

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫 : T-2 毒素多株抗體之製備及酵素免疫分析法與奈米金 *
* 名稱 : 粒子免疫層析試紙之開發 *
* ***** *

執行計畫學生： 靳家瑜
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-046-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 106 年 03 月 31 日

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 T-2 毒素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：靳家瑜

學生計畫編號：105-2815-C-040-046-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)

T-2 毒素是由鐮刀黴菌 (*Fusarium*) 產生的 A 型單端孢黴毒素 (trichothecene A)，主要是由擬分枝鐮刀菌和梨孢鐮刀菌所產生，常見於受黴菌污染的玉米、大麥、小麥及畜禽飼料中。T-2 毒素可經由攝食、吸入或透過皮膚影響人體，與大多數鐮刀黴菌毒素一樣會抑制蛋白質及核酸合成，進而造成細胞死亡，其主要侵犯的系統為淋巴、血液、骨髓、腸胃道黏膜及皮膚等。

T-2 是分子量為 466.51 Dalton 的小分子化合物，只具有抗原性而不具有免疫原性，若直接免疫動物並不會引發免疫反應，因此 T-2 毒素需要和載體蛋白質結合，合成出具有免疫原性的抗原，才可用於免疫動物以製備 T-2 的多株抗體。由於 T-2 上具有羥基 (-OH) 及甲基 (-CH₃) 可用於載體蛋白質接合，因此本計劃先利用 T-2 上的羥基進行衍生，使其具有羧基 (-COOH)，再以 EDC/NHS 法讓 T-2 衍生物 T-2-SH 的羧基與胎牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 上的胺基 (-NH₂) 反應，以製備免疫抗原來免疫一號及二號小鼠。此外 T-2 具有甲基 (CH₃) 可使用 Formaldehyde 法與豬甲狀腺球蛋白 (Thyroglobulin from porcine thyroid gland, PTG) 上的胺基 (NH₂) 進行接合，並用於免疫三號及四號小鼠，再藉由 indirect competitive ELISA (ciELISA) 來觀察抗體的專一性。

本計畫發現以 T-2-SH-BSA 免疫的一號及二號小鼠皆沒有產生 T-2 專一性的抗體，因此於免疫後 11 週改變接合方式接合抗原並免疫小鼠，藉由 ciELISA 結果得知在更改抗原接合方式後，小鼠仍然沒有產生對 T-2 專一性之抗體，抗體效價先稍微上升後逐漸下降，但又迅速上升於 30 週到達高峰，之後又迅速下降。另一方面三號及四號小鼠注射以 Formaldehyde 法所接合的 T-2-Formaldehyde-PTG，但小鼠抗體的專一性不明顯且效價也不會隨著週次上升，因此於免疫後 10 週改以 T-2-SH-PTG 作為免疫抗原來免疫小鼠，利用 ciELISA 檢測得知小鼠抗體的專一性不明顯但抗體的效價有逐漸提高。未來本計畫會持續觀察老鼠所產生的抗體對於 T-2 的專一性，並且嘗試不同 T-2 及載體蛋白質的接合方式與接合比例，以開發出具良好專一性之多株抗體及快速免疫層析試紙，提供社會大眾使用。

目錄 (Index)

摘要

一，緒論

1.1 研究起源.....	5
1.2 T-2 基本性質.....	5
1.3 T-2 相關研究.....	6
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.....	8
1.6 研究動機及研究問題.....	10

二，材料與方法

2.1 實驗藥品及動物.....	11
2.2 實驗儀器.....	12
2.3 實驗方法.....	13
2.3.1 製備不同 T-2 之衍生物	
2.3.2 利用 TLC 確認衍生物的產生	
2.3.3 製備不同 T-2 之免疫抗原	
2.3.4 將 T-2 與 OVA (Ovalbumin, 卵白蛋白) 接合作為覆被抗原	
2.3.5 將 T-2 與 HRP (Horseradish peroxidase, 辣根過氧化氫酵素) 接合	
2.3.6 免疫小鼠	
2.3.7 多株抗體的純化	
2.3.8 利用 competitive ELISA 確認抗體效價及專一性	
2.3.9 製備奈米金粒子探針	
2.3.6 免疫試紙的製備	

三，實驗結果

3.1 利用 TLC 確認衍生物的產生.....	21
3.2 利用 competitive ELISA 確定抗體效價及專一性.....	21
3.2.1 利用 T-2-SH-BSA 及 T-2- formaldehyde- BSA 作為抗原免疫小鼠	

3.2.2 利用 T-2-formaldehyde-PTG 及 T-2-SH-PTG 作為抗原免疫小鼠

四，討論.....27

五，參考文獻.....28

一，緒論 (Introduction)

1.1 研究起源

T-2 屬於鐮刀黴菌毒素，主要是由擬分枝鐮刀菌和梨孢鐮刀菌所產生，為家禽、飼料中常見的污染物，可與許多病原體共存，進而影響免疫力及改變病理和發病機制。T-2 毒素的毒性作用為抑制蛋白質、DNA、RNA 的合成而導致組織病理學的變化 (Girish & Smith, 2008)。因此農作物收穫前後的管理，是預防和控制鐮刀菌屬黴菌污染的基本方法。

先前文獻指出，斑馬魚胚胎暴露高於20 $\mu\text{mol/L}$ 的 T-2 毒素時，會造成尾部畸形、心血管缺陷和幼年時期的行為變化 (Yuan, et al., 2014)。且暴露於高劑量的 T-2 毒素會延遲排卵而導致延遲卵泡成熟的狀況，使得雌性動物無法受孕。1998 年發現長徽的乾草會影響公牛精液的品質，進而分析顯示長徽的乾草存在 T-2 毒素，進而導致雄性激素的分泌量降低。若食入 T-2 毒素也會導致兔、豬和大鼠的 Cytochrome P450 1A (CYP1A) 蛋白表現量減少和活性降低。而 CYP1A 會幫助肝臟代謝藥物，因此活性降低可能會影響動物的健康 (Goossens, et al., 2013)。

民國九十三年間知名狗飼料品牌曾爆發受到黴菌污染而導致大批貓狗腎衰竭死亡的事件。而貓狗飼主若手摸含有 T-2 毒素之飼料，可能會直接接觸 T-2 毒素，若寵物受到 T-2 毒素感染，掉在家中的毛髮也可能含 T-2 毒素，飼主長期暴露可能造成痠痛、免疫出問題等病徵。目前中國訂定豬及家禽飼料中 T-2 的限制含量為 1000 ppb，俄羅斯及以色列訂定飼料中 T-2 的限制含量為 100 ppb，台灣農委會表示訂定 T-2 毒素的殘留標準已刻不容緩，且會參考已制訂標準的國家，用以強化國內的寵物飼料之管理規範，務求與國際規範同步，以保障寵物健康。

1.2 T-2 基本性質

T-2 毒素化學式為
(2 α ,3 α ,4 β ,8 α)-4,15-bis(acetyloxy)-3-hydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-yl-3-methylbutanoate，分子量為 466.51 Dalton，為鐮刀黴菌 (*Fusarium*) 產生的 A 型單端孢黴毒素 (trichothecene A)。具有低分子量、非揮發性、熱穩定等特性，無法被熱及紫外線破壞，常見於受黴菌污染穀物的代謝產物中，會藉由吸入、接觸、

