

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 歐來金德(Olaquinox)多株抗體之製備並將其應用於 \*  
\* : 酵素連結免疫分析法及奈米金粒子免疫層析試紙分析 \*  
\* 名稱 法之開發 \*  
\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 王亭媛

學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-045-B

研究期間： 105年07月01日至106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 106年05月26日

科技部補助  
大專學生研究計畫研究成果報告

\*\*\*\*\*  
\* 計畫 歐來金德 (Olaquinox) 多株抗體製備及酵素 \*  
\* : 免疫分析法與奈米金粒子免疫層析試紙之開發 \*  
\* 名稱 \*  
\*\*\*\*\*

執行計畫學生：王亭媛

學生計畫編號：105-2815-C-040-045-B

研究期間：105年7月1日至106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 106 年 3 月 31 日

## 摘要 (Abstract)

歐來金德 (Olaquinox, OLA) 為一種用於畜牧業的抗菌劑，且能促進動物的生長，被廣泛使用於豬隻、雞鴨及魚類的飼料中，Olaquinox 甚至會殘留在動物源性的食品當中，進而影響到食品的安全性。Olaquinox 對人體具有毒性，長期累積於人體內會誘發癌症，甚至對人類的基因具有基因毒性，而造成 DNA 損傷及細胞內機制的破壞。

Olaquinox 分子量為 263.25 Dalton，是一小分子化合物，為一種半抗原 (hapten)，因此只具有抗原性 (Antigenicity) 而不具有免疫原性 (Immunogenicity)。若直接免疫至動物體內，並不足以引發實驗動物的免疫反應。因此若欲使小鼠產生對 Olaquinox 具有高度專一性之抗體，必須將 Olaquinox 進行修飾並接合載體蛋白放大其分子量，合成出具有免疫原性的抗原，再將此抗原免疫實驗動物，以製備 Olaquinox 的多株抗體。

Olaquinox 上具有羥基 (-OH) 與雙鍵氧 (=O) 可供修飾。本研究先以 Succinate Anhydride 將羥基衍生修飾後，以薄層層析法 (TLC) 確認是否有衍生成功後，刮下兩層不同分層，分別再以 EDC/NHS 方式與載體蛋白 PTG 的胺基 (-NH<sub>2</sub>) 進行接合以製備抗原免疫小鼠，另外也利用 CDI 法將羥基與載體蛋白  $\gamma$ -globulin 進行接合以製備抗原。接著利用甲基 (-CH<sub>3</sub>) 並使用 Formaldehyde 法和載體蛋白 BTG 的胺基進行接合產生抗原。最後再利用雙鍵氧以 CMO 的衍生方式進行修飾後再接合載體蛋白 PTG 以製備免疫抗原。將這五種免疫抗原免疫小鼠之後，再藉由 direct competitive ELISA (cdELISA) 觀察抗體的專一性，發現以羥基做修飾，不論是利用 Succinate Anhydride 衍生法或 CDI 法製備抗原免疫的小鼠皆未產生專一性的抗體，效價也沒有明顯上升的趨勢。以 Formaldehyde 法所接合出的抗原也未產生專一性抗體，效價也沒有明顯上升。而利用 CMO 法接合出的抗原所免疫的小鼠，雖然檢測出的抗體專一性並不明顯，但效價有明顯的上升趨勢，因此未來會以此接合方式持續研究分析，並且嘗試不同的接合方式以及載體蛋白的接合比例，以期待製備出具有高度專一性之多

株抗體，以及開發出快速免疫層析試紙以供大眾使用。

## 目錄 (Index)

主題	頁數
摘要	2
一，緒論	6
1.1 研究起源	6
1.2 Olaquinox 基本性質	6
1.3 Olaquinox 相關研究	7
1.4 酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)	8
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	14
2.3.1 製備不同 Olaquinox 衍生物	14
2.3.2 利用 TLC 確認衍生物的產生	15
2.3.3 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合	15
2.3.4 製備不同 Olaquinox 之免疫抗原	16
2.3.5 將 Olaquinox 與 HRP (Horseradish peroxidase) 接合	19
2.3.6 將 OLA 與 OVA (Ovalbumin) 接合	19
2.3.7 免疫小鼠	20
2.3.8 多株抗體之純化	20
2.3.9 利用 direct competitive ELISA 確定抗體效價及專一性	21

2.3.10 合成奈米金粒子	22
2.3.11 製備奈米金粒子探針	22
2.3.12 免疫試紙之製備	22
<b>三，實驗結果</b>	23
3.1 利用 TLC 確認衍生產物	23
3.2 SDS-PAGE 確認抗原接合	25
3.3 抗體效價及專一性測試	26
<b>四，討論</b>	36
<b>五，參考文獻</b>	37

# 一、緒論 (Introduction)

## 1.1 研究起源

Olaquinox 為一種抗生素，在畜牧業中常被用來作為抗菌劑，另外也被當作常見的飼料添加物，廣泛的使用於豬隻、雞鴨、魚類的飼料中，Olaquinox 能夠提高飼料中養分在動物體內的轉換率，使動物體重成長加快，雖然 Olaquinox 是添加在飼料中，但是並不會隨著動物體內的代謝而消失，會累積在動物的體內，

當這些家畜製作成食品時，也會殘留在食品中，進而累積在人體內。

有研究報告指出，當人類攝取到含有 Olaquinox 殘留物的食品時會影響人體的健康，使癌症發生率提高，並且帶有遺傳毒性，可能導致畸胎形成。因此 Olaquinox 在美國、歐盟等國家中已被明文禁止，我國也明文規範其限制殘留量為 15 ppm，但在中國卻可以合法使用，由於我國時常進口大陸肉品，食用的民眾非常需要提高警覺。另外，若是 Olaquinox 使用不當，動物也會產生中毒的現象，常會對畜牧業造成重大的損失。2009 年 3 月，中國大陸江蘇省曾發生過在鯉魚的飼料中加入過量的 Olaquinox，導致當地養殖的鯉魚大量死亡，產生巨大的損失。2001 年我國農業部訂定了 Olaquinox 在豬飼料中的限制添加量，並且禁止用於家禽以及水產養殖，但仍有許多不法的養殖業者依然違法使用，當我們攝入這些加工後的食品後，對我們人體都會潛藏著危害，故檢測食品中 Olaquinox 的殘留量是非常值得關注的議題。

## 1.2 Olaquinox 基本性質

歐來金德 (Olaquinox) (N-(2-hydroxyethyl)-3-methyl-2-quinoxaline carboxamide-1,4-di-N-oxide) 分子量為 263.25 Dalton (結構式見 Figure 1.)，被廣泛的應用在畜牧業當中作為抗菌劑，可以控制豬隻痢疾和細菌性的腸炎產生，同時也可以活化大腸中有益的菌落群，抑制其他有害細菌的 DNA 合成，達到抗

菌的目的，對於革蘭氏陰性菌及陽性菌都具有一定的抑制效果。另外在水產養殖及動物畜牧業中，由於 Olaquinox 可以促進蛋白質合成的作用，提高飼料養份的利用效率，因此被作為生長促進劑，達到快速增加豬隻體重的目的 (Jiang, et al., 2013)。

雖然使用少量 Olaquinox 在豬隻的腸道中能夠被快速的吸收，並且能有效的代謝，但使用過量的 Olaquinox 時會導致殘留於豬隻體內，當人類攝食這些豬隻時，會有明顯的副作用產生 (Zhao, et al., 2008; Zhao, et al., 2013)，包括有強烈的致癌性及致突變性，甚至有生殖毒性，會導致生殖細胞的突變 (Zhao, Qiao, Xu, Xu, & Yan, 2013)，長期累積在人體中，對肝、腎都有強烈的毒性作用，而其遺傳毒性也會造成 DNA 的損傷，影響細胞內的作用機制，導致基因表現增強或是降低，增加癌症的發生率 (Yang, et al., 2015)。

由於 Olaquinox 對人體的傷害是非常嚴重的，因此美國、歐盟、日本等國家都已禁止使用於動物飼料中，在我國也有殘留量限制的規範，但在中國仍然可以合法使用 (Song, et al., 2011)。



Figure 1. Olaquinox 結構式

### 1.3 Olaquinox 相關研究

目前常用於檢測 Olaquinox 的檢測方法為高效液相層析色譜法 (High performance liquid chromatography, HPLC) 以及氣相層析質譜法 (Gas chromatography mass spectrometry, GC-MS) (Zhao, He, Pu, & Deng, 2008)，這兩



種方法都具有很高的準確性，但操作繁雜，不僅花費較昂貴還需要大量的時間做檢測，檢測所需的樣品準備工作也比較複雜不易，且全程須在實驗室操作，因此利用酵素連結免疫吸附分析法（Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA）不但相對快速，成本較低，再加上靈敏度高又能同時檢測大量樣品（Cheng, et al., 2013），是另一簡便又可行的方法。

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

酵素連結免疫吸附分析法的原理是利用抗原和抗體之間具有專一性鍵結之特性對樣品進行檢測，此分析方式其中的一項步驟是加入酵素的受質與酵素進行反應呈色，透過顏色表現的深淺能夠直接地由肉眼區分，再藉由酵素免疫分析儀器定量呈色物質，由此分析可以達到檢測樣品中是否含有特定的抗原。而酵素連結免疫分析法依據操作發法的不同可以區分為三種：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），於本研究中使用直接競爭行酵素連結免疫分析法，以下簡單描述操作方法以及原理。

**直接競爭型酵素連結免疫分析法（Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay）**是利用吸附法或是共價接合法將抗體連接至固相基質上，接著加入蛋白填補基質上抗體之間的空隙，再加入樣品或是抗原標準品以及具有酵素標定的抗原進行反應，最後再加入酵素受質即可呈色，呈色的結果若是顏色越淺代表抗原濃度越高，顏色越深代表抗原的濃度越低（Figure 2.）。

