

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

(鄉土)教材獎

佳作

052004

光耀「鸞」世—金門三棘鸞自體螢光現象之探究

學校名稱：國立金門高級中學

作者： 高二 洪承欣 高二 陳旻禧	指導老師： 蘇詠晴
-------------------------	--------------

關鍵詞：三棘鸞、生物自體螢光、 β -咔啉

摘要

蠶在海洋悠遊 4 億多年，牠能存活至今的謎團尚未完全揭露。本實驗利用形態學、化學分析、物理力學和微生物學等方式探究三棘蠶（*Tachypleus tridentatus*）自體螢光現象。

首次發現蠶受紫光（400nm）照射會有自體螢光現象，且蠶殼內的膠、柱狀支持性構造亦有螢光表現。接著，以有機溶液對蠶殼螢光物質作萃取，並分析萃取液中的光譜特性，得其可吸收 405nm 光源並發散出 480~490nm 的藍綠螢光。進一步利用薄層層析法比對蠶子的螢光物質，結果顯示蠶殼中螢光物質的 Rf 值與 β -味啉相近。最後，依螢光物質分布位置和《本草綱目》曾記述蠶殼入藥，設計耐壓及抑菌兩功能性實驗，證實蠶殼中螢光層具有物理、化學屏障功效。我們衷心期盼本研究能吸引世人目光，並喚起大眾共同保育金門三棘蠶！

壹、研究動機

在四面環海的家鄉，海洋生物和島上居民有著密不可分的關係，在這層關係中存在的最大亮點，莫過於海防線上有「鐵鋼盔」之稱的活化石—蠶。每年的 5 月到 8、9 月間，當我們走在潮間帶上的泥灘地時，可能會遇見一隻身穿堅硬盔甲，走過留下"川"字形爬痕的生物，牠就是本篇研究的主角—蠶。蠶是一種外形相當獨特的生物，時常讓我們將牠們與外星生物聯想在一起。近年來，由於蠶棲地遭受嚴重的人為破壞，台灣地區的野生成蠶數量已大不如前，面對如此險峻的生存壓力，正讓牠們一步一步朝向滅絕。對於如此特殊之生物，我們希望能發掘其身世之謎，讓世人瞭解到蠶身為地球村的一份子，其獨特性以及價值是需要受到人類的愛護與尊敬。

貳、研究目的

蠶和蠍子是同屬螯肢亞門 (Chelicerates) 的近親物種。我們在資料搜尋的過程中發現，早在 1954 年，科學家就發現了蠍子其實是一種具有自體螢光現象的生物，當蠍子暴露在長波段的紫外光照射環境中，全身就能散發出亮藍色的螢光 (Pavan, 1954)。一篇刊登在 *Journal of Zoology* 的學術期刊引起了我們的關注，作者比較了蠍子和美洲蠶外骨骼標本 (保存於 1758 年) 的形態，發表了這兩者物種的外骨骼自體螢光現象是螯肢亞門的共祖徵 (plesiomorphic) (Rubin et al., 2017)。閱讀相關文獻後，一方面引起了我們對蠶自體螢光現象的好奇，因生長在我們周遭海岸線上的活體稚蠶，或許就像蠍子一樣，全身能散發著相當迷人的螢光色彩。而另一方面則是我們對實驗論點的存疑，因為蠶和蠍子是生長在兩種截然不同的棲地環境，蠍子是陸生，蠶則是海洋底棲。如果外骨骼的自體螢光是共祖徵，是否意味著螢光物質的分布、結構和功能應該是具有一定的保守性。對此，為了深入研究三棘蠶的自體螢光現象，本研究規劃了三大目標：

目標一、觀察活體稚蠶和蠶殼標本中自體螢光現象的分布與形態。

目標二、蠶殼螢光物質之成分分析。

目標三、蠶殼螢光層之功能探究。

參、研究設備及器材

一、實驗動物

蠶是一種海洋底棲性無脊椎動物，在地球上已存活了四億五千萬年，是現生種活化石之一。在動物界的分類中屬於節肢動物門、螯肢亞門、肢口綱、劍尾目，與蠍子和蜘蛛是屬同亞門的親近物種。目前全世界共有四種現生種的蠶，一種分布在北美東岸的美洲蠶 (*Limulus polyphemus*)，其他三種則分布在東亞海域，分別為三棘蠶 (*Tachypleus tridentatus*)、南方蠶 (*Tachypleus gigas*) 以及圓尾蠶 (*Carcinosvorpius rotundicauda*)。

本次研究對象為三棘蠶又名中國蠶，在台灣主要分布的地區包含了金門、澎湖以及嘉義布袋等沿海，但近年來數量有大幅減少的趨勢。

三棘鬣為節肢動物，具有外骨骼，是以蛻殼的方式逐漸成長，每蛻一次殼就增加一齡，可讓體長增長 1.3 至 1.4 倍，要達到性成熟階段，雄性約需蛻殼 15 至 16 次左右，而雌性則為 16 至 17 次左右。成熟的鬣體，體長約 30 到 70 公分，一般而言雌性體形較雄性來得大，體形外觀可分為三個部分：頭胸甲、腹甲、劍尾。

(一) 頭胸甲：在頭胸部上方前端正中央有一對單眼可感應可見光和紫外線，在兩側則各有一對複眼具視覺功能，而中後方則是長有一對硬刺是為了防衛用。鬣的口器位於頭胸甲的腹面中央位置，口器四周長有硬刺用以固定食物，頭胸甲下方具有附肢，第一對鉗狀的附肢主要是協助攝食和進食，第二到六對附肢則是步足具爬行功能。

(二) 腹甲：此部位左右兩側各長有一排的硬刺，用於防衛，雌性僅有三對棘刺較為其他棘刺發達，而雄性則是全棘刺都發達。腹甲的腹面有書腮用於呼吸和協助游泳，後方則為一排泄孔。

(三) 劍尾：主要用於防衛和腹面朝上時可協助翻身。

有別於其他肢口綱生物多數已滅絕，鬣能存活至今且過去二億年外形特徵就沒有明顯改變，顯示鬣對於環境的適應性有其獨特之處，是很值得深入研究的對象。

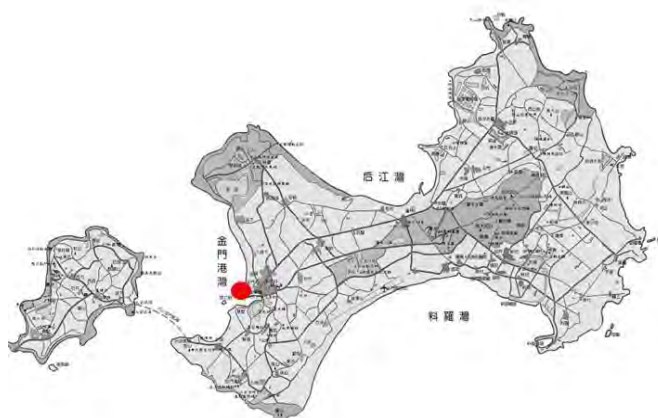


圖 1 ▲稚鬣採集地點 (金門浯江溪海域，圖中紅點)



圖 2▲藉"川"字形爬痕在泥灘地上尋找稚鬣



圖 3 ▲稚鬣採集情形

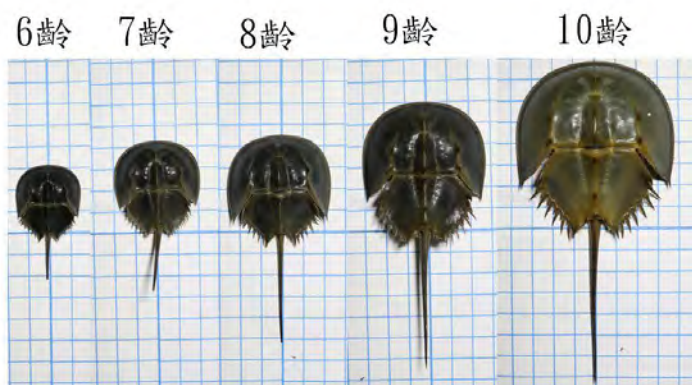


圖 4 ▲野外採集 6 至 10 齡之稚鬣

二、實驗藥品與器材

(一) 螢光形態實驗使用器材

器材	
名稱	備註
雨鞋、塑膠盆	野外採集用
紫外光源	驗鈔筆、手電筒、雷射筆、23W 紫外燈
數位相機、腳架	相機廠牌：Canon，形號：7D、77D
手持式數位紫外線顯微鏡 (400nm UV 標準型)	廠牌：Dino-Lite Pro，型號：AM4115
濾鏡、絨布	單眼相機拍照使用，過濾掉 450nm 光線和避免反光

(二) 螢光成分分析使用器材、藥品

器材	
名稱	備註
超音波水浴震盪器	廠牌：DELTA，型號：DC400H
光譜分析儀	廠牌：PASCO，型號：AM4115
石英比色管	12 x 12 x 45mm
離心機	廠牌：WIND SPEED SCIENTIFIC，型號：XYJ80-2
燒杯、量筒、滴管、鑷子	藥品配置、螢光物質萃取、光譜分析操作時使用
各式玻璃管、微量離心管	浸泡蠶殼使用、操作使用
筆記型電腦	廠牌：Acer，型號：Aspire E 15
藥品	
名稱	備註
DMSO、甲醇、乙酸乙酯、 正己烷	蠶殼萃取之溶劑、TLC 之展開液，購自 sigma
7-Hydroxy-4-methylcoumarin	香豆素標準液，為蠶子螢光物質成分之一，購自 sigma
β -carboline	β -咔啉標準液，為蠶子螢光物質成分之一，購自 sigma
薄層色層分析片	購自瑞光生物科技

(三) 螢光功能探討使用器材、藥品

器材	
名稱	備註
恆溫培養箱	購自：YIH DER，型號：LE-80RD (0°C~70°C)
線鋸機、雕刻機	切割鬻殼、鑽取鬻殼螢光層
螺旋測微器	測量鬻殼厚度使用
自製推拉力計	鬻殼耐壓測試儀器
微量分注器	配置大腸桿菌菌液、溶液樣本用
微量離心管	分裝溶液用
酒精燈	儀器滅菌用
培養皿、濾紙、打洞機	抑菌測試用
接種環、滅菌棉花棒	養菌、塗菌用
筆記型電腦、分析軟體	影像分析軟體：Photoshop、Image J
藥品	
名稱	備註
大腸桿菌菌液	抑菌測試之菌種
LB BROTH、LB AGAR	細菌培養液、培養基
硫黴素	抑菌測試所使用之抗生素



圖 5▲ 23W 紫外光源



圖 6▲ 光譜分析儀



圖 7▲ 推拉力計



圖 8▲ 抑菌實驗相關器材

肆、研究過程與方法

一、實驗架構圖

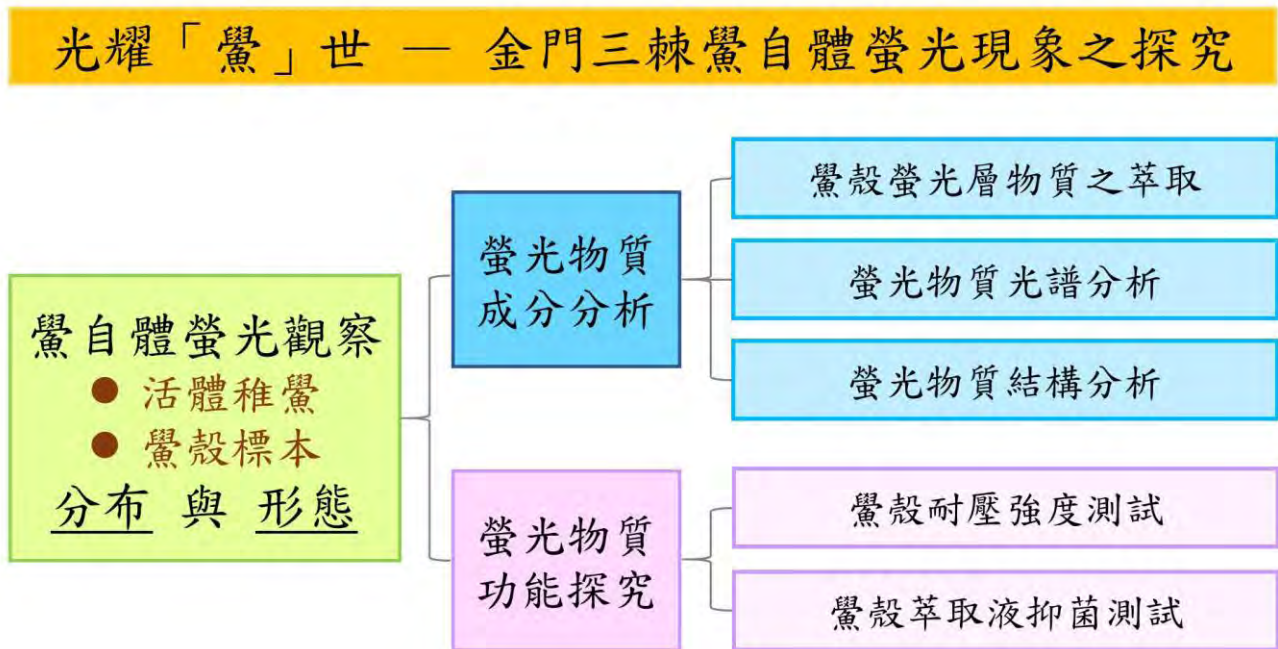


圖 9▲ 實驗架構圖

二、實驗方法：

(一)實驗一：活體稚蠶自體螢光現象的觀察

1. 說明：觀察確認活體稚蠶的螢光反應，並拍攝活體軟殼稚蠶、活體硬殼稚蠶和稚蠶蛻的殼來比較螢光反應有何不同
2. 實驗步驟：
 - (1)根據每日潮汐表，選定退至最低潮前兩小時至海邊採集稚蠶和撿拾稚蠶蛻的殼。
 - (2)架設單眼相機，且在桌上平放一張每格 1*1 公分的方格紙，作為比例尺。
 - (3)將採集的稚蠶體表水分擦拭乾，放於桌上以白光進行拍攝紀錄稚蠶形態及齡期。
 - (4)選定特定大小稚蠶，以大頭針固定於拍攝平台，使用數位紫外線顯微鏡分別以白光及 400nm 紫光照射後，進行拍照紀錄。
 - (5)同上述步驟，分別拍攝活體軟殼、硬殼稚蠶和稚蠶蛻下的蠶殼。

(6)上述三種鬻殼，再針對螢光現象有形態差異的口器、步足、螯肢三處構造，用數位紫外線顯微鏡分別以白光及 400nm 紫光照射後，進行細部的拍照紀錄。

(二)實驗二：鬻殼標本自體螢光現象的觀察

1. 說明：觀察稚鬻鬻殼和成鬻鬻殼標本螢光形態之表現。
2. 實驗步驟：
 - (1)架設單眼照相設備，包含紫光燈具、黑絨布（避免反光）、數位單眼相機和單眼鏡頭濾鏡鏡片（450nm Cut-Off）。
 - (2)利用數位紫外線顯微鏡對稚鬻鬻殼的劍尾和頭胸甲剖面進行觀察，鬻殼利用手術剪刀剪開後，分別用白光及 400nm 紫光照射觀察部位並拍照紀錄。
 - (3)利用單眼照相設備對成鬻鬻殼的劍尾和頭胸甲剖面進行觀察，分別使用白光及 400nm 紫光燈具照射觀察部位並拍照紀錄。由於成鬻鬻殼相當堅硬，因此頭胸甲邊緣一側、腹甲下半部及尾部部位，是採用線鋸機切開。

(三)實驗三：鬻殼螢光層物質之萃取

1. 說明：用 100%DMSO 浸泡全鬻殼和螢光層，以製備鬻殼萃取液。
2. 實驗步驟：
 - (1)準備小片狀的全鬻殼(1.0g)，裝入玻璃試管中後加入 6.cc 的 DMSO 中，並置於超音波水浴機震盪進行萃取 24 小時，等待鬻殼中物質的溶出。
 - (2)全鬻殼在震盪前會利用數位顯微鏡預先量測其厚度。震盪 24 小時後，再次量測全鬻殼的厚度，並比較震盪前後的形態差異。

(四)實驗四：螢光物質光譜分析

1. 說明：將實驗三所得之全鬻殼萃取液和實驗四之螢光層萃取液，利用光譜分析儀分析溶液之光譜特性和螢光現象。
2. 實驗步驟：
 - (1)螢光層萃取液備置：在玻璃試管中裝入絲狀的螢光層(1.0g)和 10.cc 的 DMSO，並置於超音波水浴機震盪進行萃取 48 小時。
 - (2)架設電腦並接上光譜分析儀，將待測樣本分別裝入石英比色管內。

(3)以 100%DMSO 溶劑作為空白溶液 (blank)、檢測樣本有：DMSO+全蠶殼、DMSO+蠶殼螢光層。

(4)用拭鏡紙擦拭比色管表面後，放入光譜分析儀中，首先檢測其吸收光譜(Absorption spectrum)，再分別用 405nm 和 500nm 作為激發光源，以檢測其放射光譜(Emission spectrum)。

(五)實驗五：螢光物質結構分析

1. 說明：利用薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography, TLC) 檢測蠶殼萃取液是否具有與蠟子相同的螢光物質 (7-羥基-4-甲基香豆素和 β -咔啉) 成分。

2. 實驗步驟：

(1)將蠶殼秤重後，裝入 250ml 錐形瓶中，先以乙酸乙酯進行第一次萃取，接著再以甲醇進行第二次萃取。萃取時，將錐形瓶置於超音波水浴機震盪進行萃取，時間為 24 小時，等待蠶殼中螢光物質的溶出。

(2)將萃取液收集並利用 0.22 μ m PES 過濾器過濾和濃縮處理，最終取得 5~10c.c.萃取液。

(3) 7-羥基-4-甲基香豆素、 β -咔啉和萃取液利用毛細管點置在 TLC 片上。

(4)將 10c.c.的展開液 (正己烷：乙酸乙酯 = 5 : 5) 倒入玻璃容器內，再將點置好的 TLC 片置於其中。待展開液自起點上升至 5 公分後，將 TLC 片取出。

