

第二十一屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA21-285

作品名稱：白棘三列海膽管足的吸附脫離

機制探討

姓名：林妮臻

關鍵字：海膽、管足、吸附-脫離

摘要

管足為棘皮動物的特有構造。本實驗利用自製的實驗裝置，測得白棘三列海膽的管足在水中具有強大的吸附力，且該吸附力主要源自於黏性物質。在觀察管足吸附與脫離的過程中，我們發現管足在吸附時會朝向介質面做出擠壓動作，藉吸盤內部片狀的小骨關節產生形變，以釋放更多的黏性物質。透過管足腳印的染色結果證實黏性物質的存在及分布，並以蛋白質電泳分析測得黏性物質內含有多種蛋白質。本研究歸納出白棘三列海膽吸附脫離的完整過程：黏性物質預先分布於吸盤表面及儲存於吸盤內部，當接觸介質面時，透過擠壓動作釋放大量黏性物質，並藉由去除黏性物質使管足快速脫離介質面。這種黏性物質可在水中作用，並且能夠被迅速移除，在仿生學上極具應用潛力。

壹、前言

一、研究動機

飼養白棘三列海膽時，我們試圖移動海膽，過程中發現它們不易抓取，這不僅是因為海膽表面尖銳的棘刺，更導因於其藉管足牢牢地將自己固定於魚缸側壁的强大吸附力，若強行移動海膽將使其吸附在缸壁的管足柄斷裂。查閱文獻後發現，卵石海膽 (*Echinocyamus crispus Mazzetti*) 管足末端的吸盤是藉由真空吸附產生吸附力 (Stephen R. Palumbi et al., 2017)；而鑽岩海膽 (*Paracentrotus lividus*) 管足末端的吸盤卻是透過分泌黏性物質使其產生吸附力 (Robert Pjeta et al, 2020)，這個線索讓我們很好奇，白棘三列海膽的管足吸附力是屬於何種機制？而且海膽生活於水中，這種能於水中輕易吸附脫離的能力更引發我們高度的興趣。配合選修生物IV「生物與環境」主題中的次主題「生物多樣性」的內容，於是我們以白棘三列海膽為題材，藉由形態學和生物力學等相關實驗，探討管足的微結構、管足形變及管足吸附脫離的可能機制，並嘗試對不同狀態下，黏性物質內的蛋白質含量與蛋白質分子量進行分析，以期提供未來在仿生學上應用的新思維。

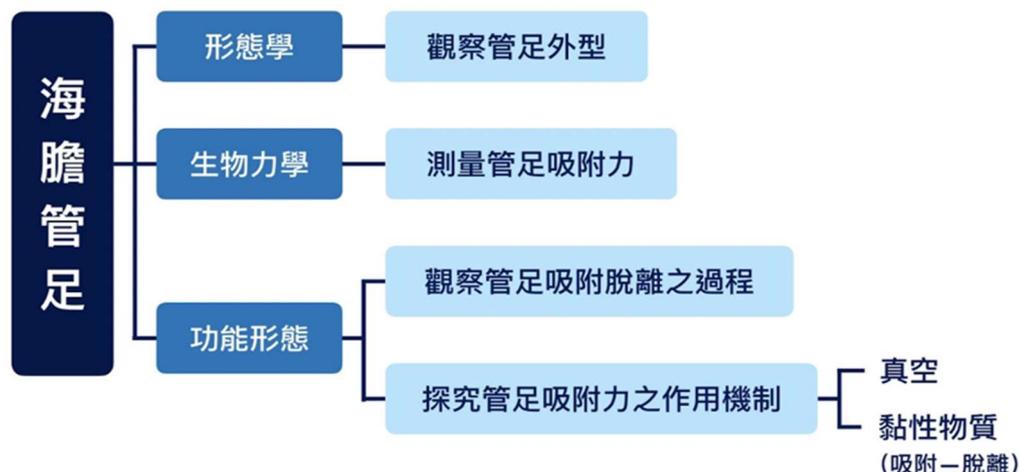
二、研究目的

- (一) 觀察白棘三列海膽的管足型態
- (二) 測量白棘三列海膽單一管足的最大吸附力
- (三) 推測白棘三列海膽之管足產生吸附力的可能方式
- (四) 探討管足吸附-脫離的運作模式
- (五) 管足黏性物質的蛋白質電泳分析

三、文獻回顧

管足為棘皮動物特有的構造，能夠協同水血管系統產生吸附力 (Eldra Peral Solomon et al, 2002)。卵石海膽 (*Echinocyamus crispus Mazzetti*) 是利用真空產生吸附力 (Stephen R. Palumbi et al, 2017)；鑽岩海膽 (*Paracentrotus lividus*) 則是利用分泌黏性物質產生吸附力 (Robert Pjeta et al, 2020)。海膽所產生之黏性物質的成分多為無機物、蛋白質及酸性醣類 (Mariana Simão et al, 2020)。

四、研究架構圖



貳、研究設備及器材

一、實驗動物

台灣常見的海膽有紫海膽 (*Anthocidaris crassispina*)、口鰓海膽 (*Stomopneustes variolaris*)、白棘三列海膽 (*Tripneustes gratilla*)。在研究前期，我們飼養了此三種海膽，發現紫海膽具有紫黑色且細長的棘刺；口鰓海膽則具有墨黑色、較為粗長的棘刺，他們的管足相較於其棘刺較短且顏色相近，使其管足較不易分辨，因此我們選擇了相對較好觀察的白棘三列海膽，它具有較短的棘刺，以及細長、較易辨認的管足。

(一)來源

白棘三列海膽 *Tripneustes gratilla* (俗名：馬糞海膽) 主要分布於朝鮮半島、日本、中國沿海的潮間帶至水深低於 20 米的淺海海域。本研究實驗動物取自於新北市萬里區的第二類漁港(龜吼漁港)。

(二)外型

白棘三列海膽呈半球形，成體直徑約六至八公分，屬中小型海膽，其外殼堅硬，表面密布棘刺與管足。



《海膽反口面》



《海膽口面》



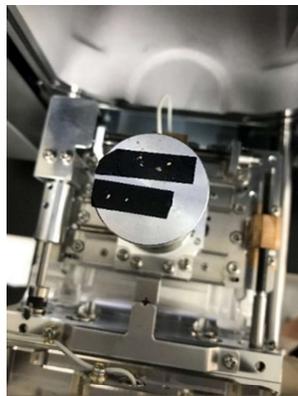
《海膽局部區域放大》

二、海膽飼育缸與冷水機



《海膽飼育缸》

三、製備 SEM 標本



《電子顯微鏡標本台》

四、解剖顯微鏡(SZ6745)、複式顯微鏡(MOTIC RED-130)、電子顯微鏡(TM3030)。



《複式顯微鏡》



《解剖顯微鏡》



《可攜式電子顯微鏡》

五、自製道具相關器材：棉線、鐵絲、口罩、砝碼、定滑輪、防水蠟、膠帶、三秒膠、離型紙、投影片、載玻片、燒杯。

六、使用染劑：結晶紫染劑、碘液染劑。

七、蛋白質定量實驗：BCA 試劑、蛋白質標準品、微量吸取器、微量離心管、96 孔微量盤、ELISA 光度計。

- 八、蛋白質電泳：迷你垂直式電泳槽、電泳膠體、電泳緩衝液、Dye、 β -Me。
- 九、其他儀器與軟體：恆溫震盪培養箱、離心濃縮機、離心機、SoftMax Pro Software、silverFast Ai。
- 十、其他器材：海水素、電子秤、濾水器、冷卻機、塑膠盆等。

參、研究過程或方法

一、管足外型之觀察

(一)直接測量：以游標尺進行量測。

(二)解剖顯微鏡

1.側面觀

- (1)將海膽置於解剖顯微鏡下。
- (2)調整焦距以觀察管足的側面型態。

2.吸盤正面觀

- (1)將海膽倒置於解剖顯微鏡下。
- (2)使口部附近的管足吸附於載玻片上。
- (3)調整焦距以觀察管足的底部型態。

(三)複式顯微鏡

1.吸盤正面觀

- (1)剪下管足並置於複式顯微鏡下觀察。

(四)電子顯微鏡

1.製作標本 A(冷凍)

- (1)分別剪下自然狀態下的管足及吸附於蓋玻片上的管足。
- (2)將兩種不同狀態的管足置於培養皿中並冷凍隔夜。

2.製作標本 B(乙醇)

- (1)配置 95%的乙醇。
- (2)分別剪下自然狀態下的管足及吸附於蓋玻片上的管足。
- (3)將兩種不同狀態的管足置於乙醇培養皿中固定隔夜。

3.製作標本 C(丙酮)

