

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 050011

參展科別 動物學

作品名稱 如「膠」似「漆」-台灣淡水渦蟲黏液黏性及
誘導抗菌分析 Mucus Viscosity and Induced
Antibacterial Analysis of Taiwanese
Freshwater Planarian.

得獎獎項 大會獎 四等獎

就讀學校 新北市私立竹林高級中學

指導教師 顏嘉怡

作者姓名 楊政穎

關鍵詞 黏液、黏性分析、誘導抗菌

作者簡介



我是楊政穎，常被人稱為生物達人，在指導老師的指導下，我正在從一個徒有熱忱的達人，蛻變為能做專題的專家。雖然我是一人做研究，但過程中我身邊的學長姐及指導老師總是關懷及包圍，在我每次需要幫忙的時候無私的協助，甚至犧牲自己課餘及假日時間有你們的盡心指導，我學會了許多技能，謝謝學長姊和指導老師們的一路相伴，在未來我將更加努力，並保持熱忱。

摘要

渦蟲黏液仿生應用評估，首先評估渦蟲黏液仿生材料黏著劑可行性，結果發現搖晃刺激能提高渦蟲黏液運動黏度 ($5.17 \text{ mm}^2/\text{s}$) 及承受正向應力程度 ($3.25 \pm 0.74 \text{ kPa}$)。不同收集渦蟲黏液方法，利用蛋白質電泳並以過碘酸硝酸銀染色法分析，皆可發現 245 kDa 醣蛋白，推測為黏液中黏性蛋白，未來將以 LC-MS 分析渦蟲黏液中 245 kDa 醣蛋白種類並推測其功能。第二部分為渦蟲黏液誘導抗菌分析，實驗發現爬行組、搖晃組及受傷組渦蟲黏液不會產生抑菌環，進一步將渦蟲置於大量環境細菌 D (*Staphylococcus haemolyticus*) 中，一天後渦蟲自體分泌具有抗菌能力的黏液。最後進行渦蟲黏液細菌分析，發現黏液細菌編號 M030 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 能對環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*) 產生抗菌能力，未來將使用 API ZYM 分析黏液細菌分泌酵素，與渦蟲黏液分泌酵素比較已推測其與渦蟲交互關係。

Abstract

This study evaluated the bionic application of mucus of *Girardia tigrina*. First, we assessed the possibility of developing the mucus into waterproofing adhesive, the result showed that the stickability and normal stress of the mucus both increased after stimulated by shaking. Further, periodic acid-silver staining revealed the glycoprotein of the mucus was 245 kDa, and different conditions of mucus also showed the same result, therefore, we suggested it a mucoprotein. LC-MS analysis of the 245 kDa glycoprotein and function will be carried out in the future. The experiment of inducing the antibacterial ability of *G. tigrina* mucus demonstrated the mucus secreted when crawling, stimulated by shaking or injured would not produce inhibition zone. Further, we placed *G. tigrina* in large amount of *Staphylococcus haemolyticus* strain D, we found that it would secrete mucus which contained antibacterial ability. By analyzing the bacteria of *G. tigrina* mucus, we found that the bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* was antibacterial against *Staphylococcus haemolyticu* strain H. In the future, the API ZYM analysis of the enzyme secreted by bacteria of *G. tigrina* mucus will be carried out, and the relationship between *G. tigrina* and the bacteria in its mucus will be revealed.

壹、前言

一、歷屆研究成果 (表 1)

本團隊於 2016 年發現淡水渦蟲會捕食蚊幼蟲，因此開始五年渦蟲生物防治評估。

第一年團隊發現渦蟲會利用黏液纏繞蚊幼蟲協助捕食，其黏液於病媒蚊防治與仿生應用上具有高度的潛能 (王與郭，2016)。

第二年進一步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體外行物理破壞蚊幼蟲外殼，並以常見的生物染劑初步分析得知渦蟲黏液主要由多糖、醣蛋白及蛋白質所組成。同時利用蛋白質電泳及 LC-MS 分析渦蟲黏液，發現渦蟲黏液主要蛋白質成分分子量約為 15 kDa，並推測黏液中可能含肌聯蛋白 (titin) 及鈣結合蛋白 (calcium binding protein) 等蛋白質種類 (王，2017)。

2018 及 2019 年時，因渦蟲捕食蚊幼蟲時會利用黏液協助其體外行化學消化蚊幼蟲，使用 API ZYM 酵素檢測盤發現其黏液中至少含八種酵素；並以蛋白質電泳分析渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中蛋白質總量差異，發現其捕食時不會分泌大量黏液、捕食前後黏液蛋白質單體無顯著差異；並以過碘酸席夫染色 (PAS) 染色嘗試分析渦蟲黏液中醣蛋白，推測其分子量低於 10 kDa (徐，2018；徐，2019)。

2020 年國際科展時，我們進行野外投放渦蟲作為生物防治可能性評估，實驗結果發現渦蟲可於野外水耕地景中有效抑制蚊幼蟲。渦蟲消化蚊幼蟲機制實驗使用薄層層析 (TLC) 分析，發現渦蟲黏液分解蚊幼蟲幾丁質外殼結構需花費 3 天時間，而渦蟲捕食蚊幼蟲僅需 10~15 分鐘即捕食完畢，故推測化學消化為協助渦蟲捕食，其主要行物理破壞蚊幼蟲外殼 (陳，2020)。

楊於 2020 年研究渦蟲黏液應用功能，初步分析渦蟲黏液中醣蛋白分子量以及探討渦蟲黏液抗菌能力，本實驗將接續其研究，增加正向應力實驗分析渦蟲黏液承受正向應力程度、嘗試推測渦蟲黏液中黏性蛋白種類，以及探討誘導渦蟲黏液產生抗菌能力之條件。另外先前研究發現黏液中含有細菌，本次將分析渦蟲黏液細菌是否具抗菌能力或協助渦蟲體外化學消化，推測其與渦蟲交互關係。

表 1 歷屆研究及成果

作品名稱	研究成果	文獻
「孑」地任務 — 渦蟲捕食白線斑蚊幼蟲之生物防治評估	1. 渦蟲會利用黏液纏繞協助捕食蚊幼蟲	王與郭，2016
「孑」戰關鍵 - 台灣淡水渦蟲捕食蚊幼蟲機制及其黏液探討	1. 渦蟲利用咽部破壞蚊幼蟲外殼行體外物理消化 2. 推測渦蟲黏液含有 titin、calcium binding protein 等蛋白質 3. 渦蟲黏液主要蛋白質成分分子量約為 15 kDa	王，2017
驚爆「膠」點 - 虎紋三角渦蟲黏液功能分析	1. 渦蟲黏液中至少有 8 種酵素協助渦蟲體外化學消化蚊幼蟲 2. 渦蟲不會分泌大量黏液進行捕食 3. 渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液中的蛋白質無顯著差異	徐，2018； 徐，2019
終「孑」之「疫」- 渦蟲野外防治評估及消化蚊幼蟲機制	1. 渦蟲可於水耕地景中有效抑制蚊幼蟲 2. 渦蟲黏液分解蚊幼蟲外殼幾丁質結構需 3 天時間 3. 化學消化為協助渦蟲捕食，其主要行物理破壞蚊幼蟲外殼	陳，2020

二、研究動機及背景介紹

(一) 渦蟲黏液黏性分析

渦蟲黏液於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，2017）。本研究自製簡易落球實驗測量運動黏度及正向應力實驗分析渦蟲黏液物理性質，並利用蛋白質電泳及醣蛋白染色法（過碘酸硝酸銀染色）分析渦蟲黏液醣蛋白分子量，並分析搖晃刺激所收集的渦蟲黏液中蛋白質單體種類及推測其濃度，嘗試找出能讓渦蟲黏液運動黏度提高的蛋白質種類，以利將渦蟲黏液防水黏著劑開發。

1. 物理分析—運動黏度測試

黏度又稱黏滯性，為液體流動特性，由液體流動時和接觸物體表面摩擦力產生。黏度越大液體越濃稠、流動速度則越慢。常見黏度為動力黏度 (dynamic viscosity) 單位為泊 (Pa·s)，與運動黏度 (kinetic viscosity) 為動力黏度對液體密度的比值單位為釐斯 (mm²/s)。先前楊於 2020 年研究中因兩者易混淆，即誤標運動黏度為動力黏度。本實驗將以現有的運動黏度計及自製落球實驗分析渦蟲黏液相對運動黏度。

2. 物理分析—正向應力實驗

本研究探討渦蟲黏液開發成防水黏著劑可能，文獻探討動物黏液黏性方法為分析

兩物體被黏液黏著時所能承受正向應力大小 (Graham *et al.*, 2005; Li & Granham, 2007)。單位面積承受作用力稱為應力，正向應力即受力方向與物體垂直之應力，可用於分析動物黏液作黏著劑時能承受多大的垂直作用力，以測試其作黏著劑可行性。本實驗以自製裝置進行，使用易取得的材料進行簡易實驗，測試渦蟲黏液承受正向應力程度，評估其作防水黏著劑可能。

3.化學分析—推測渦蟲黏液黏性蛋白

王於 2017 年時發現渦蟲黏液主要由蛋白質、醣蛋白和多醣所組成。文獻提到蝸牛等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。本次研究使用過碘酸硝酸銀染色蛋白質電泳膠片分析渦蟲黏液醣蛋白分子量，推測渦蟲黏液黏性蛋白種類。

4.化學分析—推測渦蟲黏液蛋白種類

王於 2017 年研究中曾使用 LC MS/MS 分析渦蟲黏液中蛋白質種類，並推測其中可能含有肌聯蛋白 (titin) 及鈣結合蛋白 (calcium binding protein) 等。由於當時 NCBI 等相關數據庫數據不足，王於 2017 年時僅以其他動物的數據進行比對，其比對相似程度低。本次將使用新建渦蟲數據庫重新比對，將比對到的蛋白質序列用於推測其種類、結構及功能等分析，並嘗試找出其黏性蛋白。

(二) 渦蟲黏液抗菌分析

楊在 2020 年初步實驗中發現渦蟲黏液能抑制曝氣水（飼養渦蟲使用的水）中 4 株球菌 (圖 1)，由於無法於每次實驗重現渦蟲黏液抗菌能力，查找相關文獻後發現文獻方法多為研究渦蟲攝食致病細菌汙染之食物，或以細菌感染渦蟲探討渦蟲體內致病菌生長情形 (Abnave *et al.*, 2014); Tsumtsa 等人於 2017 年發現細菌感染渦蟲後其能於 6 天內殺死體內細菌。渦蟲誘導抗菌相關研究多探討渦蟲第二道免疫機制 (先天性免疫)(表 2)，以條件誘導渦蟲體內抗菌能力，故推測渦蟲黏液抗菌能力需經誘導產生，本次研究將延續楊於 2020 年實驗，以不同條件收集渦蟲黏液誘導其黏液抗菌，探討其黏液抗菌能力為渦蟲免疫機制第一道防線。同時以蛋白質電泳分析渦蟲黏液，嘗試找出渦蟲黏液抗菌蛋白分子量。

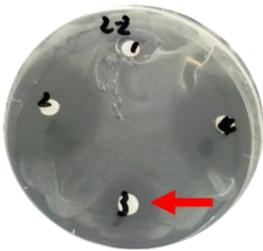
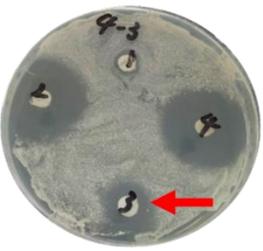
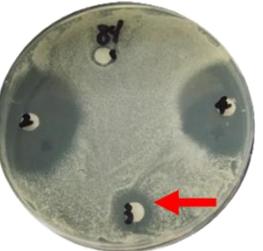
環境菌編號	B	D	F	H
抗菌實驗				
細菌種類	未鑑定	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>		

