

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

N 玉米赤黴烯酮與柱孢藻毒素之單株抗體生產及奈米金快速  
免疫檢測試紙的開發應用

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：NSC 102-2313-B-040-004-  
執行期間：102年08月01日至103年07月31日  
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

計畫主持人：余豐益

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：朱光駿

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 103 年 11 月 03 日

中文摘要： 玉米赤黴烯酮(zearalenone, Zen)與柱孢藻毒素(cylindrospermopsin 主要由黴菌 Fusarium 屬與藻類 Cylindrospermopsis 屬等常產生的黴菌毒素與藻類毒素，此兩類毒素泛存於食品、作物與水產食品中，食用遭受污染的食品或穀物導致人類許多疾病及癌症的生成。我們將玉米赤黴烯酮接合牛血清蛋白(bovine serum albumin)抗原打入兔子體內取得玉米赤黴烯酮的多株抗體，利用此一抗體建立了敏感性高的直接競爭型酵素免疫分析法和以奈米金粒子為標記物的快速免疫層析試紙分析法。直接競爭型酵素免疫分析法中，抑制 50% 的玉米赤黴烯酮與抗體結合所需 okadaic acid 的濃度(IC<sub>50</sub>)為 0.1 ng/mL。利用這個抗體與奈米金粒子相結合，形成抗體奈米金探針開發出玉米赤黴烯酮的快速免疫層析試紙，利用此一試紙來檢測穀物食品中玉米赤黴烯酮的含量，此試紙最低限制為 5 ng/mL，可在 10 分鐘完成檢測結果，不需任何儀器可進行當場的軟海棉酸檢測。以競爭型酵素免疫分析法與免疫層析試紙分析 15 個穀物食品中軟海棉酸的含量，結果顯示 6 個樣品遭受到 24.8~638.1 ppb 不等的污染，而且兩種方法得到相當一致的結果。

中文關鍵詞： 玉米赤黴烯酮素，柱孢藻毒素，酵素免疫分析法，免疫層析試紙

英文摘要： Zearalenone (Zen) and cylindrospermopsin (Cyn) are toxins that are produced by fungi Fusarium and algal Cylindrospermopsis. They are commonly found in foods, cereal products, and seafoods, which cause toxic effects and cancer in human and animal. Polyclonal antibodies specific to zearalenone were generated from rabbit which immunized with Zen-CMO-BSA. By using these antibodies, this work presents a rapid and sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (cdELISA) and a gold nanoparticle immunochromatographic strip method for detecting Zen in cereal food samples. In the rapid cdELISA, Zen at a concentration of 0.1 ng/ml causes 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of binding Zen-horseradish peroxidase to the antibodies. Effective on-site detection capability of OA is also developed based on

a rapid and sensitive antibody-gold nanoparticle immunochromatographic strip method. This strip has a detection limit of 5.0 ng/ml for Zen in cereal samples. Additionally, the entire analysis is completed within 10 min. Closely examining 15 cereal samples by cdELISA reveals that 6 are contaminated with Zen from 24.8~638.1 ppb. Results of 6 contaminated samples further analyzed with immunochromatographic strip assay correlate well with those obtained from cdELISA. The proposed cdELISA and immunochromatographic strip methods are highly sensitive to the rapid screening of Zen in cereal samples.

英文關鍵詞： zearalenone, cylindrospermopsin, ELISA, immunochromatographic strip

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告  
期末報告

玉米赤黴烯酮與柱孢藻毒素之單株抗體生產及奈米金快速免疫檢測試紙的開發應用

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 102-2313-B-040-004

執行期間：102年8月1日至103年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學生物醫學科學系

計畫主持人：余豐益

共同主持人：

計畫參與人員：朱光駿，呂權蓁

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中華民國 103 年 10 月 31 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫期末報告

玉米赤黴烯酮與柱孢藻毒素之單株抗體生產及奈米金快速免疫檢測試紙的開發應用

計畫編號：NSC 102-2313-B-040-004

執行期限：102年8月1日至103年7月31日

主持人：余豐益 中山醫學大學生物醫學科學系

## 中文摘要：

玉米赤黴烯酮(zearalenone, Zen)與柱孢藻毒素(cylindrospermopsin 主要由黴菌*Fusarium*屬與藻類*Cylindrospermopsis*屬等常產生的黴菌毒素與藻類毒素，此兩類毒素泛存於食品、作物與水產食品中，食用遭受污染的食品或穀物導致人類許多疾病及癌症的生成。我們將玉米赤黴烯酮接合牛血清蛋白(bovine serum albumin)抗原打入兔子體內取得玉米赤黴烯酮的多株抗體，利用此一抗體建立了敏感性高的直接競爭型酵素免疫分析法和以奈米金粒子為標記物的快速免疫層析試紙分析法。直接競爭型酵素免疫分析法中，抑制50%的玉米赤黴烯酮與抗體結合所需 okadaic acid 的濃度(IC<sub>50</sub>)為0.1 ng/mL。利用這個抗體與奈米金粒子相結合，形成抗體奈米金探針開發出玉米赤黴烯酮的快速免疫層析試紙，利用此一試紙來檢測穀物食品中玉米赤黴烯酮的含量，此試紙最低限制為5 ng/mL，可在10分鐘完成檢測結果，不需任何儀器可進行當場的軟海棉酸檢測。以競爭型酵素免疫分析法與免疫層析試紙分析15個穀物食品中軟海棉酸的含量，結果顯示6個樣品遭受到24.8~638.1 ppb 不等的污染，而且兩種方法得到相當一致的結果。

