

## 科技部補助專題研究計畫報告

黴菌毒素單株抗體與核酸適體的生產及快速檢測多重毒素之免疫奈米層析試紙開發(第3年)

報告類別：成果報告  
計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 106-2320-B-040-013-MY3  
執行期間：108年08月01日至109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：碩士級-專任助理：鐘惟恆  
博士班研究生-兼任助理：吳仕偉

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關  
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)  
本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

中華民國 109 年 10 月 31 日

中文摘要：T-2毒素(trichothecene A) 與恩鐮孢菌素B (enniatin B, ENN B)和鐮孢菌酸(fusaric acid, FA)主要是由Fusarium屬所產生的黴菌毒素，此類毒素經常污染食品與穀物，長期食用可能會導致人類或動物疾病，甚至包括細胞癌化的發生。本計畫開發上述毒素之專一性抗體，並且建立快速免疫檢測分析法來分析調查食品。因此本計畫的第一年期以融合瘤技術分別生產T-2毒素、恩鐮孢菌素B與和鐮孢菌酸之抗體。因此首先將T-2毒素(trichothecene A)、與恩鐮孢菌素B (enniatin B, ENN B)和鐮孢菌酸利用不同化學接合方法分別與載體蛋白質接合成抗原，接著再將各不同抗原分別免疫動物，來生產具有專一性之抗體。目前有關T-2毒素的多株抗體已經成功出來，至於T-2毒素免疫Balb/c小鼠仍持續進行中，有關恩鐮孢菌素及鐮孢菌酸免疫小鼠目前仍未有抗體生成。第二年進行T-2毒素，ENN與FA奈米快速檢測試紙開發，將抗體與奈米金粒子相結合，形成抗體奈米金探針，開發黴菌毒素的快速免疫層析檢測試紙。由於目前上述三種毒素僅有T-2毒素有抗體生成，結合實驗室之前生產之Fusarium屬所產生的伏馬鐮孢毒素(fumonisin B1)與玉米赤黴烯酮(zearalenone)黴菌毒素進行免疫奈米層析試紙開發，並且嘗試進行檢測多重毒素之免疫奈米層析試紙開發。第三年利用指數式擴增配體的系統進化技術(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) 篩選出來各DNA序列之適體可以分別辨識微孔盤之T-2毒素，ENN與FA。但是T2毒素DNA適體之篩選並不順利，因為經親合管柱層析洗下之DNA適體不具有專一性，目前正進行篩選技術之改良。

中文關鍵詞：T-2毒素，恩鐮孢菌素B，鐮孢菌酸，單株抗體，酵素免疫分析法，免疫奈米層析試紙，指數式擴增配體的系統，適體

英文摘要：T-2 (trichothecene A) toxin, enniatin B (ENN B) and fusaric acid (FA) are mycotoxins which are produced primarily by Fusarium strains. These mycotoxins are commonly found in wheat, cereals, and food/feed products and are known to cause various toxic effects on human and livestock. Therefore, production of specific antibodies and development of rapid detection methods for these mycotoxins are an important issue in food safety. The first year goal of this proposal is to generate monoclonal antibodies specific to T-2 toxin, enniatin B (ENN B) and Fusaric acid (FA), respectively. Therefore, T-2 toxin (trichothecene A), enniatin B (ENN B) and fusaric acid were conjugated to carrier proteins using different chemical conjugation methods, respectively. The antigens were immunized with animals. At present, polyclonal antibodies against T-2 toxin have been successfully produced. For the monoclonal antibody for T-2 toxin, Balb/c mice were immunized still in progress. There is no antibody production for ENN and FA, respectively. The second year goal, T-2 toxin, ENN and FA immunochromatographic strips will be developed, the antibodies will be conjugated with gold nanoparticles to

form antibody-gold nanoparticle probe for rapid detection of mycotoxins. Since above three toxins only T-2 antibody is available, we combined with the fumonisin B1 and zearalenone antibodies which previously produced in our laboratory to develop the immunochromatographic test strip for each toxin. An attempt was made to develop an immunochromatographic strip for simultaneously detecting multiple toxins. In the third year, using the Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) to screen out the DNA sequence aptamers can respectively identify the T-2 toxin, ENN or FA, in the microplate. The screening of DNA aptamer for T2 toxin is not successful, due to the DNA aptamer washed by affinity column chromatography is not specific. The screening technology for DNA aptamer is currently being improved.

英文關鍵詞：T-2 (trichothecene A), enniatin B (ENNB), fusaric acid (FA) monoclonal antibody, gold nanoparticle, quantum dot, SELEX, aptamer,

# 科技部補助專題研究計畫報告

黴菌毒素單株抗體與核酸適體的生產及快速檢測多重毒素之免疫奈米層析試紙開發

報告類別：進度報告

成果報告：完整報告/精簡報告

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 106-2320-B-040-013-MY3

執行期間：2017年8月1日至2020年7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：吳仕偉，鐘惟恆

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關\_\_\_\_\_

(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現 否 是

中華民國 109 年 10 月 31 日

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

黴菌毒素單株抗體與核酸適體的生產及快速檢測多重毒素之免疫奈米層析試紙開發

計畫編號：MOST 106-2320-B-040-013-MY3

執行期限：106年8月1日至109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：

T-2 毒素(trichothecene A) 與恩鐮孢菌素 B (enniatin B, ENN B)和鐮孢菌酸(fusaric acid, FA)主要是由 *Fusarium* 屬所產生的黴菌毒素，此類毒素經常污染食品與穀物，長期食用可能會導致人類或動物疾病，甚至包括細胞癌化的發生。本計畫開發上述毒素之專一性抗體，並且建立快速免疫檢測分析法來分析調查食品。因此本計劃的第一年期以融合瘤技術分別生產 T-2 毒素、恩鐮孢菌素 B 與和鐮孢菌酸之抗體。因此首先將 T-2 毒素(trichothecene A)、與恩鐮孢菌素 B (enniatin B, ENN B)和鐮孢菌酸利用不同化學接合方法分別與載體蛋白質接合成抗原，接著再將各不同抗原分別免疫動物，來生產具有專一性之抗體。目前有關 T-2 毒素的多株抗體已經成功出來，至於 T-2 毒素免疫 Balb/c 小鼠仍持續進行中，有關恩鐮孢菌素及鐮孢菌酸免疫小鼠目前仍未有抗體生成。第二年進行 T-2 毒素，ENN 與 FA 奈米快速檢測試紙開發，將抗體與奈米金粒子相結合，形成抗體奈米金探針，開發黴菌毒素的快速免疫層析檢測試紙。由於目前上述三種毒素僅有 T-2 毒素有抗體生成，結合實驗室之前生產之 *Fusarium* 屬所產生的伏馬鐮孢毒素(fumonisin B1)與玉米赤黴烯酮(zearalenone)黴菌毒素進行免疫奈米層析試紙開發，並且嘗試進行檢測多重毒素之免疫奈米層析試紙開發。第三年利用指數式擴增配體的系統進化技術(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX) 篩選出來各 DNA 序列之適體可以分別辨識微孔盤之 T-2 毒素，ENN 與 FA。但是 T2 毒素 DNA 適體之篩選並不順利，因為經親合管柱層析洗下之 DNA 適體不具有專一性，目前正進行篩選技術之改良。

## 英文摘要：

T-2 (trichothecene A) toxin, enniatin B (ENN B) and fusaric acid (FA) are mycotoxins which are produced primarily by *Fusarium* strains. These mycotoxins are commonly found in wheat, cereals, and food/feed products and are known to cause various toxic effects on human and livestock. Therefore, production of specific antibodies and development of rapid detection methods for these mycotoxins are an important issue in

food safety. The first year goal of this proposal is to generate monoclonal antibodies specific to T-2 toxin、enniatin B (ENNB) and Fusaric acid (FA), respectively, Therefore, T-2 toxin (trichothecene A), enniatin B (ENN B) and fusaric acid were conjugated to carrier proteins using different chemical conjugation methods, respectively. The antigens were immunized with animals. At present, polyclonal antibodies against T-2 toxin have been successfully produced. For the monoclonal antibody for T-2 toxin, Balb/c mice were immunized still in progress. There is no antibody production for ENB and FA, respectively. The second year goal, T-2 toxin, ENN and FA immunochromatographic strips will be developed, the antibodies will be conjugated with gold nanoparticles to form antibody-gold nanoparticle probe for rapid detection of mycotoxins. Since above three toxins only T-2 antibody is available, we combined with the fumonisin B1 and zearalenone antibodies which previously produced in our laboratory to develop the immunochromatographic test strip for each toxin. An attempt was made to develop an immunochromatographic strip for simultaneously detecting multiple toxins. In the third year, using the Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) to screen out the DNA sequence aptamers can respectively identify the T-2 toxin, ENN or FA, in the microplate. The screening of DNA aptamer for T2 toxin is not successful, due to the DNA aptamer washed by affinity column chromatography is not specific. The screening technology for DNA aptamer is currently being improved.

