

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫：石房蛤毒素 (Saxitoxin) 抗體之製備及酵素免疫分析 \*  
\* 名稱：法與快速免疫層析試紙之開發 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生：謝季妤

學生計畫編號：MOST 103-2815-C-040-035-B

研究期間：103年07月01日至104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

104年03月31日

行政院國家科學委員會補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\*\*\*\*\*  
\*  
\*計畫 石房蛤毒素 (Saxitoxin) 抗體之製備及  
\* : 酵素免疫分析法與  
\*名稱 快速免疫層析試紙之開發  
\*  
\*\*\*\*\*

執行計畫學生：謝季妤

學生計畫編號：103-2815-C-040 -035-B

研究期間：103年7月1日至104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：104年3月31日

## 摘要 (Abstract)

石房蛤毒素 (Saxitoxin, 簡稱 STX) 屬於麻痺性貝毒, 其作用機制在於阻斷呼吸及循環系統神經元細胞的  $\text{Na}^+$  通道, 使神經肌肉傳導受干擾, 進而使隨意肌鬆弛麻痺, 嚴重時可能造成呼吸衰竭而死。此毒素易存在於受紅潮污染的魚、貝類中, 人類若誤食可能造成死亡。

由於 STX 為一分子量為 299.29 Dalton 的小分子毒素, 是一種半抗原 (hapten), 並不足以引起實驗動物之免疫反應, 因此本計畫將 STX 結合載體蛋白做為免疫抗原, 並注射入紐西蘭大白兔體內以製備 STX 的多株抗體, 分別使用 direct competitive ELISA (cd ELISA) 及 indirect competitive ELISA (ci ELISA) 檢測血清中的抗體, 實驗結果得知此實驗動物在第三十五週所產生對 STX 專一的抗體, 其  $\text{IC}_{50}$  分別為 0.05 ng/mL 及 0.191 ng/mL。由於 ELISA 需要在實驗室中才能夠操作, 為了開發適用於一般大眾的檢測方式, 本計畫以此抗體建立一套快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip) 並檢測 STX 標準品, 而實驗結果顯示此快速免疫試紙能檢測的最小極限為 1 ng/mL。之後將會以免疫層析試紙測試貝類樣品, 期望之後能進一步開發出方便於一般大眾使用的快速免疫層析試紙, 進而減少因誤食 STX 導致中毒的發生。

# 目錄 (Index)

## 一、緒論

1.1 研究起源-----	3
1.2 石房蛤毒素 (Saxitoxin) 基本性質-----	4
1.3 石房蛤毒素 (Saxitoxin) 相關研究-----	5
1.4 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)-----	5
1.5 快速免疫層析試紙-----	7
1.6 研究動機及研究問題-----	8

## 二、材料與方法

2.1 實驗藥品及動物-----	9
2.2 實驗儀器-----	10
2.3 實驗方法-----	11
2.3.1 製備不同 STX 接合物-----	11
2.3.2 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合-----	12
2.3.3 免疫紐西蘭大白兔-----	13
2.3.4 多株抗體的純化-----	14
2.3.5 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) -----	14
2.3.6 製備奈米金粒子探針-----	15
2.3.7 快速免疫試紙的製備-----	16

## 三、實驗結果

3.1 SDS-PAGE 確認抗原接合-----	16
3.2 抗體效價及專一性測試-----	17
3.3 快速免疫試紙測試 STX 標準品-----	20

## 四、討論-----21

## 五、參考文獻-----22

# 一、緒論 (Introduction)

## 1.1 研究起源

麻痺性貝毒是全世界已知海洋毒素中發生毒害事件最頻繁的毒素，歐美地區在 1978 ~ 1997 年間發生了 21 件總共 158 人的麻痺性貝毒中毒事件。在亞太地區，1994 年以前的統計顯示，食用貝類中毒事件達三千多次，其中死亡案例共 148 人。至於大陸地區，在 1986 ~ 2003 年間先後發生 216 人麻痺性貝毒中毒，4 人死亡的事件。可以說幾乎全球沿海地帶，都曾發生過麻痺性貝毒中毒死亡的事件。國內於民國 75 年 1 月在屏東縣東港發生了因食用養殖西施貝而造成 116 人中毒、2 人不治死亡；民國 80 年 1 月，則於嘉義東石再度發生食用養殖西施貝者造成 26 人送醫急救輕微中毒案例；民國 83 年 5 月間屏東枋寮地區發生食用素面織紋螺造成 26 人中毒；民國 91 年 2 月時發生屏東縣新園鄉漁民食用含麻痺性貝毒的細線芋螺引起四肢麻痺呼吸困難，差點喪命的食物中毒事件；根據調查，臺灣在每年冬季約 12 月到 3 月期間，寒流過後臺灣南部養殖池易有紅潮發生，是造成麻痺性貝毒中毒事件發生極大的原因之一。雖然我國目前對於食物內 STX 的殘留量沒有明確規範，但在食品藥物管理署的報告中仍顯示政府對於 STX 的檢測相當重視。

STX 中毒症狀有頭痛、眩暈、運動失調、身體飄浮感、吞嚥困難、語言障礙等神經性症狀，還可能有腹痛、噁心嘔吐、腹瀉等不同程度的腸胃道不適，以及喉嚨或胸部悶痛、頭痛、全身倦怠、嗜睡，甚至會有暫時性失明的現象，嚴重時導致肌肉麻痺、呼吸困難及呼吸衰竭而死亡，死亡率約為 8 ~ 10%。由於 STX 是非蛋白質類的小分子物質，對熱相當穩定，不易藉由煮、炸、烤等烹調方式加以破壞，顯示檢測水產品中的 STX 的殘留量已刻不容緩。

## 1.2 石房蛤毒素 (Saxitoxin) 基本性質

石房蛤毒素 (Saxitoxin, 簡稱 STX)

[(3a*S*,4*R*,10a*S*)-2,6-diamino-10,10-dihydroxy-3a,4,8,9-tetrahydro-3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]p  
urin-4-yl]methyl carbamate, 分子量 299.29 Dalton (結構式見 Figure. 1), 屬於麻  
痺性貝毒, 在 1957 年從阿拉斯加奶油蚌 (*Saxidomus giganteus*) 中分離出來,  
而以此命名 (Schantz *et al.*, 1957), 由數種的海洋渦鞭毛藻及淡水藍綠菌自然產  
生, 近年來由於人類對海洋環境的污染, 造成水中氮、磷增加, 使藻類大量繁殖  
形成紅潮, 毒素大量存在, 貝類生物濾食有毒藻類而蓄積毒素於體內, 人類一旦  
攝入這些污染的魚、貝類, 會造成貝類神經麻痺中毒 (paralytic shellfish poisoning,  
PSP) (Honsell *et al.*, 1995), 毒素透過與神經元細胞的 Na<sup>+</sup> 通道蛋白上的毒素受  
體結合, 阻斷 Na<sup>+</sup> 通道, 使位於神經突觸的細胞膜不能發生去極化, 無法產生  
動作電位, 進而使神經肌肉的傳導受到干擾, 使隨意肌鬆弛麻痺, 呼吸困難, 嚴  
重時造成呼吸衰竭而死 (Uslber *et al.*, 1995)。除了 STX, 其衍生物 neoSaxitoxin  
同樣具有高致死率 (LD<sub>50</sub> = 9 μl kg<sup>-1</sup>) (Brower *et al.*, 1981)。