## 英文摘要：

Zearalenone (Zen) and cylindrospermopsin (Cyn) are toxins that are produced by fungi *Fusarium* and algal *Cylindrospermopsis*. They are commonly found in foods, cereal products, and seafoods, which cause toxic effects and cancer in human and animal. Polyclonal antibodies specific to zearalenone were generated from rabbit immunized with Zen-CMO-BSA. By using these antibodies, this work presents a rapid and sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (cdELISA) and a gold nanoparticle immunochromatographic strip method for detecting Zen in cereal food samples. In the rapid cdELISA, Zen at a concentration of 0.1 ng/ml causes 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of binding Zen-horseradish peroxidase to the antibodies. Effective on-site detection capability of OA is also developed based on a rapid and sensitive antibody-gold nanoparticle immunochromatographic strip method. This strip has a detection limit of 5.0 ng/ml for Zen in cereal samples. Additionally, the entire analysis is completed within 10 min. Closely examining 15 cereal samples by cdELISA reveals that 6 are contaminated with Zen from 24.8~638.1 ppb. Results of 6 contaminated samples further analyzed with immunochromatographic strip assay correlate well with those obtained from cdELISA. The proposed cdELISA and immunochromatographic strip methods are highly sensitive to the rapid screening of Zen in cereal samples.

## 【一】前言與目的：

玉米赤黴烯酮(zearalenone)是黴菌毒素的一種，主要由常見的 *Fusarium* 屬黴菌所產生的二級代謝產物，最早於 1974 年在日本穀物中發現含有玉米赤黴烯酮 (Ishii et al., 1974)，其分子式為  $C_{18}H_{22}O_5$ ，分子量為 318，結構主要為五個環狀結構，對熱、酸性及鹼性的環境下穩定，會在低溫及氧氣充足的環境下產生，常常污染玉米、高粱、水稻等經濟作物。人類誤食被玉米赤黴烯酮污染的食物後，會造成的中毒現象包括腹痛、嘔吐、下痢與頭痛等症狀(Wild and Gong, 2010)。玉米赤黴烯酮已知具有基因毒性，會與 17-estradiol 受體結合，引起脂質過氧化使細胞死亡與抑制蛋白質和 DNA 的合成 (Kouadio et al., 2005)，此外玉米赤黴烯酮也可具有誘發腫瘤的威脅以及破壞免疫力相關的毒性。此一毒素對人類與動物均會產生危害，不僅對畜牧業造成危害及損失，更是食品安全上的隱憂。根據 FAO (Food and Agriculture Organization) 統計結果指出，世界上有約 25% 的農產品遭受黴菌毒素的污染，人類或動物食用遭受污染的食物或穀物，導致各類疾病包括癌症之發生，所以導致農業經濟上嚴重的損失。目前澳洲對於玉米赤黴烯酮在麥粉中設有 60 ppb 的含量限制，日本與中國大陸對於玉米赤黴烯酮在食品中分別設有 1 ppm 及 500 ppb 的含量限制 (regulatory level) (Zinedine et al., 2007)，台灣則設置建議含量限制低於 200 ppb。根據台灣亞洲穀物檢驗中心於 2007 至 2010 針對亞洲地區 1346 件穀物飼料樣品進行玉米赤黴烯酮之含量檢測，四年之平均檢出率為 36.3%，毒素含量之平均偵測值為 289.3 ppb，最大值則達到 25.0 ppm，由此可知飼料中遭受玉米赤黴烯酮的污染情形可謂相當嚴重(錢偉鈞等人, 2011)。

柱孢藻毒素(cylindrospermopsin)主要由藍綠藻(菌)類 *Cylindrospermopsis* 屬所產生的毒素，分子式為  $C_{15}H_{21}N_5O_7S$ ，分子量為 415，屬於水溶性毒素，對於極端高溫與 pH 值相當穩定(Chiswell et al., 1999)。此毒素結構於 1992 年才被解讀出來(Ohtani et al., 1992)，常常被發現於湖水或飲用水中或藻類健康食品的藻類毒素，柱孢藻毒素在動物實驗已經證實具有致癌性而與基因毒性 (Falconer and Humpage, 2006)。研究指出柱孢藻毒主要對肝臟的毒性是破壞肝細胞代謝活性與蛋白質合成進而造成肝臟堆積三酸甘油脂，降低脂蛋白合成與排出。柱孢藻毒的毒性是遲緩及持續，不像微囊藻毒注射高劑量時能在 1~2 小時內殺死試驗老鼠，相對地，柱孢藻毒常需要 24~120 小時才能將老鼠殺死。目前紐西蘭針對柱孢藻毒素的限制含量為 1 ppb，巴西對柱孢藻毒素的限制含量為 15 ppb，因為柱孢藻毒素是一新發現的毒素，各國仍在對其限制含量討論中 (Van Apeldoorn et al., 2007)。因近來環境污染嚴重，藻華現象日趨嚴重，柱孢藻毒素污染水源從澳洲、美國、日本到歐洲包括台灣台灣許多水庫都已發現它的蹤跡，尤其以金門的水庫污染最嚴重(行政院環保署, 2007)。產毒藻株種類也越來越廣泛，為了不讓人類因誤食柱孢藻毒素而影響健康，發展一套敏感度高、專一性佳且快速便利的方法來檢測柱孢藻毒素是必要的。

