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 ＊
＊ ： 塑化劑-DINP 多株抗體的製備及其快速免疫檢測方法之開發 ＊
＊ 名 稱 ＊
＊ ********* ** ＊

執行計畫學生： 李銘浩
學生計畫編號： NSC 101-2815-C-040-039-B
研究期間： 101年07月01日至102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 102年03月29日

摘要

(Abstract)

Di-isononyl phthalate (鄰苯二甲酸二異壬酯，DINP) 是製造塑膠用品時常會使用的塑化劑之一。在塑膠工業上塑化劑被用來幫助塑膠軟化、使其易於成形。然而 DINP 與塑膠聚合物之間的鍵結並不穩定，所以大部分塑膠製品易受外在環境因素影響 (例如：溫度、使用次數) 而漸漸溶出塑化劑，尤其以塑膠容器裝填含油脂類的食物更容易讓塑化劑溶出。實驗證實當 DINP 進入生物體時會對肝、腎造成毒性效應以及內分泌系統干擾，若長期從環境中攝取過量 DINP 可能對代謝速率慢之嬰幼兒造成生殖系統的傷害。然而目前檢測 DINP 的方法大多過程繁複，技術設備需求高，使得樣品無法在短時間內完成分析檢測。為了避免大眾遭受到 DINP 的毒害，因此本研究以 DINP 為主題，希望建立一套有效的方式來檢測塑化劑 (DINP)。我們利用抗體與抗原之間具有專一性的特性，希望能以 DINP 的抗體建立其檢測方式。首先我們將 DINP 結合載體蛋白質，以此作為抗原免疫實驗動物產生對 DINP 具有專一性的抗體，再利用此抗體來建立一套針對 DINP 的酵素連結免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA) 以及快速免疫層析試紙分析法 (Immunochromatographic strip)，以利大量且快速檢測各類塑膠容器中塑化劑的溶出含量。由於 DINP 缺少適合蛋白質接合的官能基，因此我們利用酯化反應以及鋅粉還原反應製備出帶有胺基的 DINP 類似物，接著分別使用重氮法及 DCC/NHS 修飾法將 DINP 與載體蛋白 γ-globulins 接合成免疫抗原，並以此抗原免疫小鼠。收集小鼠所產生的抗體，再利用 competitive indirect ELISA (ciELISA) 觀察抗體的專一性。目前小鼠抗體經 ciELISA 檢測結果顯示，抗體效價雖然隨著週數上升，但無明顯專一性。推測應為自行製備的 DINP 在結構上稍有不同，導致抗體無法辨識 DINP，因此未來的研究方向，除了著重於調整 DINP 與載體蛋白的接合條件，以提高抗體對於 DINP 的專一性外，也會嘗試不同載體蛋白，期望能製備出具專一性之多株抗體。

目錄

(Index)

緒論 1

研究起源 1

塑化劑 (DINP) 基本性質 1

塑化劑 (DINP) 相關研究 2

酵素連結免疫分析法 3

快速免疫層析試紙 3

研究動機 5

材料與方法 6

實驗器材 6

實驗方法 7

實驗結果 14

討論 17

圖表 19

參考文獻 31

附錄 33

緒論

(Introduction)

研究起源

鄰苯二甲酸酯類衍生物常被拿來塑膠工業上當作塑化劑使用，其中鄰苯二甲酸二異壬酯 (Di-isononyl phthalate，DINP) 則是最為廣泛被使用的一種塑化劑。DINP 價格低廉、取得容易，大部分業者製作塑膠製品時，均會使用 DINP 來提高塑膠產品的品質，但由於塑膠合成時的鍵結方式不穩定，因此 DINP 有脫離塑膠製品而暴露在環境中的風險。研究報告指出 DINP 對於動物體之器官及荷爾蒙皆有影響，即使低攝取量也有可能造成內分泌失調，因此歐盟認定鄰苯二甲酸酯類塑化劑為環境荷爾蒙。而國內更於 2011 年 5 月爆發塑毒汙染風波，其中 DINP 被惡意添加到起雲劑使用，引起國人對塑化劑毒性的重視；2012 年 1 月的新聞中也檢驗出塑膠拖鞋含有過量 DINP，顯示檢測塑膠製品中 DINP 的含量已刻不容緩，所以本實驗希望能夠開發以免疫偵測的方式來檢驗樣品中的塑化劑 (DINP) 總含量。

塑化劑 (DINP) 基本性質

鄰苯二甲酸二異壬酯 (Di-isononyl phthalate，DINP) 的分子量為 418.61 Dalton，其分子式為 $C_{26}H_{42}O_4$，屬於小分子化合物 (結構式見圖一)。DINP 是一種高分子量通用塑化劑 (或稱為增塑劑)，主要被用來製造 PVC 物品 (Kransler *et al.*, 2012)，塑化劑穩定性高、不易揮發，當塑膠產品加工時加入塑化劑，可以減少聚合體分子間之摩擦力，使分子鏈可以在輕輕攪拌下分開，改變塑膠的物理性質，增加高分子量聚合物的柔韌性、加工性、延展性與可用性。塑化劑種類多達上百種，普及度最高的即是鄰苯二甲酸酯類化合物 (例如：DINP、DEHP、DBP、BBP)。近年來 DINP 因為價格便宜、取得方式容易，已取代大部分其他種類塑化劑，成為塑膠業者主要使用的塑化劑 (Hsu *et al.*, 2011)。

而 2011 年 5 月的塑化劑事件中，食品添加物─起雲劑的原料精緻棕櫚油被不肖業者替換成 DINP，導致許多食品被污染，此事件讓國人開始重視塑化劑的毒性。塑化劑是藉著氫鍵及凡德瓦爾力與聚合物相溶，並非以共價鍵方式鍵結於聚合物中，所以大部分塑膠製品易受到外在環境因素影響，例如溫度或是隨著使用次數增加而漸漸溶出塑化劑，尤其以塑膠容器裝填含油脂類的食物更容易讓塑化劑溶出。許多實驗指出 DINP 對於動物體之器官及荷爾蒙皆有影響，攝入鄰苯二甲酸脂類對大鼠、小鼠之睪丸造成傷害及肝臟過氧化體的增加，亦發現伴隨有雌激素的活性增加的現象 (Blom *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 1987)。國內的研究也證實當 DINP 進入到生物體時會造成肝臟和腎臟的毒性效應及內分泌系統上的干擾現象 (彭麗文，2011)。

塑膠製品的發明為人們帶來極大的便利，生活中許多用品也多以塑膠為主。正因為如此，就算食品中就算未添加 DINP，人類還是有可能從環境中攝取到高含量的 DINP。為此，2011 年 6 月食品藥物管理局因應塑毒風波針對各種塑化劑訂定每日安全耐受量，DINP 的耐受量為 0.15 mg/kg-bw/day，也就是說一個 60 公斤的成人每天不得攝取超過 9 毫克的 DINP。

塑化劑 (DINP) 相關研究

目前常用來檢測 DINP 的方式有液相層析質譜分析儀 (Abb M *et al.*, 2009; Sørensen, 2006)、氣相層析質譜分析儀 (Earls *et al.*, 2003) 以及液相層析 (Silva *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2007)。國內主要檢測 DINP 的方法為液相層析串聯式質譜法 (LC-MS-MS)、亦有人使用氣相層析質譜法 (GC-MS)，此二種方法的偵測極限均為 1 ppm。而上述幾種方法雖能測定 DINP，但檢測過程費時又繁瑣，且需有受過專業訓練的人才有辦法操作機器，樣品檢測前處理步驟又十分繁複。因此若是能針對 DINP 製備出具高專一性之多株抗體，並建立酵素連結免疫分析法及快速免疫層析試紙，即可較快速且簡便的檢測樣品中 DINP 的含量。

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

酵素連結免疫分析法乃是利用抗原與抗體之間具備專一性鍵結之特性，對樣品進行檢測。經由特殊設計其鍵結機制後，配合酵素呈色反應，即可產生能被肉眼區分或藉由酵素免疫分析儀器定量之呈色物質，並藉由呈色之深淺對抗原進行定量分析，藉此達到檢測檢體中特定抗原的存在與否。而酵素連結免疫分析法以操作方式的不同可區分為三種：直接競爭型酵素連結免疫分析 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay)、非直接競爭型酵素連結免疫分析 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay) 與三明治酵素免疫連結分析 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)，接下來簡單描述本實驗中所使用的酵素免疫分析法 (非直接競爭型) 之原理。

非直接競爭型酵素連結免疫分析 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay) (附錄一) 是將接合蛋白質之抗原吸附在固相基質上，再加入抗體、樣品或抗原標準品，而抗原標準品或樣品中的抗原會與固相基質上的抗原競爭抗體結合位，接著加入被酵素標記的二級抗體，二級抗體能夠辨識並結合於抗體的 FC region，最後再加入酵素受質即可呈色。樣品中含有的抗原濃度越高，則呈色結果越淺。酵素連結免疫分析法 (ELISA) 的優點是樣品準備不複雜，進行實驗的時間也快速，最重要的是成本開銷相對於 HPLC 或是 GC-MS 來的低，縱使 ELISA 的準確性不會比 HPLC 和 GC-MS 來的好，不過卻是一個相對較為廉價且實用的檢測方法。