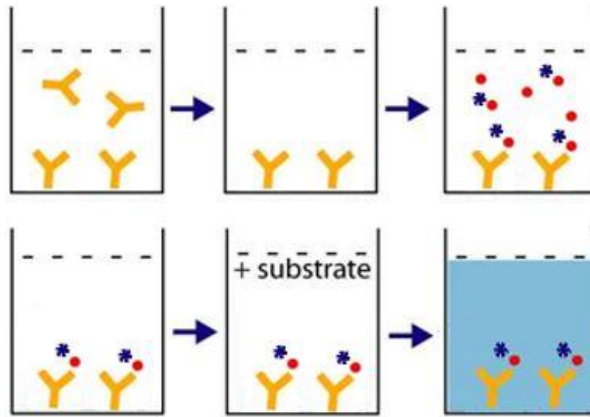


Figure 2. 直接競爭行酵素連結免疫分析法

### 1.5 快速免疫層析試紙

快速免疫層析試紙 (Figure 3A.) 是一種以膜為基質的免疫分析法 (membrane-based immunoassay)，此分析方法非常的快速便利並且能夠直接用肉眼判讀結果，主要的分析原理是利用硝化纖維膜作為基質，接著將抗原以及二級抗體分別吸附在基質的測試區以及控制區上，再將奈米金粒子作為標記物接合抗體形成探針，最後將奈米金粒子與樣品同時通過基質進行分析，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區上產生顏色，當樣品不含有抗原時，奈米金粒子探針則會在基質的測試區以及控制區上都產生顏色 (Figure 3B.)，透過有無顯示顏色，快速免疫層析試紙非常適合一般人使用，大量檢測樣品也非常快速。

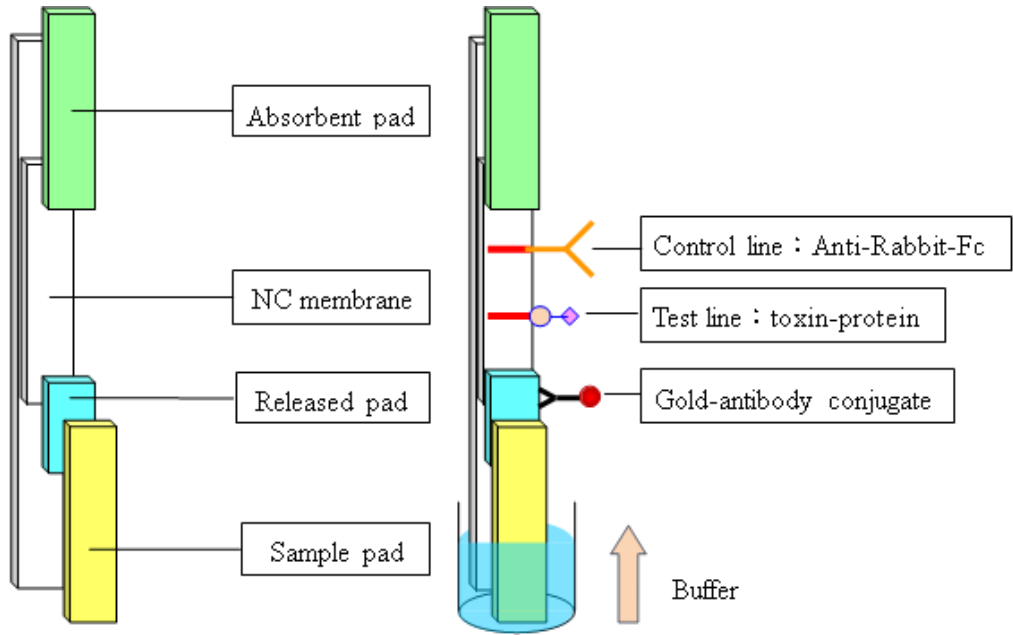


Figure 3A. 免疫試紙組成

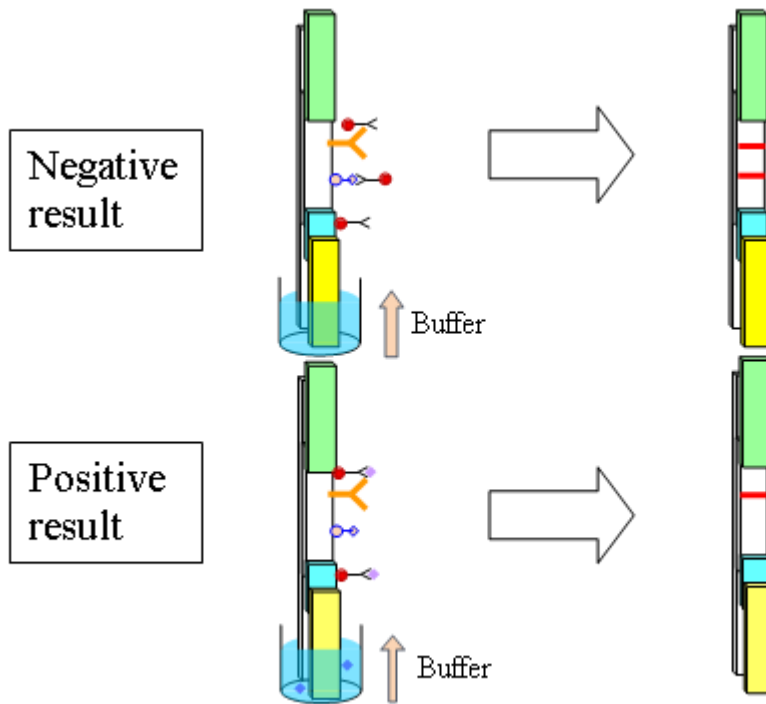


Figure 3B. 免疫試紙分析結果

## 1.6 研究動機及研究問題

目前檢測 Olaquinox 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)，這兩種檢測方式都具有高度的準確性，但操作步驟複雜，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，還能夠同時檢測大量的樣本。因此製備出高敏感度與高專一性的 Olaquinox 抗體以開發酵素連接免疫吸附法 (ELISA) 是必須的，但由於 ELISA 結果需要利用儀器來判讀，而快速免疫試紙的結果可利用目視方式判讀，因此以此 Olaquinox 抗體開發快速免疫層析試紙，對於檢測市面上的肉類加工品以及其他可能帶有 Olaquinox 殘留物的食品是迫切需要的。

本研究計畫將分為三個子目標：

### **【子目標一】：製備專一性 Olaquinox 的多株抗體**

- 製備免疫抗原
- 將免疫抗原打入小鼠及兔子產生免疫反應 (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 Olaquinox 的含量。**

- 直接競爭型 ELISA
- 非直接競爭型 ELISA

### **【子目標三】：開發 Olaquinox 快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip)。**

- 合成奈米金粒子
- 製備奈米金粒子探針
- 製備免疫試紙
- 以 ELISA 及免疫層析試紙進行樣品分析

## 二、材料與方法 (Materials and Methods)

### 2.1 實驗藥品及動物

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

Bovine serum albumin ( BSA )

Carbonyldiimidazole ( CDI )

1- ethyl-3- [ 3-dimethylaminoprophyl ] Carbondimide ( EDC )

N-hydroxysuccinimide ( NHS )

Coomassie Brilliant Bule R-250

Freund's complete adjuvant

Succinic anhydride

Sodium bicarbonate

Ovalbumin ( OVA )

Pyridine

Olaquinox

Carboxymethoxylamine hemlhydrochloride ( CMO )

Thyroglobulin from porcine thyroid gland ( PTG )

Thyroglobulin from bovine thyroid ( BTG )

Ethylenediamine ( EDA )

$\gamma$ -globulin

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

Formic Acid

Ethyl acetate

polyethylene sorbitan monolaurate ( Tween 20 )

Sodium carbonate

TLC Silica gel 60 F254

TLC Silica gel 60 RP-18 F254S

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

aqueous Hydrochloric Acid (HCl)

Actone

Chloroform

Formaldehyde

Methanol

N,N-dimethylformamide (DMF)

Sodium acetate

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

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

Horseradish peroxidase (HRP)

下列藥品購自 MDBio,Inc.

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

Microtiter plates 購自 Nunc (Roskild, Demark)

BALB/c 小鼠購於國家動物中心

## 2.2 實驗儀器

儀器名稱	購置廠商
Hot plate	Fargo HMS-102
Incubator	LAB-LINE
Microplate reader	Molecular Device E max
Vortex	GENIE Vortex-2
Centrifuge	HERMLE Z323K
Refrigerator	SHOCKLOCK

## 2.3 實驗方法

### 2.3.1 製備不同 Olaquinox 衍生物

Olaquinox 屬於小分子化合物，只具有抗原性而不具有免疫原性，必須接合載體蛋白放大分子量，其結構上具有羥基 (-OH) 與雙鍵氧 (=O)，故參考 (Li, et al., 2014) 及 (Burkin, et al., 2002) 分別利用 Succinic anhydride (SH) 修飾羥基以及利用 Carboxymethylamine hemihydrochloride (CMO) 修飾雙鍵氧後使其具有羧基 (-COOH) 再以 EDC/NHS 法活化並與載體蛋白接合，形成能夠刺激免疫反應的抗原。

#### 2.3.1-1 以 Succinic anhydride 進行修飾衍生出 Olaquinox-SH

秤取 5 mg OLA 溶於 250  $\mu$ l DMSO，再秤取 2.5 mg succinate anhydride 溶於 600  $\mu$ l DMSO。將 OLA 溶液加入 succinic anhydride 溶液中後置於室溫、氮氣環境下攪拌反應 60 小時，利用 TLC 檢視衍生結果 (Figure 4.)。

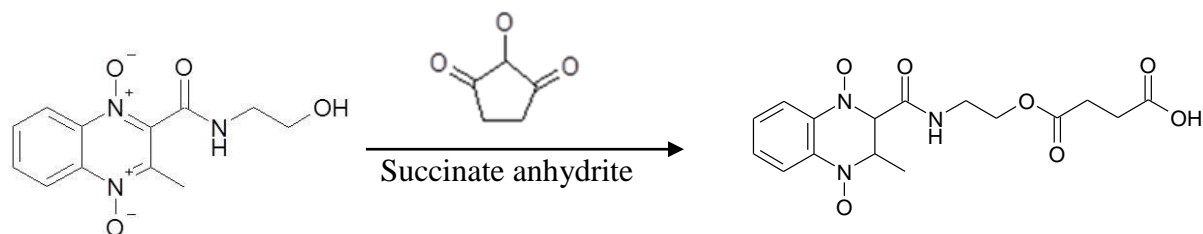


Figure 4. Succinate Anhydride 衍生示意圖

#### 2.3.1-2 以 CMO 進行修飾衍生出 Olaquinox-CMO

秤取 3 mg 的 OLA 溶於 3 mL reflux solution (pyridine : Methanol : ddH<sub>2</sub>O = 1 : 4 : 1) 及 10 mg 的 CMO 溶於 3 mL reflux solution，將上述兩溶液混合均勻後，置於回流裝置中，加熱至 60°C，避光反應 2.5 小時，置於室溫中反應 24 小時。反應完成後，以減壓濃縮將溶液抽乾，再加入 500 mL DMSO 回溶 (Figure