## (二)、材料與方法

### 2.1 Materials.

**Materials** Zearalenone (Zen) (Fig. 1) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) (San Diego, CA). Bovine serum albumin (BSA),  $\gamma$ -globulin, gelatin, ovalbumin (OVA), ammonium bicarbonate, Tween 20, dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]- carbodimide (EDC), and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Goat anti-mouse-peroxidase conjugate and keyhole limpet hemocyanin (KLH) were obtained from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Horseradish peroxidase (HRP) was obtained from Roche (Mannheim, Germany). HRP substrate solution 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine

(TMB) was obtained from Neogen Corp (Lexington, KY). Ammonium sulfate, absolute ethanol and HPLC grade acetonitrile and methanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Microtiter plates and strips (low and high protein binding) were obtained from Nunc (Roskilde, Demark). ELx 50 ELISA washer was purchased from Bio-Tek instruments (Winooski, VT). Vmax automatic ELISA reader was purchased from Molecular Devices Co. (Menlo Park, CA). Freund's incomplete adjuvant, Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal calf serum, and penicillin-streptomycin were obtained from GIBCO Laboratories (Grand Island, NY). Gold nanoparticle (20 nm and 40 nm in diameter) was prepared in our lab. A Easypack Developer's Kit consisted of three pads (sample, conjugate release and absorbent pads), cover tape and one nitrocellulose membrane plate with membrane pore size 5  $\mu$ M and 15  $\mu$ M. The Double Axes Programmable Control Printer (model P-602) for drawing the test line and control line of membrane were purchased from Troy Technology (Taichung, Taiwan). The 0.45  $\mu$ m syringe filter was obtained from Gelman Science (Ann Arbor, MI). All other chemicals and organic solvents used were of reagent grade or better.

### 2.2.1、ZEA 衍生 CMO

稱取 6 mg 的 ZEA 溶於 3 ml reflux solution ( reflux solution = pyridine : methanol : d2H2O = 1 : 4 : 1 ) 及 12 mg 的 CMO 溶於 3 ml reflux solution，混合均勻，置於回流裝置中，加熱至 60°C，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 2 ml pH 8 的 d2H2O 及 6 ml benzene 回溶。

### 2.2.2、用 EDC/NHS 的方法將 ZEA-CMO 接上牛血清白蛋白(Bovine serum albumin ; BSA)

取 ZEA-CMO (0.25 mg – 0.5 mg)，溶於 0.07 ml DMF 中，緩慢加入 EDC ( 0.8 mg 先以 0.005 ml d2H2O 溶解，再加入 0.015 ml DMF，混合均勻)與 NHS (4 mg 溶於 0.02 ml DMF )，置於室溫下反應 2 小時，再緩慢加入 0.5 mg BSA[溶於 0.4 ml 0.1 M carbonate buffer ( 0.1 M ; pH 9.6) ]，於室溫下反應 2 小時後，置於 4°C 冰箱反應 16-18 小時，用以 2 公升 0.01 M PBS 透析三次。

### 2.2.3、使兔子產生免疫反應

為了製備對 ZEA 具有專一性的抗體，我們將 1 ml 的 ZEA-CMO-BSA 溶於 0.01 M PBS 中) 與 1 ml 的完全佐劑混合均勻，分散注射於紐西蘭大白兔之背部表皮 (約分成 20~30 點注射)。注射後四週，將 1 ml 的 ZEA-CMO-BSA ( 0.5 mg 溶於 0.01 M PBS 中) 與 1 ml 的不完全佐劑混合均勻，以皮下注射於紐西蘭大白兔的四肢，加強免疫反應。於第五週起在兔子的耳朵動脈採血，純化後以 cdELISA 及 ciELISA 測試是否產生對 ZEA 具有專一性之抗體。

### 2.2.4、多株抗體的純化

第五週起在兔子的耳朵動脈採血，待其凝固後插入竹籤，於 4°C 冰箱中靜置至隔天，血球吸附於竹籤上後將其血塊移除，並以 8,000 rpm 離心 20 分鐘後取其上清液 (血清)，將血清中加入同體積 100% Ammonium sulfate，混合均勻後靜置 30 分鐘，再以 8,000 rpm 離心 20 分鐘後將上清液丟棄，沉澱物以血清一半體積的 d2H2O 回溶，回溶後加入與 d2H2O 同體積的 70% Ammoniumsulfate，混合均勻後靜置 30 分鐘，再以 8,000 rpm 離心 20 分鐘後將上清液丟棄，最後以血清一半體積的 d2H2O 回溶，以 0.01 M PBS 透析三次，取出後用 0.01 M PBS 補成與血清相同體積，儲存於 -20°C 冰箱備用。