- (1)配置 100%的丙酮。
- (2)分別剪下自然狀態下的管足及吸附於蓋玻片上的管足。
- (3)將兩種不同狀態的管足置於丙酮培養皿中固定隔夜。

4.將標本 A、B、C 取出並待其自然風乾。

5.將標本 A、B、C 分別固定於標本台上(側面觀、底面吸盤)。

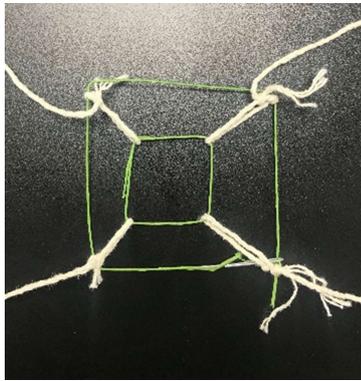
6.將標本台置於電子顯微鏡內。

7.調整不同倍率及位置並記錄觀察結果。

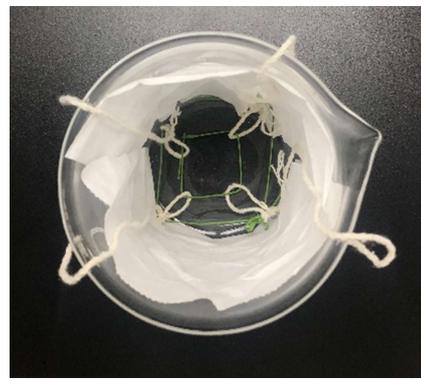
二、海膽管足吸附力之測量

(一)單一管足的最大吸附力(底面—方便觀察)

- 1.將細鐵絲折成底座並綁上棉線(網架)。
- 2.將口罩剪開取其融噴不織布層(口罩布)。
- 3.將口罩布鋪於燒杯內側杯緣(口罩布僅用於防止海膽側面管足吸附杯壁，故仍可自由移動)。
- 4.將海膽置於網架上並放入充滿水的燒杯底部。
- 5.架設定滑輪組並將棉線繞於定滑輪上
- 6.把燒杯置於三腳架上並將拍攝器材置其下，由下而上拍攝。
- 7.將砝碼置於定滑輪的另一端，每五秒增加 100 克，直到管足全數脫離燒杯。
- 8.計算不同重量下完整堅持五秒後的管足數量。
- 9.計算不同重量下單一管足的平均拉力大小。



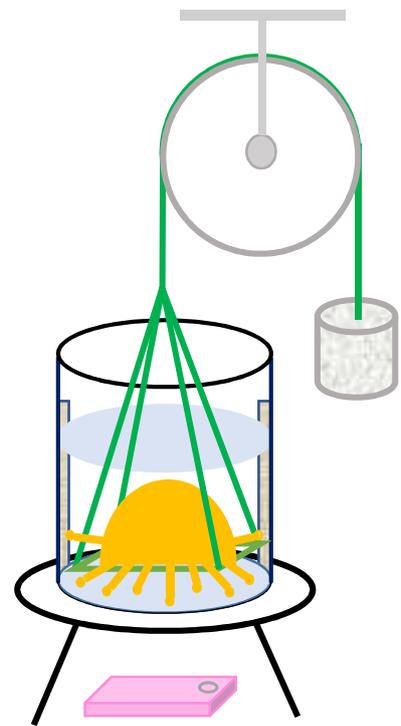
《自製器材：網架》



《自製器材：網架與燒杯》



《拉力測量的實驗裝置》



《實驗裝置的示意圖》

三、觀察管足吸附的過程

(一)由側面觀察管足吸附的過程

- 1.將海膽置於解剖顯微鏡下。
- 2.調整焦距以觀察管足吸附時側面型態的變化並錄影紀錄。

(二)由側面觀察管足吸盤是否產生形變

- 1.尋找小於管足直徑 1mm 的圓柱狀物體。
- 2.將海膽置於解剖顯微鏡下，誘導管足吸附於此圓柱狀物體。
- 3.調整焦距以觀察管足吸附時其末端的吸盤是否能隨著介質面產生形變而彎曲。

四、觀察管足脫離的過程

(一)由側面觀察管足脫離的過程

- 1.將海膽置於解剖顯微鏡下。
- 2.調整焦距以觀察管足脫離時側面型態的變化並錄影紀錄。

五、推測管足吸附力可能的產生機制

(一)吸附力源於真空

1.自製適合的多孔材質

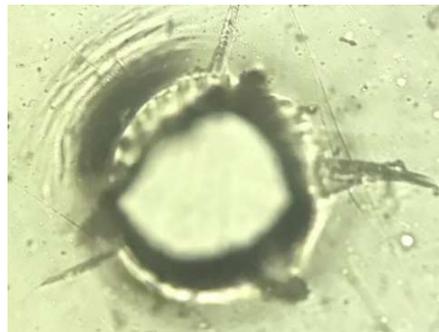
使用透明投影片，並用大頭針在其上均勻穿孔。孔面積大小為 0.6mm^2 ，密度約為 $96.75\text{孔}/\text{cm}^2$ ，遠小於海膽管足之直徑，故可防止管足穿透投影片接觸燒杯，也可避免管足透過真空吸附於投影片上。

2.利用多孔材質去除真空條件

- (1)將細鐵絲折成底座並綁上棉線(網架)。
- (2)將口罩剪開取其融噴不織布層(口罩布)。
- (3)將口罩布鋪於燒杯內側杯緣(口罩布僅用於防止海膽側面管足吸附杯壁，故仍可自由移動)。
- (4)以防水蠟將均勻戳孔的投影片固定於燒杯底部。
- (5)將海膽置於網架上並放入充滿水的燒杯底部。
- (6)架設定滑輪組。
- (7)把燒杯置於三腳架上並將拍攝器材置其下，由下而上拍攝。
- (8)置砝碼於定滑輪另一端，每五秒增加 50 克，直到管足全數脫離燒杯。
- (9)計算在此條件下單一管足的平均拉力大小。



《自製多孔透明投影片》



《顯微鏡下的戳孔(孔面積 0.6mm^2)》

(二) 吸附力源於黏性物質

1. 尋找合適的防沾黏材質

使用透明離型紙進行實驗。

2. 利用防沾黏材質去除黏附條件

(1) 將細鐵絲折成底座並綁上棉線(網架)。

(2) 將口罩剪開取其融噴不織布層(口罩布)。

(3) 將口罩布鋪於燒杯內側杯緣(口罩布僅用於防止海膽側面管足吸附杯壁，故仍可自由移動)。

(4) 以防水蠟將透明離型紙固定於燒杯底部。

(5) 將海膽置於網架上並放入充滿水的燒杯底部。

(6) 架設定滑輪組。

(7) 把燒杯置於三腳架上並將拍攝器材置其下，由下而上拍攝。

(8) 將小夾鏈袋置於定滑輪的另一端，並用滴管將水滴入夾鏈袋，直到管足全數脫離燒杯。

(9) 待管足脫離後，分別測量塑膠板及含水夾鏈袋之重量。

(10) 計算在此條件下單一管足的平均拉力大小。



《透明離型紙》

六、黏性物質的作用機制

(一) 確認黏性物質的存在

1. 使用結晶紫染劑與碘液染劑，進行黏性物質染色實驗。

(1) 使管足黏附於在玻片上，並將其剪下。

(2) 移除被剪下的管足。

(3) 以濃度 7g/L 的結晶紫染劑滴於載玻片上，停留 40 秒。

(4) 用蒸餾水去除多餘染劑。

(5) 以碘液染劑滴於載玻片上，停留 40 秒。

(6) 用蒸餾水去除多餘染劑。

(7) 蓋上蓋玻片，於複式顯微鏡下觀察。

2. 使用電子顯微鏡觀察管足表面是否具有黏性物質。

(1) 使管足吸附於蓋玻片上，並將其剪下。

(2) 將蓋玻片及其上管足一起放入 95% 的乙醇培養皿中固定一夜。

(3) 取下固定後的管足，並待其自然風乾。

(4) 將管足固定於標本台上並放入電子顯微鏡中觀察。

(二)黏性物質的分泌

1.製作不同的黏性物質標本

(1)製作標本 A

- a.使管足黏附於在玻片上，並將其剪下。
- b.移除被剪下的管足。

(2)製作標本 B

- a.使載玻片輕輕碰觸吸盤表面並於管足黏附之前移除。

(3)製作標本 C

- a.使管足黏附於在玻片上，並將其剪下。
- b.以十公克砝碼置於管足上，並對其均勻施壓，5 秒後移除。
- c.移除被剪下的管足。

(4)以濃度 7g/L 的結晶紫染劑滴於標本 ABC 上，停留 40 秒。

(5)用蒸餾水去除多餘染劑。

(6)以碘液染劑滴於標本 A、B、C 上，停留 40 秒。

(7)用蒸餾水去除多餘染劑。

2.黏性物質分泌的時機

比較染色後的標本 A 及標本 B。

3.擠壓是否會影響黏性物質量

比較染色後的標本 A 及標本 C。

(三)管足脫離的機制

1.使管足吸附於在玻片上，並待其自然脫離。

2.以濃度 7g/L 的結晶紫染劑滴於載玻片上，停留 40 秒。

3.用蒸餾水去除多餘染劑。

4.以碘液染劑滴於載玻片上，停留 40 秒。

5.用蒸餾水去除多餘染劑。

6.蓋上蓋玻片，於複式顯微鏡下觀察。

七、黏性物質的蛋白質分析

(一)管足吸附與脫離的蛋白質濃度測定

1.取得不同狀態下的黏性物質

(1)製作標本 A(管足樣本數 n=40)

