2019 年臺灣國際科學展覽會
優勝作品專輯

作品編號　**050008**

參展科別　動物學

作品名稱　驚爆「膠」點-虎紋三角渦蟲黏液分析及功能推測 **Mucus analysis and functional speculation of *Girardia tigrina***

得獎獎項　大會獎：一等獎

英特爾傑出青年女性科學家獎

出國正選代表

就讀學校　新北市私立竹林高級中學

指導教師　蔡坤憲、顏嘉怡

作者姓名　徐亦萱

關鍵詞　虎紋三角渦蟲、白線斑蚊、酵素

作者簡介



我徐亦萱，新北市竹林中學生物科展團學生。做科展過程，會遇到讓自己頭疼的事情，如實驗失敗、缺乏時間規劃等，導致課業退步許多等等。在低潮期曾有放棄念頭，但一路上有家人、老師、教授以及學長姐們支持與協助，感謝大家無私付出，才能有如今的我。未來也希望自己能保持做實驗的熱情，享受做科展的過程。

摘要

本研究進行虎紋三角渦蟲 (*Girardia tigrina*) 黏液分析及功能推測。利用 Bradford 法得知渦蟲捕食白線斑蚊幼蟲時不會分泌大量黏液；以銀染染色 SDS-PAGE，並以 ImageJ 與 Excel 分析，發現渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質單體濃度無顯著增加 ($p > 0.05$)。進一步以 API ZYM 得知渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含至少 8 種酵素，包含磷酸水解酶、脂肪酶、蛋白酶、醣水解酶，能協助於體外行化學消化；以酵素活性染檢測，則發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 α 型醣水解酶分子量位置位於 25-37 kDa。未來將持續針對渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素進行分析，如確認渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中蛋白酶、脂肪酶及幾丁質酶分子量位置；探討渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中磷酸水解酶及 α 型醣水解酶功能等等。

Abstract

In this study, the mucus analysis and functional speculation of *Girardia tigrina* were performed. By using the Bradford method, it was found that the amount of protein in the mucus mentioned above would not increase in the presence of mosquito larvae, SDS-PAGE and silver staining also showed the partial content of protein monomers in the presence of mosquito larvae would not increase ($p < 0.05$). Further, with API ZYM, at least 8 enzymes in the mucus of *G. tigrina* were discovered while preying on mosquito larvae, including phosphatase, lipase, arylamidase, galactosidase, which can be chemically digested *in vitro*. By using enzyme activity staining, it was found that the α-glycohydrolase in the mucus of *G. tigrina* in the presence of mosquito larve was 25-37 kDa. In the future, the mucus analysis of *G. tigrina* in the presence of mosquito larvae will be continued. The molecular weight of arylamidase, lipase, chitinase in the mucus of *G. tigrina* will be determined by enzyme activity staining, and the functions of phosphohydrolase and α-glucohydrolase in the mucus of *G. tigrina* will be revealed.

壹、前言

一、研究動機及背景介紹

埃及斑蚊與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， 2018 年截至今全台共計超過 150 例登革熱本土病例，其中北部地區便占大約 1/3，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。登革熱主要防治方式為化學防治、物理防治及生物防治。傳染病高峰期以化學防治為主，但以化學防治遏止登革熱不僅會危害環境，亦會使蚊子體內產生抗體，造成防治效果降低；一般時期則希望以物理防治使民眾清除孳生源；無法移除水域則使用生物防治進行抑制，如劍水蚤、孔雀魚、鬥魚等等。在前兩屆全國科展時，我們團隊發現淡水渦蟲可捕食所有齡期之白線斑蚊幼蟲，並且會利用其黏液纏住蚊幼蟲，協助捕食，其黏液對於生物防治登革熱病媒蚊具有高度潛能 (王與郭，2016) ；上一屆全國科展時，我們團隊則探討渦蟲捕食蚊幼蟲機制，發現渦蟲捕食蚊幼蟲時會於體外行物理消化 (王，2017)。今年我們將探討渦蟲捕食蚊幼蟲前後其黏液總蛋白質濃度及成分是否具差異，並深入探討其捕食蚊幼蟲時是否會於體外行化學消化，以了解渦蟲黏液在捕食蚊幼蟲時所扮演的角色。

二、研究目的

(一) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液總蛋白質濃度。

(二) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類。

(三) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液酵素種類與分子量位置。

貳、研究方法或過程

一、 研究動物、設備及器材

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

1. 來源：台灣台北市民權東路水族館。
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。頭部三角形為耳突，可偵測獵物的位置；黑色圓點為眼點，具感光的功能；其咽位於腹部，具攝食的功能 (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，每日以白蝦肉或蚊幼蟲餵食一次。
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其爬行時間，以 24 隻渦蟲爬行 60-90 分鐘進行實驗。

(二) 白線斑蚊 (*Aedes albopictus*)(以下簡稱蚊幼蟲)

1. 由國立臺灣大學環境衛生研究所蟲媒傳染病實驗室提供。
2. 生活史分為 4 個階段，卵－幼蟲 (俗稱孑孓) －蛹－成蟲。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。

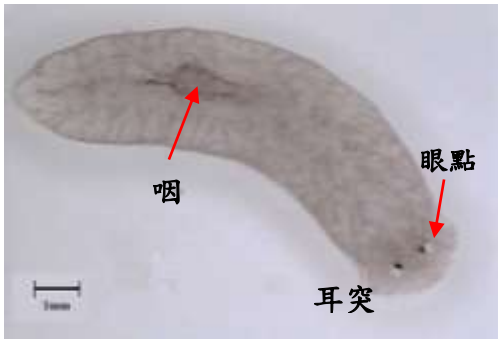


圖 1 虎紋三角渦蟲



圖 2 白線斑蚊幼蟲

(三) Bradford method 使用器材、藥品及配方

名稱	廠牌
Bovine Serum Albumin (BSA)	購自 SIGMA
Protein Assay	購自 BIO-RAD
ELISA reader	購自 BioTek

(四) 固體培養基使用器材、藥品及配方

名稱	廠牌
Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR-250)	購自 BIO-RAD
Diastase	購自 HIMEDIA
Starch Soluble	購自 CHONEYE
Agar Powder	
Congo Red	
澱粉殘留測定液	
Chitin-α 型	
蛋清粉	
纖維酵素	
Proteinase K	購自 Geneaid
培養基 13*13 公分	購自瑞光儀器

Coomassie Brilliant Blue R-250 reagent

藥品	備註
Coomassie Brilliant Blue R-250	0.25 g
Acetic acid	10 mL
Methanol	50 mL
ddH2O 40 mL	

1X Running buffer

藥品	使用量
Tris base	3 g
Glycine	14.4 g
ddH_2O	加至 1 L

(五) Native-PAGE 使用器材、藥品及配方

名稱	廠牌
1X Running 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
30 % Acrylamide/Bis Solution 29:1	購自 BIO-RAD
1.5 M Tris-HCL buffer pH 8.8	
0.5 M Tris-HCL buffer pH 6.8	
Ammonium Persulfate	
TEMED	
4X Sample Loading Buffer	
Protein Marker (10–250 kDa)	
迷你垂直式電泳槽	
電源供應器	
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
SilverQuest^{TM} Staining kit	購自 invitrogen

