

國 立 交 通 大 學

奈 米 科 技 研 究 所

碩 士 論 文

奈米粒子與蛋白質的互相影響

Interaction between Nanoparticles and Protein

研究生：陳永昌

Yung-Chang Chen

學 號：9452518

指導教授：黃國華 博士

Dr. Guewha Steven Huang

中華民國九十六年七月

中文摘要

實驗一：蠶絲是蠶在變態過程中重要的產物，蠶絲蛋白質是一種具有良好透氣與透濕性、無毒、無刺激與人體相容性強的生物材料，所以蠶絲蛋白已經開始被開發成為醫學材料如：人造皮膚、血管、肌腱、韌帶、骨骼和牙齒等人造組織。在本實驗中，我們將利用分子生物的技術來分析蠶絲蛋白的生物、物理及化學特性，之後，導入奈米尺度的微觀模式，以自組裝結構成型技術，在不外加任何能量的方式，讓蠶絲蛋白質在適當的環境條件下，進行自組裝程序，使其從無序狀態轉化成有序狀態，組成奈米尺度的絲線狀結構，而後，可以發展新的高效能的純化方法，得到純度更高的蠶絲蛋白質奈米絲狀結構，並將這些高純度的自組裝奈米結構，作導電度、熱導性、光學性質等分析，例如若其導電性質跟半導體的元件相當或更好的話，就可以將奈米蠶絲蛋白自組裝絲線應用在元件上，以提高元件效能等的相關發展應用。

關鍵詞：蠶絲蛋白質；自組裝結構

實驗二： 現今具有奈米科技技術的商品不斷被開發出來，其應用的領域相當廣泛，當使用這些奈米化技術商品所帶來的好處同時，它也有可能帶來危害，所以為了探討奈米科技化技術的議題，實驗二將以不同的奈米粒子注入老鼠體內，觀察其免疫反應，利用酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunoassay, 簡稱 ELISA)，再以結合含有量子點 (quantum dot) 的二級抗體 (secondary antibody) 來做不同奈米粒子所引起的專一性抗體辨認。



關鍵字： 酵素免疫分析法；量子點；二級抗體；專一性

誌 謝

回想起在奈米所不長不短的兩年時間裡，發現自己成長許多，不論是實驗上的真功夫，或者是心態上的成長，都有著明顯的轉變，在此真的要感謝許多人的幫忙，首先要感謝是我的指導老師 黃國華 博士，從老師對實驗上嚴謹的要求、簡報的設計、數據的分析以及報告的方式、技巧都不厭其煩的一一親自指導，非常感謝老師的耐心教導。

接下來要感謝是師母對實驗室的付出，除了三不五時的準備餐點給大家享用之外，也對大家在生活上的問題給予大力的幫助，而且師母也是實驗室的心靈導師，當有問題的時候，師母總是在第一時間就毫不客氣的給予指正，真的是實驗室重要幕後推手，非常感謝師母對我以及大家照顧。

實驗室就是一個團隊，雖然每個人都有各自的實驗進行，也因此每個人都各具本領，先感謝凱明學長，當實驗遇到狀況時，凱明學長總會適時出現幫忙技術指導一番，生活上也扮演著大哥哥的腳色，照應我們這群小弟，還要感謝大勳學長，雖然他是辛苦的扮演著黑臉的腳色幫忙管理實驗室，在實驗研究成果上，他是大家學習的好榜樣，在來最要感謝的是志杰、禮閣和嘉偉，大家總會互相鼓勵求進步，我喜歡這種感覺，當有問題發生或是狀況出現的時候，大家總是會好心的伸出援手，還要感謝學弟們高超和新堯，在實驗上的幫忙，謝謝高超提供你的汽車，帶我去拿實驗用的樣品，還有新堯熱心的擔任化學小老師，由衷的感謝大家。

目 錄

中文摘要	I
誌 謝	III
目 錄	IV
圖目錄	VI
表目錄	VIII
第一章 介紹	1
第二章 實驗設計、步驟與方法	18
實驗一：	
一. 2.1 蠶絲絲囊的取得	19
2.2 蠶絲蛋白質保存溶液的配置	19
2.3 蠶絲蛋白質的性質分析	20
2.3.1 SDS-PAGE 蛋白質電泳分離技術	20
2.3.2 高效能液相層析儀(HPLC) 分析	26
2.4 蠶絲蛋白質自組裝結構成型	26
實驗二：	
二. 2.1 抗體製備	28
2.2 酵素免疫分析法.....	28
2.3 接合含有量子點(Quantum-dots)的二級抗體作顯色觀察 ...	29

第三章 結果與討論	31
一. 3.1 蠶絲絲囊的取得	31
3.2 蠶絲蛋白質保存溶液的配置	32
3.3 SDS-PAGE 蛋白質電泳分離技術	34
3.4 高效能液相層析儀分析 (HPLC)	36
3.5 蠶絲蛋白質自組裝結構成型	37
二. 3.1 酵素免疫分析法	40
3.2 接合含有量子點(Quantum-dots)的二級抗體作顯色觀察	40
第四章 結論	44
參考文獻	47



圖 目 錄

圖1.1 蠶絲絲囊的分段方式	6
圖1.2 分段絲囊的2D膠結果	6
圖1.3 被成功標認出的93個蠶絲蛋白質點	6
圖 1.5-1 pS(4+1)蛋白質結構示意圖	11
圖 1.5-2 類蜘蛛絲合成蛋白自組裝結構之AFM圖	12
圖 1.5-3 類蜘蛛絲合成蛋白自組裝之結構分析	12
圖 1.5-4 液體狀態蜘蛛絲蛋白質之二級結構預測圖	13
圖 1.6 KFE8在保存溶液中形成自組裝結構的介穩定狀態(AFM) ...	14
圖 1.7-1 自組裝結構奈米管辨認金粒子實驗流程	15
圖 1.7-2 金粒子與自組裝奈米管接合的TEM圖	16
圖 2-1 丙烯醯胺聚合反應	21
圖 2-2 丙烯醯胺聚合成網狀結構	21
圖 2-3 跑膠的裝置	22
圖 2.4 抗體反應示意圖	30
圖 3-1 家蠶的蠶絲絲囊	31
圖 3-2 蠶絲蛋白質保存溶液穩定區域	33
圖 3-3 蠶絲絲囊在 4°C 與-80°C 保存的結果比較	34
圖 3-4 蠶絲蛋白質之電泳分析結果	35

圖 3-5 蠶絲蛋白質在 280nm 的 elution time	36
圖 3-6 蠶絲蛋白質的奈米自組裝結構	38
圖 3-7 不同奈米粒子的 ELISA 結果	40
圖 3.8 接合量子點的二抗辯認一抗的螢光顯示圖	42



表 目 錄

表格 1.4-1	被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊	6
表格 1.4-2	被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊	6
表格 1.4-3	被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊	6
表格 1.4-4	被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊	6



第一章 介紹

1.1 蠶絲在蠶轉變成蛹的變態過程，扮演著保護蛹的重要腳色，蠶絲是天然蛋白質所產生的絲線，蠶絲本身質量輕，但卻可保護蛹免去許多外來的破壞；因為蠶絲是蠶藉由吃桑葉後，將桑葉在體內經由絲囊做蛋白質的轉變過程，所以蠶絲蛋白質是一種天然蛋白質，對人體而言，它無毒、無害、無刺激性而且其與生物的相容性極佳，也因此蠶絲蛋白質被開發出成為有用的醫學材料，如：人造皮膚、血管、肌腱、韌帶、骨骼和牙齒等人造組織。蠶絲蛋白質還有良好的透氣性與保濕能力、抗 UV 的保護作用以及促進膠原蛋白分泌等效果，蠶絲蛋白質也發展成為化妝和美容的用品。蠶絲質地輕，但其保護與保暖的功能極佳，可將其開發成為軍事上和民生用品的保護用途的工具，亦可以做為環保領域上的應用。

綜合上述的了解，可知蠶絲蛋白質的應用領域相當廣泛，本實驗將以奈米尺度的微觀模式來研發蠶絲蛋白質的功能性，以自組裝成型的方式形成奈米生物材料，量測當其形成奈米尺度的生物結構時，其量子效應所主導的物性行為，如：導電性、熱傳性、光學特性等分析，並可針對性質發揮其應用之外，可再進一步了解蠶絲蛋白質形成奈米自組裝結構的機制，從中可以學習並模擬蛋白質分子自體組合的系統模式，以應用於多維的構造控制，並進而以高效率和低耗能的方法，加速發展分子光電元件、奈米級感測陣列晶片等的製造與分析方法。

1.2 從文獻回顧中來了解蠶絲蛋白質，先對蠶絲蛋白質的成份認識說起，在2001年時，日本科學家¹利用作出cDNA的方式，來分析蠶絲蛋白質中小分子量的胺基酸排序的結果，被分析到的小分子量蛋白質分別為seroin 1 和 seroin 2 (9.9KDa 和 10.3KDa) 以及 BmSPI 1 和 BmSPI 2 (6KDa 和 4.7KDa)，這些只有對少部份的蠶絲蛋白分析結果。

在2002年時，美國國家研究機構⁶，以蜘蛛絲蛋白質作分析(蜘蛛絲蛋白在固化後跟蠶絲蛋白質一樣會形成絲線結構)，先在蜘蛛絲上用C¹³做同位素標定，接著用酸解的方式將蜘蛛絲蛋白做分解，並且以HPLC和 Mass-Spectrometry分析其成分，發現成分中Glycine佔58%和Alanine佔31%為最主要的兩種胺基酸，對成分的了解有助於之後solid-state NMR的結構分析。



到2006年，日本國家研究團隊與中國的研究團隊共同合作²，將蠶絲蛋白質做整體的分析，將蠶絲絲囊分段的蛋白質以西方墨點法(Western Blotting)的2D膠上做整體分析，2D膠的實驗結果發現大約有400個蛋白質點，並且用抗體接合的方法來辨認各個蛋白質點，結果總共有93個蛋白質點被成功的標認出來，其實驗結果如下圖表所示：圖1.1 蠶絲絲囊的分段方式；圖1.2 分段絲囊的2D膠結果；圖1.3 被成功標認出的93個蠶絲蛋白質點；表格1.1 被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊

