

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 馬兜鈴酸單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快速免疫層析試紙之開發
------------	---

執行計畫學生：楊宸祐

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-044-B

研究期間：107年07月01日至108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 108年04月30日

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫名稱： *

* 馬兜鈴酸單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快速免疫層析試紙之開發 *

* *

執行計畫學生：楊宸祐

學生計畫編號：NSC107-2813-C-040 -044 -B

研究期間：107 年 7 月 1 日至 108 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 108 年 03 月 30 日

摘要 (Abstract)

馬兜鈴酸 (Aristolochic acid, AA) 為硝基菲羧酸存在於馬兜鈴 (*Aristolochia*) 及細辛屬 (*Asarum*) 等馬兜鈴科的植物中 (如: *Aristolochia clematitis*、*Aristolochia fanchi* 及 *Aristolochia manshuriensis*)，具致癌性及容易引發基因突變，國際癌症研究機構 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 於 2008 年將利用馬兜鈴屬植物製作的草藥列為第 1 類致癌物，並將馬兜鈴酸類的天然混合物列入 2A 類致癌物。馬兜鈴酸分子量為 341.28 Dalton 的小分子化合物，只具有抗原性 (Antigenicity) 而不具有免疫原性 (Immunogenicity)，若直接將馬兜鈴酸免疫實驗動物並不足以引發免疫反應，因此馬兜鈴酸需要與載體蛋白質結合成具有免疫原性的抗原，才可用來免疫實驗動物以製備馬兜鈴酸的專一性抗體。本計劃嘗試以 carbodiimide 法將馬兜鈴酸與胎牛胸腺蛋白質 (Bovine thyroglobulin, BTG) 接合為具有免疫原性的抗原，並以此抗原透過腹腔注射免疫 BalB/c 小鼠，藉此產生對馬兜鈴酸具有高度專一性抗體。本計畫利用直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA) 發現在免疫後第 37 週的一號及二號小鼠血清內已有產生對馬兜鈴酸具有高度專一性抗體，但一號小鼠血清內對馬兜鈴酸的專一性抗體效價略低於二號小鼠，一號小鼠及二號小鼠血清中抗體抑制 50% 抗原-酵素接合物與抗體接合所需的抗原濃度 (IC₅₀) 分別為 21 ng/mL 及 25 ng/mL。因此本計畫利用二號小鼠進行融合瘤實驗，取其脾臟與骨髓瘤細胞 (P3/NS-1/1-AG4-1 myeloma

cells) 融合篩選出對馬兜鈴酸具有專一性的細胞株，成功的製備針對馬兜鈴酸具有專一性的單株抗體 (10D9E10F2)，並且開發出檢測馬兜鈴酸的直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法，其 IC_{50} 為 0.79 ng/mL。本計畫於市面上收集 20 個中草藥樣品利用 cdELISA 及 immunostrip 進行檢測，結果可知所有的樣品皆含有馬兜鈴酸，其陽性率高達 100%，其馬兜鈴酸的含量介於 32 ng/g – 2473 ng/g。為了確認本計畫建立之 cdELISA 的正確性，本計畫也建立了高效液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 用於檢測樣品，其標準曲線之相關係數為 0.999；截距公式為 $y = 4715.88x + 20314.6$ ；而此 HPLC 分析法檢測極限為 2 ng。由於 cdELISA 的結果需要使用專業儀器的讀取，因此為了開發一套簡便且適合一般大眾的檢測方式，本計畫擬於往後開發出檢測馬兜鈴酸的快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip, immunostrip) 用於快速且靈敏地檢測中草藥中馬兜鈴酸的含量，為社會盡一份心力。

目錄 (Index)

主題	頁數
摘要	1
一、緒論	
1.1 研究起源	5
1.2 馬兜鈴酸基本性質	6
1.3 馬兜鈴酸相關研究	7
1.4 酵素連結免疫分析法	7
1.5 快速免疫層析試紙	9
1.6 研究動機及研究問題	10
二、材料方法	
2.1 實驗藥品及動物	12
2.2 實驗儀器	12
2.3 實驗方法	13
2.3.1 製備不同馬兜鈴酸 (Aristolochic acid) 接合物	13
2.3.2 免疫小鼠	14
2.3.3 小鼠多株抗體的純化	15
2.3.4 利用 direct competitive ELISA 確定抗體效價及專一性	15
2.3.5 細胞融合法	15

