

國立交通大學

奈米科技研究所

碩士論文

金奈米粒子對溶菌酶結構及活性影響

**The effect of gold nanoparticle on the structure and activity
of lysozyme**

研究生：林新堯

學 號：9552514

指導教授：黃國華 教授

中華民國九十七年七月

金奈米粒子對溶菌酶結構及活性影響

**The effect of gold nanoparticle on the structure and activity
of lysozyme**

研究生：林新堯

Student : Xin-yau Lin

指導教授：黃國華 教授

Advisor : Guewha Steven Huang

國 立 交 通 大 學

奈 米 科 技 研 究 所

碩 士 論 文

A Thesis

Submitted to Institute of Nanotechnology

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of Requirements

for the Degree of

Master

in

Institute of Nanotechnology

July 2008

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中 華 民 國 九 十 七 年 七 月

金奈米粒子對溶菌酶結構及活性影響

學生：林新堯

指導教授：黃國華 教授

國立交通大學 奈米科技研究所

中文摘要

我們從微觀的角度—奈米粒子與生物分子間的交互作用—去探討並觀察金奈米粒子對溶菌酶性質、活性的影響，並解釋金奈米粒子與溶菌酶彼此間的作用力。根據實驗結果發現，不同粒徑金奈米粒子使溶菌酶活性降低約 10%，且粒徑越大活性相對降低越多。金奈米粒子雖然對溶菌酶酵素活有抑制的作用，但並不會對溶菌酶結構造成影響。從 X 光繞射數據所得到的結構分析，推測金奈米粒子與溶菌酶之間吸附作用力主要是以親疏水作用力互相吸附，並非具有專一性吸附在某些帶特定電荷的殘基附近。

The effect of gold nanoparticles on the structure and activity of lysozyme

Student : Xin-yau Lin

Advisor : Dr. Guewha Steven Huang

Institute of Nanotechnology, National Chaio Tung University

Abstract

The binding of protein to solid surfaces often induces changes in the structure and activity. Here we studied the activity, structural change and interaction of chicken egg white lysozyme on gold nanoparticles(GNPs) of different diameters. The activity of lysozyme adsorbed on gold nanoparticles with different size decrease about 10% to free lysozyme. Even though the gold nanoparticles decrease the activity of lysozyme, but it does not change the conformation of lysozyme. A comparative analysis of variation in X-ray diffraction (XRD) data revealed the conformational change and interaction with gold nanoparticles at atomic resolution, we proposed that the mainly interaction between gold nanoparticle and lysozyme is the adsorption of hydrophobic/hydrophilic interaction, but not adsorb around certain of specific charged residues.

謝 誌

在交通大學奈米科技研究所碩士班兩年的研究生涯終於告一段落了，想當初懷著忐忑不安的心情來到跨領域的學習環境，多虧了大家的協助與鼓勵，讓我順利完成這碩士班兩年的時光。

首先要感謝我的指導教授 黃國華 教授，在老師的指導之下，讓我順利的進入跨領域的科學研究，也讓我不只在實驗上學到許多真功夫，也讓我在實驗觀念、學習態度以及待人處事上都有所成長。

除了在學業上獲得老師的指導，在生活上也有更多的照顧與關懷，特別是師母 洪孟燕 女士，教導我做人處事的態度，也關心我及大家的健康，經常準備美食犒賞我們的肚子，讓我感動萬分。

還要感謝清大物理 暨 同步輻射中心 陳俊榮 老師，以及 管泓翔 學長，謝謝你們讓我在同步輻射中心叨擾，並給予我實驗上的幫助及建議，讓我完成 XRD 數據分析及處理。也要感謝陽明大學 林達顯 老師及 駱啟仁 學長，謝謝你們在百忙之中幫我完成 NMR 光譜分析，並給予我實驗方向建議。

除了老師們的鼓勵、支持與協助，當然也要感謝實驗室的夥伴們。感謝孟德、凱明、耀楠、昱勳、敘安、佳典、嘉偉、志杰、永昌及禮閣學長，教導我所有基礎實驗的技巧，讓我這兩年實驗能順利進

行。感謝我的同學高超及祥溢，以及其他實驗室的中書、依蓁、上哲、
玟蓉及靖文，不論是作業、考試還是實驗問題，彼此互相幫助、學習，
讓我們一起成長，一起渡過歡笑和淚水，讓我經歷難忘的碩士班生
涯。還有實驗室的學弟們：世明、煌孟、韋旭及宏書，你們的加入，
讓實驗室更有活力！相信實驗室有你們在，未來的成果是令人期待
的！此外，還要感謝我的好朋友們：玉羚、純祥、川修、昱瑩、怡靜、
建宏、碧芸、喬俐、建竹、智詮、立德、瑋玲、惠琳、蒼君、文明、
欣悟、彥文…等，不論是實驗或生活上，因為有你們的陪伴和幫忙，
讓我一路走來不孤單，謝謝你們！

最後要感謝的是我最親愛的父母和姊姊，謝謝你們給予我最大的
支持和鼓勵，不論精神上及經濟上的支持，讓我無後顧之憂的可以完
成碩士班這兩年的學業。

能夠完成這份論文要感謝的人太多，非常可惜得沒辦法跟妳們一
一致謝，因此在最後感謝所有幫助過我的人，謝謝你們。

目錄

摘要	I
謝誌	II
目錄	III
本文	1
第一章 緒論	1
1.1 研究動機	1
1.2 研究目的	2
第二章 文獻回顧與實驗簡介	3
2.1 文獻回顧	3
2.2 金奈米粒子的特性	7
2.3 金奈米粒子的合成	10
2.4 蛋白質結構與組成	11
2.5 溶菌酶簡介	15
2.6 溶菌酶酵素活性測試	18
2.7 溶菌酶酵素結構分析	19
2.7.1 圓二色光譜儀測量原理	20
2.7.2 核磁共振分析原理	21
2.7.3 X光繞射及晶體結構分析原理	23
第三章 實驗藥品、設備與方法	24

3.1 實驗藥品	24
3.2 實驗設備	25
3.3 實驗方法	26
3.3.1 金奈米粒子之合成	26
3.3.2 金奈米粒子對溶菌酶吸附測試	28
3.3.3 金奈米粒子對溶菌酶活性影響測試	29
3.3.4 金奈米粒子對溶菌酶結構影響測試	30
3.3.4.1 利用原二色光譜分析結構影響	30
3.3.4.2 利用 X 光繞射分析結構影響	31
3.3.4.3 利用核磁共振頻譜分析結構影響	32
第四章 結果與討論	33
4.1 金奈米粒子的合成	33
4.2 金奈米粒子對溶菌酶活性影響分析	35
4.3 金奈米粒子對溶菌酶結構影響分析	37
4.3.1 利用 CD 觀察金奈米粒子對溶菌酶結構影響	38
4.3.2 利用 NMR 觀察金奈米粒子對溶菌酶結構影	43
4.3.3 利用 X 光繞射觀察金奈米粒子對溶菌酶結構影響	45
第五章 結論與建議	53
第六章 參考文獻	54

圖目錄-----	IV
圖 1. 溶菌酶結構圖-----	16
圖 2. 溶菌酶(lysozyme)與甲殼素(chitosan)作用位置-----	17
圖 3. 金奈米粒子溶液外觀-----	33
圖 4. 金奈米粒子 TEM 圖-----	34
圖 5. 金奈米粒子對溶菌酶活性的影響-----	36
圖 6. 利用 CD 光譜比較不同粒徑、不同濃度金奈米粒子對溶菌酶二級結構的影響-----	39
圖 7. 比較不同粒徑金奈米粒子對溶菌酶 CD 光譜變化-----	40
圖 8. 比較不同粒徑對溶菌酶在不同波長的 CD 光譜變化-----	41
圖 9. 比較不同粒徑對溶菌酶在波長 210nm 的 CD 光譜變化-----	42
圖 10. 溶菌酶和金奈米粒子-溶菌酶 NMR 光譜的比較-----	44
圖 11. 金奈米粒子-溶菌酶晶體外觀-----	46
圖 12. 以根均方距離分別比較加入不同粒徑金奈米粒子後，溶菌酶結構的改變-----	49
圖 13. 比較 2nm 金奈米粒子-溶菌酶和 5nm 金奈米粒子-溶菌酶兩者之間溶菌酶殘基根均方距離的不同-----	50
圖 14. 將金奈米粒子-溶菌酶結中溶菌酶的構以 Solid surface 顯示，並以顏色深淺表示殘基根均方距離差異大小-----	52

第一章 緒論

1.1 研究動機

由於許多材料在奈米 (nm, 10^{-9} m) 尺寸時，其物理性質和化學性質和巨觀時皆有所不同甚至轉變成相反的特性，科學家們利用這些不同的特性加以應用而開發出更多的技術，使得奈米科技成為近年來研究發展的重心。現今奈米化產品已普及於我們的生活之中，如：奈米化妝品、建築材料、奈米塗料、奈米化電子產品等，甚至軍事用途上。奈米粒子材料用途非常廣泛，以最常見的金奈米粒子為例，目前廣泛的應用在電子、光學、生物等領域上，尤其是在生物晶片與表面電漿生物感測器的應用上更是頻繁。

許多先進國家正如火如荼的展開奈米科技的發展，猶如新一代的工業革命，然而，奈米粒子對生物體的毒性與危害至今仍未被研究的十分透徹。在奈米科技的研究正熱烈地展開時，卻有不少人持以相反的觀點開始審慎的反向思考，評估奈米科技可能帶來的負面影響。因此我們必須在發展奈米科技的同時，謹慎的思考奈米科技對環境和人類的影響，及其可能衍生的各種問題。然而有關奈米粒子生物毒性的研究並不多見，而且奈米粒子對生物體的毒性也尚未明確，因此，奈米粒子誘發生物毒性影響值得我們做進一步的研究。

1.2 研究目的

根據文獻指出，並承接實驗室學長所發現的研究結果，奈米粒子對動物體（老鼠）及動物細胞皆會造成毒性，但是卻無法清楚指出原因及作用機制，我們根據此結論加以延伸，從更微觀的觀點—生物分子與奈米粒子間交互作用—去探討，觀察奈米粒子是否影響生物分子的性質、活性及彼此間的作用力。

本實驗以金奈米粒子與溶菌酶作為研究材料，有文獻中得知，金奈米粒子與溶菌酶可能藉由親疏水作用力、凡得瓦爾力、庫倫引力（正、負電荷相吸）、或是共價鍵而互相結合，而這些結合方式的不同，會影響金奈米粒子與溶菌酶互相吸附的位置，若溶菌酶與金奈米粒子結合位置在活性中心（active site）或在其附近，則可能會對活性造成影響。本實驗將針對預期有高生物相容性的金奈米粒子做實驗，探討金奈米粒子與溶菌酶若結合，是否可能會因金奈米粒子的物理、化學特性而破壞溶菌酶原本的立體結構，而影響溶菌酶酵素活性。

第二章 文獻回顧與實驗簡介

2.1 文獻回顧

奈米材料有許多特殊的性質與其尺寸大小的特性有關，如：量子效應、較大的原子表面積、光學、化學、物理、電阻性、導電性及磁性，皆與巨觀下的塊材性質有所不同，利用奈米粒子這些特性，其被應用的範圍相當廣泛。但是近年來在許多的研究及文獻中指出，奈米粒子對生物造成影響，讓人不得不謹慎評估奈米粒子所帶來的負面影響。

目前已有許多關於奈米顆粒及奈米材料對動物生理影響的報告及文獻。研究結果顯示，早在六十年前就有文獻指出奈米顆粒會從鼻子的神經進入靈長類動物腦部[1]，近期也有報告指出奈米顆粒進入老鼠體內，會在體內肝臟、脾臟等器官累積[2]，造成發炎作用[3]。目前有些許的研究報告指出奈米粒子具有生物毒性，主要是因為奈米粒子能產生 ROS (Reactive Oxygen Species)，透過 ROS 造成細胞的氧化傷害，如 DNA 斷裂等，或是奈米粒子也可以經由巨噬細胞的胞噬作用而升高細胞的氧化壓力，而引起發炎反應[4]；另外，也有研究指出，金奈米粒子會影響細胞內粒線體活性[5]；也有指出銀奈米粒子會降低細胞代謝、生長，並造成氧化壓力[6]。雖然目前還是不清楚奈米材料在生物體內真正的作用機制及毒性，可是許多的證據

都顯示這些奈米材料會影響或堆積在動物體內，造成傷害。雖然由生物體巨觀上的觀察，和從細胞的角度去觀察都發現傷害，但卻無法解釋其造成影響的原因，因此我們將從生物分子—蛋白質的微觀角度去討論奈米粒子對蛋白質的作用力及影響。

目前有文獻探討不同粒徑二氧化矽奈米粒子對人類碳酸酐酶 I (HCA I) 和人類碳酸酐酶 II (HCA II) 結構的影響，研究結果發現，由於奈米粒子表面曲率不同，蛋白質吸附之後對二級結構造成的影響也有不同，且粒徑越大，奈米粒子表面與蛋白質作用力越強，蛋白質二級結構改變越多，但是在蛋白質三級結構上卻幾乎不受影響。此外，文獻中也比較了結構相對較穩定的 HCA I (硬蛋白) 和結構相對較不穩定的 HCA II (軟蛋白)，發現結構相對較不穩定的 HCA II 吸附速度較快，且經過長時間處理，容易失去其三級結構[7]。

上篇文獻雖然指出二氧化矽奈米粒子會吸附蛋白質並造成其結構改變，但卻沒有討論其吸附作用力為何，因此，Norde 和 Giacomelli 在另一篇文獻中比較了親水性二氧化矽奈米粒子與疏水性聚苯乙烯 (polystyrene) 奈米粒子對小牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 結構的影響。由文獻中實驗結果，作者認為親水性二氧化矽奈米粒子對 BSA 吸附後，並不影響 BSA 二級結構，且彼此之間的吸附為可逆、

