

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫 : 橘黴素(Citrinin)的抗體生產及快速免疫分析技術開  
\* 名 稱 : 發  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生：張中懷  
學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040-019-B  
研究期間：99年07月01日至100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，1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 100年03月30日

# 目錄

摘要 .....	2
序論	
黴菌毒素 Citrinin 的簡介.....	3
酵素連結免疫吸附法.....	4
研究目的.....	4
材料與方法	
實驗材料以及實驗儀器.....	5
修飾 Citrinin 結構增加與 protein 接合效率.....	6
Citrinin-KLH by (DCC/NHS).....	6
Citrinin-CMO.....	6
Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin by (DCC/NHS).....	6
Citrinin- 1,4-butanediol diglycidyl ether-KLH.....	7
Citrinin- 1,4-butanediol diglycidyl ether-OVA.....	7
小鼠抗體製備.....	7
小鼠抗體純化.....	7
非直接型酵素連結免疫分析法.....	7
非直接競爭型酵素連結免疫分析法.....	8
Stacking gel 和 Separating gel 的配置.....	8
SDS-PAGE 檢測 Citrinin 接合 $\gamma$ -globulin 效果.....	8
實驗結果.....	9
討論 .....	11
圖表 .....	12
參考文獻 .....	23
附錄 .....	25

## 摘要

### ( Abstract )

黴菌毒素為黴菌的次級代謝物，在世界各地的食物與飼料中均可發現，誤食被汙染的食物和飼料會危害到人類及動物的健康。黴菌毒素常被發現有致癌性、基因毒性、肝腎毒性。本實驗希望建立一套有效的方式來檢測橘黴素 ( Citrinin )。我們以抗體與抗原之間具有專一性的特性，以 Citrinin 的抗體建立其檢測方式。首先以 Citrinin 結合載體蛋白質，以此作為抗原免疫實驗動物產生對 Citrinin 具有專一性的抗體，利用此抗體來建立一套針對 Citrinin 的酵素免疫吸附分析法 ( ELISA )。

實驗結果顯示，在小鼠施打 Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin 後，用 ciELISA 檢測出小鼠的體內有抗體產生，但是在加入 Citrinin 的標準品競爭時，沒有明顯的抑制效果，顯示抗體的專一性不如預期。在小鼠施打 Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether- KLH 後，用 ciELISA 檢測出小鼠的體內有抗體產生，但是在加入 Citrinin 的標準品競爭時，在第四週的抗體較有略微的抑制效果，其餘週次抗體顯示專一性不如預期。儘管如此，我們已漸漸地對於 Citrinin 與載體蛋白質接合有進一步的了解。所以，未來的研究方向中，仍著重於調整 Citrinin 與載體蛋白質的接合條件，以提高抗體對於 Citrinin 的專一性，並建立穩定的 ELISA 以利檢測食品及飼料中 Citrinin 的含量，以避免大眾受到 Citrinin 的危害。

## 序論

### (Introduction)

#### 橘黴素(Citrinin)的簡介

橘黴素 ( Citrinin , 簡稱 CTN ) 為分子量 250.3 的小分子毒素 , IUPAC ( International Union of Pure and Applied Chemistry ) 命名為 (3R,4S-trans)4,6-Dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid (圖一) , 分子式為  $C_{13}H_{14}O_5$  , 是由 *Aspergillus*、*Penicillium* 及 *Monascus* 等真菌屬所產生的二級代謝物 (Shimizu *et al.*, 2005) 。 Citrinin 最早於 1931 年的發酵農產品中的 *Penicillium citrinum* 分離出來 (Abramson *et al.*, 2001) 。 1977 年被證實會導致家禽類、豬類、犬類及鼠類動物的腎臟疾病 (Reiss, 1977) 。 在 1986 年 IARC ( International Agency for Research on Cancer ) 將其歸類為第三類致癌物 ( IARC, 1986) 。

Citrinin 普遍存在於受黴菌污染的穀類製品中 , 包括玉米、小麥、大麥及黃米等 (Blanc *et al.*, 1995) 。 在保加利亞及丹麥所作的調查發現 , 市售玉米相關產物所含的 Citrinin 可高達 584 ppb (Awuah and Kpodo, 1996) 。 此外 , Citrinin 容易伴隨紅麴菌 (*Monascus spp.*) 的發酵過程而產生。紅麴菌乃傳統的釀造菌株 , 過去的亞洲國家中 , 紅麴被廣泛添加在米類、肉類及酒類等製品中作為食品添加色素。根據研究指出 Citrinin 具有抗生素的特性 , 可用來抑制革蘭氏陽性菌的生長 (Blanc *et al.*, 1995) , 所以也有人將紅麴應用於食物的防腐上。近年來紅麴相關的保健食品十分常見 , 主要功能為調節血脂、預防心臟血管疾病等 (Su *et al.*, 2003) 。 中華民國行政院衛生署於九十八年頒布對紅麴產品中的 Citrinin 含量限制標準分別如下 : 紅麴米 5 ppm ; 紅麴製食品 : 2 ppm ; 紅麴色素 0.2 ppm (附錄一) 。 但研究指出市面販售之紅麴產品 , Citrinin 的含量從 0.1 至 17 ppm 不等 (Sabater-Vilar *et al.*, 1999) , 本實驗室先前在台灣的紅麴產品萃取物中也可以檢測到 Citrinin 的含量自 0.2 到 6.3 ppm 不等 (Liu *et al.*, 2005) 。 品質參差不齊 , 所以相關保健食品中 , Citrinin 皆為食品衛生安全的隱憂。現今不論台灣還是國際都已正視 Citrinin 在食品中的含量 , 以及其造成人體危害的重要性。

目前市面上檢測 Citrinin 的方法以高效液相層析法 ( HPLC ) 為主 , 此方法有非常高的準確性和再現性 , 但是在儀器的操作上需要訓練有素的人才且前製過程較為繁瑣 , 而價格昂貴的儀器也是研究的一大阻礙。所以建立一套敏感度高、專一性佳且快速便利的方法來檢測食品中 Citrinin 的含量 , 大大縮短了檢測時間 , 同時提升食品檢驗的便利性。

## **酵素免疫吸附分析法Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

ELISA 的操作方法較 HPLC 簡單，並能一次分析大量樣品，且樣品不需經過純化，是常用於檢測毒素的方法。本實驗中使用的 ELISA 主要為非直接競爭型酵素免疫分析法(cI-ELISA)，其原理為利用酵素標記物與樣品中的抗體或抗原進行結合，藉由抗體與抗原間的專一性反應，以及酵素放大訊號的效果，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達到檢測樣品的目的。要發展出一套敏感性高的 ELISA，最重要的是要有專一性高的抗體，並藉以開發 cI-ELISA 來分析食品中的 Citrinin 含量。

### **研究目的 (objective)**

**【階段性一】：製備專一性橘黴素(Citrinin)的多株抗體。**

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

**【階段性二】：建立酵素連接免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay) ELISA 方式檢測樣品中橘黴素 (Citrinin)的含量。**

- 非直接競爭型 ELISA

## 材料與方法

### (Materials and Methods)

#### 實驗材料

Citrinin, keyhole limpet hemocyanin (KLH),  $\gamma$ -globulin, gelatin, acetic anhydride, sodium bicarbonate, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), Freund's complete adjuvant, *N*-hydroxysuccinimide (NHS), Carboxymethylamine hemihydrochloride (CMO), 1,4-butanediol glycidyl ether 購自於 Sigma Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI). Aminonium sulfate, sodium chloride 皆購自 Riedel-deHaën (A.G., Germany). Sodium phosphate, Sodium Hydroxide, *N,N*-dimethylformamide (DMF), Tris and hydrochloric acid 皆購自於 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.). Methanol, Tween 20 and Sodium carbonate 皆購自於 Merck (Darmstadt, Germany). Rabbit anti-mouse IgG-Fc 購自於 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Horseradish peroxidase (HRP) chloroform 購自於 Roche. HRP substrate solution 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) pyridine 購自於 Neogen Corp. (Lexington, KY)

