

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 發展分析磁泳之免疫分析應用 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 94-2113-M-040-001-  
執行期間：94年08月01日至95年11月30日  
執行單位：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：蔡惠燕  
共同主持人：傅傳博  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：蘇育民  
大學生-兼任助理：蘇丁香

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

中華民國 95 年 12 月 29 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

發展分析磁泳之免疫分析應用

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2113-M-040-001

執行期間： 94 年 08 月 01 日至 95 年 11 月 30 日

計畫主持人：蔡惠燕

共同主持人：傅傳博

計畫參與人員：蘇育民、蘇丁香

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、

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

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 95 年 12 月 30 日

## 發展分析磁泳之免疫分析應用中文摘要

關鍵詞：分析磁泳、免疫分析

磁性分離技術使用功能性之磁性顆粒，是靈敏、高選擇性的方法，可快速且容易的捕獲特定的蛋白質、基因和其它生物物質並進行相關的分析。此技術相對於其他分析方法而言，對被分析物質(analytes)產生較少機械壓力(mechanical stress)且較簡便、便宜的，而且可較容易自動化和小型化。

本計畫建立以永久磁鐵為磁場源的磁性分離系統為基礎，結合免疫分析及分析磁泳來進一步探討它在生化相關分析上的應用，如 immunomagnetic assays，以建立簡單、快速、高選擇性的磁性分離技術與應用。

本年度探討以抗原抗體及其他化學鍵結反應相連結之磁性顆粒與其基質(substrate)之親合力(affinity) ( $K_{affinity}$ )關係，建立以抗原抗體為選擇基礎的高選擇性磁性顆粒及相關的分離與分析條件最適化之參數。

## Development of immunoassay applications of analytical magnetapheresis

Keywords : immunomagnetic assays, analytical magnetapheresis

The magnetic separation, using functional magnetic particles, is a fast and selective method to capture specific proteins, genetic material and other biomolecules for further analysis. This technique is simpler, economic, and less mechanical stress for analytes versus other analysis methods. This technique is also easy to automation and miniaturization. The purpose of this proposal is to investigate the immunoreactions and biochemical applications of analytical magnetapheresis. Functional magnetic particles and analytical magnetapheresis would be studied for various biochemical and related applications.

We investigated the affinity reaction of the antigen-antibody and magnetically chemical-derivatized reaction to establish the optimal parameters for high selective analysis. The optimized conditions will provide guidelines for the biomedical applications of analytical magnetapheresis in the future.

## 前言：

目前分離技術中利用物理性質為分離基礎的技術大都是以物質的大小、密度、電荷、擴散係數等為主，對於日益複雜的樣品單由以上一種物理性質來做分離往往未能達到有效的分離的效果，另外發展及使用其他具選擇性的物理性質來達到有效的分離在生化樣品之應用上是非常的重要且必需的。磁場具有高的選擇性且使用簡單，應用於水溶液中的樣品時，較使用離心場在儀器上是更較簡單且快速，若與電場比較，因其不受電解產物的干擾，所以較簡單方便。若使用永久磁鐵來組合磁場在，在儀器設備上更是非常的簡便與經濟。由於它的速度和選擇性的特點，磁性分離技術已陸續被使用在生物技術相關的應用。分析磁泳(analytical magnetapheresis)應用於有磁性感受性物質的分析則是相對較新的技術。

傳統上磁場是應用於採礦業上將磁化率高的物質分離出來<sup>[1-3]</sup>，近來在國際上有將磁場應用於顆粒<sup>[3-6]</sup>及血球<sup>[7-11]</sup>等的分離，技術上主要是利用磁場的高選擇性及簡單性，但這些應用大都使用電磁鐵以產生高的磁場強度來完成，但有些未能有效的控制流速或未能使用流洗(elution)的方式完成，所以成本高且不方便。發展以永久磁鐵組合磁場來做分離技術的基礎是非常的值得且有經濟價值，它的應用很多，包括顆粒方面、環境方面、生物(或微生物)方面等。

