

科技部補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫：芬普尼(Fipronil)多株抗體之製備及酵素免疫分析法 *
* 名稱：與奈米金粒子免疫層析試紙之開發 *
* ***** *

執行計畫學生： 吳仕偉
學生計畫編號： NSC 102-2815-C-040-018-B
研究期間： 102年07月01日至103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 103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 *
* : 芬普尼(Fipronil)多株抗體之製備及酵素免疫分析法 *
* 名稱 與奈米金粒子免疫層析試紙之開發 *
* *

執行計畫學生：吳仕偉

學生計畫編號：NSC102-2815-C-040 -018 -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：103年3月31日

摘要 (Abstract)

芬普尼 (Fipronil) 為一種苯基吡唑類殺蟲型農藥，其作用機制在於阻礙動物 γ -氨基丁酸控制的氯化物代謝，使動物的中樞神經系統中毒而死亡。由於 Fipronil 是分子量為 437.14 Dalton 的小分子化合物，只具有抗原性 (Antigenicity) 而不具有免疫原性 (Immunogenicity)，若直接將 Fipronil 免疫小鼠及兔子並不足以引發免疫反應，因此 Fipronil 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 Fipronil 的多株抗體。

由於有文獻指出可利用將 Fipronil 衍生後的衍生物來接合載體蛋白，用以免疫小鼠及兔子，因此本研究依照此一方法進行衍生及接合，但並無法成功的完成衍生的動作，故測試了另外一方法。此外 Fipronil 擁有一個胺基且為脂溶性及略水溶性，因此可以利用 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide (EDC) /N-Hydroxysuccinimide (NHS) 法及 N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) /NHS 法來進行接合載體蛋白 BSA 的動作，藉由 SDS-PAGE 可以發現 EDC/NHS 法接合效果較 DCC/NHS 為佳，故將用 EDC/NHS 法接合的抗原打入小鼠體內，使小鼠產生對 Fipronil 具專一性的抗體。藉由 indirect competitive ELISA (ciELISA) 來觀察抗體的專一性，從結果得知，抗體的專一性並不明顯且效價也不會隨著周數上升，所以本研究又利用了 EDC/NHS 法接合其他載體蛋白 γ -globulin 及 KLH，並用此抗原來免疫小鼠，從 ciELISA 結果得知用 γ -globulin 作為載體蛋白接合的抗原免疫小鼠後，在第三週至第五周時皆有產生專一性的抗體，一號小鼠 IC_{50} 大約在 0.5 ng/ml，二號小鼠 IC_{50} 位在 5 ng/ml 至 10 ng/ml 之間，但抗體專一性越來越弱，本研究推測為抗原的免疫效果不佳，另外還發現小鼠在未打入抗原時體內已有 Fipronil 抗體，推測 Fipronil 可能會和飼料中的些許蛋白質產生作用，因而使小鼠產生抗體，本研究也將接合 γ -globulin 的抗原打入兔子體內，藉由 ciELISA 結果得知在第二十八週時抗體 IC_{50} 位在 500 ng/ml 至 1000 ng/ml 之間，而用 KLH 作為載體蛋白接合的抗原免疫小鼠後，

第三週時一號小鼠及二號小鼠的 IC_{50} 皆位在 100 ng/ml 至 500 ng/ml 之間，但專一性也越來越弱，因此未來本研究的方向為持續觀察兔子所產生的抗體對於 Fipronil 的專一性，重新將 Fipronil 接合 γ -globulin 及 KLH 等蛋白用以免疫小鼠，以達到原本的抗體對 Fipronil 的專一性或使之擁有更好的專一性，另外也會嘗試不同的接合方式，期望能製備出具有良好專一性之多株抗體。

目錄 (Index)

主題	頁數
摘要	2
一，緒論	6
1.1 研究起源	6
1.2 芬普尼 (Fipronil) 基本性質	6
1.3 芬普尼 (Fipronil) 相關研究	7
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	9
1.6 研究動機及研究問題	10
二，材料與方法	12
2.1 實驗藥品及動物	12
2.2 實驗儀器	13
2.3 實驗方法	13
2.3.1 HPLC 的建立	13
2.3.2 製備不同芬普尼 (Fipronil) 接合物	14
2.3.3 利用 TLC 確認衍生物的產生	16
2.3.4 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合	16
2.3.5 免疫小鼠及兔子	17
2.3.6 多株抗體的純化	18
2.3.7 利用 indirect competitive ELISA 確定抗體效價及專一性	19
2.3.8 製備奈米金粒子探針	20
2.3.9 免疫試紙的製備	20
三，實驗結果	21

3.1 HPLC	21
3.2 TLC 確認衍生物	21
3.3 SDS-PAGE 確認抗原接合	22
3.4 抗體效價及專一性測試	25
四，討論	36
五，參考文獻	39

一，緒論 (Introduction)

1.1 研究起源

Fipronil 為一種苯基吡唑類殺蟲型農藥，可被用來撲殺甲殼類的動物，如：螞蟻，白蟻，甲蟲，蟑螂，扁蝨，浮游動物以及蜜蜂等昆蟲，而 Fipronil 也常在我國最有名的出口經濟作物-茶葉中被檢驗出有其殘留，若能在出口茶葉前，先檢驗出有 Fipronil 的殘留，不僅僅能讓我國茶葉在國際的形象有太大的提升，更對於我國出口經濟有正面的影響。

由於研究報告指出 Fipronil 會使動物的中樞神經系統中毒，產生刺痛，嗜睡，動作不協調，癲癇等症狀，甚至會導致死亡，因此日本厚生勞動省醫藥食品局食品安全部在 2012 年 12 月發布進口食品的監控計劃，加強茶葉中 Fipronil 的檢查，Fipronil 甚至已被義大利，法國，中國大陸，英國及澳洲等國禁用。國內於 2010 年 9 月，北市抽驗阿里山的高山茶發現有 Fipronil 的殘留，引起愛喝茶的國人對於茶葉農藥殘留的重視；2012 年 9 月，更在連鎖飲料店所使用的茶葉中發現了 Fipronil 的殘留；2013 年 1 月，南市抽驗市售的茶葉，又發現了 Fipronil 的殘留，顯示檢測茶葉中 Fipronil 的殘留量已刻不容緩。

1.2 芬普尼 (Fipronil) 基本性質

芬普尼 (Fipronil) 化學名為 ([5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile) 分子量為 437.14 Dalton (結構式見 Figure 1) ，是 Rhone-Poulenc Agro 在 1989 年開發的新型廣效型殺蟲劑，對於許多已對環戊二烯類，菊酯類，氨基甲酸酯類殺蟲劑產生抗藥性的害蟲都有極高的敏感性，且使用需求量少，藥效持續性長 (Jian *et al.*, 2001)，目前被廣用在防治茶葉，水稻，蔬果等多種作物的害蟲孳生，其中以茶葉為大宗。Fipronil 已被證實其作用機制在於阻礙動物 γ -氨基丁酸控制的氯化物代謝，進而干擾動物中樞神經系統的活

性，並在足夠劑量時，造成動物的死亡 (Cole *et al.*, 1993)。

在食品藥物管理局所發表的【100年度食品後市場監測結果與趨勢分析】報告中指出民國 97~100 年度共有 54 件農作物含有過量的 Fipronil，約佔所有農藥殘留的 5%，顯示 Fipronil 的殘留量是一個值得關注的議題，在不同農作物 Fipronil 容許量的規定包括玉米，米類，芒果，小黃瓜為 1 ppb，包莖菜茶葉類，茄子為 30 ppb，紅豆為 2 ppb，在茶葉的部份 2009 年規定 Fipronil 的殘留量限制必須在 2 ppb 以下，並在 2012 年將其殘留量限制下修至 1 ppb 以下。

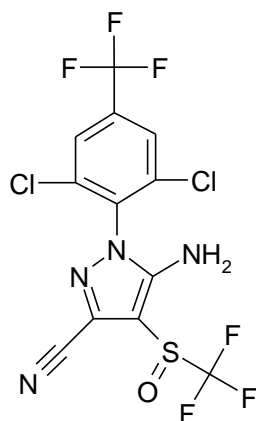


Figure.1 芬普尼 (Fipronil) 結構式

1.3 芬普尼 (Fipronil) 相關研究

目前最常用來檢測 Fipronil 的技術是利用高效液相層析色譜法 (HPLC) (Bobe *et al.*, 1998) 及氣相層析質譜法 (GC-MS) (Vilchez *et al.*, 2001)，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，而操作簡易且相對成本較低，靈敏度較高的酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 是一個能快速檢測其殘留量的方法，所以利用酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 檢測 Fipronil 殘留量是另一可行的辦法 (Liu *et al.*, 2007)。

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，並可以配合酵素的呈色作用，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與否，而酵素連結免疫分析法以操作發法的不同可區分為三種：直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay)，非直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay)，三明治型酵素連結免疫分析法 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)，本研究使用非直接競爭型酵素連結免疫分析法來做為檢測的方法，接下來簡單的描述本方法的原理。

非直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay)

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 2)

