

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : 四環黴素(Tetracycline)多株抗體之製備及酵素免疫 *
* 名稱 : 分析法與奈米金粒子免疫層析試紙之開發 *
* ***** *

執行計畫學生： 于耀安
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-022-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 余豐益

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 105年03月31日

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : **四環黴素 (Tetracycline) 株抗體製備及** *
* 名稱 **酵素疫分析法與奈米金粒子免疫層析試紙開發** *

執行計畫學生：于耀安

學生計畫編號：104-2815-C-040-022-B

研究期間：104年7月1日至105年2月底止，計8個月

指導教授：余豐益

處理方式(請勾選)： 立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可
公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中華民國 105 年 3 月 31 日

摘要 (Abstract)

四環素 (Tetracycline, 簡稱 TC) 屬於四環素類抗生素的一種, 為廣效型抗生素, 目前被廣泛用於農業、畜牧業和水產養殖業。由於 Tetracycline 是分子量為 444.43 Dalton 的小分子化合物, 若直接將 TC 免疫小鼠及兔子並不足以引發免疫反應, 因此 TC 需要與載體蛋白結合成具有免疫原性的抗原, 才可用於注射小鼠及兔子以製備 TC 的多株抗體。

由於 TC 的結構中具有 NH_2 、 OH 與 CH_3 基團三種基團, 因此本研究依照下述方法進行小分子化合物分子量放大的動作, 利用 Formaldehyde 法修飾 TC 上的 CH_3 基團和 EDC/NHS 法活化 TC 上的 NH_2 基團與載體蛋白進行接合, 並分別將利用上述兩種方法接合之抗原打入兩對小鼠體內; 之後以 CDI 法修飾 TC 上的 OH 基團並接合載體蛋白, 用以作為打入兔子體內之抗原以產生對 TC 具專一性的抗體。藉由 competitive indirect ELISA (ciELISA) 來觀察抗體的專一性, 從結果得知, 小鼠與兔子抗體的專一性並不明顯且效價也不會隨著週次上升。

因此, 本研究改變 Tetracycline 與載體蛋白的接合比例、嘗試以 CMO 衍生法修飾 Tetracycline 的雙鍵氧並與載體蛋白接合、也更換載體蛋白種類免疫新老鼠。兔子所使用的抗原則改用以 EDC/NHS 法活化並同時改變與載體蛋白的接合比例, 於兔子週齡 11 週時進行免疫, 22 週後改以 Formaldehyde 法修飾所接合的抗原免疫。藉由 ciELISA 結果得知在更改施打抗原的接合比例後, 以 Formaldehyde 法接合抗原所免疫的小鼠於第三十九週的抗體 IC_{50} 為 10 ng/ml 左右, 可著手於單株抗體的製備。而其他週齡達 38 週的老鼠和另外兩對新免疫的老鼠則沒有專一性抗體的產生。兔子於更換 2 次抗原後仍沒有抗體產生。因此未來本研究的方向為持續觀察老鼠與兔子所產生的抗體對於 Tetracycline 的專一性, 並且嘗試更換與載體蛋白接合的方法與比例, 期望能製備出具有良好專一性之多株抗體。

目錄 (Index)

摘要

一，緒論

| | |
|--|----|
| 1.1 研究起源..... | 5 |
| 1.2 四環黴素 (Tetracycline) 基本性質..... | 6 |
| 1.3 四環黴素 (Tetracycline) 相關研究..... | 6 |
| 1.4 酵素連結免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)..... | 7 |
| 1.5 快速免疫層析試紙..... | 8 |
| 1.6 研究動機及研究問題..... | 10 |

二，材料與方法

| | |
|---|----|
| 2.1 實驗藥品及動物..... | 11 |
| 2.2 實驗儀器..... | 12 |
| 2.3 實驗方法..... | 13 |
| 2.3.1 製備不同四環黴素 (TC) 之衍生物 | |
| 2.3.2 利用 TLC 確認衍生物的產生 | |
| 2.3.3 製備不同四環黴素 (TC) 之免疫抗原 | |
| 2.3.4 將四環黴素 (TC) 與 OVA (Ovalbumin, 卵白蛋白) 接合作為覆被抗原 | |
| 2.3.5 將四環黴素 (TC) 與 HRP (Horseradish peroxidase ，辣根過氧化氫酵素) 接合 | |
| 2.3.6 免疫小鼠及兔子 | |
| 2.3.7 多株抗體的純化 | |
| 2.3.8 利用 competitive ELISA 確認抗體效價及專一性 | |
| 2.3.9 製備奈米金粒子探針 | |
| 2.3.10 免疫試紙的製備 | |

三，實驗結果

| | | |
|------------|--|----|
| 3.1 | 利用 TLC 確認衍生物的產生..... | 25 |
| 3.2 | 利用 competitive ELISA 確定抗體效價及專一性..... | 26 |
| 3.2.1 | Tetracycline-EDC/NHS-BTG 作為抗原免疫小鼠 | |
| 3.2.2 | Tetracycline-formaldehyde-BTG 作為抗原免疫小鼠 | |
| 3.2.3 | Tetracycline-CMO-BTG 作為抗原免疫小鼠 | |
| 3.2.4 | Tetracycline-formaldehyde-PTG 作為抗原免疫小鼠 | |
| 3.2.5 | Tetracycline-CDI- γ -globulin ; Tetracycline-EDC/NHS- γ -globulin ; Tetracycline-formaldehyde- γ -globulin作為抗原免疫紐西蘭大白兔 | |
| 3.2.6 | 利用不同覆被抗原檢測抗體專一性 | |
| 3.2.7 | 利用不同 HRP 檢測抗體專一性 | |
| 四 | ，討論 | 38 |
| 五 | ，參考文獻 | 39 |

一，緒論 (Introduction)

1.1 研究起源

TC 是世界常用的抗生素之一，常被添加於飼料中餵與雞、豬等禽畜類。農業部分則是以鏈四環黴素 (鏈黴素、四環素混合物 **Streptomycin + tetracycline hydrochloride**) 作為農藥達到抗菌及增進作物生長能力等目的，水產業更是於水中直接添加四環素以防止魚類受到黴菌感染。當誤食過量 TC 殘留的食品時，將會對人體腸胃道造成刺激，例如噁心、嘔吐等症狀。TC 屬於 D 級懷孕用藥，易透過胎盤進入胎兒體內造成危險，因此孕婦、哺乳婦女和 8 歲以下兒童禁止使用。也有研究顯示 TC 會影響胎兒牙齒的發育，造成琺瑯質生長不良，骨骼發育亦受阻礙。且四環素會加強皮膚對紫外光的敏感度，增加皮膚在陽光照射下受傷的機率。除此之外其肝毒性會使肝功能受損，嚴重者導致肝臟壞死。

1976 年，歐盟禁止在飼料中使用 TC。2014 年 12 月俄羅斯聯邦動物防檢疫署 (VPSS) 表示目前還在對美國家禽產品以及違禁物質 (包含 TC) 進行檢測，因此俄羅斯目前禁止進口美國禽肉及家禽產品。然而在我國，這些抗生素仍然被廣泛使用，尤其在禽畜養殖業中更為普遍。前些年我國禽畜產品已開始進入國際市場，但由於藥品殘留量超標而遭他國退貨、銷毀，甚至中斷貿易往來，即使政府目前已大力宣導減少 TC 的使用且明確規範 TC 使用量和禽畜類的停藥期，國內仍有不少肉類 TC 殘留量超標的事件。2006 年衛生署曾針對市售禽畜產品動物用藥殘留進行抽檢，檢出部分烏骨雞殘留過量四環素。2011 年新北市府衛生局查出 6 家中央與學校自辦廚房的雞肉與豬肉也檢出含有過量瘦肉精和四環素類用藥。2014 年 2 月衛福部和農委會展開雞蛋稽查，54 件有 2 件驗出動物用藥 TC 殘留超標，其中一件來自超商蛋品供應商。當週該供應商約出貨一百二十箱、二萬四千顆 TC 殘留雞蛋。這些抽查結果顯示檢測肉類和奶蛋類中的 TC 殘留量已刻不容緩。

1.2 四環黴素 (Tetracycline) 基本性質

四環黴素 (Tetracycline)

(4S,6S,12aS)-4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxonaphthacene-2-carboxamide) 分子量為 444.435

Dalton，最早被用於治療霍亂 (Hossain *et al.*, 2002)。Dr. Benjamin Duggar 於 1948 年從金黴素鏈黴菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 中發現了第一個四環素類抗生素金黴素 (Chlortetracycline)，接著其他四環素類抗生素被陸續發現 (Lauren *et al.*, 2010)。TC 被廣泛使用於畜牧業以防止禽畜類受疾病影響而發育不良，然而藥物濫用卻導致越來越多病菌產生抗藥性，增加了治療感染性疾病的困難度。甚至在未來，人類將無法以現今所知的抗生素來治療感染性疾病 (Ian *et al.*, 2001)。因此我國政府於 2014 年公布之最新動物用藥殘留標準中，禽畜和魚類肌肉中殘留之 TC 不得超過 0.2 ppm，蛋類不得超過 0.4 ppm，乳品不得超過 0.1 ppm。

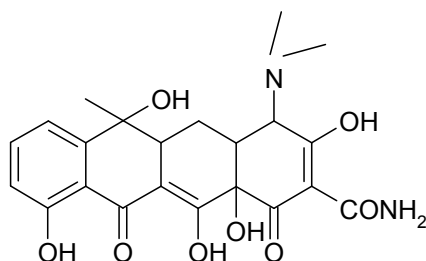


Figure.1 四環黴素 (Tetracycline) 結構式

1.3 四環黴素 (Tetracycline) 相關研究

目前最常用來檢測 TC 的技術是利用高效液相層析色譜法 (HPLC) (Ava *et al.*, 1991) 及液相層析串聯質譜法 (LC-MS-MS) (Venkatesh *et al.*, 2012)，上述兩種方法雖有很好的準確性，但這兩種方法不僅耗時又花費昂貴，再加上檢測前樣品的準備較為繁複，不利大眾操作。相較之下酵素聯結免疫吸附分析法 (ELISA) 操作簡易且相對成本較低、同時兼具高靈敏度，儼然漸漸成為檢測方式中重要的一員 (Burkin *et al.*, 2009)。

1.4 酵素連結免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

酵素連結免疫分析法的原理是利用抗原及抗體之間具有專一性的鍵結之特性，來對樣品進行檢測。透過酵素與受質的呈色作用，產生能夠被肉眼區分或藉由酵素免疫分析儀器定量之呈色物質，並可以藉由顏色的深淺來對抗原進行定量的分析，因此可以達到檢測樣品中特定抗原的有無，而酵素連結免疫分析法以操作方法的的不同可區分為三種：直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA)，非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay, ciELISA)，三明治型酵素連結免疫吸附分析法 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)，本研究使用直接競爭型和非直接競爭型酵素連結免疫分析法來做為檢測的方法，以下對此兩種方法的原理進行簡單描述。