1X Running buffer

藥品	使用量
Tris base	3 g
Glycine	14.4 g
ddH_2O	加至 1 L

RIPA lysis buffer

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

SilverQuest^{TM} Staining Kit

藥品
Destainer A
Destainer B
Sensitizer
Developer
Developer Enhancer
Stopper

(六) API ZYM 使用器材、藥品及配方

名稱	廠牌
API ZYM	購自今日儀器
試劑 ZYM A	
試劑 ZYM B	
ddH_2O	-
恆溫箱	購自 CHANNEL

(七) 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
離心館	購自 FALCON
曝氣水	靜置一天後之自來水

二、實驗架構圖

本實驗主要針對虎紋三角渦蟲進行黏液分析及功能推測。王與郭於 2016 年進行渦蟲品種鑑定、渦蟲捕食能力評估及渦蟲對環境容忍度的測試；王於 2017 年進行渦蟲捕食蚊幼蟲行為和渦蟲黏液功能與成分的初步分析。我們延續其實驗，針對渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液進行分析 (圖 3)。

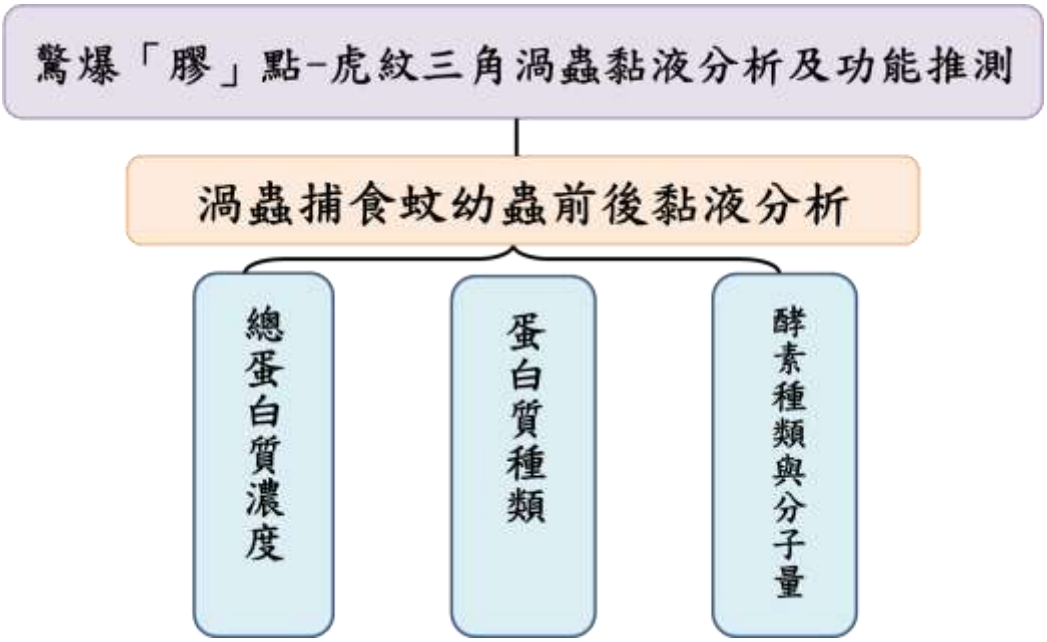


圖 3 實驗架構圖

三、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	
蚊幼蟲組 (對照組)	4 隻蚊幼蟲	
蚊幼蟲受傷組 (對照組)	4 隻凍死並剪斷其身體之蚊幼蟲	於 0.5 mL ddH_2O 玻璃罐中 60-90 分鐘後，移除實驗動物
空殼組 (對照組)*	24 隻渦蟲與 4 隻蚊幼蟲空殼	
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	

*空殼組為使渦蟲與蚊幼蟲脫殼之空殼共存於罐中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 ddH_2O 瓶中，使其爬行、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、實驗步驟

(一) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液總蛋白質濃度及蛋白質種類

為了探討渦蟲捕食蚊幼蟲時是否會分泌大量黏液，及黏液中是否含有不同種類蛋白質，本實驗利用 ELISA reader 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度；利用 SDS-PAGE，並且以銀染方法分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質種類。由於未來將嘗試以酵素活性染確認渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素種類，因此本實驗先利用 Native-PAGE，確認渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液於未變性前之蛋白質分子量。

1. 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 ddH_2O 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 OD_{595} 吸光值，畫出蛋白質標準曲線圖 (n=3)(圖 4)。

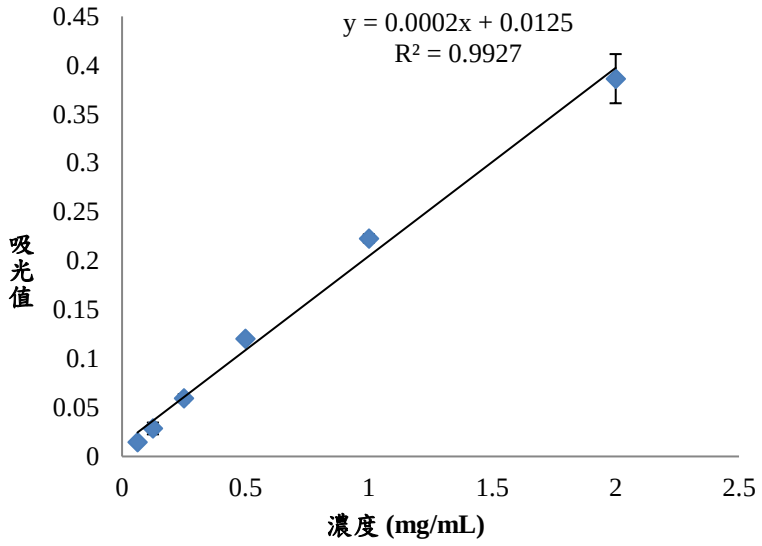


圖 4　BSA 蛋白質標準曲線圖 (n=3)

各實驗樣本組別 (表 1) 與 Protein Assay 同樣以 1：20 的比例混和，於室溫下反應 5 分鐘，利用 ELISA reader 測取樣本 OD_{595} 吸光值。將各實驗樣本組別吸光值以內插法計算總蛋白質濃度。

2. 以 SDS-PAGE 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類 (單體蛋白)

將樣本 (表 1) 與 4X Sample Loading Buffer 以 3：1 於離心管中混合，於 100℃反應 10 分鐘 (水浴加熱)，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 進行電泳 1 個小時左右。將上膠切去，下膠於低速搖晃下，以 SilverQuest^{TM} Staining kit 染色，染色完成便以 ddH_2O 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)。

(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時會於體外行物理消化，未證明是否會於體外行化學消化 (王，2017)；動物學中 (Miller, *et al*., 2001) 也僅提到渦蟲黏液含酵素能分解食物，但未詳細說明種類。為了要進一步確認渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中是否含酵素幫助消化蚊幼蟲，本實驗利用 API ZYM 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素種類與活性，並以 ELISA reader 分析 API ZYM 中酵素吸光值。

1. 樣本處理

每個樣本組別均進行九重複 (表 1)，將各樣本收集成一管，共 4.5 mL。

2. 測定總蛋白質濃度

首先以 2 mg BSA 加入 1 mL ddH_2O 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 15 分鐘，利用 ELISA reader 測取 OD_{595} 吸光值，畫出蛋白質標準曲線圖 (n=3)(圖 5)。

