

中華民國第 58 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

第三名

052001

驚爆「膠」點-虎紋三角渦蟲黏液功能分析

學校名稱：新北市私立竹林高級中學

| | |
|---------------|--------------|
| 作者： 高一 徐亦萱 | 指導老師： 顏嘉怡 |
|---------------|--------------|

關鍵詞：渦蟲、酵素、醣蛋白

摘要

本研究進行虎紋三角渦蟲黏液功能分析。利用銀染染色 SDS-PAGE，並以 ImageJ 分析，發現渦蟲捕食蚊幼蟲後黏液中總蛋白質量有增加。以酵素檢測盤測試渦蟲於捕食蚊幼蟲時會分泌不同於平時爬行時酵素 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase，幫助行體外化學消化。以 PAS 染色 SDS-PAGE 推測渦蟲黏液中醣蛋白分子量小於 10 kDa。未來將持續進行渦蟲黏液分析，以 Western blot 找出渦蟲黏液中酵素分子量位置。未來也將進行渦蟲黏液應用價值評估，尋找出具有黏性的醣蛋白種類，並探討是否可製成防水黏著劑。

壹、研究動機

埃及斑蚊及白線斑蚊是台灣傳播登革熱病毒的主要病媒蚊，過去台灣登革熱主要流行於南地區，而 2017 年 9 月新北市鶯歌爆發登革熱 (自由時報)，2018 年 5 月台北市亦爆發了首例登革熱病毒 (聯合新聞網)，可見全台都可能發生登革熱，因此登革熱是持續且須被重視的議題。王與郭於研究中提到淡水渦蟲會利用黏液纏住蚊幼蟲，協助其捕食 (王與郭，2016)，因此今年我們針對渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液進行分析，探討其黏液在捕食蚊幼蟲時所扮演的角色，如渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質種類、總蛋白質濃度及酵素種類的差異。王利用簡易染色法得知渦蟲爬行時黏液中含醣蛋白 (王，2017)。由於醣蛋白通常為動物黏液中具有黏性的成分 (Allen *et al.*, 1984)，因此我們利用 PAS 染色 SDS-PAGE，確認渦蟲黏液中的醣蛋白分子量。未來找出其黏液中具有黏性的成分後，評估其黏液是否可以製成防水黏著劑，以利日常生活的應用。

貳、研究目的與問題

- 一、渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類及總蛋白質濃度。
- 二、渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液酵素種類與活性。
- 三、渦蟲黏液醣蛋白種類。

參、研究設備及器材

一、實驗動物

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

1. 來源：台灣台北市權東路水族館。
2. 虎紋三角渦蟲成扁平葉狀，長 5-30 mm，寬 1-5 mm，顏色多成褐色，頭部呈三角形，故得此名。頭部三角形的部分為耳突，可以偵測獵物的位置，黑色圓點部分為其眼點，具有感光的功能。其咽位於腹部，具有攝食的功能 (圖 1)。
3. 將渦蟲飼養於放有石頭及竹炭片的水族箱中，外掛過濾器打入氣體，每日以蝦或蚊幼蟲餵食一次。
4. 由於王所使用渦蟲數量為 6 隻且爬行隔夜 (王，2017)，為了要減少收集渦蟲黏液時間，本實驗將增加渦蟲數量並且縮短渦蟲爬行時間，利用 24 隻渦蟲爬行 60-90 分鐘進行實驗。

(二) 白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)

1. 由台大環境衛生所提供。
2. 生活史分為 4 個階段，卵-幼蟲 (俗稱孑孓)-蛹-成蟲。其成蟲大致呈黑色，腳上有白色條紋，故得此名 (圖 2)。
3. 本實驗所使用蚊幼蟲為 3、4 齡。

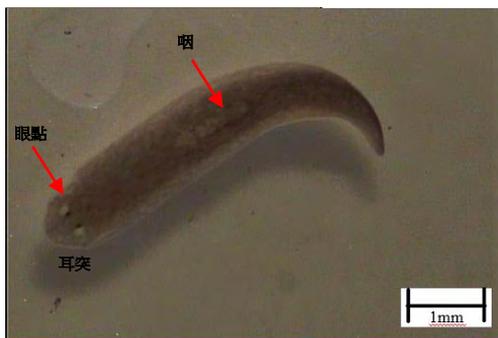


圖 1：虎紋三角渦蟲



圖 2：白線斑蚊幼蟲

二、實驗藥品、設備及器材

(一) Bradford method 使用器材、藥品及配方

| 名稱 | 廠牌 |
|--------------------------------|------------|
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | 購自 CHONEYE |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | 購自 SIGMA |
| 分光光度計 | 購自 WALTER |
| ELISA reader | 購自 BioTek |
| Protein Assay | 購自 BIO-RAD |

Coomassie Brilliant Blue G-250 reagent

| 藥品 | 使用量 |
|--------------------------------|--------|
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | 0.01 g |
| 95% Ethanol | 5 mL |
| 85% phosphoric acid | 10 mL |
| ddH ₂ O | 100 mL |

(二) SDS-PAGE 使用器材、藥品及配方

| 名稱 | 廠牌 |
|--|------------------|
| ddH ₂ O | - |
| 1X Running buffer | |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain buffer | 自行配置 |
| 4X Sample Loading Buffer | |
| RIPA lysis buffer | |
| Methanol | 購自聯工化學 |
| Waver shaker | 購自 Major Science |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR-250) Protein Marker (10–250 kDa) | 購自 BIO-RAD |
| 乾浴槽 | 購自 Thermo |
| 冷光影像分析系統 | 購自 UVP |
| 玻璃瓶 (容量 30mL, 半徑 1.25 公分、高 5 公分) | 購自 KIMBLE CHASE |

1X Running buffer

| 藥品 | 使用量 |
|--------------------|--------|
| Tris base | 3 g |
| Glycine | 14.4 g |
| SDS | 1 g |
| ddH ₂ O | 加至 1 L |

4X Sample Loading Buffer

| 藥品 | 使用量 |
|-----------------------|--------------|
| Laemmli Sample Buffer | 1900 μ L |
| 2-Mercaptoethanol | 100 μ L |

Coomassie Brilliant Blue R-250 reagent

| 藥品 | 使用量 |
|--------------------------------|--------|
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | 0.25 g |
| Acetic acid | 10 mL |
| Methanol | 50 mL |
| ddH ₂ O | 40 mL |

Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain buffer

| 藥品 | 使用量 |
|--------------------|-------|
| Acetic acid | 10 mL |
| Methanol | 40 mL |
| ddH ₂ O | 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% Na-deoxycholate |

(三) API system 使用器材、藥品及配方

| 名稱 | 廠牌 |
|--------------------|------------|
| API system | |
| 試劑 ZYM A | 購自今日儀器 |
| 試劑 ZYM B | |
| ddH ₂ O | - |
| 恆溫箱 | 購自 CHANNEL |

(四) PAS 染色使用藥品

| 藥品 | 廠牌 |
|--------------------------------------|-------------|
| Casein , from milk | 購自 SHIMAKYU |
| Sodium Metabisulfite Hydrochloric | 購自 CHONEYE |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | 購自 SIGMA |

(五) 銀染使用器材、藥品及配方

| 名稱 | 廠牌 |
|---------------------------|-----------------------|
| 離心管 | 台大環衛所提供 (容量：50 mL) |
| SilverQuest™ Staining Kit | 購自 invitrogen |
| ddH ₂ O | - |

(六) 其他使用器材

| 名稱 | 廠牌 |
|-------------|--------------|
| CCD 顯微數位攝影 | 購自瑞光儀器 |
| 電子秤、量筒 | |
| 培養皿 (玻璃、塑膠) | 購自 ExtraGene |
| 曝氣水 | 靜置一天後之自來水 |

SilverQuest™ Staining Kit

藥品

Destainer A

Destainer B

Sensitizer

Developer

Developer Enhancer

Stopper

肆、研究過程或方法

一、實驗架構圖

本實驗主要針對虎紋三角渦蟲進行黏液功能分析。王與郭於 2016 年進行了渦蟲品種鑑定、渦蟲捕食能力的評估及渦蟲對於環境容忍度的測試。王於 2017 年進行渦蟲捕食行為和渦蟲黏液功能與成分的初步分析。本實驗將延續其實驗，針對渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液進行分析，並探討其黏液中醣蛋白種類 (圖 3)。

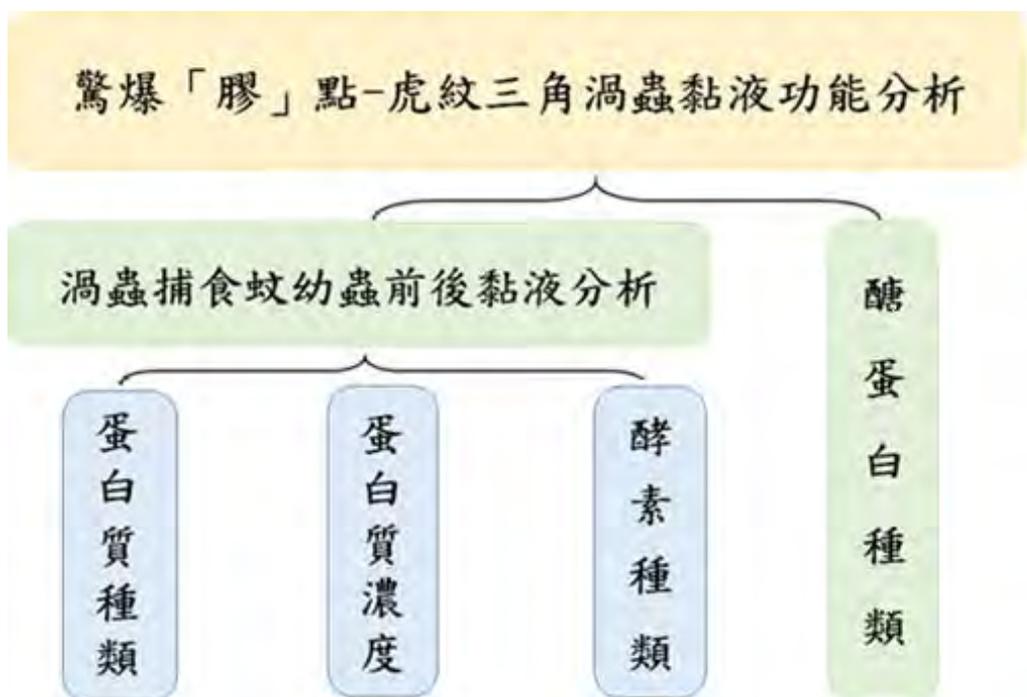


圖 3：實驗架構圖

二、實驗樣本組別配置

本實驗所使用之樣本組別如表 1 所示。

表 1：渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液分析實驗樣本配置及處理方法

| 樣本名稱 | 樣本處理方法 |
|---------------|---|
| 渦蟲組 (對照組) | 24 隻渦蟲爬行於 0.5 mL ddH ₂ O 玻璃罐中 60-90 分鐘後，移除渦蟲 |
| 蚊幼蟲組 (對照組) | 4 隻蚊幼蟲於 0.5 mL ddH ₂ O 玻璃罐中 60-90 分鐘後，移除蚊幼蟲 |
| 蚊幼蟲受傷組 (對照組)* | 4 隻凍死並剪斷身體之蚊幼蟲於 0.5 mL ddH ₂ O 玻璃罐中 60-90 分鐘後，移除蚊幼蟲 |
| 共存組 (實驗組)* | 24 隻渦蟲與 4 隻蚊幼蟲共存於 0.5 mL ddH ₂ O 玻璃罐中 60-90 分鐘後，移除渦蟲及蚊幼蟲 |
| 捕食組 (實驗組)* | 24 隻渦蟲捕食 4 隻蚊幼蟲於 0.5 mL ddH ₂ O 玻璃罐中，捕食完畢後，移除渦蟲及蚊幼蟲 |