直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay) (Figure.2)

將抗體利用吸附法或是共價接合法連接到固相基質上，加入蛋白填補基質上抗原之間的空隙後，再加入樣品或抗原標準品、具酵素標定的抗原，最後加入酵素受質即可呈色，呈色結果顏色越淺代表樣品或抗原標準品中的抗原濃度越高。

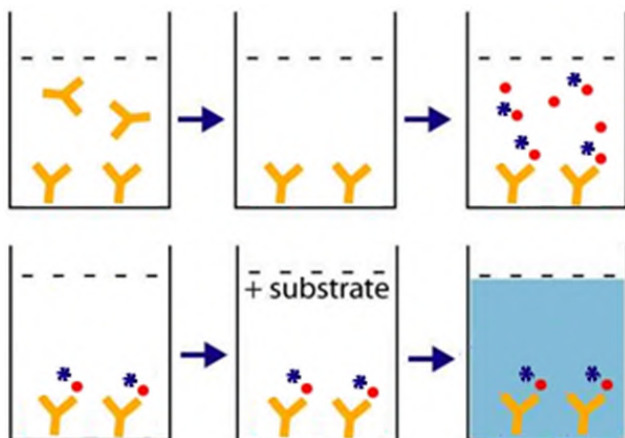


Figure.2 直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法

非直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay) (Figure.3)

此方法是將接合載體蛋白的抗原吸附在固相基質上，再加入蛋白填補吸附在基質上的蛋白之間的空隙，填補完以後加入抗體，樣品或抗原標準品，而抗原標準品及樣品中的抗原會與固相基質上的抗原競爭抗體結合位，接下來加入被酵素標記的二級抗體，二級抗體能夠辨識並結合抗體的 FC 區，最後加入酵素呈色物質即可呈色，呈色時顏色越淺代表抗原的濃度越高。

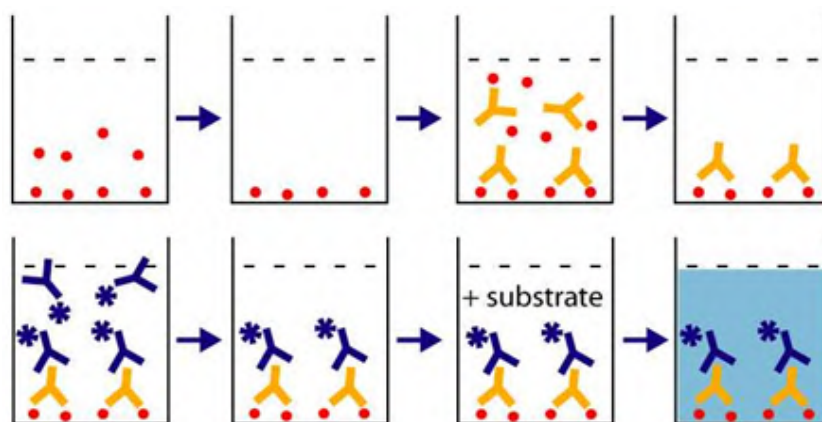


Figure.3 非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法

1.5 快速免疫層析試紙

快速免疫層析試紙 (Figure.4) 是一種以膜為基質的免疫分析法 (membrane-based immunoassay)。這類分析法極為快速簡便且能以目視的方式判讀結果，其主要分析原理為將硝化纖維膜 (Nitrocellulose membrane, NC membrane) 作為基質，並把抗原及作為控制組的二級抗體分別吸附在測試區及控制區基質上，接著將奈米金粒子作為標記物連結抗體做成探針，最後將奈米金粒子探針與樣品同時通過基質進行層析，當樣品中含有抗原時，奈米金粒子會和樣品中的抗原結合，因此會在基質的控制組區產生顏色，當樣品中不含抗原時，奈米金粒子探針則會在基質上的抗原區及控制組區產生顏色，因此快速免疫層析試紙適合一般人使用且可用於大量篩檢樣品。

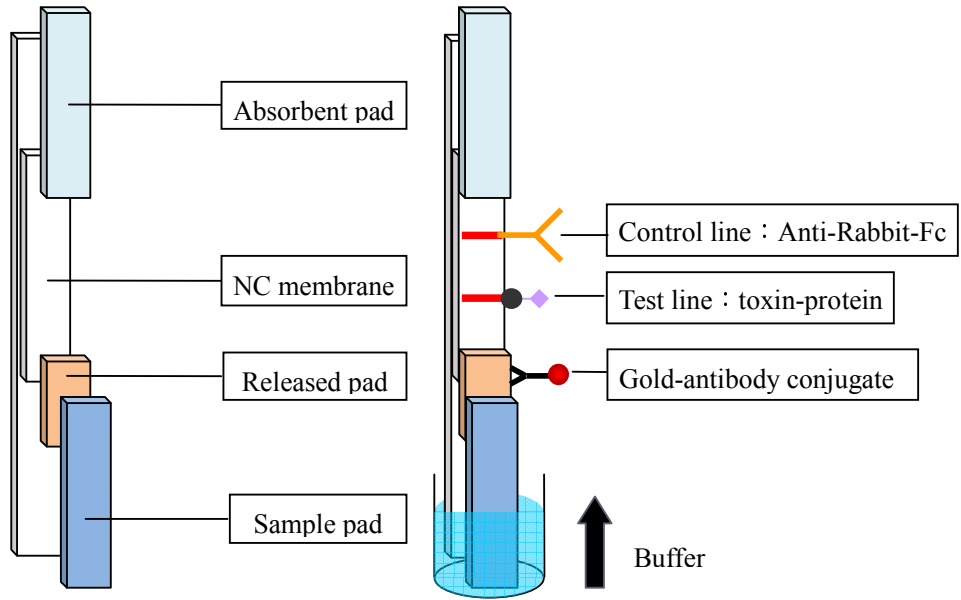


Figure. 4A 免疫層析試紙組成份

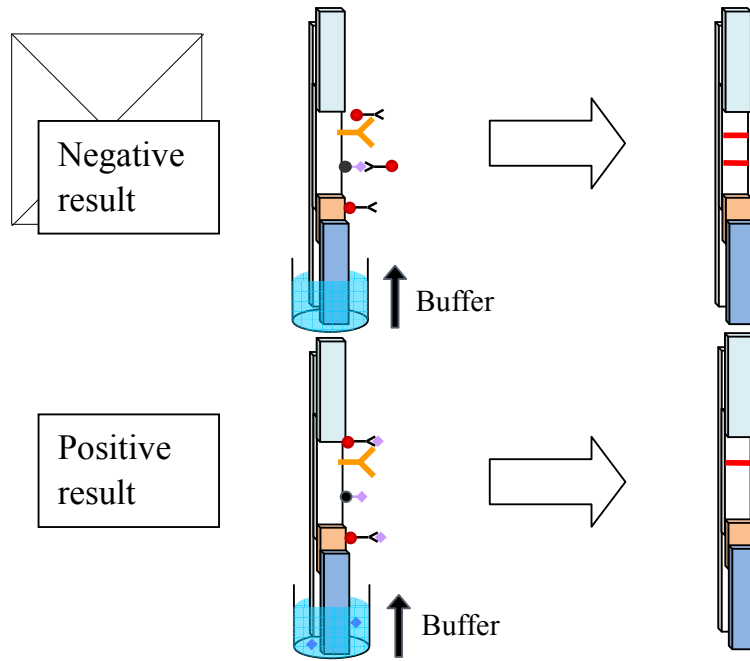


Figure. 4B 分析結果

1.6 研究動機及研究問題

目前檢測 TC 的方法主要有高效液相層析色譜分析法 (HPLC)、以及液相層析串聯質譜法 (LC-MS-MS)，這兩種方法雖然檢測結果具有一定的準確性，但操作步驟較為冗長，且需要極高的技術操作及檢測費用。相比之下，酵素聯結免疫吸附分析法 (ELISA) 操作較為快速、簡便，所以製備出高敏感度、高專一性的 TC 抗體以開發酵素聯結免疫吸附法 (ELISA)，再以此 TC 抗體開發操作簡便快速的免疫層析試紙。此試紙對於檢測市面上農業、畜牧業和水產產品的 TC 殘留量是迫切需要的。

我們將此研究計畫分為三個子目標：

【子目標一】：製備專一性 TC 的多株抗體。

- 製備免疫抗原
- 將免疫抗原打入兔子產生免疫反應 (Immunization)
- 多株抗體的純化

【子目標二】：建立酵素連接免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA) 方式檢測樣品中 TC 的含量。

- 建立直接競爭型 ELISA
- 建立非直接競爭型 ELISA

【子目標三】：開發 TC 快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip)。

- 製備奈米金粒子探針
- 製備免疫試紙
- 以 ELISA 及免疫層析試紙分析樣品中 TC 之含量

二，材料與方法

2.1 實驗藥品及動物

下列藥品購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)

Ovalbumin (OVA) Freund's complete adjuvant

γ -globulin Sodium acetate

Bovine serum albumin (BSA) Succinic anhydride

Tetracycline Carbonyldiimidazole (CDI)

Thyroglobulin from porcine thyroid gland (PTG)

Thyroglobulin from bovine thyroid (BTG)

N-Hydroxysuccinimide (NHS)

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydro-chloride (EDC)

Carboxymethoxylamine hemihydrochloride (CMO)

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

Polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)

TLC Silica gel 60 F254

下列藥品購自 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.)

