

# 中華民國第 60 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學科

第三名

052007

如「膠」似「漆」-台灣淡水渦蟲黏液黏性及抗  
菌功能分析

學校名稱：新北市私立竹林高級中學

作者： 高一 楊政穎	指導老師： 顏嘉怡
---------------	--------------

關鍵詞：渦蟲黏液、黏性、抗菌

## 摘要

本研究探討渦蟲爬行黏液應用功能。以化學及物理方式分析渦蟲爬行黏液黏性，確認其應用於仿生材料可能性，化學分析利用高濃度膠片及常見醣蛋白染色法 PAS 與過點酸硝酸銀染色，並以銀染分析做對照，發現渦蟲爬行黏液醣蛋白分子量為 15~10 kDa 及低於 5 kDa 部分。物理分析利用自製落球及斜坡實驗，發現渦蟲水溶性黏液黏度為  $2.7\text{mm}^2/\text{S}$ ，非水溶性黏液具黏滯性使鋼球於斜坡實驗中減速。再來分析渦蟲黏液抑制環境菌能力，探討其開發為抗菌塗料可能性，初步發現渦蟲爬行黏液中含有細菌，並使用無菌過濾渦蟲水溶性黏液進行抑制環境菌實驗，發現其對曝氣水中所收集到的 4 種革蘭氏陽性球菌產生抑制效果。未來將分析渦蟲黏液中醣蛋白種類及黏液抗菌機制。

## 壹、研究動機

### 一、動機

仿生學 (Bionics) 指的是模仿生物特殊生存本領的一門學問。著名的仿生學例子像是學習蛛絲韌性所發明的高強度絲織品 (賴等, 2016a)、學習貽貝極強的附著力所開發出的防水強力膠 (賴等, 2016b)。

渦蟲的黏液在水中具有黏性，能協助爬行與捕食，其黏液在仿生材料開發 (防水黏著劑) 上有高度潛能。王在 2017 年時，發現渦蟲黏液主要由蛋白質、醣蛋白和多醣所組成。而文獻提到，多數動物黏液中含有具黏性的黏蛋白 (Etim *et al*, 2016)，其主要成分為醣蛋白。本研究改變蛋白質膠片濃度與電泳條件，利用常見醣蛋白染色法：過碘酸席夫染色 (PAS) 與過點酸硝酸銀染色，確認渦蟲黏液醣蛋白分子量，以利未來人工合成其醣蛋白分子結構，開發成防水黏著劑。

歷屆研究中，皆為探討渦蟲黏液化學性質，若要將渦蟲黏液開發成仿生材料 (防水黏著劑)，必需探討其黏液的物理性質 (如黏度等)，以利仿生材料開發，因此自行設計簡易的落球實驗及斜坡實驗推算渦蟲黏液黏度。

蛞蝓會分泌黏液保持濕潤、協助爬行；魚類也會分泌黏液保護體表 (Ingram, 1980)；

蝸牛黏液除了能夠協助其爬行，亦有抗菌的功能 (Iguchi *et al*,1982)；渦蟲黏液能夠幫助其爬行及捕食 (王，2017；徐，2018)。在一次的實驗中意外現將渦蟲爬行黏液滴於長菌的培養基中，似乎產生抗菌效果，因此本研究將探討渦蟲爬行黏液是否具有抗菌功能，研究渦蟲黏液製成抗菌塗料的可能性。初步使用飼養渦蟲所使用之曝氣水中所收集到的環境菌進行實驗，探討渦蟲爬行黏液是否有抑制環境菌之功能。

## 二、背景介紹

### (一) 歷年研究結果 (表 1)

我們的團隊發現淡水渦蟲會捕食蚊幼蟲，於是花了四年進行渦蟲的生物防治評估，第一年我們的團隊發現渦蟲會利用黏液纏繞協助捕食蚊幼蟲，其黏液在病媒蚊的防治與仿生應用上具有高度的潛能 (王與郭，2016)；第二年時，我們的團隊探討渦蟲捕食蚊幼蟲機制，發現渦蟲捕食蚊幼蟲時會將咽伸出行體外物理消化，並以簡單的染色方法初步得知渦蟲黏液中成分主要由多糖、醣蛋白及蛋白質所組成 (王，2017)；去年我們則發現渦蟲捕食蚊幼蟲時會用黏液協助體外化學消化，其黏液中至少含八種酵素；並以蛋白質電泳分析渦蟲爬行黏液中蛋白質，並以過碘酸席夫染色 (PAS)染色分析渦蟲黏液中醣蛋白，推測其分子量低於 10 kDa (徐，2018)。今年我們將研究渦蟲黏液於生活中應用的可能性，如仿生材料 (防水黏著劑)、抗菌塗料等應用可能。

表 1 歷屆研究及結果

歷屆研究	研究結果
王與郭，2016	推測渦蟲黏液在病媒蚊的防治與仿生應用上具有高度的潛能
王，2017	初步以簡單染色發現渦蟲黏液主要由多糖、醣蛋白及蛋白質所組成
徐，2018	推測渦蟲黏液中醣蛋白分子量低於 10 kDa

### (二) 渦蟲水溶性黏液和非水溶性黏液定義

渦蟲黏液可以協助捕食且在仿生應用上具有高度的潛能 (王與郭，2016)。渦蟲平時生長於水中，因此其黏液因蛋白質結構上的差異，所以又分為水溶性黏液和非水溶性黏液。本研究在實驗中定義移除實驗動物後所剩溶液溶於水部分即為水溶性黏液；而殘留於罐壁上不溶於水之黏液則定義為非水溶性黏液 (表 2)。

表 2 渦蟲爬行黏液定義

黏液種類	收集方法	定義
渦蟲水溶性黏液	25 隻渦蟲於 0.5mL ddH <sub>2</sub> O 玻璃罐中	所剩溶液溶於水部分。
渦蟲非水溶性黏液	爬行 60-90 分鐘，移除實驗動物。	殘留於罐壁部分。

### (三) 醣蛋白染色法

常見的醣蛋白醣蛋白染色為過碘酸席夫染色 (PAS) 與過碘酸硝酸銀染色。PAS 染色法可用於染組織中的醣類，過碘酸將醣類相鄰兩個碳上的羥基氧化成醛基，在蛋白質電泳中，也可將醣類以過碘酸氧化後再經席夫試劑 (schiff's) 染出紫紅色色帶，因此本實驗使用 PAS 染色來分析渦蟲黏液中的醣蛋白分子量。過碘酸硝酸銀染色的靈敏度高於 PAS 染色，此方法能使醣類的官能基以過碘酸氧化為醛基，而與銀鉍錯離子結合。由於染色方法也會使蛋白質呈色，故本實驗會於膠片中會加入奶粉當正對照組、BSA 當負對照組，並於負對照組尚未呈色前停止染色，得到的色帶為醣蛋白。

## 貳、研究目的

- 一、確認渦蟲爬行黏液中醣蛋白分子量並分析渦蟲黏液黏度。
- 二、探討渦蟲爬行黏液是否具抑制其生活環境菌功能。

## 參、研究設備及材料

### 三、實驗動物

#### (一) 虎紋三角渦蟲 (*Girardia tigrina*) (以下簡稱渦蟲)

1. 來源：台灣台北市市民權東路水族館。
2. 虎紋三角渦蟲身體扁平呈葉狀，長 5-30mm，寬 1-5mm，體色多為褐色，頭部呈三角形，故以此命名，頭部三角形部分為耳突，有偵測獵物的功能，具眼點，能感應光線變化。其咽位於腹部，為攝食器官。
3. 將渦蟲飼養於塑膠罐中，每天以蝦肉餵食並使用曝氣水換水。
4. 本實驗所使用之渦蟲長約 8-12mm。



圖 1 虎紋三角渦蟲

#### 四、實驗設備及器材

##### (一) 電泳使用器材、藥品及配方

名稱	備註
ddH <sub>2</sub> O	-
Protein Marker (245-5 kDa)	購自 SMOBIO
乾浴槽	購自 Thermo
玻璃瓶 (容量 30mL, 半徑 1.25 公分、 高 5 公分)	購自 KIMBLE CHASE

##### (二) 鑄膠使用藥品

藥品	備註
15% T-pro EZ Gel Solution	購自 Omics Bio
30% Acrylamide/Bis Solution	
1.5M Tris-HCL,pH8.8	
1.5M Tris-HCL,pH6.8	購自 Bio-Rad
10% SDS	
Ammonium Persulfate (APS)	
TEMED	
ddH <sub>2</sub> O	-

##### (三) 醣蛋白染色使用藥品

藥品	備註
Sodium Metabisulfite	購自 CHONEYE
Hydrochloric	
Bovine Serum Albumin (BSA)	購自 SIGMA
奶粉	桂格高鈣脫脂奶粉

##### (四) 銀染使用器材

名稱	備註
SilverQuest™ Staining Kit	購自 invitrogen
ddH <sub>2</sub> O	-

(五) 過碘酸硝酸銀染色使用藥品

名稱	備註
Acetic acid	
Methanol	
Silver nitrate	
Formalin	購自景明化學
Periodic acid	
Citric acid	
Sodium Hydroxide	
Ammonia water	
Isopropyl Alcohol	
Ethylenediamine	購自 Alfa Aesar
ddH <sub>2</sub> O	-

(六) 渦蟲黏液黏度分析使用器材

名稱	備註
試管	長 9.5cm、14cm
膠水	購自應元化工
6mm 鋼球	鋼製，直徑 6mm、重約 0.9g
6mm 塑膠球	塑膠製，直徑 6mm、重約 0.1 g
3mm 鋼球	鋼製，直徑 3mm、重約 0.1 g
黏度計	購自錫特工業
滴定管架	-

(七) 渦蟲黏液抗菌實驗使用藥品及配方

名稱	備註
Luria Bertani Agar	購自 Himedia
Luria Bertani Broth	
Agar Power	購自景明化學

(八) 其他使用器材

名稱	備註
培養皿(玻璃、塑膠)	購自 ExtraGene
微量吸管(tip) 微量吸管(tip)	購自 Nichiryo
量筒	購自瑞光儀器
曝氣水	靜置一天之自來水
試管震盪器	購自德彥儀器

## 肆、研究過程及方法

### 一、 實驗架構圖 (圖 2)

本次研究分為兩部分:首先以化學和物理分析法確認渦蟲爬行黏液黏性,化學分析將利用銀染作為對照,分析渦蟲爬行黏液中醣蛋白分子量,比較 PAS 及過碘酸硝酸銀染色結果。並分析渦蟲經劇烈搖晃所收集到黏液中蛋白質濃度或種類變化,嘗試收集更濃稠之渦蟲爬行黏液。物理分析因渦蟲爬行黏液分泌量少,因此利用自行設計的落球實驗及斜坡實驗推算渦蟲水溶性及非水溶性黏液黏度。第二部分將分析渦蟲爬行黏液抗菌能力,探討其製成抗菌材料的可能。渦蟲黏液含少量細菌,本研究將細菌培養並進行革蘭氏染色初步鑑定菌種;為避免其黏液中細菌干擾抗菌實驗,因此先將渦蟲水溶性黏液無菌過濾後以紙錠擴散法進行渦蟲群體、個體抗菌實驗(本實驗採用曝氣水中收集到之環境菌)。