有鑑於誤食 STX 的事件層出不窮, 為了要確保民眾的安全, 各國均已將其  
列為水產品安全檢驗的項目之一。加拿大、澳大利亞、歐盟和美國的食品暨藥物  
管理局規定對於每 100 g 可食用部份的貝類可容許 40 - 80 μg 麻痺性貝毒; 日  
本、韓國和香港把標準定得更嚴格: 每 100 g 可食用部份的貝類只可容許 30 μg  
麻痺性貝毒。

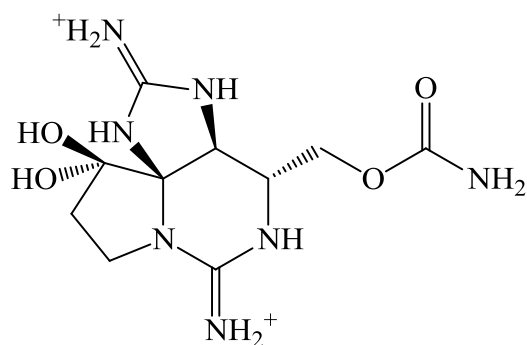


Figure. 1 石房蛤毒素 (Saxitoxin) 結構式

### 1.3 石房蛤毒素 (Saxitoxin) 相關研究

目前普遍檢測麻痺性貝毒的方法是由 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 制定標準的 “mouse bioassay” (MBA) (Cunniff, 1999), 然而這種檢測方式有時卻難以區分毒素種類、易受非毒素的成份干擾, 有較高的變異性及較低的敏感性, 也不能確認毒素的組成及含量。另外還有其他檢測方式如: 熒光光譜法 (fluorimetry) (Bates et al., 1975)、液相層析 (liquid chromatography) (Lawrence et al., 1995) (Oshima, 1995), 這些方法雖然有很好的準確性, 但是花費較昂貴且耗時, 再加上檢驗前樣品的處理也比較繁瑣; 相較之下, 操作簡易、相對成本較低、靈敏度較高且一次能檢測大量樣品的酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 成為另一個能快速檢測其殘留量的另一種選擇。

### 1.4 酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

酵素連結免疫吸附分析法是利用抗原及抗體之間具有專一鍵結的特性, 對樣品進行檢測, 配合酵素的呈色作用, 藉由呈色物質顏色的深淺, 以酵素免疫分析儀器對抗原進行定量分析, 達到檢測樣品中特定抗原的存在與否; 而酵素連結免疫吸附分析法以操作方法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 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay)、間接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay) 與三明治型酵素連結免疫吸附分析法 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay), 下列簡述本研究所使用的兩種酵素免疫分析法之原理。

**直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay, cd ELISA)** 是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。

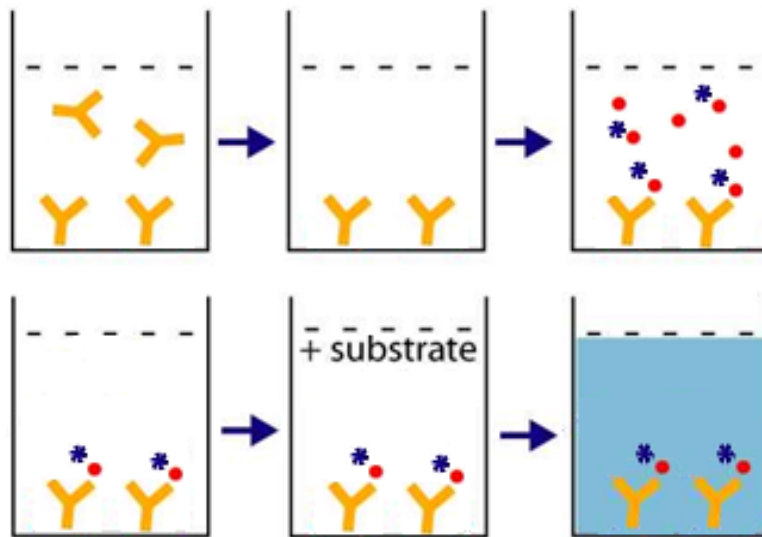


Figure. 2 直接競爭型酵素連結免疫分析法

間接競爭型酵素連結免疫吸附分析法（Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ci ELISA）是將抗原固定在固相基質上，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、抗體，樣品或抗原標準品中的抗原會與固相基質上的抗原競爭抗體結合位，接下來加入具酵素標定的二級抗體，二級抗體能夠辨識並結合於抗體的不變區，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. 3）

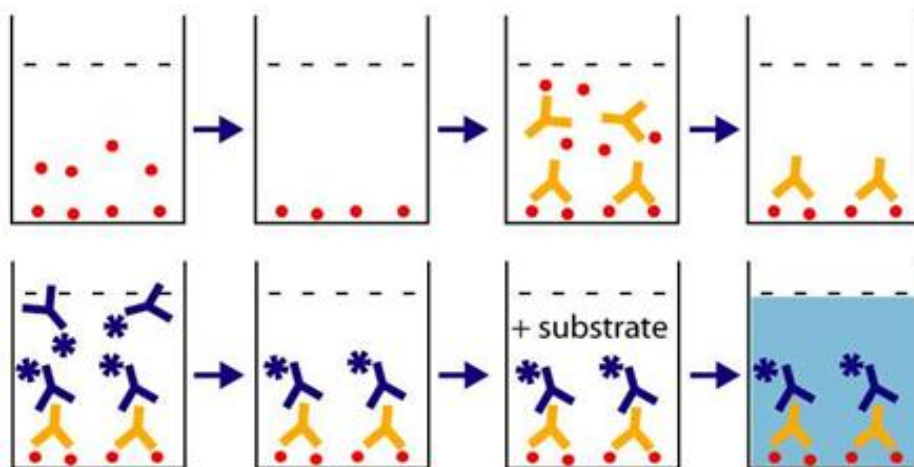


Figure. 3 間接競爭型酵素連結免疫分析法

酵素連結免疫分析法（ELISA）的優點為樣品準備較不複雜、進行實驗



的時間較為快速，且成本相對於 MBA、螢光光譜法或是液相層析低廉且人道，儘管 ELISA 的準確性不會比螢光光譜法和液相層析來的好，不過卻是一個相當廉價且實用的檢測方法。