可交換的；而疏水性聚苯乙烯奈米粒子卻會明顯改變 BSA 二級結構，且彼此間吸附為不可逆、不可交換的[8]。

另外有一篇文獻認為，二氧化矽奈米粒子會明顯改變溶菌酶（lysozyme）二級結構，而二氧化矽奈米粒子粒徑大小是影響結構改變的主要因素。文獻中以圓二色光譜儀（CD）清楚定義出粒徑大小對 α -helix 影響的程度：粒徑越大， α -helix 比例越低，溶菌酶相對活性也降低。作者認為造成此影響是因為粒徑越大的奈米粒子表面曲率越低，因此對溶菌酶有較高的覆蓋率，使溶菌酶受到影響區域較大[9]。

根據 Lundqvist, Sethson[7]和 Norde, Giacomelli[8]提出的兩篇文獻比較，雖然都有以二氧化矽奈米粒子做實驗，但結果卻有所出入：Lundqvist 認為二氧化矽奈米粒子會改變蛋白質（人類碳酸酐酶）二級結構，但 Norde 確認為二氧化矽為親水性，不會改變蛋白質（小牛血清蛋白）二級結構。雖然兩者使用不同的蛋白質做比較，結果卻有極大的差異，因此，由這兩篇文獻依然無法確定奈米粒子對蛋白質的作用力以及結構影響。

此外，也有文獻指出，經由修飾的金奈米粒子與蛋白質鍵結之後，會因奈米粒子表面親疏水性值或是表面修飾的官能基而改變蛋白質的二級結構[10,11]。

綜合比較以上文獻，我們可以發現，雖然有許多奈米粒子對蛋白質影響的文獻，但卻沒有人能夠清楚指出奈米粒子與蛋白質之間的作用力與影響，且對於一般認為生物相容性佳的金奈米粒子的報導也非常少，因此，我們將探討金奈米粒子對蛋白質的影響。



2.2 金奈米粒子的特性

許多金屬奈米粒子被應用在許多不同的領域，其中最常被利用的金屬奈米粒子不外乎金、鉑、銀、鐵...等，或是其他金屬氧化物。如二氧化鈦 (TiO_2)、氧化鐵 (Fe_2O_3)、氧化鋅 (ZnO) ...等。而以金奈米粒子來說，因為金為生物相容性最佳的金屬，因此金奈米粒子在生化相關領域上的應用特別多。

Turkevich (1954) 及 Doremus (1964) 等人提出金奈米粒子的光學性質與金奈米粒子的粒徑大小有關，他們所整理出來的數據明確的指出金奈米粒子的的大小的確改變了其光學性質，特別是小粒徑的金奈米粒子[12]。金奈米粒子溶液在可見光的量測中，可見光波長的紅移會因為金奈米粒子粒徑大小與其粒徑間的距離不同而發生，而由肉眼所觀測的溶液也會顯示各種不同的顏色變化。金奈米粒子的大小範圍在 2.6 nm ~ 10 nm 時，在可見光 ($\lambda_F = 520 \text{ nm}$) 有一相當高的吸收值，而在這粒徑範圍內，金奈米粒子的光學性質與其粒徑大小是無關的。當金奈米粒子的粒徑大於 10 nm 時，可見光的吸引值會大幅降低且可見光波長會紅位移 (red-shift) 到長波長 (long-wavelength) 處。因此，若金奈米粒子的粒徑由數十個奈米增加到大約 80 nm，則我們由肉眼所觀察到的金奈米粒子溶液會由紅紫色變成藍灰色。較小粒徑的金奈米粒子 (2-5 nm) 溶液是呈淡黃褐色，一般粒徑範圍的金奈米粒

子 (10-20 nm) 溶液是呈紅紫色，而大粒徑的金奈米粒子 (30-64 nm) 溶液則是呈藍灰色。Granqvist 和 Hunderi 發現奈米粒子的形狀也會影響到它的光學性質，若奈米粒子聚集，會使得吸收強度降低及吸收波長紅位移[13]。金奈米粒子的聚集會伴隨著金奈米粒子溶液顏色的改變以及金奈米粒子出現沉澱的現象。美國西北大學化學系 Mirkin 教授也是利用金奈米粒子所具有特殊的光學性質，將 DNA 固定於金奈米粒子表面，來當作基因序列檢測的方法[14,15,16]。

金奈米粒子被拿來當作生物上的標定是相當受到重視的一種研究方法，它被廣泛的應用在生物體及細胞上的研究。金奈米粒子在生物感測器上因其奈米的特性可使儀器的偵測訊號被放大，例如金奈米粒子可應用於表面電漿共振儀 (SPR)：表面電漿共振是一種靈敏度高的表面分析方法，主要是偵測分子吸附在金膜表面上導致其介電常數的變化，藉此可推得吸附在金膜的分子質量[17]；。當金奈米粒子固定化於金膜表面上會導致共振角度有大幅度的位移、較寬的電漿共振波以及反射度 (reflectance) 的增加，這些現象的產生主要是因為金奈米粒子增加了表面質量、金奈米粒子有較高的介電常數以及金奈米粒子與金膜間有很好的電磁耦合 (electromagnetic coupling) 效應。

另外金奈米粒子也被應用在石英晶體微量天平 (QCM)：QCM 是一種利用頻率的改變而偵測質量變化的儀器，QCM 是在兩電極中有

一石英晶體的儀器，石英是壓電式的（piezoelectric），當給予一共振頻率電壓通過電極時會造成晶體形變而振動，當電極上吸附帶偵測目標時，可以量測到其共振頻率的改變；因為生物分子的質量都是非常微小，所以將生物分子固定化於金奈米粒子可增加其質量，因此 QCM 所能偵測到頻率變化的訊號就會被放大[18,19]。



2.3 金奈米粒子的合成

在 1973 年，Frens 提出一個簡單合成金奈米粒子的方法[20]，他使用檸檬酸鈉（sodium citrate）還原法來還原四氯金酸（ HAuCl_4 ），製備粒徑均一的金奈米粒子溶液，這樣的一個方法提出後，馬上被應用於生物上的研究，同樣使用類似的方法亦有 Stathis 和 Fabrikas 等人使用抗壞血酸鈉（sodium ascorbate，維生素 C 鈉）來還原四氯金酸溶液來生產金奈米粒子[21]。這些方法所合成出來的金奈米粒子皆是內層由奈米金球所構成，外層則是包覆了一層帶負電荷的離子層，所以這些金奈米粒子會因為靜電排斥而分散於溶液相中。使用還原法的優點在於在製備奈米粒子時，不需有機溶劑來參與反應。

本實驗以檸檬酸鈉還原法（citrate method），利用不同濃度比例的檸檬酸鈉還原氯金酸，藉此得到粒徑控制精確且分布均勻的金奈米粒子。

2.4 蛋白質結構與組成

蛋白質是經由胺基酸所組成的多胜鏈 (polypeptide chain)，而不論是何種蛋白質，組成的胺基酸皆是20種基本胺基酸的其中數種，蛋白質是生物體內維持各種機能之重要分子，其具有催化反應、保護功能、輸送功能、構造作用、收縮作用和基因調節等功能。

蛋白質在產生生物體特有的功能時，會因蛋白質個別的結構不同而產生其不同的功能及活性，若結構遭受破壞或改變，會使蛋白質暫時或永久失去活性，而無法正常發揮功能。所以要使蛋白質能有效催化各種反應進行，除了要有正確的一級結構外，還必須要考慮其特定立體結構和它的穩定性。一般定義上將蛋白質的結構分成四級：

1. 一級結構

為多個胺基酸由肽鍵 (peptide bond) 連接而成的鏈狀；即一個胺基酸的羰基 (carbonyl group) 碳與另一個胺基酸的胺基 (amino group) 氮以共價鍵結形成之醯胺鍵連接而成。

2. 二級結構

在蛋白質結構中，胺基酸序列的某些區段藉由側鏈官能基之間鍵結形成一特殊的形狀，通常產生二級結構的鍵結為氫鍵。一般二級結構可分為 α -螺旋 (α -helix)、 β -摺板 (β -pleated sheet) 或不規則卷曲 (random coil)，其中 β -摺板又可分為同向平行 (parallel) 和反向平

行 (antiparallel) 兩種。

3.三級結構

整個多胜肽鏈的立體結構，形成的主要作用力為疏水作用力、氫鍵、靜電作用力、雙硫鍵等鍵結。蛋白質在三級結構正確具有生化活性，破壞其結構可使蛋白質失去活性。

4.四級結構

由數條相同或不同胜肽鏈所構成，即是由許多次單元彼此間以弱鍵相互作用而形成的結構，以形成更複雜的生理功能，穩定此結構的作用力類似於穩定三級結構的作用力。

而維持其特定立體結構的穩定需靠蛋白質分子內共價鍵 (covalent：雙硫鍵) 與非共價鍵 (noncovalent：疏水作用力、氫鍵、靜電作用力等) 的作用力結合，形成三維的立體結構，而穩定蛋白質結構之作用力依鍵結強弱可分為兩類：

1.非共價鍵結

a) .疏水作用力 (hydrophobic interaction)

蛋白質分子上中性胺基酸的非極性側鏈之殘基，因其側鏈皆為疏水性官能基，易聚集在一起而在其分子內部之中心形成一穩定而緻密之疏水性區域，此大量的疏水作用力扮演穩定三級結構之重要力量，亦提供蛋白質內部的穩定作用。

b) .氫鍵 (hydrogen bond)

參與胜肽結合之胺基酸側鏈之間可形成氫鍵，在胜肽鏈本身的氧原子和氫原子之間亦可形成氫鍵，而蛋白質的極性殘基與水分子間亦可形成氫鍵，具有很強的方向性，這些氫鍵在維持蛋白質的三、四級結構上皆扮演重要角色，亦為穩定二級結構的主要力量。

c) .靜電作用力 (electrostatic interaction)

在蛋白質分子表面上帶有正負電性的胺基酸殘基之間因庫倫引力易形成靜電鍵結，使兩帶相異電荷之官能基團相鄰在一起，藉以穩定蛋白質結構。

2. 共價鍵結

a) .胜肽鍵 (peptide bond)

胺基酸以胺基和羧基形成胜鏈之鍵結，亦是決定蛋白質一級結構的主要鍵結，此特性對蛋白質的高級結構具深遠影響。

b) .雙硫鍵 (disulfide bond)

在兩半胱胺酸 (cysteine) 殘基間形成的雙硫鍵將多肽鏈的兩部份透過一胱胺酸 (cysteine) 殘基而連接在一起，當雙硫鍵形成時會限制蛋白質在摺疊過程，且當所有穩定蛋白質結構之作用力皆形成後，雙硫鍵具有固定住蛋白質最後結構的功能[22]。

在蛋白質結構中，非共價作用力是維持蛋白質三級結構之主要力

量，但由於其鍵結力量相當弱，可輕易的將其破壞，蛋白質結構也會因此而鬆散成無特定立體結構（random coil）之鏈，此蛋白質結構的破壞稱之為變性作用（denaturation）。一般變性作用僅限於破壞穩定蛋白質二、三、四級結構之力量，而不影響一級結構。蛋白質的變性方法很多，主要可分為物理法、化學法及生物法三種，常見的蛋白質變性方法如：物理方法的改變溫度、壓力、機械應力；化學方法的強酸（鹼）、有機溶劑、清潔劑、還原劑、鹽濃度；生化方法的酵素分解（Protease）等[23]。



2.5 溶菌酶簡介

溶菌酶(Lysozyme)最早於1921年為Alexander Fleming所發現，是目前所知的第一種天然抗菌素。溶菌酶普遍存在生物體液中，如血液、眼淚、鼻涕等組織液，植物中也可發現它的存在。

溶菌酶分子約為一扁長橢圓球體，主要分為兩個區域：(1) α -domain：為三個 α -helices所組成，(2) β -domain：為兩個 β -sheet及不規則環(irregular loop)所組成，其結構如圖2-1所示。溶菌酶的胺基酸序列中，殘基38~55幾乎都是親水性，而前40個殘基有利於形成 α -helix，酸性(Asp及Glu)與鹼性(Lys、Arg及His)胺基酸的側鏈和末端殘基分布在分子表面，疏水的核心和突出表面的親水性胺基酸側鏈都讓其更穩定。溶菌酶催化機制不含輔酶或金屬離子，其催化反應主要由溶菌酶立體結構上六個胺基酸殘基所構成的深凹陷，可以容納基質中的六個糖單元，來水解微生物細胞壁多醣類間的N-acetylglucosamine (NAG)及N-acetylmuramic acid (NAM)之 β (1 \rightarrow 4) 糖苷鍵結[24]。

本實驗所使用的溶菌酶(Lysozyme)來源為母雞蛋白(hen egg-white)，是一個經X光結晶學研究已決定完整立體構造的酵素。共由18種，129個胺基酸所組成，是一單條多肽鏈之酵素，分子量約為14.3kDa。