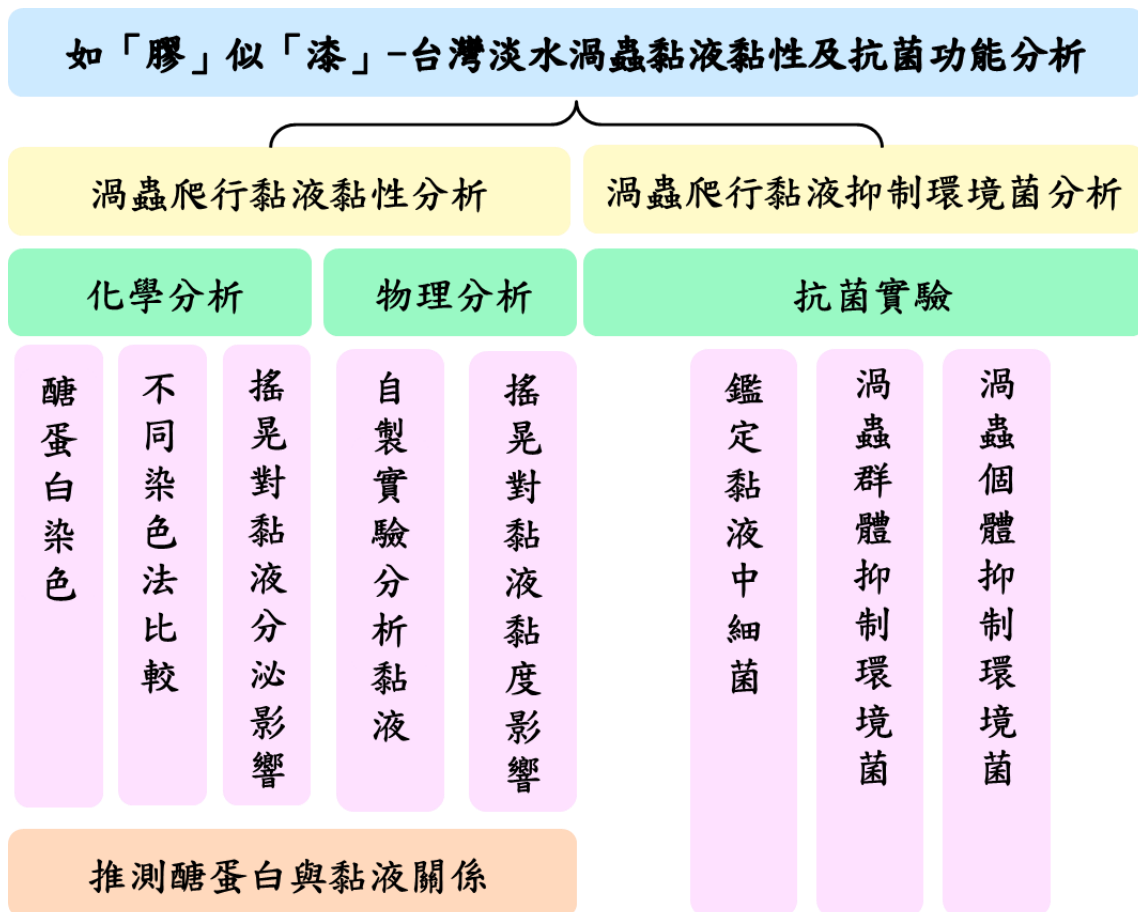


圖 2 實驗架構圖

### 二、 渦蟲爬行黏液定義

渦蟲爬行黏液:將渦蟲置於 ddH<sub>2</sub>O 清洗 10 分鐘後,放入 0.5mL ddH<sub>2</sub>O 玻璃罐中爬

行 60-90 分鐘，移除實驗動物後所剩溶液溶於水部分即為水溶性黏液；而殘留於罐壁上不溶於水之黏液則定義為非水溶性黏液。另電泳時會使用 Lysis buffer 回溶以獲得更高濃度樣本。

經劇烈搖晃渦蟲爬行黏液：25 隻渦蟲於 0.5mL ddH<sub>2</sub>O 玻璃罐中，每 20 分鐘以 3000rpm 試管震盪器震盪 10 秒，共震盪 4 次（收集後渦蟲皆存活）。

表 3 各實驗所使用黏液種類

實驗	使用黏液種類
蛋白質電泳	渦蟲爬行黏液 (以 Lysis buffer 回溶)
落球實驗	渦蟲水溶性黏液
斜坡實驗	渦蟲非水溶性黏液
收集黏液中細菌	渦蟲水溶性黏液
渦蟲黏液抗菌實驗	渦蟲水溶性黏液 (經無菌過濾)

### 三、 實驗方法與步驟

#### (一) 醣蛋白染色分析渦蟲爬行黏液中醣蛋白分子量

渦蟲黏液在水中具有黏性能夠幫助其捕食、爬行。我們的團隊曾初步推測其黏液成分為蛋白質、醣蛋白及多糖所組成 (王, 2017)；於 2018 年以蛋白質電泳初步推測渦蟲黏液中醣蛋白分子量低於 10 kDa，但可能受 Loading dye 影響而實驗中負對照組產生色帶，導致誤判結果使其結果正確性仍待確認 (徐, 2018)。文獻中提到蝸牛的抗菌蛋白為一種醣蛋白 (Otsuka Fuchino *et al*, 1992)，且抗菌蛋白分子量大多低於 10 kDa 以下 (表 4)。因此本實驗將自行配置無色 Loading dye 將其影響降低，並將膠片濃度提升至 20% 及使用 15% 梯度膠片，嘗試分析渦蟲黏液中低於 10 kDa 以下的醣蛋白，再分別利用 PAS 及過碘酸硝酸銀染色結果與銀染作對照，確認醣蛋白分子量。

表 4 動物抗菌蛋白比較

抗菌蛋白種類	提取動物	胺基酸數量 (個)	分子量推測 (kDa)	文獻
Achatin-1	非洲大蝸牛	47	5.2	查自 NCBI
epinecidin-1	石斑魚	66	7.3	
Cecropin A2	蒼蠅	63	6.9	



## 1. 蛋白質電泳

本實驗使用蛋白質電泳分析渦蟲爬行黏液中的蛋白質，將電泳後的膠片進行醣蛋白染色以分析渦蟲爬行黏液中醣蛋白分子量。為分析渦蟲爬行黏液中 10 kDa 以下的蛋白質，本實驗降低電壓使電泳速度減慢以分離小分子蛋白。

### 【實驗方法】

將樣本與無色 2X Sample Loading Buffer 以 1:1 混合，加熱後將樣本放於冰上，避免蛋白質再次變性。將樣本注入膠體樣品槽中，先以 70V 跑電泳約 1 個小時，使所有樣品於同一起點，再將電壓調至 100V，使樣本因為分子量大小不同導致電泳速度不一，於膠片中分離。電泳完成後將膠片使用 PAS 染色及過碘酸硝酸銀染色兩種醣蛋白染色方法分析膠片。

表 5 電泳樣本配置

樣本名稱	樣本處理方法
Protein marker (M)	為分子量 245-5 kDa 之蛋白質標準品
渦蟲爬行黏液 (PL)	25 隻渦蟲於 0.5mL ddH <sub>2</sub> O 玻璃罐中爬行 60-90 分鐘，以 100 $\mu$ L RIPA lysis buffer 回溶
劇烈搖晃渦蟲爬行黏液 (SP)	25 隻渦蟲於 0.5mL ddH <sub>2</sub> O 玻璃罐中爬行，每 20 分鐘以 3000rpm 試管震盪器震盪 10 秒，震盪 4 次後以 100 $\mu$ L RIPA lysis buffer 回溶
BSA 牛血清蛋白 (B)	負對照組，16 $\mu$ g/mL
奶粉 (MP)	正對照組，32 $\mu$ g/mL

## 2. PAS 染色

### 【實驗方法】

膠片電泳後進行 PAS 染色 (染色步驟參考 Wang, *et al*, 2017 的實驗)。首先將膠片浸入 ddH<sub>2</sub>O 中，清洗 10 分鐘。接著泡入 1% 過碘酸、3% 醋酸溶液中 30 分鐘，使醣蛋白上醇基轉為醛基。將膠片取出泡入 0.1% 焦亞硫酸鈉於 0.01M 鹽酸中，每次 5 分鐘，進行 2 次 (以退去背景顏色避免顏色過深影響判讀色帶)。取出膠片放入席夫試劑 (schiff's) 中，浸泡 10-15 分鐘。席夫試劑會與醛基結合產生紫紅色色帶。最後再將膠片泡入 0.1% 焦亞硫酸鈉於 0.01M 鹽酸中去背景 5 分鐘，反應完成後以 ddH<sub>2</sub>O 清洗膠片，清洗後掃描膠片。

### 3. 過碘酸硝酸銀染色

#### 【實驗方法】

膠片電泳後將膠片以固定液 A 浸泡隔夜，之後改固定液 B 浸泡 30 分鐘。倒去固定液 B 後，加入過碘酸溶液置於冰箱以 4°C 泡 60 分鐘。浸入 ddH<sub>2</sub>O 中清洗 3 至 5 次，共 3 小時，以洗去過碘酸。接著泡入硝酸銀溶液 10 分鐘，再以 ddH<sub>2</sub>O 清洗 10 分鐘，期間以水清洗 3 至 5 次。清洗後浸於還原液中，觀察膠片呈色情形，並在負對照組呈色前倒去還原液。將膠片浸泡於反應中止液 60 分鐘，完成後掃描膠片。

#### (二) 不同染色法比較

未經過碘酸氧化的醣蛋白在 PAS 染色、過碘酸硝酸銀染色無法染出，但在 CBR 及銀染中仍可呈色 (Dubray & Bezar, 1982)。故本實驗以銀染作為對照，確認渦蟲爬行黏液中醣蛋白色帶是否與蛋白質色帶重合，以確保呈色物質為醣蛋白，而非多肽等其他小分子物質。

#### 【實驗方法】

電泳後，進行 Fix 20 分鐘，以 30% 酒精清洗膠片 10 分鐘後，在進行 Sensitive 增加靈敏度及對比，再以 30% 酒精清洗兩次，共 20 分鐘。將膠片進行 Stain 使銀離子與蛋白質結合；以 ddH<sub>2</sub>O 短暫清洗 10 分鐘後，接著 Develop 至色帶呈色，最後加入 Stop 停止膠片繼續染色避免顏色過深。

表 6 銀染步驟相關藥品配方

步驟名稱	藥品配方
Fix	30% Ethanol 45 mL+ Acetic acid 5 mL
Sensitive	30% Ethanol 45 mL+ Sensitiver 5 mL
Stain	Stainer 0.5 mL, add water to 50 mL
Develop	Developer 5 mL+ Developer enhancer 30 $\mu$ L, add water to 50 mL
Stop	Stopper 5 mL