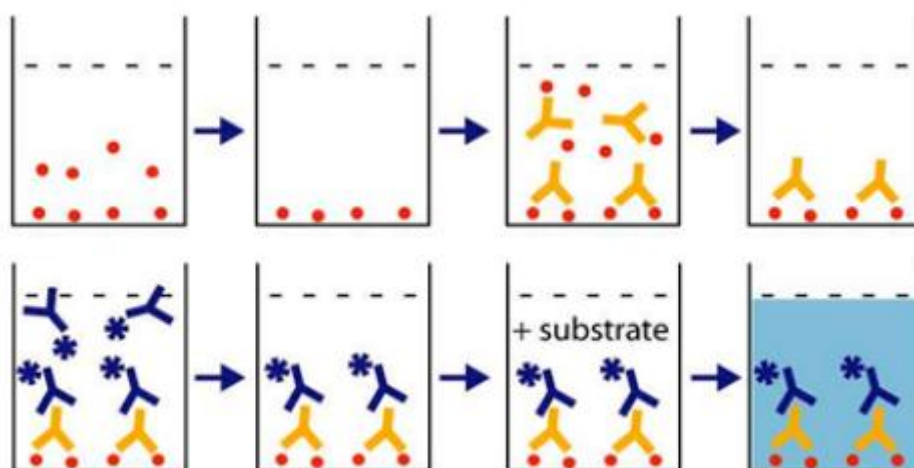


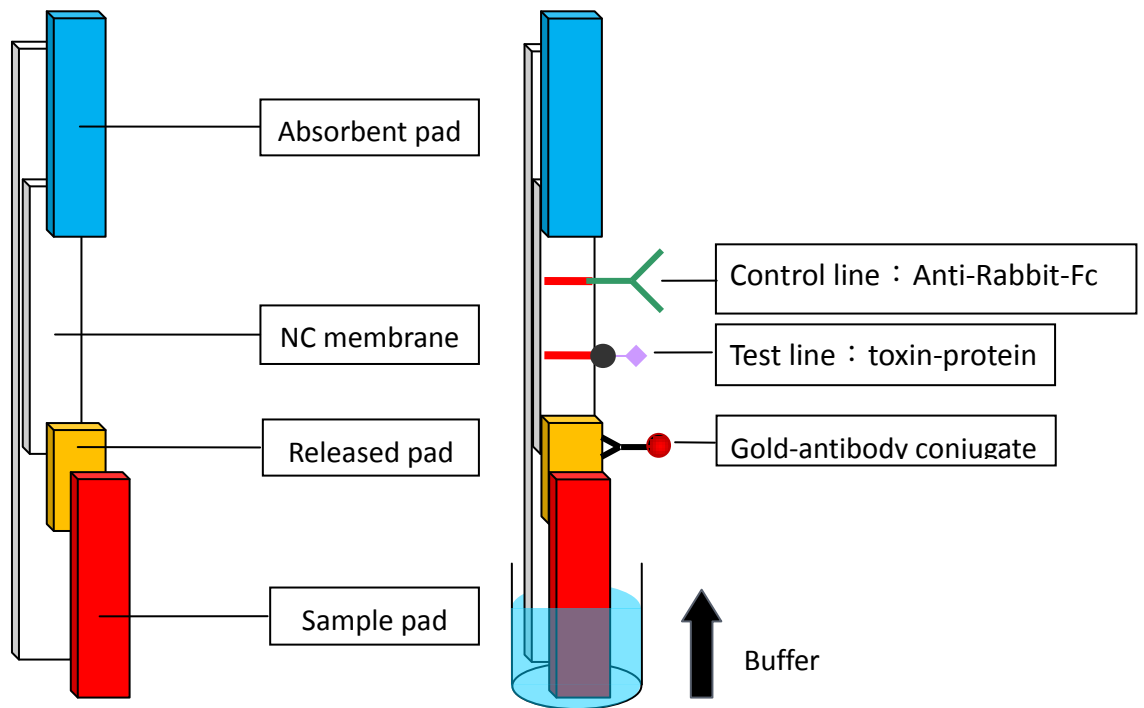
Figure.2 非直接競爭型酵素連結免疫分析法

酵素連結免疫分析法 (ELISA) 的優點為樣品準備較不複雜且進行實驗的時間較為快速，成本的開銷也相對於 HPLC 或是 GC-MS 來的低，儘管 ELISA 的準確性不會比 HPLC 及 GC-MS 來的好，不過卻是一個相對較為廉價且實用的檢測方式。

1.5 快速免疫層析試紙

快速免疫層析試紙 (Figure 3) 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作為基質，並把抗原及作為抗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，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。

(A) Negative 結果



(B) Positive 結果

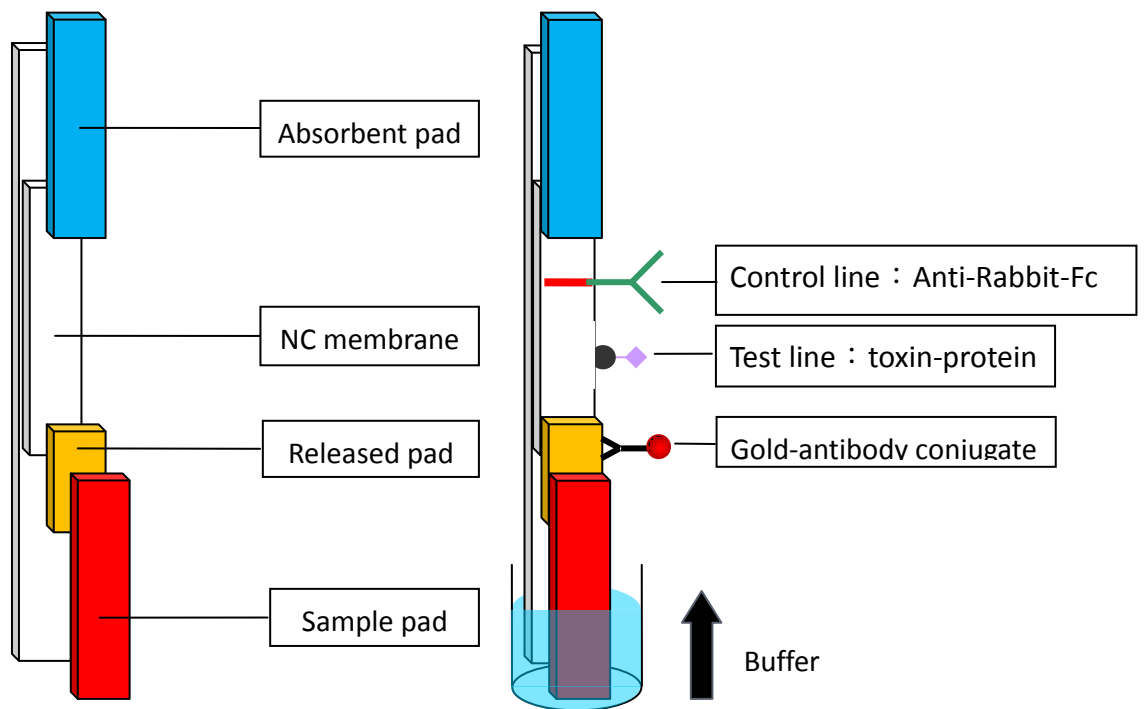


Figure 3 免疫層析試紙組成份與分析結果。(A) 陰性結果；(B) 陽性結果。

1.6 研究動機及研究問題

目前檢測 Fipronil 的方法主要有高效液相層析色譜分析法 (HPLC) 及氣相層析質譜法 (GC-MS)，這兩種方法雖然檢測結果具有一定的準確性，但操作步驟較為繁複，且具有技術層面及檢測費用的困擾及需要專業技術的人員進行儀器操作。酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 在偵測的靈敏度上優於上述方法，且操作較為快速，簡便。因此製備出高敏感度與高專一性的 Fipronil 抗體以開發酵素連接免疫吸附法 (ELISA)，再以此 Fipronil 抗體開發快速免疫層析試紙，對於檢測市面上茶飲品或其他使用茶葉所製作出的產品及其它可能會有 Fipronil 殘留的農作物是迫切需要的。

我們將此研究計畫分為三個子目標：

【子目標一】：製備專一性 Fipronil 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 Fipronil 的含量。

- 直接競爭型 ELISA
- 非直接競爭型 ELISA

【子目標三】：開發 Fipronil 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

2.1 實驗藥品及動物

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

Gelatin	Ammonium persulfate
Ovalbumin (OVA)	Coomassie Brilliant Blue R-250
Freund's complete adjuvant	Fipronil
N, N, N',N'-tetramethylethylenediamine	γ -globulin
Bovine serum albumin (BSA)	Keyhole limpet hemocyanin (KLH)
Sodium bicarbonate	Tris
Carbonyldiimidazole	Sodium nitrite

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)

Acetic acid

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)

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
pH meter	METTLER TOLEDO MP220
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
HPLC Pump	BACKMEN
HPLC Detector	JASCO
HPLC column	Merck

2.3 實驗方法

2.3.1 HPLC 的建立

本研究的高效能液相層析儀利用 C18 column 結合螢光偵測器來做分析，其分析原理是根據極性大小來分離，因固定相為非極性且移動相為極性，所以稱為 reverse phase。

將 Fipronil 毒素的標準品，取 10 μ l 打入 Lichrospher C18 reverse phase column (25 cm x 4.6 mm，5 μ m)，前配備連結 Lichrospher C18 guard column (4 cm x 4.0 mm，5 μ m)，最後利用動態相的溶劑 (Acetonitrile / Methanol，50% / 50%)，以流速 1 ml / min，分析三十分鐘，用激發波長 220 nm 激發 Fipronil 和 Fipronil 的發射波長 450 nm 偵測其螢光強度，以 Beckman System Gold

Nouveau software 分析，建立 HPLC 曲線。

2.3.2 製備不同芬普尼 (Fipronil) 接合物

由於 Fipronil 為小分子化合物，分子量為 437.14 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，本研究參考 Alain Bobe 的方法 (Bobe *et al.*, 1998) 製備出 Fipronil 的類似物 FH，及利用 EDC/NHS 法和 DCC/NHS 法將 Fipronil 與載體蛋白 BSA (Bovine Serum Albumin, 牛血清蛋白)， γ -globulin，KLH (Keyhole limpet hemocyanin, 匙孔血藍蛋白) 接合，產生出具有刺激免疫反應的抗原。

2.3.2-1 製作 Fipronil 衍生物

秤取 Fipronil 20 mg 溶於 1 ml 丙酮中，將其緩慢滴加到 1 ml，pH = 12 的氫氧化鈉溶液中，攪拌並反應 12 小時，用鹽酸調製 pH = 5，收集黃色沉澱物。將黃色沉澱物溶於少量的氫氧化鈉溶液後，再次用鹽酸沉澱，反覆洗滌三次。

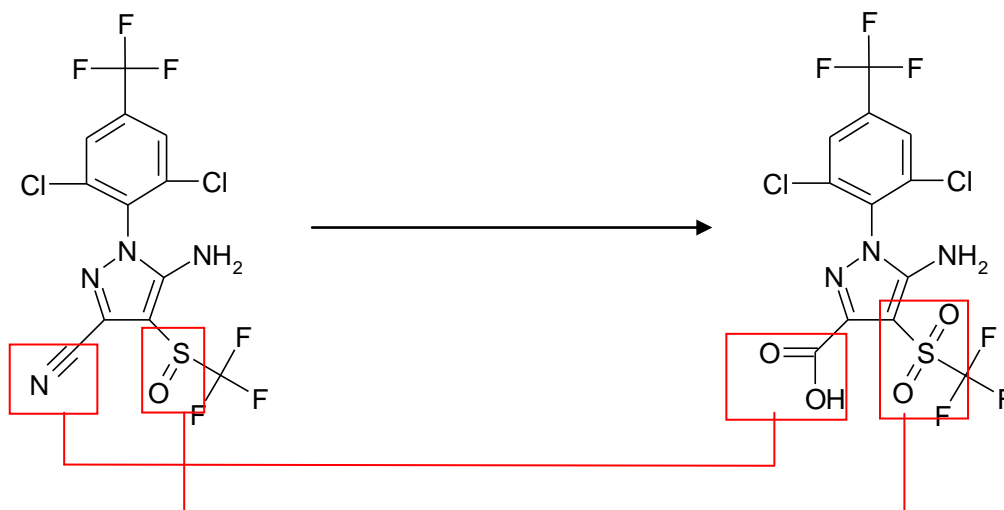


Figure 4 Fipronil 衍生示意圖。

2.3.2-2 使用 EDC/NHS 法將 Fipronil 與載體蛋白 BSA 接合

秤取 1 mg Fipronil 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 0.4 mg NHS 及 0.9 mg EDC 溶於 90 ml DMF 中，將其緩慢加入到 100 μ l DMF (含有 1 mg Fipronil) 中，