## 研究目的：

本研究以永久磁鐵為基礎磁場的磁性分離系統為基礎，結合免疫分析及分析磁泳陸續地進一步來探討它在生化相關分析上的應用，如 immunomagnetic assays，以更進一步建立簡單、快速、高選擇性的磁性分離技術與應用。

## 文獻探討：

磁性分離技術使用功能性之磁性顆粒，是靈敏可靠的方法，可快速且容易的捕獲特定的蛋白質、基因和其它生物物質。此技術相對於其他分析方法而言，對分析物質(analytes)產生較少機械壓力(mechanical stress)且較簡便、便宜的，而且可自動化和小型化。

磁性流體或 ferrofluids 主要包括微米或奈米大小的氧化鐵顆粒( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  或  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) 分散在載體液體。近年來，根據使用磁性固態支持(magnetisable solid phase supports, MSPS) 發現了許多在生物領域應用即診斷、藥物標的、分子生物學、細胞分離和純化、免疫分析等<sup>[12-14]</sup>。當前被使用的許多磁性顆粒是超順磁性的(superparamagnetic)，即這些顆粒在一個外加磁場下可容易地被磁化，當磁場被去除時立刻再分散。商業化的磁性顆粒一般分類為赤裸顆粒(unmodified magnetic particles)、化學衍生化的顆粒(chemically derivatized)、以及一般特異性配位基(general specificity ligands)，如 streptavidin, 蛋白質 A 或 monoclonal 和 polyclonal 抗體。

Immunoassays 由於它的敏感性、特異性和一般適用性，在臨床診斷和在基礎研究上成為一個重要工具。包括 fluoroimmunoassays、酵素 immunoassays 或放射免疫測定的各式各樣的 immunoassays，主要是將酵素或抗體固定化在為微盤上，再經過與分析物反應(incubation)、清洗(wash)..... 等步驟，所需步驟多，時間長。磁性顆粒已應用於與一級或二級抗體，用來分離和定量抗原。此方法可減少離心試樣的步驟，如此可減少分析試樣的時間和簡化操作，因此增加效率和準確性。Matsunaga 等人<sup>[16]</sup>開發了一個新穎的 fluoroimmunoassay 方法，螢光素 isothiocyanate (FITC) 被共軛的單株抗體 (conjugated monoclonal)，anti-Escherichia coli 抗體，固定在細菌磁性顆粒(bacterial magnetic particles, BMPs) 用來作為 E. coli 之偵查和移除。Matsunaga 等人亦開發了化學發光酵素 immunoassay 與 BMPs 使用 IgG 作為試樣抗原<sup>[17]</sup>。同樣磁性顆粒基於 ELISA 的原理亦被開發做為葡萄球菌種類<sup>[18]</sup>偵查。

## 研究方法：

本計畫結合生化immunoassay 技術及分析磁泳技術以研究功能性磁性顆粒與分析磁泳分離系統在生化相關分析上可能的各種應用。

探討以抗原抗體及其他化學鍵結反應相連結之磁性顆粒與其基質(substrate)之親合力 (affinity) ( $K_{affinity}$ )，以便建立以抗原抗體為選擇基礎的高選擇性顆粒及相關的分離與分析技術。抗原抗體接在磁性顆粒後之親合力或酵素與其substrate之親合力，對磁性分離之選擇性及回收率扮演著重要的因素，但一般商業化產品均不提供此資訊，文獻上提供之資訊也大都都是抗原抗體本身在均勻溶液(homogeneous solution)利用equilibrium dialysis 所測量而得。本研究結合分析磁泳技術，將抗原或抗體接在磁性顆粒上，利用磁場將磁性顆粒沉積在分析槽內，再注射經螢光標示或與微米顆粒結合之抗體或抗原，以達到分離及分析定量之目的，此運作條件下之抗體磁性顆粒與抗原之親合力探討，一來可驗證本實驗系統裝置是否正常運作，二來可提供後續分析應用之最適化條件之參數選擇指標。

## 結果與討論

The interaction of Biotinylated silica and streptavidin-coated magnetic beads with a Laminar flow chamber