## 2.3、直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 [Competitive direct enzyme-linked

## **immunosorbent assay (cdELISA)]**

### **2.3.1、用 EDC/NHS 的方法將 ZEA-CMO 接上辣根過氧化酶 (Horseradish peroxidase, HRP)**

取 ZEA-CMO (0.25 mg – 0.5 mg), 溶於 0.07 ml DMF 中, 緩慢加入 EDC (0.8 mg in 0.005 ml d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 溶解, 再加入 0.015 ml DMF) 與 NHS (0.5 mg in 0.015 ml DMF), 置於室溫下反應 2 小時, 再緩慢加入 2 mg HRP (in 0.4 ml 0.1 M carbonate buffer; pH 9.6), 於室溫下反應 2 小時後, 置於 4°C 冰箱反應 16-18 小時, 用以 2 公升 0.01M PBS 透析三次。

**2.3.2、** 在 96 孔盤中, 每個微孔加入 0.1 ml 的 ZEA 抗體 (編號 51 號兔子; 以 71 週 Ab 用 0.01 M PBS 稀釋 1,000 倍), 置於 37°C 反應 1 小時, 反應完後以 washing buffer (0.05% Tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗盤子三次。加入 0.17 ml blocking buffer (0.1% BSA in 0.01 M PBS), 置於 37°C 反應 30 分鐘, 反應完後以 washing buffer 清洗盤子三次。加入 0.05 ml ZEA 標準品 (0.01~10 ng/ml) 或樣品, 同時再加入 0.05 ml ZEA-CMO-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋 5,000 倍), 置於 37°C 反應 1 小時, 反應完後以 washing buffer 清洗盤子三次。最後加入 0.1 ml TMB substrate, 置於暗處反應 15 分鐘, 再加入 0.1 ml HCl 終止反應, 並以 ELISA reader 測量其在 450 nm 的吸光值。

## **2.4 非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 [Competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ciELISA)]**

### **2.4.1、用 EDC/NHS 的方法將 ZEA-CMO 接上 OVA**

取 ZEA-CMO (0.25 mg – 0.5 mg), 溶於 0.07 ml DMF 中, 緩慢加入 DCC (0.8 mg in 0.02 ml DMF) 與 NHS (0.5 mg in 0.02 ml DMF), 置於室溫下反應 2 小時, 再緩慢加入 4 mg OVA (in 0.4 ml 0.1 M carbonate buffer; pH 9.6), 於室溫下反應 2 小時後, 置於 4°C 冰箱反應 16-18 小時, 用以 2 公升 0.01 M PBS 透析三次。

**2、** 在 96 孔盤中, 每個微孔加入 0.1 ml 的 ZEA-CMO-OVA (以 0.01 M PBS 稀釋 4,000 倍), 置於 37°C 反應 1 小時, 反應完後以 washing buffer (0.05% Tween 20 in 0.01 M PBS) 清洗盤子三次。加入 0.17 ml blocking buffer (0.1% gelatin in 0.01 M PBS), 置於 37°C 反應 30 分鐘, 反應完後以 washing buffer 清洗盤子三次。加入 0.05 ml ZEA 標準品 (0.01~10 ng/ml) 或樣品, 同時再加入 ZEA 抗體 (編號 51 號兔子; 以 71 週 Ab 用 0.01 M PBS 稀釋 10,000 倍), 置於 37°C 反應 1 小時, 反應完後以 washing buffer 清洗盤子三次。接著加入 0.1 ml 的二級抗體 (Goat anti-rabbit-IgG-HRP; 以 0.01 M PBS 稀釋 20,000 倍), 置於 37°C 反應 1 小時, 反應完後以 washing buffer 清洗盤子六次。最後加入 0.1 ml TMB substrate, 置於暗處反應 15 分鐘, 再加入 0.1 ml HCl 終止反應, 並以 ELISA reader 測量其在 450 nm 的吸光值。

## **2.5、免疫層析試紙分析法 (immunochromatographic strip)**

### **2.5.1、製備奈米金粒子**

取 10 ml 1 mM 的 H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 水溶液, 攪拌並煮沸, 煮沸後立刻加入 1 ml 1% trisodium citrate dehydrate (sodium citrate tribasic dehydrate), 使其反應至冷卻, 冷卻後稀釋 4 倍, 儲存於 4°C 冰箱備用。

### **2.5.2、製備奈米金粒子探針 (Preparation of Gold Nanoparticle Probe)**

取 3 µg ZEA 抗體加入 1 ml Boric acid-Borax buffer (2 mM; PH = 9) 中, 緩慢加入 2 ml 奈米金粒子中, 置於室溫混合反應 1 小時。接著加入 0.35 ml 10% (w/v) BSA (須先以 0.45 µm 的濾膜過濾) blocking, 於室溫反應 30 分鐘。以 13,000 rpm 離心 30 分鐘, 丟棄上清, 將抗體-奈米金沉澱物回溶