圖 1 紙錠擴散法初步結果 (楊, 2020)

樣本編號：1 為 dH₂O；2 為 5 mg/mL 紅黴素（正對照組）；3 為無菌過濾之渦蟲爬行黏液 (PL)；4 為 5 mg/mL 四環黴素（正對照組）。

表 2 渦蟲抗菌文獻比較

渦蟲種類	免疫機制防線	文獻
<i>Dugesia japonica</i>	第二道防線 (先天性免疫)	Abnave <i>et al.</i> , 2014
<i>Schmidtea mediterranea</i>		Tsoumtsa <i>et al.</i> , 2017
<i>Girardia tigrina</i>	第一道防線 (黏液)	This study

1. 抗生素殺菌原理介紹 (Kohanski *et al.*, 2010)

抗菌指殺死或抑制微生物生長，日常生活中常見的抗生素提取自黴菌與放線菌，其抗菌機制主要分為兩類：抑菌型主要透過抑制細菌蛋白質及核酸合成使細菌無法合成必要蛋白或核酸抑制其生長，並未殺死細菌；殺菌型抗生素則能改變細胞膜通透性破壞細胞膜完整性，使細菌細胞無法維持形狀而死亡，達到殺菌效果。

2. 動物免疫機制介紹

動物則靠免疫機制達到抗菌效果，免疫機制分三道防禦，第一、二道為先天性免疫，第一道為表皮及黏液等，如魚類分泌黏液保護體表 (Ingram, 1980)、蝸牛黏液具抗菌能力 (Iguchi *et al.*, 1982)、鯰魚體表黏液中的抗菌肽能造成細胞膜穿孔殺死大腸桿菌 (Li *et al.*, 2020)；第二道為發炎反應等，無脊椎動物的免疫機制研究多為第二道的先天性免疫，較著名的為昆蟲的包囊作用 (encapsulation)，其以蟲體中的血淋巴細胞包覆入侵異物、病原菌，阻隔有害物質擴散；第三道適應性免疫系統為脊椎動物特有，能識

別細菌抗原使下一次受到同種細菌感染時更迅速做出反應。本次研究將以不同條件收集渦蟲黏液嘗試誘導其抗菌能力，探討部分為渦蟲免疫機制第一道防線（表皮及黏液等）。

3. 生物間交互作用介紹

生物間交互作用有捕食、競爭以及共生，共生關係分為寄生、片利共生及互利共生，寄生僅對一方有利，另一方會受到傷害甚至死亡，如小蘭蜂與鱗翅目幼蟲；片利共生同樣僅單方獲利，但另一方不受傷害，如鯊魚和印魚、樹幹和鳥巢蕨；互利共生則雙方皆從中受益，如小丑魚和海葵、螞蟻和蚜蟲等。而微生物與多細胞生物同樣具共生關係，如人體表皮和其中共生菌：人體表皮會因流汗呈酸性，能保護人體不被環境中致病微生物入侵。

4. 共生菌抗菌相關文獻探討

關於體表共生細菌研究多針對脊椎動物表皮共生細菌，如 Holden 等人在 2015 年對南方豹蛙 (*Rana sphenoccephala*) 體表共生菌進行鑑定，推測其體表共生菌能夠保護青蛙不被致病蛙壺菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*) 感染。而對無脊椎動物表皮共生菌相關研究較為探討其腸內共生菌，如自麵包蟲 (*Tenebrio molitor*) 及大麥蟲 (*Zophobas morio*) 腸道中分離內共生菌研究其分解保麗龍功能 (曾, 2009; 詹等, 2012; 董等, 2015)。

5. 渦蟲體表微生物研究

2017 年時 Morokuma 等人分析渦蟲的微生物群落，發現其微生物群落中細菌屬於擬桿菌門及變形桿菌門，並推測其可能影響渦蟲的再生能力；2018 年時 Lee 等人則提出 10 種常見於渦蟲微生物群落中的細菌，並發現其微生物群落中 *Aquitalea sp.* 的代謝產物吲哚 (Indole) 能抑制渦蟲再生，本研究則收集渦蟲黏液中細菌，並分析其黏液細菌是否具抗菌能力及分析其能否產生酵素協助渦蟲體外化學消化，推測其是否與渦蟲具共生關係。

6. 渦蟲共生菌功能推測

Wilden 等人於 2019 年研究發現渦蟲黏液離開渦蟲自身後，仍有黏性有助於黏液

中微生物在其中繁殖。本研究於渦蟲黏液抗菌實驗意外發現黏液中有細菌，將收集黏液細菌，探討其是否具抗菌能力。徐於 2019 年使用 API ZYM 檢測渦蟲捕食蚊幼蟲前後黏液酵素種類，發現渦蟲捕食時分泌至少 8 種酵素行化學消化；陳於 2020 年研究發現渦蟲黏液中酵素分解幾丁質需 3 天時間，而其捕食蚊幼蟲僅花 10~15 分鐘。本研究推測渦蟲捕食行物理消化破壞蚊幼蟲幾丁質外殼外，其黏液細菌亦可能產生酵素協助渦蟲體外化學消化，未來將以 API ZTM 分析黏液細菌分泌酵素，研究其能否協助渦蟲行體外化學消化，以推測其與渦蟲是否具共生關係。

貳、研究目的

一、渦蟲黏液仿生材料黏著劑評估

- (一) 自製落球實驗及正向應力實驗分析渦蟲黏液黏性。
- (二) 蛋白質電泳分析黏性蛋白及嘗試推測黏液蛋白種類。

二、誘導渦蟲黏液抗菌分析

- (一) 不同條件收集渦蟲黏液誘導抗菌分析。
- (二) 環境細菌誘導渦蟲分泌抗菌黏液。

三、渦蟲黏液細菌分析

- (一) 拍攝及鑑定黏液細菌。
- (二) 共生菌推測
 1. 黏液細菌抗菌分析。
 2. API ZYM 分析黏液細菌分泌酵素 (尚未完成)

參、研究設備及器材

一、實驗動物

(一) 虎紋三角渦蟲 (*Girardia tigrina*) (以下簡稱渦蟲) (圖 2)

1. 取自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 5~30 mm，寬 1~5 mm，體色多為褐色，頭部呈三角形，故以此命名，頭部三角

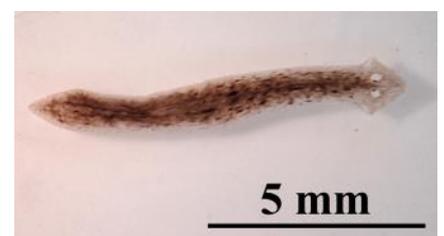


圖 2 虎紋三角渦蟲

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 10~12 mm。

二、黏液定義及蒐集方法 (表 3)

渦蟲會分泌黏液協助爬行，其黏液分為溶於水中之水溶性部分 (水溶性黏液) 以及殘留於玻璃罐壁之非水溶性部分 (非水溶性黏液) (圖 3)。將 25 隻渦蟲置於 dH₂O 中 10 分鐘後，按照不同條件處理渦蟲 (表 3)，放入有 0.5 mL dH₂O 的玻璃罐中爬行 60~90 分鐘。渦蟲非水溶性黏液會以 Lysis buffer 回溶。

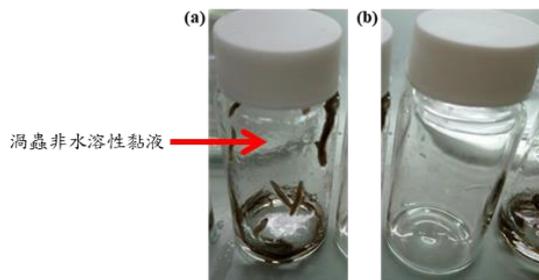


圖 3 渦蟲非水溶性黏液

(a) 渦蟲非水溶性黏液 (箭頭處)，(b) 空罐。

Pedersen 於 1959 年推測渦蟲受傷後分泌大量黏液可能與抗菌有關，因此本次研究將以不同方法收集黏液進行抗菌實驗，將收集渦蟲爬行黏液、搖晃刺激渦蟲所分泌黏液及渦蟲受傷時所分泌黏液 (受傷組)。探討誘導渦蟲黏液產生抗菌能力條件。

表 3 渦蟲黏液收集方法

黏液種類	渦蟲處理方法
爬行組 (PL)	25 隻渦蟲於罐中爬行
受傷組 (HP)	將 25 隻渦蟲各橫切成兩段於罐中爬行
搖晃組 (SP)	25 隻渦蟲每 20 分鐘以 3000 rpm 震盪 10 秒，共 4 次

三、使用環境細菌種類

本次研究以收集渦蟲生活周圍環境細菌探討渦蟲黏液抗菌能力，選用菌株為楊於 2020 年研究中抗菌實驗發現被渦蟲黏液抑制之 4 種陽性球菌(圖 4)。目前已鑑定 3 株菌株，編號 D、F 及 H 為不同品系的溶血葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)。

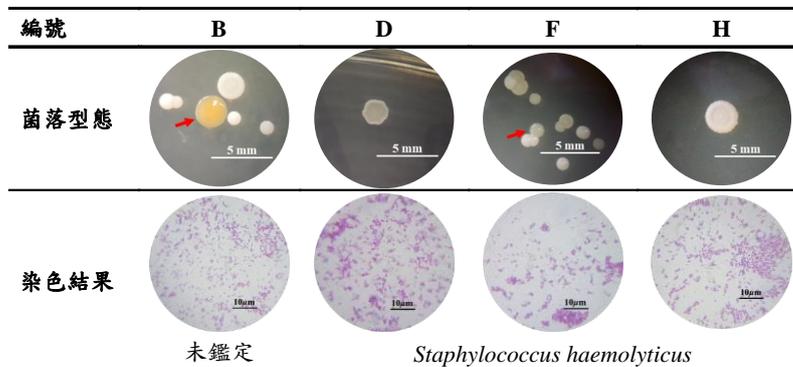


圖 4 渦蟲黏液抗菌實驗所使用菌株 (環境細菌)

四、實驗設備及器材

(一) 渦蟲黏液黏性分析使用器材

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

(二) 電泳使用器材、藥品及配方

名稱	備註
dH ₂ O	-
Protein Marker (5~245 kDa)	購自 SMOBIO
乾浴槽	購自 Thermo
玻璃瓶 (容量 30 mL，半徑 1.25 mm、高 5mm)	購自 KIMBLE CHASE

(三) 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,pH 8.8	
1.5M Tris-HCL,pH 6.8	購自 Bio-Rad
10% SDS	
Ammonium Persulfate (APS)	
TEMED	
dH ₂ O	-

(四) 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	品牌:桂格高鈣脫脂奶粉

(五) 銀染使用器材

名稱	備註
SilverQuest™ Staining Kit	購自 invitrogen
dH ₂ O	-

(六) 過碘酸硝酸銀染色使用藥品

名稱	備註
Acetic acid	
Methanol	
Silver nitrate	
Formalin	
Periodic acid	購自 景明化學
Citric acid	
Sodium Hydroxide	
Ammonia water	
Isopropyl Alcohol	
Ethylenediamine	購自 Alfa Aesar
dH ₂ O	-