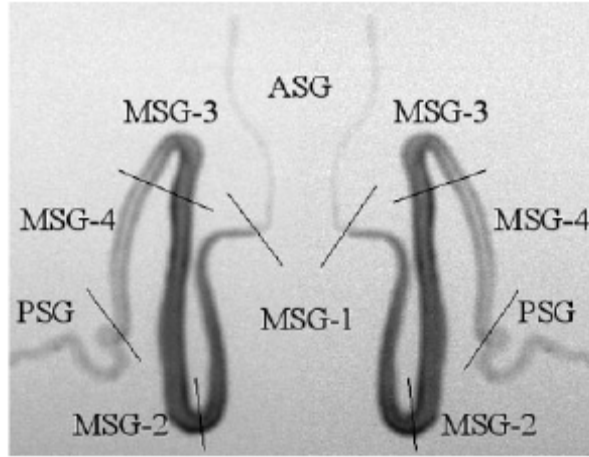


圖1.1 蠶絲絲囊的分段方式

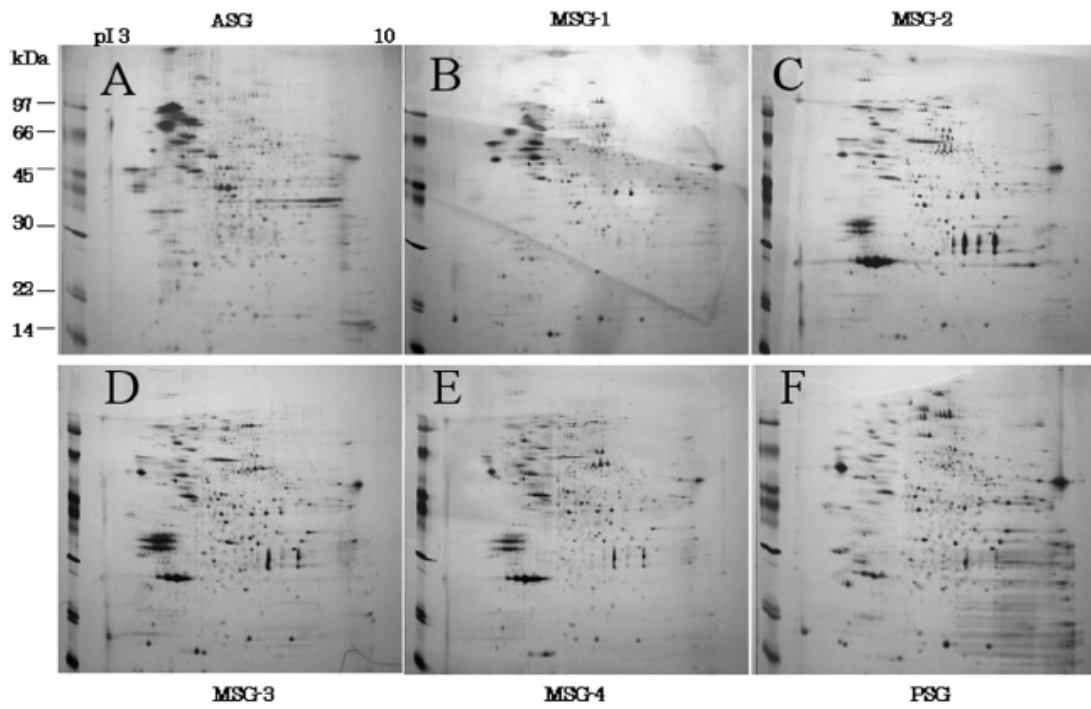


圖1.2 分段絲囊的2D膠結果

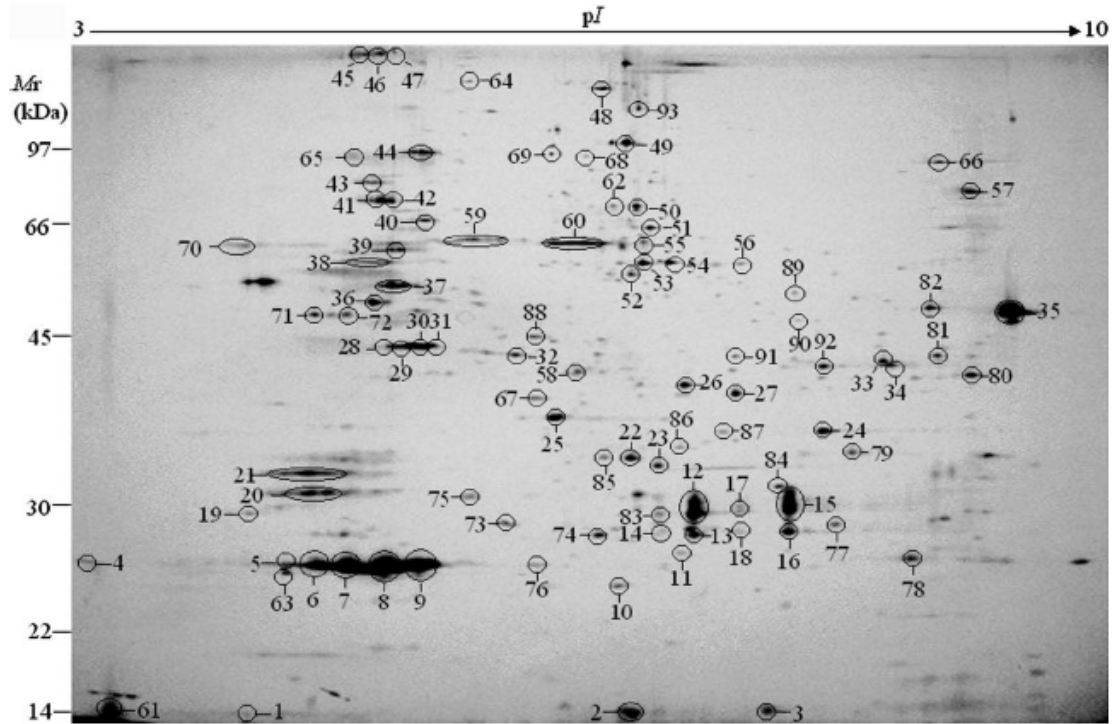


圖1.3 被成功標認出的93個蠶絲蛋白質點



Function classification	Spot no.	Gene name	Protein description	MW (Da)/pI	Accession no.		Matches, <i>n</i>	Coverage (%)	MOWSE score	Gene family	GRAVY value ^{bl}
					Swiss-Prot	NCBI GI					
Apoptosis	1	pdcd5	Tfar19 protein	14285.0/5.7	O14737	6226219	5	28.0	88.5	PDCD5	-0.902
	86	CG5370	Caspase-1 (EC 3.4.22. -)	35927.0/7.6	O02002	3023993	10	26.0	113.7	Peptidase	-0.353
Protein metabolism											
I. Biosynthesis	2	moac	Molybdenum cofactor C	17173.0/8.9	P94328	30179734	7	31.0	69.3	MoaC	0.063
	37	trpe	Anthranilate synthase	56085.0/5.4	P21689	136327	9	21.0	96.2	Anthranilate synthase	-0.129
	59 ^{d)}	alp	ALP (EC 3.1.3.1)	59235.2/5.9	P29523	14917025	8	18.0	216	Alkaline phosphatase	-0.344
II. Protein folding	43	hsp 90	90-kDa heat shock protein	82423.0/5.0	Q9BLC5	56207786	13	19.0	4.89E + 04	Heat shock protein 90	-0.689
	60 ^{d)}	CG8977	T-complex protein 1	59394.8/6.4	P48605	1729872	9	23.0	101.0	TCP-1 chaperonin	-0.099
III. Proteolysis	4	CG16749	CG16749 protein	28358.3/5.7	Q9VHF7	20152069	11	28.0	3.12E + 03	Peptidase	-0.158
	63	CG10938	Proteasome subunit alpha	26883.8/4.9	Q95083	12643296	10	33.0	722.0	Peptidase	-0.124
	70	CG32754	Vanin-like protein 1	62342.5/4.8	Q9NFP1	14423997	12	14.0	204.0	CN Hydrolase	-0.205
IV. Translation	33	gcat	Glycine acetyltransferase	45286.0/8.3	O75600	6685545	4	9.0	195.0	Amino-transferase	-0.012
	34	agxt	SPT (EC 2.6.1.51)	45816.0/8.6	O35423	10720292	5	16.0	147.0	Amino-transferase	-0.076
	35	None	Elongation factor 1-alpha	50373.0/9.2	P29520	232028	11	28.0	3226.0	GTP-binding elongation factor	-0.292
	40	glns	Glutamyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.18)	64310.0/5.3	P57847	13431881	8	18.0	327.0	Aminoacyl-tRNA synthetase	-0.570
	76	rpl 10	60S ribosomal protein L10	25506.0/9.9	O96647	18202261	4	20.0	599.0	Ribosomal proteins L10e	-0.659
Nucleic acid metabolism											
I. DNA metabolism	10	nudc (ypo3736)	NADH pyrophosphatase (EC 3.6.1.-)	29678.1/6.2	Q8ZAQ5	21362738	7	19.0	1.12E + 03	NUDIX hydrolase	-0.338
	36 ^{d)}	atpsyn-beta	ATP synthase beta chain (EC 3.6.3.14)	54140.0/5.2	Q05825	47606749	8	20.0	5689.0	ATPase alpha/beta chains	0.028
II. DNA binding	11	hexbp	Hexamer-binding protein	28226.0/8.2	Q04832	729704	7	23.0	96.7	CCHC-type finger zinc protein	-1.091
	27	fbx 18	F-box only protein 18 (EC 3.6.1.-)	38423.0/8.8	Q8NFX0	45476952	5	22.0	141.0	Helicase	-0.272
	78	None	Oocyte zinc finger protein	25812.8/9.2	P18750	141717	6	29.0	136.0	Zinc finger protein	-0.709
III. Transcription factor	26	CG7893 (ceh-20)	TALE/PBX homeobox	38155.0/6.7	P41779	1170308	9	26.0	66.4	TALE/PBX homeobox	-0.657
	77	CG6474 (taf 40)	TAFII-42 (p42) (TAFII40)	29314.7/9.3	Q27272	2498980	7	25.0	54.5	TAF9	-0.369
	79	CG5193	Transcription initiation factor IIB	34369.7/8.6	P29052	135628	11	27.0	124.0	TRIB	-0.257
	88	dpf 1	Zinc-finger protein neuro-d4 (D4)	44239.8/6.7	Q9QX66	13431818	10	26.0	1.31E + 03	Requiem/DPF	-0.737

表格 1.4-1 被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊

Table 1. Continued

Function classification	Spot no.	Gene name	Protein description	MW (Da)/pI	Accession no.		Matches, <i>n</i>	Coverage (%)	MOWSE score	Gene family	GRAVY value ^{bl}
					Swiss-Prot	NCBI GI					
IV. RNA binding	62	CG14637 (abs)	DEAD-box protein abstrakt	69488.4/6.4	Q9V3C0	12643521	7	29.0	5751.0	DEAD box helicase	-0.402
Signal transduction											
I. Transmembrane receptor	48	Igf2r	Insulin-like growth factor 2 receptor	274278.0/5.6	P11717	60416403	23	15.0	1.24E + 04	Tyr family of protein kinases	-0.368
	80	CG2028 (cki)	Casein kinase I (EC 2.7.1.-)	39535.4/9.4	P54367	1708620	11	44.0	5.00E + 03	Ser/Thr protein kinase	-0.484
II. G protein-linked receptor	66	CG7893 (vav)	Vav protein (DroVav)	91356.2/8.1	Q9NHV9	21759460	15	34.0	138.0	Rho GTPase activator	-0.487
III. Inhibitor	25	fst	Follistatin precursor	38003.0/5.5	O62650	3913668	7	21.0	436.0	Follicle stimulating hormone	-0.524
	56	CG11502	Steroid receptor seven-up type 1	57988.3/8.6	P16375	112858	14	20.0	1.68E + 03	Nuclear hormone receptor	-0.242
IV. Nuclear hormone receptor	38 ^{cl}	ftz-f 1	BmFTZ-F1	62174.0/7.8	P49867	44889025	16	31.0	106.0	Nuclear hormone receptor	-0.343
	67	nr2e1	Orphan nuclear receptor NR2E1	42619.5/9.2	O64104	6094489	9	18.0	1.33E + 03	Nuclear hormone receptor	-0.181
	82	cf1	BmCF1	52149.6/8.4	P49700	1345734	13	30.0	501.0	Nuclear hormone receptor	-0.363
Development protein	57	CG10901	Maternal effect protein oskar	69284.9/9.4	P25158	129239	12	28.0	259.0	Maternal effect protein	-0.482
	58	CG3956	Snail protein (Adducin-like protein)	42955.7/8.5	P08044	17380524	11	29.0	133.0	Snail C2H2-type family	-0.587
	64	CG9325	Hu-li tai shao protein (Adducin-like protein)	127939.2/5.9	Q02645	12644023	11	16	2.91E + 04	Aldolase class II	-0.480
	65	CG17369	Abrupt protein (Clueless protein)	95093.9/5.7	Q24174	27923726	14	25.0	246.0	C2H2-type zinc fingers	-0.621
	81	wnt-1	Wnt-1 protein (XWnt-1) (XInt-1)	41126.1/9.0	P10108	139748	12	29.0	2.21E + 03	Wnt	-0.366
	87	wnt-2	Wnt-2 protein (dWnt-2)	39763.4/9.4	P28465	34395990	17	56.0	93.6	Wnt	-0.476
	91	wnt-1	Wnt-1 protein	44204.4/9.6	P49340	1351426	21	52.0	1.31E + 05	Wnt	-0.521
	92	wnt-1	Wnt-1 protein	44204.4/9.6	P49340	1351426	18	26.0	4.82E + 04	Wnt	-0.521
Secretion and transport protein	5	Fibl	Fibroin light chain (Fib-L)	27669.1/5.1	P21828	119850	7	30.0	211.0	Fibroin	0.048
	6	Fibl	Fibroin light chain (Fib-L)	27669.1/5.1	P21828	119850	7	25.0	2.48E + 03	Fibroin	0.048
	7	Fibl	Fibroin light chain (Fib-L)	27669.1/5.1	P21828	119850	7	28.0	141.0	Fibroin	0.048
	8	Fibl	Fibroin light chain (Fib-L)	27669.1/5.1	P21828	119850	8	25.0	1.06E + 03	Fibroin	0.048
	9	Fibl	Fibroin light chain (Fib-L)	27669.1/5.1	P21828	119850	8	25.0	187.0	Fibroin	0.048

表格1.4-2 被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊

Table 1. Continued

Function classification	Spot no.	Gene name	Protein description	MW (Da)/pI	Accession no.		Matches, <i>n</i>	Coverage (%)	MOWSE score	Gene family	GRAVY value ⁶¹
					Swiss-Prot	NCBI GI					
	12	p25	25 kDa silk protein (p25)	25167.0/6.7	P04148	134484	5	17.0	757.0	P25	-0.102
	13	p25	25 kDa silk protein (p25)	25167.0/6.7	P04148	134484	7	29.0	785.0	P25	-0.102
	14	p25	Fibroin P25	25204.0/7.1	Q9BLL8	13383195	7	26.0	151.0	P25	-0.105
	15	p25	Fibroin P25	25204.0/7.1	Q9BLL8	13383195	6	25.0	169.4	P25	-0.105
	16	p25	Fibroin P25	25204.0/7.1	Q9BLL8	13383195	6	22.0	173.0	P25	-0.105
	17	p25	Fibroin P25	25204.0/7.1	Q9BLL8	13383195	5	17.0	384.0	P25	-0.105
	18	p25	Fibroin P25	25204.0/7.1	Q9BLL8	13383195	6	25.0	568.0	P25	-0.105
	20	ser1	Silk gum protein (Sericin 1)	38820.0/7.0	P07856-1	66774164	13	34.0	702.0	Sericin	-1.111
	21	ser1	Silk gum protein (Sericin 1)	38820.0/7.0	P07856	66774164	12	30.0	669.0	Sericin	-1.111
	22	Cbp	CBP	33638.0/6.5	Q8MYA9	21624017	10	49.0	4.90E + 05	Start	-0.589
	23	apoa1	Apolipoprotein A-I (Apo-AI)	30778.0/5.6	P02647	113992	5	26.0	58.8	Apolipoprotein	-0.717
	36 ^(s)	arcn1	Coatomer delta subunit	57210.4/5.9	P48444	1351970	6	14.0	62.7	Delta-COP	-0.392
	44	copg 2	Gamma-2 COP	97623.0/5.6	Q9UBF2	13124090	20	27.0	1.29E + 04	COPG	-0.113
	49	CG3879	p-Glycoprotein 49	142726.0/6.4	Q00449	266518	15	12.0	1.51E + 04	ABC transporter	0.014
	51	CG6816	Cytochrome P450 18a1 (EC 1.14.-.-)	61949.4/7.7	Q95078	12644471	13	38.0	64.0	Cytochrome P450	-0.238
	52	CG17369	V-ATPase 57 kDa subunit	54550.0/5.3	P31409	401325	10	24.0	2.76E + 05	ATPase	-0.151
	59 ^(s)	CG8302	Cytochrome P450 4a1 (EC 1.14.-.-)	58976.1/8.7	Q9V7G5	11386655	11	25.0	66.4	Cytochrome P450	-0.127
	60 ^(s)	CG4486	Cytochrome P450 9b2 (EC 1.14.-.-)	58911.7/8.4	Q9V4I1	12643913	11	37.0	162.0	Cytochrome P450	-0.277
	61	None	Pheromone-binding protein (PBP)	18086.0/4.9	P34174	2506472	18	78.0	706.0	PBP/GOBP	-0.136
	83	p25	25 kDa silk protein (p25)	25167.0/6.7	P04148	134484	5	17.0	361.0	P25	-0.102
	93	stard 9	StARD9	197964.0/5.9	Q9P2P6	25009281	18	26.0	2.43E + 04	Start	-0.645
Storage protein	68	sp2	Sex-specific storage protein 2	83467.0/6.0	P20613	1174445	14	23.0	3.69E + 04	Hemocyanin	-0.180
	69	sp1	Sex-specific storage protein 1	87242.6/6.8	P09179	134925	12	24.0	2.52E + 04	Hemocyanin	-0.190
	73	Lp	Low molecular weight 30 kDa (lipoprotein PBMHP-12)	30035.2/6.8	P09335	126416	18	59.0	845.0	30 kDa lipoprotein	-0.338
	74	Lp	Low molecular weight 30 kDa (lipoprotein PBMHPC-21)	28682.8/8.3	P09337	126418	6	32.0	148.0	30 kDa lipoprotein	-0.366
	75	Lp	Low molecular weight 30 kDa (lipoprotein PBMHP-6)	29734.1/6.1	P09334	126415	9	38.0	240.0	30 kDa lipoprotein	-0.444
	84	Lp	Low molecular weight 30 kDa (lipoprotein PBMHPC-23)	30343.0/8.5	P09338	126419	6	29.0	136.0	30 kDa lipoprotein	-0.339
Cell defense	19	CG14823	MHC 1 Antigen	29682.9/6.5	Q9VS11	24659731	7	21.0	152.0	Antibacterial peptide	-0.536

表格1.4-3 被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊

Table 1. Continued

Function classification	Spot no.	Gene name	Protein description	MW (Da)/pI	Accession no.		Matches, <i>n</i>	Coverage (%)	MOWSE score	Gene family	GRAVY value ^{bl}
					Swiss-Prot	NCBI GI					
	45	None	Humoral lectin	343355.0/5.6	P98092	1346296	16	19.0	2.49E + 04	Lectin	-0.477
	46	None	Humoral lectin	343355.0/5.6	P98092	1346296	16	19.0	2.49E + 04	Lectin	-0.477
	47	None	Humoral lectin	343355.0/5.6	P98092	1346296	14	14.0	1.94E + 04	Lectin	-0.477
	53	CG9081	Cytochrome P450 4s3 (EC 1.14.-.-)	57189.8/9.0	Q9VXY0	11386677	14	38.0	1.33E + 03	Cytochrome P450	-0.357
	54	CG10243	Cytochrome P450 6a19 (EC 1.14.-.-)	57758.6/9.0	P82711	11386688	12	38.0	392.0	Cytochrome P450	-0.183
	55	CG10243	Cytochrome P450 6a19 (EC 1.14.-.-)	57758.6/9.0	P82711	11386688	19	39.0	633.0	Cytochrome P450	-0.183
	89	cyp6a2	Cytochrome P450 6a2 (P450-B1)	58685.4/8.5	P33270	12644217	7	26.0	136.0	Cytochrome P450	-0.206
	90	CG10247	Cytochrome P450 6a21 (EC 1.14.-.-)	57842.4/8.6	Q9V774	11386702	11	24.0	309.0	Cytochrome P450	-0.230
Cell structure											
I. Organelle organization	24	mrps 9	40S ribosomal protein S9	38593.0/10.3	O94150	12229973	6	24.0	92.1	Ribosomal protein	-0.564
	39 st	hsp 60	Heat shock protein 60	61888.7/5.7	P50142	8488985	7	14.0	605.0	HSP 60	-0.056
	41	None	Heat shock 70kDa protein	73096.0/5.1	O76180	3426021	15	25.0	2.13E + 05	HSP 70	-0.519
	42	None	Heat shock 70kDa protein	73096.0/5.1	O76180	3426021	15	31.0	9.80E + 05	HSP 70	-0.519
	85	CG16844 (sesB)	ADP/ATP translocase	32909.5/9.8	Q26365	25453424	7	20.0	201.0	Mitochondrial carrier	0.061
II. Cytoskeleton organization	3	CG4254	Cofilin/actin depolymerising factor (twinstar protein)	17153.6/6.7	P45594	1168731	5	24.0	94.0	ADF	-0.719
	28	act1D	Actin, cytoplasmic A4	41822.2/5.3	P84183	67462113	8	25.0	5.36E + 03	Actin	-0.193
	29	None	Actin, cytoplasmic A3	41918.3/5.4	P04829	3123181	5	30.0	672.0	Actin	-0.225
	30	None	Actin, cytoplasmic A3	41918.3/5.4	P04829	3123181	8	27.0	2481.0	Actin	-0.225
	31	act1D 1D)	Actin, cytoplasmic A4	41822.2/5.3	P84183	67462113	8	19.0	126.0	Actin	-0.193
	38 st	CG9359	Tubulin beta-2 chain	49869.9/4.7	P61857	48429158	9	19.0	1659.0	Tubulin	-0.360
	39 st	None	Tubulin beta chain	50335.0/4.7	P41385	1174602	10	28.0	1.87E + 05	Tubulin	-0.328
	71	None	Tubulin alpha chain	49906.0/5.0	P52273	1729841	7	16.0	2.55E + 04	Tubulin	-0.205
	72	None	Tubulin alpha chain	49906.0/5.0	P52273	1729841	16	27.0	4.32E + 05	Tubulin	-0.205
Cell cycle regulation	32	ccn B2	G2/mitotic-specific cyclin B2	43960.6/8.5	O93229	5921732	6	19.0	2.55E + 04	Cyclin	-0.236
	50	CG4488 (wee)	Wee1-like protein kinase (EC 2.7.1.112)	68810.0/7.1	P54350	12644315	6	9.0	192.0	Ser/Thr protein kinase	-0.625

表格1.4-4 被標認出的93個蠶絲蛋白質點的資訊

1.3 就蛋白質的結構分析而言，在參考文獻²⁸中有實驗設計是利用高解析度固態 C^{13} 同位素NMR來分析蠶絲的胜肽鍵結結構，蠶絲蛋白質結構大致上分成3種形式：(i)由高度重覆的AGSGAG單體(共有432複製品)組成的結晶區域，(ii)由重複性較低的GAGAGY和/或GAGAGVGY單體(分別有120個和11個複製品)共同組合成的半結晶的區域，(iii)第三種形式是類型i的衍生物，如AGSGAGAAS所形成的非結晶區域，此非結晶區域通常帶負電、具有極性且是體積較大的親水性區域，結合這三種形式的結構後，這也是蠶絲蛋白質具有超級二級結構的主要原因。