- a.使管足自然吸附於玻片上並待其自然脫離。
- b.將印有黏性物質之玻片暫時保存於 4°C。

(2)製作標本 B(管足樣本數 n=40)

- a.使管足自然吸附於玻片上後快速剪斷管足柄。
- b.將印有黏性物質之玻片暫時保存於 4°C。

(3)製作標本 C(管足樣本數 n=40)

- a.使管足自然吸附於玻片上後快速剪斷管足柄。

b. 置十公克砝碼置於管足上，對其均勻施壓，5 秒之後移除。

c. 將印有黏性物質之玻片暫時保存於 4°C。

2. 取得黏性物質溶液

(1) 取 200 μ l 的 ddH₂O 滴加於印有黏性物質之玻片上。

(2) 使用刮勺刮下玻片上之黏性物質。

(3) 將被刮下的溶液滴加於下一片玻片上。

(4) 重複(2)(3)步驟以取得高濃度的黏性物質溶液。

(5) 重複(1)~(4)三次，分別蒐集標本 A、B、C 的黏性物質溶液。

(6) 將三瓶黏性物質溶液離心後取其上清液。

3. 製作蛋白質標準曲線

(1) 將 2000 μ g/ml 的蛋白質標準品分別稀釋成 0、125、250、500、750、1000、1500、2000(μ g/ml)的標準品。

(2) 分別取不同濃度的標準品 10 μ l 加入 96 孔微量盤中並重複三次。

4. 各取 10 μ l A、B、C 溶液的上清液加入 96 孔微量盤中並重複兩次。

5. 在各孔中加入 10 μ l 的 BCA 試劑。

6. 將 96 孔微量盤放入恆溫震盪箱反應 28 分鐘。

7. 將 96 孔微量盤置於 ELISA 光度計上並測量 562nm 的吸光值。

8. 運用 SoftMax Pro Software 軟體繪出蛋白質標準曲線，並推算出 A、B、C 溶液的蛋白質濃度。

(二) 管足吸附與脫離的蛋白質種類分析

蛋白質膠體電泳(膠體濃度 12.5%)

1. 定量 3 μ g 的蛋白質粉末。

(1) 經前述測得的蛋白質濃度推算後取 A 溶液 8.91 μ l。

(2) 經前述測得的蛋白質濃度推算後取 B 溶液 8.91 μ l。

(3) 經前述測得的蛋白質濃度推算後取 C 溶液 5.59 μ l。

(4) 將三溶液置入離心濃縮機中抽乾成粉末，保存於 -20°C。

2. 取 250 μ l 的 1 倍 dye 並加入 2.5 μ l 的 β -Me。

3. 各取 20 μ l 的 dye 分別加入 A、B、C 粉末中。

4. 將三溶液裝上防爆夾後置於 100°C 的乾式溫育槽中加熱 10 分鐘，並待其冷卻後離心。

5. 架膠並在凹槽中填入 marker、positive control、樣本 A、B、C，並在剩餘格中填入 dye (negative control)。

6. 將電壓設為 50V，跑 stacking gel；將電壓設為 120V，跑 running gel。

7. 將跑完的膠片取下，並切除上膠後進行銀染。

8. 將銀染完的膠片置於雷射掃描成像儀中。

9. 運用 silverFast Ai 軟體掃描銀染結果。

10. 比較 marker 與 A、B、C 溶液的銀染結果，分析 A、B、C 溶液中的蛋白質分子量大小。

肆、研究結果

一、管足外型之觀察

(一)直接測量：白棘三列海膽的棘刺長度約為 5-6mm；管足伸長時的長度可超過 2cm。

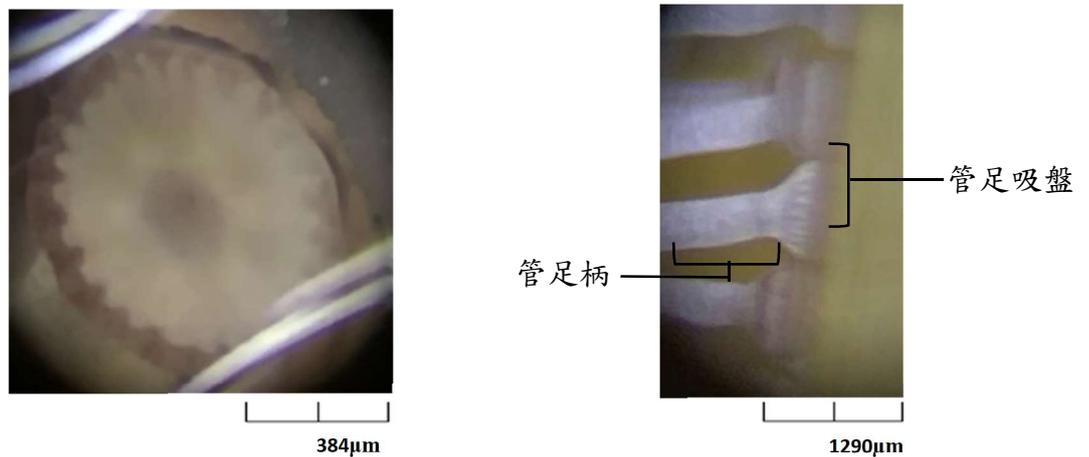
(二)以複式顯微鏡觀察：



圖一 以複式顯微鏡觀察管足

實驗結果：在複式顯微鏡的影像中，觀察到片狀的小骨(Ossicle)、周圍分布色素細胞(Pigment cell)，以及可折疊的管足柄。管足吸盤的直徑約為 0.7-1mm，小骨的片數多為 5-8 片，也有少數吸盤內的小骨超過 10 片。

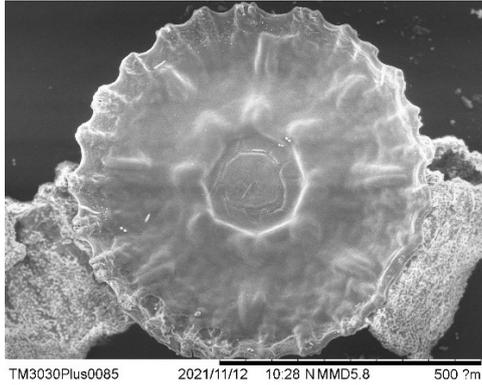
(三)以解剖顯微鏡觀察：



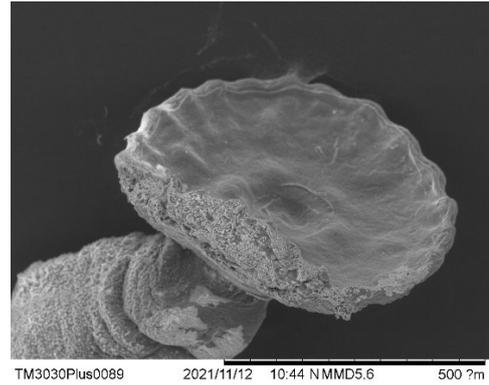
圖二 以解剖顯微鏡觀察管足的底面(左圖)與側面(右圖)

實驗結果：在解剖顯微鏡的影像中，觀察到管足底面的吸盤具有中央凹陷，吸附時管足柄無明顯折疊。

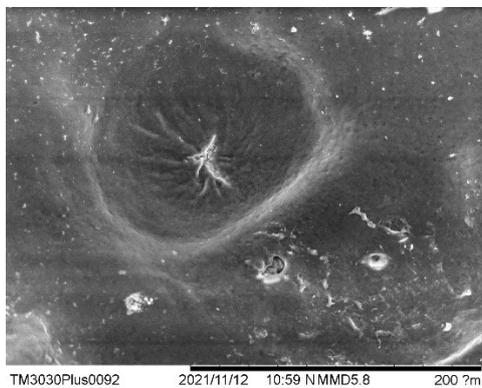
(四)以電子顯微鏡觀察：



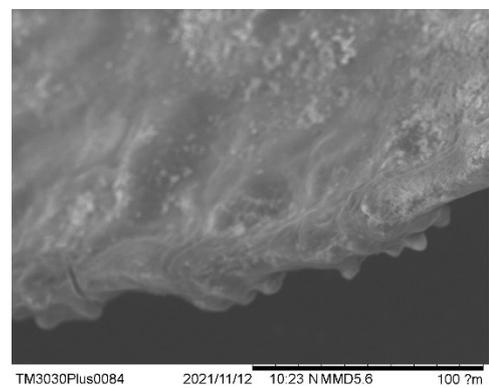
圖三之 1



圖三之 2



圖三之 3



圖三之 4

圖三 電子顯微鏡下的管足

實驗結果：在電子顯微鏡的影像中，觀察到管足脫水後小骨的立體結構(圖三之 1)、折疊的管足柄(圖三之 2)、中央的凹陷(圖三之 3)及小骨在吸盤邊緣的突起(圖三之 4)。吸盤表面並無可增加表面積的其他微結構。