(七) 渦蟲黏液抗菌實驗使用藥品

名稱	備註
Luria Bertani Broth	購自 Himedia
Agar Power	購自 景明化學
Ampicillin	取自中研院
Kanamycin	

(八) 菌種鑑定使用藥品

名稱	備註
Primer (27F、1492R)	購自 Genomics
Agarose	購自 GeneON
DNA Marker (250~10000 bp)	購自 Omics Bio
Gel Extraction Kit	購自 QIAGEN

(九) 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)	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 5)

本次研究將進一步分析渦蟲黏液應用功能，實驗主要分三部分，首先評估渦蟲黏液作為仿生材料的可行性，實驗以自製落球實驗分析渦蟲黏液運動黏度及正向應力實驗分析其承受正向應力程度，使用蛋白質電泳嘗試找出渦蟲黏液中黏性蛋白，並以近年新增的數據庫分析王於 2017 年 LC MS/MS 結果，藉此推測渦蟲黏液中蛋白質種類。第二部分為誘導抗菌實驗，將以三種不同條件收集渦蟲黏液進行抗菌實驗，並嘗試使用環境細菌誘導渦蟲黏液產生抗菌能力，找出誘導渦蟲產生抗菌能力黏液之條件。最後分析渦蟲黏液細菌，拍攝渦蟲黏液中細菌並收集細菌進行 DNA 鑑定，同時鑑定渦蟲生活環境中所發現細菌進行交叉比對，藉此確認細菌屬於黏液中的細菌或環境細菌，並分析黏液細菌抗菌能力及使用 API ZYM 分析其所分泌酵素，推測其是否為渦蟲黏液中共生菌。

如「膠」似「漆」-台灣淡水渦蟲黏液黏性及誘導抗菌分析

Mucus Viscosity and Induced Antibacterial Analysis of Taiwanese Freshwater Planarian

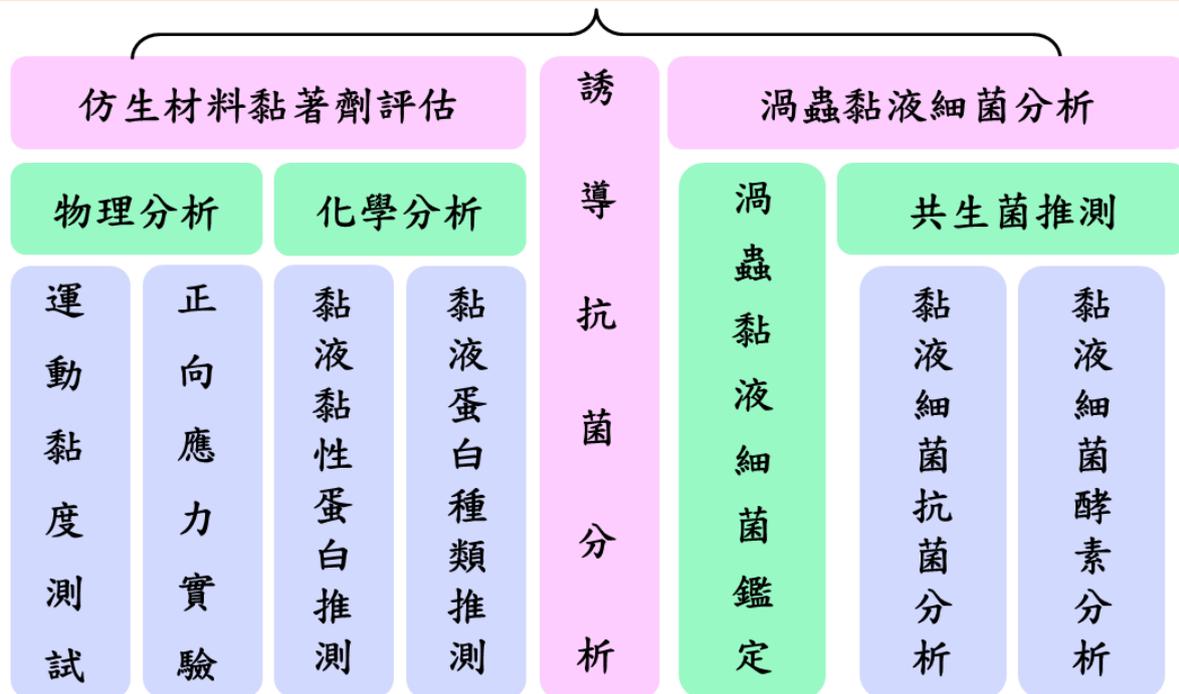


圖 5 實驗架構圖

二、實驗步驟

(一) 渦蟲黏液仿生材料黏著劑評估

1. 物理分析—運動黏度測試 (實驗使用渦蟲水溶性黏液)

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)。本實驗因渦蟲分泌黏液量有限，無法直接以現有運動黏度計 (圖 6a) 測量其黏液黏性，因此自製簡易落球實驗 (圖 6b) 並搭配運動黏度計測量稀釋膠水標準品，並繪製成運動黏度標準曲線 (圖 6c)，推算渦蟲水溶性黏液運動黏度，另比較搖晃組經搖晃刺激後所收集渦蟲水溶性黏液運動黏度 (黏性程度) 差異。

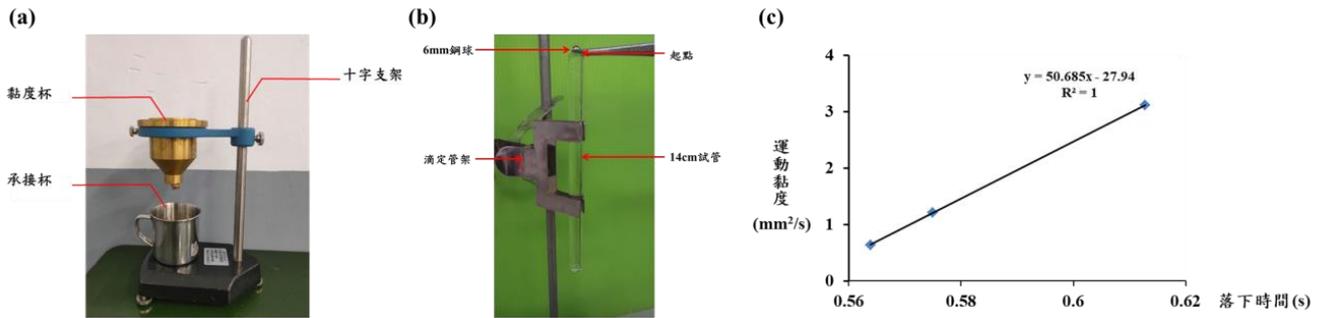


圖 6 運動黏度計及實驗裝置

(a) 為運動黏度計。(b) 為自製落球實驗裝置。(c) 運動黏度標準曲線 (n=15; Tech=15)。

【實驗方法】

稀釋膠水時將膠水原液定義為 100%膠水，以便後續實驗定量。

使用運動黏度計 (圖 6a) 前先将儀器調整至水平，以紙巾擦拭裝置並待其乾燥。將待測溶液 (稀釋膠水) 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，同時開始計時待測溶液流完所費時間。重複試驗，使其誤差不超過 0.5 秒。待測溶液流完時間低於 23 秒，則使用公式：流出時間 (s) = $0.154 \times \text{運動黏度 (mm}^2/\text{s)} + 11$ 。將其繪製成運動黏度標準曲線。

將 14 cm 長試管裝滿待測溶液 (稀釋膠水、渦蟲水溶性黏液)(圖 6b)，將鋼球 (直徑 6 mm、重約 0.9 g) 以鑷子垂直丟入待測溶液中，計算其掉落至底部所耗時間，最後以內插法計算渦蟲水溶性黏液運動黏度。

2.物理分析—正向應力實驗 (實驗使用渦蟲非水溶性黏液)

本實驗將研究渦蟲黏液作為黏著劑時承受正向應力程度，將以自製正向應力實驗進行分析。

【實驗方法】

實驗裝置由兩個懸吊紙製三角柱所構成 (圖 7)。使用渦蟲黏液將兩個三角柱黏接，黏著面積為 1 cm^2 ，待乾燥後將其懸吊，並於下方紙杯中持續增加鋼球 (重約 0.9 g) 數量，直到裝置無法承受重量斷裂，測量重物 (紙杯與鋼球) 重量並代入公式：

$\frac{\text{承受重量 (kgw)}}{\text{黏著面面積 (cm}^2\text{)}}$ ，即求出待測溶液（稀釋膠水、渦蟲非水溶性黏液）所能承受正向應力

大小，並將其換算成常用單位 kPa ($1 \text{ kgw/cm}^2 \approx 98.07 \text{ kPa}$)。

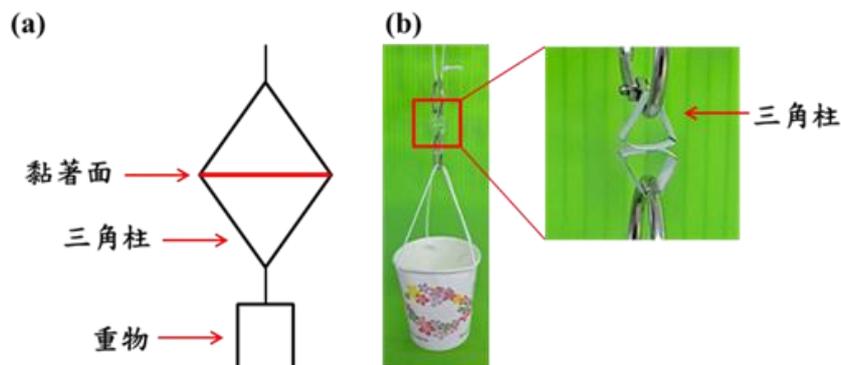


圖 7 正向應力實驗裝置示意圖及裝置

(a) 正向應力實驗裝置示意圖。(b) 實驗裝置，裝置由兩個紙製三角柱用線懸吊所構成。

3.化學分析—渦蟲黏液黏性蛋白推測（實驗使用渦蟲水溶性及非水溶性黏液）

使用蛋白質電泳進行分析渦蟲爬行組 (PL) 及搖晃組 (SP) 黏液，將電泳後的膠片進行過碘酸硝酸銀染色和銀染分析渦蟲黏液中醣蛋白、蛋白質分子量，並進一步以 ImageJ 分析，推測其中蛋白質相對濃度。

【蛋白質電泳步驟】

將樣本與 4X Sample Loading Buffer 以 3 : 1 混合， 100°C 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 90V 跑電泳約 1 個小時，使所有樣品於同一起點，再將電壓調至 110V，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過碘酸硝酸銀染色或銀染分析膠片。

(1) 過碘酸硝酸銀染色

【染色步驟】

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 dH_2O 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，

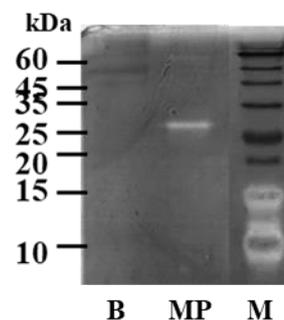


圖 8 過碘酸硝酸銀染色
樣本編號：B 為負對照組 BSA、MP 為正對照組奶粉、M 為 5~245 kDa 蛋白質標準品。

再以 dH₂O 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，醣蛋白色帶呈白色 (圖 8)。將膠片浸泡於反應中止液 60 分鐘，完成後掃描膠片。