室溫攪拌 2 小時。秤取 BSA 1 mg 溶於 100 μ l 0.1 M Carbonate buffer (16 μ l sodium carbonate + 34 μ l sodium bicarbonate + 50 μ l ddH₂O) 中緩慢加入 DMF (含有 Fipronil、NHS 及 EDC) 混合液中，在 4°C 下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.2-2 使用 DCC/NHS 法將 Fipronil 與載體蛋白 BSA 接合

秤取 1 mg Fipronil 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 0.4 mg NHS 及 0.9 mg DCC 溶於 90 ml DMF 中，將其緩慢加入到 100 μ l DMF (含有 1 mg Fipronil) 中，室溫攪拌 2 小時。秤取 BSA 1 mg 溶於 100 μ l 0.1 M Carbonate buffer (16 μ l sodium carbonate + 34 μ l sodium bicarbonate + 50 μ l ddH₂O) 中緩慢加入 DMF (含有 Fipronil、NHS 及 DCC) 混合液中，在 4°C 下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.2-4 使用 EDC/NHS 法將 Fipronil 與載體蛋白 γ -globulin 接合

秤取 1 mg Fipronil 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 0.4 mg NHS 及 0.9 mg EDC 溶於 90 ml DMF 中，將其緩慢加入到 100 μ l DMF (含有 1 mg Fipronil) 中，室溫攪拌 2 小時。秤取 γ -globulin 2 mg 溶於 200 μ l 0.1 M Carbonate buffer (16 μ l sodium carbonate + 34 μ l sodium bicarbonate + 50 μ l ddH₂O) 中緩慢加入 DMF (含有 Fipronil、NHS 及 EDC) 混合液中，在 4°C 下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.2-5 使用 EDC/NHS 法將 Fipronil 與載體蛋白 KLH 接合

秤取 1 mg Fipronil 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 0.4 mg NHS 及 0.9 mg EDC 溶於 90 ml DMF 中，將其緩慢加入到 100 μ l DMF (含有 1 mg Fipronil) 中，室溫攪拌 2 小時。秤取 KLH 2 mg 溶於 200 μ l 0.1 M Carbonate buffer (16 μ l sodium carbonate + 34 μ l sodium bicarbonate + 50 μ l ddH₂O) 中緩慢加入 DMF (含有 Fipronil、NHS 及 EDC) 混合液中，在 4°C 下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

2.3.2-6 使用 EDC/NHS 法將 Fipronil 與 OVA (Ovalbumin ，卵白蛋白) 接合作為覆被抗原

秤取 1 mg Fipronil 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 0.4 mg NHS 及 0.9 mg EDC 溶於 90 ml DMF 中，將其緩慢加入到 100 μ l DMF (含有 1 mg Fipronil) 中，室溫攪拌 2 小時。秤取 OVA 16 mg 溶於 1600 μ l 0.1 M Carbonate buffer (128 μ l sodium carbonate + 272 μ l sodium bicarbonate + 800 μ l ddH₂O) 中緩慢加入 DMF (含有 Fipronil 、 NHS 及 EDC) 混合液中，在 4°C 下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 72 小時。

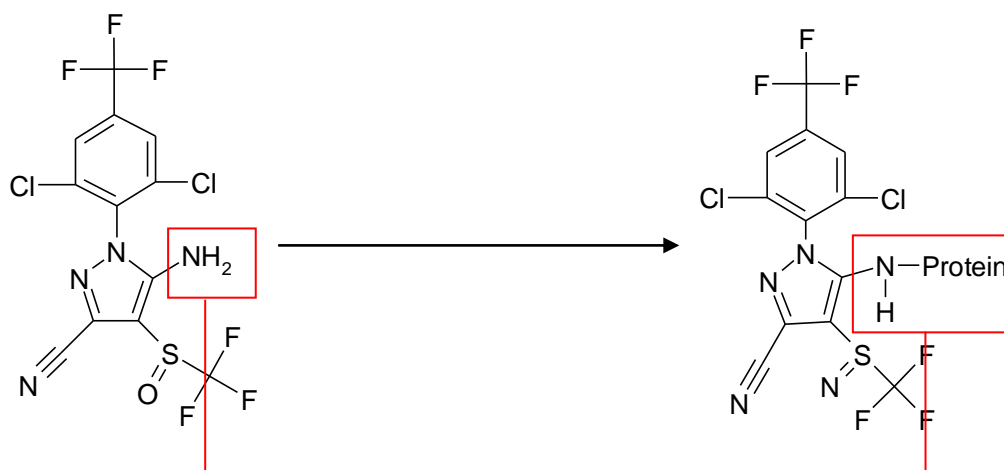


Figure 5 Fipronil 利用 EDC/NHS 法或 DCC/NHS 法接合示意圖。

2.3.3 利用 TLC 確認衍生物的產生

取 5 μ l 的 Fipronil 標準品 和 1 μ l 已製備出的 Fipronil 衍生物，點在 TLC Silica gel 60 F254 上，以展開液 (acetone : methanol = 1 : 1) 展開之，將展開完成之 TLC 於波長 254 nm 下觀察其結果。

2.3.4 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合

2.3.5-1 製作 0.75 nm 10% 的下層解析膠體

分別取 4,000 μ l 的 dd H₂O，3,300 μ l 的 30% Acrylamide，2,500 μ l 的 1.5

M Tris pH 8.8 , 100 μ l 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) , 100 μ l 10% Ammonium persulfate (APS) 與 8 μ l 的 N, N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) , 混合均勻後加入玻璃片中待其凝固。

2.3.5-2 加入酒精將下膠壓平

2.3.5-3 製作 0.75 mm 5% 的上層膠體

分別取 1,700 μ l 的 ddH₂O , 415 μ l 的 30% Acrylamide , 315 μ l 的 1.0M Tris pH 6.8 , 25 μ l 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) , 25 μ l 10% Ammonium persulfate (APS) 與 2.5 μ 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。

2.3.5-4 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 μ l 2M pH 6.8 Tris , 15% 2-Mercaptoethanol) 並平衡體積使每一管樣品體積相同 , 之後在 100°C 水中加熱 5 分鐘使蛋白質四級結構變性。

2.3.5-5 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 ddH₂O , 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 ddH₂O , 100 ml Acetic acid , 400 ml Methanol) 進行退染 , 最後使用掃描器擷取影像。

2.3.5 免疫小鼠及兔子

2.3.5-1 免疫小鼠

為了使 BALB/c 小鼠產生對 Fipronil 具有專一性的抗體 , 我們將 Fipronil-BSA 、 Fipronil- γ -globulin 及 Fipronil-KLH (0.25 mg 的 BSA 、

γ -globullin 及 KLH 溶於 475 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 Fipronil-BSA、Fipronil- γ -globullin、Fipronil-KLH (0.25 mg 溶於 475 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 Fipronil 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 Fipronil 的專一性抗體，將 Fipronil- γ -globullin (0.5 mg 的 γ -globullin 溶於 950 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 Fipronil- γ -globullin (0.5 mg 的 γ -globullin 溶於 950 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靜脈採血，並使用 ciELISA 進行檢測血清中是否產生了 Fipronil 的專一性抗體。

2.3.6 多株抗體的純化

2.3.6-1 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 冰箱中。

2.3.6-2 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。

2.3.7 利用 indirect competitive ELISA 確定抗體效價及專一性

2.3.7-1 抗體效價檢測

在 96 孔盤中，每個微孔內加入 100 µl Fipronil-OVA (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) 沖去未反應之物質。再加入 200 µl 的 blocking buffer (0.1 % Gelatin in 0.01M PBS)，在 37 °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 µl 0.01 M PBS 及 50 µl 純化過的抗體，在 37 °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 µl Goat anti-mice 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 96 孔盤兩次。最後加入 100 µl 的酵素受質 (TMB substrate) 於暗處反應 15 ~ 20 分鐘後，加入 100 µl 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。

2.3.7-2 專一性檢測

在 96 孔盤中加入 100 µl Fipronil-OVA (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。再於 96 孔盤中加入 200 µl blocking buffer (0.1 % Gelatin in 0.01 M PBS)，置於 37°C 環境中反應 30 分鐘。以 washing buffer 洗去未反應物質後，加入 50 µl 不同濃度的 Fipronil 標準品 (0.01 ~ 1000 ng/ml) 及 50 µl 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。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°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 製備奈米金粒子探針

將 Fipronil 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 Fipronil 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°C 保存備用。

2.3.9 免疫試紙的製備

先將 Fipronil 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5 μ l/strip)，37°C 環境下烘乾。再將 0.25 μ l 的 Fipronil-BSA 和 0.25 μ l 的 Anti-rabbit-Fc antibody (0.2 mg/ml) 分別點於 NC membrane (孔徑為 5 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°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 Fipronil 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 HPLC

由於目前市面上大多都用 HPLC 來檢測 Fipronil 的殘留量，因此本研究也希望在本實驗室可以建立 HPLC 的檢測方法，本研究參考行政院農委會的檢測方法加以改良，動態相的溶劑改為 (Acetonitrile / Methanol ， 50% / 50%) ， 以流速為 1 ml/min ， 分析三十分，用以建立出好的 HPLC 的標準圖，本研究發現激發光為 220 nm 時可激發 Fipronil ，且在從事 HPLC 時也印證了 HPLC 費時且檢測前樣品的準備較為繁複的缺點，因此開發操作簡易且相對成本較低，靈敏度較高的酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA)，且開發快速免疫試紙是必要的。由於存放 HPLC 實驗結果的電腦損壞，因此無法將此實驗結果放入此結報當中。