#### 實驗動物

Balb/c by J 購自國家實驗動物中心

#### 實驗儀器

Vmax automatic ELISA reader [Molecular Devices CO. (Menlo park, CA)], ELx50 ELISA washer [Winooski, VT]

## 實驗方法

### 1. 修飾Citrinin結構增加與蛋白質接合效率

以 250  $\mu$ l acetic anhydride 溶解 1mg Citrinin，再加入 50  $\mu$ l pyridine，置於 60  $^{\circ}$ C 反應 1hr，再將其產物點在薄層層析片上 (TLC Silica gel plate)，以展開液 (Cholorform : Acetone : enthanol :  $d_2H_2O$  = 6 : 4 : 1 : 0.1) 展開，以 365nm 波長下照射 TLC 片並觀察，刮取 TLC 上顯著螢光的範圍，即代表已被修飾官能基(or 改變結構)的 Citrinin，接著以萃取液 (Methanol :  $CHCl_3$  = 1 : 9) 將 Citrinin 溶出，離心 1200 rpm 5 分鐘取其上清液，以氮氣吹乾，即取得修飾過的 Citrinin 粉末。

### 2. Citrinin-KLH by (DCC/NHS)

將已修飾過的 Citrinin 粉末溶於 150  $\mu$ l 的 DMF ( N,N-dimethylformamide ) 中，緩緩加入 2.0 mg DCC 和 2.0 mg NHS 在室溫下反應 2 小時，再取 2.0 mg KLH ( keyhole limpet hemocyanin ) 溶於 1.0 ml bicarbonate buffer (pH = 9.6)，緩緩加入已修飾過的 Citrinin 中，室溫下反應兩個小時，以 2 L 0.01 M PBS 透析 3 次。

### 3. Citrinin-CMO

秤取 1 mg Citrinin 和 2 mg CMO ( Carboxymethoxylamine hemihydrochloride )，溶於 6 ml 迴流液 ( 1 ml pyridine , 4 ml methanol, 1 ml  $d_2H_2O$  ) 中，混合均勻，置於迴流裝置中加熱到 60  $^{\circ}$ C，反應 2 小時，待其冷卻後，減壓濃縮成 1 ml。將 Citrinin -CMO 點在薄層層析片上 (TLC Silica gel plate)，用展開液 (Cholorform : Acetone : enthanol :  $d_2H_2O$  = 6 : 4 : 1 : 0.1)，於 365 nm 波長下觀察，並刮取 Citrinin-CMO 的部分，以萃取液 (Methanol :  $CHCl_3$  = 1 : 9) 將 Citrinin-CMO 溶出，離心 1200 rpm 5 分鐘取其上清液，以氮氣吹乾，即取得 Citrinin-CMO 的粉末。

### 4. Citrinin-CMO- $\gamma$ - globulin by (DCC/NHS)

將製備好的 Citrinin-CMO 溶於 150  $\mu$ l 的 DMF 中，緩緩加入 2.0 mg DCC 和 2.0 mg NHS，在室溫下反應 2 小時，再取 2.0 mg  $\gamma$ -globulin 溶於 1.0 ml bicarbonate buffer (pH = 9.6)，緩緩加入 Citrinin-CMO 中，室溫反應兩個小時後，以 2 L 0.01 M PBS 透析 3 次。

5. **Citrinin- 1,4-butanediol diglycidyl ether-KLH**

將 0.5 mg Citrinin 溶於 0.5 ml 的 NaOH ( 0.6 mol/ml )，再加入 0.5 ml NaBH<sub>4</sub> ( 2 mg/ml ) 和 0.5 μl 1,4-butanediol diglycidyl ether，於 25 °C 下反應 4 小時。反應完後，再加入 31.8 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 2.1 mg KLH，在 37 °C 下反應 24 小時。最後以 2 L 0.01 M PBS 透析 3 次。(WANG Yuan-Yuan *et al*, 2010)

6. **Citrinin- 1,4-butanediol diglycidyl ether-OVA**

將 0.5 mg Citrinin 溶於 0.5 ml 的 NaOH ( 0.6 mol/ml )，再加入 0.5 ml NaBH<sub>4</sub> ( 2 mg/ml ) 和 0.5 μl 1,4-butanediol diglycidyl ether，於 25 °C 下反應 4 小時。反應完後，再加入 31.8 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 2.1 mg OVA，在 37 °C 下反應 24 小時。最後以 2 L 0.01 M PBS 透析 3 次。(WANG Yuan-Yuan *et al*, 2010)

7. **小鼠抗體製備**

為了使小鼠產生對 Citrinin 具有專一性的抗體，我們分別將 Citrinin-CMO-γ-globin 和 Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether - KLH ( 50 μg 溶於 100 μl 0.01 M PBS ) 與等體積的完全佐劑 ( complete Freund's adjuvant ) 混合均勻，以腹腔注射的方式將混合物打入小鼠體內，第二週開始從小鼠的尾巴採血，離心後取其血清以 ELISA 測試是否產生對 Citrinin 具有專一性的抗體。

8. **小鼠抗體純化**

將採集到的小鼠血液 ( 100 μl /次 )，直接離心 13000 rpm，15 分鐘取其上清液即為血清，並保存於 -20 °C 冰箱中。

9. **非直接型酵素免疫分析法 (indirect ELISA)**

在 96 孔盤中加入 100 μl Citrinin-KLH 或 Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether-OVA ( 以 0.01 M PBS 稀釋 )，置於 37 °C 反應 1 小時。以 washing buffer ( 0.05% Tween 20 in 0.01 M PBS ) 清洗盤子四次後，再於 96 孔盤中加入 170 μl blocking buffer ( 0.1% Gelatin in 0.01 M PBS )，置於 37 °C 反應 30 分鐘。再以 washing buffer 清洗盤子四次後，接著加入 100 μl 純化過的抗體 ( 以 0.01 M PBS 稀釋 )，置於 37 °C 反應 1 小時。以 washing buffer 清洗盤子四次。再加入 100 μl 二級抗體 (Rabbit anti-mouse IgG-HRP，以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37 °C 反應 1 小時。最後將 96 孔盤以 washing buffer 清洗盤子四次後。加入 100 μl TMB substrate solution，置於室溫避光反應 30 分鐘後，加入 100 μl 1 N HCl 終止反應。利用 ELISA Reader 測量波長 450nm 的吸光值(附錄二)。



#### 10. 非直接競爭型酵素免疫分析法(cielisa)

在96孔盤中加入100 µl Citrinin-KLH或Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether-OVA (以0.01 M PBS稀釋)，置於37 °C反應1小時。以washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS)清洗盤子四次後，再於96孔盤中加入170 µl blocking buffer (0.1 % Gelatin in 0.01 M PBS)，置於37 °C反應30分鐘。再以washing buffer清洗盤子四次，接著加入50 µl不同濃度的Citrinin毒素標準品 (1~1000 ng/ml) 及50 µl 純化過的抗體 (以0.01 M PBS稀釋)，置於37 °C反應1小時。washing buffer清洗盤子四次。再加入100 µl 二級抗體 (Rabbit anti-mouse IgG-HRP，以0.01 M PBS稀釋)，置於37 °C反應1小時。最後將96孔盤以washing buffer清洗盤子四次後。加入100 µl TMB substrate solution，置於室溫避光反應30分鐘後，加入100 µl 1 N HCl終止反應。利用ELISA Reader測量波長450 nm的吸光值 (附錄三)

#### 11. Stacking gel 和 Separating gel 的配置

Stacking gel : 3.4 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O、830 µl 30 % poly -acrylamide (Acrylamide/Bis 29 : 1)、630 µl 1 M Tris (pH 6.8)、50 µl 10% SDS、50 µl 10% APS、10 µl TEMED ;  
Separating gel : 5.32 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O、1.98 ml 30 % poly -acrylamide (Acrylamide/Bis 29:1)、2.5 ml 1.5 M Tris, pH 8.8、0.1 ml 10 % SDS、0.1 ml 10 % APS、8 µl TEMED

#### 12. SDS-PAGE檢測Citrinin接合γ-globulin效果

分別取10 µg 和20 µg的γ-globulin以及Citrinin-γ-globulin以6 % SDS-聚丙烯醯氨凝膠 進行電泳分離，接著置入Coomassie-blue 15分鐘染色後，再用destain buffer 褪染15分鐘3次。

