

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050013

參展科別 動物學

作品名稱 建立檢測化學壓力新型模式生物-大生熊蟲實際應用與耐受機制探討

得獎獎項 一等獎

美國 ISEF 正選代表

就讀學校 新北市私立竹林高級中學

指導教師 顏嘉怡

作者姓名 顏健弘

關鍵詞 大生熊蟲、模式生物、實際化學壓力

作者簡介



我是顏健弘，來自新北市竹林高中。很榮幸能再次踏入國際科展這個高手雲集的殿堂與大家切磋交流。今年是我邁入水熊蟲專題研究的第 4 年，一路上經歷不少挫敗，比賽與課業成績起起伏伏，常要為了比賽交件爆肝熬夜，雖然過程艱辛，但很慶幸自己有堅持下來，才有機會學到文獻查找、實驗操作、數據分析與報告撰寫等各項能力。更感謝有父母的支持、嘉怡老師與學長姊的指導、書平老師與永達老師的培訓以及吳漢忠老師提供實驗資源，我才能不斷精進作品並在賽中屢次獲獎，希望自己在未來能持續保有科學熱忱並繼續在學術研究貢獻一己之力甚至發光發熱。

摘要

本研究是評估大生熊蟲 (*Macrobotus* sp.) 檢測小白菜混合化學壓力的應用潛能。目前已建立大生熊蟲檢測實際環境化學壓力方法，若以正常活動樣本檢測化學壓力需 24 小時獲得結果；但乾燥隱生樣本則能在 2 小時內獲得檢測結果，每週檢測 1 次，至少可重複 6 次檢測，所以隱生大生熊蟲最適合在符合生物倫理準則之下檢測化學壓力。

探討大生熊蟲檢測實際化學壓力時耐受機制，發現大生熊蟲在小白菜萃取液隱生時，其 100、50 與 40~50 kDa 蛋白質單體表現量顯著增加，另外自乾燥隱生恢復活動時 40~50 kDa 單體表現量亦顯著提升，未來將以 LC MS/MS 分析其蛋白質種類與功能。藉由加熱實驗的總抗氧化能力數據確認大生熊蟲能以酵素與非酵素抗氧化系統對抗實際化學壓力，未來將探討對抗常見抗氧化物質的單一酵素活性。目前尚未成功分析大生熊蟲常見抗氧化基因表現量，本研究會持續改良設計出合適的 primer 與目標基因黏合，分析表現量。檢測其脂質含量則發現，大生熊蟲在實際化學壓力下隱生、乾燥隱生以及自隱生恢復活動階段體內脂質含量顯著增加。

Abstract

In this study, we used Chinese cabbage extract which contain nitrate to simulate chemical stress in the environment to evaluate the application potential of *Macrobotus* sp. The result showed that it takes 24 hours detecting chemical stress under active *Macrobotus*. In the other hand, cryptobiotic *Macrobotus* took less than 2 hours to detect, further, the cryptobiotic *Macrobotus* could be reused at least 6 times in a week under dehydrated condition. In summary, cryptobiotic *Macrobotus* are best option that compliance with bioethics (4Rs) for detecting stress. Moreover, method for the detection of chemical stress by using *Macrobotus* has been established in this study.

We have figured out the tolerance mechanisms of *Macrobotus* under practical chemical stress. The 100, 50 and 40-50 kDa polypeptide increased significantly in cryptobiotic *Macrobotus* under chemical stress, besides, the expression of 40-50 kDa polypeptide would increase significantly when recovering from cryptobiosis. In the future, we will try to find out the functions of the above polypeptide by LC MS/MS. This study also found that *Macrobotus* can resist chemical stress by enzymatic and non-enzymatic antioxidant system, we will figure out the activity of specific antioxidant substances in the future. The experiment of analyzing common antioxidant genes expression in *Macrobotus* was not completed. The future research will continue to design a suitable primer to anneal with the target genes and analyze their expression. By detecting lipid content, it was found that the lipid increased significantly during the stage of cryptobiosis under chemical stress, anhydrobiosis and recovering from cryptobiosis.

1、前言

1、研究動機

為了檢測對人體有害化學物質，許多模式生物用於協助人類評估化妝品、藥物與保健食品的安全性，例如：以線蟲檢測保養品的二氧化鈦及食品中的真菌毒素是否超標（王，2018；楊，2016）。然而常見模式生物皆以致死性指標（LC50 與 LD50）評估化學物質濃度，有鑑於近年提倡生物倫理 4R 準則，本研究希望發展出合適的模式生物，檢測環境化學壓力的同時也能減少實驗動物犧牲。

水熊蟲生活在潮濕的環境，其面臨乾燥或惡劣條件（如：高溫、高壓、高劑量輻射等物理壓力）會藉由隱生（cryptobiosis）降低水分散失以及外在壓力傷害（Hengherr *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 2009; Jönsson *et al.*, 2005）。先前研究亦發現，對環境敏感的大生熊蟲（*Macrobiotus*）接觸硝酸鹽等化學壓力時會進入隱生狀態，並在壓力解除後仍能恢復正常活動，進一步體表染色，發現其在硝酸鹽壓力下未受到傷害，耐受機制實驗亦推測大生熊蟲藉由抗氧化系統與抗逆境蛋白對抗硝酸鹽壓力，由此可知大生熊蟲極具潛能作為重複檢測硝酸鹽壓力之模式生物。

日常生活中，人體為了獲得足夠含氮物質以合成核酸與蛋白質，接觸硝酸鹽的途徑常來自攝取蔬菜。為提高生產效率，蔬菜在種植過程中常被施用氮肥，這些含氮化合物經過固氮與硝化作用會轉變為硝酸鹽供植物吸收，然而長期施肥可能導致蔬菜吸收過多硝酸鹽。過量硝酸鹽進入人體內轉變為亞硝酸鹽時，有可能誘發組織缺氧與癌症等疾病，因此檢測蔬菜硝酸鹽含量是否超標在食安議題更顯重要。現今檢測硝酸鹽以化學方法為主，一般民眾想知道蔬菜中硝酸鹽含量是否超標，需將樣本送至研究機構使用儀器檢測，流程耗時且無法立即得知結果，因此本研究嘗試以大生熊蟲檢測蔬菜中的硝酸鹽，評估其作為模式生物實際應用可行性。初步實驗發現，使用化學方法能檢測出小白菜、地瓜葉、菠菜與山萵蒿中的硝酸鹽，進一步將活動大生熊蟲置於上述蔬菜萃取液，發現接觸地瓜葉的大生熊蟲不易隱生，接觸菠菜與山萵蒿的樣本於實驗後半數無法存活，因此在本研究將以小白菜四季皆產且大生熊蟲接觸後會隱生的特性，使用其模擬實際檢測環境，評估大生熊蟲應用潛能。

現實環境壓力為混合物，非單一成分組成。初步實驗已證實小白菜中含硝酸鹽與亞硝酸鹽，可知小白菜萃取液亦屬於混合物，因此使用其模擬實際環境壓力。由此可知小白菜萃取液可能含多種壓力物質導致大生熊蟲隱生，因此應用評估的過程中，本研究會以染色、蛋白

質與抗氧化分析等實驗，探討大生熊蟲實際應用時的耐受機制，並與單一硝酸鹽壓力耐受機制比較瞭解是否有差異。

2、 文獻探討

(1) 歷年研究成果 (表 1)

不同物種水熊蟲對環境壓力耐受度有所差異，為了收集大量同物種水熊蟲進行實驗，本研究於 2020 年調查在地生活圈水熊蟲多樣性，發現對環境變化敏感的大生熊蟲 (*Macrobiotus sp.*) 數量最多且分布最廣，因此後續研究以大生熊蟲作為模式生物進行實驗。

2021 年本研究嘗試建立大生熊蟲模式生物系統，希望其能符合生物倫理 4R 準則重複檢測常見環境化學壓力，結果發現大生熊蟲具潛能重複檢測硝酸鹽等 6 種化學壓力， Cu^{2+} 則對其造成不可逆傷害，然而大生熊蟲對抗上述化學壓力機制以及是否受到傷害尚未了解，因此 2022 年初期的研究嘗試探討大生熊蟲對抗硝酸鹽壓力機制，實驗結果推測大生熊蟲藉由增加脂質含量、 $> 20 \text{ kDa}$ 持續性活化蛋白、 $< 20 \text{ kDa}$ 酵素抗氧化系統或非酵素抗氧化系統機制對抗硝酸鹽壓力，亞甲藍染色結果也證實其體表未受硝酸鹽壓力傷害。

截至目前研究已確認大生熊蟲具潛能作為模式生物檢測化學壓力，並初步瞭解其對抗硝酸鹽壓力機制。因此本次研究將使用含硝酸鹽的小白菜萃取液模擬實際環境，以大生熊蟲檢測評估其實際應用可行性，檢測過程中亦會分析總蛋白質單體表現量、蛋白質定序、抗氧化能力測定、抗氧化基因表現量、體表染色與脂質含量分析，瞭解小白菜萃取液對大生熊蟲可能造成的壓力影響，並與 2022 年初期的研究比較，探討大生熊蟲接觸實際環境壓力時的耐受機制與面對單一硝酸鹽壓力有無差異。

表 1 歷年研究成果

研究主題	研究成果
校園水熊蟲分布與種類調查	1.大生熊蟲數量最多分布最廣。
南勢角水熊蟲分類與生態棲位分析	2.自製快速鑑種二叉檢索表
水熊蟲分類與建立模式生物系統評估	大生熊蟲具潛能重複檢測硝酸鹽等 6 種常見化學壓力。
水熊蟲於化學壓力耐受機制探討	1. 亞甲藍染色確認水熊蟲是否受傷，評估重複檢測可行性。 2.推測以下機制抗硝酸鹽壓力：增加脂質、> 20 kDa 持續性活化蛋白、< 20 kDa 酵素或非酵素抗氧化系統。

(2) 模式生物 (model organism)用途

研究基於生物倫理考量，不適合以人體或脊椎動物進行實驗。因此多以模式生物的特性：易取得、生命力強以及獨特生理機制進行實驗。隨著化學環境汙染日益嚴重，近年來模式生物實驗常探討不同化學物質與劑量對其致死率，並進一步將模式生物應用於環境毒理學或醫學等領域，檢測潛在的化學環境壓力為人體健康把關（許，2009）。

(3) 當代生物實驗倫理準則 (4R 準則) (秦，2012)

取代 (Replacement)強調使用較低等的無脊椎動物或非動物進行研究。減量 (Reduction)謹慎地設計與操作實驗，盡可能減少實驗動物的使用量。精緻化 (Refinement)藉由精準的實驗設計與操作，將實驗生物置於最適合的環境進行實驗，降低生物在實驗中受到的傷害。負責 (Responsibility)實驗操作過程中以將心比心的態度對待實驗生物，對實驗生物負責。

(4) 硝酸鹽檢測方法介紹

1. 硝酸鹽與硝酸鹽氮

一般檢測硝酸鹽含量時會以硝酸根 (NO_3^-) 或硝酸鹽氮 (NO_3^--N) 濃度作為依據。硝酸鹽氮是指硝酸根離子中的氮含量，佔硝酸根離子的 22.6 %。

2. 化學檢測方法 (表 2)

表2 比較不同硝酸鹽化學檢測方法

名稱	原理與方法	優點	缺點	參考文獻
試紙檢測法	Griess reaction 判讀試紙呈色結果	短時間測出結果	精準度低	Irandoust <i>et al.</i> , 20
鹽酸 分光光度法	NO_3^- 在 220nm 有最大吸光值， 275nm 不吸光。將樣本 OD220 扣除 2 倍 OD275 求出硝酸鹽濃度。	精準度高	1. 易受雜質干擾 2. 器材取得不易	APHA, 2017
水楊酸 分光光度法	NO_3^- 與水楊酸反應形成硝基水楊酸，遇鹼呈黃色，在 410 nm 有最大吸光度。	1. 精準度高 2. 操作簡易	易受雜質干擾	段等, 2002
HPLC	物質因吸附親和力差異被移動相帶出，並在固定相分離後測定 OD210 。	精準度高	1. 流程繁瑣耗時 2. 器材取得不易	陳等, 2012