3.2 TLC 確認衍生物

本研究參考 Xianjin Liu 的方法 (Liu *et al.*, 2007) 欲衍生出 Fipronil 衍生物，衍生完成後我們將 Fipronil 的標準品及 Fipronil 的衍生物分別點在 TLC 片上，已展開液 (acetone : methanol = 1 : 1) 展開，並於 254 nm 波長下觀察結果 (Figure 6)。實驗結果 TLC 片顯示其展開後的點高度皆相同，代表極性並無改變且 Fipronil 結構也沒改變，因此得知經由此方法衍生是不可行的。但本研究發現 Fipronil 本身的結構上就擁有胺基這一官能基，故本研究接下來嘗試利用 EDC/NHS 法及 DCC/NHS 法直接接合蛋白，此一結果在 3.3 中會提到。



Figure 6 利用 TLC 觀察是否有衍生成功

由左至右分別比較 Fipronil 標準品，Fipronil 衍生物（反應完成後溶液呈澄清），Fipronil 衍生物（反應完成後溶液呈白色混濁）三者之間的極性變化。由結果得知不管是澄清還是混濁極性都沒有變化，故此衍生法並無法成功衍生出 Fipronil 衍生物。

3.3 SDS-PAGE 確認抗原接合

為了確定 Fipronil 和載體蛋白之間的接合效果及結果，本研究使用 SDS-PAGE 觀察 Fipronil 和載體蛋白接合前後之分子量的變化，用以比較接合效果及確定是否有接上。利用 EDC/NHS 法及 DCC/NHS 法接合 BSA (Figure 7)，其 SDS-PAGE 結果顯示，訊號的位置較接合前略高了一點，因此可知接合後蛋白分子量較接合前略大了一些，而 EDC/NHS 法所接合的蛋白其位置又比 DCC/NHS 法接合的蛋白略高一點，由此可知 EDC/NHS 法分子量的變化較 DCC/NHS 法大，因此可得利用 EDC/NHS 法接合上的蛋白量較大其接合效果也較好，故本研究在往後接合蛋白時皆利用 EDC/NHS 法來接合，並利用

EDC/NHS 法接合 BSA 的抗原來免疫小鼠。

利用 EDC/NHS 法接合 γ -globulin (Figure 8) ，其 SDS-PAGE 結果顯示，訊號位置較接合前略高一點，因此可知接合後蛋白分子量略大一些，故此蛋白接合是成功的，所以本研究將此一蛋白抗原免疫小鼠。

利用 EDC/NHS 法接合 KLH (Figure 8) ，其 SDS-PAGE 結果顯示，由於 KLH 的分子量較大，所以跑 SDS-PAGE 時較不易跑下去，因此無法判斷蛋白是否有接合成功，但本研究也將此一蛋白抗原免疫小鼠。

利用 EDC/NHS 法接合覆被蛋白 OVA (Figure 9) ，其 SDS-PAGE 結果顯示，訊號位置較接合前略高了一點，因此可知接合後蛋白分子量較接合前略大一點，由此可知蛋白接合是成功的，故本研究將此一蛋白用來作為非直接競爭型 ELISA 的覆被蛋白。

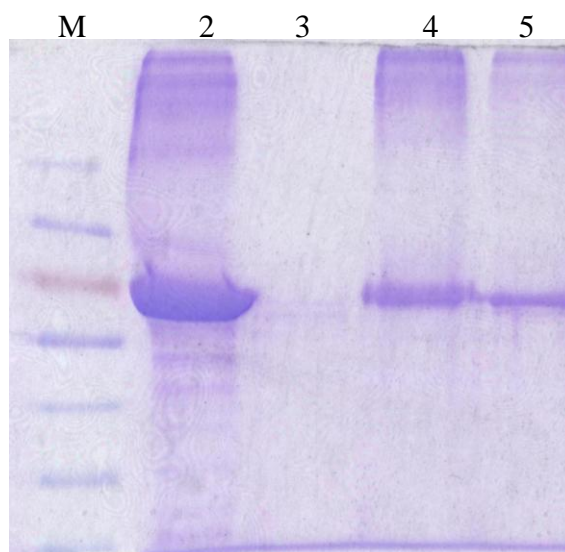


Figure 7 利用 SDS-PAGE 確認使用 EDC/NHS 及 DCC/NHS 法將 Fipronil 與載體蛋白 BSA 的接合情形

由左到右第一行為 Marker，第二行為 BSA 標準品，第三行為 Fipronil-BSA (反應完成後有白色沉澱)，第四行為使用 EDC/NHS 法接合 Fipronil-BSA (反應完成後溶液為澄清)，第五行為使用 DCC/NHS 法接合 Fipronil-BSA。由結果得知有白色沉澱時代表蛋白與蛋白自行接合，蛋白並沒有接合上 Fipronil；使用

EDC/NHS 法及 DCC/NHS 法接合且反應完成後溶液呈澄清時，BSA 和 Fipronil 接合後的蛋白質帶 (protein band) 會相對於 BSA 標準品的蛋白質帶 (protein band) 位置較高，故 BSA 有接合到 Fipronil。由 SDS-PAGE 還可以看到 EDC/NHS 法接合的蛋白質帶 (protein band) 較 DCC/NHS 法接合的蛋白質帶 (protein band) 高且顏色較深，此結果代表利用 EDC/NHS 法接合的蛋白量比 DCC/NHS 法的蛋白量多，因此得知 EDC/NHS 法接合效果較好。

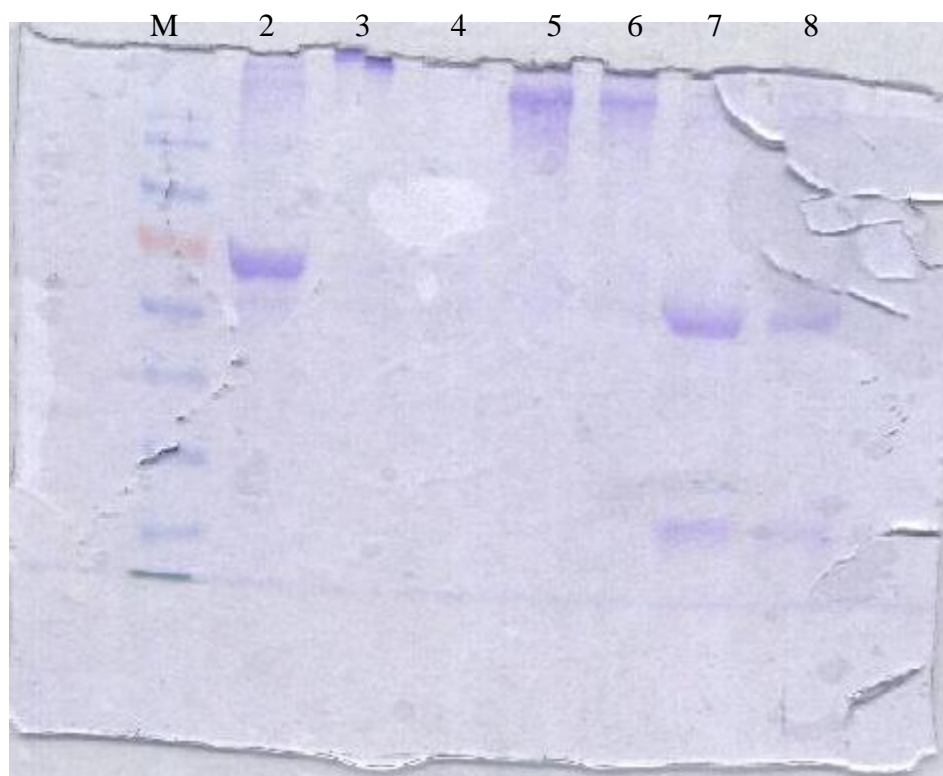


Figure 8 利用 SDS-PAGE 確認使用 EDC/NHS 法將 Fipronil 與載體蛋白 γ -globulin 及 KLH 的接合情形

由左到右第一行為 Marker，第二行為 BSA 標準品，第三行及第四行為 Fipronil-BSA，第五行為 KLH 標準品，第六行為 Fipronil-KLH，第七行為 γ -globulin 標準品，第八行為 Fipronil- γ -globulin。由結果得知此次 BSA 並沒有成功的接合；KLH 由於分子量太大，所以在 SDS-PAGE 上並無法往下跑，因此無法判別是否接合成功； γ -globulin 和 Fipronil 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，故 γ -globulin 有接合到 Fipronil。



Figure 9 利用 SDS-PAGE 確認使用 EDC/NHS 法將 Fipronil 與覆被蛋白 OVA 的接合情形

由左到右第一行為 Fipronil-OVA，第二行為 OVA 標準品，第三行為 Marker。由結果得知 OVA 和 Fipronil 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，因此可知 OVA 有接合到 Fipronil。

3.4 抗體效價及專一性測試

Fipronil-EDC/NHS-BSA 作為抗原免疫小鼠

本研究利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價的測試，本研究採用 pre-immune 至第三十四週的小鼠血清來進行抗體的效價測試，由 Figure

10 可以觀察到，一號小鼠的抗體效價在 pre-immune 時就比二號小鼠差，且可以發現在前七週時兩隻小鼠的抗體效價都有提升，但在七週至十四週時又往下掉，在第十四週至第二十一週時效價又開始往上升，本研究推測由於在抗原接合時，並不會一次就接合很大量，一次接合的量大約可以免疫兩隻小鼠七次(七週)，所以可能是接合抗原時接的並不是很好，才會造成抗體效價呈現鋸齒狀的分布。

本研究利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來測試抗體對 Fipronil 的專一性，但發現注射此一抗原的小鼠，其抗體專一性從第三周開始至死亡時的第三十四週都不甚理想，由 Figure 11 可以觀察到，不管是一號小鼠還是二號小鼠，都無法明確地看出 IC₅₀ 的位置。