表 4 過碘酸硝酸銀染色藥品配方

藥品名稱	配方
固定液 A	10%醋酸+25%異丙醇
固定液 B	7.5%醋酸
過碘酸溶液	0.2%過點酸
硝酸銀溶液	0.36%氫氧化鈉 10.5 mL+0.7 mL 氨水+0.4 g 硝酸銀+36.8 mL dH ₂ O
還原液	0.5%檸檬酸 0.5 mL+0.5 mL 甲醛+7.5 mL 甲醇+50 mL dH ₂ O

(2) 銀染

【染色步驟】

電泳後，泡固定液 (Fix) 20 分鐘，以 30%酒精清洗膠片 10 分鐘後，再進行增加靈敏度及對比 (Sensitive)，以 30%酒精清洗兩次，共 20 分鐘。將膠片進入硝酸銀容液使銀離子與蛋白質結合 (Stain)；以 dH₂O 短暫清洗 60 秒後，泡還原液至色帶呈色 (Develop)，最後加入中止液停止染色避免色帶過深 (Stop)。

表 5 銀染步驟藥品配方

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

(3) 以 ImageJ 分析色帶亮度

為了分析電泳後的膠片蛋白質濃度，參考徐於 2019 年分析方法，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。

【ImageJ 分析方法】(徐，2019)

複製已知 BSA 色帶於其他分子量位置，去除背景 (圖 9a)，圈選膠片上蛋白

質色帶 (圖 9b)，計算樣本組別色帶亮度面積 (圖 9c)，根據已知 BSA 色帶濃度面積，以 Excel 進一步分析推算膠片中蛋白質單體濃度 (圖 9d)。



圖 9 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。

4.化學分析—渦蟲黏液蛋白質種類推測

王於 2017 年研究中以 LC MS/MS 分析渦蟲黏液，因當時數據庫資訊不足而無法推測渦蟲黏液中蛋白質種類，本次實驗將重新以新增的數據庫分析，將對應本實驗蛋白質電泳分子量的蛋白，進行立體結構模擬及分析基本性質，並推測其對應到的蛋白功能。

【分析方法】

將王於 2017 年研究中 LC MS/MS 所分析渦蟲黏液中蛋白質序列與新建渦蟲數據庫 (<https://cuttingclass.stowers.org/en>) 中 *Girardia sp.* 的蛋白質數據進行比對，並將比對到的蛋白質序列輸入由交通大學設立用於模擬蛋白質序列網站 (PS)2-v2，推測蛋白質形狀及比對功能相似之同源蛋白，用以推測渦蟲黏液中未命名之蛋白質功能。將蛋白質序列輸入 TMHMM Server v. 2.0 分析其是否為跨膜蛋白、輸入 SignalP-5.0 Server 分析其是否為細菌信號肽以及將同源蛋白與渦蟲黏液蛋白胺基酸序列輸入 MEME Suite 分析其相似程度，用以推測渦蟲黏液中蛋白質基本性質。

(二) 誘導渦蟲黏液抗菌分析 (實驗使用渦蟲水溶性黏液)

本實驗將使用環境細菌 B (未鑑定) 及環境細菌 D、F 及 H (*Staphylococcus haemolyticus*) 進行誘導抗菌實驗，同時以電泳分析抗菌實驗所使用渦蟲黏液樣本，嘗試分析黏液中抗菌蛋白。由於爬行組 (PL)、受傷組 (HP) 及搖晃組 (SP) 皆無法誘導渦蟲產生抗菌能力，於是嘗試利用環境細菌誘導渦蟲自體產生抗菌。

【實驗方法】

(1) 不同條件收集渦蟲黏液誘導抗菌分析

將培養基塗滿環境細菌後，在培養基表面打數個洞，直徑約 0.7 cm。將收集爬行組 (PL)、受傷組 (HP)、搖晃組 (SP)、dH₂O、Ampicillin (10 µg/mL) 分別注入其中，樣本注入量 20 µL，以 37 °C 培養觀察抑菌環大小。將不同條件收集的渦蟲黏液對 4 株環境細菌進行抗菌分析，同時比較其黏液經無菌過濾後影響。

(2) 環境細菌誘導渦蟲分泌抗菌黏液分析

每天測量樣本 (表 6) 吸光值 (OD 600) 及塗盤算細菌數量，實驗共測量兩天。每日取 1 mL 實驗樣本溶液以 4000 rpm 離心去除大部分細菌後，取上清液進行抗菌實驗和蛋白質電泳分析，嘗試推測其中抗菌蛋白。

表 6 環境細菌誘導渦蟲抗菌樣本配置方法

組別	配置方法	總體積
誘導組		4×10 ⁷ CFU/mL 環境細菌、1 隻渦蟲
渦蟲組	0.13% LB 培養基	4×10 ⁷ CFU/mL 環境細菌
細菌組		1 隻渦蟲

(三) 渦蟲黏液細菌分析

1. 拍攝及鑑定黏液細菌 (實驗使用渦蟲水溶性黏液)

以革蘭氏染色法分析渦蟲黏液，嘗試拍攝渦蟲黏液中的細菌，並將其收集後初步以革蘭氏染色確定細菌型態，統計細菌於收集次數中出現次數，找出較常於渦蟲黏液中發現的菌株，進一步以 DNA 定序鑑定，同時實驗將鑑定渦蟲生活環境細菌，交叉比對比較其黏液細菌與其生活環境細菌差異，藉此確認其屬於黏液細菌或環境細菌。

【實驗方法】

於無菌環境收集渦蟲黏液，將黏液用革蘭氏染色觀察並拍照紀錄。將渦蟲黏液塗盤以 37 °C 培養，待菌落形態明顯後將其依照菌落形狀分離、純化，並以革蘭氏染色初步菌種鑑定再以 DNA 定序鑑定。

2. 共生菌推測—黏液細菌抗菌分析

分離出渦蟲黏液共生細菌後，將分析其是否具抗菌能力，探討渦蟲黏液抗菌能力是否為渦蟲黏液中共生細菌所導致。

(1) 劃菌法

【實驗方法】

將渦蟲黏液中分離出細菌接種於以塗滿環境細菌的培養基上，以 37 °C 培養後，觀察黏液中細菌是否產生抑菌環。

(四) 革蘭氏染色

將接種環進行殺菌後，沾菌落並抹於載玻片上，火烤玻片背面以固定，滴上結晶紫 1 分鐘後，蒸餾水沖洗接著滴上碘液，1 分鐘後以蒸餾水沖洗並使用 95% 酒精脫色，以番紅複染 45 秒，濾紙吸除多餘染劑後封片以顯微鏡觀察。

(五) DNA 定序

萃取細菌 DNA，並置於 PCR 反應試管中，加入引子 (Primers)、DNA 聚合酶 (Taq DNA Polymearse) 及 dNTPs，至於 PCR 反應器中，設定反應時間。首先升溫至 96 °C 期間內 DNA 會因高溫而變為單股，隨後溫度降至 58 °C，引子便會結合 DNA，再次升溫至 72 °C 時完成 DNA 複製，增加樣本數量。PCR 反應結束後，將以核酸電泳確認其中 DNA 分子量，並送至生技公司定序。參考 Morokuma 等人在 2017 年研究使用 27F、1492R 兩種引子；並使用 NCBI 數據庫比對 DNA 序列。定序結果送回後將進一步使用 MEGA 繪製演化樹推測細菌種類。

(六) 分析方式

以 T 檢驗 (T-test) 單因子變異數 (One-way ANOVA) 進行分析， $p < 0.05$ 為顯著差異 (*)， $p < 0.01$ 為極顯著差異 (**)。

伍、研究結果

一、渦蟲黏液仿生材料黏著劑評估

(一) 物理分析—運動黏度測試

落球實驗發現渦蟲水溶性爬行黏液 (PL) 運動黏度約為 $1.59 \text{ mm}^2/\text{s}$ ，搖晃組 (SP) 運動黏度則為 $5.17 \text{ mm}^2/\text{s}$ 。經搖晃刺激後渦蟲所分泌黏液運動黏度為爬行黏液 4.66 倍，兩者具極顯著差異 ($p < 0.01$) (圖 10)。

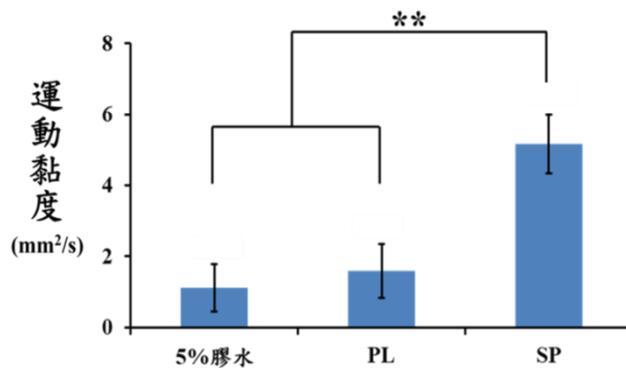


圖 10 渦蟲黏液運動黏度比較 (n=45 ; Bio=3 ; Tech=15)

鋼球直徑 6 mm、重 0.9 g，試管長度 14 cm。PL 為渦蟲爬行組黏液；SP 為搖晃組黏液。(p < 0.05) 為顯著差異；(p < 0.01) 為極顯著差異。

(二) 物理分析—正向應力實驗

圖 11 中發現搖晃組 (SP) 能夠承受約 $3.25 \pm 0.74 \text{ kPa}$ 的正向應力，與爬行組 (PL)、20% 稀釋膠水具極顯著差異 ($p < 0.01$)。

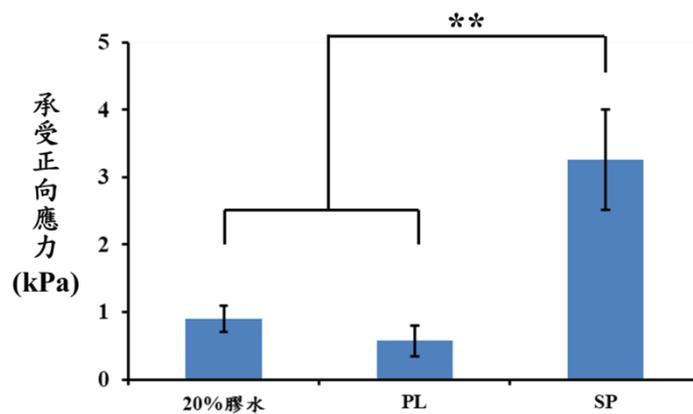


圖 11 分析渦蟲黏液承受最大正向應力 (n=30 ; Bio=3 ; Tech=10)

使用自製正向應力測試裝置。樣本編號：PL 為渦蟲爬行組黏液、SP 為渦蟲搖晃組黏液。以 One-way ANOVA 分析，(p < 0.05) 為顯著差異；(p < 0.01) 為極顯著差異。