Silk I和silk II是兩種結晶形式，經由X-ray繞射方法、Infra-red觀察和 ^{13}C 加 ^{15}N 同位素固態NMR光譜儀的結果發現到是同種二形物，silk I是液態的蠶絲蛋白質在形成絲之前的固體結構，silk II則是液態的蠶絲蛋白質形成絲之後的固體結構，可藉由化學方法讓silk I轉變成silk II，例如：將液體狀態的蠶絲蛋白質或其胜肽鍵結構溶解在9 M LiBr溶液裡，接著用去離子水作透析，這樣就可以得到silk I的結晶結構，若繼續將silk I結構泡在甲酸溶液中(formic acid)，之後進行乾燥，就會形成silk II的結構，結構的轉變可藉由chemical shift和碳鍵的共振模式作很明顯的區分和辨別。這是蠶絲蛋白質所擁有的特殊性質。

跟蠶絲蛋白質具有類似特性的蜘蛛絲蛋白質，在結構的研究上有顯著的進步，例如：使用高解析度的原子力顯微鏡 (atomic force microscopy

AFM)¹⁰，將類似蜘蛛絲蛋白的成分和結構的單分子結構合成類蜘蛛絲蛋白作掃描分析，此結構由兩種單分子聚合而成，為SPI和SPII序列，SPI序列為poly(A)[poly-(alanine)]和poly(GA)[poly-(glycy-alanine)]所組成的16個胺基酸排列，側鍊再加上22個胺基酸所組成的富含glycine的GGX單體，SPII序列則為12個胺基酸所構成的2個GPGGX單體，之後藉由基因選植表現之後，蛋白質組成結果為[(SPI)₄ + SPII]₄的重複排列結構，可以形成奈米纖維狀的結構，作者將此結構稱為pS(4+1)，結果的如下圖所示：

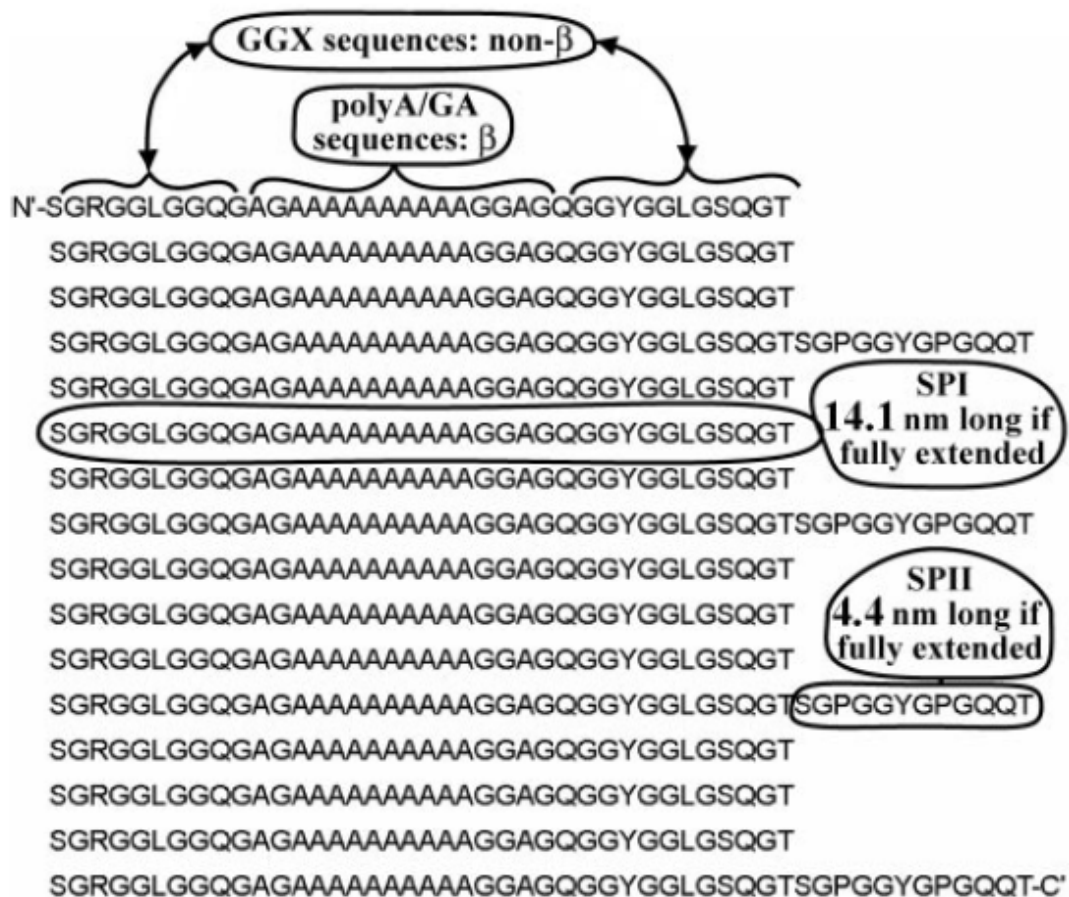


圖 1.5-1 pS(4+1)蛋白質結構示意圖

之後將此合成的類蜘蛛絲蛋白質結構進行AFM掃描，可發現結構的結果跟蛋白質排列示意圖中所描述的幾乎相近，蛋白質結構掃描後的AFM

圖：

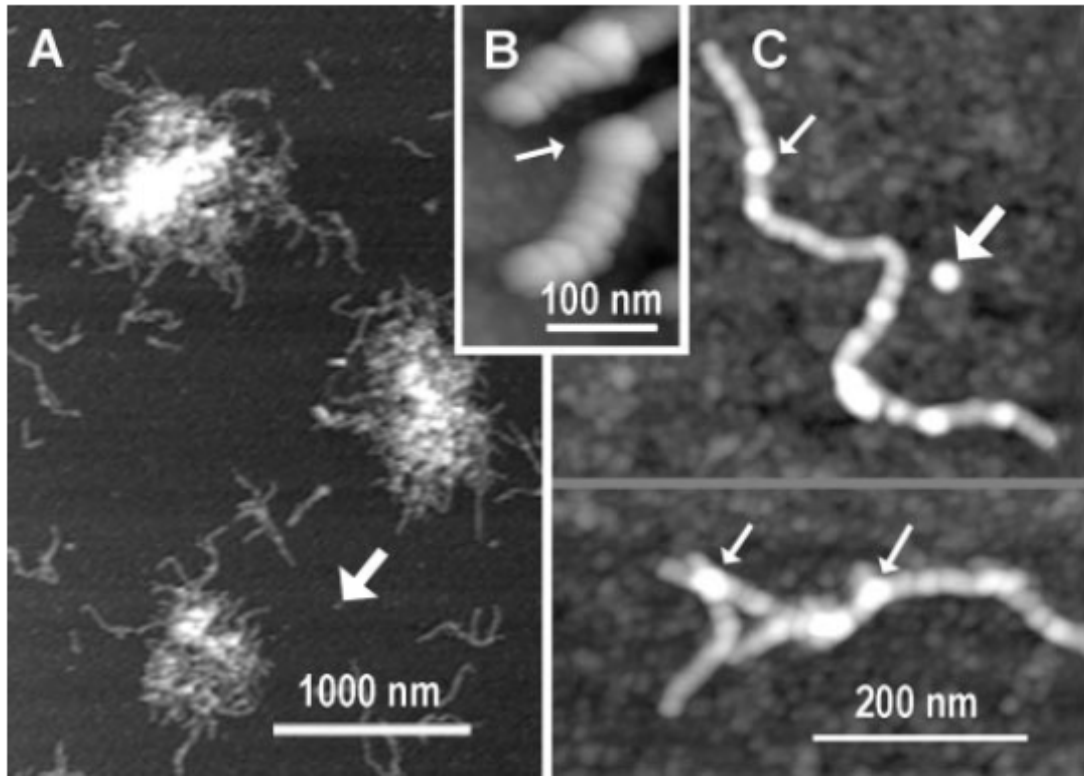


圖 1.5-2 類蜘蛛絲合成蛋白自組裝結構之AFM圖

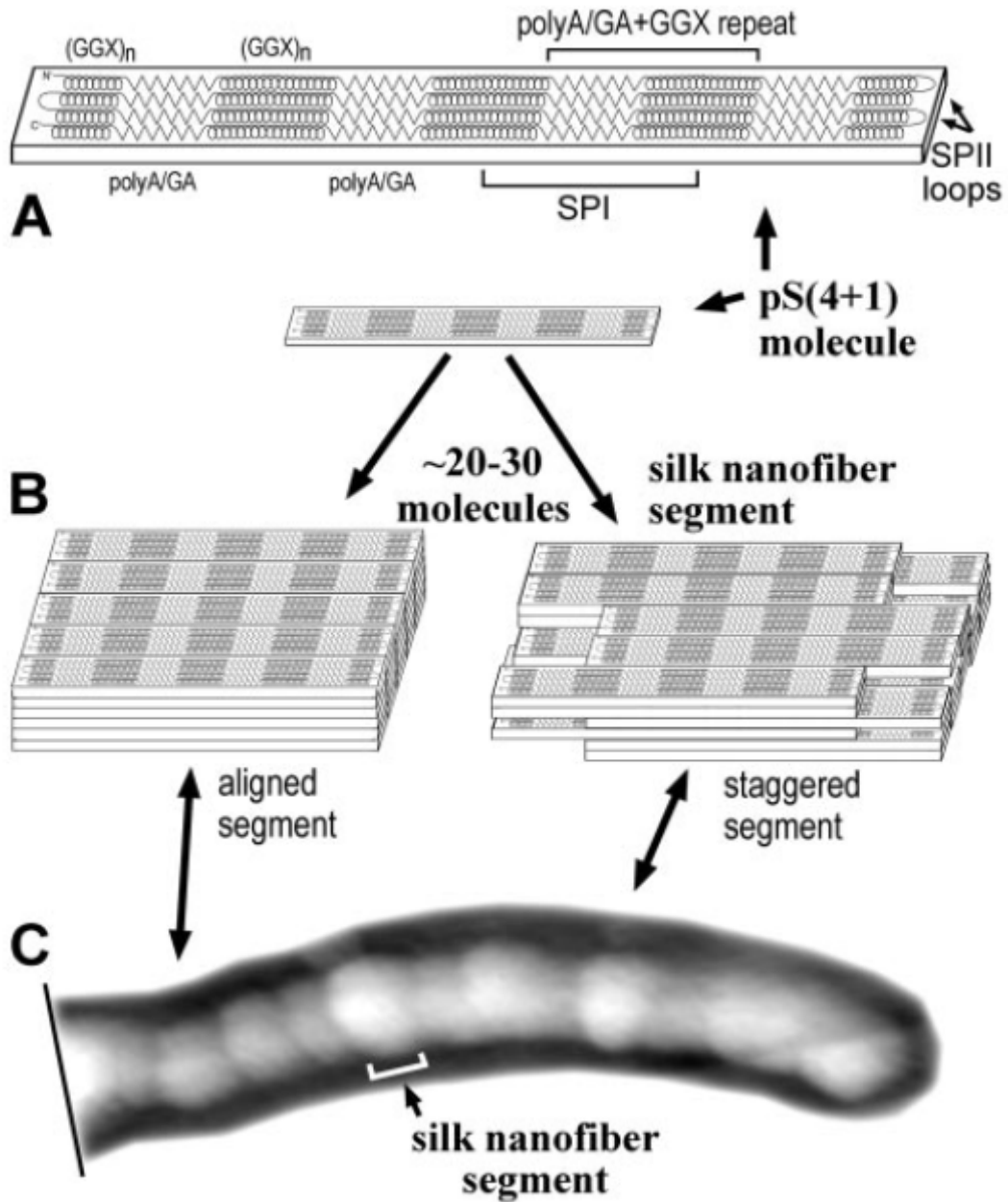


圖 1.5-3 類蜘蛛絲合成蛋白自組裝之結構分析

從圖中，我們可以明顯發現結構的形狀是螺旋狀以及摺板狀一起組成的，呈現整齊而且重複出現的奈米纖維結構，與之前預測的原始蜘蛛絲蛋白質的二級結構³⁵非常相類似(如下圖所示)。

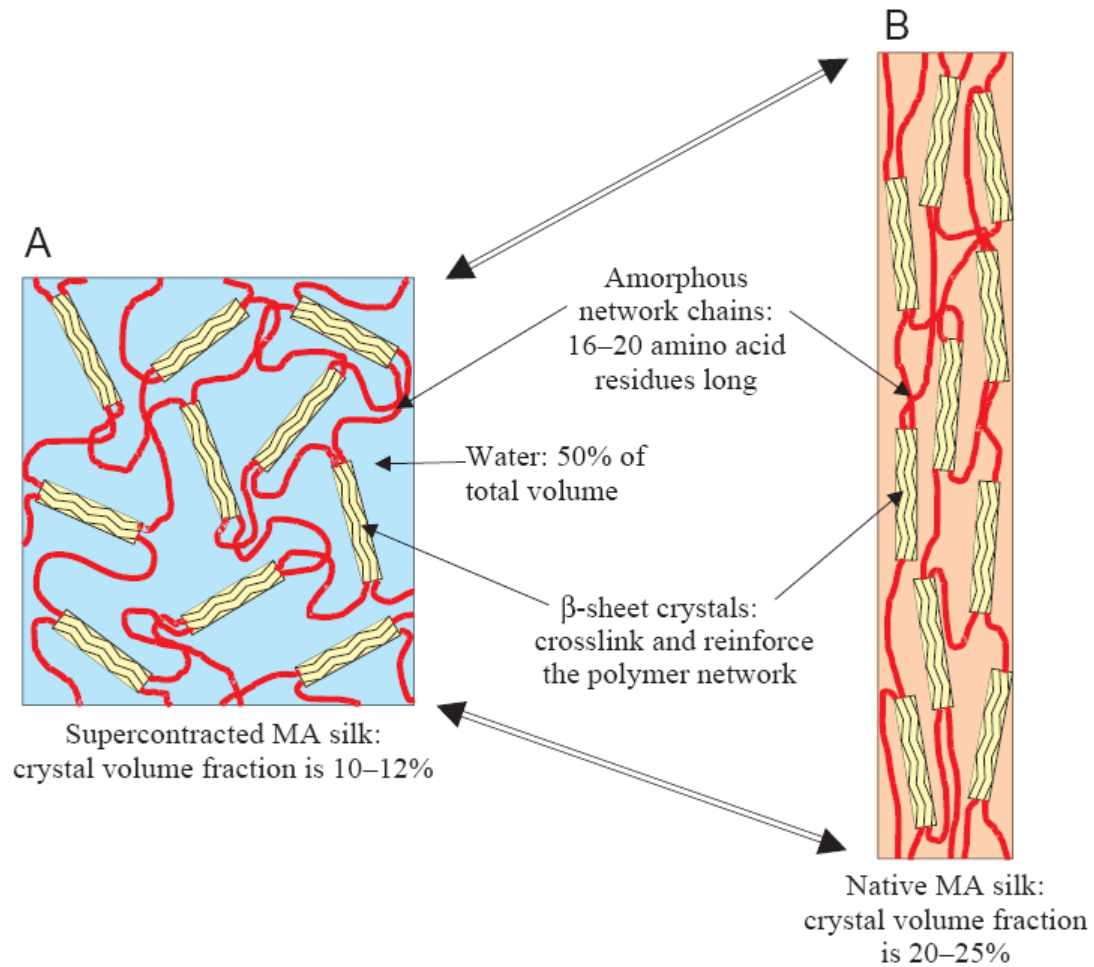


圖 1.5-4 液體狀態蜘蛛絲蛋白質之二級結構預測圖

此研究團隊也利用了AFM的探針對奈米纖維作細微的機械性質量測，而且有實驗顯示蠶絲蛋白質與蜘蛛絲蛋白質性質相近，所以相信這些方法都值得去學習跟利用。

對於蠶絲蛋白質二級結構的認識非常重要，因為我們可以預測當蠶絲蛋白質作自組裝結構之後，所會形成的形狀，我們預測會形成奈米纖維狀或者是管狀的形式。同樣的，可以參考不同種類蛋白質會形成自組裝結構的方式以及應用。

例如：用KFE8 (FKFEFKFE)的胜肽鍵¹⁴來觀察其在自組裝的進行的時

候，隨時間改變的結構變化情形，藉由AFM作為觀測的工具，觀察每個時間點的介穩定狀態結構，實驗方法為先將KFE8溶解在穩定的保存溶液當中，讓保存溶液能夠在室溫中作保存，並且藉由控制保存溶液的濃度和酸鹼值(pH值)，來避免因為溶液中的離子不穩定而造成有析出物產生，接著將這個含有KFE8的溶液在雲母片上形成自組裝結構，並且設定觀測的時間點來看介穩定的結構狀態，實驗結果如下圖：