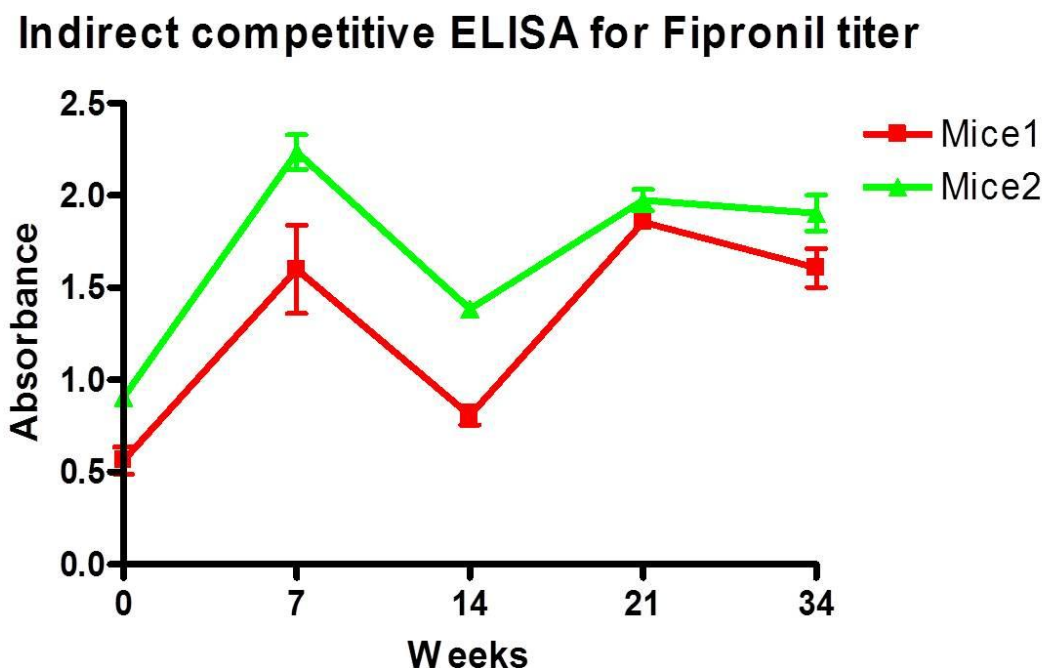


Figure 10 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行抗體效價測試

此圖顯示抗體效價呈鋸齒狀分布，可能的原因為抗原每一次都結合效果都不盡相同，因此會造成抗體效價上的波動。

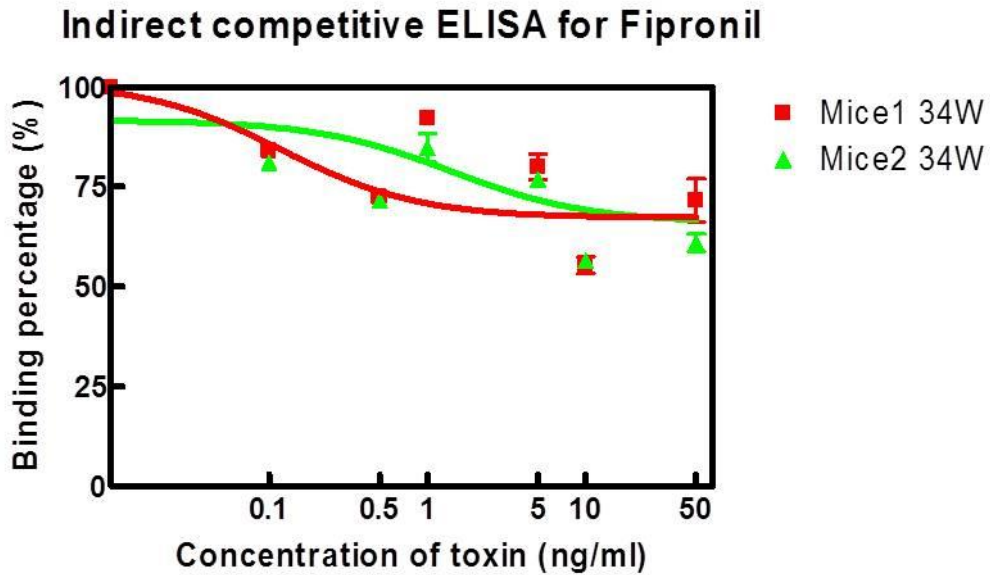


Figure 11 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試
 由此圖可知一號小鼠的專一性較二號小鼠好，但宏觀來看注射此抗原生產出的抗
 體專一性不佳，故本研究嘗試將另外的載體蛋白接合 Fipronil。

Fipronil-EDC/NHS- γ -globulin 作為抗原免疫小鼠

本研究利用非直接競爭型 ELISA 來進行抗體效價測試，採用 pre-immune 至第三十四週的小鼠血清來進行，從 Figure 12 中得知在第三週至第七週不管是一號小鼠還是二號小鼠的抗體效價有明顯的上升，但在利用重新接合的抗原加強免疫時，其抗原的效價有下降的趨勢，雖然在第十四週至第二十一週時有上升的現象，但也還沒達到第七週時的強度，本研究推測抗原接合不好是造成本現象的原因，而初始免疫時注射的抗原本研究也拿來免疫紐西蘭大白兔，紐西蘭大白兔的結果在之後會詳加敘述。

本研究利用 ciELISA 進行抗體專一性的測試，從 Figure 13 及 Figure 14 中顯示，在未注射 Fipronil 抗原之前，一號小鼠及二號小鼠就擁有對 Fipronil 專一性的抗體，一號小鼠的抗體 IC_{50} 為 1 ng/ml 至 5 ng/ml 之間，二號小鼠的抗體 IC_{50} 為 5 ng/ml 至 10 ng/ml 之間，本研究推測可能是 Fipronil 結構上的某

一個基團會與小鼠飼料中的成份產生作用，使小鼠食用以後產生了抗 Fipronil 的抗體，但此抗體在第七週時專一性效果開始下降 (Figure 15)，和 Figure 12 對照出當抗體的效價下降時其抗體的專一性也隨之下降，本研究認為此時的抗原接合的效果非常不好，所以才會造成效價降低及專一性降低的結果，從 Figure 12 ， Figure 16 中得知，在第三十四週時雖然抗體的效價有下降的趨勢，但抗體的專一性有開始上升的趨勢。因此在未來持續加強免疫使其抗體專一性增強至第三週時甚至比其更好是重要的課題。

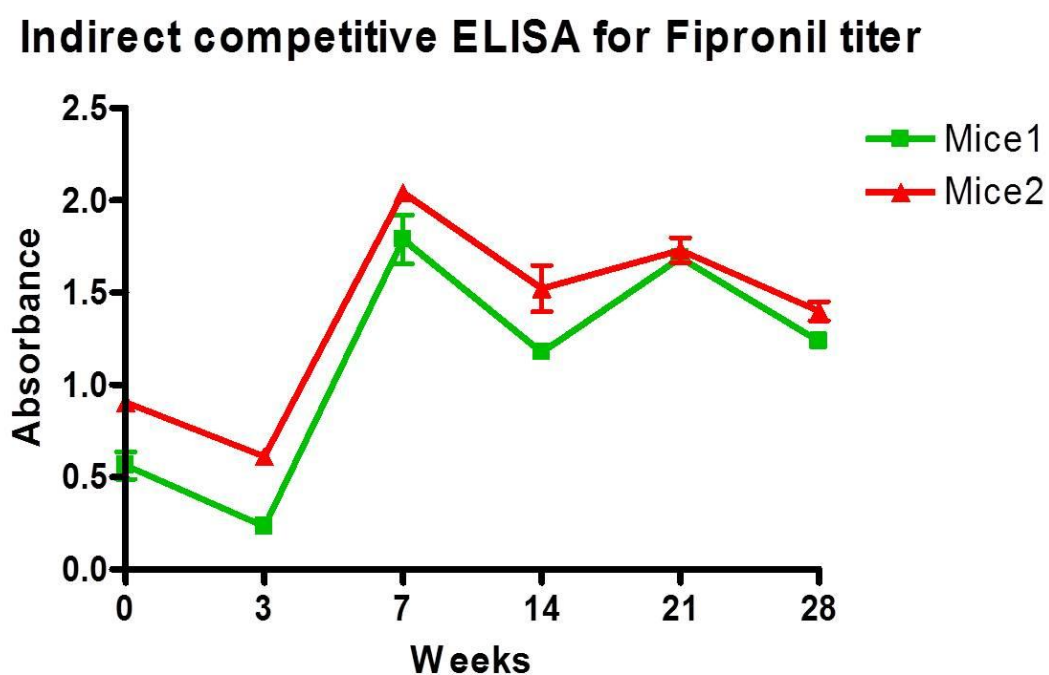


Figure 12 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行抗體效價測試

從此圖可以得知抗體效價在第三週至第七週時有上升的趨勢，但在七週之後抗體效價就開始下降，導致此結果的原因本研究推測為抗原的接合時接合的不好。

Indirect competitive ELISA for Fipronil

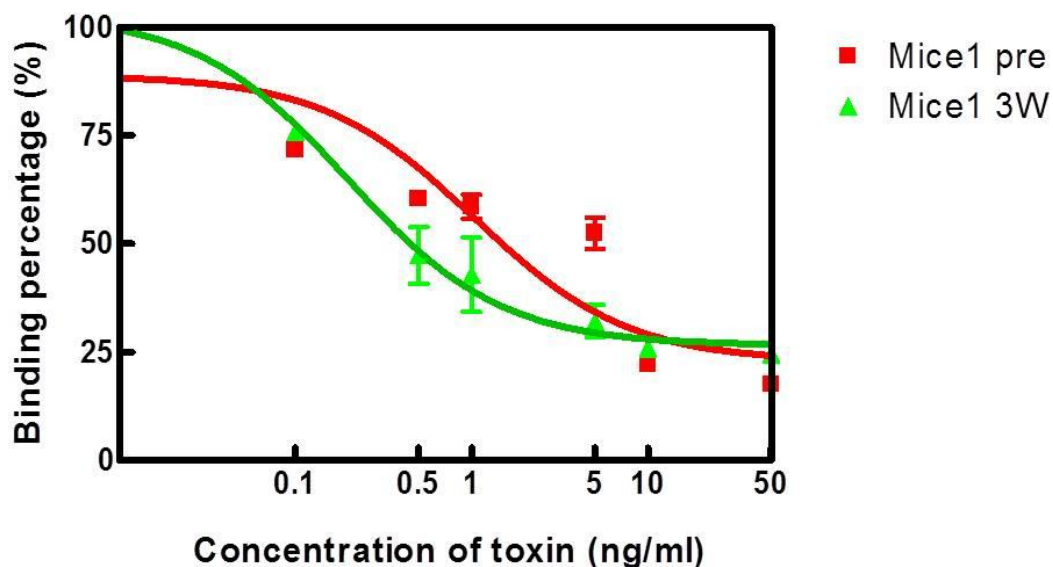


Figure 13 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試
由此圖可知一號小鼠 pre-immune 的血清中有抗 Fipronil 的抗體且 IC_{50} 位在
1ng/ml 至 5 ng/ml 之間，在初始免疫之後抗體的專一性有升高的趨勢 IC_{50} 降低
至 0.5 ng/ml ，因此此次抗原的接合效果非常的好。