於 0.18 ml buffer A (20 mM ; pH = 8 ; 含 1 %BSA 和 0.1 % sodium azide ) , 儲存於 4°C 冰箱備用。

### 2.5.3、制備 ZEA 免疫層析試紙

取 10  $\mu$ l /strip ZEA 抗體-奈米金粒子平均吸附於conjugate release pad 上 , 置於室溫使其乾燥。將 NC membrane (membrane 孔徑為 10  $\mu$ m ; 黏附於 strip 塑膠片)上 control line 與 test line 部分 , 分別以 Easy Printer 使其平均吸附 0.75  $\mu$ l /strip goat anti-rabbit-IgG-Fc antibody (0.002 mg/ml) 與 1.5  $\mu$ l /strip 之ZEA-OVA (1:30), 置於室溫乾燥。進行試紙組裝時, 先將 conjugate release pad 重複疊 2 mm 於 NC membrane 上 , 再將 sample pad 重複疊 6 mm 於conjugate release pad 上 , 最後利用 cover pad 將其固定 , 試紙另一端則黏附著 absorbent pad 以幫助溶液吸收。置備完成後置於 4°C 冰箱備用。

## 2.6、食品樣品中 ZEA 的分析

### 2.6.1、萃取食品樣品中的 ZEA

收集市面上販售的 15 種穀物樣品做 ZEA 含量的檢測。先將樣品以果汁機打碎, 將打碎樣品皆秤 10 g, 置於 50 ml 離心管中。將處理過樣品中加入 25 ml 萃取液 (Methanol : d2H2O ; 70 : 30 ; v/v) , 置於迴轉式振盪器反應 10 分鐘, 以 3,000 rpm 離心 10 分鐘, 取上清液, 此步驟重複兩次。將取出之上清液以減壓濃縮去除甲醇, 以 d2H2O 回溶至原體積, 置備完樣品萃取液後置於 4°C 冰箱備用。

### 2.6.2、用 cdELISA 檢測樣品中 ZEA 的殘留量

將樣品萃取液稀釋成不同比例 (1:5 ; 1 : 10) 以 cdELISA 測試, 將測出之結果以 450 nm 吸光值內插入標準品, 建立標準曲線, 以求得樣品萃取液中 ZEA 濃度。

### 2.6.3、用免疫層析試紙分析樣品中 ZEA 的殘留量

取 0.2 ml 之樣品萃取液及不同濃度 0.2 ml 的 ZEA 標準品 (0 ~ 100 ng/ml) 加入 96 孔盤中, 將組裝好的免疫層析試紙垂直放入, 樣品及標準品會因毛細現象將溶液往 NC membrane 移動, 10 到 15 分鐘後, 可以目視觀察結果, 將樣品與標準品對照, 即可測得 ZEA 之濃度。

## 三. 結果(Results)

### 3.1 以 ciELISA 及 cdELISA 檢測 ZEA 抗體的專一性

免疫兔子後第五週起, 採集兔子血並純化抗體, 我們利用 51 號兔子, 71 週抗體, 以 ciELISA 的方式檢測 ZEA 多株抗體之專一性, 抑制 50 % 抗體結合至 ZEA-CMO-OVA 所需 ZEA 的濃度 (IC<sub>50</sub>) 為 0.95 ng/ml (圖二 A), 以 cdELISA 的方式檢測 ZEA 多株抗體之專一性。實驗結果顯示, 抑制 50 % 抗體結合至 ZEA-HRP 所需 ZEA 的濃度 (IC<sub>50</sub>) 為 0.1 ng/ml (圖二B)。ciELISA 及 cdELISA 偵測限制量則分別為 0.014 與 0.068 ng/ml (IC<sub>10</sub>)。

### 3.2 以 cdELISA 檢測食品樣品中的 ZEA

ZEA 具有性荷爾蒙的功能, 是一種非類固醇雌激素的黴菌毒素, 穀物的保存常受到溫度及濕度的影響, 而產生黴菌毒素。我們從市場上購買 15 件穀物樣品, 其中有 4 件玉米樣品, 5 件麥片樣品, 2 件紅豆樣品, 綠豆、黃豆、薏仁、十穀粉各一件, 將樣品萃取完成後, 以建立 ZEA 多株抗體的 cdELISA 做檢測, 樣品中 3, 5, 7, 9, 10 與 12 號樣品中檢測出含有 ZEA ; 而 3, 5, 7, 10 與 12 號樣品中 ZEA 含量大於 200 ng/ml, 9 號樣品中 ZEA 含量為 24.8 ng/ml, 其於樣品中並無檢測出含有 ZEA, 結果見表一。