#### (三) 劇烈搖晃對渦蟲爬行黏液分泌影響

渦蟲生活於溪流中，水流湍急時其仍能吸附於石塊上，推測其經過強勁水流沖刷時會分泌較多黏液以幫助爬行，發現收集黏液時搖晃玻璃罐疑似能收集到較濃稠渦

蟲爬行黏液 (圖 3)，將以銀染分析經試管震盪器震盪收集之渦蟲爬行黏液蛋白質種類或濃度變化。

本實驗將以劇烈搖晃刺激渦蟲，模擬野外強勁水流沖刷，嘗試刺激其分泌爬行黏液。並分析爬行黏液是否更濃稠或其中蛋白質種類、濃度變化。

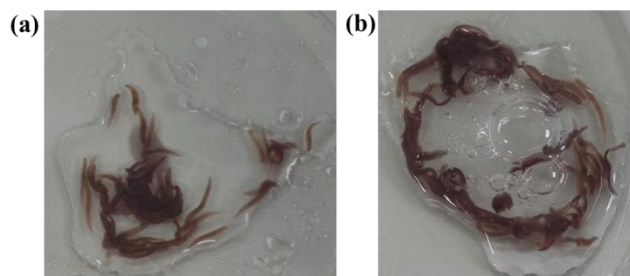


圖 3 不同條件收集之渦蟲爬行黏液

(a)為未經試管震盪器震盪當收集之渦蟲水溶性黏液。(b)為經試管震盪器震盪當收集之渦蟲水溶性黏液。

#### (四) 以 ImageJ 分析色帶亮度 (參考徐，2019 步驟)

利用 ImageJ 分析膠片上的色帶面積亮度，再以 Excel 推算其蛋白質單體濃度。

##### 【使用方法】(參考徐，2019 步驟)

複製已知 BSA 色帶於其他分子量位置，去除背景 (圖 4a)，圈選膠片上蛋白質色帶 (圖 4b)，計算樣本組別色帶面積 (圖 4c)，根據已知 BSA 色帶濃度面積，以 Excel 進一步分析膠片中蛋白質單體濃度 (圖 4d)。

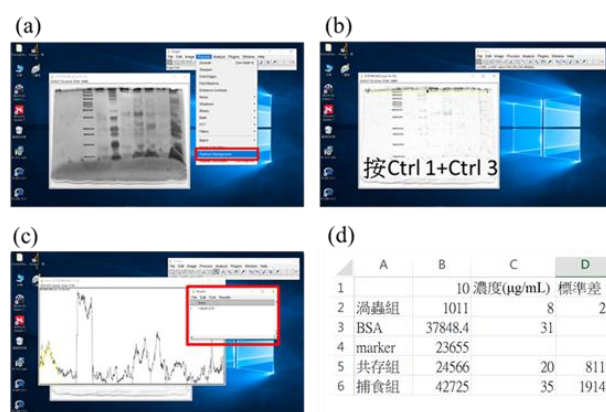


圖 4 ImageJ 分析色帶方法(步驟參考徐，2019)

(a) 將欲分析膠片去背處理。(b) 圈選分析區域。(c) 計算樣本組別色帶面積。(d) 以 Excel 進一步分析膠片中蛋白質單體濃度。

#### (五) 自製物理實驗分析渦蟲爬行黏液

渦蟲黏液在水中能保持黏性，在開發仿生材料 (防水黏著劑) 上有高度潛能 (王，

2017)。本實驗因渦蟲黏液樣本量不足而無法直接以黏度計測量其黏度。於是自行設計簡易的落球實驗及斜坡實驗，推算出渦蟲水溶性其非水溶性黏液的物理性質。

### 1. 落球實驗分析渦蟲水溶性黏液黏度 (本實驗進行 15 重複)

渦蟲爬行黏液分泌量少，無法直接以黏度計測量。因鋼球在液體中掉落時，所耗時間與液體黏度會呈正相關，故找出鋼球於膠水和鋼球在渦蟲爬行黏液中落下時間相同的稀釋膠水比例，並以黏度計測量其膠水黏度，以推測渦蟲水溶性黏液黏度。

本研究曾改變球材質進行落球實驗，預備實驗結果如表 7，故採用 6mm 鋼球進行實驗。

表 7 落球實驗改變條件及結果

實驗名稱	條件	結果
落球實驗	3mm 鋼球 (0.1g)	體積小難以判斷鋼球位置
	6mm 塑膠球 (0.9g)	質量過輕不便判讀終點位置
	6mm 鋼球 (0.1g)	易判斷鋼球位置及容易判讀終點位置

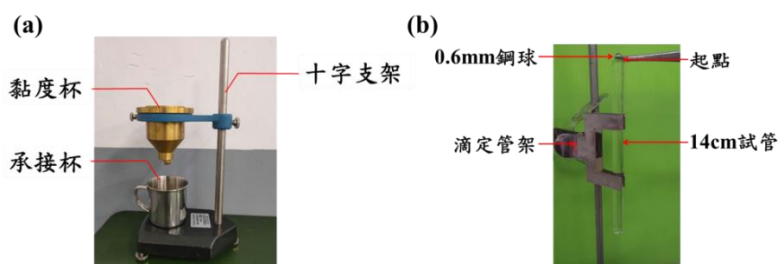


圖 5 實驗裝置及使用器材

(a) 為本實驗所使用之黏度計。(b) 為落球實驗裝置。

#### 【實驗方法】

將 14cm 長試管裝滿待測溶液，使直徑：6mm 重：約 0.9g 的鋼球一半浸於液體中（避免落下時產生氣泡影響）。測量鋼球落下所耗時間。使用 1% 及 5% 稀釋膠水嘗試找出落下時間與鋼球在渦蟲水溶性黏液中落下時間相同的稀釋膠水比例。並進一步以黏度計測量稀釋膠水黏度以推算渦蟲水溶性黏液黏度。

#### 【黏度計使用方法】

使用前先調整至水平，以紙巾擦拭並待黏度計乾燥。將待測溶液注入黏度計，注滿後刮除黏度杯上多餘試液。於下方放置承接杯承接試液。將黏度杯底部打開，同時開始計時液體流完所費時間。重複試驗，使其誤差不超過 0.5 秒，將測得秒

數後帶入下方公式 (表 8)。

表 8 流出時間對應公式 t-流出時間(s) v-運動黏度(mm<sup>2</sup>/s)

流出時間	帶入公式
t<23s	t=0.154v+11
23s<t<150s	0.223v+0.6

## 2. 斜坡實驗分析渦蟲非水溶性黏液 (本實驗進行 15 重複)

渦蟲會分泌少量渦蟲非水溶性黏液 (圖 6)。為證明其具黏性，本實驗使渦蟲爬行於試管管壁後，將試管傾斜，測量鋼球滑至底部所需時間，計算鋼球滑落速度變化。鋼球於斜坡上滑落時，其速度變化與斜坡表面物質黏滯阻力呈正相關。球與管壁接觸面所產生的黏滯阻力越大，其速度越慢。故假設管壁的渦蟲非水溶性黏液黏度越高，鋼球的速率即越慢。

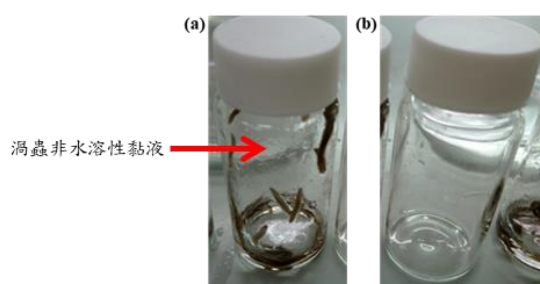


圖 6 蒐集渦蟲黏液示意圖

(a) 渦蟲爬行黏液(玻璃罐壁面上殘留渦蟲非水溶性黏液)(箭頭處)，(b) 空罐。

斜坡實驗曾針對球材質及角度進行實驗，起初使用較低高度角進行實驗，以便計算滑落速度，後續為證明假設而將角度提升。改變條件及結果如表 9。故於高度角 8°時使用 6mm 鋼球；高度角 30°使使用 6mm 塑膠球。

表 9 斜坡實驗改變條件及結果

實驗名稱	條件	結果
斜坡實驗	高度角 8°、3mm 鋼球 (0.1g)	無法滑落
	高度角 8°、6mm 塑膠球 (0.1g)	
	高度角 8°、6mm 鋼球 (0.9g)	可滑落
	高度角 30°、3mm 鋼球 (0.1g)	體積小不易判斷鋼球位置
	高度角 30°、6mm 塑膠球 (0.1g)	滑落速度慢易於分析
	高度角 30°、6mm 鋼球 (0.9g)	質量大滑落度過快

## 【實驗方法】

測量試管內部長度 (L)，其為球滑落時之路徑。將試管高度角設為 8°、30°(圖 7)。測量鋼球滑落至試管底部所需時間 (T)。速度公式:  $\frac{\text{試管內長度 (L)}}{\text{鋼球滑落所需時間 (T)}}$ ，求出鋼球滑落時速度。對照組為空試管、管壁沾水之試管。

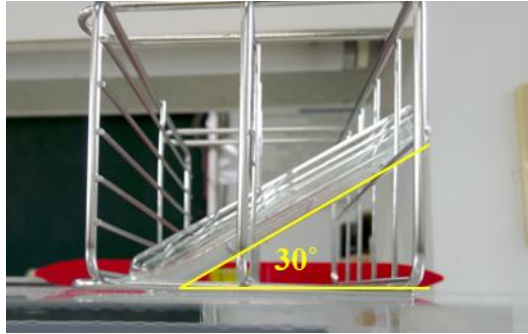


圖 7 實驗裝置示意圖 (圖中高度角為 30°)

本裝置由一長度為 9.5cm 試管及試管架組成，測量鋼球滑落至底部所耗時間並代入速率公式求出鋼球速度。

### (六) 劇烈搖晃對渦蟲爬行黏液黏度影響

以自製物理實驗分析經試管震盪器劇烈搖晃所蒐集的渦蟲爬行水溶性黏液及非水溶性黏液物理性質，比較與渦蟲爬行黏液物理性質差異。

### (七) 分析方式

以單因子變異數 (One-way ANOVA) 分析小球落下時間、小球於斜坡滑落速率， $p < 0.05$  為顯著差異 (\*)， $p < 0.01$  為極顯著差異 (\*\*)。

### (八) 收集渦蟲爬行黏液中細菌

本研究曾使用直接收集到之渦蟲水溶性黏液於抑制環境菌實驗中，發現黏液部分其會長出其他細菌，因此本實驗將收集渦蟲爬行黏液中細菌，並初步以革蘭氏染色分析其細菌型態。

#### 1. 初步鑑定渦蟲爬行黏液中細菌

將渦蟲水溶性黏液進行塗盤，從中分離、培養型態不同之菌落，以革蘭氏染色初步鑑定細菌之型態為革蘭氏陽性或陰性菌，並比較渦蟲生活環境水樣中細菌及渦蟲水溶性黏液中細菌種類差異。