5.)。

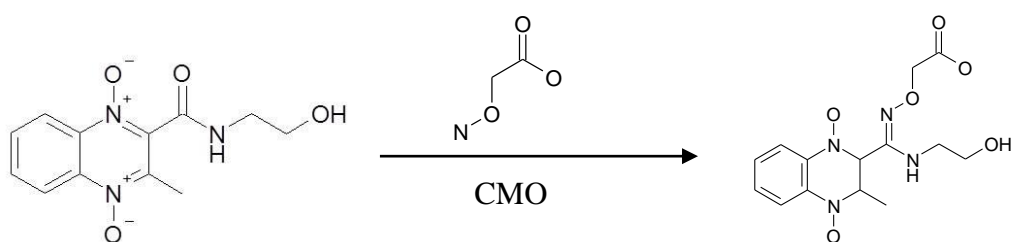


Figure 5. CMO 衍生示意圖

### 2.3.2 利用 TLC 確認衍生物的產生

取 1  $\mu$ l 的 OLA 標準品和 1  $\mu$ l 已製備出的 OLA 衍生物，點在 TLC Silica gel 60 F254 上，以展開液 (ethyl acetate : acetone : alcohol = 60 : 42 : 3) 展開，將展開完成之 TLC 於波長 254 nm 下觀察其結果。

由於 OLA-SH 分為兩層，分別標記為 L1 以及 L2，將其刮下後以 70°C ddH<sub>2</sub>O 反覆洗滌數次，取上清液凍乾，再以 500  $\mu$ l DMSO 回溶。

### 2.3.3 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合

#### 2.3.3-1 製作 0.75 mm 10% 的下層解析膠體

分別取 4 mL 的 dd H<sub>2</sub>O，3.3 mL 的 30% Acrylamide，2.5 mL 的 1.5 M Tris (pH = 8.8)，100  $\mu$ l 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)，100  $\mu$ l 10% Ammonium persulfate (APS) 與 8  $\mu$ l 的 N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)，混合均勻後加入玻璃片中待其凝固。

#### 2.3.3-2 加入酒精將下膠壓平

#### 2.3.3-3 製作 0.75 mm 5% 的上層膠體

分別取 1.7 mL 的 ddH<sub>2</sub>O，415  $\mu$ l 的 30% Acrylamide，315  $\mu$ l 的 1.0M Tris (pH = 6.8)，25  $\mu$ l 的 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)，25  $\mu$ l 10% APS 與



2.5  $\mu\text{l}$  的 TEMED，混合均勻後加入玻璃片中並放入齒梳待其凝固。

#### 2.3.3-4 製作蛋白質樣本

取一定濃度待測的蛋白質，加入 4 倍 SDS (8 ml 10% SDS, 9 ml Glycerol, 1,250  $\mu\text{l}$  2M Tris pH = 6.8, 15% 2-Mercaptoethanol) 並使用 ddH<sub>2</sub>O 平衡體積使每一管樣品體積相同，之後在 100°C 水中加熱 5 分鐘使蛋白質變性。

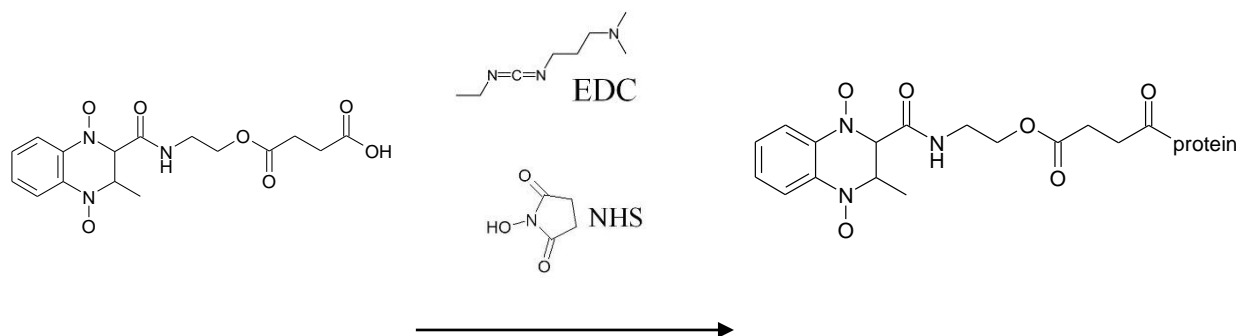
#### 2.3.3-5 進行 SDS-PAGE

將樣品注入膠體後，把膠體放入 running buffer (19.2 mM glycine, 0.1% SDS, 2.5 mM Tris base) 中使用電源供應器使樣品通過膠體，等到樣品線移動至膠體底部時即可將膠取出，使用 Coomassie Brilliant Blue (48.4 ml ddH<sub>2</sub>O, 41.6 ml Methanol, 10 ml Acetic Acid, 0.1 g Brilliant Blue R) 進行染色 30 分鐘，之後使用 Destain buffer (100 ml ddH<sub>2</sub>O, 100 ml Acetic acid, 400 ml Methanol) 進行退染，最後使用掃描器擷取影像。

#### 2.3.4 製備不同 OLAquinox 之免疫抗原

##### 2.3.4-1 使用 EDC/NHS 法將 OLA-SH(L1) 及 OLA-SH(L2) 與載體蛋白 PTG 接合

秤取 1 mg OLA-SH 溶於 200  $\mu\text{l}$  DMSO 中，再秤取 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 20  $\mu\text{l}$  和 15  $\mu\text{l}$  DMSO 中。將 EDC、NHS 溶液依序緩慢加入到 OLA-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時後。秤取 8 mg PTG 溶於 800  $\mu\text{l}$  0.1 M carbonate buffer (pH = 9.6) 中。將反應完成的 OLA-SH 溶液緩慢加入 PTG 溶液中，置於 4°C 攪拌反應一個晚上後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次 (Figure 6.)。



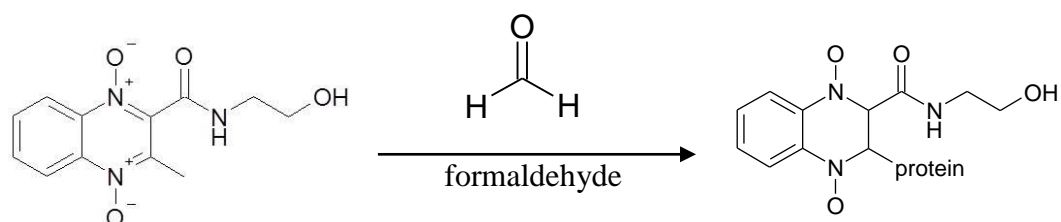
**Figure 6. OLA-SH 利用 EDC/NHS 法接合示意圖**

#### 2.3.4-2 利用 EDC/NHS 法將 EDA 及 BTG 接合

秤取 50 mg BTG 溶於 2.5 mL ddH<sub>2</sub>O，取 70 mg EDC 直接倒入 BTG 溶液中，再加入 200 uL 10% EDA 並以 1 N HCl 調整 pH 值至 5.5 後，於室溫攪拌兩小時後，再取 80 mg EDC 直接倒入 BTG 溶液中，於室溫攪拌一個晚上後，使用 0.01 M PBS 透析 3 次。

#### 2.3.4-3 使用 Formaldehyde 法將 OLA 與載體蛋白 EDA-BTG 接合

秤取 4 mg EDA-BTG 溶於 100 μl DMSO，再秤取 1 mg OLA 溶於 100 μl DMSO。將 OLA 溶液緩慢加入 EDA-BTG 溶液中，再加入 100 μl 36.5 % formaldehyde 置於室溫下避光攪拌反應 3 天，再置於 4°C 攪拌反應一個晚上。反應完成後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次 (Figure 7.)。



**Figure 7. OLA 利用 formaldehyde 法接合示意圖。**

#### 2.3.4-4 使用 EDC/NHS 法將 OLA-CMO 與載體蛋白 PTG 接合

秤取 1 mg OLA-CMO 溶於 166  $\mu$ l DMSO 中，再秤取 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 20  $\mu$ l 和 15  $\mu$ l DMSO 中。將 EDC、NHS 溶液依序緩慢加入到 OLA-CMO 溶液中，於室溫攪拌 2 小時後。秤取 8 mg PTG 溶於 800  $\mu$ l 0.1 M carbonate buffer (pH = 9.6)。將反應完成的 OLA-CMO 緩慢加入 PTG 溶液中，置於 4°C 攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次 (Figure 8.)。