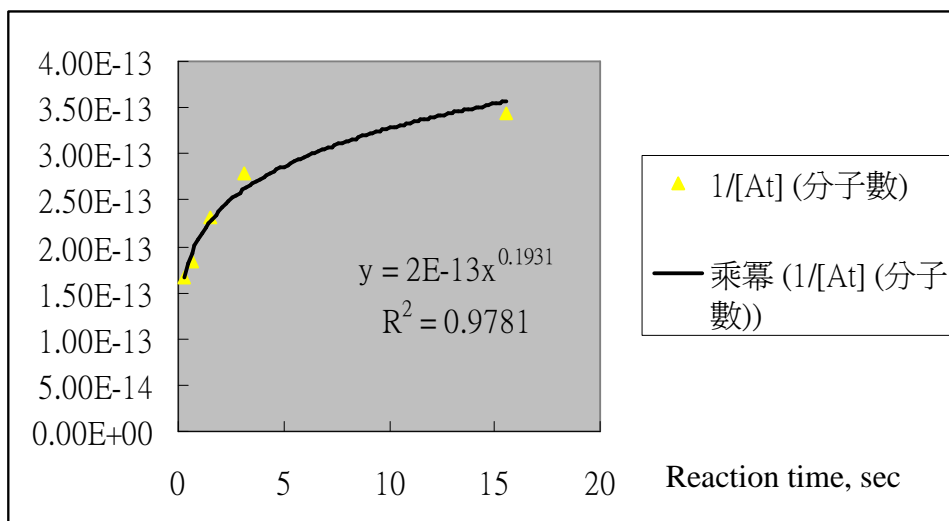
The association rate constant ,  $k$  was determined by different methods:

1. determined by initial rate method  $d[p]/dt = k * M * L_{bulk}$
2. determined by first-order reaction (integral method)  
 $\ln[A]_t = \ln[A]_0 - kt$
3. determined by second-order reaction

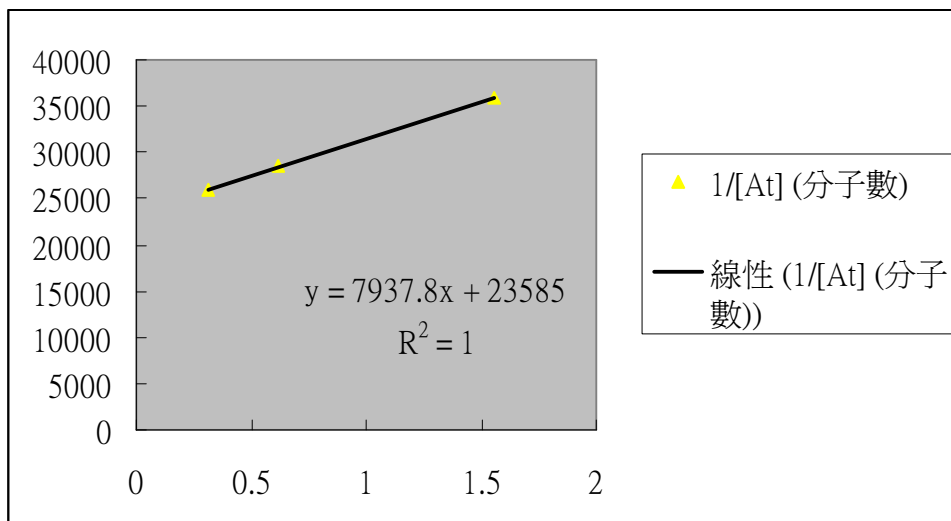
$$\frac{1}{[A]_t} = kt + \frac{1}{[A]_0}$$

The results from the reaction of biotinylated silica and different sizes of streptavidin-coated magnetic beads were shown on below.