二、海膽吸附力大小之測量

(一)單一管足最大吸附力

嘗試比較後發現口面的管足吸附力遠大於反口面的管足的吸附力，故後續的力學研究皆以口面的管足進行量測。

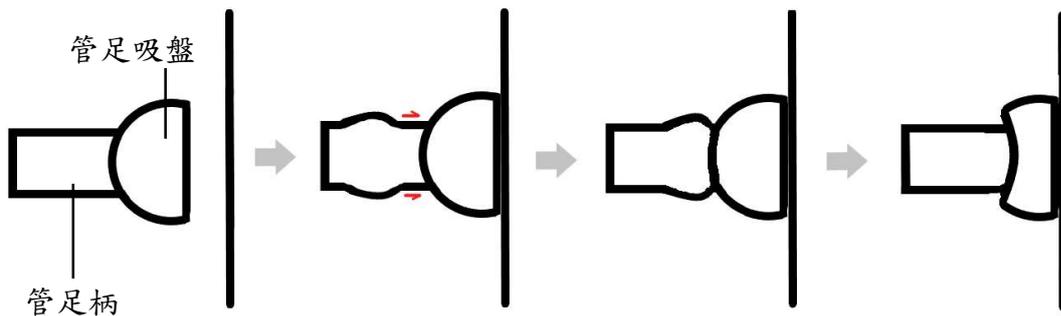
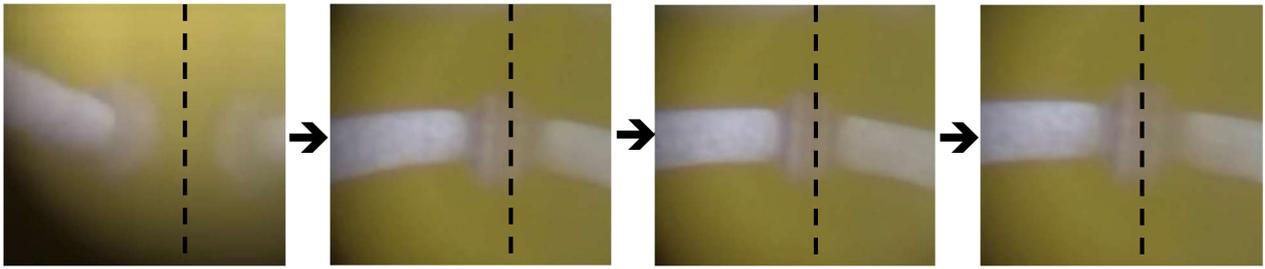
我們對六隻海膽進行以玻璃材質作為介質面的吸附力測量實驗，每隻重複兩次。在測量過程中，觀察到海膽有時會有不願意吸附的狀況，又本實驗的主要目的為測量單一管足的平均最大吸附力，為避免在此類情況下的數據影響實驗結果，故僅採用總拉力值超過 1000gw 的數據加以平均。

實驗結果：以玻璃材質作為介質面時，單一管足的平均最大吸附力為 $14.16 \pm 3.31 \text{ gw}$ (n=4)

三、觀察管足吸附的過程

(一)由側面觀察管足吸附的過程

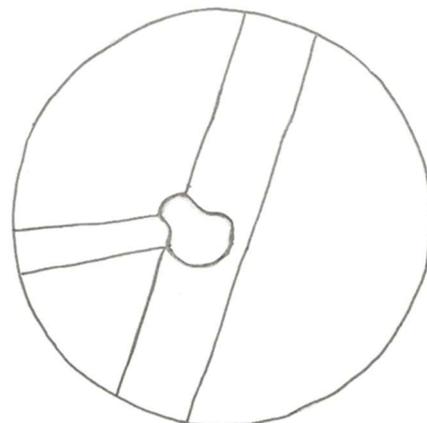
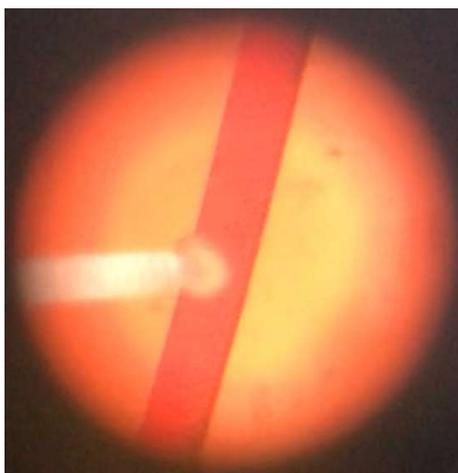
介質面



圖四 管足的吸附過程及其示意圖

實驗結果：從側面觀察管足吸附時的連續變化，發現管足會先輕觸介質面，待整個吸盤垂直於介質面時，管足柄末端會稍微膨大(推測是藉由水血管系統將水注入管足內)，並朝向介質面進行擠壓的動作。

(二)由側面觀察吸盤是否可以產生形變

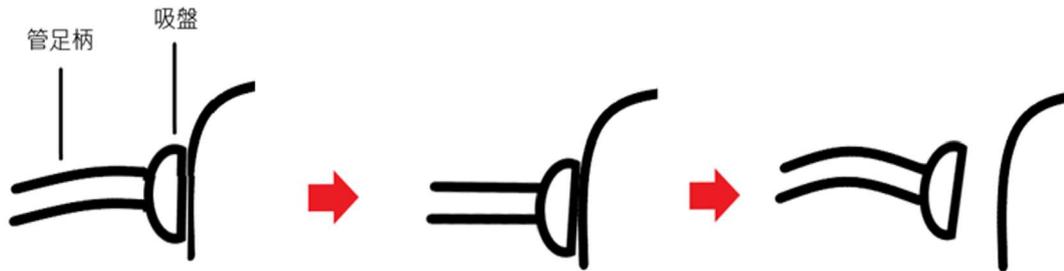


圖五 管足吸附時吸盤可產生形變

實驗結果：管足吸附於彎曲面時，管足末端的吸盤可隨著介質面曲度產生形變而彎曲。藉此推測小骨應具有關節，可使吸盤產生形變。

四、觀察管足脫離的過程

(一)由側面觀察管足脫離的過程



圖六 管足側面脫離之連續變化圖及其示意圖

實驗結果：從側面觀察管足脫離時的連續變化，發現無明顯形變。同時也觀察到，管足能夠迅速脫離並快速收回。

五、推測管足吸附力可能的產生機制

(一)真空

1.正常狀態—以無戳孔投影片為介質面進行吸附力測量實驗

實驗結果：以投影片為介質面時，單一管足的平均最大吸附力為 $8.14 \pm 1.01 \text{gw}$ ($n=3$)。

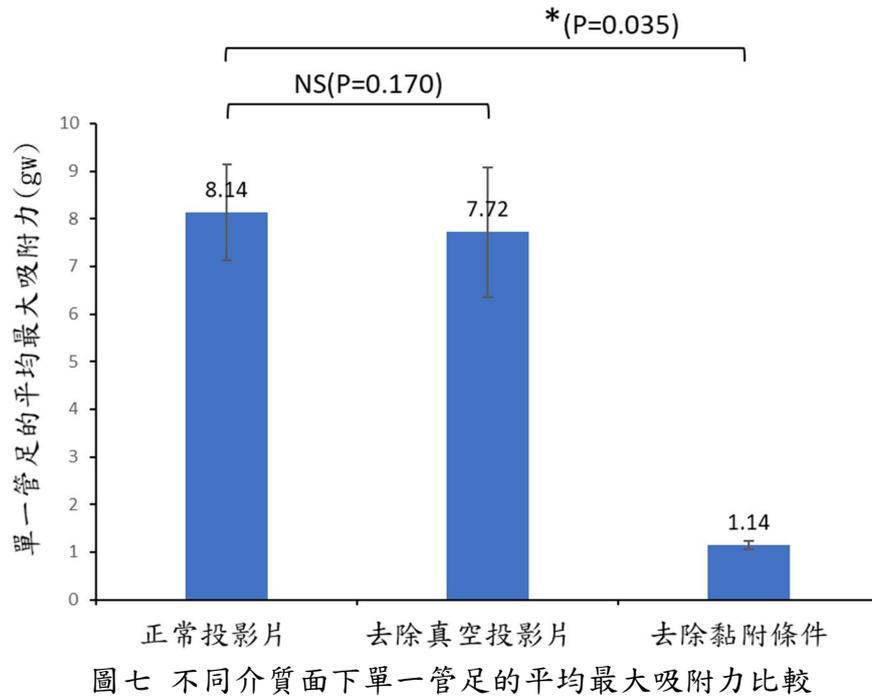
2.去除真空條件—以均勻戳孔投影片為介質面進行吸附力測量實驗

實驗結果：在去除真空的條件時，單一管足的平均最大吸附力為 $7.72 \pm 1.36 \text{gw}$ ($n=3$)，吸附力略低於正常條件下的管足，但仍然具有明顯的吸附力。