(5) 自由基與生物體抗氧化機制簡介

帶有孤對電子的自由基會搶奪生物體內分子的電子導致氧化反應，造成疾病、老化與細胞組織受損等影響 (王, 2014)。生物體接觸環境壓力、化學物質或污染時易形成過量自由基，進一步誘發疾病與 DNA 突變 (黎與曾, 民 96 年; 王, 2014) (Valko *et al.*, 2004), 如硝酸鹽在體內易轉變成具強氧化性的一氧化氮, 常見的自由基包括: 過氧化氫 (H_2O_2)、超氧化物 (superoxide, O_2^-)、過氧化物自由基 (peroxy radical, $ROO\cdot$) 與氫氧自由基 (hydroxyl radical, $\cdot OH$)。為降低自由基危害, 生物的酵素 (如: SOD) 與非酵素抗氧化系統 (如: Vit. C,E) 能還原自由基, 降低毒性減少傷害。本研究將分析抗氧化系統活性與其基因表現量, 探討大生熊蟲在硝酸鹽與實際化學壓力下, 能否藉由酵素與非酵素抗氧化系統降低氧化壓力傷害。

(6) 常見水熊蟲抗逆境蛋白與抗氧化酵素 (表 3)

過去研究發現 *Ramazzottius varieornatus* 在活動與乾燥隱生時抗逆境蛋白基因表現量無顯著差異 (Hashimoto *et al.*, 2016), *Adorybiotus coronifer* 在乾燥隱生時 71 kDa 蛋白質單體表現量顯著增加 (Ramløv & Westh, 2001), 由此可知不同物種水熊蟲對抗壓力機制有所差異, 且過去研究僅探討物理壓力對水熊蟲影響, 本研究主要探討化學壓力對大生熊蟲影響以及耐受機制。本研究於 2022 年初步發現硝酸鹽壓力下活動與隱生大生熊蟲在 20~220 kDa 蛋白質單體表現量無顯著差異 ($p > 0.05$)。由表 3 亦可得知部分抗逆境蛋白與抗氧化酵素分子量 < 20 kDa。本次研究使用 4~20 % 梯度膠, 以分離實際化學壓力下大生熊蟲更廣分子量範圍的總蛋白質單體, 並對表現量具顯著差異的單體進行定序瞭解其功能。

表 3 常見抗逆境蛋白與抗氧化酵素

抗逆境蛋白與抗氧化酵素	分子量 (kDa)
觸酶 (CAT)	60 kDa
麩胱甘肽還原酶 (GR)	50 kDa
損傷抑制蛋白 Dsup	42 kDa
熱休克蛋白 HSP (HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP20 & HSP10)	10~90 kDa
麩胱甘肽過氧化酶 (GPX)	19 kDa
超氧化物歧化酶 (SOD)	15 kDa
LEA 蛋白	9.1 kDa
冷休克蛋白 CSP	7.2 kDa

分子量
< 20 kDa

2、 研究目的

- 1、 評估大生熊蟲能否實際檢測環境化學壓力（使用含硝酸鹽之小白菜萃取液模擬實際環境）
 - (1) 探討活動大生熊蟲於實際化學壓力隱生率，並評估能否重複使用。
 - (2) 探討隱生大生熊蟲於實際化學壓力恢復正常活動所需時間，並評估能否重複使用。
- 2、 探討大生熊蟲於實際環境化學壓力的耐受機制（以檢測小白菜萃取液為例）
 - (1) 蛋白質分析
 1. 以 **4~12 %** 梯度膠分析大生熊蟲總蛋白質單體表現量。
 2. 以 **LC MS/MS** 分析實際化學壓力下的蛋白質，深入瞭解其功能。
 - (2) 抗氧化系統分析
 1. 比較酵素與非酵素抗氧化系統總抗氧化能力。
 2. 探討常見抗氧化酵素基因表現量。
 3. 分析實際化學壓力下常見抗氧化物質活性。
 - (3) 分析大生熊蟲接觸實際環境化學壓力時體內脂質含量。

3、 研究設備及器材

1、 實驗動物簡介

(1) 水熊蟲分類階層簡介

水熊蟲為緩步動物門 (*Tardigrada*)的俗稱，現今世界記錄的水熊蟲物種共有 1298 種 (Degma, 2019)，而台灣目前已知的水熊蟲物種則有 26 種 (陰等, 2011) (Ito, 1990; Leong, 2019; Li & Li, 2008; Mathews, 1937; Séméria, 1994)。根據其棲息環境主要可分為海生種類的異緩步綱水熊蟲以及棲息於陸地的真緩步綱水熊蟲，不同物種的水熊蟲對於環境壓力耐受程度有所差異，如 *Milnesium tardigradum* 能在極端環境下 (100 °C) 持續活動 (Hengherr *et al.*, 2009)，本研究實驗動物為對環境變化敏感的大生熊蟲 (*Macrobiotus sp.*) (圖 1)，在環境壓力下會進入隱生狀態。



圖1 大生熊蟲

(2) 大生熊蟲來源

初期研究自新北市南勢角山的捲葉濕地苔 (*Hyophila involute*) 採集實驗動物，經過二又檢索表、形態特徵矩陣與分子生物定序鑑定物種後，發現大生熊蟲 (*Macrobiotus sp.*) 為在地生活圈數量最多的物種，因此本研究以大生熊蟲作為實驗動物。

(3) 大生熊蟲形態

大生熊蟲具有爪子的 4 對足，頭部可觀察到口器構造。成蟲平均體長 200~700 μm (Altiero *et al.*, 2006)。本研究使用體長 300~500 μm 的大生熊蟲進行實驗。

(4) 培養方式

本研究將大生熊蟲置於含有原生環境水樣的 2 % 洋菜膠培養基進行培養。光照條件為光週期 12 小時。每日根據其雜食性特性餵食輪蟲、線蟲、蘚苔植物的假葉與土壤中的藻類，並更換培養基內的食物與原生環境水樣。

2、 實驗主要器材與藥品

(1) 蔬菜汁液萃取實驗

名稱	備註
小白菜	產銷履歷認證
果汁機	購自動風

(2) 蔬菜硝酸鹽檢測

名稱	備註
NaNO ₃	購自 SHIMAKYU CHEMICAL
Salicylic acid	
Sulfuric acid	購自景明化工
NaOH	
硝酸鹽與亞硝酸鹽檢測試紙	購自 QUANTOFIX

(3) SDS-PAGE 銀染

名稱	廠牌
4X Sample Loading Buffer	
Lysis buffer	自行配置
Ultrasonication system	購自 Diagenode
Silver stain protein ladder (10–250 kDa)	
迷你垂直式電泳槽套件	購自 BIO-RAD
冷光影像分析系統	購自 UVP
SilverQuest™ Staining kit	購自 Invitrogen
4~12 % gradient gel	
MOPS buffer	購自 Genscript

(4) T-AOC Assay Kit 使用器材、藥品及配方

名稱	廠牌
T-AOC Assay Kit	購自 Elabscience
BCA method kit	購自 Thermo

(5) RNA extraction, RT-PCR, qPCR 實驗器材

名稱	廠牌
Trizol reagent	購自 Invitrogen
pestle	-
Chloroform, Isopropanol, Ethanol	購自 SIGMA
DEPC H ₂ O	自行配置
RT-PCR kit	購自 QIAGEN
SYBR green	購自 Roche
qPCR kit	購自 Invitrogen
qPCR machine	購自 Roche
各基因 primers	購自 GENOMICS

(6) 其他器材

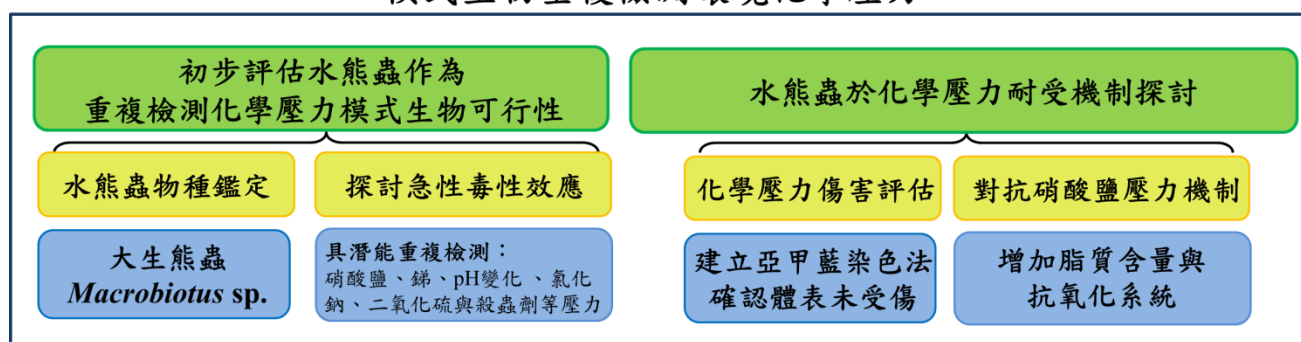
名稱	廠牌
Cat Eye 三眼實體顯微鏡	購自 瑞光儀器
倒立顯微鏡	購自 ZEISS
複式顯微鏡	購自 Motic
Wifi CMOS 彩色相機	
microplate reader	購自 Bio Tek
Nanodrop	購自 Thermo
離心機	購自 Kubota
乾浴槽	購自 Thermo

4、 研究過程及方法

1、 實驗架構 (圖 2)

本研究評估大生熊蟲能否作為模式生物，協助人類重複檢測環境中的化學壓力。先前研究發現大生熊蟲多次接觸硝酸鹽等 6 種化學壓力時，能進入隱生狀態且不受傷害，並推測大生熊蟲能藉由增加脂質含量、抗氧化系統與抗逆境蛋白等方式對抗化學壓力硝酸鹽，極具潛能發展成重複檢測化學壓力之模式生物。因此本研究以含有硝酸鹽的小白菜萃取液模擬環境壓力，使用大生熊蟲檢測，評估其能否實際應用。本次研究亦規劃 LC MS/MS 定序、qPCR 分析基因表現量與單一抗氧化物質活性分析等實驗，進階探討大生熊蟲實際檢測化學壓力時的耐受機制。

前期研究發現大生熊蟲具潛能作為 模式生物重複檢測環境化學壓力



本次研究 探討實際應用潛能

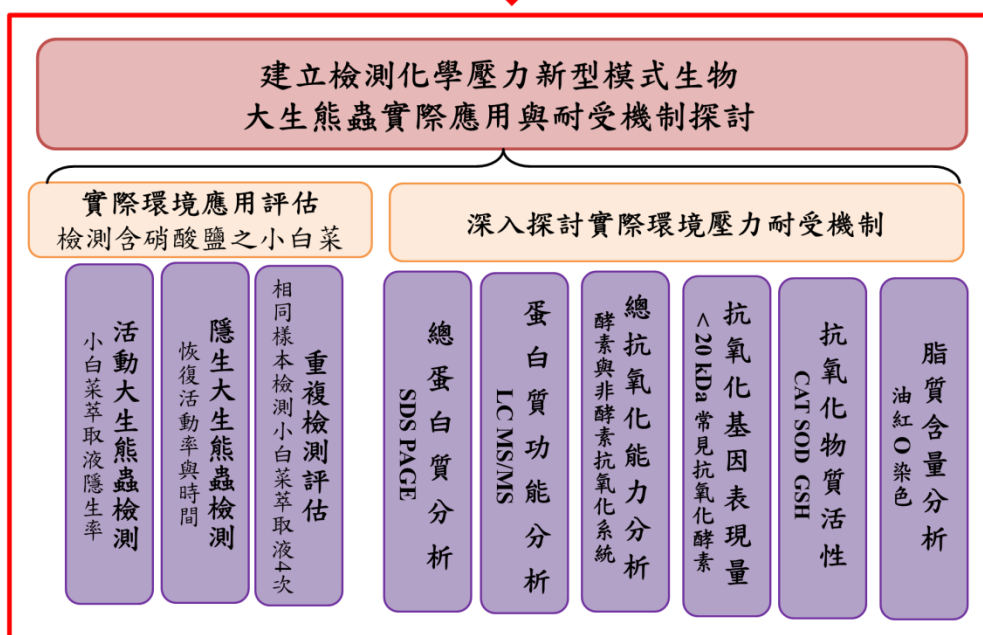


圖 2 研究架構圖

2、水熊蟲活動狀態定義

研究初期將大生熊蟲在實驗中的各種狀態進行定義（表 4）。實驗結束後會將大生熊蟲置於原生水樣，並於 24 小時後再次觀察其活動狀態，若大生熊蟲置於原生水樣超過 24 小時仍無正常活動跡象則定義為無法存活。

表 4 實驗中大生熊蟲活動狀態定義

活動狀態	定義
正常活動 (圖 3a)	任一對足運動收縮。
完全隱生 (圖 3b)	體腔與 4 對足完全收縮，形態成酒桶狀。
缺氧隱生 (圖 3c)	接觸壓力時靜止不動，4 對足與體腔向外伸展。
無法存活 (圖 3d)	實驗後接觸原生水樣 24 小時仍靜止不動，體腔與 4 對足拉長。