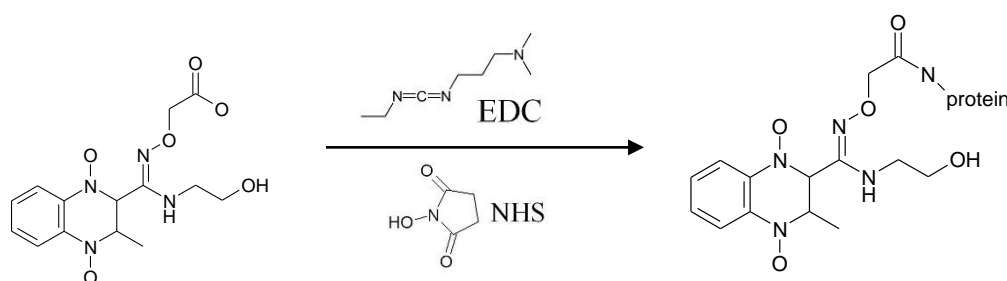
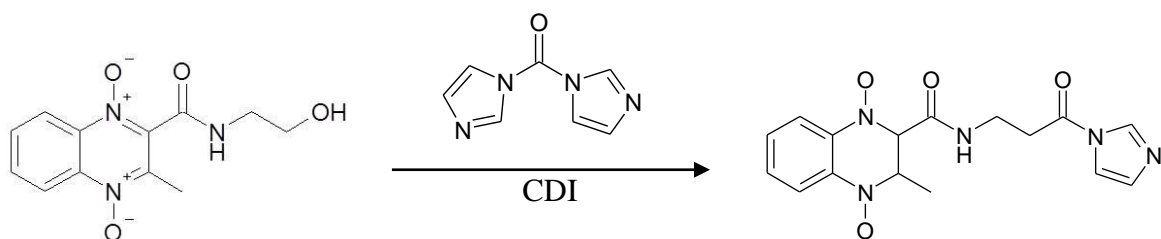
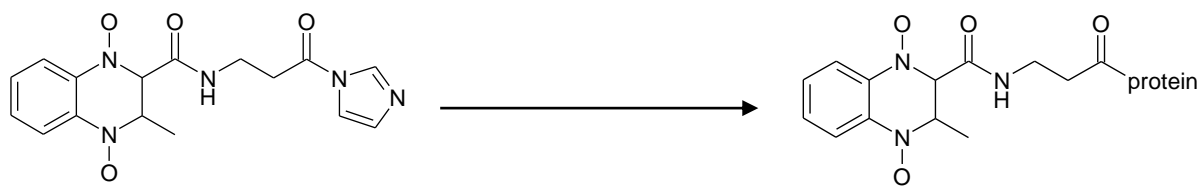


Figure 8. OLA-CMO 利用 EDC/NHS 法接合示意圖

#### 2.3.4-5 使用 CDI 法將 OLA 與載體蛋白 $\gamma$ -globulin 接合

秤取 1 mg OLA 溶於 300  $\mu$ l DMSO，再秤取 2 mg CDI 溶於 300  $\mu$ l DMSO。將 CDI 溶液緩慢加入 OLA 溶液中，在 37°C 於氮氣環境下避光攪拌 3 小時後，秤取 2 mg  $\gamma$ -globulin 溶於 400  $\mu$ l 0.1 M carbonate buffer (pH = 9.6)，將反應完成之 OLA 溶液加入  $\gamma$ -globulin 溶液中，於氮氣環境下避光攪拌 48 小時，反應完成後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次 (Figure 9.)。





**Figure 9. OLA 利用 CDI 法接合示意圖**

### 2.3.5 將 OLA 與 HRP (Horseradish peroxidase) 接合

#### 2.3.5-1 使用 EDC/NHS 法將 OLA-SH 與 HRP 接合

秤取 0.5 mg OLA-SH 溶於 100  $\mu$ l DMSO 中，再秤取 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 20  $\mu$ l 和 15  $\mu$ l DMSO 中。將 EDC、NHS 溶液依序緩慢加入到 OLA-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時後。秤取 2 mg HRP 溶於 200  $\mu$ l 0.1 M carbonate buffer (pH = 9.6)。將反應完成的 OLA-SH 溶液緩慢加入 HRP 溶液中，置於 4°C 攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次。

#### 2.3.5-2 使用 Formaldehyde 法將 OLA 與 HRP 接合

秤取 0.5 mg OLA 溶於 100  $\mu$ l DMSO，再秤取 2 mg HRP 溶於 200  $\mu$ l 0.1 mM sodium acetate。將 OLA 緩慢加入 HRP，再加入 100  $\mu$ l 36.5 % formaldehyde 置於室溫下避光攪拌反應 3 天，再置於 4°C 攪拌反應一個晚上。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

### 2.3.6 將 OLA 與 OVA (Ovalbumin) 接合

#### 2.3.6-1 使用 EDC/NHS 法將 OLA-SH 與 OVA 接合

秤取 0.5 mg OLA-SH 溶於 100  $\mu$ l DMSO 中，再秤取 2 mg EDC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 20  $\mu$ l 和 15  $\mu$ l DMSO 中。將 EDC、NHS 溶液依序緩慢加入到 OLA-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時後。秤取 4 mg HRP 溶於 400  $\mu$ l 0.1 M

carbonate buffer (pH = 9.6)。將反應完成的 OLA-SH 溶液緩慢加入 OVA 溶液中，置於 4°C 攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次。

#### 2.3.6-2 使用 DCC/NHS 法將 OLA-SH 與 OVA 接合

秤取 0.5 mg OLA-SH 溶於 100  $\mu$ l DMSO 中，再秤取 2 mg DCC 及 1.5 mg NHS 分別溶於 20  $\mu$ l 和 15  $\mu$ l DMSO 中。將 DCC、NHS 溶液依序緩慢加入到 OLA-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時後。秤取 4 mg HRP 溶於 400  $\mu$ l 0.1 M carbonate buffer (pH = 9.6)。將反應完成的 OLA-SH 溶液緩慢加入 OVA 溶液中，置於 4°C 攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次。

#### 2.3.6-3 使用 CDI 法將 OLA 與 OVA 接合

秤取 1 mg OLA 溶於 300  $\mu$ l DMSO，再秤取 2 mg CDI 溶於 300  $\mu$ l DMSO。將 CDI 溶液緩慢加入 OLA 溶液中，在 37°C 於氮氣環境下避光攪拌 3 小時後，秤取 4 mg OVA 溶於 400  $\mu$ l 0.1 M carbonate buffer (pH = 9.6)，將反應完成之 OLA 溶液加入 OVA 溶液中，於氮氣環境下避光攪拌 48 小時，反應完成後在 4°C 下於 1 L 0.01 M PBS 中透析 3 次。

#### 2.3.7 免疫小鼠

為了使 Balb/c 小鼠產生對 OLA 具有專一性的抗體，本研究將 OLA-SH-PTG、OLA-CMO-PTG、OLA-Formaldehyde-EDA-BTG、OLA-CDI- $\gamma$ -globulin (0.25mg 的 PTG、EDA-BTG、 $\gamma$ -globulin 溶於 375  $\mu$ l 0.01 M PBS)，再加入等體積的費氏完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant) 混合均勻，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

OLA-SH-PTG、OLA-CMO-PTG、OLA-Formaldehyde-EDA-BTG、OLA-CDI- $\gamma$ -globulin (0.25 mg 的 PTG、EDA-BTG、 $\gamma$ -globulin 溶於 375  $\mu$ l 0.01 M PBS) 注射入小腹部，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 OLA 的專一性抗體。

### 2.3.8 小鼠多株抗體的純化

將採集到的小鼠血液(約 100  $\mu$ 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。

### 2.3.9 利用 direct competitive ELISA 確定抗體效價及專一性

#### 2.3.9-1 利用 direct competitive ELISA 檢測抗體效價

在 96 孔盤中加入 100  $\mu$ l 純化過的抗體(以 0.01 M 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  $\mu$ l 的 blocking buffer(0.1 % BSA in 0.01 M 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  $\mu$ l 0.1 M PBS 及 50  $\mu$ l OLA-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，在 37°C 環境中反應 1 小時後，以 washing buffer 沖去未反應之物質。最後加入 100  $\mu$ l 的酵素受質(TMB substrate)於暗處反應 15~20 分鐘後，加入 100  $\mu$ l 1 N 的 HCl 終止反應，再利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 吸光值。

#### 2.3.9-2 利用 direct competitive ELISA 檢測抗體專一性

在 96 孔盤中加入 100  $\mu$ l 純化過的抗體(以 0.01 M 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  $\mu$ l 的 blocking buffer(0.1 % BSA in 0.01 M 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  $\mu$ l 不同濃度的 OLA 標準品 (1 ~ 500 ng/ml) 及 50  $\mu$ l OLA-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，在 37°C 環境中反應 1 小時後，以 washing buffer 沖去未反應之物質。最後加入 100  $\mu$ l 的酵素受質 (TMB substrate) 於暗處反應 15 ~ 20 分鐘後，加入 100  $\mu$ l 1 N 的 HCl 終止反應，再利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm - 650 nm 吸光值。

#### 2.3.10 合成奈米金粒子

配製 1 mM HAuCl<sub>4</sub> (19.69 mg HAuCl<sub>4</sub> 溶於 50 mL ddH<sub>2</sub>O)，加熱攪拌至沸騰後加入 5 mL 的 1% trisodium citrate 還原劑 (0.05 g trisodium citrate 溶於 5 mL ddH<sub>2</sub>O)，持續沸騰 5 分鐘即為我們所需之奈米金粒子，將合成好的奈米金粒子靜置於室溫冷卻後，置入 4°C 冰箱備用。

#### 2.3.11 製備奈米金例子探針

將合成好的奈米金粒子以 Boric acid-Borax buffer(2 mM, pH = 5)稀釋 5 倍 (最終體積為 2 ml)，取 15  $\mu$ g OLA 多株抗體緩慢加入至奈米金粒子溶液中，置於室溫攪拌反應一小時後，加入 220  $\mu$ L 10% BSA(以孔徑 0.22  $\mu$ m 濾膜過濾)，置於室溫攪拌反應 30 分鐘後移除上清液，將抗體-金粒子接合物以 0.18 mL buffer A(20 mM, pH = 8.0, 1% BSA and 0.1% sodium azide)回溶後，置入 4°C 冰箱備用。

#### 2.3.12 免疫試紙之製備

先將 OLA 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5  $\mu$ l/strip)，37°C 環境下烘乾。再將 0.25  $\mu$ l 的 OLA-OVA 和 0.25  $\mu$ l 的 Anti-rabbit-Fc

antibody (0.2 mg/ml) 分別點於 NC membrane (孔徑為 5  $\mu$ m, 黏附於塑膠片上, 5 mm $\times$ 75 mm) 的 Test line 以及 Control line 的位置, 置於 37 $^{\circ}$ 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。