Aqueous hydrochloric acid (HCl)

Methanol

下列藥品購自 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)

2' Ab (Goat anti-rabbit IgG-HRP)

Horseradish peroxidase (HRP)

Microtiter plates 購於 Nunc (Roskild, Demark)

3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, K-Blue) 購自 Neogen Corp. (Lexington, KY)

BALB/c 小鼠購於國家動物中心

紐西蘭大白兔購於大宗畜牧場

2.2 實驗儀器

| | |
|-------------------|--------------------------|
| Centrifuge | HERMLE Z323K |
| Vortex | GENIE Vortex-2 |
| Auto strip washer | Bio TEK INSTRUMENT ELx50 |
| Microplate reader | Molecular Device E max |
| Incubator | LAB-LINE |
| Refrigerator | SHOCKLOCK |
| Hot plate | Fargo HMS-102 |

2.3 實驗方法

2.3.1 製備不同四環黴素 (TC) 之衍生物

由於 Tetracycline 為小分子化合物，分子量為 444.435 Dalton，只具有抗原性而沒有免疫原性，故必須以載體蛋白接合放大其分子量。除了利用 formaldehyde 與 EDC/NHS 活化法將 TC 與載體蛋白接合，還可使用 CMO、CDI 與 Succinic anhydride 衍生效使 TC 產生能夠與載體蛋白接合之官能基。

2.3.1-1 以 CMO 衍生 TC

先以 pyridine : methanol : d₂H₂O = 1 : 4 : 1 配置 reflux solution 備用。取 10 mg 的 TC 溶於 5 mL reflux solution，再取 20 mg 的 CMO 溶於 6 mL reflux solution。將 TC 與 CMO 混合均勻後用回流裝置加熱至 60°C 反應 16 小時後放置室溫反應 10 小時。上述步驟完成後，利用減壓濃縮將溶劑抽乾，並加入 5 mL methanol 回溶，以 TLC 確認衍生是否成功。測完後使用減壓濃縮將溶劑抽乾後以 1 mL DMSO 回溶備用。

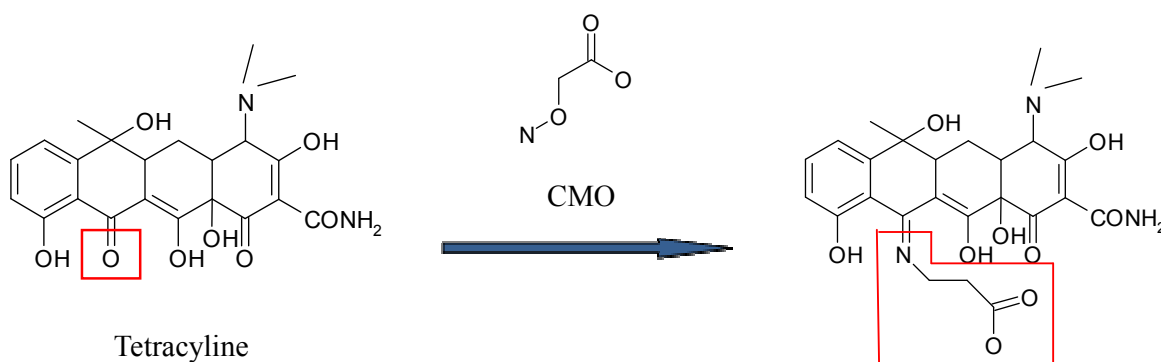


Figure. 5 CMO 衍生示意圖

2.3.1-2 以 CDI 衍生 TC

秤取 1 mg TC 溶於 100 μl 的 acetone，再秤取 2 mg CDI 溶於 200 μl 的 acetone。將 CDI 加入 TC，於氮氣環境下反應 3 小時。

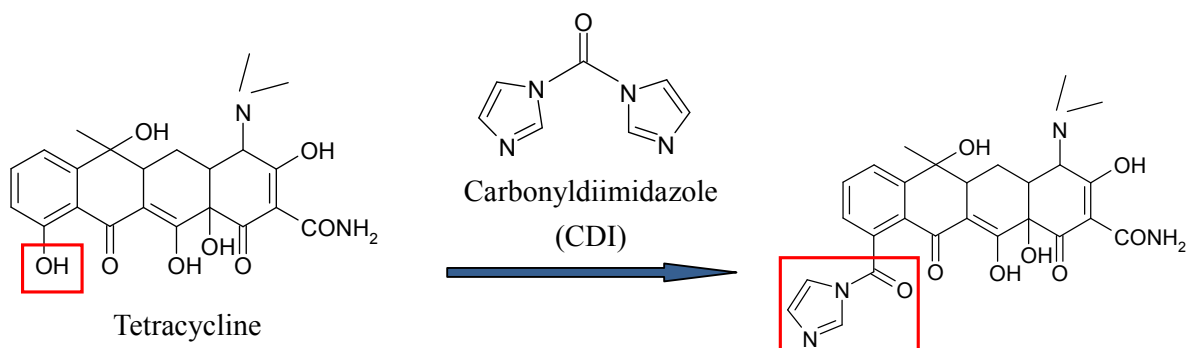


Figure. 6 CDI 衍生示意圖

2.3.1-3 以 Succinic anhydride 衍生 TC

秤取 5 mg TC 溶於 200 μl pyridine，再秤取 2.5 mg succinic anhydride 溶於 600 μl pyridine。將 TC 加入 succinic anhydride 後置於室溫、氮氣環境下反應 60 小時，再以減壓濃縮法去除 pyridine。待 pyridine 抽乾後以 1000 μl methanol 回溶並且以 TLC 片確認衍生結果。

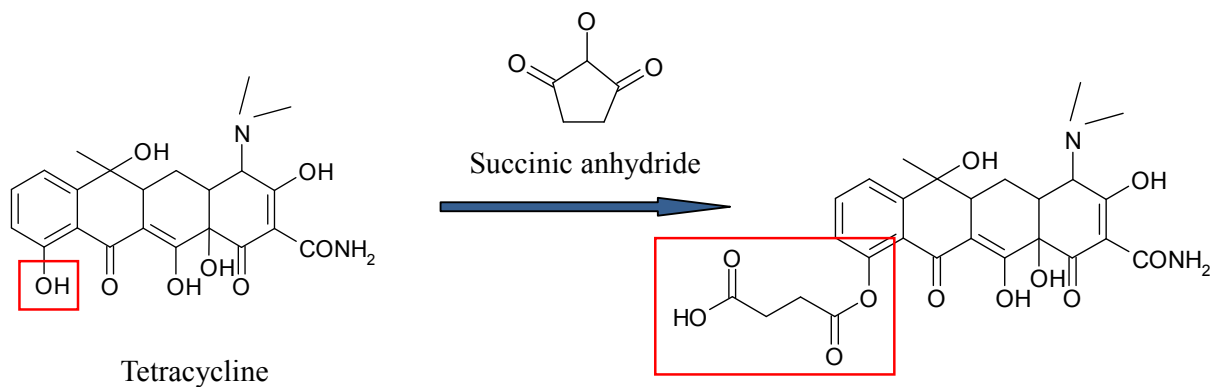


Figure. 7 Succinic anhydride 衍生示意圖

2.3.2 利用 TLC 確認衍生物的產生

取 1 μ l 的 TC 標準品和 1 μ l 已製備出的 TC 衍生物，點在 TLC Silica gel 60 F254 上，以展開液 (chloroform : ethyl acetate = 9 : 1) 展開，將展開完成之 TLC 於波長 254 nm 下觀察其結果。

2.3.3 製備不同四環黴素 (TC) 之免疫抗原

2.3.3-1 使用 EDC/NHS 法將 TC 與載體蛋白 BTG 接合

秤取 5 mg TC 溶於 600 μ l DMSO 中，再秤取 5.2 mg EDC 及 3.9 mg NHS 分別溶於 100 μ l DMSO 中。將 EDC、NHS 依序緩慢加入到 TC，於室溫攪拌 2 小時。秤取 10 mg BTG 溶於 1400 μ l 0.1M carbonate buffer (224 μ l sodium carbonate + 476 μ l sodium bicarbonate + 700 μ l ddH₂O)。將反應完成的 TC 緩慢加入溶於 0.1M carbonate buffer 之 BTG，於室溫攪拌反應 2 小時後置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.3-2 使用 EDC/NHS 法將 TC 與載體蛋白 γ -globulin 接合

秤取 1 mg TC 溶於 100 μ l DMSO 中，再秤取 1.2 mg EDC 及 0.9 mg NHS 分別溶於 30 μ l DMSO 中。將 EDC、NHS 依序緩慢加入到 TC，於室溫攪拌 2 小時。秤取 6 mg γ -globulin 溶於 600 μ l 0.1M carbonate buffer (96 μ l sodium carbonate + 204 μ l sodium bicarbonate + 300 μ l ddH₂O)。將反應完成的 TC 緩慢加入溶於 0.1M carbonate buffer 之 γ -globulin，於室溫攪拌反應 2 小時後置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

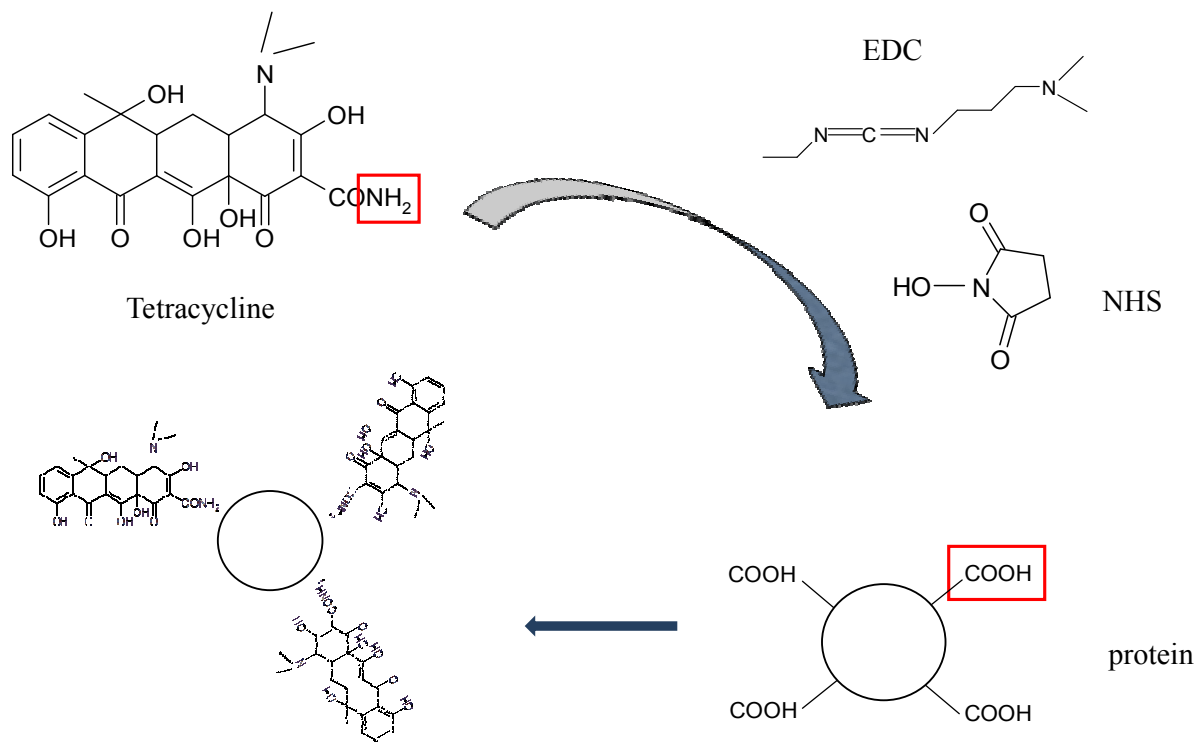


Figure. 8 EDC/NHS 活化法示意图

2.3.3-3 使用 Formaldehyde 法將 TC 與載體蛋白 BTG 接合

秤取 6 mg BTG 溶於 1200 μ l 0.1M sodium acetate，再秤取 3 mg TC 溶於 600 μ l 0.1M sodium acetate。將 TC 緩慢加入 BTG，再加入 100 μ l 37% formaldehyde 置於室溫攪拌反應 3 天。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