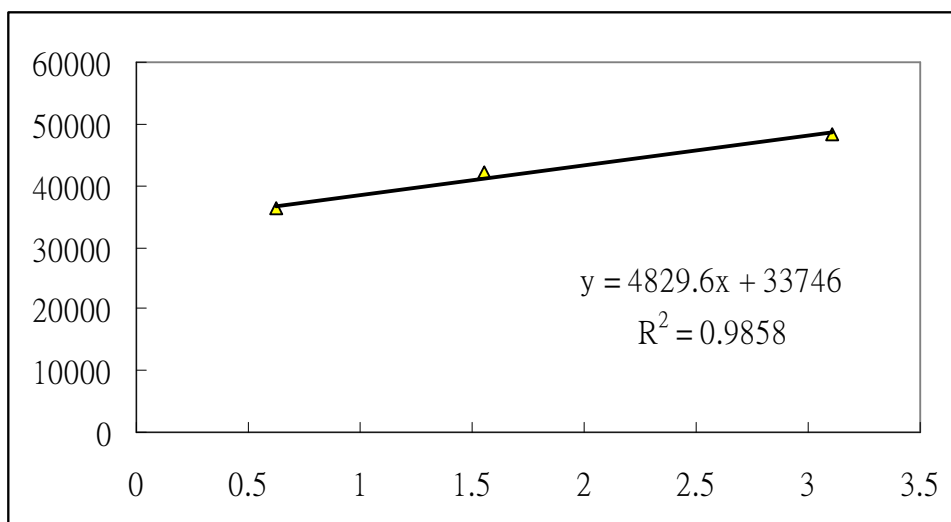
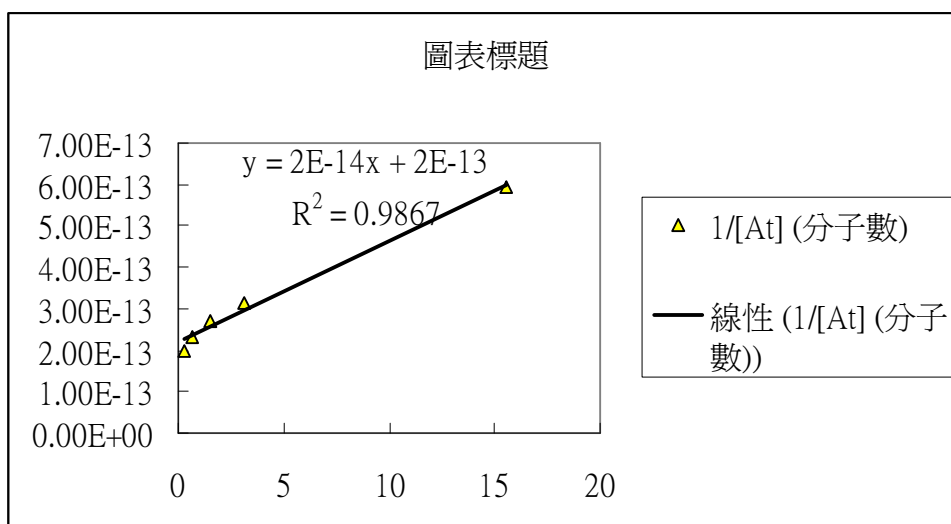
(a) 2um S-beads, Reaction time 0.31~15.5 sec