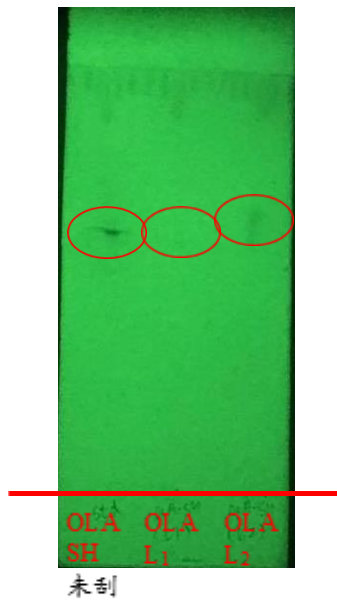
在 96 孔盤中, 加入 200  $\mu$ l 欲檢測樣品及不同濃度的 OLA 標準品, 再將組裝好的試紙垂直插入孔中, 樣品或標準品會藉由 sample pad 的吸引而往 NC membrane 移動, 經 10 分鐘後即可以目視觀察結果。

### 三、實驗結果

#### 3.1 利用 TLC 確認衍生產物

OLA 衍生完成後, 將 OLA 的標準品與 OLA 的衍生物分別點在 TLC 上, 接著以展開液 (ethyl acetate : acetone : alcohol = 60 : 42 : 3) 展開, 待展開液揮發至乾後, 於 254 nm 波長下觀察結果並將分層結果分別標記為 L1 以及 L2。由 Figure 10. 最左邊顯示出衍生 Rf 值後並沒有顯著差異且分層也不明顯, 且各層結果之顏色顏色非常淺, 即代表衍生產率不佳, 由於高度的差異非常不明顯且產率不佳, 因此分別將分層刮下後純化, 使其後續可以進行接合蛋白的動作。另外由 Figure 11. 觀察 OLA-CMO 的衍生結果, 也可以看出 Rf 值有明顯的差異, 即代表 OLA 在經此方法衍生後結構發生改變, 極性也隨之改變。





**Figure 10. 利用 TLC 觀察 OLA-SH 衍生結果**

由左至右分別比較 OLA-SH (未刮)、OLA-SH (L1)、OLA-SH (L2)，Rf 值差異並不明顯，且產量不佳。

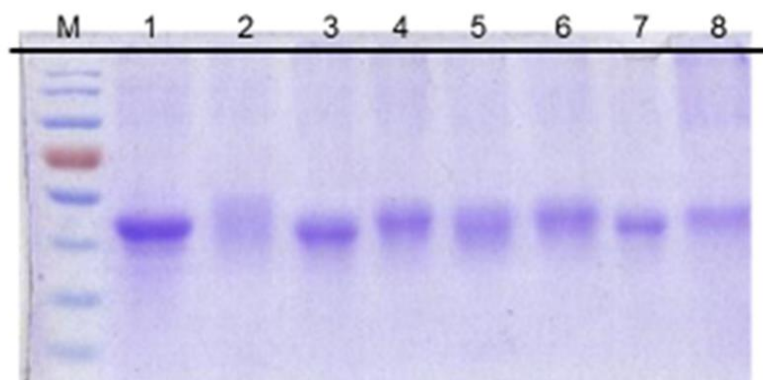


**Figure 11. 利用 TLC 觀察 OLA-CMO 衍生結果**

由左至右分別為 OLA 標準品、OLA-CMO，由結果可以看出衍生之 Rf 值比標準品之 Rf 值略低，代表此衍生方式改變了 OLA 的結構及極性，故推測此衍生法的效果較佳。

### 3.2 SDS-PAGE 確認抗原接合

為了確認 OLA 和載體蛋白之間的結果以及是否有接上，故利用 SDS-PAGE 觀察 OLA 和載體蛋白接合前後分子量的變化，以比較接合效果。(Figure 12.) 利用 EDC/NHS 法及 DCC/NHS 法將 OLA-SH 接合 OVA。先前的結果顯示 OLA-SH 分為兩層，於是分別將兩層刮下純化和未刮下的衍生物接合 OVA 做比較，另外也使用 CDI 進行接合，由結果可以得知，接上 OVA 後的分子量較大，故結果位置較標準品位置高，而 EDC/NHS 法的接合結果比 DCC/NHS 的方法還要好，另外刮片純化再接合的結果又比未刮片純化再接合的接合效果更好，因此往後接合蛋白時皆利用有刮片純化且使用 EDC/NHS 方法來進行接合載體蛋白。最後透過 CDI 接合方式的蛋白分子量也比接合之前略大，顯示出有接合成功，故在往後接合蛋白時，也有使用此方法製備免疫小鼠的免疫抗原。



**Figure 12. 利用 SDS-PAGE 確認使用 OLA 的接合情形**

第一行為 OVA 標準品，第二行為 OLA-SH (未刮) -EDC/NHS-OVA，第三行為 OLA-SH(未刮)-DCC/NHS-OVA，第四行為 OLA-SH(L1)-EDC/NHS-OVA，第五行為 OLA-SH (L1) -DCC/NHS-OVA，第六行為 OLA-SH (L2) -EDC/NHS-OVA，第七行為 OLA-SH (L2) -DCC/NHS-OVA，第八行為 OLA-CDI-OVA，由結果可知結果位置的高低變化即表示蛋白的分子量大小改變，

且使用 EDC/NHS 方法所呈現出的蛋白質帶 (protein band) 顏色較深，代表此接合方式較好。

### 3.3 抗體效價及專一性測試

#### OLA-SH (L1) -EDC/NHS-PTG 作為抗原免疫小鼠

本研究利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體效價的測試，採用 pre-immune 至第三十九週的小鼠血清來測試抗體的效價，由 Figure 13. 可以看出一號小鼠的效價一直都比二號小鼠好，並且持續維持些微上升的趨勢，在第三十五至第三十九週之間，兩隻小鼠的效價皆明顯往上升，於是推測為可能第二次所接的同樣抗原接合效果比第一次來的好，所以在最後四週效價明顯的升高。

另外本研究利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體對 OLA 的專一性測試，但由 Figure 14. 及 Figure 15. 可以觀察到，免疫此抗原的小鼠，其抗體專一性由第三周開始至第三十九周的結果都不甚理想，雖然在第三十週時注射了新抗原，但不論是一號小鼠還是二號小鼠，皆沒有產生對 OLA 專一性抗體。

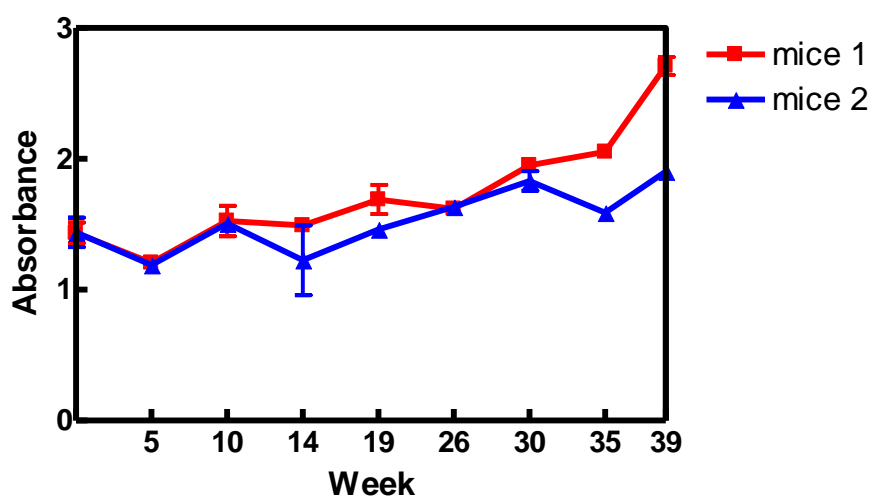


Figure 13. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對 OLA 進行抗體效價測

試

由圖可知一號小鼠一直呈現些微上升的趨勢，於第 35 週免疫新抗原之後，兩隻小鼠效價皆明顯的升高。

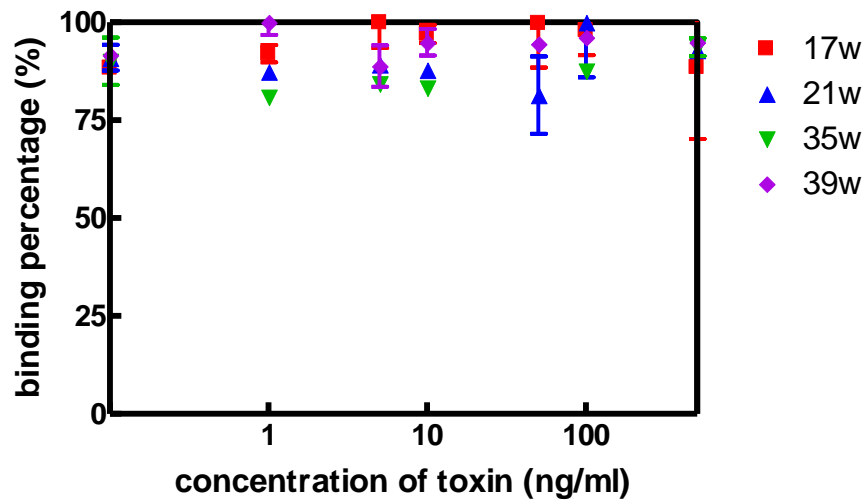


Figure 14. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對一號老鼠進行 OLA 專一性

測試

由圖可以得知一號小鼠並未對 OLA 產生專一性抗體。

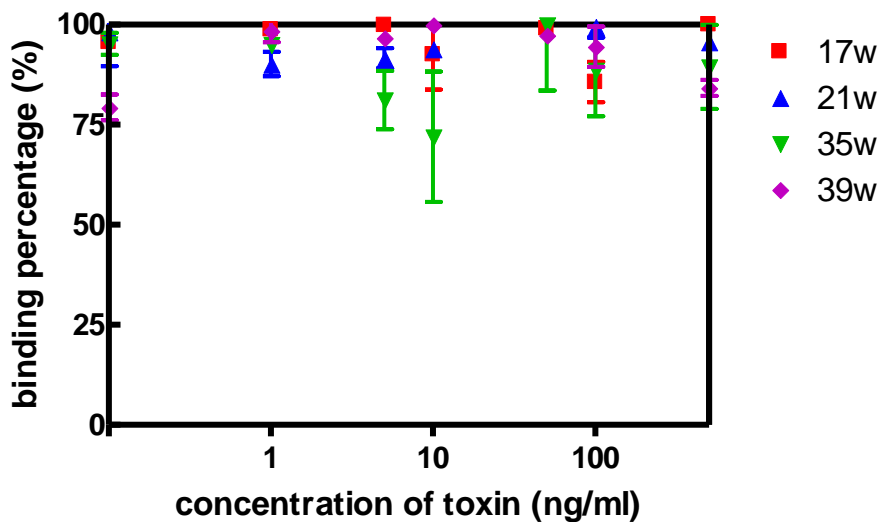


Figure 15. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對二號老鼠進行 OLA 專一性

測試

由圖可以得知二號小鼠並未對 OLA 產生專一性抗體。

#### OLA-SH (L2) -EDC/NHS-PTG 作為抗原免疫小鼠

利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體效價的測試，同樣採用 pre-immune 至第三十九週的小鼠血清來測試抗體的效價，由 Figure 16. 可以看出此抗原所免疫的小鼠抗體效價幾乎維持在同一水平線上沒有特別顯著的起伏，一號小鼠在第十九週之前只有少許上升，二號小鼠則在水平線上呈現小幅度鋸齒狀起伏，由此可以推測從 TLC 上刮下的 L2 所接合的免疫抗原效果並不好。