Indirect competitive ELISA for Fipronil

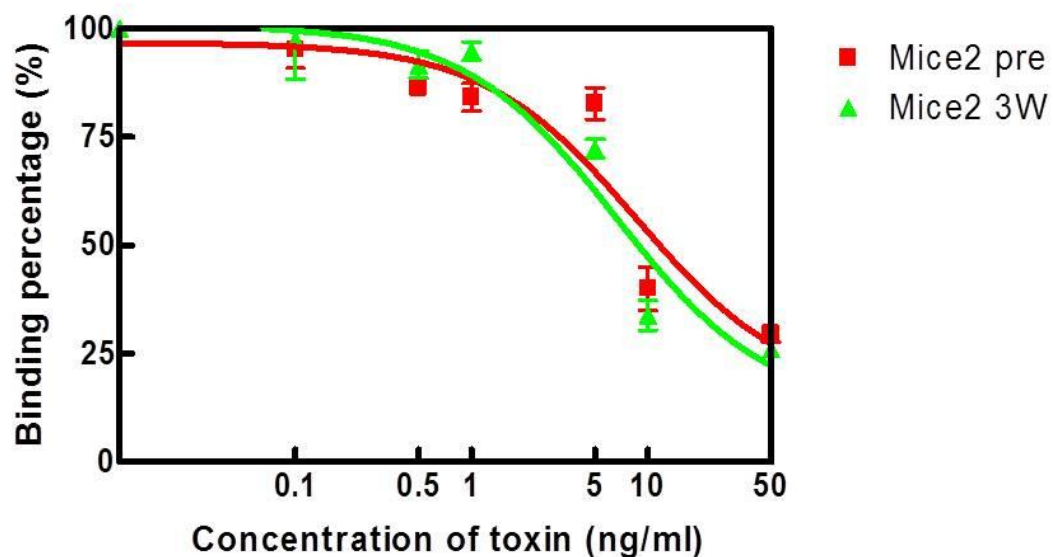


Figure 14 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試

由此圖得知二號小鼠的 pre-immune 血清中有抗 Fipronil 的抗體且 IC_{50} 位在 10 ng/ml 左右，在初始免疫之後其 IC_{50} 也大約位在 10 ng/ml 左右，但第三週的抗體專一性效果較好，也再次證明此次接合效果較好，因此本研究利用此蛋白抗

原去免疫紐西蘭大白兔。

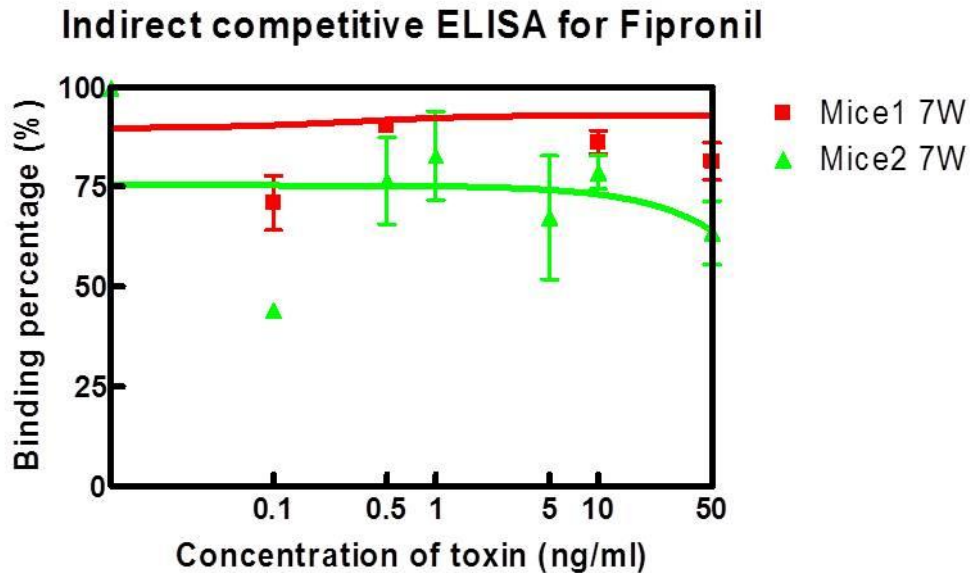


Figure 15 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試
由此圖得知第七週的一號小鼠及二號小鼠所產生的抗體專一性下降，造成此結果
的原因可能為第二批的抗原接合效果不佳所導致的。

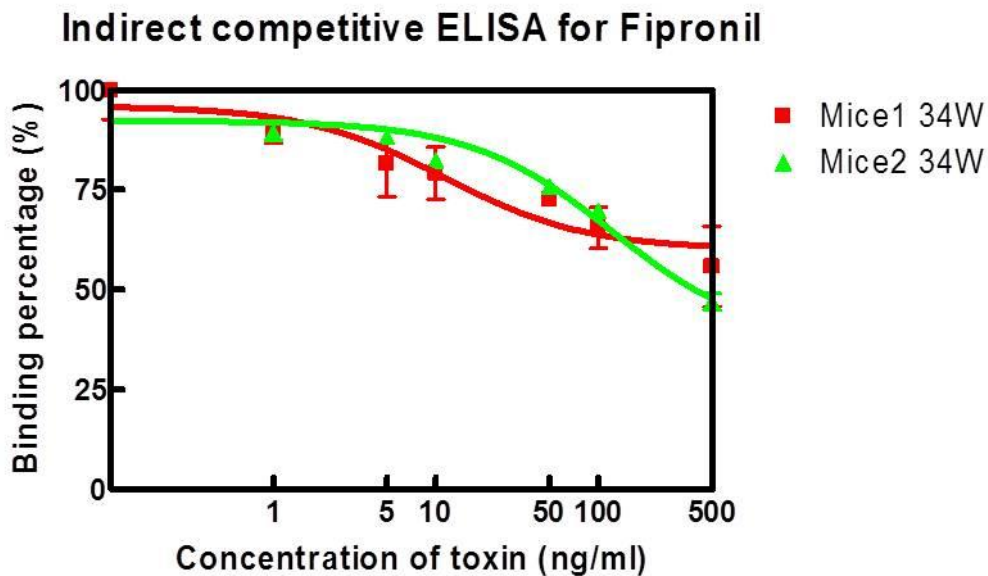


Figure 16 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試
由此圖得知第三十四週的一號小鼠及二號小鼠所產生的抗體專一性有上升的趨勢，因此未來持續加強免疫並觀察其專一性的變化。

Fipronil-EDC/NHS-KLH 作為抗原免疫小鼠

此次抗原在初次免疫時注射在不同的位置，一號小鼠使用腹腔注射，二號小鼠使用背部皮下注射，每週加強免疫時交替背部及皮下兩個部位的注射，再來本研究採用 pre-immune 至第九週的小鼠血清來進行抗體的效價測試，由 Figure 17 結果中可以看到二號小鼠的抗體效價較一號小鼠佳，且二號小鼠的效價有持續的上升，因此可以判定此次的蛋白接合是有成功的。

再來本研究利用 ciELISA 進行抗體對於 Fipronil 專一性測試，由 Figure 18 可以看到一號小鼠及二號小鼠的 IC_{50} 是差不多的大約位於 500 ng/ml 至 100 ng/ml 之間，而在第九週時抗體的專一性變弱 (Figure 20)，由此可推測第二批接合的抗原接合效果不佳，因此本研究重新接合一批新的抗原，期望能夠使此抗體的專一性能夠回升。

本研究也從 Figure 17，Figure 18，Figure 19 中得到，若初始免疫時採取背部皮下注射，將可以使抗體的效價較為穩定且較強，但在專一性的部分沒有特別的影響，因此本研究在往後的初始注射，皆會採取背部皮下注射，以達到抗體更好的效價。