## 一、前言與目的：

黴菌毒素(mycotoxins)主要是由*Aspergillus*、*Fusarium* 和 *Penicillium* 屬等常見黴菌所產生的二級代謝產物，黴菌毒素可能藉由採收前後或儲藏運送的過程中污染食品、穀物與穀類製品，已知在許多食品中例如玉米、稻米、小麥、大麥製品中常常發現受到黴菌毒素的污染(IARC, 2002)。由於絕大多數的黴菌毒素為小分子且脂溶性高的天然化合物，高溫烹調不易破壞其結構並且容易堆積在動物體內，因此消費者或是牲畜若是長期低量的攝取被黴菌污染的穀類或食品將嚴重危害到公共食品安全。其中影響經濟較鉅的常見黴菌毒素有黃麴毒素 B1(aflatoxin B1)、嘔吐毒素(deoxynivalenol)、T-2毒素(trichothecene A)、赭麴毒素A(ochratoxin A)和伏馬鐮孢毒素B1(fumonisin B1)，近年來由*Fusarium*所產生的新興黴菌毒素(emerging mycotoxins)如恩鐮孢菌素(ENNs)和鐮孢菌酸(fusaric acid)在歐洲未加工之穀物有高於50%之檢出率，在加拿大曾分析48個豬飼料樣品中，其中有85%是含鐮孢菌酸污染的樣品，其最高含量高達135.86 ppm，此外此兩類毒素亦泛存於中草藥中，目前已受到許多研究者的關注。此外這些黴菌毒素結構非常穩定，不會因為加熱而有所破壞。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，導致經濟上嚴重的損失，美國估計一年損失約14億美金(CAST, 2003)。此外多種黴菌毒素已知可導致腎臟與肝臟的傷害，大部分經證實具有抑制免疫力和遺傳毒性，甚至可能具有致癌性質(IARC, 1993;2002)。

T-2 毒素(分子量466.5)是由多種鐮孢黴菌屬(*Fusarium*)產生的A型單端孢黴毒素(trichothecene A)。T-2 毒素可經由攝食或透過皮膚影響人體，與大多數鐮孢黴菌毒素一樣會

與核醣體RNA鍵結，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，此毒素也是一強烈致命毒素，也曾經在戰場上被當作生化武器使用即俗稱的黃雨(yellow rain)。食入 T-2 毒素亦會在免疫系統和胎兒組織誘導細胞凋亡，且已有文獻指出 T-2 毒素和其代謝產物 HT-2具有很高毒性。大陸於2013年分析420個飼料中T-2含量，高達80%檢出T-2毒素其污染含量介於10~735 ppb. (Wang et al., 2013)。2004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，T-2毒素即在飼料被檢出，飼主若手摸含有T-2 毒素污染之飼料，可能會直接接觸 T-2 毒素造成皮膚受傷，長期暴露可能造成痠痛、免疫出問題等病徵。台灣農委會表示訂定 T-2 毒素的殘留標準已刻不容緩，國際規範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，目前有俄羅斯和以色列訂定T-2毒素的含量限制100 ppb以下，其他國家則尚在擬訂規範中

恩鐮孢菌素B (enniatin B, ENN B)和鐮孢菌酸(fusaric acid, FA) 兩者都屬於近年新興的黴菌毒素，主要由全球穀物污染較最嚴重黴菌鐮孢菌所產生，恩鐮孢菌素構造具有環狀 hexadepsipeptide的結構，恩鐮孢菌素毒性是由於本身離子載體特性會協助鈣、鉀離子穿過細胞膜而破壞正常之生理濃度，而誘發細胞凋亡(Gruber-Dorninger et al., 2016)。實驗結果顯示恩鐮孢菌素不僅具有急性肝致毒性也可能導致肝癌的生成 (Svingen et al., 2016)。鐮孢菌酸會對多種細胞株，如腎臟細胞、卵巢纖維細胞、肝癌細胞，有細胞毒性及抑制生長的影響。此外鐮孢菌酸會誘發細胞形成氧化及粒線體壓力，並造成細胞的凋亡或壞死。在豬隻實驗中，發現單餵食鐮孢菌酸時，會有神經化學物的改變造成低血壓及嘔吐的現象發生；而同時餵食鐮孢菌酸及嘔吐毒素時，會造成體重的減少及食慾不振。因此鐮孢菌酸與嘔吐毒素或T-2毒素可能有協同作用會對人類及牲畜造成傷害，目前尚未有國家設下針對鐮孢菌酸含量限制，需要更多動物體內及體外毒性試驗研究。

## 二、文獻探討

在穀物中常見的 T-2 毒素，ENN 與 FA 除了在人體和動物體引起毒性外，也會藉由影響神經系統而造成厭食、體重減輕等慢性中毒症狀，T-2 毒素除了免疫抑制外也是一強烈致命毒素，。食入 T-2 毒素亦會在免疫系統和胎兒組織誘導細胞凋亡，國際規範 T-2 毒素及其代謝物 HT-2 毒素建議 T-2 毒素的含量降至 100 ppb 以下時，可以防止慢性中毒的發生。恩鐮孢菌素毒性是由於本身離子載體特性會協助鈣、鉀離子穿過細胞膜而破壞正常之生理濃度，而誘發細胞凋亡(Gruber-Dorninger et al., 2016)。實驗結果顯示恩鐮孢菌素不僅具有急性肝致毒性也可能導致肝癌的生成。鐮孢菌酸會誘發細胞形成氧化及粒線體壓力，並造成細胞的凋亡或壞死。在豬隻實驗中，發現單餵食鐮孢菌酸時，會有神經化學物的改變造成低血壓及嘔吐的現象發生；而同時餵食鐮孢菌酸及嘔吐毒素時，會造成體重的減少及食慾不振，加拿大曾分析 48 個豬飼料樣品中有 85%是含鐮孢菌酸污染的樣品，其最高含量高達 135.86 ppm，由此可見污染的比例與含量都算相當嚴重。

T-2 毒素的單株抗體生產起源於 1987 年(Goodloff et al., 1987; Fan et al., 1988; Barna-vetro et al., 1994)，其中開發出酵素免疫分析法之 IC50 大多於 100~250 ng/ml 左右，最

低偵測含量大約為 12.5~25 ng/mL。一般而言，上述抗體的專一辨識性不夠，因而無法達到商業化免疫分析法或是快速檢驗試紙的應用標準。至於 T-2 之免疫層析試紙直到 2008 年才有第一篇免疫層析試紙發表出來，其試紙偵測含量約為 100 ng/ml (Molinelli et al., 2008)，考量 T-2 的建議含量為 100 ppb，一般樣品需要加入約 5 倍溶液來萃取，因此 T-2 毒素快速免疫層析試紙偵測含量最好約為 20 ng/ml 才能達到偵測要求。至於 T-2 毒素之 DNA 適體，目前只有一篇報導發表於 2014 年之 J. Agric Food Chem 報告(Chen et al., 2014)，主要是藉由 graphene oxide 的協助來找到 T-2 毒素之 DNA 適體，建立螢光分析法偵測 T-2 在啤酒中之含量，期最低偵測限制 0.4  $\mu$ M (Chen et al., 2014)。而在 ENN/FA 至今仍無抗體之生產及免疫分析法或層析試紙之報告發表。

### 三、材料與方法

#### Materials.

**Materials** T-2, and enniatin B ( ENN B), fusaric acid ( FA ), Bovine serum albumin (BSA),  $\gamma$ -globulin, thyroglobulin from bovine thyroid ( BTG ) , ovalbumin (OVA), ammonium biocarbonate, 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). Virus-free, 9–10-week-old, female BALB/c mice, rabbits were obtained from National Animal Research Center (Taipei, Taiwan). All other chemicals and organic solvents used were of reagent grade or better. Aptamer design and synthesis. T2 toxin, ENN B, fusaric acid. Affinity column.