快速免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip)

快速免疫層析試紙 (附錄三) 是一種以膜為基質的免疫分析法 (membrane-based immnoassay)，這類分析法極為快速簡便且以目視就能判讀分析結果。其主要的分析原理是將硝化纖維膜 (Nitrocellulose membrane，NC membrane) 做為基質，並且把抗原以及做為控制組的抗體 (Anti-rabbit FC region antibody) 吸附於基質上。接著將奈米金粒子做為標記物連結抗體做成探針，之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，奈米金粒子探針會和樣品中的抗原先行結合，因此只會在基質的控制組區域顯色，呈現一個訊號；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域顯色，呈現兩個訊號。由於根據訊號的數目及可簡單區分樣品中是否含有抗原，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。

研究動機

(Motive)

目前檢測 DINP 的方法主要有高效液相層析色譜法 (HPLC)、氣相層析質譜法 (GC-MS) 以及液相層析串聯質譜法 (LC-MS-MS)，這三種方法雖然檢測結果具有一定的再現性及準確性，但操作步驟較為繁複，且具有技術層面及檢驗費用層面的困擾，例如：昂貴的儀器與耗材、待檢測樣品的預先處理步驟繁複、且需要專業技術的人員進行儀器操作，所以上述的檢測方法無法在短時間內篩檢大量檢體。因此本實驗希望能夠製備出 DINP 的多株抗體，並以此建立酵素連結免疫分析法以及快速免疫層析試紙分析法 (Immunochromatographic strip)，以期能夠準確且更簡便的檢測市面上塑膠製品中 DINP 之含量，本研究將大致分為下列三個目標：

【目標一】：製備專一性 DINP 的多株抗體。

-製備免疫抗原

-將免疫抗原打入小鼠或紐西蘭大白兔產生免疫反應 (Immunization)

-多株抗體的純化

【目標二】：建立高專一性檢測 DINP 含量的酵素連接免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent Assay，ELISA)。

-利用非直接競爭型 ELISA 觀察抗體專一性

-利用非直接競爭型 ELISA 檢測樣品中 DINP 的含量

【目標三】：開發 DINP 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

材料與方法

(Materials and Methods)

實驗藥品

Ammonium persulfate, coomassie brilliant bule R-250, di-isononyl phthalate (DINP), Freund's complete adjuvant, gelatin, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), N-hydroxysuccinimide (NHS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, ovalbumin (OVA), γ-globulin, sodium bicarbonate, sodium carbonate, sodium dodecyl sulfate, sodium nitrite, sodium sulfite, Tris, urea 皆購於 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 1-Octanol, 4-nitrophthalic acid, acetic acid, di-sodium tetraborate, ethyl acetate, sodium carbonate 皆購於 Merck (Darmstadt, Germany). Aqueous hydrochloric acid (HCl), boric acid (Granular), ethanol, hexanes, N,N-dimethylformamide (DMF), polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20), sodium hydroxide 皆購於 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.). 1,4-Butanediol diglycidly, benzene, succinic anhydride 皆購於 ALDRICH. Freund's incomplete adjuvant, Goat anti-rabbit IgG-HRP, Horseradish peroxidase (HRP) 皆購於 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Acrylamide 購自生工生技. Zinc powder 購於 Alfa Aesar. Microtiter plates 購於 Nunc (Roskild, Demark). 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, K-Blue) 購於 Neogen Corp.

實驗動物

Balb/c white mice 購自國家實驗動物中心

實驗儀器

ELx 50 ELISA washer [Bio-Tek instruments (Winooski,VT)], High-speed refrigerated centrifuge [HERMLE], Vmax automatic ELISA reader [Molecular Devices CO. (Menlo park, CA)], Stirrer / Hot plate [CORNING].

實驗方法

1. 合成帶有胺基 (amino group) 之 DINP 類似物以利接合蛋白：

1.1 製備 4-硝基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-nitrophthalate，DINNP)：

秤取 2.4 g (0.0227 mol) 的 4-Nitrophthalic acid 溶於 5.5 ml (0.035 mol) 的 Octanol，一邊攪拌並緩慢滴加 500 µl 的濃鹽酸，於 120℃ 加熱迴流 7 小時。接著利用減壓濃縮除去未反應的 Octanol 以及生成的水，濃縮後的油狀殘留物趁尚有餘溫倒入分液漏斗，用 pH 8.0 的 10 % Na_2CO_3 洗滌此油狀粗製品，當洗滌至水層靜置 5 分鐘可略為澄清時。取油層，加入少量乙醇並加熱除去酒精及雜質，得到 DINNP 黃色澄清油狀液體。

1.2 製備 4-氨基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-amino phthalate，DINAP)：

吸取 245 µl (5.6 mmol) 的 DINNP 溶於 28 ml 的 Benzene，加入 0.28 g 的鋅粉，室溫攪拌反應 1 小時。接著在冰上環境緩慢滴入 820 µl 濃鹽酸，待液體冷卻後除去冰，並在室溫下攪拌 1 小時。再加入 0.28 g 鋅粉，室溫反應 12 小時。移至冰上環境加入 34 ml ddH_2O，並用 1N NaOH 中和至溶液 pH 7.0。除去冰後以分液漏斗移除水層，並將苯層移至新容器中，加入 Na_2SO_3 移除苯層中剩餘水分。過濾雜質後利用減壓蒸餾除去剩餘苯，加入乙醇重新結晶後，用 DMF 回溶並以 TLC 分離並刮取 RF 值為 0.42 的產物，加入乙醇回溶並離心 13,000 rpm，取上清液減壓濃縮後，保存至 -20℃ 冰箱備用。

2. 利用 TLC 觀察 DINP 標準品與自行合成之 DINAP 之性質

裁取 TLC 片成適當大小 (寬 4 cm × 高 8 ㎝)，接著在 TLC 片上下各預留 1 公分劃線作為頂線與底線，並且將欲觀察性質之樣品以同等間距點在 TLC 片之底線上。接著將 4-Nitrophthalic acid、Octanol、DINP 標準品、以及本實驗所合成之 DINAP 分別點於 TLC 片上。並且配置展開液 ethyl acetate：hexanes = 1：3，接著將 TLC 片放入展開槽中展開，待展開液之液面到達 TLC 片頂線

即可取出風乾，於波長 254 nm 下觀察結果。

3. 利用重氮法將 DINAP 接上 γ-globulin：

秤取 0.4 mg (0.0032 mmol) 的 DINAP 與 10 µl 濃鹽酸及 200 µl dd H_2O 混合溶解，置於冰上冷卻至 5℃ 以下，緩慢滴入 $NaNO_2$ 溶液 (2.4 mg $NaNO_2$ in 875 µl ddH_2O)，反應 1 小時後滴加少量 Urea (1.2 mg Urea in 100 µl dd H_2O) 反應 15 分鐘，以除去未反應 $NaNO_2$。接著將 0.8 mg γ-globulin 溶於 200 µl 的 Sodium borate buffer (0.1 M, pH 9.2)，逐滴加入 DINAP 反應液中，並於室溫反應 2 小時，反應完畢後置入 2 L 0.01 M PBS 透析三次。

4. 利用 DCC/NHS 修飾法將 DINAP 接上 γ-globulin：

秤取 1 mg 的 γ-globulin 溶於 100 µl 的 carbonate buffer (0.1 M, pH 9.6)。接著將 0.5 mg 的 DINAP 溶於 100 µl DMF，並且加入先前溶有 γ-globulin 的 carbonate buffer 攪拌 15 分鐘混合均勻。接著取 1 mg 的 DCC 溶於 20 µl DMF，並加入先前的反應物中，接著隨即取 1 mg NHS 溶於 15 µl DMF 並加入先前反應物中，於室溫反應 2 小時後，移入 4℃ 環境中反應過夜。最後在 2 L 的 PBS (0.01 M, pH 7.4) 中透析三次。

5. 使用 Glutaraldehyde – two step 方法將 DINAP 接上 OVA：

5.1 使用 Glutaraldehyde 活化 OVA：

將 10 mg 的 OVA 溶於 300 µl PB buffer (0.1 M, pH 7.5)，接著加入 17 µl 的 Glutaraldehyde (讓溶液最終含有 1.25 % Glutaraldehyde)，並在室溫中反應隔夜。在 2 L 的 PBS (0.01 M, pH 7.4) 中透析三次後，加入 100 µl 的 Na_2CO_3 (0.5 M) 將 pH 調整至 9.5，即為已活化過之 OVA。

5.2 將活化過的 OVA 接上 DINAP：

接下來取 0.5 mg DINAP (in 10 µl DMF) 溶於 90 µl DMF，並且再取 2 mg 的已活化 OVA (70 µl) 加入 DINAP 中。接著在 4℃ 環境中反應隔夜。反應完畢後，加入 100 µl 的 Lysine (1M, pH 7.0) 中止反應，並於室溫反應