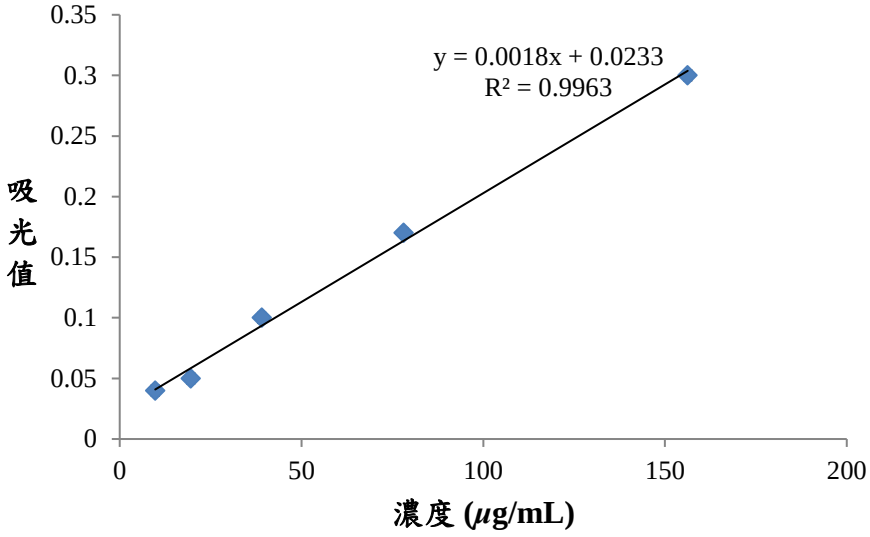


圖 5　BSA 蛋白質標準曲線圖

各實驗樣本組別 (表 1) 與 Protein Assay 同樣也以 1：20 的比例混和，於室溫下反應 5 分鐘，利用 ELISA reader 測取樣本 OD_{595} 吸光值。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 API ZYM 中，每格 65 μL，共 20 格 (n=3)。將 API ZYM 放入 30℃恆溫箱，靜置隔夜。隔天取出 API ZYM，滴入 ZYM A 和 ZYM B，待背景顏色變淡後 (即編號 1 顏色變為透明)，以 ELISA reader 檢測個編號孔中酵素濃度。表 2 為酵素檢測盤各酵素波長。

表 2 酵素檢測盤各編號孔酵素波長 (Collin, *et al*., 2013)

Enzymes	波長	Enzymes	波長	Enzymes	波長
2. Alkaline phosphatase	537	9. Tryspin	494	16. α-glucosidase	537
3. Easterase (C4)	537	10. α-chymotrypsin	494	17. β-glucosidase	537
4. Esterase Lipase (C8)	537	11. Acid phosphatase	547	18. N-acetyl-β-glucosamanidase	454
5. Lipase (C14)	537	12. Naphthol-AS-BI-phospohydrolase	582	19. α-mannosidase	537
6. Leucine arylamidase	494	13. α-galactosidase	547	20. α-fucosidase	537
7. Valine arylamidase	494	14. β-galactosidase	547		
8. Cystine arylamidase	494	15. β-glucuronidase	582		

編號 1 為負對照組

4. 測取酵素檢測盤中各編號孔之濃度

表 2 為酵素檢測盤中各編號孔酵素之波長，利用 ELISA reader 檢測各酵素吸光值後，以 One-way ANOVA 分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素吸光值是否具差異。

(三) 以固體培養基與酵素活性染確認渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素種類與分子量

我們在實驗 (二) 中發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含 8 種酵素，包含磷酸水解酶、脂肪酶、蛋白酶、醣類水酶。為了確認其分子量位置，我們利用固體培養基與酵素活性染找出渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素分子量。

1. 以固體培養基確認渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素種類

將樣本 (表 1) 及對照組滴入分別含有 Starch Soluble、Chitin-α 型及蛋清粉的固體培養基中，於 30℃恆溫箱反應三天之後，分別滴入澱粉殘留測定液、Congo Red 及 CBR-250，觀察固體培養基中酵素分解的情形。

2. 以酵素活性染檢測渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素分子量

將樣本 (表 1) 與 4X Sample Loading Buffer 以 3：1 於離心管中混合，分別注入膠體的凹洞內，以 120 V 進行 Native-PAGE 電泳 1 個小時左右。將上膠切去，下膠放入分別含有 Starch Soluble、Chitin-α 型及蛋清粉的固體培養基中，於 30℃恆溫箱反應一天之後，分別滴入澱粉殘留測定液、Congo Red 及 CBR-250，觀察固體培養基中酵素分解的情形，並確認其分子量位置。

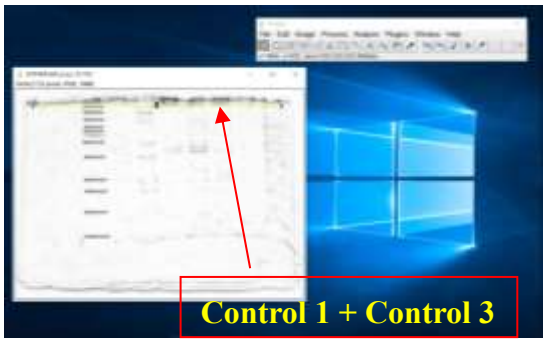
(四) 以 ImageJ 與 Excel 分析電泳圖色帶面積

複製已知 BSA 色帶於其他分子量位置，去背景(圖 6a)，圈取電泳圖上蛋白質色帶 (圖 6b)，計算樣本組別色帶面積 (圖 6c)，根據已知 BSA 濃度及色帶面積，以 Excel 進一步推算渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質單體濃度 (圖 6d)。

(a)



(b)



(c)



(d)

樣本組別	Area	平均	標準差	濃度	平均	標準差
渦蟲1	6347.004			4.75010234		
渦蟲2	6158.832	6252.918	94.086	4.60927428	4.67969	0.07041
BSA 0.003125%	41421.66			31		
Marker	18038.054					
共存1	3522.731			2.6364144		
共存2	3123.388			2.33754582		
共存3	12619.882	6422.000333	4385.59548	9.44472872	4.80623	3.28218
捕食1	11657.468			8.7244574		
捕食2	12947.267			9.68974389		
捕食3	23213.539	15939.42467	5170.45774	17.3730292	11.9291	3.86957

圖 6 以 ImageJ 與 Excel 分析電泳圖之操作步驟 (操作步驟為 a-d)

(五) 定義

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

標準差採用公式: STDEV.P

(六) 統計分析

以 T 檢驗 (t-test) 與單因子變數 (One-Way ANOVA) 進行分析，$p > 0.05$ 訂為無顯著差異，$p < 0.05$ 訂為顯著差異。