(5)將 TLC 片置於 400nm 紫光下拍照，並計算各點的 Rf 值。

(六)實驗六：蠶殼耐壓強度測試

1. 說明：探討具螢光層的蠶殼對承受外力的表現，以推拉力計進行耐壓強度測試。

2. 實驗步驟：

(1)將蠶殼頭胸甲的背面及腹面蠶殼切割成 2x2 公分大小相同之蠶殼樣本。

(2)分組說明：PNF：薄螢光層蠶殼；PFD：螢光層朝下的腹面蠶殼；PFU：螢光層朝上的腹面蠶殼；DFD：螢光層朝下的背面蠶殼；DFU：螢光層朝上的背面蠶殼。

(3)使用螺旋測微器測量蠶殼厚度，將具螢光層且厚度相近的蠶殼進行成對分組，一片為螢光層朝上，另一片即為螢光層朝下。

(4)實驗操作時，以手動將推拉力計對每片蠶殼的中央位置進行施壓直到蠶殼破裂。儀表上之壓力值為蠶殼所能承受的最大壓力。最後，將數據輸入電腦進行統計分析。

(七)實驗七：蟹殼萃取物抑菌測試

1. 說明：以「濾紙片擴散試驗」探討實驗四所得之蟹殼萃取液對大腸桿菌（革蘭氏陰性菌）之抑菌效果。
2. 實驗步驟：
 - (1)培養液的製備：用 20 公克的 LB BROTH 溶於 500c.c.的水混合成培養液。
 - (2)菌液的製備：取 5.cc 的 LB BROTH 放入試管，將接種環過火高溫殺菌後，取適量大腸桿菌放入試管。將試管放在震盪儀上，並置於溫度為 37°C 的恆溫培養箱 24 小時。
 - (3)培養基的製備：將液態 LB BROTH AGAR 倒入培養皿，靜置冷卻至固態。
 - (4)器材消毒：圓形濾紙（直徑為 6mm）和鑷子以 121°C 高溫高壓滅菌處理 30 分鐘。
 - (5)樣本的製備：實驗分為四組：DMSO 溶劑作為空白對照組、螢光層萃取液、全蟹殼萃取液、抗生素（硫黴素，12500ppm）作為陽性對照組。
 - (6)細菌培養：將已培養好的菌液用醫療棉花棒沾取後，均勻塗抹於培養皿上。
 - (7)用鑷子夾取圓形濾紙浸泡在 DMSO、螢光層萃取液、全蟹殼萃取液、抗生素溶液中，吸取適量溶液後，再放在培養皿上。
 - (8)再將此培養基置於 37°C 培養 24 小時後，觀察各溶液的抑菌表現。
 - (9)拍照記錄結果並利用 ImageJ 軟體對抑菌環大小進行量測。最後，將數據進行統計分析。

三、統計分析：

本研究利用 GraphPad Prism 軟體進行統計分析。根據不同的實驗規劃，採用單因子變異數分析，而多重比較則以 Tukey' s 方法。



圖 10▲ 裁切蟹殼



圖 11▲ 蟹殼耐壓測



圖 12▲ 紀錄抑菌
實驗結果



圖 13▲ 薄層層析
跑片情形

伍、 研究結果

一、 實驗一：活體稚蠶自體螢光現象的觀察

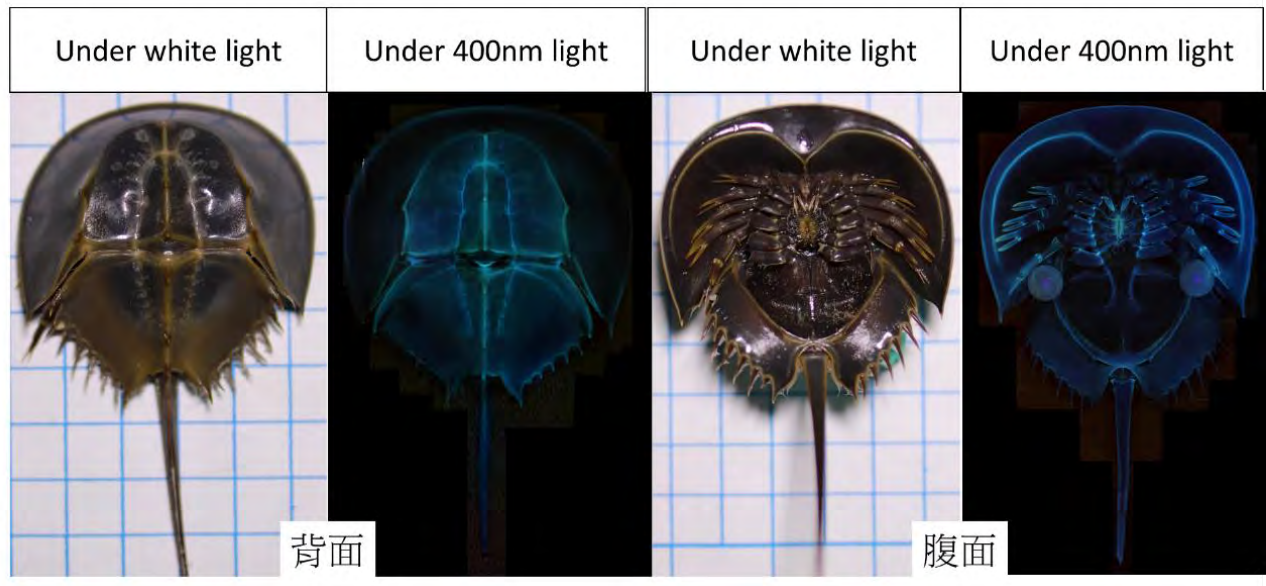


圖 14 ▲以紫光(400nm)照射活體稚蠶的螢光現象。

本實驗以 8 齡稚蠶進行觀察，結果顯示稚蠶經紫光（400nm）照射後，從背面可看出頭胸甲的凸處（中脊、側脊）和凹處、腹甲的肌肉止端窩（muscle insertion fossa）以及劍尾所呈現的螢光反應最為明顯。從腹面可發現頭胸甲腹面邊緣及口器、螯肢的螢光反應最為明顯。



圖 15 ▲正在蛻殼的活體稚蠶在 400nm 紫光照射下所呈現的螢光反應。

從圖可知，蠶蛻去的舊殼有明顯的螢光反應，而新殼則無螢光反應。

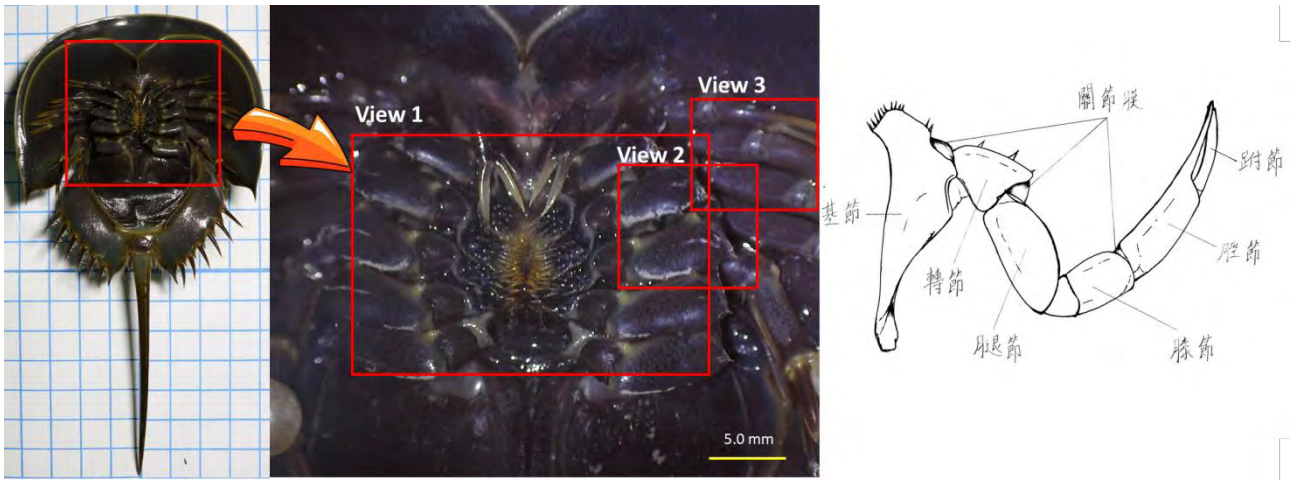


圖 16▲ 稚蠶腹面六對附肢和步足構造示意圖。

View1 (基節、關節膜和轉節特寫)、View2 (關節膜和轉節特寫)、View3 (脛節和跗節特寫)。

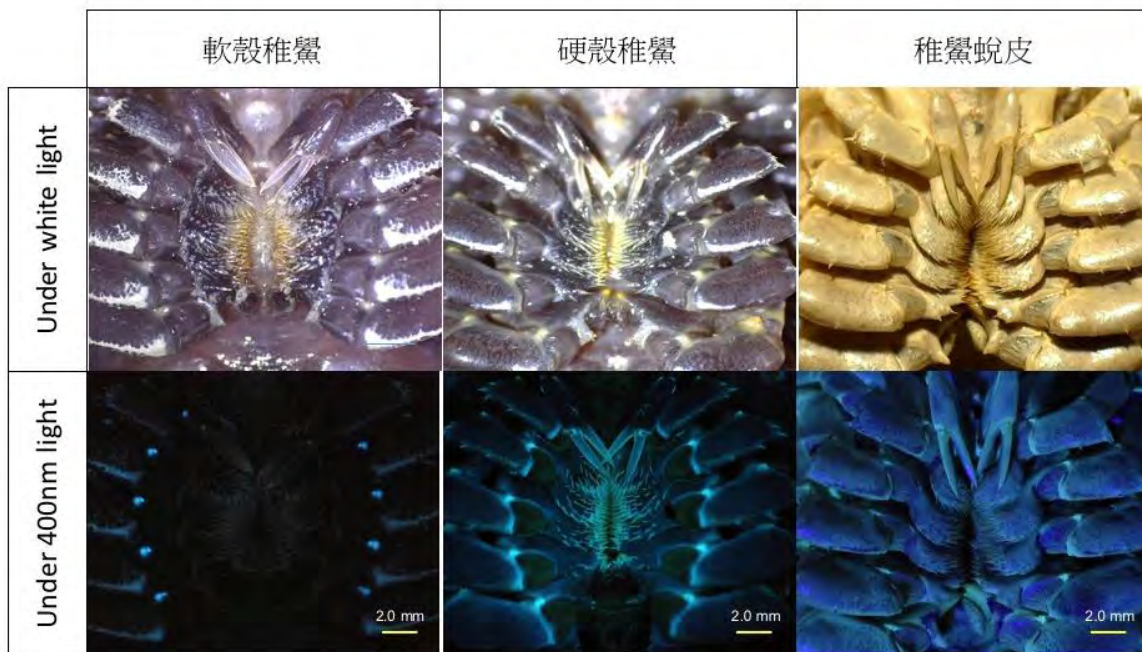


圖 17 ▲View 1 之軟殼、硬殼稚蠶和稚蠶蛻殼的螢光反應比較。

從圖可知，軟殼稚蠶的螢光現象在基節與轉節的支點處最為明顯。硬殼稚蠶中，在螯肢、嘴（基節上的脊）、關節膜邊緣、支點及基節的螢光現象都較軟殼稚蠶更為明顯。稚蠶蛻皮雖有螢光反應，但與背景顏色的對比並不明顯。

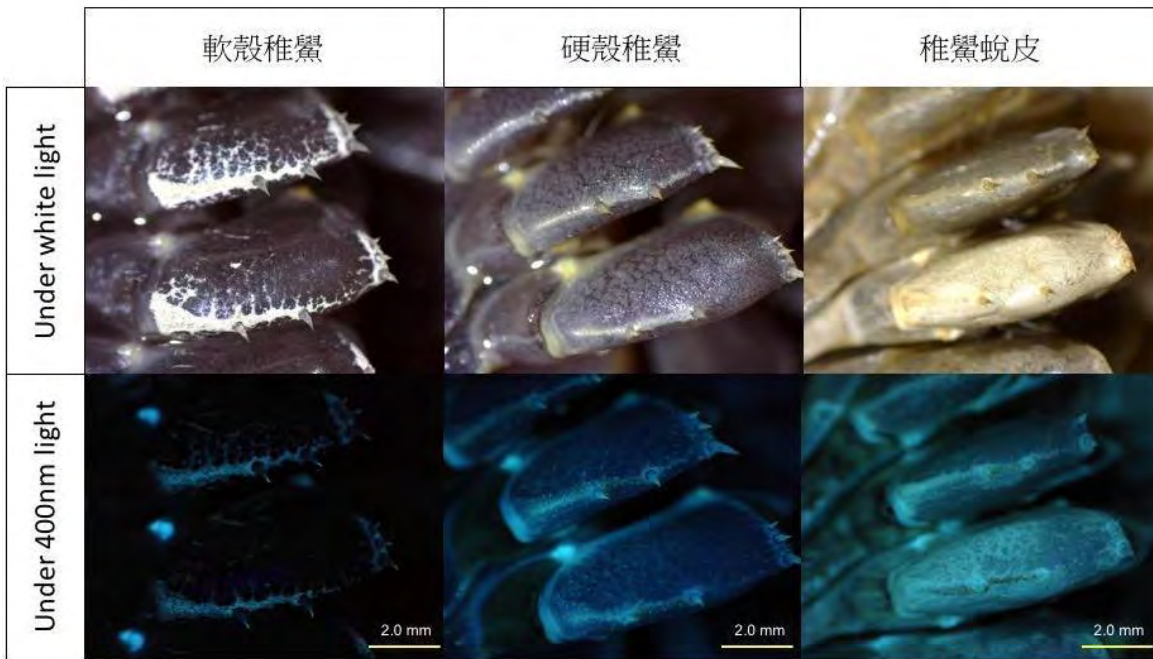


圖 18 ▲View 2 之軟殼、硬殼稚蟹及稚蟹蛻皮的螢光反應比較。

從圖可知，軟殼稚蟹的螢光現象在基節與轉節的支點處最為明顯，而在轉節邊緣也有些微的螢光反應。硬殼稚蟹中，在基節與轉節的支點處、關節膜周圍、轉節和棘的螢光現象都較軟殼稚蟹更為明顯。稚蟹蛻皮雖有螢光反應，但與背景顏色的對比並不明顯。

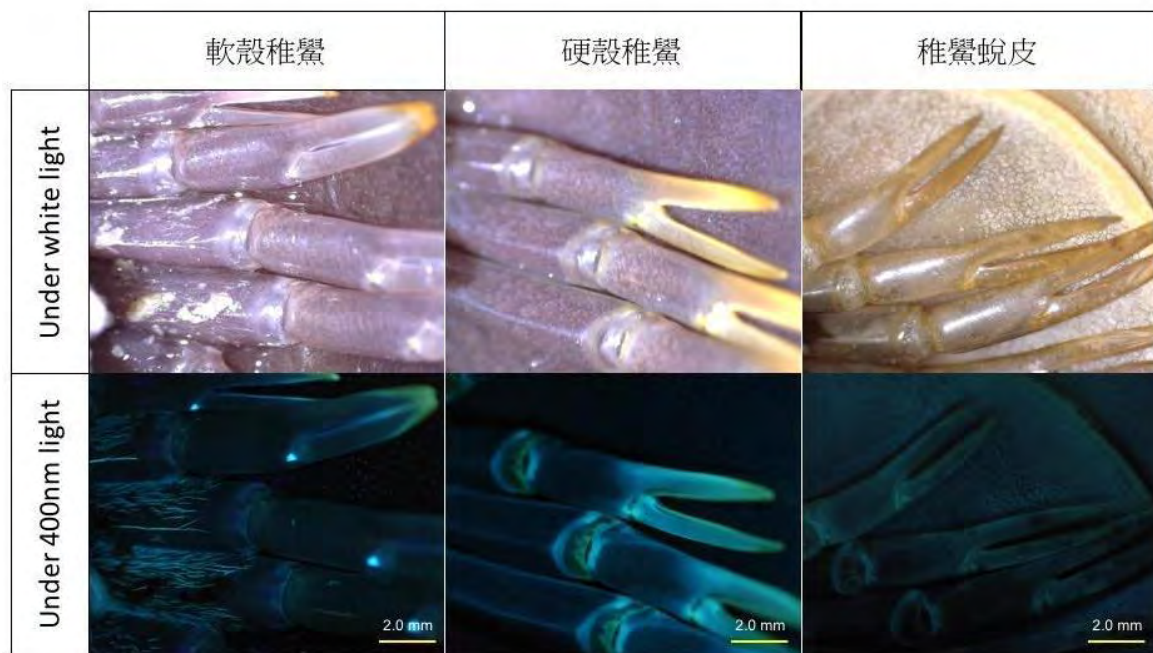


圖 19 ▲View 3 之軟殼、硬殼稚蟹及稚蟹蛻殼的螢光反應比較。

從圖可知，軟殼稚蟹在脛節與跗節的支點處螢光現象最為明顯，同時在膝節上會有很多細毛的分布。硬殼稚蟹中，在脛節與跗節支點處、關節膜周圍和跗節的螢光現象都較軟殼稚蟹更為明顯。稚蟹蛻皮的螢光反應並不明顯。

◆ 實驗結果：

生物螢光屬於光致發光反應，當生物體內螢光物質吸收了特定波長的光能後，處於高能態的螢光物質並不穩定，隨即在轉換至較低能階的穩定態過程中，所釋放的能量會以輻射方式發散出波長較長的螢光。目前發現有生物螢光現象的生物例子有：蠍子、樹蛙、玳帽龜等。先前的報導指出，與蠍子同屬有螯肢亞門（Chelicerates）的美洲蠶，其成蠶標本具有螢光現象（Rubin et al 2017）。但，稚蠶是否同樣具有螢光現象則並無相關報導。

本研究首次證實活體稚蠶經紫光（400nm）照射下，蠶殼的背、腹面皆具有明顯的自體螢光現象（圖 14）。蠶殼背面的螢光反應多分布於較突出的位置(例如單眼、副眼)和易與環境中砂礫摩擦的部位。另外，由圖 15 可知，剛完成蛻殼的稚蠶其新殼並無螢光反應。由圖 17、圖 18、圖 19 的結果顯示，比較軟殼與硬殼稚蠶腹面的螢光形態，可明顯發現，螢光物質最早顯現的部位是在關節的支點處，隨著蠶殼逐漸硬化的過程中，基節與基節上的棘、轉節與轉節上的棘、關節膜周圍和螯肢的螢光反應也同步顯著提升。此外，蛻皮後的舊殼內仍有螢光物質的存在，但其螢光的形態並不如活體稚蠶來得明顯。