(二)黏性物質

去除黏附條件—以離型紙為介質面進行吸附力測量實驗

實驗結果：在使用防沾黏材質下，管足吸附力變得相當微弱。去除黏附條件下單一管足的平均最大吸附力為 $1.14 \pm 0.34 \text{gw}$ ($n=3$)，遠低於正常條件下的管足吸附力。



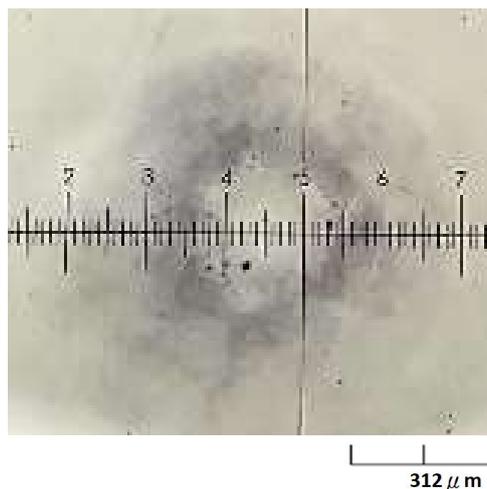
延伸想法：從上述測試結果可推知，管足主要是透過黏性物質產生吸附力，故我們進一步研究黏性物質的作用機制。

六、黏性物質的作用機制

由文獻得知，動物產生的黏性物質成分多為無機物、蛋白質及酸性醣類，故我們嘗試以結晶紫確認黏性物質的存在並標示其分布位置。

(一) 確認黏性物質的存在

為了避免黏性物質在管足脫離時被移除，我們選擇於管足吸附在介質面上時自管足柄處快速剪斷管足。



圖八 管足腳印以結晶紫染色的結果

實驗結果：白棘三列海膽確實可分泌黏性物質用於吸附，為了進一步了解黏性物質的作用機制及分佈區域，於是我們進行了以下實驗。

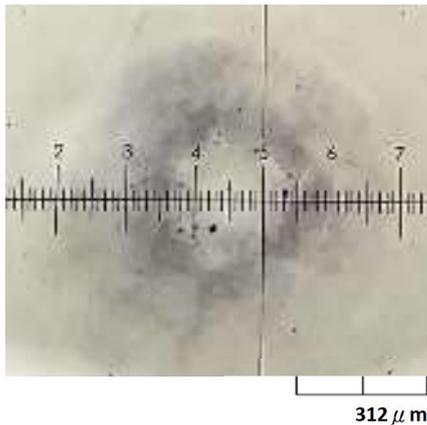
(二)黏性物質的分泌

1.黏性物質的分泌時機

由側面觀察管足吸附過程的實驗時，發現管足在輕觸介質面後會有一向介質面擠壓的動作，因此我們想了解管足是否是藉由擠壓動作來分泌黏性物質。

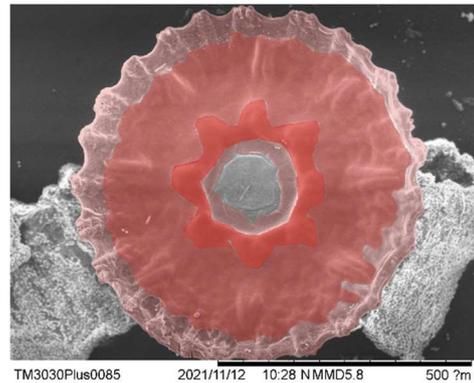
標本 A：管足自然吸附於玻片上，經移除管足後遺留在玻片上的管足腳印

染色結果：



圖九之 1 標本 A

(管足自然吸附的腳印染色結果)



圖九之 2 管足自然吸附的黏性物質
分布範圍示意圖

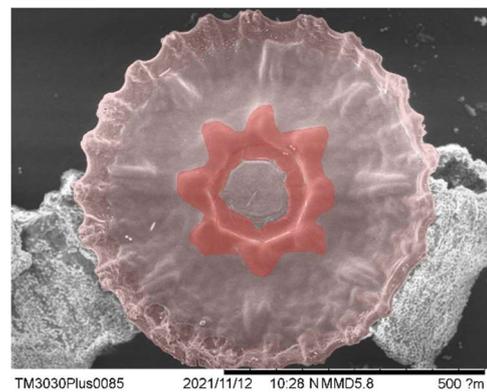
標本 B：玻片輕觸介質面但尚未吸附(未擠壓)，遺留在玻片上的管足腳印

染色結果：



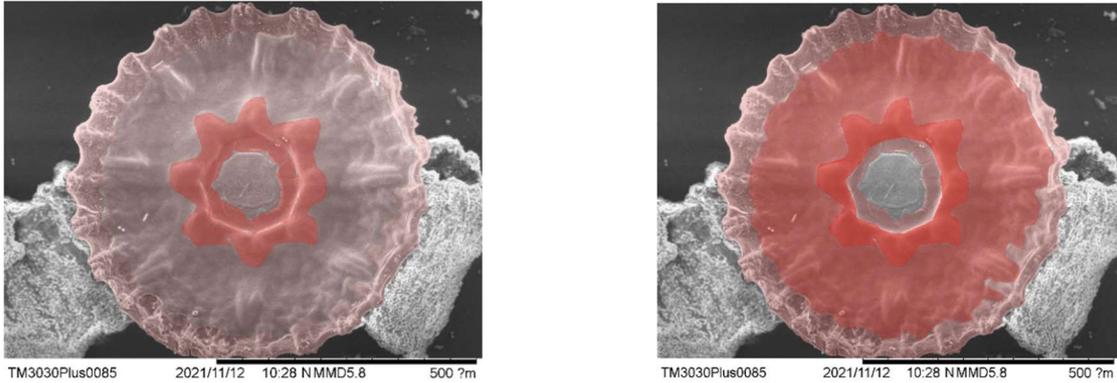
圖十之 1 標本 B

(管足輕觸的腳印染色結果)



圖十之 2 管足輕觸的黏性物質
分布範圍示意圖

→ 統整比較：標本 B、A 的黏性物質分布範圍示意圖



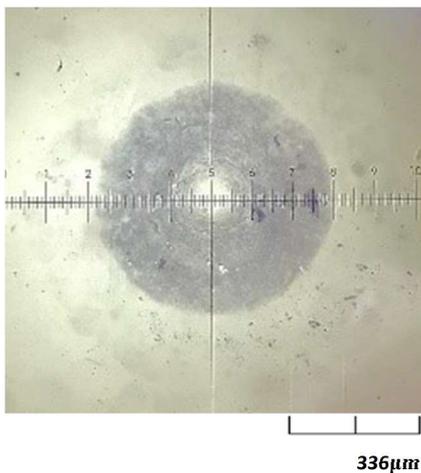
圖十一 標本 B：管足輕觸介質面但尚未吸附(未擠壓)(左圖)與標本 A：管足自然吸附(右圖)的黏性物質分布範圍示意圖比較

延伸想法：由圖十一左右兩圖比較可知，管足於吸附之前黏性物質就已存在於吸盤表面，而且不論是輕觸或確實自然吸附，黏性物質分布範圍大致相同，於是我們進一步討論管足朝向介質面進行擠壓動作對於黏性物質分泌的影響。

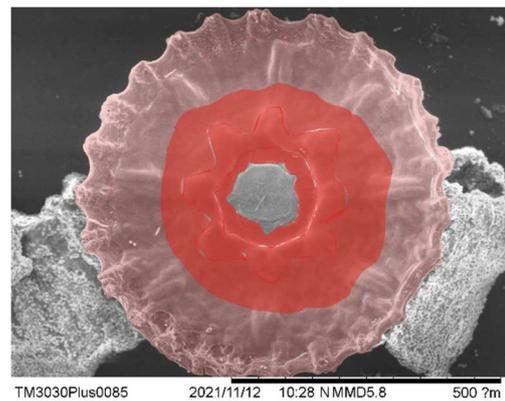
2. 擠壓動作是否會影響黏性物質分泌量

標本 C：管足自然吸附於玻片上，其上以 10 公克砝碼對管足均勻加壓 5 秒，移除管足後遺留在玻片上的管足腳印。

染色結果：

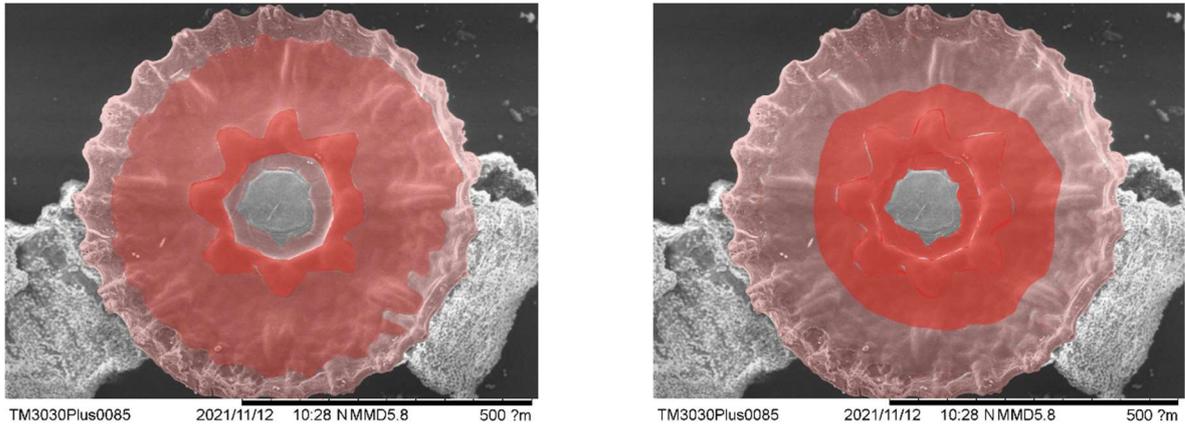


圖十二之 1 標本 C
(管足自然吸附後均勻加壓的腳印染色結果)