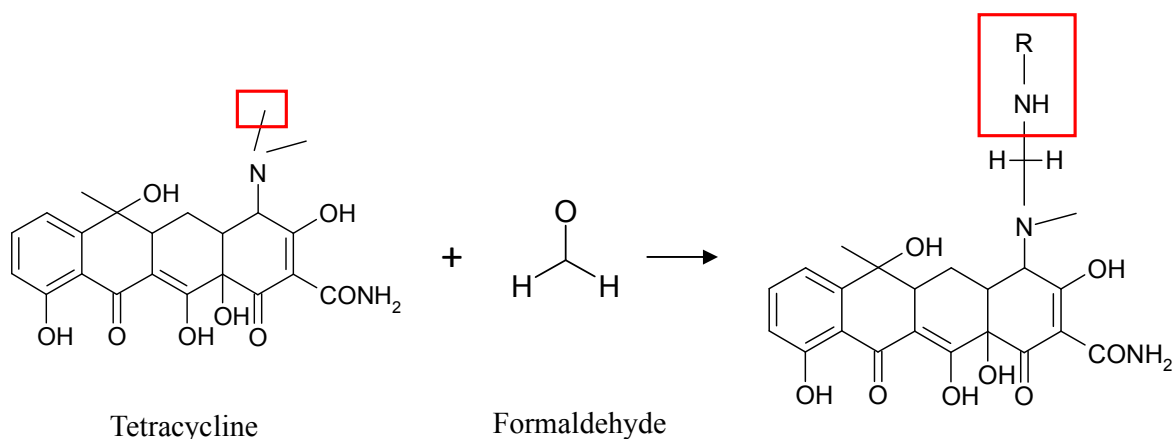


Figure. 9 Formaldehyde 活化法示意圖

2.3.3-4 使用 Formaldehyde 法將 TC 與載體蛋白 PTG 接合

秤取 4 mg PTG 溶於 600 μ l 0.1M sodium acetate，再秤取 0.5 mg TC 溶於 200 μ l 0.1M sodium acetate。將 TC 緩慢加入 PTG，再加入 100 μ l 37% formaldehyde 置於室溫攪拌反應 3 天。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.3-5 使用 Formaldehyde 法將 TC 與載體蛋白 γ -globulin 接合

秤取 5 mg γ -globulin 溶於 650 μ l 0.1M sodium acetate，再秤取 0.5 mg TC 溶於 200 μ l 0.1M sodium acetate。將 TC 緩慢加入 PTG，再加入 40 μ l 37% formaldehyde 置於室溫攪拌反應 3 天。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.3-6 使用 CMO 法將 TC 與載體蛋白 BTG 接合

秤取 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 60 μ l DMSO。依序將 EDC、NHS 加入含有 1 mg TC-CMO 之 100 μ l DMSO，置於室溫攪拌反應 4 小時後移至 4°C 環境攪拌反應至少 12 小時。秤取 8 mg BTG 溶於 1200 μ l 0.1M carbonate buffer，將反應完成之 TC-CMO 緩慢加入 BTG，於室溫攪拌反應 2 小時後於 4°C 下反應一個晚上，再以 1 L 的 0.01 M PBS 透析 72 小時。

2.3.3-7 使用 CDI 法將 TC 與載體蛋白 γ -globulin 接合

秤取 2 mg 的 γ -globulin 溶於 200 μ l 0.1M carbonate buffer。再將 2.3.1-2 敘述之 TC-CDI 衍生物緩慢加入 γ -globulin，放置室溫、氮氣環境下攪拌反應 48 小時後以 1L 的 0.01M PBS 透析三次。

2.3.4 將四環黴素 (TC) 與 OVA (Ovalbumin, 卵白蛋白) 接合作為覆被抗原

2.3.4-1 使用 EDC/NHS 法將 TC 與 OVA 接合

秤取 1 mg TC 溶於 200 μ l DMSO 中，再秤取 1.2 mg EDC 及 0.5 mg NHS 分別溶於 50 μ l DMSO 中。將 EDC、NHS 依序緩慢加入到 TC，於室溫攪拌 2 小時。秤取 8 mg OVA 溶於 800 μ l 0.1M carbonate buffer (128 μ l sodium carbonate + 272 μ l sodium bicarbonate + 400 μ l ddH₂O)。將反應完成的 TC 緩慢加入溶於 0.1M carbonate buffer 之 OVA，於室溫攪拌反應 2 小時後置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.4-2 使用 Formaldehyde 法將 TC 與 OVA 接合

秤取 8 mg OVA 溶於 1200 μ l 0.1M sodium acetate，再秤取 1 mg TC 溶於 300 μ l 0.1M sodium acetate。將 TC 緩慢加入 OVA，再加入 200 μ l 37% formaldehyde 置於室溫攪拌反應 3 天。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.4-3 使用 Succinic anhydride 法將 TC 與 OVA 接合

將 2.3.1-3 敘述產生的 TC-succinate 衍生物抽乾 methanol 後，以 125 μ l DMSO 加 125 μ l 1,4-dioxane 回溶。取 4 mg EDC 溶於 20 μ l DMSO 與 20 μ l 1,4-dioxane，再取 3 mg NHS 溶於 15 μ l DMSO 與 15 μ l 1,4-dioxane，依序加入 50 μ l 的 TC-succinate 且放置室溫攪拌反應 2 小時。取 8 mg OVA 溶於 800 μ l 0.1M carbonate buffer，並將活化完成的 TC-succinate 緩慢加入，放置室溫攪拌反應兩小時後移置 4°C 反應一個晚上，再於 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.4-4 使用 CMO 法將 TC 與 OVA 接合

秤取 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 60 μ l DMSO。依序將 EDC、NHS 加入含有 1 mg TC-CMO 之 100 μ l DMSO，置於室溫攪拌反應 4 小時後移至 4°C 環境攪拌反應至少 12 小時。秤取 8 mg OVA 溶於 1200 μ l 0.1M carbonate buffer，將反應完成之 TC-CMO 緩慢加入 OVA，於室溫攪拌反應 2 小時後於 4°C 下反應一個晚上，再以 1 L 的 0.01 M PBS 透析 72 小時。

2.3.5 將四環黴素 (TC) 與 HRP (Horseradish peroxidase，辣根過氧化氫酵素) 接合

2.3.5-1 使用 EDC/NHS 法將 TC 與 HRP 接合

秤取 0.5 mg TC 溶於 100 μ l DMSO 中，再秤取 10.6 mg EDC 溶於 20 μ l DMSO 和 0.4 mg NHS 溶於 40 μ l DMSO 中。將 EDC、NHS 依序緩慢加入到 TC，於室溫攪拌 2 小時。秤取 8 mg HRP 溶於 800 μ l 0.1M carbonate buffer (128 μ l sodium carbonate + 272 μ l sodium bicarbonate + 400 μ l ddH₂O)。將反應完成的 TC 緩慢加入溶於 0.1M carbonate buffer 之 HRP，於室溫攪拌反應 2 小時後置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.5-2 使用 Formaldehyde 法將 TC 與 HRP 接合

秤取 4 mg HRP 溶於 1000 μ l 0.1M sodium acetate，再秤取 0.5 mg TC 溶於 150 μ l 0.1M sodium acetate。將 TC 緩慢加入 HRP，再加入 100 μ l 37% formaldehyde 置於室溫攪拌反應 3 天。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.5-3 使用 Succinic anhydride 法將 TC 與 HRP 接合

將 2.3.1-3 敘述產生的 TC-succinate 衍生物抽乾 methanol 後，以 125 μ l DMSO 加 125 μ l 1,4-dioxane 回溶。取 4 mg EDC 溶於 20 μ l DMSO 與 20 μ l 1,4-dioxane，再取 3 mg NHS 溶於 15 μ l DMSO 與 15 μ l 1,4-dioxane，依序加入 50 μ l 的 TC-succinate 且放置室溫攪拌反應 2 小時。取 8 mg HRP 溶於 800 μ l 0.1M carbonate buffer，並將活化完成的 TC-succinate 緩慢加入，放置室溫攪拌反應兩小時後移置 4°C 反應一個晚上，再於 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.5-4 使用 CMO 法將 TC 與 HRP 接合

秤取 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 60 μ l DMSO。依序將 EDC、NHS 加入含有 1 mg TC-CMO 之 100 μ l DMSO，置於室溫攪拌反應 4 小時後移至 4°C 環境攪拌反應至少 12 小時。秤取 8 mg HRP 溶於 1000 μ l 0.1M carbonate buffer，將反應完成之 TC-CMO 緩慢加入 HRP，於室溫攪拌反應 2 小時後於 4°C 下反應一個晚上，再以 1 L 的 0.01 M PBS 透析 72 小時。

2.3.6 免疫小鼠及兔子

2.3.6-1 免疫小鼠

為了使 Balb/c 小鼠產生對 Tetracycline 具有專一性的抗體，本研究將 Tetracycline-BTG (0.25 mg 的 BTG) 溶於 480 μ l 0.01 M PBS，加入等體積的費氏完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant) 混合均勻，再以腹腔注射方式將混合物打入小鼠體內。二週後進行加強免疫動作，取 Tetracycline-BTG (0.25 mg 溶於

480 μ l 0.01 M PBS)，注射入小鼠腹部，於第三週之後開始對小鼠進行尾靜脈採血，並使用 ELISA 進行檢測是否產生 Tetracycline 的專一性抗體。

2.3.5-2 免疫兔子

為了使紐西蘭大白兔產生對 Tetracycline 的專一性抗體，將 Tetracycline - γ -globullin (0.5 mg 的 γ -globullin 溶於 850 μ l 0.01 M PBS)，並加入等體積的完全佐劑 (complete Freund's adjuvant) 混合均勻，將混合物以表皮注射的方式注入兔子體內。四週後再進行增強免疫的動作，取 Tetracycline - γ -globullin (0.5 mg 的 γ -globullin 溶於 850 μ l 0.01 M PBS)，並加入等體積的不完全佐劑 (incomplete Freund's adjuvant) 混合均勻，接著以皮下注射的方式注射在兔子的腿部，第五週後即可對兔子進行耳動脈採血，並使用 ciELISA 進行檢測血清中是否產生了 Tetracycline 的專一性抗體。

2.3.7 多株抗體的純化

2.3.7-1 小鼠多株抗體的純化

將採集到的小鼠血液 (約 100 μ l/次)，經由高速冷凍離心機直接離心 13,000 rpm 4°C 20 分鐘，離心完後取其上清液即為血清，並保存於 -20°C 冰箱。

2.3.7-2 兔子多株抗體的純化

採集的血液置於 4°C 冷藏隔夜。移除血液中凝結的血塊，離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C。離心完畢後取上清液 (血清)，加入與血清相同體積之 100% Ammonium Sulfate 沉澱血清內的蛋白質，混合均勻後靜置 30 分鐘，離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C。離心完畢去除上清液，加入一半體積的 ddH₂O 回溶沉澱物，再加入一半體積之 70% Ammonium Sulfate，靜置 30 分鐘後，離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C，重複此步驟直到沉澱物變為純白。將沉澱物以一半體積 ddH₂O 回溶並置入透析袋，在 2L 的 0.01M PBS 環境中透析。隔天透析完畢後取出，以 0.01M PBS 補回原體積，分裝並保存於 -20°C 冰箱備用，即為純化好的多株抗體。