## 實驗結果

### ( Results )

#### 藉由TLC檢測Citrinin結構的改變

根據研究指出，在 Citrinin 的八號碳原子上 hydroxy group 和十四號碳原子上 carboxylic acid 形成氫鍵，且六號碳原子上的 ketone group 會和十四號碳原子上的 carboxylic acid 形成氫鍵(Abramson *et al.*, 2001)，如此一來 Citrinin 缺乏外露的羧基 (-COOH) 和載體蛋白質上的胺基 (-NH<sub>3</sub>) 作結合。我們合成抗原 (Citrinin-載體蛋白質) 時，要面對的問題是 citrinin 易形成分子內氫鍵，不易和載體蛋白質形成共價鍵結 (圖二)，因此難以引起 Balb/c 品系的小鼠體內專一於 Citrinin 的免疫反應，因此製造針對 Citrinin 的抗體成為一大挑戰。我們嘗試將 Citrinin 衍生出 COCH<sub>3</sub> 基團來降低分子內氫鍵情形 (H. Xiao, 1995)，並將 Citrinin 標準品以及衍生的 Citrinin (圖三) 分別點在 TLC plate 上，展開後於 254 nm 波長的下觀察 (圖四)，觀察到在衍生前後有明顯的差異。

#### 藉由TLC檢測Citrinin衍生CMO結果

我們將 Citrinin 標準品 以及 Citrinin 衍生 CMO (Carboxymet - hoxylamine hemi - hydrochloride) 的產物分別點在 TLC plate 上，以展開液 (colorform: acetone: enthanol: d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O = 6: 4: 1: 0.1) 展開，於 254 nm 波長下觀察 (圖五)，觀察到在衍生前後 Citrinin 的位置有明顯差異。

#### 用非直接型酵素免疫分析法 (indirect ELISA) 檢測抗體產生結果

我們用非直接型酵素免疫分析法檢測在施打 Citrinin- CMO-  $\gamma$ -globulin 後，小鼠體內有抗體產生(圖六) 以及施打 Citrinin- 1,4-butanediol diglycidyl ether - KLH 後，小鼠體內有抗體產生(圖七)。因此以 Citrinin 毒素標準品競爭的方法來檢測抗體是否對 Citrinin 具有專一性。

#### 用非直接競爭型酵素免疫分析法(competitive indirect ELISA) 檢測

#### Citrinin -KLH抗體的專一性

由前一個實驗結果得知，小鼠在注射 Citrinin- CMO-  $\gamma$ -globulin 四週後產生抗體，而抗體的專一性藉由 competitive indirect ELISA 中的競爭表現來確知。實驗結果顯示 (圖八)，隨著 Citrinin 毒素標準品的濃度提高，抗體與游離 Citrinin 毒素標準品結合力不足以抑制抗體盤底的 Citrinin 抗原結合。換言之，在施打 Citrinin- CMO-  $\gamma$ -globulin 於實驗動物體內有抗體產生，但抗體的專一性尚未達到預期，產生非專一於 Citrinin 的抗體。

## 用非直接競爭型ELISA ( competitive indirect ELISA ) 檢測

### Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether-KLH抗體的專一性

由前一個實驗結果得知，小鼠在注射 Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether-KLH 四週後產生抗體，而抗體的專一性藉由 competitive indirect ELISA 中的競爭表現來確知。實驗結果顯示（圖九），隨著 Citrinin 毒素標準品的濃度提高，抗體與游離態的 Citrinin 毒素標準品有結合比例提高，結換言之，在施打 Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether-KLH 於實驗動物體內，在第四周時採集的抗體為專一於 Citrinin 的抗體。

## 討論 ( Discussion )

橘黴素 ( Citrinin ) 的分子量為 250.3，因為其分子量小於 1000，所以不具有誘導免疫反應的能力，僅能稱為具有抗原性 ( antigenicity ) 的半抗原 ( hapten )，而半抗原可藉由和大分子的載體蛋白質耦合，而成為具有免疫原性的物質。目前本實驗中使用的大分子載體蛋白是 KLH ( Keyhole limpet hemocyanin )  $\gamma$ -globulin。在免疫實驗動物時，抗體可能會辨識半抗原或載體蛋白質，所以免疫動物的載體蛋白質和檢測時的載體蛋白質必需不同，藉由運用不同載體蛋白質以達到降低偽陽性的產生。本實驗藉修飾 Citrinin 結構來提高和載體蛋白質的結合效率，冀望能產生專一性較高的抗體，然而尚未達到預期結果。

我們進一步以 SDS-PAGE 確認小分子毒素 Citrinin 與載體蛋白質 (  $\gamma$ -globulin ) 的接合效果 ( 見圖十 )。由結果可以觀察到 Citrinin 接合  $\gamma$ -globulin 後的蛋白質帶 ( protein band ) 相對於  $\gamma$ -globulin 的蛋白質帶位置較高，其原因為  $\gamma$ -globulin 接合上 Citrinin 後分子量相對變大，又因每個  $\gamma$ -globulin 和 Citrinin 接合的比例未必相同，因此會呈現出較模糊的蛋白質帶，由此可推測至少有部分 Citrinin 和載體蛋白質  $\gamma$ -globulin 是接合成功的。

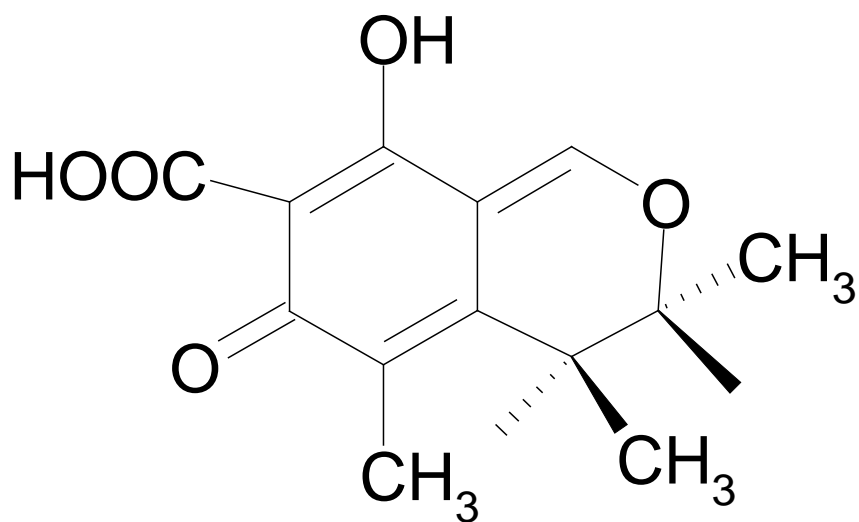
此外，本實驗根據前人研究指出 1,4-butanediol diglycidyl ether 在特定條件下能穩定將 Citrinin 和蛋白質作共價性結合。本實驗利用其特定條件下將 Citrinin 和蛋白質作共價結合後施打於小白鼠腹腔，於第四週採集血液並純化抗體，在經過 competitive indirect ELISA 測試結果顯示略有專一性的抗體。但是其後隨週次增加，抗體專一性逐漸減弱並消失，抗體僅有短暫的表現。其確切原因為未來研究的重要方向之一。

Benjamin R. Clark 等人於 2006 年對 *Penicillium citrinum* 所產生的 Citrinin 進行化學分析，指出在 Citrinin 中有 dimeric products 的現象 ( 附錄四 )，其中又以 Dicitrinin A 佔其大多數 ( 附錄五 )，且 Dicitrinin A 會因為溶劑的酸鹼值而使結構上有所改變 ( 附錄六 ) ( Clark *et al.*, 2006 )。根據此篇研究結果，我們將 Citrinin 標準品以全波長分光光度儀檢測其吸收波長，並和 Benjamin R. Clark 等作者所研究之結果相互比對 ( 圖十一 ) ( 附錄六 )，結果顯示，我們的 Citrinin 毒素標準品和 Benjamin R. Clark 等作者實驗中鹼性環境下的 Dicitrinin A 波長較為相似，但在波長約 422nm 和 540 nm 時 Dicitrinin A 有兩個波峰出現，而我們的 Citrinin 毒素標準品則沒有這兩個波峰，我們推測，Citrinin 毒素標準品仍未發生 dimeric products 的現象。