2.5 小時，最後在 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

6. 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合

6.1 製作 0.75 mm 10% 的下層解析膠體：

分別取 1 ml 的 ddH_2O、1.65 ml 的 30% Acrylamide、1.25 ml 的 1.5 M Tris pH 8.8、50 μl 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、50 μl 的 10% Ammonium persulfate (APS) 與 8 μl 的 N, N, N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)，混合均勻後加入玻璃片中待其凝固。

6.2 加入酒精將下膠壓平：

緩慢將酒精加入玻璃片中，除去氣泡，使下膠平整凝固。

6.3 製作 0.75 mm 5% 的上層膠體：

分別取 1.7 ml 的 ddH_2O、415 μl 的 30% Acrylamide、315 μl 的 1 M Tris pH 6.8、25 μl 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、25 μl 的 10% Ammonium persulfate (APS) 與 2.5 μl 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。

6.4 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、1.25 ml 2 M Tris pH 6.8、15 % 2-Mercaptoethanol) 並平衡體積使每一管樣品體積相同，之後在 100℃ 水中加熱 5 分鐘使蛋白質四級結構變性。

6.5 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 Bule (48.4 ml ddH_2O、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 d_2H_2O, 100 ml Acetic acid, 400 ml Methanol) 進行退染，最後使用掃描器擷取影像。

7. 注射免疫抗原至小鼠體內使其產生免疫反應 (Immunization)：

由於將抗原注射至紐西蘭大白兔體內到能夠拿到兔子抗體所需時間較長，故先將抗原免疫小鼠，用以觀察抗原是否能夠成功使小鼠引起免疫反應並產生對 DINP 有專一性之多株抗體，待觀察可行後再將抗原注射至紐西蘭大白兔以取得大量之多株抗體。免疫小鼠的步驟如下，取蛋白量含 100 μg 的 DINP-γ-globulin，並加入 0.01 M PBS 將體積補至 500 μl，接著加入 500 μl 的完全佐劑 (complete Freund's adjuvant) 混合均勻，將混合物以腹腔注射的方式注入兩隻小鼠體內，每隻小鼠注射 50 μg 的蛋白量 (即 500 μl)。於兩周後利用腹腔注射對小鼠進行增強免疫的動作，取蛋白量含 100 μg 的 DINP-γ-globulin，並加入 0.01 M PBS 將體積補至 600 μl，兩隻小鼠分別注射 50 μg 的蛋白量 (即 300 μl)。第三週開始對小鼠進行剪尾採血，採血完畢再利用腹腔注射進行增強免疫的動作，接著取其血清即可使用 ELISA 進行檢測血清中是否產生了 DINP 的專一性抗體。

8. 小鼠多株抗體的純化：

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

9. 注射免疫抗原至紐西蘭大白兔體內使其產生免疫反應 (Immunization)：

為使紐西蘭大白兔產生對 DINP 的專一性抗體，取蛋白量含 500 μg 的 DINP-γ-globulin，並利用 0.01 M PBS 將體積補至 950 μl，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。四周後再進行增強免疫的動作，取 DINP-γ-globulin (0.5 mg 的 BSA 溶

於 950 μl 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，第五週後即可從兔子的耳動脈採血，並將血液中的血清純化出來，即可使用 ELISA 檢測血清中是否產生了 DINP 的專一性抗體。

10. 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 dd H_2O 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 dd H_2O 回溶並置入透析袋，在 2 L 的 0.01 M PBS 環境中透析。透析完畢後以 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。

11. 抗體效價測試 (Titer test)

利用非直接競爭型酵素連結免疫分析法來進行抗體效價之測試。DINAP-OVA 以 0.01 M PBS 稀釋後，在各微孔注入 100 μl 並且放置 37℃ 培養箱中反應 1 小時，以 washing buffer (0.05％ Tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗盤子四次後加入 170 μl 的 blocking buffer (0.1％ Gelatin in 0.01 M PBS) 後放置 37℃ 培養箱中反應 30 分鐘，以 washing buffer 清洗盤子四次，再加入 50 μl 0.01 M PBS 以及 50 μl 相同稀釋倍率、不同週次之抗體，並且放置於 37℃ 培養箱中反應 1 小時，以 washing buffer (0.05％ Tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗盤子四次後，在每孔中加入 100 μl Goat anti-mouse IgG-HRP，以 0.01 M PBS 稀釋 20,000 倍，置於 37℃ 培養箱反應 1 小時，以 washing buffer 清洗盤子四次，最後加入 100 μl TMB substrate，置於室溫避光反應約 30 分鐘後，加入 100 μl

1 N HCl 終止反應，終止反應後利用 ELISA Reader 測量波長 450-650 nm 吸光值。

12. 非直接競爭型 ELISA (ciELISA)：

在 96 孔盤中加入 100 µl DINAP-OVA (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37℃ 環境中反應 1 小時，以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗盤子四次。再於 96 孔盤中加入 170 µl blocking buffer (0.1 % Gelatin in 0.01 M PBS)，置於 37℃ 環境中反應 30 分鐘。以 washing buffer 清洗盤子四次後，加入 50 µl 不同濃度的 DINP 標準品(0.01 ~ 10 ng/ml) 及 50 µl 純化過的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37℃ 環境中反應 1 小時。以 washing buffer 清洗盤子四次並加入 100 µl Goat anti-mouse IgG-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37℃ 環境中反應 1 小時。然後再以 washing buffer 清洗盤子八次。最後加入 100 µl TMB substrate，置於室溫避光反應 15 分鐘後，加入 100 µl 1N HCl 終止反應。最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 吸光值。

13. 製備奈米金粒子探針：

將 DINP 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 µg 透析完畢的 DINP 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 µm 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 µl Tris buffer (20 mM，pH 8.0，含 1 % BSA 和 0.1 % sodium azide)，置於 4℃ 保存備用。

14. 免疫試紙的製備：

先將 DINP 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5 µl/strip)，37℃ 環境下烘乾。再將 0.25 µl 的 DINP-OVA 和 0.25 µl 的 Anti-rabbit-Fc antibody (0.2 mg/ml) 分別點於 NC membrane (孔徑為 5 µm，黏附

於塑膠片上，5 mm×75 mm) 的 Test line 以及 Control line 的位置，置於 37℃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 (組成結構見附錄三 A)。

在 96 孔盤中，加入 200 µl 欲檢測樣品及不同濃度的 DINP 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 (附錄三 B)。

實驗結果

(Results)

1. 利用 TLC 觀察 DINP 與自行合成 DINNP 之性質

本實驗利用 4-硝基鄰苯二甲酸 (4-Nitrophthalic acid) 及正辛醇 (Octanol) 經過酯化反應製備出了 4-硝基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-nitrophthalate，DINNP)。接著我們將 DINP 標準品、4-硝基鄰苯二甲酸 (4-Nitrophthalic acid)、正辛醇 (Octanol) 以及 4-硝基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-nitrophthalate，DINNP) 分別點於 TLC 片上，以展開液 (ethyl acetate：hexanes = 1：3) 展開，並於 254 nm 波長下觀察結果 (圖二)。實驗結果顯示經由酯化反應所製備出的 DINNP 與 DINP 標準品的性質極為相似，且從圖中亦可看出 4-硝基鄰苯二甲酸在酯化反應中全數反應完畢，表示 DINNP 的製備十分成功。

2. 利用 TLC 檢測還原反應前後 DINNP 與 DINAP 之性質變化

接著將 DINNP 於酸性條件下與鋅粉進行還原反應，製備出了 4-氨基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-amino phthalate，DINAP)，並加入乙醇再結晶以除去雜質。為了觀察酯化反應前後以及產物再結晶前後性質的差異與變化，我們分別將 DINNP、DINAP 粗製品以及再結晶過的 DINAP 樣品分別點於 TLC 片上，接著以展開液 (ethyl acetate：hexanes = 1：3) 展開，並於 254 nm 波長下觀察結果 (圖三)。實驗結果顯示，經過還原反應後，產生出與 DINNP 性質截然不同的新化合物，且此新化合物觀察到許多不同的訊號位置。而再結晶前後化合物的性質並沒有十分明顯的轉變。

3. 利用 NMR 檢測還原反應產物是否帶有氨基 (amino group)

由於鋅粉還原反應的產物經過 TLC 分離後在 TLC 片上出現了 5 個訊號位置，為了確定我們是否成功地製備出帶有氨基 (Amino group，NH_2) 的 DINP 類似物，也為了進一步確定哪一個訊號位置才是 DINAP。我們刮取了 TLC 片

上每一個訊號位置的產物並請應化系幫我們測定 NMR。測定結果顯示 RF 值為 4.2 的藍色訊號位置的產物測出具有胺基之訊號 (圖四)。

4. 利用 TLC 純化以取得高純度的 DINAP

在確定 DINAP 於 TLC 片上的訊號位置後，我們將所有的鋅粉還原反應產物均勻點在 TLC 片上，接著同樣以展開液 (ethyl acetate：hexanes = 1：3) 展開，並於 254 nm 波長下觀察 (圖五)，接著我們刮取 RF 值為 4.2 的藍色帶狀區塊，使用乙醇將 DINAP 溶出，接著將上清液抽乾，得到了高純度的 DINAP。