### 3.3、ZEA 專一性快速免疫層析試紙的製作與定性

為了可以更快且以簡單的方式測出穀物中的 ZEA，我們製備快速免疫層析試紙，主要原理為 ZEA-OVA 會跟樣品中 ZEA 競爭抗體-奈米金粒子結合物，試紙組裝方法見圖十二。當免疫層析試紙組裝完成後，將 sample pad 放入樣品萃取液中，萃取液會藉由毛細現象而往上擴散至 conjugate pad，而 conjugate pad 上的抗體-奈米金粒子會隨著樣品萃取液擴散至 NC membrane，與測試區(test zone) 上的 ZEA-OVA 和對照區 (control zone) 上的 goat anti-rabbit -IgG-Fc antibody 接觸，而試紙最上端的 absorbent pad 功能為加強毛細作用。當樣品萃取液中沒有 ZEA 時，抗體-奈米金粒子結合物會結合到 ZEA-OVA 上，在測試區顯示出紅線，為陰性反應 (negative results)。另外當樣品萃取液中含有 ZEA 時，ZEA 則會與抗體-奈米金粒子上的抗原區結合，抗體-奈米金粒子則無法與 ZEA-OVA 結合，測試區則不會產生紅線，為陽性反

應 (positive results)。對照區則是為了確認試紙是否可正常使用，所以無論是陽性反應或是陰性反應，在正確方式操作下，對照區上都顯示紅線。簡言之，樣品萃取液中不含 ZEA 時，NC membrane 上會呈現兩條紅線；在樣品萃取液中含有定量的 ZEA 時，NC membrane 上則會呈現一條紅線。四、ZEA 免疫層析試紙的偵測限度將製備完成的 ZEA 免疫層析試紙放入不同濃度的 ZEA 標準品容易 (0 ~100 ng/ml)，由圖十三結果顯示，我們建立 ZEA 的免疫層析試紙可偵測 ZEA 之最低濃度為 5 ng/ml。當 ZEA 的濃度高於 5 ng/ml 時，ZEA 可完全佔據抗體上的抗原結合位，是抗體-奈米金粒子探針無法與測試區上的 ZEA-OVA 結合，因此在 NC membrane 上只會觀察到一條紅線。

### 3.4、用免疫試紙檢測食品樣品中的 ZEA

將 15 件穀物樣品經由甲醇萃取後，最後溶於 d2H<sub>2</sub>O，取出 200  $\mu$ l 的樣品萃取液以 ZEA 免疫層析試紙檢測，結果見圖十四。根據免疫層析試紙檢測結果顯示，穀物樣品 3 號、5 號、7 號、9 號、10 號、12 號的樣品萃取液含有超過 1 ng/ml 的 ZEA，判讀結果為陽性 (positive result)，只顯示出一條線於是紙上，以正號表示 (+)；其於穀物樣品中 ZEA 的含量低於 1 ng/ml，試紙分析結果為陰性反應，試紙上顯示出兩條紅線，以負號 (-) 表示。

## 四、計畫成果自評

本研究主要目的是將建立玉米赤黴烯酮與柱孢藻毒素的單株抗體，原來三年計畫僅核一年執行，目前有關玉米赤黴烯酮的多株抗體已經產生，並且利用此一抗體建立了敏感性高的直接競爭型酵素免疫分析法及以奈米金粒子為標記物的快速免疫層析試紙分析法，此一研究成果進行文稿之撰寫。此外對於柱孢藻毒素研究方面，進行的並不算順利，主要是毒素來源太昂貴取得困難。玉米赤黴烯酮 Balc/c 單株抗體，老鼠血液已獲得到高專一性抗體以進行融合瘤篩選。本計畫原計畫為三年期計畫被刪減成一年期計畫，因此許多計畫無法順利執行如電化學免疫分析法無法順利執行。

## 五、參考文獻

錢偉鈞，劉孟哲，陳齊聖 2011. 穀物中黴菌毒素玉米赤黴烯酮之感染現況分析及吸附技術之應用. 化工技術 19:114-126.

Barna-Vetro, I.; Gyongyosi, A.; Solti, L. 1994. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl Environ Microbiol* 60:729-31.

Ishii, K., Sawano, M., Ueno, Y., and Tsunoda, H. (1974). Distribution of zearalenone-producing *Fusarium* species in Japan. *Appl Microbiol* 27:625-628.

Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D., and Creppy, E.E. 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in

- human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* 213, 56-65.
- Liu, B. H., Tsao, Z. J., Wang, J. J., Yu, F. Y. 2008. Development of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. *Anal. Chem.* 80: 7029-7035.
- Liu, M. T.; Ram, B. P.; Hart, L. P.; Pestka, J. J. 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microbiol* 50:332-6.
- Ohtani, I., Moore, R.E. and Runnegar, M.T.C., 1992. Cyindrospermopsin: A potential hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 7941-7942.
- Shim, W. B.; Kim, K. Y.; Chung, D. H. 2009. Development and validation of a gold nanoparticle immunochromatographic assay (ICG) for the detection of zearalenone. *J Agric Food Chem* 57:4035-4041.
- Tsao, Z. J., Liao Y. C. Liu, B. H., Su, C. C., Yu, F. Y. 2007. Development of a monoclonal antibody against domoic acid and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunostrip. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4921-4927.
- Tudorache, M., Bala, C. 2007. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal. Bioanalytical. Chem.* 388:565-578.
- Visconti, A., and Pascale, M. 1998. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 815, 133-140.
- Wild, C. P., Gong, Y. Y., 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis.* 31:71-82.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C, Manes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 45:1-18.