2.3.6 單株抗體的篩選、生產及純化	16
2.3.7 鑑別單株抗體特性	17
2.3.8 樣品萃取	17
2.3.9 建立酵素連接免疫吸附分析法檢測樣品中馬兜鈴酸含量 . . .	17
2.3.10 開發馬兜鈴酸快速免疫層析試紙	18
2.3.11 HPLC 分析法之建立	20
三、實驗結果	
3.1 利用 cdELISA 檢測 AA 專一性抗體之效價及專一性	22
3.2 鑑別抗體的特性	25
3.3 製備奈米金粒子探針	26
3.4 HPLC 標準曲線之建立	26
3.5 樣品分析	28
四、討論	30
五、參考文獻	34

一、緒論

1.1 研究起源

Aristolochic acid 為硝基菲羧酸且具致癌性及容易引發基因突變，這類有機化合物是自然存在於馬兜鈴屬 (*Aristolochia*) 及細辛屬 (*Asarum*) 等馬兜鈴科的植物中，而其中也有作為中藥材的植物，華人認為相較於西藥，中草藥有性溫及副作用低的優點，因此利用中草藥治病已有數千年的歷史。西元 1993 年，比利時發現多位年輕女性因服用含中草藥成分的減肥藥後，出現急速的腎臟功能惡化，經過研究發現一家減肥診所誤將含有 Aristolochic acid 的中草藥 - 廣防己代替了原來藥方中無毒的粉防己。此外有研究指出 Aristolochic acid 是造成腎病變的罪魁禍首，在最近幾年的研究發現 Aristolochic acid 造成的腎病變也包括區域性巴爾幹半島腎病變 (Balkan Endemic Nephropathy, BEN)，這同時也會造成泌尿道上皮的惡性腫瘤形成，台灣於西元 2001 年至 2002 年間也發生 33 例誤用含有 Aristolochic acid 中草藥之情況，國際癌症研究機構於西元 2008 年將利用馬兜鈴屬植物製作的中草藥列為第 1 類致癌物 (對人類有確認的致癌性)，並將馬兜鈴酸類的天然混合物列入 2A 類致癌物 (對人類很可能有致癌性)。因此各國皆相繼禁用含有 Aristolochic acid 的中草藥。有鑑於亞洲國家食用中草藥的習性，開發快速免疫檢測分析方法來檢測中藥材中有無 Aristolochic acid 為一迫切而且重要之工作。

1.2 馬兜鈴酸基本性質

馬兜鈴酸 (Aristolochic acid) 化學名為 (8-Methoxy-6-nitrophenanthro[3,4-d][1,3]dioxole-5-carboxylic acid)，分子量為 341.28 Dalton 化學結構式如 Figure 1.，存在於部分馬兜鈴科植物。有研究指出 Aristolochic acid 容易和 DNA 結合，進而接上 DNA 的核苷酸，造成基因的突變產生致癌性，而當 Aristolochic acid 被肝臟代謝後也會增加罹患肝癌的風險。

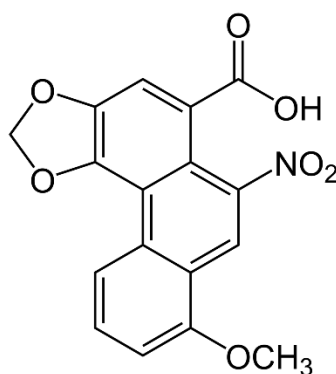


Figure 1. 馬兜鈴酸 (Aristolochic acid) 結構式

根據衛生福利部國家中醫藥研究所在西元 2011 年發表的【誤用馬兜鈴科植物為中藥材之省思】，可得知 Aristolochic acid 會引起腎病變，當誤食含有馬兜鈴酸的中草藥，初期腎衰竭症狀並不明顯且尿液檢查也無明顯異常，半數以上病患血壓正常，但患者通常有嚴重貧血。與其他疾病引起的腎衰竭相比，Aristolochic acid 所引起的腎病變病患的貧血發生較早且較嚴重。因此這類患者通常透過抽血檢查時才意外發現腎功能異常，或等到尿毒素引發了噁心嘔吐、全身不適才就診。然而，若誤食含有馬兜鈴酸的中草藥即便停藥後，大部分病患腎功能損害仍會持續快速進展，服

藥的時間愈長，累積劑量愈大，腎功能損壞也愈快。因此台灣衛生福利部於西元 2003 年 11 月正式禁用關木通、廣防己、青木香、天仙藤、馬兜鈴等五種含 Aristolochic acid 的中藥材，並註銷含有馬兜鈴酸中藥製劑的五十張藥證。