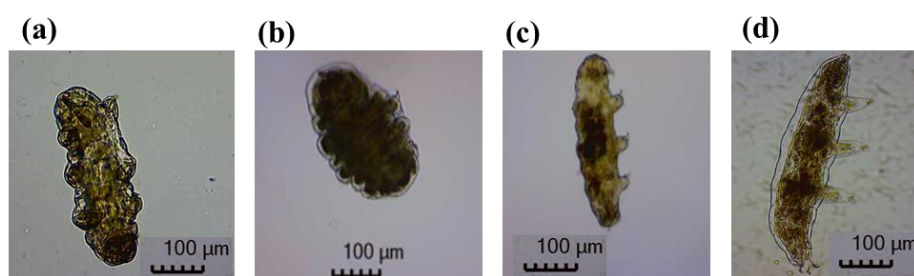


圖3 水熊蟲活動狀態

(a)為正常活動。(b)為完全隱生。(c)為缺氧隱生。(d)為無法存活。

3、實驗步驟

(1)評估大生熊蟲能否實際檢測環境化學壓力

初期研究已分析硝酸鹽對大生熊蟲急性毒性效應，並探討其硝酸鹽耐受機制，發現大生熊蟲具潛能作為模式生物檢測環境硝酸鹽。本實驗使用含硝酸鹽之蔬菜模擬實際壓力環境，並以大生熊蟲進行檢測。預備實驗檢測常見蔬菜：小白菜、地瓜葉、菠菜與山萵萵的硝酸鹽含量，發現小白菜硝酸鹽濃度最適合大生熊蟲檢測，因此大生熊蟲實際應用實驗以小白菜萃取液模擬實際化學環境壓力。

1. 萃取蔬菜汁液步驟

取 60 g 小白菜與 180 mL ddH₂O 以果汁機碎冰模式打碎混和，並將打碎後的小白菜在室溫以 4000 rpm 離心 15 分種，上清液即為實驗使用之萃取液，多餘的上清液可至於 -20 °C 冷凍保存，供後續實驗使用。

2. 使用化學方法檢測蔬菜硝酸鹽濃度

實驗前以化學方法確認小白菜萃取液硝酸鹽濃度，接著使用大生熊蟲檢測小白菜萃取液，並將結果與前期研究的硝酸鹽急性毒性效應實驗結果比對。預備實驗嘗試以硝酸鹽試紙、鹽酸分光光度法與水楊酸分光光度法檢測小白菜萃取液硝酸鹽濃度，發現試紙的比色法無法精確得知濃度，鹽酸分光光度法則易受到樣本中雜質干擾影響準確度，因此後續實驗以水楊酸分光光度法檢測小白菜硝酸鹽濃度。

實驗步驟

(1) 標準曲線繪製

I. 使用濃硫酸配置 5 % 水楊酸溶液。

II. 以硝酸鈉 (NaNO_3) 配置 5~300 mg/L NO_3^- -N 作為標準溶液。

III. 將硝酸鹽標準溶液與 5 % 水楊酸以 11:40 混和，靜置反應 20 分鐘，此時水楊酸會轉變為二硝基水楊酸。

IV. 將二硝基水楊酸與 8 % 氫氧化鈉以 1:20 混合，並待其冷卻，測定 OD410 繪製標準曲線。

(2) 檢測蔬菜硝酸鹽濃度

同繪製標準曲線步驟，測定小白菜萃取液中硝酸鹽與水楊酸及氫氧化鈉反應後的 OD410，藉由標準曲線推算小白菜硝酸鹽濃度。目前實驗用小白菜硝酸鹽濃度為 238 ± 11 mg/L。

3. 使用大生熊蟲檢測實際化學壓力

(1) 探討活動大生熊蟲於實際化學壓力隱生率

以化學方法確認小白菜硝酸鹽濃度後，將活動大生熊蟲置於小白菜萃取液中觀察隱生百分率，評估其能否應用於檢測環境化學壓力。

實驗組：將大生熊蟲置於小白菜萃取液 (n = 60 ; Bio = 20 ; Tech = 3)

I. 取 20 隻活動大生熊蟲置於懸滴玻片凹槽中，加入 200 μL 238 ± 11 mg/L NO_3^- -N 小白菜萃取液。

II. 記錄大生熊蟲在小白菜萃取液中不同時間點 (2、24 或 48 小時) 的活動狀態。

III. 參考(顏, 2022) 步驟，於實驗後將大生熊蟲進行亞甲藍液染色，確認其實驗中是否受傷 (使用 ImageJ 分析染色面積，以正常活動樣本染色面積作為對照，若實驗樣本亞甲藍染色面積占比顯著高於對照組，則定義為體表受壓力傷害)。

IV. 染色後將樣本置於原生水樣 24 小時並記錄實驗後 1 天存活率。

V. 實驗 1 週後將同一批正常活動樣本再次以步驟 I~IV 檢測小白菜萃取液，評估大生熊蟲重複檢測實際化學壓力可行性。共進行 4 週重複檢測。

對照組：將大生熊蟲置於 dH₂O (n = 60 ; Bio = 20 ; Tech = 3)

參考實驗組步驟觀察大生熊蟲於 dH₂O。

(2) 探討隱生大生熊蟲於實際化學壓力恢復正常活動所需時間與百分率 (圖 4)

活動大生熊蟲在乾燥時會進入隱生狀態，再次接觸潮濕環境則能在短時間 (15~20 分鐘) 恢復正常活動。預備實驗發現活動大生熊蟲接觸小白菜萃取液需 2 小時才達到半數隱生。為了在短時間藉由大生熊蟲快速評估環境化學壓力，本實驗探討乾燥隱生大生熊蟲接觸單一硝酸鹽壓力與小白菜萃取液後，恢復活動所需時間以及隱生率，並以接觸蒸餾水作為對照，評估隱生大生熊蟲在短時間能否實際應用於檢測化學壓力。

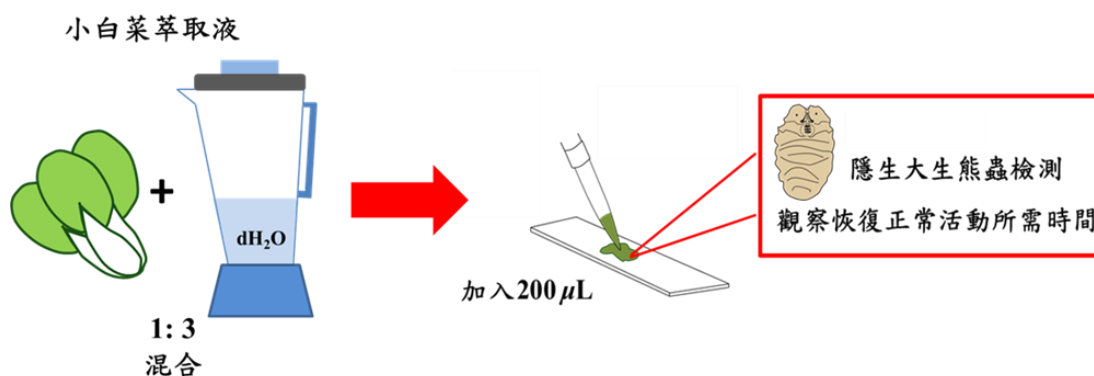


圖 4 以大生熊蟲實際檢測環境化學壓力流程圖

活動大生熊蟲乾燥隱生步驟

將 20 隻正常活動的大生熊蟲以蒸餾水反覆沖洗，並將其置於懸滴玻片凹槽中，加入 200 μ L dH₂O。接著將玻片置於 37 °C 烘箱 24 小時，使大生熊蟲在水分蒸發後進入乾燥隱生狀態。

實驗組 (n = 60 ; Bio = 20 ; Tech = 3)(圖 4)

- I. 測定小白菜硝酸鹽濃度後，將乾燥隱生大生熊蟲浸泡於 $200 \mu\text{L } 238 \pm 11 \text{ mg/L NO}_3^- \text{-N}$ 小白菜萃取液。
- II. 持續觀察 2 小時，記錄半數和全數隱生大生熊蟲恢復正常活動所需時間。
- III. 待所有樣本恢復活動，以亞甲藍液染色確認其實驗中是否受傷（使用 ImageJ 分析染色面積，以正常活動樣本染色面積作為對照，若實驗樣本亞甲藍染色面積占比顯著高於對照組，則定義為體表受壓力傷害）。步驟參考(顏, 2022)。
- IV. 染色後將樣本置於原生水樣 24 小時並記錄實驗後 1 天存活率。
- V. 將步驟 IV.的樣本至於 37°C 使其乾燥 1 週後，再次將同一批大生熊蟲以步驟 I~IV 檢測化學壓力，評估大生熊蟲實際應用時重複檢測化學壓力可行性。重複檢測直至其體表受傷或恢復正常活動時間與前次實驗具顯著差異，確認其重複使用極限。

對照組 (n = 60 ; Bio = 20 ; Tech = 3)

參考實驗組步驟記錄乾燥隱生大生熊蟲加入 dH_2O 後恢復正常活動所需時間。

(2) 探討大生熊蟲對實際化學環境壓力機制

1. 蛋白質分析

本研究過去以 10 % SDS gel 分離大生熊蟲在單一硝酸鹽壓力下 20~220 kDa 總蛋白質單體，發現不同活動狀態樣本間蛋白質單體表現量均無顯著差異 ($p > 0.05$)。由於 10 % SDS gel 無法分離出 $< 20 \text{ kDa}$ 的蛋白質單體，因此本研究將使用 4~12 % 梯度膠 (gradient gel) 進行實驗，分離更大範圍分子量 (10~220 kDa) 總蛋白質單體，並進一步探討大生熊蟲在正常活動、物理乾燥隱生、實際化學壓力隱生以及隱生後恢復活動階段的總蛋白質單體表現量。對表現量較高的蛋白質單體將以 LC MS/MS 定序確認其種類與功能，了解實際化學壓力對大生熊蟲造成的影響以及耐受機制。

(1) 樣本配置與處理方式 (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

實驗分成 5 個組別進行總蛋白質分析 (表 5)。樣本加入 Lysis buffer 後藉由研杵 (pestle) 壓碎處理與超音波破碎 (ultrasonication) 抽取總蛋白。

表 5 實驗樣本配置與描述

樣本名稱	樣本狀態描述
正常活動 (對照組)	10 隻未經歷硝酸鹽環境壓力的正常活動大生熊蟲。
乾燥隱生 (實驗組)	10 隻乾燥隱生 24 小時的大生熊蟲。
蒸餾水恢復活動 (實驗組)	接觸蒸餾水後，自乾燥隱生恢復正常活動的大生熊蟲 10 隻。
實際化學壓力恢復活動 (實驗組)	接觸小白菜萃取液，自乾燥隱生恢復正常活動的大生熊蟲 10 隻。
實際化學壓力隱生 (實驗組)	接觸 24 小時小白菜萃取液後，隱生的大生熊蟲 10 隻。

(2)測定樣本蛋白質濃度－ BCA method

- I. 以 BSA 為標準品，配置 2000 , 1000, 500, 200, 100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ BSA。
- II. 將 Reagent A 與 Reagent B 以 50 : 1 混合，製備 working solution。
- III. 將不同濃度 BSA 與 working solution 以 20 : 1 混合，靜置 30 分鐘反應。
- IV. 測量混和後溶液的 OD562，繪製出蛋白質標準曲線圖。

(3)以蛋白質電泳分離不同活動狀態大生熊蟲總蛋白質單體

以 4~12 % 梯度膠進行電泳實驗，分離不同樣本總蛋白質單體比較其分子量與表現量是否有差異。

SDS-PAGE 步驟

- I. 將表 5 樣本與 4X Sample Buffer 以 3 : 1 混合，在 4 °C 以 14000 rpm 離心 10 分鐘。
- II. 混合後的樣本使用乾浴槽以 100 °C 加熱 10 分鐘。
- III. 膠體凹洞注入蛋白質樣本，對照組與實驗組每一樣本總蛋白質濃度皆為 10 μg 。
- IV. 以 90 V 進行電泳 90 分鐘。
- V. 將膠片銀染，並使用 ImageJ 與 Excel 推算蛋白質單體濃度 (分析方法參考 徐, 2019) 。

$$\text{樣本組別蛋白質單體濃度 } (\mu\text{g/mL}) : \text{已知濃度} \times \frac{\text{樣本蛋白質單體面積}}{\text{已知濃度蛋白質單體面積}}$$