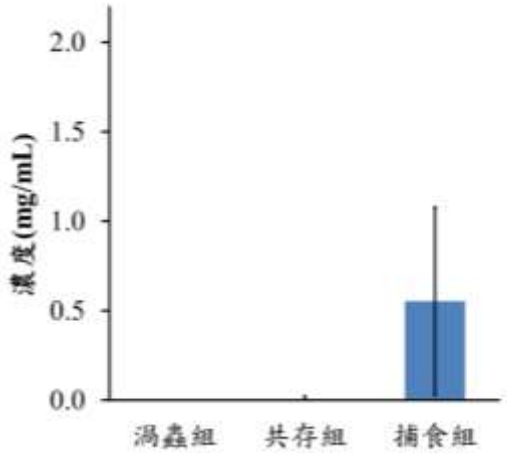
參、研究結果與討論

一、研究結果與討論

(一) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液總蛋白質濃度

圖 7 為以 ELISA reader 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度結果 (n=3)。根據圖 7a 可以發現渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度並無顯著差異；進一步以 RIPA lysis buffer 回溶樣本組別，也發現渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度無顯著差異。

(a) 樣本組別之水溶液



(b) 以 RIPA lysis buffer 回溶樣本組別

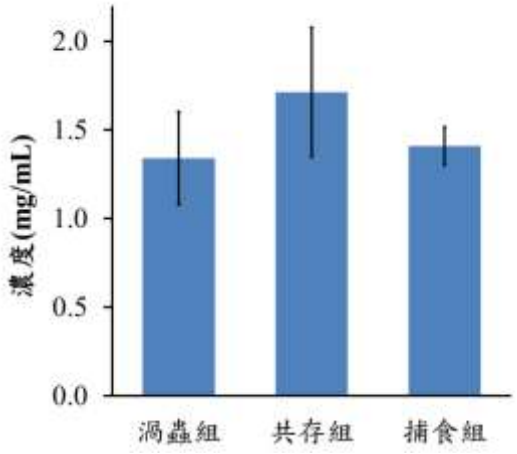


圖 7 利用 ELISA reader 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液總蛋白質濃度 (n=3)
渦蟲組為僅有渦蟲之對照組；共存組為使飽食渦蟲與蚊幼蟲共存之實驗組(未被取食)；捕食組為渦蟲捕食蚊幼蟲完畢之實驗組。

【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 7) 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；亦推測 RIPA lysis bufffer 中含干擾測取吸光值之成分。未來會利用 DC Protein Assay，降低干擾，並且再次進行渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度的測試。

2. 將圖 7 中圖 a 與圖 b 進行比較

根據圖 7a，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 7b，卻可以發現共存組總蛋白質濃度高於渦蟲組與捕食組。初步推測是因 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較高；也推測因 RIPA lysis buffer 中含干擾測取吸光值測取之物質。但根據兩圖實驗結果，均可發現渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中總蛋白質濃度無顯著差異，初步推測渦蟲捕時蚊幼蟲時不會分泌大量黏液。

3. 以 RIPA lysis buffer 無法畫出蛋白質標準曲線

圖 8 為將水、RIPA lysis buffer 分別加入 Coomassie Brilliant Blue R-250 後的顏色變化。我們可以發現以水為溶劑之圖 8a 為 Coomassie Brilliant Blue R-250 之顏色，以 RIPA lysis buffer 為溶劑之圖 8b 則為藍色。進一步使 BSA 溶入 RIPA lysis buffer 所得到樣本顏色也均為藍色。初步推測 RIPA lysis buffer 中含干擾吸光值測定之成分，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 8 將 Coomassie Brilliant Blue R-250 加入水、RIPA lysis buffer 呈色結果

(二) 以 SDS-PAGE 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液蛋白質種類 (單體蛋白)

為了進一步確認渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液之蛋白質單體濃度，同時將 BSA 進行電泳 (圖 9)。以 ImageJ 分析各色帶面積後，根據已知 BSA 濃度推算其他樣本濃度，可以發現渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質單體濃度無顯著差異 (圖 10)。

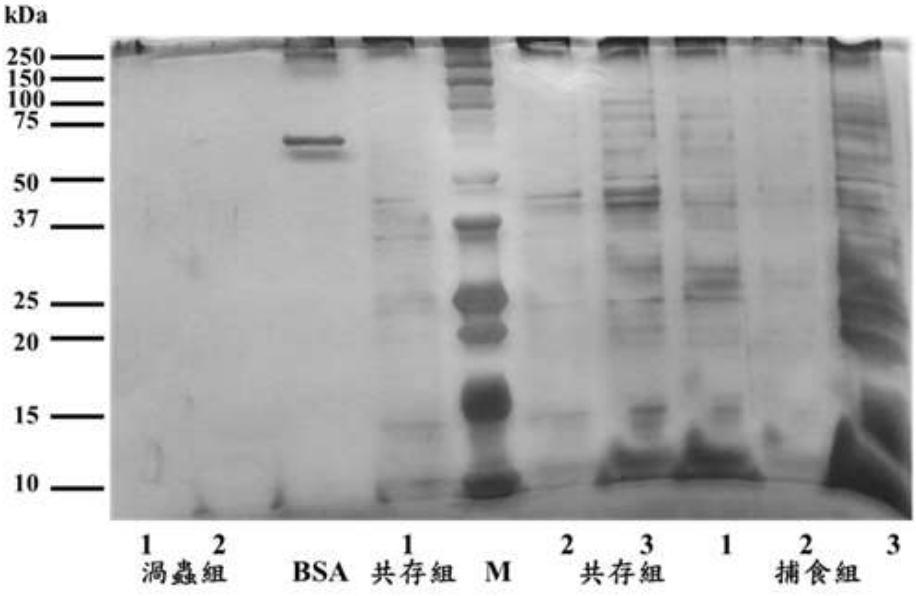


圖 9 以 SDS-PAGE 分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質電泳圖

膠片濃度為 15 %。M 為分子量 10-250 kDa 之標準品。BSA 濃度為 31 μg/mL。渦蟲組為僅有渦蟲之對照組；共存組為使飽食之渦蟲與蚊幼蟲共存之實驗組 (未被取食)；捕食組為渦蟲捕食蚊幼蟲完畢之實驗組。數字代表重複次數。注入膠體量：20 μL。