再來本研究利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體對 OLA 的專一性測試，但由 Figure 17. 及 Figure 18. 可以觀察到，免疫此抗原的小鼠對 OLA 也並未產生專一性抗體，另外在第三十三週時接合了第二批的抗原，第二批抗原接合的效果相較於第一次較差，免疫抗原呈現白濁色狀態。從上述結果得知利用 Succinate Anhydride 法所衍生接合而成的抗原，都無法讓小鼠產生對 OLA 的專一性抗體，由此推測此衍生方式對於免疫抗原的製備效果並不佳。

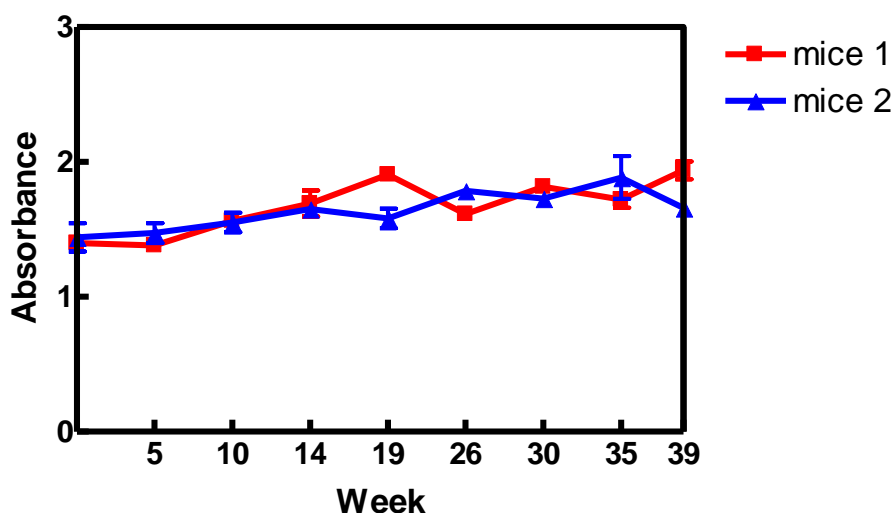


Figure 16. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對 OLA 進行抗體效價測

試

由圖可知一號小鼠在第十九周之前，抗體的效價有些許上升的趨勢，但在第十九

週之後沒有顯著的起伏，二號小鼠則是幾乎沒有改變。

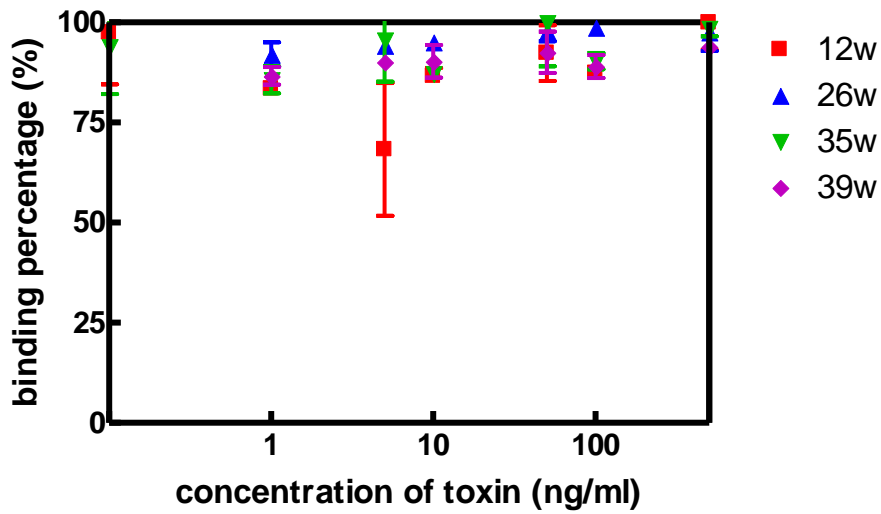


Figure 17. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對一號老鼠進行 OLA 專一性  
測試

由圖可以得知一號小鼠並未對 OLA 產生專一性抗體。

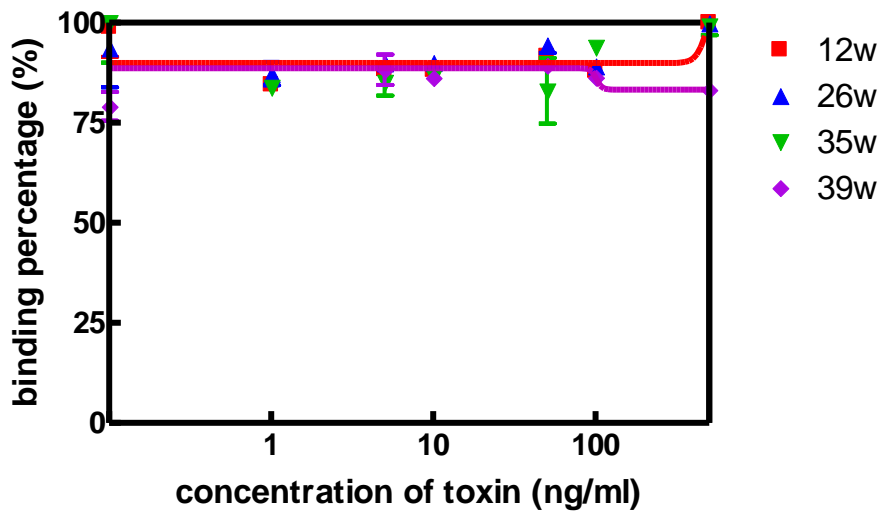


Figure 18. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對二號老鼠進行 OLA 專一性  
測試

由圖可以得知二號小鼠並未對 OLA 產生專一性抗體。

OLA-formaldehyde-EDA-BTG 作為抗原免疫小鼠

本研究利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體效價的測試，採用 pre-immune 至第二十七週的小鼠血清來測試抗體的效價測試，由 Figure 19. 可以得知這對小鼠在免疫初期效價的上升幅度非常微小，直至第 10 週混以不完全佐劑加強免疫後，第十三週效價便有往上升高的趨勢，但在幾週後效價有下降的趨勢，但仍持續每週進行免疫，於第二十一週時即有回升的趨勢，由此推測可能在進行加強免疫時，抗原未完全注射至腹腔內。

接著本研究利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體對 OLA 的專一性測試，但由 Figure 20. 及 Figure 21. 可以觀察到雖然效價的測試顯示此接合方法成功，但是小鼠並未對 OLA 產生專一性抗體。

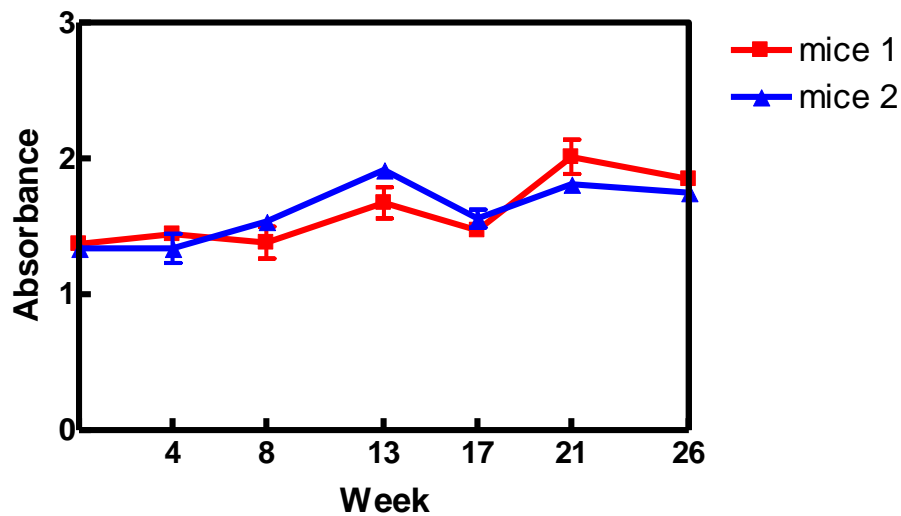


Figure 19. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對 OLA 進行抗體效價測試

由圖可知，一號及二號小鼠皆在第十三週以及第二十一週效價有往上升高，但過了幾週卻往下降低。

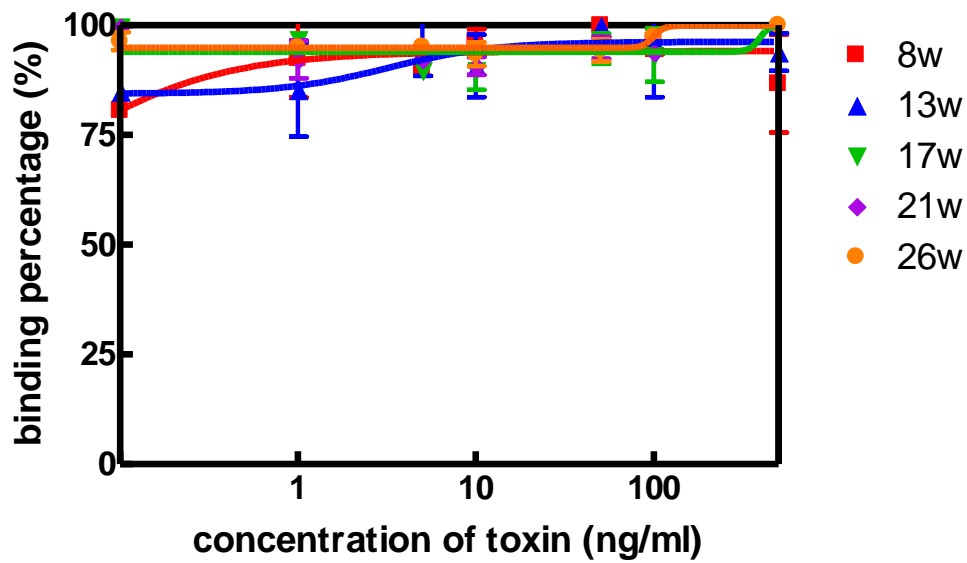


Figure 20. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對一號小鼠進行 OLA 專一性  
測試