(4)以 LC MS/MS 分析實際化學壓力下大生熊蟲的表現量較高的蛋白質，了解其抗壓機制

In-gel digestion 步驟

- I. 銀染後將膠片以 MQ water wash 至少 4 小時。接著用無菌手術刀將目標 peptide 切下，分割成數個約 1 mm³的小碎塊後移至 0.65 mL 離心管進行退染。
- II. 加入 100 µL 50 mM Dithioerythreitol (DTE)/25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)，靜置 37 °C 浸泡 1 小時。
- III. 以 10000 g 離心 1 分鐘，去除 DTE solution，接著加入 100 µL 100 mM Iodoacetamide (IAA)/25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)，避光靜置於室溫 1 小時。
- IV. 以 10000 g 離心 1 分鐘，去除 IAA solution，接著加入 100 µL 50 % Acetonitrile (ACN)/25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)，靜置 15 分鐘後以 10000 g 離心 1 分鐘，去除 ACN solution。重複此步驟 1 次。
- V. 將 gel 浸泡於 100 % ACN 5 分鐘，待觀察到 gel 轉變為白色後以 10000 g 離心 1 分鐘，去除 ACN solution。重複此步驟 1 次。
- VI. 真空離心 5 分鐘使膠體乾燥，接著以 22.5 ng trypsin 回溶，使用 pestle 壓碎 gel。於 37 °C 反應至少 16 小時。
- VII. 加入 50 µL 50 % ACN/ 5 % Trifluoroacetic acid (TFA)，以超音波破碎儀振出 peptide。
- VIII. 以 10000 g 離心 1 分鐘，將上清液轉移至新的離心管。重複步驟 VII.~VIII 一次。
- IX. 真空離心將上清液烘乾，接著進行 Desalting。

Desalting

- I. 吸取 10 µL sample preparation solution (0.5 % TFA in MQ water) 加入步驟 IX. 的離心管，pipetting 溶解鹽類。

步驟 II.~III. 目的為潤洗 Zip Tip

- II. 使用 Zip tip 吸取 10 µL wetting solution (50 % ACN/ 0.1 % TFA, dispense to waste)。重複此步驟 3 次。
- III. 使用 Zip tip 吸取 10 µL Equilibration washing solution (0.1 % TFA in MQ water), dispense to waste。重複此步驟 3 次。
- IV. 將 Zip tip pipetting 步驟 IX. 的離心管，此時 Zip tip 上的 C18 會 binding peptide。

V. 重複步驟 II., 去除 Zip tip 上的鹽類。

VI. 依序以 Zip tip 吸取 10 μ L 10, 30 與 50% ACN/ 0.1 % TFA 至新離心管 elute peptide。

VII. 將新離心管的 peptide 真空離心烘乾, 並將樣本送至中央研究院生物化學研究所進行 LC MS/MS 分析。

2. 抗氧化系統分析

過去研究發現大生熊蟲接觸單一硝酸鹽壓力隱生後, 總抗氧化能力極顯著提升, 因此本實驗將檢測大生熊蟲接觸實際化學壓力時的總抗氧化能力, 探討小白菜萃取液是否對其造成氧化壓力傷害。

生物體抗氧化機制主要有酵素與非酵素抗氧化系統, 本研究將以酵素在高溫下會失去活性的特性, 探討大生熊蟲接觸環境化學壓力時酵素與非酵素抗氧化系統的作用情形。最後進一步分析常見抗氧化酵素在化學壓力下的基因表現量, 以及抗氧化物質活性, 了解大生熊蟲如何對抗實際化學壓力產生的自由基傷害。

(1) 酵素與非酵素抗氧化系統總抗氧化能力測定 (n = 30 ; Bio = 10 ; Tech = 3)

I. 將表 5 的樣本藉由超音波破碎 (ultrasonication) 與研杵 (pestle) 壓碎處理, 並以 100 °C 加熱 15 分鐘, 使抗氧化酵素失去活性。

II. 使用 T-AOC Assay Kit 與 BCA method kit 藉由下方公式推算出總抗氧化能力。

公式：總抗氧化能力 T-AOC (mmol/gprot) = $(\Delta A_{593} - b) \div a \times f \div C_{pr}$

a 為標準曲線斜率。b 為標準曲線截距。 ΔA_{593} 為 $OD_{Sample} - OD_{Blank}$ 。

f 為試驗前樣本稀釋係數。C_{pr} 為樣本蛋白質濃度 (gprot/L)。

(2)探討抗氧化酵素基因表現量

本研究初期推測大生熊蟲會藉由抗氧化酵素對抗硝酸鹽壓力。而預備實驗以加熱實驗也證實大生熊蟲能以酵素與非酵素抗氧化系統對抗單一硝酸鹽產生的自由基壓力 (圖 5) , 為進一步確認其酵素種類, 本實驗將分析大生熊蟲在實際化學壓力下, 常見抗氧化酵素基因表現量。

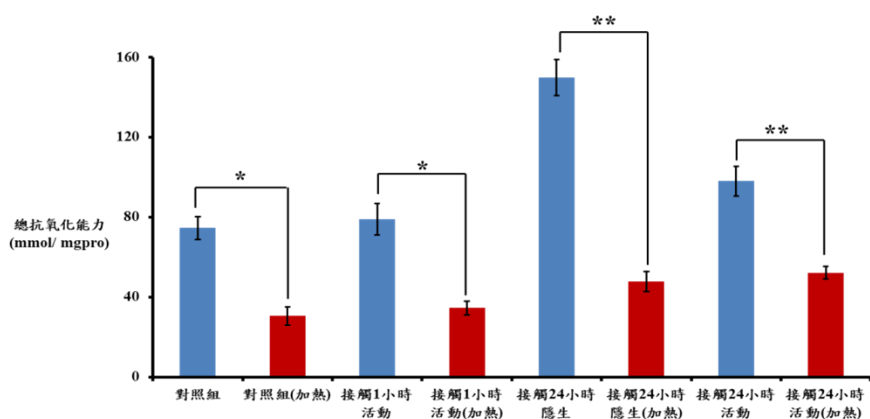


圖5 大生熊蟲於單一硝酸鹽壓力總抗氧化能力

藍色柱狀為接觸硝酸鹽壓力未經加熱處理的樣本。紅色柱狀則為經過加熱處理酵素失活後的總抗氧化能力。初步實驗可發現任何狀態下酵素與非酵素抗氧化系統皆會作用, 數據以T-test分析, $p < 0.05$ (*)為顯著差異, $p < 0.01$ (**)為極顯著差異。

RNA 萃取與反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

- I. 將表樣本加入 500 μL Trizol 試劑, 浸泡在 -196°C 液態氮使管內試劑快速結凍。
- II. 將樣本於 60°C 加熱 3 分鐘, 解凍後以研杵 (pestle) 研磨管內水熊蟲個體。
- III. 重複步驟 1~2 直至水熊蟲個體完全破壞 (於解剖顯微鏡下檢查)。
- IV. 加入 100 μL 氯仿並搖晃混合 15 秒, 離心 (4°C , 12000 g, 15 分鐘) 分離出水相層、中間層與有機層。
- V. 吸取水相層後加入 200 μL 異丙醇析出 RNA, 離心 (4°C , 12000 g, 15 分鐘) 使其沉澱。
- VI. 去除上清液後以 70 % 乙醇清洗 RNA 沉澱物 2 次, 接著置於 37°C 烘乾。
- VII. 將 RNA 沉澱加入 20 μL DEPC 水混合, 使用 Nanodrop 測定樣本 OD_{260} , 推算 RNA 濃度。
- VIII. 取 1 μg total RNA, 參考 QIAGEN, OneStep RT-PCR Kit protocol, 加入 Oligo (dT) primer, dNTP, RT buffer, RNase inhibitor & Reverse transcriptase。

IX. 進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (45 °C 30 分鐘、85 °C 5 分鐘、最後降溫至 16 °C) 。

即時定量聚合酶連鎖反應 (qPCR) primers 設計

基因序列取自 NCBI GenBank, 並使用 Primer-BLAST 設計 qPCR primers

Primer	Sequence
目標基因	
GPX	Forward: 5'- TTCCCGTGTGTATCAGCAA-3' Reverse: 5'- CAAGACAGGGCGATCATCTT-3'
SOD	Forward: 5'- CGGAGTAATCGGTCTCGTTG-3' Reverse: 5'- AGCGGTTTATGCTGAATTGC-3'
Housekeeping Gene	
β -actin	Forward: 5'-AGGCCAATCGTGAGAAGATG-3' Reverse: 5'-CAGGGCATAGCCTTCGTAGA-3'

基因表現量分析

- I. 將 cDNA 稀釋 10~20 倍, 使樣本進行 qPCR 時濃度為 10~100 ng。
- II. 依據在 96 孔盤中加入 SYBR green, primer mix, ddH₂O & cDNA template。
- III. 將 96 孔盤至於 Roche Lightcycler 480 進行 qPCR (反應條件: 95 °C 10 秒、60 °C 10 秒、72 °C 10 秒, 共 45 循環) 。
- IV. 使用 Lightcycler 480 軟體測得 Ct value, 並利用目標基因 (GPX & SOD) 相對於 β -actin 標準化後表達的差異倍數進行 $\Delta\Delta Ct$ 相對定量。

(3)分析實際化學壓力下常見抗氧化物質活性

Rizzo *et al.* (2010)的研究發現 *Paramacrobiotus richtersi* 水熊蟲在**物理壓力乾燥隱生**時, 酵素抗氧化系統 SOD & GPX 與非酵素抗氧化系統 GSH 較正常活動樣本極顯著增加, 因此本研究將分析大生熊蟲接觸**實際化學壓力**時, 是否也會以上述物質對抗氧化壓力。參考 Rizzo *et al.*, 2010 實驗步驟, 藉由氧化還原方式分別測定實際化學壓力下 SOD, GPX 與 GSH 的活性。

3. 分析體內脂質含量

過去研究指出乾燥隱生的水熊蟲會將脂質運輸至表皮最外層堆積，避免水分散失 (Bjørn, 2006; Litwin, 1985; Wright, 1988)。本研究初期亦發現大生熊蟲於單一硝酸鹽壓力下隱生時，體內脂質含量會增加，推測能防止硝酸鹽進入體內影響滲透壓平衡。因此本實驗將探討大生熊蟲接觸實際化學壓力時，是否也會藉由脂質隔絕外界物質傷害。

實驗組 (n = 60 ; Bio = 20 ; Tech = 3)

- (1) 大生熊蟲接觸小白菜萃取液壓力後，以 dH₂O 清洗。
- (2) 以 **Paraformaldehyde** 固定樣本，並使用異丙醇使樣本脫水。
- (3) 使用油紅 O 染劑對大生熊蟲染色，並以 dH₂O 清洗。
- (4) 脂質染色後呈橘紅色，以倒立顯微鏡觀察拍照脂質分布，並使用 **ImageJ** 分析油紅 O 呈色面積，進一步以下方公式推算脂質含量。

$$\text{油紅 O 呈色面積占體表總面積百分比 (\%)} : \frac{\text{油紅O呈色面積}}{\text{樣本體表總面積}} \times 100 \%$$

對照組 (n = 60 ; Bio = 20 ; Tech = 3)

同實驗組染色步驟，對正常活動、乾燥隱生接觸單一硝酸鹽壓力的大生熊蟲染色。

(3) 統計分析方式

以 **T 檢驗 (T-test)**或單因子變異數 (**One-way ANOVA**)進行分析， $p < 0.05$ 為顯著差異 (*), $p < 0.01$ 為極顯著差異 (**).

