的台灣淡水渦蟲以黏液固定獵物，但獵物仍會持續掙扎，並無被麻痺的情況(圖 11)；而 ***Mesostoma***屬淡水渦蟲會釋放毒素到水中或注入獵物體內使其麻痺(Case & Washino, 1979; Blaustein *et al.*, 1990)； ***Artioposthia***屬的陸生渦蟲則會以身體纏住獵物，同時以黏液中的毒素及酵素麻痺並消化。由此推論 ***Girardia*** 屬渦蟲並無分泌毒素捕食的行為(表 4)。

表 4 不同種渦蟲捕食方式比較

渦蟲種	*G. tigrina* (淡水渦蟲)	*Mesostoma* spp. (淡水渦蟲)	*Artioposthia triangulata* (陸生渦蟲)
固定獵物方式	分泌黏液並纏繞獵物	釋放毒素麻痺獵物	分泌具毒素黏液纏繞固定獵物
說明	會將獵物黏住且纏繞防止逃脫，蚊幼蟲仍會掙扎，推論不用毒素麻痺獵物	在捕食並沒有纏繞獵物的行為	體表黏液具毒素及消化酶，可麻痺並軟化獵物角質層
參考資料	This study	Case & Washino(1979) Blaustein & Dumont (1990)	McGee, *et al.*(1998)

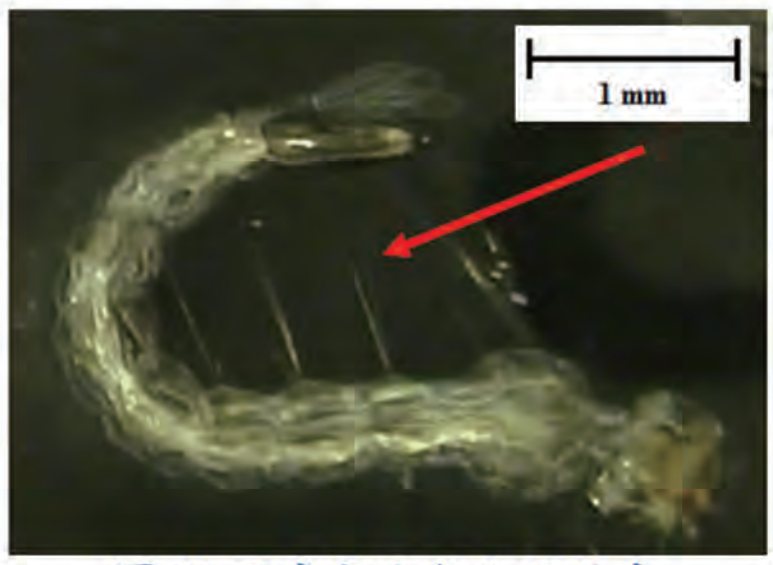


圖 11 渦蟲黏液黏住蚊幼蟲
紅色箭頭位置為渦蟲黏液；顯微錄影截圖

二、不同動物黏液功能比較(表 5)

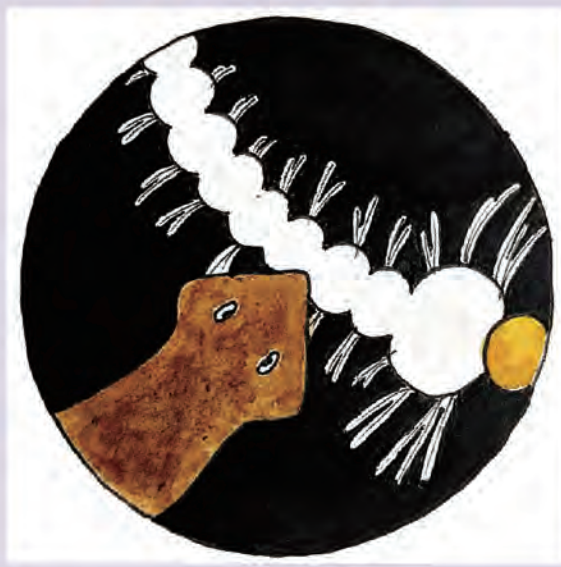
為了瞭解淡水渦蟲黏液是否還有尚未發現的功能，未來將嘗試以**抑菌環實驗**及 **Api Zym Kit**分析測試其是否具抗菌及酵素分解能力，以了解淡水渦蟲是否有其他的應用價值。