二、實驗二：蠶殼標本自體螢光現象觀察

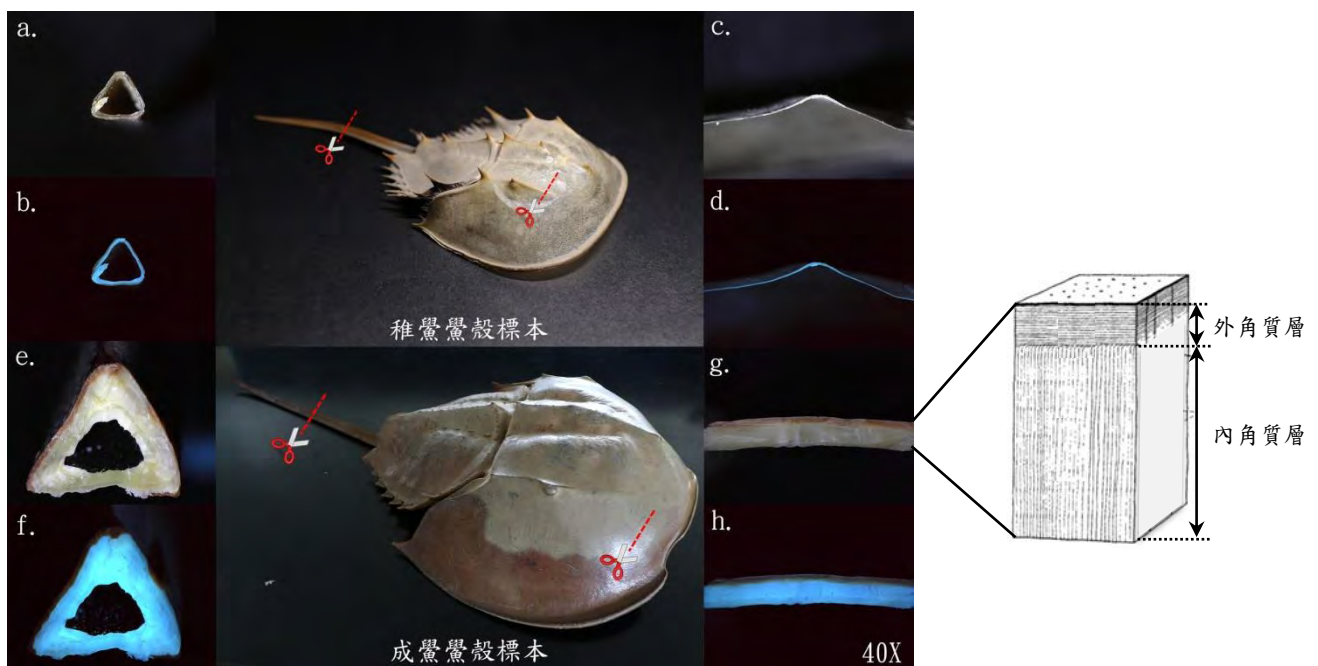


圖 20 ▲ 稚蠶、成蠶蠶殼標本劍尾及頭胸甲蠶殼切面螢光形態。

從圖可知，成蠶蠶殼不管是頭胸甲還是劍尾的位置，其螢光層都比稚蠶蠶殼的來得厚上許多。比對蠶殼外骨骼構造示意圖，發生螢光現象的部位是位於內角質層內，而非外角質層。

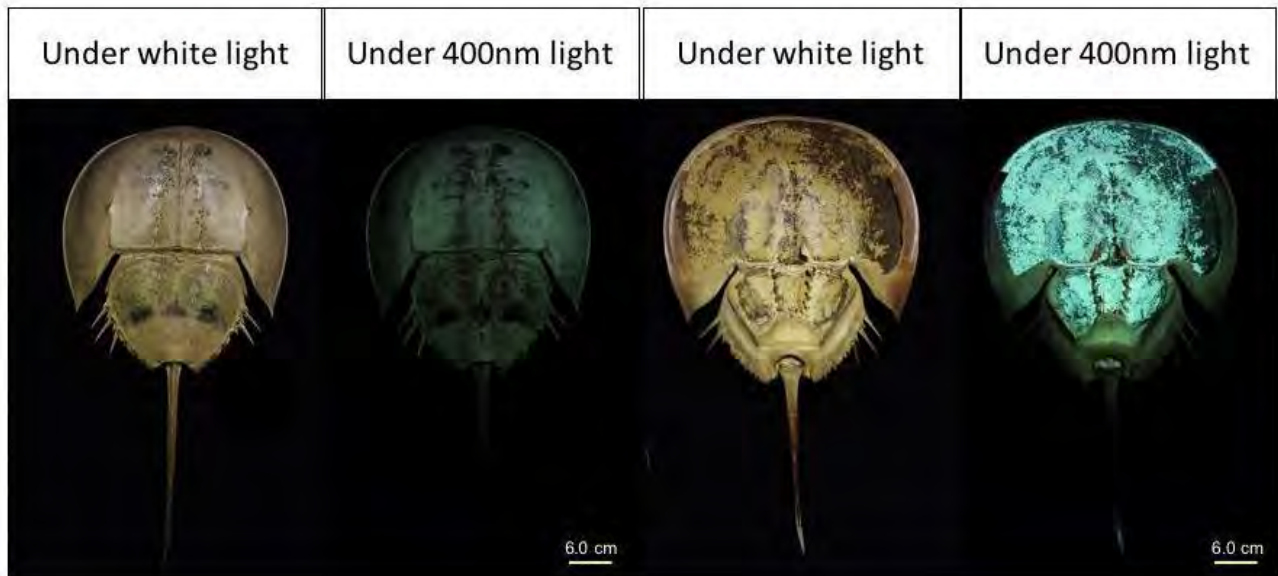


圖 21 ▲ 以紫光（400nm）照射成鬣鬣殼外部、內部的螢光現象。

從圖可知，成鬣鬣殼內、外部的螢光反應對比強烈，內比外明顯，且內部螢光分布範圍廣泛。

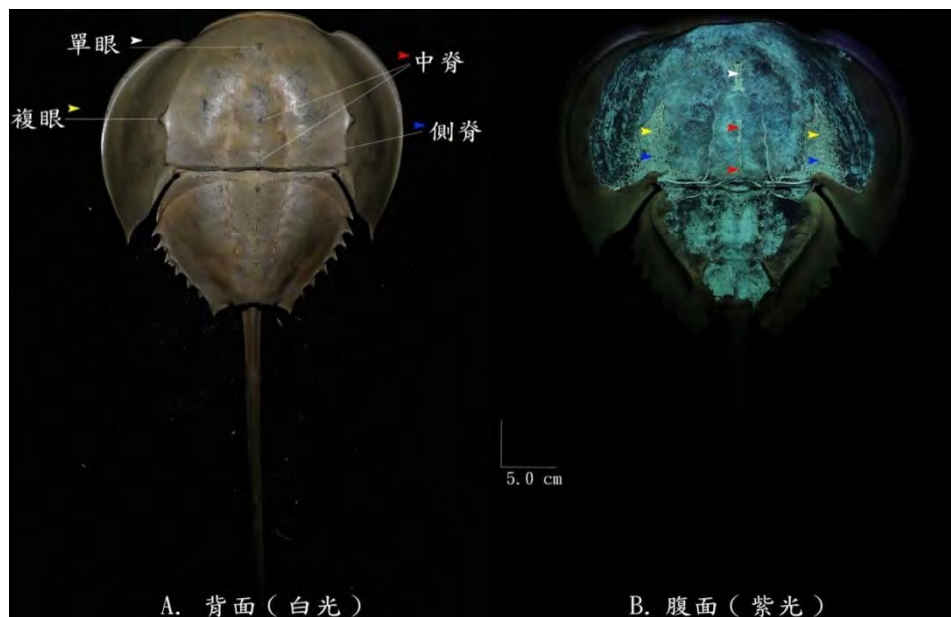


圖 22 ▲ 成鬣鬣殼內膠狀支持性構造與鬣殼外部構造相對位置之比較。

從圖可知，成鬣鬣殼內具有特殊的區塊構造，我們稱之為膠狀支持性構造，且其含有螢光物質的分布。將鬣殼內、外部構造進行比對，可發現單眼、複眼、中脊和側脊部位所對應的內部構造，皆有膠狀支持性構造的分布。

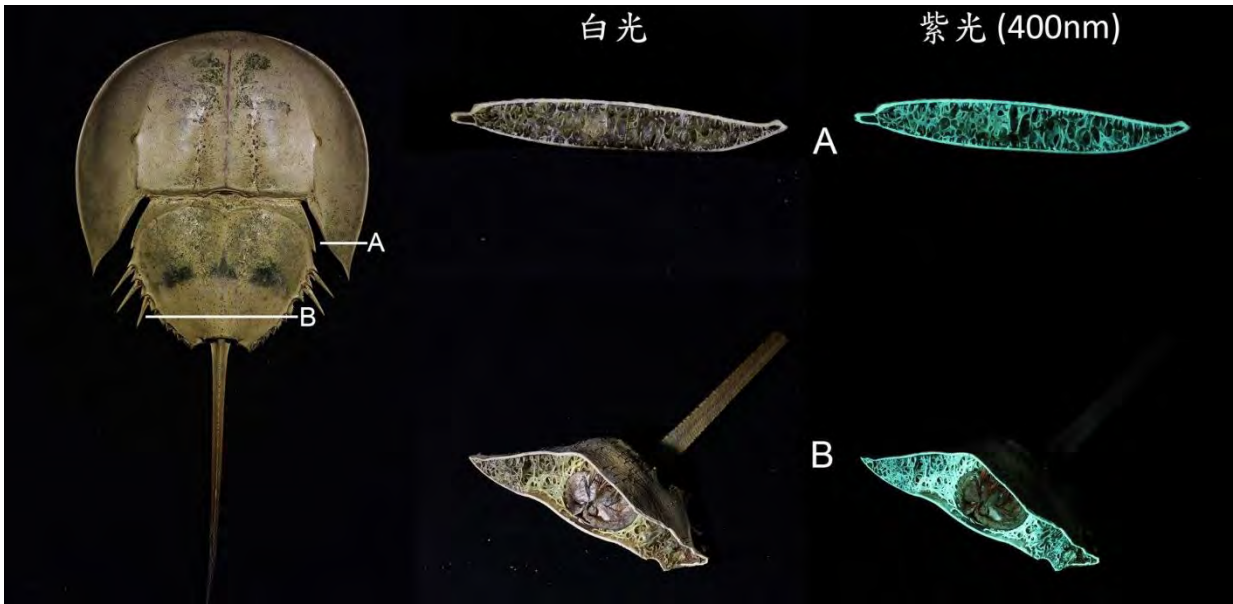


圖 23 ▲ 成鬻鬻殼內柱狀支持性構造在頭胸甲邊緣及腹甲尾部的螢光形態。

從圖可知，成鬻鬻殼內的柱狀支持性構造是分布於鬻殼夾層內的特殊結構。以紫光（400nm）照射柱狀支持性構造，可明顯觀察其螢光表現。

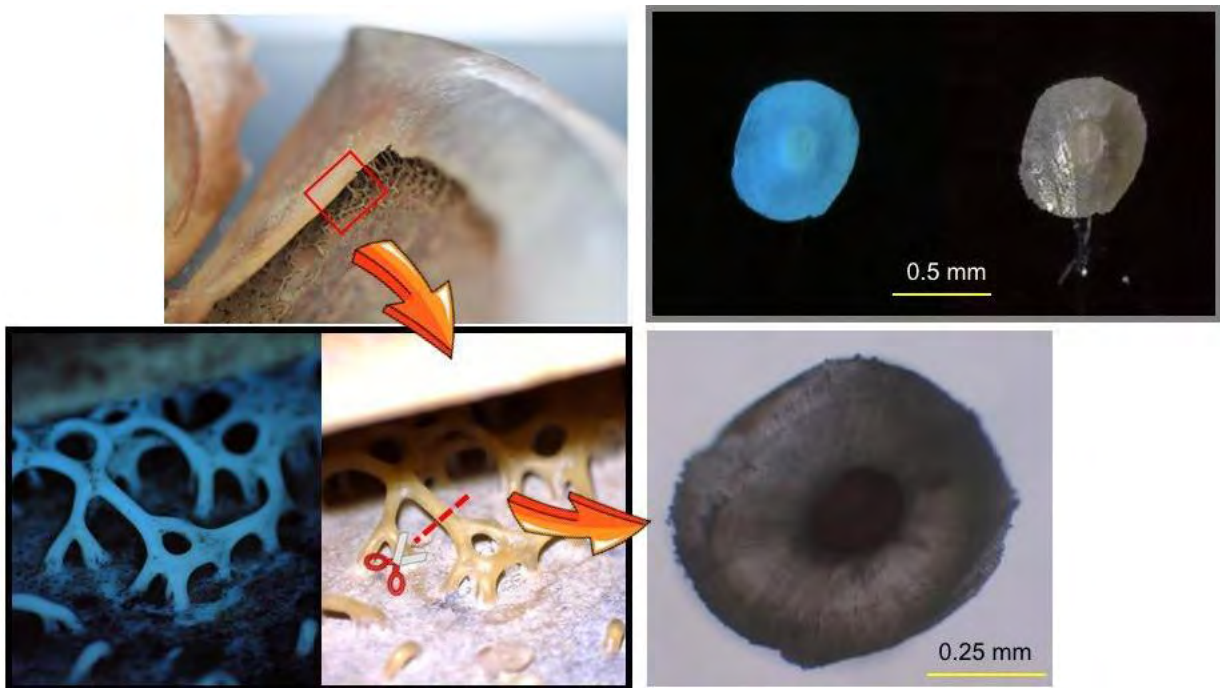


圖 24 ▲ 成鬻鬻殼柱狀支持性構造的结构形態。

從圖可知，將柱狀支持性構造以切片觀察其形態和螢光現象，結果顯示該構造為實心柱狀，有同心圓形態，中央部位密度較高不易透光，且螢光物質均勻分布於柱狀內。

◆ 實驗結果：

由上述結果可知，無論是稚蟹或成蟹標本均具有螢光現象，且產生螢光的部位是位於外骨骼的內角質層。再詳細檢視成蟹蟹殼內外部可發現內部螢光表現強烈，甚至具有膠狀及柱狀兩種支持性的螢光形態，其中膠狀支持性構造分布於蟹殼構造上較突出的位置，如單眼、複眼、中脊和側脊；而柱狀支持性構造則是位於蟹殼夾層內。

三、實驗三：蟹殼螢光層物質之萃取

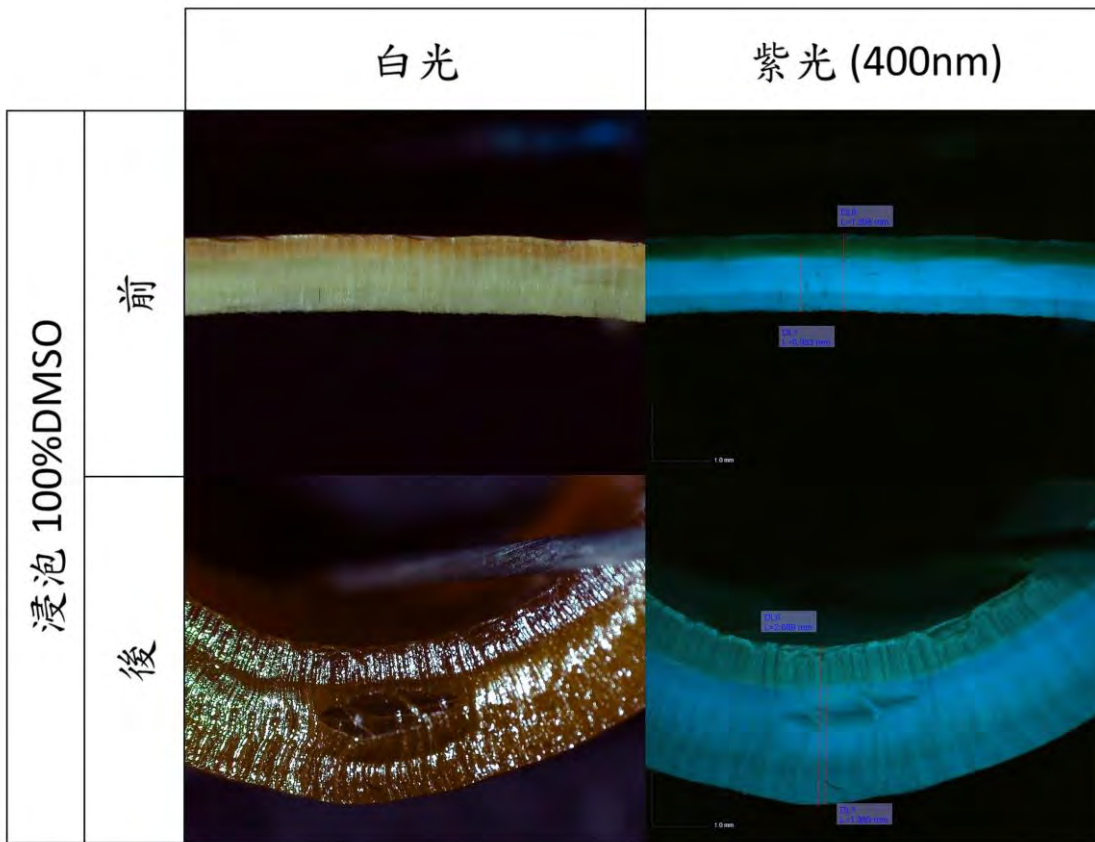


圖 25 ▲ 成蟹蟹殼浸泡 100%DMSO 前後的對照圖。

利用數位紫外線顯微鏡拍攝白光和紫光（400nm）照射下蟹殼浸泡 DMSO 前後的變化，在螢光結果圖中測量蟹殼全厚度以及螢光層厚度，蟹殼全厚度從 1.308mm 增加至 2.689mm，螢光層厚度從 0.953mm 增加至 1.980mm。