*蚊幼蟲受傷組為將蚊幼蟲凍死後剪斷其身體的對照組；共存組為使飽食渦蟲和蚊幼蟲共存於罐中，並且未被取食；捕食組為使渦蟲捕食罐中所有蚊幼蟲完畢。

三、實驗步驟

(一) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類及總蛋白質濃度

為了要探討渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中是否含有不同種類蛋白質，以及探討其於捕食蚊幼蟲時是否會分泌大量黏液，本實驗利用 SDS-PAGE，並且以銀染方法分析渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中蛋白質種類是否具有差異；利用 ELISA reader 檢測渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液總蛋白質濃度的差異。

1. 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類

將樣本 (表 1) 與 4X Sample Loading Buffer 以 3 : 1 於離心管中混合，放入乾浴槽 100°C 反應 10 分鐘，反應完成後立即將樣本放於冰上，樣本分別注入膠體的凹洞內，以 120 V 跑 1 個小時左右。將上膠切去，下膠於低速搖晃 (45 rpm) 下，以 SilverQuest™ Staining kit 染色，染色完成便以 ddH₂O 清洗膠體，將膠片放入冷光影像分析系統中照相，最後以 ImageJ 比較蛋白質色帶亮度是否有差異 (膠體蛋白質濃度)。

2. 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液總蛋白質濃度

首先以 2 mg BSA 加入 1 mL ddH₂O 中作為原液進行連續對半稀釋，再將稀釋後 BSA 溶液及 Protein Assay 以 1:20 的比例混和，於室溫下反應 5 分鐘，利用 ELISA reader 測取 OD₅₉₅ 吸光值，畫出蛋白質標準曲線圖 (n=3)(圖 4)。

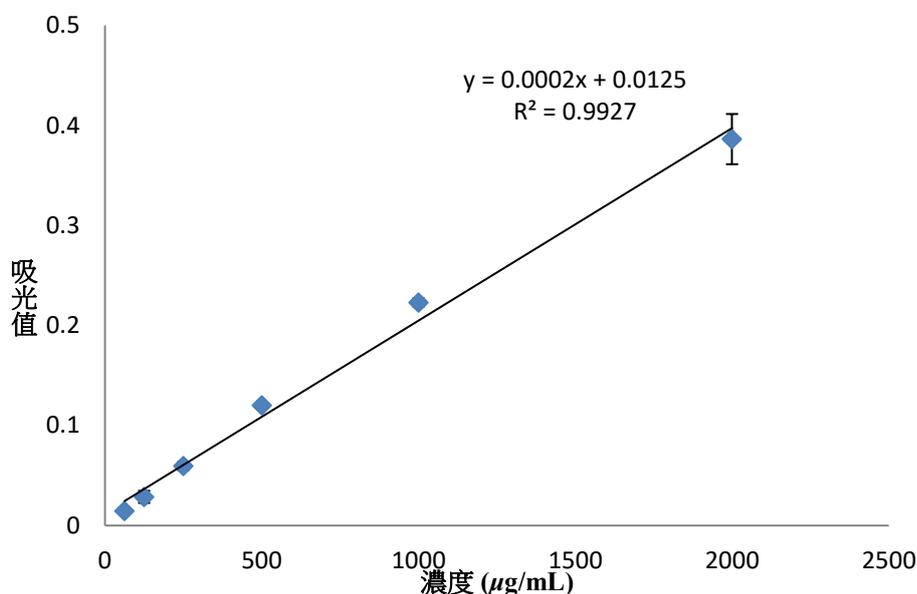


圖 4：BSA 蛋白質標準曲線圖

各實驗樣本組別與 Protein Assay 同樣也以 1:20 的比例混和 (表 1)，於室溫下反應 5 分鐘，利用 ELISA reader 測取樣本 OD₅₉₅ 吸光值。將各實驗樣本組別吸光值以內插法計算各樣本總蛋白質濃度。

(二) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液酵素種類與活性

王發現渦蟲捕食蚊幼蟲會於體外行物理消化，未證明其是否會於體外行化學消化 (王，2017)。為了要進一步確認渦蟲於捕食蚊幼蟲時體外黏液中是否含酵素幫助其進行消化蚊幼蟲，本實驗利用生物檢測盤 (API system) 檢測渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中酵素種類與活性。

1. 測定總蛋白質濃度

首先以 2 mg BSA 加入 1 mL ddH₂O 作為原液進行連續對半稀釋，再將稀釋後 BSA 溶液及 Protein Assay 以 1:20 的比例混和，於室溫下反應 5 分鐘，利用 ELISA reader 測取 OD₅₉₅ 吸光值，畫出蛋白質標準曲線圖 (n=3)(圖 5)。

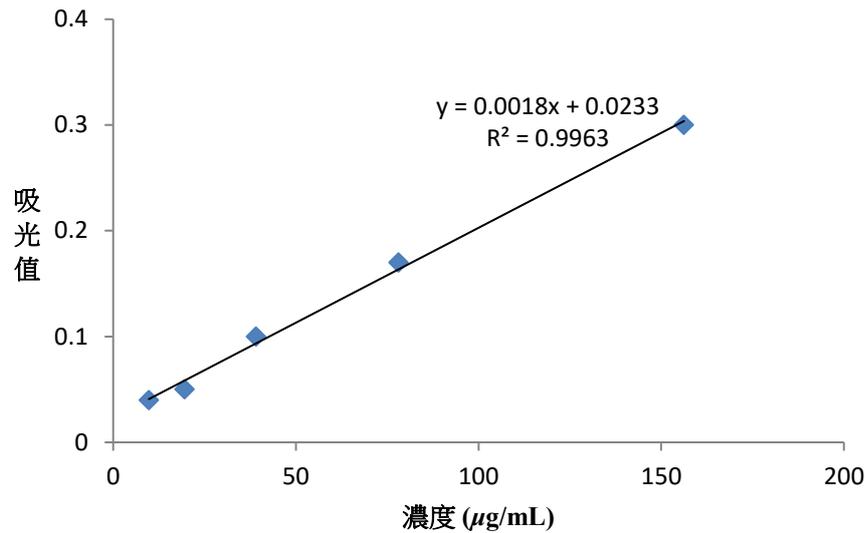


圖 5：BSA 蛋白質標準曲線圖

2. 樣本處理

每個實驗樣本組別分別都有 9 罐 (表 1)，將各樣本所有罐中水溶液收集成 1 管，共 4.5 mL。以 5 : 1 的比例加入 Coomassie Brilliant Blue G-250 及各實驗樣本組別 (表 1)，於室溫下反應 5 分鐘。將各實驗樣本組別吸光值以內插法計算總蛋白質濃度。

3. 酵素檢測盤中檢測渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液酵素種類與活性

各實驗樣本組別 (表 1) 分別滴入酵素檢測盤 (API system) 中，每格 65 µL，共 20 格 (n=3)。將酵素檢測盤 (API system) 放入 30°C 恆溫箱，靜置隔夜。隔天取出酵素檢測盤，滴入 ZYM A 和 ZYM B，避光，於室溫下靜置 5-15 分鐘後觀察結果。表 2 為酵素檢測盤各反應判讀標準。

表 2：酵素檢測盤各反應酵素及判讀標準

| Enzymes | 正反應 (+) | Enzymes | 正反應 (+) | Enzymes | 正反應 (+) | Enzymes | 正反應 (+) | Enzymes | 正反應 (+) |
|-------------------------|---------|------------------------|---------|--------------------------------|---------|---------------------|---------|--------------------------------|---------|
| 1. Control | 黃色 | 5. Lipase(C14) | 紫色 | 9. Trypsin | 橘色 | 13. α-galactosidase | 紫色 | 17. β-glucosidase | 紫色 |
| 2. Alkaline phosphatase | 紫色 | 6. Leucine arylamidase | 橘色 | 10. α-chymotrypsin | 橘色 | 14. β-galactosidase | 紫色 | 18. N-acetyl-β-glucosaminidase | 棕色 |
| 3. Esterase(C4) | 紫色 | 7. Valine arylamidase | 橘色 | 11. Acid phosphatase | 紫色 | 15. β-glucuronidase | 藍色 | 19. α-mannosidase | 紫色 |
| 4. Esterase Lipase(C8) | 紫色 | 8. Cystine arylamidase | 橘色 | 12. Naphthol-AS-BI-phosphatase | 藍色 | 16. α-glucosidase | 紫色 | 20. α-fucosidase | 紫色 |

編號 1 為負對照組，負反應為和編號 1 呈相同顏色

(三) 渦蟲黏液醣蛋白種類

醣蛋白通常為動物黏液中具有黏性的成分 (Allen *et al.*, 1984)，先前使用簡易染色法證明渦蟲黏液中含有醣蛋白 (王, 2017)，因此我們利用 PAS 染色 SDS-PAGE 確認渦蟲黏液中醣蛋白分子量。