(三) 化學分析—渦蟲黏液黏性蛋白推測

以銀染分析爬行組及搖晃組所分泌黏液 (圖 12 a), 發現搖晃組中蛋白質濃度高於爬行組, 具顯著差異 (圖 12b) ($p < 0.05$)。

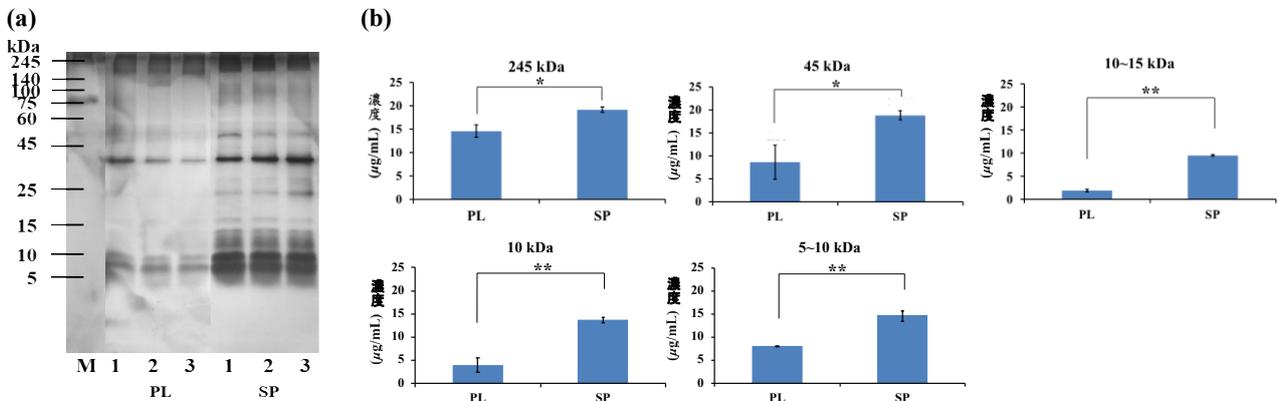


圖 12 以 SDS-PAGE 分析渦蟲黏液蛋白質濃度 (n=42; Bio=14; Tech=3)

(a) 銀染分析渦蟲黏液中蛋白質結果, 使用 4~15% 梯度膠片進行電泳。樣本編號: M 為 5~245 kDa 蛋白質標準品、PL 為渦蟲爬行黏液、SP 為搖晃刺激所收集之渦蟲黏液; (b) 以 ImageJ 與 Excel 分析渦蟲黏液蛋白質濃度分析。以 T-test 分析, ($p < 0.05$) 為顯著差異; ($p < 0.01$) 為極顯著差異。黏液樣本使用

過碘酸硝酸銀染色分析渦蟲黏液中醣蛋白分子量, 發現每次實驗 245 kDa 部分於渦蟲水溶性黏液及非水溶性黏液兩種黏液皆可重現 (圖 13)(表 7), 推測其為渦蟲黏液中主要黏性蛋白。

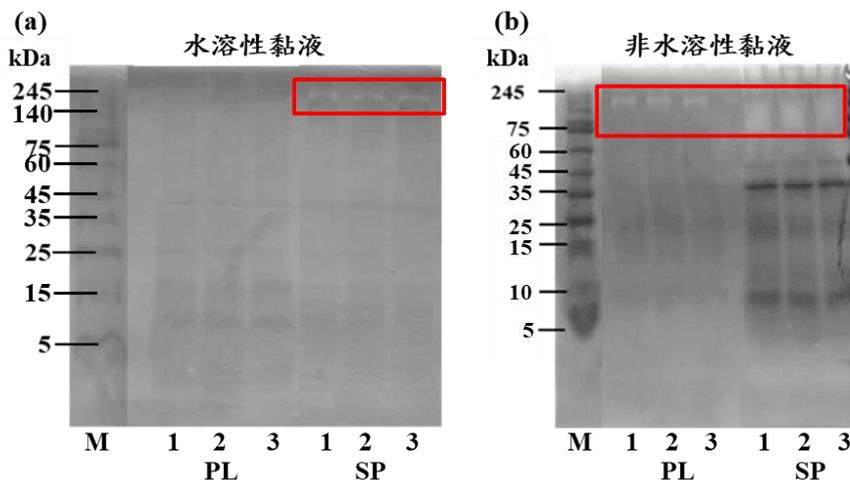


圖 13 以 SDS-PAGE 分析渦蟲黏液中醣蛋白分子量 (n=41; Bio=17; Tech=3)

使用 4~15% 梯度膠片, 以過碘酸硝酸銀染色進行分析。(a) 非水溶性黏液; (b) 水溶性黏液。樣本編號: M 為 5~245 kDa 蛋白質標準品、PL 為渦蟲爬行黏液、SP 為搖晃刺激所收集之渦蟲黏液。

表 7 渦蟲黏液中醣蛋白出現比例

分子量位置	非水溶性黏液 (lysis buffer 回溶)	水溶性黏液
245 kDa	+ (62%)	+ (100%)
10~15 kDa	+ (8%)	-
小於 5 kDa	+ (31%)	+ (25%)

*註：1. +能發現色帶；-無法發現色帶

2. 非水溶性黏液 (n=39；Bio=13；Tech=3)

3. 水溶性黏液 (n=12；Bio=4；Tech=3)

(四) 化學分析—渦蟲黏液蛋白質種類推測

數據庫中蛋白質尚未命名，且大分子渦蟲黏液蛋白無法建模和推測其功能 (圖 14a)，其他對應蛋白質為肌動蛋白絲 (Actin filament)、烯醇化酶 (Enolase)、微管蛋白鍊 (Tubulin chain)(圖 14b)。

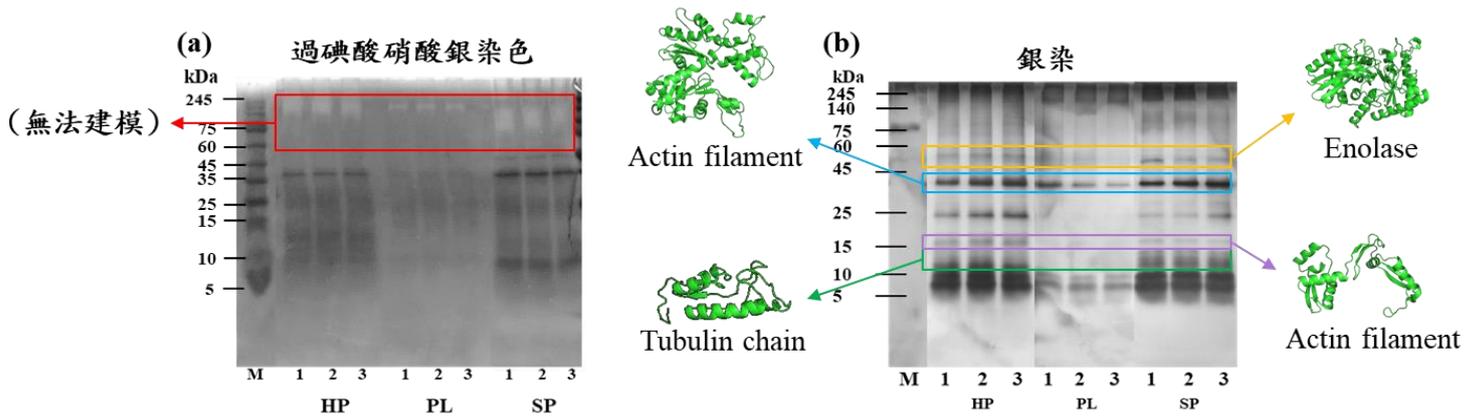


圖 14 渦蟲黏液蛋白推測對應其黏液電泳結果

渦蟲數據庫使用自：<https://cuttingclass.stowers.org/en>；(a) 過碘酸硝酸銀染色分析渦蟲黏液中醣蛋白；(b) 銀染分析渦蟲黏液中蛋白質。

【實驗討論】

1. 搖晃刺激渦蟲可產生大量且較濃稠的黏液

使用試管震盪器劇烈搖晃模擬強烈水流沖刷刺激渦蟲分泌黏液，發現可刺激渦蟲產生大量且較濃稠的黏液，以利其他黏性分析實驗。此方法不會對渦蟲造成傷害，實驗後渦蟲皆存活。未來可進一步研究不同搖晃程度或搖晃時間等條件能否獲得更黏稠的渦蟲黏液。

2. 推測渦蟲黏液主要醣蛋白分子量約 245 kDa

本次實驗發現渦蟲黏液中 3 個分子量位置處皆有醣蛋白色帶，而 245 kDa 醣蛋白於每次實驗及不同樣本處理方法皆可重現，推測其為渦蟲黏液中主要黏性蛋白。另渦蟲數據庫中發現大分子蛋白分子量 (217 kDa) 與本實驗中所發現大分子醣蛋白分子量 (245 kDa) 相似，推測其可能為同種醣蛋白，由於嘗試模擬其分子結構時無法建模，目前僅能推測其非細菌信號素及位於細胞膜外並非跨膜蛋白，未來將嘗試以 LC-MS 分析渦蟲黏液中 245 kDa 醣蛋白種類並推測其功能。

二、誘導渦蟲黏液抗菌分析

(一) 不同條件收集渦蟲黏液誘導抗菌分析

圖 15a 發現渦蟲黏液經濾後無抗菌環產生；而未過經濾黏液則具有微弱抗菌環抑制環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*)，且抑菌環內有其他細菌生長 (圖 15b)。

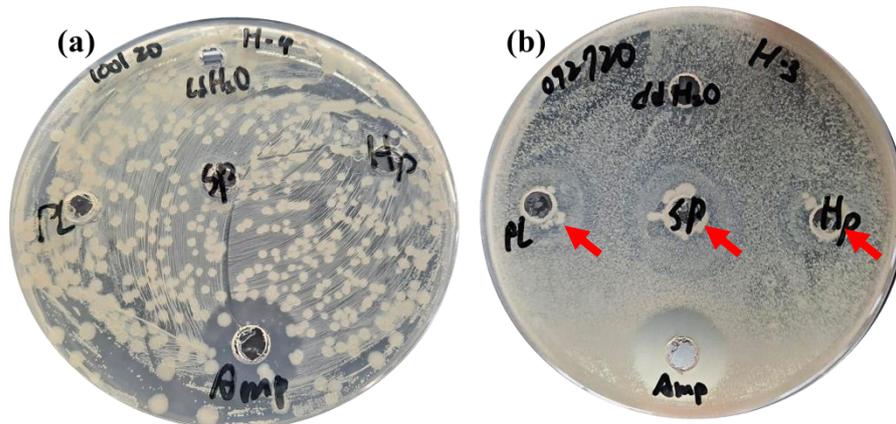


圖 15 紙錠擴散法及培養基擴散法分析渦蟲黏液抗菌能力 (n=9 ; Bio=3 ; Tech=3)

(a) 無菌過濾之渦蟲黏液實驗結果；(b) 未經過濾之渦蟲黏液實驗結果。樣本編號:PL 為爬行組；SP 為搖晃組；HP 為受傷組；Amp 為正對照組 Ampicillin。使用環境菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*)

【實驗討論】

1. 推測渦蟲黏液細菌能協助渦蟲抗菌

未經無菌過濾之渦蟲黏液產生抑菌環且此處有細菌滋生 (圖 15b)，其形態與環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*) 不同 (圖 16a)，將其編號為 FM001 並進行 DNA 鑑定

後發現為 *Bacillus cereus*，推測其為渦蟲黏液細菌，能對環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*) 產生抗菌能力 (圖 16cd)，並發現其具移動能力 (圖 16d)。