食用等途徑而感染，主要侵犯的系統為淋巴、血液、骨髓、腸胃道黏膜及皮膚等。T-2 毒素會藉由抑制蛋白質及核酸合成而使細胞死亡，若皮膚或眼睛接觸到時，可能會造成皮膚壞死或眼睛的過敏症狀。若誤食 T-2 毒素會在短時間內會產生不同程度之腹痛、嘔吐、喉嚨痛、腹瀉等症狀；若吸入 T-2 毒素可能有流鼻水、鼻子癢、咳嗽、呼吸困難、哮喘、胸痛及咳血等症狀，嚴重中毒時會導致白血球減少症、骨髓抑制、全身無力、敗血症，甚至休克及死亡。家禽對黴菌毒素雖更具耐受性，但牠們仍可能造成口腔細胞壞死、乏力、食慾不振、腹瀉、生長速率降低、減少產蛋、蛋殼變薄，以及產生免疫系統毒性 (Maragos, et al., 2013)。

目前台灣尚未訂定 T-2 毒素的限制含量，而國外在動物飼料有訂定規範或建議值，範圍為 80 ppb 至 1000 ppb，FAO/WHO 食品添加物專家聯合委員會 (JECFA) 於 2002 年第 110 屆會期暫定 T-2 毒素及其代謝物 HT-2 毒素之單獨或合計攝食最高容許量為 60 ng/kg-bw/day。

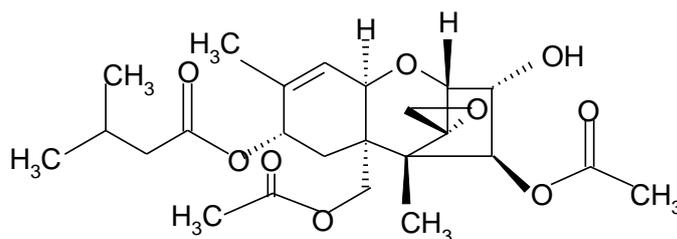


Figure. 1 T-2 結構式

1.3 T-2 相關研究

目前用於檢測 T-2 毒素含量的方法有：高效液相層析色譜法 (HPLC)、液相層析串聯質譜法 (LC/MS/MS) 及氣相層析串聯質譜法 (GC/MS/MS)，但從結構上來看，T-2 毒素較不易吸收紫外光，由於 HPLC 使用 UV 光，因此不適合用於 T-2 毒素的檢測，熒光檢測 (FLD) 具有高靈敏度、選擇性和可重複性，更適用於檢測 T-2 毒素的含量。但這些儀器分析方法需要精確和昂貴的設備，也不能滿足快速篩選的要求 (Li, et al., 2014)。酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 是一個能快速檢測樣品內待測物殘留量的方法，操作簡單且前置準備相較於其他檢測技術簡單，具高專一性、靈敏、檢驗成本低及可同時進行大量樣本檢測，因此 ELISA 用於檢測 T-2 毒素是一個非常成熟和良好的技術 (Li, et al., 2014)。

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進行樣品的檢測。其中步驟為加入酵素的受質與酵素進行反應與呈色。呈色結果可利用肉眼觀察或是使用酵素免疫分析儀器對不同深淺之顏色進行定量分析，達到檢測樣品中是否含有某特定抗原和其含量是否超標。酵素連結免疫分析法以操作方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)，本計畫使用直接競爭型和非直接競爭型酵素連結免疫分析法來做為檢測的方法，接下來簡單描述此兩種方法的原理。

直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA) (Figure. 2)

利用吸附法或是共價接合的特性使抗體連接到固相基質上，並且加入蛋白質填補未被抗體填滿之基質空隙。接著加入樣品或抗原標準品、具酵素標定的抗原，最後加入酵素受質即可呈色。呈色結果顏色越淺代表樣品或抗原標準品中的抗原濃度越高。

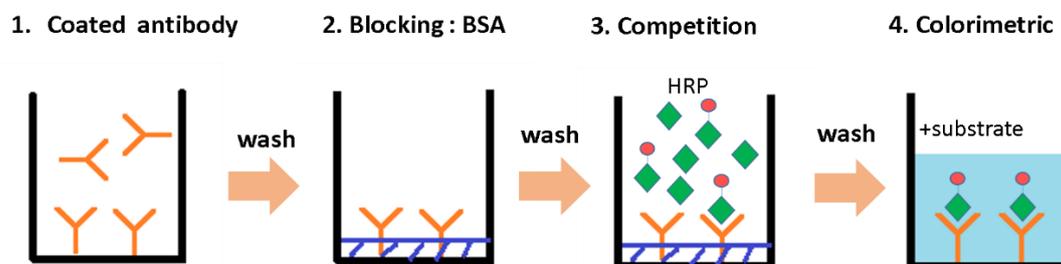


Figure. 2 直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法

非直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay) (Figure. 3)

利用載體蛋白質與抗原所接合的複合物吸附於固相基質後，加入蛋白質填補未被此複合物填滿之基質空隙。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，接著加入被酵素標記的二級抗體，使二級抗體辨識並結合抗體的 FC 區且放大訊號。最後加入酵素呈色物質即可呈色，呈色結果顏色越淺代表樣品或抗原標準品中的抗原濃度越高。

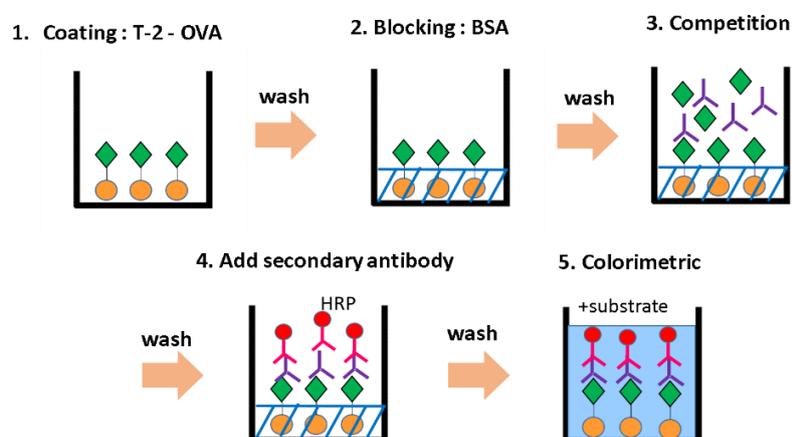


Figure. 3 非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析

1.5 快速免疫層析試紙

快速免疫層析試紙 (Figure. 4) 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，並把抗原及作為控制組的二級抗體分別吸附在測試區與控制區膜上，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膜上進行層析，當樣品中含有抗原時，奈米金粒子會和樣品中的抗原結合，因此會在基質的膜上控制組區產生顏色，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。