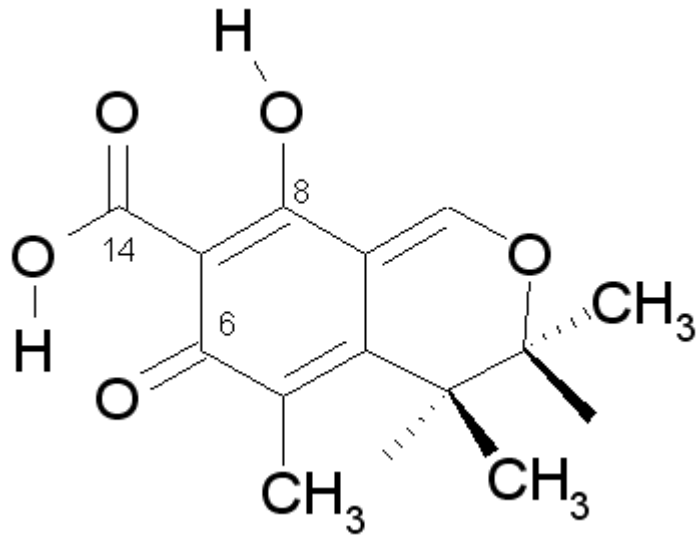
在未來的實驗中，我們會根據 Benjamin R. Clark 等作對 Dicitrinin A 在不同酸鹼值的溶液下會有不同構型的想法，觀察 Citrinin 毒素標準品在不同酸鹼值的溶液下，其吸收波長及結構的改變，並選擇適當的溶液酸鹼值與載體蛋白質進行接合，找出較理想的條件，並用於產生對 Citrinin 具有專一性的抗體，並且藉以建立 ELISA 等其他免疫化學的方式檢測 Citrinin，進而有效控管食品及飼料中，避免人類和寵物誤食受汙染的產品。

圖表

(Figures and Tables)

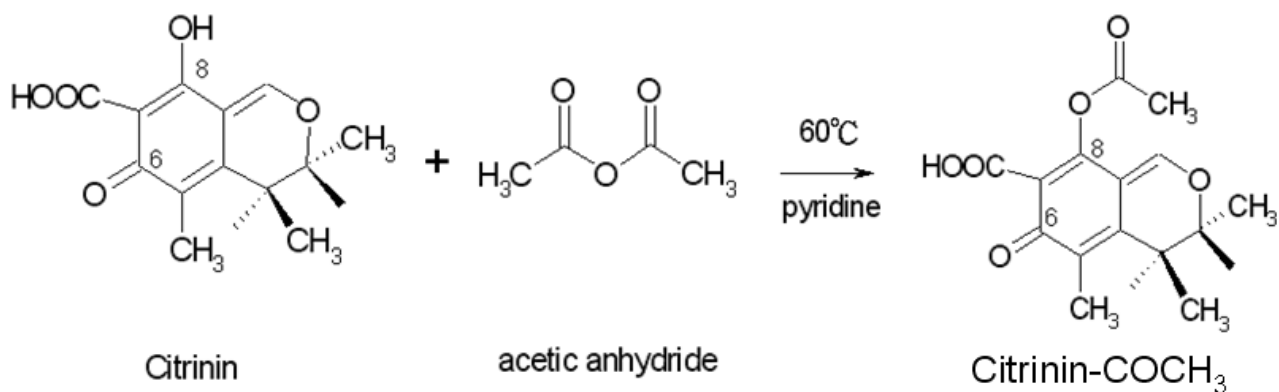


圖一. Citrinin 的結構式



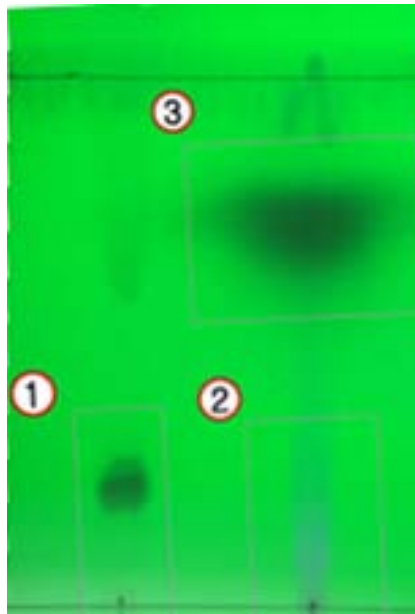
圖二. Citrinin 形成分子內氫鍵穩定結構

在 Citrinin 的八號碳原子上的 hydroxy group 和十四號碳原子上的 carboxylic acid 會形成氫鍵，且六號碳原子上的 ketone group 會和十四號碳原子上的 carboxylic acid 形成氫鍵，如此一來，Citrinin 便會缺乏外露的羧基 (-COOH) 而無法和載體蛋白質上的胺基 (-NH<sub>3</sub>) 結合。



**圖三. Citrinin 衍生 COCH<sub>3</sub> 基團以抑制分子內氫鍵形成**

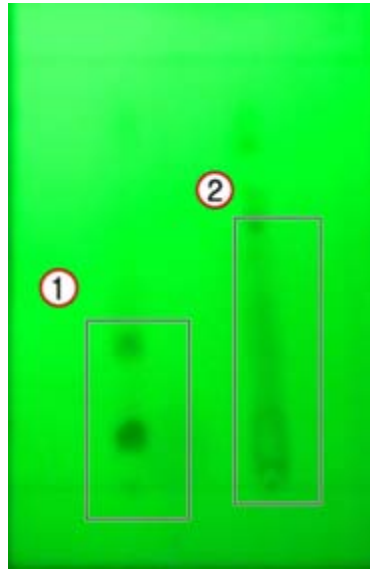
Citrinin 八號碳原子上的-OH 基(-OH group or 羥基(-OH))和 acetic anhydrid 在 60°C 下進行 acetylation 反應，產生 Citrinin-COCH<sub>3</sub>，而 Pyridine 帶有弱鹼性，在此作為除酸劑以中和副產物 acetic acid 產生的酸鹼值便變化。



**圖四.藉 TLC 檢測已修飾過的 Citrinin 和 Citrinin 標準品之間的差異**

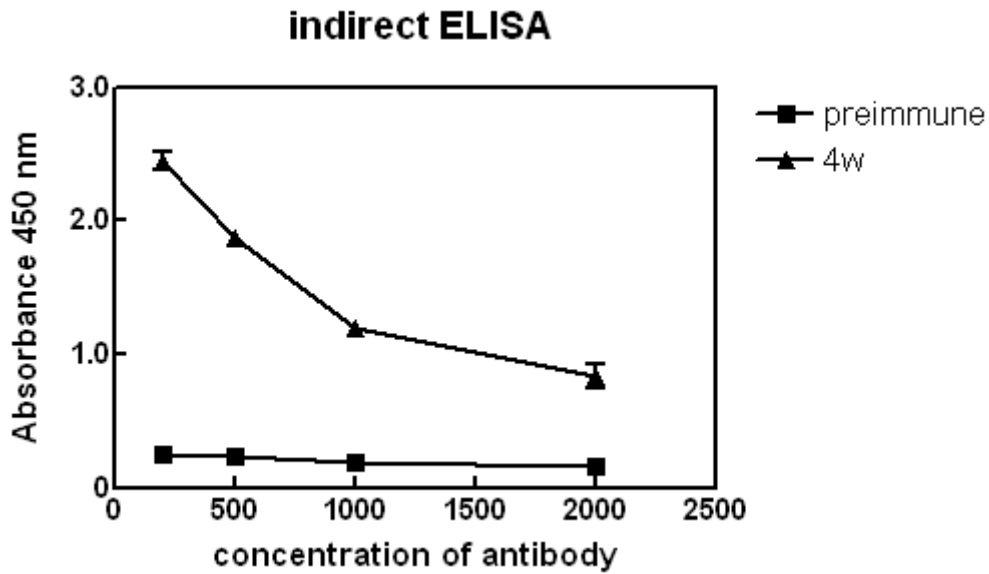
將 Citrinin 標準品和 Citrinin- COCH<sub>3</sub> 分別點在薄層層析片上(TLC Silica gel plate)，再用展開液 ( Chloroform : Acetone : ethanol : d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O = 6 : 4 : 1 : 0.1 ) 展開，於波長 254 nm 的波長下觀察。一號點為 Citrinin 標準品；二號點為 Citrinin- COCH<sub>3</sub>；三號點經實驗證實為 pyridine。顯示 Citrinin 衍生 COCH<sub>3</sub> 和 Citrinin 標準品的位置不同，所以我們推測 Citrinin 有成功衍生 COCH<sub>3</sub>。