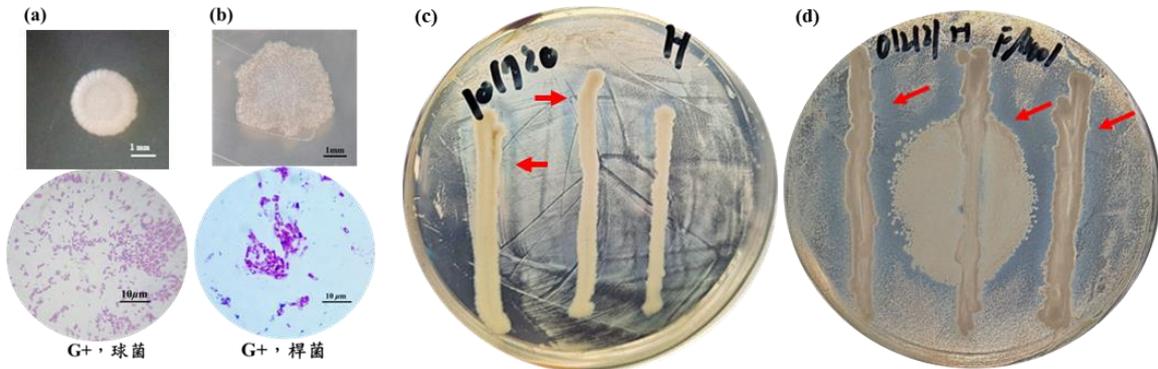


圖 16 細菌型態比較及畫菌法抗菌結果

(a) H (*Staphylococcus haemolyticus*)；(b) FM001 (*Bacillus cereus*)。(c) (d) 箭頭為微弱抗菌環。FM001 抗菌實驗，使用環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*)。

(二) 環境細菌誘導渦蟲分泌抗菌黏液分析

實驗結果發現以環境細菌 D (*Staphylococcus haemolyticus*) 進行誘導渦蟲分泌抗菌黏液時，誘導組溶液於第一天即產生抗菌能力 (圖 17a)，而第二天時渦蟲於玻璃罐中自解導致溶液無抑菌能力 (圖 17b)。比較第一天及第二天細菌數，發現誘導組溶液中細菌數第二天具極顯著差異 ($p < 0.01$)。

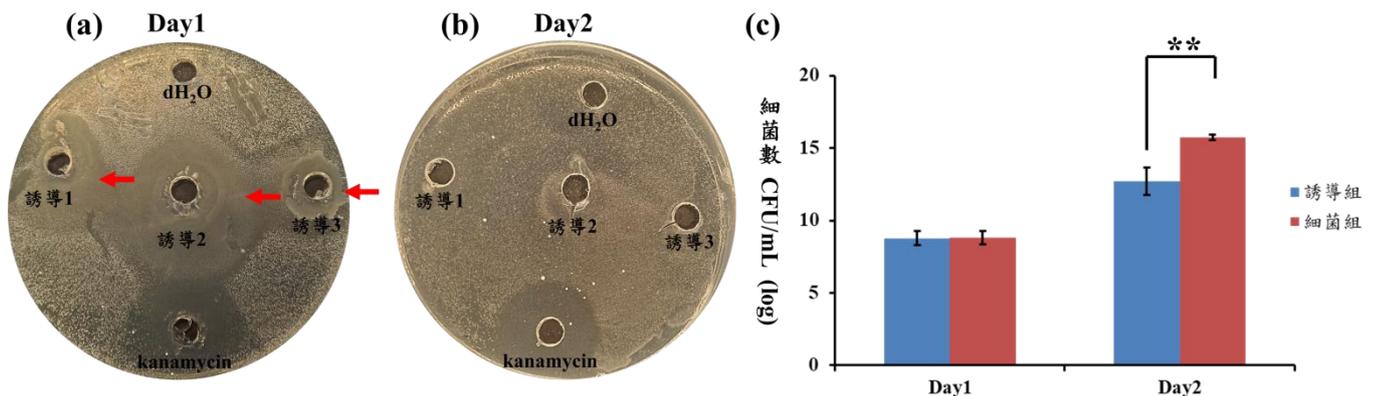


圖 17 誘導抗菌結果及溶液中細菌數比較 (n=9；Bio=3；Tech=3)

(a) 為第一天誘導組抗菌實驗結果。(b) 為第二天誘導組抗菌實驗結果。樣本編號：dH₂O (負對照組)、kanamycin 濃度為 50 μg/mL (正對照組)、數字為誘導組生物性重複數。(c) 誘導組及細菌組細菌數量比較。起始環境細菌 D (*Staphylococcus haemolyticus*)濃度： 4×10^7 CFU/mL。以 T-test 分析，($p < 0.05$) 為顯著差異；($p < 0.01$) 為極顯著差異。

將誘導組及細菌組溶液進行蛋白質電泳分析發現色帶 (圖 18a)，且誘導組蛋白質濃度於 60 kDa 部分與渦蟲組及細菌組具有顯著差異 (圖 18b)($p < 0.05$)。

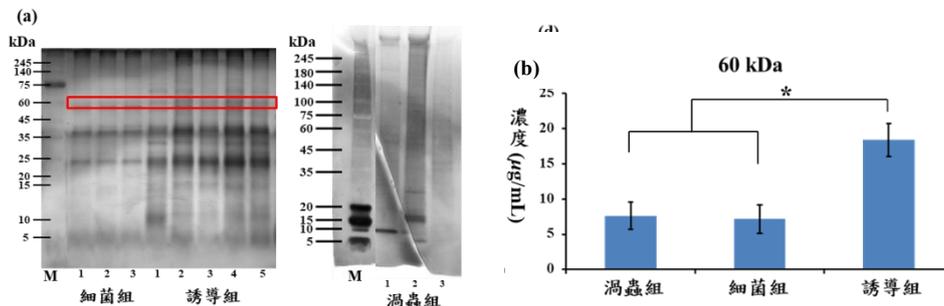


圖 18 以 SDS-PAGE 分析誘導組色帶差異 (n=9; Bio=3; Tech=3)

(a) 以銀染分析細菌組、誘導組及渦蟲組。數字為其重複次數，樣本編號：M 為 5~245 kDa 蛋白質標準品；
(b) 細菌組、誘導組及渦蟲組 60 kDa 相對蛋白質濃度差異。以 One-way ANOVA 分析，($p < 0.05$) 為顯著差異；($p < 0.01$) 為極顯著差異。

【實驗討論】

1. 渦蟲黏液抗菌誘導條件推測

發現渦蟲生存於有大量環境細菌 D (*Staphylococcus haemolyticus*) 的溶液中，能誘導渦蟲體表能產生抗菌黏液，並將抗菌黏液中抗菌物質經水溶性黏液擴散至水中，抑制環境中細菌生長，避免自身遭細菌感染，目前實驗使用 1 隻渦蟲進行誘導抗菌實驗，未來將嘗試以 25 隻渦蟲收集黏液進行抗菌實驗，並以蛋白質電泳分析嘗試推測其黏液抗菌蛋白。

2. 推測 60 kDa 蛋白質為渦蟲黏液中抗菌蛋白

以電泳分析誘導組黏液時，發現其溶液中 60 kDa 部分蛋白質濃度明顯增加，並與渦蟲組、細菌組具顯著差異 ($p < 0.05$)，推測其為渦蟲黏液中抗菌蛋白，未來可使用 native-PAGE 分離 60 kDa 部分蛋白質進行抗菌實驗。

三、渦蟲黏液細菌分析

(一) 渦蟲黏液細菌鑑定

革蘭氏染色方法不易發現細菌，因此將革蘭氏染色步驟分解，每隔一步驟使用顯微鏡觀察。使用結晶紫加碘液染色 (圖 19a) 發現黏液細菌，以酒精脫色後其仍呈紫色 (圖 19b)。

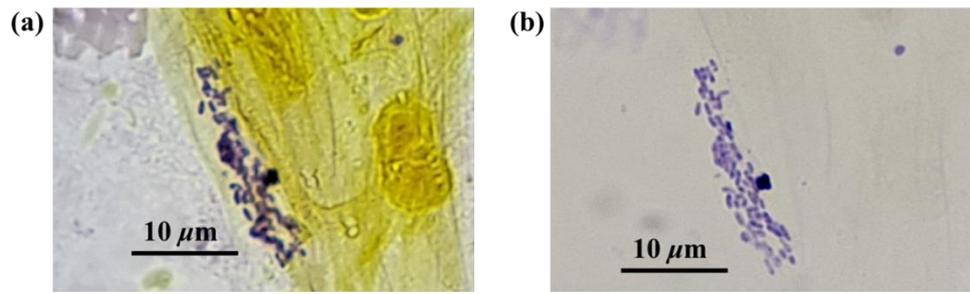


圖 19 渦蟲爬行黏液細菌

(a) 結晶紫及碘液染色，黃色處為渦蟲黏液；(b)酒精脫色後黏液細菌。

目前於渦蟲黏液中收集到 50 株型態各異的菌株，將收集比例較高的 10 種菌株進行定序，並拍攝其型態 (圖 20)。同時已收集 14 株渦蟲生活環境細菌，目前已定序 5 株菌株 (圖 21)。將渦蟲黏液細菌與其生活環境細菌 DNA 鑑定結果比較，發現兩者細菌種類皆不重複，推測收集到的黏液細菌為渦蟲黏液中細菌 (表 8)。

編號	M005	M017	M022	M026	M030
菌落型態					
染色結果					
	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Variovorax</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>
編號	M031	M035	M039	M042	M044
菌落型態					
染色結果					
	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i>	<i>Tsukamurella</i> sp.	<i>Methyloburum</i> <i>rhodesianum</i>	<i>Pedobacter</i> <i>solisilvae</i>

圖 20 渦蟲黏液細菌 (M001~M050)

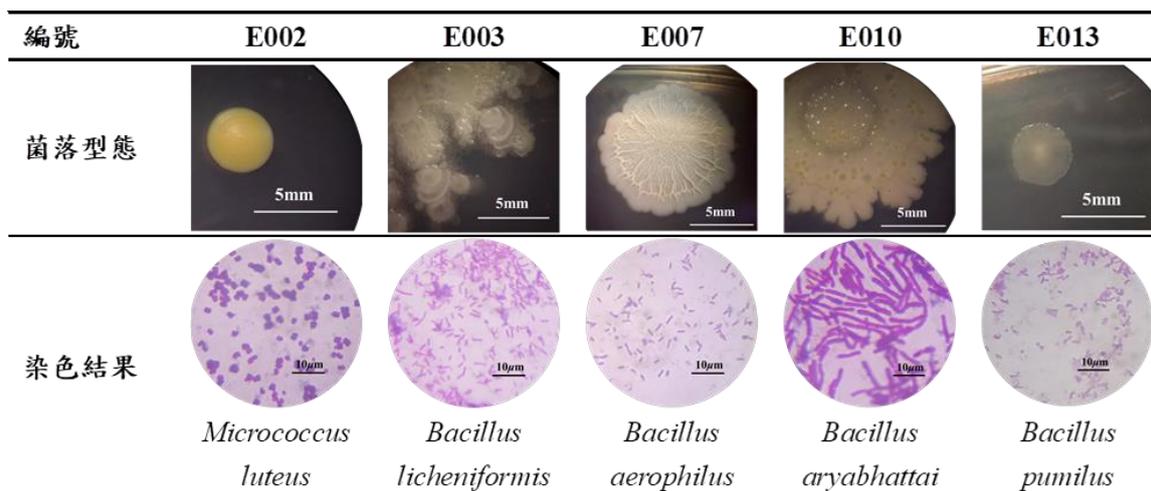


圖 21 渦蟲生活環境細菌種類及形態 (E001~E014)