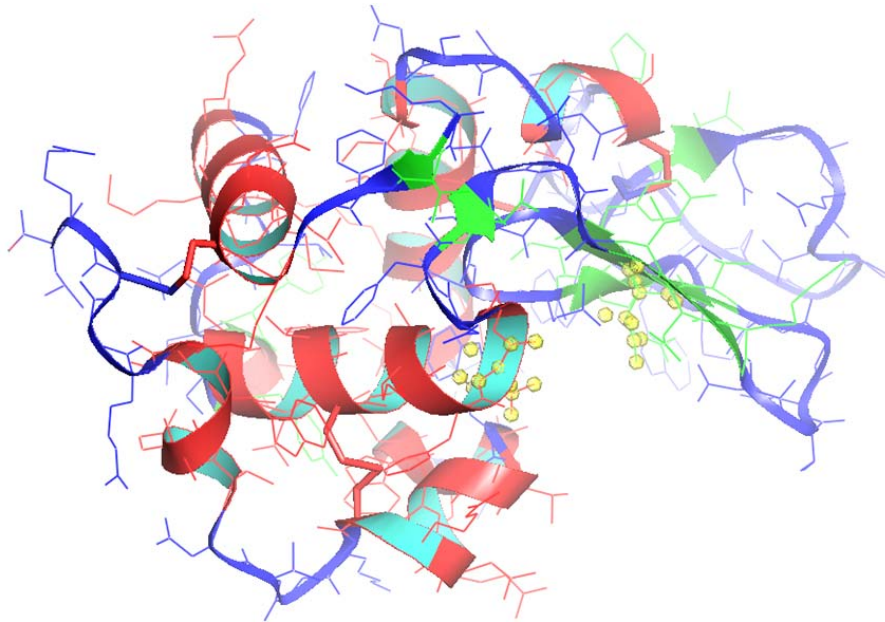


圖 1：溶菌酶結構圖：紅色部分為結構中 α -helices 部分；綠色部分為 β -sheet；藍色部分為 irregular loop 或 random coil 部分；黃色部分為溶菌酶主要之活性中心（activity site），活性中心為第 35 和第 52 個胺基酸。

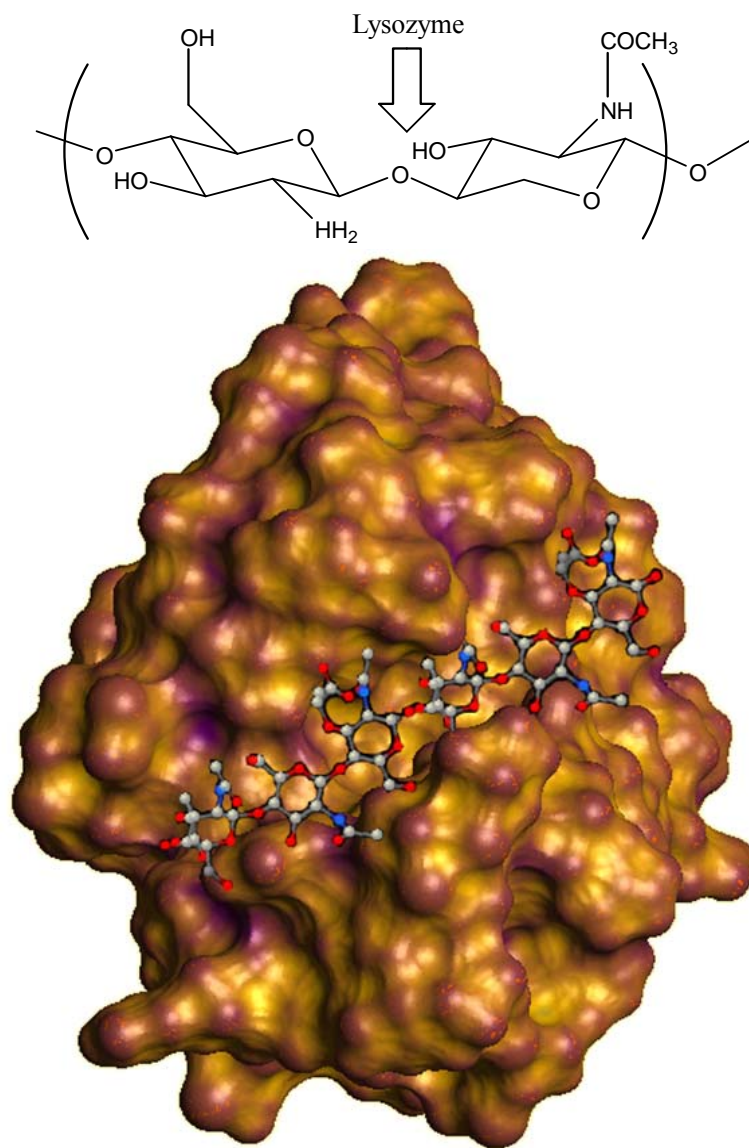


圖 2：溶菌酶 (lysozyme) 與甲殼素 (chitosan) 作用位置。

2.6 溶菌酶酵素活性測試

實驗方法參考 Ellis (1990) [25]，溶菌酶活性單位 (U) 之定義為每 0.001 分鐘始含菌溶液吸光值減少量。以雞蛋白溶菌酶溶於 pH 4.5，0.1 M 醋酸鈉緩衝溶液 (sodium acetatae buffer) 配製成溶菌酶標準液，其濃度為 1 mg/ml，而後再以 pH 4.5，0.1 M 醋酸鈉緩衝溶液配製 0.5% 甲殼素溶液。取溶菌酶之標準液 10、20、30、40、50ul，分別加入 2ml 0.5% 甲殼素溶液反應 30 分鐘，之後加入 2ml 濃度 0.5mg/ml 赤血鹽的碳酸鈉溶液，於 100°C 呈色反應 15 分鐘，分別量測並記錄波長 420nm 之吸光值，根據不同濃度溶菌酶之標準溶液其對吸光值之改變作圖。之後再以固定比例混合金奈米粒子溶液重複以上步驟，記錄反應後之吸光值，依據其吸光值的改變量，由檢量線推估混合奈米金粒子之後溶菌酶酵素之活性。

2.7 溶菌酶酵素結構分析

蛋白質是生物體內維持各種機能之重要分子，而蛋白質的功能決定於它的結構。生物巨分子（包含DNA、RNA 和蛋白質）的三維結構，已漸漸成為在分子層次上了解各種生命現象所不可或缺的要素。在蛋白質結構當中個別蛋白質的研究並非一項新的研究領域，化學家及生物學家不斷的追求有關蛋白質的更多知識，以及瞭解它們如何相互聯合或與其它的分子聯合而在細胞中運作，這是因為它們的結合將會影響其結構，而在蛋白質結構上一點點的變化，就會對其功能有決定性的影響，因此要掌握其結構狀況，就必須擁有“目睹”的能力。過去以來，用於確定蛋白質結構的方法可分為三類：（1）圓二色旋光光譜儀（CD）；（2）結晶-X射線繞射（x-ray crystallography）；（3）核磁共振（nucleic magnetic resonance；NMR）。本實驗將透過這三種方法分別觀察溶菌酶酵素結構。

2.7.1 圓二色光譜儀測量原理

圓二色光譜儀 (CD) 主要是利用一個偏極光 (polarized light) 通過具有旋光性的物質，而此偏極光又可分成右旋偏極光 (right circularly polarized light) 及左旋偏極光 (left circularly polarized light)，當它們同時通過不具有旋光性的物質時，左右旋偏極光的前進速度是相同的，因此在通過非旋光性物質後兩偏極光並無差別，而在通過具有旋光性物質時左右旋偏極光前進的速度並不會相等，因此在通過具有旋光性物質之後，偏極光方向 (相角) 會產生偏轉，而圓二色光譜儀主要是偵測此偏轉變化的值，定義為分子對左旋偏極化光的吸收係數與對右旋偏極化光的吸收係數差。藉由圓二極光於遠紫外光範圍 (far-UV, 190~250nm) 之光譜圖形可以鑑定蛋白質二級結構， α -helix、 β -sheet 和 random coil 等二級結構分別會在遠紫外光-圓二極光呈現特有之圖形及光譜強度， α -helix 會在波長 202 及 222nm 有最大的負訊號， β -sheet 特徵訊號則是在波長 218nm 的地方有最大負訊號，而 random coil 則是在波長 197nm 有一個最大的負特徵訊號。藉由此原理，我們首先利用圓二色光譜儀，初步測試不同濃度、不同粒徑之金奈米粒子對溶菌酶二級結構的影響。

2.7.2 核磁共振分析原理

在核磁共振技術發明之前，X-ray晶體學是唯一能解出分子在三度空間中立體結構的方法。

1924年物理學家鮑利 (Wolfgang Pauli) 提出：物質中的原子核，在某些狀況下，會以角動量運動，即自旋的方式，而變得有磁性。核磁共振光譜法是在探討物質與電磁波作用時所分支出的一門學問。核磁共振基本原理為：原子、電子及核都具有角動量，其磁矩與相應的角動量之比稱為磁旋比 (γ)。磁矩 (M) 在磁場 (B) 中受到轉矩 $MB\sin\theta$ (θ 為 M 與 B 間夾角) 的作用。此轉矩使磁矩繞磁場作加速運動，加速度的角頻率 $\omega = \gamma B\omega_0$ ， ω_0 稱為拉莫爾頻率。由於阻尼作用，這一加速運動會很快衰減掉，即 M 達到與 B 平行，加速就停止。但是，若在磁場 B 的垂直方向再加一高頻磁場 $b(\omega)$ (角頻率為 ω)，則 $b(\omega)$ 作用產生的轉矩使 M 離開 B ，與阻尼的作用相反。如果高頻磁場的角頻率與磁矩加速度的拉莫爾 (角) 頻率相等 $\omega = \omega_0$ ，則 $b(\omega)$ 的作用最強，磁矩 M 的加速度夾角 (M 與 B 角的夾角) 也最大。1946年，Bloch和Purcell兩位物理學家發現，不同物質核磁矩與外加磁場電磁波產生交互作用，會吸收特定電磁波頻率，此頻率與原子和種類有關，也和原子的化學環境有關，藉由此種關係可以推測出分子的結構。在1966年，Ernst利用高強度不同頻率的電磁脈衝激發原子核的自

旋，在收集自由感應衰減訊號（FID），並利用傅立葉轉換（Fourier transform）和多次累加，成功的提高靈敏度。到了1976年，Jeener成功實驗出二維圖譜技術後，使核磁共振光譜解析度大為提升，成為分析生物巨分子的工具之一。

在蛋白質結構的研究中，最常使用的方法為X光繞射和核磁共振光譜分析，二者最大的不同處在於X光繞射法必須先將蛋白質結成晶體後，才能進行結構上的分析，而以核磁共振光譜則可測得在溶液環境下分子的結構。蛋白質存在生物體中，主要都是在溶液環境下發揮作用，且結構通常具有相當大的彈性，有時形成結晶後已與先前活化狀態的型態不同，由X光繞射法所得到的結構，並非都可正確的表現出蛋白質於活性狀態下的構形，因此用核磁共振光譜法對蛋白質結構的研究帶來很大的幫助。

2.7.3 X 光繞射及晶體結構分析原理

最常用來確定蛋白質立體空間結構的方法為X光繞射法，首先利用各種結晶的方法長出蛋白質晶體後，再以X光繞射收集繞射數據，並加以分析以解出其結構。利用同步輻射X光光源之高解析繞射分析金奈米粒子-溶菌酶之立體結構，因為其光源光子密度大、準直性佳、且強度為一般X光光管強 $10\sim 10^5$ 倍，因此能得到高解析度的繞射圖譜，進而對溶菌酶結構做詳細的分析。

在數據處理方面，首先先對繞射圖譜處理，我們利用軟體計算每個繞射點的強度並做積分，刪除不理想的繞射數據，並做檔案轉換。之後再利用軟體以PDB (RCSB PDB, RCSB Protein Data Bank) 上一般溶菌酶結構建立模型，根據繞射圖譜解析所得的電子密度做計算，再作結構精調，使胺基酸側鏈能夠符合電子密度，以得到理想的R值。最後再比較加入金奈米粒子前後溶菌酶的結構，以分析其差異。

第三章 實驗藥品、設備與方法

3.1 實驗藥品

溶菌酶 (Lysozyme, USB)

醋酸 (Acetic acid, 99.7%, J.T.Baker)

醋酸鈉 (Sodium acetate, 99.5%, Merck)

氫氧化鈉 (Sodium hydroxide, 99%, Riedel deHaën)

氯化鈉 (Sodium chloride, 99.8%, Sigma-Aldrich)

碳酸鈉 (Sodium carbonate, 99.8%, Sigma-Aldrich)

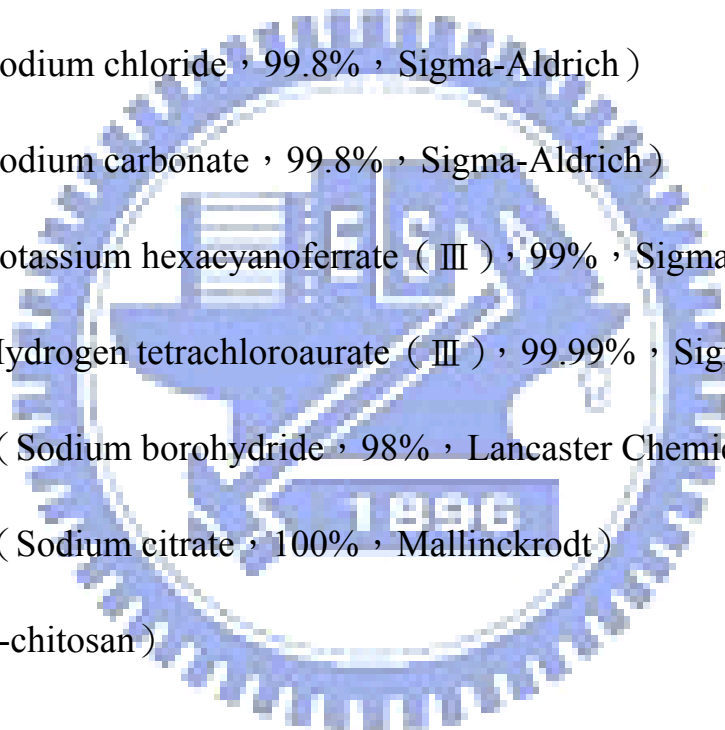
赤血鹽 (Potassium hexacyanoferrate (III), 99%, Sigma-Aldrich)

