

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

* *****
* 計畫名稱：瘦肉精(Ractopamine)之抗體生產及快速免疫檢測方法之開發
* *****

執行計畫學生：石健佑
學生計畫編號：NSC 100-2815-C-040-027-B
研究期間：100年07月01日至101年02月28日止，計8個月
指導教授：余豐益

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 101年03月30日

中山醫學大學生物醫學科學學系

專題研究實驗

瘦肉精(Ractopamine)之抗體生產及快速免疫檢測方法
之開發

Production of antibody and Development of rapid
immunoassay for Ractopamine

指導教授：余豐益 教授 Feng-Yih Yu, Ph. D.

學生：石健佑 Chien-Yu Shih

中華民國 101 年 3 月

摘要

瘦肉精 (Ractopamine) 是一種常見的動物用藥，業者常將瘦肉精加入動物的飼料中，用以增加動物的瘦肉與脂肪比，進而能夠減少飼料的消耗達到降低成本的效果。如果食用了含有瘦肉精的肉品，可能會立即出現噁心、頭暈、肌肉顫抖、心悸、血壓上升等中毒症狀。各國對瘦肉精 (Ractopamine) 的限制含量有所不同，例如：美國之限制含量為 50 ppb、澳洲之限制含量為 50 ppb、日本之限制含量為 10 ppb，而台灣之限制含量則為不得檢出。最近新聞與報紙也常出現相關之報導，因此肉品與內臟中瘦肉精 (Ractopamine) 的毒性及含量亦為食品健康安全的隱憂之一。

目前市面上用來檢測瘦肉精 (Ractopamine) 的方法大多為氣相層析質譜法 (GC-MS) 與高效液相層析色譜法 (HPLC)，氣相層析質譜法 (GC-MS) 與高效液相層析色譜法 (HPLC)，它們雖然有很好的準確性，但是敏感度卻比不上酵素免疫分析法，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免疫分析法不方便。本實驗著重於製作出高專一性的瘦肉精 (Ractopamine) 抗體，並用此抗體開發一敏感度好的酵素免疫分析法及快速層析試紙分析法，以利於大量且快速檢驗肉品與相關產品。

首先使用 carbonyldiimidazole (CDI) 作為接合毒素與攜帶蛋白質之連接化合物，並把接合好之抗原用來免疫兔子，並使用酵素免疫分析法檢測血清中的抗體，經實驗結果得知，CDI 不是一個好優良的連接化合物，觀察 ELISA 所得到的曲線圖，無法觀察到好的 IC50，而且各濃度的數值也呈現不規則，之後利用 SDS-PAGE 來確定抗原是否有接合成功，從 SDS-PAGE 的結果得知抗原的接合並沒有成功，經過搜尋資料以及文獻之後，我決定選用新的接合試劑 succinic anhydride 來接合毒素與蛋白質來作為抗原免疫動物，但經過測試後效果依然不理想，後來改變接合之比例以及替換攜帶蛋白，並使用 ELISA 來檢驗抗體，由於實驗尚未完成所以未繳交數據，但本人會持續研究此專題，希望能完成此計劃。

目錄

一、前言	3
1.1 研究起源	3
1.2 瘦肉精基本性質	3
1.3 瘦肉精相關研究	4
1.4 酵素連結免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)	4
1.5 研究動機與研究問題	6
二、實驗材料與方法	7
2.1 實驗藥品	7
2.2 實驗儀器	8
2.3 實驗方法	9
三、實驗結果	17
3.1 瘦肉精抗體之效價測試	17
3.2 非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法	18
3.3 使用 SDS-PAGE 確認抗原之接合	19
3.4 檢測被瘦肉精免疫後小鼠抗體之專一性及敏感度	24
3.5 接合新 ELISA 用之抗原並檢測小鼠之抗體	25
3.6 接合新的免疫用抗原免疫兔子並用 ELISA 檢測	26
四、討論	27
五、參考文獻	29

一、前言

1.1 研究起源

瘦肉精 (Ractopamine) 是一種常見的動物用藥，畜牧業者經常將瘦肉精加入動物的飼料中，以增加動物瘦肉與脂肪的比例，進而減少飼料的消耗以達到降低成本的效果。如果食用含有瘦肉精的肉品，可能會立即出現噁心、頭暈、肌肉顫抖、心悸、血壓上升等中毒症狀，近年來經常在新聞或報章雜誌上看到相關的報導，基於維護食品安全衛生的必要性，開發瘦肉精快速檢驗系統的工作已刻不容緩，於是我們希望開發出以免疫偵測方式來檢驗樣品中的瘦肉精 (Ractopamine) 總含量。

1.2 瘦肉精 (Ractopamine) 基本性質

瘦肉精 (Ractopamine) (4-[3-[[2-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amino]-butyl]phenol)，簡寫為 Rac，分子式為 $C_{18}H_{23}NO_3$ ，瘦肉精 (Ractopamine) 為分子量 301.38 Da 的小分子毒素，瘦肉精 (Ractopamine) 是一種 phenolethanolamine β -adrenoceptor agonist，具有促進蛋白質合成的功能，增加動物的瘦肉與脂肪比 (Jones *et al.*, 1985; Maclennan and Edwards, 1989)，因此養成的豬隻體形健美利潤比較高。業者在豬飼料中加入瘦肉精 (Ractopamine)，豬隻食用含有瘦肉精的飼料後，其瘦肉會快速生長，但是若未依照規定使用，將造成瘦肉精 (Ractopamine) 在肌肉與內臟中的殘留量過多，當人類食用含有瘦肉精的肉品時可能會立即出現噁心、頭暈、肌肉顫抖、心悸、血壓上升等中毒症狀。

根據行政院衛生署的資料指出，各國對於豬隻肉品內殘留瘦肉精容許量的標準不同，如：澳洲的 Ractopamine 殘留量不可超過 50 ppb、加拿大的 Ractopamine 殘留量不可超過 40 ppb、美國的 Ractopamine 殘留量不可超過 50 ppb、日本的 Ractopamine 殘留量不可超過 10 ppb，而台灣則是完全禁止使用瘦肉精 (Ractopamine)，因為各國的風土民情與政府法規的不同，所以有不同的瘦肉精限制

含量，由於本國國人經常食用內臟，例如：豬肝、豬腎等，因此本國對於瘦肉精 (Ractopamine) 的殘留較嚴格。

1.3 瘦肉精 (Ractopamine) 相關研究

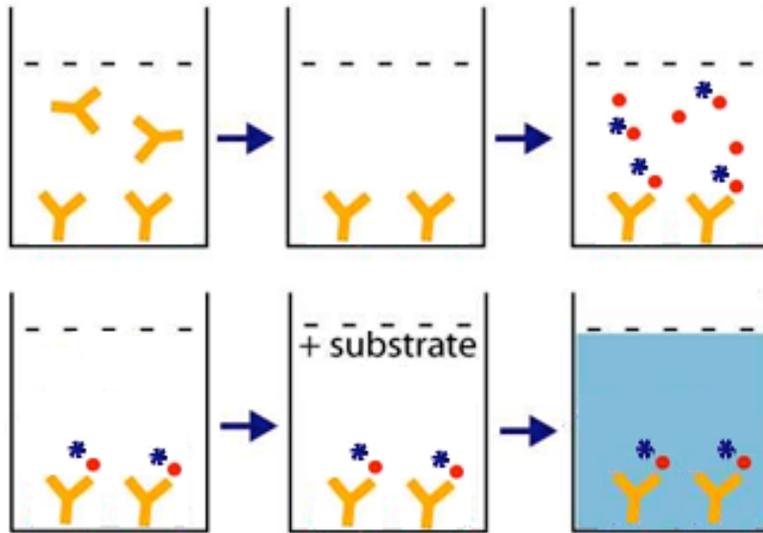
目前已有檢測動物組織中瘦肉精 (Ractopamine) 含量的方法，例如免疫檢測 (Shelver and Smith, 2000, 2002a)，液相層析 (Turberg *et al.*, 1995, 1996; Smith and Shelver, 2002)、液相層析質譜儀 (Antignac *et al.*, 2002; Shishani *et al.*, 2003) 及其他方法 (Inoue and Chang, 2003; Shelver and Smith, 2003)。