### 1.5 快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip)

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肉眼判讀結果，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。其主要分析原理為將硝化纖維膜作為基質，並把抗原及作為控制組的抗體吸附在基質上，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 (Figure. 5)。

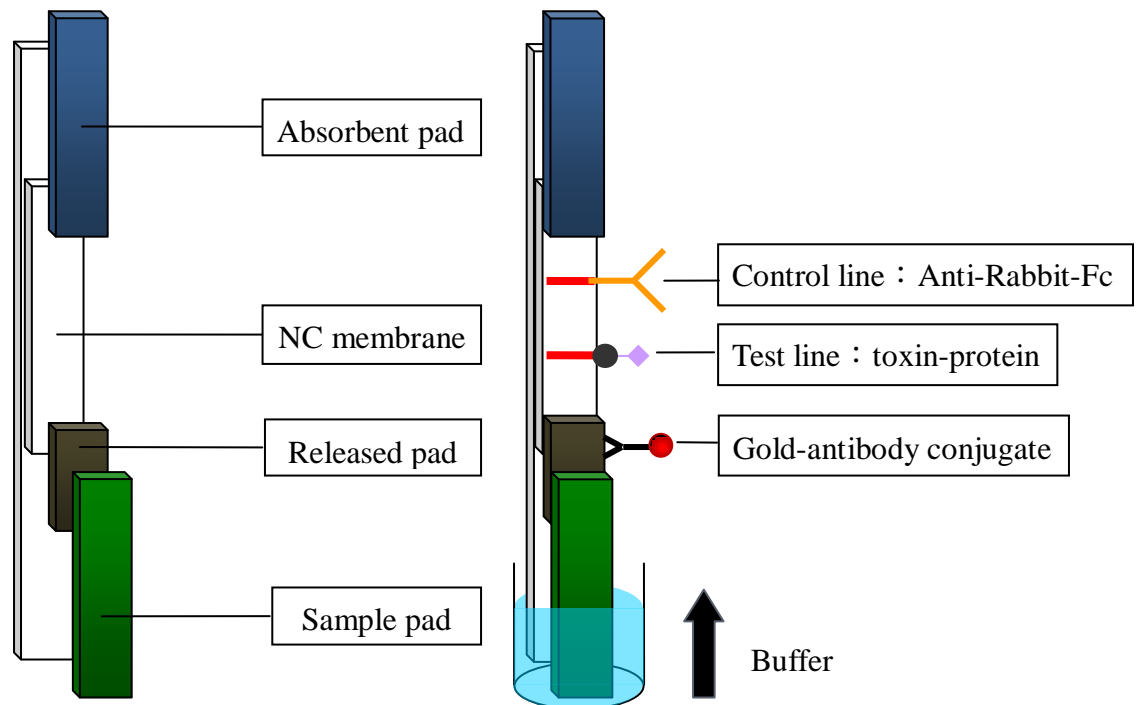


Figure. 4 免疫層析試紙組成份

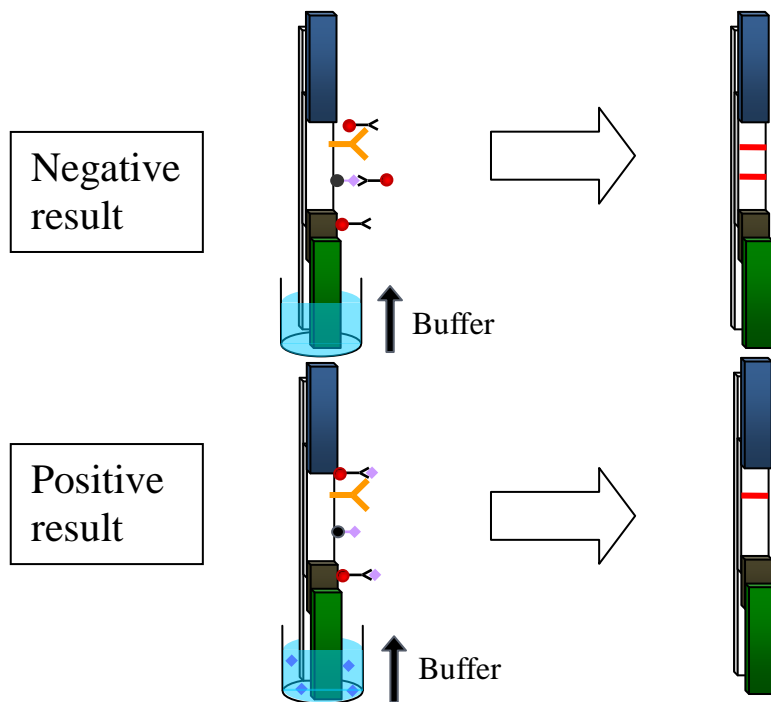


Figure. 5 免疫層析試紙分析結果

## 1.6 研究動機及研究問題

目前檢測 STX 的方法為螢光光譜法 (fluorimetry) 及液相層析 (liquid chromatography)，這兩種方法雖具有一定準確性，但因具有技術層面及檢驗費用層面的困擾及需要專業技術的人員進行儀器操作，再加上檢驗前樣品的處理也比較繁瑣，不管在時間、金錢或實用性上都比酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 差許多，所以製作出高敏感度、高專一性、操作簡易且可檢測大量樣品的 STX 抗體用來開發一酵素連結免疫吸附分析法，進而以此抗體開發快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip) 對於檢驗可能含有 STX 的水產品是非常需要的。

此研究計畫分為三個子目標：

**【子目標一】：製備專一性 STX 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】：建立酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA) 方式檢測樣品中 STX 的含量。**

-直接競爭型 ELISA

-間接競爭型 ELISA

**【子目標三】：開發 STX 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 及免疫層析試紙進行樣品分析

## 二、材料與方法 (Materials and Methods)

### 2.1 實驗藥品及動物

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

Ammonium persulfate

Bovine serum albumin (BSA)

Carbonyldiimidazole

Coomassie Brilliant Blue R-250

Freund's complete adjuvant

N, N, N',N'-tetramethylethylenediamine

$\gamma$ -globulin

Sodium bicarbonate

Sodium nitrite

Tris

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

Acetic acid

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 ALDRICH

N,N-dimethylaniline

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

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

Horseradish peroxidase (HRP)

下列藥品購自 FDA

Saxitoxin Dihydrochloride

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

Microtiter plates 購自 Nunc (Roskild, Demark)