1.3 馬兜鈴酸相關研究

目前最常用來檢測 Aristolochic acid 的方法主要有 TLC (Agrawal & Laddha, 2017; Ioset, Raelison & Hostettmann, 2003) 和 HPLC (Liu et al., 2011; Song et al., 2014) 上述兩種方法雖有很好的準確性，但這兩種方法不僅耗時又花費昂貴，再加上檢測前樣品的準備較為繁複，而操作簡易且相對成本較低、靈敏度較高的 ELISA 是一個能快速檢測其含量的方法，所以利用 ELISA 檢測 Aristolochic acid 含量是另一可行的辦法。由於 ELISA 的結果需要使用專業儀器的讀取，因此開發一套簡便且適合一般大眾的快速免疫層析試紙是迫切需要的。

1.4 酵素連結免疫分析法

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特性，來對樣品進行檢測，並可以配合酵素的呈色作用，產生能夠被肉眼區分或藉由酵素免疫分析儀器定量之呈色物質，並可以藉由顏色的深淺來對抗原進行定量的分析，因此可以達到檢測樣品中特定抗原的與否，而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) 及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酵素連結免疫分析法來做為檢測的方法，接下來簡單的描述本方法的原理。

直接競爭型酵素連結免疫分析法

此方法是將單株抗體吸附在固相基質上，再加入蛋白質填補空隙，填補完以後加入抗原標準品或樣品與接合酵素的抗原，而抗原標準品及樣品中的抗原會與接合酵素的抗原競爭固相基質上的抗體結合位，最後加入酵素呈色物質即可呈色，呈色時顏色越淺代表抗原的濃度越高 (Figure 2.)。

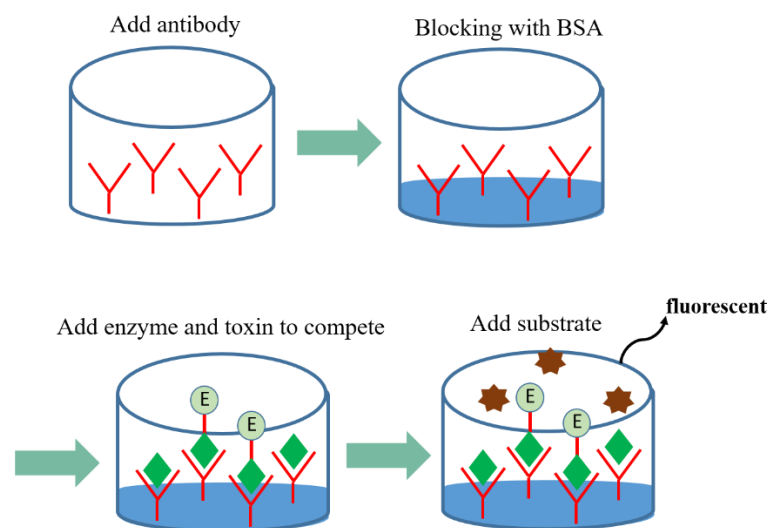


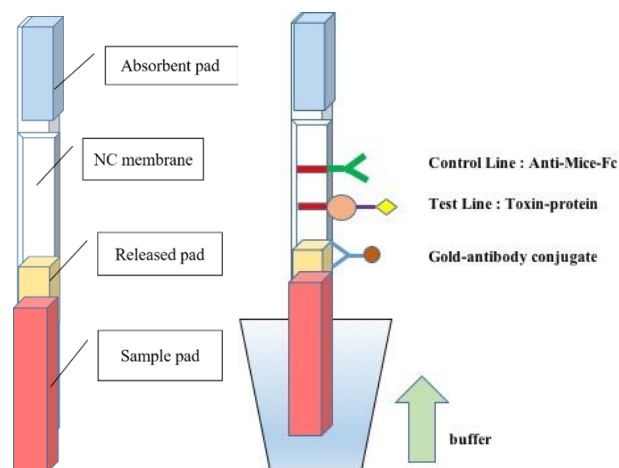
Figure 2. 直接競爭型酵素連結免疫分析法

酵素連結免疫分析法的優點為相較於利用 HPLC 和 TLC 檢測樣品，檢測前的樣品準備較簡單，實驗的時間也較為快速，成本低且操作簡單，是一個相對快速而且實用的檢測方法。

1.5 快速免疫層析試紙

快速免疫層析試紙是一種以膜為基質的免疫分析法，這類分析法極為快速簡便且能以目視的方式判讀結果。其主要原理為將硝化纖維膜作為基質，再將抗原及作為控制組的二級抗體吸附在基質上，接著將奈米金粒子作為標記物接合抗體做成探針，最後將奈米金粒子探針與樣品同時通過基質進行層析，當樣品中含有超過一定量之待測抗原時，奈米金粒子探針會和樣品中的抗原接合，因此不會與抗原區 (test line) 之抗原產生顏色，再經由毛細現象在基質的控制組區 (control line) 辨識到二級抗體而產生顏色；反之，當樣品中不含抗原時，奈米金粒子探針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。