目前最常用以檢驗瘦肉精 (Ractopamine) 的技術是利用高效液相層析色譜法 (HPLC) (method B03766; available from the U.S. FDA upon request)，也可以使用氣相層析質譜法 (GC-MS)，雖然這兩種方法有很好的準確性，例如 HPLC 之 Limit of detection (LOD) 為 0.1 ~ 0.21 ppb (Journal of Chromatography A, 2010)，但是這兩種方法不僅耗時也耗費，且檢測前樣品的準備非常繁複，所以利用酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 是另一可行的辦法 (Weilin, 2002)。

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

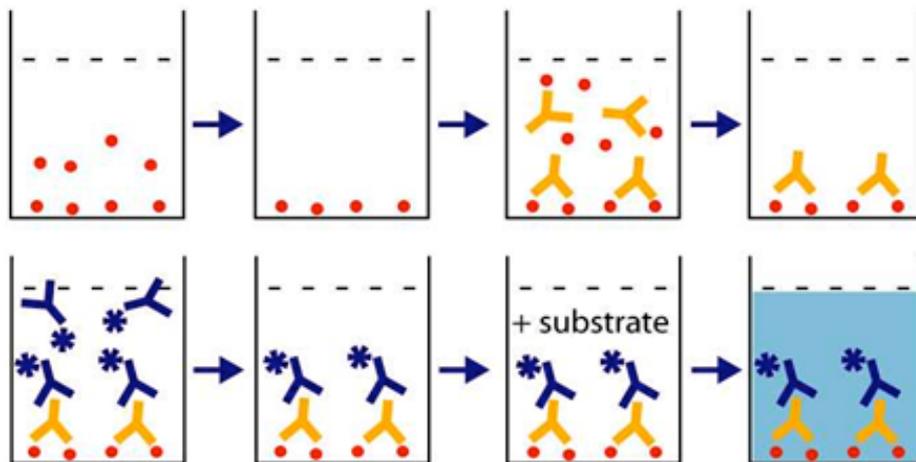
酵素連結免疫分析法就是利用抗體與抗原之間的專一性來進行樣品中抗原含量，而所謂的抗原，通常以需要檢測的物質為主，像是小分子毒物：黴菌毒素、藻類毒素、抗生素或毒品；也可以是高分子化合物，例如：HIV 病毒表面抗原、細菌的外鞘蛋白、蛇毒等蛋白質毒素。而酵素免疫分析法以操作方式的不同可分為三種：直接競爭型酵素連結免疫分析 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay)、非直接競爭型酵素連結免疫分析 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay) 與三明治酵素免疫連結分析 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)，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分析 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay) 是先將抗體利用吸附法或是共價接合法，連接到固相基質上，在同時加入樣品與酵素標記的抗原標準品，待抗原與抗體反應一段時間後，加入酵素受質即可呈色。所得到的產物顏色與樣品中的抗原含量呈反比。



圖一、直接競爭型酵素連結免疫分析

非直接競爭型酵素連結免疫分析 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay) 是將抗原固定在固相基質上，加入樣品、抗原標準品與抗體，而樣品中的抗原會抑制抗體結合於附著在固相基質上的抗原，最後加入具酵素標定的二級抗體，二級抗體會結合於抗體的不變區，最後再加入酵素受質即可呈色。樣品的抗原濃度越高，則呈色結果越淺。



圖二、非直接競爭型酵素連結免疫分析

酵素連結免疫分析 (ELISA) 的優點是樣品準備不複雜，進行實驗的時間也快速，最重要的是所花費的金錢相對於 HPLC 或是 GC-MS 來的低，雖然 ELISA 的準確性不會比 HPLC 和 GC-MS 好，不過卻是一個相當廉價且實用的檢測方法。

1.5 研究動機與研究問題

目前市面上用來檢測瘦肉精 (Ractopamine) 的方法大多為氣相層析質譜法 (GC-MS) 與高效液相層析色譜法 (HPLC)，氣相層析質譜法 (GC-MS) 與高效液相層析色譜法 (HPLC)，雖然準確性佳，但是敏感度比酵素免疫分析法差，且檢驗前樣品的處理較繁瑣，又無法一次檢測大量的樣品，不管在時間、金錢、操作人員的培訓或實用性上都比酵素免疫分析法差。所以製作出高敏感度與高專一性的瘦肉精 (Ractopamine) 抗體用來開發一酵素免疫分析法於檢驗肉品與相關產品是迫切需要的。因此我將研究分為三個子目標：

【子目標一、】：製備專一性瘦肉精 (Ractopamine) 的多株抗體。

- 製備免疫抗原
- 將毒素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) 方式檢測樣品中瘦肉精 (Ractopamine) 的含量。

- 直接競爭型ELISA
- 非直接競爭型ELISA

【子目標三、】：開發瘦肉精 (Ractopamine) 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

二、實驗材料與方法

2.1 實驗藥品

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

Gelatin	Bovine serum albumin (BSA)
Ovalbumin (OVA)	Sodium bicarbonate
Freund's complete adjuvant	Carbonyldiimidazole
Pyridine	Tris
N, N, N',N'-tetramethylethylenediamine	Ammonium persulfate
Sodium dodecyl sulfate	Coomassie Brilliant Blue R-250

下列藥品購自 Fluka

Ethyl Chloroformate

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Acetic acid
Tetrahydrofuran (THF)	Sodium carbonate

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

aqueous Hydrochloric Acid (HCl)	Sodium Hydroxide
N,N-dimethylformamide (DMF)	Methanol

下列藥品購自 ALDRICH

Succinic anhydride

1,4-Butanediol diglycidly

下列藥品購自 Alfa Aesar

Tri-n-butylamine

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

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

Freund's incomplete adjuvant

Horseradish peroxidase (HRP)

Microtiter plates 購於 Nunc (Roskild, Demark)

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

New Zealand white rabbits 購自彰化鹿和牧場

Balb/c white mice 購自國家實驗動物中心

Distilled water

Acrylamide 購自生工生技

2.2 實驗儀器

儀器名稱	廠牌
Centrifuge	HERMLE Z323K HERAEUS Biofuge pico
pH meter	METTLER TOLEDO MP220
Vortex machine	GENIE Vortex-2
Water bath	TKS WB221
Microplate reader	Molecular Device E max
Auto strip washer	BIO TEK INSTRUMENT ELx50
Rotary vacuum evaporator	EYELA

Incubator	LAB-LINE
Refrigerator	SHOCKLOCK
Hot plate	Fargo HMS-102
HPLC system	BECKMAN COULTER
Ultrasonic cleaner	ENSHINE

2.3 實驗方法

製備用於免疫兔子或小鼠之瘦肉精抗原

因為瘦肉精 (Ractopamine) 屬於小分子毒素，只具有抗原性而沒有免疫原性，所以必須與載體蛋白質接合放大其分子量，本計劃欲使用牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, BSA) 作為載體蛋白。由於瘦肉精 (Ractopamine) 的結構中缺乏與載體蛋白接合時常使用的胺基 (-NH₂) 及羧基 (-COOH)，故必須先以 carbonyldiimidazole (簡稱CDI)，與瘦肉精 (Ractopamine) 的 -OH 基接合，再利用 carbonyldiimidazole 與載體蛋白 (BSA) 做接合，產生出具有刺激免疫反應的抗原 Ractopamine-CDI-BSA (Figure 1)。

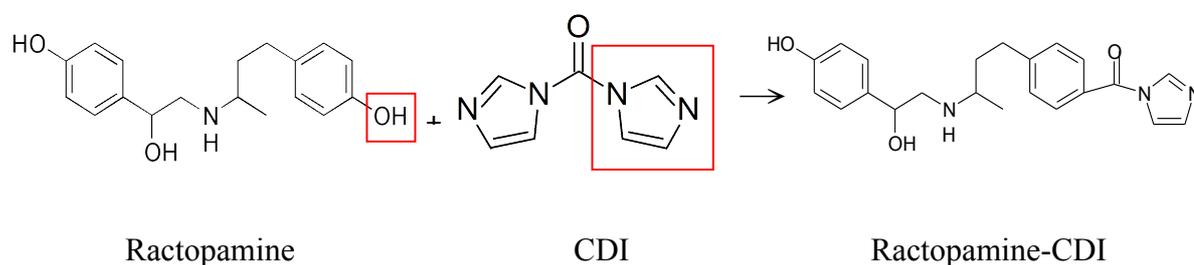


Figure 1. 利用 CDI 接合 Ractopamine 的 -OH 基，衍生一個可供載體蛋白接合的羧基。

【子目標一、】:製備的瘦肉精 (Ractopamine) 多株抗體

1.製備免疫抗原:

- a. 將瘦肉精 (Ractopamine) 與 carbonyldiimidazole 接合:

秤取 2 mg 的瘦肉精 (Ractopamine) 與 4 mg 的 carbonyldiimidazole, 分別溶於 1 ml 的丙酮, 在室溫下反應一小時。

- b. 使用 Ractopamine-CDI 與 BSA 接合成為抗原:

取 1 ml 的 Ractopamine-CDI (含有 1 mg 的 Ractopamine), 再把 4 mg 的 BSA 溶入 160 μ l 的 carbonate buffer, 並使其在室溫下反應一個晚上, 之後在 2 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

- c. 使用 Ractopamine-CDI 與 OVA 接合作為覆被抗原:

取 0.5 ml 的 Ractopamine-CDI (含有 0.5 mg 的 Ractopamine), 再把 2 mg 的 OVA 溶入 80 μ l 的 carbonate buffer, 並使其在室溫下反應一個晚上, 之後於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

- d. 使用 Ractopamine-CDI 與 HRP 接合:

取 0.5 ml 的 Ractopamine-CDI (含有 0.5 mg 的 Ractopamine), 再把 2 mg 的 HRP 溶入 80 μ l 的 carbonate buffer, 並使其在室溫下反應一個晚上, 之後於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

2.利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合

- a. 製作 0.75 mm 10% 的下層解析膠體:

分別取 4,000 μ l 的 d_2H_2O 、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% 的 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。

b.加入酒精將下膠壓平

c.製作 0.75 mm 5% 的上層膠體:

分別取 1,700 μ l 的 d_2H_2O 、415 μ l 的 30% Acrylamide、315 μ l 的 1.0 M Tris pH 6.8、25 μ l 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、25 μ l 10% 的 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。

d.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 之 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。

e.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 d_2H_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。

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

為了使紐西蘭大白兔產生對瘦肉精 (Ractopamine) 具有專一性的抗體，我們將 Ractopamine-CDI-BSA (0.5 mg 的 BSA 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，再以表皮注射的方式，將混合物打入兔子的體內。免疫四周之後，再進行 boost 的動作，取

Ractopamine-CDI-BSA (0.5 mg 的 BSA 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, 第五週之後就開始對兔子進行靜脈採血, 並使用 ELISA 進行檢測是否產生了瘦肉精 (Ractopamine) 的專一性抗體。

4. 多株抗體的純化:

等到採集到的兔子血液凝固之後, 插入竹籤放在 4°C 冰箱中隔夜使血液黏附在竹籤上, 將血塊清除後取上清液即為血清並計算其體積。之後加入與血清同體積的 100% (NH₄)₂SO₄, 混合均勻靜置 30 分鐘, 再以冷凍高速離心機離心 8,000 rpm 4°C 20 分鐘並去除上清液。之後用一半體積的 d₂H₂O 回溶沉澱物, 再加入一半體積的 70% (NH₄)₂SO₄, 混合均勻靜置 30 分鐘, 接著離心 8,000 rpm 20 分鐘並去除上清液, 一直重覆此步驟直到沉澱物顏色為純白, 之後以一半體積的 d₂H₂O 回溶沉澱物並放入透析袋中, 置於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析, 隔天將透析液取出, 用 0.01 M 的 PBS 補回原體積, 即為純化好的多株抗體。

5. 抗體效價測試 (Titer test)

利用非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法來進行抗體效價之測試。將 RAC-CDI-OVA 以 0.01 M PBS 稀釋後, 在各孔注入 100 μ l 並且放置 37°C 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 μ l 的 blocking buffer (0.1% Gelatin in 0.01 M PBS) 後放置 37°C 培養箱中反應 30 分鐘, 以 washing buffer 清洗盤子四次, 再加入 100 μ l 以不同稀釋倍率濃度的抗體, 並且放置於 37°C 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 μ l Goat anti-rabbit IgG-HRP, 以 0.01 M PBS 稀釋 20,000 倍, 置於 37°C 培養箱反應 1 小時, 以 washing buffer 清洗盤子四次, 最後加入 100 μ l TMB

substrate，置於室溫避光反應約 30 分鐘後，加入 100 μ l 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。

6. 非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay, ciELISA)

將 Rac-CDI-OVA 以 0.01 M PBS 稀釋後，在各個孔洞中注入 100 μ l 並且放置 37°C 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 μ l 的 blocking buffer (0.1% Gelatin in 0.01 M PBS) 後放置 37°C 培養箱中反應 30 分鐘，以 washing buffer 清洗盤子四次，再加入 50 μ l 不同濃度的瘦肉精標準品 (100 ng/ml ~ 0.01 ng/ml) 與 50 μ l 的純化好的多株抗體，放置 37°C 培養箱中反應 1 小時，一樣以 washing buffer 清洗盤子四次，之後加入 100 μ l Goat anti-rabbit IgG-HRP，以 0.01 M PBS 稀釋 20,000 倍，置於 37°C 培養箱反應 1 小時，以 washing buffer 清洗盤子四次，最後加入 100 μ l TMB substrate，置於室溫避光反應約 30 分鐘後，加入 100 μ l 1 N HCl 終止反應，終止反應後利用 ELISA Reader 測量波長 450-650 nm 的吸光值。

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

將純化好的多株抗體以 0.01 M PBS 稀釋後，在各個孔洞中注入 100 μ l 並且放置 37°C 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，然後加入 170 μ l 的 blocking buffer (0.1% BSA in 0.01 M PBS) 後放置 37°C 培養箱中反應 30 分鐘，以 washing buffer 清洗盤子四次，然後加入 50 μ l 不同濃度的瘦肉精標準品 (100 ng/ml ~ 0.01 ng/ml) 與 50 μ l 的 Rac-CDI-HRP，放置 37°C 培養箱中反應 1 小時，以 washing buffer 清洗盤

子四次，加入 100 μ l TMB substrate，置於室溫避光反應約 30 分鐘後，加入 100 μ l 1 N HCl 終止反應，最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm-650 nm 的吸光值。

【子目標二、】:以酵素連接免疫吸附分析法檢測樣品中瘦肉精 (Ractopamine) 的含量

1. 樣品的萃取

把肉品或是內臟剝碎並與甲醇均勻混合，之後放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中隔夜反應，之後取 2 mg 含甲醇的樣品並用均質機打碎，加入 10 ml 的 0.01 M PBS 並混合均勻，之後用離心機離心 4,000 rpm 10 分鐘，離心後把脂肪層去除剩下的液體就可以用 ELISA 檢測是否含有瘦肉精 (Ractopamine)。

2. 直接競爭型 ELISA (cdELISA)

在 96 孔盤中加入 100 μ l 純化後的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時，接著以 washing buffer (0.05% Tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗盤子。然後每個孔中加入 170 μ l blocking buffer (0.1% BSA in 0.01 M PBS) 放置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 30 分鐘，以 washing buffer 清洗。然後加入 50 μ l Ractopamine 毒素標準品 (0.01~10 ng/ml) 及 50 μ l Ractopamine-CDI-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，放置於 37 $^{\circ}$ C 環境中反應 1 小時，以 washing buffer 清洗盤子。最後加入 100 μ l TMB substrate，置於室溫避光反應 15 分鐘後，加入 100 μ l 1 N HCl 終止反應。最後用 ELISA Reader 測量波長 450 nm- 650 nm 的測吸光值。

3. 非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

在 96 孔盤中加入 100 μ l Ractopamine-CDI-OVA (以 0.01 M PBS 稀釋)，

置於 37°C 環境中反應 1 小時。接著以 washing buffer (0.05% Tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗盤子後，再於 96 孔盤中加入 170 µl blocking buffer (0.1% Gelatin in 0.01 M PBS)，置於 37°C 環境中反應 30 分鐘。再以 washing buffer 清洗盤子後，接著加入 50 µl 不同濃度的 Ractopamine 毒素標準品 (0.01~10 ng/ml) 及 50 µl 純化過的抗體 (以 0.01M PBS 稀釋)，置於 37°C 環境中反應 1 小時。再用 washing buffer 清洗盤子。再加入 100 µl Goat anti-rabbit 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 µl TMB substrate，置於室溫避光反應 30 分鐘後，加入 100 µl 1 N HCl 終止反應。最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm- 650 nm 的測吸光值。