由圖可推測小鼠對 OLA 並沒有產生專一性的抗體

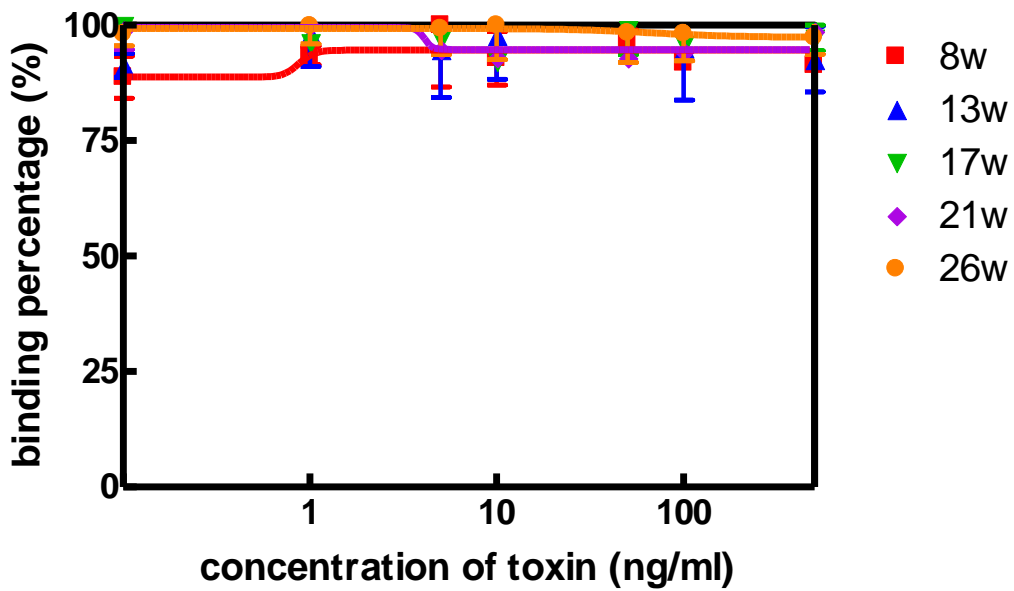


Figure 21. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對二號老鼠進行 OLA 專一性  
測試

由此圖可看出，二號小鼠並未對 OLA 產生專一性的抗體。



## OLA-CMO-PTG 作為抗原免疫小鼠

本研究利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體效價的測試，採用 pre-immune 至第十九週的小鼠血清來測試抗體的效價測試，由 Figure 22. 可以看出不論是一號小鼠或是二號小鼠，效價皆明顯地穩定往上升高，由此可知透過 CMO 衍生法所接合的蛋白是可行的。

透過直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體對 OLA 的專一性測試，由 Figure 23. 及 Figure 24. 可以觀察到，一號小鼠以及二號小鼠於第十九週時已有產生對 OLA 專一性之抗體，但是效價和專一性還不夠穩定，未來會仍然會持續每週免疫，及利用此衍生方式接合不同載體蛋白或是不同比例的載體蛋白，以期小鼠能夠產生專一性更好穩定度更佳的抗體。

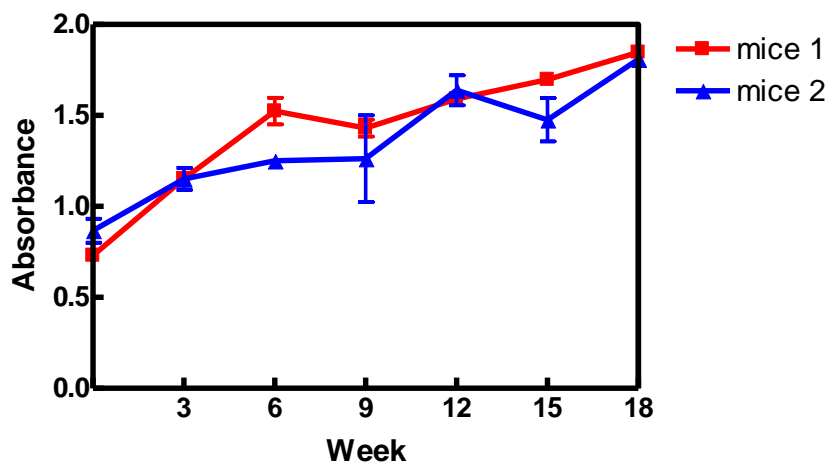


Figure 22. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對 OLA 進行抗體效價測試

由圖可以很明顯的看出一號及二號小鼠的抗體效價皆穩定的上升，由此可以推測此次蛋白的接合是可行的。

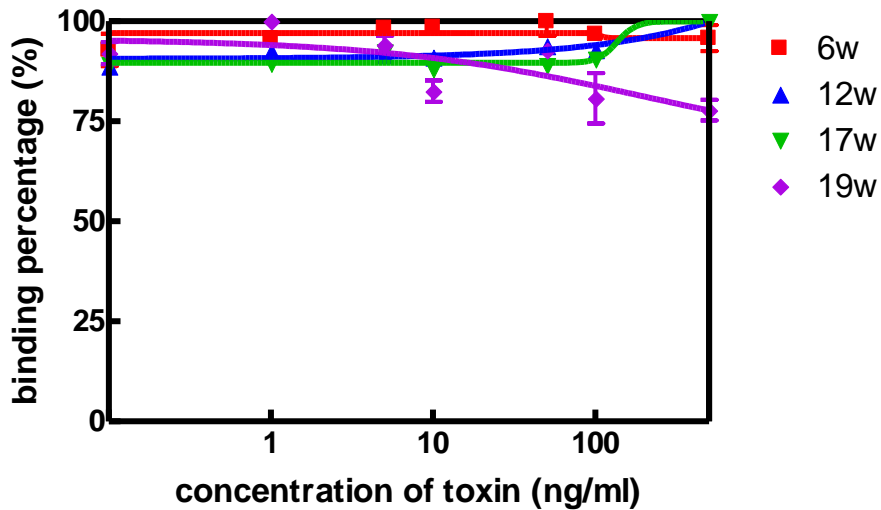


Figure 23. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對一號小鼠進行 OLA 專一性  
測試

由圖可以看出一號小鼠於第十九週時有對 OLA 專一性之抗體，但效價及專一性還不足以檢測樣品，未來每週會持續免疫，讓抗體的效價及專一性提高。

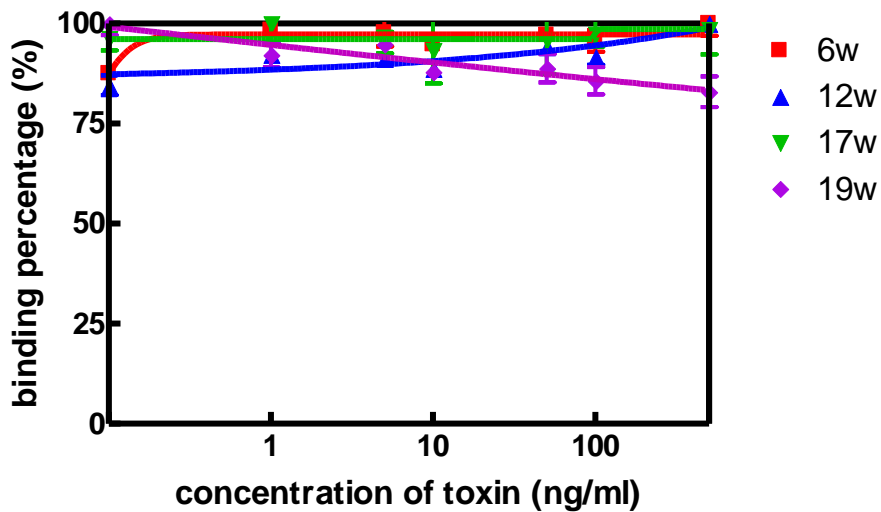


Figure 24. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對二號老鼠進行 OLA 專一性  
測試

由圖可以看出，二號小鼠也有產生對 OLA 專一性之抗體，不過效價及專一性皆不佳，未來仍會每週持續免疫，期望能夠提高抗體的效價及專一性。

## OLA-CDI- $\gamma$ -globulin 作為抗原免疫小鼠

本研究利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體效價的測試，採用 pre-immune 至第十八週的小鼠血清來測試抗體的效價測試，由 Figure 25. 可以得知一號小鼠的抗體效價有升高的趨勢，二號小鼠抗體的效價雖然於第十二週下降，但經過每週持續免疫後又有回升的趨勢，另外效價升高也顯示出此次抗原蛋白的接合是成功的。

接著透過直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來進行抗體對 OLA 的專一性測試，由 Figure 26. 及 Figure 27. 可以看到一號小鼠並未對 OLA 產生專一性抗體，二號小鼠於第十七週以及第十九週有產生對 OLA 專一性之抗體，不過效價及專一性皆不甚理想，往後還會持續週免疫，希望能產生高穩定高專一性的抗體。