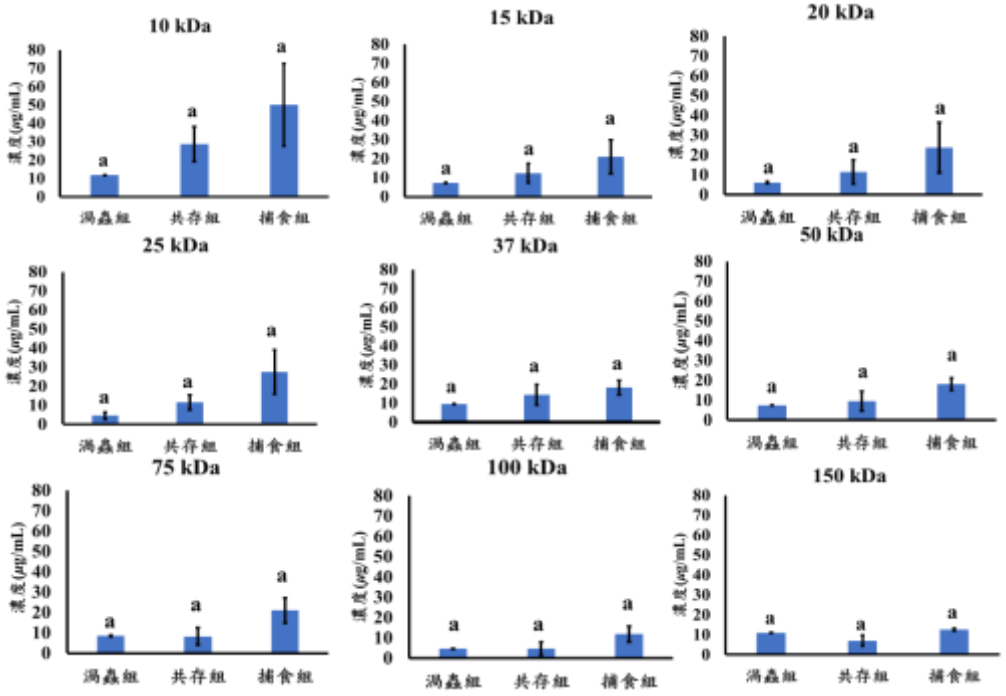


圖 10 以 ImageJ 與 Excel 分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質電泳圖

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 ($p < 0.05$)。

(三) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液酵素種類與活性

圖 11 為將所有樣本組別滴入 API ZYM 後的呈色結果進行比較，以 ELISA reader 檢測各編號孔酵素之活性 (圖 12)，可以發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含 8 種酵素。

(a) 使 API ZYM 反應隔夜　　**(b) 使 API ZYM 反應 4 小時**

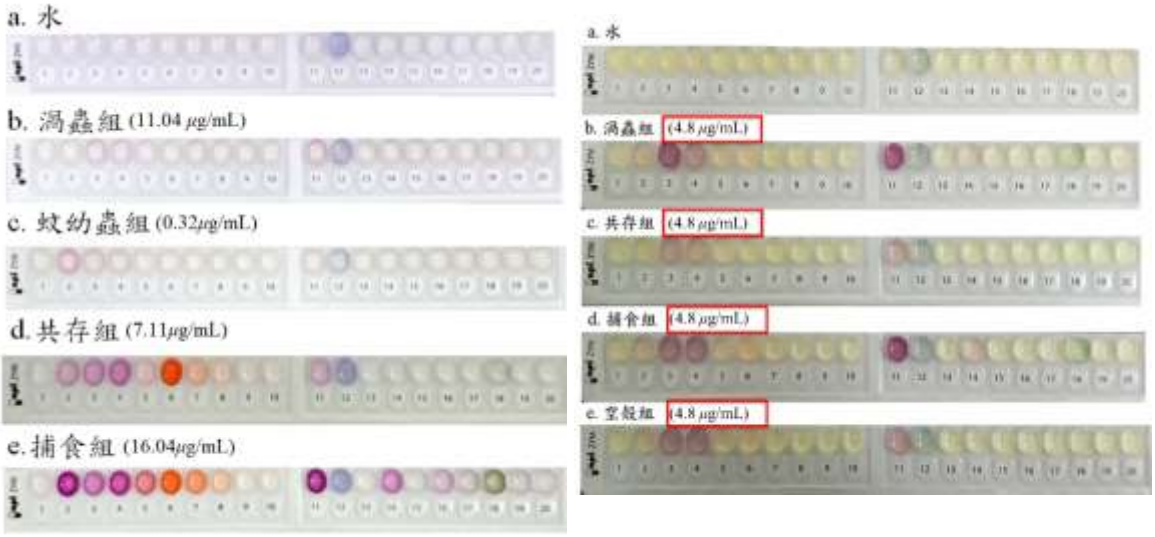


圖 11 滴入樣本組別後 API ZYM 呈色結果

編號 1 為不具有任何受質之對照組。

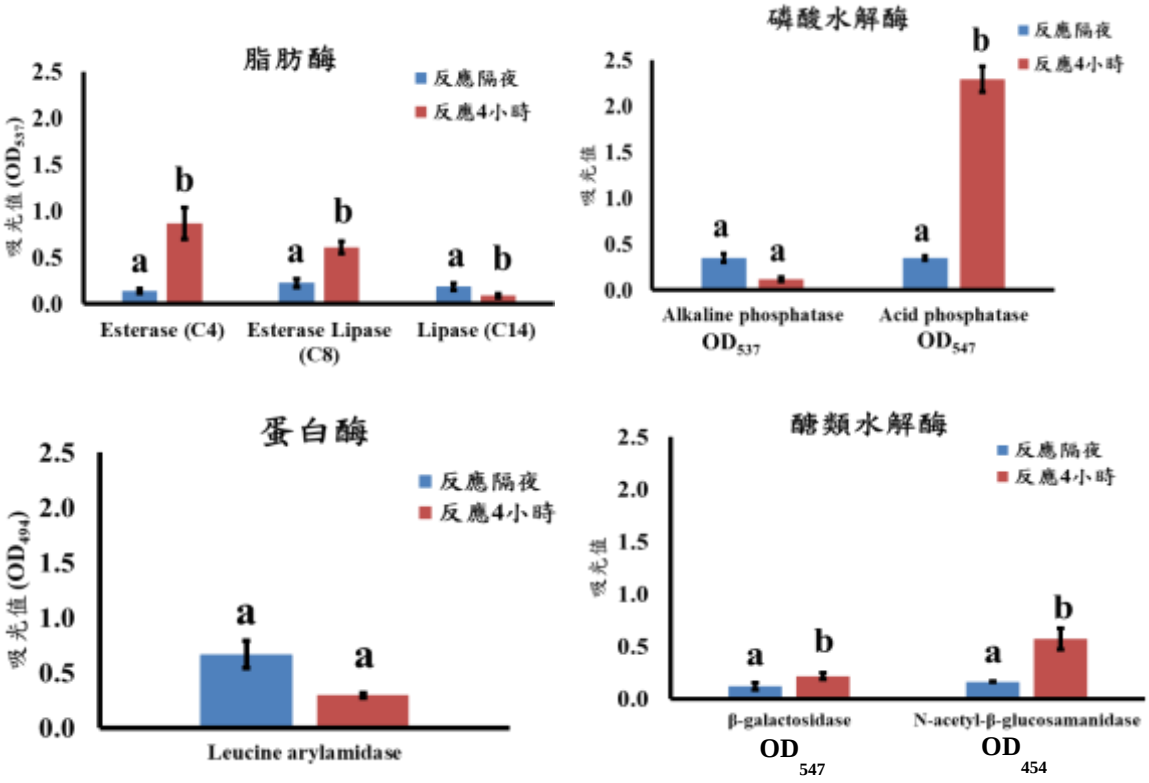


圖 12 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素吸光值

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 ($p < 0.05$)。

【實驗討論】

1. 渦蟲與蚊幼蟲空殼共存時不會進行捕食蚊幼蟲的動作。

根據以 ELISA reader 檢測空殼組中酵素吸光值結果 (圖 13)，可以發現空殼組與渦蟲組的酵素濃度無顯著差異。因此我們推測渦蟲與蚊幼蟲空殼共存時並不會進行捕食的動作。