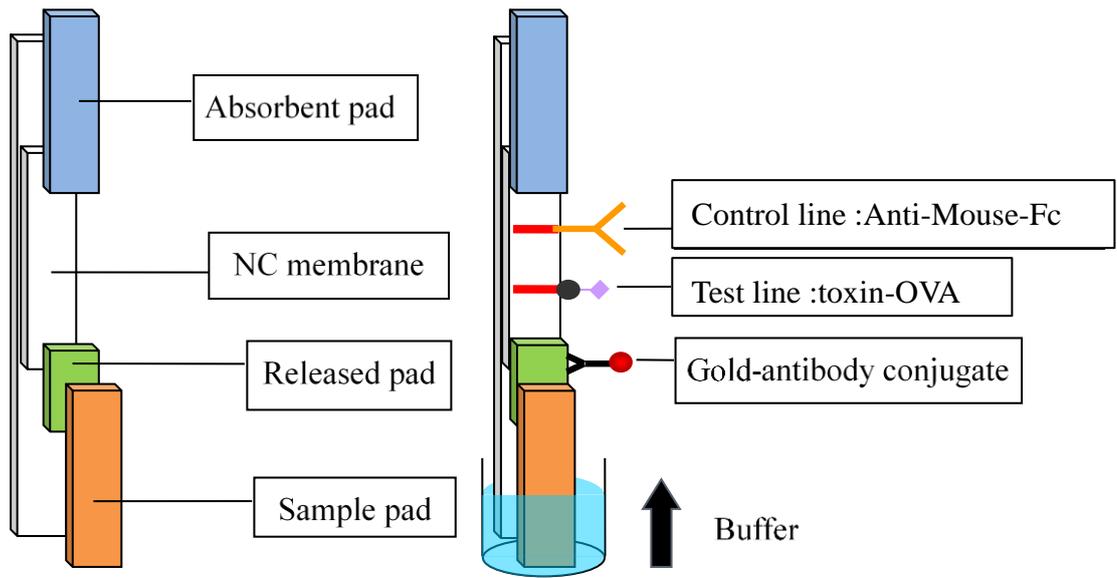


Figure. 4A 免疫層析試紙組成

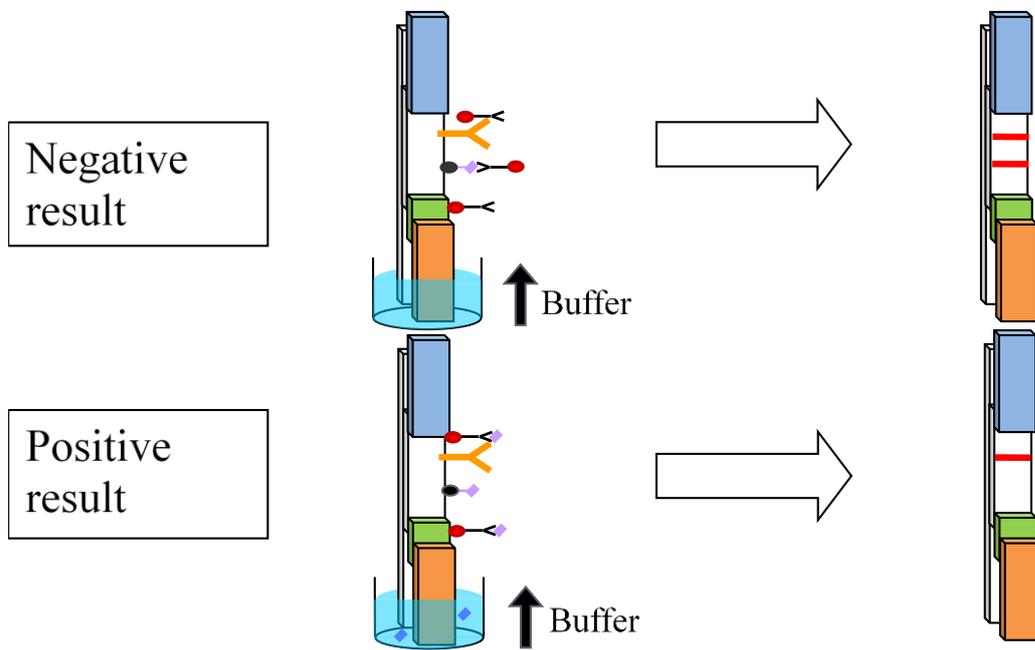


Figure. 4B 分析結果

1.6 研究動機及研究問題

目前檢測 T-2 毒素的方法主要有高效液相層析色譜法 (HPLC)、液相層析串聯質譜法 (LC/MS/MS) 及氣相層析串聯質譜法 (GC/MS/MS)，雖然這些方法檢測的結果具有高度的準確性，但操作步驟較為繁複，檢測費用較高以及需要專業技術的人員操作儀器。酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 成本低，實驗操作較為快速、方便並可同時進行大量的樣本檢測。因此本計畫打算製備出對 T-2 具有專一性的多株抗體並用以開發一套 ELISA 系統來檢測 T-2，但 ELISA 之結果需要利用儀器判讀，因此更進一步開發出快速免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip) 供一般民眾使用。

本計畫分為三個子目標：

【子目標一】：製備專一性 T-2 的多株抗體。

- 製備免疫抗原
- 將免疫抗原打入老鼠產生免疫反應 (Immunization)
- 多株抗體的純化

【子目標二】：建立酵素聯結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA) 方式檢測樣品中 T-2 的含量。

- 直接競爭型 ELISA (Direct Enzyme-linked immunosorbent Assay)
- 非直接競爭型 ELISA (Indirect Enzyme-linked immunosorbent Assay)

【子目標三】：開發 T-2 快速免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip)。

- 製備抗體奈米金粒子探針
- 製備免疫試紙
- 以 ELISA 及快速免疫層析試紙分析樣品中 T-2 之含量

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-dimethylaminopropyl] Carbondimide (EDC)

N-hydroxysuccinimide (NHS)

Freund's complete adjuvant

Freund's incomplete adjuvant

Succinic anhydride

Sodium bicarbonate

Ovalbumin (OVA)

Pyridine

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

Ethyl acetate

polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)

Sodium carbonate

TLC Silica gel 60 RP-18 F254S

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

Hydrochloric Acid HCl

Acetone

Chloroform

Formaldehyde

Methanol

N,N-dimethylformamide (DMF)

Sodium acetate

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

Goat anti-mouse IgG-HRP

Horseradish peroxidase (HRP)

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
Auto strip washer	Bio TEK INSTRUMENT ELx50

2.3 實驗方法

2.3.1 製備不同 T-2 之衍生物

由於 T-2 屬小分子化合物，只具有抗原性而沒有免疫原性，故必須與載體蛋白質接合放大其分子量，由於 T-2 結構上具有羥基 (-OH) 與甲基 (CH₃)，所以本計劃參考 Yanshen Li 的方法 (Li, et al., 2014) 先利用 Succinic anhydride (SH) 衍生再以 EDC/NHS 法使其與載體蛋白質接合，或以 Formaldehyde 法接合載體蛋白質，產生出具有刺激免疫反應的抗原。

2.3.1-1 以 Succinic anhydride 衍生 T-2

秤取 0.5 mg T-2 溶於 200 μ l pyridine，再秤取 10.5 mg succinic anhydride 溶於 300 μ l pyridine。將 T-2 溶液加入 succinic anhydride 溶液中後置於室溫、氮氣環境下反應 72 小時，再以減壓濃縮法去除 pyridine。待 pyridine 抽乾後以 700 μ l methanol 回溶並且以 TLC 片確認衍生結果。

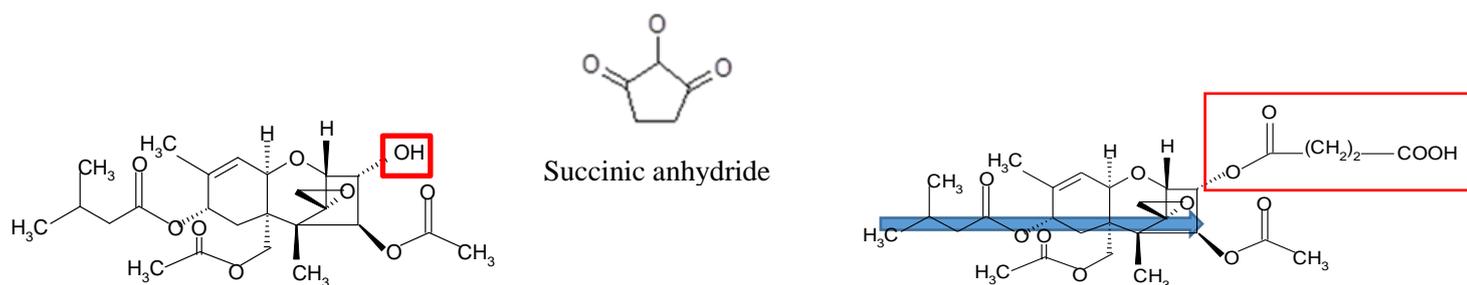


Figure. 5 succinic anhydride 衍生示意圖

2.3.2 利用 TLC 確認衍生物的產生

取 1 μ l 的 T-2 標準品和 1 μ l 已製備出的 T-2 衍生物，點在 TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄ S 上，以展開液 (methanol : H₂O = 9 : 1) 展開，將展開完成之 TLC 於波長 254 nm 下觀察其結果。