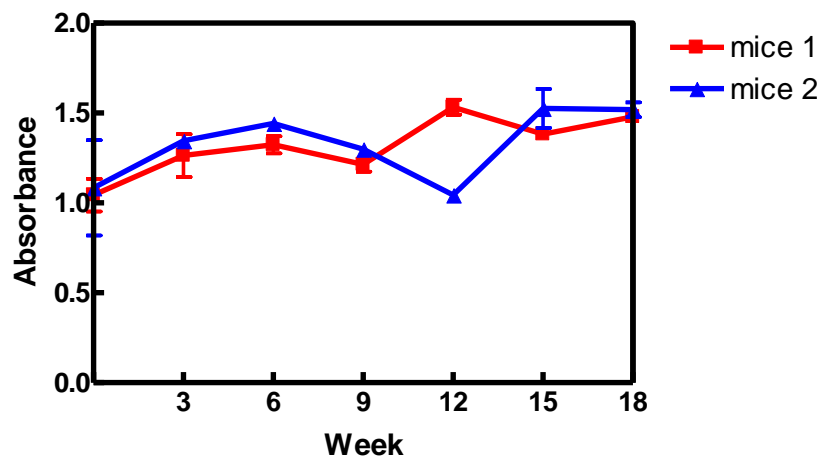


Figure 25. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對 OLA 進行抗體效價測試

由圖可得知，抗體的效價持續的升高，二號小鼠雖然於第十二週些微下降，但經過加強免疫後又有回升的趨勢。

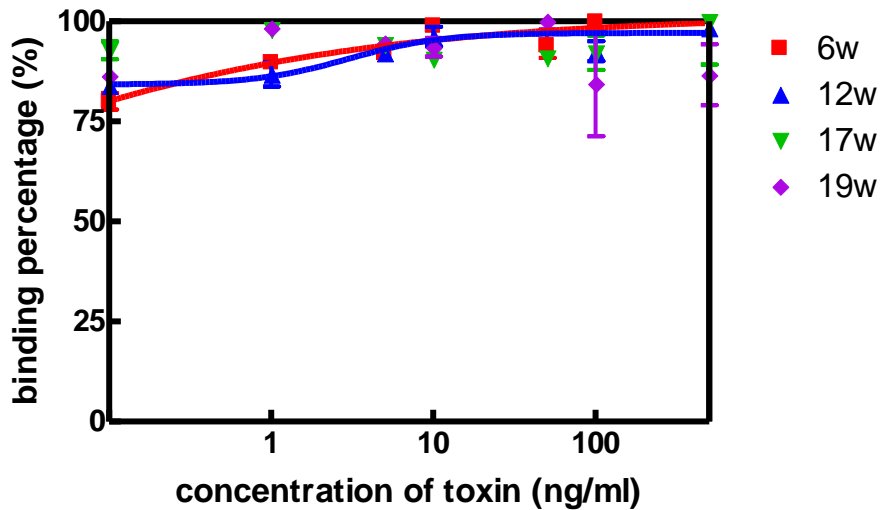


Figure 26. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對一號小鼠進行 OLA 專一性  
測試

由圖可知一號小鼠並未對 OLA 產生專一性抗體。

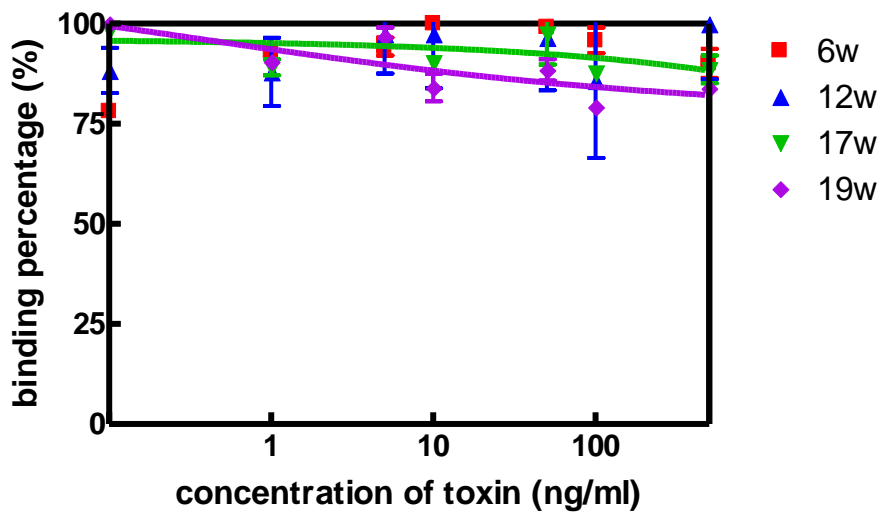


Figure 27. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對二號老鼠進行 OLA 專一性  
測試

由圖片可知二號小鼠有產生對 OLA 專一性之抗體，不過效價及專一性未達到檢  
測標準，未來仍會持續免疫，期望能提高抗體的專一性及效價。

## 四、討論

小分子的免疫檢測系統建立並不容易，主要原因為小分子的分子量太小，若是直接免疫實驗動物，通常無法使實驗動物產生免疫反應，為了解決此問題，小分子製備成免疫抗原過程就變得極為重要，必須要多方面的嘗試不同的接合方式以及不同的載體蛋白質，甚至小分子與載體蛋白質的接合比例都相當重要。

本研究一開始使用 Succinate Anhydride 的衍生法讓 OLA 產生梭基用以接合載體蛋白質，並且嘗試使用 EDC/NHS 和 DCC/NHS 做為橋樑接合。首先透過 TLC 片 (Figure 10.) 可以看到 Succinate Anhydride 的衍生效果並不好，產率極低，且在操作刮片純化反覆洗滌步驟時，上清液與沉澱的 TLC 片粉末界線並不清楚，導致在抽取上清液時非常容易抽到粉末，以至於在後續接合蛋白時形成混濁狀，接著在 SDS-PAGE (Figure 12.) 可以看見，利用 EDC/NHS 做為橋樑所接合的蛋白質較好，但是當製備好的抗原注射入小鼠體內時，透過抗體的效價曲線圖 (Figure 13.) 及 (Figure 16.) 可以顯示抗體的效價並沒有明顯的升高，表示抗體的接合效果並不好，而小鼠體內也沒有產生對 OLA 專一性的抗體。

OLA 的結構還具有一個甲基，故可利用 formaldehyde 作為接合方式製備免疫抗原，利用此抗原免疫小鼠後，從結果圖中 (Figure 19.) 可以得知雖然抗體的效價有些微的往上升，過幾週後卻往下降低，再次將抗原混和不完全佐劑加強免疫時，效價有顯著的上升，但仍然是幾週後隨之降低，顯示出抗體並不穩定，再透過 ELISA 檢測顯示小鼠體內並沒有產生對 OLA 專一性的抗體，故此接合方式或許可行，只是還需要再多方嘗試不同的載體蛋白質及接合比例，以達到讓小鼠產生專一性抗體的目的。

除此之外 OLA 結構上還擁有雙鍵氧，因此可利用 CMO 的衍生方式製備抗原，從結果中得知 (Figure 23.) 此接合方式為目前最有效果的，不但抗體的效價持續穩定地往上提高，ELISA 測試抗體時也有檢測到對 OLA 專一性的產生，只是專一性和表現量都不夠高，由與此對小鼠大約免疫四個月，未來會持續

免疫觀察，另外也會利用此衍生方式嘗試更好的載體蛋白質接合比例，藉此期望產生更穩定的抗體。

除了上述的接合方法，本研究還另外嘗試使用 CDI 活化接合載體蛋白，透過效價結果圖中 (Figure 25.) 能看出此抗原的接合是成功的，抗體效價皆往上升高，另外專一性測試結果中 (Figure 27.) 也得知有產生對 OLA 專一性之抗體，未來依然會繼續嘗試不同比例的載體蛋白質接合方式，以盼能提高抗體效價以及專一性。

在往後的實驗中，會持續嘗試不同的載體蛋白質製備方式及接合比例。由於 OLA 不溶於大多數的有機溶劑、酒精以及水，故在製備的過程中仍然有許多問題點需要克服，藉此期望能夠產生對 OLA 專一性之抗體並建立一套多株抗體酵素連結免疫吸附分析法系統與快速層析免疫試紙，提供一般民眾便利使用，避免社會大眾攝取到 OLA 殘留物的肉類加工品而導致疾病的產生。

## 五、文獻討論

Cheng, L., Shen, J., Wang, Z., Jiang, W., & Zhang, S. (2013). A sensitive and specific ELISA for determining a residue marker of three quinoxaline antibiotics in swine liver. *Anal Bioanal Chem*, 405(8), 2653-2659.

Jiang, W., Beier, R. C., Wang, Z., Wu, Y., & Shen, J. (2013). Simultaneous screening analysis of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid and quinoxaline-2-carboxylic acid residues in edible animal tissues by a competitive indirect immunoassay. *J Agric Food Chem*, 61(42), 10018-10025.

Le, T., Zhu, L., Shu, L., & Zhang, L. (2015). Simultaneous determination of five quinoxaline-1,4-dioxides in animal feeds using an immunochromatographic strip. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 1-8.

- Song, C., Liu, Q., Zhi, A., Yang, J., Zhi, Y., Li, Q., Hu, X., Deng, R., Casas, J., Tang, L., & Zhang, G. (2011). Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of olaquinox residues. *J Agric Food Chem*, 59(17), 9319-9326.
- Yang, Y., Jiang, L., She, Y., Chen, M., Li, Q., Yang, G., Geng, C., Tang, L., Zhong, L., Jiang, L., & Liu, X. (2015). Olaquinox induces DNA damage via the lysosomal and mitochondrial pathway involving ROS production and p53 activation in HEK293 cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 40(3), 792-799.
- Zhao, D., He, L., Pu, C., & Deng, A. (2008). A highly sensitive and specific polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibiotic olaquinox in animal feed samples. *Anal Bioanal Chem*, 391(7), 2653-2661.
- Zhao, D., Qiao, X., Xu, Z., Xu, R., & Yan, Z. (2013). Development of a biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay method based on a hydrophilic molecularly imprinted polymer film for determination of olaquinox in chick feed samples. *J Immunoassay Immunochem*, 34(1), 16-29.