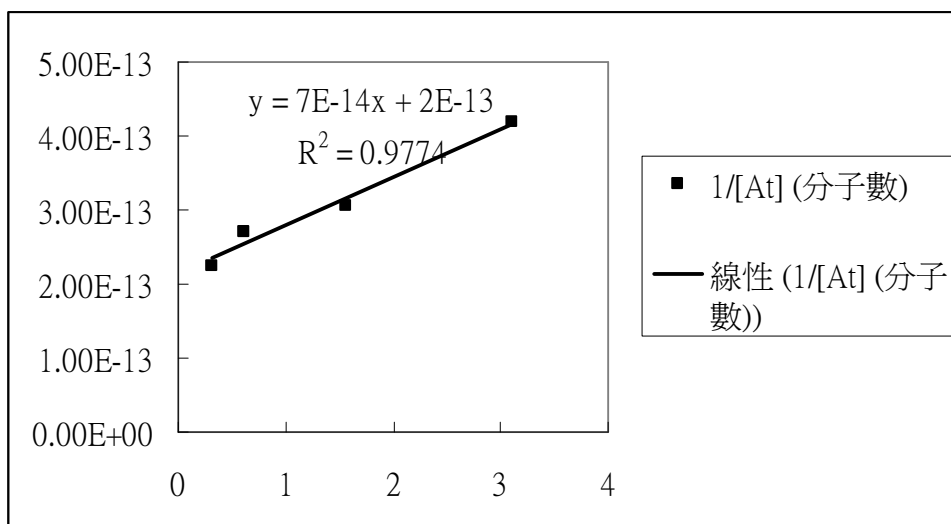
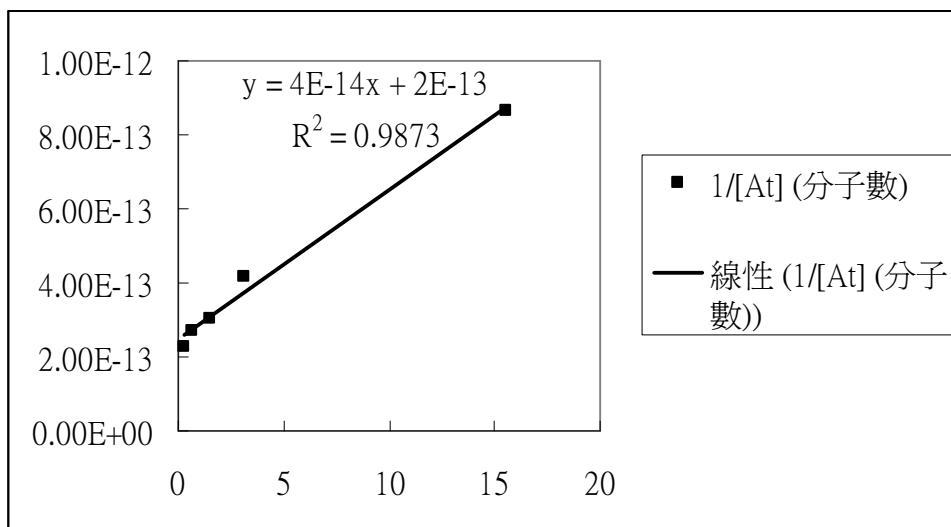
0.31~1.55 sec