2.3.8 利用 competitive ELISA 確定抗體效價及專一性

2.3.8-1 利用 indirect competitive ELISA 檢測抗體效價

在 96 孔盤中，每個微孔內加入 100 μ l Tetracycline -OVA(以 0.01M PBS 稀釋)，在 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時後，以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 沖去未反應之物質。再加入 200 μ l 的 blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01M PBS)，在 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 30 分鐘後，以 washing buffer 沖去未反應之物質。接著加入 50 μ l 0.01 M PBS 及 50 μ l 純化過的抗體，在 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時後，以 washing buffer 沖去未反應之物質。再加入 100 μ l Goat anti-mouse IgG-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時。再以 washing buffer 清洗 96 孔盤兩次。最後加入 100 μ l 的酵素受質 (TMB substrate) 於暗處反應 15~20 分鐘後，加入 100 μ l 1 N 的 HCl 終止反應，最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 吸光值。

2.3.8-2 利用 indirect competitive ELISA 檢測抗體專一性

在 96 孔盤中加入 100 μ l Tetracycline -OVA(以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時，以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應物質。再於 96 孔盤中加入 200 μ l blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01 M PBS)，置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 30 分鐘。以 washing buffer 洗去未反應物質後，加入 50 μ l 不同濃度的 Tetracycline 標準品 (0.01 ~ 1000 ng/ml) 及 50 μ l 純化過的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時。以 washing buffer 洗去未反應物質並加入 100 μ l Goat anti-rabbit IgG-HRP 或 Goat anti-mouse IgG-HRP(以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時。然後再以 washing buffer 清洗盤子兩次。最後加入 100 μ l TMB substrate，置於室溫避光反應 20 分鐘後，加入 100 μ l 1N HCl 終止反應。最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 吸光值。

2.3.8-3 利用 direct competitive ELISA 檢測抗體專一性

在 96 孔盤中加入 100 μ l 純化過的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋), 置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時, 以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應物質。再於 96 孔盤中加入 200 μ l blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01 M PBS), 置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 30 分鐘。以 washing buffer 洗去未反應物質後, 加入 50 μ l 不同濃度的 Tetracycline 標準品 (0.01 ~ 1000 ng/ml) 及 50 μ l TC-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋), 置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時。最後加入 100 μ l TMB substrate, 置於室溫避光反應 20 分鐘後, 加入 100 μ l 1N HCl 終止反應。最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 吸光值。

2.3.9 製備奈米金粒子探針

將 Tetracycline 之多株抗體置於 2 L Boric acid-Borax buffer (2 mM, pH 8.0) 中透析 24 小時。取 5 μ g 透析完畢的 Tetracycline 多株抗體, 並緩慢的加入 2 ml 奈米金粒子 (直徑大約 40 nm), 於室溫反應 1 小時。加入 0.35 ml 10 % (w/v) BSA (以 0.45 μ m 的過濾膜過濾) 將金粒子上未接合的位置填滿, 置於室溫混合 30 分鐘。然後離心 14,000 rpm 30 分鐘, 最後將奈米金粒子沉澱物回溶於 180 μ l Tris buffer (20 mM, pH 8.0, 含 1 % BSA 和 0.1 % sodium azide), 置於 4 $^{\circ}$ C 保存備用。

2.3.10 免疫試紙的製備

先將 Tetracycline 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5 μ l/strip), 37 $^{\circ}$ C 環境下烘乾。再將 0.25 μ l 的 Tetracycline-OVA 和 0.25 μ l 的 Anti-rabbit-Fc antibody (0.2 mg/ml) 分別點於 NC membrane (孔徑為 15 μ m, 黏附於塑膠片上, 5 mm \times 75 mm) 的 Test line 以及 Control line 的位置, 置於 37 $^{\circ}$ C 烘箱中烘乾 10 分鐘。接著組裝試紙, 其組裝方式為: 將 conjugate release pad 疊在 NC membrane 上 (大約重疊 2 mm)。並將 sample pad 再疊於 conjugate release pad 上 (大約重疊 6 mm)。最後將 absorbent pad (5 mm X 27 mm) 置於

strip 的另一端。在 96 孔盤中，加入 200 μ l 欲檢測樣品及不同濃度的 Tetracycline 標準品，再將組裝好的試紙垂直插入孔中，樣品或標準品會藉由 sample pad 的吸引而往 NC membrane 移動，經 10 分鐘後即可以目視觀察結果。

三，實驗結果

3.1 利用 TLC 確認衍生物的產生

當 Tetracycline 衍生完成後，本研究將 Tetracycline 的標準品及 Tetracycline 的衍生物分別點在 TLC 片上，以展開液 (chloroform : ethyl acetate = 1 : 9) 展開，並於 254 nm 波長下觀察結果 (Figure 10)。實驗結果 TLC 片顯示其展開後的點高度不同，代表 Tetracycline 的極性與結構產生改變，因此本研究利用衍生後的 Tetracycline 衍生物接合載體蛋白。

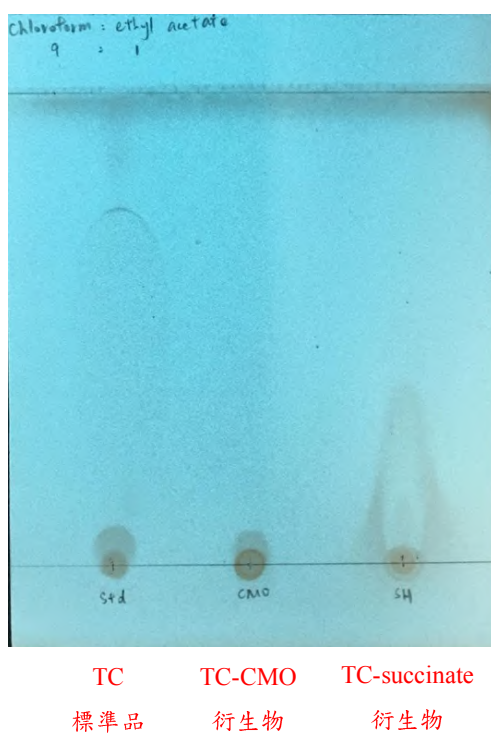


Figure. 10 以 TLC 觀察 TC-CMO 與 TC-succinate 是否有衍生成功

由左至右分別比較 Tetracycline 標準品、Tetracycline 接合 CMO 之衍生物與 Tetracycline 接合 Succinate 之衍生物。Tetracycline 於反應前呈鮮黃色，與 CMO 反應後變為橘黃色，與 Succinic anhydride 反應後變為紅棕色。由此 TLC 片可得知 Tetracycline 經過衍生後極性與結構均產生變化，因此推測 TC-CMO 與 TC-succinate 可能為接合成功之衍生物。

3.2 利用 Competitive ELISA 確定抗體效價及專一性

3.2.1 Tetracycline-EDC/NHS-BTG 作為抗原免疫小鼠

本研究利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價與專一性的測試。此對小鼠 (Mice1 與 Mice2) 於一開始以 TC 與 BTG 接合比例 1:2 的抗原進行免疫。但直到 24 週以 ciELISA 測試抗體專一性後仍無產生對 TC 有效的抗體 (Figure. 11)，因此本研究於 25 週以後改免疫 TC 與 BTG 接合比例 1:8 的抗原，並且持續檢測此對老鼠抗體的專一性。本研究發現，小鼠於更換免疫抗原比例後，於 38 週抗體對 TC 的專一性仍無改善 (Figure. 12)，因此推測 EDC/NHS 接合法並不能有效將 TC 與載體蛋白接合。本研究將 0-36 週的小鼠血清進行抗體的效價測試後，發現小鼠於 0-24 週雖無專一性抗體的產生，但抗體效價仍逐漸上升。小鼠於 25 週免疫新抗原後抗體效價逐漸下降，因此新接合的抗原並沒有前一種抗原來的好 (Figure. 12)。

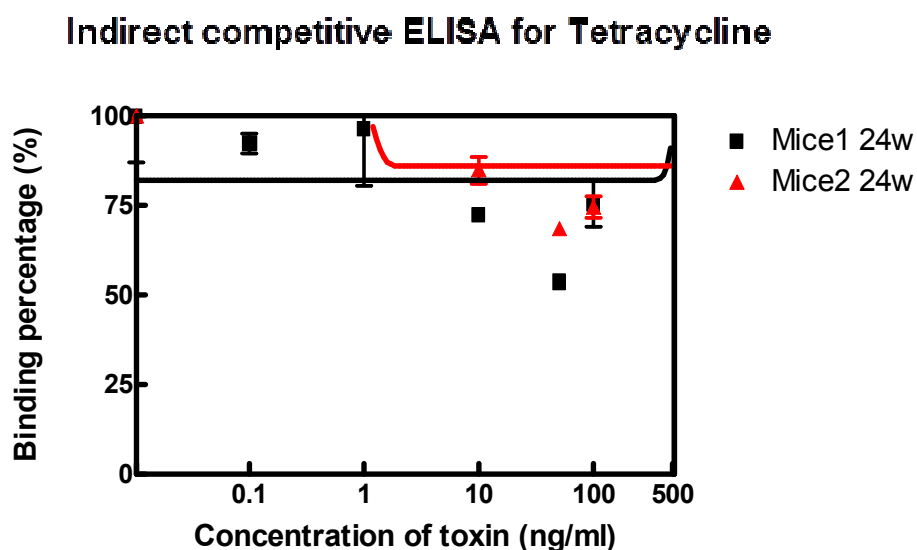


Figure. 11 小鼠第二十四週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 Tetracycline 進行專一性測試

由此圖可知小鼠一號與二號均未產生專一性抗體，因此推測免疫 TC-EDC/NHS-BTG (1:2) 抗原並不佳，故決定改變抗原接合比例。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline

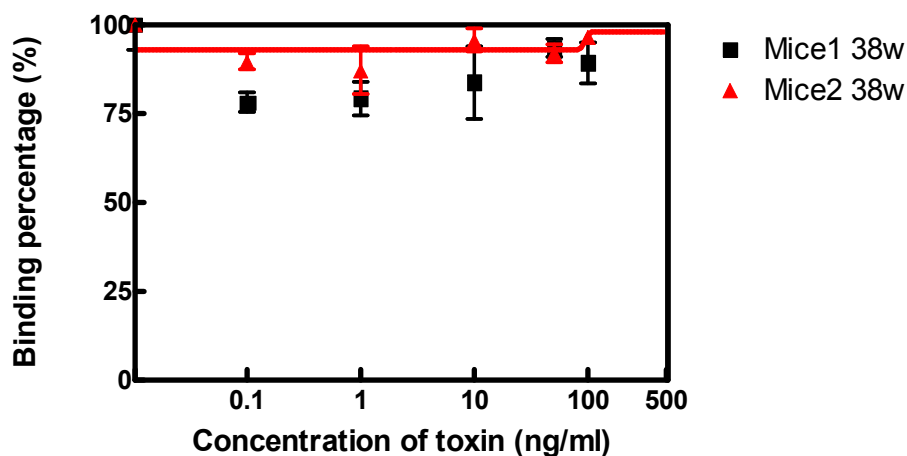


Figure. 12 小鼠第三十八週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 Tetracycline 進行專一性測試