◆ 實驗結果：

DMSO 可破壞蟹殼結構造成蟹殼的膨脹。

四、實驗四：蠶殼萃取物光譜分析

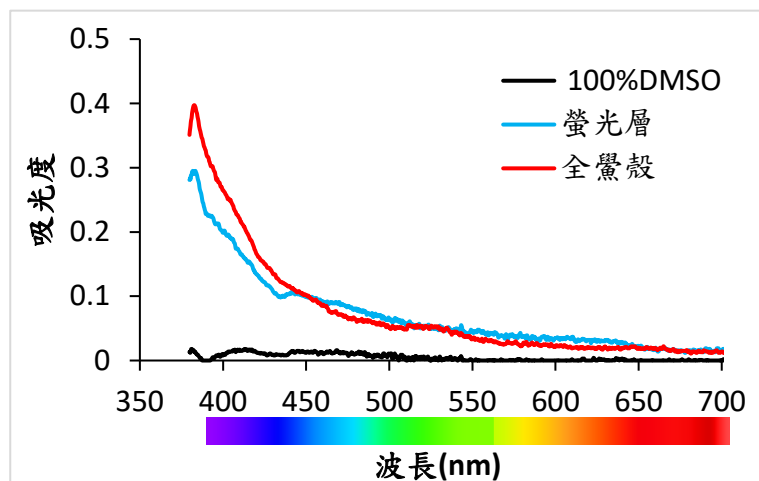


圖 26 ▲ 全殼萃取液、螢光層萃取液和 DMSO 的吸收光譜圖。

用光譜分析儀測量各溶液的吸收光譜，以 100%DMSO 作為 blank，觀察全殼萃取液、螢光層萃取液和 DMSO 的吸收光譜判斷主要吸收光的波長和吸光度。

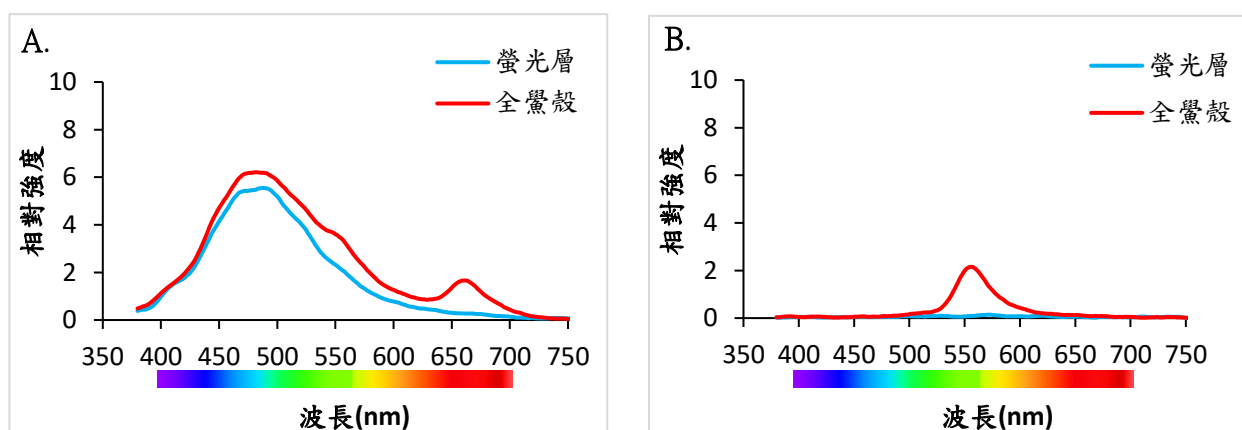


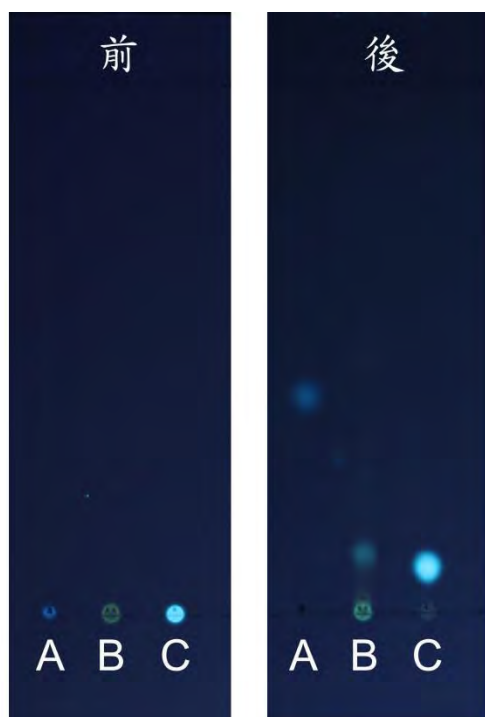
圖 27 ▲全蠶殼萃取液和螢光層萃取液以 (A) 405nm (B) 500nm 光源照射的放射光譜圖。

利用光譜分析儀中 (A) 405nm (B) 500nm 的激發光 (Excitation light) 照射全蠶殼和螢光層萃取液，分析它們的放射光譜 (Emission spectrum)，實驗結果以 100%DMSO 作為 blank 進行繪圖。

◆ 實驗結果：

全蠶殼萃取液和螢光層萃取液對於紫光(400nm 左右)具有吸收的現象。當激發光為 405nm 時，全蠶殼萃取液的大小波峰位於 490nm 和 660nm，而螢光層萃取液的單一波峰則同在 490nm。當激發光為 500nm 時，全殼萃取液的波峰位在 560nm，而螢光層萃取液則沒有明顯的波峰。

五、實驗五：螢光物質結構分析



物質代號	展開液移動距離 (mm)	物質移動距離 (mm)	Rf
A	50	21.8	0.44
F1	50	0	0
F2	50	6.70	0.13
C	50	5.88	0.12

圖 28 ▲利用薄層色層分析 (TLC) 分析螢光層中螢光物質成分。

實驗將 (A) 7-羥基-4-甲基香豆素，(B) 蠶殼萃取液 和 (C) β -啡啉，點置在 TLC 片上 (前)，經過展開液 (正己烷：乙酸乙酯= 5:5) 分離後，蠶殼萃取液可分離出兩個明顯的螢光點，一個位於原點 (F1)，另一個則隨展開液上升 (F2)。經過比對蠍子外骨骼中的兩種螢光物質，可知 F2 的 Rf 值和 β -啡啉相近，而與 7-羥基-4-甲基香豆素則相差甚遠。

◆ 實驗結果：

結果顯示，蠶殼萃取液中的螢光物質不只一種，而其中一種可能是和 β -啡啉化學結構類似的螢光物質。

六、實驗六：蠶殼耐壓強度測試

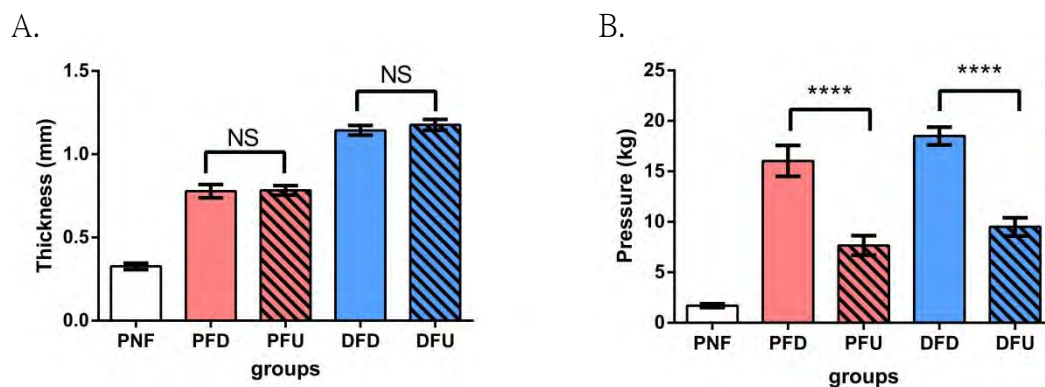


圖 29 ▲ 以推拉力計對蠶殼進行耐壓強度測試。

(A) 各分組間蠶殼的厚度比較。(B) 各分組進行壓力測試後的結果。**** $p < 0.0001$

(分組說明：PNF：薄螢光層蠶殼；PFD：螢光層朝下的腹面蠶殼；PFU：螢光層朝上的腹面蠶殼；DFD：螢光層朝下的背面蠶殼；DFU：螢光層朝上的背面蠶殼。)

◆ 實驗結果：

1. 由圖 B 可知，無論是背面或腹面蠶殼，當螢光層（內角質層）朝下置放時，其耐壓強度均較朝上置放時高，而薄螢光層蠶殼則明顯低於其他四組。
2. 由圖 A 可知，腹面殼兩組間、背面殼兩組間的蠶殼厚度沒有差異，但耐壓測試結果卻明顯不同，顯示螢光層（內角質層）和外角質層的上下排序是影響蠶殼承壓量的主因，而非蠶殼厚度。

七、實驗七：蠶殼萃取物抑菌測試

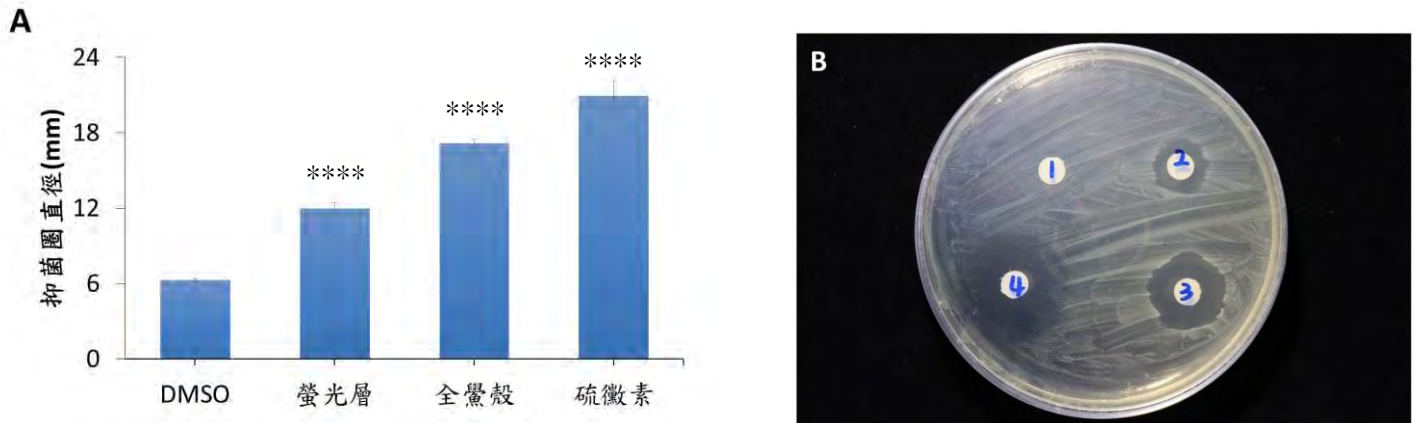


圖 30 ▲ 蠶殼萃取液對大腸桿菌抑菌活性檢測。

將吸附 DMSO、螢光層萃取液、全蠶殼萃取液、硫黴素四種溶液之圓形濾紙置放於大腸桿菌培養皿中 24 小時後其細菌生長情形，並測量各組抑菌圈之直徑(平均值±平均標準差)。(n=6) (分組說明：1：溶劑 DMSO；2：螢光層萃取液；3：全蠶殼萃取液；4：硫黴素。)

****p<0.0001 compared to the DMSO group

◆ 實驗結果：

由圖可知，作為溶劑的 DMSO 並無抑菌效果，而全殼、螢光層萃取液均有出現抑菌圈，顯示兩種萃取液中含有可以抑菌之物質，而抗生素（硫黴素）則作為陽性對照組，具有抑菌效果。

陸、討論

蟹 (Horseshoe crab) 是一種在地球上存活了 4 億多年的活化石。目前全世界共有四種現生種，一種分布在北美東岸，其他三種則分布在東亞海域。在台灣所分布的蟹為三棘蟹 (*Tachypleus tridentatus*)。本研究利用形態學、化學分析、物理力學以及微生物學等實驗方法對三棘蟹自體螢光現象進行探討，期盼能藉由本研究之成果，讓世人對於蟹的身世有更深入的瞭解。

本研究首次證實活體稚蟹經紫光 (400nm) 照射下，可產生自體螢光的現象，並以蟹殼標本深入觀察此螢光表現在蟹殼上所分布之位置和形態。根據螢光物質分布在內角質層的形態和本草綱目中對蟹殼入藥功效的敘述，我們設計兩個功能性探討實驗，證實螢光層具有強化外骨骼以及抑菌之功能，以此推論螢光層讓蟹的外骨骼具備著物理性和化學性屏障的保護。最後，我們利用有機溶劑 DMSO 和甲醇將螢光物質進行萃取，並以光譜分析和色層分析檢測，以揭露蟹殼螢光層中螢光物質的種類和結構成分。

(一) 三棘蟹自體螢光形態之觀察

1. 比較軟、硬殼稚蟹的螢光形態，我們推測螢光物質的出現與蟹殼的硬化過程有關。當稚蟹進行蛻殼時，由於個體成長後體型較舊殼來的大，為求順利脫殼，螢光物質的表現會先受到抑制。隨著舊殼蛻去後，稚蟹外骨骼的螢光形態才會逐漸形成與增強，同時，蟹殼的硬度也會隨之提升，這些發現與蠍子的自體螢光現象非常相似 (Pavan., 1954)。
2. 節肢動物的關節支點是負責關節活動的要角，實驗中發現軟殼稚蟹螢光現象最明顯的部位都集中於關節支點處，推測其原因在於讓螢光物質聚集在支點處將能大大提升支點的硬度，使得軟殼稚蟹能持續維持正常的行走和覓食行為。
3. 從圖 20 可見，稚蟹螢光層較成蟹來得薄，推測原因有兩點：
 - (1) 稚蟹須經歷 15~17 次蛻殼才發育成熟，因此對於生物能量的運用，若稚蟹的螢光層很厚，每一次蛻殼後，稚蟹都需要再耗費大量的生物能量維持螢光層的厚度，這對稚蟹而言相當不利於生存。
 - (2) 稚蟹生活於砂質潮間帶，因此並不像成蟹需要厚度較大的螢光層，以對抗水深二十至三十公尺的水壓環境。

4. 從圖 21 可見，成蠶內部的螢光反應比外部強烈許多，加上內部的螢光層分布極廣，因此推論，蠶的螢光現象或許並非是為了吸引異性或是引誘獵物，而是為了強化自身外骨骼硬度來對抗深海水壓。
5. 觀察稚蠶以及成蠶蠶殼標本的自體螢光現象，我們發現兩者發生自體螢光的部位皆位在蠶殼的內角質層(Endocuticle)中(圖 20)。但，成蠶蠶殼有兩處獨有的支撐構造(膠狀以及柱狀)也具有螢光表現(圖 22, 圖 23)。頭胸甲背部內側的膠狀支持性構造為不連續分布，分布的區域位於單眼、複眼、中脊、側脊以及頭胸甲-腹甲關節處，其中以在側脊的分布面積最大。對此，我們推測膠狀支持性構造分布於側脊的目的是為了強化和維持頭胸背甲的U形結構。蠶殼夾層中的柱狀支撐構造與人類海綿骨中的骨小樑(trabeculae)非常相似(圖 24)，該柱狀構造的排列方式讓蠶殼以輕量材質建構，進而達到最大堅固性。綜合上述兩種支持性構造的形態以及螢光現象的發現，我們相信螢光物質對於兩類支持性構造功能的展現具有相當重要的意義，但仍需要後續更多的實驗證據進一步探討螢光物質在其中的角色。

(二) 蠶殼螢光物質之成分分析

1. 過去對昆蟲外骨骼的研究發現，節肢動物的外骨骼是由蛋白質、幾丁質和酚類化合物(phenolic compound)等成分。其中，酚類化合物是由芳香環的胺基酸-酪氨酸(tyrosine)、苯丙氨酸(phenylalanine)、色氨酸(tryptophan)等，經酵素作用所產生的物質。酚類化合物的作用是負責牽引大分子蛋白質與幾丁質醣鏈彼此能交叉連接，以強化外骨骼之支撐性(Noh et al., 2016; Xu et al., 1997)。因此，若能有效破壞蛋白質亦或是幾丁質結構，則可將螢光物質自外骨骼中分離。
2. 在進行實驗三製備螢光層萃取液時，以 DMSO 浸泡蠶殼過程中發現，浸泡過 DMSO 的蠶殼有膨脹現象，推測原因是因為 DMSO 具有讓蛋白質變性和使幾丁質長鏈斷裂的特性，因此當蠶殼中各物質間結構崩解的時候，DMSO 滲入結構中，使蠶殼膨脹。根據上述現象的出現，我們推測以 DMSO 浸泡蠶殼，可使螢光物質因此而溶出。
3. 形態實驗利用紫光(400nm)照射蠶殼，能觀察到蠶殼的螢光現象。由圖 26 的結果可知，全蠶殼和螢光層萃取液同樣對於 400nm 左右的光也具有吸收的作用。因此，推論 DMSO 能將螢光物質自蠶殼中萃取出。為了進一步驗證 DMSO 能有效萃取蠶殼螢光物質，首先選定 405nm 為激發光源(圖 27A)，結果顯示全蠶殼和螢光層萃取液所放射出的波段較廣，因此推測萃取液中應該含有一種以上的螢光物質，後續 TLC 的結果證實此觀點(圖 28)。

4. 前人研究提出蠍子與蠶均有自體螢光之現象，可能為其演化上之共祖徵 (Rubin et al., 2017)，而蠍子的螢光物質已被證實有兩種化學成分，為 7-Hydroxy-4-methylcoumarin (7-羥基-4-甲基香豆素) 和 β -carboline (β -咔啉) (Stachel et al. 1999; Frost et al. 2001)，因此本研究推測或許利用 TLC 分離出的螢光物質，可能與蠍子已發表的這兩種螢光物質相似。結果顯示，蠶殼萃取液中的螢光物質和蠍子的螢光物質並不相同，但有可能是一個和 β -咔啉化學結構類似的螢光物質。 β -咔啉類化合物具有各種不同官能基的構型，進而影響螢光物質的大小和極性。未來，我們將繼續利用 TLC 和氣相色譜法 - 質譜法聯用 (Gas chromatography - mass spectrometry) 等方法進一步解析蠶螢光物質是否為 β -咔啉類化合物。