【子目標三、】：開發瘦肉精 (Ractopamine) 快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip)

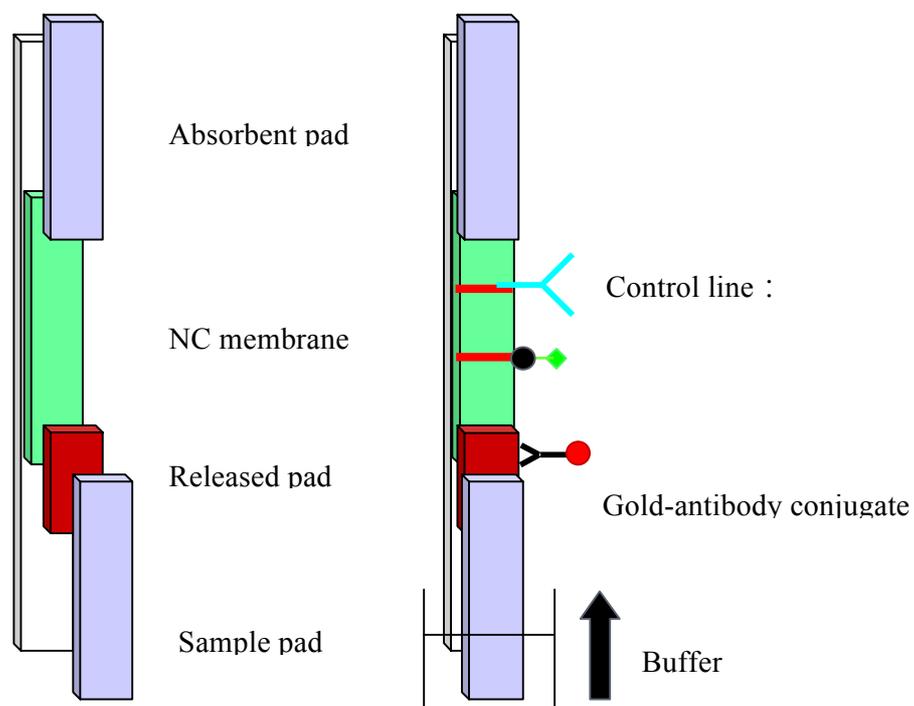
1. 製備奈米金粒子探針

將瘦肉精 (Ractopamine) 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 的瘦肉精 (Ractopamine) 多株抗體【已溶於 2 L Boric acid-Borax buffer (2 mM, pH 8.0)】，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，接著加入 0.35 ml 10% (w/v) BSA (以 0.45 µm 的過濾膜過濾) blocking，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 200 µl Tris buffer (20 mM, pH 8.0, 含 1% BSA 和 0.1% sodium azide)，置於 4°C 保存備用。

2. 免疫試紙的製備

先將瘦肉精 (Ractopamine) 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5 μl / strip)，置於 37°C 烘乾。再將 0.25 μl 的 Ractopamine-OVA 和 0.25 μl 的 Anti-rabbit-Fc antibody (0.2 mg/ml) 分別點在 NC membrane (孔徑為 5 μm ，黏附於塑膠片上，5 mm \times 75 mm) 上的 Test line 和 Control line 的位置，置於 37°C 環境中 10 分鐘烘乾。接著組裝試紙，其組裝方式為：首先將 conjugate release pad 疊在 NC membrane 上(大約重疊 2 mm)，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 (Figure 2a)。在 96 孔盤中，加入 200 μl 欲測試的樣品和不同濃度的 Ractopamine 毒素標準品，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 分鐘後就可以目視觀察結果 (Figure 2b.)。

(a)



(b)

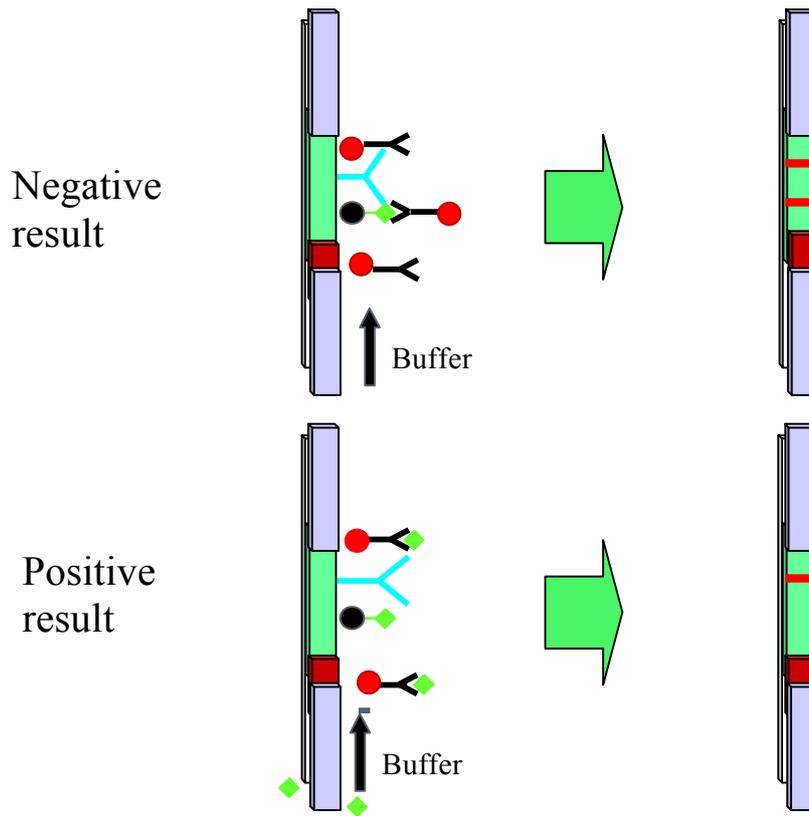


Figure. 2. (a)免疫層析試紙組成與(b)分析結果。

三、實驗結果

首先本研究選用 Pre-immune、第 5 週、第 6 週和第 7 週的血清以進行抗體效價測試，抗體效價於第五週時有上升，但是在第六週下降 (Figure 3)。而在毒素競爭測試的實驗中，本研究選用第 8 週的血清以進行檢測，實驗結果得知，無法明確看出 IC50 的位置且曲線也呈現不規則 (Figure 4)。綜合以上結果顯示，因此本研究推測造成此現象的原因能是瘦肉精 (Ractopamine) 的抗體沒有產生，或抗體的量少且專一性和敏感度不佳。