小鼠於第二十五週更換免疫抗原後直至第三十八週仍無專一性抗體的產生。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline titer

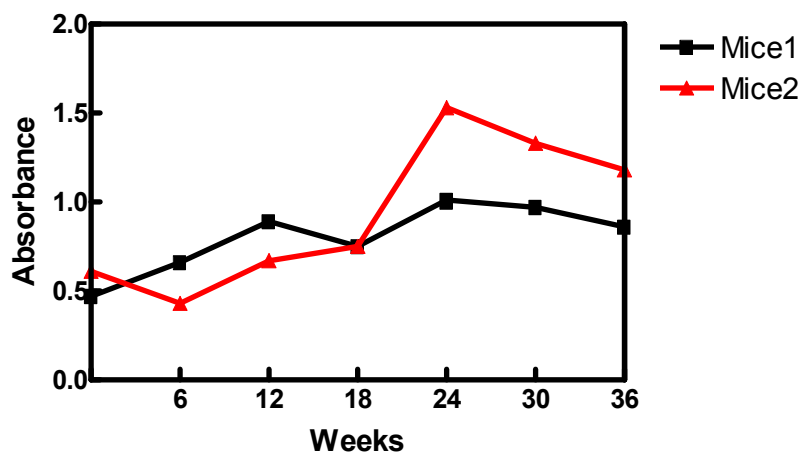


Figure. 13 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Tetracycline 進行抗體

效價測試

由此圖可得知小鼠零到二十四週抗體效價逐漸上升，二十五週以後免疫新抗原卻

使效價下降，因此第二次所接的新抗原並不如原本的抗原好。

3.2.2 Tetracycline-formaldehyde-BTG 作為抗原免疫小鼠

本研究利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價與專一性的測試。此對小鼠 (Mice 3 與 Mice 4) 一開始以 TC 與 BTG 接合比例 1:2 的抗原進行免疫，但與小鼠一號和二號的結果相同，直到 24 週以 ciELISA 測試抗體專一性後仍無法產生對 TC 有效的抗體 (Figure. 14)，因此本研究於 25 週以後也同樣改免疫 TC 與 BTG 接合比例 1:8 的抗原，並持續檢測此對老鼠抗體的專一性。免疫新接合的抗原後，將小鼠每週取得的抗體以非直接競爭型 ELISA 檢測可發現小鼠三號產生對 Tetracycline 具專一性的抗體。於三十八週時，小鼠四號仍未有抗體產生，而小鼠三號已對 Tetracycline 產生專一性極高的抗體，抗體 IC₅₀ 介於 1 ng/ml 至 5 ng/ml 之間 (Figure. 15)。目前我國政府公布之 Tetracycline 最低殘留標準含量，乳品不得超過 0.1 ppm，而小鼠三號產生的抗體已接近能夠製作成快速免疫層析試紙所需的 IC₅₀ 標準。因此未來幾週將會繼續以 Tetracycline-formaldehyde-BTG 1:8 抗原免疫此老鼠，期許小鼠三號抗體的專一性再提高，並能夠進入篩選單株抗體的階段。

本研究將 0-36 週的小鼠血清進行抗體的效價測試後，發現小鼠於 0-24 週雖無專一性抗體的產生，但抗體效價仍逐漸上升。小鼠三號於 25 週免疫新抗原後抗體效價仍逐漸上升，並產生具有專一性之抗體，小鼠四號的抗體效價則於 25-30 週逐漸上升，31 週後開始下降 (Figure. 16)。基於上述結果，本研究推測小鼠四號未產生抗體的原因可能是個體差異所造成，也由於小鼠三號產生具專一性之抗體，所以認為 Tetracycline-formaldehyde-BTG 1:8 為一接合成功之抗原。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline

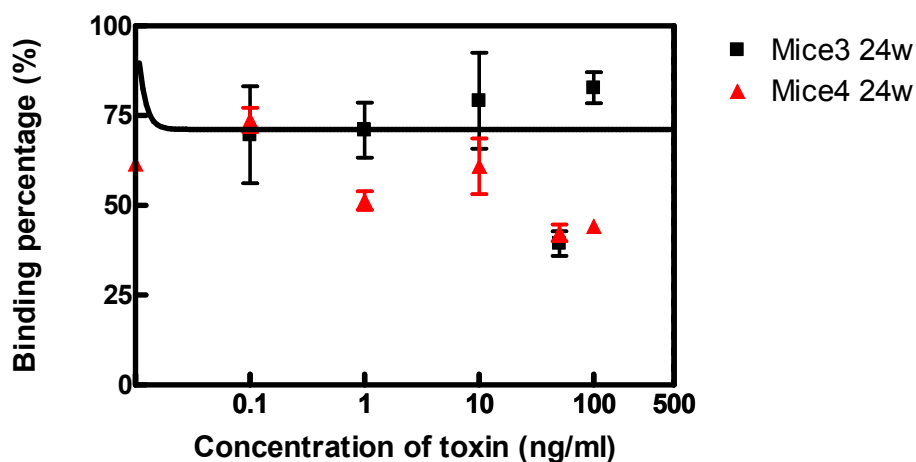


Figure. 14 小鼠第二十四週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 Tetracycline 進行專一性測試

由此圖可知小鼠三號與四號均未產生專一性抗體，故決定改變抗原接合比例。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline

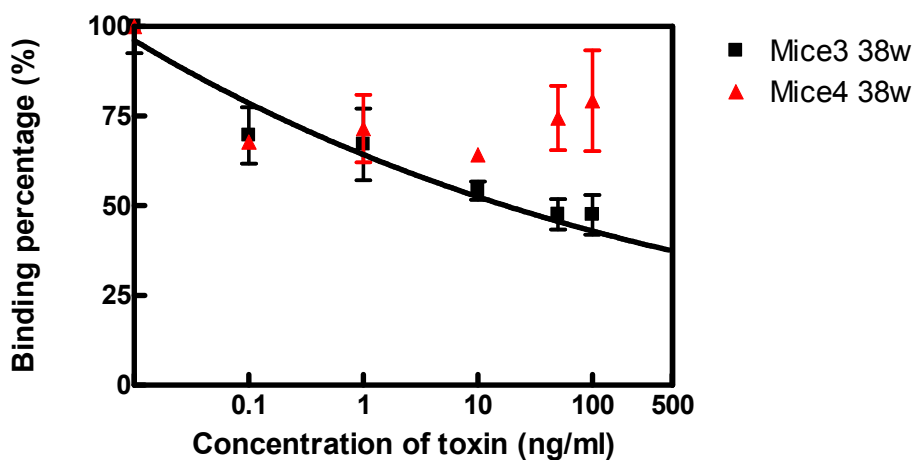


Figure. 15 小鼠第三十八週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 Tetracycline 進行專一性測試

小鼠四號於第二十五週更換免疫抗原後直至第三十八週仍無專一性抗體的產生，而小鼠三號則於更換抗原後產生抗體。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline titer

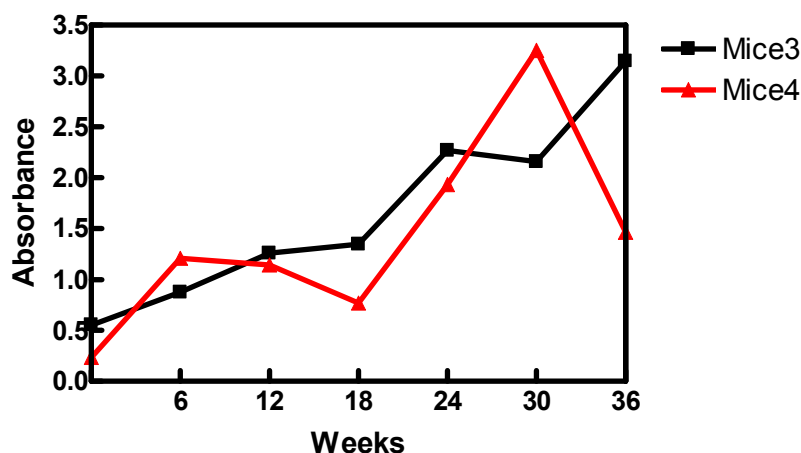


Figure. 16 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Tetracycline 進行抗體效價測試

由此圖可得知小鼠三號從零到三十八週抗體效價逐漸上升，小鼠四號於三十一週後抗體效價開始下降。

3.2.3 Tetracycline-CMO-BTG 作為抗原免疫小鼠

本研究利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價與專一性的測試。此對小鼠 (Mice 5 與 Mice 6) 免疫 TC 與 BTG 接合比例為 1:8 之抗原。目前此對小鼠週齡只有十週，從第十週的血清檢測結果得知兩隻小鼠皆無專一性抗體的產生 (Figure. 17)。並將 0~10 週的小鼠血清進行抗體的效價測試後，發現小鼠於雖無專一性抗體的產生，但抗體效價仍逐漸上升 (Figure. 18)。此一結果可以有兩種推論，一是小鼠週齡才十週，因此繼續每週以抗原免疫小鼠並持續監測抗體；二是 Tetracycline-CMO-BTG 此一抗原並未接合成功，因此無法使小鼠產生對 Tetracycline 具有專一性之抗體。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline

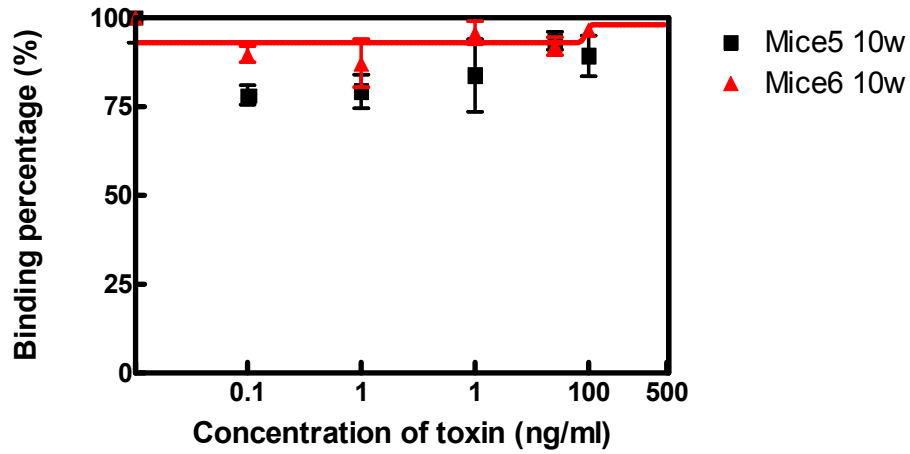


Figure. 17 小鼠第十週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 Tetracycline 進行專一性測試