Table 1. ELISA and Immunochroatographic Strip Analysis of Zen Corn Samples

No.	ELISA <sup>a</sup>		Immunochromatographic strip <sup>a</sup>
	(ng/mL ± SD)	(ng/g± SD) <sup>b</sup>	
1.	ND	ND	—
2.	ND	ND	—
3.	211.0	211.0	+
4	ND	ND	—
5	482.3	482.3	+
6	ND	ND	—
7.	441.3	441.3	+
8.	ND	ND	—
9.	24.8	24.8	+
10.	638.1	638.1	+
11	ND	ND	—
12	225.3	225.3	+
13.	ND	ND	—
14 .	ND	ND	—
15.	ND	ND	—

<sup>a</sup> Each sample was extracted twice and each extract was analyzed in triplicate.

<sup>b</sup> One mL extract solution contains 1 g of corn samples.

<sup>c</sup> ND, not detectable

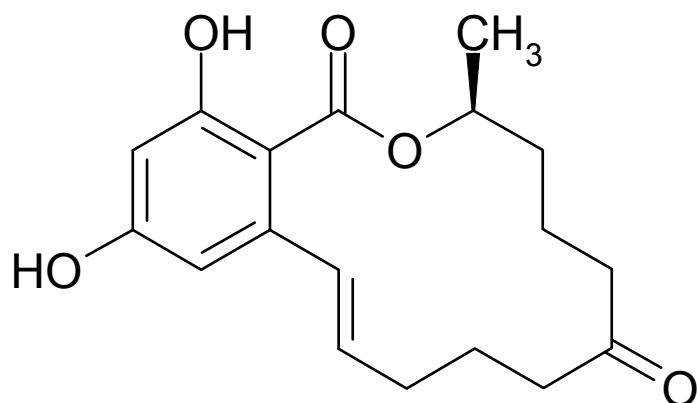
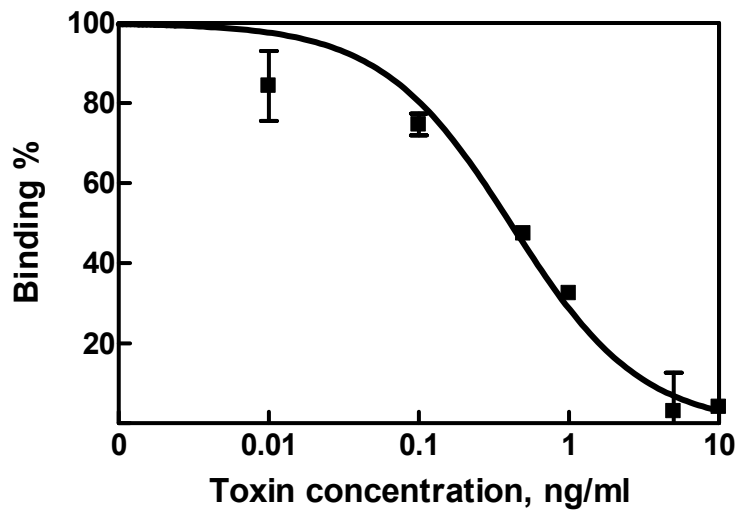
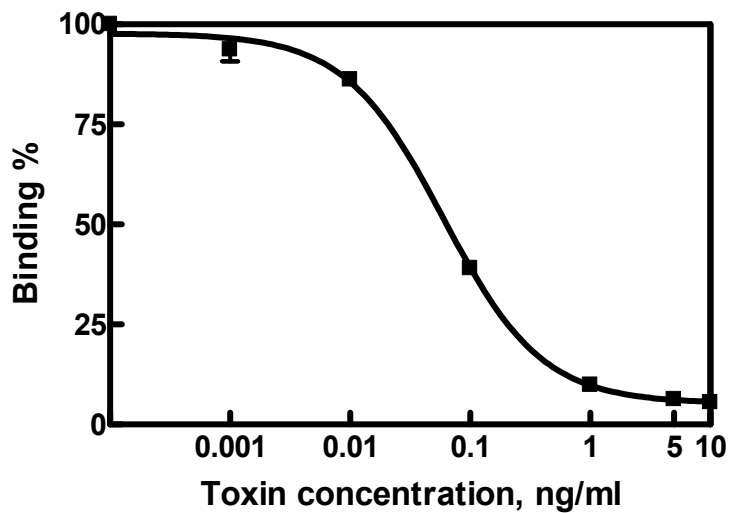