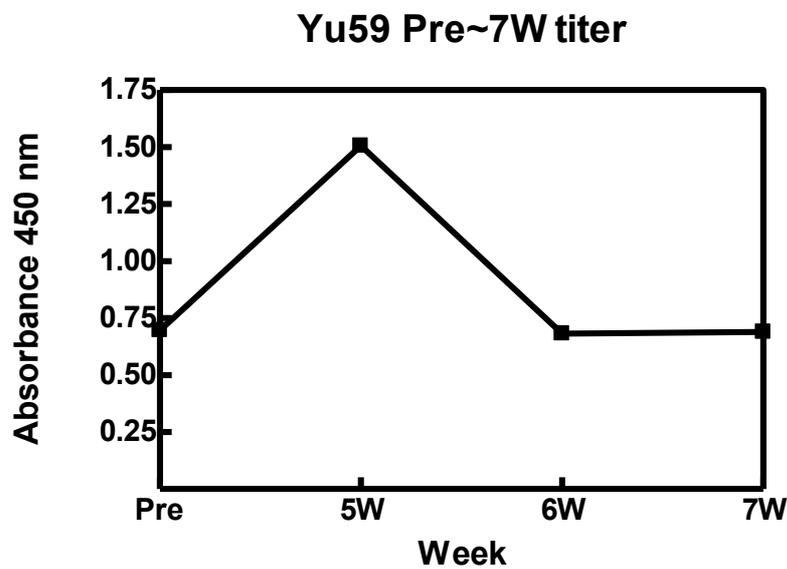


Figure 3. Anti-Rac 之血清效價測試

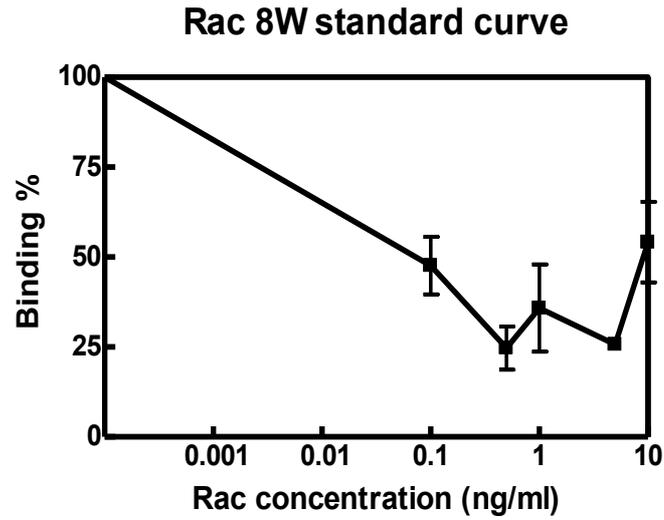


Figure 4. 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Rac 進行專一性測試

本研究認為造成抗體沒有產生或品質不佳的原因，可能是抗原的接合有問題，於是本研究使用 SDS-PAGE 以確認抗原是否接合成功。

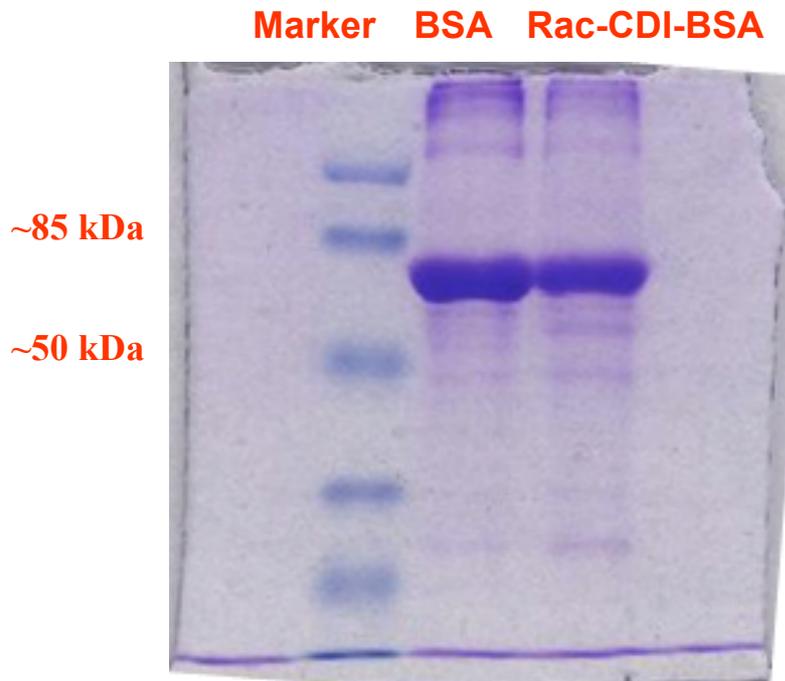


Figure 5. 以 SDS-PAGE 確認抗原 (Rac 與攜帶蛋白質 BSA 結合情形)

由 SDS-PAGE 的結果顯示，第一行為 Marker，第二行為 BSA，第三行為 Rac-CDI-BSA，BSA 的分子量為 66.7 kDa，與 Marker 對照可觀察到第二行蛋白質分佈與預期符合，比較第二行與第三行，接合的 Rac-CDI-BSA 所跑出來結果與 BSA 並無差異 (Figure 5)，因此結果證明推論抗原無法接合到蛋白質上，也得知使用 CDI 作為衍生的化合物較不適合，而導致兔子沒有抗體的產出。由於抗原接合失敗，因此本研究將使用其他連接化合物 succinic anhydride，其衍生方法如下圖 (Figure 6)。

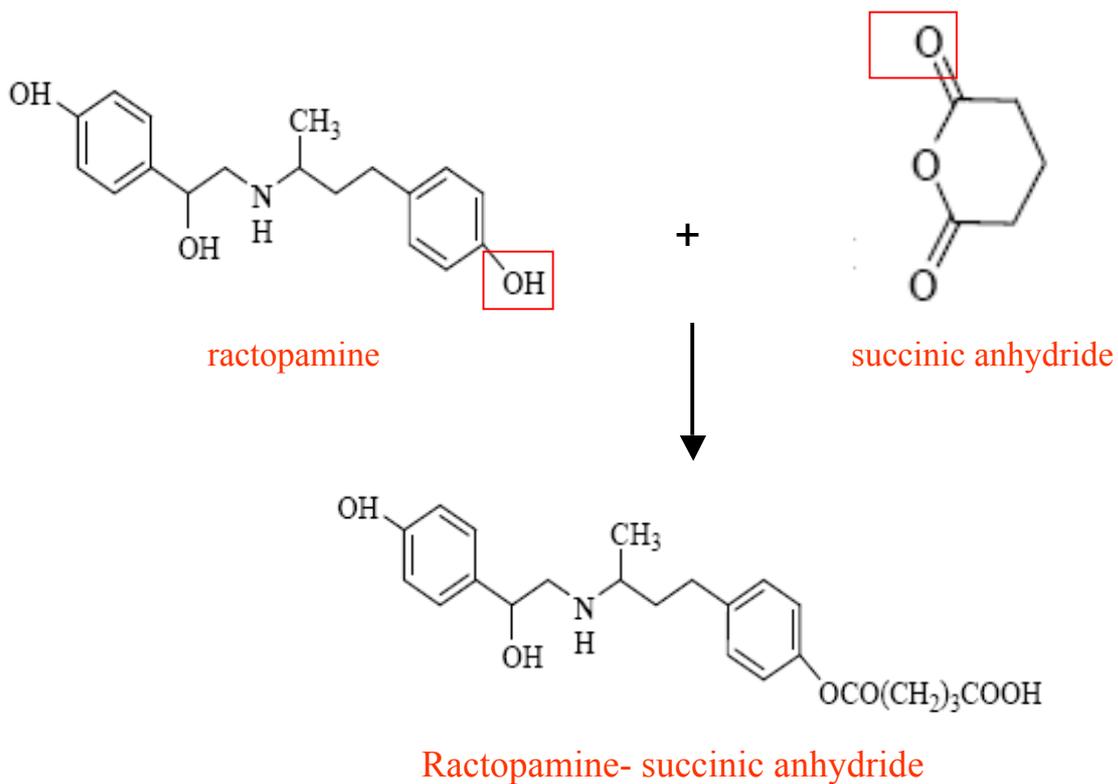


Figure 6. 以 succinic anhydride 衍生 Ractopamine

衍生完成的半抗原再與攜帶蛋白 γ -globulin 接合，完成抗原的製備，其接合如下圖 (Figure 7)。

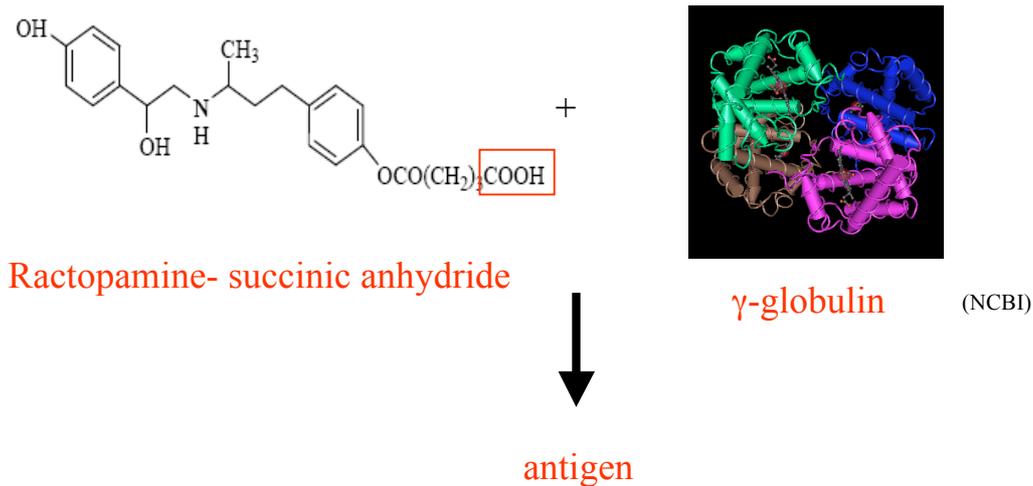


Figure 7. 半抗原與攜帶蛋白 γ -globulin 之接合

接合完成後先用 SDS-PAGE 來確認抗原接合是否有成功，第一行為 Marker，第二行為 γ -globulin，第三行為 Rac- succinic anhydride- γ -globulin (Rac : γ -globulin = 1:2)，由於 γ -globulin 的分子量約為 80 kDa 與 Marker 對照後結果是正確的 (γ -globulin 加熱後會分離成兩個次單元，兩個次單元分子量加起來約為 80 kDa)，經由第二行 (Control) 與第三行 (Rac : γ -globulin = 1:2) 之比較結果得知接合的抗原其分子量有明顯的增加，因此抗原接合是成功的 (Figure 8)。