表 8 渦蟲黏液與其生活環境細菌比較

渦蟲黏液細菌	渦蟲生活環境細菌
<i>Mesorhizobium sp.</i> (M005)	<i>Micrococcus luteus</i> (E002)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (M017)(M030)	<i>Bacillus licheniformis</i> (E003)
<i>Microbacterium sp.</i> (M022)(M031)	<i>Bacillus aerophilus</i> (E007)
<i>Variovorax sp.</i> (M026)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (E010)
<i>Bacillus megaterium</i> (M035)	<i>Bacillus pumilus</i> (E013)
<i>Tsukamurella sp.</i> (M039)	
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> (M042)	
<i>Pedobacter solisilvae</i> (M044)	
<i>Bacillus cereus</i> (FM001)	

【實驗討論】

1. 可嘗試使用倒立顯微鏡螢光拍攝渦蟲黏液細菌

目前使用一般可見光光源拍攝，但革蘭氏染色方法不易發現細菌。未來可嘗試以倒立顯微鏡螢光光源拍攝渦蟲黏液細菌。螢光拍攝時顯微鏡會發出高能量光線使樣本中蛋白質及細菌等物質吸收，反射出不同波長之螢光，藉此於視野下找到欲觀察的目標，嘗試能否更容易拍攝黏液中細菌。

2. 分析黏液細菌分泌酵素推測和渦蟲共生關係

徐於 2019 年研究使用 API ZYM 檢測渦蟲捕食前後黏液酵素種類差異，並參考 Collin 等人在 2013 年研究各酵素波長，使用 ELISA reader 檢測酵素濃度，初發現渦蟲

捕食時會分泌至少 8 種酵素進行體外化學消化蚊幼蟲 (徐, 2019)。本次實驗收集渦蟲黏液中細菌, 未來將分析其分泌酵素種類及濃度, 並與徐 (2019) 推測渦蟲黏液中酵素進行比較, 分析黏液細菌是否分泌酵素參與渦蟲捕食, 推測其和渦蟲是否具共生關係。

(三) 渦蟲黏液細菌抗菌分析

將已鑑定的渦蟲黏液細菌進行抗菌分析, 發現黏液細菌 M030 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 對環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*) 產生抗菌能力 (圖 22)。



圖 22 渦蟲黏液細菌抗菌實驗

使用渦蟲黏液細菌為 M030 (*Stenotrophomonas maltophilia*) ; 環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*)。箭頭處為抗菌環。

【實驗討論】

1. 推測渦蟲黏液部分細菌能對特定細菌產生抗菌環

發現黏液細菌 M030 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 能對環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticus*) 產生抗菌能力, 推測其能協助渦蟲產生抗菌能力, 與渦蟲可能有進一步交互關係, 未來將以 API ZYM 分析其能否分泌酵素參與渦蟲行體外化學消化, 推測其與渦蟲共生關係。

陸、討論

一、渦蟲黏液仿生材料黏著劑評估

(一) 與其他文獻測量正向應力比較

文獻中三線蛞蝓 (*Lehmannia valentiana*) 承受正向應力為 1700 ± 100 kPa ; 十字架青蛙 (*Notaden bennetti*) 承受正向應力為 1700 ± 300 kPa (Graham *et al.*, 2005 ; Li & Granham,

2007)，其所能承受的正向應力皆高於渦蟲黏液，然而因實驗金費有限，所以本研究以自製正向應力實驗裝置進行分析，與文獻分析動物承受正向應力實驗裝置有所差異，因此未來將嘗試以自製實驗測量其他易取得的動物黏液（如蛞蝓）以進行比較。

(二)、以微觀角度分析渦蟲黏液黏性

本研究發現渦蟲黏液所能承受正向應力為 3.25 ± 0.74 kPa，而王與郭在 2016 年研究中發現渦蟲黏液能協助其捕食及爬行，其黏液黏性足以協助其捕食及爬行。文獻分析動物生理性質時，常以動物自身微觀角度進行分析，如 Nguyen 等人於 2014 年分析螞蟻 (*Formica exsectoides*) 頸部結構所能承受重量為其體重的 5000 倍；Rivera 等人於 2020 年時發現惡魔鐵錠甲蟲 (*Phloeodes diabolicus*) 外骨骼可承受其體重 39000 倍的壓力而不被破壞。故未來將測量渦蟲平均重量及其爬行時平均表面積，嘗試以渦蟲微觀角度分析其黏液黏性程度。

(三) 渦蟲黏性物質仿生應用

模仿生物特殊生存本領並應用於日常生活的學問稱為仿生學 (Bionics)。著名例子如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) 以及將蝸牛黏液更進一步被開發成兼具抗菌及保濕的食品包裝材料 (Di Filippo *et al.*, 2021)。王於 2017 年推測渦蟲黏液開發成防水黏著劑具高度潛能，另外其黏液亦可能開發為具保濕特性的凝膠等應用，未來可持續分析及評估渦蟲黏液應用潛能。

(四) 渦蟲黏液中黏性蛋白推測

動物黏液中具黏性成分大多為大分子蛋白 (表 9)；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所組成，楊在 2020 年研究於渦蟲黏液中發現 3 種分子量位置不同的醣蛋白，本研究則發現渦蟲黏液中 245 kDa 部分醣蛋白於渦蟲水溶性黏液及非水溶性黏液解可重現且再現性較高，推測其黏液分子量約 245 kDa 部分為其黏液黏性蛋白。未來將嘗試進一步使用 LC-MS 分析電泳分離出 245 kDa 部分，分析其蛋白質種類。

表 9 動物黏性蛋白分子量

物種	蛋白質名稱	分子量 (kDa)	文獻
棘背魚 (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	spiggin glycoprotein	130	Graham <i>et al.</i> , 2005
蠶 (<i>Bombyx mori</i>)	蠶絲蛋白	350	Jin&Kaplan, 2003
貽貝 (<i>Mytilus edulis</i>)	足絲蛋白	110	Waiter, 1999
虎紋三角渦蟲 (<i>Girardia tigrina</i>)	-	約 245	This study

二、渦蟲黏液誘導抗菌分析

(一) 渦蟲抗菌文獻比較 (表 10)

Abnave 等人於 2014 年研究渦蟲抗菌能力，其研究渦蟲攝食致病細菌污染之食物或以細菌感染渦蟲來探討致病菌於渦蟲體內生長情形；Tsoumtsa 等人於 2017 年發現渦蟲受感染後能於 6 天內殺死體內金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，文獻探討部分多為渦蟲的體內殺菌機制及渦蟲與微生物病原體的相互作用 (Maciel *et al.*, 2019)，其為渦蟲免疫機制的第二道防線 (先天性免疫)。本研究探討部分為誘導渦蟲黏液產生抗菌能力，為免疫機制第一道防線，並發現將 1 隻渦蟲置於大量環境細菌 D (*Staphylococcus haemolyticu*) 中能誘導其分泌抗菌物質，實驗過程僅第 1 天即產生抗菌能力，未來將嘗試同時以 25 隻渦蟲進行實驗並收集黏液進行抗菌分析及使用蛋白質電泳推測其抗菌蛋白。

表 10 渦蟲抗菌相關文獻比較

渦蟲種類	方法	結果	文獻
<i>Dugesia japonica</i>	餵食細菌污染之食物	渦蟲能殺死體內致病菌	Abnave <i>et al.</i> , 2014
<i>Schmidtea mediterranea</i>	餵食細菌污染之食物	受感染後渦蟲能於 6 天內殺死體內細菌	Tsoumtsa <i>et al.</i> , 2017
	將渦蟲浸泡於細菌溶液中	渦蟲適合做為研究細菌感染的模式動物	Maciel <i>et al.</i> , 2019
<i>Girardia tigrina</i>	將渦蟲浸泡於細菌溶液中	能誘導渦蟲產生抗菌黏液	This study

三、渦蟲黏液細菌分析

(一)、渦蟲黏液細菌比較 (表 11)

Lee 等人於 2018 年時曾提出 10 種常見及可培養的渦蟲體表微生物，將本研究於渦蟲黏液中所收集到細菌與其比較，發現除文獻提到擬桿菌門 (*Bacteroidetes*) 及變形桿菌門 (*Proteobacteria*) 的細菌，本研究亦收集到放線菌門 (*Actinobacteria*) 及厚壁菌門細菌 (*Firmicutes*)，其中放線菌門中特定細菌能提煉抗生素 (如鏈黴菌)；本研究發現厚壁菌門的 FM001 (*Bacillus cereus*) 能夠對環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticu*) 造成抑制效果。未來將進一步探討所收集到的黏液細菌，研究其是否與渦蟲具有共生關係，

表 11 渦蟲黏液細菌比較

Lee et al., 2018	渦蟲黏液細菌 (This study)	渦蟲生活環境細菌 (This study)
<i>Paucibacter sp.</i>	<i>Mesorhizobium sp.</i> (M005)	<i>Micrococcus luteus</i> (E002)
<i>Taibella sp.</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (M017)(M030)	<i>Bacillus licheniformis</i> (E003)
<i>Chryseobacterium sp.</i>	<i>Microbacterium sp.</i> (M022)(M031)	<i>Bacillus aerophilus</i> (E007)
<i>Variovorax sp.</i>	<i>Variovorax sp.</i> (M026)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (E010)
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Bacillus megaterium</i> (M035)	<i>Bacillus pumilus</i> (E013)
<i>Herminiumonas sp.</i>	<i>Tsukamurella sp.</i> (M039)	
<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> (M042)	
<i>Pedobacter sp.</i>	<i>Pedobacter solisilvae</i> (M044)	
<i>Aquitqeq sp.</i>	<i>Bacillus cereus</i> (FM001)	

*註：螢光筆標示處為文獻與本實驗對應到的菌株

(二) 渦蟲黏液中所收集到細菌抗菌能力推測

本研究推測渦蟲黏液抗菌能力與渦蟲黏液細菌有關，文獻提到芽孢桿菌 (*Bacillus sp.*) 細菌會與海洋中鯊魚、腹足動物共生並具有抗菌能力 (Wu *et al.*, 2018 ; Viju & Satheesh, 2020)；海洋中根瘤菌 (*Mesorhizobium sp.*) 亦會與海綿共生並產生具抗菌能力的次級代謝產物 (Krick *et al.*, 2007)。未來將繼續探討渦蟲黏液中細菌對環境細菌之抗菌能力，並嘗試推測其是否與渦蟲具共生關係。

柒、結論

一、渦蟲黏液仿生材料黏著劑評估

- (一) 搖晃刺激能提高渦蟲黏液黏度 ($5.17 \text{ mm}^2/\text{s}$) 及承受正向應力程度 ($3.25 \pm 0.74 \text{ kPa}$)。
- (二) 推測渦蟲黏液中 245 kDa 部分為其黏液中醣蛋白主要成分。

二、誘導渦蟲黏液抗菌分析

- (一) 不同條件收集渦蟲黏液 (爬行組、搖晃組及受傷組) 無法誘導其黏液產生抗菌能力
- (二) 透過環境細菌 D (*Staphylococcus haemolyticu*) 誘導，渦蟲黏液能對其產生抗菌能力。

三、渦蟲黏液細菌分析

- (一) 初步鑑定了 10 株渦蟲黏液中細菌，與渦蟲生活環境細菌不同，推測黏液中含有特定細菌。
- (二) 黏液細菌 M030 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 能對環境細菌 H (*Staphylococcus haemolyticu*) 產生抗菌能力。