Figure 1. Structures of Zearalenone

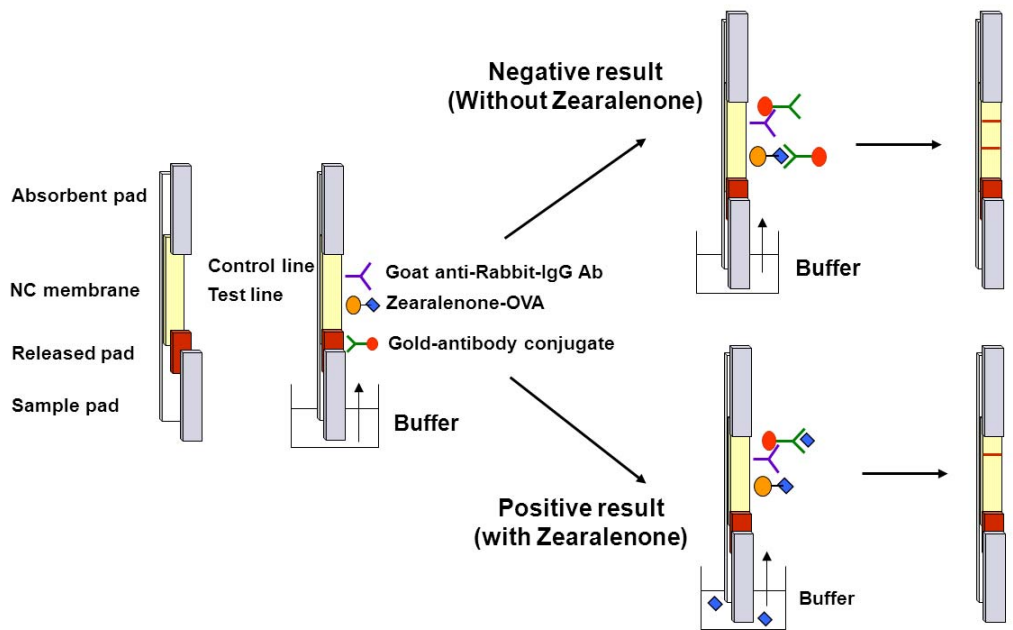
(A)



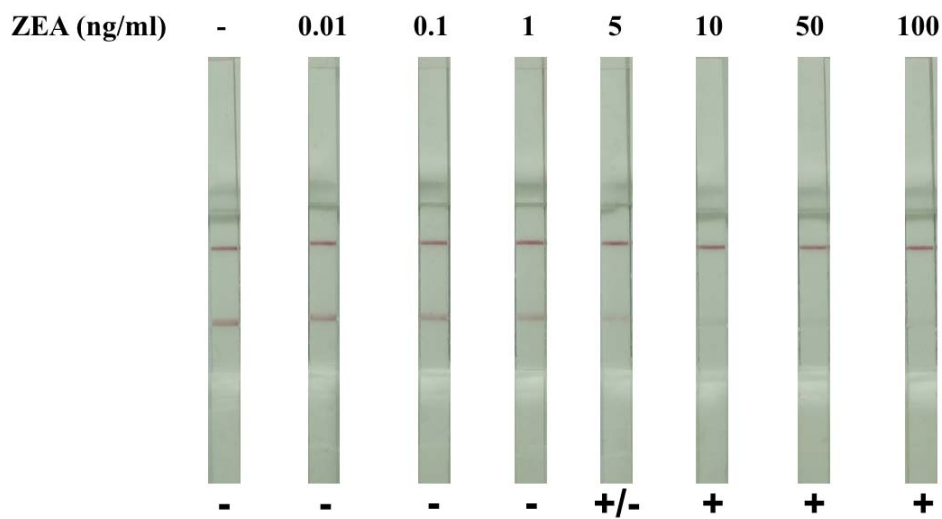
(B)



**Figure 2. A.** The anti-zearalenone antibodies with zearalenone (■) in a cdELISA. **B.** The anti-zearalenone antibodies with zearalenone (■) as determined by a ciELISA. All data were obtained based on the average of three sets of experiments. The absorbance of the control, A0, with no toxin present, was 1.8.



**Figure 3.** Schematic illustration of immunochromatographic strip. C, control zone (Goat anti-rabbit; T, test zone (zearalenone-OVA)).



**Figure 4.** Detection limit of zearalenone with immunochromatographic strip. A series of dilution (0-100 ng /mL) of certificated standard zearalenone was dissolved in PBS. A concentration higher than 5 ng/mL of zearalenone was found to cause a disappearance of a red line at the test zone.



# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2014/11/03

科技部補助計畫	計畫名稱: 玉米赤黴烯酮與柱孢藻毒素之單株抗體生產及奈米金快速免疫檢測試紙的開發應用
	計畫主持人: 余豐益
	計畫編號: 102-2313-B-040-004- 學門領域: 食品及農化
無研發成果推廣資料	

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：余豐益		計畫編號：102-2313-B-040-004-				計畫名稱：N 玉米赤黴烯酮與柱孢藻毒素之單株抗體生產及奈米金快速免疫檢測試紙的開發應用	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p style="text-align: center;">無</p>
---	--------------------------------------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

生產開發小分子毒素抗體建立酵素免疫分析法（ELISA）與快速免疫層析試紙來分析樣品中此兩類毒素，由於抗體自製使得品質穩定並且規格一致化，並可降低成本，有利於長期實驗以及產品化的進行。