## 【實驗方法】

將細菌進行革蘭氏染色。接種環殺菌後沾取菌落抹於載玻片，滴上 ddH<sub>2</sub>O 火

烤玻片背面固定滴上結晶紫 1 分鐘後，以蒸餾水沖洗後滴上碘液，1 分鐘後以蒸餾水沖洗並使用 95% 酒精進行脫色，將酒精洗除後以番紅複染 45 秒，吸乾多餘染劑以複式顯微鏡觀察。

## (九) 渦蟲爬行黏液抑制環境菌分析

蝸牛黏液除了能保濕亦能抗菌 (Iguchi *et al*,1982)，本實驗將探討渦蟲黏液抗菌功能。先前研究發現渦蟲黏液中含有少量細菌，故本實驗先將渦蟲水溶性黏液無菌過濾後，進行渦蟲水溶性黏液對環境菌的抗菌實驗。

### 1. 使用環境菌進行實驗

本實驗採用於飼養渦蟲所使用之曝氣水中所收集到環境菌進行實驗 (以最安全之方式探討渦蟲水溶性黏液抗菌能力)，探討渦蟲水溶性黏液對其可能接觸到之環境菌是否有抑制效果，。

表 10 曝氣水中所收集到之細菌菌落描述

菌落編號	菌落描述
A	橘黃色、表面光滑濕潤、邊緣平滑、圓形
B	白色、表面光滑濕潤、邊緣平滑、圓形
C	粉色、表面乾燥、邊緣平滑、圓形
D	米白色、表面乾燥粗糙、邊緣形狀不規則
E	米白色、表面光滑濕潤、邊緣平滑、圓形、中央突起
F	米白色、表面光滑濕潤、邊緣平滑、圓形
G	白色、表面乾燥、邊緣平滑、圓形、外圍隆起
H	白色、表面乾燥、邊緣鋸齒、外圍隆起

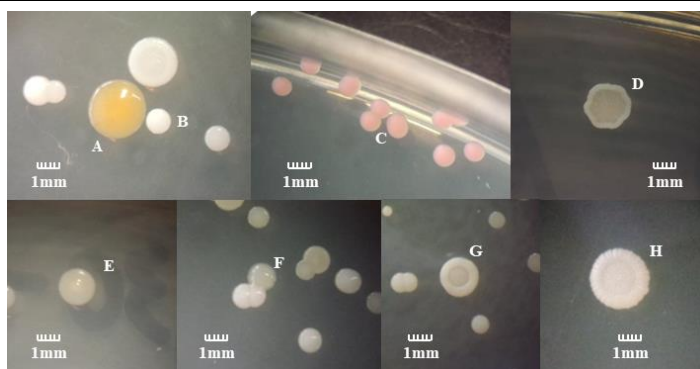


圖 8 曝氣水中所收集之環境菌

## 2. 渦蟲群體抑制環境菌能力分析

在先前設計曾使用未經過濾的渦蟲水溶性黏液，發現滴上渦蟲黏液部分會先長出菌落。本次使用經無菌過濾之渦蟲水溶性黏液進行實驗，以紙錠擴散法確認其抑制環境菌能力。

### 【實驗方法】

將渦蟲水溶性黏液進行無菌過濾，並將濾紙浸泡於其中，將浸泡無菌渦蟲黏液的濾紙至於已塗滿純環境菌的培養基上，若其有抑菌能力即會產生抑菌環。負對照組為無菌水；正對照組為紅黴素、四環黴素眼藥膏。

## 3. 渦蟲個體抑制環境菌能力分析

於紙錠擴散法發現 25 隻渦蟲所收集之黏液並非每次皆具抗菌能力，其可能與渦蟲個體差異有關。故使用單隻渦蟲置於已塗抹環境菌之培養基上方爬行，觀察渦蟲爬行時分泌黏液對環境菌影響。

### 【實驗方法】

將渦蟲浸入 ddH<sub>2</sub>O 中 10 分鐘。以接種環挑起渦蟲，將渦蟲置於以塗抹環境菌的培養基上。待渦蟲爬行後，將渦蟲挑出。以 30°C 培養後觀察渦蟲爬行區域細菌生長情形。

# 伍、研究結果

## 一、化學分析渦蟲爬行黏液

### (一) 醣蛋白染色分析渦蟲爬行黏液中醣蛋白

#### 1. PAS 染色

由圖 9a、b 發現經染色後下方皆產生大面積色帶。

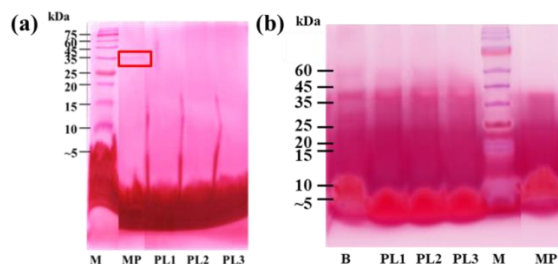


圖 9 PAS 染色分析渦蟲爬行黏液結果

(a) 使用 20% SDS-PAGE 進行染色，正對照組產生色帶（紅框處）。(b) 使用 15% 梯度膠片進行染色。樣本配置參考表。樣本注入量 20 $\mu$ L。使用無色 loading dye 進行電泳。



## 2. 過碘酸硝酸銀染色

圖 10a、b 皆發現正對照組產生色帶 (箭頭處)，而圖 10a 渦蟲爬行黏液於 10-15 kDa 處產生色帶 (圖 10 a 紅框處)。圖 10b 發現渦蟲爬行黏液染色結果含有多個色帶，除了 10-15 kDa 產生色帶，於 45 kDa (圖 10 b 紅框處) 及 5kDa 以下部分亦有色帶產生 (藍框處)。

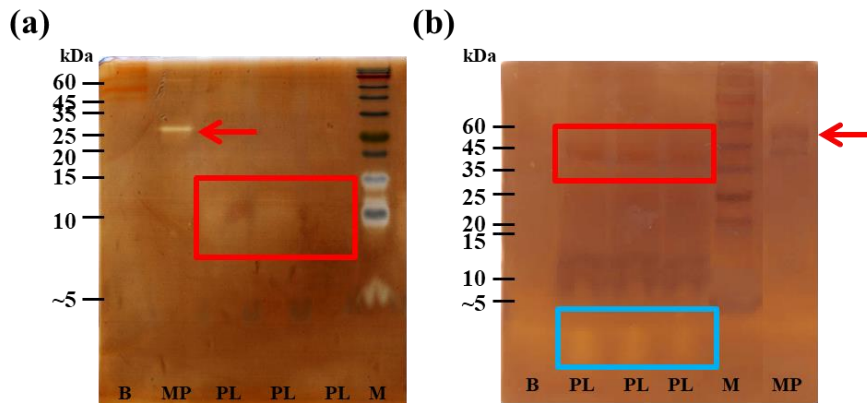


圖 10 過碘酸硝酸銀染色分析渦蟲爬行黏液結果

(a) 使用 20% SDS-PAGE 進行染色。(b) 使用 15% 梯度膠片進行染色。樣本配置參考表。樣本注入量 20 $\mu$ L。使用無色 loading dye 進行電泳。

### 【實驗討論】

#### (1) 硝酸銀染色色帶顏色不同

圖 11 為硝酸銀染色正對照組奶粉 (MP) 及負對照組 BSA (B) 經過過碘酸硝酸銀染色結果，負對照組因染色時間過長呈色。推測兩者色帶顏色不相同的原因為兩者呈色原理不同，過碘酸硝酸銀染色其呈色原理、步驟與硝酸銀色大致相同，步驟僅於膠片是否有浸泡過碘酸溶液上具差異，浸泡過碘酸能將醣蛋白中醣類相鄰官能基氧化成醛基，醛基進一步與硝酸銀液產生銀鏡反應，導致正對照組色帶顏色呈現白色；負對照組則因其無法經過碘酸氧化產生醛基並發生銀鏡反應而導致色帶顏色呈銀染之棕黑色。

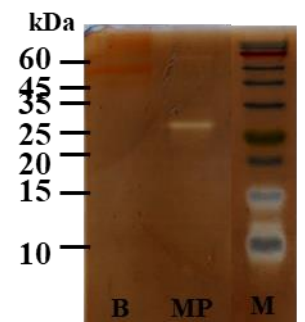


圖 11 對照組過碘酸硝酸銀染色結果

#### (2) 15% 梯度膠分離出較多種類醣蛋白

過碘酸硝酸銀染色 15% 梯度膠結果 (圖 10b)，發現其除了於 10-15 kDa 產

生色帶，於 45 kDa (紅框處) 及 5kDa 以下部分亦有色帶產生 (藍框處)。推測 15% 梯度膠體內孔徑由上至下逐步縮小，較能分離渦蟲爬行黏液中不同分子量的蛋白質。

### (3) 過碘酸硝酸銀染色色帶反白的其他原因

渦蟲黏液中含有疏水性蛋白 (徐 2018)。故推測過碘酸硝酸銀染色中醣蛋白部分產生白色色帶，其原理亦可能為黏液中疏水性蛋白結構無法與過碘酸硝酸銀染色試劑反應，導致疏水性蛋白部分無法成色，形成膠片本身顏色所導致。

## (二) 不同染色法比較

銀染 (圖 12a) 及過碘酸硝酸銀染色 (圖 12b) 交叉比對分析 20% SDS-PAGE 後，發現過碘酸硝酸銀染色中 10-15 kDa 部分於銀染中亦有呈色 (紅框處)。

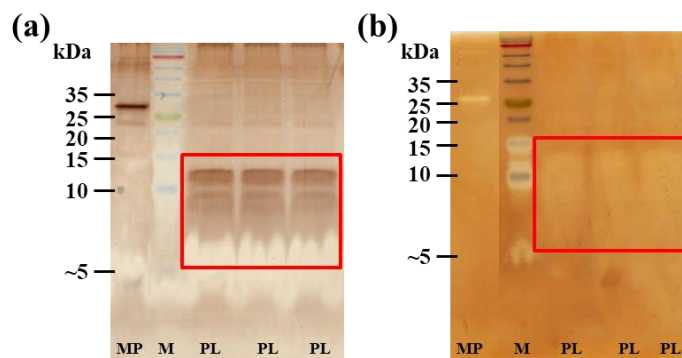


圖 12 20% SDS-PAGE 銀染及過碘酸硝酸銀染色結果

(a) 銀染結果；(b) 過碘酸硝酸銀染色結果。樣本配置參考表。樣本注入量 20 $\mu$ L。使用無色 loading dye 進行電泳。

## 【實驗討論】

### (1) 渦蟲爬行黏液中 10-15 kDa 部分亦為醣蛋白

將銀染結果與過碘酸硝酸銀染色結果比對後，發現正對照組皆於同一位置產生色帶，證明過碘酸硝酸銀染色之正確性。渦蟲爬行黏液經過碘酸硝酸銀染色分析，其於 10-15 kDa 部分產生色帶，推測渦蟲爬行黏液中 10-15 kDa 處亦為醣蛋白。