2.3.3 製備不同 T-2 之免疫抗原

2.3.3-1 使用 EDC/NHS 法將 T-2-SH 與 BSA 接合

秤取 0.5 mg T-2-SH 溶於 500 μ l DMF 中，再秤取 4.2 mg EDC 及 1.8 mg NHS 分別溶於 336 μ l 和 240 μ l DMF 中。將 EDC 溶液、NHS 溶液依序緩慢加入到 T-2-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時。秤取 5 mg BSA 溶於 1666 μ l 0.1 M carbonate buffer。將反應完成的 T-2-SH 溶液緩慢加入至 BSA 溶液中，置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

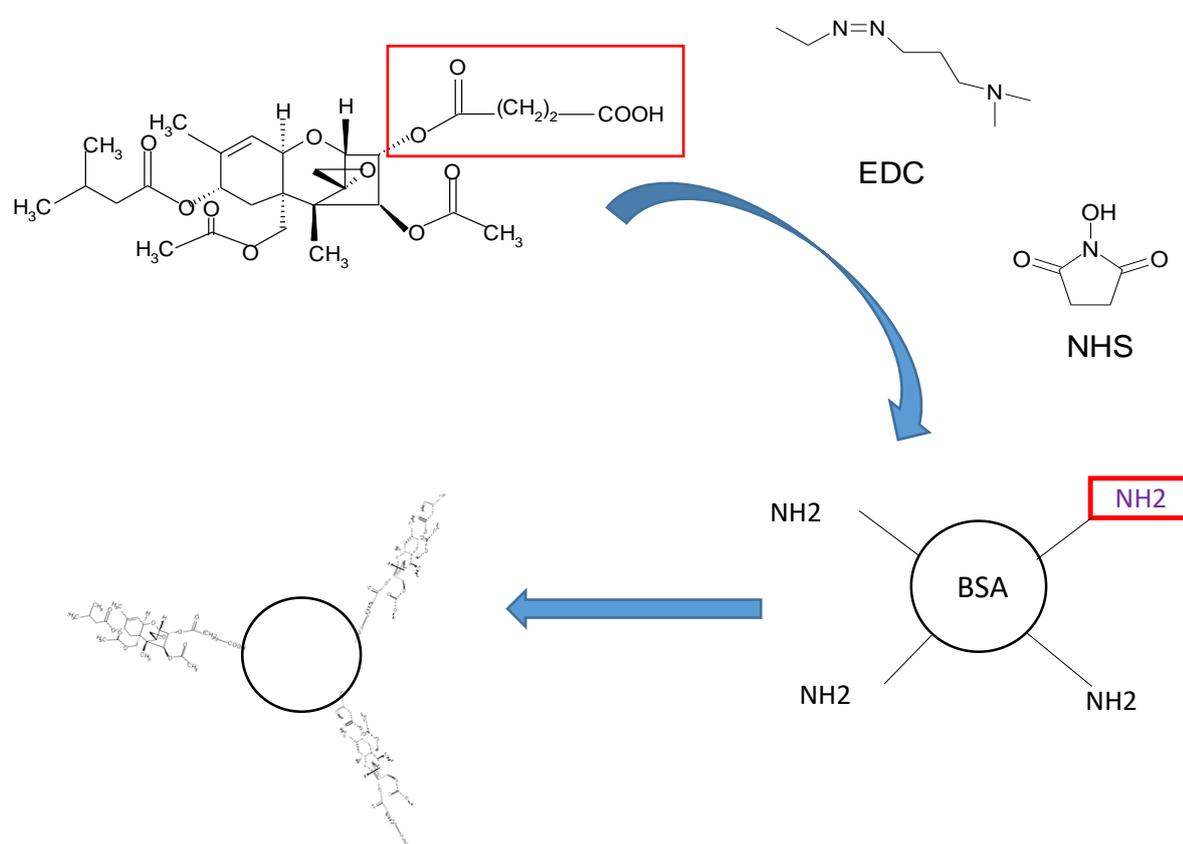


Figure. 7 EDC/NHS 法示意圖

2.3.3-2 使用 Formaldehyde 法將 T-2 與 BSA 接合

秤取 3 mg BSA 溶於 300 μ l 0.1 M sodium acetate。秤取 1 mg T-2 先溶於 100 μ l DMF 再加入 300 μ l 0.1 M sodium acetate。將 T-2 溶液緩慢加入至 BSA 溶液中，再加入 200 μ l 36.5% formaldehyde 置於室溫下避光攪拌反應 3 天，再置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

2.3.3-3 使用 Formaldehyde 法將 T-2 與 PTG 接合

秤取 4 mg PTG 溶於 500 μ l 0.1 M sodium acetate，再秤取 1 mg T-2 溶於 300 μ l methanol。將 T-2 溶液緩慢加入至 PTG 溶液中，再加入 100 μ l 36.5% formaldehyde 置於室溫下避光攪拌反應 3 天，再置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

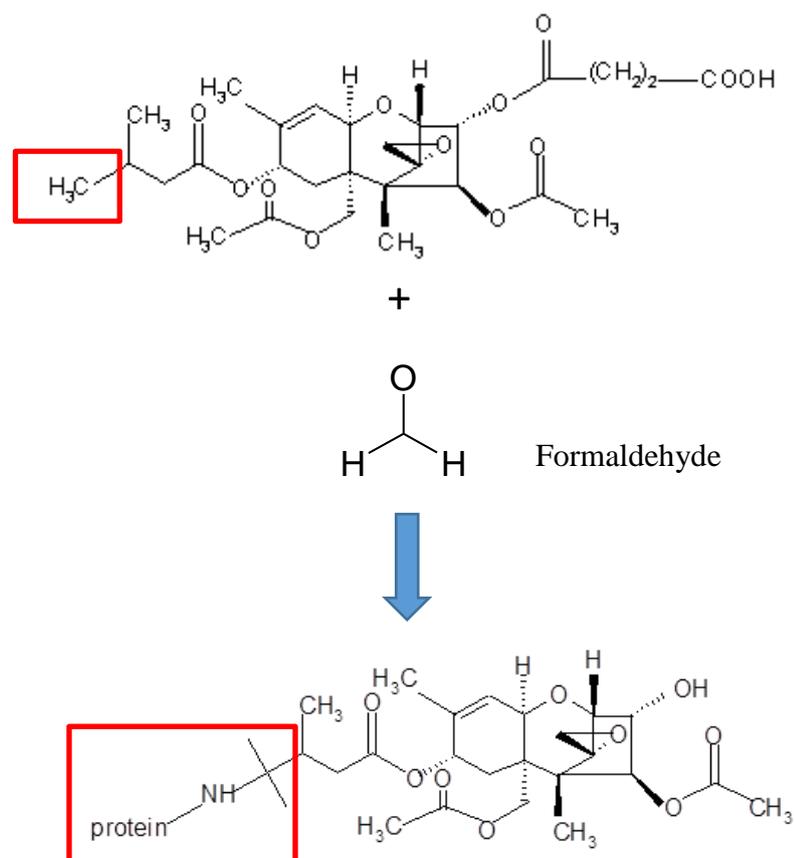


Figure. 8 Formaldehyde 法示意圖

2.3.3-4 使用 EDC/NHS 法將 T-2-SH 與 PTG 接合

秤取 0.5 mg T-2-SH 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 1 mg EDC 及 0.75 mg NHS 分別溶於 10 μ l 和 7.5 μ l DMF 中。將 EDC 溶液、NHS 溶液依序緩慢加入到 T-2-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時。秤取 2 mg PTG 溶於 200 μ l 0.1 M carbonate buffer。將反應完成的 T-2-SH 溶液緩慢加入至 PTG 溶液中，置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