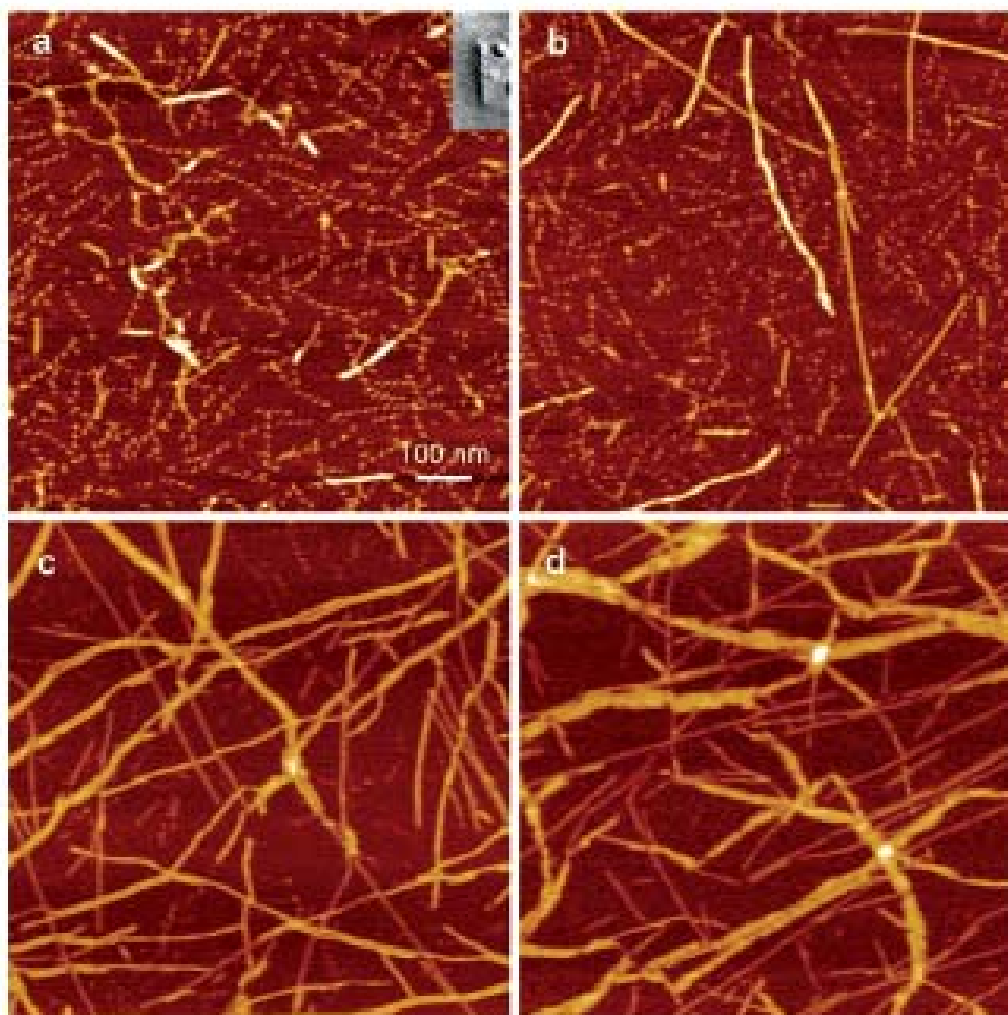


圖 1.6 KFE8在保存溶液中形成自組裝結構的介穩定狀態(AFM)

a .8分鐘之後的狀態,a圖的右上方是用快速冷卻的方式，讓結構定型

時，用電子顯微鏡觀察到的結果；b.35分鐘之後的結果；c.2小時後的結果；d.30小時後的結果，由此可見，自組裝結構會隨時間慢慢轉變成更複雜的結構，了解蛋白質形成自組裝結構的機制是非常重要的，這有助於作蠶絲蛋白質的自組裝結構的條件設定。

除了了解自組裝的機制之外，自組裝結構的應用變得更令人感興趣了，例如：使用利用有機胍肽鍵所形成的自組裝結構來辨認奈米金粒子¹²，用diphenylalanine做自組裝，最後會形成共軸的奈米管狀結構，第二步是加入銀離子，讓銀離子填滿奈米管的中空部份，並且將銀離子做還原，第三步再將奈米管接合含有硫氫鍵(-SH)的diphenylalanine，接著第四步就是加入金粒子，這樣金粒子就會被奈米管表面的硫氫鍵接合。實驗的流程圖如下：

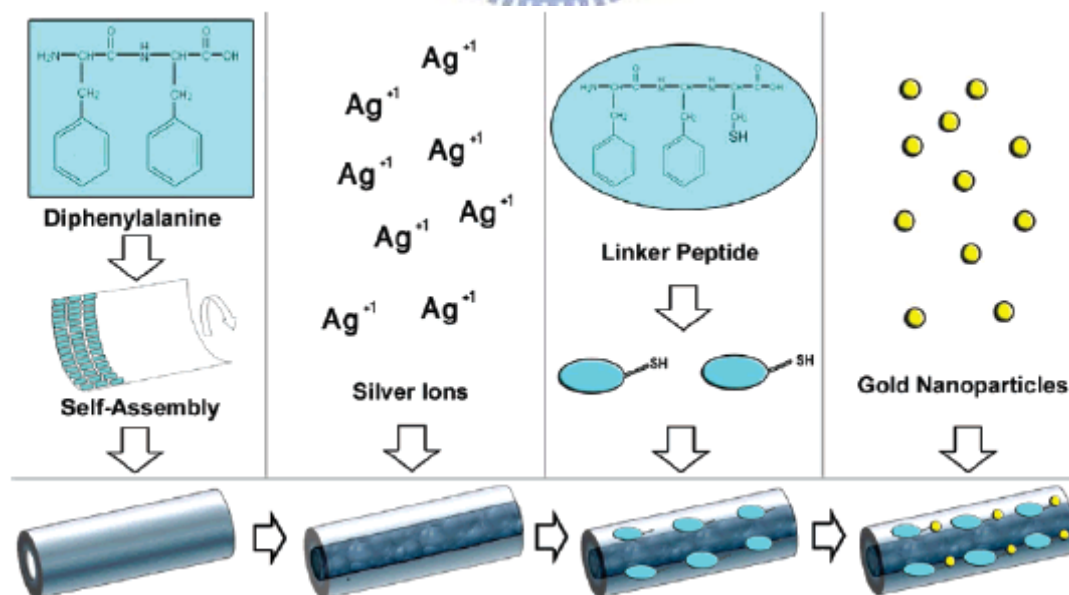


圖 1.7-1 自組裝結構奈米管辨認金粒子實驗流程

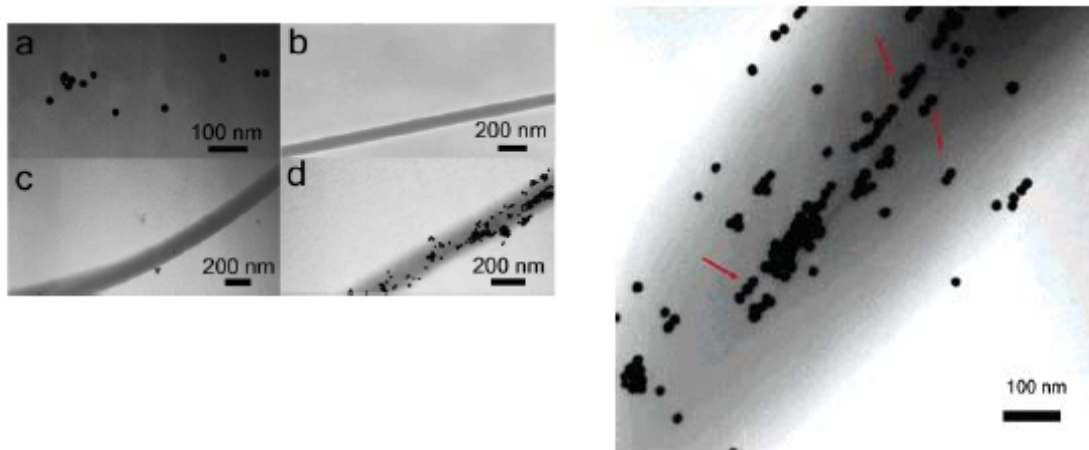


圖 1.7-2 金粒子與自組裝奈米管接合的TEM圖

從上圖的結果可以清楚看出，自組裝奈米管的表面有修飾硫氫鍵跟沒有硫氫鍵，對於金粒子在表面上的接合，會有很明顯的差異，在上圖的左圖當中，c圖表示奈米結構表面無修飾硫氫鍵，所以幾乎沒有金粒子接合上去，而d圖表示結構表面有修飾硫氫鍵，所以就很容易與金粒子接合，上圖的右圖是d圖放大的結果，從圖中更可以明顯的看出，金粒子也會隨著表面修飾的硫氫鍵做具有方向性的接合。

1.5 在選作此實驗之前，搜尋到幾篇的相關研究論文，其中的一篇¹¹是將選用的鞭毛狀蛋白質做自組裝的奈米結構成型，並且針對這種特殊形狀的奈米結構作分析，利用螢光顯微鏡、transmission electron microscopy (TEM)以及光學性質的量測，希望藉由此種新式的奈米結構，讓它發展成為具功能性的蛋白質，而本實驗將學習這些觀念並朝著此方向來做。

1.6 在本實驗中，所選用的蛋白質為蠶絲蛋白質，會選用蠶絲蛋白質的

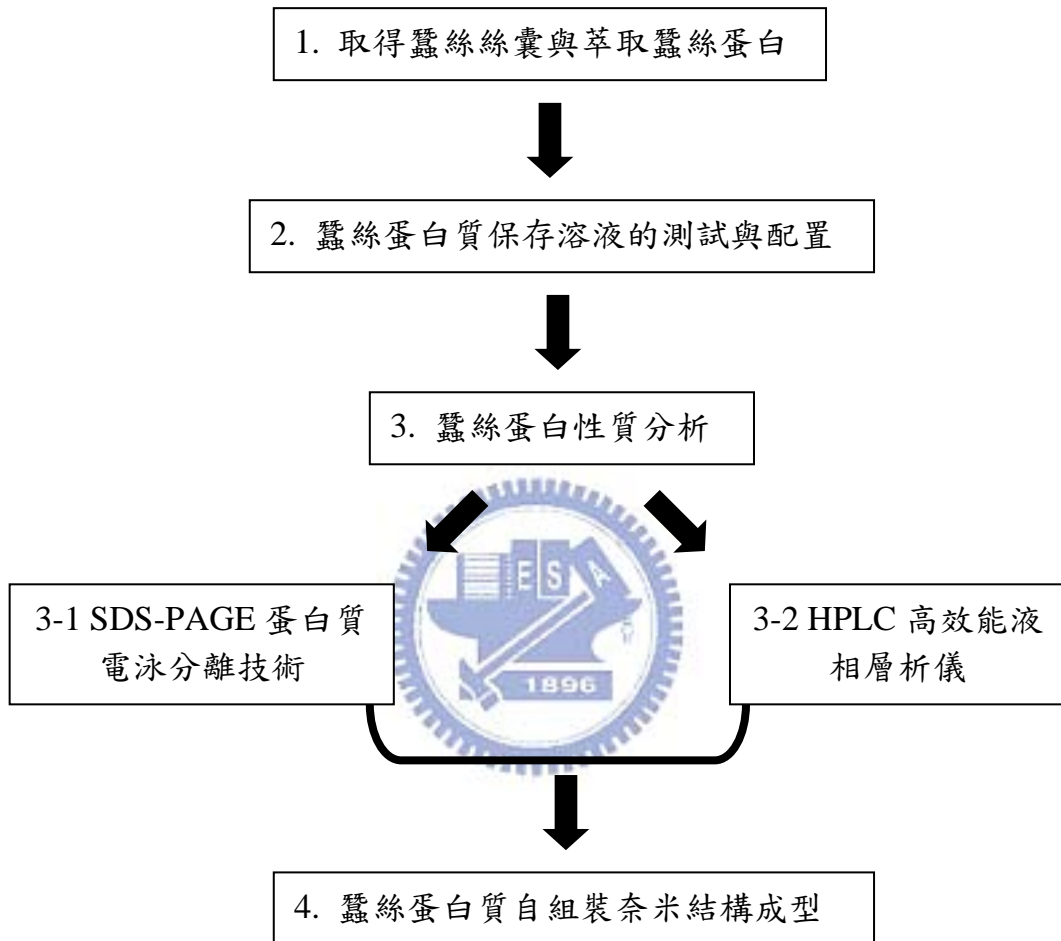
主要原因有二，一. 蠶絲蛋白質可藉由一定程度的培養，來獲得較大量而且品質較佳的蠶絲蛋白質，這對於實驗的進行相當有利，可排除掉很多的失敗因素，第二. 截至目前為止，大家對蠶絲蛋白質的研究僅停留在分析其組成成分和探討其分子量大小的地步，並未做更進一步深入探討和發展，而在本實驗中除了做成分分析以及分子量定量之外，將朝著在上面所論述的方向來進行研究，以更微觀的角度，再結合生物分子自組裝的觀念和模式導入實驗方法，讓蠶絲蛋白質形成奈米結構構型，分析其在奈米尺度中所具有的量子物性行為、光學性質、導電性和熱傳度等，讓蠶絲蛋白的應用更多元且更加強化其功能性。



第二章 實驗設計、步驟與方法

實驗一：

▲ 實驗設計流程圖：



▲ 實驗方法與步驟：

一. 2.1 蠶絲絲囊的取得

蠶在成蟲時期，每隔七天會脫皮一次，脫皮一次稱二齡蠶，脫皮二次稱三齡蠶，成蟲到結蛹前總共會脫皮四次，所以欲取得大量的蠶絲蛋白質必須解剖五齡蠶的蠶絲絲囊，本實驗所用的蠶的種類是家蠶(**Bombyx mori**)，取得蠶絲蛋白之後，必須將蠶絲蛋白保存在能夠讓蛋白質穩定又不變性的化學溶液中，以利之後的自組裝結構形成。

一. 2.2 蠶絲蛋白質保存溶液的配置

蠶絲蛋白質也是蛋白質的一種，蛋白質容易在空氣中氧化且變性，所以保持蠶絲蛋白質的活性變的相當重要，利用製作相圖的方式來找出能夠讓蠶絲蛋白質穩定存在的保存溶液。相圖的條件設計分別有溶液中的鹽類濃度、酸鹼度以及保存溫度，條件範圍如下：

1. KCl (鹽類)濃度： 0~600mM
2. 加入磷酸根(NaH_2PO_4)來調整溶液酸鹼度： pH= 2.0~10.0
3. 加入尿素(Urea)濃度：0~4M
4. 保存溫度有3種：4°C、-30°C、-80°C


溶液的配置均必須用二次水 (milli Q water) 以避免水溶劑中不必要的離子雜質干擾蛋白質，並且須經過0.25 μm 的filter過濾，以確保溶液的潔淨度。

在這些條件之內，找出最適合蠶絲蛋白質穩定存在的條件範圍。

一. 2.3 蠶絲蛋白質的性質分析

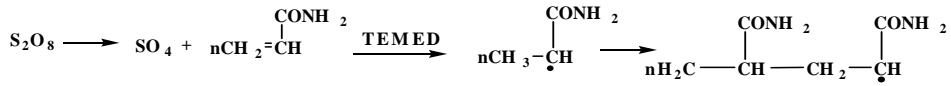
2.3.1 ——分子量分析

由於蠶絲蛋白質具有多種蛋白質成分組合而成，所以必須先將蠶絲蛋白質製成帶電分子，再經電泳原理將蛋白質做分離，帶電分子在電場中會被電流移動，是為泳動；其泳動的大小程度稱為泳動率 (mobility)。蛋白質的相對泳動率(R_f)與分子上電荷密度(q)，所施加的電壓(E) 成正比，而與其分子摩擦力成反比，電泳即是利用各種蛋白質在電場中不同的移動速率來達到分離的目的。



Polyacrylamide gel 組成：主成份是 acrylamide 組成網狀直鏈結構與 BIS (N,N-methylene bisacrylamide)組成網狀的支鏈結構，在加入 APS (ammonium persulfate)與 TEMED (N,N,N,N-tertramethyl-ethylenediamine) ，產生氧化自由基與開始聚合(polymerization)反應，膠體孔洞大小取決於 acrylamide 總濃度，濃度越大，孔洞越小。其聚合反應如圖 2-1 與圖 2-2