將渦蟲組樣本與 4X Sample Loading Buffer 以 3 : 1 混合，離心後於乾浴槽 100°C 反應 10 分鐘，加溫完成後立即將樣本放於冰上，將 20 μ L 樣本分別注入膠體小凹洞中，以 120 V 跑 1 個小時左右。跑膠完成後，切去上膠，下膠於低速搖晃 (45 rpm) 下，進行 PAS 染色。我們參考了 Wang, *et al.* 和 Streitz, *et al.* 的實驗。除了 Wang, *et al.* 的染色方法多了一次退染的動作 (將膠片泡入 0.1 % 焦亞硫酸鈉於 0.01 M 鹽酸中 5 分鐘)，目的是為了要使背景顏色更淡，其餘的染色原理均與 Streitz, *et al.* 的實驗相同。

參考 Wang, *et al.* 的實驗：首先將膠片泡入 ddH₂O 中，清洗 10 分鐘。接著泡入 1 % 高碘酸、3 % 醋酸溶液中 30 分鐘。將膠片取出泡入 0.1 % 焦亞硫酸鈉於 0.01 M 鹽酸中，每次 5 分鐘，進行 2 次。取出膠片放入席夫試劑 (schiff's) 中，浸泡 10-15 分鐘，最後再將膠片泡入 0.1 % 焦亞硫酸鈉於 0.01 M 鹽酸中 5 分鐘。反應完成後以 ddH₂O 清洗膠片，並且放入冷光引影像分析系統中照相。

參考 Streitz, *et al.* 的實驗：首先將膠片泡入 12 % 三氯乙酸中 20 分鐘，接著泡入 1 % 高碘酸中，避光反應 25 分鐘。取出膠片放入席夫試劑 (schiff's)，避光反應 10-15 分鐘。最後將膠片泡入 0.5 % 焦亞硫酸鈉，每次 5 分鐘，進行 2 次。反應完成後以 ddH₂O 清洗膠片，並且放入冷光引影像分析系統中照相。

四、以 ImageJ 分析 SDS-PAGE 色帶亮度。

圈取 SDS-PAGE 上渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中蛋白質色帶，進行其色帶亮度面積大小比較。

伍、研究結果

結果一、渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液分析

(一) 蛋白質種類 (單體蛋白)

於圖 6 銀染膠片中看到渦蟲組、共存組及捕食組蛋白質都於分子量 10-15 kDa 位置有最明顯的色帶 (紅色框)，透過 ImageJ 分析色帶亮度如圖 7 (藍色斜線)，卻可以發現於捕食組蛋白質分子量 10-15 kDa 色帶亮度面積大於渦蟲組、蚊幼蟲組及共存組。

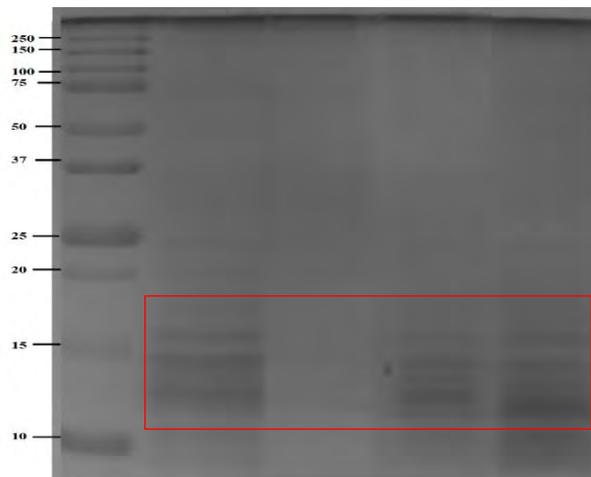


圖 6：以銀染分析渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質電泳圖(n=3)

膠片濃度為 15 %。M 為分子量 10-250 kDa 之標準品。渦蟲組為只有渦蟲的對照組；蚊幼蟲組為只有蚊幼蟲的對照組；共存組為使飽食渦蟲和蚊幼蟲共存於罐中，並且為未被取食；捕食組為使渦蟲將罐中所有蚊幼蟲捕食完畢。樣本皆利用 RIPA lysis buffer 回溶。注入樣本量：20 μ L。

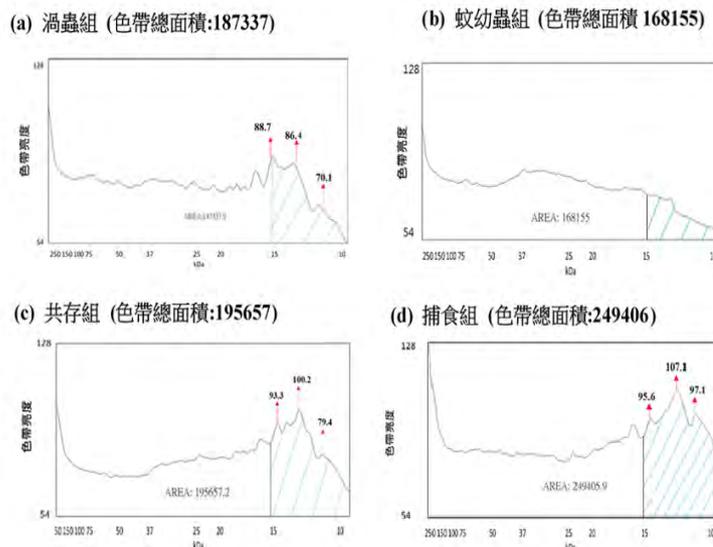
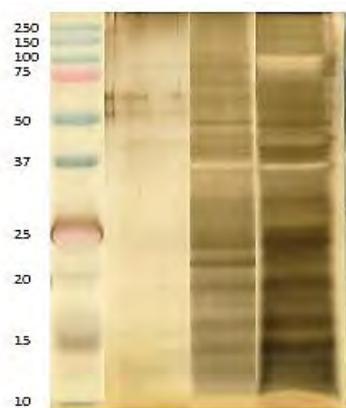


圖 7：分析圖 6 色帶亮度

以 ImageJ 進行分析，紅色箭頭為該點之色帶亮度，藍色斜線區域代表 10-15kDa 之色帶亮度總面積。

圖8銀染膠片中可以發現共存組及捕食組黏液中蛋白質於分子量10-15、20-25、37-50及75-100 kDa均有明顯的色帶，渦蟲組於分子量10-15 kDa有明顯的色帶。為了確認樣本組別之色帶亮度是否具有差異，利用ImageJ分析(圖9)，發現捕食組分子量10-15、20-25、35-50及75-100 kDa之色帶亮度均高於渦蟲與共存組。



M 渦蟲組 共存組 捕食組

圖8：以銀染分析渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質電泳圖(n=3)

膠片濃度為15%。樣本皆利用RIPA lysis buffer回溶。渦蟲組為只有渦蟲的對照組；共存組為使飽食渦蟲和蚊幼蟲共存於罐中，並且未被取食；捕食組為使渦蟲將罐中所有蚊幼蟲捕食完畢。樣本皆利用RIPA lysis buffer回溶。注入樣本量：30 μL。

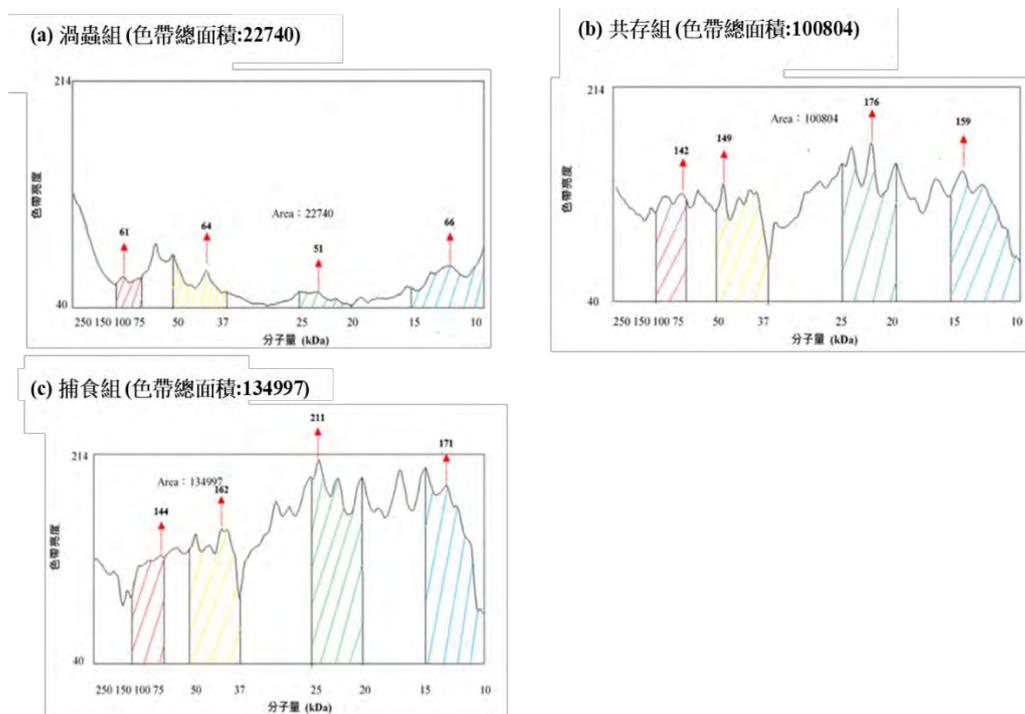


圖9：分析圖8色帶亮度

以ImageJ進行分析，紅色箭頭為該點之色帶亮度。斜線代表該分子量位置總色帶亮度面積，藍色為10-15 kDa、綠色為20-25 kDa、黃色為37-50 kDa、紅色為75-100 kDa之色帶亮度總面積。

【實驗討論】

1. 渦蟲於捕食蚊幼蟲後黏液總蛋白質量有增加的情形

根據圖 7、9 實驗結果，可以發現捕食組色帶亮度總面積高於渦蟲組、蚊幼蟲組及共存組。因此我們初步推測渦蟲於捕食蚊幼蟲後黏液中總蛋白質量有增加的情形。

2. 渦蟲黏液蛋白質色帶於每次實驗所呈現位置具有差異

觀察圖 6、8 的實驗結果，可以發現渦蟲組蛋白質色帶位置具有差異，而 Dongmei (2007) 研究中也提到，利用 SDS-PAGE 檢測陸生蛞蝓黏液蛋白質種類無法於每次實驗都得到相同的色帶位置，文獻顯示目前沒有找到明確的原因可以解釋其結果。但是我們可以發現，圖 6、8 渦蟲蛋白質於分子量 10-15 kDa 均有色帶。

3. 渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中蛋白質含 20 種以上單體

根據 ImageJ 分析的結果 (圖 6、8)，可以發現渦蟲組、共存組及捕食組蛋白質色帶亮度具有差異，推測可能含不同種類的蛋白質單體。而目前我們推測渦蟲捕食蚊幼蟲後黏液中蛋白質應含 20 種以上的單體。