(A)



(B)

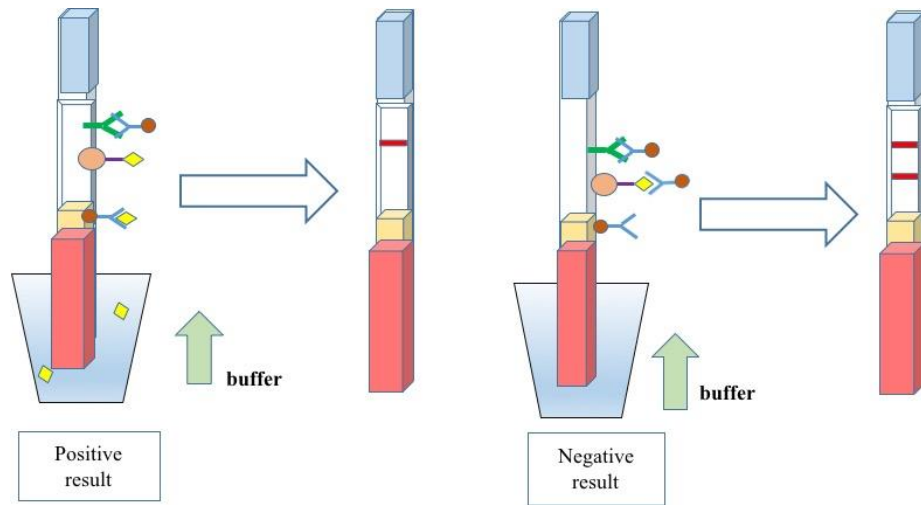


Figure 3. (A) 免疫層析試紙組成份與 (B) 分析結果。

1.6 研究動機及研究問題

目前檢測 Aristolochic acid 的方法主要有薄層層析法 (TLC) 和高效液相層析色譜法 (HPLC)，這兩種方法雖然檢測結果具有一定的準確性，但操作步驟較為繁複，且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。ELISA 在操作較為快速、簡便。因此製備出高敏感度與高專一性的 Aristolochic acid 抗體用以建立 ELISA，再以此 Aristolochic acid 抗體開發快速免疫層析試紙是迫切需要的。因此本計畫將分為三個子目標

【子目標一】製備專一性 Aristolochic acid 的單株抗體

- 製備免疫抗原
- 將免疫抗原打入 BalB/c 小鼠產生免疫反應 (Immunization)
- 細胞融合法

-單株抗體的生產與篩選

【子目標二】建立酵素連接免疫吸附分析法檢測樣品中馬兜鈴酸含量

-樣品製備

-直接競爭型 ELISA

【子目標三】開發馬兜鈴酸快速免疫層析試紙

-合成奈米金粒子

-製備奈米金粒子探針

-製備免疫試紙

二、 材料與方法

2.1 實驗藥品及動物

、 Bovine serum albumin (BSA) 、 Aristolochic acid Freund's complete adjuvant 、 Aristolochic acid (mixture) 、 Thyroglobulin from bovine thyroid (BTG) 、 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC) 、 N-hydroxysuccinimide (NHS) 、 Polyethylene Glycol 1500 (PEG-1500) 、 HAT medium supplement (50X) 、 HT medium supplement (50X) 購於 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 。 Polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) 購於 Merck (Darmstadt, Germany) 。 Aqueous Hydrochloric Acid (HCl) 、 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 購於 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, U.S.A.) 。 Horseradish peroxidase (HRP) 購於 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 。 Microtiter plates 購於 Nunc (Roskild, Demark) 。 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, K-Blue) 購於 Neogen Corp. (Lexington, KY) 。 BALB/c 小鼠購於國家動物中心 。

2.2 實驗儀器

設備名稱	廠牌及型號
HPLC pump	JASCO PU-4180
Photo diode array detector	JASCO MD-4010
Interface box	JASCO LC-NetII/ADC
HPLC autosampler	JASCO AS-4050
Centrifuge	HERMLE Z323K

pH meter	METTLER TOLEDO MP220
Vortex	GENIE Vortex-2
Auto strip washer	Bio TEK INSTRUMENT ELx50
Microplate reader	Molecular Device E max
Incubator	LAB-LINE L-C INCUBATOR
Refrigerator	SHOCKLOCK
Hot plate	Fargo HMS-102