A. Polymerization of acrylamide



B. Reaction involved in cross-linking acrylamide chains

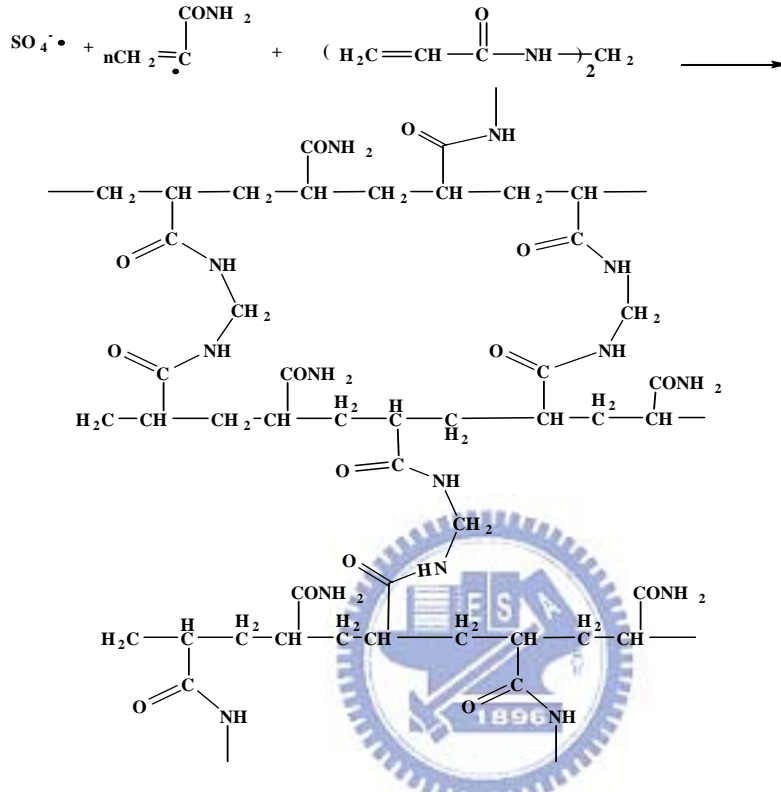


圖 2-1 丙烯醯胺聚合反應

圖 2-2 丙烯醯胺聚合成網狀結構

在膠體中加入一種 detergent 為 sodium dodecyl sulfate(SDS)用來使蛋白質變性(denature)，SDS 會與蛋白質結合使一有摺疊構形蛋白質拉成直鏈狀之一級結構，此複合體均帶負電，所以在膠體中移動率僅與蛋白質分子量有關。電泳的裝置在本實驗中為 slab gel(如下圖 2-3)，利用兩片玻璃白板組成的空隙形成膠體，膠體分為兩層，上層為 stacking gel 孔洞較大，目的是讓樣品中的蛋白質在進入 separating gel 前被壓縮成一直線(在 stacking gel 中為

pH6.8，此時緩衝液中 glycine 不帶電跑最慢，而氯離子跑最快，蛋白質被夾

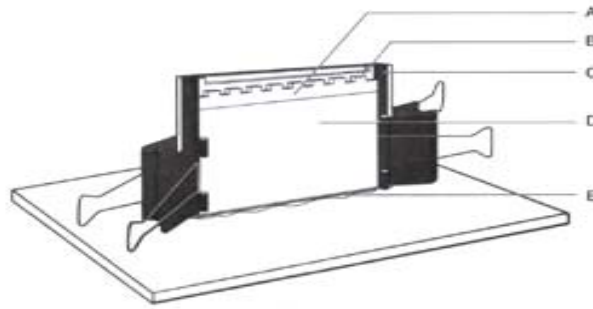


圖 2-3 跑膠的裝置

在中間)，下層為 separating gel，pH 值為 8.8，此時 glycine 變為帶負電移動最快，再來是氯離子，而蛋白質則因其孔洞較小，為主要利用分子量大小分離之。

而最常用來偵測蛋白質 bands 的方法是利用一染劑 Coomassie Brilliant Blue R-250，使得 gel 上的蛋白質 bands 會被固定，而大部分 dodecyl sulfate 會被 buffer 中的甲醇與醋酸洗去。所以跑 SDS-PAGE 是一種最常使用來分析蛋白質純度與定量的方法，尤其是在進行蛋白質純化時，若此酵素沒有一個適當的活性分析的方法時，可以利用 SDS-PAGE 來判斷之。

所需器材及試劑

器材：

1. 玻璃片、白板各一片；
2. spacer、comb；
3. 夾子兩個；
4. 電泳槽；
5. Power Supply；
6. 塑膠盒一個；
7. Incubator；
8. 錐形瓶兩個；
9. 塑膠吸管；
10. 玻

璃紙

試劑：

Separating gel 8%

	8%
H₂O	4.68 ml
1.5M Tris-HCl (pH=8.8)	2.5 ml
30% Acrylamide-Bis	2.67 ml
10% SDS	100 ul
10% APS	50 ul
TEMED	10 ul

Stacking gel 4%

	4%
H₂O	3.05 ml
0.5M Tris-HCl (pH=6.8)	1.25ml
30% Acrylamide-Bis	650 ul
10% SDS	50 ul
10% APS	25 ul
TEMED	10 ul

5X Sample buffer

ddH ₂ O	4.0 ml
0.5M Tris-HCl, pH6.8	1.7 ml
Glycerol	5.0 ml
20%(w/v)SDS	0.5 ml
2-mercaptoethanol	2.0 ml
0.05%(w/v)bromophenol blue	4~8 mg
total	10.0 ml

dillute the sample at least 1:4 with sample buffer,and heat at 95°C ,5 min
store in -20~-70°C

Gel stock solution

All gel stock solution filtered through millipore 0.45 µm

30% Acrylamide

300g acrylamide dissolved in ddH₂O, add ddH₂O to 1 liter
Store at 4°C in dark

1% Bis-Acrylamide (N,N'-methylene bis-acrylamide)

5g bis-acrylamide dissolved in ddH₂O, add ddH₂O to 0.5 liter
Store at 4°C in dark

Separation Gel Buffer--- 1M Tris pH8.8,

24.6 g Tris-Hcl (MW 158)

102.6 g Tris-base (MW 121.1)

Make to 1 liter ddH₂O, Store at 4°C

Stacking Buffer---1M Tris pH6.8

121.1 g Tris base + HCl

Make to 1 liter ddH₂O adjust pH to 6.8 Store at 4°C

20% SDS Store at room temperature

20 g SDS dissolved in ddH₂O , add final H₂O to 100 ml

10X Electrode Buffer Stock, pH8.3

144g glycine

30g Tris-base

10g SDS

make to 1 liter ddH₂O Store at 4°C

1X Electrode Buffer (made from 10X)

Dilute to 1X electrode buffer when used

Gel Stain-Coomassie Blue

1.5 g coomassie Blue

Dissolve dye in methanol first

500ml methanol(absolute)

500ml ddH₂O

100ml acetic acid

Store at room temperature

Destain solution I

Methanol 400ml

Acetic acid 100ml

ddH₂O 500ml

Store at room temperature

· 10% APS and TEMED

· Saturated Tert-butanol in ddH₂O

· Protein Marker

Destain solution II

Methanol 50ml

Acetic acid 120ml

ddH₂O 880ml

實驗步驟：

1. 把 spacer 夾於玻璃與白板間，組裝架好後，用夾子施力平均的夾好兩邊

(用水先試驗會不會漏)。

2. 依上述配方的順序依次加入，配製下層膠(separating gel)加到整片 gel 的 2/3 的地方(當 APS 與 TEMED 加入時聚合反應即開始，混合均勻後須盡快倒入)。
3. 加入 ethanol(可蓋過一層薄薄的量即可，不需太多)壓平 gel，進行聚合反應約 30 分鐘。
4. 倒掉 ethanol，用水輕輕沖洗。
5. 同樣依上述步驟配製上層 gel 後，插入尺梳(comb)，進行聚合約 30 分鐘。
6. 樣品配製：加入 5X sample buffer(最後稀釋成 1X)。
7. 樣品於 95 °C，加熱 10 分鐘後待冷卻。
8. 倒入 running buffer 於電泳槽中。
9. 將樣品小心注入 well 中(注意不要讓 sample 飄起)。
10. 進行電泳(一開始用 80 伏特電壓，待 dye 跑至下層 gel 時，電壓可加大至 100 伏特電壓，直至 dye 跑到 gel 底下還未完全跑掉時即可關掉)。
11. Coomassie brilliant Blue R250 染色 20 分鐘。
12. 用 destain buffer I 去染色 20 分鐘。
13. 用 destain buffer II 去染至隔天。
14. 用玻璃紙封膠，把膠放於燒杯頂上，先放一片玻璃片，放上弄濕的玻璃紙並倒上一些水，再把膠放上去，用另一玻璃紙蓋上(小心儘量不要有

氣泡)待其自然乾。

2.3.2 高效能液相層析儀分析 (HPLC)

液相層析分離過程，主要是由各成分物質與固定相之間相互作用，利用移動相極性強度將不同成分物質沖提分離出來。利用 HPLC 分析蠶絲蛋白的光吸收值，及了解蠶絲蛋白質的分子量大小，若有分離出小分子的話，再針對各個小分子進行定量或定性的分析，HPLC 系統包含 L-2100 pump、L-2200 Autosampler、L-2450 diode array detector，實驗中所用的管柱(column) 型號為 BioSep-SEC-S4000，在注入蠶絲蛋白質溶液之前，必須先用 $0.2\ \mu\text{m}$ filter 進行過濾，以除去多餘雜質，移動相 (mobile phase) 用蠶絲蛋白質保存溶液 (即 buffer I)，流速 (flow rate) 設定為 $1\text{mL}/\text{min}$ ，觀測波長為 280nm ，時間設為 20 分鐘。

一. 2.4 蠶絲蛋白質自組裝結構成型

自組裝奈米技術：「自組裝」(Self-Assembly) 是存在於化學及生化系統中隨處可見的一種自然現象，其主要是指多種不同組成的分子，受到分子間非共價鍵作用力的影響，依熱力學原理以最穩定之狀態組合，而自然發生自組裝排列的現象。其特色為以非常簡單而直接形成奈米大小的分子，且在幾乎不需外加能量的方式，進行製造組裝的程序；也可能因此帶來低廉的製造成本及簡便的操作、設備；所以在奈米製造及控制技術中，深具

開發潛力。

將置於保存溶液中的蠶絲蛋白質藉由參數的設定與控制來找出讓蠶絲蛋白質行成自組裝結構的最佳條件，參數設定和範圍如下：

- (1) 蛋白質濃度(UV-OD280nm)：1.0mg/mL；0.5mg/mL；0.25mg/mL。
- (2) 乾燥時間：1 week；3 days；1 days。
- (3) 乾燥溫度：25 °C；37 °C；50°C。
- (4) 溶液 PH 值：8.0；7.0；6.0。
- (5) 自組裝的環境：乾燥箱；培養箱。

依照上述的五種參數條件去進行實驗，將各組的結果先進行SEM觀察前的固定處理，固定的步驟為加入戊二醛(GLUTARALDEHYDE)與已成型的蠶絲蛋白質自組裝結構作用 30 分鐘，目的是讓蠶絲蛋白質的自組裝結構能夠固定於乾淨的矽晶圓上，接著加入PBS buffer清洗，再來加入鉞酸溶液(OsO₄)作用 30 分鐘，加入鉞酸的目的是利用重金屬染色的原理使我們的結果在SEM觀察下得到更好的對比效果，緊接著在做梯度酒精的脫水動作，酒精的梯度順序為 50%；60%；70%；80%；90%；95%；100%(無水酒精)，每個梯度分別作用 5 分鐘，從 50%到 90%的梯度作用一次，95%作用兩次，無水酒精作用三次，最後再加入HMDS (hexamethyldisilazane)幫助脫水，之後用JEOL 6700 SEM (10KV，10mA，Field Emission Gun) 來觀察，並找出如預期的絲狀或是管狀結構與最佳的實驗參數。

實驗二： 抗體製備

二. 2.1

將不同成分和不同大小的奈米粒子注入老鼠體內，奈米粒子的種類有ZnO和TiO₂，各有兩種尺寸，如下方表格所示：

	large size	small size
ZnO	90~220 nm	20 nm
TiO ₂	10~40 nm	5 nm

選用的老鼠品系為 BALB/c，並分別先將這四種奈米粒子抗原跟乳化劑結合之後，再注入老鼠體內，實驗時間為 21 天：第一天(第一周)是將抗原以 100 μ L 與 Complete adjuvant (100 μ L) 作等體積混合之後，同時施打於腹腔、肌肉及背部；第八天(第二周)是將抗原以 100 μ L 與 Incomplete adjuvant (100 μ L) 作等體積混合之後，進行施打；至第十五天(第三周)與第二十一天(第四周)時，重複第八天的實驗步驟，實驗進行的同時也同時記錄老鼠的行為狀況。

接著將老鼠進行解剖，進行取血與取內臟，取的內臟部分包含有腦、心、肺、肝、脾、腎六種

二. 2.2 酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunoassay, 簡稱 ELISA)

利用抗原抗體之間專一性鍵結之特性，對檢體進行檢測；由於結合於固體承載物(一般為塑膠孔盤)上之抗原或抗體仍可具有免疫活性，因此設計其鍵結機制後，配合酵素呈色反應，即可顯示特定抗原或抗體是否存在，並可利用呈色之深淺進行定量分析。

一般之操作步驟為：

- (1) 將四種抗原固著於塑膠孔盤上，完成後用 BSA 洗去多餘之抗原
- (2) 加入待測的抗體，並做梯度的濃度實驗，抗體中若含有待測之一次抗體(primary antibody)，則其會與塑膠孔盤上的抗原進行專一性鍵結
- (3) 用 PBS 洗去多餘待測抗體，加入含有螢光酵素之二次抗體 [secondary antibody : Goat polyclonal to Mouse IgG H&L (HRP) Pre-Adsorbed] 與待測之一次抗體 (primary antibody) 鍵結
- (4) 用 PBS 洗去多餘未鍵結二次抗體(secondary antibody)，加入酵素受質使酵素呈色，用 ELISA reader 儀器讀取呈色結果

二. 2.3 接合含有量子點(Quantum-dots)的二級抗體作顯色觀察

利用量子點(Quantum-dots)被特定波長的光激發後，可發出螢光的特性，實驗中使用含有量子點的二級抗體，並且使用酵素免疫分析法(ELISA)的操作步驟，如下圖所示，將抗原作用的基質改成矽晶圓，並且在矽晶圓

的表面修飾一層 APTES (3-aminopropyltriethoxysilane, 3-氨基丙基三甲氧基甲矽烷), 作為抗原與矽晶圓的連接劑, 之後接合待測的一級抗體, 再來讓一級抗體與有接合量子點的二級抗體作專一性的鍵結, 在觀察的時候, 利用綠色的螢光 (波長約為 550nm) 作為激發光源, 在螢光顯微鏡下的視野擷取發螢光的結果; 另一個觀察工具為 JEOL 6700 SEM (Scanning Electron Microscopy: 10KV, 10mA, Field Emission Gun), 試片在進入 SEM 觀測之前, 同樣的, 必須將試片作前固定與脫水的步驟, 以避免破壞 SEM 內部的真空度, 預期能看到一級抗體與含有量子點的二級抗體結合的影像。

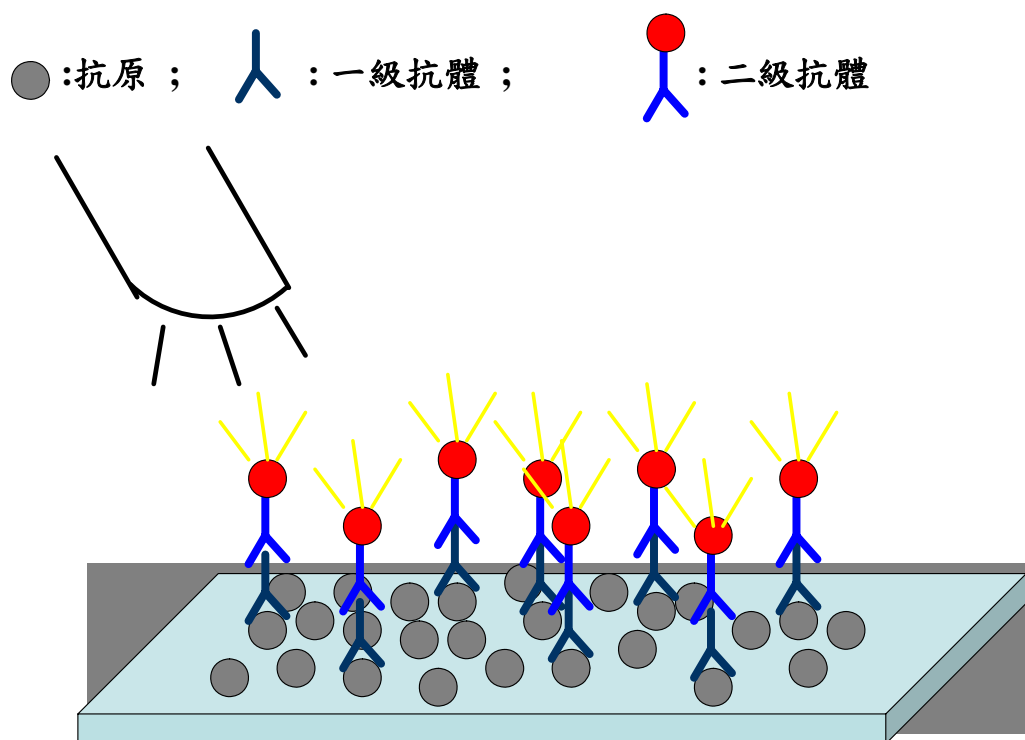


圖 2.4 抗體反應示意圖

第三章 結果與討論

一. 3.1 蠶絲絲囊的取得

欲取得蠶絲蛋白質必須先了解家蠶的內部構造，了解蠶絲絲囊的形狀，藉由查閱相關書籍和參考論文，來確認我們所取得部位的就是蠶絲絲囊，就如同第三章實驗中所提到的，取的蠶絲絲囊必須是家蠶為五齡蠶到形成繭的階段，這樣的蠶絲絲囊才會飽滿，所取得的蠶絲蛋白質的量也會相對的比較多；在取得蠶絲絲囊之後，必須馬上將蠶絲絲囊放入以測試好的穩定保存溶液（此將保存溶液稱為 buffer I），讓蠶絲蛋白質具繼續保有其原來的蛋白質活性，以利之後實驗的進行，所取得的絲囊如圖 4-1 所示，