4. 蚊幼蟲受傷不會影響捕食組實驗結果

為了排除銀染膠片中捕食組樣本組別含有蚊幼蟲蟲體蛋白質，我們將蚊幼蟲凍死後剪斷其身體，泡在水裡 1 小時進行跑膠。根據圖 10 (紅色框)，可以發現蚊幼蟲受傷組不具任何色帶，因此我們推測蚊幼蟲受傷並不會影響捕食組黏液中的蛋白質色帶位置。

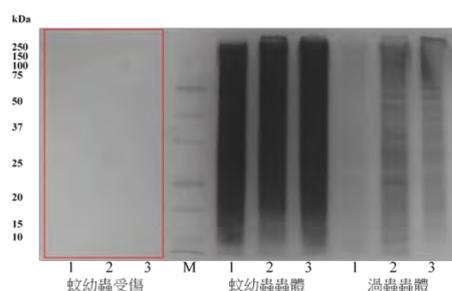


圖 10：以銀染分析對照組之蛋白質電泳圖

膠片濃度為 15%。M 為分子量 10-250 kDa 之標準品。蚊幼蟲受傷組為將蚊幼蟲凍死之後剪斷其身體之對照組；蚊幼蟲蟲體組別為將蚊幼蟲搗碎之對照組；渦蟲蟲體為將渦蟲搗碎之對照組。數字代表重複次數。注入樣本量：20 μ L。

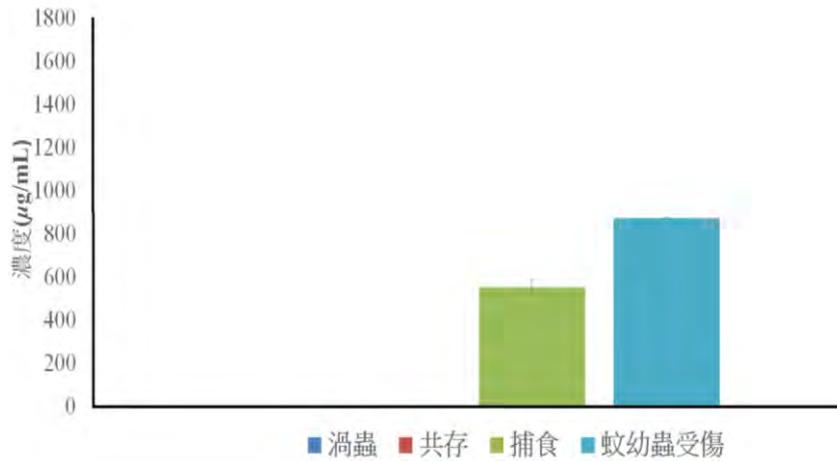
5. 以不同時間利用 RIPA lysis buffer 回溶之樣本組別得到黏液蛋白質量有差異

進行圖 6 銀染時，利用 RIPA lysis buffer 沖洗罐中渦蟲黏液後，立即取出渦蟲黏液；進行圖 8 銀染實驗時，則以 RIPA lysis buffer 回溶罐中渦蟲黏液 10 分鐘，再取出渦蟲黏液。根據實驗結果，可以發現經長時間 RIPA lysis buffer 回溶之樣本組別（圖 8）回收蛋白質量較多。未來收集樣本組別時，我們會將 RIPA lysis buffer 回溶 10 分鐘後，取出罐中渦蟲黏液，最後再進行跑膠。

(二) 捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質總濃度差異

圖 11 為以 ELISA reader 檢測渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中總蛋白質濃度結果 (n=3)。根據圖 a 可以發現捕食組總白質濃度高於渦蟲組與共存組，而渦蟲組與共存組水溶液總蛋白質濃度很低。根據圖 b 則可以看到所有樣本組別總蛋白質濃度高於圖 a 的樣本組別，而共存組總蛋白質濃度則高於渦蟲組與捕食組。

(a) 樣本組別之水溶液



(b) 以 RIPA lysis buffer 回溶樣本組別

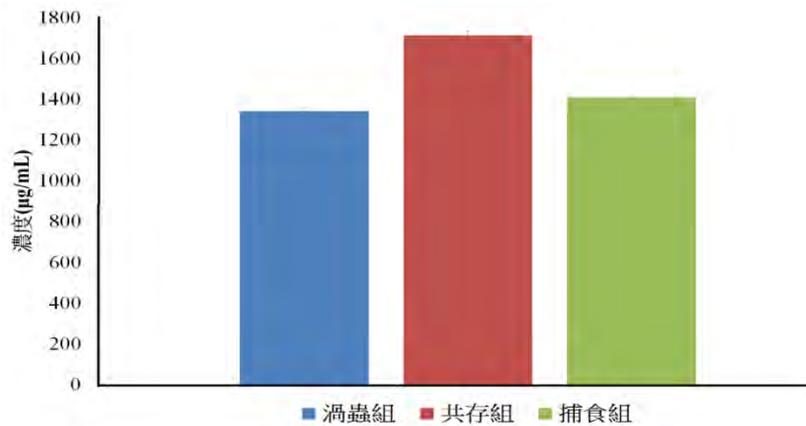


圖 11：利用 ELISA reader 測量渦蟲於捕食前後蛋白黏液濃度差異 (n=3)

渦蟲組為僅有渦蟲的對照組；共存組為使飽食渦蟲和蚊幼蟲共存於罐中，並且未被取食；捕食組為渦蟲捕食蚊幼蟲的實驗組；蚊幼蟲受傷組為將蚊幼蟲凍死後剪斷其身體的對照組。

【實驗討論】

1. 以 RIPA lysis buffer 回溶所得樣本濃度較高

根據實驗結果 (圖 11) 可以發現以 RIPA lysis buffer 回溶樣本組別能測得較高的總蛋白質濃度。初步推測因渦蟲黏液中多含疏水性蛋白質，無法溶於水，利用 RIPA lysis buffer 則能使渦蟲黏液溶於其中。我們也推測可能是因為 RIPA lysis buffer 中含鹽類，導致其干擾測取吸光值的結果。未來會利用 DC Protein Assay，降低干擾，並且再次進行渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度的測試。

2. 將圖 11 中圖 a 及圖 b 進行比較

根據圖 a，可以發現捕食組總蛋白質濃度高於渦蟲組與共存組；根據圖 b，卻可以發現共存組總蛋白質濃度高於渦蟲組與捕食組。初步推測可能是因為 RIPA lysis buffer 所溶解之蛋白質量有差異，導致共存組所測出之樣本總蛋白質濃度最高；推測也有可能是因為 RIPA lysis buffer 中所含鹽類干擾測取吸光值之結果。

3. RIPA lysis buffer 無法畫出蛋白質標準曲線

圖 12 為將水、RIPA lysis buffer 加入 Coomassie Brilliant Blue G-250 後的顏色變化。我們可以發現以水為溶劑之圖 a 所得到溶液為 Coomassie Brilliant Blue G-250 的顏色，但以 RIPA lysis buffer 為溶劑之圖 b 所得到的卻為藍色。而我們利用 RIPA lysis buffer 進行連續稀釋 BSA 時所得到樣本顏色也均為藍色。我們推測 RIPA lysis buffer 中含鹽類會干擾吸光值的測定，導致無法畫出蛋白質標準曲線圖，未來會以 DC Protein Assay 降低干擾的情形。

(a) 水 (b) RIPA lysis buffer



圖 12：將 Coomassie Brilliant Blue G-250 加入水、RIPA lysis buffer 呈色結果

(三) 酵素種類

圖 13 為將所有樣本組別進行比較，根據實驗結果可以發現共存組和渦蟲組、蚊幼蟲組相較之下多出的酵素為 Leucine arylamidase (藍色箭頭)，捕食組和渦蟲組、蚊幼蟲組及共存組相較之下多出的酵素為則 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase (紅色箭頭)。

A. ddH₂O 組



B. 渦蟲組 (48 μ g/mL)



C. 蚊幼蟲組 (2 μ g/mL)



D. 蚊幼蟲屍體組



E. 共存組 (26 μ g/mL)



F. 捕食組 (31 μ g/mL)



圖 13：滴入反應劑後的酵素檢測盤呈色結果

A-E 組每格皆加入 65 μ L 的樣本，檢測盤均隔夜放置於 30°C 恆溫箱中。取出酵素檢測盤後滴入 ZYMA、ZYMB，於室溫下避光 5 分鐘後觀察呈色結果。編號 1 為不具有任何物質之對照組。蚊幼蟲屍體組為將被渦蟲捕食之蚊幼蟲清洗過後泡於水之對照組。

【實驗討論】

1. 首次利用 API system 確認虎蚊三角渦蟲黏液中酵素種類與活性

在 McGee *et al.* 研究中提到其利用 API system 分析陸生渦蟲黏液中酵素，但是尚未有人利用 API system 分析淡水渦蟲黏液中所含酵素。本研究首次利用 API system 分析，初步發現渦蟲於爬行時黏液中含有 Esterase (C4) (編號 3)、Esterase Lipase (C8)(編號 4)、Acid phosphatase (編號 11)及 Naphthol-AS-BI-phosphatase (編號 12)。

2. 將共存組的酵素與渦蟲組和蚊幼蟲組進行比較 (表 3)

共存組相較渦蟲組與蚊幼蟲組多出的酵素為 Leucine arylamidase (編號 6)；Alkaline phosphatase (編號 2) 僅在蚊幼蟲組及共存組出現，推測共存組的 Alkaline phosphatase 源自蚊幼蟲本身；觀察 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (編號 12) 的結果 (圖 12)，發現共存組顏色較偏藍色，而蚊幼蟲組所含的此種酵素也較渦蟲組多；因此推測共存組 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase 也是源自蚊幼蟲本身。

3. 將捕食組的酵素與其他組別進行比較 (表 3)

將捕食組、渦蟲組及蚊幼蟲組的酵素進行比較，可以發現捕食組額外含有的酵素為 Lipase (編號 5)、 β -galactosidase (編號 14) 及 N-acetyl- β -glucosaminidase (編號 18)。根據我們的實驗結果 (圖 3)，發現渦蟲於捕食為幼蟲時會分泌出較平常多的酵素，初步推測其會於體外行化學消化。