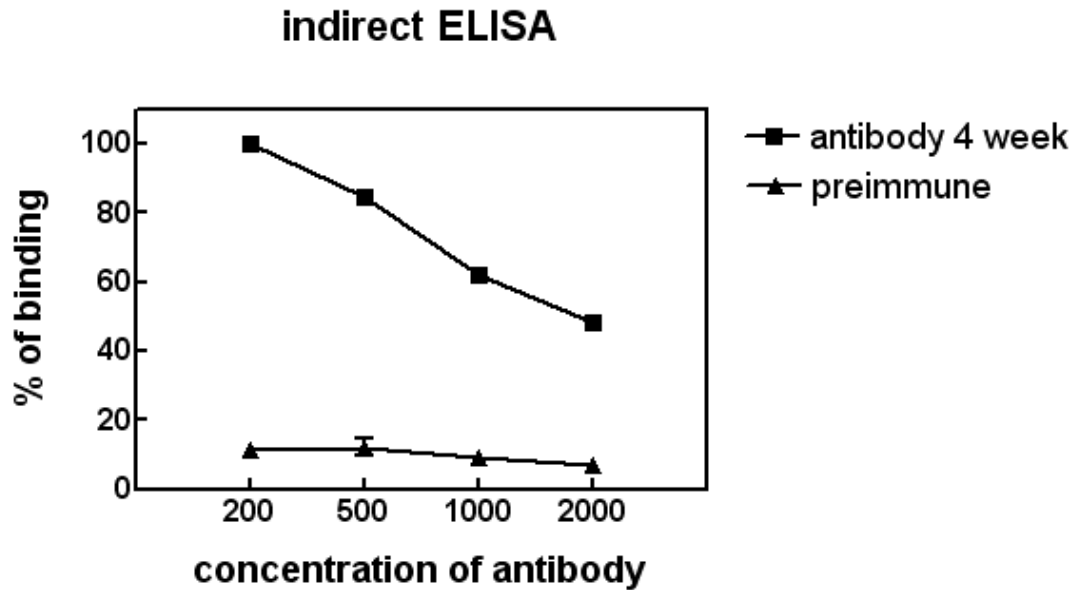
**圖五. 由 TLC 檢測 Citrinin 標準品和 Citrinin 衍生 CMO 之間的異同**

將 Citrinin 標準品和 Citrinin- CMO 分別點在薄層層析片上(TLC Silica gel plate)，再用展開液（同上）展開，於波長 365 nm 下觀察。一號點為 Citrinin 標準品；二號點為 Citrinin-CMO。顯示 Citrinin 衍生 CMO 和標準品 Citrinin 的位置不同，所以我們推測 Citrinin 有成功衍生 CMO。



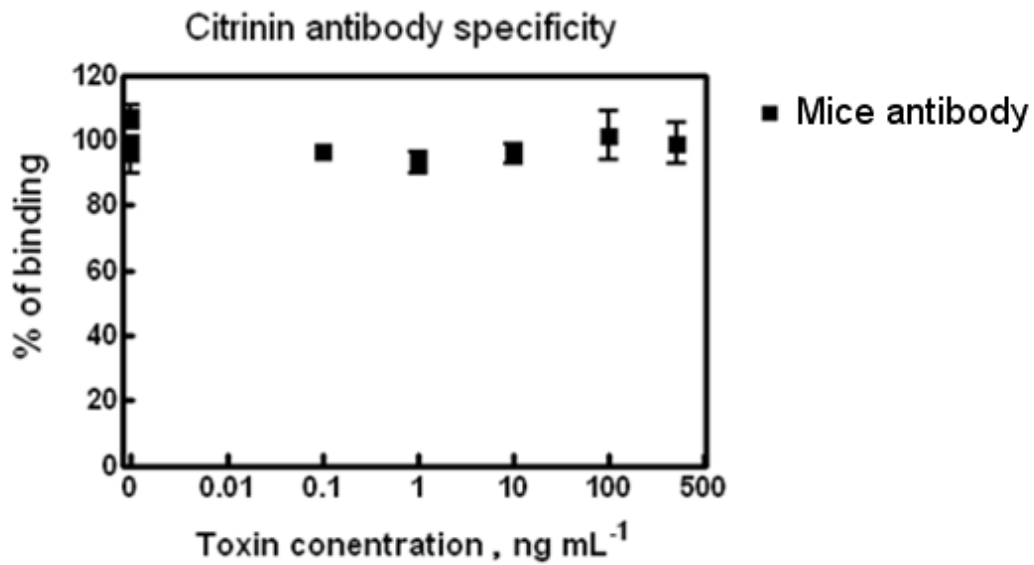
**圖六. 非直接型酵素免疫分析法( indirect ELISA)檢測抗體的產生**

在 96 孔盤中，加入 0.1 ml/well 的 Citrinin-KLH ( 1 : 2000 ; 0.65  $\mu\text{g}/\text{ml}$  )，用 washing buffer ( 0.05 % tween 20 in 0.01 M PBS )清洗後加入 0.1ml 的 anti-Citrinin antiserum (1:200; 1:500; 1:1000; 1:2000)辨識盤底的 Citrinin-KLH，最後加入 0.1ml 的二級抗體 (Rabit anti-mouse IgG-HRP ; 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。尚未施打 Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin 的小鼠血清作為控制組 (preimmune) 和施打 Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin 後第四週作比較，顯示在施打 Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin 後，小鼠體內有抗體產生。



圖七. 非直接型酵素免疫分析法( indirect ELISA)檢測抗體的產生

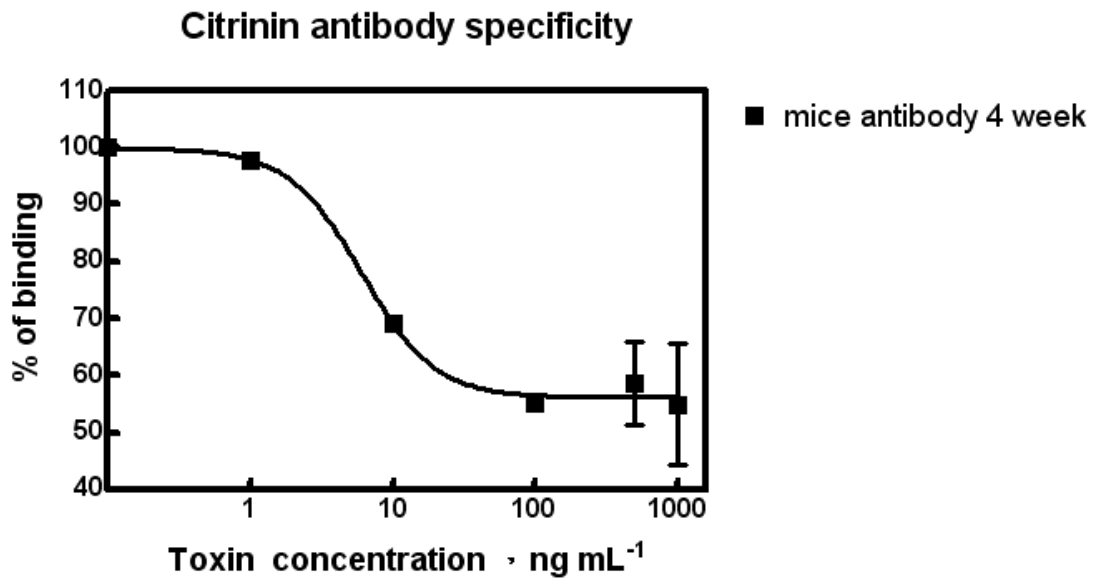
在 96 孔盤中,加入 0.1 ml/well 的 Citrinin- 1,4-butanediol diglycidyl ether-KLH ( 1 : 500 ; 0.42  $\mu\text{g}$  /ml ) , 用 washing buffer ( 0.05 % tween 20 in 0.01 M PBS ) 清洗後加入 0.1ml 的 anti-Citrinin antiserum (1:200 ; 1:500 ; 1:1000 ; 1:2000)辨識盤底的 Citrinin-KLH , 最後加入 0.1ml 的二級抗體 (Rabbit anti-mouse IgG-HRP ; 0.5  $\mu\text{g}$ /ml) 。尚未施打 Citrinin-Citrinin- 1,4-butanediol diglycidyl ether-KLH 的小鼠血清作為控制組( preimmune)和施打 Citrinin-Citrinin-1,4-butanediol glycidyl ether-KLH 後第四週作比較,顯示在施打 Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin 後,小鼠體內有抗體產生。