Indirect competitive ELISA for Fipronil titer

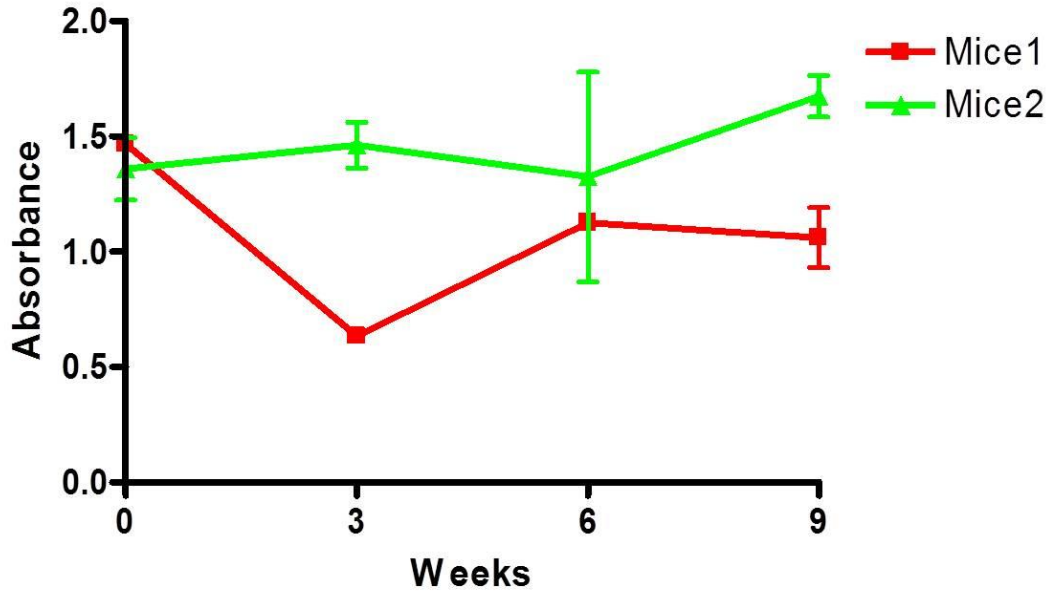


Figure 17 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行抗體效價測試

由圖可知一號小鼠的效價較二號小鼠差，且二號小鼠的抗體效價有上升的趨勢，因此可以推知此次的蛋白接合是成功的。

Indirect competitive ELISA for Fipronil

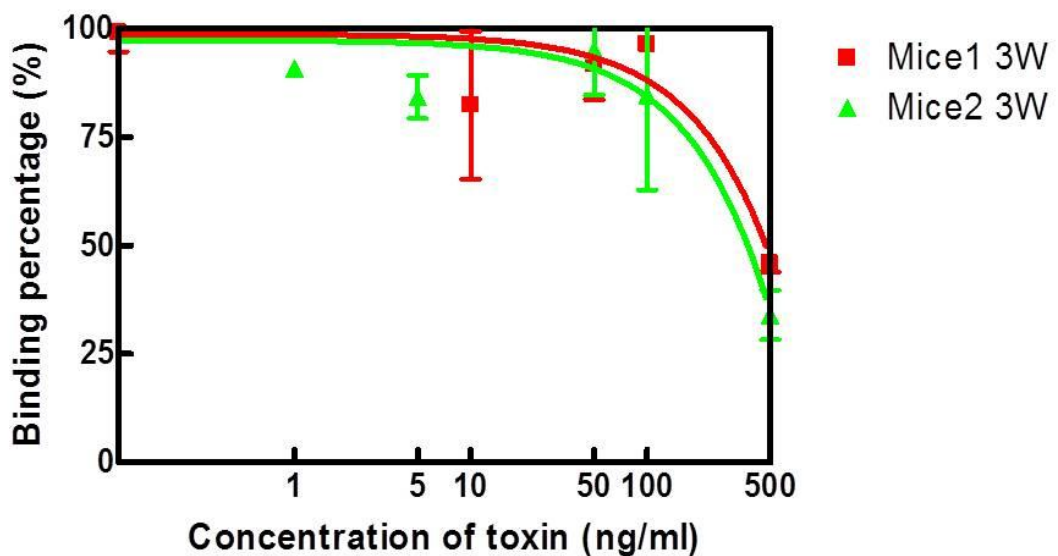


Figure 18 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試

由圖可知在三週時，一號小鼠及二號小鼠的抗體的 IC_{50} 皆差不多，大約位於 500 ng/ml 至 100 ng/ml 之間。

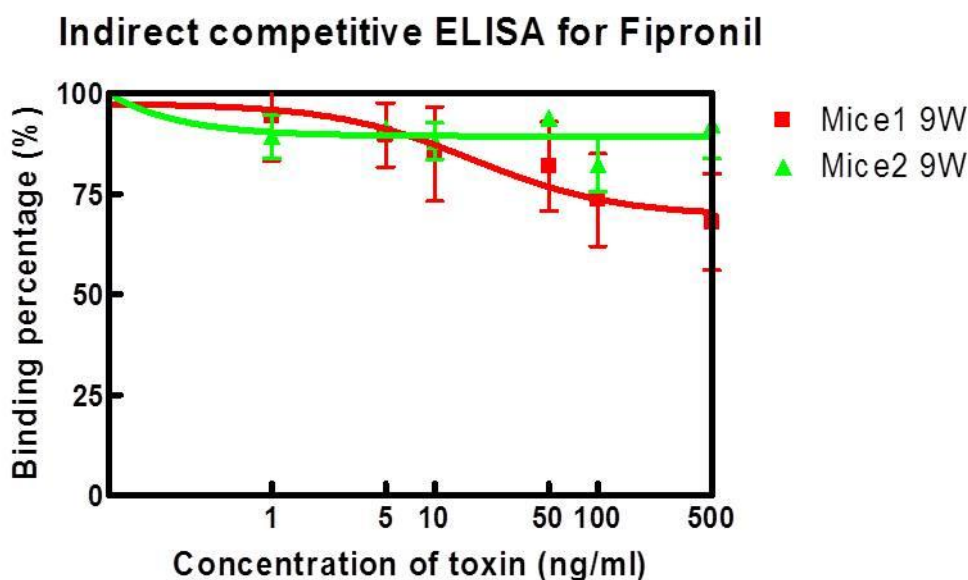


Figure 19 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試

由此圖可知不管是一號小鼠還是二號小鼠的抗體專一性變差，本研究推測可能是第二批的抗原接合效果不佳所致。

Fipronil-EDC/NHS- γ -globulin 作為抗原免疫紐西蘭大白兔

本研究採用 pre-immune 至第二十八週的紐西蘭大白兔血清來進行抗體的效價測試，由 Figure 20 結果中可以看到抗體的效價從第三週開始至第二十一週逐漸下降，因此本研究為了使紐西蘭大白兔抗體效價可以往上升，所以在第二十一週時進行加強免疫，我們可以從 Figure 中看到在進行加強免疫後抗體的效價已明顯的上升。

由 Figure 21, Figure 22 中看到紐西蘭大白兔的抗體在第三週時及至第二十一週時並無明顯的專一性，也無法明確看出 IC_{50} 的位置且曲線也呈現不規則，但在加強免疫之後，抗體的專一性上升有明顯的上升 (Figure 23)， IC_{50} 的位置可以看出來大約於 500 ng/ml 至 1000 ng/ml 之間，本研究推測可能為初次免疫

時的抗原接合的不甚理想，本研究欲想在第四十週時在進行一次加強免疫，期望紐西蘭大白兔所產生的抗體專一性能夠提高，也希望用此抗體建立一套多株抗體之酵素連結免疫吸附分析系統。