5. 利用 SDS-PAGE 檢測 DINAP 接合載體蛋白的接合效果

為了確定 DINAP 和載體蛋白之間的接合效果，我們使用 SDS-PAGE 觀察 DINAP 和載體蛋白接合前後之分子量變化。利用重氮法所接合的免疫抗原 DINAP-γ-globulin，第一行為 Marker，第二行為 γ-globulin，第三行為 DINAP-γ-globulin，其 SDS-PAGE 的結果顯示，接合後之蛋白分子量較接合前稍微大了一些，訊號位置較接合前高，由此可知免疫抗原 DINAP-γ-globulin 是接合成功的 (圖六)。而非直接競爭型酵素免疫分析法所使用的覆被蛋白，其 SDS-PAGE 的結果也是相同，第一行為 Marker，第二行為 OVA，第三行為 DINAP-OVA，接合後的分子量亦較接合前高，顯示覆被蛋白接合成功 (圖七)。而使用 DCC / NHS 修飾法所接合的免疫抗原 DINAP-γ-globulin，其 SDS-PAGE 的結果顯示，第一行為 Marker，第二行為 γ-globulin，第三行為 DINAP-γ-globulin，雖然接合後蛋白的量稍有減少，但仍然是接合成功的 (圖八)

6. 利用 indirect ELISA 及 ciELISA 檢測小鼠抗體的專一性與效價

我們自免疫小鼠後的第三週起開始採集小鼠的血清，利用 ciELISA 檢測 DINP 之小鼠多株抗體的效價及專一性。效價測試選用了 1 號及 2 號小鼠 Pre-immune 到第 15 週之奇數週的血清進行檢測，結果顯示小鼠抗體效價自開始免疫到第 15 週均大致呈現上升的趨勢 (圖九)。而在檢測抗體專一性的實驗中，選用了第 15 週的小鼠血清進行檢測，實驗結果得知，抗體僅對 DINP 標

準品有些微專一性 (圖十)。

為此我們使用 DCC/NHS 修飾法接合新的免疫抗原來免疫新的小鼠 3 號及 4 號，並且也測試其多株抗體的效價及專一性。效價測試選用了 3 號及 4 號小鼠 Pre-immune 到第 7 週的血清進行檢測，測試結果雖沒有像 1 號及 2 號小鼠這般明顯，但 4 號小鼠抗體效價從開始免疫到第 7 週亦大致呈現上升趨勢，3 號老鼠的抗體則呈現不太穩定的趨勢 (圖十一)。而檢測抗體專一性的實驗部份 3 號及 4 號老鼠的專一性仍然沒有改善 (圖十二)。

7. 結論

綜觀上述實驗之初步結果，可以得知小鼠雖有產生抗體但是目前抗體專一性十分不足且極不穩定，本研究日後將經由不斷追加抗原的劑量以提高抗體的穩定性，並持續尋找新的載體蛋白接合方法，期望能夠製備出專一性高之多株抗體，並以此開發出高敏感性之快速免疫檢測法以及快速免疫試紙。

討論

(Discussion)

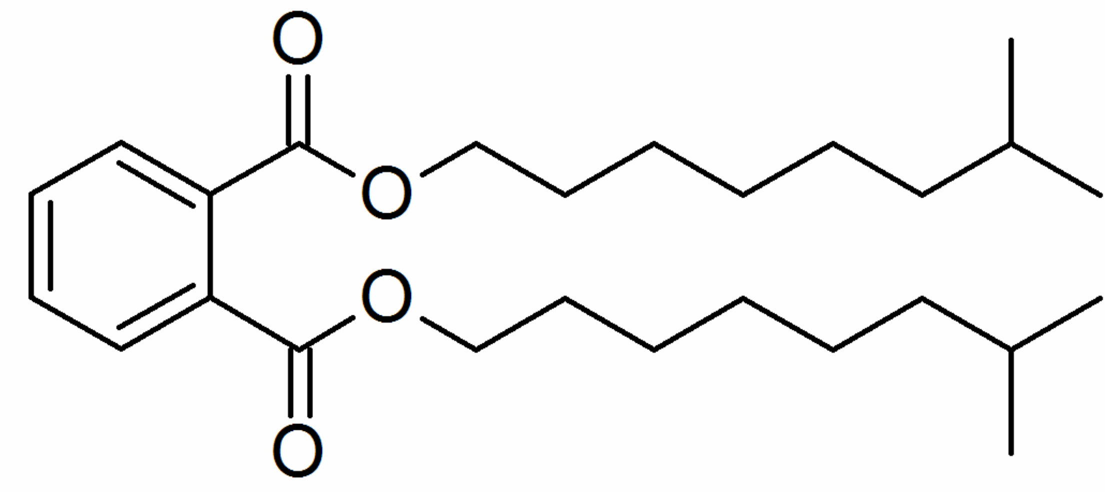
小分子毒素的免疫檢測系統建立不易，主要因為小分子毒素分子量太小，雖具抗原性卻不具免疫原性。為了解決此問題，小分子毒素必須與載體蛋白接合以放大分子量，因此在研究之初必須要嘗試多種衍生及蛋白接合方法才能成功製備抗原。本實驗使用 γ-globulin 與 DINP 接合，然而 DINP 在結構上並沒有適合和蛋白質接合的官能基 (如：氨基及羧基) (圖一)，且目前 DINP 亦尚未有免疫抗原接合相關的研究發表，因此本實驗方法是參考自 Zhang (2006) 接合 Dibutyl phthalate (DBP) 的方法 (Zhang *et al.*, 2006) 並加以修改，應用於 DINP 的免疫原置備。實驗初期預計利用 4-硝基鄰苯二甲酸 (4-Nitrophthalic acid) 及異壬醇 (7-Methyl-1-octanol) 經過酯化反應產生 4-硝基鄰苯二甲酸二異壬酯 (Diisononyl-4-nitrophthalate)，再把產物經由鋅粉還原反應，並與 γ-globulin 進行接合，產生出具有刺激免疫反應的抗原 DINP-γ-globulin (附錄二 A)。但由於無法購買到異壬醇 (7-Methyl-1-octanol)，因此本實驗合成的原料是使用結構上少了一個分支碳的正辛醇 (Octanol) 代替異壬醇，來合成出與 DINP 結構極為相似的化合物 (附錄二 B)。

實驗結果顯示 DINP-γ-globulin 的免疫效果不是很好，經推測歸納出兩個原因。第一，可能目前我接合蛋白所使用的重氮法及 DCC / NHS 修飾法雖然能成功接合載體蛋白與 DINP，但接合出之抗原可能不足以誘發專一性的抗體產生。第二，亦有可能是實驗初期合成 DINNP 之步驟時使用 Octanol 代替購買不到的 7-Methyl-1-octanol 所致，由於產物尾部共少兩個甲基，造成免疫小鼠後，其抗體辨識 DINAP 之抗原結合位 (Epitope) 可能與辨識 DINP 標準品之抗原結合位構型不相同，導致小鼠抗體無法成功辨識 DINP 尾部之構型。日後我將藉由調整抗原的劑量觀察是否能夠提高抗體的專一性，並著手尋找新的接合方法接合 DINP 與 γ-globulin 再免疫新的小鼠，此外我亦會嘗試始用不同的載體蛋白

接合免疫抗原並觀察免疫效果，當確定小鼠可成功產生穩定抗體後，便利用該小鼠製備出具專一性辨認 DINP 的單株抗體。並且著手免疫紐西蘭大白兔，製備出較大量的多株抗體，期望藉由單株及多株抗體的製備，成功應用於 DINP 快速免疫檢測系統。

圖表

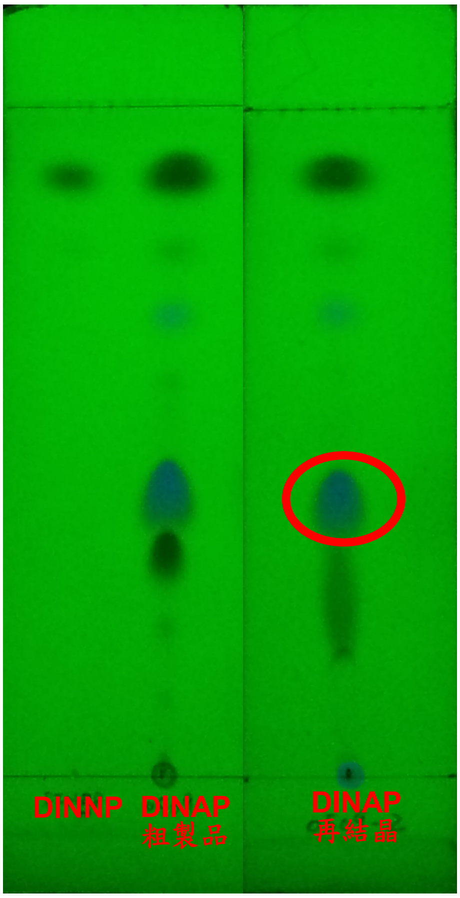
(Figures and Tables)