### (2) 銀染並未染出低於 5 kDa 部分

使用 20% SDS-PAGE 進行銀染分析，發現渦蟲爬行黏液低於 5 kDa 部分並未產生明顯色帶。推測為 20% SDS-PAGE 膠體孔徑小及電泳時間較常，導致小

分子部分因擴散作用而散失。

### (三) 搖晃對渦蟲黏液分泌影響

利用銀染分析發現經搖晃蒐集之渦蟲爬行黏液 (SP) 蛋白質色帶較深 (圖 13a, 紅框處)；且部分蛋白質濃度較高 (圖 13b)。

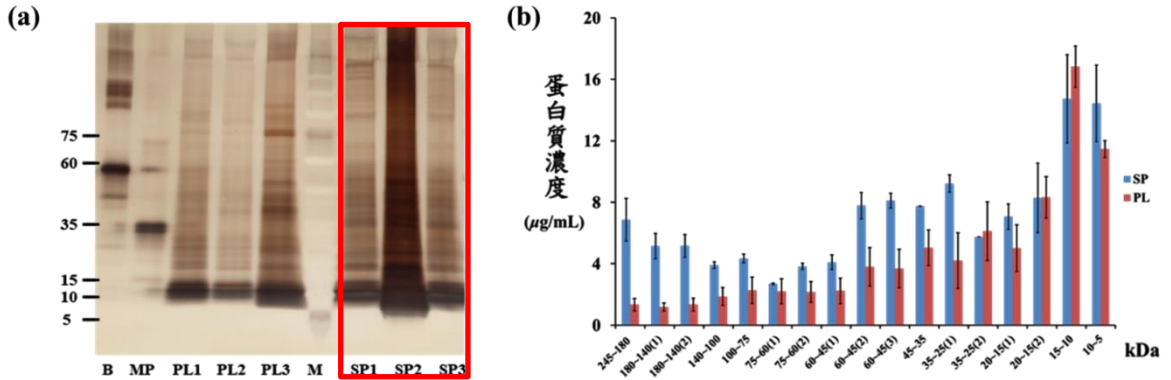


圖 13 分析渦蟲黏液經搖晃收集蛋白質濃度差異

(a) 使用 15% 預鑄膠進行電泳結果。樣本配置參照表；PL 渦蟲爬行黏液、SP 經搖晃收集之渦蟲爬行黏液。  
(b) 以 ImageJ 分析蛋白質濃度結果

## 二、物理分析渦蟲爬行黏液

### (一) 落球實驗推算渦蟲水溶性黏液黏度

圖 14a 發現 6mm 鋼球於水溶性渦蟲黏液中掉落所耗時間與 5% 膠水無差異 ( $p > 0.05$ )；使用黏度計測量 5% 膠水，其動力黏度為  $2.7 \text{ mm}^2/\text{s}$ ，其動力黏度與水及 1% 膠水呈顯著差異 (圖 14b)。

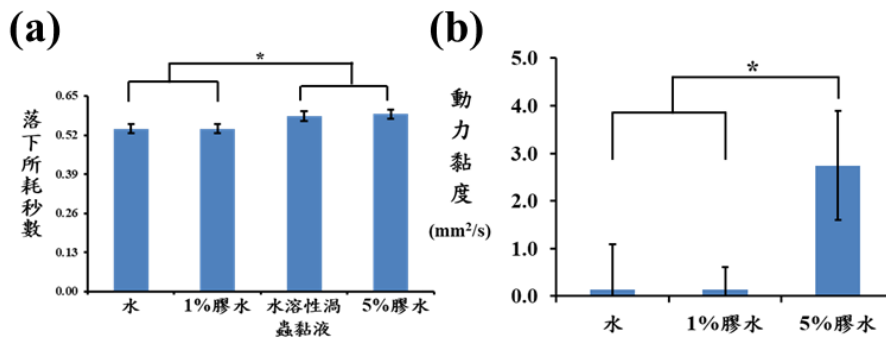


圖 14 落球實驗結果

(a) 鋼球於試液掉落所耗秒數，(b) 進一步以黏度計測量結果。鋼球直徑：6mm、重：約 0.9 克鋼球。

## 【實驗討論】

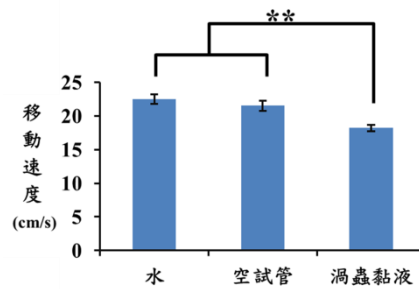
### (1) 推測渦蟲水溶性黏液動力黏度為 $2.7 \text{ mm}^2/\text{s}$

發現鋼球於渦蟲水溶性黏液中掉落所耗時間與 5% 稀釋膠水無差異 ( $p > 0.05$ )，推測鋼球於兩者掉落時所受黏性阻力無差異，而黏性阻力與液體黏度呈

正相關。故測量 5% 稀釋膠水動力黏度即可推算渦蟲水溶性黏液動力黏度。

## (二) 斜坡實驗計算球體滑落速度差異

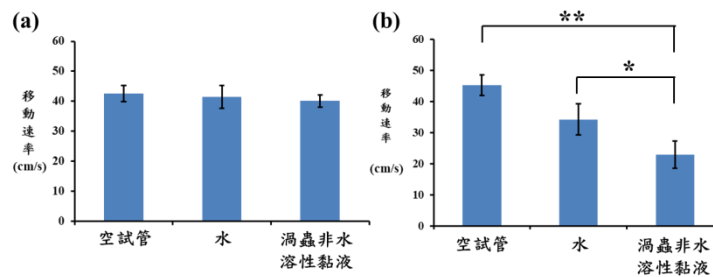
果如圖 15，發現於斜坡高度角 8° 鋼球於渦蟲非水溶性黏液中滑落速度明顯較慢，與其他組別具極顯著差異 ( $p < 0.01$ )。



**圖 15 鋼球於不同斜坡滑行速度**

使用空試管、管壁附著少量水及管壁附著渦蟲非水溶性爬行黏液進行實驗。鋼球直徑：6 mm；斜坡傾斜角度：8°。

為確認結果正確，另將斜坡高度角提高至 30° 進行實驗，發現 6mm 鋼球因質量較大滑落速度快而無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 16a)。改以質量較低之 6mm 塑膠球進行實驗，塑膠球於渦蟲非水溶性黏液中滑落速度明顯較慢，與空試管組具極顯著差異 ( $p < 0.01$ ) (圖 16b)；其滑落速度與管壁附著少量水具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



**圖 16 塑膠球於不同斜坡滑行速度**

(a) 使用 6mm 鋼球，斜坡高度角為 30° 進行實驗；(b) 使用 6mm 塑膠球，斜坡高度角 30°。所使用斜坡為空試管、試管管壁含有少量水及渦蟲非水溶性黏液。

## 【實驗討論】

### (1) 證明渦蟲非水溶性黏液具黏性

球體於斜坡滑落時，其滑動速度會受球體與斜坡接觸面影響，若斜坡表面附著物具有黏滯阻力，球體滑落速度即會減慢。故 6mm 鋼球於試管管壁附著渦蟲非水溶性黏液之斜坡滑落速度較 6mm 鋼球於空試管及管壁附著水慢，證明渦

蟲非水溶性黏液具黏性。

### (三) 搖晃對渦蟲黏液黏度影響 (實驗規劃中)

## 三、收集渦蟲爬行黏液中細菌

### (一) 鑑定渦蟲爬行黏液中細菌 (表 11)

發現渦蟲生活環境水僅發現 1 種菌落 (圖 17a)；而渦蟲水溶性黏液中觀察到 5 種形態不同之菌落 (圖 17b)。

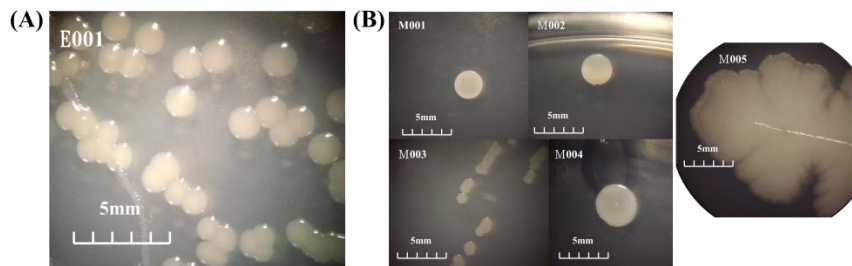


圖 17 離心管實驗所收集到之細菌

(a)為渦蟲生活境中所收集到之菌落；(b)為渦蟲水溶性黏液收集之菌落。

表 11 離心管實驗所收集到之細菌菌落描述

菌落編號	菌落描述
E001	半透明白色、表面光滑濕潤、邊緣平滑、圓形、有特殊氣味
M001	米白色、表面光滑、邊緣平滑、菌落中央呈半透明凹陷、圓形
M002	半透明白色、表面光滑、邊緣平滑、圓形
M003	米白色、表面光滑、邊緣平滑、菌落外圍呈半透明、圓形
M004	米白色、表面光滑、邊緣平滑、菌落中央突起、圓形
M005	白色、表面具顆粒感、邊緣及菌落形狀不規則

### 【實驗討論】

#### (1) 渦蟲生活環境中僅收集到單一型態菌落

將培養渦蟲生活水樣之 LB 培養液塗盤，僅發現單一型態之菌落。推測此種細菌為渦蟲生活環境中較具優勢之菌種，因此可於 LB 培養基中佔有較大優勢並大量繁殖。將進一步鑑定其細菌種類，未來可探討渦蟲爬行黏液對其是否具抗菌能力。