圖十二之 2 管足自然吸附後均勻加壓的黏性物質分布範圍示意圖

→ 統整比較：標本 A、C 的黏性物質分布範圍示意圖



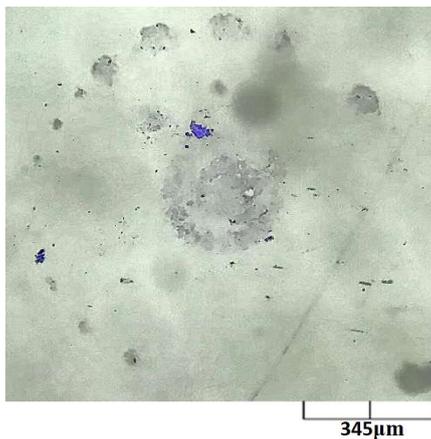
圖十三 標本 A：管足自然吸附(左圖)與標本 C：管足自然吸附後均勻加壓(右圖) 的黏性物質分布範圍示意圖比較

實驗結果：由標本 A、C 之比較可知，外加壓力可增加介質面表面的黏性物質分泌量。因此我們推測，管足可能藉由擠壓的動作朝向介質面釋放更多量的黏性物質。

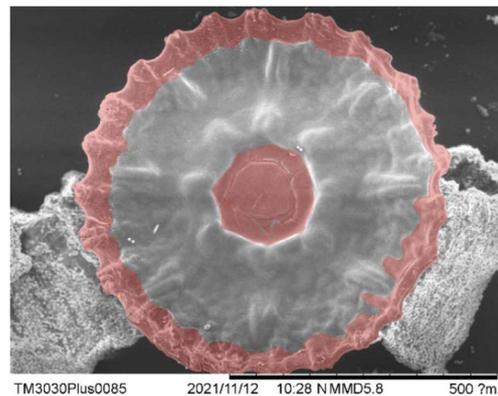
(三)脫離的機制

我們藉由比較海膽是否經自然脫離程序的玻片染色結果，推測管足脫離的機制。

海膽管足經自然吸附脫離後的玻片染色結果：

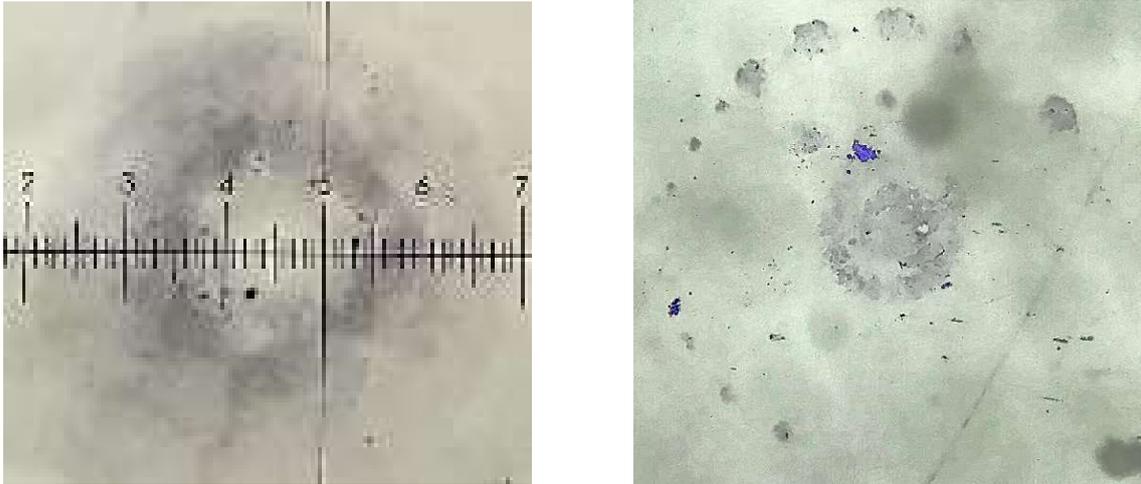


圖十四之 1 管足自然脫離的腳印染色結果



圖十四之 2 管足自然脫離的黏性物質分布範圍示意圖

→ 統整比較：海膽管足有無自然脫離的腳印染色結果比較



圖十五 管足未自然脫離(圖左)與管足自然脫離(圖右)的腳印染色結果

實驗結果：比較圖十五左右兩圖後，發現管足自然脫離後殘留於玻片上的黏性物質含量會減少，所以我們推測管足應是藉由去除黏性物質以達到脫離目的。

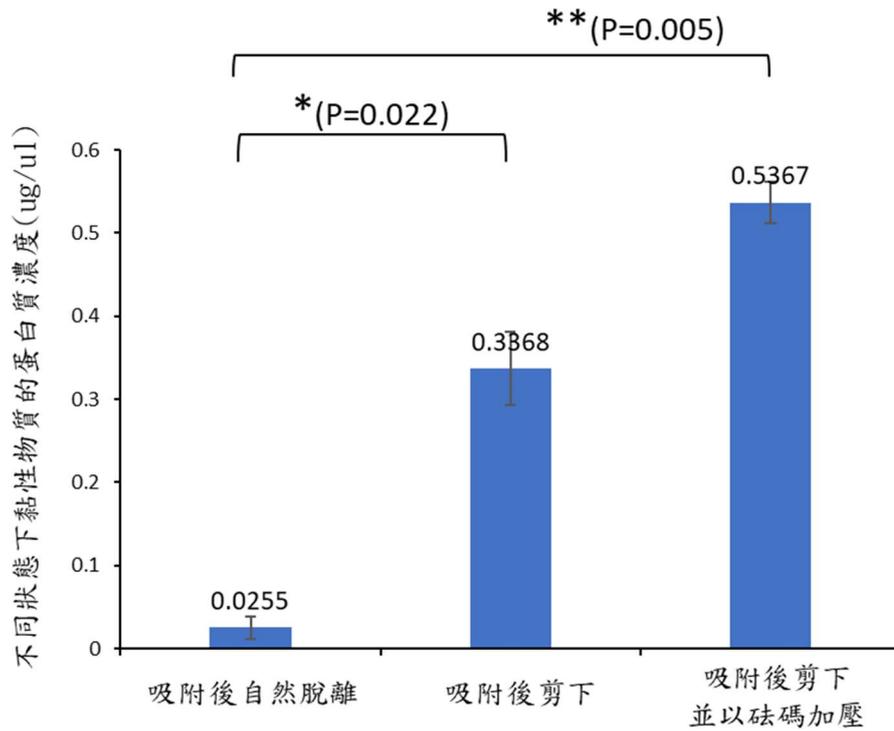
七、黏性物質的蛋白質測定

由前述實驗得知黏性物質與吸附脫離機制具有密切關連，但若僅以結晶紫染色無法明確將黏性物質定量，因此我們接著以 BCA 蛋白質分析試劑進行蛋白質定量實驗。

(一)管足吸附與脫離的蛋白質濃度測定

我們針對不同狀態下的黏性物質，進行蛋白質濃度測定

- 1.樣本 A：管足自然吸附且自然脫離，測得蛋白質濃度為 $0.0255 \pm 0.0135 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (n=2)。
- 2.樣本 B：管足自然吸附後將管足剪斷(未脫離)，測得蛋白質濃度為 $0.3368 \pm 0.0438 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (n=2)。
- 3.樣本 C：管足自然吸附後將管足剪斷並置 10g 砝碼加壓(未脫離且有均勻加壓)，測得蛋白質濃度為 $0.5367 \pm 0.0251 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (n=2)。