(B) 860nm



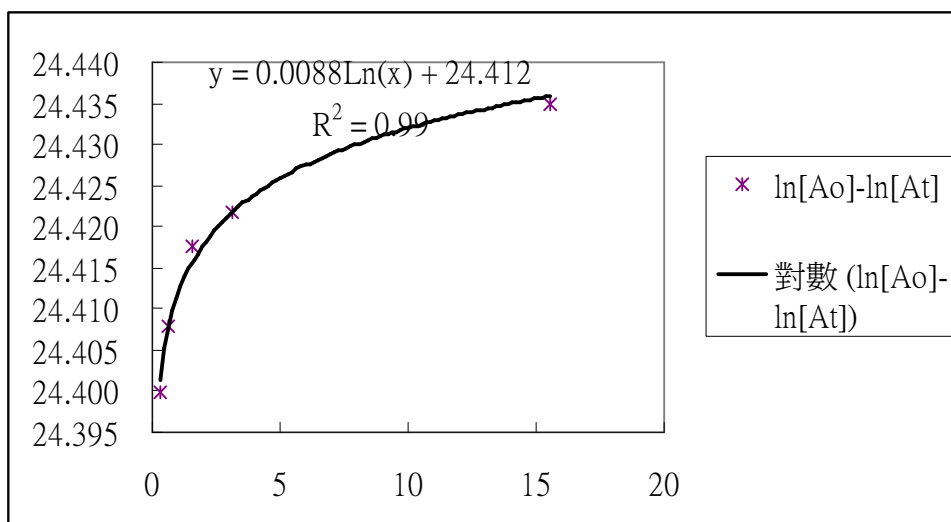
(C) 420nm



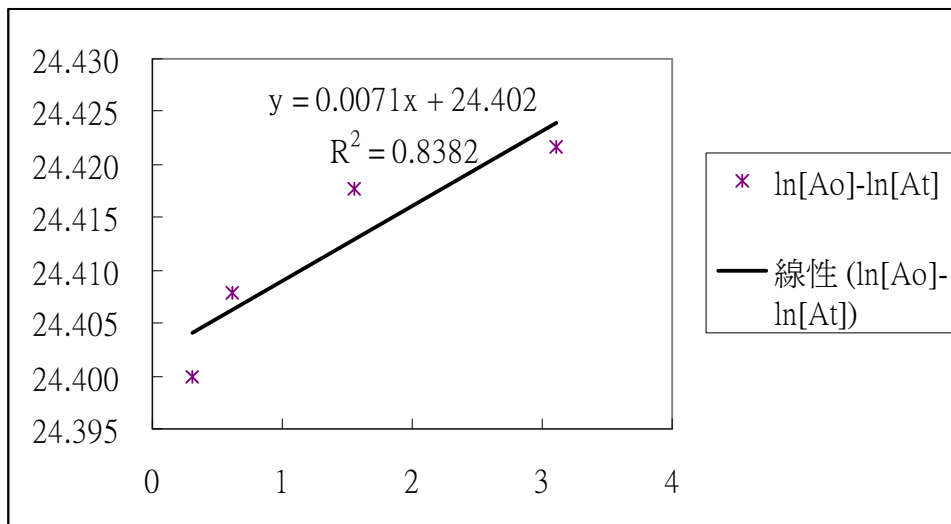
(b) determined by first-order reaction (integral method)