#### **Methods:**

##### **1. 利用 Succinic anhydride (SH) 製備 T-2 衍生物 T-2-SH :**

取 2 mg Succinic anhydride 溶於 400  $\mu$ l pyridine，再取 2 mg T-2 溶於 400  $\mu$ l pyridine，將 T-2 溶液緩慢加入 Succinic anhydride 溶液中，於 37  $^{\circ}$ C 氮氣環境中，攪拌 60 小時，反應完成後利用減壓濃縮機將 pyridine 抽乾。

##### **2.利用 Carbodiimide 法與 *N*-hydroxysuccinimide (NHS)方法 將 T-2-SH 與 BSA 接合物:**



製備三組 1 mg T-2-SH 溶於 100  $\mu$ l methanol，再將 2 mg DCC 與 1.5 mg NHS (N-Hydroxysuccinimide)分別溶於 20 與 15  $\mu$ l methanol 後緩慢加入 100  $\mu$ l 含 T-2-SH 1 mg 的 methanol 中，於室溫避光攪拌反應 2 小時。再將每份加入至 600  $\mu$ l 0.1 M carbonate buffer (pH=9.6) 溶有 6 mg BSA 中，並於室溫避光攪拌反應一個晚上。最後以 2L 的 0.01M PBS 於 4  $^{\circ}$ C 透析 72 小時。

### 3. T2 toxin 之抗體的製備

為了使 BALB/c 小鼠產生對 T-2 專一性的抗體，取 50  $\mu$ g 的抗原 (T-2-SH-BSA) 溶於 200  $\mu$ L 0.01 M PBS 中，與等體積之費氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 混合均勻，以腹腔注射的方式將混合物免疫至 4 週大的雌性小鼠，於免疫後一週開始，每週進行尾靜脈採血與加強免疫的動作，將 50  $\mu$ g 的抗原溶於 200  $\mu$ L 0.01 M PBS 腹腔注射至小鼠體內增強免疫。若抗體效價下降，則將 50  $\mu$ g 的抗原溶於 200  $\mu$ L 0.01 M PBS 中，與等體積之費氏不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 混合均勻，以腹腔注射的方式加強免疫。為了使紐西蘭大白兔產生對 T-2 專一性的抗體，取 500  $\mu$ g 的抗原 (T-2-SH-BSA) 溶於 1 mL 0.01 M PBS 中，與等體積之費氏完全佐劑混合均勻，以表皮注射方式將抗原混合物免疫至紐西蘭大白兔之背部，在免疫後四週，取 500  $\mu$ g 的抗原溶於 1 mL 0.01 M PBS 中，與等體積之費氏不完全佐劑混合均勻，以皮下注射的方式將混合物免疫至紐西蘭大白兔之四肢與頸部進行加強免疫，並每週進行耳動脈採血。

### 4. 合成奈米金粒子

配製 1 mM HAuCl<sub>4</sub> (19.9 mg HAuCl<sub>4</sub> 溶於 50 mL 去離子水中) 加熱攪拌至沸騰後加入 0.01% trisodium citrate 還原劑 (5 mg 溶於 50 mL 去離子水中)，持續沸騰 5 分鐘即為我們所需 15 nm 之奈米金粒子 (顏色變化為：淡黃色  $\rightarrow$  透明無色  $\rightarrow$  黑色  $\rightarrow$  酒紅色)，將合成好的奈米金粒子靜置於室溫冷卻後，置入 4 $^{\circ}$ C 冰箱備用。

### 5. 製備 T-2 奈米金粒子探針

將 15 nm 奈米金粒子用 2 mM Boric acid-Borax buffer (pH 5.5) 稀釋 5 倍 (總體積為 2 mL)，分別取 5  $\mu$ g、7.5  $\mu$ g、10  $\mu$ g 與 15  $\mu$ g T-2 toxin 多株抗體緩慢加入至奈米金粒子溶液中，於室溫攪拌反應 1 小時後，加入 220  $\mu$ L 10% BSA 溶於 0.01 M PBS (以孔徑 0.45  $\mu$ m 濾膜過濾)，於室溫攪拌反應 30 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 30 分鐘，並移除上清液，將抗體-奈米金粒子接合物以 180  $\mu$ L 20 mM Tris-buffer saline, pH 8.0 (含 1% BSA 與 0.1% sodium azide) 回溶，於 4  $^{\circ}$ C 保存備用。

### 6. 製備 T-2 免疫層析試紙

將 0.25  $\mu$ L 接合完的 T-2 蛋白質溶液與 0.25  $\mu$ L 以 0.01 M PBS 稀釋 10 倍的 goat anti-rabbit-IgG-Fc 溶液先後利用畫線機畫於 NC membrane 上，作為 test line 與 control line；取 10  $\mu$ L 合成好的奈米金粒子探針 (7.5  $\mu$ g) 加至 release pad 上，於 37  $^{\circ}$ C 烘乾後，疊至 NC membrane 上，再將 sample pad 重疊至 release pad 上，最後於試紙的另一端貼

上 absorbent pad，並以雙面膠帶固定，即完成免疫層析試紙之組裝。

### 7. 製備 FmB1 免疫層析試紙

利用劃線機將 FmB1-OVA 接合物溶液及二級抗體溶液 (以 0.01 M PBS 稀釋) 分別劃於 NC membrane (孔徑：15  $\mu\text{m}$ ，寬度：4 mm) 上的 test line 及 control line 的位置上，劃線後置於室溫下自然風乾。將 10  $\mu\text{L}$  合成好的奈米金粒子探針及 180  $\mu\text{L}$  樣品加至 96 孔盤孔洞中混合均勻後，將組裝好的免疫層析試紙插入，等待 20 分鐘後即可目視得知結果。試紙組裝方式為：sample pad 疊於 NC membrane 上，absorbent pad 置於免疫層析試紙另一端，最後利用膠帶固定後即完成免疫層析試紙組裝 (免疫層析試紙規格為 4 mm x 75 mm)。

### 8. 製備 Zea 免疫層析試紙

利用劃線機將 Zea-OVA 接合物溶液及二級抗體溶液 (以 0.01 M PBS 稀釋) 分別劃於 NC membrane (孔徑：15  $\mu\text{m}$ ，寬度：4 mm) 上的 test line 及 control line 的位置上，劃線後置於室溫下自然風乾。將 8  $\mu\text{L}$  合成好的奈米金粒子探針及 180  $\mu\text{L}$  樣品加至 96 孔盤孔洞中混合均勻後，將組裝好的免疫層析試紙插入，等待 20 分鐘後即可目視得知結果。試紙組裝方式為：sample pad 疊於 NC membrane 上，absorbent pad 置於免疫層析試紙另一端，最後利用膠帶固定後即完成免疫層析試紙組裝 (免疫層析試紙規格為 4 mm x 75 mm)。