氯金酸 (Hydrogen tetrachloroaurate (III), 99.99%, Sigma-Aldrich)

硼氫化鈉 (Sodium borohydride, 98%, Lancaster Chemical)

檸檬酸鈉 (Sodium citrate, 100%, Mallinckrodt)

甲殼素 (α -chitosan)



3.2 實驗設備

加熱板 (Corning)

離心機 (Kendor)

水浴槽 (Kansin)

光學顯微鏡 (Leica)

核磁共振儀 (Bruker)

穿透式電子顯微鏡 (Hitachi)

紫外可見光分光光譜儀 (Hitachi)

同步輻射先進光源 (NSRRC)



3.3 實驗方法

3.3.1 金奈米粒子之合成

A. 12nm 金奈米粒子合成方法：

1. 配製 1 mM，500 mL 的 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液，並加熱至沸騰。
2. 配製 38.8 mM，50 mL 的檸檬酸三鈉溶液。
3. 取步驟1.和步驟2.所配製的兩溶液以體積比1：10混合攪拌，持續加熱10分鐘。
4. 反應時其溶液顏色變化由淡黃色變成深紅紫色，靜置至室溫後，放入冰箱保存。

B. 5nm 金奈米粒子合成方法：

1. 配製 0.5 mM，500 mL 的 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液，並加熱至沸騰。
2. 配製 0.5 mM，50 mL 的檸檬酸三鈉溶液。
3. 配製 0.1M，50 mL 的硼氫化鈉溶液。
4. 取步驟1.、步驟2.和步驟3.所配製的溶液以比例5：5：0.3混合攪拌，持續加熱10分鐘。
5. 反應時其溶液顏色變化由淡黃色變成粉紅色，靜置至室溫後，放入冰箱保存。

C. 2nm 金奈米粒子合成方法：

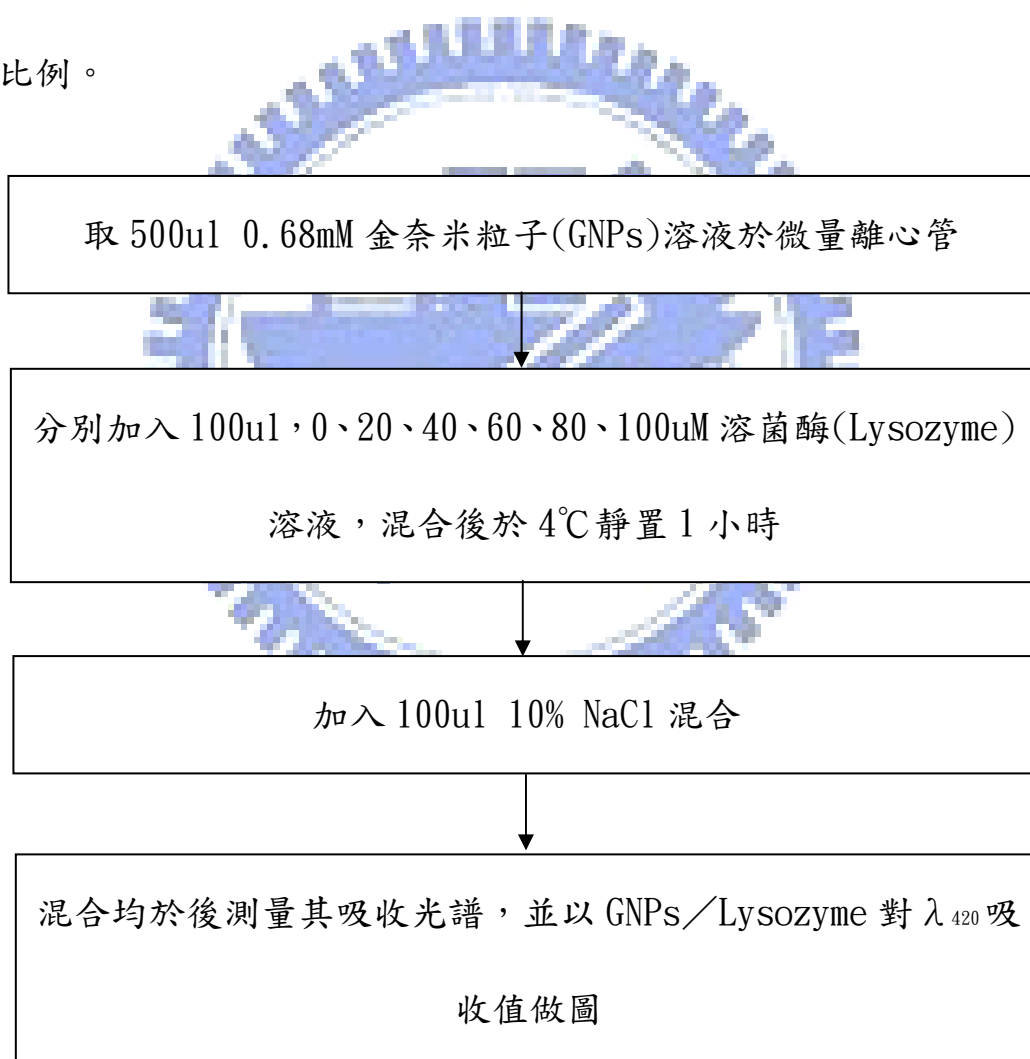
1. 配製 0.5 mM，500 mL 的 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液，並加熱至沸騰。

2. 配製0.5 mM，50 mL 的檸檬酸三鈉溶液。
3. 配製0.1M，50 mL 的硼氫化鈉溶液。
4. 取步驟1、步驟2.和步驟3.所配製的溶液以比例2：5：0.3混合攪拌，持續加熱10分鐘。
5. 反應時其溶液顏色變化由淡黃色變成粉紅色，靜置至室溫後，放入冰箱保存。



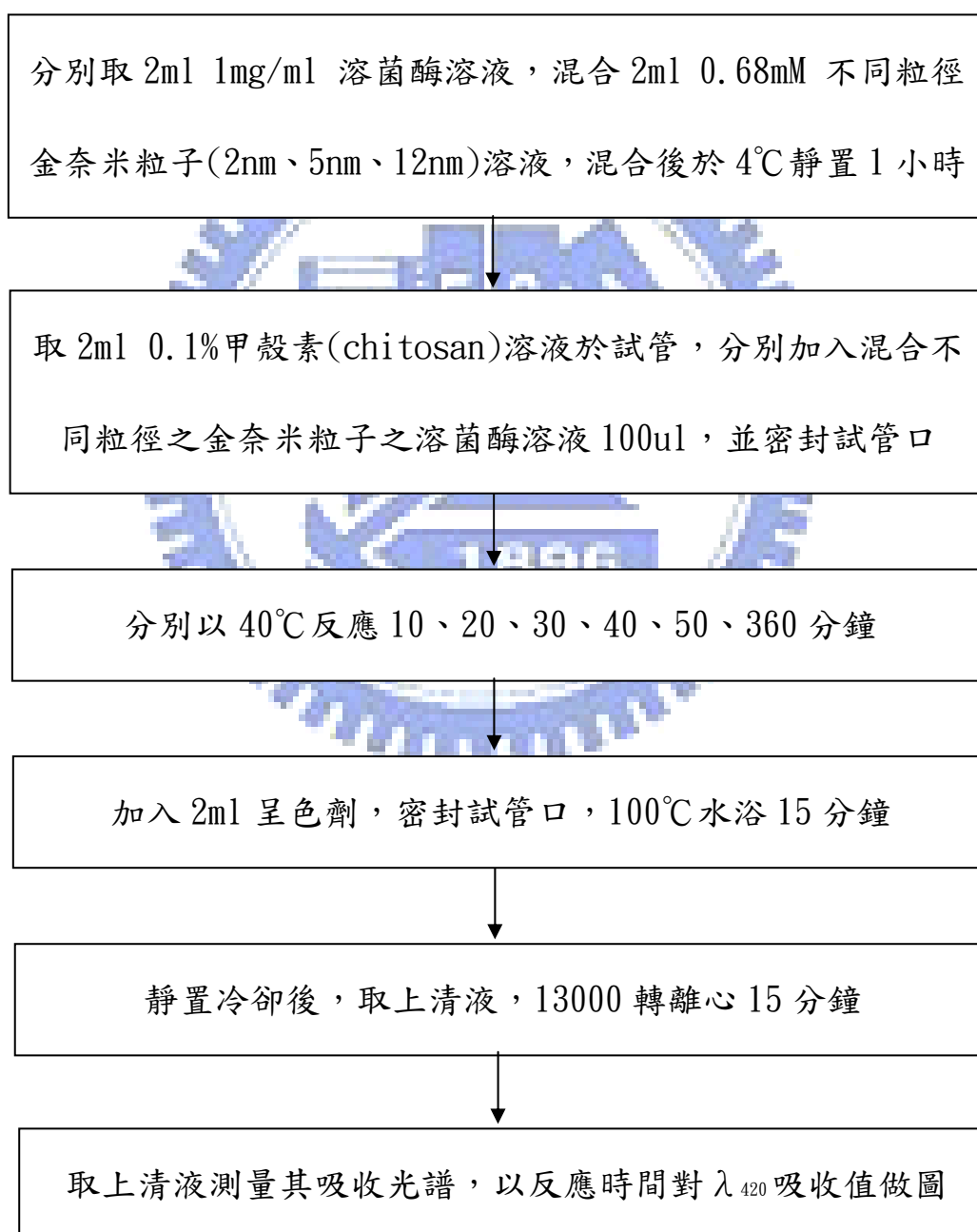
3.3.2 金奈米粒子對溶菌酶吸附測試

金奈米粒子在表面帶有部分正電荷，因此容易吸附有帶負電荷的分子。當金奈米粒子吸附或鍵結上蛋白質後，因蛋白質本身帶電，且具有緩衝功能，可以避免金奈米粒子因外在溶液環境離子強度的改變而造成聚集沉澱，但是此帶電荷的吸附方式是否會影響蛋白質活性？本實驗將利用不同濃度溶菌酶與金奈米粒子混合，並測其飽和吸附濃度比例。



3.3.3 金奈米粒子對溶菌酶活性影響測試

金奈米粒子與溶菌酶混合後會互相結合，而其結合的位置若位於溶菌酶的活性中心 (active site) 或在其附近，此外也可能因金奈米粒子之物理、化學特性而改變蛋白質的二級結構，進而影響溶菌酶酵素活性。在此將測試金奈米粒子對溶菌酶酵素活性的影響。



3.3.4 金奈米粒子對溶菌酶結構影響測試

本實驗利用圓二色光譜儀 (CD)、X 光繞射 (XRD) 與核磁共振 (NMR) 等技術分析金奈米粒子對溶菌酶的結構影響。

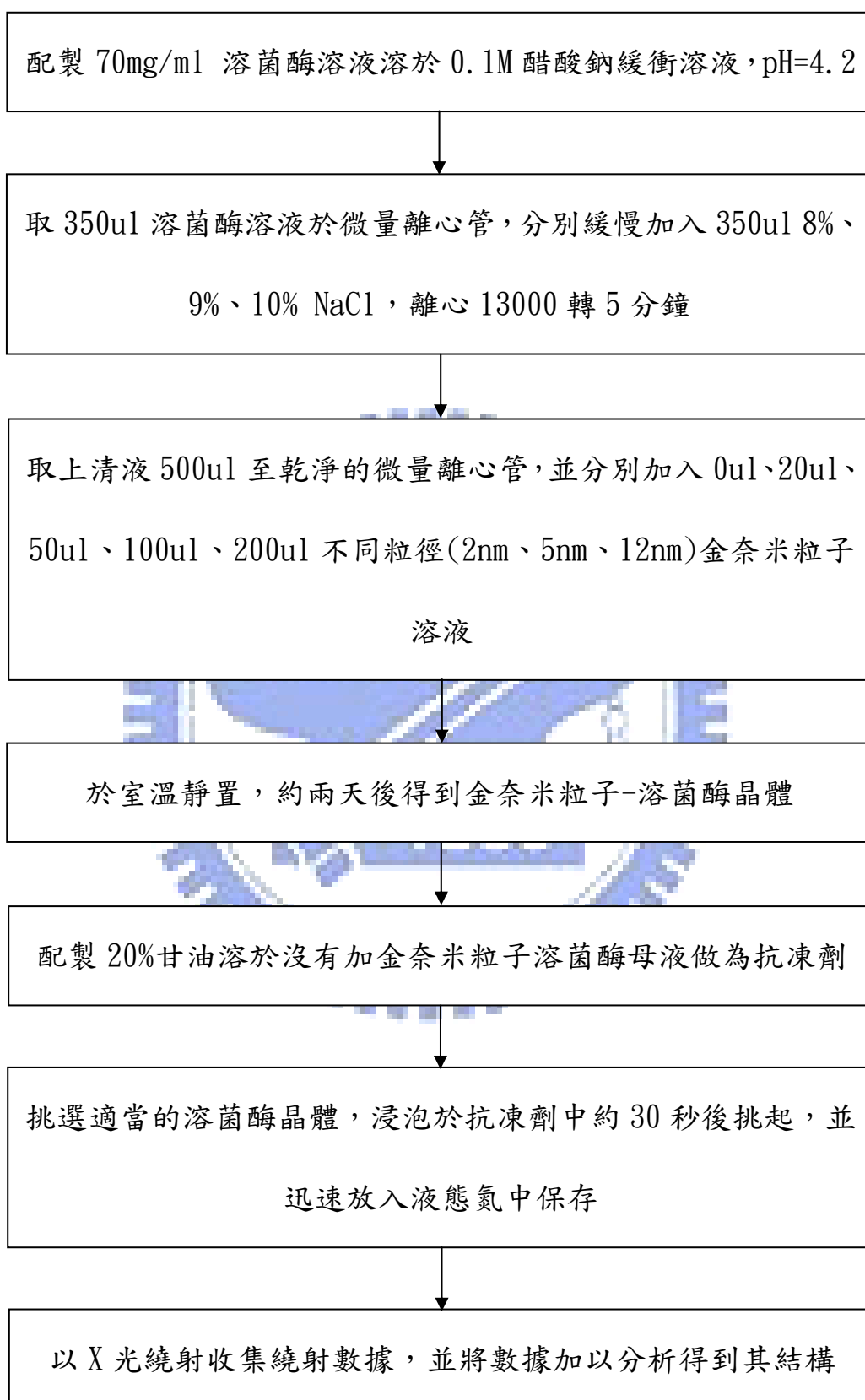
3.3.4.1 利用圓二色光譜分析

取 20ul 1mM 溶菌酶溶液，混合 380ul 不同濃度 2nm 金奈米粒子(最終濃度分別為 3.4、17、34、85、170、340、510、646uM) 溶液，混合後於 4°C 靜置 1 小時