2.3 實驗方法

2.3.1 製備不同馬兜鈴酸 (Aristolochic acid) 接合物

由於 Aristolochic acid 為小分子毒素，只具有抗原性而沒有免疫原性，故必須以載體蛋白質接合放大其分子量，本計劃參考 Yu 的方法 (Yu, Lin, & Su, 2006) 利用 carbodiimide 法將載體蛋白 BTG 與 Aristolochic acid 接合，製備出具有刺激免疫反應的抗原 AA-BTG。

2.3.1.1 接合 Aristolochic acid 與 BTG

秤取 1mg 的 Aristolochic acid 溶於 200 μ l DMSO 中，再秤取 1.5 mg EDC 溶於 15 μ l DMSO 中，接著取 1 mg NHS 加入 10 μ l DMSO，接著將 EDC 溶液與 NHS 溶液加入 Aristolochic acid 溶液中並於室溫下攪拌兩小時。秤取 2 mg BTG 溶於 200 μ l DMSO，並緩慢加入已攪拌好的 Aristolochic acid 溶液中，於室溫下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下以 0.01 M PBS 透析 72 小時。

2.3.1.2 接合 Aristolochic acid 與辣根過氧化氫酵素 (Horseradish peroxidase, HRP)

將 EDC 溶液 (1.5 mg EDC 溶於 15 μ l DMSO) 和 NHS 溶液 (1.0 mg NHS 溶於 10 μ l DMSO) 加入 Aristolochic acid 溶液 (0.5 mg Aristolochic acid 溶於 500 μ l DMSO) 中，在室溫下反應兩小時。將此混和液緩慢的加入 HRP 溶液 (4 mg HRP 溶於 400 μ l 0.2 M carbonate buffer, pH 9.6) 中，於室溫反應兩個小時後，於室溫攪拌 16 小時，最後在 4°C 下以 0.01 M PBS 透析 72 小時。

2.3.1.3 接合 Aristolochic acid 與牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)

將 EDC 溶液 (1.5 mg EDC 溶於 15 μ l DMSO) 和 NHS 溶液 (1.0 mg NHS 溶於 10 μ l DMSO) 加入 Aristolochic acid 溶液 (0.5 mg Aristolochic acid 溶於 500 μ l DMSO) 中，在室溫下反應兩小時。將此混和液緩慢的加入 HRP 溶液 (5 mg HRP 溶於 500 μ l 0.2 M carbonate buffer, pH 9.6) 中，於室溫反應兩個小時後，於室溫攪拌 16 小時，最後在 4°C 下以 0.01 M PBS 透析 72 小時。

2.3.2 免疫小鼠

製備好的抗原 (AA-BTG) 與費氏完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant) 混合均勻，再以腹腔注射方式將混合物打入小鼠體內。兩週後進行加強免疫動作，於第三週之後開始對小鼠進行尾靜脈採血，並使用 ELISA 檢測是否產生 Aristolochic acid 的專一性抗體。

2.3.3 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，離心完後取上清液即為血清，並保存於 -20°C 冰箱中。

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

在 96 孔盤中加入 100 μ l Anti-M-Fc antibody (以 0.01 M PBS 稀釋 2000 倍)，於 37°C 恆溫箱置放 2 小時後，以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應物質，接著再加入 100 μ l 的老鼠血清 (以 0.01 M PBS 稀釋)，於 37°C 恆溫箱置放 1 小時後，以 washing buffer 洗去未反應物質。再加入 200 μ l 的 blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01 M PBS)，於 37°C 恆溫箱置放 30 分鐘。以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 50 μ l Aristolochic acid 標準品 (0.01 – 10 ng/ml)，並同時加入 50 μ l AA-HRP (0.7 mg/mL，以 0.01 M PBS 稀釋 20000 倍)，置於 37°C 恆溫箱反應 1 小時。以 washing buffer 洗去未反應物質並加入 100 μ l TMB substrate，於室溫避光反應 20 分鐘後，加入 100 μ l 1N HCl 終止反應。最後以 ELISA reader 測量波長 450 nm - 650 nm 的吸光值。