綜合以上，本次研究發現渦蟲黏液具有開發為防水黏著劑潛能，其黏液能經特定環境細菌誘導能產生抗菌能力並推測黏液中部分細菌具抗菌能力。

捌、未來展望

一、渦蟲黏液仿生材料黏著劑評估

- (一) 使用其他易取得的動物黏液 (如蛞蝓) 進行正向應力分析

自製正向應力實驗僅分析渦蟲黏液承受正向應力程度，未來將收及其他易取得的動物黏液進行正向應力分析，以比較渦蟲黏液黏性。

- (二) 測量渦蟲平均重量級爬行時平均表面積，嘗試以微觀角度分析渦蟲黏液黏性

將嘗試以渦蟲微觀角度分析渦蟲黏液黏性，探討其黏液能夠承受多少倍的渦蟲自身重量，以及分析渦蟲體表面積，推測其能承受正向應力程度。

- (三) 以 LC-MS 分析渦蟲黏液 245 kDa 醣蛋白部分

由於目前無法推測 245 kDa 醣蛋白種類，未來將嘗試以 LC-MS 分析其蛋白質種類，

推測其是否為渦蟲黏液中黏性蛋白。

二、誘導渦蟲黏液抗菌分析

(一) 以環境細菌誘導 25 隻渦蟲分泌抗菌黏液分析

目前僅分析單一個體經誘導分泌抗菌能力的黏液，未來將使用 25 隻渦蟲收集黏液進行誘導抗菌實驗，並使用蛋白質電泳分析，嘗試找出渦蟲所分泌的抗菌蛋白。

(二) 分析渦蟲黏液抗菌機制

Abdel-Shafi 於 2019 年時從鯰魚 (*Clarias gariepinus*) 體表黏液中分離出抗菌醣蛋白 CFG，其分子量約為 22 kDa，能使革蘭氏陰性菌細胞膜畸形產生抗菌能力；Wang 等人於 2019 年分析克氏海葵魚 (*Amphiprion clarkii*) 所分泌黏液對寄生蟲及細菌的免疫機制，發現其能使細菌細胞變形並黏附成團以產生抗菌能力；2020 年 Li 等人則發現鯰魚身上的抗菌肽 CF-14 能造成大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 細胞膜穿孔殺死細菌。近年來對於動物抗菌物質研究多著重於其抗菌機制，未來可嘗試分析渦蟲黏液中抗菌物質及其抗菌機制，參考文獻使用電子顯微鏡以高倍率觀察細菌形態變化，研究渦蟲黏液抗菌機制。

三、渦蟲黏液細菌分析

(一) 使用自體螢光嘗試拍攝渦蟲黏液細菌

由於革蘭氏染色不易發現渦蟲黏液中細菌，將嘗試使用自體螢光拍攝其細菌，以更快速度發現黏液中細菌。

(二) 以 API ZYM 分析渦蟲黏液細菌所分泌酵素

初步鑑定渦蟲黏液中 10 種細菌後，將利用 API ZYM 分析收集到的黏液細菌，能否產生徐在 2018 年時分析渦蟲捕食時黏液所分泌的酵素，推測黏液細菌能否協助渦蟲體外化學消化，推測其與渦蟲相互關係。

玖、參考資料文獻

一、科展、小論文

- (一) 王琳雅與郭應廷 (2016)。中華民國第 56 屆中小學科學展覽會作品說明書：「孑」地任務－渦蟲捕食白線斑蚊幼蟲之生物防治評估。
- (二) 王琳雅 (2017)。中華民國第 57 屆中小學科學展覽會作品說明書：「孑」戰關鍵－台灣淡水渦蟲捕食蚊幼蟲機制及其黏液探討。
- (三) 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。
- (四) 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。
- (五) 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。
- (六) 曾依晴 (2009)。2009 年國際國際科學展覽會優勝作品：從麵包蟲體內分離出可分解保麗龍之菌種。
- (七) 董冠群、莊智宇與李岱瑾 (2015)。中華民國第 55 屆中小學科學展覽會作品說明書：親愛的，微生物把保麗龍分解了！
- (八) 詹鈞翔、詹鈞年與謝典儒 (2012)。中華民國第 52 屆中小學科學展覽會作品說明書：屠龍高手－分解保麗龍細菌之分離
- (九) 楊政穎 (2020)。中華民國第 60 屆中小學科學展覽會作品說明書：如「膠」似「漆」－台灣淡水渦蟲黏液黏性及抗菌功能分析。

二、書籍、期刊

- (一) Abdel-Shafi, S., Osman, A., Al-Mohammadi, A. R., Enan, G., Kamal, N., & Sito, 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.
- (二) Abnave, P., Mottola, G., Gimenez, G., Boucherit, N., Trouplin, V., Torre, C., ... & Hamaoui, D. (2014). Screening in planarians identifies MORN2 as a key component in LC3-associated phagocytosis and resistance to bacterial infection. *Cell host & microbe*, 16 (3), 338-350.

- (三) Collin, R., & Starr, M. J. (2013). Comparative Ontogenetic Changes in Enzyme Activity During Embryonic Development of Calyptraeid Gastropods. *The Biological Bulletin*, 225 (1), 8-17. doi:10.1086/bblv225n1p8
- (四) Di Filippo, M. F., Dolci, L. S., Liccardo, L., Bigi, A., Bonvicini, F., Gentilomi, G. A., ... & Albertini, B. (2021). Cellulose derivatives-snail slime films: New disposable eco-friendly materials for food packaging. *Food Hydrocolloids*, 111, 106247.
- (五) 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
- (六) 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/bm050335e016/j.fsi.2020.03.038
- (七) Holden, W. M., Hanlon, S. M., Woodhams, D. C., Chappell, T. M., Wells, H. L., Glisson, S. M., Parris, J. M., Mckenzie, J. V., Kingt, R., Rollins-Smith, L. A. (2015). Skin bacteria provide early protection for newly metamorphosed southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*) against the frog-killing fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Conservation*, 187, 91-102. doi:10.1016/j.biocon.2015.04.007
- (八) 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
- (九) 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.
- (十) Jin, H., & Kaplan, D. L. (2003). Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, 424 (6952), 1057-1061. doi:10.1038/nature01809
- (十一) Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (6), 423-435. doi:10.1038/nrmicro2333
- (十二) Krick, A., Kehraus, S., Eberl, L., Riedel, K., Anke, H., Kaesler, I., . . . König, G. M. (2007). A Marine *Mesorhizobium* sp. Produces Structurally Novel Long-Chain N-Acyl-L-Homoserine Lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (11), 3587-3594. doi:10.1128/aem.02344-06
- (十三) Li, D. & Graham, L.D. (2007) *Epermal secretions of terrestrial flatworms and slugs : Lehmanna valentiana* mucus contains matrilin-like proteins. *Elsevier Science PartB*148 (2007)231-244
- (十四) Lee, F. J., Williams, K. B., Levin, M., & Wolfe, B. E. (2018). The Bacterial Metabolite Indole Inhibits Regeneration of the Planarian Flatworm *Dugesia japonica*. *IScience*, 10, 135-148. doi:10.1016/j.isci.2018.11.021

- (十五) Li, T., Liu, Q., Chen, H., & Li, J. (2020). Antibacterial activity and mechanism of the cell-penetrating peptide CF-14 on the gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. *Fish & Shellfish Immunology*, 100, 489-495. doi:10.1016/j.fsi.2020.03.038
- (十六) Maciel, E. I., Jiang, C., Barghouth, P. G., Nobile, C. J., & Oviedo, N. J. (2019). The planarian *Schmidtea mediterranea* is a new model to study host-pathogen interactions during fungal infections. *Developmental & Comparative Immunology*, 93, 18-27.
- (十七) Morokuma, J., Durant, F., Williams, K. B., Finkelstein, J. M., Blackiston, D. J., Clements, T., Levin, M. (2017). Planarian regeneration in space: Persistent anatomical, behavioral, and bacteriological changes induced by space travel. *Regeneration*, 4 (2), 85-102. doi:10.1002/reg2.79
- (十八) Nguyen, V., Lilly, B., & Castro, C. (2014). The exoskeletal structure and tensile loading behavior of an ant neck joint. *Journal of biomechanics*, 47 (2), 497-504
- (十九) Pedersen KJ. (1959). Some features of the fine structure and histochemistry of planarian subepidermal gland cells. *Zeitschrift fur Zellforschung* 1959; 50:121-42; <https://doi.org/10.1007/BF00350411>
- (二十) Rivera, J., Hosseini, M. S., Restrepo, D., Murata, S., Vasile, D., Parkinson, D. Y., ... & Kisailus, D. (2020). Toughening mechanisms of the elytra of the diabolical ironclad beetle. *Nature*, 586 (7830), 543-548.
- (二十一) Tsoumtsa LL, Torre C, Trouplin V, Coiffard B, Gimenez G, Mege JL, Ghigo E. (2017). Antimicrobial capacity of the freshwater planarians against *S. aureus* is under the control of timeless. *Virulence* 2017;1-10; PMID:28051908; <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1276689>
- (二十二) Viju, N., Punitha, S. M., & Satheesh, S. (2020). Antibiofilm activity of symbiotic *Bacillus* species associated with marine gastropods. *Annals of Microbiology*, 70 (1). doi:10.1186/s13213-020-01554-z
- (二十三) Waiter, J. H. (1999). Reverse Engineering of Bioadhesion in Marine Mussels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 875 (1), 301-309. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb08513.x
- (二十四) Wang, H., Tang, W., Zhang, R., & Ding, S. (2019). Analysis of enzyme activity, antibacterial activity, antiparasitic activity and physico-chemical stability of skin mucus derived from *Amphiprion clarkii*. *Fish & shellfish immunology*, 86, 653-661.
- (二十五) Wilden, B., Majdi, N., Kuhlicke, U., Neu, T. R., & Traunspurger, W. (2019). Flatworm mucus as the base of a food web. *BMC Ecology*, 19 (1). doi:10.1186/s12898-019-0231-2
- (二十六) Wu, J., Xu, G., Jin, Y., Sun, C., Zhou, L., Lin, G., . . . Liu, K. (2018). Isolation and characterization of *Bacillus* sp. GFP-2, a novel *Bacillus* strain with antimicrobial activities, from Whitespotted bamboo shark intestine. *AMB Express*, 8 (1). doi:10.1186/s13568-018-0614-3

三、網站

- (一) 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。2021 年 1 月 28 日取自 <https://scitechvista.nat.gov.tw/c/L83x.htm>
- (二) 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。2021 年 1 月 28 日取自 <https://scitechvista.nat.gov.tw/c/sZ1f.htm>
- (三) Chen, C., Hwang, J., & Yang, J. (n.d.). (PS)2v2: Protein Structure Prediction Server. Retrieved January 27, 2021, Retrieved from <http://ps2.life.nctu.edu.tw/>
- (四) SignalP-5.0 Server. (n.d.). Retrieved January 27, 2021, Retrieved from <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/?fbclid=IwAR1NxXwdybPRqTZvTVzBdaEFBqH4kI19TBuxLp66pTFGZ59cqoJRnveoHUs>
- (五) TMHMM Server v. 2.0. (n.d.). Retrieved January 27, 2021, Retrieved from <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/?fbclid=IwAR3ge21IHSnX6nvl9B2oRQHSs7qYj0oU3eiyNArzw1XO38yWOhkS3eqBcAQ>
- (六) Useful Links. (n.d.). Retrieved January 27, 2021, from <https://cuttingclass.stowers.org/en/node/121397>

【評語】 050011

1. 此作品同時探討黏液黏性及其抗菌成份，所結合的兩大部分尚有深入探討的空間。建議可取黏性研究部分作為探討的主題，加強黏性蛋白的研究。例如，分析黏性蛋白組成。
2. 對於與黏性相關的共生菌部分的研究與論述仍然屬於未成熟階段，建議可以更深入探討。