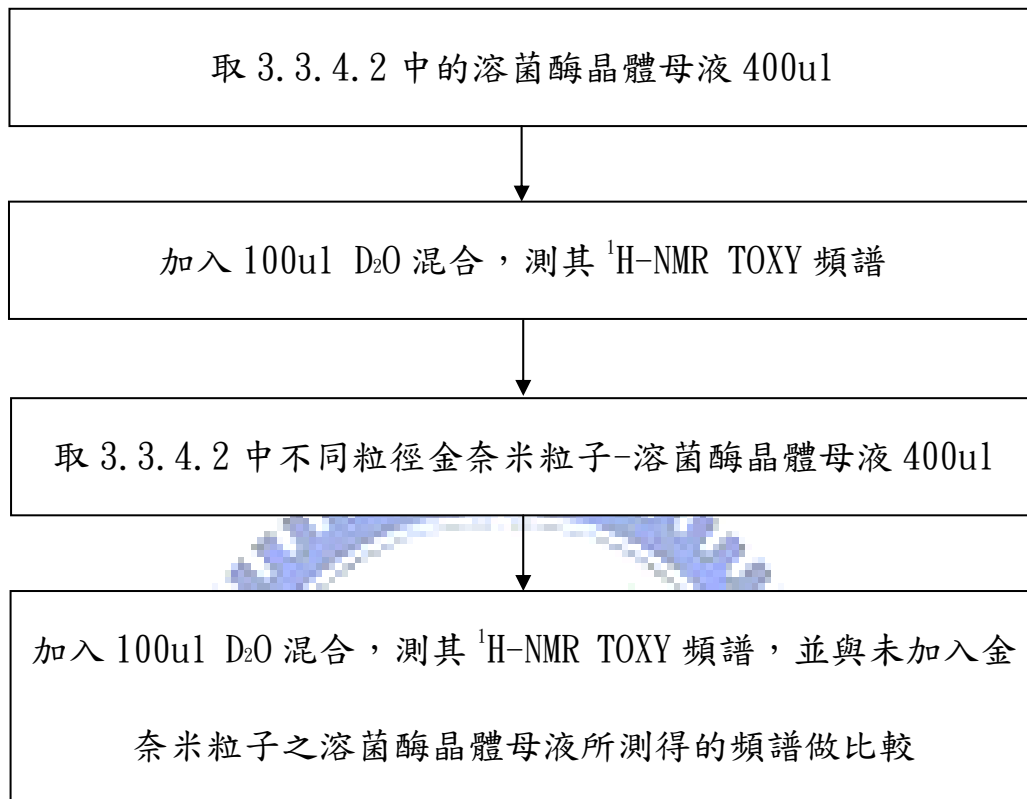
掃描波長 320~190nm 並記錄

分別以不同粒徑(5nm、12nm)金奈米粒子重複上述 1.2 步驟，
比較其結果

3.3.4.2 利用 X 光繞射分析



3.3.4.3 利用核磁共振頻譜分析



第四章 結果與討論

4.1 金奈米粒子的合成

本實驗根據文獻，利用不同的檸檬酸鈉濃度比例來還原氯金酸，可精確控制金奈米粒子粒徑大小。我們利用穿隧式電子顯微鏡(TEM)觀察合成好的金奈米粒子，如下圖 4.所示，可以發現金奈米粒子的粒徑控制的非常準確，且其粒徑分布相當均勻。



圖 3.金奈米粒子溶液外觀：由左而右分別為 2nm、5nm、12nm 金奈米粒子溶液。

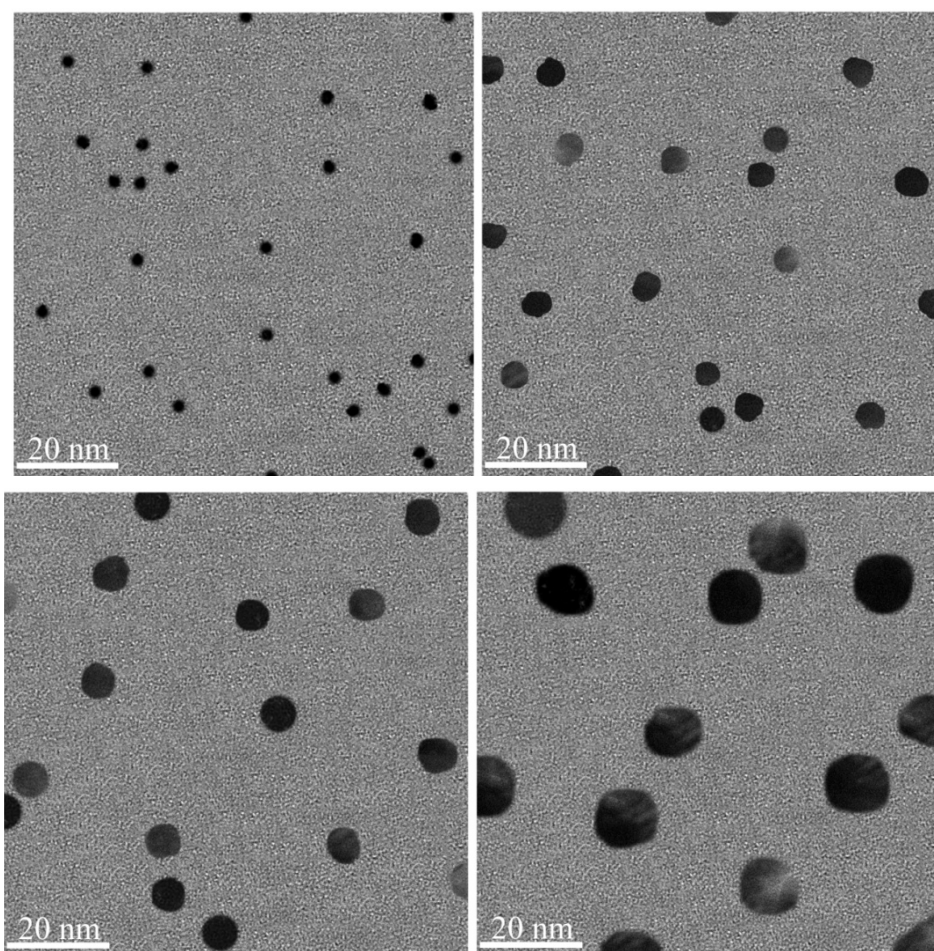


圖 4.金奈米粒子 TEM 圖：圖分別為 2nm (A)、4nm (B)、5nm (C)、12nm (D)，發現經由檸檬酸鈉濃度比例來還原氯金酸，可得到粒徑控制良好的金奈米粒子。

4.2 金奈米粒子對溶菌酶活性影響分析

將溶菌酶酵素加入金奈米粒子混合後，因溶菌酶與金奈米粒子之間的作用力，使溶菌酶與金奈米粒子互相結合，此實驗利用酵素活性反應（Enzyme assay）觀察溶菌酶與金奈米粒子的結合是否造成溶菌酶活性下降。

實驗發現，金奈米粒子對溶菌酶酵素具有抑制作用。根據酵素活性分析發現，金奈米粒子與溶菌酶結合後（Lysozyme-GNPs）活性相對於溶菌酶（free Lysozyme）降低，且在相同濃度下，不同粒徑的金奈米粒子對溶菌酶抑制效果相近。雖然溶菌酶對金奈米粒子的吸附飽和點約為 1：10，但是受限於金奈米粒子的濃度，以及溶菌酶活性測試濃度，因此本實驗只針對 Lysozyme：GNPs 濃度比例 1:0.68 討論。經由本實驗發現，在 Lysozyme：GNPs 濃度比例 1:0.68 時，Lysozyme 活性降低約 10%，且粒徑越大，溶菌酶相對活性降低越多。

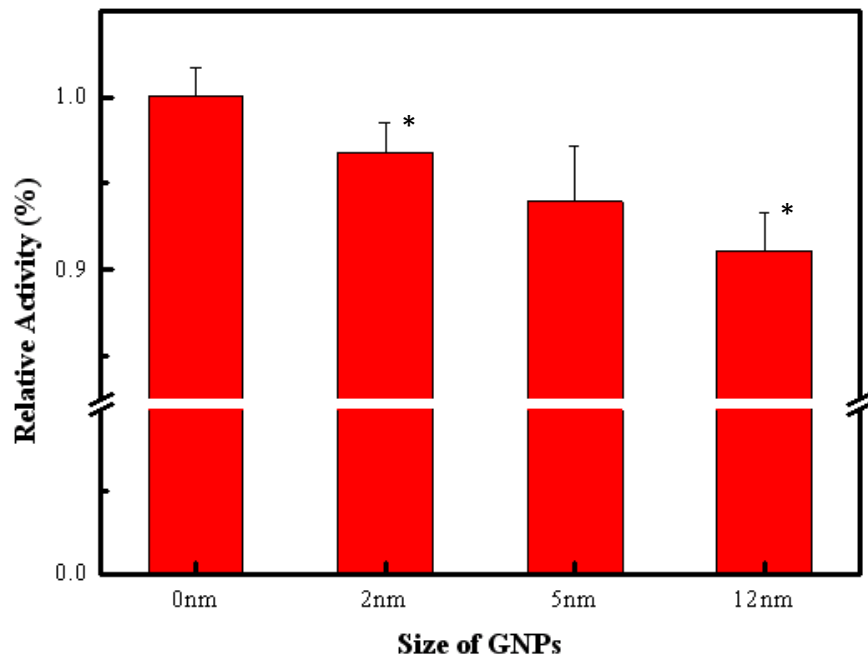


圖 5.金奈米粒子對溶菌酶活性的影響：將溶菌酶與不同粒徑的金奈米粒子以 1 : 0.68 混合後測其活性，發現活性相對降低約 10%；且時驗發現，金奈米粒子粒徑越大，溶菌酶相對活性降低越多。

4.3 金奈米粒子對溶菌酶結構影響分析

經由金奈米粒子對溶菌酶活性測試後得知，金奈米粒子確實降低溶菌酶酵素活性，但是造成溶菌酶酵素之活性下降的原因是因為金奈米粒子與溶菌酶結合位置在溶菌酶活性中心而抑制溶菌酶活性，或是因為金奈米粒子造成溶菌酶立體結構改變而使溶菌酶失去活性？為了做進一步的確認，我們將在此對金奈米粒子是否會造成溶菌酶立體結構改變做進一步探討，以下我們將利用一般分析蛋白質的三種方法：圓二色光譜儀 CD、核磁共振光譜 NMR、和 X 光單晶繞射 XRD 三個部分去探討。



4.3.1 利用 CD 觀察金奈米粒子對溶菌酶結構影響

首先我們利用圓二色光譜儀 (CD) 觀察溶菌酶-金奈米粒子之旋光性，觀察金奈米粒子是否會改變溶菌酶二級結構。根據文獻中顯示，蛋白質和多種經表面修飾過不同材質的奈米粒子作用後，會改變蛋白質中的二級結構，尤其以 α -helixes 最為明顯。我們利用 CD 觀察金奈米粒子和溶菌酶表面鍵結時對結構的影響，實驗結果發現，與金奈米粒子鍵結後的溶菌酶 CD 光譜和溶菌酶 (free lysozyme) 相似。在 2nm GNPs-Lysozyme 和 3nm GNPs-Lysozyme 的 CD 光譜中發現，隨著濃度增加，光譜最小值 210nm 特徵峰逐漸消失；隨著粒徑增大，在 4nm GNPs 以上 (4nm~12nm) GNPs-Lysozyme 光譜幾乎與 free lysozyme 相同。此外， α -helix 特徵峰 220nm 和 202nm 有極小值的地方並無改變； β -sheet 極小值特徵峰 218nm 和 random coil 極小值特徵峰 197nm 也皆無改變，說明 lysozyme 並未因與 GNPs 結合後改變其二級結構。推測金奈米粒子並沒有明顯的影響蛋白質二級結構。