$$\ln[A]_t = \ln[A]_0 - kt$$

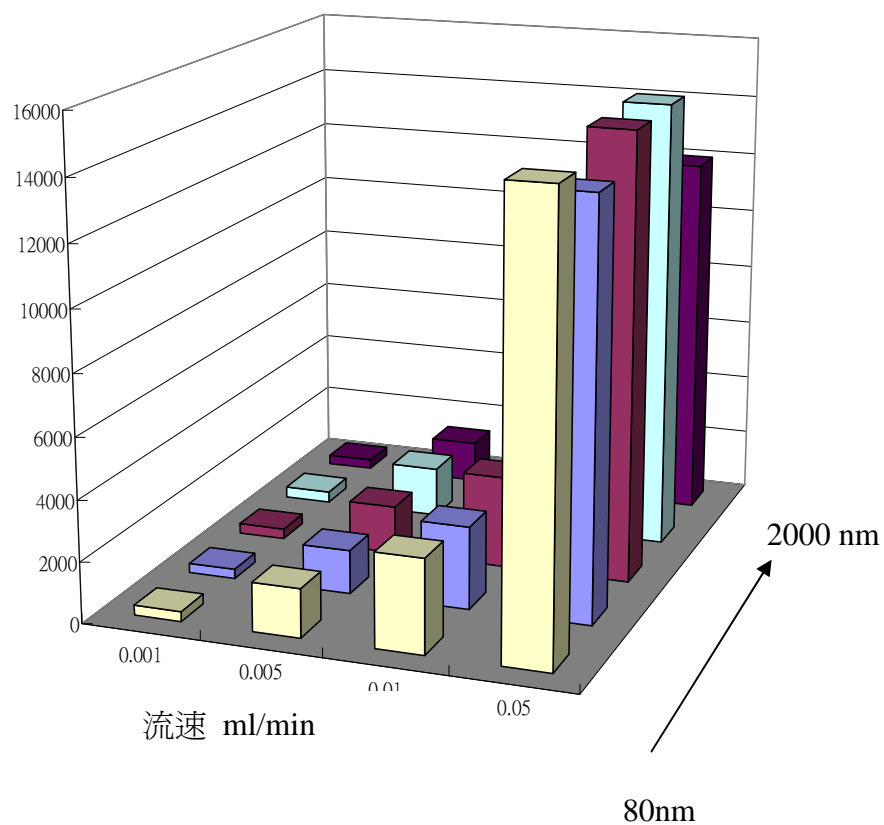
80 nm



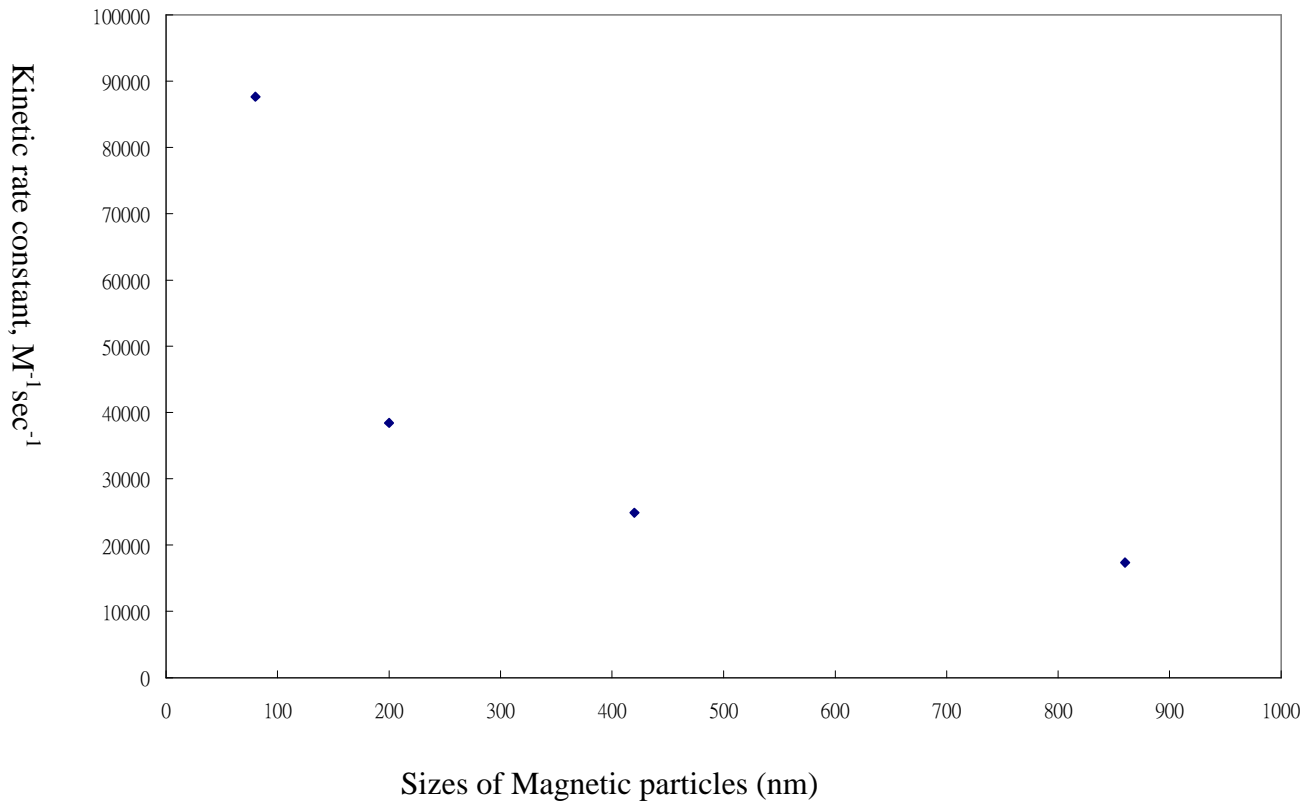




由以上結果可知本實驗條件下，在較高流速時，所得結果可利用 pseudo-first rate reaction，並利用 initial rate method 求 reaction rate constant，來比較顆粒大小對反應之影響



以上結果，我們實際上是透過平均產物量所求的反應速率常數，反應物濃度隨時間減少，反應速率愈慢，進樣流速愈慢，反應時間愈長，所得之 rate constant 也較小。因此我們固定流速在 0.05 ml/min，進樣不同濃度樣品，在透過 initial rate method 求得不同顆粒與反應速率之關係。