圖八. 非直接競爭型酵素免疫分析法( competitive indirect ELISA )檢

#### 測試 Citrinin 抗體的專一性

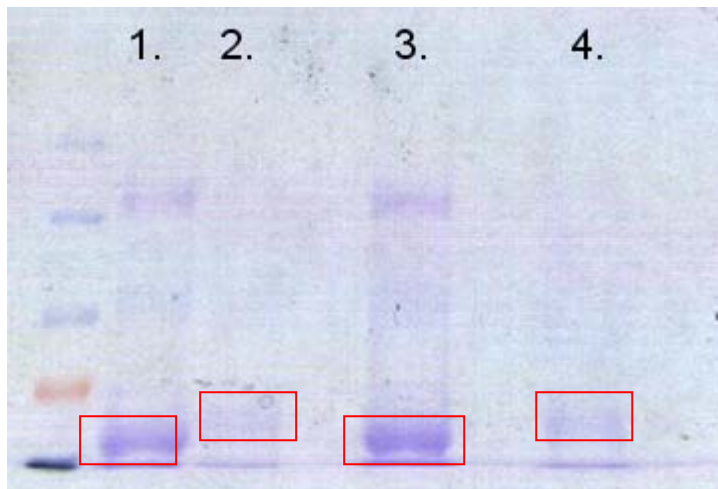
在 96 孔盤中，加入 0.1 ml/well 的 Citrinin-KLH ( 1 : 2000 ; 0.65  $\mu\text{g}$  /ml )，用 washing buffer ( 0.05 % tween 20 in 0.01 M PBS ) 清洗後加入 0.05 ml 的 anti-Citrinin antiserum ( 1:2000 )，同時加入 Citrinin 標準品作競爭，清洗後加入 0.1 ml 的二級抗體 (Rabbit anti-mouse IgG-HRP ; 0.5  $\mu\text{g}$ /ml )。隨著 Citrinin 標準品濃度提高，Citrinin 標準品無法抑制抗體辨識 Citrinin- CMO-  $\gamma$ -globulin，顯示抗體對於 Citrinin 的專一性並不理想。



圖九. 非直接競爭型酵素免疫分析法(competitive indirect ELISA)檢

#### 測試 Citrinin 抗體的專一性

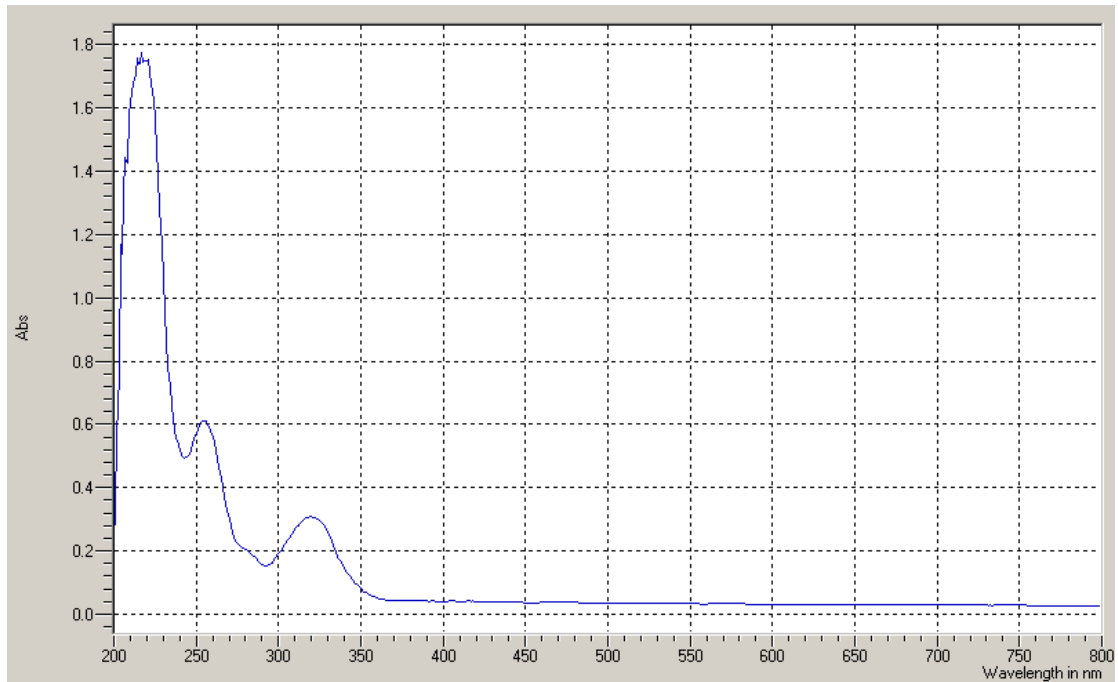
在 96 孔盤中，加入 0.1 ml/well 的 Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether- OVA (1 : 500 ; 0.42  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )，用 washing buffer (0.05 % tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗後加入 0.05 ml 的 anti-Citrinin antiserum (1:500)，同時加入 Citrinin 標準品作競爭，清洗後加入 0.1 ml 的二級抗體 (Rabbit anti-mouse IgG-HRP ; 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。隨著 Citrinin 標準品濃度提高，Citrinin 標準品能抑制抗體並辨識 Citrinin-1,4-butanediol diglycidyl ether- KLH，顯示抗體對於 Citrinin 的專一性。



1.  $\gamma$ -globulin 標準品 (10  $\mu\text{g/ml}$ )
2. Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin (10  $\mu\text{g/ml}$ )
3.  $\gamma$ -globulin 標準品 (20  $\mu\text{g/ml}$ )
4. Citrinin-CMO- $\gamma$ -globulin (20  $\mu\text{g/ml}$ )

**圖十. 用 SDS-PAGE 檢測 Citrinin-CMO 接合  $\gamma$ -globulin 效果**

我們由結果可以得知  $\gamma$ -globulin 和 Citrinin 接合後的蛋白質帶 (protein band) 會相對於  $\gamma$ -globulin 標準品的蛋白質帶 (protein band) 位置較高。



圖十一. 以全波長分光光度儀檢測 Citrinin 毒素標準品的吸收光波長

將 Citrinin 標準品溶於 MeOH 中，再以全波長分光光度儀檢測其吸收波長。根據文獻指出，Citrinin 的吸收波長約在 213, 253 和 321 nm 下有波峰出現 (Devi *et al.*, 2006)。我們藉由全波長分光光度儀檢測的毒素標準品和 Benjamin R. Clark 等人研究的 Dicitrinin A 在鹼性溶液下的波峰相似，但在波長 422nm 和 540nm 處不同 (附錄六)。