2.3.4 將 T-2 與 OVA (Ovalbumin, 卵白蛋白) 接合作為覆被抗原

2.3.4-1 使用 EDC/NHS 法將 T-2-SH 與 OVA 接合

秤取 0.1 mg T-2-SH 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 0.5 mg EDC 及 0.3 mg NHS 分別溶於 40 μ l DMF 中。將 EDC 溶液、NHS 溶液依序緩慢加入到 T-2-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時。秤取 1.4 mg OVA 溶於 700 μ l 0.1 M carbonate buffer。將反應完成的 T-2-SH 溶液緩慢加入至 OVA 溶液中，置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

2.3.4-2 使用 Formaldehyde 法將 T-2 與 OVA 接合

秤取 2 mg OVA 溶於 200 μ l 0.1 M sodium acetate，再秤取 0.25 mg T-2 溶於 100 μ l 0.1 M sodium acetate。將 T-2 溶液緩慢加入至 OVA 溶液中，再加入 200 μ l 37% formaldehyde 置於室溫攪拌反應 3 天，再置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

2.3.5 將 T-2 與 HRP (Horseradish peroxidase, 辣根過氧化氫酵素) 接合

2.3.5-1 使用 EDC/NHS 法將 T-2-SH 與 HRP 接合

秤取 0.1 mg T-2-SH 溶於 100 μ l DMF 中，再秤取 0.5 mg EDC 及 0.3 mg NHS 分別溶於 40 μ l DMF 中。將 EDC 溶液、NHS 溶液依序緩慢加入到 T-2-SH 溶液中，於室溫攪拌 2 小時。秤取 1.6 mg HRP 溶於 800 μ l 0.1 M carbonate buffer。將反應完成的 T-2-SH 溶液緩慢加入至 HRP 溶液中，置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時，之後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

2.3.5-2 使用 Formaldehyde 法將 T-2 與 HRP 接合

秤取 2 mg HRP 溶於 200 μ l 0.1 M sodium acetate，再秤取 0.5 mg T-2 溶於 100 μ l 0.1 M methanol。將 T-2 溶液緩慢加入至 HRP 溶液中，再加入 100 μ l 37 % formaldehyde 置於室溫下避光攪拌反應 3 天，再置於 4°C 攪拌反應至少 12 小時。反應完成後在 4°C 下於 1 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。

2.3.5-3 使用 CDI 法將 T-2 與 HRP 接合

秤取 0.5 mg T-2 溶於 150 μ l 的 acetone，再秤取 1 mg CDI 溶於 150 μ l 的 acetone。將 CDI 加入 T-2，於氮氣環境下避光反應 3 小時。秤取 2 mg 的 HRP 溶於 400 μ l 0.1 M carbonate buffer，並將 T-2-CDI 溶液緩慢加入至 HRP 溶液中，放置室溫、氮氣環境下避光攪拌反應 48 小時後以 1 L 的 0.01 M PBS 透析 3 次。

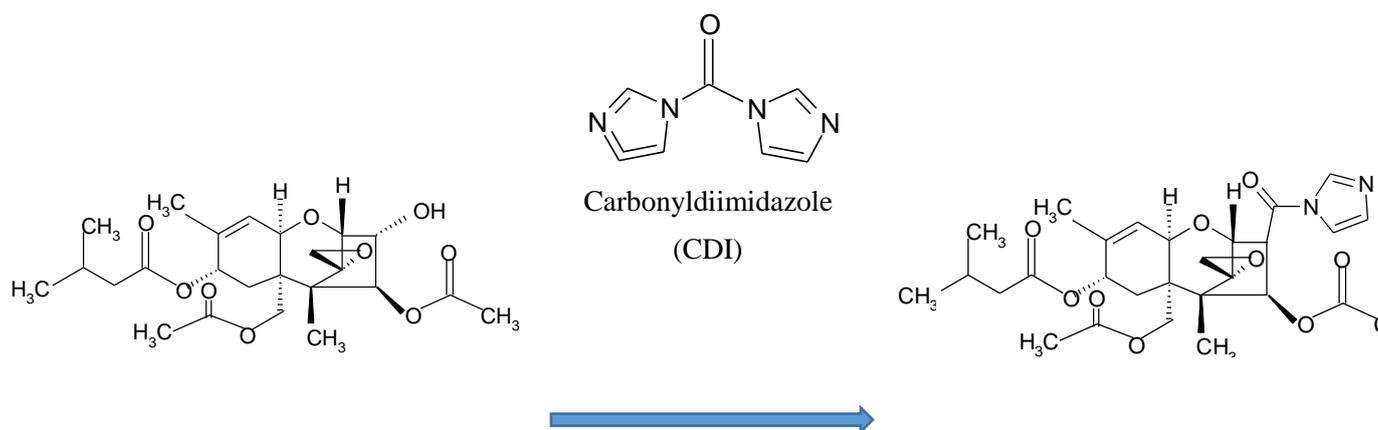


Figure. 6 CDI 示意圖

2.3.6 免疫小鼠

為了使 Balb/c 小鼠產生對 T-2 具有專一性的抗體，本計畫將 T-2-SH-BSA (50 μ g 的 BSA 溶於 365 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，再以腹腔注射方式打入小鼠體內。二週後進行加強免疫動作，取 T-2-SH-BSA (50 μ g 溶於 365 μ l 0.01 M PBS) 注射入小鼠腹腔，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 T-2 的專一性抗體。

2.3.7 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。

2.3.8 利用 competitive ELISA 確定抗體效價及專一性

2.3.8-1 利用 indirect competitive ELISA 檢測抗體效價

在 96 孔盤中加入 100 μ l T-2-SH-OVA (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 μ 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 μ l 0.01 M PBS 及 50 μ l 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 μ l Goat anti-mouse 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 μ l 的酵素受質 (TMB substrate) 於暗處反應 15 ~ 20 分鐘後，加入 100 μ 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。

2.3.8-2 利用 indirect competitive ELISA 檢測抗體專一性

在 96 孔盤中加入 100 μ l T-2-SH-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 μ l blocking buffer (0.1 % BSA 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 μ l 不同濃度的 T-2 標準品 (0.1 ~ 1000 ng/ml) 及 50 μ l 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-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 的酵素受質 (TMB substrate) 於暗處反應 15 ~ 20 分鐘後，加入 100 μ 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。

2.3.8-3 利用 direct competitive ELISA 檢測抗體專一性

在 96 孔盤中加入 100 μ l 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 (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 μ l blocking buffer (0.1 % BSA 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 μ l 不同濃度的 T-2 標準品 (0.1 ~ 1000 ng/ml) 及 50 μ l T-2-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37°C 環境中反應 1 小時。最後加入 100 μ l 的酵素受質 (TMB substrate) 於暗處反應 15 ~ 20 分鐘後，加入 100 μ 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 製備奈米金粒子探針