2.3.5 細胞融合法

將產生 Aristolochic acid 抗體小鼠之脾臟取出剪破後，置於濾網上並

以 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 沖洗，使脾臟細胞置於 DMEM 中，離心 2000 rpm 10 分鐘，移除上清液取沈澱物 (脾臟細胞) 再加入 10 ml DMEM 培養液，將 NS-1 (小鼠骨髓瘤細胞株) 與脾臟細胞混合，離心 2000 rpm 10 分鐘，移除上清液並加入 1 ml Polyethylene Glycol 1500 (PEG 1500) 後，靜置 1 分鐘使脾臟細胞與 NS-1 充分融合，加入 1ml HT (Hypoxanthine thymidine) 培養液靜置 1 分鐘，加入 2ml HT 培養液靜置 2 分鐘，加入 4ml HT 培養液靜置 4 分鐘，加入 8ml HT 培養液後，離心 1000 rpm 10 分鐘。移除上清液後拍散細胞，將細胞加入 200 ml HAT 培養液中，最後分裝至 96 孔盤中，再置於培養箱 (37°C/6% CO₂) 中培養，待細胞菌落形成，便可利用 ELISA 測試 medium 中是否有 Aristolochic acid 抗體。

2.3.6 單株抗體的篩選、生產及純化

2.3.6.1 單株抗體之篩選

細胞融合後加入 HAT-DMEM 開始初步篩選，若為 NS-1 與脾臟細胞融合之細胞則可存活。而後再以 ELISA 篩選出能產生專一性抗體之細胞株。

2.3.6.2 單株抗體之生產

首先，在 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.5 ml 的 Pristane 使小鼠的免疫力下降。一週後，取融合瘤細胞，離心後移除上清液，加入 0.5 ml 的 DMEM 培養液中後打入小鼠腹腔中。待一至兩週，小鼠腹部開始脹大後

即可抽取腹水。

2.3.6.3 單株抗體之純化

加入與採集之腹水或細胞培養液相同體積之 100% Ammonium Sulfate 沉澱血清內的蛋白質，混合均勻後靜置 30 分鐘，離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C。離心完畢去除上清液，加入一半體積的去離子水回溶沉澱物，再加入一半體積之 100 % Ammonium Sulfate，靜置 30 分鐘後，離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C，將沉澱物以一半體積去離子水回溶並置入透析袋，在 1 L 的 0.01 M PBS 環境中透析 72 小時後，保存於 -20°C 冰箱備用，即為純化好的單株抗體。

2.3.7 鑑別單株抗體特性

利用 monoclonal antibody isotyping kit 進行測試，取 50 µg AA 單株抗體以 0.01 M PBS 稀釋至總體積 200 µL 後，加入至 kit 所附之試管中反應 5 分鐘，插入 isotype 免疫層析試紙，待溶液牽引至試紙頂端，即可觀察結果。

2.3.8 樣品萃取

秤取 2 克樣品溶於 30 mL 0.01 M PBS，利用均質機絞碎後，再利用超音波震盪機震盪 30 分鐘，最後離心 8000 rpm 30 分鐘，吸取上清液，並以 0.45 µm 過濾器過濾後，保存於 -20°C。

2.3.9 建立酵素連接免疫吸附分析法檢測樣品中馬兜鈴酸含量

在 96 孔盤中加入 100 µl Anti-M-Fc antibody (以 0.01 M PBS 稀釋

2000 倍)，於 37°C 恆溫箱置放 2 小時後，以 washing buffer 洗去未反應物質，再加入 100 μ l 的純化後的 AA 單株抗體 (1.4 mg/mL，以 0.01 M PBS 稀釋 1000 倍)，於 37°C 恆溫箱置放 1 小時後，以 washing buffer 洗去未反應物質。再加入 200 μ l 的 blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01 M PBS)，於 37°C 恆溫箱置放 30 分鐘。以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 50 μ l Aristolochic acid 標準品 (0–50 ng/ml) 或萃取出之樣品，並同時加入 50 μ l AA-HRP (0.7 mg/mL，以 0.01 M PBS 稀釋 20000 倍)，置於 37°C 恆溫箱置放 1 小時。以 washing buffer 洗去未反應物質並加入 100 μ l TMB substrate，於室溫避光反應 20 分後，加入 100 μ l 1N HCl 終止反應。最後以 ELISA reader 測量波長 450 nm – 650 nm 的吸光值，並將分析後的樣品吸光值利用內插法插入標準曲線內，換算樣品內馬兜鈴酸的濃度。

2.3.10 開發馬兜鈴酸快速免疫層析試紙

2.3.10.1 合成奈米金粒子

配製 1 mM H₂AuCl₄ (19.7 mg H₂AuCl₄ 溶於 50 mL 去離子水)，加熱攪拌至沸騰後加入 2.5 mL 的 1% trisodium citrate 還原劑 (2.5 mg trisodium citrate 溶於 2.5 mL 去離子水)，持續沸騰 5 分鐘後降溫至室溫，即為所需之 40 nm 奈米金粒子，最後置入 4°C 冰箱備用。