5、 研究結果

1、 評估大生熊蟲能否實際檢測環境化學壓力

使用**正常活動**的大生熊蟲檢測實際化學壓力，發現其接觸小白菜萃取液（平均硝酸鹽濃度 $238 \pm 11 \text{ mg/L}$ ）24 小時後全數進入隱生狀態（圖 6），檢測結束後將樣本置於原生水樣環境，發現 $97 (\pm 2) \%$ 大生熊蟲未受傷害（亞甲藍染色結果未受傷，見圖）並能重複使用至少 4 次，且 4 次重複檢測過程於不同時間點隱生率皆無顯著差異 ($p > 0.05$)； $3 (\pm 2) \%$ 的大生熊蟲第 2 次檢測化學壓力後則受到傷害（亞甲藍染色結果受傷，見圖 7），實驗後無法存活。

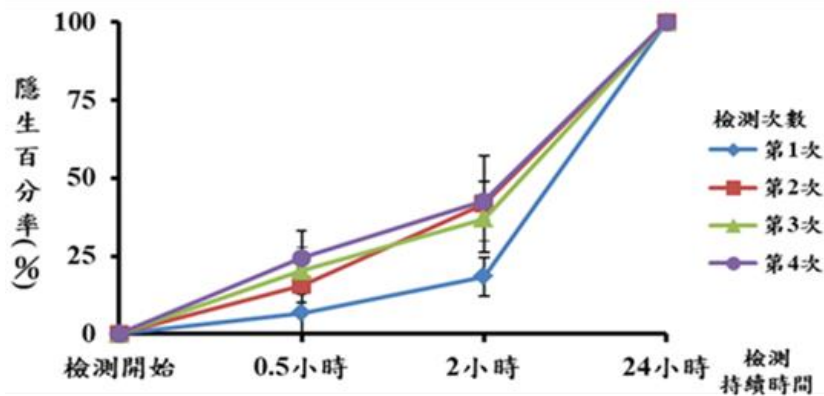


圖6

正常活動大生熊蟲檢測實際化學壓力活動狀態每次實驗間隔1週，記錄活動大生熊蟲持續檢測小白菜萃取液壓力過

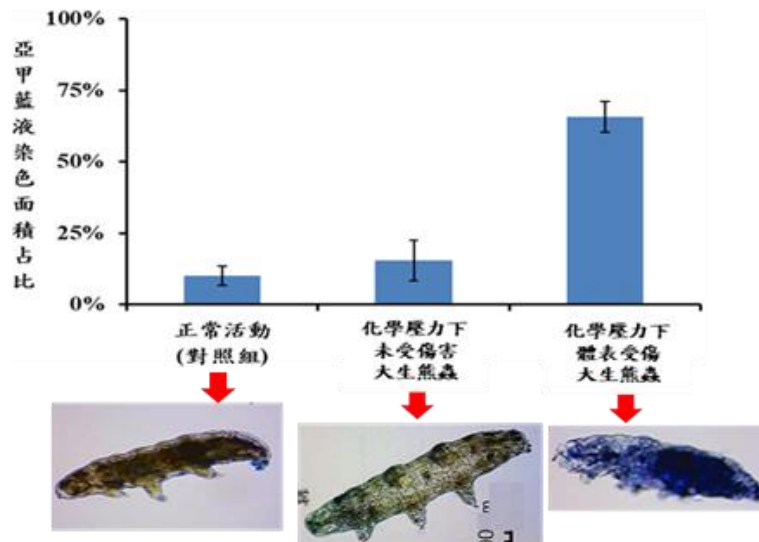


圖7 確認活動大生熊蟲檢測實際化學壓力時是否受傷

使用小白菜萃取液模擬實際化學壓力，並以亞甲藍液染色，確認檢測壓力後置於原生環境恢復活動之樣本體表有無受傷。以正常活動樣本作為對照組，若實驗樣本體表染色面積顯著大於對照組，則定義為體表受傷害。

使用**乾燥隱生**狀態大生熊蟲檢測實際化學壓力，探討其接觸小白菜萃取液恢復活動所需時間。目前能使用同一批大生熊蟲重複檢測實際化學壓力至少 6 次，其接觸化學壓力（小白

菜萃取液) 恢復正常活動所需時間顯著高於對照組 (dH_2O) ($p < 0.05$) (圖 8)。在經歷 6 次檢測後發現所有樣本皆能存活且體表未受傷害 (亞甲藍染色結果未受傷, 見圖 9)。第 7 次檢測時則發現大生熊蟲於檢測後皆無法存活, 亞甲藍液染色則顯示體表未受傷害 (圖 9)。

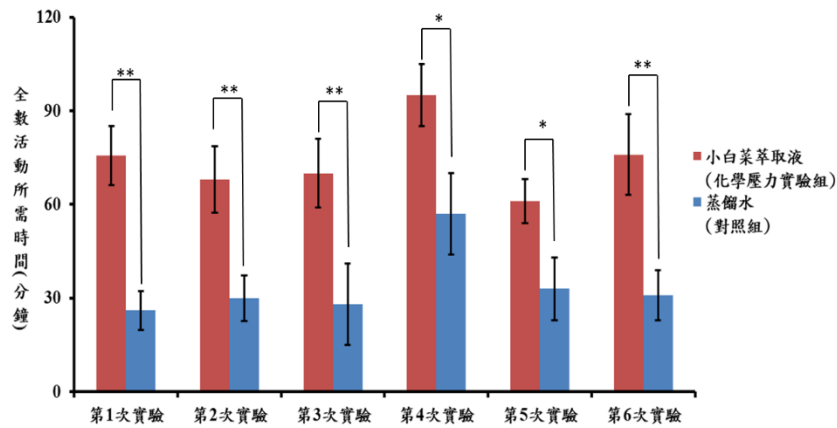


圖8 隱生大生熊蟲接觸壓力恢復活動所需時間

每次實驗間隔1周, 使大生熊蟲長時間乾燥隱生。數據以One-way ANOVA分析, $p < 0.05$ 為顯著差異 (*), $p < 0.01$ 為極顯著差異 (**)。

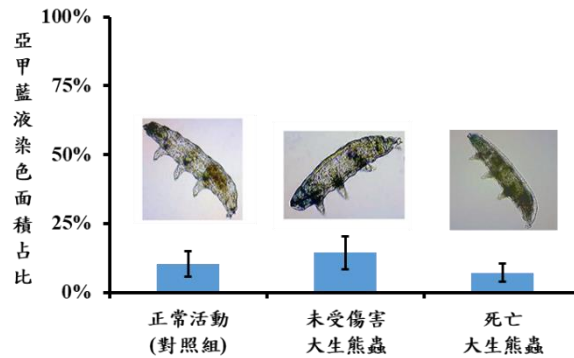


圖9 隱生大生熊蟲檢測實際化學壓力後立即染色

以亞甲藍液染色, 確認檢測壓力後置於原生環境恢復活動之樣本體表有無受傷。以正常活動樣本作為對照組, 若實驗樣本體表染色面積顯著大於對照組, 則定義為體表受傷害。

實驗討論

(1) 蔬菜萃取液為混合物對大生熊蟲造成多重壓力

研究初期進行急性毒性效應實驗時，發現大生熊蟲接觸單一硝酸鹽壓力 24 小時的**半數隱生**濃度為 $213.9 \text{ mg/L NO}_3^- - \text{N}$ ，本次研究在實際應用實驗卻發現，大生熊蟲接觸硝酸鹽濃度相近 ($238 \pm 11 \text{ mg/L}$) 的小白菜萃取液 24 小時後**全數進入隱生狀態**。進一步以亞硝酸鹽試紙與甲基橙合成法 (蔡與賴, 2012) 檢驗實驗第 24 小時的小白菜萃取液，發現其能檢測出硝酸鹽 (圖 10) (濃度約 $195 \pm 32 \text{ mg/L}$)，另外小白菜萃取液的溶解氧濃度在 24 小時內亦從 6 mg/L 下降到 2 mg/L ，由此可推測小白菜萃取液中亞硝酸鹽含量增加、溶氧下降等混合壓力，導致大生熊蟲接觸小白菜萃取液 24 小時後隱生率相較接觸單一硝酸鹽壓力提高。自上述結果可知小白菜壓力為混合物，實際環境壓力亦為混合物對生物體造成多重影響，因此後續實驗將持續以小白菜模擬實際壓力並使用大生熊蟲檢測。

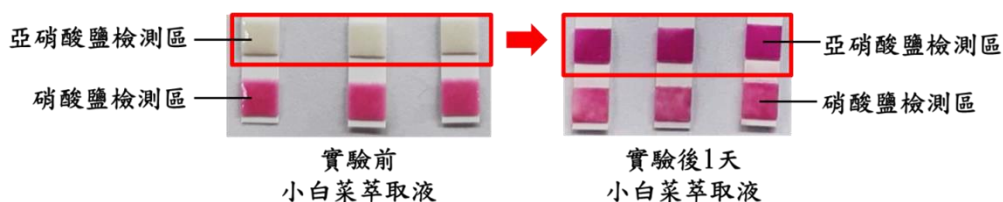


圖10 小白菜萃取液於實驗前後硝酸鹽與亞硝酸鹽濃度

使用硝酸/亞硝酸鹽試紙進行檢測。待測樣本中若含有硝酸鹽或亞硝酸鹽，滴入檢測區後試紙由無色轉變為紅

(2) 建立大生熊蟲檢測化學壓力方法

根據實驗結果可發現，**活動**大生熊蟲檢測過程耗時超過一天，不適合應用於模式生物。使用隱生大生熊蟲則能大幅縮短時間於**2**小時內獲得檢測結果，若接觸壓力時其恢復正常活動時間相較於接觸正常環境時增加，甚至在壓力過大時可能會持續隱生不恢復活動，應用時可藉此判斷環境壓力對生物體影響程度。**適合以隱生大生熊蟲**恢復活動所需時間為指標檢測實際化學壓力（圖 11）。目前已確認大生熊蟲在實際應用時能重覆檢測化學壓力至少**6**次。雖然其在第**7**次檢測後無法存活，但根據染色結果其體表卻未受傷害，推測其無法存活原因並非體表破損影響，可能是其壽命週期結束或是多次接觸化學壓力導致內源性傷害所致，未來可以持續探討其無法存活原因。



圖11 大生熊蟲檢測化學壓力流程示意圖

2、 探討大生熊蟲於實際環境化學壓力的耐受機制

(1) 分析總蛋白質單體表現量

以 4~12 % 梯度膠分離大生熊蟲乾燥隱生、乾燥隱生恢復正常活動以及接觸實際化學壓力的總蛋白質。發現樣本接觸小白菜萃取液 24 小時隱生後，100 kDa 的蛋白質單體表現量

顯著高於正常活動樣本 ($p < 0.01$)、50 kDa 表現量顯著高於正常活動以及接觸小白菜萃取液後自隱生恢復活動之樣本 ($p < 0.05$)、40~50 kDa 表現量顯著高於正常活動樣本 ($p < 0.05$)。另外乾燥隱生大生熊蟲接觸蒸餾水與小白菜萃取液恢復活動的過程中，其 40~50 kDa 蛋白質單體表現量則顯著高於正常活動與乾燥隱生樣本 (圖 12)。

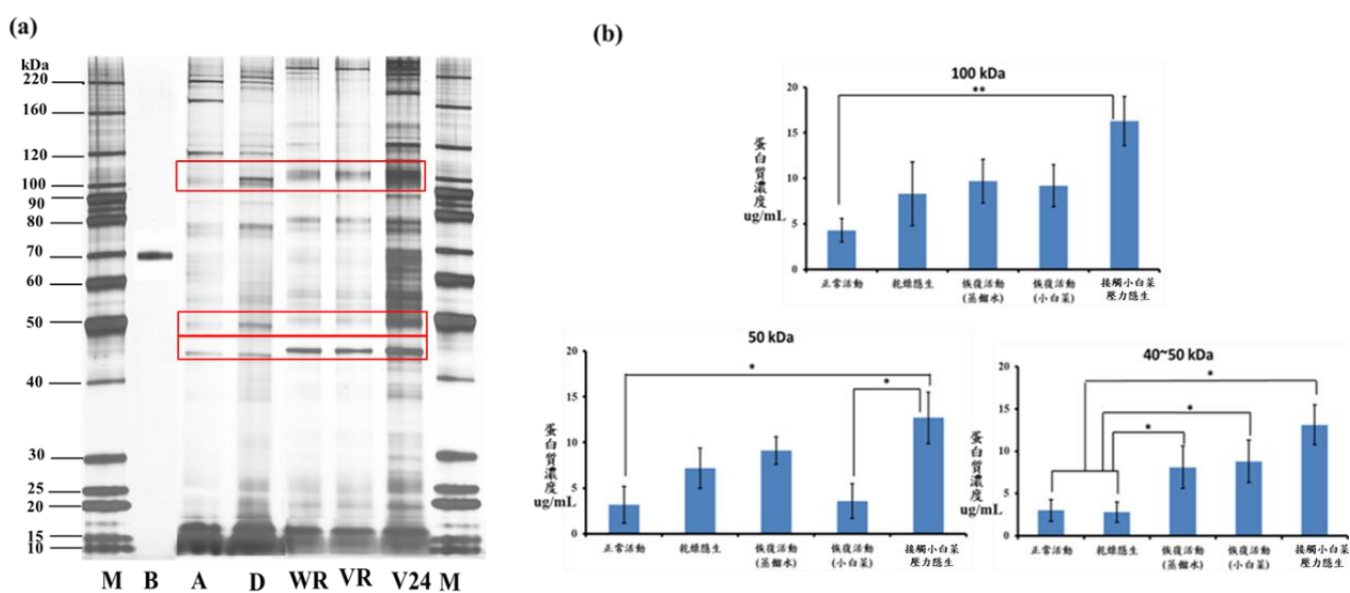


圖 12 分析大生熊蟲在實際化學壓力下總蛋白質單體表現量

每一組樣本總蛋白質濃度皆為 10 μg 。(a)為銀染分析結果，英文代號為不同樣本組別。M為分子量10~220 kDa蛋白質標準品。B為10 $\mu\text{g/mL}$