由此圖可知小鼠五號與六號均未產生專一性抗體，未來將持續觀測。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline titer

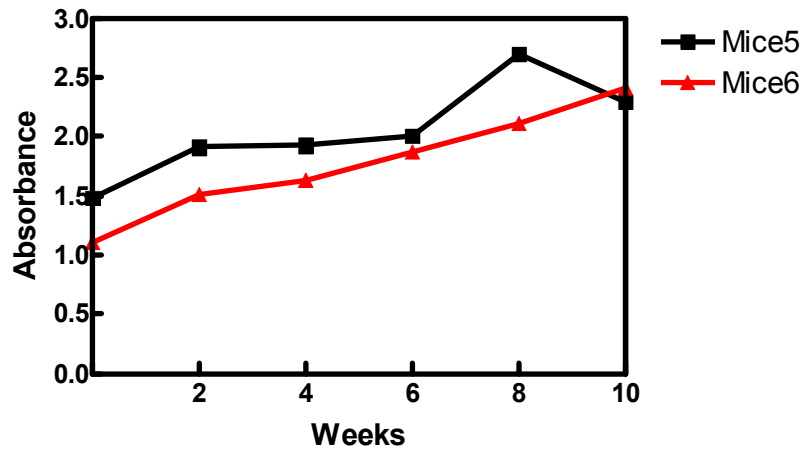


Figure. 18 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Tetracycline 進行抗體

效價測試

由此圖可得知兩隻小鼠從零到十週抗體效價逐漸上升。

3.2.4 Tetracycline-formaldehyde-PTG 作為抗原免疫小鼠

經由 3.2.2 以 Tetracycline-formaldehyde-BTG (1:8) 免疫小鼠後可使小鼠產生專一性抗體的結果，本研究仿照此一抗原接合方式再製備另一種抗原 Tetracycline-formaldehyde-PTG (1:8)。期望以此抗原免疫新小鼠後可產生更佳的抗體。本研究利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價與專一性的測試。目前此對小鼠 (Mice7 與 Mice8) 週齡只有五週，從第五週的血清檢測結果得知兩隻小鼠目前也無專一性抗體的產生 (Figure. 19)。雖然八號小鼠的曲線圖看似有抗體，但是誤差線過大。也就是指原本 ELISA 二重複所產生的讀值差異極大，而此曲線圖僅剛好為二重複之平均值所畫成，因此不可表示有專一性抗體的產生。本研究將 0-5 週的小鼠血清進行抗體的效價測試後，發現小鼠抗體效價不穩定，無法判斷效價上升或下降的趨勢 (Figure 20)。由於週數過少，因此未來將持續免疫小鼠與監測抗體專一性與效價。

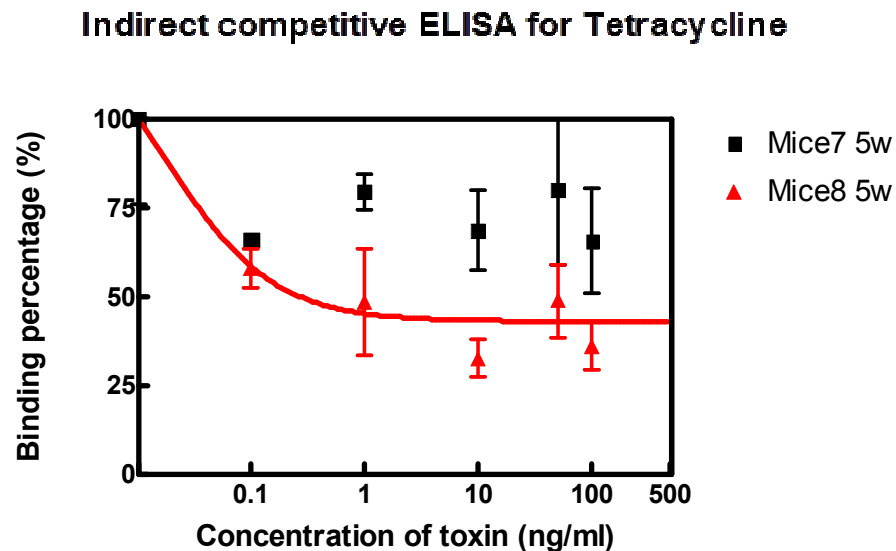


Figure. 19 小鼠第五週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)
對 Tetracycline 進行專一性測試

由此圖可知小鼠七號與八號均未產生專一性抗體，未來將持續觀測。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline titer

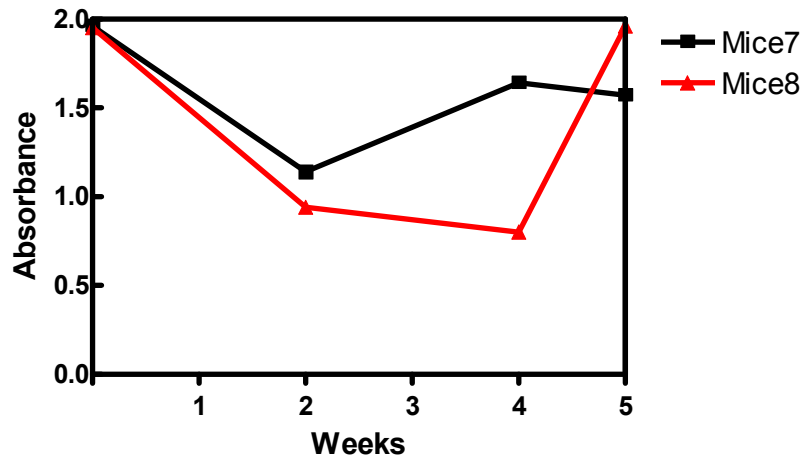


Figure. 20 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Tetracycline 進行抗體效價測試

七號小鼠與八號小鼠週齡僅為五週，因此將要多觀察幾週抗體效價變化後才能預測效價是否上升以及此抗原能否有效引起小鼠免疫反應並產生專一性抗體。

3.2.5 Tetracycline-CDI- γ -globulin ; Tetracycline-EDC/NHS- γ -globulin ;

Tetracycline-formaldehyde- γ -globulin作為抗原免疫紐西蘭大白兔

本研究於一開始選用 Tetracycline-CDI- γ -globulin 作為免疫紐西蘭大白兔的抗原，並於一個月後持續每週對兔子抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價與專一性的測試，於免疫後第十週的抗體檢測結果顯示兔子並無產生專一性抗體。故決定於第十一週更換免疫抗原為 Tetracycline-EDC/NHS- γ -globulin。接下來仍是每週利用 ELISA 檢測抗體，發現兔子更換抗原後的第十九週仍沒有產生專一性抗體，因此於第二十週嘗試再更換抗原為 Tetracycline-formaldehyde- γ -globulin。目前兔子達到免疫後第二十六週，可看見即便再次更換抗原後，以 ELISA 檢測後依然沒有抗體的產生。但未來還會再多觀察幾週以確認此抗原能否成功引起兔子的免疫反應並產生抗體 (Figure. 21)。

本研究將 0-24 週的抗體進行效價測試後，發現從免疫抗原後，兔子抗體效價並未上升 (Figure. 22)，並且於更換抗原的過程中沒有太大的波動。從此一結果本研究推測，用以免疫兔子的這三種抗原可能沒有接合的很成功，以致於既沒有專一性抗體的產生，抗體效價也未提升。

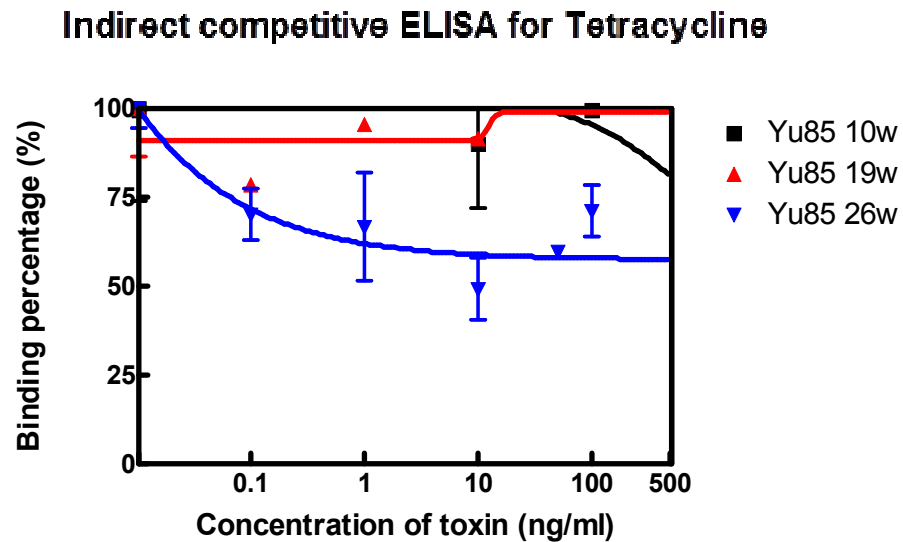


Figure. 21 兔子以第十週、十九週與二十六週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Tetracycline 進行專一性測試

由此圖可得知此三種不同接合方法所製備之抗原皆無法使兔子產生專一抗體，因此這些抗原可能未成功接合。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline titer

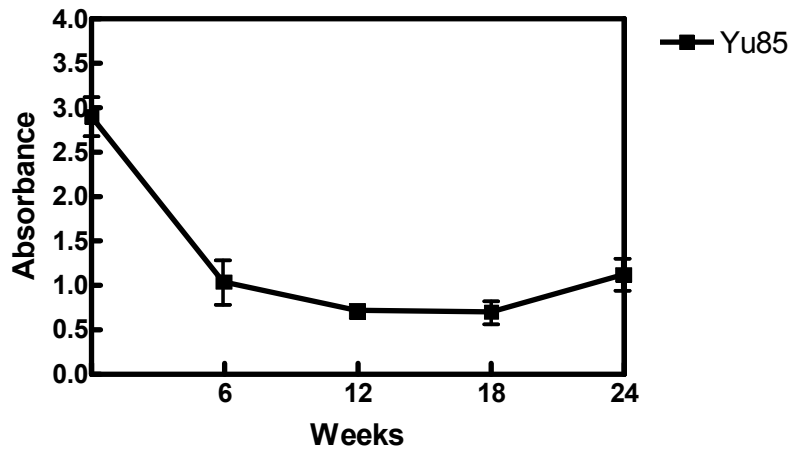


Figure. 22 兔子抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 Tetracycline 進行專一性測試