Indirect competitive ELISA for Fipronil titer

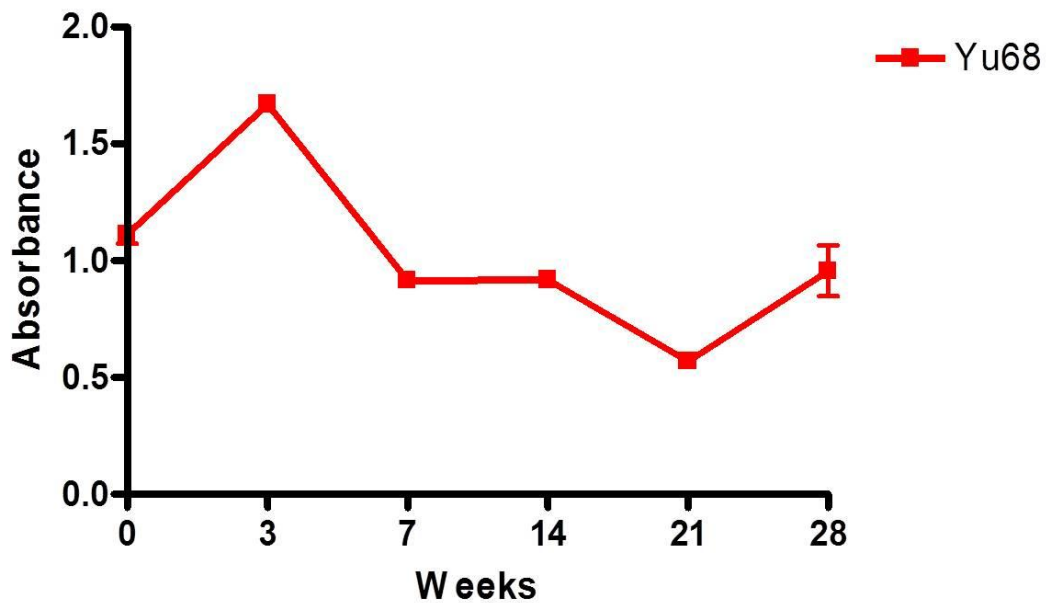


Figure 20 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行抗體效價測試

此圖顯示抗體效價在初始免疫時並沒有上升，但在二十一週加強免疫後即有上升的趨勢。可能為初始免疫時的抗原接合效果不佳，加強免疫時的抗原接合效果較好的緣故。

Indirect competitive ELISA for Fipronil

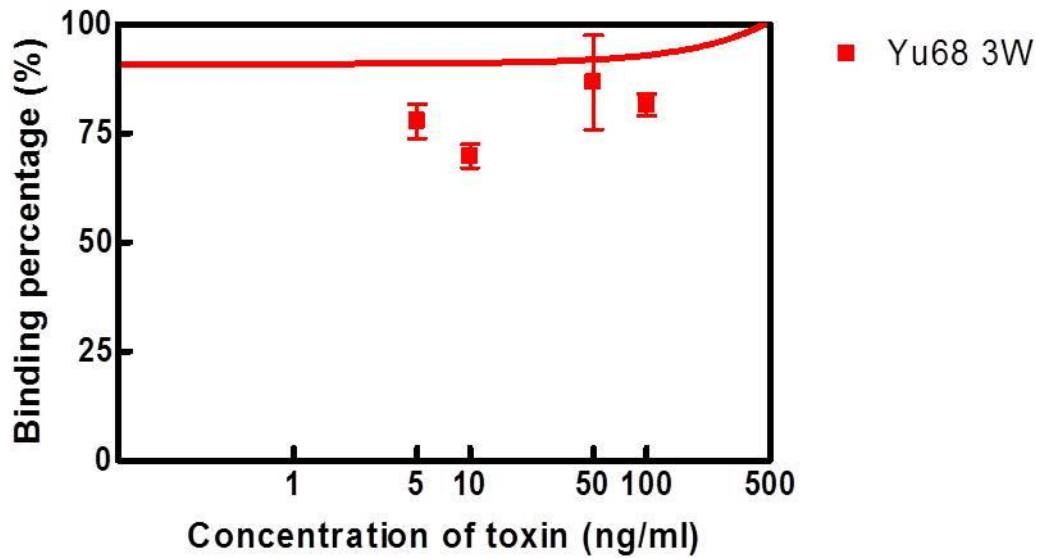


Figure 21 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試

此圖顯示在初始免疫時，抗體在第三週時的專一性並沒有很好。

Indirect competitive ELISA for Fipronil

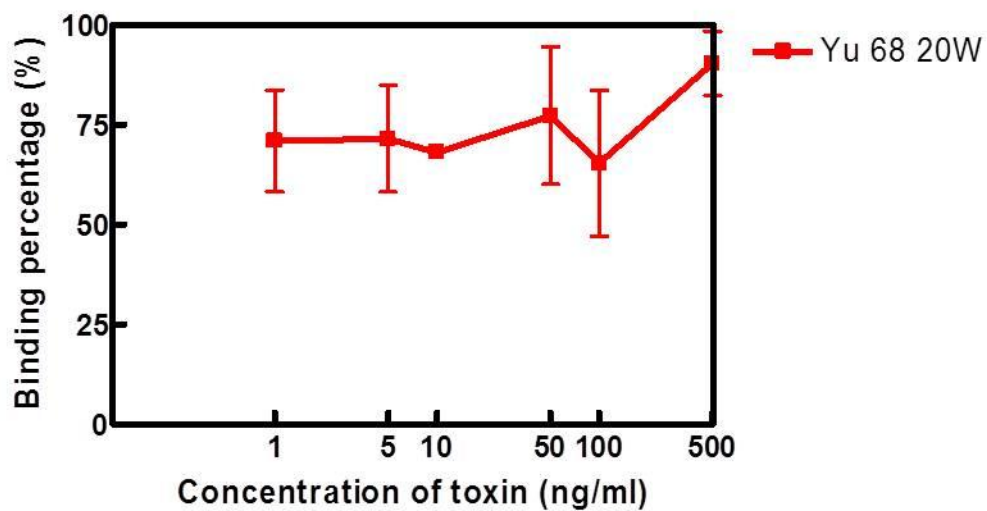


Figure 22 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試

由此圖可知抗體在第二十週時，抗體的專一性並沒有很好。

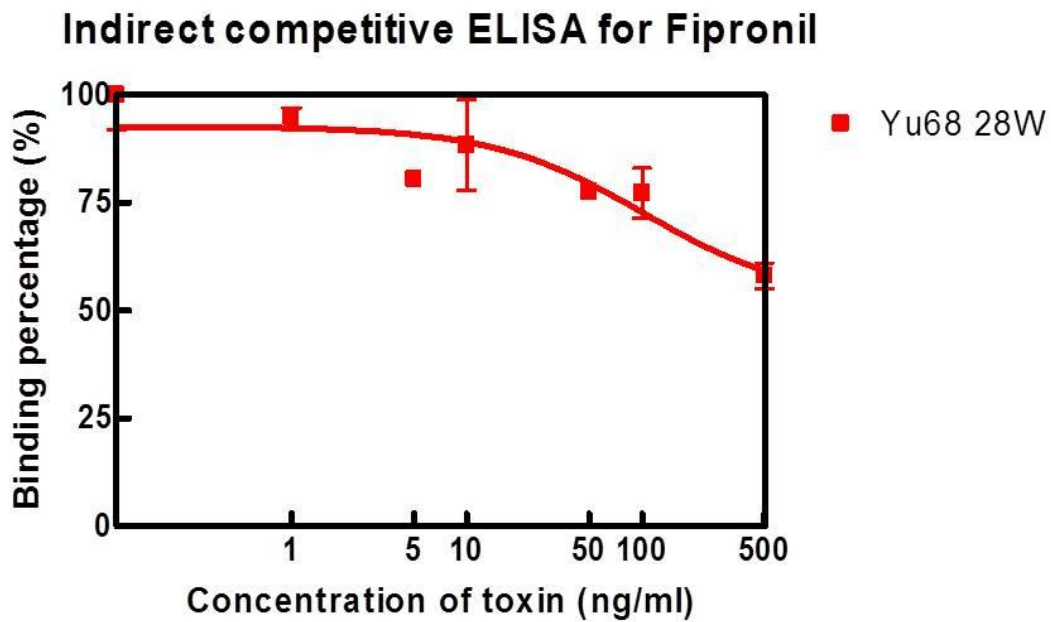


Figure 23 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Fipronil 進行專一性測試
 此圖顯示在加強免疫之後，抗體的專一性有明顯的上升， IC_{50} 約在 500 ng/ml 至 1000 ng/ml 之間。

四，討論

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，若直接免役動物時，將無法引發免疫反應，為了解決此問題，小分子毒素的抗原製備極為重要，在研究之初必須要嘗試多種的載體蛋白及多種的接合方式，來達到成功抗原的製備，本研究一開始使用文獻中的衍生法衍生 Fipronil 衍生物，但經由 TLC 片的結果可以得到衍生法是不可行的 (Figure 7)，本研究推測此一衍生法的訣竅並未在文獻中提及導致不能仿效，而為了仿效此衍生法所耗費的時間及金錢是非常可觀的，此時發現 Fipronil 有一胺基可以利用 EDC/NHS 法或 DCC/NHS 法來接合蛋白上的羧基，以達到製備抗原的目的 (Figure 5)。

本研究利用 EDC/NHS 法及 DCC/NHS 來接合載體蛋白 BSA 來製備抗原，藉由 SDS-PAGE 的結果中顯示 EDC/NHS 法接合效果較佳，故本研究便立即採

用利用 EDC/NHS 法接合的抗原來免疫小鼠，但初步從 ciELISA 的結果中可以歸納出，本次實驗抗體專一性效果不佳 (Figure 11)，且也可藉由 ciELISA 的結果發現抗體的效價呈現鋸齒狀 (Figure 12)，本研究推測可能為抗原接合時每一次的接合效果不一，是可能導致此結果的原因，可以藉由固定轉速，溫度，接合反應的時間及緩衝溶液的調整來改善此一問題。由於利用 BSA 做完載體蛋白接合的抗原免疫小鼠後的效果不佳，本研究立刻著手於另一個載體蛋白 γ -globulin 的接合，期望能改善抗體專一性不足的問題。

本研究再來利用 EDC/NHS 法來使 γ -globulin 接合上 Fipronil 做為抗原免疫小鼠，但在利用 ciELISA 檢測 pre-immune 抗體時，意外發現一號小鼠及二號小鼠竟然在為免疫時就含有 Fipronil，且一號小鼠的 IC_{50} 竟然位在 1 ng/ml 至 5 ng/ml 之間 (Figure 13)，二號小鼠的 IC_{50} 位於 5 ng/ml 至 10 ng/ml 之間 (Figure 14)，本研究推測 Fipronil 或許會跟飼料中的蛋白產生反應，因而使小鼠體內產生免疫反應而造成的，因此本研究期望能將此一抗體的專一性提高及使其抗體的效價提高，但在第七週時，不僅是一號小鼠的抗體效價及專一性開始緩慢下降，連二號小鼠的抗體效價及專一性也開始緩慢的下降，直到無法明確觀察出 IC_{50} 的位置 (Figure 15)，且利用 ciELISA 觀察到其抗體的效價也呈鋸齒狀的分布，因此本研究推測造成此一問題的原因為抗原的接合每次都不穩定所造成的，與接合 BSA 時有相同的問題，因此克服抗原接合的不穩定是本研究未來最大的課題，然而此一小鼠在第三十四週時抗體的專一性有慢慢提高的趨勢 (Figure 16)，其抗體效價雖無明顯的上升，但在未來可以藉由每週的加強免疫動作來達到提高效價的效果。

本研究最後利用 EDC/NHS 法當作鍵結的橋樑，用以使 Fipronil 接合上 KLH 來做完免疫抗原來免疫小鼠，在初次免疫時，本研究欲想知道注射的位置是否會影響其抗體的專一性及效價，故一號小鼠利用腹腔注射來進行初次免疫，而二號小鼠利用背部皮下注射來進行初次免疫，並在往後每週加強免疫時背部及

腹腔每週交換，接下來本研究利用 ciELISA 檢測其產生的抗體效價的變化，由結果顯示一號小鼠的效價呈現下降的趨勢，但二號小鼠的效價有明顯上升的趨勢 (Figure 17)，因此本研究推測初次免疫時利用背部皮下注射及交換腹腔和背部位置注射是可以讓效價提高的一種方法，本研究再利用 ciELISA 測試其抗體的專一性雖然二號小鼠的抗體效價有持續的升高，但在抗體專一性上卻有逐漸削弱的趨勢 (Figure 18, Figure 19)，本研究探討其原因推測，可能是因為 KLH 的分子量大結構也較為巨大，因此抗體所便的是的位置可能會在 KLH 上，而造成其對 Fipronil 的專一性不佳。

本研究也利用 EDC/NHS 法將 Fipronil 接合 γ -globulin 做為抗原用來免疫紐西蘭大白兔，從 ciELISA 的結果中顯示，抗體的效價在第三週至第二十一週時有下降的趨勢 (Figure 20)，因此本研究在第二十一週時進行加強免疫，加強免疫以後發現抗體的效價便有明顯的上升 (Figure 20)，再利用 ciELISA 檢測其抗體的專一性，發現在第二十一週加強免疫前其抗體的專一性都並不明顯 (Figure 22)，在加強免疫之後抗體的專一性才慢慢有增強的趨勢 (Figure 23)，因此本研究在往後將要在第四十周時再進行加強免疫，期望可以使抗體的專一性再提高。

在未來的實驗中，本研究預先想先克服目前實驗上的困難，再來本研究欲想利用 EDC/NHS 及 Glutaraldehyde 法來接合辣根過氧化氫酶 (HRP) 來從事直接競爭型 ELISA (cdELISA) 的實驗，能夠更快速的檢測抗體的專一性及效價，接下來本研究想利用別的接合方式如：Glutaraldehyde 或重氮法等方法來使 Fipronil 接合載體蛋白，期望免疫小鼠及兔子可以產生更好的專一性及效價的抗體，使本研究能夠利用兔子的抗體，建立一套多株抗體隻酵素連結免疫吸附分析系統，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 Fipronil 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 Fipronil 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農藥殘留，對社會的食安問題盡一份心力。

五，參考資料

成四喜，吳放軍，1995，「新型吡啶類廣效殺蟲劑 Fipamil 的合成與應用」，*農藥譯叢* 17(1):18-21

Alain Bobe., Pierre Meallier., Jean-François Cooper., Camille M. Coste. (1998).

Kinetics and Mechanisms of Abiotic Degradation of Fipronil (Hydrolysis and Photolysis). *J. Agric. Food Chem.* 46:2834-2839

Dong Jian., Liu Xianjin., Han Zhaojun. (2001). Hapten Design and Antibody Preparation of Fipronil. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* 17(3):172-175

Bobe A., Camille MC., Jean-François C. (1998). Behavior of fipronil in soil under sahelian plain field conditions. *Pesticide Science.* 52:275-281

Cole L.M., Nicholson R.A., Casida J.E. (1993). Action of Phenylpyrazole Insecticide at the GABA-Gated Chloride Channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46:47-54.

Vilchez J.L., Prieto A., Araujo L., Navalon A. (2001). Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 919:215-221

Xianjin Liu., Chunrong Yan., Jian Dong., Xiangyang Yu., Dunming Xu. (2007). Poly- and Monoclonal Antibody-Based ELISAs for Fipronil. *J. Agric. Food Chem.* 55:226-230