#### (2) 於渦蟲水溶性黏液中發現五種型態各異之菌落

於渦蟲水溶性黏液中共分出 5 種菌落型態各異之菌落，推測於渦蟲水溶黏液

中收集到較多種類菌落與渦蟲爬行黏液性質有關，渦蟲爬行黏液可能適合特殊菌種生長。未來將進一步探討與渦蟲黏液之關係。

#### 四、渦蟲爬行黏液抑制環境菌分析

##### (一) 渦蟲群體抑制環境菌能力分析

發現 25 隻渦蟲所收集到之水溶性黏液經無菌過濾後，對曝氣水中所收集到的 4 種環境菌產生抑制效果 (圖 18)，其具有明顯抑菌環 (箭頭處)。

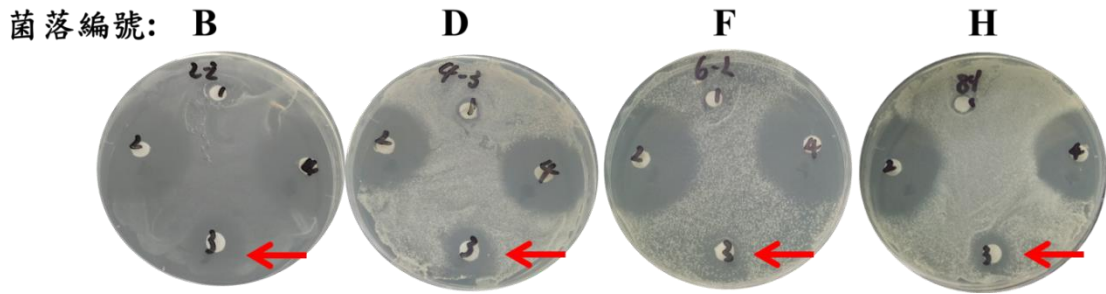


圖 18 渦蟲群體抑制環境菌結果

使用曝氣水中所收集到 8 種環境菌進行實驗。樣本編號 1. ddH<sub>2</sub>O、2. 紅黴素、3. 無菌過濾之渦蟲爬行、4. 四環黴素。

##### 【實驗討論】

##### (1) 渦蟲黏液能抑制環境中所收集到的部分陽性球菌

將 4 種被渦蟲水溶性黏液抑制之環境菌進行革蘭氏染色，發現皆為革蘭氏陽性球菌 (圖 19)，推測渦蟲黏液能抑制特殊種類之革蘭氏陽性球菌。

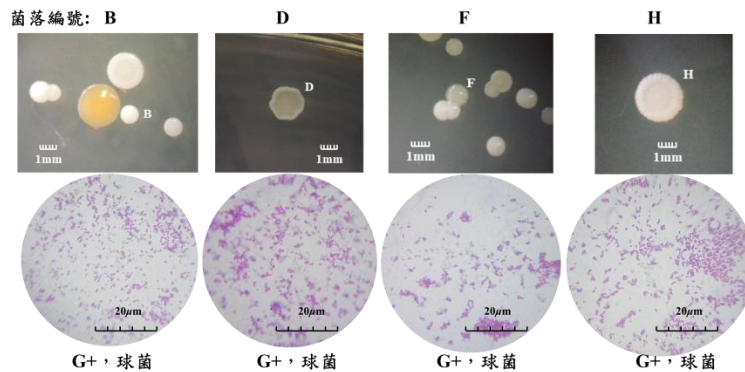


圖 19 渦蟲水溶性黏液抑制之環境菌革蘭氏染色結果

##### (二) 渦蟲個體抑制環境菌能力分析

實驗結果發現並非每隻渦蟲皆能對同一種環境菌產生抑菌效果 (圖 20)，(a) 產

生抑菌範圍 (箭頭處)；(b) 則無抑菌範圍產生。

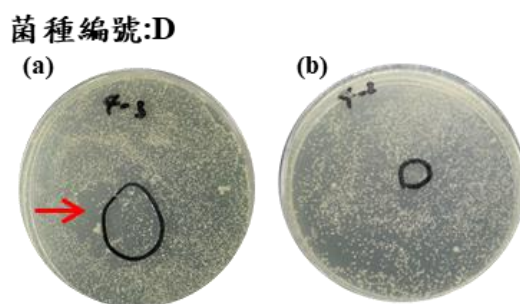


圖 20 渦蟲個體抑制環境菌結果

(a)、(b)使用同種細菌不同隻渦蟲進行實驗，僅(a)產生抑菌範圍(箭頭處)。

### 【實驗討論】

#### (1) 實驗後大部分渦蟲斷裂

渦蟲個體抑制環境菌實驗後，將參與實驗之渦蟲置於玻璃管中分開飼養觀察，發現大部分渦蟲斷裂生殖為兩隻渦蟲，推測為將渦蟲挑起時造成渦蟲受傷導致，其並不影響實驗，渦蟲於實驗結束後皆存活。

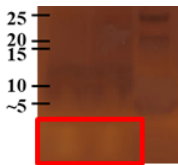
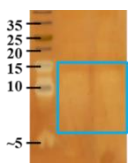
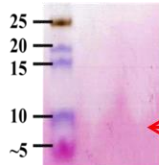
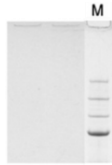
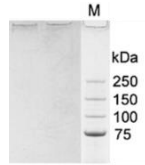
## 陸、討論

### 一、渦蟲爬行黏液黏性分析

#### (一) 比較不同物種醣蛋白染色結果

表 12 為將本實驗過碘酸硝酸銀染色、PAS 染色結果與文獻進行比較 (徐, 2018) (Li & Granham, 2007)。Li & Granham 利用 PAS 染色分析陸生渦蟲及蛞蝓黏液時，未產生明顯色帶，推測為其醣蛋白分子量小導致。而渦蟲黏液於 10 kDa 以下產生大片色帶 (紅箭頭)，推測為 Loading dye 所導致。而配置無色 Loading dye 進行染色時，膠片下方仍產生大面積色帶；以過碘酸硝酸銀染色則發現 10~15 kDa (藍框處)及 5 kDa 以下出現色帶 (紅框處)，且下方大面積色帶影響。初步推測渦蟲爬行黏液中醣蛋白分子量低於 5 kDa，且 15~10kDa 部分亦為醣蛋白。

表 12 不同物種醣蛋白染色結果比較

物種	虎紋三角渦蟲 <i>G. tigrina</i>	虎紋三角渦蟲 <i>G. tigrina</i>	陸生渦蟲 1. <i>Caenoplana coerulea</i> 2. <i>Parakontikia ventrolineata</i>	蛞蝓 <i>Lehmannia valentiana</i>	
染色方法	過碘酸硝酸銀染色	PAS	PAS	PAS	PAS
SDS-PAGE					
參考文獻	this study	(徐, 2018)	(Li&Granham, 2007)	(Li&Granham, 2007)	

## (二) 渦蟲爬行黏液中醣蛋白可能為抗菌蛋白

鯰魚體表黏液中發現一種醣蛋白，其具抗菌功能 (Abdel Shafi *et al*, 2019)、蝸牛的抗菌蛋白亦是一種小分子醣蛋白 (Otsuka Fuchino *et al*, 1992)，故推測本研究以過碘酸硝酸銀染色所得到醣蛋白亦可能是抗菌蛋白，未來可進一步使用 LC mass 鑑定 5 kDa 以下的蛋白質種類。

## (三) 推測渦蟲經搖晃刺激所收集到之黏液較黏稠

帽貝黏著性黏液及非黏著性黏液具蛋白質濃度及種類差異 (Smith *et al*, 1999)，其黏著性黏液中各類蛋白質濃度皆高於非黏著性黏液，且具非黏著性黏液中缺少之特殊蛋白質。渦蟲爬行黏液經搖晃收集後，蛋白質濃度亦有上升情形，推測其與渦蟲爬行黏液黏滯性上升有關。將進一步探討是否有特定蛋白影響渦蟲黏液黏滯性。

## (四) 渦蟲黏液流體性質比較

本研究所測量之渦蟲水溶性黏液黏度為其流體性質，其數值越大液體越黏稠，試比較渦蟲水溶性黏液黏度與其他常見流體黏度 (表 13)，其黏度約為水的 2.7 倍。



表 13 常見流體黏度比較 (參考丞宏)

常見流體	單位(mm <sup>2</sup> /s)
20°C 水	1
渦蟲水溶性黏液	2.7
牛奶	4.3
鮮奶油	20.6
植物油	43.2

## (五) 其他動物黏液黏著能力計算方法及比較

文獻中探討物種黏液作為黏著劑的黏著能力，皆有探討其承受正向應力之程度 (表 14) (應力為單位面積所承受之力，作用力與作用面垂直之應力，即為正向應力，當正向應力越大；其黏著能力越強)。因此未來將探討渦蟲黏液承受正向應力之大小，研究其開發成黏著劑之可能。

正向應力 ( $\sigma$ ) 其公式:  $\sigma = \frac{P}{A}$ ,  $P$  為垂直作用面之力，單位為：N、kg； $A$  為其受力面積，單位為 m<sup>2</sup>、cm<sup>2</sup>。求出  $\sigma$  單位為 N/m<sup>2</sup> = Pa、kg/cm<sup>2</sup>。

表 14 其他物種黏液承受正向力大小

物種	承受正向力大小	文獻
石蠶	0.26±0.2 Mpa	(Li&Granham, 2007)
青蛙	1.7±0.3 Mpa	(Graham <i>et al</i> , 2005)
陸生渦蟲	1.4±0.1 MPa	(Li&Granham, 2007)

## 二、渦蟲爬行黏液抑制環境菌分析

### (一) 抗菌蛋白的抗菌原理

抗菌肽、分子量較大的抗菌蛋白為生物的免疫系統，可以快速殺死微生物。細胞膜是由脂質分子組成的雙層結構，脂質分子分為親水及疏水端，抗菌肽亦是如此。當抗菌肽接近細胞膜時就會因親水、疏水作用而嵌入細胞膜中，越來越多抗菌肽於細胞膜上聚集時，就會使細胞膜破裂、膜內物質流出，導致細胞死亡。著名的抗菌蛋白像是石斑魚的 epinecidin-1 (陳等，2007)、蒼蠅的防禦素、蝸牛黏液中的抗菌蛋白更是一種小分子醣蛋白 (Otsuka Fuchino *et al*, 1992)。初步推測渦蟲黏液中醣蛋白可能也是小分子的抗菌物質，未來將深入探討其功能。

## (二) 推測黏液中細菌能協助渦蟲捕食蚊幼蟲

本研究發現渦蟲黏液中含有少量細菌；而徐於 2018 年初步推測渦蟲黏液中至少含有 8 種酵素，推測此結果與黏液中細菌有關，因細菌於生長過程中會產生酵素幫助分解營養物質；另陳於 2020 年研究中發現渦蟲黏液中酵素分解幾丁質需耗 3 天的時間，然而渦蟲捕食蚊幼蟲僅 10-15 分鐘，因此初步推測渦蟲捕食蚊幼蟲時除了以物理消化破壞幾丁質外殼外，黏液中細菌亦能產生酵素協助捕食。

## 柒、結論

- 一、渦蟲爬行黏液中 15~10 kDa 及低於 5 kDa 部分為醣蛋白。
- 二、初步推測渦蟲水溶性黏液動力黏度約為  $2.7\text{mm}^2/\text{s}$ 。
- 三、渦蟲黏液中至少含有 5 種細菌。
- 四、渦蟲爬行黏液能抑制 4 種環境中細菌，其抑菌能力具個體差異。