### 9. 製備 FmB1 及 Zea 多重免疫試紙

利用劃線機將 FmB1-OVA ru6 及 Zea-OVA 接合物溶液及二級抗體溶液 (以 0.01 M PBS 稀釋) 分別劃於 NC membrane (孔徑：15  $\mu\text{m}$ ，寬度：4 mm) 上的 test line 1、test line 2 及 control line 的位置上，劃線後置於室溫下自然風乾。將 3  $\mu\text{L}$  之 FmB1 奈米金粒子探針、8  $\mu\text{L}$  之 Zea 奈米金粒子探針及 180  $\mu\text{L}$  樣品加至 96 孔盤孔洞中混合均勻後，將組裝好的免疫層析試紙插入，等待 20 分鐘後即可目視得知結果。試紙組裝方式為：sample pad 疊於 NC membrane 上，absorbent pad 置於免疫層析試紙另一端，最後利用膠帶固定後即完成免疫層析試紙組裝 (免疫層析試紙規格為 4 mm x 75 mm)。

### 10. 利用 SELEX 篩選 T2 aptamer

將 2 mg 的 T2 毒素以化學接合連接到磁珠或 DEAE cellulose 上製備 T2 毒素之親和管柱後，合成長度約 80 個核苷酸的單股核酸序列資料庫：此資料庫片段兩端具有特定的 DNA 序列可作為未來 PCR 擴增的模板用，而中間 40 個核苷酸則是由 ATCG 隨機排列組合的序列，取 200 pmol 核酸序列資料庫經過 T2 毒素之親和管柱，使其與 T2 毒素結合，接著將吸附結合在管柱之核酸適體 (aptamer) 洗出後，再以 PCR 擴增，並且將 PCR 擴增產物進一步經過幾次之循環以期得到真正對 T2 具有專一性結合的核酸適體。

### 11. T2 之高效液相層析法 (HPLC) 建立

由於 T-2 無可激發螢光之基團，因此利用 2-naphthoyl chloride (2-NC) 螢光物與 T-2 接合，使其可激發螢光並分析，取 0.1 mg 乾燥之 T-2，加入 50  $\mu\text{L}$  DMAP 溶液 (6.3 mg 溶於

2 mL acetonitrile) 與 50  $\mu$ L 2-NC 溶液 (4.9 mg 溶於 2 mL acetonitrile)，旋渦混合 1 分鐘後，於 50 °C 反應 10 分鐘，續冰浴 10 分鐘，在 50 °C 中用氮氣吹乾後，以 1 mL 移動相溶液回溶，用 0.45  $\mu$ m 針頭過濾器過濾至樣品瓶中，-20°C 貯存備用。T-2 之高效液相層析方法參考署授食字第 0981800375 號，使用移動相溶液 acetonitrile / d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O = 75 / 25 (v/v)，以流速 1 mL/min 流經 LiChrospher® RP-18 (5  $\mu$ m, 4 X 250 mm) 層析管柱，利用激發波長 (excitation) 237 nm 激發物質並檢測發射波長 (emission) 370 nm 的訊號。

#### 四、結果與討論

##### 1. T-2 toxin 抗體生產

###### 1. 利用非直接競爭型酵素連結免疫法 (ciELISA) 確認抗體之專一性

本計劃以 T-2-SH-BTG 作為免疫抗原免疫兔子，將 T-2-SH-BSA (1:4, w/w) 作為抗原與費氏完全佐劑以表皮注射之方式免疫至紐西蘭大白兔，4 週後再次將抗原混合費氏不完全佐劑進行加強免疫並持續利用 cdELISA 檢測兔子血清，於第 92 週有抗 T-2 抗體產生，其 IC<sub>50</sub> 為 23 ng/mL，A<sub>0</sub> 為 0.281 (圖一)。此外亦以 T-2-CDI-BTG 作為免疫抗原免疫小鼠，結果顯示直至第 21 週尚未產生 T-2 專一性之抗體。故於第 22 週加強免疫時將抗原混合不完全佐劑加強其免疫，直至第二十八週仍無產生 T-2 專一性之抗體。接著改以 T-2-SH-BTG 作為免疫抗原免疫小鼠，且於第三週後每週利用 ciELISA 對小鼠血清進行檢測，結果顯示直至第 28 週尚未產生 T-2 專一性抗體。故於第 29 週加強免疫時將抗原混合不完全佐劑加強其免疫，結果顯示至第 41 週時還尚未產生 T-2 專一性抗體，因此於第 42 週加強免疫時再將抗原混合不完全佐劑加強其免疫，結果顯示於第 48 週老鼠血清中仍無產生 T-2 專一性抗體。

###### 2. 建立 ELISA 以檢測 T-2 toxin

ciELISA 中 T-2-SH 接合載體蛋白質的競爭最顯著，因此使用 T-2-SH 接合辣根過氧化氫酶，並比較不同 pH 值的接合環境 (pH 5.7、pH 7.0 與 pH 9.6) 於 cdELISA 中的效果，由結果可知 T-2-SH-HRP (1:4, w/w) 在三種 pH 值環境反應於 cdELISA 檢測中皆有明顯的競爭效果，其 IC<sub>50</sub> 分別為 67、40.3 與 37.9 ng/mL，A<sub>0</sub> 分別為 0.49、0.664 與 0.514 (圖二 a)。由於 ELISA 於最濃的條件 (抗體稀釋 500 倍與 T-2-HRP 稀釋 500 倍) 中，其吸光值未達 1.0，因此將 T-2-SH-HRP (pH 9.6) 濃縮 4 倍後再次檢測，其 IC<sub>50</sub> 為 4.33 ng/mL，A<sub>0</sub> 為 1.24，而 T-2-CDI-HRP (1:8, w/w)、T-2-CDI-OVA-HRP (1:8, w/w) 與 T-2-formaldehyde-HRP (1:8, w/w) 於 cdELISA 檢測中皆無競爭效果 (圖二 b)。

###### 3. T-2 免疫層析試紙開發

小分子免疫層析試紙是使用競爭型原理，即抗體奈米金粒子呈色數目跟樣品中分析物的含量呈反比 (樣品中的分析物愈多，所呈顏色愈少)。在 test line 畫上不同比例的 T-2 載體蛋白 (T-2-SH-BSA)，control line 畫上二級抗體以捕捉抗體與金粒子接合物，其各組成分如圖三所示。因此我們在試紙上 test line 畫上不同比例的 T-2 載體蛋白 (T-2-SH-BSA)，並使用

不同 T-2 抗體量的奈米金粒子接合物，分別加入濃度 0 ng/mL 的標準品，比較顯色結果。在 T-2-SH-BSA(1:10) 與 7.5  $\mu$ g T-2 抗體-奈米金粒子的條件下，顯色效果相對較好(圖四)，但是此抗體之專一性仍不夠強，所呈現之顏色相對較弱。以此條件再進行競爭測試，在 96 孔盤中加入不同濃度的 T-2 標準品 (0~5000 ng/mL)，將組裝好的試紙垂直插入 well 中。當樣品含有 T-2 存在時 (positive sample)，會出現一條紅線；當樣品中 T-2 不存在時 (negative sample)，則會出現兩條紅線。以 T-2 多株抗體所建立的免疫層析試紙其偵測 T-2 的最低限制含量為 500 ng/mL (圖五)。

#### 4. Fumonisin B1 免疫層析試紙開發

本計劃將合成好的奈米金粒子探針及 FmB1 標準品 (0–50 ng/mL) 加至 96 微孔盤孔洞中混合均勻後，再將免疫層析試紙插入，由圖中可知 FmB1 免疫層析試紙能偵測 FmB1 的最低濃度為 0.5 ng/mL。當 FmB1 的濃度高於 0.5 ng/mL 時，可完全佔據抗體的接合位，使抗體-奈米金粒子探針無法和 test line 上的 FmB1-OVA 接合，因此可看到一條紅線出現在 Control line 上；當 FmB1 的濃度低於 0.5 ng/mL 時，抗體-奈米金粒子探針會和 test line 上的 FmB1-OVA 接合，也會和 Control line 上的二級抗體接合，因此可看到兩條紅線(圖六)。

#### 5. Zearalenone 免疫層析試紙開發

本計劃將合成好的奈米金粒子探針及 Zea 標準品 (0–100 ng/mL) 加至 96 孔盤孔洞中混合均勻後，再將免疫層析試紙插入，由圖中可知 Zea 免疫層析試紙能偵測 Zea 的最低濃度大於 5 ng/mL (圖七)，本計劃所製備之 Zea 免疫層析試紙敏感度已達到檢測標準，接著利用此 Zea-OVA 接合物與 FmB1-OVA 接合物分別畫於 test line T2 和 T1 位置，來開發可同時檢測多重毒素之試紙。