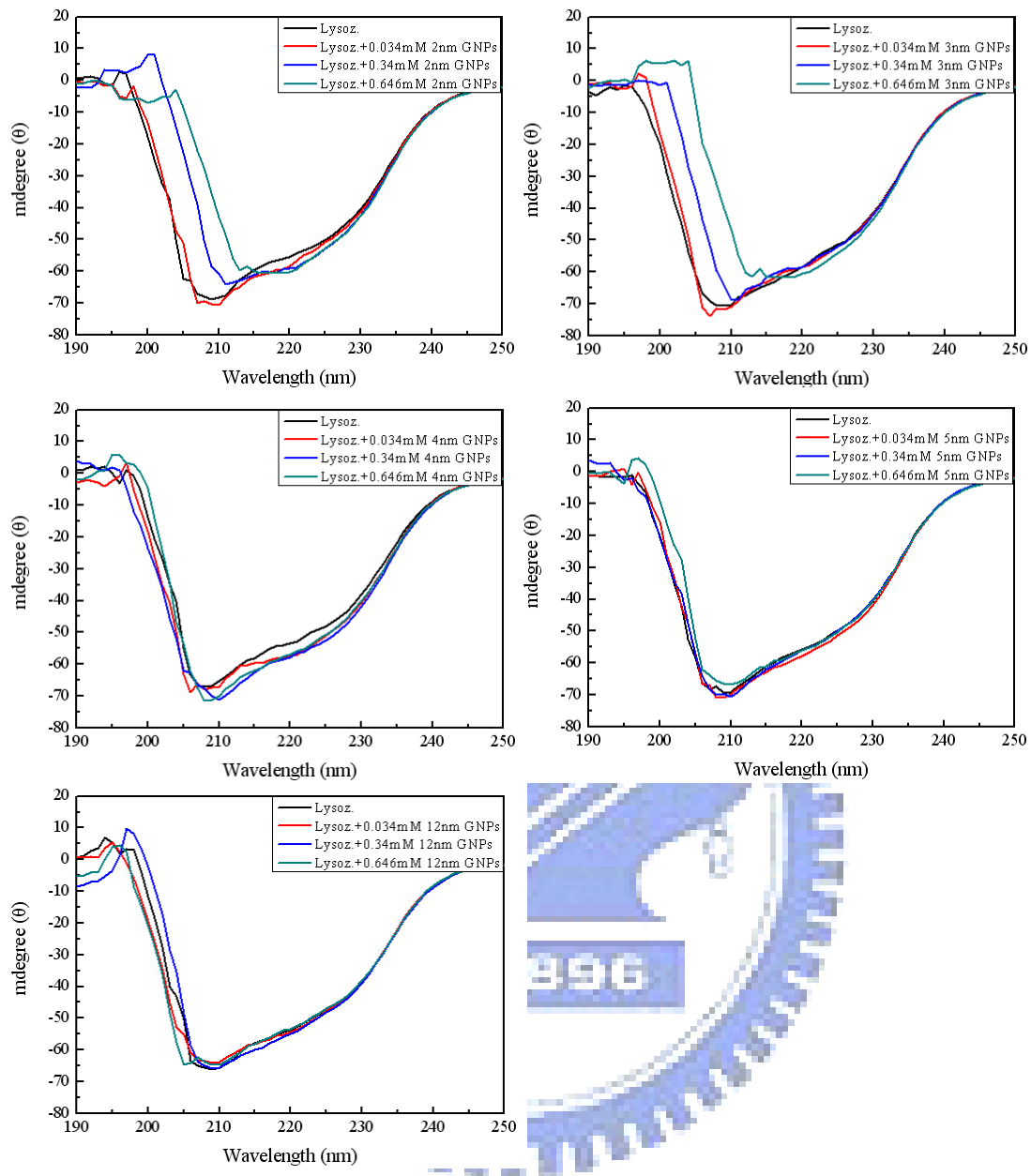


圖 6.利用 CD 光譜比較不同粒徑、不同濃度金奈米粒子對溶菌酶二級結構的影響：在 2nm 和 3nm 金奈米粒子和溶菌酶作用後，CD 光譜改變較明顯，特別是在金奈米粒子濃度較高時，波長 210nm 的吸收峰有明顯減弱；而在較大粒徑（4nm、5nm、12nm 等）則無此現象。

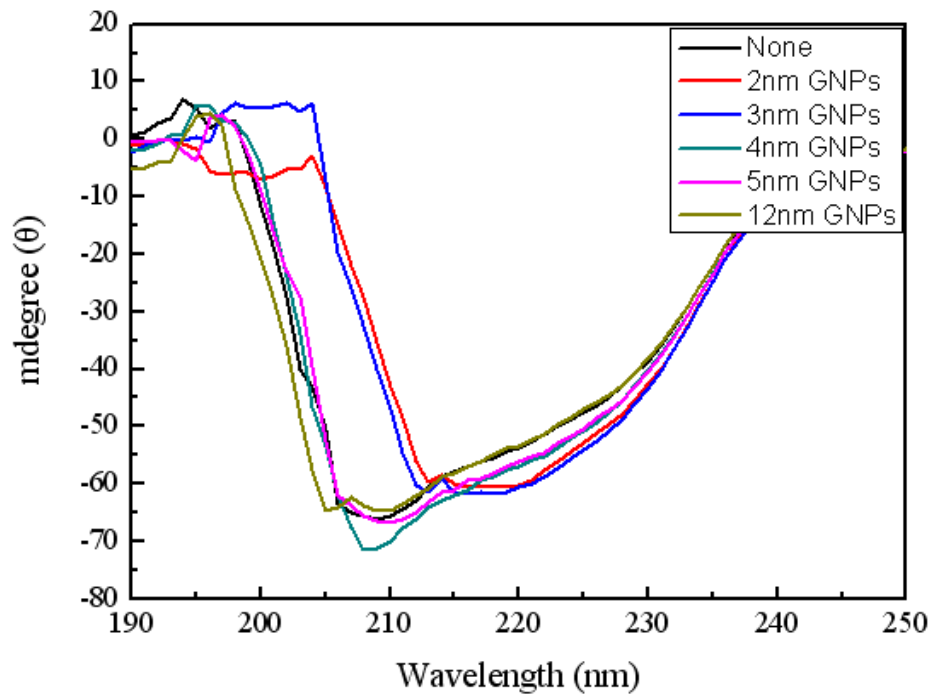


圖 7.比較不同粒徑金奈米粒子對溶菌酶 CD 光譜變化：溶菌酶：金奈米粒子濃度比為 1：10 時 CD 光譜的不同，發現其最大的差異在於波長約 210nm 的極小值有所不同。

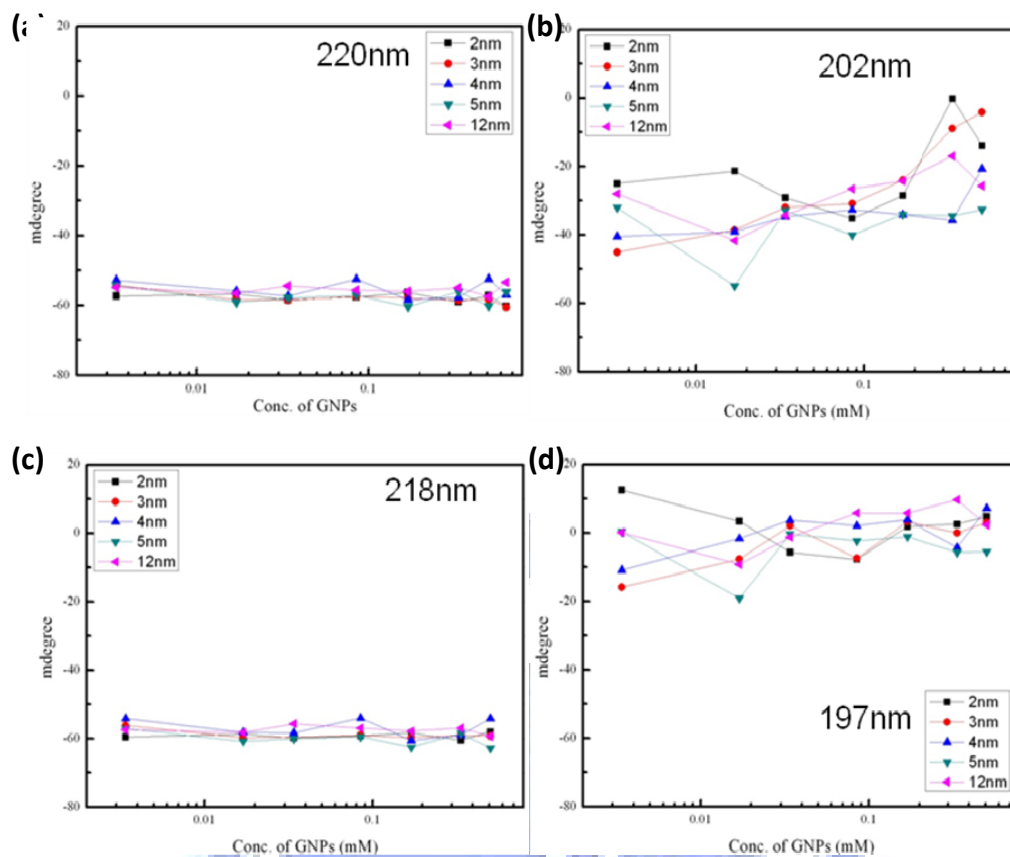


圖 8.比較不同粒徑金奈米粒子對溶菌酶在不同波長的 CD 光譜變化：

(a, b) 觀察 α -helix 特徵峰 220nm 和 202nm 處有兩的極小值，發現加入不同粒徑、不同濃度金奈米粒子後，並沒有太大改變；(c) 觀察 β -sheet 特徵峰 218nm 處有極小值，發現加入不同粒徑、不同濃度金奈米粒子後，也沒有太大改變；(d) 觀察 random coil 特徵峰 197nm 處有極小值，發現加入不同粒徑、不同濃度金奈米粒子後，也沒有太大改變；根據以上結果推測，加入金奈米粒子後對溶菌酶二級結構並無太大改變。

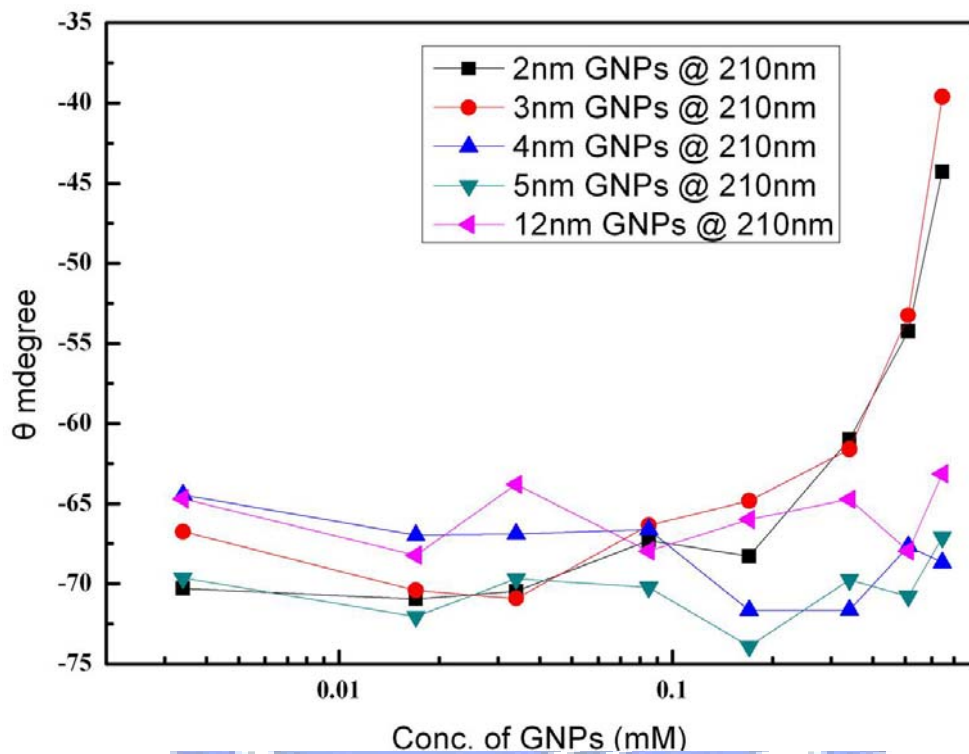


圖 9. 比較不同粒徑金奈米粒子對溶菌酶在波長 210nm 的 CD 光譜變化：粒徑越小的金奈米粒子，在高濃度時改變 CD 吸收值越明顯，雖然不清楚波長 210nm 代表的意義，但是我們可以推測金奈米粒子會對溶菌酶造成影響。

4.3.2 利用 NMR 觀察金奈米粒子對溶菌酶結構影響

除了圓二色光譜儀 (CD) 來觀察二級結構之外，我們利用核磁共振光譜 (NMR) 來分析溶菌酶結構。本實驗中比較 2nm 金奈米粒子對溶菌酶結構的影響，將 0.5mM 溶菌酶混合 2.5mM 金奈米粒子，利用 $^1\text{H-NMR}$ 的 TOXY 做 2D 共振頻譜，比較加入金奈米粒子前後溶菌酶的結構是否有改變。從下圖的頻譜可以發現，未加入金奈米粒子與加了金奈米粒子兩張頻譜的指紋區 (finger print)，最大的差異小於 0.05ppm，因此推測，就結構而言兩樣品之間並沒有明顯差異，溶菌酶的結構並未因金奈米粒子而產生影響，此一結果與文獻中報導加入其它奈米粒子的結果有明顯不同。