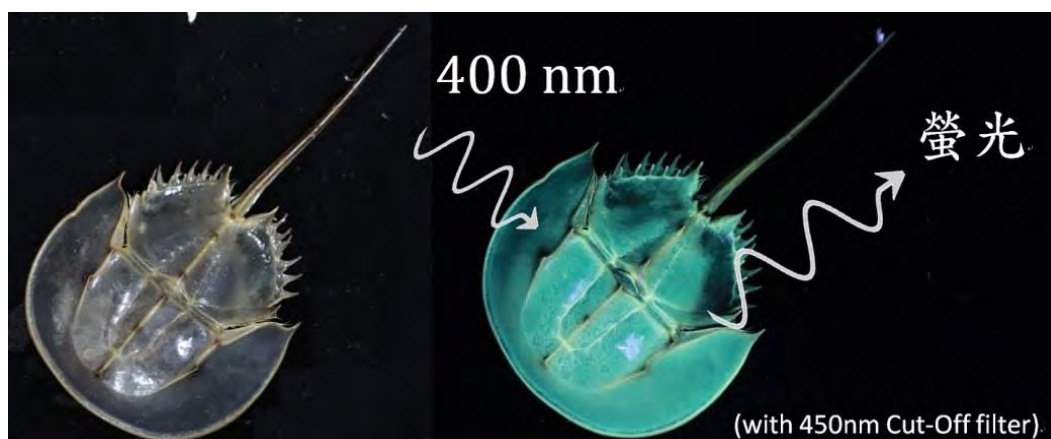
(三) 蠶殼螢光層之功能探討

1. Rubin 等人在 2017 年的發表中指出，美洲蠶和蠍子標本的螢光現象是發生在外骨骼中的外角質層 (Rubin et al., 2017)。本研究的實驗結果顯示，三棘蠶無論是稚蠶或成蠶蠶殼，螢光現象分布的區域都在外骨骼中的內角質層而非外角質層。因此，我們推論螢光層 (內角質層) 之功能與其所在的部位有關，特別是用於強化外骨骼的耐壓性，故設計耐壓測試來探討兩者之關聯性。
2. 一般認為蠶殼的厚度會影響其殼的抗壓效果，因此推斷螢光層只是用來增厚以增加承壓量。但從圖 29 可知，同樣擁有螢光層且厚度相近的蠶殼會因螢光層和外層的排序不同而有不同承壓量，進而得知厚度並非影響承壓量的主因，螢光層以及外角質層的排序才是主因。從圖 29-B 發現螢光層朝下比螢光層朝上的承壓量來得高，認為是因為螢光層較有韌性，當蠶殼受外力壓迫時，螢光層不易產生裂隙，進而讓蠶殼的承壓量提高；反之，螢光層朝上時，因外角質層性質為堅硬但易脆，當蠶殼受外力壓迫時，外角質層較產生裂隙，進而使得蠶殼瞬間斷裂。
3. 研究發現，海洋中的革蘭氏陰性菌，例如霍亂弧菌、產黃菌、假單胞菌、巴斯德氏菌和腐敗希瓦氏菌等一旦入侵蠶體內，就會引發疾病的發生 (Leibovitz and Lewbart., 2004)。因此，蠶的外骨骼除是堅硬的物理性屏障，或許也具有化學性屏障的作用，以對抗細菌的侵入。此外，古書《本草綱目》介部第四十五卷中也記載著蠶殼入藥可主治積年咳嗽。由圖 30 結果可知，蠶殼萃取物無論是全蠶殼或螢光層均對大腸桿菌生長都有顯著的抑制作用，其中，全蠶殼的抑菌效果明顯優於螢光層。對此，我們推論是由於物質萃取過程無法標準化所致。另外，外角質層或許也具有抑菌成分之緣故。

4. 由圖 30 觀察到成蟹的全殼萃取液對大腸桿菌有如此顯著的抑菌效果，讓我們未來想以此實驗結果為基礎，再進一步以全殼萃取液進行更多的細菌檢測實驗，以釐清抗菌物質的成分為何。藉由對蟹殼抑菌成分的了解，最終之目的是希望以化學合成方式，產生製造具有顯著療效的抑菌物質，為人類開發新的抗生素提供一個研究方向。

柒、 結論

- 一、三棘蟹的稚蟹活體和蟹殼標本在受到紫光（400nm）照射後均會產生藍綠色螢光現象。且在蟹殼突出、關節和常磨損的部位(螯肢、步足等)螢光現象最為明顯。
- 二、成蟹蟹殼內部有膠狀和柱狀兩種支撐構造且具有螢光表現。膠狀支撐構造廣泛分布，柱狀支撐構造則位於蟹殼夾層。
- 三、蟹殼中的螢光物質可利用有機溶液作萃取。
- 四、依薄層色層分析結果推論蟹殼中的螢光物質可能是 β -咔啉類化合物。
- 五、蟹殼螢光層能強化外骨骼，進而增加蟹殼對外力的承壓量之功能。
- 六、蟹殼萃取物具有抑制大腸桿菌生長之功效。



捌、參考資料及其他

- 1、 陳章波、陳勇輝（2011）。**蟹的史詩—台灣三棘蟹保育特展專刊**。屏東：國立海洋生物博物館。
- 2、 謝明昌、張志堅、林金榮、陳其欽、黃丁士、蔡萬生（2011）。**蟹的研究與應用**。水試專訊，33，11-15。
- 3、 鄭明倫（2017）。**照亮生命科學的地球微光(三)生物螢光**。國立自然科學博物館訊。第 360 期。
- 4、 Kawase M, Varu B, Shah A, Motohashi N, Tani S, et al. 2001. Antimicrobial activity of new coumarin derivatives. *Arzneimittelforschung* 51: 67-71
- 5、 Leibovitz L, Lewbart GA . 2004. Diseases and symbionts: Vulnerability despite tough shells. In: Shuster CN Jr, Barlow RB, Brockmann HJ (eds) *The American Horseshoe Crab*. Harvard University Press, Cambridge, pp 245 – 275
- 6、 Noh MY, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Arakane Y. 2016. Cuticle formation and pigmentation in beetles. *Curr Opin Insect Sci* 17: 1-9
- 7、 Pavan M. 1954. [Presence and distribution of a fluorescent substance in scorpion tegument]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 30: 801-3
- 8、 Rubin M, Lamsdell J, Prendini L, Hopkins M. 2017. Exocuticular hyaline layer of sea scorpions and horseshoe crabs suggests cuticular fluorescence is plesiomorphic in chelicerates. *Journal of Zoology* 303: 245-53
- 9、 Stachel, S.J., Stockwell, S.A. and VanVranken, D.L. 1999. The fluorescence of scorpions and cataractogenesis. *Chem. Biol.*, 6: 531-539.
- 10、 Xu R, Huang X, Hopkins TL, Kramer KJ. 1997. Catecholamine and histidyl protein cross-linked structures in sclerotized insect cuticle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 101-08

【評語】 052004

本研究對金門三棘蠶自體螢光現象之探討。用有機溶劑抽取蠶殼之螢光物質，可吸收 405nm 並 480-490 藍絲螢光，並經 thin-layer chromatography 分析之 RF 值與 β 咔啉相近。經證實蠶殼入藥可殺菌。本實驗對於蠶的自體螢光現象以及特性討論相當有意思，實驗的完整性及可讀性出色，解說及圖片呈現得宜，其抑菌效果也具有前瞻性，可以作為後續研究的題目。

本研究實驗資料整理的相當清楚，但與過往研究之間的關係較不清楚，文獻整理上宜加入較新的文獻。建議 LC/M/M 分析其分子量並分析其殺菌作用。

摘要

鱈在海洋悠遊4億多年，牠能存活至今的謎團尚未完全揭露。本實驗利用形態學、化學分析、物理力學和微生物學等方式探究三棘鱈 (*Tachypleus tridentatus*) 自體螢光現象。

本研究首次發現鱈受紫光 (400nm) 照射會有自體螢光現象，且鱈殼內的膠、柱狀支持性構造亦有螢光表現。再以有機溶液對鱈殼螢光物質作萃取，並分析萃取液中的光譜特性，得其可吸收405nm光源並發散出480~490nm的藍綠螢光。進一步利用薄層層析法比對蠍子的螢光物質，結果顯示鱈殼中螢光物質的Rf值與蠍子中的β-卟啉相近。最後，依螢光物質分布位置和《本草綱目》曾記述鱈殼入藥，設計耐壓及抑菌兩功能性實驗，證實鱈殼中螢光層具有物理、化學屏障功效，有助於其生存。最後，我們衷心期盼本研究能吸引世人目光，並喚起大眾共同保育三棘鱈！

壹、研究動機

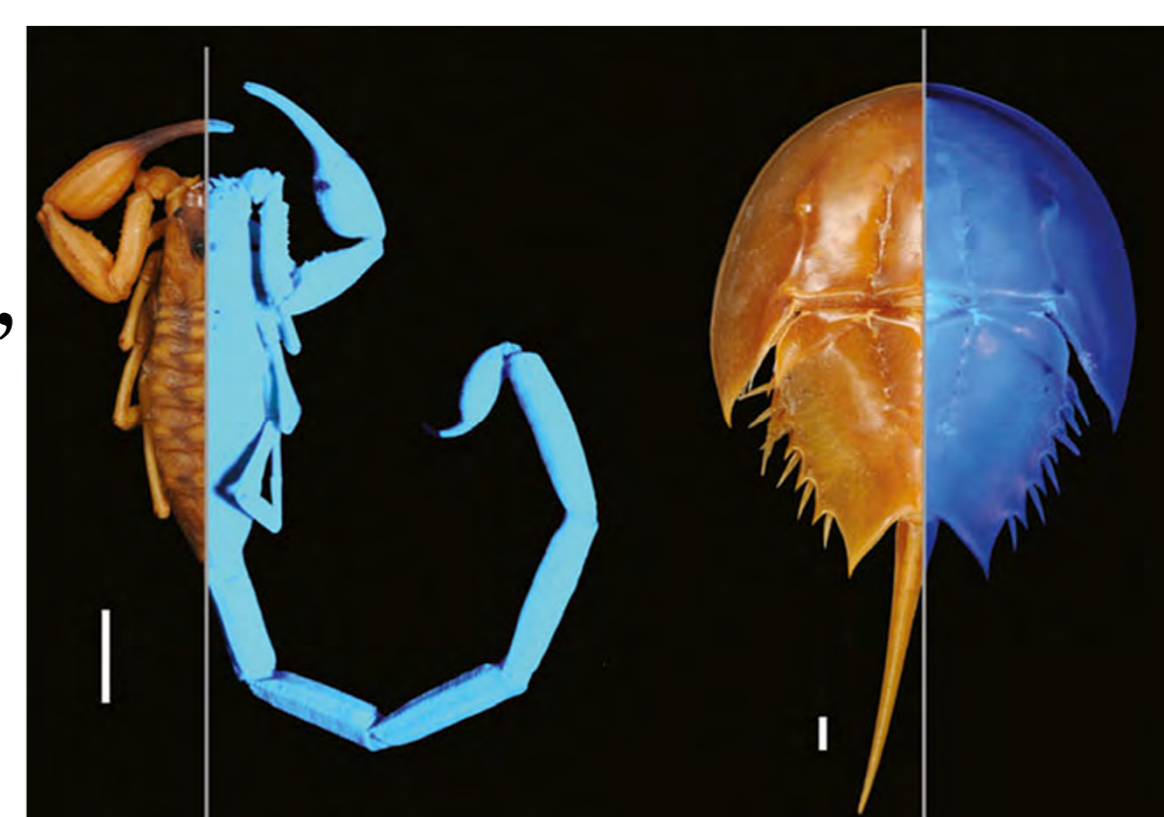
在四面環海的家鄉，海洋生物和島上居民有著密不可分的關係，其中讓我們最感興趣的是外型特殊，有著「鐵鋼盔」之稱的活化石—鱈。我們在海岸泥灘地常可藉由其「川」字形爬痕，一窺稚鱈蹤影。但近年，我們在海邊撿拾到的稚鱈鱈殼數量愈來愈少，讓我們驚覺其生存危機，因此我們希望能發掘其獨特之處，讓世人更認識牠進而守護牠！



▲圖1. 以「川」字形爬痕找尋稚鱈

貳、研究背景

鱈為海洋底棲性無脊椎動物，在地球上已存活了四億五千萬年，是現生種活化石之一。屬於節肢動物門、螯肢亞門 (Chelicerates)、肢口綱、劍尾目，與蠍子是屬同亞門的親近物種。在全世界四種現生鱈種中，分布在台灣為三棘鱈 (*Tachypleus tridentatus*)。

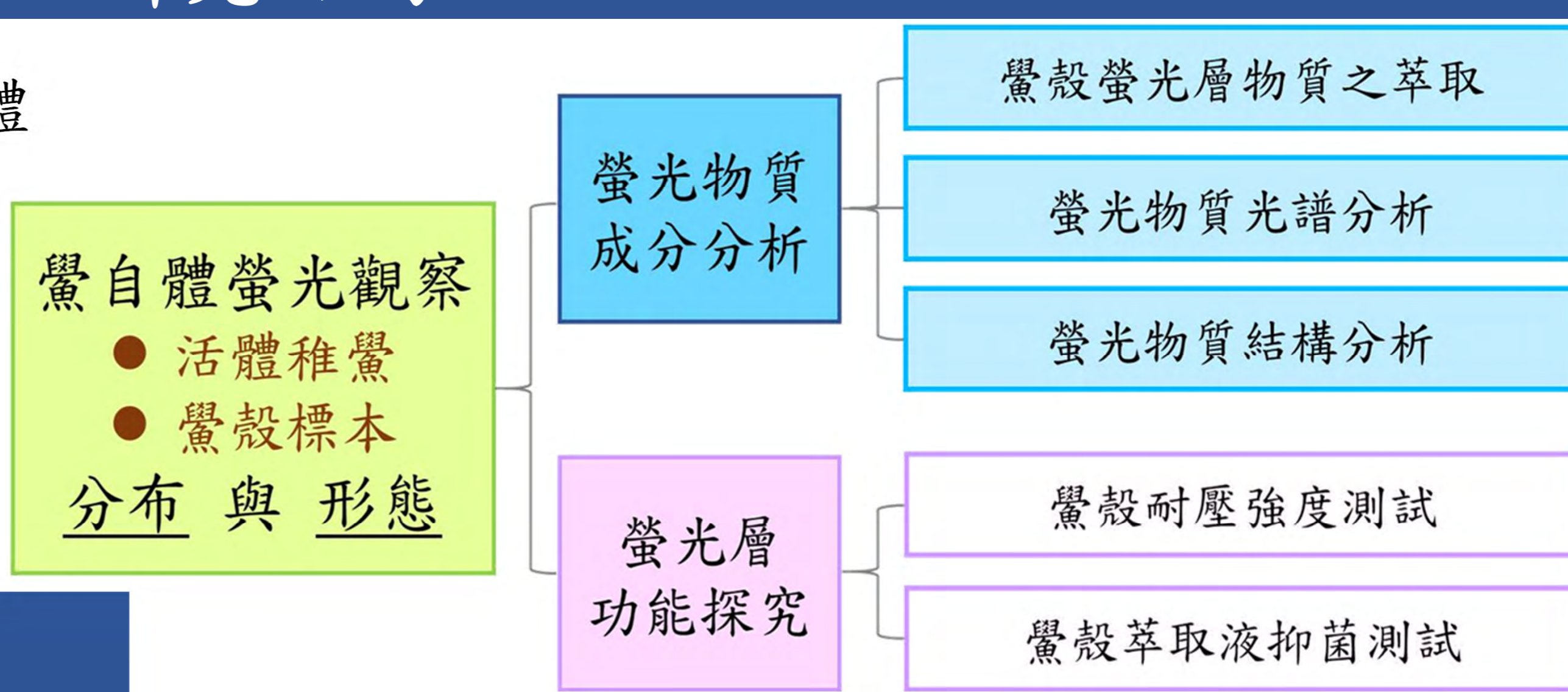


▲圖2. 蠍子和美洲鱈螢光形態 (擷取自doi:10.1111/jzo.12493)

過去研究發現蠍子體表經過長波段紫外光照射具自體螢光現象 (Pavan,1954)。此外，與蠍子相似的自體螢光現象也存在於美洲鱈外骨骼標本中 (如圖2)，因此，科學家推論此外骨骼自體螢光現象可能是螯肢亞門的共祖徵 (Rubin et al.,2017)。