將 T-2 毒素之多株抗體置於 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 T-2 毒素之多株抗體，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 % 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。然後以 14,000 rpm 離心 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。

2.3.10 免疫試紙的製備

先將 T-2 毒素的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5 μ l /strip)，37 $^{\circ}$ C 環境下烘乾。再將 0.25 μ l 的 T-2-SH-OVA 和 0.25 μ l 的 Anti-mouse-Fc antibody (0.2 mg/ml) 分別點於 NC membrane (孔徑為 15 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 $^{\circ}$ 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 \times 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 T-2 毒素之標準品，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 確認衍生物的產生

當 T-2 衍生完成後，本計畫將 T-2 的標準品及 T-2 的衍生物分別點在 TLC 片上，以展開液 (methanol : H₂O = 9 : 1) 展開，並於 254 nm 波長下觀察結果。結果顯示其展開後的點高度不同，代表 T-2 的極性與結構產生改變，因此本計畫利用衍生後的 T-2 衍生物接合載體蛋白質。

3.2 利用 Competitive ELISA 確定抗體效價及專一性

3.2.1 利用 T-2-SH-BSA 及 T-2-formaldehyde-BSA 作為抗原免疫小鼠

本計畫利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價與專一性的測試。一號小鼠及二號小鼠一開始免疫抗原使用 EDC/NHS 法進行接合，且 T-2-SH 與 BSA 接合重量比為 1:8。為了增強小鼠的免疫反應，於第 9 週將抗原加入等體積的不完全佐劑並進行注射，第 10 週進行抗體專一性測試時，看到一號及二號小鼠抗體的競爭效果並沒有提升，仍無產生對 T-2 有效的抗體 (Figure. 9 & Figure. 10)，可推測接合抗原時並不是接的很好。因此本計畫更改抗原接合方式，於第 11 週後改以 T-2-Formaldehyde-BSA 且 T-2 與 BSA 接合重量比為 1:3 的抗原進行免疫，並且持續檢測此對小鼠抗體的專一性。本計畫發現一號小鼠於更換免疫抗原接合方法與比例後，於第 33 週依然沒有產生對 T-2 具有專一性之抗體，且此抗體於第 37 週呈現不規則分佈 (Figure. 11)。二號小鼠更換免疫抗原結合方法與比例後，於第 33 週及第 37 週進行抗體專一性檢測，發現抗體對 T-2 的專一性仍無改善，無產生對 T-2 具專一性的抗體 (Figure. 12)。本計畫將第 0 至第 36 週的小鼠血清進行抗體的效價測試，發現一號小鼠和二號小鼠於第 0 至第 10 週雖然沒有產生專一性的抗體，但抗體效價先迅速上升後趨近平穩，於第 10 週免疫新抗原後，抗體效價先稍微上升後逐漸下降，但又迅速上升於第 30 週到達高峰，之後又迅速下降 (Figure. 13)。因此本計畫

推測，用以免疫小鼠的兩種抗原並沒有接合的很成功，以致沒有專一性抗體的產生。

Indirect competitive ELISA of # 1 mouse serum

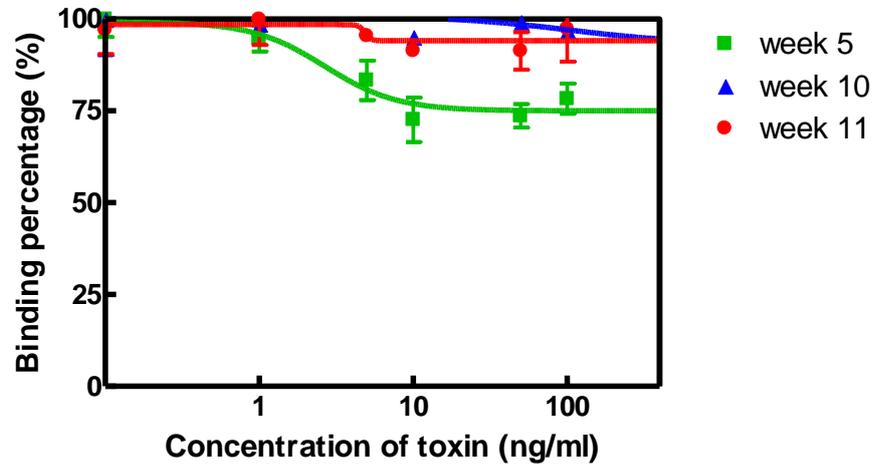


Figure. 9 一號小鼠第五、十、十一週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 T-2 進行專一性測試

由圖可知，一號小鼠並未產生專一性抗體，因此推測免疫 T-2-SH-BSA 抗原效果並不佳，故更改免以抗原接合方法與比例。

Indirect competitive ELISA of #2 mouse serum

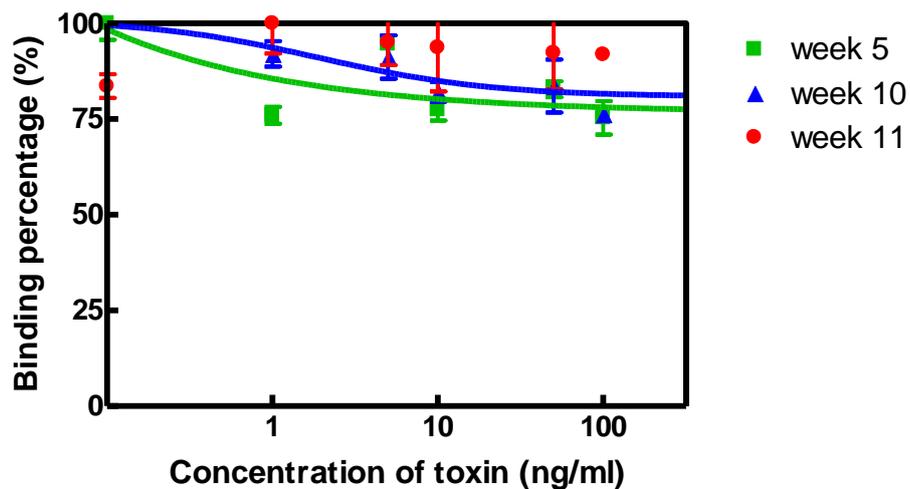


Figure. 10 二號小鼠第五、十、十一週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

對 T-2 進行專一性測試

由圖可知，二號小鼠如同一號小鼠並未產生專一性抗體，因此推測免疫 T-2-SH-BSA 抗原效果並不佳，故更改免疫抗原接合方法與比例。

Indirect competitive ELISA of #1 mouse serum

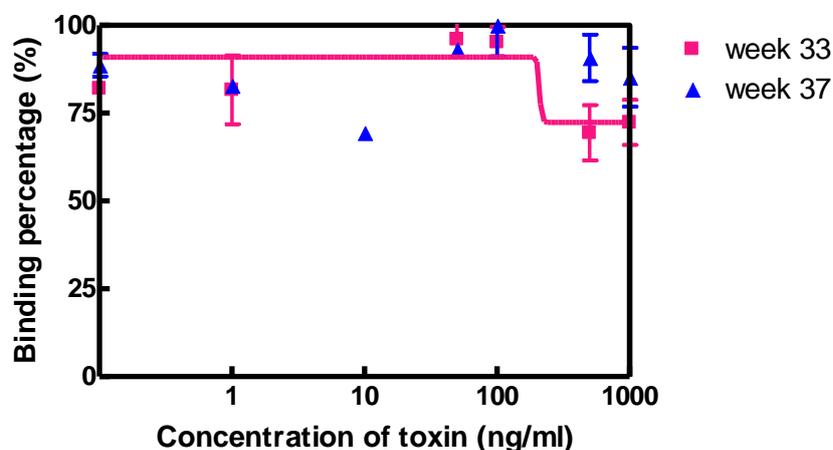


Figure. 11 一號小鼠第三十三、三十七週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 T-2 進行專一性測試