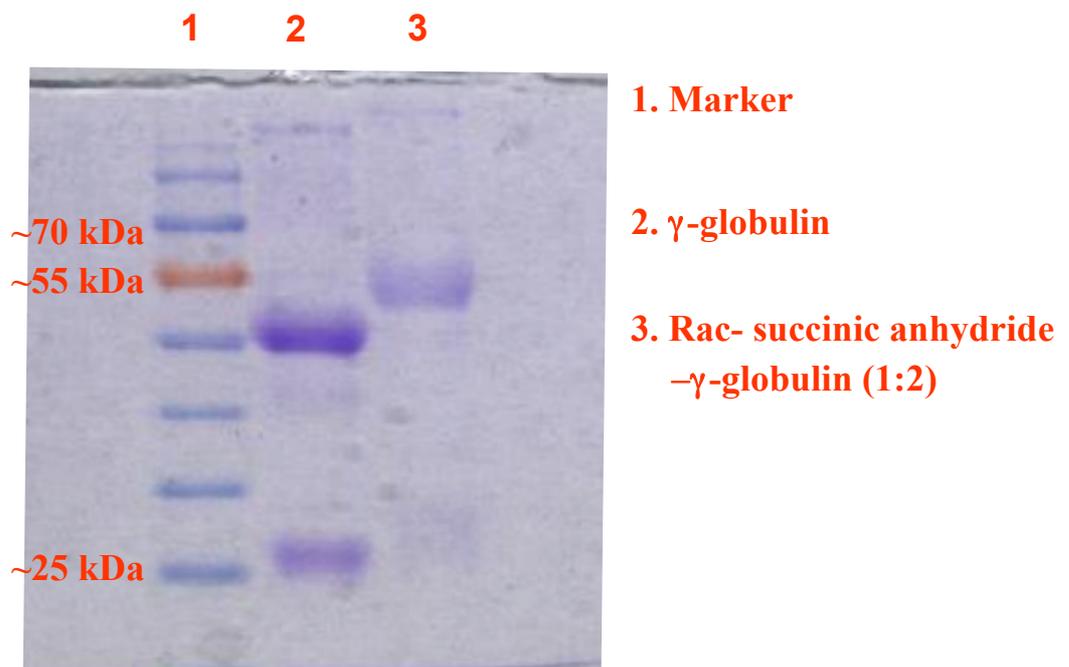


Figure 8. 以 SDS-PAGE 確認抗原 (毒素與攜帶蛋白 γ -globulin 結合情形)

接著本研究將此衍生條件應用於 ELISA 所使用的材料中，進行 ELISA 開發檢測系統之前須製備 Rac-succinic anhydride-OVA，及 Rac-succinic anhydride-HRP，使用 SDS-PAGE 以確認操作 ELISA 時所使用之 OVA 與 HRP 的接合是否有成功，第一行為 Marker，第二行為 OVA (control)，第三行為 Rac-succinic anhydride-OVA (1:2)，第四行為 RAC-succinic anhydride-OVA (1:4)，第五行為 HRP (control)，而第六行為 RAC-succinic anhydride-HRP，由於 OVA 的分子量為 45 kDa，HRP 的分子量為 44 kDa，與 Marker 對照後皆可確認蛋白質分子量正確，同時又觀察到經過 Rac 接合之蛋白的分子量比原本的 OVA 與 HRP 還大，由此得知接合之蛋白是成功的 (Figure 9)。

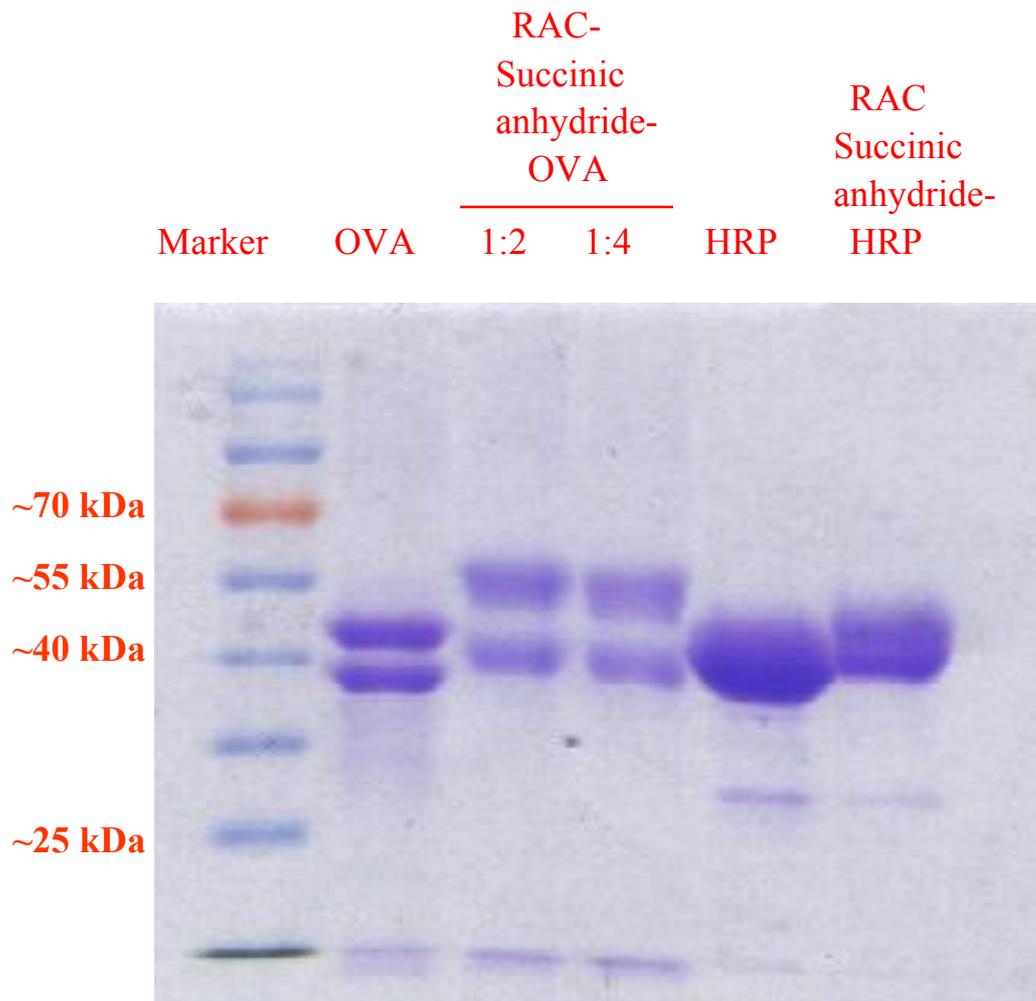


Figure 9. 以 SDS-PAGE 確認 Rac 與 OVA 及 HRP 接合情形

確認抗原已置備成功後，接著我便開始進行對老鼠免疫，免疫兩週後使用 ELISA 對血清中的抗體進行檢測，雖然已有抗體產生但是實驗結果仍不穩定，於是我推測是因為 Ractopamine 的結構中有三個 -OH 基團，在抗原或進行 ELISA 時所使用之蛋白質接合時或許三個 -OH 基團都接上蛋白質，因而造成免疫細胞無法辨識到 Ractopamine 的結構，或是產生的抗體無法辨識到 Ractopamine 造成實驗結果的不穩定，所以我決定調整接合的比例，從原先的 1:2 或 1:4 (Rac : 攜帶蛋白) 修改成 2:1 (Rac : 攜帶蛋白)。