#### 6. Fumonisin B1 及 Zearalenone 多重免疫層析試紙之開發

本計劃將合成好的奈米金粒子探針分別加入 FmB1 標準品 (5 ng/mL) 及 Zea 標準品 (1000 ng/mL) 加至微孔盤孔洞中混合均勻後，再將置備好免疫層析試紙插入，由圖六中可知，當樣品中皆未含有 FmB1 及 Zea 時，則 T1 及 T2 位置皆會有紅線產生；當 Zea 濃度 1000 ng/mL 但未含有 FmB1，因此於 T1 位置紅線明顯減弱或消失；當 FmB1 濃度 5 ng/mL 但未含有 Zea，因此於 T2 位置紅線明顯減弱或消失；當 Zea 濃度 1000 ng/mL 且含有 5 ng/ml FmB1 時 T1 及 T2 位置紅線明顯減弱或消失，Control line 一直有紅色線出現顯示整體分析結果完成(圖八)。由於檢測雙重毒素之試紙，兩者之抗體與金粒子會彼此影響，仍待找出適合之反應條件來改善測試靈敏度。

#### 7. 利用 SELEX 篩選 T2 aptamer

我們將 2 mg 的 T2 毒素以化學接合連接到磁珠或 DEAE cellulose 上製備 T2 毒素之親和層析管柱後，取 200 pmol 核酸序列資料庫經過 T2 毒素之親和管柱，在適當溶液條件下使其與 T2 毒素結合，接著將吸附結合在管柱之核酸適體 (aptamer) 洗出後，跑膠再以 PCR 擴增，將 PCR 擴增產物再次經過親和層析管柱次之循環以期得到真正對 T2 毒素具有專一性結合的核酸適體。但經過 PCR 增幅後在經過管柱吸附分離後，核酸適體喪失其專一性，所以一直無法篩選

出具有親和性高之T2適體。

## 8. 建立 HPLC 以檢測 T-2 toxin

為了重複驗證 ELISA 分析的結果，更精確的檢測樣品，建立了 T-2 標準品的 HPLC 分析方法。將 T-2 利用 DMAP 與 2-naphthoyl chloride 接合成 T-2-NC，使用移動相 (acetonitrile : d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O = 75 : 25 , v/v) 序列稀釋 T-2-NC，並注入不同量的 T-2-NC (0.1-4 ng) 至 HPLC 後利用螢光檢測器分析結果。在注入 T-2-NC 後的第 3.06 – 4.75 分鐘、5.27 – 5.92 分鐘與 9.06 – 10.2 分鐘出現波峰 (圖九 a)，分別計算其面積，只有第 5.27 – 5.92 分鐘的波峰所計算出來的面積成倍數差距，並建立標準曲線 (圖九 b)。再分析 2-NC 的結果，只有於第 3.06 – 4.75 分鐘出現波峰 (圖九 c)，因此認定第 5.27 – 5.92 分鐘是 T-2-NC。

## 五、計畫成果自評

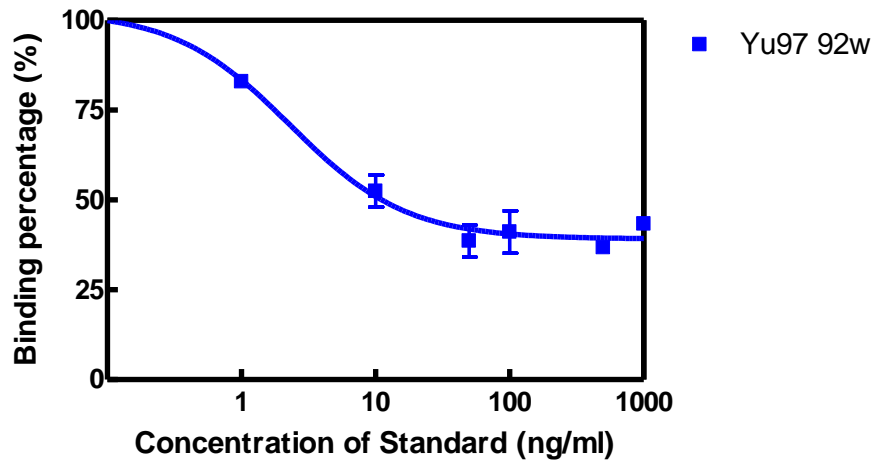
本研究主要目的是分別針對 T-2 毒素(trichothecene A) 與恩鐮孢菌素 B (enniatin B, ENN B)和鐮孢菌酸(FA)生產單株抗體以及核酸試體及開發免疫層析法檢測多重黴菌毒素。目前此一計畫是多年期計畫第三年，目前有關 T-2 毒素的多株抗體已經成功出來，至於 T-2 毒素免疫 Balb/c 小鼠仍持續進行中，有關恩鐮孢菌素以 ENB-formaldehyde-KLH 免疫小鼠目前仍未有抗體生成。目前我們利用 T-2 多株抗體進行免疫層析試紙開發，但是 T-2 多株層析試紙顯色仍有待改進來達到預期效果，此外結合實驗室先前生產出 FmB1 及 Zea 之多株抗體來進行鐮孢屬黴菌毒素如 FmB1 及 Zea 之多重毒素層析試檢測系統之開發，目前結果顯示以 FmB1 免疫層析試紙檢測效果最佳，其最低偵測限制為 0.5 ng/mL。第三年只要以 SELEX 選擇 T-2 毒素，ENN 和 FA 專一性之適體，但是在 T2 SELEX 篩選過程中，雖然親合層析管柱可以獲得少量之 DNA aptamer，但經過 PCR 增幅後在經過管柱吸附分離後，喪失其專一性，所以一直無法篩選出具有親和性高之 T2 適體，目前持續改進適體篩選方法來篩選。

## 六、參考文獻

- Barna-Vetro, I., Gyöngyösi, A., & Solti, L. 1994. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of Fusarium T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Applied and environmental microbiology*, 60(2), 729-731.
- CAST, 2003. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*. Council of Agricultural Science and Technology, CAST, Ames, IA.
- Chen, X., Huang, Y., Duan, N., Wu, S., Xia, Y., Ma, X., & Wang, Z. (2014). Screening and identification of DNA aptamers against T-2 toxin assisted by graphene oxide. *J. Agric. Food Chem.* 62:10368-10374.
- Chowdhury, S. R., & Smith, T. K. (2004). Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. *Poul. Sci.* 83:1849-1856.
- Chen, D., Cao, X., Tao, Y., Wu, Q., Pan, Y., Peng, D., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Wang, X., Yuan, Z. 2013. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultrasound-assisted extraction and auto solid-phase clean-up method for the determination of Fusarium toxins in animal derived foods. *J Chromatogr A.* 1311:21-29.
- Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P., & Croubels, S. 2013. Quantitative determination of the Fusarium mycotoxins beauvericin, enniatin A, A1, B and B1 in pig plasma using high