## 捌、研究貢獻

本研究於醣蛋白染色結果發現渦蟲爬行黏液中 15~10 kDa 及低於 5 kDa 部分為醣蛋白，以利未來人工合成醣蛋白分子結構，開發成防水黏著劑；本研究注重於研究渦蟲黏液應用於日常生活中可能性，針對渦蟲黏液的黏性及抗菌功能進行探討，期望能將渦蟲黏液開發成仿生材料 (防水黏著劑) 或抗菌塗料。渦蟲爬行黏液的物理分析實驗中，發現渦蟲水溶性黏液的黏度為  $2.7\text{mm}^2/\text{S}$ ，非水溶性黏液具黏滯性使鋼球於斜坡實驗中減速。另發現渦蟲黏液中含有細菌，未來可進一步探討其黏液中細菌與渦蟲爬行黏液之關係；並使用經無菌過濾渦蟲水溶性黏液進行抑制環境菌實驗，發現其能抑制環境中所收集到的 4 種革蘭氏陽性球菌，證明渦蟲黏液開發成抗菌塗料具潛能。

## 玖、未來展望

- 一、進一步分析渦蟲爬行黏液 15~10 kDa 及低於 5 kDa 部分蛋白質，分析其中醣蛋白種類。
- 二、比較渦蟲的水溶性黏液及非水溶性黏液物理性質上的差異。
- 三、探討渦蟲黏液承受正向應力之大小，研究其開發成黏著劑之可能。

- 四、分析渦蟲黏液中可能的抗菌蛋白。
- 五、確認渦蟲黏液中的細菌與本身黏液關係。
- 六、探討渦蟲黏液的抗菌原理。

## 壹拾、參考資料文獻

### 一、科展、小論文

- (一) 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。
- (二) 徐亦萱 (2018)。中華民國第 58 屆中小學科學展覽會作品說明書：驚爆「膠」點—虎紋三角渦蟲黏液功能分析。
- (三) 徐亦萱 (2019)。2019 年臺灣國際科學展覽會優勝作品：驚爆「膠」點-虎紋三角渦蟲黏液分析及功能推測。
- (四) 陳澤葳 (2020)。2020 年國際國際科學展覽會優勝作品：終「孑」之「疫」—渦蟲野外防治評估及消化蚊幼蟲機制。

### 二、書籍、期刊

- (一) 楊嘉慧 (2008)。鑿殺細菌的天然小蛋白。科學人雜誌。
- (二) 陳志毅、郭欽明、潘婕玉 (2007)。知識天地 海洋生物中的天然抗生素—抗菌蛋白。中央研究院週報第 1148 期。
- (三) Abdel Shafi, S., Osman, A., Al-Mohammadi, A.-R., Enan, G., Kamal, N., & Sitohy, M. (2019). Biochemical, biological characteristics and antibacterial activity of glycoprotein extracted from the epidermal mucus of African catfish (*Clarias gariepinus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 773–780. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.150
- (四) Etim, L., Aleruchi, C., & Obande, G. (2016). Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection. *British Microbiology Research Journal*, 11(2), 1–9. doi: 10.9734/bmrj/2016/21731
- (五) Graham, L. D., Glattauer, V., Huson, M. G., Maxwell, J. M., Knott, R. B., White, J. W., ... Ramshaw, J. A. (2005). Characterization of a Protein-based Adhesive Elastomer Secreted

by the Australian Frog *Notaden bennetti*. *Biomacromolecules*, 6(6), 3300–3312. doi: 10.1021/bm050335e

- (六) Ingram, G. A. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection-A review. *Journal of Fish Biology*, 16 (1), 23–60. doi: 10.1111/j.1095-8649.1980.tb03685.
- (七) Iguchi, S. M., Aikawa, T., & Matsumoto, J. J. (1982). Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 72(3), 571–574. doi: 10.1016/0300-9629(82)90123-2
- (八) Li, D., Graham, L.D. (2007) Epermal secretions of terrestrial flatworms and slugs : *Lehmannia valentiana* mucus contains matrilin-like proteins. *Elsevier Science Part B* 148 (2007)231-244
- (九) OBARA, K., OTSUKA-FUCHINO, H., SATTAYASAI, N., NONOMURA, Y., TSUCHIYA, T., & TAMIYA, T. (1992). Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Ferussac. *European journal of biochemistry*, 209(1), 1-6.
- (十) Smith, A. M., Quick, T. J., & Peter, R. L. S. (1999). Differences in the Composition of Adhesive and Non-Adhesive Mucus From the Limpet *Lottia limatula*. *The Biological Bulletin*, 196(1), 34–44. doi: 10.2307/1543164
- (十一) Wang, R. & Hasnain Sumaira Z. (2017). Analyzing the Properties of Murine Intestinal Mucins by Electrophoresis and Histology. *bio-protocol* 7 (14) : e2394.

### 三、網站

- (一) 丞宏科技有限公司 (無日期)。[技術資源] 黏度。2020年6月17日，取自：<https://reurl.cc/pdRYoQ>
- (二) 莊榮輝 (2002年7月27日)。酵素化學實驗。2020年6月17日，取自：<http://juang.bst.ntu.edu.tw/M1230/B3-3b.htm>
- (三) 賴婉婷、歐陽盛芝、李冬齡 (2016年9月2日)。蜘蛛絲和蠶絲合體的醫療新應用—科技大觀園。2020年6月17日，取自：<https://scitechvista.nat.gov.tw/c/L83x.htm>
- (四) 賴婉婷、歐陽盛芝、李冬齡 (2016年9月9日)。仿生貽貝黏膠將可降低胎兒手術風險—科技大觀園。2020年6月17日，取自：<https://scitechvista.nat.gov.tw/c/sZ1f.htm>

## 【評語】 052007

本研究延續前幾屆作品進一步探討渦蟲爬行黏液應用功能，以化學及物理方式分析渦蟲爬行黏液黏性，研究渦蟲黏液於生活中應用的可能性，如仿生材料 (防水黏著劑)、抗菌塗料等應用可能。化學分析利用高濃度膠片及常見醣蛋白染色法 PAS 與過點酸硝酸銀染色，並以銀染分析做對照，發現渦蟲爬行黏液醣蛋白分子量為 15~10 kDa 及低於 5 kDa 部分。物理分析利用自製落球及斜坡實驗，發現渦蟲水溶性黏液黏度為 2.7mm<sup>2</sup>/S，非水溶性黏液具黏滯性使鋼球於斜坡實驗中減速。醣蛋白染色分析渦蟲爬行黏液中醣蛋白結論不明確，過碘酸硝酸銀染色的結果有待加強宜再重做，並深入探討醣蛋白的性質及序列，抗菌實驗應該再加入不同濃度抑菌圈的實驗，比較能掌握殺菌效果。

# 前言

仿生學 (Bionics) 為模仿生物特殊生存本領的一門學問，此應用使生活更加便利。渦蟲的黏液在水中仍有黏性，能協助爬行與捕食，其黏液在開發仿生材料(防水黏著劑)上有高度潛能。多數動物黏液中含有具黏性的黏蛋白 (Etim *et al.*, 2016)，其主要成分為醣蛋白。我們團隊發現渦蟲黏液主要由蛋白質、醣蛋白和多醣所組成(王, 2017)，初步推測渦蟲黏液中醣蛋白分子量低於10 kDa(徐, 2018)，且渦蟲黏液似乎具抗菌的功能。因此本研究將探討渦蟲黏液中的醣蛋白及其抗菌功能。

## 研究器材及方法

### 一、研究器材

虎紋三角渦蟲 (*Girardia tigrina*) (圖1)、蛋白質電泳儀器及染色藥品、培養細菌、抗菌實驗等相關器材。

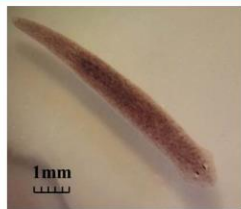


圖1 虎紋三角渦蟲

### 二、實驗架構圖

#### 如「膠」似「漆」-台灣淡水渦蟲黏液黏性及抗菌功能分析

##### 渦蟲爬行黏液黏性分析

##### 渦蟲爬行黏液抑制環境菌分析

##### 物理分析

##### 化學分析

##### 抗菌實驗

自製實驗分析黏液

搖晃對黏液黏度影響

醣蛋白染色

不同染色法比較

搖晃對黏液分泌影響

鑑定黏液中細菌

渦蟲群體抑制環境細菌

渦蟲個體抑制環境細菌

##### 推測醣蛋白與黏液關係

### 三、黏液定義

將渦蟲置 ddH<sub>2</sub>O 清洗 10 分鐘後，放入 0.5 mL ddH<sub>2</sub>O 玻璃罐中爬行 60-90 分鐘，移除實驗動物後所剩溶液溶於水部分即為水溶性黏液；而殘留於罐壁上不溶於水之黏液則定義為非水溶性黏液。

表1 渦蟲爬行黏液定義

黏液種類	收集方法	定義
渦蟲水溶性黏液	25 隻渦蟲於 0.5 mL ddH <sub>2</sub> O 玻璃罐中爬行	所剩水溶液
渦蟲非水溶性黏液	60-90 分鐘，移除實驗動物。	殘留於罐壁

### 四、統計方式

以單因子變異數 (One-way ANOVA) 分析小球落下時間、小球於斜坡滑落速率， $p < 0.05$  為顯著差異 (\*)， $p < 0.01$  為極顯著差異 (\*\*)。

## 一、渦蟲黏液黏性分析

### (一) 物理分析—落球實驗 (圖2)

搖晃收集渦蟲水溶性黏液動力黏度具顯著差異 ( $p < 0.01$ )。

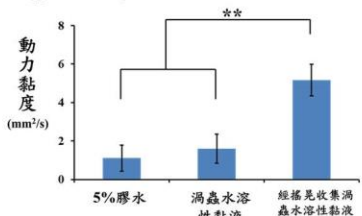
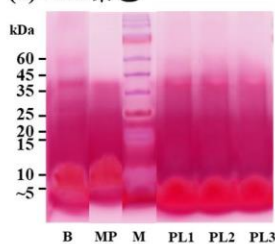


圖2 落球實驗動力黏度比較 (n=15)

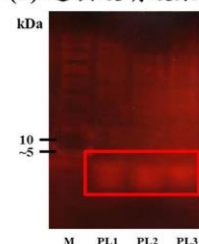
### (三) 化學分析—醣蛋白染色 (圖4)

圖4 (a) 膠片下方具大面積色帶 (b)、(c)、(d) 發現渦蟲黏液低於5、10-15及大於245 kDa 具醣蛋白 (紅框處)。

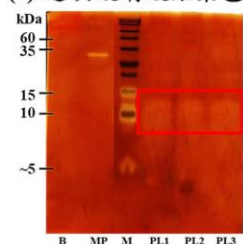
#### (a) PAS 染色



#### (b) 過碘酸硝酸銀染色



#### (c) 過碘酸硝酸銀染色



#### (d) 過碘酸硝酸銀染色

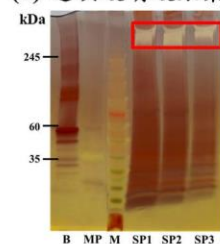


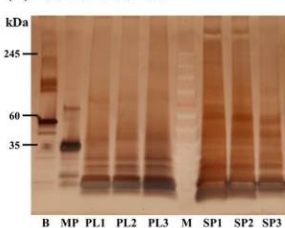
圖4 SDS-PAGE分析渦蟲黏液中醣蛋白電泳圖

B 為 BSA; MP 為奶粉; M 為標準品; PL 渦蟲黏液; SP 為經搖晃收集渦蟲黏液。樣本皆為三重複。

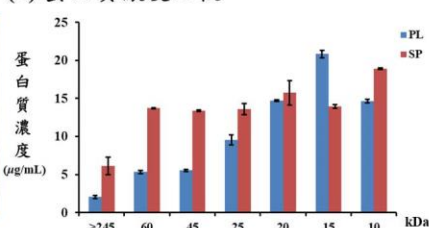
### (四) 化學分析—不同方法收集渦蟲黏液蛋白質濃度比較 (圖5)