參、研究目的

- 目標一、觀察活體稚鱈和鱈殼標本中自體螢光現象的分布與形態。
- 目標二、鱈殼螢光物質之成分分析。
- 目標三、鱈殼螢光層之功能探究。



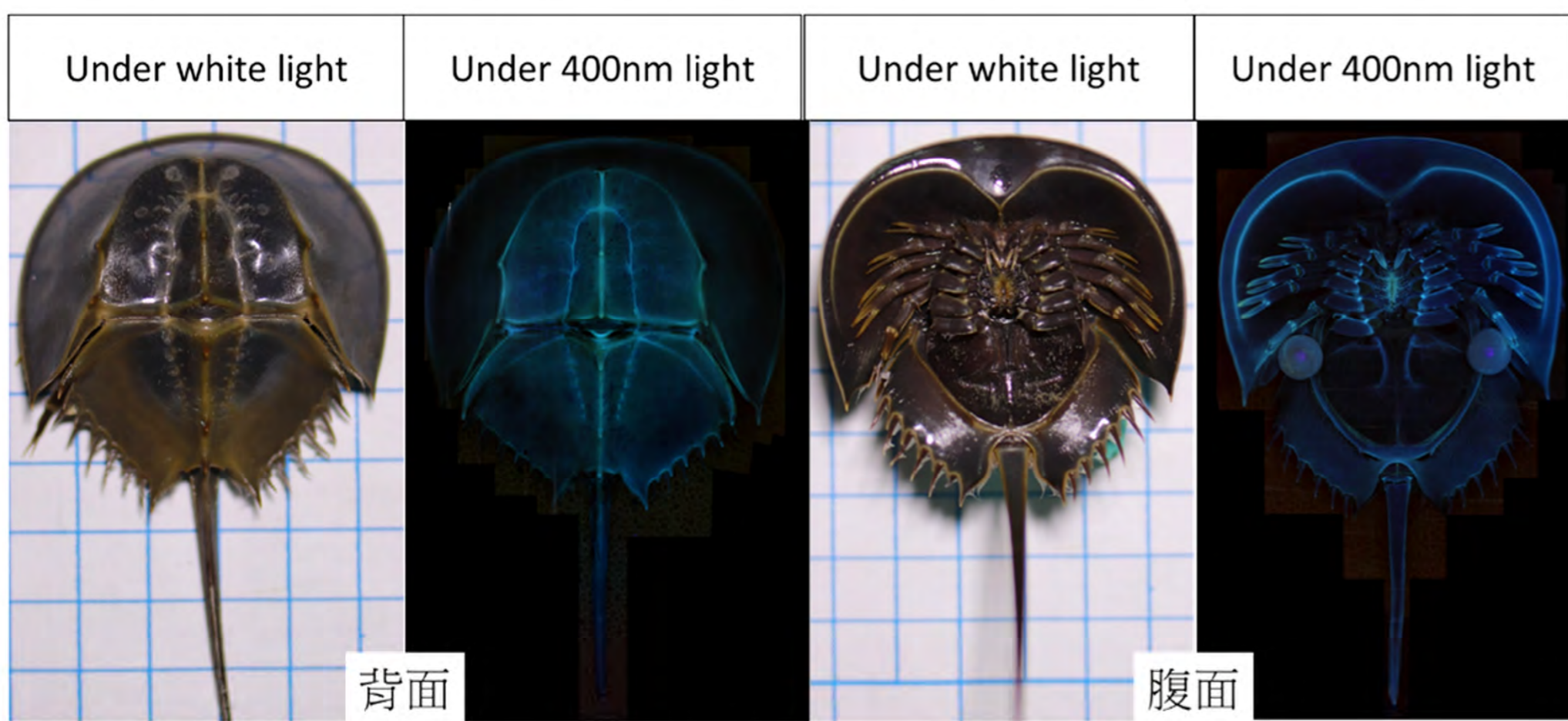
▲圖3. 本研究實驗架構圖

肆、研究方法與結果

◆ 實驗一：活體稚鱈自體螢光現象的觀察

(一)實驗方法：用數位紫外線顯微鏡分別以白光及400nm紫光照射後，拍照紀錄比較軟殼稚鱈、活體硬殼稚鱈和稚鱈蛻殼的螢光現象。

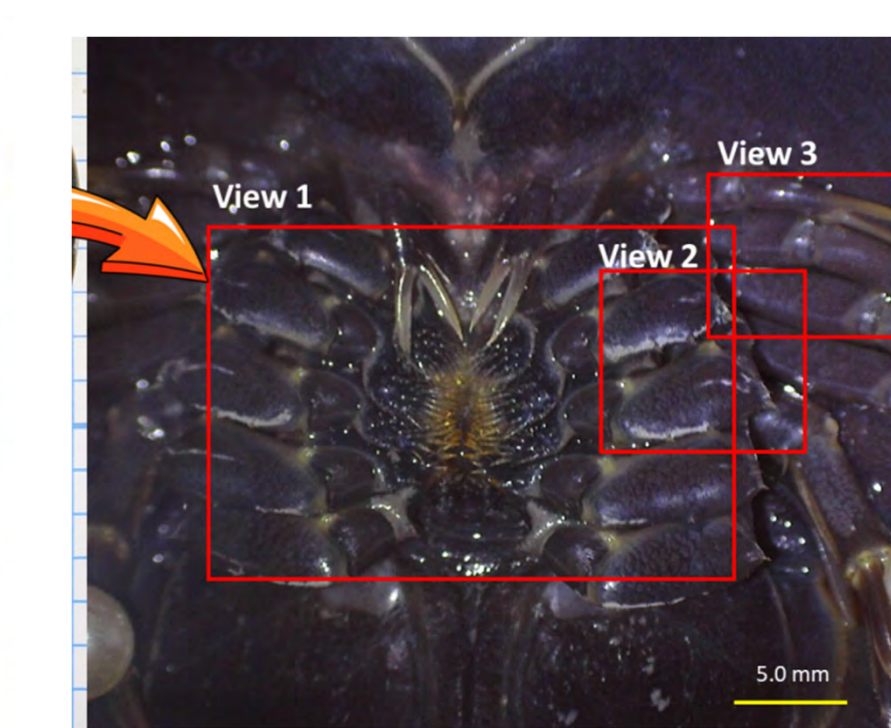
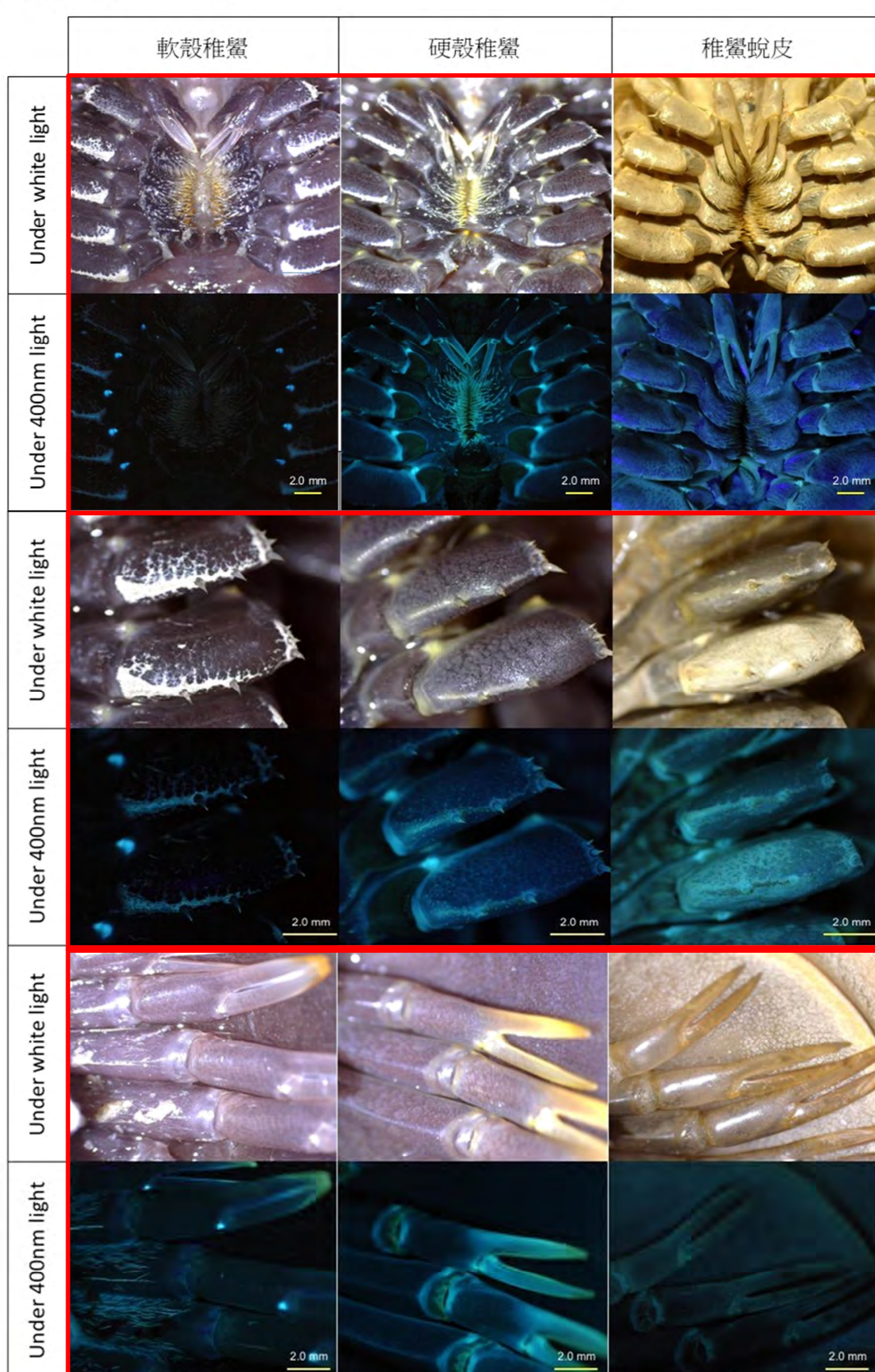
(二)實驗結果：



▲圖4. 以400nm紫光照射活體稚鱈的螢光現象



▲圖5. 蛻殼時的活體稚鱈在白光及400nm紫光照射下所呈現的螢光反應



▲圖6. 稚鱈腹面六對附肢構造示意圖

View1:基節、關節膜和轉節
View2:關節膜和轉節
View3:脛節和附節

◀圖7. 軟殼、硬殼稚鱈和稚鱈蛻殼螢光反應之比較

【結果分析】

1. 活體稚鱈經400nm紫光照射下，鱈殼的背、腹面皆具有明顯的自體螢光現象。
2. 鱈殼背面的螢光反應多分布於較突出處 (如單眼、複眼)和易與環境中砂礫摩擦部位。
3. 蛻殼中的稚鱈其新殼並無螢光反應。

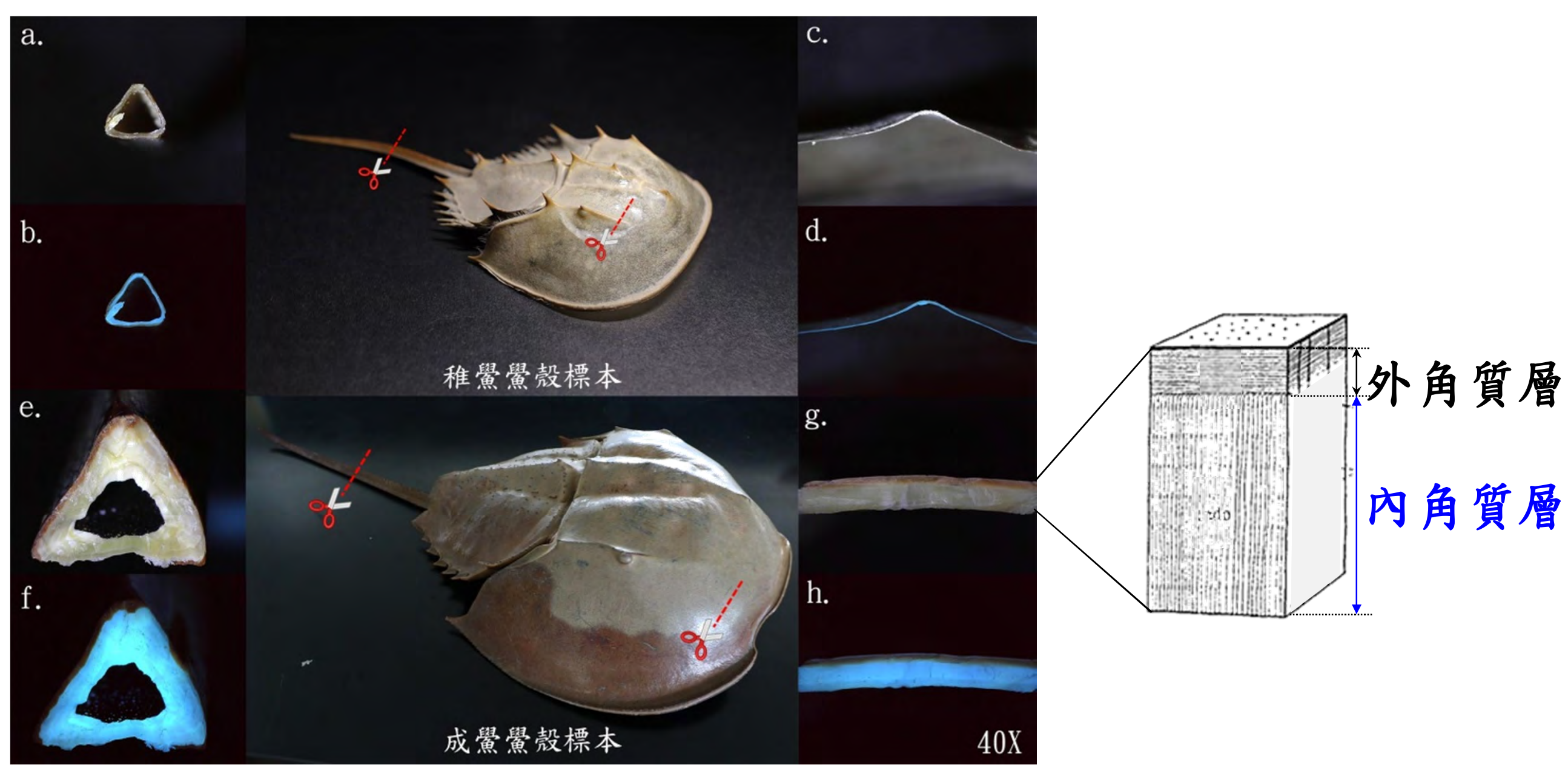
【結果分析】

比較軟、硬殼稚鱈腹面螢光形態，發現螢光物質最早顯現的部位是在關節的支點處，隨著鱈殼逐漸硬化的過程中，基節與基節上的棘、轉節與轉節上的棘、關節膜周圍和螯肢的螢光反應也同步顯著提升。