一號小鼠更改免疫抗原接合方法及比例後，於第 33 週及第 37 週皆沒有產生對 T-2 專一性的抗體。

Indirect competitive ELISA of #2 mouse serum

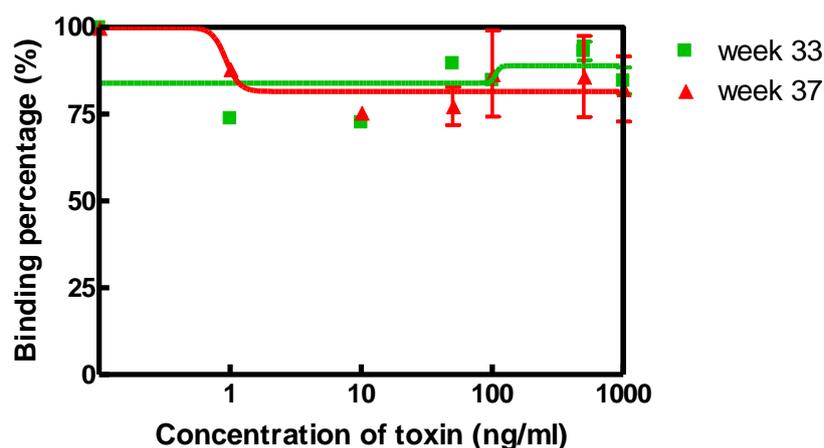


Figure. 12 二號小鼠第三十三、三十七週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 T-2 進行專一性測試

由圖可得知更改免疫抗原接合方法及比例後，二號小鼠於第 33 週及第 37 週皆

沒有產生對 T-2 專一性的抗體

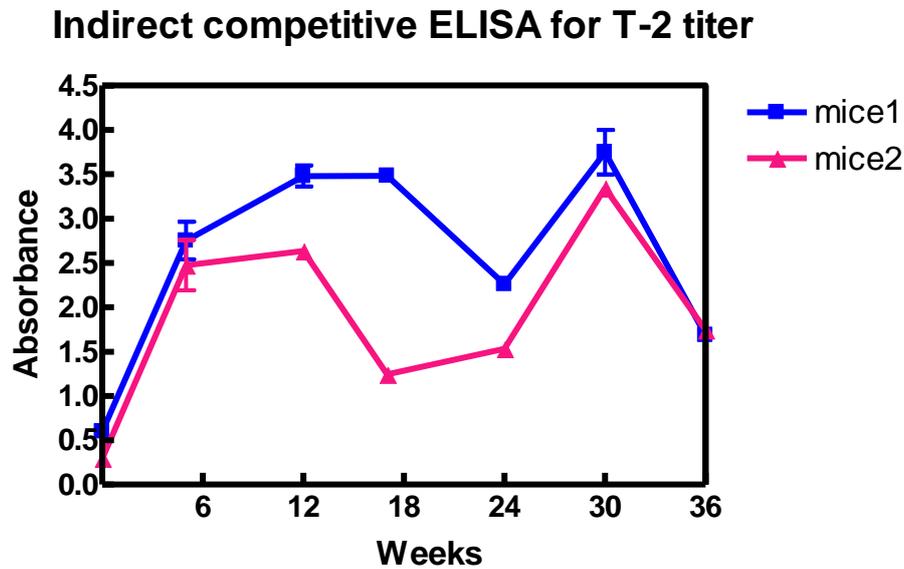


Figure. 13 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 T-2 進行抗體效價測試
由圖可知，一號及二號小鼠抗體效價變化相似，抗體效價先迅速上升後趨近平穩，於第 10 週免疫新抗原後，抗體效價先稍微上升後逐漸下降，但又迅速上升於第 30 週到達高峰，之後又迅速下降。

3.2.2 利用 T-2-formaldehyde-PTG 及 T-2-SH-PTG 作為抗原免疫小鼠

本計畫利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 來進行抗體效價與專一性的檢測。三號小鼠及四號小鼠一開始免疫抗原以 Formaldehyde 法進行接合，且 T-2 與 PTG 接合重量比為 1:4，於第 8 週以 ciELISA 檢測試抗體專一性，兩隻小鼠並沒有產生對 T-2 有效的抗體 (Figure. 14 & Figure. 15)，此一結果可以有兩種推論，一是小鼠週齡才第 10 週，之後會每週以抗原免疫老鼠並持續監測抗體，二是 T-2-Formaldehyde-PTG 並沒有接合成功，所以無法使小鼠產生對 T-2 具專一性的抗體。因此本計畫於第 10 週以後更改免疫抗原的接合方式，注射 T-2-SH-PTG 且接合重量比為 1:4 的抗原到小鼠體內，並持續檢測此對老鼠抗體的專一性。但三號及四號小鼠於第 15 週仍然無產生對 T-2 之專一性抗體

(Figure. 14 & Figure. 15)。本計畫發現，小鼠於更換免疫抗原接合方法後，抗體對 T-2 的專一性仍無改善。本計畫將第 0 至第 14 週的小鼠血清進行抗體的效價測試，發現三號小鼠於第 0 至第 10 週雖然沒有產生專一性的抗體，但抗體效價先稍微下降後逐漸穩定上升，於第 10 週免疫 T-2-SH-PTG 新抗原後，抗體效價上升幅度更大。四號小鼠於第 0 至第 10 週也沒有產生專一性的抗體且抗體效價呈現鋸齒狀，無法判斷抗體效價上升或下降趨勢，但於第 10 週免疫 T-2-SH-PTG 新抗原後，抗體效價迅速上升於第 12 週到達高峰 (Figure. 16)。有此結果可得知 T-2-SH-PTG 抗原免疫效果比 T-2-formaldehyde-PTG 好，未來會每週持續免疫小鼠，以確認此抗原是否能成功引發小鼠的免疫反應並產生抗體。

Indirect competitive ELISA of #3 mouse serum

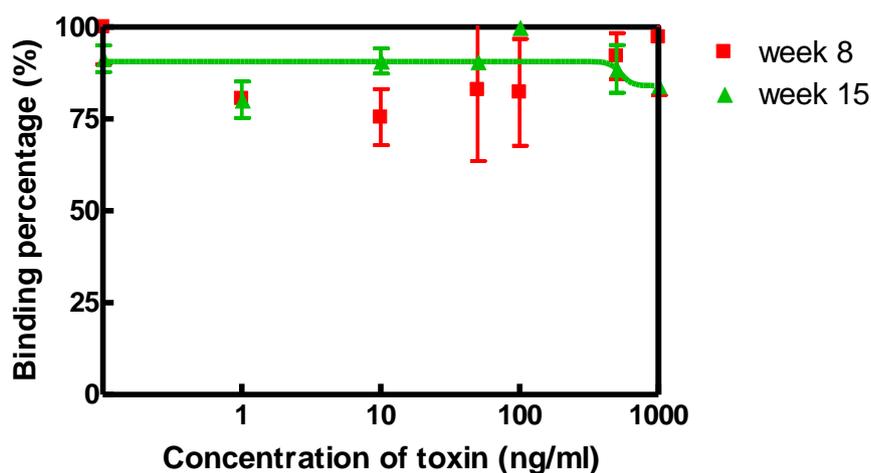


Figure. 14 三號小鼠第八、十五週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 T-2 進行專一性測試