## 參考資料

### (References)

- Abramson, D., Usleber, E., Martlbauer, E. (2001). Immunochemical method for citrinin. *Methods in molecular biology* 157, 195-204.
- Awuah, R. T., and Kpodo, K. A. (1996). High incidence of *Aspergillus flavus* and aflatoxins in stored groundnut in Ghana and the use of a microbial assay to assess the inhibitory effects of plant extracts on aflatoxin synthesis. *Mycopathologia* 134, 109-114.
- Blanc, P. J., Laussac, J. P., Le Bars, J., Le Bars, P., Loret, M. O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Santerre, A. L., Goma, G. (1995) Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International journal of food microbiology* 27, 201-213.
- Clark, B. R., Capon, R. J., Lacey, E., Tennant, S., Gill, J. H. (2006). Citrinin revisited: from monomers to dimers and beyond. *Organic & biomolecular chemistry* 4, 1520-1528.
- Devi, P., Naik, C. G., Rodrigues, C. (2006). Biotransformation of citrinin to decarboxycitrinin using an organic solvent-tolerant marine bacterium, *Moraxella* sp. MB1. *Marine biotechnology* 8, 129-138.
- H. Xiao, J. R. Clarke, R. R. Marquardt, A. A. Frohlich (1995) Improved Methods for Conjugating Selected Mycotoxins to Carrier Proteins and Dextran for Immunoassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2092-2097.
- IARC(1986). Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. IARC Working Group. Lyon, 15-22 October 1985. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans* 40, 1-415.
- Liu, B. H., Wu, T. S., Su, M. C., Chung, C. P., Yu, F. Y. (2005). Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in *Monascus* fermentation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 170-175.



**Reiss, J. (1977). Mycotoxins in foodstuffs. X. Production of citrinin by *Penicillium chrysogenum* in bread. *Food and Cosmetics Toxicology* 15, 303-307.**

**Sabater-Vilar, M., Maas, R. F., Fink-Gremmels, J. (1999). Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutation research* 444, 7-16.**

**Shimizu, T., Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, K., Nagai, S., Nihira, T. (2005). Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Applied and environmental microbiology* 71, 3453-3457.**

**Su, Y. C., Wang, J. J., Lin, T. T., Pan, T. M. (2003). Production of the secondary metabolites gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 30, 41-46.**

**Wang, Y.Y., Li, Y.N., Guoy A.H. (2010). Preparation of CIT-protein Antigen and Antibody With The Bicoupling Method. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 37 (3): 337-341**