上圖為 reaction rate 與 sizes of streptavidin labeled magnetic particles 之關係圖，利用 PEARSON 函數計算 particle size 與 kinetic rate 相關係數  $r$  (-0.7849)，由此可見磁性顆粒愈大反應速率及速變小，因建議在 flow system 之應用，應選擇小顆粒反應較佳。

## 參考文獻

1. Mitchell R, Bitton G, Obertenffer JA, *Sep. Purif. Meth.*, 1975, 4, 267-303.
2. Oder RR, *IEEE Trans Magn.*, 1976, 12, 428-435.
3. Hirschbein B.L., Brown D.W., Whitesides G.M., *Chemtech.*, 1982, 172-179.
4. Evens C.H., Russell A.P., Westcott V.C., *J. Chromatog.*, 1986, 351, 409-425.
5. Seifert W.W., Westcott V.C., *Wear*, 1972, 21, 27-42.
6. Takayasu M, Gerber R, Friedlaender F.J., *IEEE Trans Magn.* 1983, 19, 2112-2114.
7. Graham M.D., Selvin P.R., *IEEE Trans Magn.* 1982, 18, 1523-1525.
8. Miltenyi S., Muller W., Weichel W., Radbruch A., *Cytometry*, 1990, 11, 231-238.
9. Zborowski M., Fuh C.B., Green R., Sun L., Chalmers J., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 3702-3712.
10. Mellvile D., Paul F., *Nature*, 1975, 255, 706-710.
11. Ugelstad J., Berge A., *Anal. Chem.*, 1988, 328, 303-334.
12. Ramchand CN, Priyadarshini P, Kopcansky P, Mehta RV: Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology. *Indian J Pure Appl Phys* 2001, 39:683-686.
13. Ramchand CN, Priyadarshini P, Kopcansky P, Mehta RV: Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology. *Indian J Pure Appl Phys* 2001, 39:683-686.
14. Safarik I, Safarikova M: Overview of magnetic separations used for biochemical and biotechnological applications. In *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers* (Edited by: Hafeli U, Schutt W, Teller J, Zborowski M). New York: Plenum Press 1997, 323-340.
15. Nakamura N, Burgess JG, Yagiuda K, Kudo S, Sakaguchi T, Matsunaga T: Detection and removal of *Escherichia coli* using fluorescein isothiocyanate conjugated monoclonal antibody immobilized on bacterial magnetic particles. *Anal Chem* 1993, 65(15):2036-2039.
16. Matsunaga T, Kawasaki M, Yu X, Tsujimura N, Nakamura N: Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles. *Anal Chem* 1996, 68(20):3551-3554
17. Yazdankhah SP, Hellenmann AL, Ronningen K, Olsen E: Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus* species in milk by ELISA based on monodisperse magnetic particles. *Vet Microbiol* 1998, 62:17-26.
18. 林中生, 中山醫學大學內科教授, 87.12.30中國醫藥學院全院性演講「Renin Angiotensin System在抗高血壓藥物發展的重要性」摘錄
19. Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation. Specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct* 1980; 13: 67-81
20. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6499-503.
21. Halliwell B. Current status review: free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989; 70: 737-57.
22. Palinsky W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, et al. Low density lipoprotein undergoes modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1372-6.
23. Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U 937. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 904-8
24. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Eng J Med* 1992; 326: 242-50.
25. Frostegard J, Wu R, Giscombe R, Holm G, Lefvert AK, Nilsson J. Induction of T cell activation by oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 461-7.
26. Stiko-Rahm A, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Hamsten A, Nilsson J. Oxidized and native LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1099-109.

27. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 1992; 339: 1183-6.
28. Freyschuss A, Stiko-Rahm A, Swedenborg J, et al. Antioxidant treatment inhibits the development of intimal thickening after balloon injury of the aorta in hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest* 1993; 91: 1282-8.
29. Adriana Scoccia , María Silvina Molinuevo , Antonio Desmond McCarthy , Ana María Cortizo , A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins, *BMC Clinical Pathology* 2001, 1, 1.