紐西蘭大白兔購自大宗畜牧場

## 2.2 實驗儀器

Auto strip washer	Bio TEK INSTRUMENT ELx50
Centrifuge	HERMLE Z323K
Hot plate	Fargo HMS-102
Incubator	LAB-LINE
Microplate reader	Molecular Device E max
pH meter	METTLER TOLEDO MP220
Refrigerator	SHOCKLOCK
Vortex	GENIE Vortex-2

## 2.3 實驗方法

### 2.3.1 製備不同 STX 接合物

由於 STX 為一分子量為 299.29 Dalton 的小分子毒素，只具有抗原性 (antigenicity) 而不具有免疫原性 (immunogenicity)，故必須以載體蛋白接合放大其分子量，本計劃參考 L. Micheli 的方法 (Zhang *et al.*, 2006) 利用  $\gamma$ -globulins (Bovine Blood, 牛血球蛋白) 作為載體蛋白與 STX 接合，產生出具有刺激免疫反應的抗原。(Figure. 6)

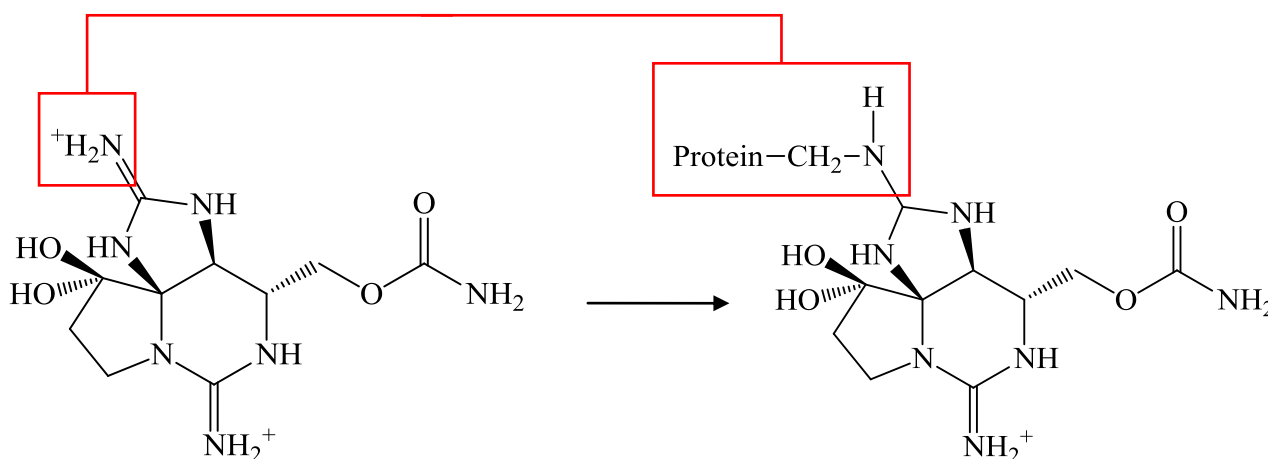


Figure. 6 利用 Formaldehyde 法接合示意圖。

#### 2.3.1-1 以 EDA (ethylenediamine, 乙二胺) 修飾 $\gamma$ -globulin

秤取 100 mg  $\gamma$ -globulin 溶於 6 mL ddH<sub>2</sub>O 中，再秤取 48 mg EDA 溶於 480  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中，將其緩慢加入至 6 mL ddH<sub>2</sub>O (含有 100 mg  $\gamma$ -globulin) 中，再秤取 150 mg EDC 溶於 ddH<sub>2</sub>O 後緩慢加入至 6.48 mL ddH<sub>2</sub>O (含有 100 mg  $\gamma$ -globulin、48 mg EDA) 中，利用 1 N HCl 調整 pH 值至 pH 5.5，室溫攪拌 2 小時。秤取 100 mg EDC 溶於 ddH<sub>2</sub>O 後緩慢加入至 6.48 mL ddH<sub>2</sub>O (含有 100 mg  $\gamma$ -globulin、48 mg EDA、150 mg EDC) 中，在室溫下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次後凍乾備用。

#### 2.3.1-2 使用 Formaldehyde 法將 STX 與載體蛋白 EDA- $\gamma$ -globulin 接合作為免

疫抗原

取 500  $\mu$ l 0.1 M Sodium acetate 溶解 515  $\mu$ g STX，再取 1 mL Sodium acetate 溶解凍乾的 10 mg EDA- $\gamma$ -globulin，將其取出 400  $\mu$ l 並緩慢加入至 500  $\mu$ l 0.1 M Sodium acetate (含有 515  $\mu$ g STX) 中，再取 100  $\mu$ l Formaldehyde 37 加入至 900  $\mu$ l 0.1 M Sodium acetate (含有 515  $\mu$ g STX、10 mg EDA- $\gamma$ -globulin) 中，在室溫避光攪拌 72 小時後，在 4°C 下攪拌 12 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

#### 2.3.1-3 使用 Formaldehyde 法將 STX 與載體蛋白 BSA(Bovine Serum Albumin, 牛血清蛋白)接合作為覆被抗原

取 500  $\mu$ l 0.1 M Sodium acetate 溶解 515  $\mu$ g STX，再秤取 4 mg BSA 溶於 1 mL Sodium acetate 中，將其緩慢加入至 500  $\mu$ l 0.1 M Sodium acetate (含有 515  $\mu$ g STX) 中，再取 100  $\mu$ l Formaldehyde 加入至 1.5 mL 0.1 M Sodium acetate (含有 515  $\mu$ g STX、4 mg BSA) 中，在室溫避光攪拌 72 小時後，在 4°C 下攪拌 12 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

#### 2.3.1-4 使用 Formaldehyde 法將 STX 與 HRP (Horseradish peroxidase, 辣根過氧化氫酵素)接合

取 500  $\mu$ l 0.1 M Sodium acetate 溶解 515  $\mu$ g STX，再秤取 500  $\mu$ g HRP 溶於 1 mL Sodium acetate 中，將其緩慢加入至 500  $\mu$ l 0.1 M Sodium acetate (含有 515  $\mu$ g STX) 中，再取 100  $\mu$ l Formaldehyde 加入至 1.5 mL 0.1 M Sodium acetate (含有 515  $\mu$ g STX、4 mg HRP) 中，在室溫避光攪拌 72 小時後，在 4°C 下攪拌 12 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

### 2.3.2 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合

#### 2.3.2-1 製作 0.75 nm 10% 的下層解析膠體

分別取 4,000  $\mu$ l 的 dd H<sub>2</sub>O、3,300  $\mu$ l 的 30% Acrylamide、2,500  $\mu$ l 的 1.5 M Tris pH 8.8、100  $\mu$ l 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、100  $\mu$ l 10%

Ammonium persulfate (APS) 與 8  $\mu$ l 的 N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)，混合均勻後加入玻璃片中待其凝固。