表 3 樣本酵素比較

| Enzymes | 渦蟲組 | 蚊幼蟲組 | 蚊幼蟲屍體組 | 共存組 | 捕食組 |
|--|-----|------|--------|-----|-----|
| Alkaline phosphatase (鹼性磷酸酶) | - | + | + | + | - |
| Esterase (C4) (酯酶) | + | + | - | + | + |
| Esterase Lipase (C8) (酯酶分解脂酶) | + | - | - | - | + |
| Lipase (脂肪酶) | - | - | - | - | + |
| Leucine arylamidase (亮氨酸芳基酰胺酶) | - | - | - | + | + |
| Acid phosphatase (磷酸水解酶) | + | - | - | + | + |
| Naphthol-AS-BI-phosphatase (萘酚磷酸水解酶) | + | + | + | + | + |
| β -galactosidase (β -葡萄糖苷酶) | - | - | - | - | + |
| N-acetyl- β -glucosaminidase (N-乙酰醯- β -葡萄糖胺酶) | - | - | - | - | + |

渦蟲組為只有渦蟲的對照組；蚊幼蟲屍體組為將被渦蟲捕食之蚊幼蟲清洗過後泡於水之對照組；共存組為使飽食渦蟲和蚊幼蟲共存於罐中，並且未被取食；捕食組為使渦蟲將罐中所有蚊幼蟲捕食完畢。紅色字代表渦蟲與捕食時將較於爬行時黏液中額外含有的酵素。

4. 推測 Leucine arylamidase 之功能

於表 3 中可以發現共存組具 Leucine arylamidase (編號 6)，渦蟲組、蚊幼蟲組則無。彭等人於研究中提到蟲生真菌蛋白酶的分泌產生與昆蟲體壁的誘發有關 (彭等人, 2010)。由於蚊幼蟲體表含蛋白質成分，我們推測共存組所出現 Leucine arylamidase 是因受到蚊幼蟲體壁的誘發而分泌。

5. 蚊幼蟲屍體不會影響捕食組的實驗結果 (表 3)

為了避免蚊幼蟲屍體影響捕食組實驗結果，本實驗將被渦蟲捕食之蚊幼蟲泡於水裡，檢測樣本酵素種類與活性。根據實驗結果可以發現蚊幼蟲屍體組組所含酵素為 Alkaline phosphatase (編號 2) 及 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (編號 12)，因此證明渦蟲於捕食蚊幼蟲時黏液中所含 Lipase (編號 5)、 β -galactosidase (編號 14) 及 N-acetyl- β -glucosaminidase (編號 18) 為渦蟲黏液所分泌，能幫助其消化蚊幼蟲。

6. 未來利用 ELISA reader 檢測反應後 API system 中各樣本酵素濃度

由於利用 API system 僅能進行半定量之分解酵素，確認渦蟲於捕食蚊幼蟲黏液中酵素種類差異，無法看出酵素濃度的差異。未來我們會利用 ELISA reader，掃描全光譜，分析 API system 中酵素的濃度，進行定量。

結果二、渦蟲黏液醣蛋白種類

圖 14 為 PAS 染色渦蟲黏液中醣蛋白實驗結果。由圖 13 可知，以不同 PAS 染色法所得到之渦蟲黏液醣蛋白分子量均位於 10 kDa 以下 (紅色箭頭)。因此根據此實驗結果，初步推測渦蟲黏液中醣蛋白分子量小於 10 kDa。

(a) 參考 Wang, *et al.* 的實驗

(b) 參考 Streitz, *et al.* 的實驗

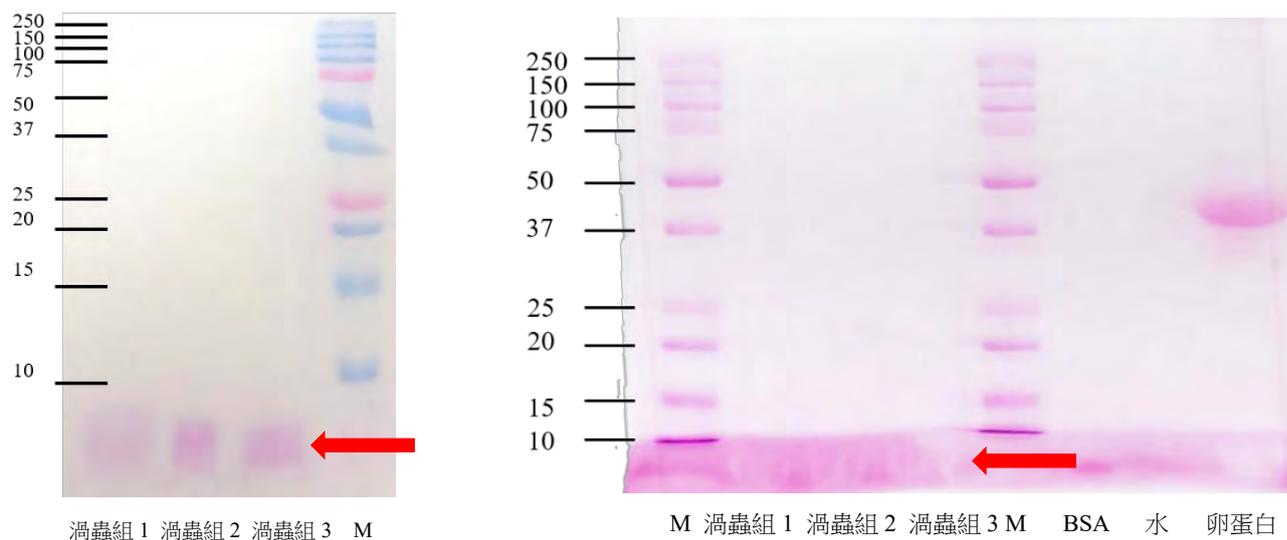


圖 14：以不同 PAS 染色方法確認渦蟲黏液中醣蛋白分子量

膠片濃度為 15%。M 為分子量 10-250 kDa 之標準品。BSA 與水為負對照組，卵蛋白為正對照組。

【實驗討論】

1. 與參考文獻染色結果進行比較

本實驗參考 Wang *et al.* (2017) 的 PAS 染色步驟，其分析小鼠醣蛋白的結果如圖 15。根據圖中結果可以發現其色帶呈長短的差異，於我們的 PAS 染色膠片中 (圖 14) 樣本色帶也出現長短的差異，因此推測我們的 PAS 染色結果具有再現性。

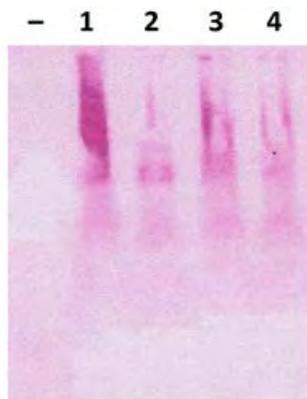


圖 15：以 PAS 染色分析小鼠蛋白 (Wang *et al.*, 2017)

2. 將 PAS 染色樣本進行銀染

為了要確認圖 14 所染出色帶為渦蟲黏液中的醣蛋白分子量，我們利用相同樣本組別進行銀染分析 (圖 16)。根據銀染結果，可以發現對照組 BSA 及卵蛋白皆於銀染膠片上出現正確的色帶位置。因此我們推測本實驗 (圖 14) 以 PAS 所染出的色帶為渦蟲黏液中的醣蛋白。

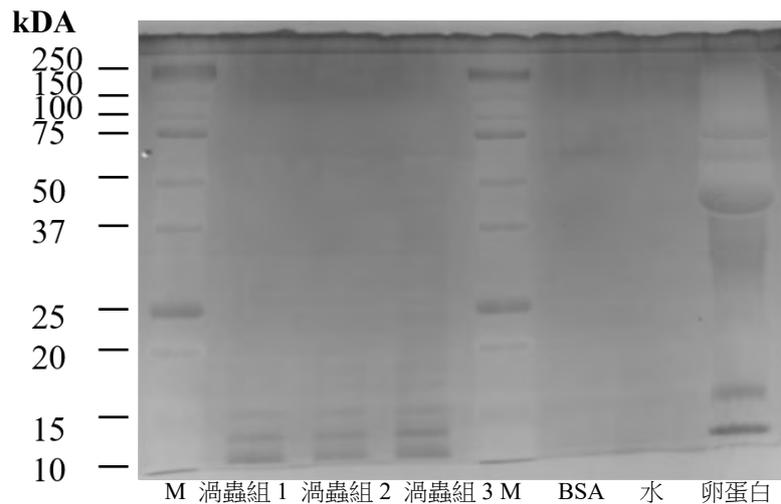


圖 16：以銀染方法確認渦蟲黏液中蛋白質分子量電泳圖

膠片濃度為 15 %。M 為分子量 10-250 kDa 之標準品。BSA 與水為負對照組，卵蛋白為正對照組。

陸、討論

一、渦蟲於捕食前後黏液分析

(一) 酵素種類

1. 比較淡水渦蟲與陸生渦蟲在沒有獵物存在下，爬行時黏液中具有的酵素 (表 3)

將本實驗結果與陸生渦蟲黏液酵素分解研究的文獻 (McGee *et al.*, 1998) 進行比較,發現淡水渦蟲與陸生渦蟲爬行時黏液中均含 Esterase、Esterase Lipase、Acid phosphatase 及 Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase, 由此可以推測淡水渦蟲與陸生渦蟲含有部分相同的酵素 (表 4)。

表 4：淡水渦蟲與陸生渦蟲爬行黏液酵素種類

| 物種 | 淡水渦蟲 | 陸生渦蟲 |
|---------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Enzymes | | |
| Esterase | + | + |
| Esterase lipase | + | + |
| Lipase | - | + |
| Leucine arylamidase | - | + |
| Valine arylamidase | - | + |
| Acid Phosphatase | + | + |
| Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase | + | + |
| | <small>this study</small> | <small>C.McGee et al.,1998</small> |

2. 渦蟲黏液中酵素功能推測

Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase 均為捕食組相較於渦蟲組額外具有的酵素,表 5 為初步推測渦蟲於捕食蚊幼蟲時其黏液中酵素之功能。蚊幼蟲體表成分含脂蛋白與幾丁質,因此初步推測渦蟲黏液中 Lipase 能消化蚊幼蟲體壁和蟲體節間膜; β -galactosidase 可將幾丁質分解成小分子的寡糖 (林與劉, 2004), 而幾丁質是由乙醯葡萄糖胺鍵結連結而成 (黃與陳, 2005), 初步推測渦蟲黏液中所含 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase 能消化蚊幼蟲幾丁質骨骼。綜合了上述實驗結果,推測渦蟲會於體外行化學消化。