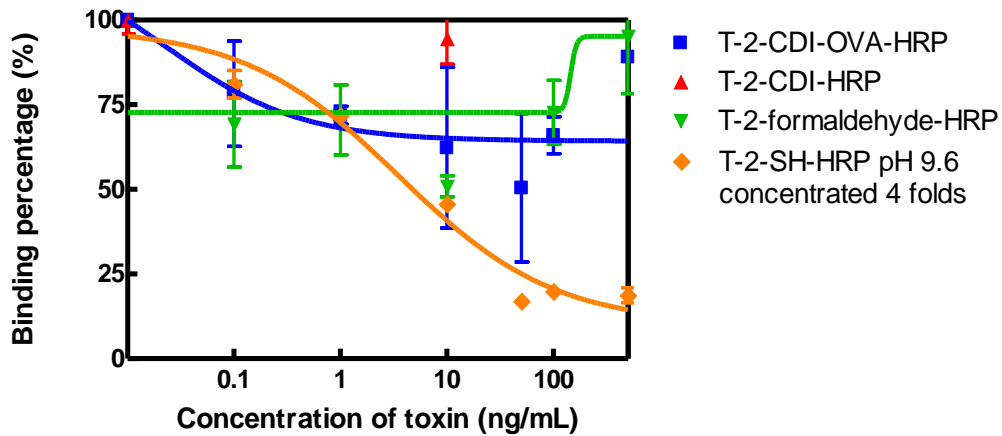
- performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 106, 212-219.
- Fan, T. S. L., Zhang, G. S., Chu, F. S., 1984. An indirect ELISA for T-2 Toxin in biological fluids. *J. Food Prot.* 47:964-968.
- Gendloff, E. H., Pestka, J. J., Dixon, D. E., and Hart, L. P. 1987. Production of a monoclonal antibody to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites. *Phytopathology* 77:57-59.
- Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., & Berthiller, F. (2016). Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b03413.
- IARC, 1993. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human, Vol.56. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, pp.
- IARC 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, 82, 171-300. 489-521.
- Molinelli, A., Grossalber, K., Führer, M., Baumgartner, S., Sulyok, M., Krska, R. 2008. Development of qualitative and semiquantitative immunoassay-based rapid strip tests for the detection of T-2 toxin in wheat and oat. *J. Agric. Food Chem.* 56:2589-2594.
- Logrieco, A., Rizzo, A., Ferracane, R., & Ritieni, A. (2002). Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 82-85.
- Official Journal of the European Union. Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. L12-15
- Porter, J. K., Bacon, C. W., Wray, E. M., & Hagler, W. M. (1995). Fusaric acid in *Fusarium moniliforme* cultures, corn, and feeds toxic to livestock and the neurochemical effects in the brain and pineal gland of rats. *Nat. Toxins* 3:91-100.
- Rhouati A, Yang C, Hayat A, Marty J. L. 2013. Aptamers: a promising tool for ochratoxin A detection in food analysis. *Toxins* 5:1988-2008
- Svingen, T., Lund Hansen, N., Taxvig, C., Vinggaard, A. M., Jensen, U., Have Rasmussen, P. 2016. Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high-content imaging platform. *Environ. Toxicol.* 32:1658-1664.
- Zhang, M., Wang, Y., Yuan, S., Sun, X., Huo, B., Bai, J., Peng, Y., Ning, B., Liu, B., & Gao, Z. (2019). Competitive fluorometric assay for the food toxin T-2 by using DNA-modified silver nanoclusters, aptamer-modified magnetic beads, and exponential isothermal amplification. *Microchimica Acta*, 186, 219.
- Yoshizawa, T., Kohno, H., Ikeda, K., Shinoda, T., Yokohama, H., Morita, K., Kusada, O., & Kobayashi, Y. (2004). A practical method for measuring deoxynivalenol, nivalenol, and T-2 and HT-2 toxin in foods by an enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68, 2076-2085.

附圖

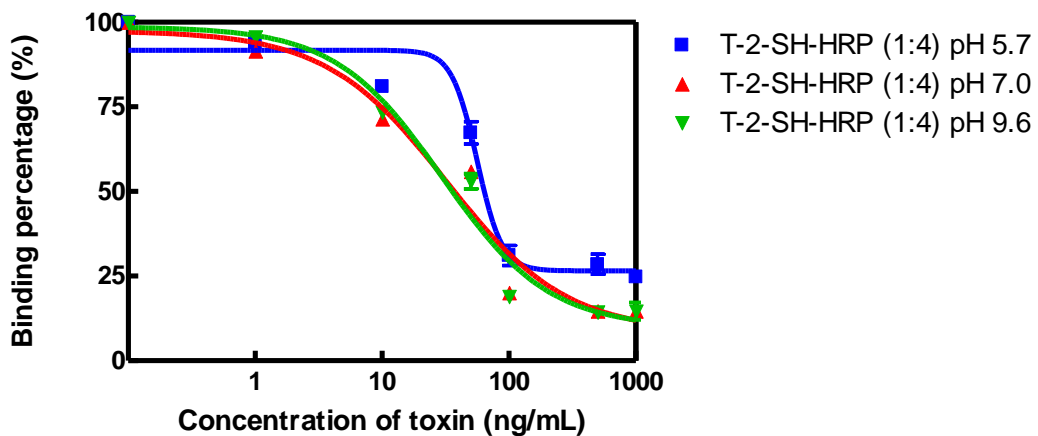


圖一、利用 cdELISA 檢測以 T-2-SH-BSA (1:4, w/w) 作為抗原免疫紐西蘭大白兔之血清抗體專一性。於 96 孔盤中，加入紐西蘭大白兔之血清 (以 0.01M PBS 稀釋 500 倍)，接著加入 T-2 標準品與 T-2-SH-HRP (1:4, w/w) pH 9.6 (4 倍濃縮) (以 0.01M PBS 稀釋 1,000 倍)，最後以 TMB 呈色後，讀其吸光值。由圖可知，紐西蘭大白兔於第 92 週時，有對 T-2 具專一性抗體之產生， $IC_{50}$  為 23 ng/mL， $A_0$  為 0.281。

(a)



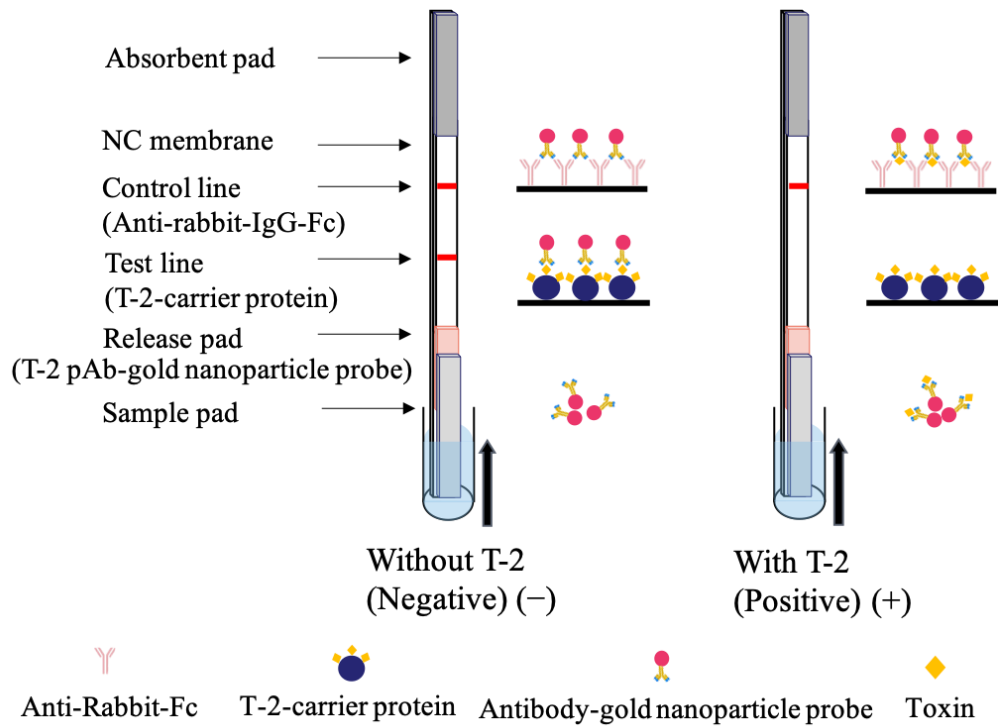
(b)