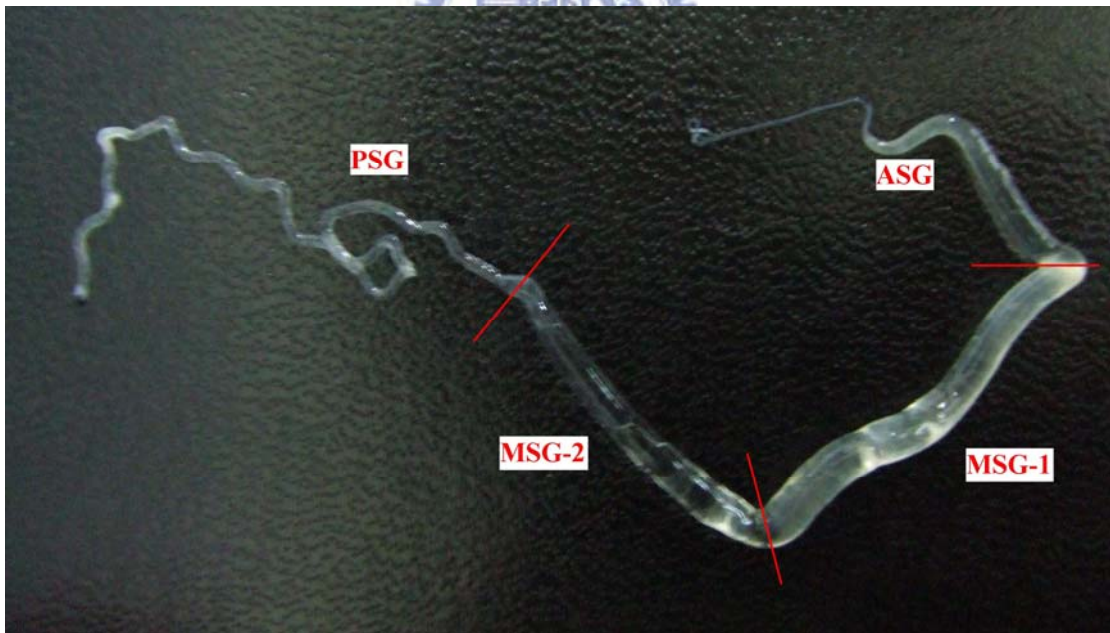


圖 3-1 家蠶的蠶絲絲囊

簡單的將蠶絲絲囊分成 4 部分，分別為 ASG、MSG-1、MSG-2、PSG (ASG=anterior silk gland；MSG=middle silk gland；PSG=posterior silk gland)。

一. 3.2 蠶絲蛋白質保存溶液的配置

保存溶液的配置對於之後實驗進行蛋白質自組裝結構時相當重要，必須避免因為接觸空氣而氧化或者溫度的效應所造成的蛋白質變性，如此一來自組裝結構就無法形成了，保存溶液的配置就根據第三章實驗中所提到的四種條件進行測試，1. KCl鹽類濃度；2. 溶液的pH值[以磷酸根(NaH_2PO_4)來調整溶液酸鹼度]；3. 尿素(Urea)的濃度；4. 保存溫度的測試，將這四種條件用相圖的方式找出能夠讓蛋白質穩定存在的範圍，鹽類的濃度以 50mM為梯度作調整，溶液的pH值範圍從 2.0 到 10.0，每次均以一個單位為梯度作調整，尿素(Urea)從 0M到 4M，梯度變化為 0.5M，看每個條件當中，蛋白質在溶液裡是否會有顏色或者沉澱物產生，如果有顏色或沉澱物產生的話，就表示蛋白質已經產生變化，必須繼續調整範圍，下面的圖表為測試的出來的結果。

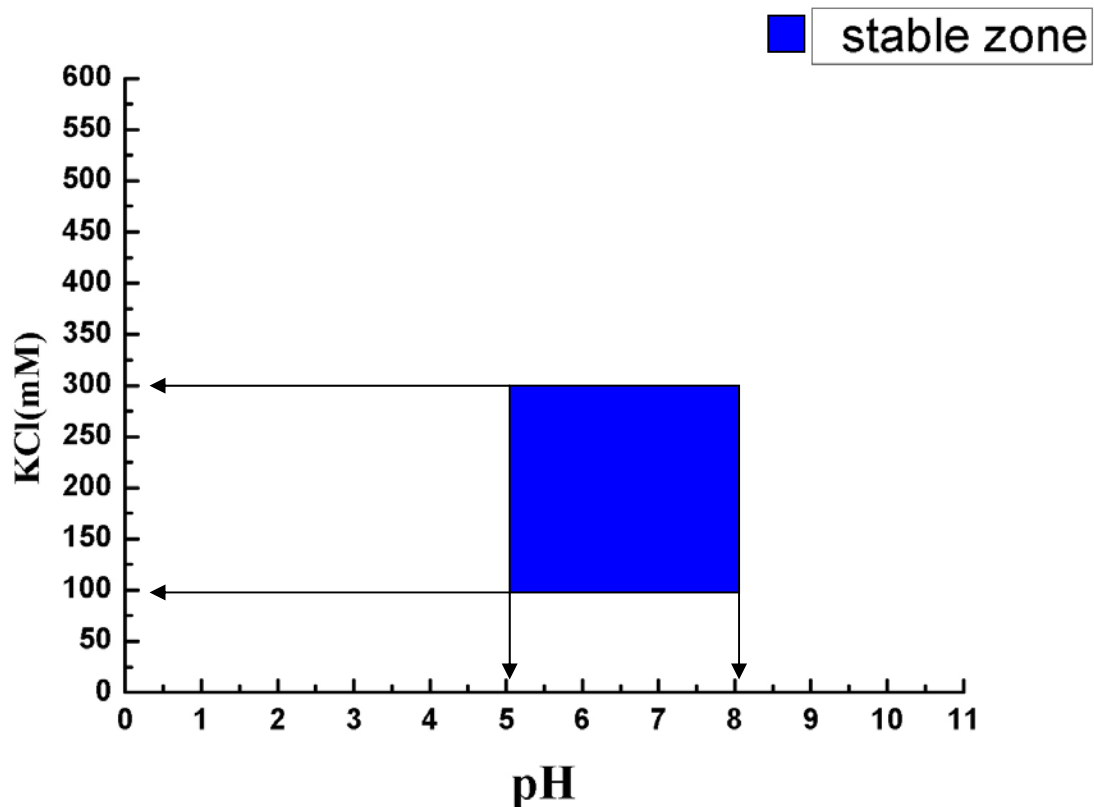


圖 3-2 蠶絲蛋白質保存溶液穩定區域

由圖 3-2 的結果顯示，黑色區域為鹽類和酸鹼值的穩定範圍，鹽類濃度在 100mM 到 300mM 不會產生沉澱，溶液的 pH 值從 5 到 8 可讓蛋白質穩定存在，接著延續此結果，再加入 Urea 的濃度調整，濃度變化從 0.1M 至 4.0M，實驗結果發現，Urea 濃度在 0.5M 到 4.0M 可以讓蠶絲蛋白質穩定存在，所以綜合上述 3 種結果，最後設定保存溶液條件為鹽類濃度 =200mM、pH=7 且 Urea 濃度=2M，並且稱此保存溶液為 buffer I；最後一項保存條件是溫度的保存，有 3 種保存溫度分別為 4°C、-30°C 和 -80°C，測試結果，以 4°C 的保存條件效果最佳，因為 -30°C 和 -80°C 的溫度太低，

會造成蠶絲蛋白質產生固化而且加熱之後無法回覆到原來的狀態，其結果亦可以從圖片中觀察得知，如下圖所示，

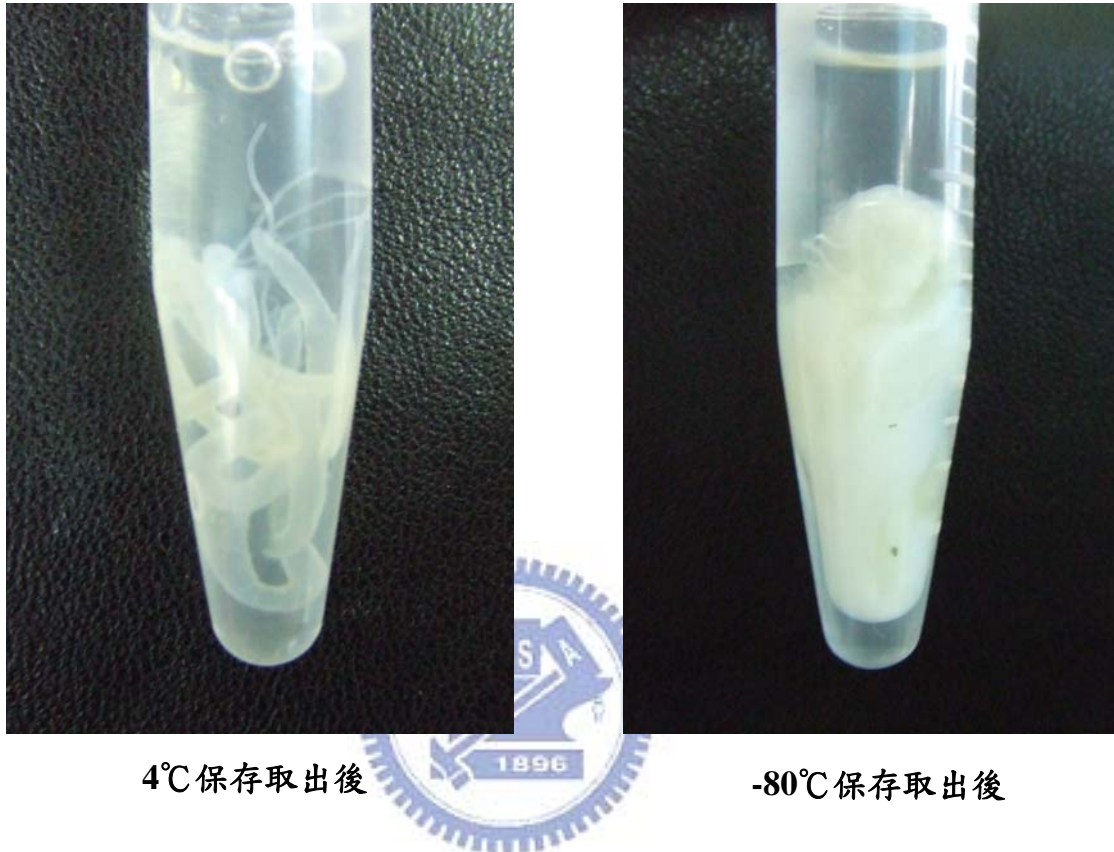


圖 3-3 蠶絲絲囊在 4°C 與-80°C 保存的結果比較

在均含有 buffer I 溶液的保存下，在 4°C 左右的保存溫度還是可以讓蠶絲蛋白質繼續保有其原來的樣子，但是在-80°C 的時候，卻會造成蠶絲蛋白質的硬化而形成白色的固體，所以保存溫度以 4°C 為最佳保存溫度。

一. 3.3 SDS-PAGE 蛋白質電泳分離技術——分子量分析

藉由蛋白質電泳分離技術的設計，找出能讓蠶絲蛋白質得到最好分

離效果的電泳膠配法，將蠶絲蛋白質做更細微的蛋白質分離，欲得到最佳分離效果，必須控制 separating gel 的濃度以及跑膠時的電壓伏特數，最後測試的結果，發現最好的條件是將 separating gel 的濃度調成 8%，然後在加入蛋白質跑膠前，先將加 50 伏特的電壓預跑一次，預跑的目的是先去除膠體內的雜質，避免讓蛋白質在跑膠時受到雜質的干擾而產生拖曳的現象，之後正式跑膠時，使用的電壓為 100 伏特，所得的跑膠結果如圖

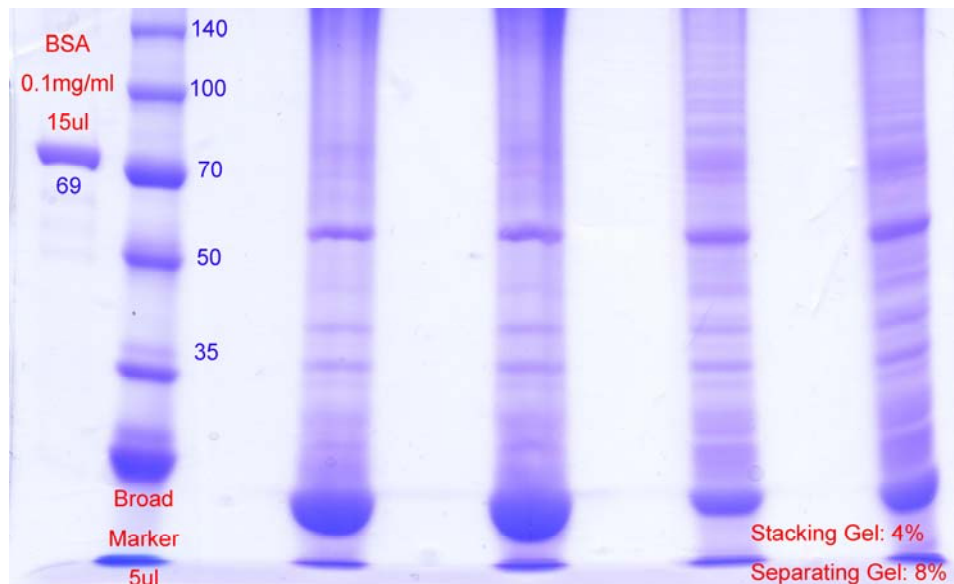


圖 3-4 蠶絲蛋白質之電泳分析結果

從結果發現，對照著 protein marker 來看，在將近 60KDa 的附近以及 35KDa 和 40KDa 均有明顯的蛋白質帶，顯示著蠶絲蛋白質有著更小的蛋白質結構，但是在膠體的上方也同時發現，有比較大分子量的蛋白質尚

未被分離，根據參考資料推測，在較大分子量的蛋白質裡，可能在蠶絲蛋白質裡有強鍵結無法藉由電泳原理來打斷，這些鍵結也是造成蠶絲蛋白質會很黏稠的主因。

一. 3.4 高效能液相層析儀分析 (HPLC)

在做蛋白質分析的實驗中，如果能夠將蛋白質做純化成為相當重要的關鍵，可藉由不同管柱(column)的使用，來達到良好的純化效果，實驗中使用的管柱(column)型號為 BioSep-SEC-S4000，實驗參數為流動相(mobile phase)

為保存液(buffer I)，且將流速(flow rate)設定為 1mL/min，觀測波長為

280nm，時間設為 20 分鐘。

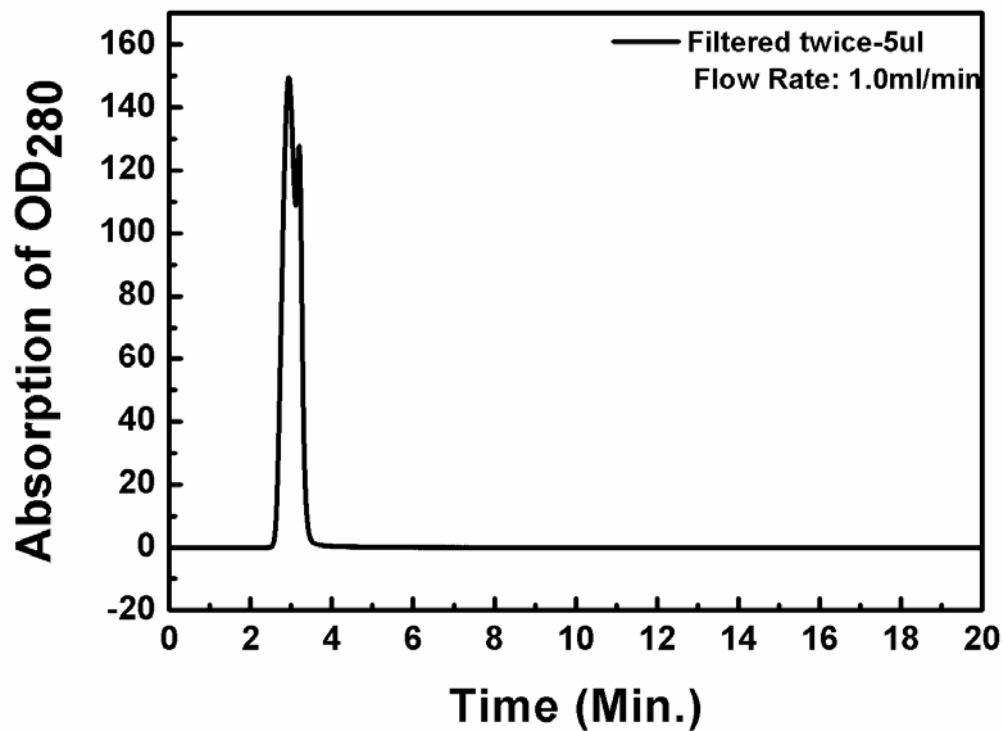


圖 3-5 蠶絲蛋白質在 280nm 的 elution time

從結果可以對照已知的分子量大小的物質來分析，分子量越大者，elution time 越小，即越早出現吸收峰值；實驗中最後發現蠶絲蛋白質造成管柱(column)塞住，所以實驗結果僅剩 4 分鐘以前的數據，而且從峰值的結果也發現，所被分析的蛋白質不能完全有效的被純化析出，造成峰值不是單一的波峰，由此也發現蠶絲蛋白質的鍵結相當強，可以與跑膠結果做呼應，所以造成無法有效的純化分析。