#### 2.3.2-2 加入酒精將下膠壓平

#### 2.3.2-3 製作 0.75 mm 5% 的上層膠體

分別取 1,700  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O、415  $\mu$ l 的 30% Acrylamide、315  $\mu$ l 的 1.0M Tris pH 6.8、25  $\mu$ l 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)，25  $\mu$ l 10% Ammonium persulfate (APS) 與 2.5  $\mu$ l 的 N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)，混合均勻後加入玻璃片中並放入齒梳待其凝固。

#### 2.3.2-4 製作蛋白質樣本

取一定濃度所要檢測的蛋白質，加入 4 倍 SDS (8 mL 10% SDS、9 mL Glycerol、1,250  $\mu$ l 2 M pH 6.8 Tris、15% 2-Mercaptoethanol) 並平衡體積使每一管樣本體積相同，之後在 100°C 水中加熱 5 分鐘使蛋白質四級結構變性。

#### 2.3.2-5 進行 SDS-PAGE

將樣品注入膠體後，把膠體放入 running buffer (19.2 mM glycine、0.1% SDS、2.5 mM Tris base) 中使用電源供應器使樣品通過膠體，等到樣品線移動至膠體底部時即可將膠取出。使用 Coomassie Brilliant Blue (48.4 mL ddH<sub>2</sub>O、41.6 mL Methanol、10 mL Acetic Acid、0.1 g Brilliant Blue R) 進行染色 15 分鐘，之後使用 destain buffer (100 mL ddH<sub>2</sub>O、100 mL Acetic acid、400 mL Methanol) 進行退染，最後使用掃描器擷取影像。

### 2.3.3 免疫紐西蘭大白兔

為了使紐西蘭大白兔產生對 STX 的專一性抗體，將 STX- $\gamma$ -globulin (0.5 mg 的  $\gamma$ -globulin) 溶於 887.5  $\mu$ 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，約注射 10 - 20 個位置。四週後，進行加強免疫的動作，取 STX- $\gamma$ -globulin (0.5 mg 的

$\gamma$ -globulin) 溶於 887.5  $\mu$ 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，以皮下注射的方式注射在兔子的腿部，約注射 4 個位置。第五週後即可對兔子耳朵進行動脈採血。

#### 2.3.4 多株抗體的純化

將採集之兔子血液，待其凝固後插入竹籤，放置 4°C 環境中隔夜使血液黏附在竹籤上，移除血液中凝結的血塊後取上清液 (血清)，並計算體積。加入與血清相同體積之 100%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉澱血清內的蛋白質，混合均勻後靜置 30 分鐘後，以冷凍高速離心機離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C。離心完畢後去除上清液，加入一半體積的 ddH<sub>2</sub>O 回溶沉澱物，再加入一半體積之 70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，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 ddH<sub>2</sub>O 回溶並置入透析袋，在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。透析完畢後取出，以 0.01 M 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。

#### 2.3.5 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)

##### 2.3.5-1 抗體效價檢測

在 96 孔盤中加入 100  $\mu$ l 不同週次的純化後抗體 (以 0.01M PBS 稀釋)，在 37 °C 環境中反應 1 小時後，以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應物質。加入 200  $\mu$ l 的 blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01M PBS)，37°C 環境反應 30 分鐘後，以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 50  $\mu$ l 0.01M PBS，再加入 50  $\mu$ l STX-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37°C 環境反應 1 小時後，以 washing buffer 洗去未反應物質。最後加入 100  $\mu$ l TMB substrate，於室溫避光反應 15 分鐘後，加入 100  $\mu$ l 1 N HCl 終止反應。以 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 的吸光值。



#### 2.3.5-2 直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (cd ELISA)

在 96 孔盤中加入 100  $\mu\text{l}$  的純化後抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋)，於 37°C 環境反應 1 小時後，以 washing buffer (0.05% Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應物質。加入 200  $\mu\text{l}$  的 blocking buffer (0.1% BSA in 0.01 M PBS)，37°C 環境反應 30 分鐘後，以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 50  $\mu\text{l}$  STX 毒素標準品 (0.01 ~ 10 ng/mL)，再加入 50  $\mu\text{l}$  STX-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37°C 環境反應 1 小時後，以 washing buffer 洗去未反應物質。最後加入 100  $\mu\text{l}$  TMB substrate，於室溫避光反應 15 分鐘後，加入 100  $\mu\text{l}$  1 N HCl 終止反應。以 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 的吸光值。

#### 2.3.5-2 間接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (ci ELISA)

在 96 孔盤中加入 100  $\mu\text{l}$  STX-BSA (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37°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。加入 200  $\mu\text{l}$  blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01 M PBS)，置於 37°C 環境中反應 30 分鐘，以 washing buffer 洗去未反應物質。加入 50  $\mu\text{l}$  不同濃度的 STX 標準品 (0.01 ~ 10 ng/mL) 及 50  $\mu\text{l}$  純化過的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37°C 環境中反應 1 小時後，以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 100  $\mu\text{l}$  Goat anti-rabbit IgG-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37°C 環境中反應 1 小時，再以 washing buffer 清洗盤子兩次。最後加入 100  $\mu\text{l}$  TMB substrate，置於室溫避光反應 15 分鐘後，加入 100  $\mu\text{l}$  1 N HCl 終止反應。最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 吸光值。

#### 2.3.6 製備奈米金粒子探針

將 STX 之多株抗體以 1 mL Boric acid-Borax buffer (2 mM, pH 8.0) 稀釋。取 20  $\mu\text{g}$  透析完畢的 STX 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  $\mu\text{m}$

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。接著離心 15,000 rpm 30 分鐘，移除上清液，最後將奈米金粒子沉澱物回溶於 180  $\mu$ l Tris buffer (20 mM, pH 8.0, 含 1% BSA 和 0.1% sodium azide)，置於 4°C 保存備用。

### 2.3.7 快速免疫試紙的製備

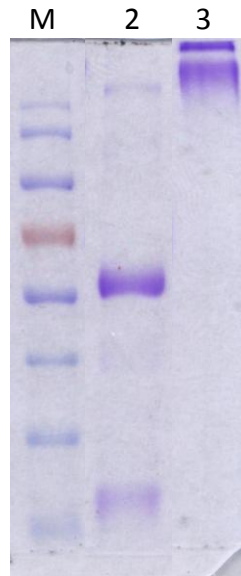
先將 STX 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上(5  $\mu$ l/strip)，置於 37°C 環境下烘乾。將 0.25  $\mu$ l 的 STX-BSA 和 0.25  $\mu$ l 的 Anti-rabbit-Fc antibody(0.2 mg/mL)分別點於 NC membrane(孔徑為 5  $\mu$ m, 黏附於塑膠片上, 4 mm  $\times$  75 mm)上 Test line 及 Control line 的位置，置於 37°C 環境下烘乾 10 分鐘。接著組裝試紙，其組裝方式為：將 conjugate release pad 疊在 NC membrane 上(大約重疊 2 mm)，再將 sample pad 疊於 conjugate release pad 上(大約重疊 6 mm)，最後將 absorbent pad (4 mm  $\times$  27 mm)置於 strip 的另一端即組裝完成。在 96 孔盤中，加入 200  $\mu$ l 欲檢測樣品及不同濃度的 STX 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 (Results)**