圖十六 不同狀態下黏性物質的蛋白質濃度

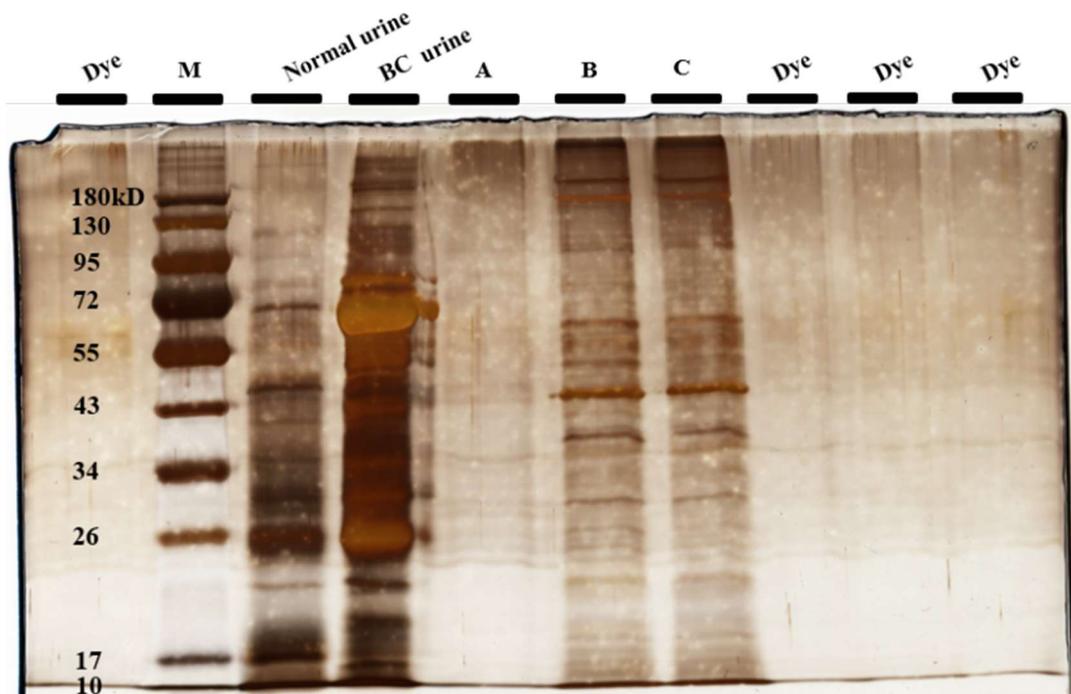
實驗結果：管足自然吸附自然脫離後，幾乎測不到蛋白質；自然吸附但未脫離的黏性物質含有蛋白質，且加壓形變後可明顯增加黏性物質中的蛋白質濃度。本結果高度符合我們前述實驗的推論：白棘三列海膽的管足吸附力主要是源自黏性物質，管足可藉由加壓形變增加黏性物質的蛋白質分泌量，並藉由去除黏性物質達到管足脫離的目的。

(二)管足吸附與脫離的蛋白質種類分析

比較管足於自然吸附或吸附後再加壓的黏性物質樣本，測得蛋白質濃度具有明顯差異，因此我們接著以蛋白質膠體電泳進行分子量測定，探討參與吸附或吸附後再加壓的蛋白質種類是否也會有所不同。

我們針對不同狀態下的黏性物質，進行蛋白質分子量分析。

- 1.樣本 A：管足自然吸附且自然脫離。
- 2.樣本 B：管足自然吸附後將管足剪斷(未脫離)，蛋白質樣本含量 3 μ g。
- 3.樣本 C：管足自然吸附後將管足剪斷並置 10g 砝碼加壓(未脫離且有均勻加壓)，蛋白質樣本含量 3 μ g。



圖十七 不同狀態下黏性物質內的蛋白質(經銀染顯色)

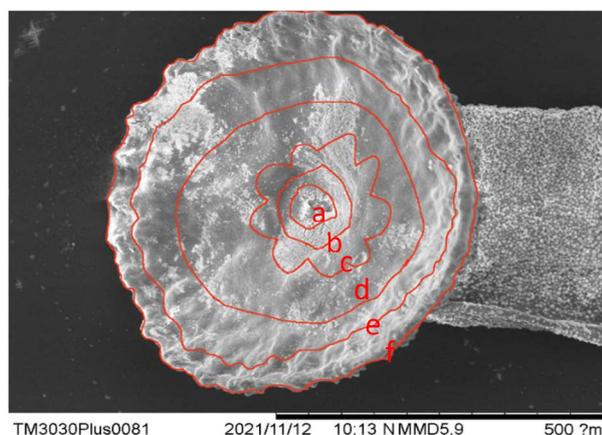
M：蛋白質標準品 Dye：僅含染劑(無待測樣本) Normal urine：正常人的尿液蛋白(對照組) BC urine：腎臟癌患者的尿液蛋白(對照組)

實驗結果：管足自然吸附且自然脫離後，幾乎測不到蛋白質；管足自然吸附時的黏性物質是由許多種類的蛋白質參與吸附過程，且不論是否經過加壓，參與吸附過程的蛋白質種類幾乎相同，其中濃度較高的為分子量約 200kD、180kD、45kD、40kD 等的蛋白質。

伍、討論

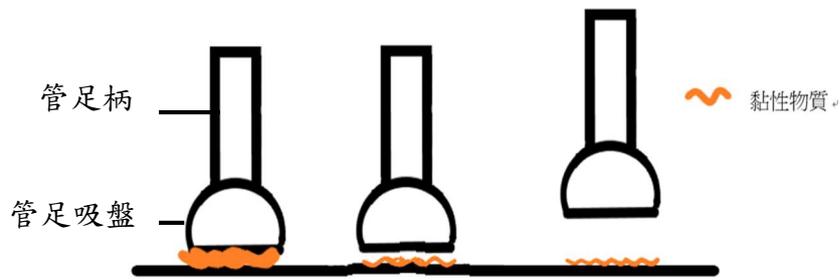
一、實驗結果測得白棘三列海膽在玻璃介質面下，單一管足的平均最大吸附力為 14.16gw。當以投影片作為介質面時，單一管足的平均最大吸附力為 8.14gw，以戳孔投影片去除真空條件後仍然具有大部分的吸附力，但若使管足吸附於離型紙則吸附力會明顯減弱。使用 T test 分析後，正常狀態與去除真空狀態兩者並無差異 (p value：0.170)；但正常狀態與去除黏附條件則具顯著差異(p value：0.035)，故我們推測白棘三列海膽的管足主要是藉由分泌黏性物質而產生吸附力，同時也藉由管足腳印染色實驗，證實吸盤表面確實具有黏性物質的存在。

- 二、在推測管足的吸附力主要源自於黏性物質後，我們進一步探討管足於吸附時的形態變化與黏性物質之間的關聯性。經觀察後發現，管足於吸附時會朝向介質面產生一擠壓動作，為了確認此形變是否導致管足分泌黏性物質，因此我們誘使管足的吸盤輕觸玻片，並於產生擠壓之動作之前將玻片移除。經染色後我們發現即使只有輕觸（尚未進行擠壓動作），玻片上仍可染到顏色較淺的腳印，因此我們推測管足在尚未接觸介質面之前，少量黏性物質即已經存在於吸盤表面。而管足產生擠壓形變的目的為增加接觸介質面的黏性物質釋放量，並非誘導黏性物質分泌。
- 三、為確認上述推測是否正確，我們將吸附於玻片上的管足剪下後，在其上放置十公克的砝碼加壓，而後將砝碼與管足於玻片上取下，將此玻片染色後與未放置砝碼的玻片比較。經過對比後，我們發現相較於未經加壓的管足，加壓後所產生之黏性物質的顏色明顯加深，藉此結果顯示管足產生形變與擠壓動作確實可以增加黏性物質的釋放量。
- 四、觀察管足吸附於具彎曲面時，我們發現管足末端的吸盤於吸附時確實可以產生形變，藉此增大吸盤與介質面的接觸面積，同時我們也推測吸盤內的小骨為具有關節的構造。對照先前於管足上加壓所產生的黏性物質染色結果，我們發現黏性物質顏色顯著加深的區域大致與小骨區(圖十八的 b.c.d.區)重合，因此我們推測管足於吸附時的擠壓動作可能是協同水血管系統及小骨形變所產生。

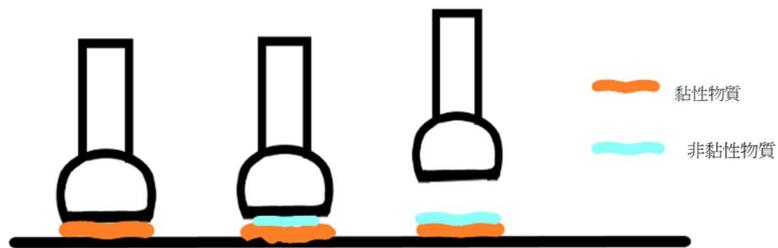


圖十八 管足分區示意圖

- 五、在探討管足脫離機制時，我們發現管足可迅速脫離介質面，脫離過程中管足並沒有明顯的形變，因此我們針對管足脫離的方式做了兩種假設：一、管足透過去除黏性物質使自身脫離(圖十九)；二、管足透過分泌非黏性物質取代黏性物質，使自身脫離(圖二十)。觀察管足自然吸附且自然脫離的實驗結果，發現自然脫離後殘留的黏性物質染色後顏色明顯變淡，此結果與我們的第一種假設較為相符，因此我們推測管足是藉由去除黏性物質達到脫離的目的。此外，觀察自然脫離後殘留的黏性物質染色結果可發現，小骨區域的黏性物質明顯減少，故推測被去除的黏性物質主要分布於此，換言之，黏性物質主要是作用於小骨所在部位。