表 5：推測淡水渦蟲 (*G. tigrina*) 黏液酵素功能

| 酵素 | 虎紋三角渦蟲 (<i>Girardia tigrina</i>)黏液功能 |
|------------------------------------|--|
| | 捕食時 |
| Lipase | 消化蚊幼蟲體壁和蟲體節間膜 |
| β -galactosidase | 消化蚊幼蟲骨骼 (幾丁質) |
| N-acetyl- β -glucosaminidase | |

(二) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液分析實驗結果進行比較

1. 蛋白質種類與總蛋白質濃度實驗比較

根據蛋白質種類實驗結果可以發現捕食組總蛋白質量有增加的情形；根據總蛋白質濃度實驗結果則可以發現水溶液樣本中，捕食組總蛋白質濃度也有增加的情形。綜合上述實驗結果，初步推測渦蟲於捕食蚊幼蟲後其黏液中總蛋白質濃度有增加。

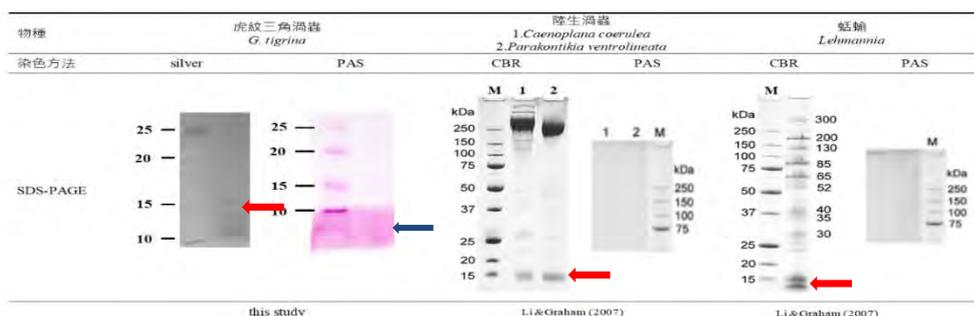
2. 酵素種類與蛋白質種類實驗結果進行比較

根據我們的研究結果，可以發現渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中酵素種類及總蛋白質量具有差異。由於酵素為蛋白質，因此我們推測捕食組相較於渦蟲組所多出的酵素 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase 的色帶應出現在銀染膠片中。未來嘗試以 western blot 方法找出渦蟲於捕食蚊幼蟲時其黏液中 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase 的分子量位置，並且比較渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中蛋白質質量具有差異的地方是否為上述三種酵素的分子量。

二、比較不同物種黏液中蛋白質及醣蛋白分子量

表 6 為將本實驗虎紋三角渦蟲與文獻 (Li&Granham, 2007) 陸生渦蟲與蛞蝓黏液中所含之蛋白質與醣蛋白分子量進行比較。由表中可以發現虎紋三角渦蟲、陸生渦蟲及蛞蝓黏液中蛋白質分子量於 15 kDa 都有明顯的色帶 (紅色箭頭指向處)，但僅有在本實驗虎紋三角渦蟲 PAS 染色膠片中看出其黏液中醣蛋白分子量小於 10 kDa (藍色箭頭指向處)。因此我們推測陸生渦蟲及蛞蝓黏液中醣蛋白分子量可能是因為太小的關係，導致無法在其 PAS 染色膠片中看到色帶。

表 6：比較不同物種黏液中蛋白質及醣蛋白分子量



柒、結論

- 一、以銀染染色 SDS-PAGE，並且以 ImageJ 進行分析，推測渦蟲捕食蚊幼蟲前後總蛋白質量有增加的情形。
- 二、渦蟲於捕食蚊幼蟲時會於體外進行化學消化，並分泌 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase。
- 三、渦蟲黏液醣蛋白分子量小於 10 kDa。

捌、未來展望

- 一、使用 DC Protein Assay，進行渦蟲捕食蚊幼蟲前後總蛋白濃度實驗。

為了避免樣本中含鹽類影響蛋白質呈色反應，導致所測出濃度不準確，未來會購買 DC Protein Assay，以 ELISA reader 再次進行渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度的實驗。

- 二、以 Western blot 找出 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase 分子量。

由於初步發現渦蟲於捕食蚊幼蟲前後其黏液中酵素種類、總蛋白質量具有差異，未來以 Western blot 找出酵素分子量。找出 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase 分子量之後，比對渦蟲捕食蚊幼蟲前後其黏液蛋白質在 SDS-PAGE 呈現的色帶位置。

- 三、以 Lipase、 β -galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase 進行蚊幼蟲體外消化試驗。

未來嘗試直接將酵素滴於蚊幼蟲身上，確認該酵素是否能分解蚊幼蟲蟲體，再進一步推測渦蟲於捕食蚊幼蟲時黏液中所含酵素之功能。

- 四、以 ELISA reader 測取 API system 中酵素濃度。

目前僅能初步確認渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素種類的差異，無法確認其酵素濃度的差異。未來會利用 ELISA reader 檢測渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素濃度的差異。

- 五、找出渦蟲黏液中醣蛋白種類，並進行其黏液應用價值評估。

目前已初步確認渦蟲黏液中醣蛋白分子量小於 10 kDa，再確認醣蛋白種類，並且尋找黏液中具黏性成分後，探討是否能製成防水黏著劑，以利日常生活中應用。

玖、參考資料文獻

一、科展、小論文、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) 王琳雅 (2017)。中華民國第 57 屆中小學科學展覽會作品說明書：「孑」戰關鍵－台灣淡水渦蟲捕食蚊幼蟲機制及其黏液探討。
- (三) 林秀芬、劉顯達 (2005)。四種蟲真菌感染溫室內蚜蟲及其產生酵素之探討。 *植物保護學會會刊*, 46:143-154。
- (四) 黃健瑞、陳昭瑩 (2005)。幾丁質分解性拮抗細菌。 *科學發展*, 391, 30-33。
- (五) 彭馨儀、簡巧治、蕭文鳳 (2010)。蟲生真菌 *Nomuraea viridulus* 之生物學探討。 *台灣昆蟲*, 30, 145-165。
- (六) Allen A., Hutton D.A., Pearson J.P., Sellers L.A. (1984) Mucus glycoprotein structure, gel formation and gastrointestinal mucus function. *Ciba Found Symp.*109 : 137-56.
- (七) Li, D.,Graham, L.D. (2007) Epermal secretions of terrestrial flatworms an slugs : *Lehmannia valentiana* mucus contains matrilin-like proteins. *Elsevier Science Part B*148 (2007)231-244.
- (八) Van-Seuningen, I., Davril, M. (1992). A rapid periodic acid-Schiff staining procedure for the detection of glycoproteins using the PhastSystem. *Electrophoresis* 13 : 97-99.
- (九) Streitz, J. M., Madden, M. T., Salo, W., Bermadino, K. P., Deutsh, J. L., & Deutsh, J. C. (2014). Defferentiation of mucinous from non-mucinouspancreatic cyst fluid using dual-stained, 1 dimensional polyacrylamide gelelectrophoriesis. *Clinical Proteomics* 11 : 42.
- (十) 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.
- (十一) Wang, R. & Hasnain Sumaira Z. (2017). Analyzing the Properties of Murine Intestinal Mucins by Electrophoresis and Histology. *bio-protocol* 7 (14) : e2394.

二、網站

- (一) 自由時報-新北今年首例本土登革熱 鶯歌夫婦無出國史。2017 年，9 月，取自 <http://news.ltn.com.tw/news/life/breakingnews/2207357>
- (二) 北市今年首件登革熱境外移入群聚 確診台大 3 例。2018 年，5 月，取自 <https://udn.com/news/story/7266/3162276>

【評語】 052001

本研究進行虎紋三角渦蟲黏液功能分析。利用銀染染色 SDS-PAGE，並以 ImageJ 分析，發現渦蟲捕食蚊幼蟲後黏液中總蛋白質量有增加。以酵素檢測盤測試渦蟲於捕食蚊幼蟲時會分泌不同於平時爬行時酵素 Lipase、 β galactosidase 及 N-acetyl- β -glucosaminidase，幫助行體外化學消化。利用渦蟲分泌之黏液特性以吸附蚊蟲幼蟲，希望能達控制病媒蚊之功效或製成防水黏著劑，有新穎的想法。整體實驗操弄佳，撰寫流暢，組織清楚，但與過往研究之間的關係宜再加強。

前言

淡水渦蟲腹面表皮含腺體能分泌液體，如桿狀細胞能排出桿狀體，防止體表乾燥；黏著腺產生化學物質協助爬行；釋放腺則含化學物質能溶解附著物質 (Miller *et al.*, 2001)。渦蟲利用黏液纏繞蚊幼蟲協助捕食，對於防治登革熱病媒蚊具有高度潛能 (王與郭，2016年)；王於2017年探討渦蟲捕食蚊幼蟲機制 (物理消化) 及其爬行時的黏液成分。今年本研究更進一步針對渦蟲捕食蚊幼蟲前後分泌之黏液進行分析，並推測渦蟲黏液中酵素在捕食蚊幼蟲時的功能。

研究器材及方法

一、研究動物及器材

虎紋三角渦蟲 (*Girardia tigrina*) (圖1)、白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)、CCD顯微攝影、API ZYM、SDS-PAGE、ELISA reader、蛋白質定量相關器材及藥品。



圖1 虎紋三角渦蟲 (*Girardia tigrina*)

二、實驗架構圖

驚爆「膠」點-虎紋三角渦蟲黏液功能分析

渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液分析

總蛋白質濃度
利用Bradford方法
進行分析

蛋白質種類
SDS-PAGE分離黏
液蛋白，以銀染方
式進行分析

酵素種類
利用API ZYM
進行分析

三、實驗組別配置 (表1)

表1 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液分析組別配置

| 組別名稱 | 樣本處理方法 |
|------------|-----------------------------|
| 渦蟲組 (對照組) | 24隻渦蟲爬行 |
| 蚊幼蟲組 (對照組) | 4隻蚊幼蟲 |
| 共存組 (實驗組)* | 24隻渦蟲與4隻蚊幼蟲共存 |
| 捕食組 (實驗組)* | 24隻渦蟲捕食4隻蚊幼蟲，捕食完畢後，移除渦蟲及蚊幼蟲 |