圖二、利用 cdELISA 檢測 T-2-HRP 接合之效果

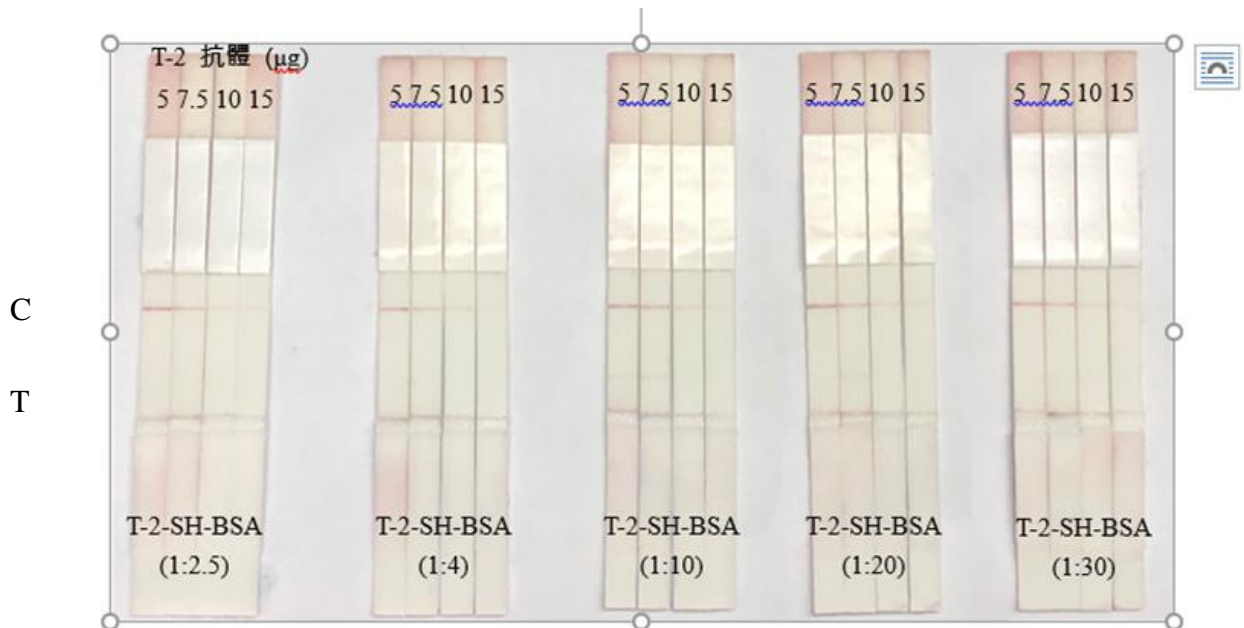
(a)於 96 孔盤中，加入 T-2 抗體 (以 0.01M PBS 稀釋 500 倍)，再加入 T-2 標準品與 T-2-HRP (以 0.01M PBS 稀釋 500 倍)。以 T-2-SH-HRP (1:4, w/w) pH 5.7、pH 7.0 與 pH 9.6 作為競爭時所用之毒素-酵素接合物的  $IC_{50}$  分別為 67、40.3 與 37.9 ng/mL， $A_0$  分別為 0.49、0.664 與 0.514。(b) 將 T-2-SH-HRP pH 9.6 濃縮 4 倍後，再將其用於 cdELISA 檢測， $IC_{50}$  為 4.33 ng/mL， $A_0$  為 1.24。而以 T-2-CDI-HRP、T-2-CDI-OVA-HRP 與 T-2-formaldehyde-HRP 作為競爭時所用之毒素-酵素接合物皆無競爭效果 (b)。



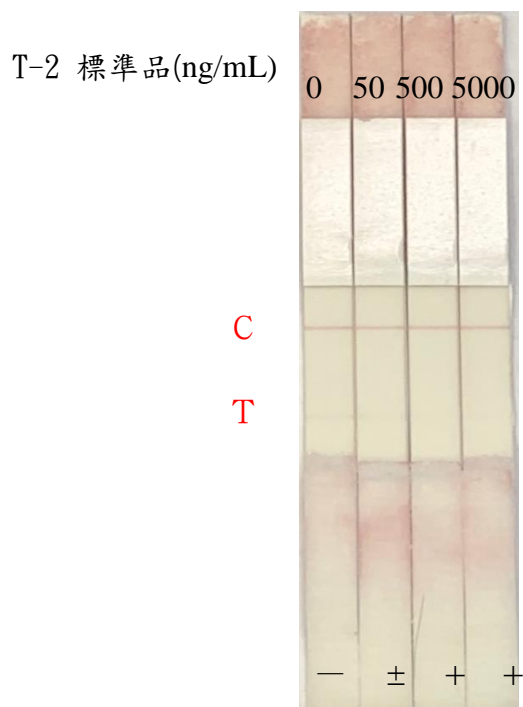


圖三、T-2 免疫層析試紙分析法之示意圖

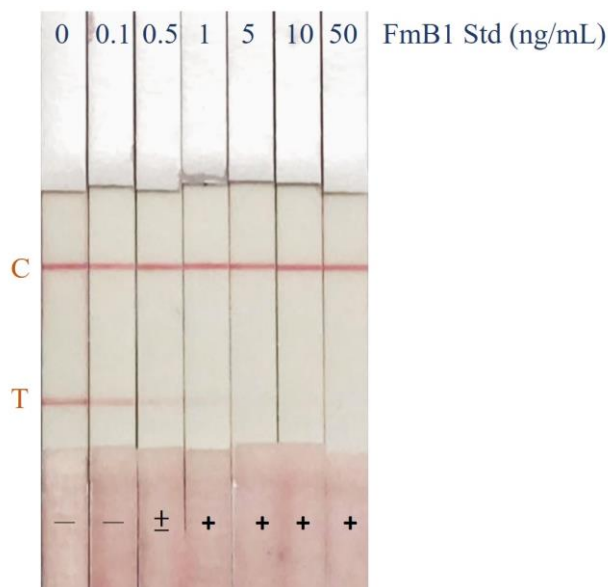
於 NC membrane 分別畫上 0.25  $\mu\text{L}$  anti-rabbit-IgG-Fc (以 0.01 M PBS 稀釋 10 倍) 與 0.25  $\mu\text{L}$  T-2 接合載體蛋白質，作為 control line 與 test line，再將 10  $\mu\text{L}$  T-2 抗體接合奈米金粒子探針加至 released pad 並置於 NC membrane 上。於 96 孔盤中加入 150  $\mu\text{L}$  樣品後放入組裝好之免疫試紙，反應 15 分鐘後，即可用肉眼觀察結果。



圖四.在 test line 畫不同比例的 T-2 載體蛋白 (T-2-SH-BSA)，並使用不同 T-2 抗體量的奈米金粒子接合物，分別加入濃度 0 ng/mL 的標準品，比較顯色結果。在 T-2-SH-BSA (1:10) 與 7.5  $\mu\text{g}$  T-2 抗體-奈米金粒子的條件下，顯色效果相對較好。

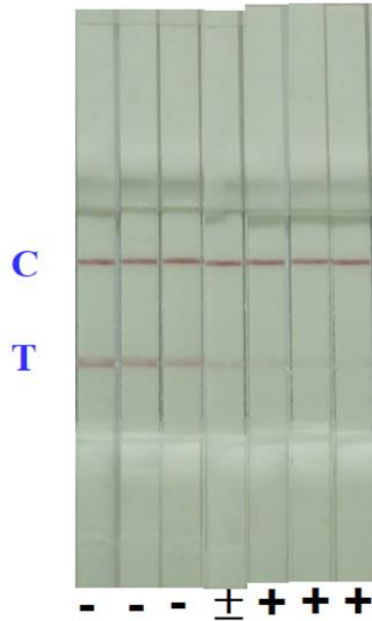


圖五、在微孔盤中加入不同濃度的 T-2 標準品 (0-5000 ng/mL)，將組裝好的試紙垂直插入 well 中。當樣品含有 T-2 存在時 (positive sample)，會出現一條紅線；當樣品中 T-2 不存在時 (negative sample)，則會出現兩條紅線。以 T-2 多株抗體所建立的免疫層析試紙其偵測 T-2 的最低限制含量為 500 ng/mL。