圖十九 假設一示意圖



圖二十 假設二示意圖

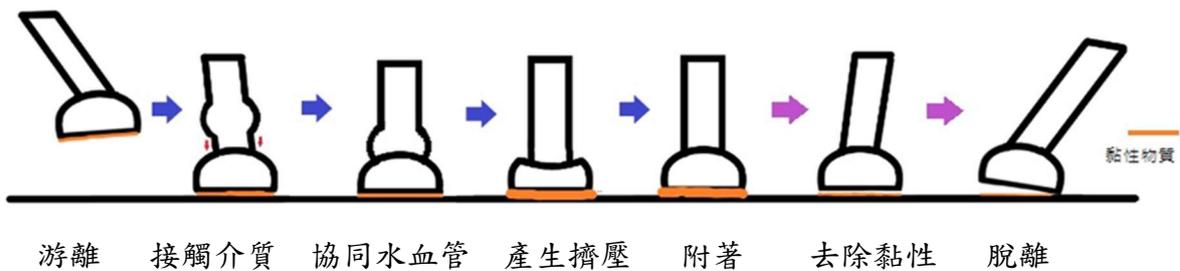
六、白棘三列海膽管足在吸附後自然脫離的條件下，黏性物質中的蛋白質濃度僅為 $0.0255 \pm 0.0135 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。在吸附後未脫離的條件下，蛋白質濃度為 $0.3368 \pm 0.0438 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。而在吸附後未脫離但有均勻加壓的條件下，蛋白質濃度為 $0.5367 \pm 0.0251 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。使用 T test 分析，吸附後自然脫離與吸附後未脫離兩狀態相比，黏性物質中蛋白質的濃度具顯著差異(p value: 0.022)；比較吸附後自然脫離與吸附後未脫離但有均勻加壓兩狀態相比，加壓後黏性物質中蛋白質的濃度具非常顯著差異(p value: 0.005)。白棘三列海膽的黏性物質中確實具有蛋白質，且此實驗結果也直接支持我們對管足脫離模式的假設一：管足是藉由去除黏性物質達到脫離目的。

七、在蛋白質電泳實驗中，自然吸附但未脫離的黏性物質不論是否經過加壓，只要在相同重量下，黏性物質的蛋白質組成成分及含量比例基本上相同，因此在管足吸附與脫離的蛋白質濃度測定時的蛋白質濃度差異，應是受黏性物質含量的多寡所影響，以上實驗符合管足可透過擠壓動作向介質面釋放更多量黏性物質的推測。

八、一般市面上的黏性產品在水中吸附力會明顯下降，甚至無法使用；而常見的水生生物黏合劑如藤壺的黏性物質，雖可在水中使用，但卻有無法被分解的問題。相較之下，白棘三列海膽能夠牢固但暫時的吸附在介質面，藉由釋放黏性物質和去除黏性物質，反覆使管足黏附在介質面上並從介質面脫離，具有可在水中作用並且可被迅速移除的特性，在仿生膠的應用上相當具有優勢。

陸、結論

- 一、白棘三列海膽的管足柄具有可伸長縮回的特性，管足伸長時的長度可超過 2cm。管足末端具有吸盤，吸盤的直徑約為 0.7-1mm，具中央凹陷。吸盤表面平滑不具細毛或其他微結構，吸盤內部可觀察到多個片狀的小骨構造。
- 二、白棘三列海膽吸附玻璃介質面時，單一管足能產生的平均最大吸附力為 14.16 克重。
- 三、白棘三列海膽的管足吸附力主要源自於黏性物質。
- 四、白棘三列海膽管足的黏性物質內含有許多種蛋白質，其中濃度較高的蛋白質分子量約為 200kD、180kD、45kD、40kD。
- 五、管足末端的吸盤可隨著介質面曲度產生形變而彎曲。
- 六、管足在吸附過程時會先輕觸介質面，待吸盤垂直於介質面時，管足柄末端稍微膨大，朝向介質面進行擠壓動作；在脫離過程時管足能夠快速脫離介質面，脫離時管足無明顯形變。
- 七、管足進行吸附之前，少量黏性物質已預先存在於吸盤表面，當實際接觸到介質面時，管足可透過擠壓動作釋放更多黏性物質以增加吸附力；當管足欲脫離時，則藉由去除黏性物質使管足迅速脫離介質面而使管足不致斷裂。



圖二十一 管足吸附脫離完整過程示意圖

柒、應用及未來展望

- 一、本研究顯示白棘三列海膽是藉由去除黏性物質達到脫離目的，但如何去除黏性物質（藉酵素分解或直接回收）則是我們仍極度感興趣的部分，後續研究期望能深入探討管足如何快速去除黏性物質的相關機制。
- 二、本研究顯示黏性物質中含有許多種蛋白質參與，後續研究將利用液相層析質譜儀 (LC/MS/MS) 進行蛋白質分子量測定、胜肽指紋比對與蛋白質身分鑑定。
- 三、本研究顯示，黏性物質的作用可能與吸盤內的小骨具有密切關連，後續研究期望能深入探討小骨在吸盤吸附與脫離的過程中，小骨關節的型態變化。
- 四、海膽主要生長在礁石上，相對於本研究的實驗器材(光滑玻璃)表面粗糙許多，後續研究期望能探討在相同材質的光滑面與粗糙面下，管足吸附能力的差異。
- 五、白棘三列海膽所產生的黏性物質可在水中發揮黏附作用，且具有可快速移除的可逆性，非常適合應用於仿生學研究。期望未來能從仿生的角度，開發出在水中具高度黏附效果，能兼用於光滑及粗糙的表面，且可迅速去除黏性並能分解移除的仿生黏合劑，在醫療方面應用於外科手術或牙科治療時的黏合材料。

捌、參考文獻資料

- Eldra Peral Solomon, Linda R. Berg, Diana W. Martin. (2002). *Biology*. Brooks/Cole.
- Stephen R. Palumbi, Anthony R. Palumbi (2017) 潘震澤譯《海洋的極端生物》，衛城出版。
- Robert Pjeta ,Herbert Lindner ,Leopold Kremser ,Willi Salvenmoser ,Daniel Sobral ,Peter Ladurner ,Romana Santos. (2020). *Integrative Transcriptome and Proteome Analysis of the Tube Foot and Adhesive Secretions of the Sea Urchin Paracentrotus lividus*. MDPI ,Switzerland.
- Mariana Simão, Mariana Moço, Luís Marques, Romana Santos. (2020). Characterization of the glycans involved in sea urchin *Paracentrotus lividus* reversible adhesion. SpringerLink.
- Lisa Gaspar, Patrick Flammang, Ricardo Jose, Ricardo Nuno Costa Luís, João Gama Monteiro, João Canning-Clode, Romana Santos. (2021). Interspecific Analysis of Sea Urchin Adhesive Composition Emphasizes Variability of Glycans Conjugated With Putative Adhesive Proteins. *Frontiers*.
- Birgit Lengerer, Peter Ladurner. (2018). Properties of temporary adhesion systems of marine and freshwater organisms. ResearchGate.
- Elise Hennebert, Romana Santos, Patrick Flammang.(2012) . *Echinoderms don't suck: Evidence against the involvement of suction in tube foot attachment*. Université de Mons. Belgium.
- Romana Santos, Stanislav Gorb, Valérie Jamar, Patrick Flammang. (2005). Adhesion of echinoderm tube feet to rough surfaces. ResearchGate.
- 丹尼爾·吉爾平(2013) 餘知融譯，渾身疙瘩的棘皮動物，黃山書社，第 22 頁，英國。
- Hyman, L. H. (1955). *The Invertebrates. Volume IV: Echinodermata*. McGraw-Hill, New York.
- Akira Yamada, Masaki Tamori, Tomoaki Iketani, Kazuhiro Oiwa and Tatsuo Motokawa.(2010) *A novel stiffening factor inducing the stiffest state of holothurian catch connective tissue*. *The Journal of Experimental Biology*. 213: 3416-3422.
- Hyunwoo Yuk, Jingjing Wu, Tiffany L. Sarrafian, Xinyu Mao, Claudia E. Varela, Ellen T. Roche, Leigh G. Griffiths, Christoph S. Nabzdyk & Xuanhe Zhao(2021) *Rapid and coagulation-independent haemostatic sealing by a paste inspired by barnacle glue*. *Nature Biomedical Engineering*.