2.3.10.2 製備奈米金粒子探針

將合成好的奈米金粒子以 Boric acid-Borax buffer (2 mM, pH 5.0) 稀釋 5 倍 (最終體積為 2 mL)，取 15 μ g AA 單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 μ L 10% BSA 溶液 (以孔徑 0.45 μ m 濾膜過濾)，置於室溫攪拌反應 30 分鐘，將金粒子上未接合的位置填滿。再以 13,000 rpm 30 分鐘離心移除上清液，將抗體-金粒子接合物以 0.18 mL buffer A (Tris) (20 mM, pH 8.0, 1% BSA and 0.1% sodium azide) 回溶後，置入 4°C 冰箱備用。

2.3.10.3 免疫試紙的製備

將 Aristolochic acid 的單株抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5 μ L/strip)，37°C 恆溫箱置放下烘乾。再將 0.25 μ L 的 AA-BSA 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 X 75 mm) 的 Test line 以及 Control line 的位置，置於 37°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。

2.3.10.4 免疫試紙檢測馬兜鈴酸標準品及中草藥樣品

將 200 μ L 不同馬兜鈴酸標準品 (0–100 ng/mL) 加入 96 孔盤之

well 中，再將組裝好的試紙垂直插入 well 中，樣品會經由 sample pad 會往 NC membrane 移動，等待 10 分鐘後即可目視觀察結果。最後利用免疫層析試紙讀值機，讀取 test line 上紅線的顯色強度。

20 個中草藥的樣品萃取液取 100 μ L 再加入 100 μ L 0.01 M PBS (等同將萃取液稀釋 2 倍)，將稀釋好的樣品 200 μ L 加至 96 孔盤之 well 中，再將免疫層析試紙插入 well 中，等待 10 分鐘後即可目視結果。

2.3.11 HPLC 分析法之建立

2.3.11.1 HPLC 標準曲線建立

本計劃參考 Yu 的方法 (Yu, Lin & Su, 2006) ，秤取 2 mg Aristolochic acid 溶於 DMSO，並稀釋成 0.1 μ g/mL – 100 μ g/mL，並參照下列條件進行 HPLC 分析，以面積及對應之標準品濃度製作標準曲線。

高效液相層析測定條件:

層吸管柱: Atlantis T3 Column (5 μ m)，內徑為 4.6 mm X 250 mm

移動相溶液: 幫浦 A 為甲醇，幫浦 B 為去離子水

移動相流速: 1 mL/min

梯度變化: 第 0 分鐘至第 20 分鐘時，混合比例漸漸由幫浦 A 的 60% 至 100%，第 20 分鐘至第 25 分鐘時，混合比例由幫浦 A 的 100% 至 60%，第 25 分鐘至第 30 分鐘時，持續以混合比例為 60% 的幫浦 A。

分析波長: 254 nm

2.3.11.2 HPLC 之標準品及樣品分析

取 20 μL 中草藥樣品，以 0.45 μm 過濾器過濾，再以上述的條件進行 HPLC 分析，分析位於 12.7 分 – 13.0 分的峰的面積，並利用此面積利用內插法內插至標準曲線內，即可換算出樣品中馬兜鈴酸的濃度。

三、 實驗結果

3.1 利用 cdELISA 檢測 AA 專一性抗體之效價及專一性

3.1.1 小鼠血清對於 AA 專一性抗體之效價及專一性測試

本計畫利用 AA-BTG 作為免疫抗原免疫 BalB/c 小鼠，並於免疫後第 37 週，利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對小鼠血清進行抗體的效價及專一性測試，由 Figure 4. 可知，一號小鼠及二號小鼠血清中對馬兜鈴酸之 IC₅₀ 分別為 21 ng/mL 及 25 ng/mL，A₀ (Control，無 AAI 競爭) 分別為 1.155 及 1.237，因為二號小鼠專一性與一號小鼠相近，但二號小鼠效價略高於一號小鼠，因此本計畫選用二號小鼠進行融合瘤實驗。