## 附錄 (Appendices)

### 附錄一. 中華民國行政院衛生署對食品中的 Citrinin 含量限制

中華民國 98 年 12 月 4 日衛署食字第 0980462647 號令發布

第一條 本標準依食品衛生管理法第十條規定訂定之。

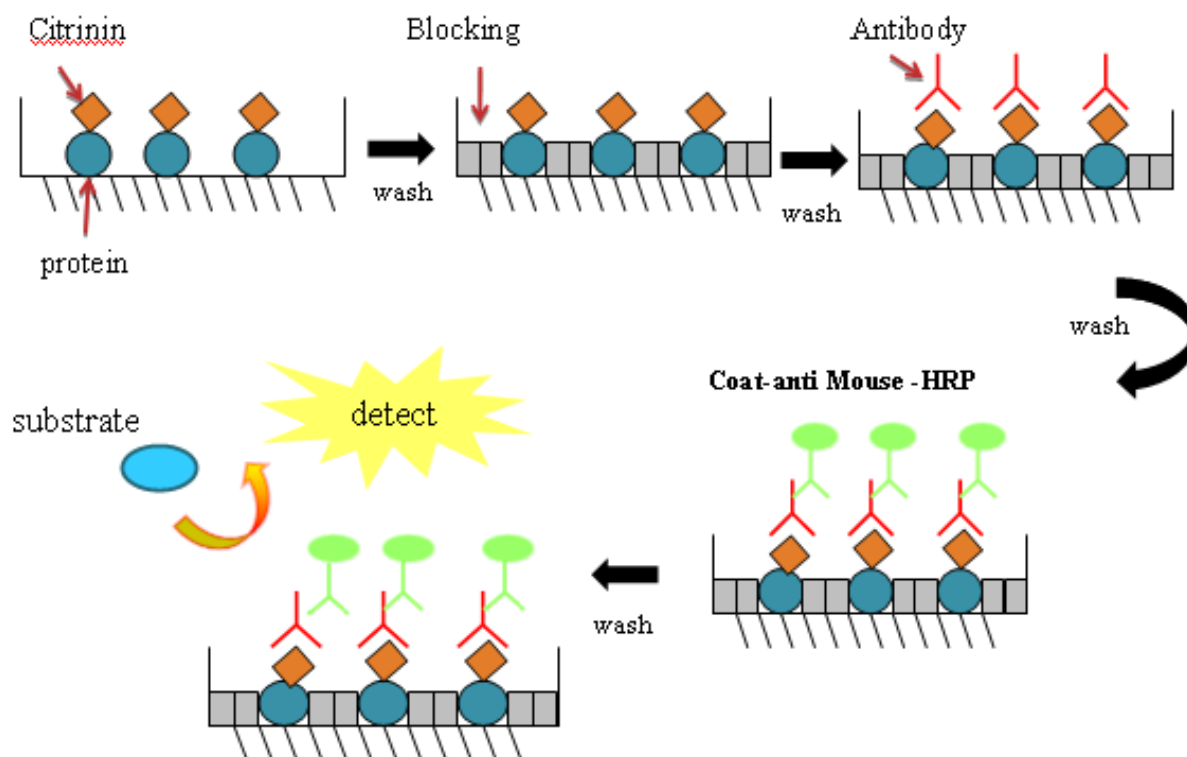
第五條 食品中橘黴素 (Citrinin) 限量應符合下列標準：

食品種類	橘黴素限量
紅麴色素	200 ppb 以下
原料用紅麴米	5 ppm 以下
使用紅麴原料製成之食品	2 ppm 以下

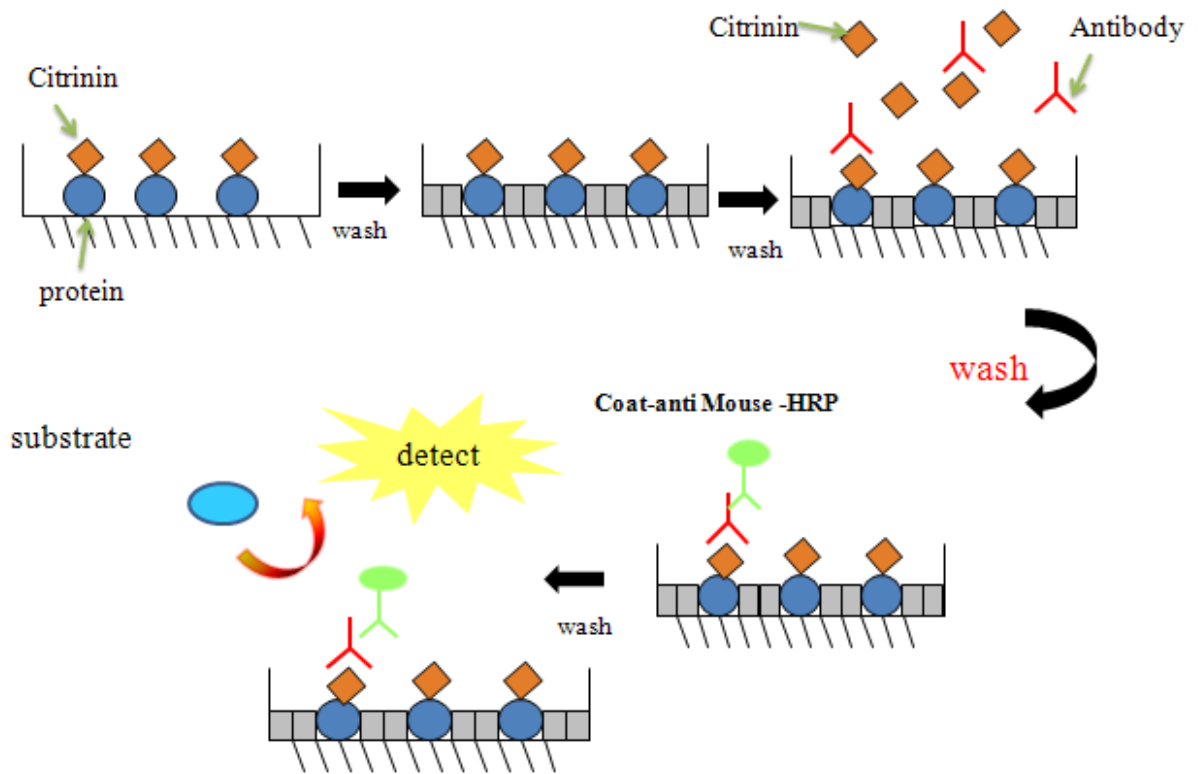
第六條 嬰兒食品之真菌毒素限量應符合嬰兒食品類衛生標準之規定。

第七條 本標準自發布日施行。

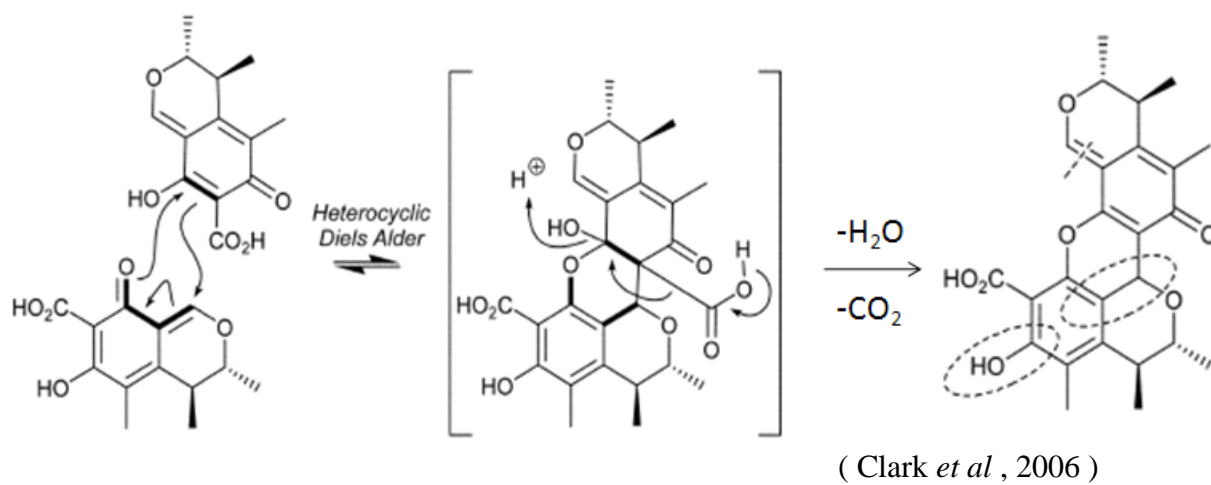
附錄二. 非直接型酵素免疫分析法( indirect ELISA )



附錄三. 非直接競爭型非酵素免疫分析法( competitive indirect ELISA )



附錄四. Citrinin 眾多化合物中有 dimeric products 的現象



附錄五. 從 Australian *Penicillium citrinum* 萃取出來的 Citrinin

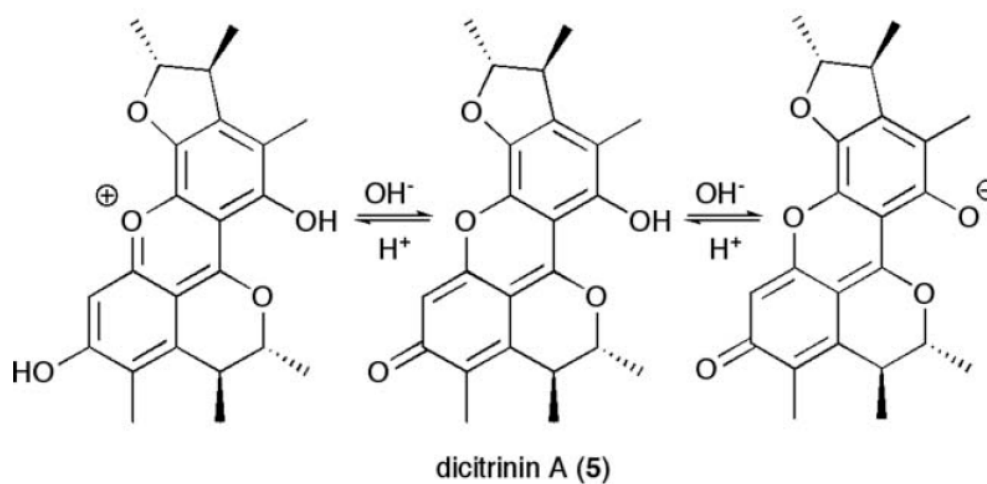
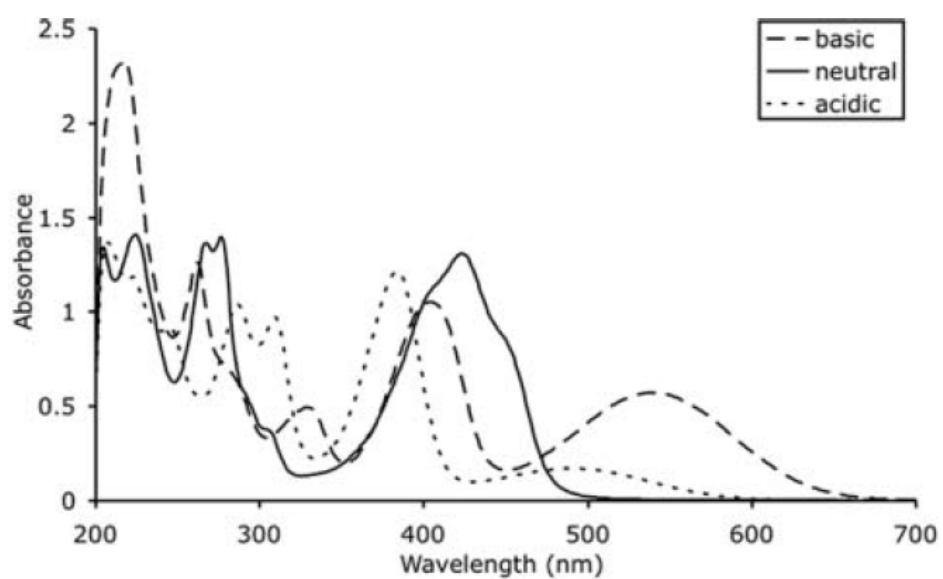
decomposition 中以 dicitrinin A 最多。

Compound	Yield/mg	Major ions (+ve)	Major ions (-ve)	UV-vis maxima <sup>a</sup>
Phenol A (2)	3.3 (6.6%)	197 (M + H)	195 (M - H), 179 (M - 17)	282, 223 (sh), 202
Phenol A acid (6)	4.2 (8.4%)	241 (M + H)	239 (M - H)	315, 252, 214
Decarboxycitrinin (9)	1.5 (3.0%)	207 (M + H)	223 (M + H <sub>2</sub> O - H), 205 (M - H)	336, 288, 228 (sh), 203
Dicitrinin D (14)	0.9 (1.8%)	437 (M + H)	453 (M + H <sub>2</sub> O - H)	413 (sh), 394, 267, 232
Citrinin (1)	1.0 (2.0%)	251 (M + H)	267 (M + H <sub>2</sub> O - H)	409 (sh), 332, 236
Dicitrinin C (13)	<0.7 (1.4%)	393 (M + H)	409 (M + H <sub>2</sub> O - H)	450 (sh), 425 (sh), 378, 293 (sh), 269, 230
Dicitrinin A (5)	8.0 (16%)	381 (M + H)	379 (M - H)	516 (sh), 451 (sh), 422 (sh), 385, 308, 279, 223 <sup>b</sup>
Dicitrinin B (12)	<0.8 (1.6%)	383 (M + H)	381 (M - H)	408, 281, 267, 241

<sup>a</sup> Extracted from DAD. <sup>b</sup> This UV-vis spectrum does not correspond to any of those shown in Fig. 2, due to the presence of protonated species.

( Clark *et al* , 2006 )

附錄六. Dicitrinin A 在不同酸鹼性環境下的結構會不同



( Clark *et al* , 2006 )