一. 3.5 蠶絲蛋白質自組裝結構成型

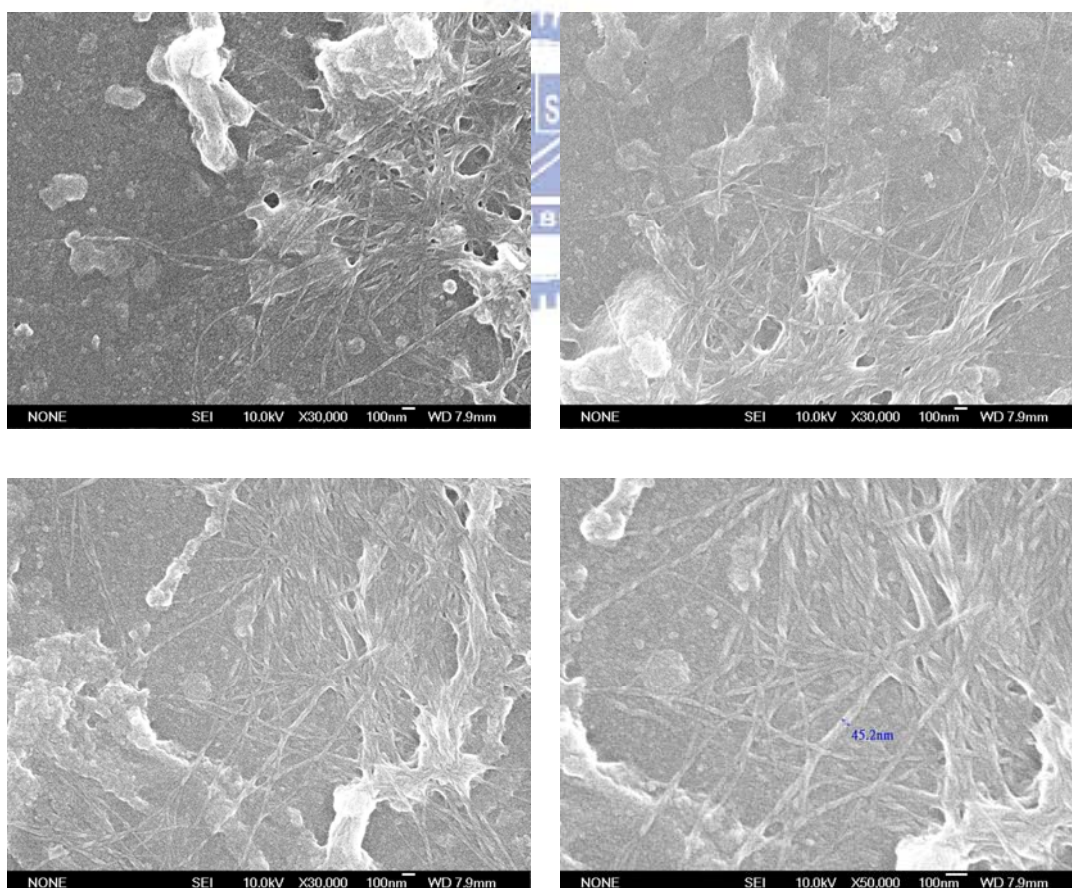
根據參考資料所顯示，蠶絲蛋白質被預測出具有 β -sheet 摺板狀的結構，並且與鏈狀的蛋白質共同聚合，形成奈米等級的共聚物，藉由設定實驗條件來讓這種奈米結構做自組裝的動作，實驗結果顯示，最佳的實驗參數為下列所示：

- (1) 蛋白質濃度(UV-OD280nm)：0.25mg/mL。
- (2) 乾燥時間：1 days。
- (3) 乾燥溫度： 25 °C
- (4) 溶液 PH 值：7.0。
- (5) 自組裝的環境：培養箱。

配合上述條件，讓蠶絲蛋白質在矽晶片上形成自組裝結構，結構形成之後，在不破壞自組裝結構的條件下，在進行 SEM 的觀察前，先做好固

定和脫水的步驟，利用 JEOL 6700 SEM (10KV, 10mA, Field Emission Gun) 的觀察來找出最佳的自組裝結構條件，下列圖片的實驗結果與預期結果最為接近，蠶絲蛋白質的自組裝可形成線狀的奈米結構；從 SDS-PAGE 的跑膠結果與 HPLC 的純化結果得知，蠶絲蛋白質在較大的分子量基團裡有強大的化學力鍵結，所以無法做有效的純化，因此會看到奈米自組裝結構與其他較大蛋白質一起出現，若想得到只有奈米自組裝結構的結果，就必須將蠶絲蛋白質體作更進一步的有效分離純化。

圖中奈米自組裝結構的線寬大小為 30 到 60nm 左右



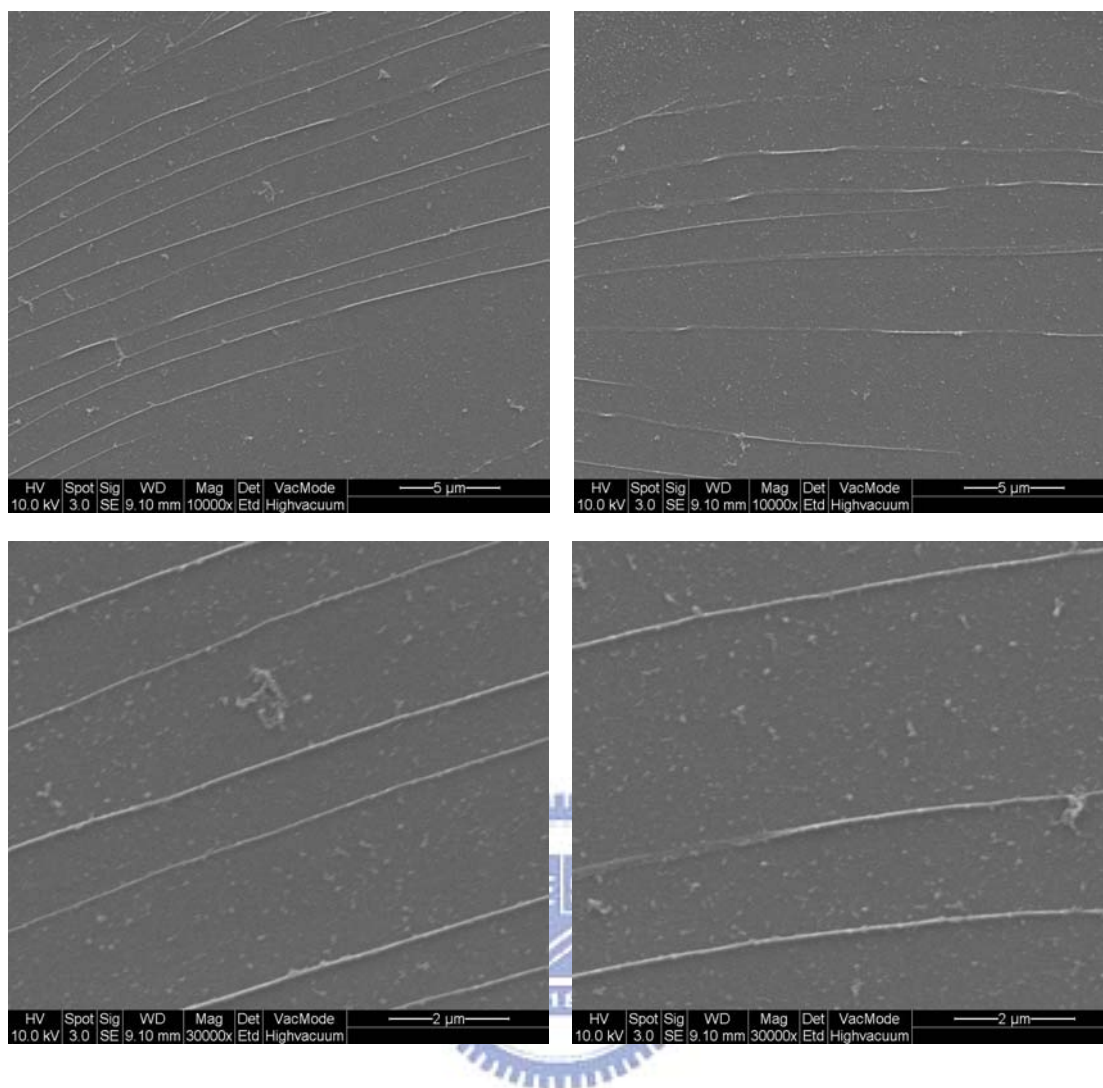


圖 3-6 蠶絲蛋白質的奈米自組裝結構

二. 3.1 酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunoassay, 簡稱 ELISA)

酵素免疫分析法的實驗步驟第三章所描述，藉此來檢測抗體的免疫反應，並且將抗體濃度作梯度測試，實驗結果如下圖：

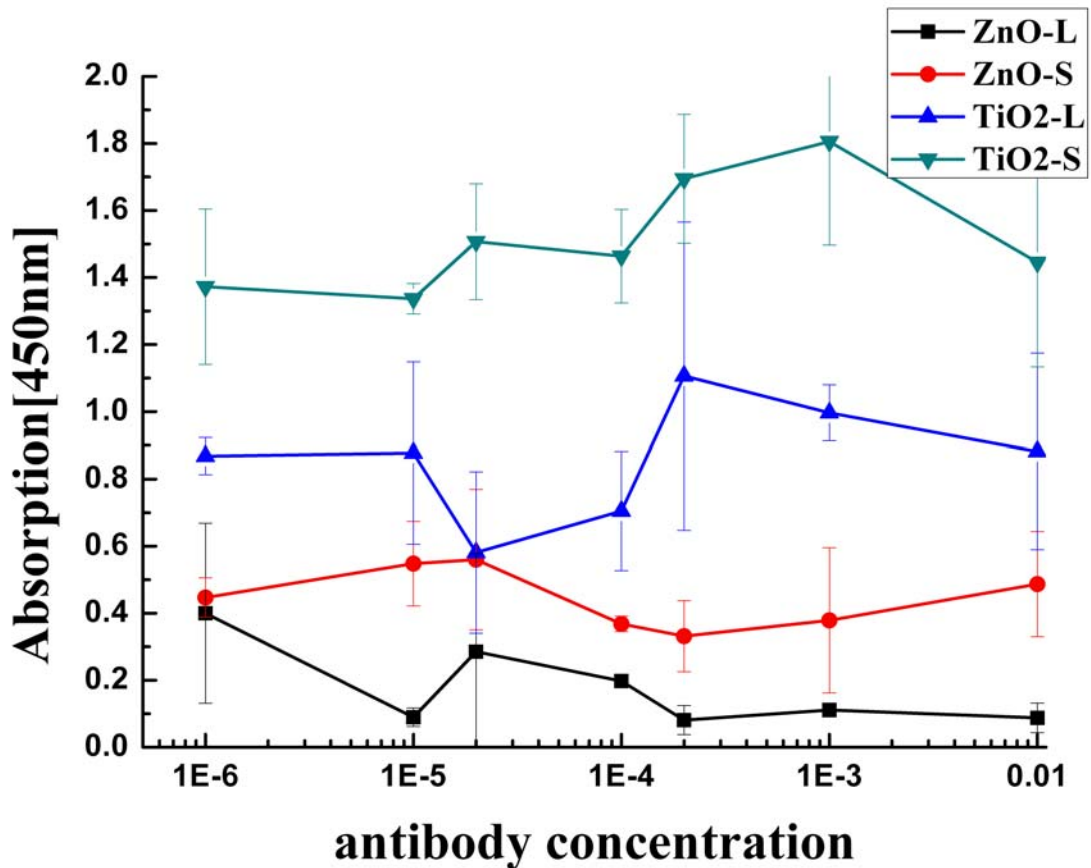


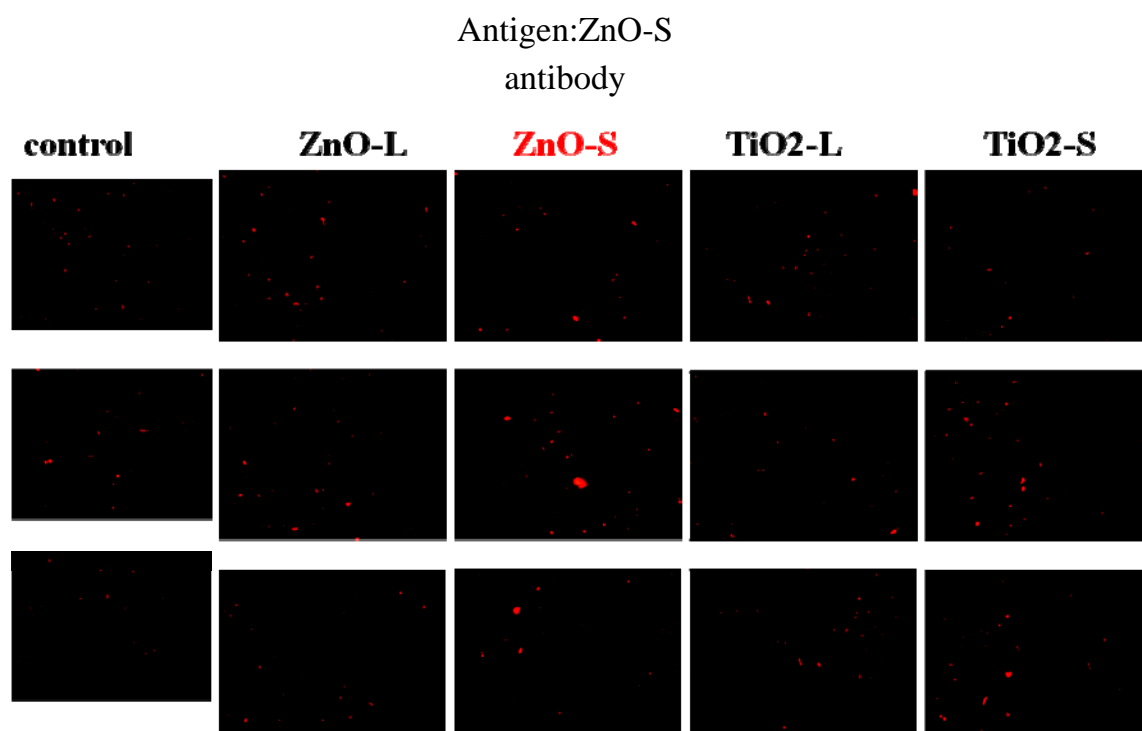
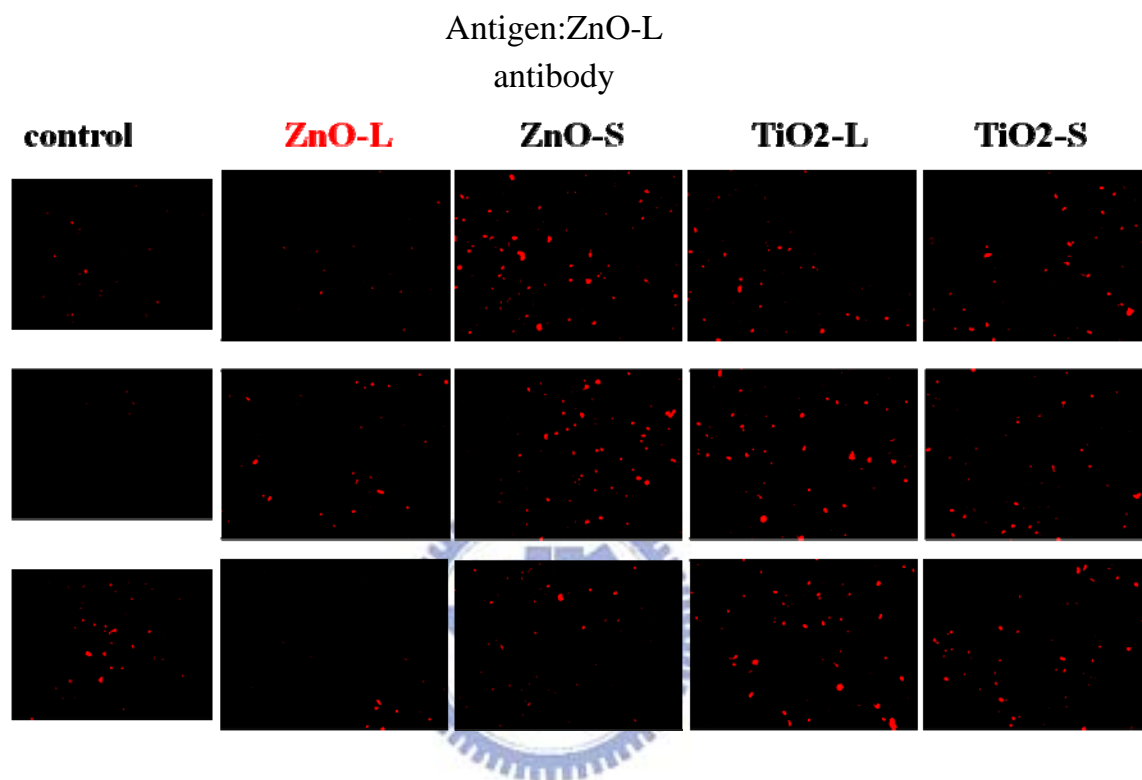
圖 3-7 不同奈米粒子的 ELISA 結果

從圖中的結果可知，每種抗原都有相對性的抗體接合反應，而且以TiO₂-S的反應量為最多，但是結果卻沒有濃度梯度變化，推論由於抗原與塑膠孔盤的接合不均勻是造成無濃度梯度變化的主要因素。