### 3.1 SDS-PAGE 確認抗原接合

為了確定 STX 和載體蛋白之間的接合效果及結果，本研究使用 SDS-PAGE 觀察 STX 和載體蛋白接合前後之分子量的變化，以比較接合效果及確定是否有接上。使用 Formaldehyde 法接合 STX 與載體蛋白 EDA- $\gamma$ -globulin (Figure. 7)，其 SDS-PAGE 結果顯示，訊號聚集在頂部沒有跑下去，因此可知接合後分子量較大，可能是蛋白上接了多個毒素，或是蛋白和蛋白互相接上，形成大分子量的聚集而無法跑下去，由於不能確定是哪種結果，所

以直接以此一蛋白抗原免疫紐西蘭大白兔用以確定是否具有免疫效果。



**Figure. 7 利用 SDS-PAGE 確認使用 Formaldehyde 法將 STX 與載體蛋白 EDA- $\gamma$ -globulin 接合的情形**

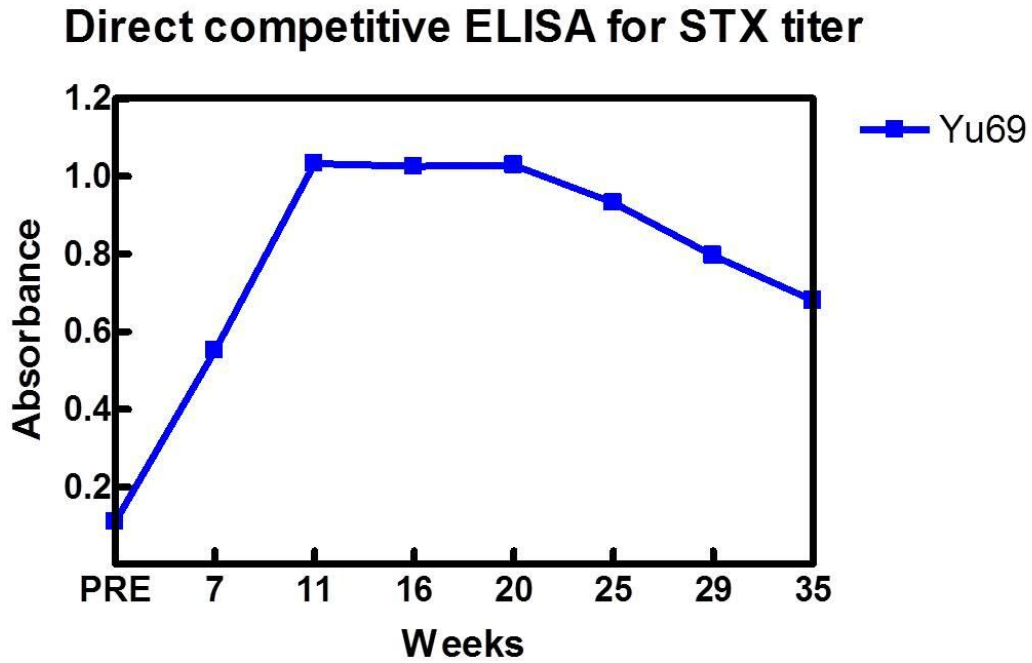
由左到右第一行為 Marker，第二行為 EDA- $\gamma$ -globulin 標準品，第三行為 STX-EDA- $\gamma$ -globulin。由結果得知 EDA- $\gamma$ -globulin 和 STX 接合後的蛋白帶 (protein band) 顯示分子量太大，所以在 SDS-PAGE 上並無法往下跑，因此無法判別是否接合成功。

### 3.2 抗體效價及專一性測試

本計畫採用 pre-immune 至第三十五週的紐西蘭大白兔血清來進行抗體的效價測試，由 Figure. 8 結果顯示，抗體效價從 pre-immune 至第十一週時快速上升，在第十一週至第二十週穩定，但在第二十週之後抗體效價就開始緩慢下降；由於從第十一週開始抗體效價就有下降的趨勢，因此在第十六週時有對兔子進行加強免疫的動作，之後抗體雖然維持一定效果，卻在第二十週後又往下掉，本計畫判斷可能是抗原接合效果不佳所導致。

以 cd ELISA 來進行抗體的專一性測試，由 Figure. 9 結果中可以看到抗體的專一性有越來越好的趨勢，第七週抗體 IC<sub>50</sub> 的位置可以看出來大約於 0.5

ng/mL 至 1 ng/mL 之間，在 Figure. 10 結果中顯示第三十五週抗體 IC<sub>50</sub> 為 0.05 ng/mL；以 ci ELISA 來進行抗體的專一性測試，由 Figure. 11 結果中顯示第三十五週抗體 IC<sub>50</sub> 為 0.191 ng/mL。