由圖可知，三號小鼠雖然於第 10 週後免疫新抗原，於第 15 週仍然沒有產生對 T-2 專一性的抗體

Indirect competitive ELISA of #4 mouse serum

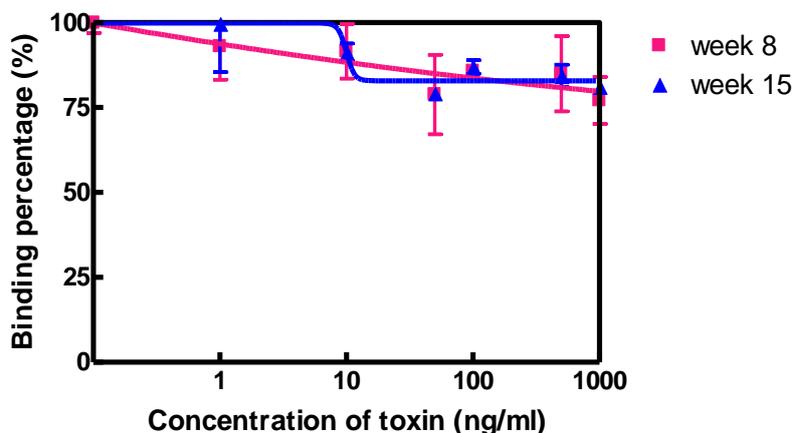


Figure. 15 四號小鼠第八、十五週抗體利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 T-2 進行專一性測試

由圖可知，四號小鼠雖然於第 10 週後免疫新抗原，於第 15 週仍然沒有產生對 T-2 專一性的抗體

Indirect competitive ELISA for T-2 titer

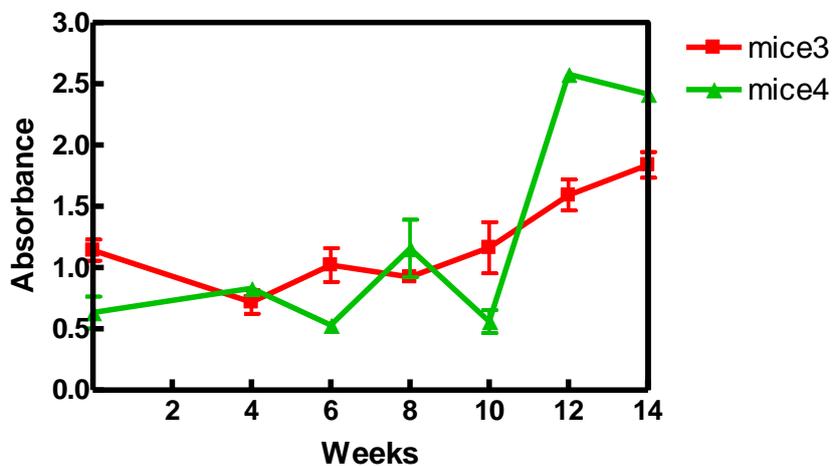


Figure. 16 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對 T-2 進行抗體效價測試

由圖可知，三號小鼠抗體效價先稍微下降後逐漸上升。四號小鼠於第 0 至第 10 週無法判斷抗體效價上升或下降趨勢，但於第 10 週免疫新抗原後，抗體效價迅速上升。

四、討論

小分子毒素免疫檢測系統的建立實屬不易，因為小分子毒素的分子量太小，雖具抗原性但無法單獨誘發免疫反應，使動物產生對其具有專一性的抗體，因此小分子毒素抗原的製備為此檢測系統能否成功建立的關鍵。然而小分子毒素抗原的製備有許多可改變的條件，以接合成不同的抗原。首先會先將小分子毒素與載體蛋白質進行接合，因此在研究之初必須嘗試多種載體蛋白質及多種接合方式，並且同時調整小分子毒素與載體蛋白質的接合比例，來達到成功抗原的製備。

本計畫嘗試了 EDC/NHS、Formaldehyde 兩種方法來進行抗原接合，並使用了 BSA、PTG 兩種不同載體蛋白質。ELISA 檢測所需的覆被蛋白與 HRP 使用了 EDC/NHS、Formaldehyde、CDI 三種活化方法來進行製備。從 T-2 的結構來觀察，可發現其具有一個羥基 (-OH)、五個甲基 (-CH₃) 與三個雙鍵氧 (=O)，本計畫起初先以 EDC/NHS 做為橋樑再與載體蛋白質接合，藉此期望增加抗原呈現的機率以產生專一性的抗體。從 Figure. 11 & Figure. 12 的實驗結果發現更換免疫抗原結合方法與比例後，一號小鼠及二號小鼠皆沒有產生對 T-2 具專一性的抗體，因此本計畫推測，用以免疫小鼠的兩種抗原並沒有接合的很成功，以致於沒有專一性抗體的產生。

三號及四號小鼠雖然都尚未產生專一性的抗體，但抗體效價皆有逐漸上升的趨勢。在未來的實驗中，除了持續免疫監測小鼠，還會嘗試其他方法接合抗原、覆被蛋白與 HRP，期望以新接合之抗原免疫小鼠可以產生高專一性及效價的抗體，並密集檢測三號及四號小鼠的抗體，期望三號及四號小鼠抗體的專一性能更高，以建立一套多株抗體酵素連結免疫吸附分析系統與快速層析免疫試紙，提供給社會大眾使用，避免人類、寵物或家禽動物因誤食 T-2 毒素而導致疾病的發生。

五、參考文獻

- Zhang, X., Wu, C., Wen, K., Jiang, H., Shen, J., Zhang, S., & Wang, Z. (2015). Comparison of Fluorescent Microspheres and Colloidal Gold as Labels in Lateral Flow Immunochromatographic Assays for the Detection of T-2 Toxin. *Molecules*, *21*(1).
- Yuan, G., Wang, Y., Yuan, X., Zhang, T., Zhao, J., Huang, L., & Peng, S. (2014). T-2 toxin induces developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *J Environ Sci (China)*, *26*(4), 917-925.
- Goossens, J., De Bock, L., Osselaere, A., Verbrughe, E., Devreese, M., Boussery, K., Van Bocxlaer, J., De Backer, P., & Croubels, S. (2013). The mycotoxin T-2 inhibits hepatic cytochrome P4503A activity in pigs. *Food Chem Toxicol*, *57*, 54-56.
- Dalcerro, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., & Rosa, C. A. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. *Food Addit Contam*, *19*(11), 1065-1072.
- Girish, C. K., & Smith, T. K. (2008). Impact of feed-borne mycotoxins on avian cell-mediated and humoral immune responses. *World Mycotoxin Journal*, *1*(2), 105-121.
- Agrawal, M., Bhaskar, A. S., & Lakshmana Rao, P. V. (2015). Involvement of mitogen-activated protein kinase pathway in T-2 toxin-induced cell cycle alteration and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Mol Neurobiol*, *51*(3), 1379-1394.
- Maragos, C. M., Kurtzman, C., Busman, M., Price, N., & McCormick, S. (2013). Development and evaluation of monoclonal antibodies for the glucoside of T-2 toxin (t2-glc). *Toxins (Basel)*, *5*(7), 1299-1313
- Li, Y., Luo, X., Yang, S., Cao, X., Wang, Z., Shi, W., & Zhang, S. (2014). High specific monoclonal antibody production and development of an ELISA method for monitoring T-2 toxin in rice. *J Agric Food Chem*, *62*(7), 1492-1497.