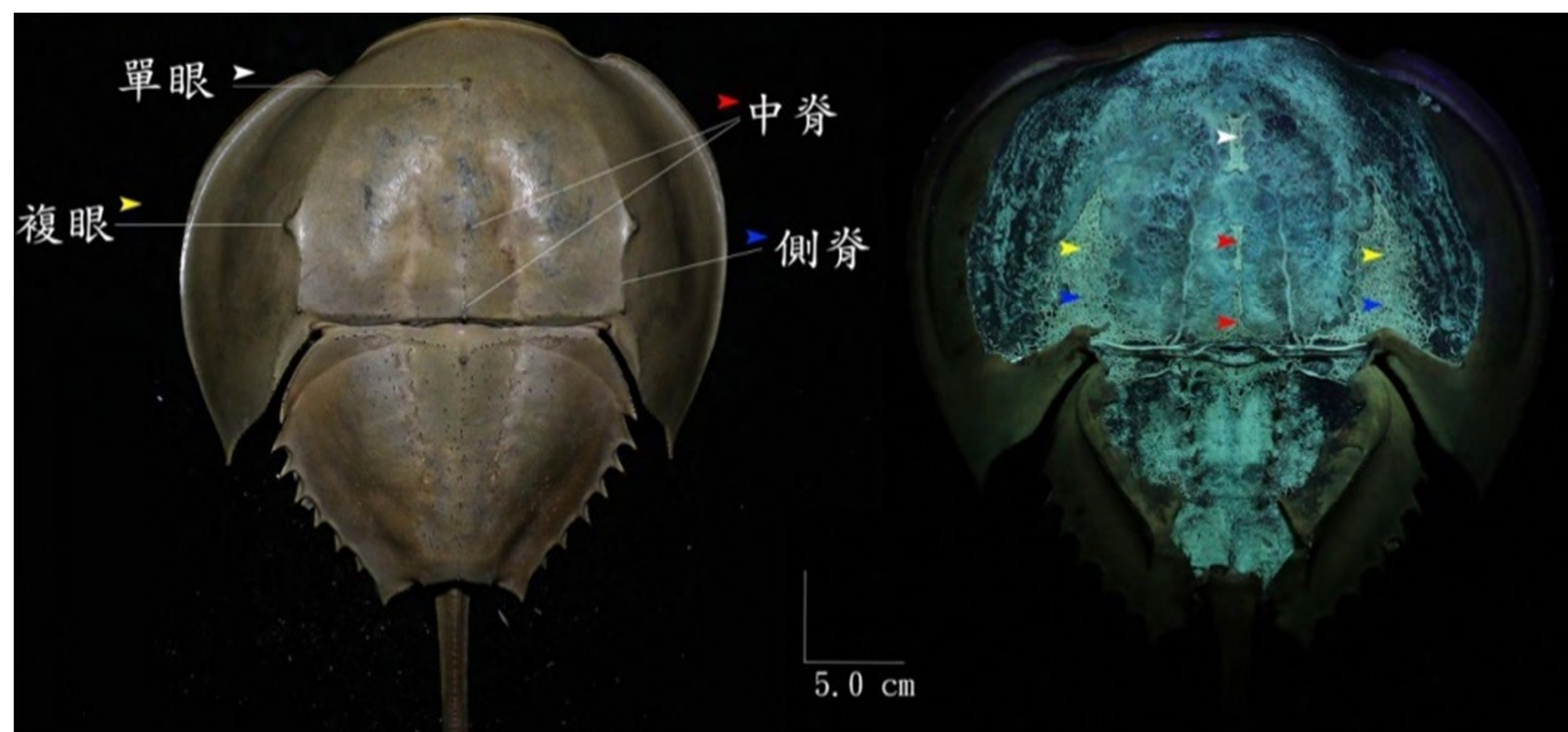
◆ 實驗二：蟹殼標本自體螢光現象的觀察

(一) 實驗方法：用單眼相機和數位紫外線顯微鏡分別以白光及400nm紫光照射蟹殼標本，比較成、稚蟹螢光現象差異，以及針對成蟹標本做細部觀察。

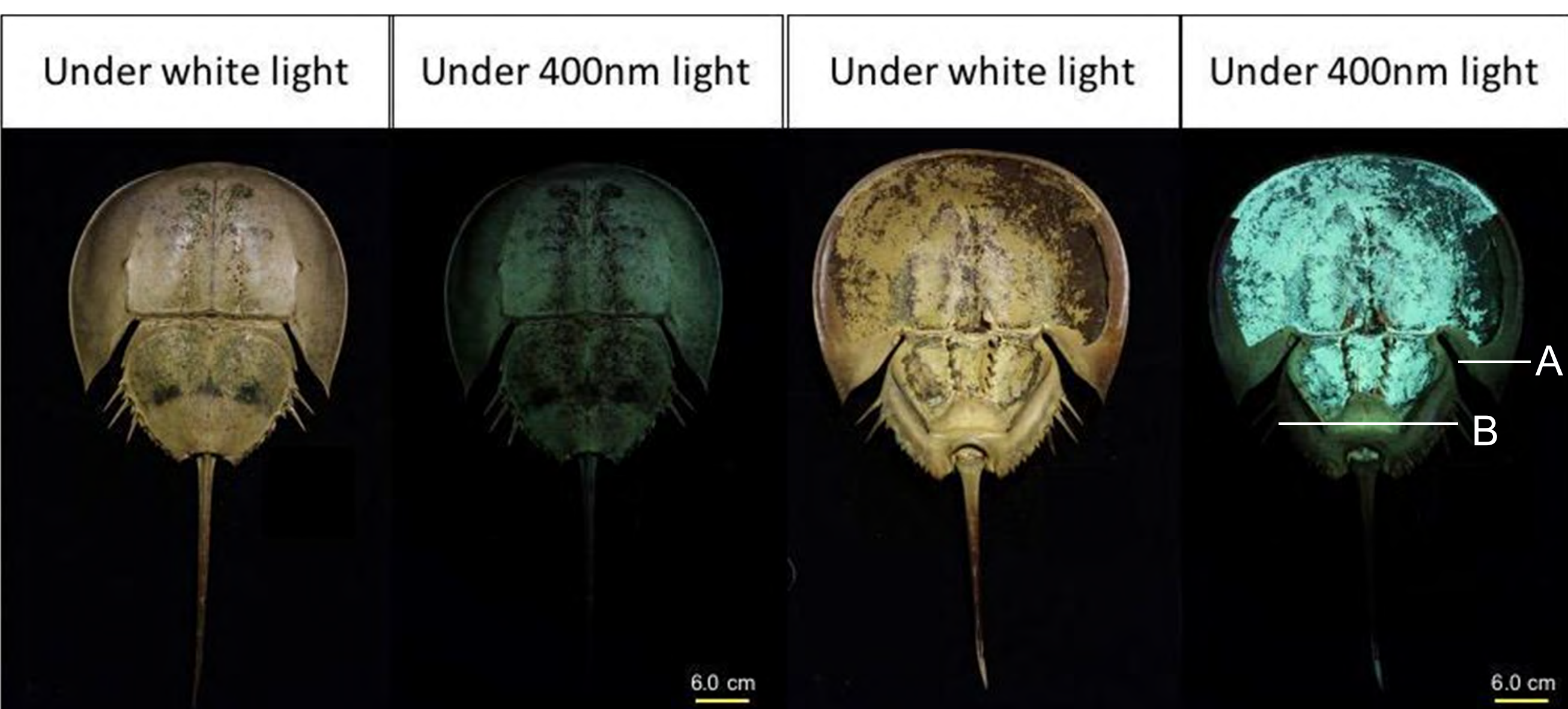
(二) 實驗結果：



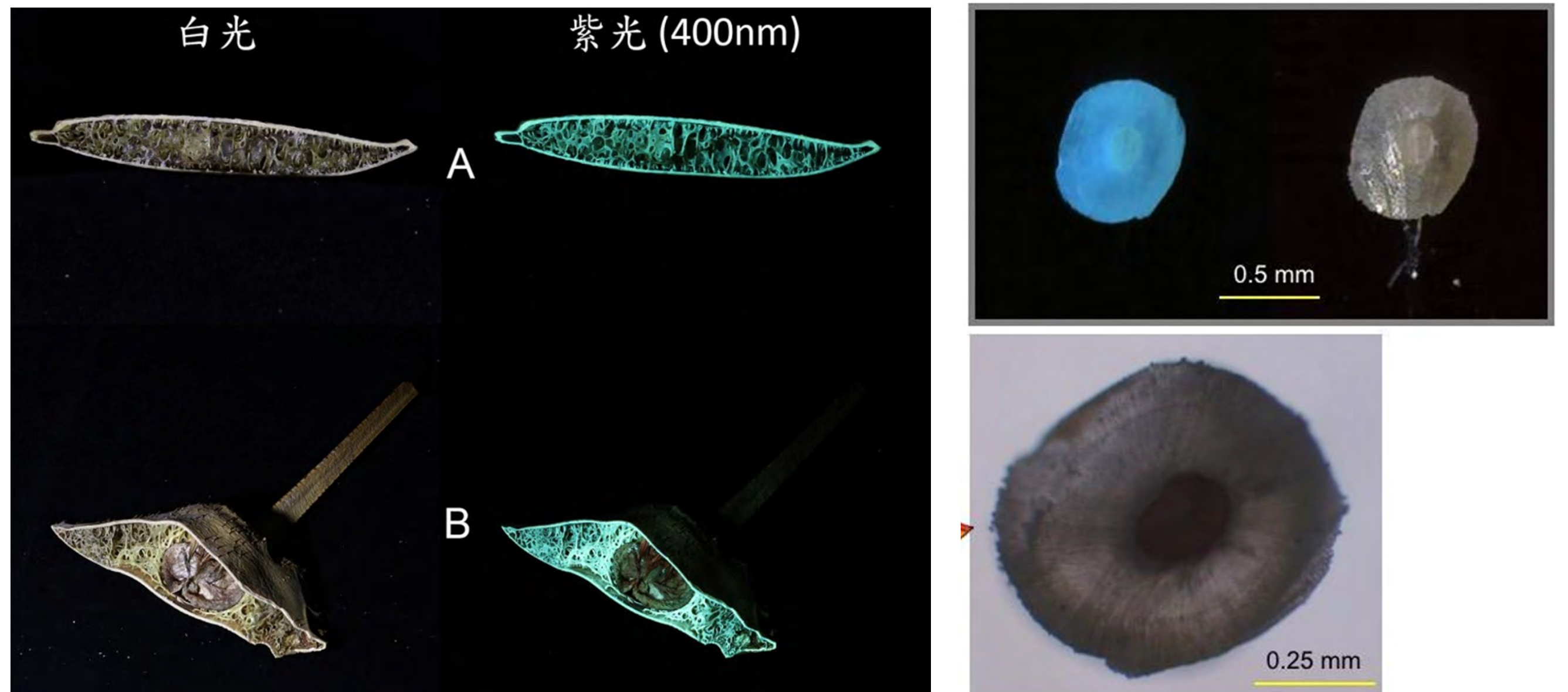
▲圖8. 稚蟹、成蟹蟹殼標本劍尾及頭胸甲蟹殼切面螢光形態



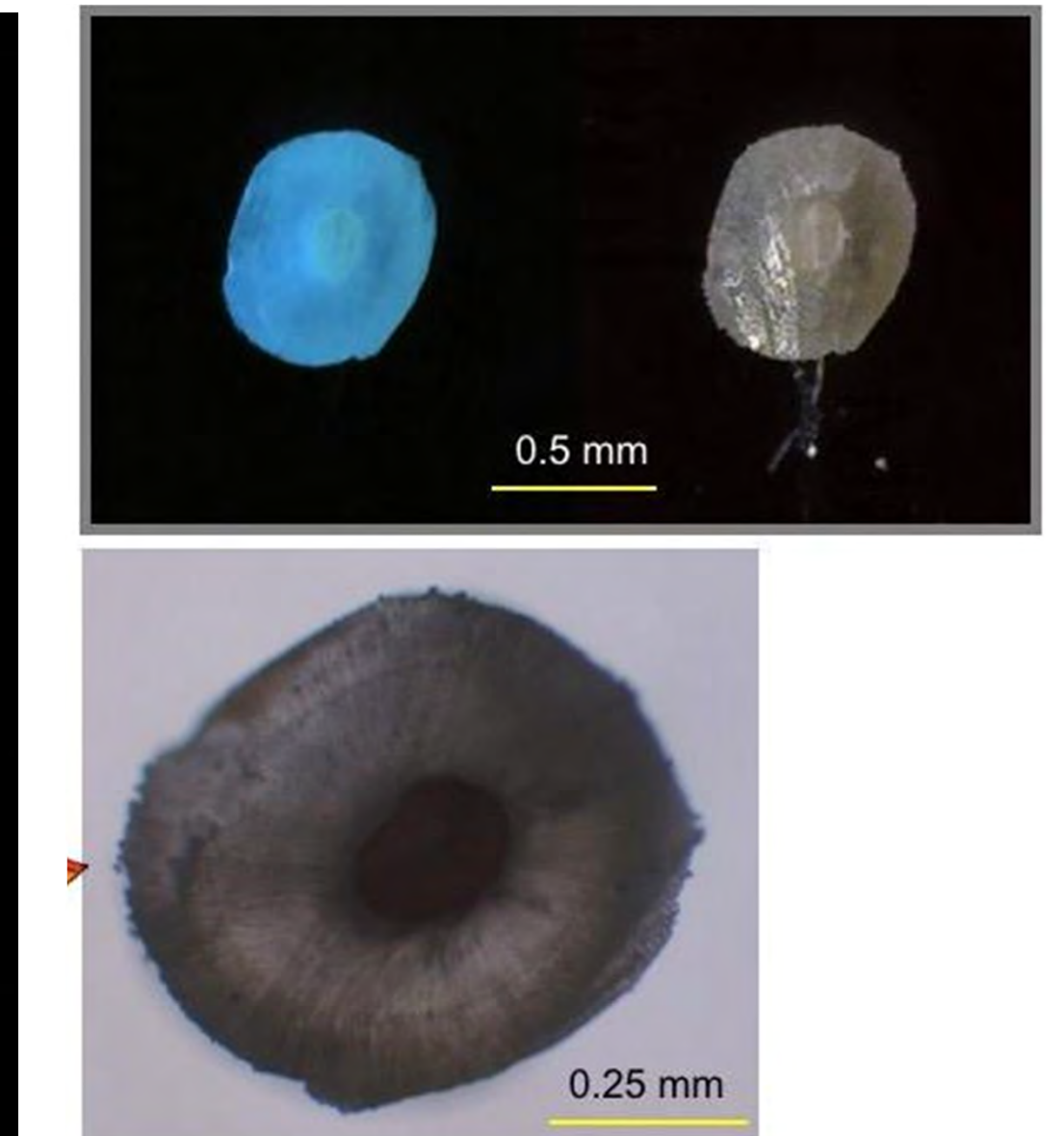
▲圖10. 成蟹蟹殼內膠狀支持性構造與蟹殼外部構造相對位置之比較



▲圖9. 以400nm紫光照射成蟹蟹殼外部、內部的螢光現象



▲圖11. 蟹殼內柱狀支持性構造在頭胸甲邊緣及腹甲尾部的螢光形態



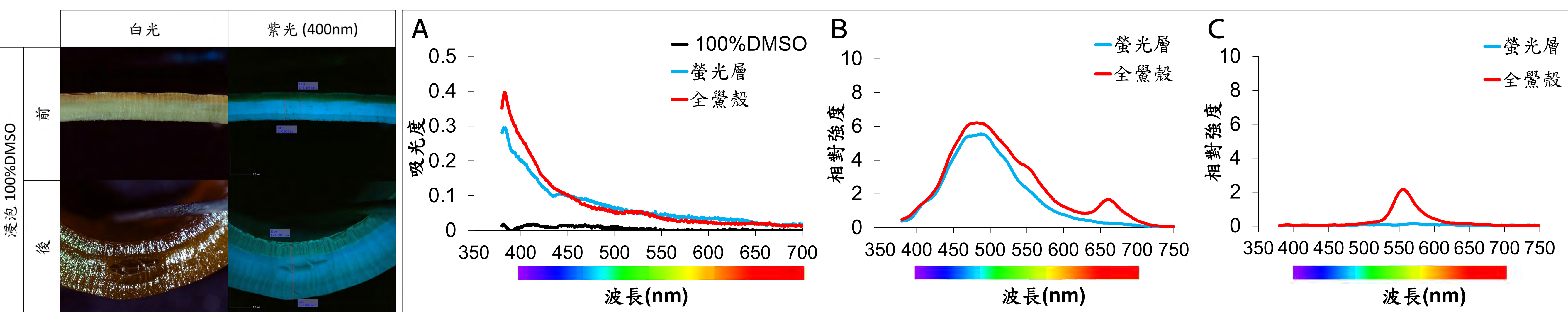
▲圖12. 柱狀支持性構造剖面圖

【結果分析】 無論是稚蟹或成蟹的標本均有螢光現象，且產生螢光的部位是位於外骨骼的內角質層。再詳細檢視成蟹蟹殼內部可發現有兩處螢光表現特別強烈，分別為膠狀和柱狀支持性構造。膠狀支持性構造分布於蟹殼構造上較突出的位置，如單眼、複眼、中脊和側脊；而柱狀支持性構造則是位於蟹殼夾層內，其形態為實心柱狀，且螢光物質均勻分布於柱狀內。

◆ 實驗三、四：蟹殼螢光層物質之萃取及螢光物質光譜分析

(一) 實驗方法：用DMSO浸泡蟹殼，製備蟹殼萃取液，再將所得之萃取液，以光譜分析儀分析溶液之光譜特性。

(二) 實驗結果：



▲圖13. 成蟹蟹殼浸泡DMSO前後對照圖 ▲圖14. DMSO、全殼和螢光層萃取液 A. 吸收光譜圖 B. 以405nm照射放射光譜圖 C. 以500nm照射放射光譜圖

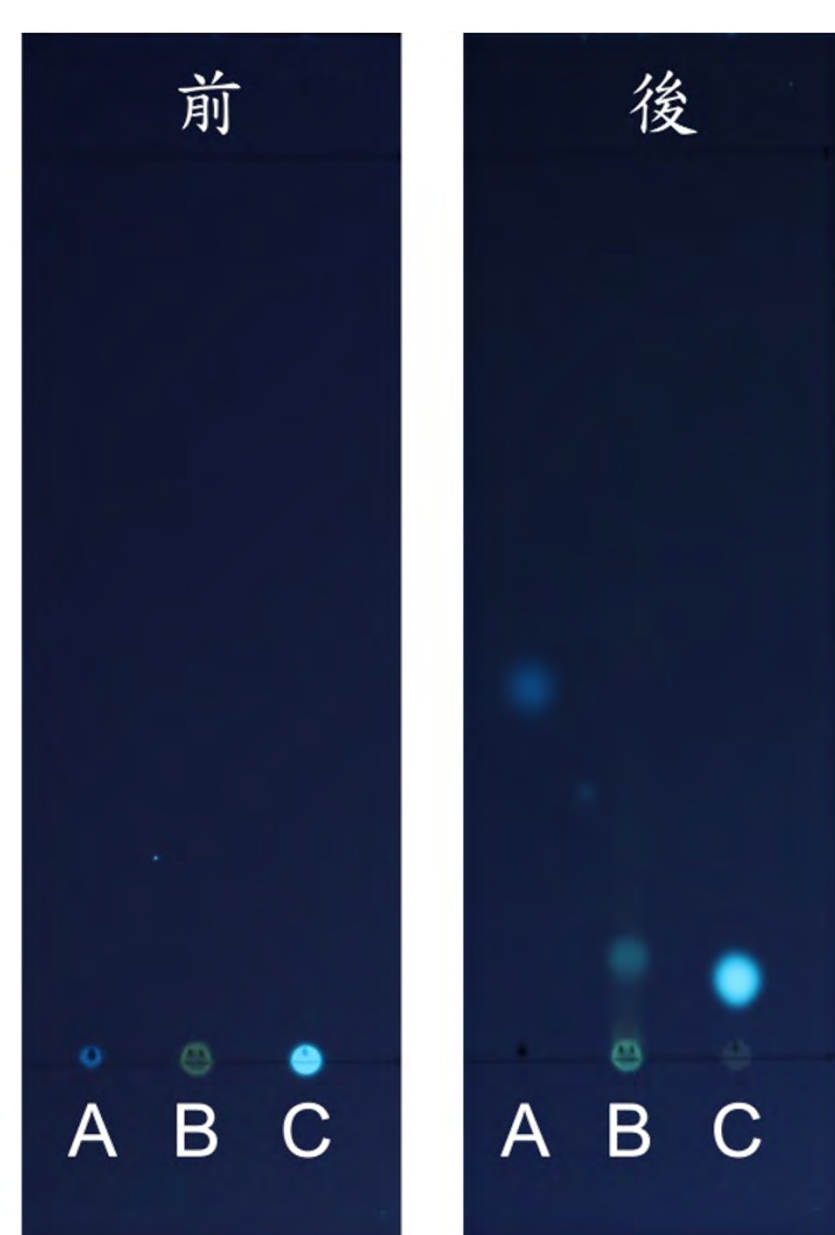
【結果分析】

1. 以DMSO浸泡蟹殼，可有效破壞蟹殼結構，使蟹殼膨脹。
2. 全蟹殼萃取液和螢光層萃取液對於400nm左右紫光具有吸收的現象。
3. 當激發光為405nm時，全蟹殼萃取液的大小波峰位於490nm和660nm，而螢光層萃取液的單一波峰則同位於490nm。
4. 當激發光為500nm時，全殼萃取液的波峰位在560nm，螢光層萃取液則沒有明顯的波峰。

◆ 實驗五：螢光物質之結構分析

(一) 實驗方法：利用薄層色層分析 (Thin Layer Chromatography, TLC) 檢測蟹殼萃取液是否具有與蠍子相同的螢光物質 (7-羥基-4-甲基香豆素和β-咔啉) 成分。

(二) 實驗結果：



▲圖15. 利用薄層層析法 (TLC) 分析螢光層中螢光物質主要成分。實驗將 (A) 7-羥基-4-甲基香豆素，(B) 蟹殼萃取液和 (C) β-咔啉，點置在TLC片上 (前)，經過展開液 (正己烷：乙酸乙酯= 5:5) 分離後，蟹殼萃取液可分離出兩個明顯的螢光點，一個位於原點 (F1)，另一個則隨展開液上升 (F2)。

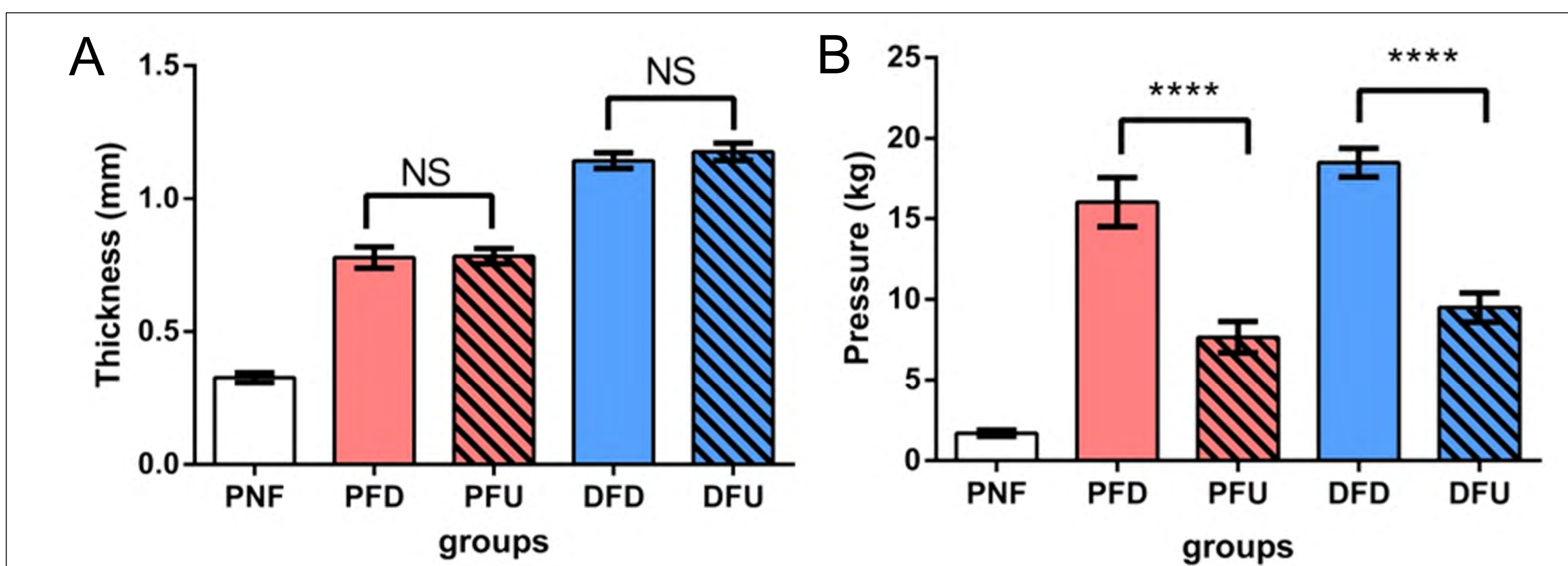
表 1. 螢光物質各螢光點之移動距離及Rf值

物質代號	展開液移動距離 (mm)	物質移動距離 (mm)	Rf
A	50	21.8	0.44
F1	50	0	0
F2	50	6.70	0.13
C	50	5.88	0.12