圖一、Diisononyl phthlate (DINP) 的化學結構

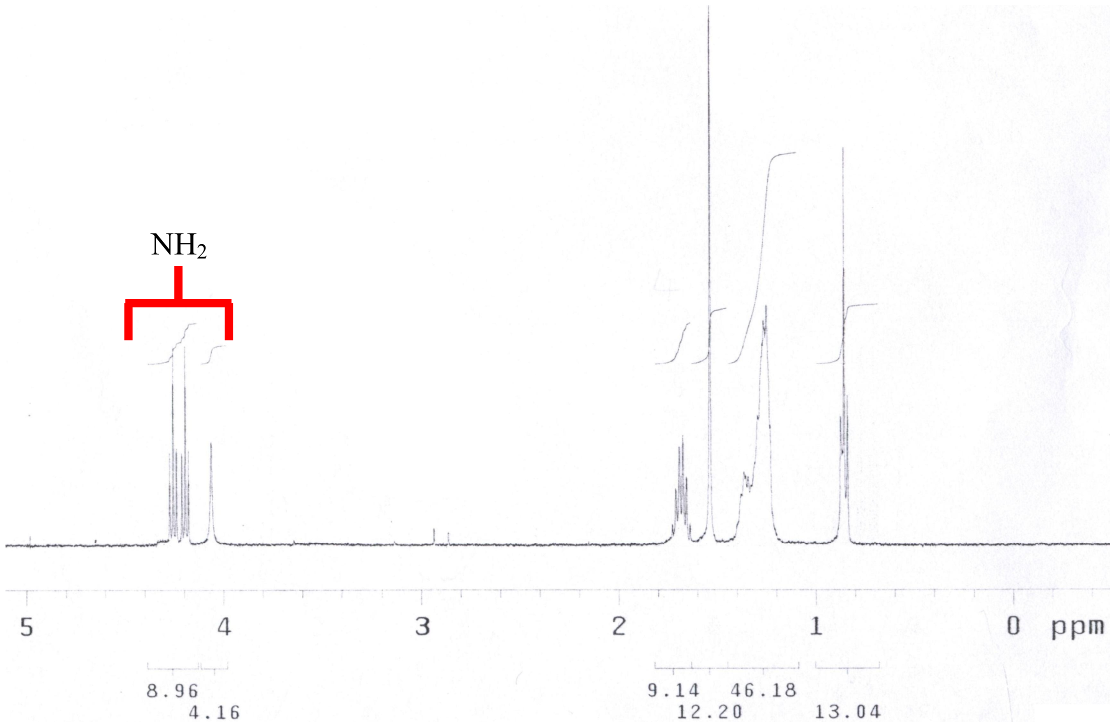
圖二、利用 TLC 觀察 DINP 與自行合成 DINNP 之性質

由左而右分別比較 DINP 標準品、4-硝基鄰苯二甲酸 (4-Nitrophthalic acid，4-NP)、正辛醇 (Octanol) 以及 4-硝基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-nitrophthalate，DINNP) 四者之間的極性變化。



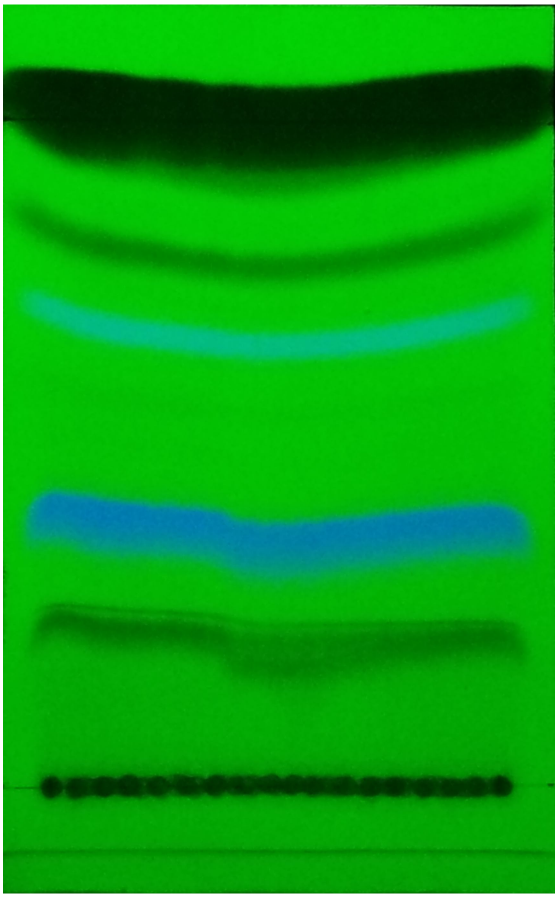
圖三、利用 TLC 檢測還原反應前後 DINNP 與 DINAP 之性質變化

由左而又分別比較 4-硝基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-nitrophthalate，DINNP)、4-氨基鄰苯二甲酸二辛酯 (Dioctyl-4-amino phthalate，DINAP) 再結晶前後三者間的極性變化。

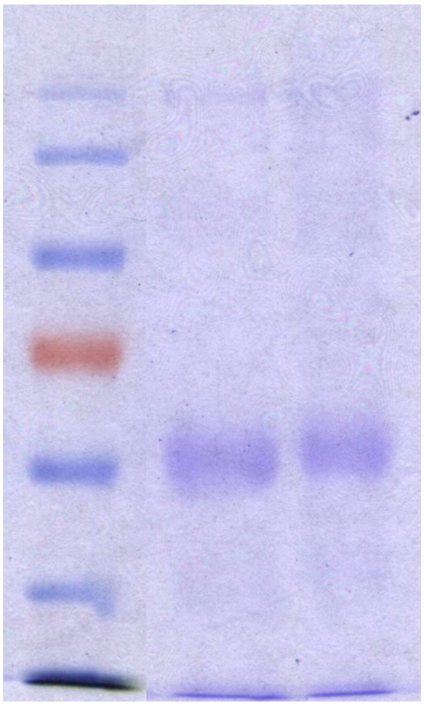


圖四、利用 NMR 檢測還原反應產物是否帶有氨基 (amino group)

NMR 之測定結果顯示有 NH2 之波峰存在，表示鋅粉還原反應成功。

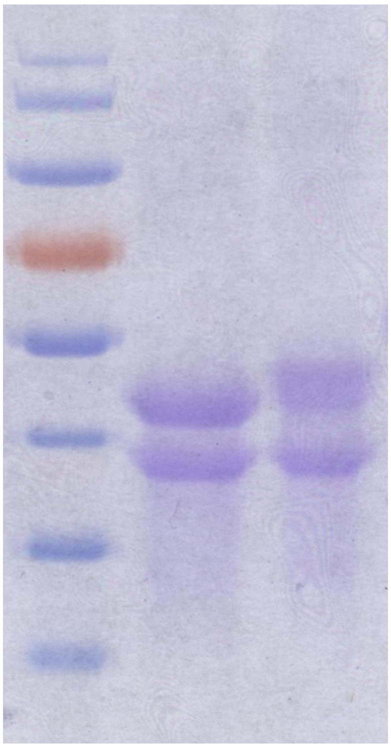


圖五、利用 TLC 將所有的鋅粉還原反應之產物層析分離



圖六、利用 SDS-PAGE 確認使用重氮法將抗原 DINAP 與載體蛋白 γ-globulin 的接合情形

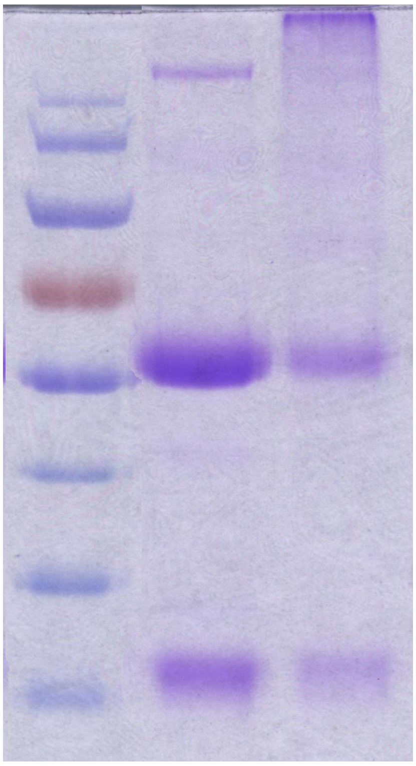
由結果可以得知 γ-globulin 和 DINAP 接合後的蛋白質帶 (protein band) 會相對於 γ-globulin 標準品的蛋白質帶 (protein band) 位置較高。