兔子抗體於更換免疫抗原的過程中維持較低的效價並且為上升。

3.2.6 利用不同覆被抗原檢測抗體專一性

在利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 檢測抗體專一性的過程中，第一步驟即為於 96 孔盤加入覆被抗原。此一覆被抗原若有成功接合，將可使抗體與覆被抗原上的 Tetracycline 結合，且會因為加入不同濃度之 Tetracycline 標準品而產生競爭效果，得到不同的吸光值。本研究初始進行的時候並無法得知哪一隻小鼠或是兔子是否有產生抗體，因此以 ELISA 檢測時，也無法得知哪種覆被蛋白是適合用來進行 ELISA 檢測的。所以本研究以四種不同活化方式接合了四種覆被蛋白，分別是 TC-formaldehyde-OVA、TC-EDC/NHS-OVA、TC-CMO-OVA 與 TC-succinate-OVA，比例皆為 1:8。一開始以這四種覆被蛋白用 ELISA 分別檢測小鼠與兔子抗體，卻發現始終沒有競爭效果，因此無法確定是動物確實沒有產生抗體或是覆被蛋白沒有接合成功。直到免疫 TC-formaldehyde-BTG 的小鼠三號於更免疫打比例為 1:8 產生專一性抗體後才測出 TC-formaldehyde-OVA 有接合成功，其他三種方法則沒有 (Figure. 23)。

Indirect competitive ELISA for Tetracycline

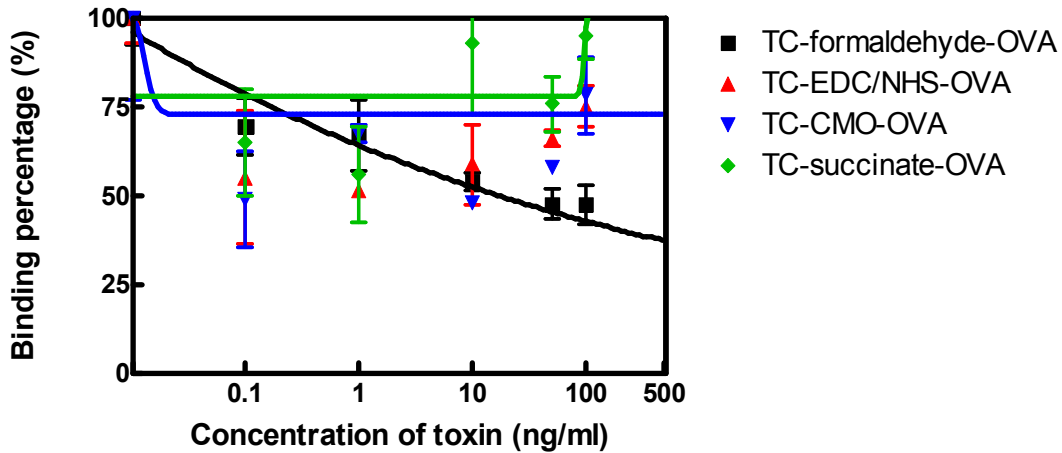


Figure. 23 以不同覆被蛋白將三號小鼠三十八週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Tetracycline 進行專一性測試

從此圖本研究得知，唯有使用 TC-formaldehyde-OVA 1:8 的蛋白可測得三號小鼠抗體的 IC_{50} 介於 1 ng/ml 至 10 ng/ml 之間。其他覆被蛋白則無法測得。

3.2.7 利用不同 HRP 檢測抗體專一性

即使僅使用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 就可測得小鼠之抗體，使用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 檢測小鼠之抗體 IC_{50} 還是必要的。本研究同 3.2.6 於實驗一開始無法得知哪隻小鼠或兔子有專一性抗體的產生，因此也接合了四種不同的 HRP，分別為 TC-EDC/NHS-HRP、TC-formaldehyde-HRP、TC-CMO-HRP 與 TC-succinate-HRP。一開始以這四種蛋白用直接競爭型 ELISA 分別檢測小鼠與兔子抗體，卻發現同樣沒有競爭效果，且吸光值過小，表示可能此 HRP 並未接合成功，或是小鼠與兔子皆未產生專一性抗體，且抗體效價過低，才會導致無法利用直接競爭型 ELISA 測得有效抗體。直到以非直接競爭型 ELISA 測得三號小鼠的抗體後，本研究利用三號小鼠三十八週抗體進行直接競爭型 ELISA 測試這四種 HRP。從結果可以看到，只有 Tetracycline-

formaldehyde-HRP 為接合成功之 HRP，且測得三號小鼠抗體之 IC_{50} 為 20 ng/ml (Figure. 24)。通常直接競爭型 ELISA 所測得抗體之 IC_{50} 會比非直接競爭型 ELISA 還要低，若其 IC_{50} 並沒有相對較低時，表示此 HRP 效果不佳。未來將可以接合不同毒素與蛋白比例之 HRP 做測試。

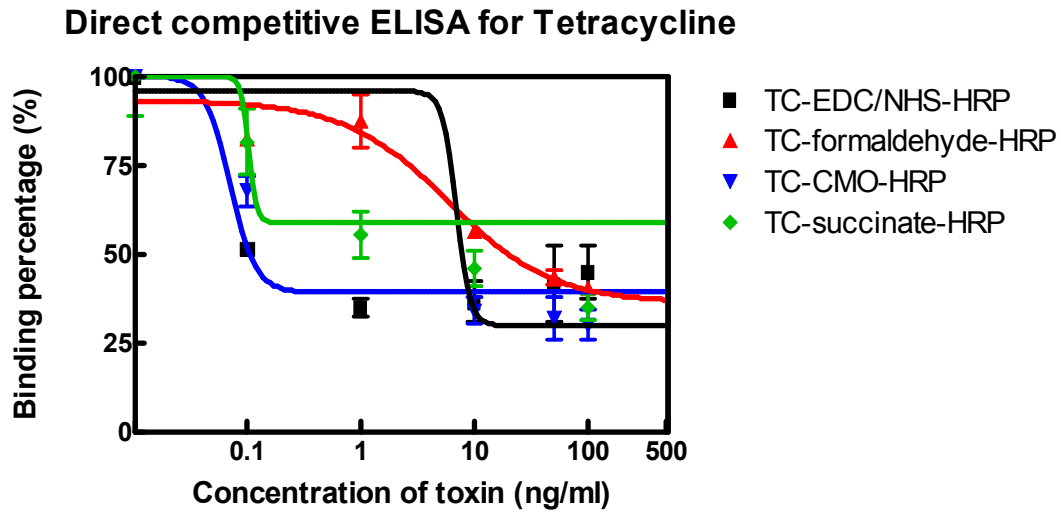


Figure. 24 以不同 HRP 將三號小鼠三十八週抗體利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對 Tetracycline 進行專一性測試

由此圖可得知，只有 Tetracycline-formaldehyde-HRP 能使抗體有競爭效果，證明小鼠抗體對 Tetracycline 具有專一性，其他三種接合方法之 HRP 則無法使用。

四，討論

小分子毒素免疫檢測系統建立不易的原因之一即因小分子毒素分子量過小，若直接以小分子毒素注射至動物體內將無法引起有效的免疫反應。為了解決此問題，小分子毒素抗原的製備就成了此檢測系統能否成功建立的關鍵。然而小分子毒素抗原的製備又有許多條件可改變以接合成各式各樣不同的抗原，除了能選擇製備抗原欲活化的官能基團外，還必須要調整小分子毒素與載體蛋白的接合比例。因此在研究之初必須要嘗試多種載體蛋白及多種接合方式，來達到成功抗原的製備，所以以免疫動物之抗原來說，本研究就嘗試了 EDC/NHS、Formaldehyde、CDI、CMO 四種方式來進行抗原接合的活化與製備，使用了 BTG、PTG 與 γ -globulin 三種不同載體蛋白。ELISA 檢測所需的覆被蛋白與 HRP 也使用了 EDC/NHS、Formaldehyde、CMO 與 Succinic anhydride 四種方法來進行製備。

從 Tetracycline 的結構來觀察，可發現其結構上具有一個 NH_2 、五個 OH、三個 CH_3 與兩個雙鍵氧，看似為一容易被修飾活化與載體蛋白接合之小分子毒素。然而從實驗結果卻發現本研究所免疫的四對小鼠中，只有免疫 Tetracycline-formaldehyde-BTG (1:8) 的小鼠有產生抗體，顯示 1:8 的比例作為免疫抗原較 1:2 還要好。且能夠檢測抗體專一性之 OVA 與 HRP 也皆為利用 formaldehyde 法製備而成。因此本研究推測 雖具有多種官能基，但可能因其環形結構導致結構較穩定而較不易被活化或修飾。

在未來的實驗中，除了持續免疫與監測現有的小鼠與兔子外，還會嘗試接合其他比例之抗原、覆被蛋白與 HRP，期望以新接合之抗原免疫小鼠及兔子可以產生高專一性及效價的抗體，使本研究能夠利用兔子的抗體，建立一套多株抗體酵素連結免疫吸附分析系統。而最近則會密集檢測已產生抗體的三號小鼠。若小鼠抗體的 IC_{50} 未能在下降，將會再次將抗原混和不完全佐劑進行免疫的動作，使小鼠抗體的專一性能更高，並期望可以開始著手下一階段的目標，利用小

鼠的脾臟細胞及融合瘤細胞的融合技術，來製備可專一性辨認 Tetracycline 的單株抗體，希望藉由單株及多株抗體的製備，將其成功的應用於 Tetracycline 快速免疫檢測系統，以便於一般社會大眾可隨時隨地的檢測食品的抗生素殘留，對社會的食安問題盡一份心力。

五，參考文獻

- Hossain, MS., Salam, MA., Rabbani, GH., Kabir, I., Biswas, R., Mahalanabis D.,
(2002) Tetracycline in the Treatment of Severe Cholera Due to *Vibrio Cholerae* O139 Bengal. *J Health Popul Nutr* ; 20(1):18-25
- Lauren, B. P., Tang, Y.,(2009) Decoding and Engineering Tetracycline Biosynthesis. *NIH Public Access Author Manuscript*, March ; 11(2): 69–75
- Ian, C., Roberts, M.,(2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.*; 65(2): 232–260
- Ava, R., Newton, V.,(1991) Use of High-Performance Liquid Chromatography To Monitor Stability of Tetracycline and Chlortetracycline in Susceptibility Determinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; p. 1264-1266
- Venkatesh, P., Arun Kumar, N., Hari Prasad, R., Krishnamoorthy, K.B., Hari Prasath, K., Soumya, V.,(2012) LC–MS/MS analysis of tetracycline antibiotics in prawns (*Penaeus monodon*) from south India coastal region. *Journal of Pharmacy Resarch* ; 6(1):48–52
- Burken, M.A., Glavidis, I.A.,(2009)Improved Group Determination of Tetracycline Antibiotics in Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Food Agric. Immunol* ; 20(3),245-252