*共存組為使飽食渦蟲和蚊幼蟲共存於罐中，並且未死亡 (未被取食)；
捕食組為使渦蟲捕食罐中所有蚊幼蟲完畢。

四、黏液定義

將渦蟲放入裝有 0.5 mL ddH₂O之瓶中，其爬行、與蚊幼蟲共存及捕食蚊幼蟲時分泌物之水溶液稱為黏液。

五、分析方法

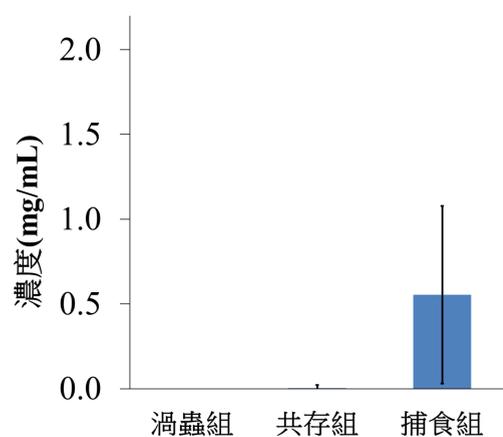
以ImageJ分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後蛋白質電泳圖色帶亮度。以單因子變異數 (One-way ANOVA) 分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素活性， $p < 0.05$ 為顯著差異， $p < 0.01$ 為極顯著差異。

研究結果

一、渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液總蛋白質濃度差異

根據圖2結果，渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中總白質濃度無顯著差異。

(a) 實驗組別之水溶液



(b) 以RIPA lysis buffer回溶實驗組別

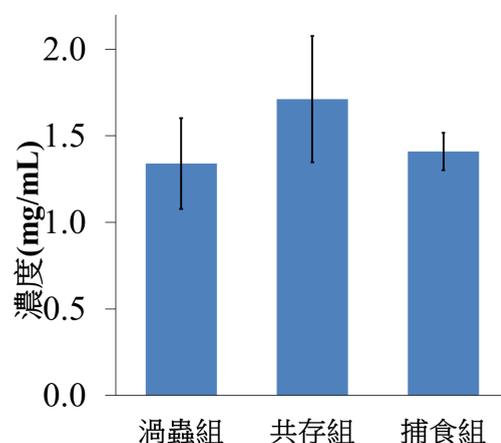


圖2 渦蟲於捕食蚊幼蟲前後黏液總蛋白濃度差異 (n=3)

以Bradford法進行分析

二、渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類差異

利用銀染方法分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類差異 (圖3)，以ImageJ分析色帶亮度，發現渦蟲捕食蚊幼蟲後黏液中大約 13、15、16、19 kDa之蛋白質含量有顯著增加 (圖4)。

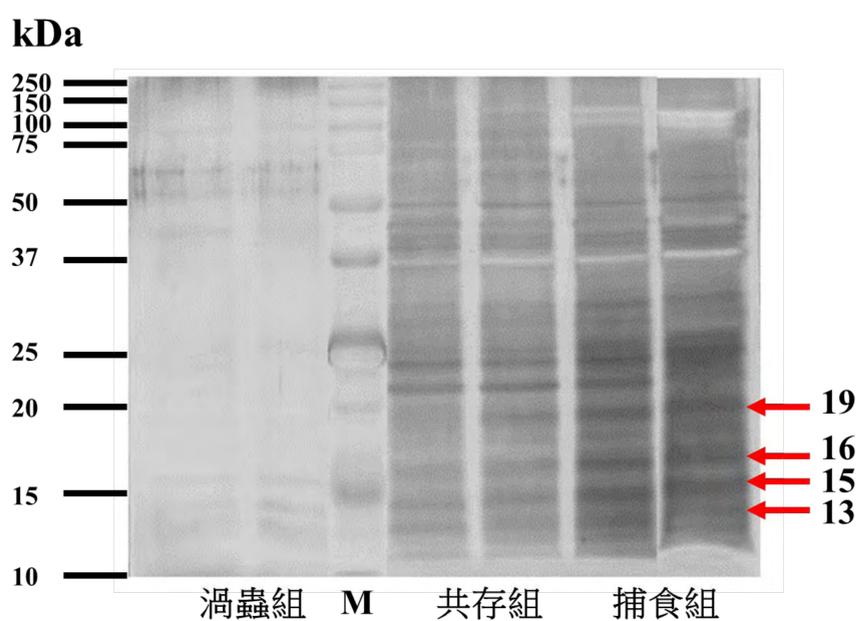


圖3 以SDS-PAGE分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質電泳圖 (n=2)

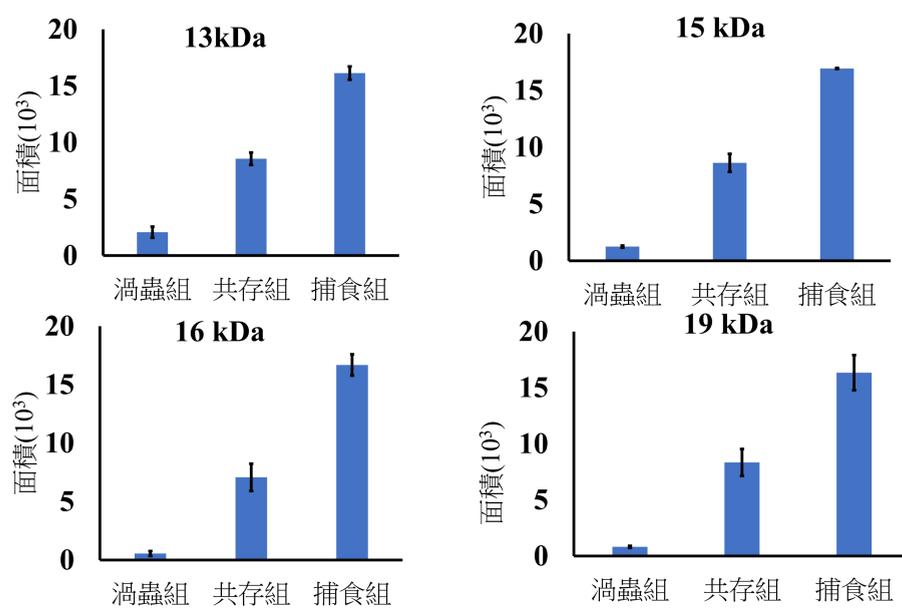


圖4 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質單體色帶面積以ImageJ進行分析

三、渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液酵素種類差異

利用ELISA reader測量酵素檢測盤各酵素吸光值之後，以One-way ANOVA進行分析，發現渦蟲於捕食蚊幼蟲後黏液中 9 種酵素吸光值顯著增加 (圖5、6)。

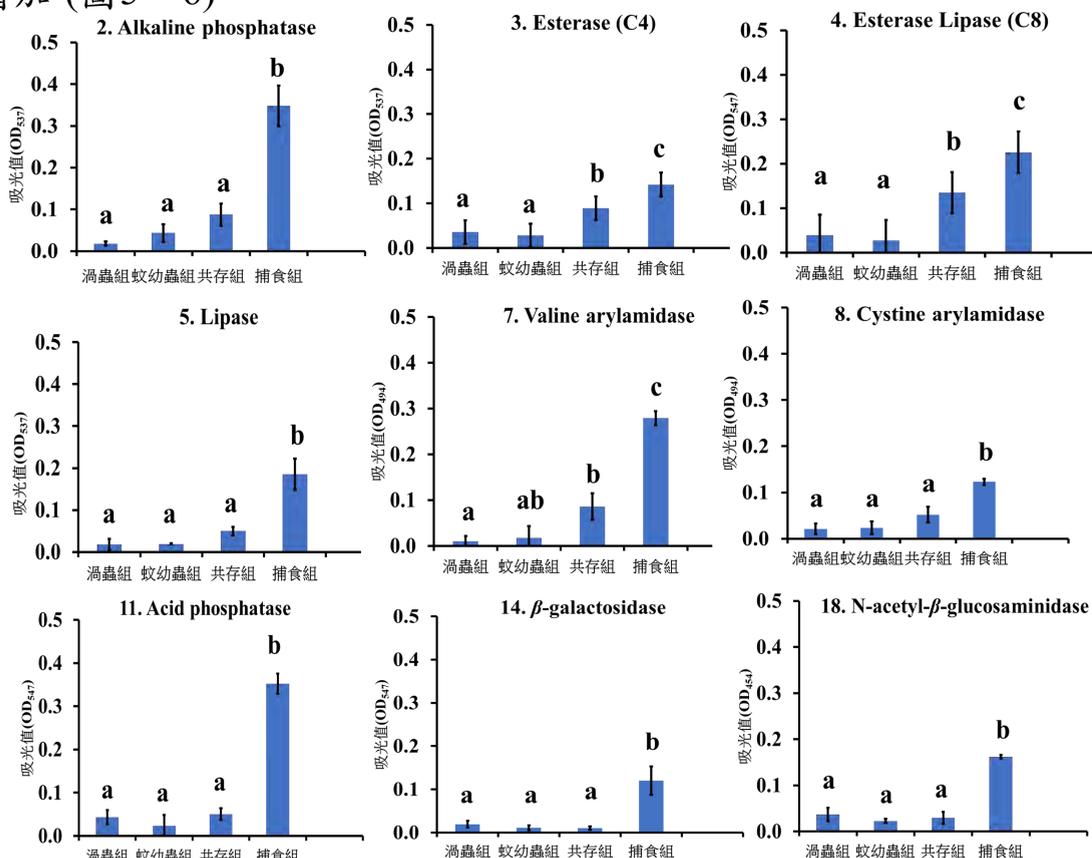
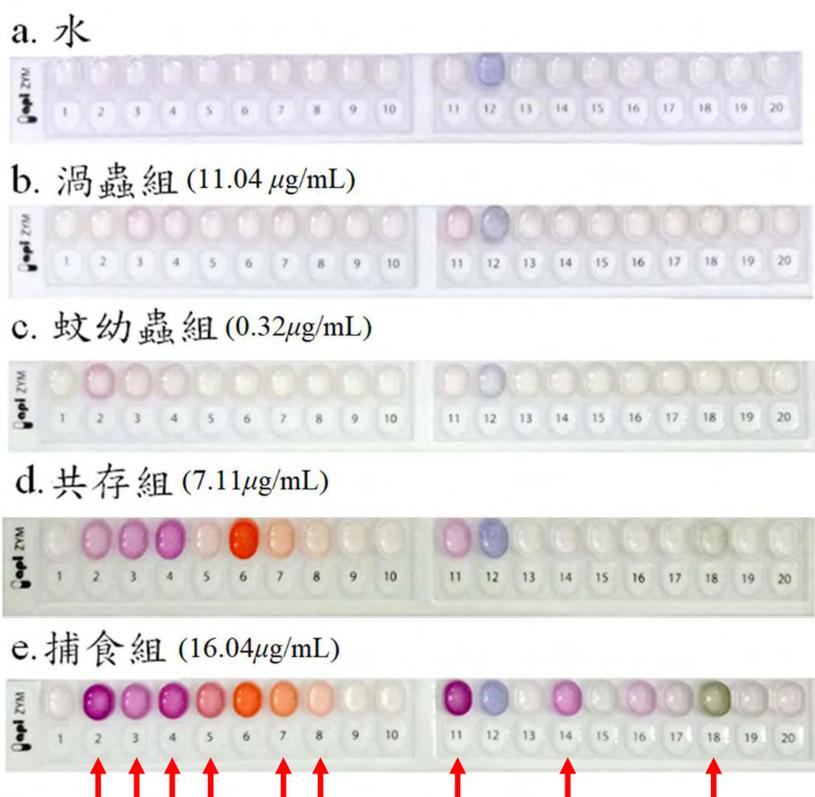