接著使用 SDS-PAGE 來確認接合之效果，第一行為 Marker，第二行為 BSA (control)，第三行為 Rac-BSA，第四行為 γ -globulin (control)，而第五行為 Rac-succinic anhydride- γ -globulin，由於 γ -globulin 的分子量約為 80 kDa，BSA 的分子量為 66.7 kDa 與 Marker 比較後是正確的，比較對照組與實驗組結果得知 Rac-succinic anhydride - γ -globulin 的接合是成功的，但是 Rac-BSA 的接合卻不如預期 (Figure 10)。所以接下來便改用比例為 2:1 (Rac : 攜帶蛋白) 之抗原對老鼠進行免疫。

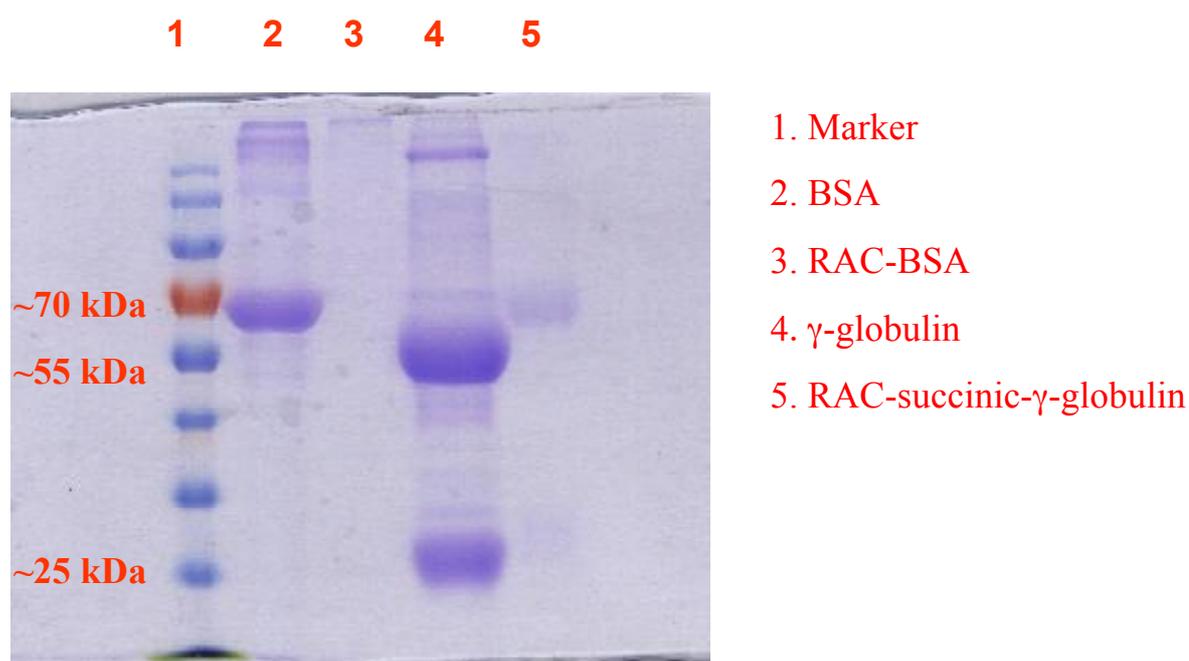


Figure 10. 以 SDS-PAGE 確認 Rac 與 BSA 及 γ -globulin 接合情形

接著利用直接競爭型 ELISA 對老鼠之血清進行專一性檢測，由實驗結果看出兩隻老鼠之抗體專一性並不好，無法得到有規律之曲線，更無法找到 IC50 (Figure 11、12)。

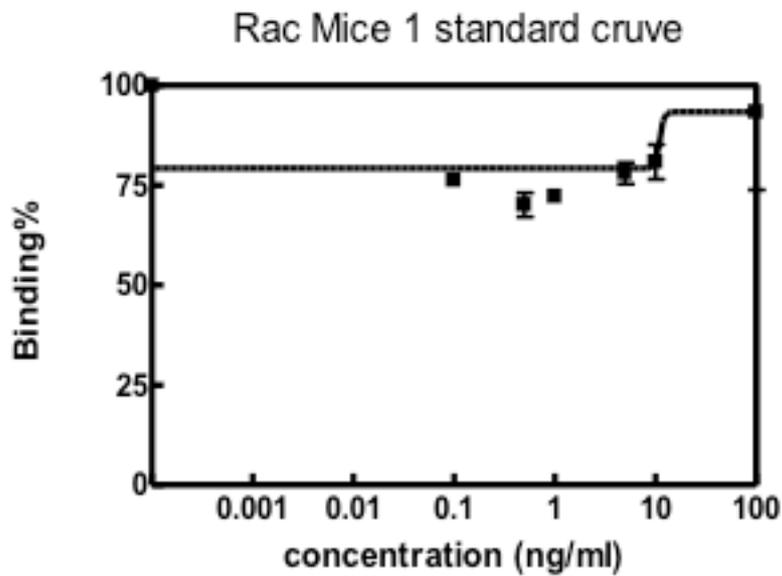


Figure 11. 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Mice 1 進行專一性測試

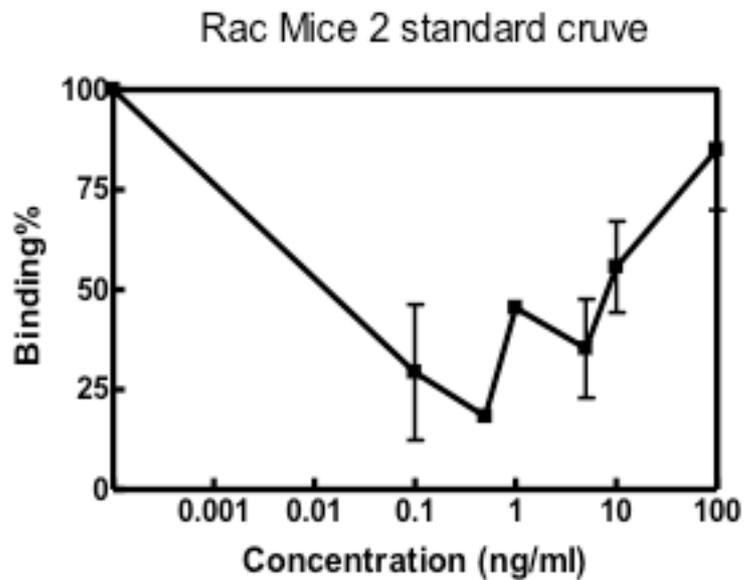


Figure 12. 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Mice 2 進行專一性測試

由於實驗結果不盡理想，於是接合新的 ELISA 用之抗原，來嘗試是否因為抗原不同而影響實驗的結果，我所接合之新的 ELISA 抗原為 Rac-succinic-BSA 接合的比例為 2:1 (Rac : 攜帶蛋白)，利用此抗原再對老鼠進行 ciELISA 的測試，由 ELISA 的結果得知，使用新接合的抗原來進行 ELISA 並沒有使實驗結果更好，所以推測是抗體的專一性不夠理想 (Figure 13、14)。