搖晃收集渦蟲黏液蛋白質濃度較高。

#### (a) 硝酸銀染色



#### (b) 蛋白質濃度比較



#### (c) 色帶亮度比較

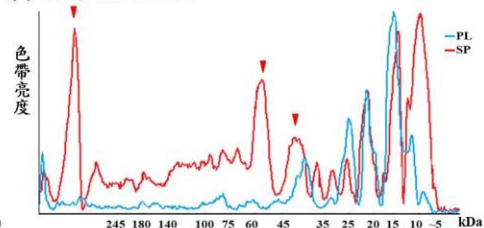


圖5 以SDS-PAGE分析不同收集渦蟲黏液方法

(a) 使用4~15% 預鑄膠片。(b)、(c) 以ImageJ分析。

## 二、渦蟲黏液抗菌分析

### (一) 初步鑑定黏液中細菌型態 (圖6)

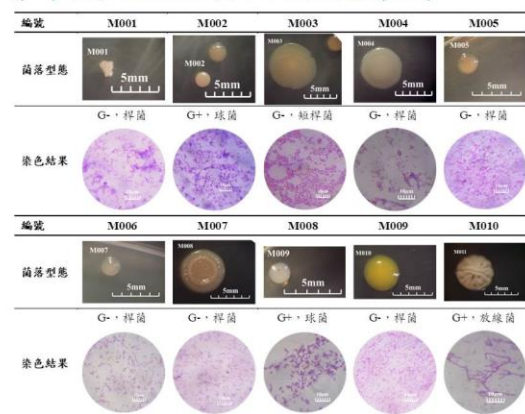


圖6 渦蟲黏液中收集到細菌

### (二) 物理分析—斜坡實驗 (圖3a、b)

渦蟲非水溶性黏液能明顯減緩小球滑下速度。

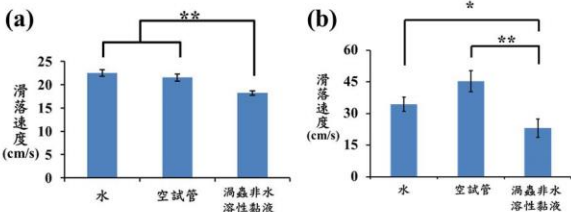


圖3 斜坡實驗滑落速度比較 (n=5)

(a) 0.6 cm 鋼球、高度角8°。(b) 0.6 cm 塑膠球、高度角30°。

### (二) 渦蟲黏液抑制環境細菌 (圖7)

渦蟲黏液對環境細菌產生抗菌環 (箭頭處)。

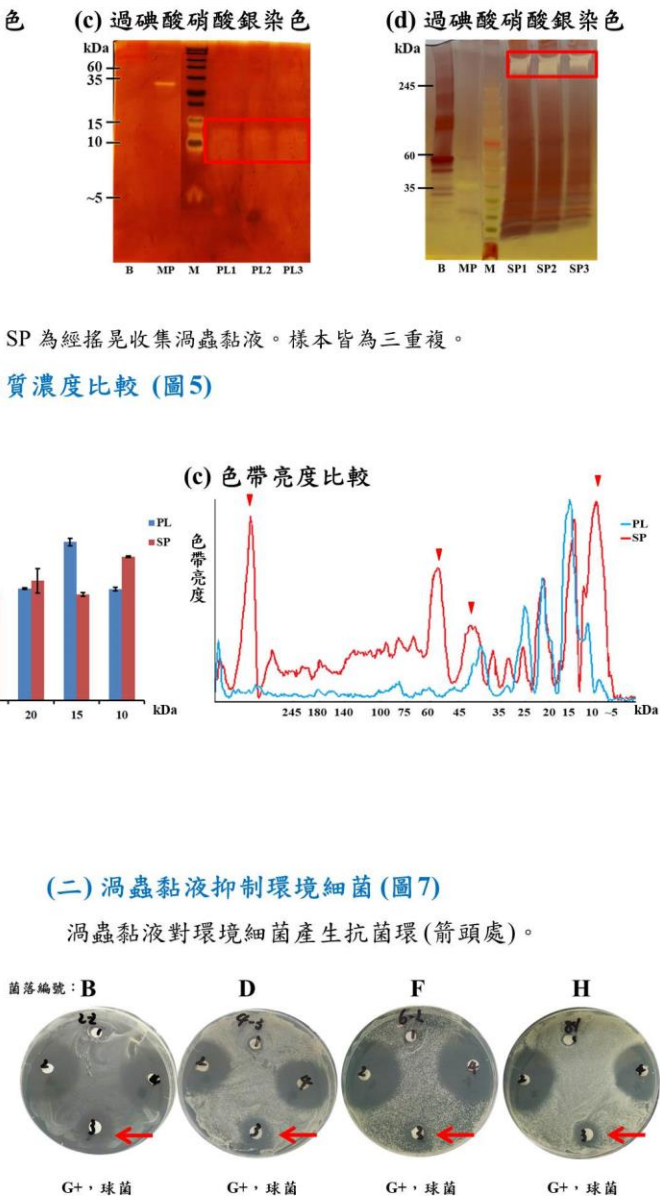


圖7 渦蟲黏液抑制環境細菌結果

使用紙錠擴散法進行實驗。紙錠編號：1 為 ddH<sub>2</sub>O、2 為紅黴素、3 為無菌過濾之渦蟲黏液、4 為四環黴素。

# 研究討論

## 一、收集條件對黏液濃度影響(表2)

表2 不同收集條件對黏液中蛋白質濃度差異

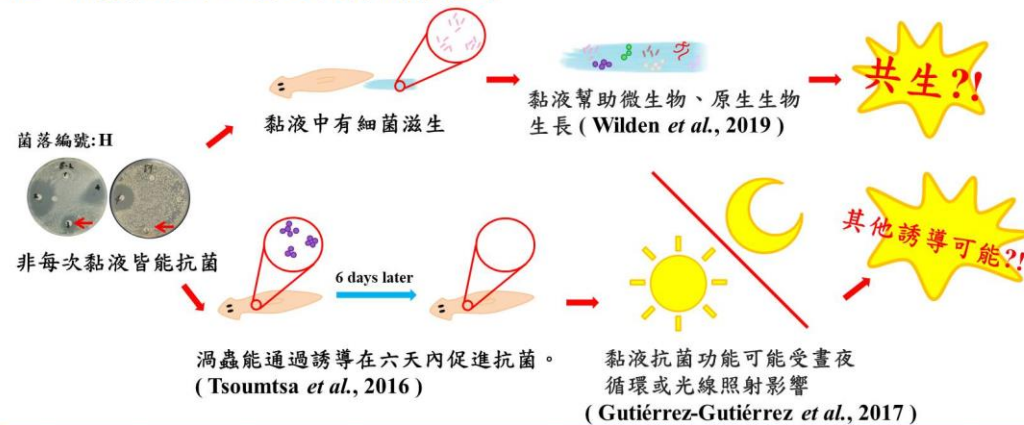
實驗動物	不同黏液差異	參考文獻
帽貝	黏性黏液	
<i>Lottia limatula</i>	蛋白質濃度較高	Smith <i>et al.</i> , 1999
虎紋三角渦蟲	搖晃後	
<i>Girardia tigrina</i>	1. 動力黏度較高 2. 蛋白質濃度提升	This study

## 三、抗菌蛋白分子量比較(表4)

表4 不同物種抗菌蛋白分子量比較

抗生素種類	提取動物	分子量推測 (kDa)	出處
Achatin-1	非洲大蝸牛	5.2	
epinecidin-1	石斑魚	7.3	查自
Cecropin A2	蠶蛾	6.9	NCBI
SALF	草蝦	10.8	
—	虎紋三角渦蟲	低於 5	This study

## 五、渦蟲黏液中細菌及抗菌機制推測



## 二、醣蛋白染色比較(表3)

表3 常見醣蛋白染色法與色帶比較

步驟差異	色帶顏色	文獻
固定液		
乙醇和醋酸	棕灰色、灰綠色	Tsai & Frasch., 1982
固定液	白色	This study
異丙醇和醋酸	—	Dubray & Bezard, 1982
直接過碘酸氧化	—	Fomsgaard <i>et al.</i> , 1990
將甲醛從步驟中去除	—	Zhu <i>et al.</i> , 2012

註: —代表並未提及色帶顏色

## 四、渦蟲抗菌相關結果比較(表5)

表5 渦蟲抗菌相關結果比較

實驗動物	結果	文獻
<i>Dugesia japonica</i>	渦蟲免疫可對抗致病菌	Abnave <i>et al.</i> , 2014
<i>Polycelis tenuis</i>	黏液附加抗菌能力較費能	Wilden <i>et al.</i> , 2019
<i>Girardia tigrina</i>	黏液能抑制 4 種 G+ 環境菌	This study

# 研究貢獻

- 一、利用簡單實驗工具證明渦蟲爬行黏液具黏性及推測其動力黏度。
- 二、發現搖晃刺激渦蟲能提升其黏液動力黏度及其中蛋白質濃度。
- 三、使用過碘酸硝酸銀染色發現渦蟲爬行黏液中醣蛋白分子量。
- 四、發現渦蟲黏液中含有特定細菌，且其黏液具有抗菌能力。

# 結論

- 一、搖晃收集渦蟲黏液動力黏度及其中蛋白質濃度提升。
- 二、渦蟲黏液於 5 以下、10~15 及大於 245 kDa 皆含有醣蛋白。
- 三、渦蟲黏液中至少有 10 種細菌，且其中特定細菌佔總細菌 54%。
- 四、渦蟲黏液具抗菌能力，推測需由誘導產生。

## 未來展望

- 一、進一步分析渦蟲黏液中醣蛋白種類。
- 二、確認渦蟲黏液 5 kDa 以下是否為抗菌蛋白。
- 三、進一步研究渦蟲與其黏液中細菌關係。
- 四、探討誘導渦蟲黏液抗菌條件。

## 參考資料

- 一、徐亦萱 (2018)。中華民國第 58 屆中小學科學展覽會作品說明書：驚爆「膠」點—虎紋三角渦蟲黏液功能分析。
- 二、Wang, R. & Hasnain Sumaira Z. (2017). Analyzing the Properties of Murine Intestinal Mucins by Electrophoresis and Histology. *bio-protocol* 7 (14): e2394. (詳細請見作品說明書)