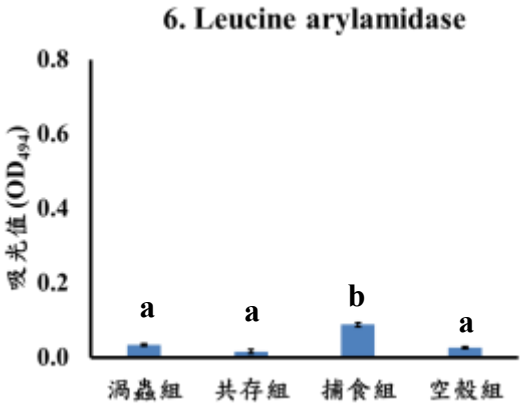


圖 13 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中酵素吸光值

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 ($p < 0.05$)。

2. 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 phosphatase 會進行去磷酸化作用 (圖 14)。

根據圖結果，可以發現渦蟲捕食蚊幼蟲時其黏液中 Acid phosphatase 有顯著增加的情形。初步推測當蚊幼蟲被渦蟲黏液中酵素消化時，其體內含物質能磷酸化渦蟲黏液中酵素，使酵素失去原本結構，無法繼續消化蚊幼蟲體表。渦蟲為了能夠持續利用其黏液消化蚊幼蟲體表，便會分泌大量磷酸水解酶，使磷酸化之酵素去磷酸化，能夠繼續消化蚊幼蟲體表。

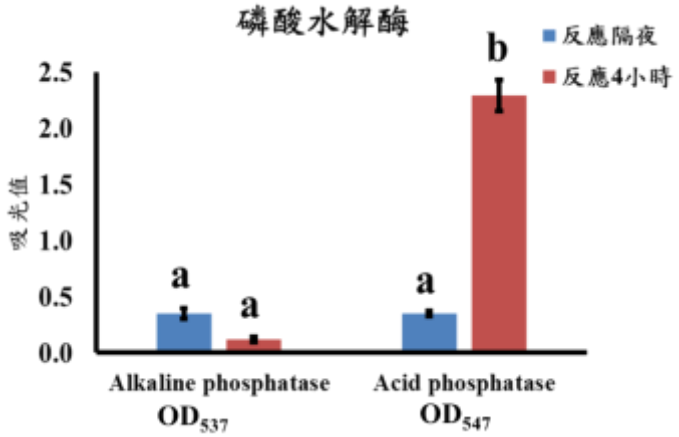


圖 14 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中磷酸水解酶吸光值

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 ($p < 0.05$)。

二、以固體培養基檢測渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素種類

圖 15 為將各樣本組別滴入固體培養基，放入 30℃ 恆溫箱六天後，並且以澱粉殘留測定液染色後的結果。根據圖中結果可以發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含 α 型醣水解酶能分解固體培養基中的 Starch Soluble。

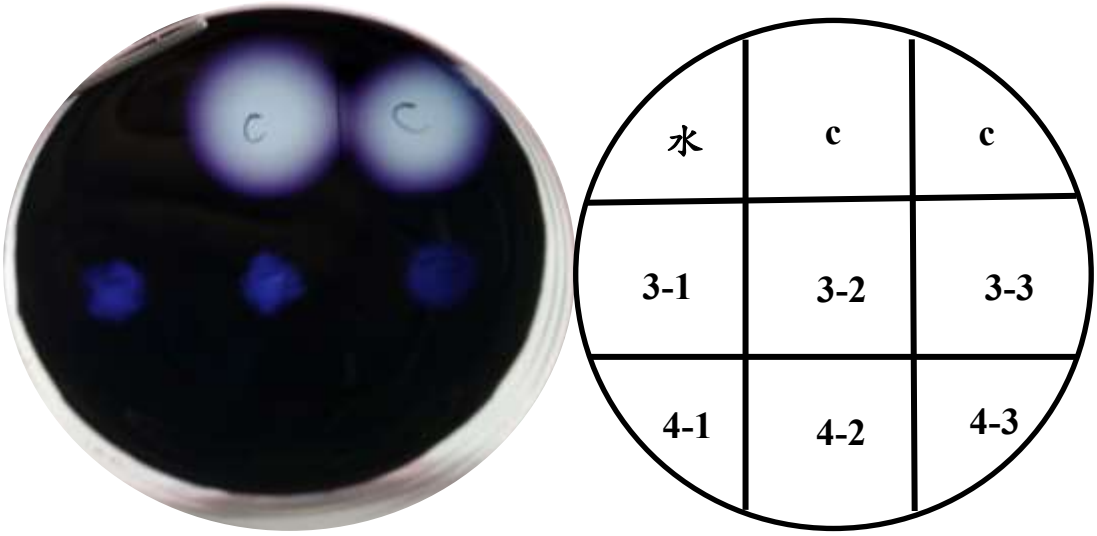


圖 15 以固體培養基檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中是否含澱粉酶

圖為將樣本組別滴於固體培養基後，於 30 ℃恆溫培養六天後，並且以澱粉殘留測定液染色的結果。C 為 Diastase；3 為捕食組；4 為共存組，數字代表重複次數，每個樣本組別均滴入 30 μL。

三、以酵素活性染確認渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素分子量。

由於我們在實驗二中發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含有澱粉酶，因此我們以酵素活性染確認渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中澱粉酶分子量。根據圖 16-a 結果，可發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 α 型醣類水解酶分子量位於 20-37 kDa；根據圖 16-b 結果，則可以發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中蛋白質分子量位於 25-37 kDa。

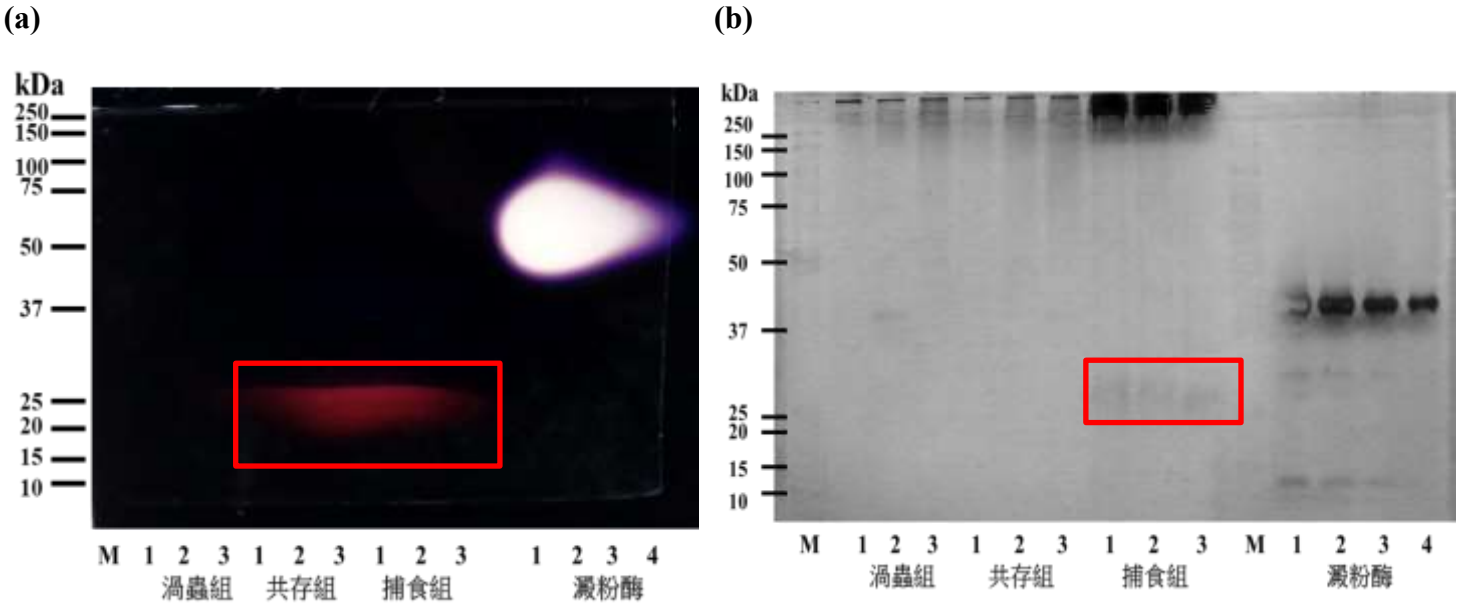


圖 16 以 Native-PAGE 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 α 型醣類水解酶及蛋白質分子量