Marker　OVA 10 μg/ml　DINAP-OVA 10 μg/ml

圖七、利用 SDS-PAGE 確認覆被抗原 DINAP 與載體蛋白 OVA 接合情形。

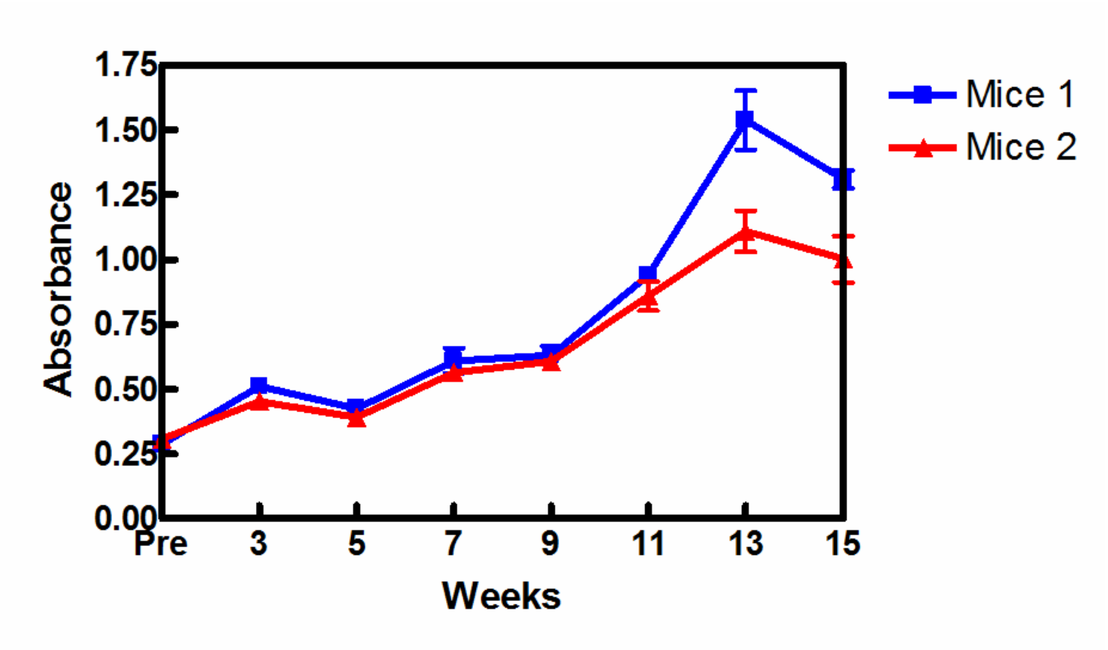
由結果可以得知 γ-globulin 和 DINAP 接合後的蛋白質帶 (protein band) 會相對於 OVA 標準品的蛋白質帶 (protein band) 位置較高。



圖八、利用 SDS-PAGE 確認使用 DCC / NHS 修飾法將抗原 DINAP 與載體蛋白 γ-globulin 的接合情形

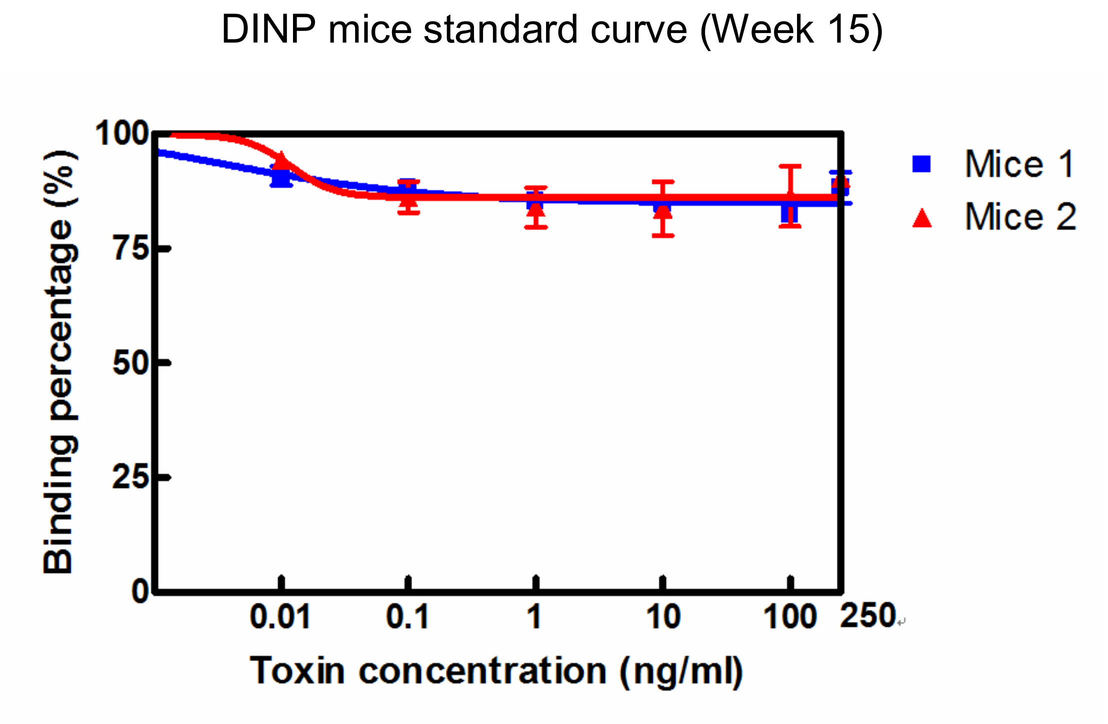
由結果可以得知 γ-globulin 和 DINAP 接合後的蛋白質帶 (protein band) 雖然較接合前的蛋白量減少許多，但仍然較 γ-globulin 標準品的蛋白質帶 (protein band) 位置高。

DINP mice titer (Pre-immune ~ Week 15)



圖九、利用非直接型 ELISA (indirect ELISA) 檢測 1 號 2 號老鼠的抗體效價

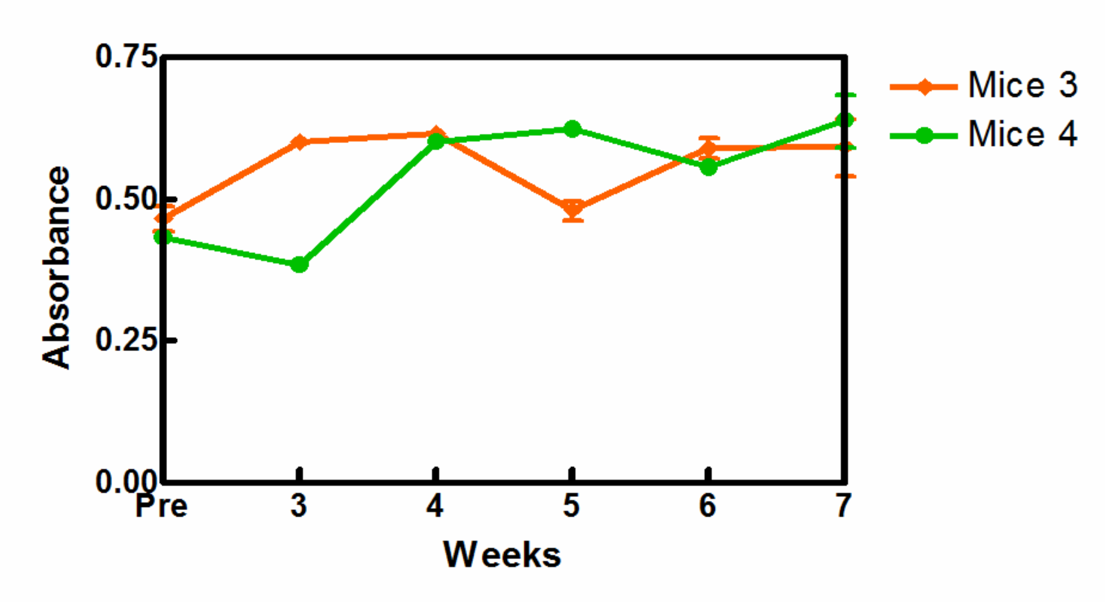
在 96 孔盤中，加入 0.1 ml / well 的 DINAP-OVA (1：500，8 μg / ml)，然後加入 0.05 ml 的 anti-DINP-polyclonal antibody (antiserum，1：500) 和 0.05 ml 的 0.01 M PBS，最後加入 0.1 ml goat-anti-mouse-HRP conjugate (1：20000，0.1 μg / ml)。結果顯示抗體的效價有隨著每週的加強免疫持續上升。所有數據皆為 2 次獨立實驗所求得的平均值。



圖十、利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 檢測 1 號 2 號老鼠的抗體專一性

在 96 孔盤中，加入 0.1 ml / well 的 DINAP-OVA (1：500，8 μg / ml)，然後加入 0.05 ml 的 anti-DINP-polyclonal antibody (antiserum，1：500) 和 0.05 ml 的 DINP 標準品，最後加入 0.1 ml goat-anti-mouse-HRP conjugate (1：20000，0.1 μg / ml)。結果顯示抗體的效價有隨著每週的加強免疫持續上升。所有數據皆為 2 次獨立實驗所求得的平均值。對照組 (control，無標準品競爭) 的吸光值 (A_0) 為 1.65 (1 號) 及 1.45 (2 號)。