BSA。A為活動狀態大生熊蟲。D為乾燥隱生大生熊蟲。VR為接觸小白菜萃取液後自乾燥隱生恢復活動的大生熊蟲。WR為接觸蒸餾水後自乾燥隱生恢復活動的大生熊蟲。V24為接觸小白菜萃取液24小時後隱生的大生熊蟲。(b)使用ImageJ分析蛋白

實驗討論

過去研究分析不同活動狀態大生熊蟲在單一硝酸鹽壓力下總蛋白質單體時，發現部分實驗組的色帶在銀染後呈色不明顯，推測僅藉由超音波破碎與加入 RIPA lysis buffer 無法完整萃取大生熊蟲個體與組織的總蛋白質（圖 13）。所以本次實驗在抽取總蛋白的過程中以研杵 (pestle) 壓碎大生熊蟲個體，提高總蛋白萃取成功率，圖 8b 可發現樣本經研杵壓碎處理後，其總蛋白質單體在銀染後皆能明顯呈色。

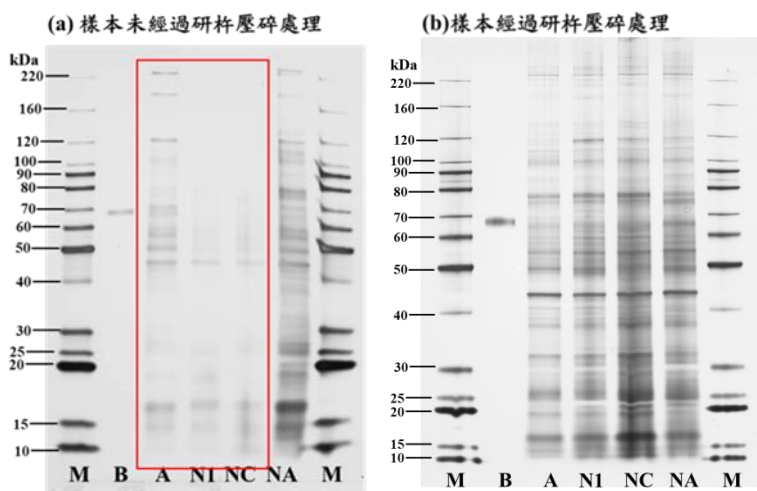


圖13 分離大生熊蟲在單一硝酸鹽壓力下總蛋白質單體

每一組樣本總蛋白質濃度皆為10 μg 。(a)與(b)為銀染分析結果，代號M為分子量10~220 kDa protein ladder，B為10 $\mu\text{g/mL}$

BSA，A為對照組正常活動大生熊蟲，N1為接觸硝酸鹽1小時活動大生熊蟲，NC為接觸硝酸鹽24小時隱生大生熊蟲，NA為接觸硝酸鹽24小時活動大生熊蟲。(a)紅框處可發現樣本未經研杵壓碎處理無法完整萃取總蛋白質，銀染後表現不明顯。(b) 樣本經過研杵壓碎處理。

(2) 以 LC MS/MS 分析實際化學壓力下的蛋白質，深入瞭解其功能。

目前已建立 LC MS/MS In-gel digestion 的實驗步驟，未來會持續重複多次實驗確認哪些蛋白質單體在實際化學壓力表現量較高，並進一步對其進行定序做功能分析。

(3) 分析大生熊蟲於實際化學壓力下總抗氧化能力

大生熊蟲於乾燥隱生、接觸實際化學壓力、乾燥隱生後接觸蒸餾水以及小白菜萃取液復甦時，酵素與非酵素抗氧化系統皆表現（圖 14）。

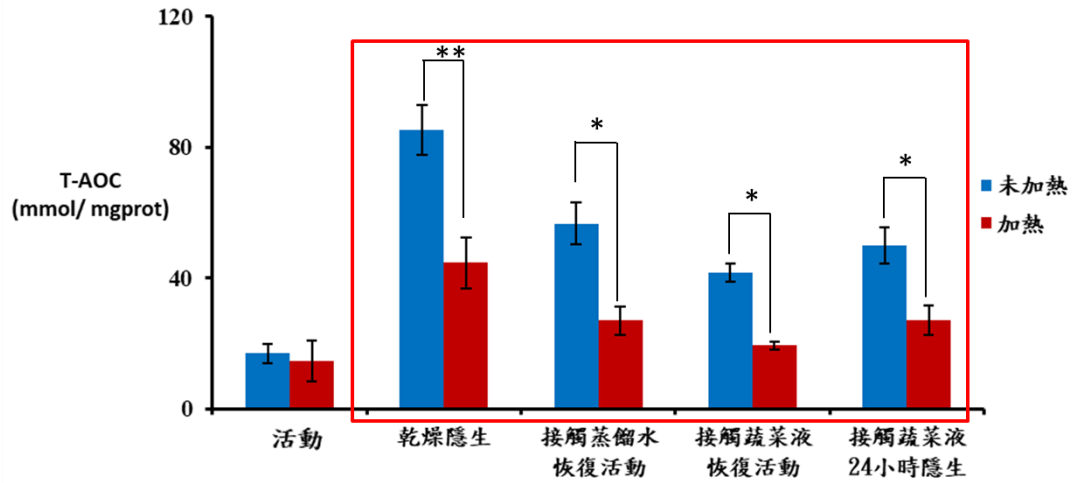


圖14 大生熊蟲於實際化學壓力總抗氧化能力

使用TAOC kit 分析樣本於實際化學壓力下總抗氧化能力 (TAOC)。以One-way ANOVA分析， $p < 0.05$ (*)為顯著差異， $p < 0.01$ (**)為極顯著差異。

實驗討論

實驗結果發現大生熊蟲在乾燥隱生時總抗氧化能力高於其他實驗組樣本，推測其在乾燥隱生時持續受到脂質過氧化等氧化壓力，需要更多抗氧化物質協助其對抗氧化壓力傷害。

(4) 探討抗氧化酵素基因表現量

實驗發現正常活動與隱生大生熊蟲，抗氧化酵素基因皆無表現，housekeeping gene (β -actin)則是在 qPCR 後亦 Ct 值約 40~50 (圖 15)。

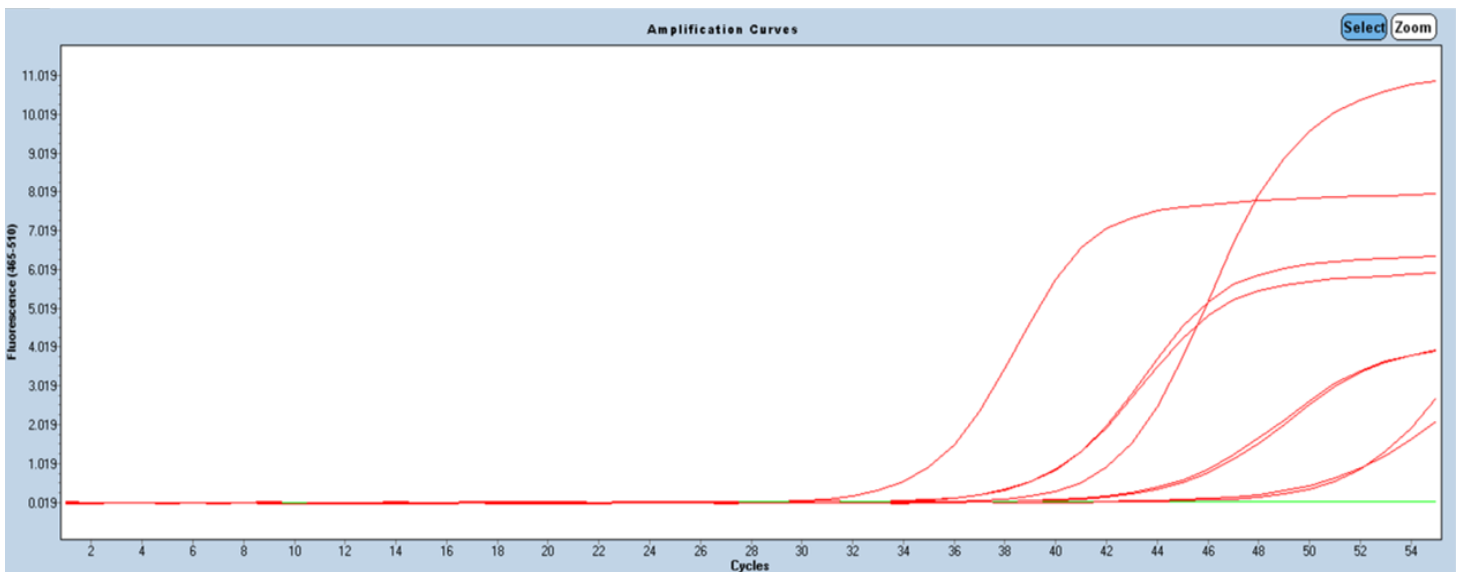


圖15 β -actin於qPCR後擴增曲線圖

縱軸為SYBR Green螢光強度，橫軸為擴增循環次數。

實驗討論

實驗初期僅以 Trizol 試劑萃取大生熊蟲總 RNA，但發現 RNA 濃度過低 (<10 ng/uL)無法進行 RT-PCR，因此本研究參考 (Tenlen *et al.*, 2013)的實驗步驟，在萃取總 RNA 的過程中藉由液態氮反覆凍融以及研杵研磨的方式完整破壞樣本組織與細胞，成功萃取足夠濃度之大生熊蟲 total RNA (圖 16)，並在後續實驗每一樣本以 1000 ng total RNA 進行反轉錄 PCR 製造 cDNA。

進行 qPCR 時，housekeeping gene Ct 值正常範圍為 14~32。 β -actin 於本實

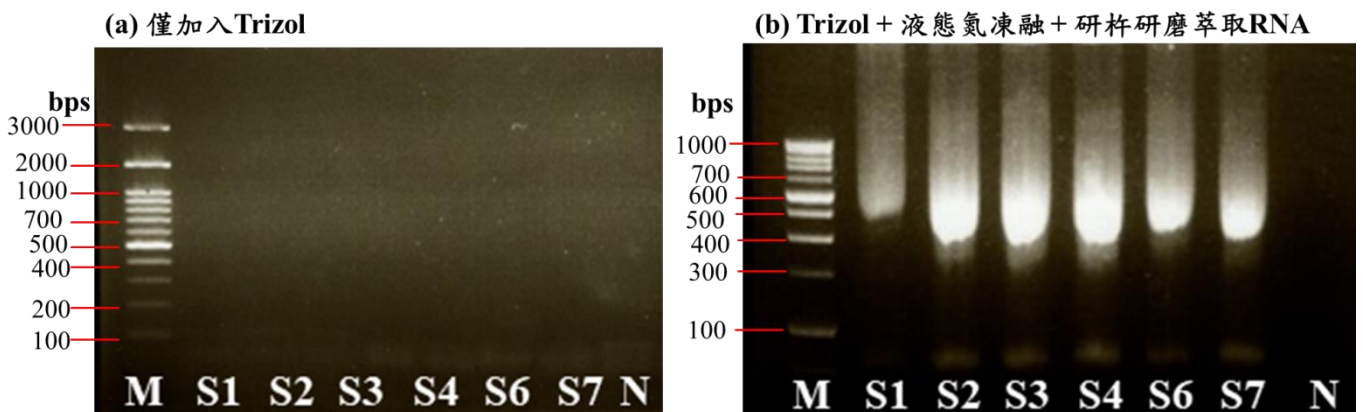


圖16 以不同方法萃取RNA後核酸電泳分析圖

N為DNA ladder。S1~S7為實驗樣本。N為負對照組ddH₂O。

驗超過 35 次擴增循環後 SYBR 螢光強度才增強。由於大生熊蟲的 β -actin 在 NCBI

GenBank 中僅有 **partial sequence (452 bp)** 數據，因此使用 **Primer-BLAST** 設計後僅產出 **3 組可用 primer**，其 **self complementarity score** 皆 **>5**，推測 **qPCR** 過程亦形成 **primer dimer**，導致其無法精準與目標基因黏合。為了解決此問題，本研究將大生熊蟲的 **β -actin partial sequence** 與另一物種高生熊蟲的 **β -actin complete cds sequence** 比對，發現 **2** 者相似度為 **88 %**。目前已嘗試使用高生熊蟲完整的 **β -actin** 序列設計更適合的 **primer**，未來嘗試其能否在 **qPCR** 過程與大生熊蟲的 **β -actin** 基因黏合。