膠片濃度均為 15 %。M 為分子量 10-250 kDa 之標準品。渦蟲組為僅有渦蟲之對照組；共存組為使飽食之渦蟲與蚊幼蟲共存之實驗組 (未被取食)；捕食組為渦蟲捕食蚊幼蟲完畢之實驗組。數字代表重複次數，注入膠體量: 10 μL。澱粉酶初始濃度為 0.5 mg/mL，數字代表對半稀釋次數，數字越大，濃度越低，注入膠體量: 5 μL。標準品注入膠體量: 5 μL。圖 a、b 均滴入相同樣本組別，圖 a 為酵素活性染色結果；圖 b 為銀染結果。澱粉酶蛋白質分子量為 41、45 kDa。

【實驗討論】

1. 渦蟲捕食蚊幼蟲時其黏液中位於 25-37 kDa 之蛋白質種類能協助消化蚊幼蟲。

根據圖 16b 結果可以發現捕食組黏液位於 25-37 kDa 出現明顯的色帶；進一步利用 ImageJ 與 Excel 分析 (圖 17) (表 3)，得知渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 25-37 kDa 之蛋白質濃度顯著高於渦蟲組及共存組。而先前實驗我們也嘗試過以 Native-PAGE 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中蛋白質分子量 (圖 18a)，根據圖 18 結果可發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 25-37kDa 出現明顯色帶 (黃色框出處)。因此初步推測渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中位於 25-37 kDa 之蛋白質種類能協助消化蚊幼蟲。

表 3 各樣本組別於 25-37 kDa 之蛋白質濃度

分子量/樣本組別	澱粉酶 (37-50 kDa)	渦蟲組	共存組	捕食組
25-37 kDa	62.5 μg/mL	19.3 μg/mL	11 μg/mL	49.2 μg/mL

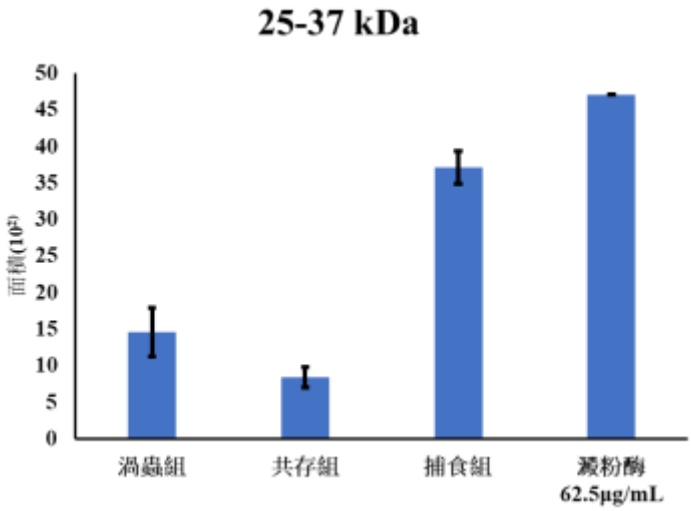


圖 17 以 ImageJ 與 Excel 分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質電泳圖 (n=3)

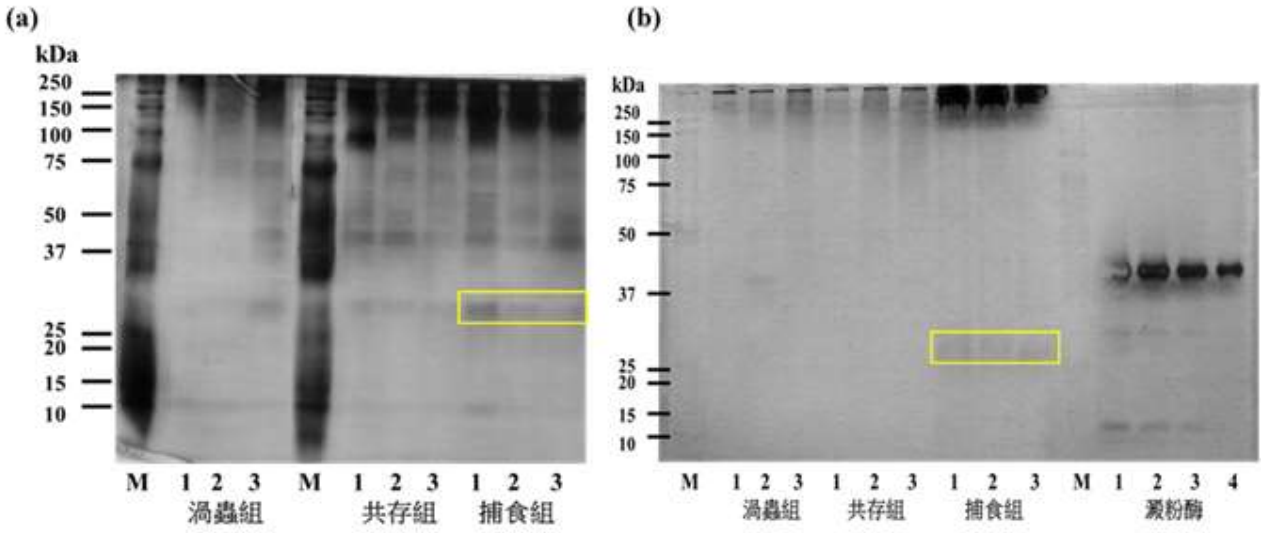


圖 18 以 Native-PAGE 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中澱粉酶及蛋白質分子量

膠片濃度均為 15 %。M 為分子量 10-250 kDa 之標準品。渦蟲組為僅有渦蟲之對照組；共存組為使飽食之渦蟲與蚊幼蟲共存之實驗組 (未被取食)；捕食組為渦蟲捕食蚊幼蟲完畢之實驗組。數字代表重複次數，注入膠體量: 10 μL。澱粉酶初始濃度為 0.5 mg/mL，數字代表對半稀釋次數，數字越大，濃度越低，注入膠體量: 5 μL。標準品注入膠體量: 5 μL。圖 a 為先前實驗的銀染結果；圖 b 為本次實驗結果。

2. 渦蟲捕食蚊幼蟲時其黏液中 α 型醣類水解酶分子量位於 25-37 kDa。

根據圖 16a 結果得知渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 20-37 kDa 含澱粉酶；根據圖 17 結果則發現渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 25-37 kDa 蛋白質濃度顯著增加。初步推測渦蟲捕食蚊幼蟲時其黏液中所增加的蛋白質種類 (25-37 kDa) 為澱粉酶，即渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中澱粉酶分子量為 25-37 kDa。