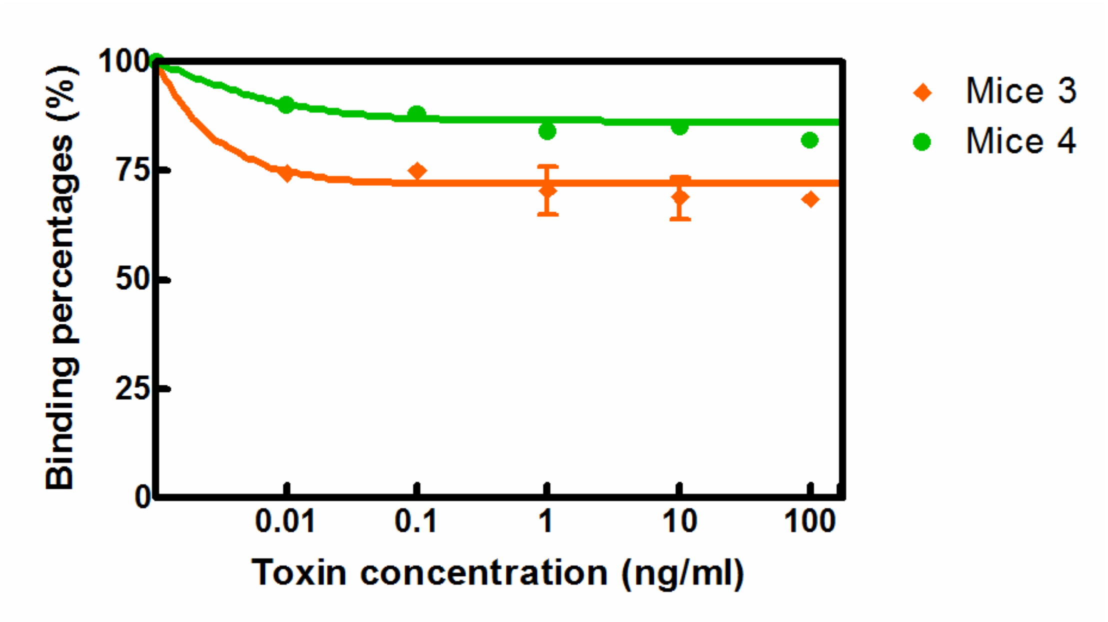
DINP mice titer (Pre-immune ~ Week 7)



圖十一、利用非直接型 ELISA (indirect ELISA) 檢測 3 號 4 號老鼠的抗體效價

在 96 孔盤中，加入 0.1 ml / well 的 DINAP-OVA (1：500，8 μg / ml)，然後加入 0.05 ml 的 anti-DINP-polyclonal antibody (antiserum，1：500) 和 0.05 ml 的 0.01 M PBS，最後加入 0.1 ml goat-anti-mouse-HRP conjugate (1：20000，0.1 μg / ml)。結果顯示只有 4 號老鼠抗體的效價隨著每週的加強免疫持續上升，3 號老鼠則呈現不太穩定的趨勢。所有數據皆為 2 次獨立實驗所求得的平均值。

DINP mice standard curve (Week 4)



圖十二、利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 檢測 3 號 4 號老鼠的抗體專一性

在 96 孔盤中，加入 0.1 ml / well 的 DINAP-OVA (1：500，8 μg / ml)，然後加入 0.05 ml 的 anti-DINP-polyclonal antibody (antiserum，1：500) 和 0.05 ml 的 DINP 標準品，最後加入 0.1 ml goat-anti-mouse-HRP conjugate (1：20000，0.1 μg / ml)。結果顯示抗體的效價有隨著每週的加強免疫持續上升。所有數據皆為 2 次獨立實驗所求得的平均值。對照組 (control，無標準品競爭) 的吸光值 (A_0) 為 0.896 (3 號) 及 1.027 (4 號)。

參考文獻

(References)

彭麗文，2011，「利用大鼠肝臟酵素進行體外代謝結合液相層析質譜儀法鑑定DINP 代謝產物做為曝露指標」，成功大學環境醫學研究所學位論文。

Abb, M., Heinrich, T., Sorkau, E., and Lorenz, W. (2009). Phthalates in house dust. *Environ Int.* 35(6):965-970.

Blom, A., Ekman, E., Johannisson, A., Norrgren, L., and Pesonen, M. (1998). Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human 41 breast cancer cell line (MCF-7). *Arch Environ Contam Toxicol.* 34(3):306-310.

Earls, A. O., Axford, I. P., and Braybrook, J. H. (2003). Gas chromatography-mass spectrometry determination of the migration of phthalate plasticisers from polyvinyl chloride toys and childcare articles. *J Chromatogr A.* 983(1-2):237-246.

Hsu, J. F., Peng, L. W., Li, Y. J., Lin, L. C., and Liao, P. C. (2011). Identification of di-isononyl phthalate metabolites for exposure marker discovery using in vitro/in vivo metabolism and signal mining strategy with LC-MS data. *Anal Chem.* 83(22):8725-8731.

Koch, H. M., Müller, J., and Angerer, J. (2007). Determination of secondary, oxidised di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 847(2):114-125.

Kransler, K. M., Bachman, A. N., and McKee, R. H. (2012). A comprehensive review of intake estimates of di-isononyl phthalate (DINP) based on indirect exposure models and urinary biomonitoring data. *Regul Toxicol Pharmacol.*

62(2): 248-256.

Lamb, J. C., Chapin, R. E., Teague, J., Lawton, A. D., and Reel J. R. (1987). Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 88(2):255-269.

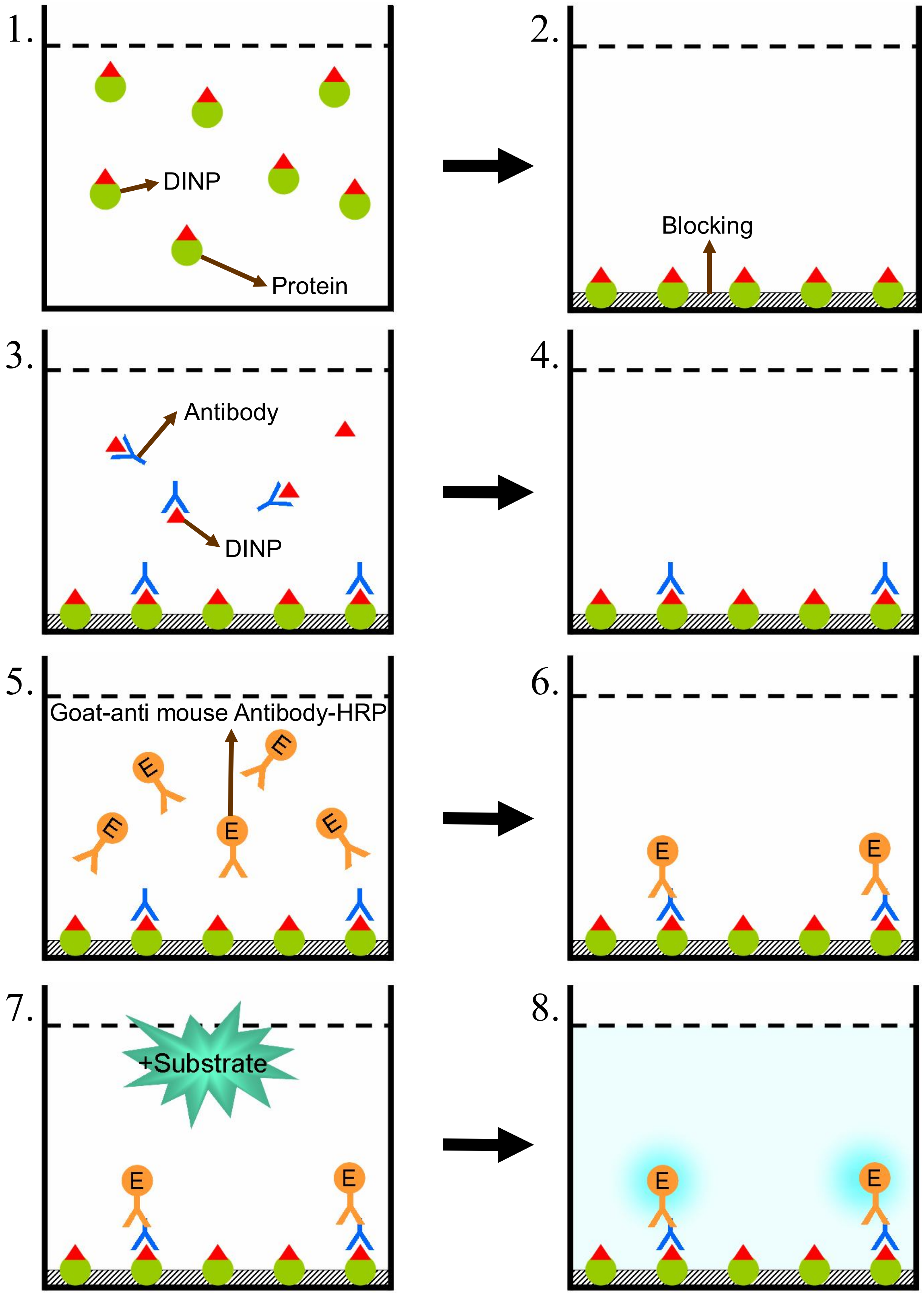
Silva, M. J., Kato, K., Wolf, C., Samandar, E., Silva, S. S., Gray, E. L., Needham, L. L., and Calafat, A. M. (2006). Urinary biomarkers of di-isononyl phthalate in rats. *Toxicology.* 223(1-2):101-112.