Primer	Sequence
β-actin	Forward: 5'- ATCCTCCGTCTGGATTTGGC -3' Reverse: 5'- GACCGTCGGGAAGTTCGTAG -3'

(5) 分析實際化學壓力下常見抗氧化物質活性

目前已建立實驗步驟，未來完成酵素與非酵素總抗氧化分析實驗後，將分析大生熊蟲於實際化學壓力下常見抗氧化物質活性。

(6) 分析實際化學壓力下大生熊蟲體內脂質含量

圖 17 實驗結果可發現，大生熊蟲在實際化學壓力下隱生、乾燥隱生以及隱生剛恢復正常活動階段的體內脂質含量相較於接觸單一硝酸鹽壓力時極顯著增加。

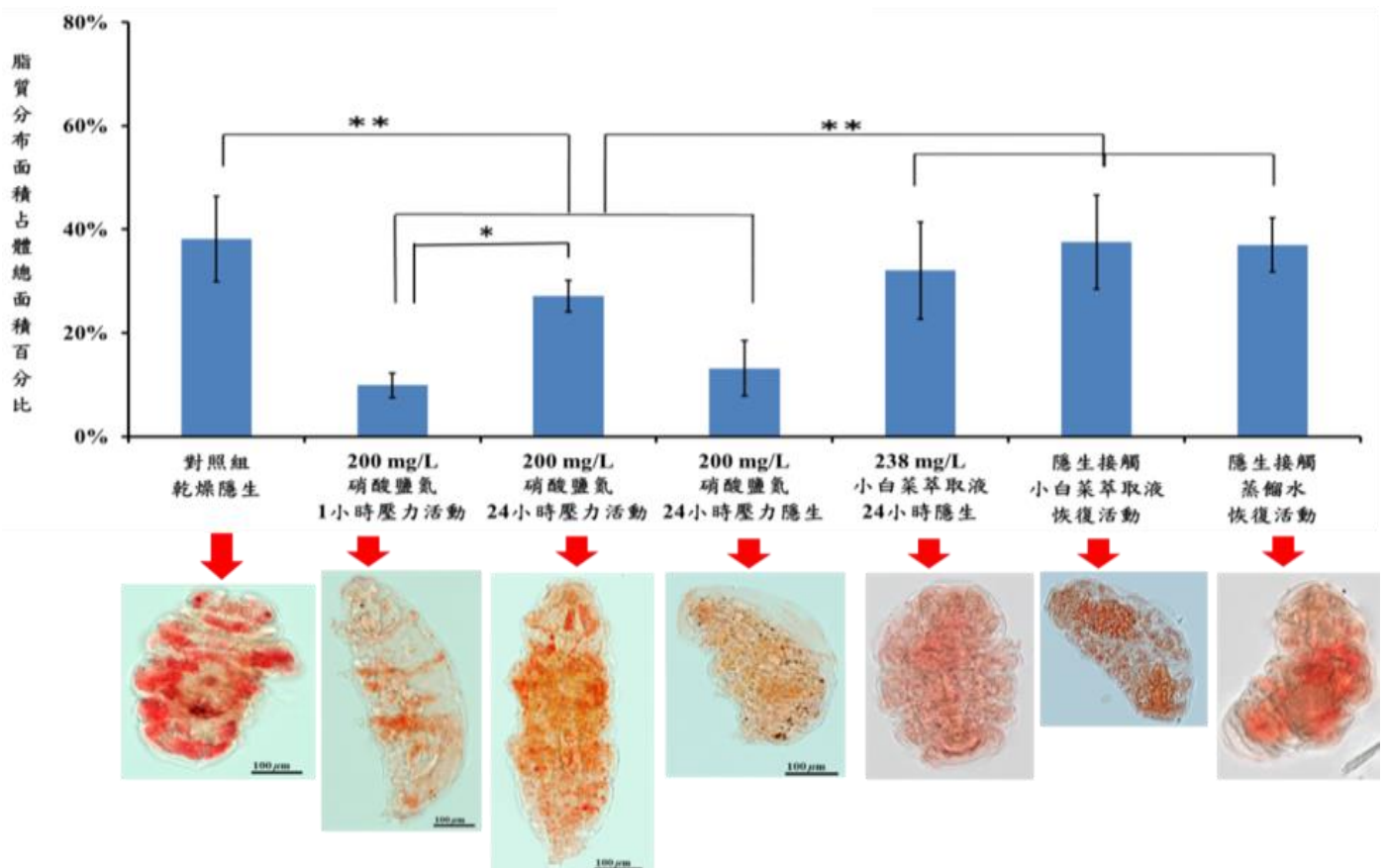


圖17 分析大生熊蟲於不同壓力下體內脂質含量與分布

以ImageJ分析不同實驗條件下大生熊蟲油紅O呈色面積，確認脂質面積占體總面積百分比。以One-way ANOVA分析， $p < 0.05$ (*)為顯著差異， $p < 0.01$ (**)為極顯著差異。

6、研究討論

1、大生熊蟲模式生物實際應用範疇

硝酸鹽是人體在飲食常接觸的化學壓力之一，過去研究指出硝酸鹽在體內會轉變為有害的亞硝酸鹽、一氧化氮與氮亞硝基化合物 (**N-nitroso compounds**)，引發缺氧、氧化壓力甚至致癌等症狀 (**ATSDR Online, 2017; Crowe, 2019**) (王與蔡, 2011)。因此本研究原本希望以大生熊蟲評估蔬菜硝酸鹽含量是否超標，為人體健康把關。然而小白菜萃取液與實際化學壓力多為混合物，無法確認大生熊蟲檢測後隱生是否為單一壓力因子所致。儘管無法由大生熊蟲隱生率測出實際化學壓力中單一硝酸鹽含量，本研究以乾燥隱生樣本接觸化學壓力恢復活動時間為指標，在未來實際應用時仍能藉由恢復時間長短評估待測物質中是否含過量壓力。

另外近期評估硝酸鹽風險的研究藉由毒理動力學分析硝酸鹽於人體內的吸收、分布與代謝途徑，發現常人平均攝取硝酸鹽的劑量幾乎不會造成健康風險 (**Cheng et al., 2021**)，許多研究也推測硝酸鹽與亞硝酸鹽降血壓和預防心血管疾病潛能 (**Bryan and Loscalzo, 2017, Bryan and Ivy, 2015, Milkowski et al., 2010**)。雖然蔬菜中硝酸鹽對人體風險可能利大於弊，但從研究初期評估常見化學壓力對水熊蟲毒性效應實驗可發現，大生熊蟲不僅限於檢測食品中的硝酸鹽，根據研究初期常見化學壓力急性毒性效應實驗結果，未來仍具潛能以隱生大生熊蟲為模式生物，幫助人體檢測環境中其他有害化學毒物如重金屬、殺蟲劑、酸雨等。

2、比較傳統方法與大生熊蟲檢測化學壓力差異 (表 6)

化學方法檢測結果雖然精確，但無法直接呈現壓力對生物體影響。傳統模式生物如線蟲，雖然從致死率就能評估壓力程度，但檢測過程耗時，需藉由 **24~48** 小時急性毒性效應數據獲得檢測結果，且實驗動物在檢測過程中容易犧牲，有違當代生物倫理 **4R** 準則。本研究發展之模式生物大生熊蟲在乾燥隱生下檢測化學壓力，不但能在短時間 (**2** 小時內) 評估化學壓力是否超標，檢測過程中大生熊蟲不易受傷害，能重複檢測壓力減少實驗動物用量，未來實際應用時乾燥隱生熊蟲能 **coating** 於載玻片上，方便保存攜帶，隨時都能檢測。

表 6 常見化學壓力檢測方法

檢測方法	目前應用領域	特點	參考文獻
化學方法	環境污染、 食藥毒物等	準確度高，但無法瞭解對生物體影響。	陳等，2012
傳統模式生物（如線蟲）	藥妝重金屬、 食品真菌毒素	操作簡單，但需要長時間觀察獲得檢測結果，且實驗動物無法重複使用。	Gooldstein, 2018
新型模式生物 水熊蟲	食品硝酸鹽、 水域汙染等	操作簡單，能快速得知化學壓力是否超標，實驗動物亦能重複檢測。	本研究

3、 評估大生熊蟲長期乾燥隱生後能否實際檢測化學壓力

目前結果發現最適合以隱生大生熊蟲檢測化學壓力。實驗結果發現，大生熊蟲乾燥隱生後 24 小時，總抗氧化能力極顯著提升，推測未來將大生熊蟲置於載玻片上乾燥隱生後能長期保存，方便攜帶，隨時可檢測實際檢測化學壓力。

然而文獻指出，*Paramacrobiotus spatialis* 水熊蟲在進入乾燥階段與乾燥隱生後，活性氧自由基 ROS (Reactive oxygen species) 持續增加 (Giovannini *et al.*, 2022)。*P. richtersi* 水熊蟲則是在乾燥隱生下 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 極顯著高於正常活動樣本 (Rizzo *et al.*, 2010)，TBARS 為評估脂質過氧化的指標（脂質過氧化的主要降解產物丙二醛，可以與 TBA 反應呈色，以判斷脂質過氧化情形），生物膜磷脂的不飽和脂肪酸側鏈易受自由基攻擊導致過氧化作用，破壞生物膜結構，改變其通透性及細胞膜酵素活性 (許，2002)。

從上述文獻內容可知即便水熊蟲處於乾燥隱生狀態，仍持續受氧化壓力影響，雖然抗氧化系統能協助其對抗自由基傷害，但其作用時間可能僅限於初期（隱生初期 24 小時內），水熊蟲在長時間隱生（20 天）後體內生理機制與代謝會大幅降低，無法產生抗氧化物質對抗持續形成的自由基氧化壓力，導致水熊蟲長時間乾燥隱生後，恢復活動所需時間甚至是死亡率可能會隨隱生時間增加 (Giovannini *et al.*, 2022; Rizzo *et al.*, 2010)。

本研究使用的大生熊蟲在未來實際應用時，可能被放置一段時間後才用於檢測環境化學壓力，由於目前僅確認乾燥隱生一週的樣本能重複檢測實際化學壓力至少 6 次，因此本研究

嘗試將大生熊蟲長時間乾燥隱生 7 週後，以相同方法檢測實際化學壓力，發現無論是接觸對照組蒸餾水或是實驗組小白菜萃取液的樣本，皆無法自乾燥隱生恢復正常活動，而是直接無法存活。由於大生熊蟲的平均壽命約為 7 個月，推測其無法存活原因為壽命週期結束，或是長時間乾燥隱生脂質過氧化傷害所致，未來可以持續探討其無法存活原因。未來將持續探討大生熊蟲經歷不同時間乾燥隱生後，恢復活動時間是否增加以及總抗氧化能力，訂定大生熊蟲最適乾燥隱生週期，使其發揮最大效益在短時間檢測化學壓力並重複使用。

4、大生熊蟲抗逆境蛋白作用時機推測

熱休克蛋白 (Hsps) 能夠在生物體面臨高溫、氧化等壓力時維持細胞結構完整性，避免蛋白質錯誤折疊，以及修復 DNA 損傷 (Kalmar & Greensmith, 2009)。Jönsson & Schill (2007) 研究了 *Richtersius coronifer* 水熊蟲在正常活動、乾燥隱生以及復水恢復活動的 Hsp70 表現量，

發現 Hsp70 僅在乾燥復水的樣本增加，而非乾燥隱生樣本。推測 Hsps 主要功能為修復水熊蟲經歷乾燥壓力後造成的傷害，而非穩定乾燥狀態下的體內分子。

本研究發現相較於乾燥隱生或正常活動等狀態，乾燥隱生大生熊蟲接觸蒸餾水以及小白菜萃取液恢復活動後，40~50 kDa 單體的表現量增加，推測其用於修復乾燥以及小白菜萃取液壓力造成的傷害。未來將增加實驗重複數持續分析大生熊蟲於實際化學壓力的總蛋白質單體，並以 LC MS/MS 分析表現量較高的蛋白質種類與功能。

5、比較單一硝酸鹽壓力與實際化學壓力蛋白質單體表現量差異

圖 18 紅框處分別比較大生熊蟲於單一硝酸鹽壓力與實際化學壓力隱生時蛋白質單體表現量，可發現大生熊蟲在實際化學壓力下，70~80、50 與 40~50 kDa 蛋白質單體表現量顯著高於單一硝酸鹽壓力。推測實際化學壓力為混合物，其所造成的壓力影響與單一硝酸鹽有所差異，使大生熊蟲表現出不同抗逆境蛋白。未來將進一步使用 LC MS/MS 分析其功能。