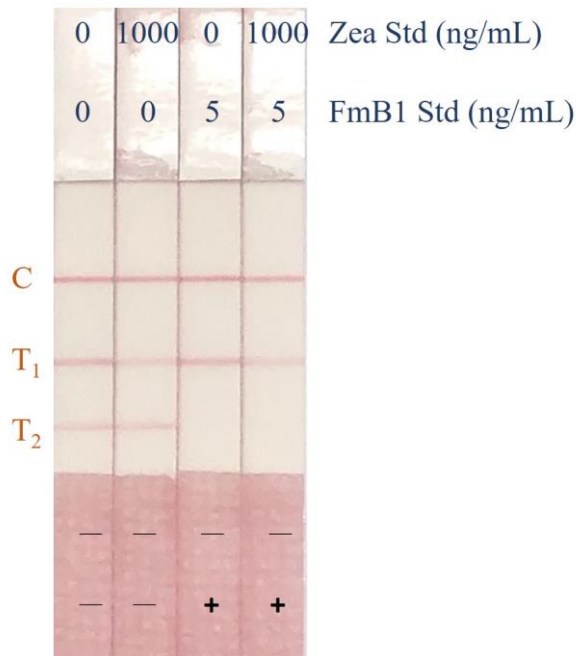


圖六、在 test line (T) 畫上 FmB1 載體蛋白接合物 (FmB1-OVA)，並使用 FmB1 抗體與奈米金粒子接合物，分別加入濃度 0-50 ng/mL 的 FmB1 標準品，比較顯色結果。在 FmB1 毒素在 0.5 ng/mL 時 test line 顏色消失，表示樣品最低偵測限制為 0.5 ng/mL 左右

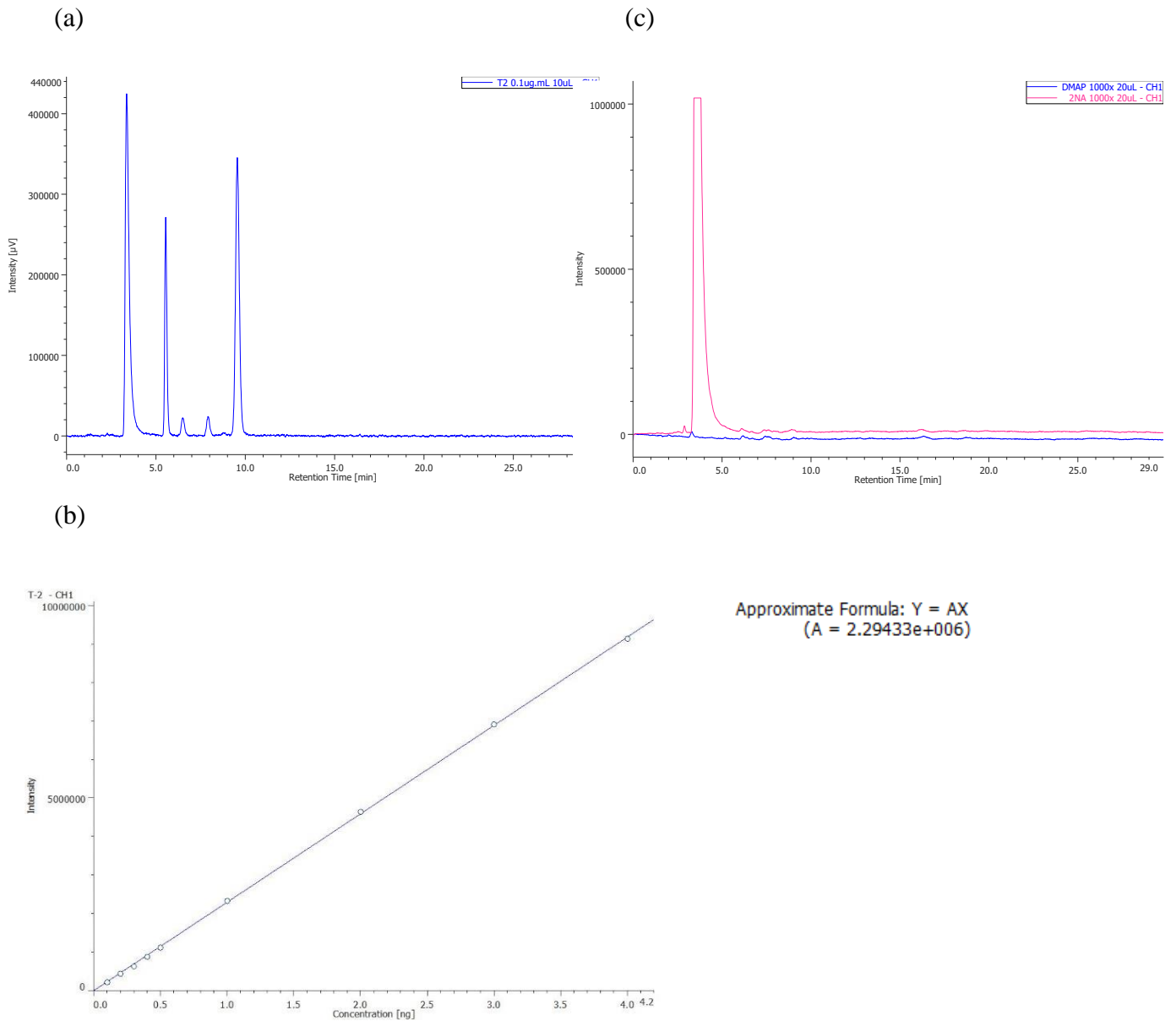
ZEA (ng/ml) 0 0.1 1 5 10 50 100



圖七、當 Zea毒素含量在5 ng/mL時T line 紅線仍未消失，顯示 Zea免疫層析試紙能偵測 Zea的最低濃度大約為 5 ng/mL左右



圖八、Zea-OVA接合物與FmB1-OVA 接合物分別畫於test line T1 和T2位置，來開發可同時檢測多重毒素之試紙。當Zea濃度為1000 ng/mL與FmB1濃度為5 ng/ml時T1及T2位置紅線明顯減弱或消失



圖九、利用 HPLC 分析 T-2 毒素

(a)將 T-2-NC 注入 HPLC 後利用螢光檢測器分析結果，在第 3.06 – 4.75 分鐘、5.27 – 5.92 分鐘與 9.06 – 10.2 分鐘出現波峰。(b)注入不同量的 T-2-NC (0.1-4 ng) 以第 5.27 – 5.92 分鐘之波峰建立標準曲線。(c)取 6.3 mg DMAP 與 4.9 mg 2-NC 分別溶於 2 mL acetonitrile/d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (78 : 25, v/v)，各取 20 μL 注入 HPLC 後利用螢光檢測器分析結果，只有 2-NC 於 3.06 – 4.75 分鐘有波峰。

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：余豐益		計畫編號：106-2320-B-040-013-MY3			
計畫名稱：黴菌毒素單株抗體與核酸適體的生產及快速檢測多重毒素之免疫奈米層析試紙開發					
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)	
國內	學術性論文	期刊論文	0	篇	
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
國外	學術性論文	期刊論文	1	篇	Wu, S. W., Ko, J. L., Liu, B. H., & Yu, F. Y.* 2020. A sensitive two-analyte immunochromatographic strip for simultaneously detecting aflatoxin M1 and chloramphenicol in milk. Toxins, 12(10), 637-649.
		研討會論文	0		
		專書	0	本	
		專書論文	0	章	
		技術報告	0	篇	
		其他	0	篇	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	1		碩士生兼任任研究助理1名協助毒素接合動物免疫
		博士生	1		博士班兼任研究助理1名 免疫層析試紙製備與適體篩選 Wu, S. W., Ko, J. L., Liu, B. H., & Yu, F. Y.* 2020. A sensitive two-analyte immunochromatographic strip for simultaneously detecting aflatoxin M1 and chloramphenicol in milk. Toxins, 12(10), 637-649.
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士級研究人員	0		
		專任人員	0		

<p>其他成果 (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>本計畫擬開發上述毒素之專一性抗體，並且建立快速免疫檢測分析法來分析調查食品中T-2毒素(trichothecene A)與恩鐮孢菌素B (enniatin B, ENN B)和鐮孢菌酸(fusaaric acid)含量. 其中T-2免疫分析法已經成功建立.</p>
--	---