【結果分析】 蟹殼萃取液中的螢光物質不只一種，而其中一種可能是和β-咔啉化學結構類似的螢光物質。

◆ 實驗六：蟹殼耐壓強度測試

- (一)實驗方法：探討具螢光層的蟹殼對承受外力的表現，以自製推拉力計進行耐壓強度測試。
- (二)實驗結果：



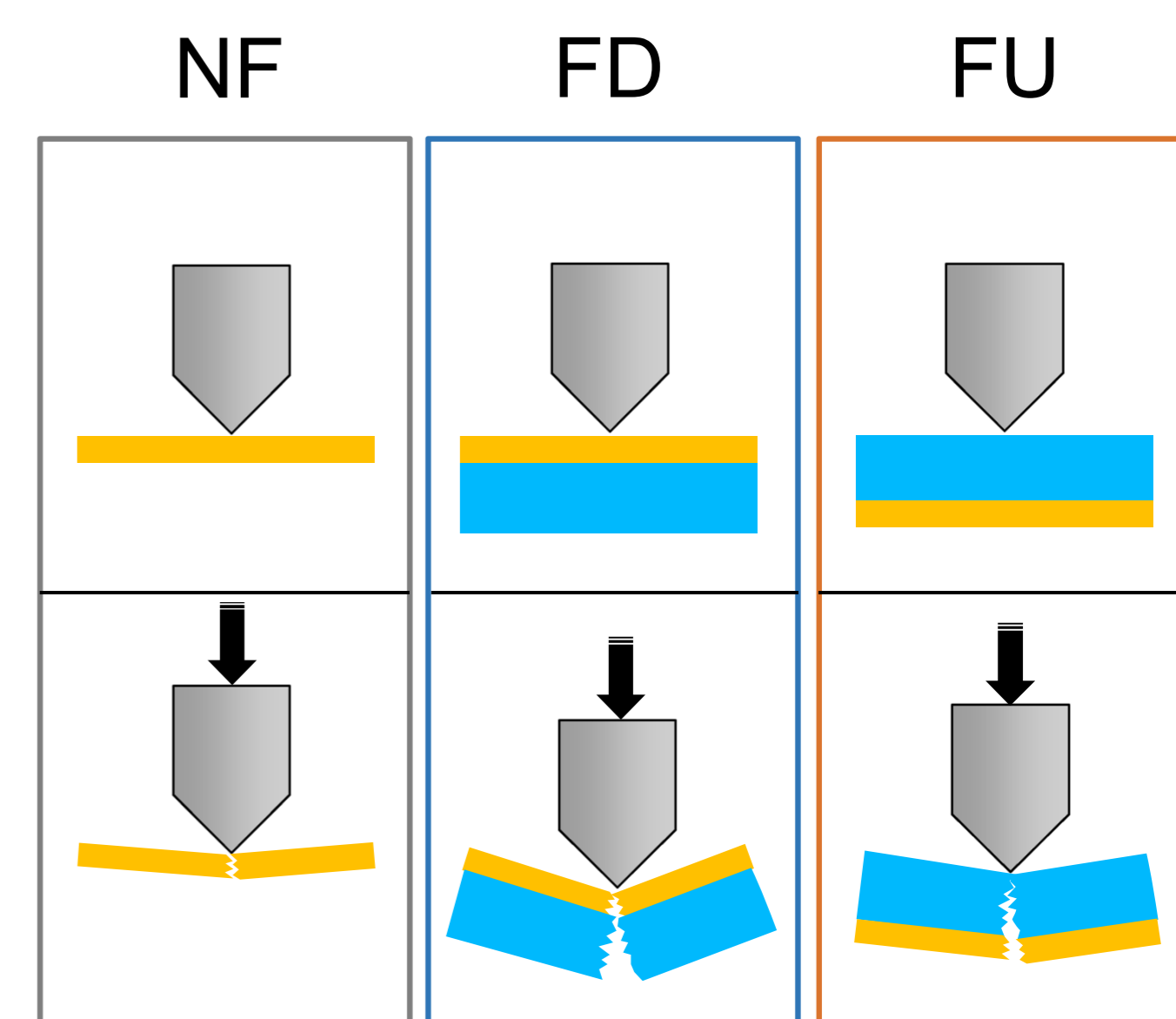
▲圖16. 以推拉力計對蟹殼進行耐壓強度測試

(A) 各組間蟹殼厚度之比較。(B) 各組間壓力測試之結果。**** $p < 0.0001$

分組為：PNF-薄螢光層蟹殼

PFD-螢光層朝下的腹面蟹殼、PFU-螢光層朝上的腹面蟹殼

DFD-螢光層朝下的背面蟹殼、DFU-螢光層朝上的背面蟹殼



▲圖17. 蟹殼承壓前後碎裂之示意圖

分組為：NF-薄螢光層蟹殼

FD-螢光層朝下的蟹殼

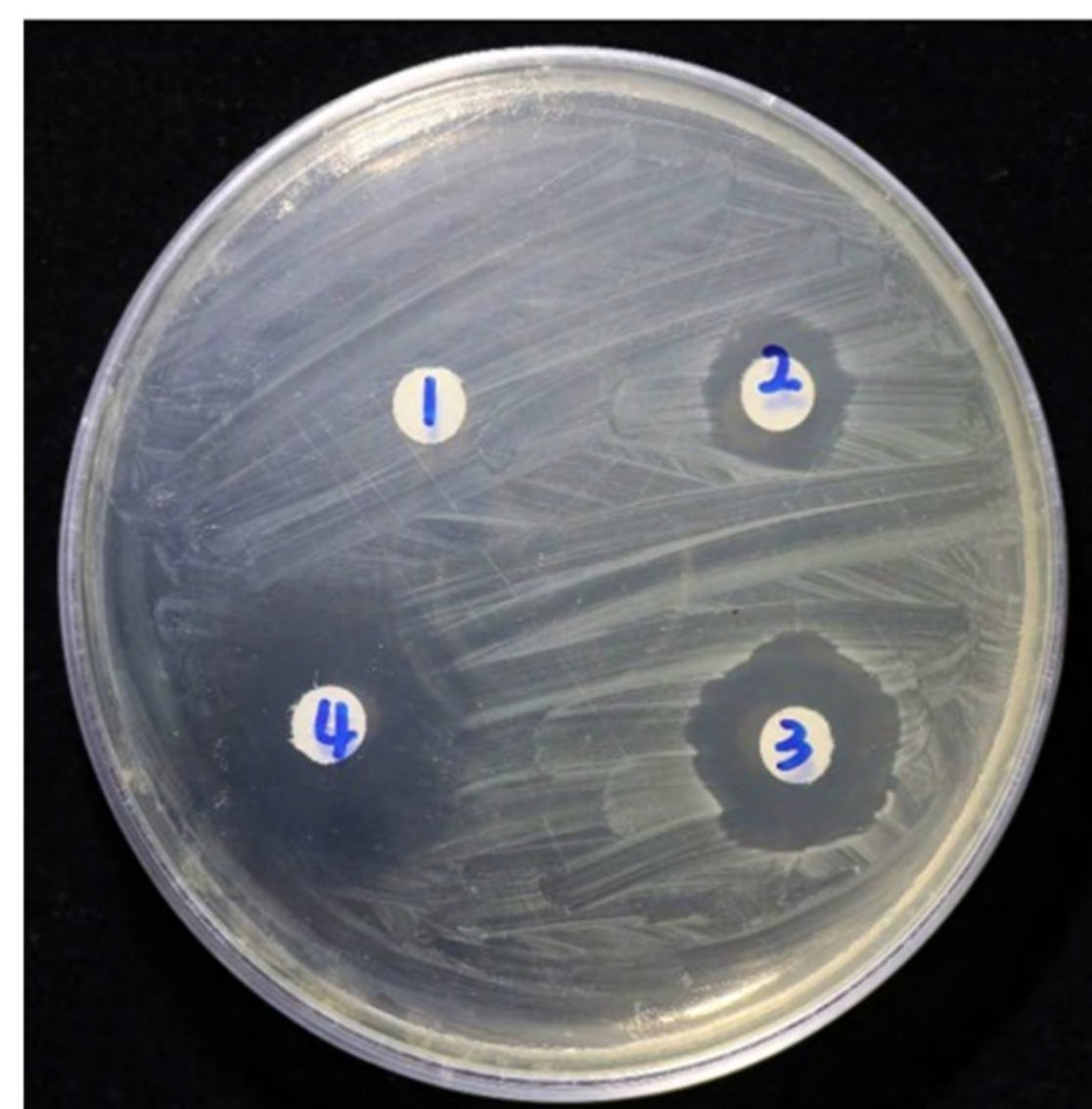
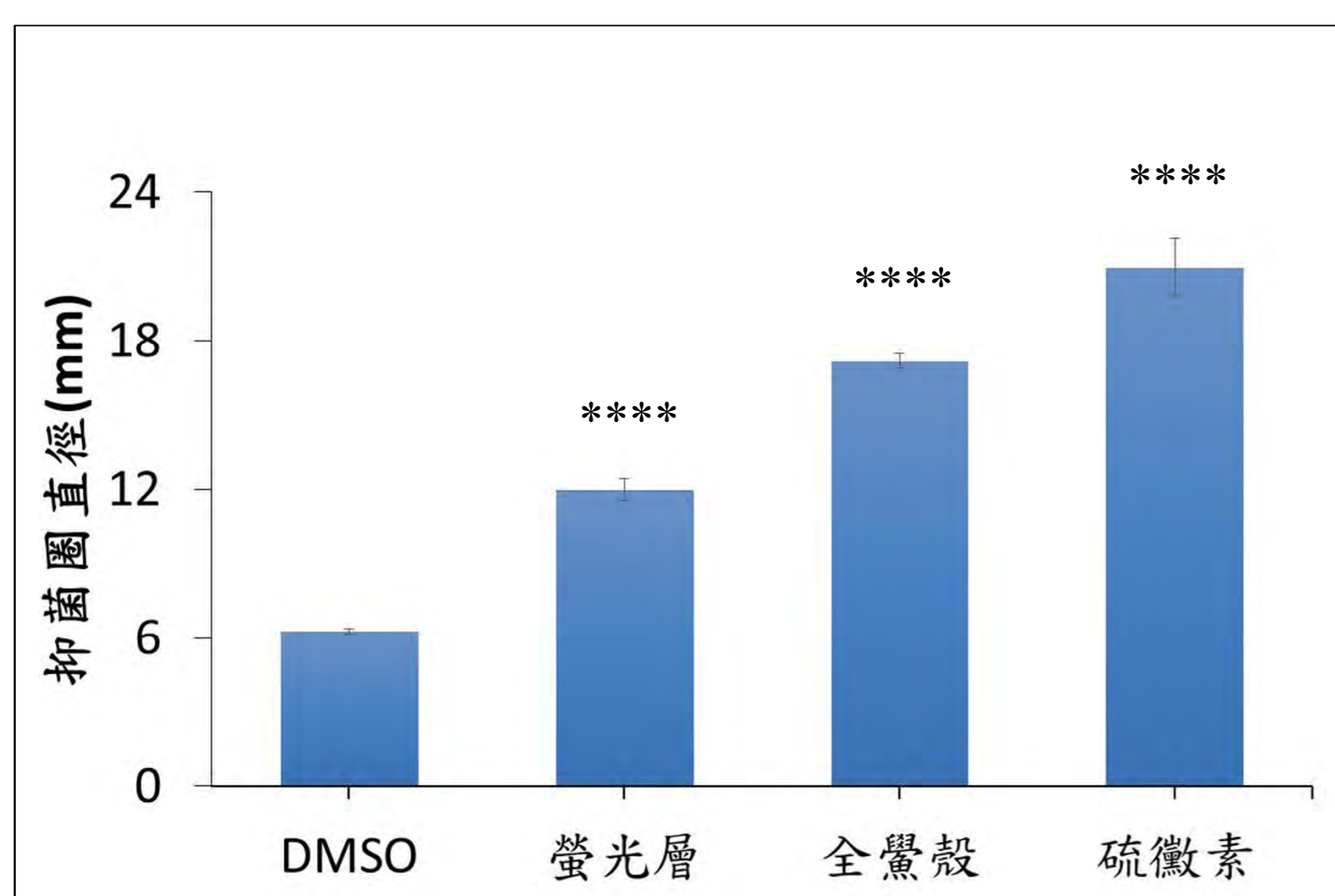
FU-螢光層朝上的蟹殼

【結果分析】

由圖16A可知，腹面殼兩組間、背面殼兩組間的蟹殼厚度沒有差異，但耐壓測試結果卻明顯不同(圖16B)。當背、腹面蟹殼螢光層(內角質層)朝下置放時，耐壓強度均較朝上置放時高，而薄螢光層蟹殼則明顯低於其他四組。顯示螢光層(內角質層)和外角質層的上下排序是影響蟹殼承壓量主因，而非蟹殼厚度。

◆ 實驗七：蟹殼萃取液抑菌測試

- (一)實驗方法：以「濾紙片擴散試驗」探討蟹殼萃取液對大腸桿菌之抑菌效果。
- (二)實驗結果：



▲圖19. 各組抑菌圈之大小

各組與DMSO比較之結果**** $p < 0.0001$

各分組：1-溶劑DMSO、2-螢光層萃取液、3-全蟹殼萃取液、4-硫黴素

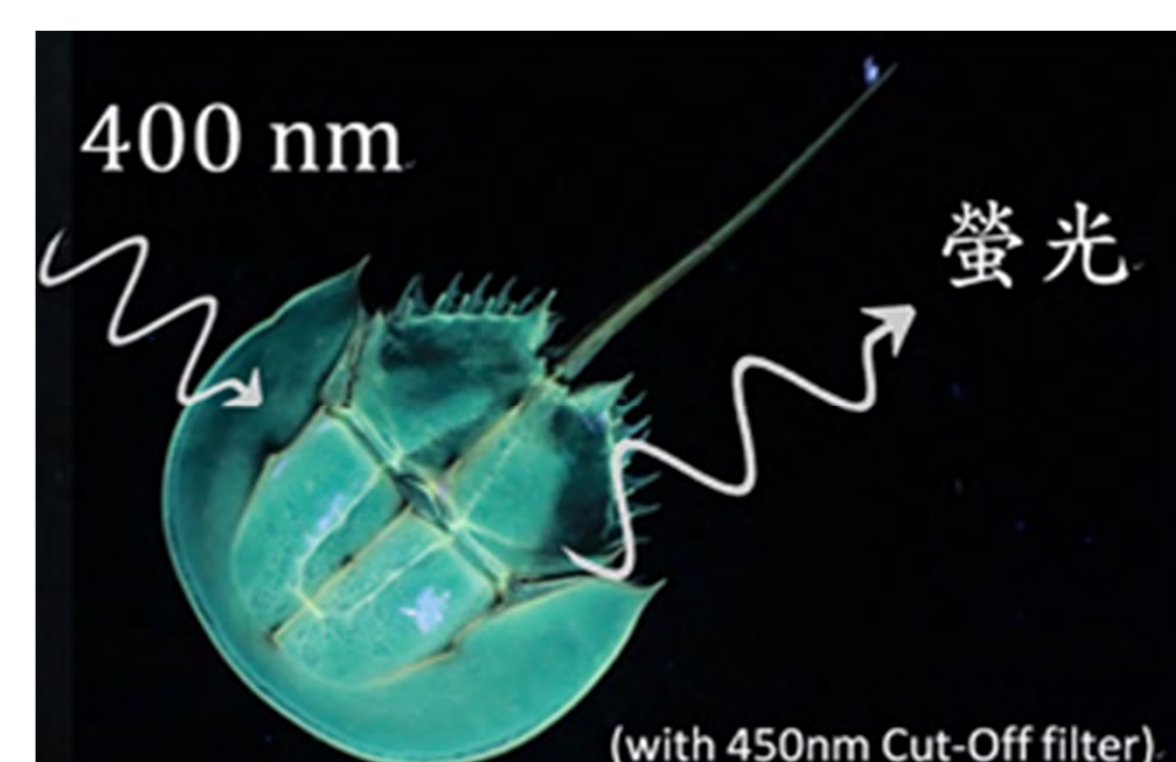
【結果分析】

作為溶劑的DMSO無抑菌效果，而全殼、螢光層萃取液均有出現抑菌圈，顯示兩種萃取液中具有抑制大腸桿菌生長之物質，而抗生素(硫黴素)則作為陽性對照組。

→蟹殼中的抑菌成分提供蟹對抗細菌性病原的化學性屏障，以利生存。

伍、結論

- 三棘蟹的稚蟹活體和蟹殼標本在受到紫光(400nm)照射後均會產生藍綠色螢光現象。且在蟹殼突出、關節和常磨損的部位(螯肢、步足等)螢光現象最為明顯。
- 成蟹蟹殼內部有膠狀和柱狀兩種支撐構造且具有螢光表現。膠狀支撐構造廣泛分布，柱狀支撐構造則位於蟹殼夾層。
- 蟹殼中的螢光物質可利用有機溶液作萃取。
- 依薄層層析結果推論蟹殼中主要的螢光物質可能是 β -咔啉類化合物。
- 蟹殼螢光層能強化外骨骼，進而增加蟹殼對外力的承壓量之功能。
- 蟹殼萃取物具有抑制大腸桿菌生長之功效。



本研究首次證實三棘蟹稚蟹活體受到400nm紫光照射後會產生自體螢光現象，且螢光層具有強化外骨骼和抑菌之功能，為三棘蟹能適應多變的地球，存活4.5億年之久提供一個新的觀點。

陸、未來展望

- 本研究發現蟹殼的螢光物質分布在外骨骼的內角質層中且主要成分為可能是 β -咔啉類化合物。未來我們將繼續利用TLC和氣相色譜法-質譜法聯用(Gas chromatography-mass spectrometry)等方法進一步解析蟹殼螢光物質的化學結構。
- 成蟹的全蟹殼萃取液對大腸桿菌有顯著的抑菌效果，未來希望能更純化和標準化萃取方式，以進行更多的細菌檢測實驗，並釐清抗菌物質的成分。最終希望能藉由對蟹殼抑菌成分的了解，以化學合成的方式製造具有顯著療效的抑菌物質，為人類抗生素藥物的開發提供一個新的研究方向！

柒、參考資料

- (一)Pavan M. (1954). Presence and distribution of a fluorescent substance in scorpion tegument. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 30: 801-803.
- (二)Rubin M, Lamsdell J, Prendini L, Hopkins M. (2017). Exocuticular hyaline layer of sea scorpions and horseshoe crabs suggests cuticular fluorescence is plesiomorphic in chelicerates. *J Zool.* 303: 245-253.
- (三)Stachel, S.J., Stockwell, S.A. and VanVranken, D.L. (1999). The fluorescence of scorpions and cataractogenesis. *Chem. Biol.* 6: 531-539.
- (四)陳章波、陳勇輝(2011)。蟹的史詩—台灣三棘蟹保育特展專刊。屏東：國立海洋生物博物館。
- (五)鄭明倫(2017)。照亮生命科學的地球微光(三)生物螢光。國立自然科學博物館訊。第360期。