7、研究結論

1、本研究以小白菜萃取液模擬實際化學壓力。活動大生熊蟲接觸小白菜萃取液 24 小時後隱生。乾燥隱生 1 周後的大生熊蟲接觸小白菜萃取液在 2 小時內恢復正常活動，且能重複檢測至少 6 次，體表均未受傷害。最適合以隱生水熊蟲恢復活動所需時間檢測化學壓力。

- 2、乾燥隱生的大生熊蟲，接觸小白菜萃取液恢復活動後，100、70~80 與 50 kDa 的蛋白質單體表現量相較於正常活動與乾燥隱生時增加。接觸小白菜萃取液 24 小時隱生後，100、50 與 40~50 kDa 的蛋白質單體濃度相較於其他活動狀態增加。
- 3、大生熊蟲於乾燥隱生及接觸實際化學壓力隱生時酵素與非酵素抗氧化系統皆會作用。
- 4、在乾燥以及實際化學壓力下隱生時，大生熊蟲體內脂質含量顯著增加。

8、未來展望

- 1、大生熊蟲於未隱生的狀態下，平均壽命約 7 個月。目前結果已確認乾燥隱生 1 周樣本在其壽命期間能重複檢測實際化學壓力至少 6 次。未來將將探討大生熊蟲乾燥隱生極限，訂定大生熊蟲最適乾燥隱生週期，了解實際應用時乾燥隱生樣本能保存多久。
- 2、持續分析實際化學壓力下大生熊蟲總蛋白質，並對表現量較高之單體定序，瞭解其蛋白質種類與功能。
- 3、確認大生熊蟲接觸實際化學壓力時酵素與非酵素抗氧化系統作用情形，以及常見抗氧化物質活性。

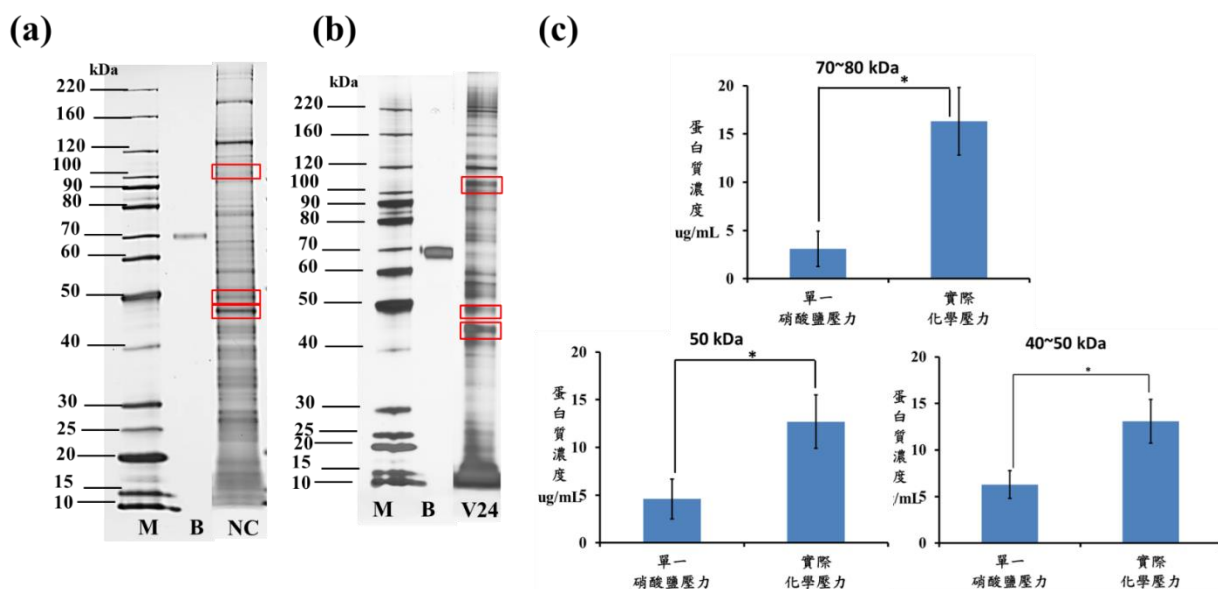


圖18 分離大生熊蟲在硝酸鹽與實際化學壓力下隱生時總蛋白質單體

每一組樣本總蛋白質濃度皆為10

μg。(a)分析大生熊蟲接觸單一硝酸鹽壓力24小時隱生後總蛋白質單體(代號NC)。(b)分析大生熊蟲接觸小白菜萃取液24小時隱生後總蛋白質單體(代號V24)。代號M為分子量10~220 kDa protein ladder，B為10 μg/mL BSA。

(c)分析大生熊蟲在硝酸鹽與實際化學壓力下隱生時總蛋白質單體表現量差異。數據以T-test分析， $p < 0.05$ (*)為顯著差異， $p <$

9、參考文獻

1、書籍、期刊、論文、科展報告

- (1) 王仁助與蔡淑珍 (2011)。蔬菜中硝酸鹽的思辨。苗栗區農業專訊, 第 62 期, 頁 4-6。
- (2) 王晶晶 (2018)。奈米二氧化鈦與重金屬對秀麗線蟲的複合毒性及其機制研究 (Doctoral dissertation, 中國科學技術大學)。
- (3) 段建軍, 周建斌, 王國棟, 胡普輝與劉延風 (2002)。NO₃-N 的水楊酸比色法快速測定。西北農林科技大學學報 (自然科學版), 30(3)。
- (4) 秦成靜 (2012)。第四章 負責任的研究行為—動物實驗倫理。載於戴正德、李明濱 (主編), 人體試驗—研究倫理的理念與實踐 (頁 39-62)。臺北市: 教育部。
- (5) 徐亦萱 (2019)。2019 年台灣國際科學展覽會研究報告: 驚爆「膠」點—虎紋三角渦蟲黏液分析及功能推測。
- (6) 陳瑋芸, 蔡沁玟, 郭景豪, 黃立宇, 蔡佳芬, 曾素香, 闕麗卿與施養志 (2012)。利用離子層析法檢測蔬菜中硝酸鹽及亞硝酸鹽含量。食品藥物研究年報, (3), 1-7。
- (7) 楊振東 (2016)。模式生物秀麗隱杆線蟲評價真菌毒素毒性毒理機制的研究 (Doctoral dissertation, 無錫: 江南大學)。
- (8) 陰環與李曉晨 (2011)。臺灣緩步動物 (緩步動物門) 新紀錄種記述 (Doctoral dissertation)。
- (9) 黎孝韻與曾國慶 (2007)。自由基及抗氧化物功能的探討。臨床藥學第 24 卷, 第 2 期, 頁 95-103。
- (10) Altiero, T., Rebecchi, L., & Bertolani, R. (2006). Phenotypic variations in the life history of two clones of *Macrobotus richtersi* (Eutardigrada, Macrobiotidae). *Hydrobiologia*, 558(1), 33-40.
- (11) American Publish Health Association. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition. Method 4500 B, pp.4-87~4-88, APHA, Washington, D.C., USA.
- (12) Bryan, J.L. Ivy. Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients. *Nutr. Res.*, 35 (8) (2015), pp. 643-654, 10.1016/j.nutres.2015.06.001
- (13) Bryan, Joseph Loscalzo (Eds.), Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease, Springer International Publishing, Cham (2017)
- (14) Cheng, C. J., Kuo, Y. T., Chen, J. W., Wei, G. J., & Lin, Y. J. (2021). Probabilistic risk and benefit assessment of nitrates and nitrites by integrating total diet study-based exogenous dietary exposure with endogenous nitrite formation using toxicokinetic modeling. *Environment International*, 157, 106807.
- (15) Crowe, W., Elliott, C. T., & Green, B. D. (2019). A review of the in vivo evidence investigating the role of nitrite exposure from processed meat consumption in the development of colorectal cancer. *Nutrients*, 11(11), 2673.
- (16) Hashimoto, T., Horikawa, D. D., Saito, Y., Kuwahara, H., Kozuka-Hata, H., Shin, T., ... & Kunieda, T. (2016). Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature communications*, 7(1), 1-14.
- (17) Hengherr, S., Worland, M. R., Reuner, A., Brümmer, F., & Schill, R. O. (2009). High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(6), 749-755.
- (18) Irandoust, M., Shariati-Rad, M., & Haghghi, M. (2013). Nitrite determination in water samples based on a modified Griess reaction and central composite design. *Analytical Methods*, 5(21), 5977-5982.
- (19) Ito, M. (1990). A new species of the genus *Itaquascon* (Eutardigrada: Hypsibiidae) from

- Taiwan. *Edaphologia* (Japan).
- (20) Jönsson, KI, Schill, RO, 2007. Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heatshock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 146, 456–460
- (21) Jönsson, K. I., Harms-Ringdahl, M. & Torudd, J. Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 649–656 (2005).
- (22) Kalmar, B., Greensmith, L., 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28, 310–318.
- (23) Leong Weng I (2019, September). *The diversity of Water bears of Taiwan and Macau*. [Poster presentation]. Summer Internship Poster Competition, Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
- (24) Li, X., & Li, H. (2008). Tardigrades from Taiwan, with the description of a new species of *Doryphoribius* (Tardigrada, Hypsibiidae). *Zoological science*, 25(5), 554-559.
- (25) Mathews G B. T ardig rada from Japan [J] . Peking Natur al H isto ry Bulletin, 1936- 1937, 11: 410- 412.
- (26) Milkowski, A., Garg, H.K., Coughlin, J.R., Bryan, N.S., 2010. Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: a risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.08.004>.
- (27) Ono, F. et al. Effect of high hydrostatic pressure on to life of the tiny animal tardigrade. *J. Phys. Chem. Solids* 69, 2297–2300 (2008).
- (28) Ramløv, H., & Westh, P. (2001). Cryptobiosis in the eutardigrade *Adorybiotus* (*Richtersius*) *coronifer*: tolerance to alcohols, temperature and de novo protein synthesis. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 240(3-4), 517-523.
- (29) Rizzo, A. M., Negroni, M., Altiero, T., Montorfano, G., Corsetto, P., Berselli, P., ... & Rebecchi, L. (2010). Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 156(2), 115-121.
- (30) Séméria, Y. (1994). Une espèce nouvelle de tardigrade de Taiwan: *Echiniscus pseudelegans*, n. sp.(Heterotardigrada Echiniscidae). *Publications de la Société Linnéenne de Lyon*, 63(1), 28-32.
- (31) Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1), 37-56.

2、網站資料

- (1) ATSDR Online. “ToxFAQs for Nitrate and Nitrite.” July 2017. <https://reurl.cc/7DbDGk>
- (2) 王淑卿 (2014 年 05 月 13 日) 。自由基與活性氧化物。科學 Online。2021 年 05 月取自：<https://highscope.ch.ntu.edu.tw/wordpress/?p=53230>
- (3) 許一懿 (2009 年 08 月 14 日) 。模式生物(Model Organisms)–上。科學 Online。2021 年 05 月取自：<https://reurl.cc/a9N7eQ>。

【評語】 050013

1. 此研究以大生熊蟲為模式生物，測試大生熊蟲作為化學壓力的指標生物，以大生熊蟲的動物行為改變，隱生與恢復行動的改變，作為判別標準，為連續試驗，希望發展出合適的模式生物，檢測環境化學壓力，減少實驗動物犧牲。此方法具有應用性，可作為環境狀態檢測使用。
2. 研究目標明確，也符合目前 3R 的要求。文獻檢討也清楚說明前人的發現與本研究的差異，顯示本研究的創新。實驗設計可支持其目標，結果說明邏輯清楚。
3. 大生熊蟲面臨環境壓力時會有行為改變，此研究以硝酸鹽壓力為檢測對象，主因為硝酸鹽壓力主要為蔬菜類使用氮肥的殘存，此研究在蔬菜簡易檢測部分具有可行性。
4. 在隱聲大生熊蟲恢復部分，蒸餾水平均值約為低於 30 分鐘、200mg/L 硝酸鹽氮標準液約 30 分鐘，小白菜萃取液約 90 分鐘，此部分技術層面約為 90 分鐘，此部分(1)是否超越現階段已有檢測方法？(2)應有設計大生熊蟲對硝酸鹽標準液梯度的先期實驗資料，以了解實驗中小白菜萃取液所含硝酸鹽的可能含量範圍。

5. 實驗的基礎資料紀錄良好，相關實驗紀錄簿資料約 10 本左右，紀錄清楚完整。
6. 對於要測量的逆境化學物質，宜有隱生到恢復的濃度測試前期試驗以作為標準趨線。
7. 此研究對於未來的應用性存在有環境監測的價值，不只僅有在蔬菜部分，宜規劃環境監測項次的研究。實驗材料的培養條件完善為未來建置之重要項次。