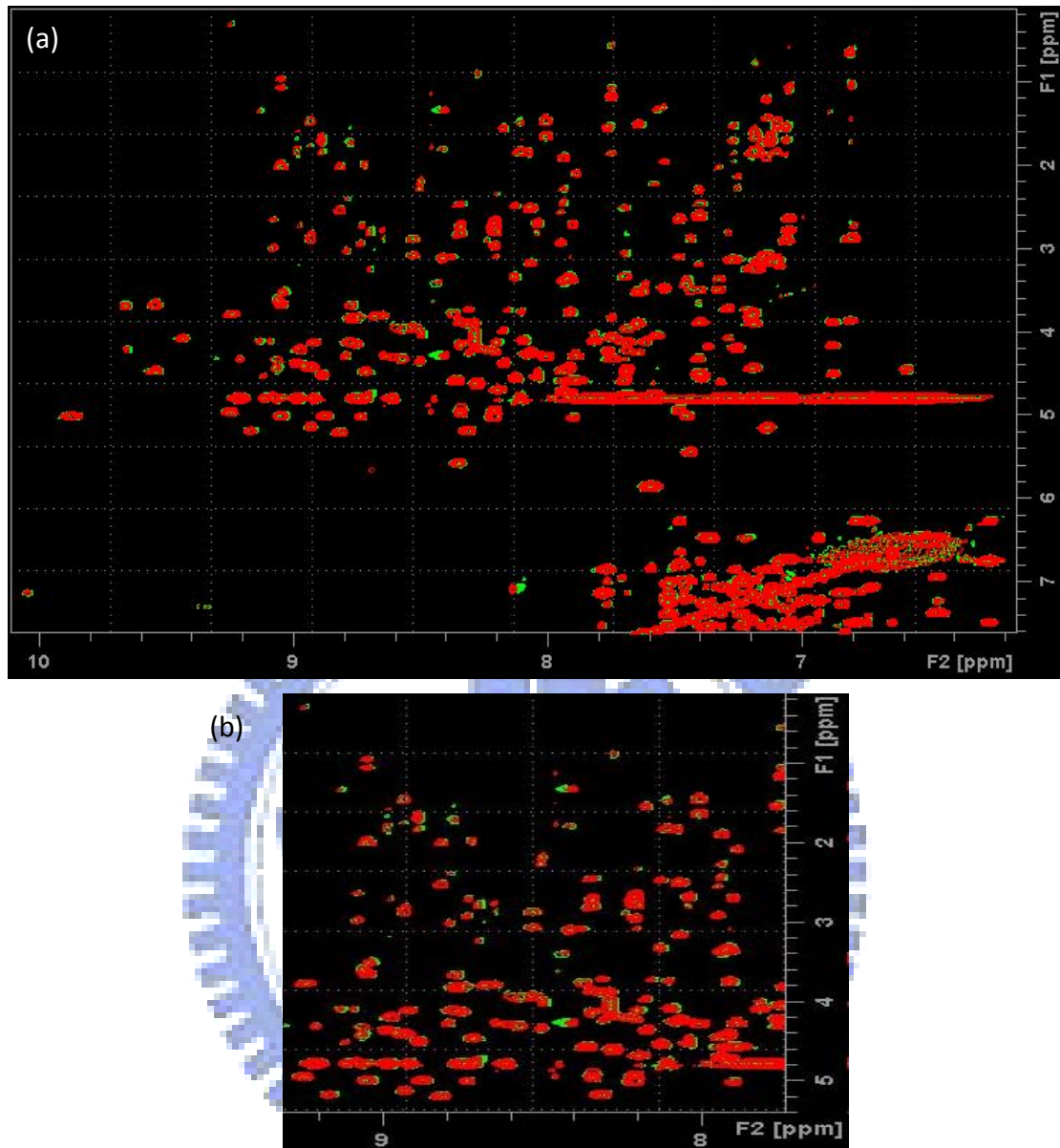


圖 10.溶菌酶和金奈米粒子-溶菌酶 NMR 光譜 (a) 的比較，其中溶菌酶濃度為 0.5mM，金奈米粒子為 2.5mM。圖中綠色訊號表示溶菌酶的 NMR 光譜；紅色訊號表示 2nm 金奈米粒子-溶菌酶的 NMR 光譜。將兩張光譜疊在一起比較發現並無太大差異，且在指紋區 (finger print) 也無明顯差異，推測金奈米粒子並不會對溶菌酶整體結構造成太大改變。(b) 為局部放大圖。

4.3.3 利用 X 光繞射觀察金奈米粒子對溶菌酶結構影響

除了以核磁共振光譜來判定溶菌酶細部結構之外，我們更利用 X 光繞射來解金奈米粒子-溶菌酶晶體結構，觀察金奈米粒子與溶菌酶在立體空間中的位置。可惜的是，在我們養晶過程中，只成功養出 2nm 金奈米粒子-溶菌酶晶體和 5nm 金奈米粒子-溶菌酶晶體，因此在這部分並無法探討 12nm 金奈米粒子-溶菌酶的 X 光繞射與晶體結構分析。

首先觀察晶體外觀，發現 2nm 金奈米粒子-溶菌酶的晶體顏色呈現紫紅色，與 2nm 金奈米粒子溶液顏色相近；而 5nm 金奈米粒子-溶菌酶晶體呈淡黃褐色，不同於溶菌酶的晶體，推測這兩晶體內皆含有金奈米粒子。另外，有一組 2nm 金奈米粒子-溶菌酶的晶體顏色外觀呈藍紫色，此顏色與聚集 (aggregated) 的金奈米粒子溶液顏色相近，推測此結晶內的金奈米粒子再結晶形成之前就先聚集了，因此造成顏色的改變。

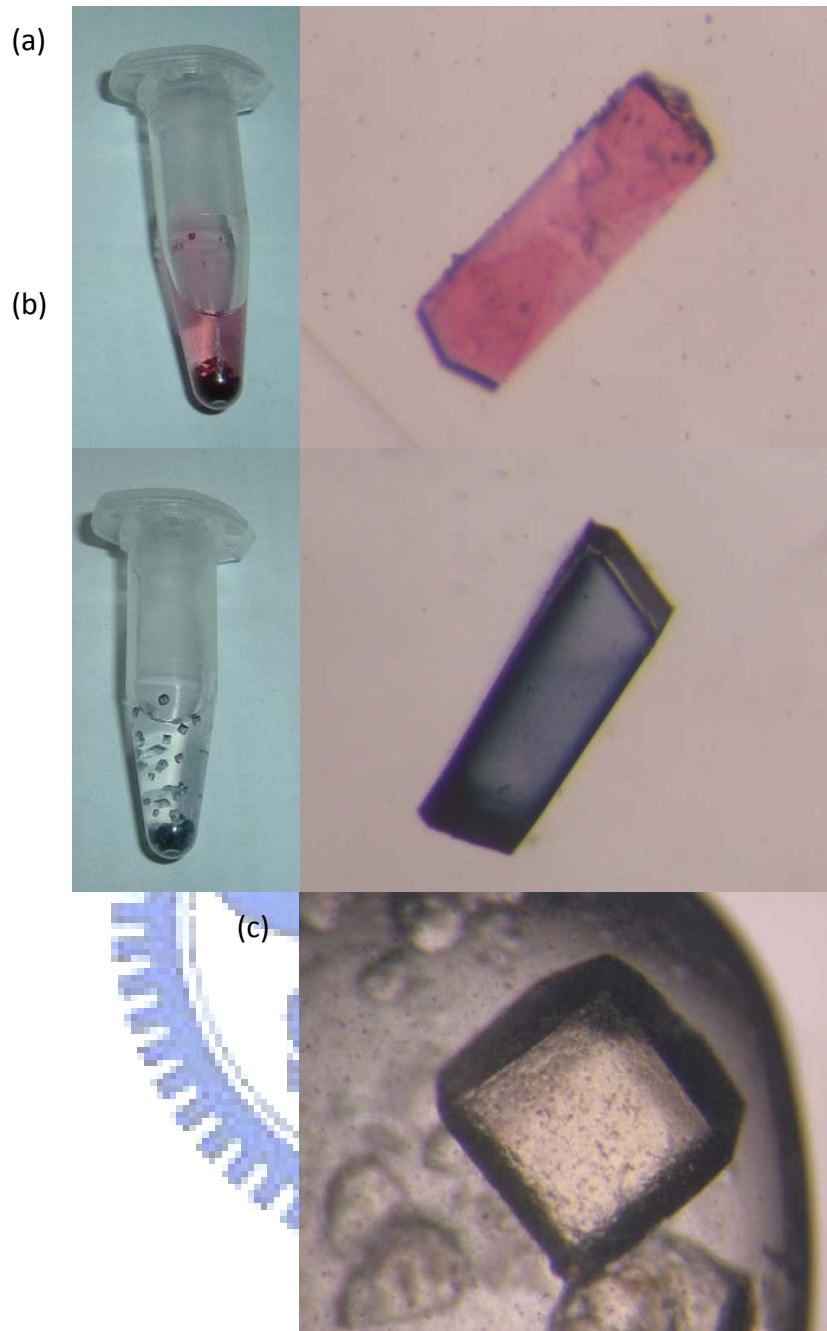


圖 11.金奈米粒子-溶菌酶晶體外觀：(a) 2nm 金奈米粒子-溶菌酶晶體，其顏色呈紫紅色；(b) 2nm 金奈米粒子-溶菌酶晶體，其顏色呈藍紫色，推測可能因金奈米粒子在結晶形成之前已經聚集，造成顏色改變；(c) 5nm 金奈米粒子-溶菌酶晶體，其顏色呈淡黃褐色。

由 X 光繞射數據我們可以解得溶菌酶的結構；在溶菌酶之外尚有一些殘餘的電子，但仔細比對發現，這些電子雲密度雖然比結晶水電子雲密度大，但是卻遠小於金的電子雲密度，推測這些電子雲是溶液中的氯離子，而非我們預期中金奈米粒子（或金原子）的訊號。雖然我們從晶體外觀顏色上判斷晶體中確實含有金奈米粒子，但是在我們的數據中並無法觀察到金奈米粒子對溶菌酶的鍵結或吸附位置的關係，但是，在解晶體結構的過程中，我們意外發現，加入金奈米粒子的溶菌酶晶體，其繞射數據的解析度較一般溶菌酶晶體繞射數據解析度高。

比對加入不同粒徑金奈米粒子和沒有加入金奈米粒子的兩組溶菌酶晶體繞射數據，發現其結構有些微的改變，加入金奈米粒子後溶菌酶其結構有些微的改變，雖然這些受影響的殘基物、化性質不相同，但是在加入 2nm 金奈米粒子和 5nm 金奈米粒子的兩組溶菌酶結構中，有改變的殘跡幾乎一樣。和溶菌酶結構比較，2nm 金奈米粒子-溶菌酶中，溶菌酶殘基的方均根距離（Root mean square distances, RMSD）較大的殘基有第 7（GLU）、17（LEU）、18（ASP）、19（ASN）、21（ARG）、25（LEU）、27（ASN）、45（ARG）、48（ASP）、61（ARG）、69（THR）、71（GLY）、73（ARG）、78（ILE）、97（LYS）、101（ASP）、109（VAL）、112（ARG）、

125 (ARG)、128 (ARG)、129 (LEU) 發現這些殘基除了第 17、25、78、109、129 胺基酸為疏水性外，其餘皆為親水性；而溶菌酶和 5nm 金奈米粒子-溶菌酶結構比較，其根均方距離較大的殘基有第 7 (GLU)、15 (ARG)、17 (LEU)、18 (ASP)、19 (ASN)、21 (ARG)、25 (LEU)、44 (ASN)、48 (ASP)、59 (ASN)、61 (ARG)、69 (THR)、71 (GLY)、73 (ARG)、78 (ILE)、87 (ASP)、93 (ASN)、101 (ASP)、109 (VAL)、113 (ASN)、121 (GLN)、128 (ARG)、129 (LEU)，發現這些殘基除了第 17、25、78、109、129 胺基酸為疏水性外，其餘皆為親水性。由這兩個比較，可以發現不同粒徑的金奈米粒子對溶菌酶有影響且影響具有重複性的殘基皆為親水性。

再以 2nm 金奈米粒子-溶菌酶和 5nm 金奈米粒子-溶菌酶比較不同粒徑影響溶菌酶上的殘基，發現在第 14、18、21、44、45、61、68、87、101、121、125 殘基有較大差異，不同粒徑金奈米粒子影響到的胺基酸皆為親水性的胺基酸（除了最後一個胺基酸：129[LEU]），我們可以推測，這些微小的改變是因為殘基與金奈米粒子之間產生作用力，且因為受到影響的皆為親水性殘基，所以金奈米粒子與溶菌酶之間的作用可能為親疏水作用力為主。