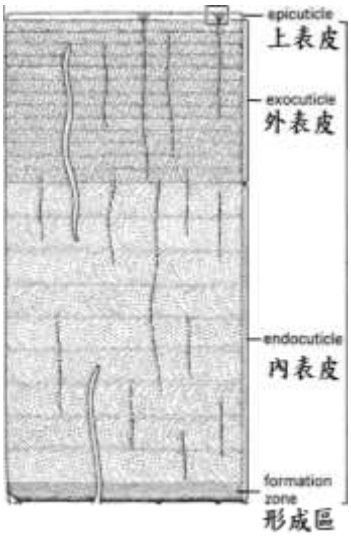
二、研究討論

(一) 渦蟲捕食前後黏液中酵素種類與活性

1. 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中酵素功能推測 (圖 19)

圖 19a 為蚊幼蟲體表構造，由外而內分為上表皮、外表皮及內表皮。根據 (Guallan & Cranston, 2015)文獻，整理出蚊幼蟲體表各層之結構，並且根據本實驗渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中所含酵素推測其作用部位 (圖 19b)。

(a) 蚊幼蟲體表構造 (Jawale, 2010)



(b) 淡水渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液酵素功能推測 (Guallan & Cranston, 2015)

表皮(由外而內)		成分	推測作用酵素
上表皮	護蠟層 cememt layer	類脂、蠟質、鞣化蛋白	Alkaline phosphatase Acid phosphatase
	蠟層 wax layer	長鏈烴、酯類	Esterase (C4)
	多元酚層 polyphenol layer	脂蛋白、多元酚化合物	Esterase Lipase (C8) Lipase (C14)
	表皮質層 cuticulin layer	酯類、鞣化蛋白、多元酚化合物	Leucine arylamidase
外表皮 exocuticle		鞣化蛋白	Leucine arylamidase
內表皮 endocuticle		幾丁質-蛋白質複合體、節肢蛋白	Leucine arylamidase β-galactosidase N-acetyl-β-glucosamanidase

圖 19 淡水渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液酵素種類及功能推測

2. 渦蟲體外消化蚊幼蟲過程推測

王與郭於 2016 年研究中提到，渦蟲捕食蚊幼蟲時會利用咽纏住無幼蟲，使其無法動彈，再利用其咽破壞為幼蟲外殼 (王與郭，2016)。根據圖 19b，蚊幼蟲體表最外層構造為上表皮護蠟層，成分為類脂、蠟質及鞣化蛋白。根據本實驗結果，渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含脂肪酶與蛋白酶，因此初步推測渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液會於體外化學消化蚊幼蟲上表皮護蠟層成分 (圖 20)。蚊幼蟲是表皮蠟層成分含長鏈烃 (圖 19b)，長鏈烃結構屬於較難分解結構，推測渦蟲會利用其咽物理消化蚊幼蟲上表皮長鏈烃成分 (圖 20)。蚊幼蟲外表皮與內表皮成分為蛋白質與幾丁質 (圖 19b)，推測渦蟲會利用其黏液中蛋白酶與醣類水解酶化學消化蚊幼蟲體表外表皮與內表皮成分 (圖 20)。於體外消化蚊幼蟲體表完畢後，推測渦蟲會利用其咽吸食蚊幼蟲體內養分，最後在進入體內行化學消化 (圖 20)。



圖 20 渦蟲體外消化蚊幼蟲過程推測

3. 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含 α 型醣類水解酶

根據酵素活性染結果，渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含 α 型醣類水解酶；而根據 API ZYM 實驗結果 (圖 21)，渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中亦含微量 α 型醣類水解酶。但根據圖 19，蚊幼蟲體表構造醣之成分為 β 型醣類，因此未來我們會持續探討渦蟲捕食蚊幼蟲時其黏液中 α 型醣類水解酶所分解之蚊幼蟲體表部位。

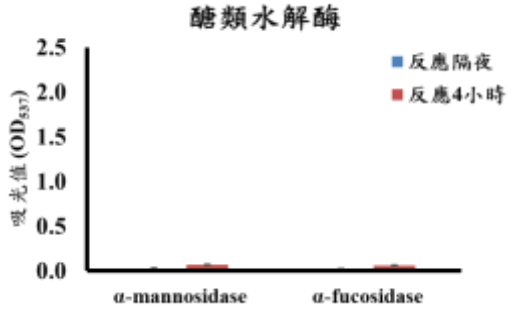


圖 21 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中醣類水解酶吸光值

肆、結論與未來展望

一、結論

(一) 渦蟲捕食蚊幼蟲時不會分泌大量黏液。

(二) 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質單體濃度無顯著差異。

(三) 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中含至少 8 種酵素能協助消化蚊幼蟲，並於體外行化學消化。

(四) 渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中 α 型醣類水解酶分子量位於 25-37 kDa。

二、未來展望

(一) 找出渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中蛋白酶、脂肪酶及幾丁質酶分子量。

(二) 探討渦蟲捕食蚊幼蟲時黏液中磷酸水解酶去磷酸化酵素種類與 α 型醣類水解酶捕食蚊幼蟲時所扮演的角色。

(三) 以渦蟲黏液進行蚊幼蟲體外化學消化試驗

伍、主要參考資料文獻

一、書籍

(一) 廖欽峰 (2010)。實驗動物管理與使用指南第三版，行政院農業委員會，76-79。

(二) Gullan, P. J. & Cranston, P. S. (2015)。昆蟲學概論，合記圖書出版社，24-27。

(三) Gorb, S. (2001). Attachment devices of insect cuticle, Kluwer Academic Publishers, 9-19.

(四) Miller, S. A. & Harley, J. P. (2001)。動物學 (上冊)，藝軒圖書出版社，284-288。

二、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) Collin, R. & J.Starr, M. (2013). Comparative ontogenetic changes in enzyme activity during embryonic development of calyptraeid Gastropods. Biol. Bull. 225: 8-17.

(七) Li, D.,& Graham, L.D. (2007) Epidermal secretions of terrestrial flatworms and slugs：Lehmannia valentiana mucus contains matrilin-like proteins. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 143(3): 231-244.

(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 triangµlata* (Dendy). Comp. Biochem. Physiology. B Biochem. Mol. Biol. 119(2): 293-298.

三、網站

(一) 新北、臺中新增 6 例本土登革熱病例，提醒民眾落實孳生源清除及防蚊措施。2018 年，10 月，取自 https://www.cdc.gov.tw/professional/info.aspx?treeid=cf7f90dcbcd5718d&nowtreeid=F94E6AF8DAA9FC01&tid=C72A9D04B1B05371

【評語】050008

此作品探討了三角渦蟲黏液對蚊子幼蟲的體外消化現象。作者探討渦蟲黏液的成分以及所含消化酵素的種類，用了各種方法來探討。得知一些重要的酵素成分，相當具新穎性。

在定量分析上較弱，是否會因為採樣的方式為大量樣本混雜在一起而導致無法區分出濃度差異？建議可多考慮所發現的消化酵素的應用。