圖5 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液酵素檢測盤呈色結果

紅色箭頭指向處為以One-way ANOVA分析渦蟲捕食蚊幼蟲後黏液中顯著增加的酵素種類。

圖6 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素吸光值

利用One-way ANOVA分析，柱狀圖上方英文代號不同，則代表有顯著差異。

研究討論

一、渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素種類

(一) 共存組及捕食組之Leucine arylamidase受蚊幼蟲體壁誘發而分泌(圖7)。

蟲生真菌的蛋白酶分泌與昆蟲體壁誘發有關(彭等, 2010)。推測共存組及捕食組之Leucine arylamanidase因受到蚊幼蟲體壁誘發而分泌。

(二) 渦蟲捕食蚊幼蟲時, 會分泌9種酵素進行體外化學消化(圖8、9)。

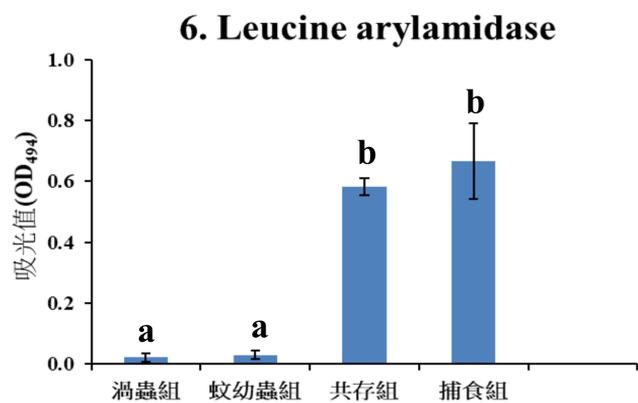


圖7 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中Leucine arylamidase吸光值

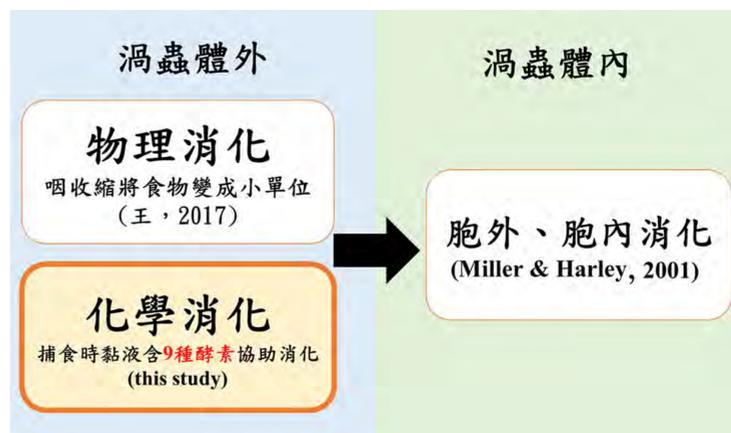
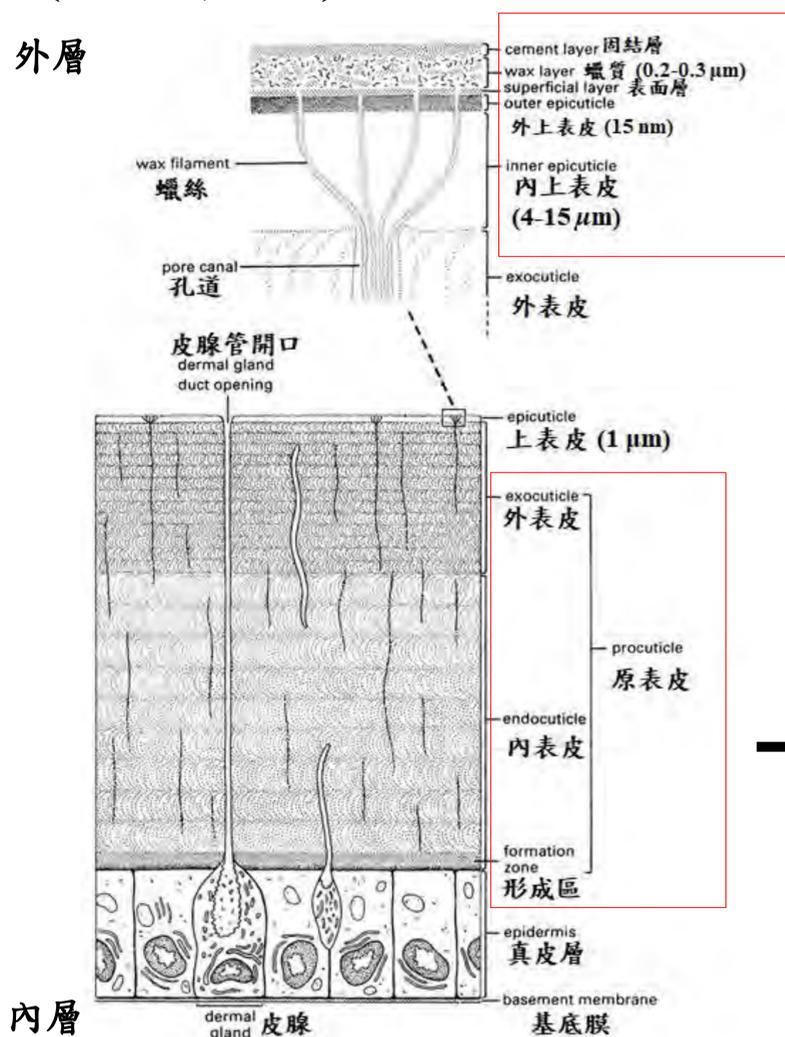


圖8 淡水渦蟲消化食物途徑推測

(a) 蚊幼蟲體表構造
(Jawale, 2010)



(b) 渦蟲捕食蚊幼蟲時所分泌9種酵素功能推測
(Guallan & Cranston, 2015)

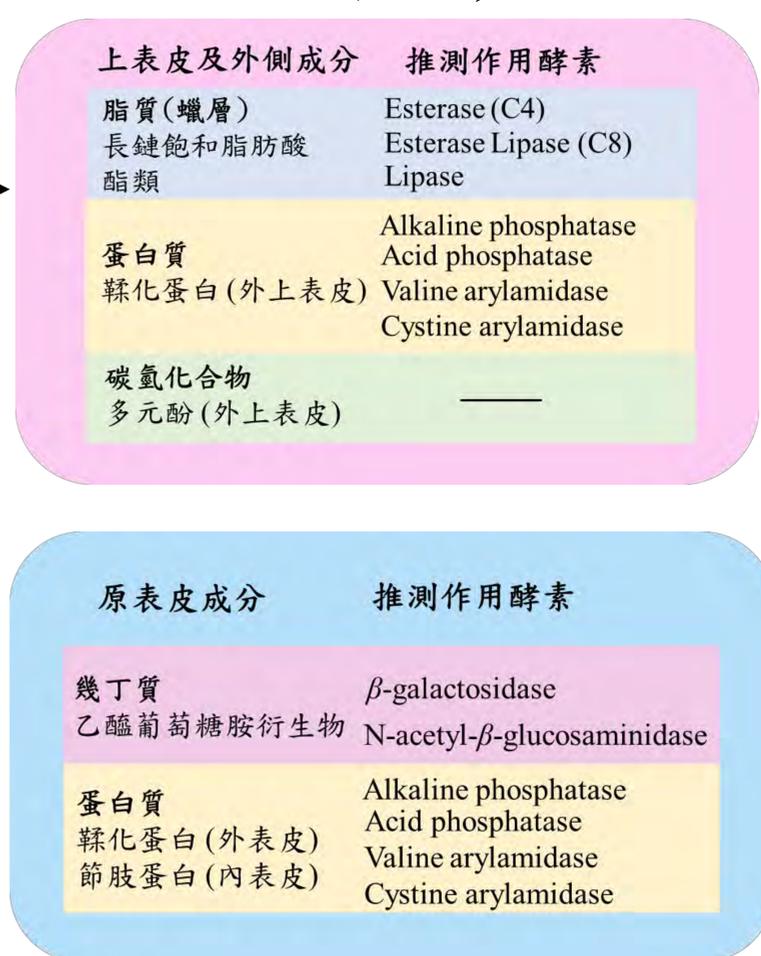


圖9 淡水渦蟲捕食蚊幼蟲時所分泌酵素種類及功能推測

二、作品貢獻

過去研究認為渦蟲黏液含酵素幫助其體外分解食物, 但未說明酵素種類(Miller *et al.*, 2001), 本研究發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中至少含9種酵素能協助行體外化學消化。

結論

- 一、渦蟲捕食蚊幼蟲時雖不會分泌大量黏液, 但黏液中蛋白質位大約 13、15、16 及 19 kDa 之蛋白質單體量有顯著增加。
- 二、渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含 9 種酵素能協助消化蚊幼蟲。

未來展望

利用 Western blot 找出渦蟲黏液酵素分子量, 並將酵素滴於蚊幼蟲體表進行體外化學消化試驗, 再切片染色觀察, 確認渦蟲體外消化蚊幼蟲過程。

參考資料

- 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、王琳雅(2017)。中華民國第57屆中小學科學展覽會作品說明書: 「孑」戰關鍵—台灣淡水渦蟲捕食蚊幼蟲機制及其黏液探討。
- 三、彭馨儀、簡巧治、蕭文鳳(2010)。蟲生真菌 *Nomuraea viridulus* 之生物學探討。台灣昆蟲, 30, 145-165。
- 四、Collin, R. & Starr, M. J. (2013). Comparative ontogenetic changes in enzyme activity during embryonic development of calyptroid gastropods. *Biol. Bull.* **225**: 8-17.
- 五、McGee, C., Wisdom, G. B., Fairweather, I., Blackshaw, R. P., McIlroy, 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.
- 六、Miller, S. A. & Harley, J. P. (2001)。動物學(上冊), 藝軒圖書出版社, 284-288。
(詳細請見作品說明書)