**Figure. 8 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對 STX 進行抗體效價測試**

從此圖可以得知抗體效價從 pre-immune 至第十一週時快速上升，在第十一週至第二十週穩定，但在第二十週之後抗體效價就開始緩慢下降。

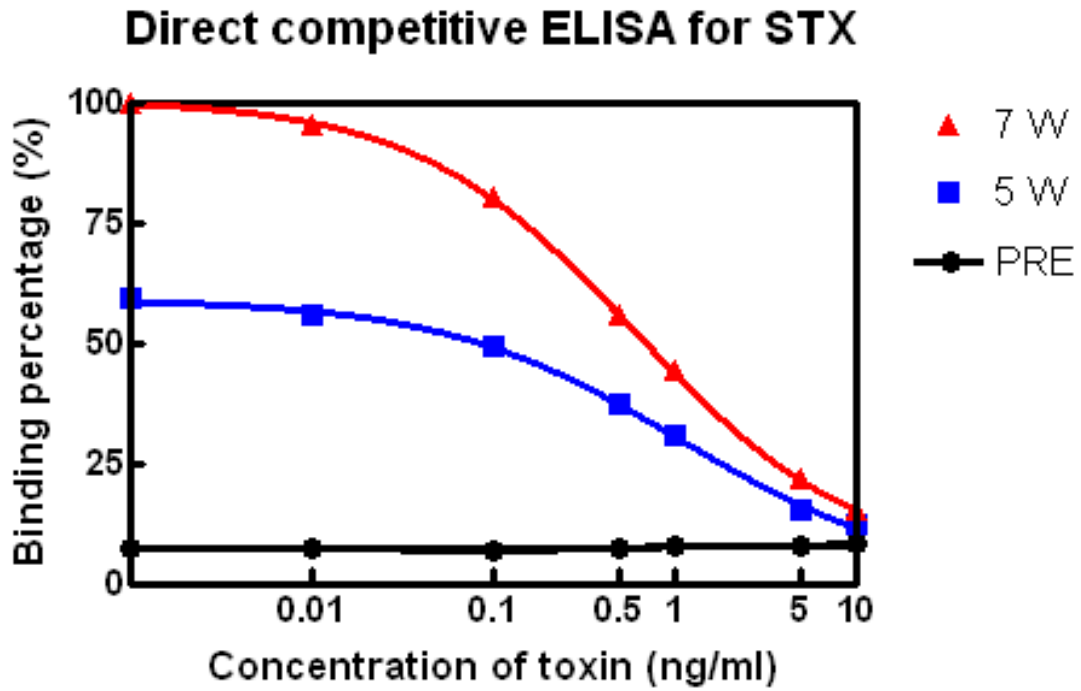


Figure. 9 利用直接競爭型 ELISA (cd ELISA) 對 STX 進行專一性測試

此圖顯示 pre-immune 的血清不論標準品在哪種濃度下都不會競爭，表示此實驗動物先前不具有對 STX 專一性的抗體，而此實驗動物在接受 STX-EDA- $\gamma$ -globulin 免疫之後，在第五週及第七週產生對 STX 專一性的抗體，並且隨著週次的增加，抗體的專一性也越來越好。

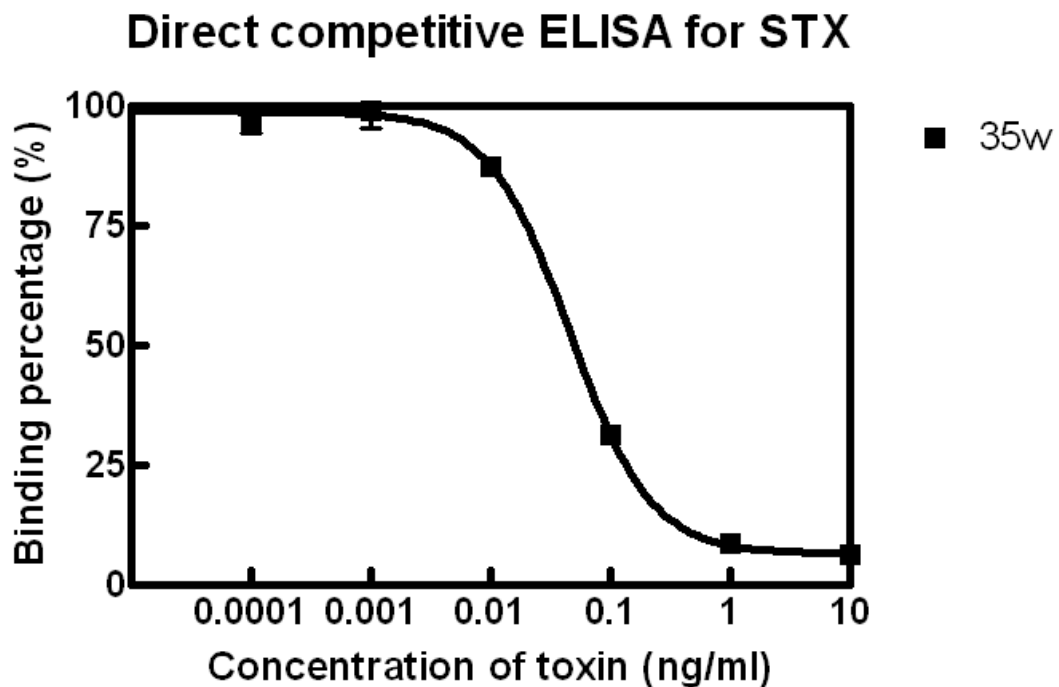


Figure. 10 利用直接競爭型 ELISA (cd ELISA) 對 STX 進行專一性測試

由此圖曲線可算出抗體在第三十五週時  $IC_{50}$  為 0.05 ng/mL。

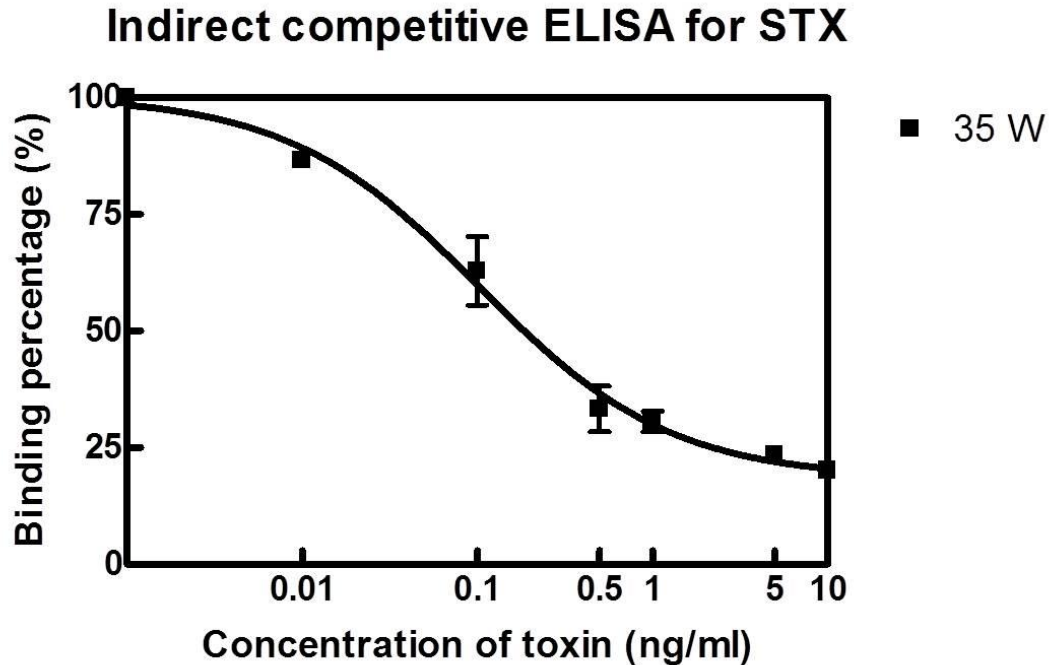
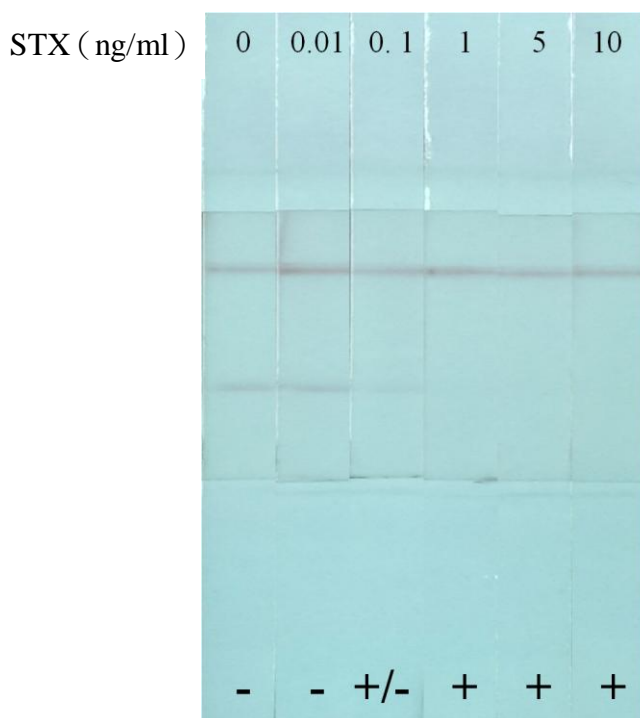