表 5 不同物種表皮分泌黏液之功能比較

動物名	黏液功能類似處	黏液功能差異處	參考文獻
G. tigrina (淡水渦蟲)		1.幫助捕捉獵物	This study Miller & Harley(2001)
A. triangulata (陸生渦蟲)		1.具神經毒素可麻痺蚯蚓 2.具消化酶可將蚯蚓角質層軟化	McGee, *et al.*(1998)
陸生蝸牛	1.幫助爬行運動及附著於物體上 2.保護身體防乾燥 3.避免被天敵捕食	1.抗病菌侵襲 2.促進皮膚再生與癒合 3.保持皮膚彈性 4.防止紫外線傷害	Iguchi, *et al.*(1982) 戎(2015)
大多數魚類 (包含淡水生及海生)		1.抗病菌及寄生物等的侵襲	黃等(2009)

三、研究貢獻及未來應用(作者自行繪製)

設計為實驗課程



提供黏液收集方法

黏液具防治潛能

開發仿生材料

柒、研究結論

一、淡水渦蟲會在體外行物理消化，再將小單位食塊吸入體內化學消化分解吸收。

二、淡水渦蟲捕食時，多從蚊幼蟲腹部末端或肛進行攻擊，並以口部的收縮及舒張破壞蚊幼蟲幾丁質外殼，再以咽內的體積變化產生負壓將食物吸入。

三、淡水渦蟲黏液中含有多醣和蛋白質。

四、有無蚊幼蟲環境並不影響淡水渦蟲黏液分泌量，但淡水渦蟲在捕捉蚊幼蟲時可能有分泌不同的蛋白質，未來須進一步實驗。

五、淡水渦蟲黏液中有 8 種以上蛋白質，以分子量 15 kDa 之黏液蛋白為主要成分，經初步定序可能為 titin 等。

捌、未來展望

一、將淡水渦蟲黏液蛋白以高速離心過濾法進行濃縮，再進行胺基酸定序。

二、進階評估淡水渦蟲黏液用於防治蚊幼蟲的可行性。

三、分析淡水渦蟲黏液蛋白是否具有抗菌及酵素分解等功能，及是否還有其他應用價值。

四、進一步探討淡水渦蟲在捕食蚊幼蟲及爬行時所分泌的黏液是否有差異。

五、評估淡水渦蟲黏液是否可以應用於防水性黏著劑及抗菌材料研發。

玖、參考資料

一、Miller, S. A. & Harley, J. P. (2001)。動物學(下冊)，藝軒圖書出版社。

二、王琳雅、郭應廷(2016)。中華民國第 56 屆中小學科學展覽會作品說明書：「孑」地任務－渦蟲捕食白線斑蚊幼蟲之生物防治評估。

三、戎茜(2015)。動物黏液的功能與利用概述。*生物學教學*第 40 卷第 11 期。

四、黃智慧、馬愛軍、汪岷(2009)。魚類體表黏液分泌功能與作用研究進展。*海洋科學* 第 33 卷第 1 期。

五、Blaustein, L.,Dumont, H.J.(1990).Typhloplanid flatworms (***Mesostoma*** and related genera): Mechanisms of predation and evidence that they structure aquatic invertebrate communities. ***Hydrobiologia*** 198: 61-77.

六、Case, T. J., & Washino, R. K. (1979). Flatworm Control of Mosquito Larvae in Rice Fields. ***Science New Series***206: 1412-1414.

七、Iguchi, S. M. M., Aikawa, T., Matsumoto, J. J. (1982). Antibaerial activity of snail mucus mucin. ***Comparative Biochemistry and Physiology***72: 571-574.

八、McGee, C., Wisdom, G. B., Fairweather, I., Blackshaw, R. P., Mcllroy, J., Walker, B. (1998). Characterization of the Proteins Present in the Mucus of the Flatworm ***Artioposthia triangulata***(Dendy). ***Comparative Biochemistry and Physiology*** 119B: 293-298.