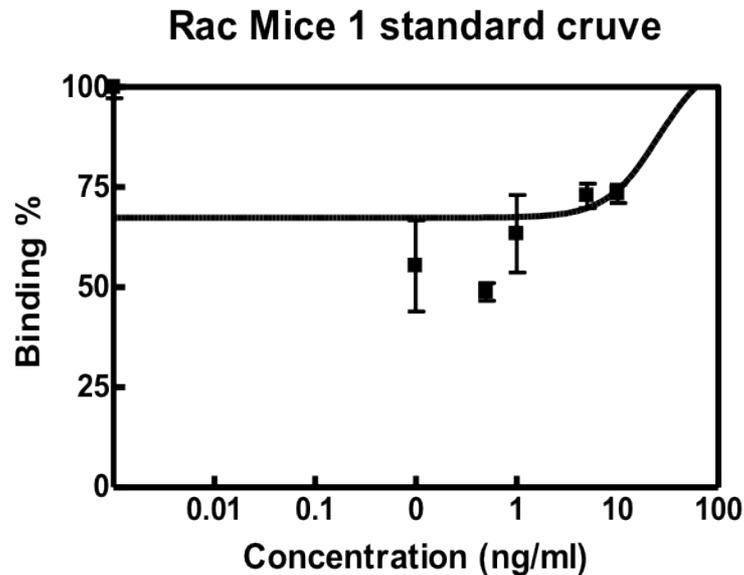


Figure 13. 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Mice 1 進行專一性測試

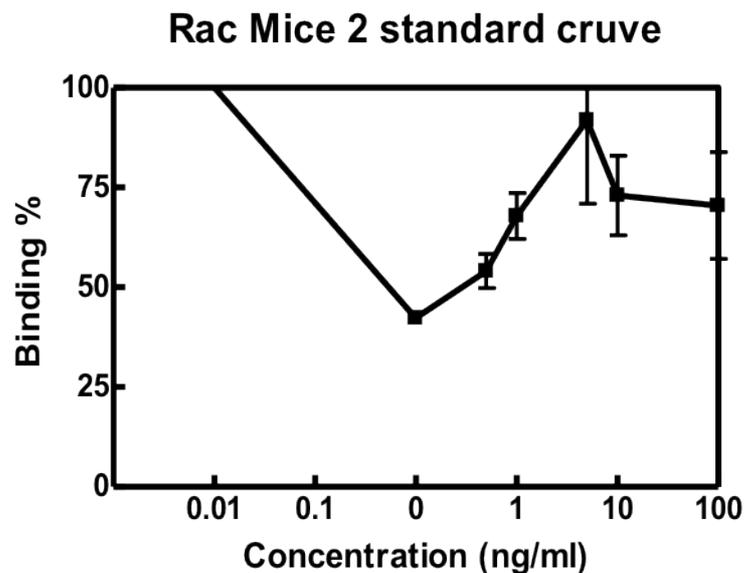


Figure 14. 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 Mice 2 進行專一性測試

由於老鼠的實驗一直不盡理想，所以決定再次嘗試使用兔子來當做免疫的對象，重新接合新的抗原 Rac-succinic-KLH 2:1 (Rac：攜帶蛋白)，由於 KLH 脆取自海中生物，由於兔子不可能接觸過此蛋白再加上 KLH 之分子量相當大，相信其免疫性會更好，將接和完成之抗原與完全佐劑混合均勻，對兔子進行表皮注射，待三週之後再進行 boost 的動作，接著開始採血並使用 ciELISA 來檢測抗體。

由於成果報告繳交時間已到，還未完成之實驗數據無法一併繳交，不過本人會持續進行此計劃之實驗，希望未來能夠成功製作出效果較好的瘦肉精免疫試紙，以利民眾用於檢驗肉品之安全。

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，若直接免疫動物，將無法引發免疫反應，為了解決此問題，小分子毒素的抗原置備極為重要，在研究之初必須要嘗試多種衍生方法方能成功置備抗原。本實驗一開始使用 CDI 做為衍生物，連結 Rac 與 BSA，但初步從 ELISA 的結果可以歸納出，本次實驗抗體並沒有產生或者是品質不盡理想 (Figure 3 and Figure 4)，為了確認抗原的完整性，本研究選擇使用 SDS-PAGE 分析抗原，利用蛋白質與 Rac 結合將增加蛋白質分子量的特性，可藉由觀察載體蛋白在 SDS-PAGE 的分布情形得知抗原的接合是否成功；經由 SDS-PAGE 的實驗結果可以看出，Rac 與 BSA 蛋白質的接合並沒有成功 (Figure 5)，所以我得知使用 CDI 作為 Rac 與蛋白質間的連接化合物是不夠理想的。於是我決定重新接合抗原，在閱讀過相關之文獻後，選擇 Succinic anhydride 作為的連接化合物，並重新嘗試抗原的接合，經過複雜的化學反應後，為了避免重蹈覆轍，在免疫兔子前先使用 SDS-PAGE 確認抗原接合是否成功，由結果得知蛋白質的分布位置明顯提高，推測使用 Succinic anhydride 可以成功的衍生 Rac，使其產生羧基，並且成功與 γ -globulin 結合 (Figure 8)，由於 ELISA 檢測系統的建立不單單需要抗原的置備，仍須要置備 ciELISA 及 cdELISA 所需的材料，因此本實驗將此條件應用於 ELISA 檢測系統所需的其他材料，如 Rac-succinic anhydride-OVA (ciELISA) 與 Rac- succinic anhydride-HRP (cdELISA)，經由 SDS-PAGE 得知接合的效果相當良好(Figure 9)，顯示本實驗所選擇的 Succinic anhydride 是一個優良的連結化合物。

之後我著手免疫老鼠，經過兩周的等待後開始使用 ELISA 對抗體進行檢測發現有抗體產生，不過抗體的效價還不夠，在經過幾周的測試後發現抗體的效價有明顯上升，但是專一性似乎稍嫌不足造成實驗結果不穩定，經過思考後我歸納出的可能原因為 Ractopamine 的結構中有三個 -OH 基團，在抗原或進行

ELISA 時所使用之蛋白質接合時或許三個 -OH 基團都接上蛋白質，因而造成免疫細胞無法辨識到 Ractopamine 的結構，或是產生的抗體無法辨識到 Ractopamine 造成實驗結果的不穩定。於是我重新改變蛋白質對毒素接合的比例，經過 SDS-PAGE 確認後證實抗原仍然成功接合 (Figure 10)，目前已將此抗原免疫老鼠，並重新測試抗體的效價，希望過幾週後抗體的效價能夠提高，並可穩定的應用於 ELISA，但結果並不如預期，由 ELISA 的結果顯示老鼠血清的敏感性及專一性並不高 (Figure 11、12)，且在使用不同抗原進行 ELISA 的結果也是一樣 (Figure 13、14)，所以之後決定更換新的攜帶蛋白來接和抗原，我所選用的攜帶蛋白為 KLH 接合完成後用來免疫兔子，待四週後開始採血並用 ELISA 來檢測抗體之專一性及敏感度，由於時間上之關係未完成之實驗數據無法一並繳交，但本人會持續進行本實驗希望未來能夠成功製作出效果較好的瘦肉精免疫試紙，以利民眾用於檢驗肉品之安全。

五、参考文献

- Antignac,J.P. Marchand,P., Bizec,B.L. (2002). Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultratrace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B* 774:59–66.
- Inoue,T.,Chang,J. (2003). Capillary electrophoretic separation and quantitation of ractopamine stereoisomers using cyclodextrins as chiral additives. *J. Liquid Chromatogr. Technol.*26:1669–1675.
- Jones,R.W., Easter,R. A., Mckelth,F.K. (1985). Effect of the beta-adrenergic agonist cimaterol (CL 263,780) on the growth and carcass characteristics of finishing swine. *J. Anim. Sci.*61:905–913.
- Maclennan,P.A., Edwards.R.H. (1989). Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass: evidence that clenbuterol stimulates muscle beta-adrenoceptors to induce hypertrophy. *Biochem. J.* 264:573–579.
- Shelver,W.L.,Smith,D.J. (2002). Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals. *J. Agric. Food Chem.* 2742-2747.
- Shelver,W.L., Smith,D.J. (2002a). Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals. *J. Agric. Food Chem.* 50:2742–2747.
- Shelver,W.L.,Smith,D.J. (2003). Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA. *J. Agric. Food Chem.* 3715-3721.
- Shelver,W.L., Smith,D.J. (2003). Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: Comparative study with

HPLC and ELISA. *J. Agric. Food Chem.* 51:3715–3721

Shelver, W.L., Smith, D.J. (2000). Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine. *J. Immunoassay* 21:1–23.

Shishani, E., Chai, S.C., Jamokha, S. (2003). Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 483:137–145.

Smith, D.J., Shelver, W.L. (2002). Tissue residues of ractopamine and urinary excretion of ractopamine and metabolites in animals treated for 7 days with dietary ractopamine. *J. Anim. Sci.* 80:1240–1249

Turberg, M.P., Rodewald, J.M., Coleman, M.R. (1995). Determination of ractopamine hydrochloride in swine and turkey tissues by liquid chromatography with coulometric detection. *J. AOAC Int.* 78:1394–1402.

Wang, J. P., Zhang, S. X., Shen, J. Z. (2006). A monoclonal antibody-based immunoassay for determination of ractopamine in swine feeds. *J. Anim. Sci.* 84:1248-1251.

Zhang, Y., Wang, F.X., Fang, L., Wang, S., Fang, G.Z. (2009). Rapid Determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix Effects. *J. Biomed and Biotech.* 579175.