Figure. 11 利用間接競爭型 ELISA (ci ELISA) 對 STX 進行專一性測試

由此圖曲線可算出抗體在第三十五週時  $IC_{50}$  為 0.191 ng/mL。

### 3.3 快速免疫試紙測試標準品

雖然各國對 STX 限制規範均相當嚴格，但目前本計畫製備的抗體已符合需求。由於 ELISA 必須要在實驗室操作，因此本計畫便以此抗體進一步製備出快速免疫試紙。本計畫採用第二十四週的紐西蘭大白兔血清抗體與奈米金粒子接合製成奈米金粒子探針，用以檢測 STX 標準品。由 Figure. 12 結果中顯示在 STX 標準品濃度為 0 及 0.01 ng/mL 時為陰性結果；而在 STX 標準品濃度為 1、5 及 10 ng/mL 時則為陽性結果；在 STX 標準品濃度為 0.1 ng/mL 時為正負值，表示此快速免疫試紙的檢測極限為 1 ng/mL。



**Figure. 12** 以快速免疫試紙檢測 STX 標準品

由左到右 STX 標準品濃度分別為 0、0.01、0.1、1、5 以及 10 ng/mL。檢測極限在 0.1 ng/mL。

#### 四、討論 (Discussion)

小分子毒素的免疫檢測系統建立不易，主要因為小分子毒素分子量太小，若直接免疫動物，是無法引發免疫反應，因此，為了解決此問題，小分子毒素的抗原製備極為重要，而毒素本身是否具備可直接與蛋白接合或是可被衍生的官能基是關鍵，在計劃之初必須要嘗試多種接合方式及載體蛋白，以找到最適合的方法成功製備抗原。本計畫一開始使用文獻中的接合法連結 STX 與以 EDA 修飾的  $\gamma$ -globulin (Figure. 6)，由於 EDA 會將  $\gamma$ -globulin 的胺基伸長以便減少立體障礙，所以在接合時  $\gamma$ -globulin 的胺基容易與另一個  $\gamma$ -globulin 的羧基結合而形成大分子量聚集，本研究選擇使用 SDS-PAGE 分析抗原，利用載體蛋白與 STX 結合將增加蛋白分子量的特性，藉由觀察抗原載體蛋白複合物在 SDS-PAGE 的分布情形得知抗原與載體蛋白接合是否成功，而此複合物經由 SDS-PAGE 的實

驗結果可以看出因為分子量過於巨大而無法判別，根據此結果本計畫推測可能為多個 STX 連接上  $\gamma$ -globulin 或只是  $\gamma$ -globulin 相互連接而成的情況 (Figure. 7)。由於無法確定為何種情況，因此直接將此抗原免疫紐西蘭大白兔，藉由 cd ELISA 的結果發現抗體的效價在 pre-immune 後上升並穩定至第二十週後開始緩慢下降，由於在第十一週時抗體效價開始有往下掉的趨勢，因此給予兔子加強免疫的動作，雖然之後抗體效價有微微上升並持平，但卻在第二十週後又往下掉，本計畫推測有可能是此次抗原接合效果不佳所導致。從 cd ELISA 的結果顯示，紐西蘭大白兔的確有產生對 STX 專一的抗體，且第三十五週的抗體  $IC_{50}$  為 0.05 ng/mL (Figure. 10)；從 ci ELISA 的結果顯示，第三十五週的抗體  $IC_{50}$  為 0.191 ng/mL (Figure. 11)，此兩種 ELISA 結果顯示皆滿足現今各國對 STX 的限制規範。本計畫再以此抗體製備出快速免疫試紙，並測試 STX 標準品，結果顯示此快速免疫試紙的檢測極限為 1 ng/mL (Figure. 12)，雖然沒有和 ELISA 相當的敏感度，但也足以應付各國對 STX 的限制規範。

在未來的實驗中，本計畫將嘗試各種萃取樣品的方法，並以此抗體建立的酵素連結免疫吸附分析系統及快速免疫試紙檢測，希望在不久的將來能完成 STX 的快速免疫檢測系統，以便於一般社會大眾可隨時隨地檢測魚、貝類的 STX 殘留，對食品安全方面的疑慮能減少更多、更能放心。

## 五、參考文獻 (References)

- Bates HA, Rapoport H (1975) *J Agric Food Chem* 23:237-239
- Brower DJ, Hart RJ, Matthews PA, Howden MEH (1981) *Clin Toxicol* 18:813-865
- Cunniff P (1999)(ed) *Official methods of analysis of AOAC International*, 16th edn, II(49):46B
- Honsell G, Nichetto P, Sidari L, Tubaro A (1995) *Giornale Botanico Italiano* 129:391-403
- L. Micheli, S. Di Stefano, D. Moscone, G. Palleschi, S. Marini, M. Coletta, R. Draisci, F. delli Quadri (2002) Production of antibodies and development of highly sensitive formats of enzyme immunoassay for saxitoxin analysis. *Anal Bioanal*



*Chem.* 373:678–684

Lawrence JF, Menard C, Cleroux C (1995) *JAOAC Int* 78:514-520

Oshima Y (1995) *JAOAC Int* 78:528-532

Schantx, E. J., Mold, J. D., Stanger, D. W., Shavel, J., Riel, F. J., Bowden, J. P., Lynch, J. M., Wyler, R. S., Riegel, B. R., Sommer, H. (1957). Paralytic shellfish poison VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues. *J. Am. Chem. Soc.* 79:5230-5238.

Uslber E, Shneider E, Terplan G, Laycock MV (1995) *Food Addit Contam* 12:405-413