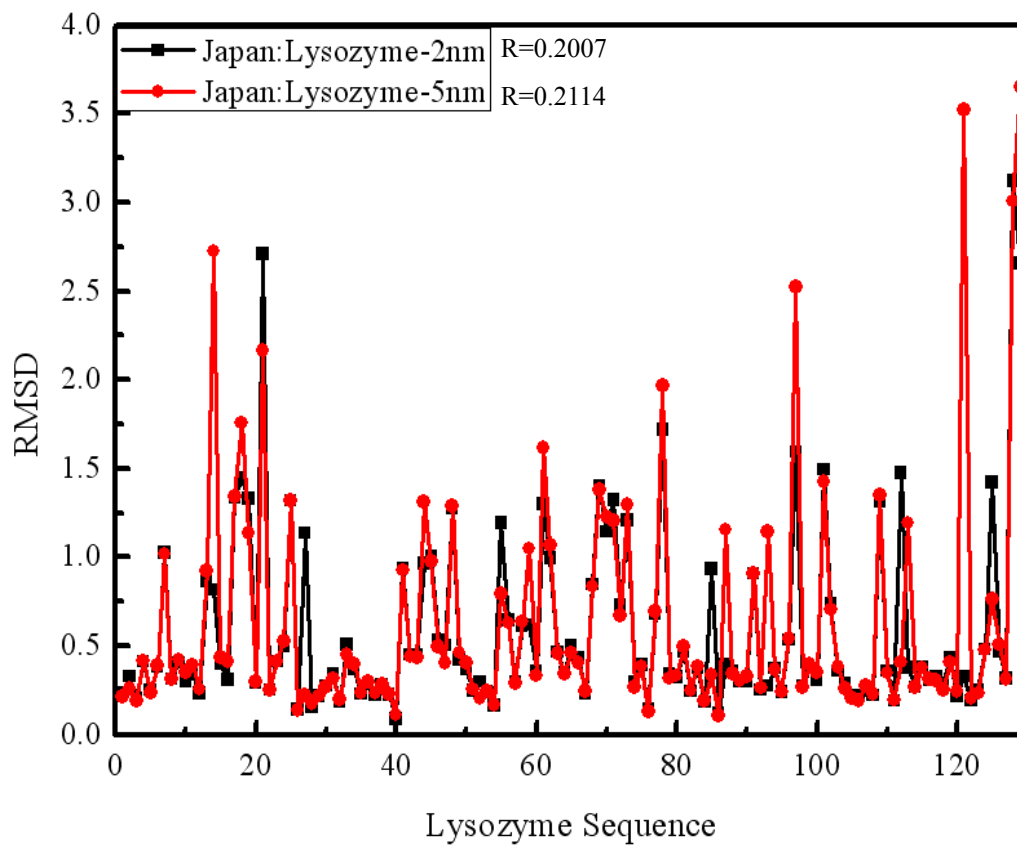


圖 12.以方均根距離分別比較加入不同粒徑金奈米粒子後，溶菌酶結構的改變：黑色為 2nm 金奈米粒子-溶菌酶對未加入金奈米粒子溶菌酶結構的比較；紅色為 5nm 金奈米粒子-溶菌酶對未加入金奈米粒子溶菌酶結構的比較。

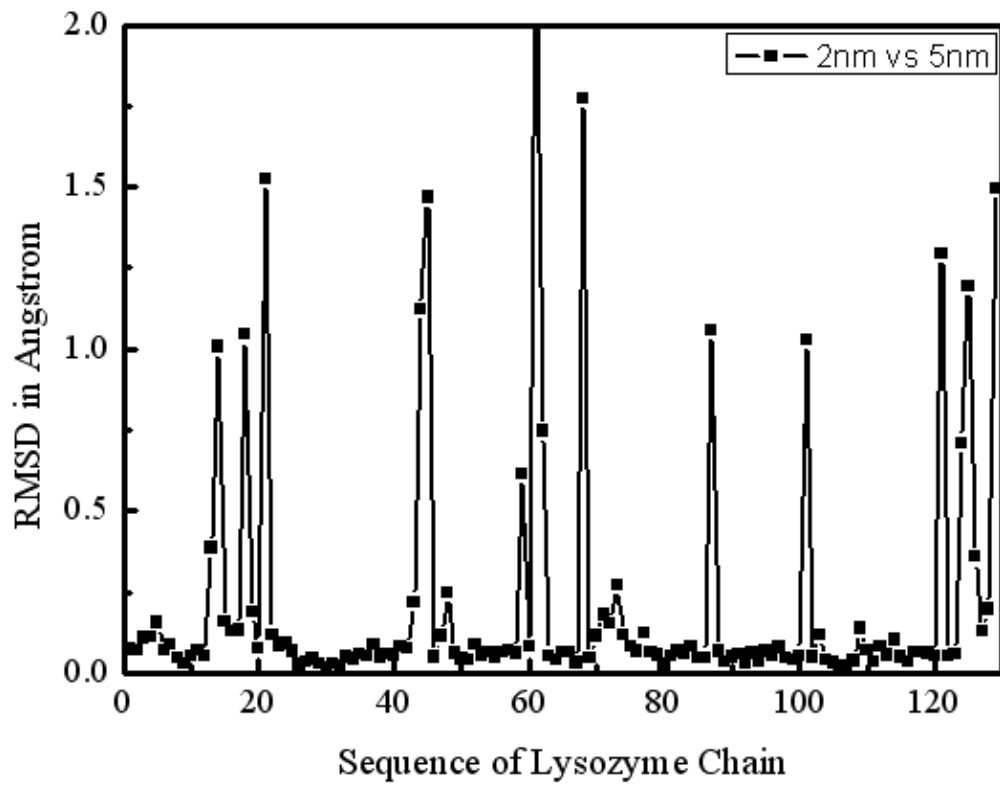


圖 13.比較 2nm 金奈米粒子-溶菌酶和 5nm 金奈米粒子-溶菌酶兩者之間溶菌酶殘基方均根距離的不同：發現在第 19、24、44、48、125、129 殘基有較大差異。

雖然這些受影響的殘基物理、化學性質不完全相同，但是在加入 2nm 金奈米粒子和 5nm 金奈米粒子的兩組溶菌酶晶體結構中，根均方距離有改變的殘基幾乎一樣。比較這些殘基的親、疏水性或所帶電荷，我們發現這些被改變的殘基所帶電荷並無一定，但是它們都屬於親水性較高的殘基（最後一個殘基[129LEU]除外），因此我們推測金奈米粒子和溶菌酶之間的吸附作用力是藉由親、疏水性作用力，而非單純藉由電荷引力或是共價鍵。



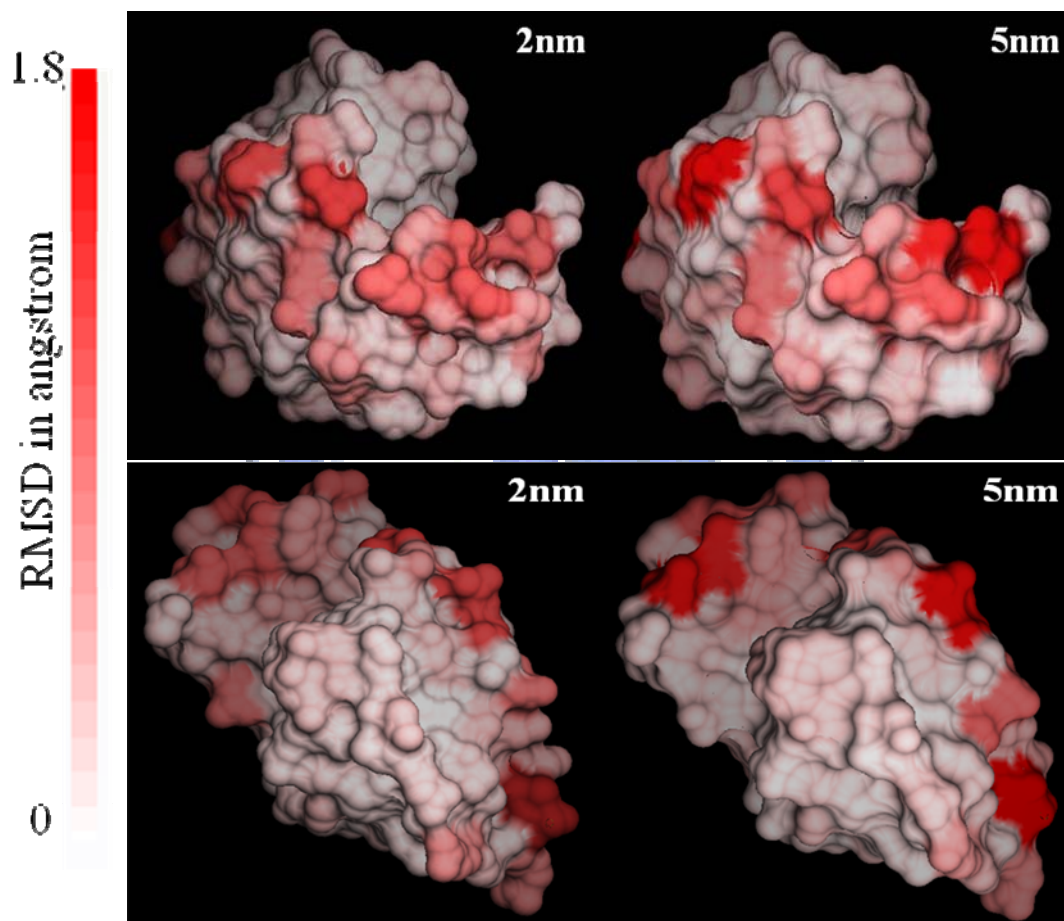


圖 14.將金奈米粒子-溶菌酶結中溶菌酶的構以 Solid surface 顯示，並以顏色深淺表示殘基根均方距離差異大小，從不同角度觀察此結果，圖中清楚顯示出 2nm 金奈米粒子和 5nm 金奈米粒子對溶菌酶影響位置相近。

第五章 結論與建議

本實驗利用溶菌酶做為模型，觀察蛋白質與金奈米粒子之間的作用力，並了解金奈米粒子對蛋白質的毒性及影響。根據以上實驗結果發現，金奈米粒子雖然對溶菌酶酵素活有抑制的作用，但並不會對溶菌酶結構造成影響，顯然不容易造成生物毒性；此外，實驗發現金奈米粒子與溶菌酶之間的作用力是以吸附為主，並沒有明顯的鍵結，且此吸附作用力主要是以親疏水性互相吸附，並非吸附在某些帶特定電荷的地方。

比較文獻中所提到，不同材質的奈米粒子經由表面修飾後與蛋白質鍵結，此一修飾雖然能將蛋白質固定在奈米粒子上，但卻會抑制蛋白質活性，且可能對蛋白質二級結構造成影響。本實驗中使用生物相容性佳的金奈米粒子，且並未經過修飾讓蛋白質直接吸附在金奈米粒子上，雖然金奈米粒子對溶菌酶會形成抑制劑抑制其酵素活性，但是卻不會影響蛋白質結構。

本實驗以溶菌酶做為研究模型，來推測金奈米粒子與蛋白質之間的作用，但並無法確定所有蛋白質與金奈米粒子作用力與影響皆是如此。因此，未來我們需要再以其他生物體中重要的酵素或蛋白質，來加以確定金奈米粒子對生物體的影響。

[1]. Li, Z., R. Salmen, et al. (2005). "Pulmonary exposure to carbon nanotubes induces vascular toxicity." The Toxicologist CD—An Official Journal of the Society of Toxicology **84**(1): 213.

[2]. Huang, X. L., B. Zhang, et al. "In vivo toxic studies and biodistribution of near infrared sensitive Au–Au 2 S nanoparticles as potential drug delivery carriers." Journal of Materials Science: Materials in Medicine: 1-8.

[3]. Petersen, E. J., Q. Huang, et al. "ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES."

[4]. Giles, J. (2004). "Nanoparticles in the brain." Nature **5**.

[5]. Khan, J. A., B. Pillai, et al. (2007). "Molecular Effects of Uptake of Gold Nanoparticles in HeLa Cells." CHEMBIOCHEM-WEINHEIM-**8**(11): 1237.

[6]. Hussain, S. M., K. L. Hess, et al. (2005). "In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells." Toxicology in Vitro **19**(7): 975-983.

[7]. Lundqvist, M., I. Sethson, et al. (2005). "High-resolution 2D ¹H-¹⁵N NMR characterization of persistent structural alterations of proteins induced by interactions with silica nanoparticles." Langmuir **21**(13): 5974-5979.

[8]. Norde, W. and C. E. Giacomelli (2000). "BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states." Journal of Biotechnology **79**(3): 259-268.

[9]. Vertegel, A. A., R. W. Siegel, et al. (2004). "Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme." Langmuir **20**(16): 6800-6807.

[10]. Chen, G., J. Zhao, et al. (2007). "Electrochemical sensing DNA damage with nano-titanium dioxide and repair with a medicinal herb species resveratrol." Journal of Biotechnology **127**(4): 653-656.

- [11]. Fischer, N. O., C. M. McIntosh, et al. (2002). "Inhibition of Chymotrypsin through Surface Binding Using Nanoparticle-Based Receptors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(8): 5018-5023.
- [12]. Zhang, X., C. Shu, et al. "Protein Conformation Changes Induced by a Novel Organophosphate-Containing Water-Soluble Derivative of a C 60 Fullerene Nanoparticle."
- [13]. Lundqvist, M., I. Sethson, et al. (2004). "Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability." Langmuir **20**(24): 10639-10647.
- [14]. Mirkin, C. A., R. L. Letsinger, et al. (1996). "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials." Nature **382**(6592): 607-609.
- [15]. Elghanian, R. (1997). "JJ Storhoff, RC Mucic, RL Letsinger and CA Mirkin." Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles.,". " Science **227**: 1078-1080.
- [16]. Taton, T. A., C. A. Mirkin, et al. (2000). Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes. **289**: 1757-1760.
- [17]. He, L., M. D. Musick, et al. (2000). "Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization." J. Am. Chem. Soc **122**(38): 9071-9077.
- [18]. Liu, T., J. Tang, et al. (2002). "Particle size effect of the DNA sensor amplified with gold nanoparticles." Langmuir **18**(14): 5624-5626.
- [19]. Su, X., S. J. O'Shea, et al. (2001). "Au nanoparticle-and silver-enhancement reaction-amplified microgravimetric biosensor." Chemical Communications **2001**(8): 755-756.
- [20]. Frens, G. (1973). "Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solutions." Nat. Phys. Sci **241**: 20-22.

[21]. Hayat, M. A. (1989). Colloidal gold: principles, methods, and applications, San Diego: Academic Press.

[22]. Boyer, R. F. (1999). "Biochemistry." Brook/Cole Publishing Company.

[23]. Campbell, M. K. (1999). Biochemistry 3rd, Saunders College Publishing, Philadelphia.

[24]. Phillips, D. C. (1974). In Lysozyme (Osserman, EF, Canfield, RE, and Beychok, S., eds.), Academic Press, New York.

[25]. Ellis, A. E. (1989). "The immunology of teleosts." Fish Pathology **2**: 135-152.