二. 3.2 接合含有量子點(Quantum-dots)的二級抗體作顯色觀察

將抗體免疫分析方法中所用的塑膠孔盤改換成矽晶圓基底，並且在矽晶圓的表面上修飾一層 APTES(接連劑)，讓抗原更能與矽晶圓接合，之後

的實驗步驟就與抗體免疫分析法相同，反應完之後，先用 Leica DM2500M 的螢光顯微鏡作觀察，並且以綠色螢光(波長約為 550nm)來激發含有量子點的二級抗體，實驗結果如下：



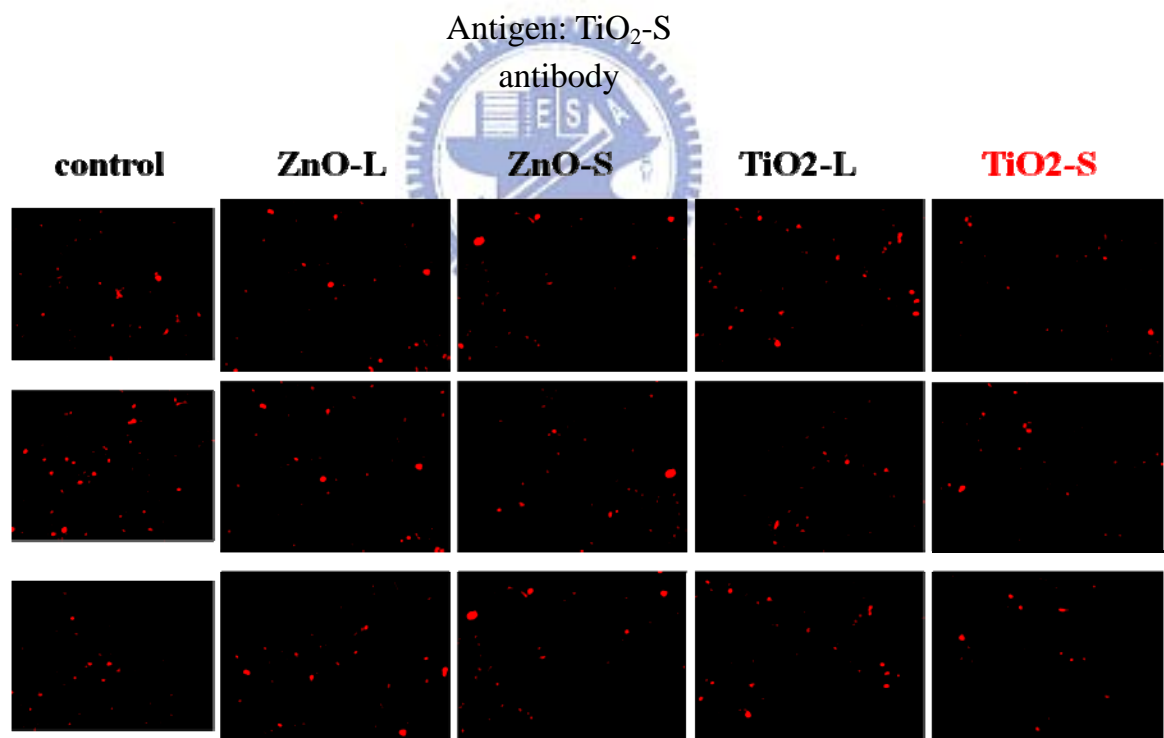
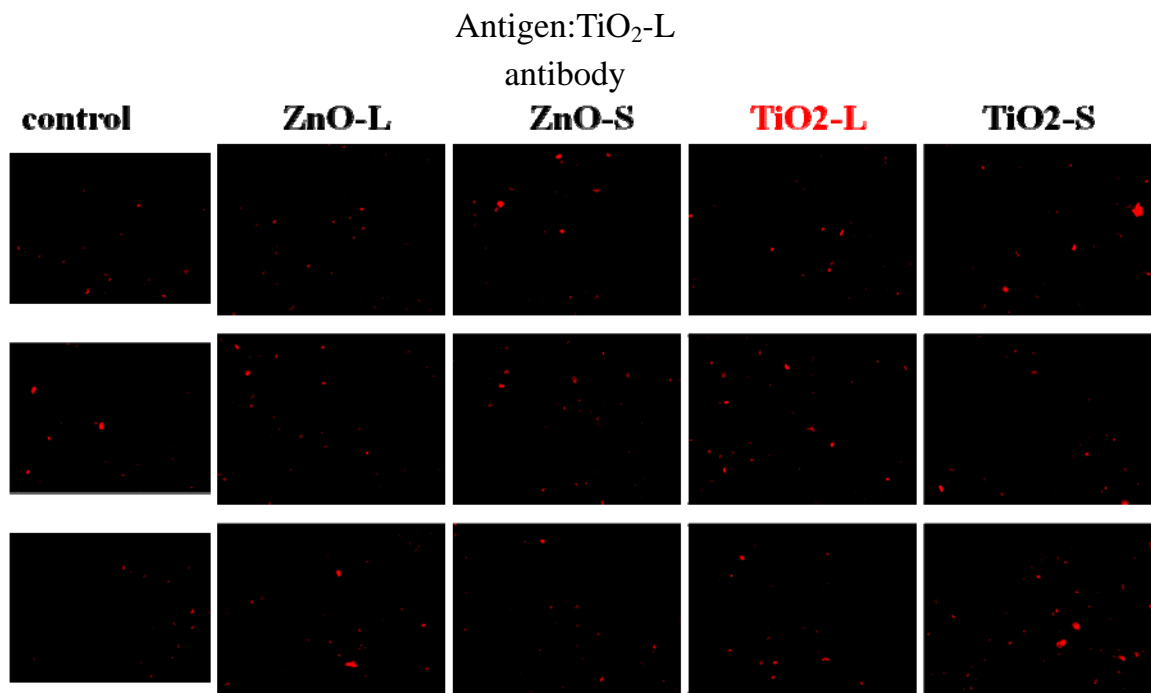


圖 3.8 接合量子點的二抗辨認一抗的螢光顯示圖

預期想從二級抗體辨認一級抗體的螢光顯示來看，當 ZnO-L 與 ZnO-S 作用所產生的一級抗體能否與抗原做互相辨認接合的反應，實際上，從

上列的結果來看，發現二級抗體對一級抗體的辨認，似乎專一性的接合不高，導致所有的反應皆無明顯的差異。



第四章 結論

實驗一.

作蠶絲蛋白質體學的研究，第一步首要工作就是測試出能讓蛋白質穩定存在的溶液來保存，才能進行之後的相關實驗，接著以相對巨觀的模式對蠶絲蛋白質體作物性及化性分析，進一步的找出可以讓蠶絲蛋白質形成自組裝奈米結構的最佳條件。

取得五齡蠶的飽滿蠶絲絲囊後，首先將保存蛋白質的條件列出，分別有鹽類濃度、酸鹼度以及保存的溫度，找出最適合蛋白質存在的環境範圍所以最後採用保存溶液的條件為鹽類濃度=200mM、pH=7 且 Urea 濃度=2M，並且以 4°C 的狀態保存之。

蠶絲蛋白質分析，實驗設計流程是先以 SDS-PAGE 蛋白質電泳分離技術，再來將蠶絲蛋白質作 HPLC 的純化分析，先利用 SDS-PAGE 電泳膠體將蠶絲蛋白質體作初步的定量分析，從膠體的結果發現，對照著 protein marker，蠶絲蛋白質有大有小，小的部分是在將近 60KDa 的附近以及 35KDa 和 40KDa 均有明顯的蛋白質帶，大的部分，預估大於 200KDa，參照文獻與實際的實驗結果，推測較大分子量的蠶絲蛋白質有強力的化學鍵結，導致無法利用電泳膠體將大分子的分離；接著用 HPLC 高效能液相層析儀將蠶絲蛋白質作純化，由吸光值 OD280nm 的實驗數據發現，蠶絲蛋白質的峰值只在 4 分鐘以前出現，顯示有大分子量的蛋白質無法被分離，

所以無法得到有效的蛋白質純化，此結果卻可以和 SDS-PAGE 的跑膠結果作驗證，亦即蠶絲蛋白質有強力的化學鍵結。

從上述的實驗結果，了解到蠶絲蛋白質目前無法被純化出來，所以未來可以找出相關參考文獻，跟蛋白質純化有關的方法，或者是利用加入界面活性劑的方式，來打斷液體蠶絲蛋白質中的強力化學鍵，接著再做蛋白質分離與純化的工作；另一種方法是可以使用比較前段時期的蠶，如一齡蠶、二齡蠶、三齡蠶或/和四齡蠶，使用比較前期的蠶絲絲囊蛋白質，先比較不同時期的蠶絲蛋白質的成分與性質，再決定要採用何種時期的蠶絲蛋白質來做自組裝奈米結構，如此才可以得到更好且性質更佳的自組裝結構。



自組裝結構成型技術，是以不外加能量的方式，讓分子或物質以最低能量方式作最穩定的自然排列結果，實驗中，同樣用控制環境因子的方式找出能讓蠶絲蛋白質作自組裝的環境，截至目前為止，從 SEM 的實驗結果發現，在所設計的實驗控制因子中，當蛋白質濃度(OD280nm)=0.25、溶液 pH 值=7.0、乾燥溫度=25°C 且乾燥時間為一天的狀態下，蠶絲蛋白質可以形成自組裝的結構為奈米尺度的絲線狀，尺度大小為 40~60nm 左右。

現在大家對奈米科技的認知，已經有相當程度的了解，也就是當物質或分子結構的尺寸大小達 100nm 以下時，其所擁有的物理性質和化學特性，甚至光學特性、導電度和熱傳性質都將改變，而展現新的機能與特性；

所以之後蠶絲蛋白質奈米自組裝結構可以做性質分析，並且利用其奈米尺度所擁有的獨特性質作嶄新的應用，亦可結合不同奈米物質，形成新式的奈米複合材料，做特殊功能材料以供產業應用，例如：利用其高生物相容性的特質，發展新式的醫用材料等等，其對未來的產業的應用，將可跨足多項領域。



參 考 文 獻

實驗一：

- [1] X. Nirmala, K. Mita, V. Vanisree, M. Zurovec and F. Sehnal, *Insect Molecular Biology* (2001) 10 (5) : 437–445
- [2] Pingbo Zhang, Yoichi Aso, Kohji Yamamoto, Yutaka Banno, Yongqiang Wang, Kozo Tsuchida, Yutaka Kawaguchi and Hiroshi Fujii, *Proteomics* (2006), 6 : 2586 – 2599
- [3] Pingbo ZHANG, Kohji YAMAMOTO, Yoichi ASO, Yutaka BANNO, Daisuke SAKANO, Yongqiang WANG, and Hiroshi FUJII, *Biosci. Biotechnol. Biochem* (2005)., 69(11) : 2086-2093
- [4] J. F. Graveland-Bikker, I. A. T. Schaap, C. F. Schmidt, and C. G. de Kruif, *NANO LETTERS* (2006) Vol. 6, No. 4:616-621
- [5] Meital Reches and Ehud Gazit, *SCIENCE* VOL 300, 25 APRIL (2003)
- [6] Sonja Hess, a, Jacco van Beek, and Lewis K. Pannella, *Analytical Biochemistry* 311 (2002) : 19 – 26
- [7] Sachiko Matsumura, Shinobu Uemura and Hisakazu Mihara, *Mol. BioSyst.*, (2005), 1 : 146–148
- [8] Shuguang Zhang, Davide M Marini, Wonmuk Hwang and Steve Santoso, *Current Opinion in Chemical Biology* (2002), 6:865–871
- [9] Hidenori Yokoi, Takatoshi Kinoshita, and Shuguang Zhang, *PNAS* (2005) vol.102 ,no. 24 : 8414–8419
- [10] E. Oroudjev, J. Soares, S. Arcidiacono, J. B. Thompson, S. A. Fossey, and H. G. Hansma, *PNAS*, (2002) vol. 99, 6460–6465
- [11] J. D. van Beek, S. Hess, F. Vollrath, and B. H. Meier, *PNAS* (2002) vol. 99, no. 16 : 10266–10271

- [12] Ohad Carny, Deborah E. Shalev, and Ehud Gazit , NANO LETTERS (2006), Vol. 6,No.8 : 1594-1597
- [13] Mudalige Thilak Kumara, Narayanan Srividya, Subra Muralidharan, and Brian C. Tripp , NANO LETTERS (2006), Vol. 6,No.9 : 2121-2129
- [14] Davide M. Marini, Wonmuk Hwang, Douglas A. Lauffenburger, Shuguang Zhang, and Roger D. Kamm, NANO LETTERS (2002), Vol. 2,No.4 : 295-299
- [15] Sylvain Vauthey, Steve Santoso, Haiyan Gong, Nicki Watson, and Shuguang Zhang, PNAS, (2002) vol. 99 ,no. 8 : 5355–5360
- [16] Shun-ichi Inoue, Hidetoshi Tsuda, Toshihisa Tanaka, Masatoshi Kobayashi, Yoshiko Magoshi, and Jun Magoshi, NANO LETTERS (2003),Vol.3,No.10 : 1329-1332
- [17] Kun Huang, Yuanjian Zhang, Yunze Long, Junhua Yuan, Dongxue Han, Zhijuan Wang, Li Niu, and Zhaojia Chen, Chem. Eur. J.(2006) 12: 5314-5319
- [18] Yann Astier¹, Hagan Bayley¹ and Stefan Howorka², Current Opinion in Chemical Biology (2005), 9:576–584
- [19] Nitzan Kol, Lihi Adler-Abramovich, David Barlam, Roni Z. Shneck, Ehud Gazit, and Itay Rousso, NANO LETTERS (2005) Vol. 5,No.7:1343-1346
- [20] Karthikan Rajagopal and Joel P Schneider_ Current Opinion in Structural Biology (2004), 14:480–486
- [21] Carol C. Barford, Steven C. Wofsy, Michael L. Goulden, J. William Munger, Elizabeth Hammond Pyle, Shawn P. Urbanski, Lucy Hutyra, Scott R. Saleska, David Fitzjarrald, Kathleen Moore, SCIENCE (2001) VOL 294:1684-1688
- [22] NATHAN BECKER¹, EMIN OROUDJEV, STEPHANIE MUTZ, JASON P. CLEVELAND, PAUL K. HANSMA, CHERYL Y.

HAYASHI, DMITRII E. MAKAROV AND HELEN G. HANSMA,
NATURE (2003) VOL 2,278-283

- [23] Timothy H. Bayburt and Stephen G. Sligar, *Protein Science* (2003), 12:2476–2481.
- [24] Steve Santoso, Wonmuk Hwang, Hyman Hartman, and Shuguang Zhang, *NANO LETTERS* (2002), Vol. 2, No. 7 : 687-691
- [25] Lihi Adler-Abramovich, Meital Reches, Victoria L. Sedman, Stephanie Allen, Saul J. B. Tendler, and Ehud Gazit, *Langmuir* (2006), 22, 1313-1320
- [26] Rupesh Dash¹, Soumen Mukherjee, S.C. Kundu, *International Journal of Biological Macromolecules* 38 (2006) 255–258
- [27] Ann E. Terry, David P. Knight, David Porter, and Fritz Vollrath, *Biomacromolecules* (2004), 5, 768-772
- [28] Juming Yao, Kosuke Ohgo, Rena Sugino, Raghuvansh Kishore, and Tetsuo Asakura, *Biomacromolecules* (2004), 5, 1763-1769
- [29] Yasushi Tamada, *Biomaterials* 25 (2004) 377 – 383
- [30] Tetsuo Asakura, Rena Sugino, Tatsushi Okumura and Yasumoto Nakazawa, *Protein Science*. (2002) 11: 1873-1877
- [31] Michal Z̃urovec and František Sehnal, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 277, No. 25, Issue of June 21, pp. 22639–22647, (2002)
- [32] Robert Fedic̃, Michal Z̃urovec, and František Sehnal, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 278, No. 37, Issue of September 12, pp. 35255–35264, (2003)
- [33] Masafumi Yamao, Nagakazu Katayama, Hiroshi Nakazawa, Minoru Yamakawa, Yoshiyuki Hayashi, Saburo Hara, Kaeko Kamei and Hajime Mori, *GENES & DEVELOPMENT* (1999) 13:511–516

[34] John M. Kenney¹, David Knight², Michael J. Wise³ and Fritz Vollrath^{2,4}
EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (2002), 269, 4159–4163

[35] J. M. GOSLINE, P. A. GUERETTE, C. S. ORTLEPP , K. N. SAVAGE,
The Journal of Experimental Biology (1999) 202, 3295–3303

實驗二:

[1] G. Steven Huang, Yu-Shiun Chen, and Hsiao-Wei Yeh, NANO
LETTERS (2006), Vol. 6, No.11 : 2467-2471

[2] Bernard F. Erlanger, Bi-Xing Chen, Min Zhu, and Louis Brus, NANO
LETTERS (2001), Vol. 1, No.9 : 465-467

[3] Hrushikesh M. Joshi, Devika R. Bhumkar, Kalpana Joshi, Varsha
Pokharkar, and Murali Sastry, Langmuir 2006, 22, 300-305

[4] Ivan H. El-Sayed, Xiaohua Huang, and Mostafa A. El-Sayed, NANO
LETTERS (2001), Vol. 5, No.5 : 829-834