Sørensen, L. K. (2006). Determination of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 20(7):1135-1143.

Zhang, M. C., Wang, Q. E., and Zhuang, H. S. (2006). A novel competitive fluorescence immunoassay for the determination of dibutyl phthalate. *Anal Bioanal Chem.* 386: 1401-1406.

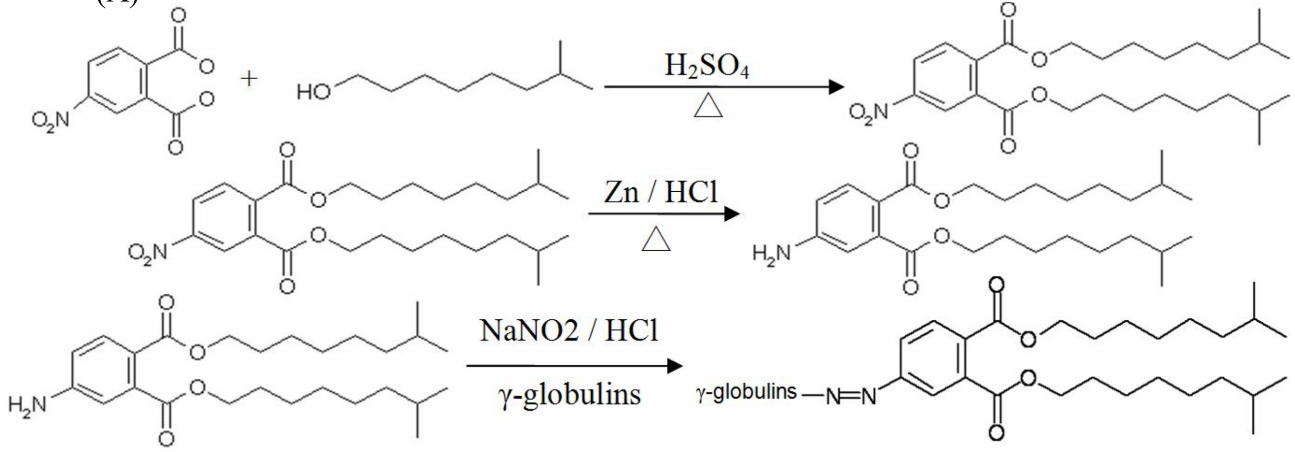
附錄

(Appendices)

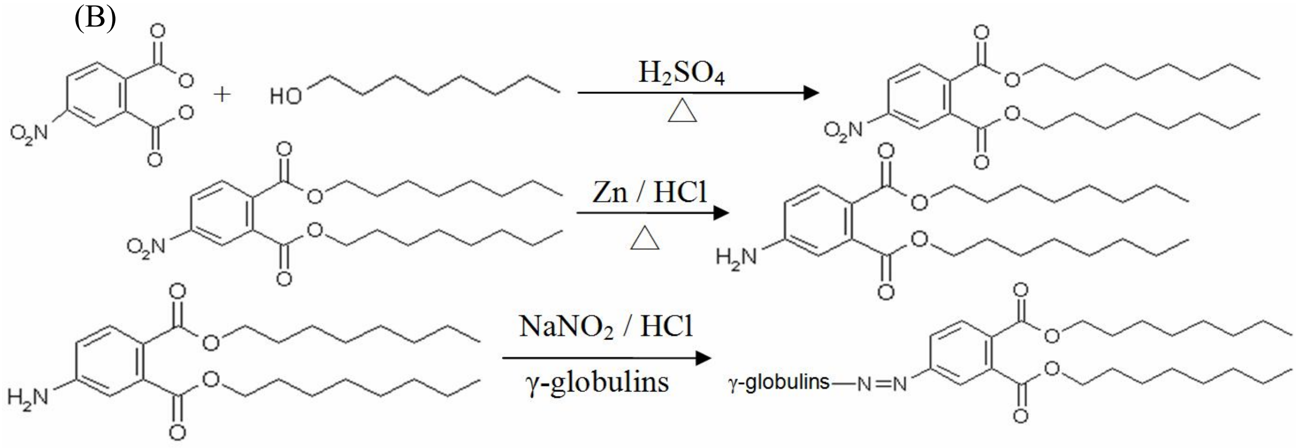


附錄一、非直接競爭型酵素連結免疫分析法 (ciELISA) 示意圖

(A)



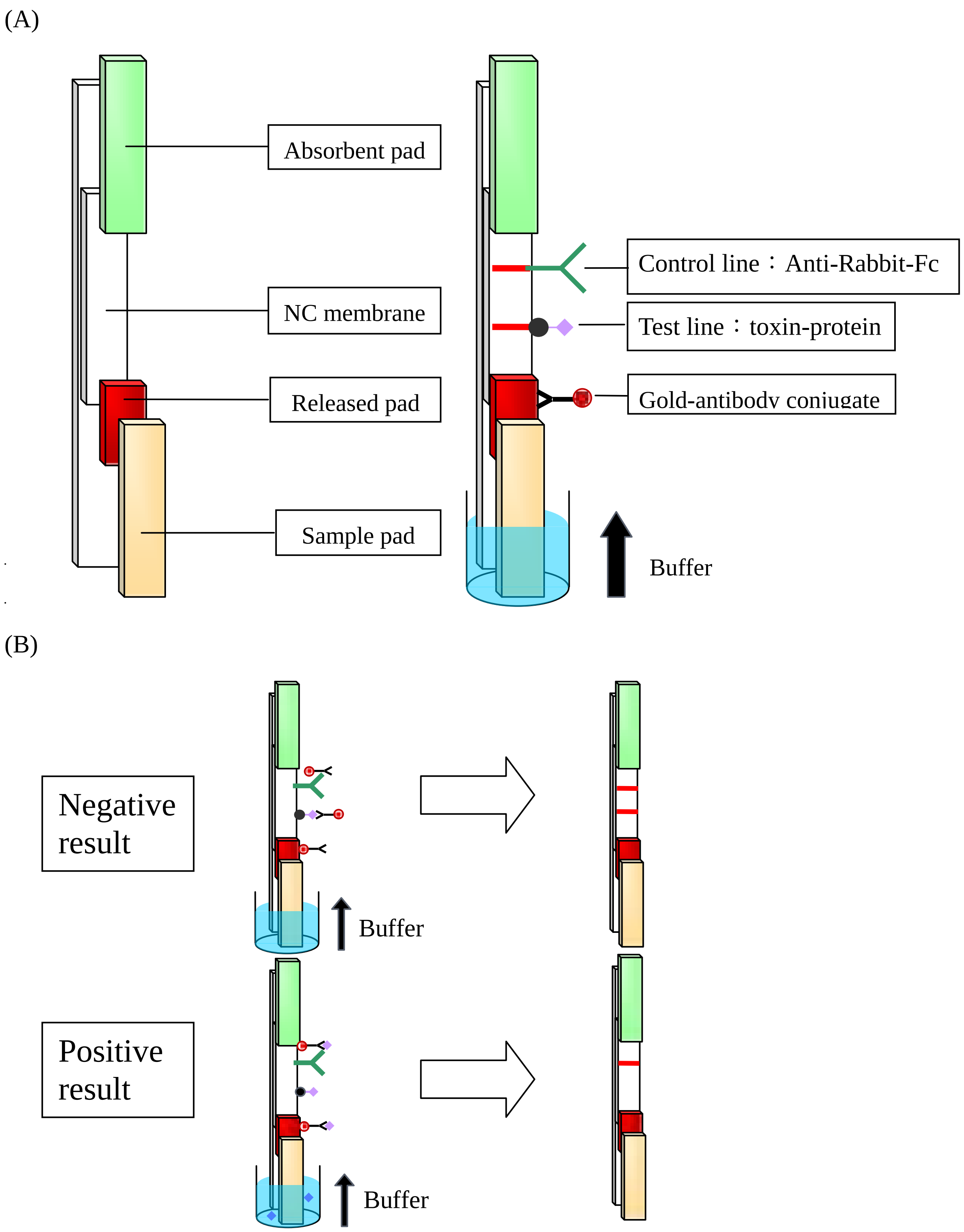
(B)



附錄二、免疫抗原製備流程

(A) 利用 7-Methyl-1-octanol 合成免疫抗原 DINP-γ-globulin 的製備流程。

(B) 使用 Octanol 取代 7-Methyl-1-octanol 合成免疫抗原 DINP-γ-globulins 的製備流程。



附錄三、免疫層析試紙

(A) 免疫層析試紙之組成架構。(B) 免疫層析試紙之分析結果。