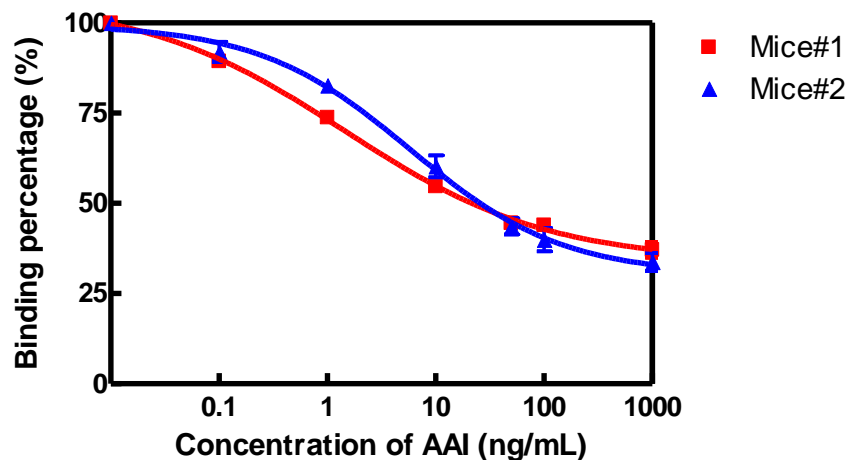


Figure 4. 利用 cdELISA 對免疫 Aristolochic acid 小鼠之血清進行抗體效價及專一性測試

3.1.2 馬兜鈴酸單株抗體之效價及專一性比較

本計畫於第 38 週加強免疫三次後，進行小鼠脾臟細胞與 NS-1 小鼠骨隨瘤細胞融合的實驗，經過融合和細胞培養的過程後，將培養液加入已

事先吸附好 anti-mouse-Fc 的 96 孔盤，再加入 AA-HRP 及 AA 標準品來篩選細胞培養液中是否有對馬兜鈴酸專一性的抗體，融合瘤細胞於 10 盤 96 孔細胞培養盤中，共 960 個 well，經過篩選過程後，得到 1 個 well 中的培養液有高度專一性的抗體反應，但 well 中細胞聚落並無法確認是否為單一細胞生長而成，因此本計畫利用兩次 limiting dilution 步驟分離，使融合瘤成為由單一個細胞所分裂複製出的 clone，同時也會分泌對馬兜鈴酸具有專一性的單株抗體，本計畫得到 9 個會分泌對馬兜鈴酸專一性抗體的單株抗體細胞株，由 Figure 5. 可知，9 個細胞株所分泌的單株抗體其 IC_{50} 介於 1.6 ng/mL – 3.1 ng/mL 之間， A_0 介於 0.983 – 1.215 之間。

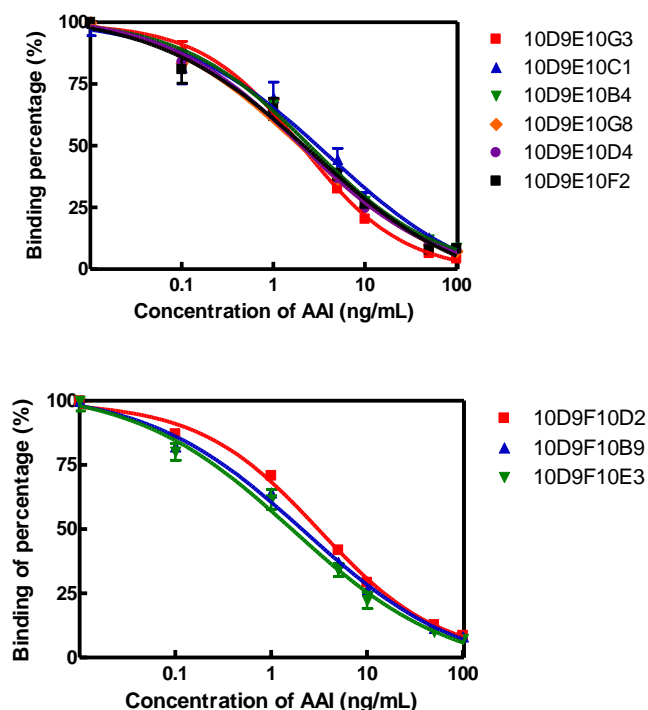


Figure 5. 利用 cdELISA 比較 9 個細胞株所分泌的單株抗體之效價及

專一性

9 個細胞株所分泌的單株抗體其專一性及效價並沒有太大的差異，由於 10D9E10F2 細胞株生長速度較其他細胞株快，因此本計畫選用 10D9E10F2 細胞株來進行小鼠腹水的製備。細胞株打入小鼠腹腔後第三週，收集其腹腔中產生之腹水，並將腹水進行純化，利用此腹水建立檢測馬兜鈴酸的直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法，其 IC_{50} 為 0.79 ng/mL；檢測區間 ($IC_{20} - IC_{80}$) 為 0.16 ng/mL – 3.94 ng/mL；檢測極限為 0.07 ng/mL； A_0 為 1.552 (Figure 6.)。

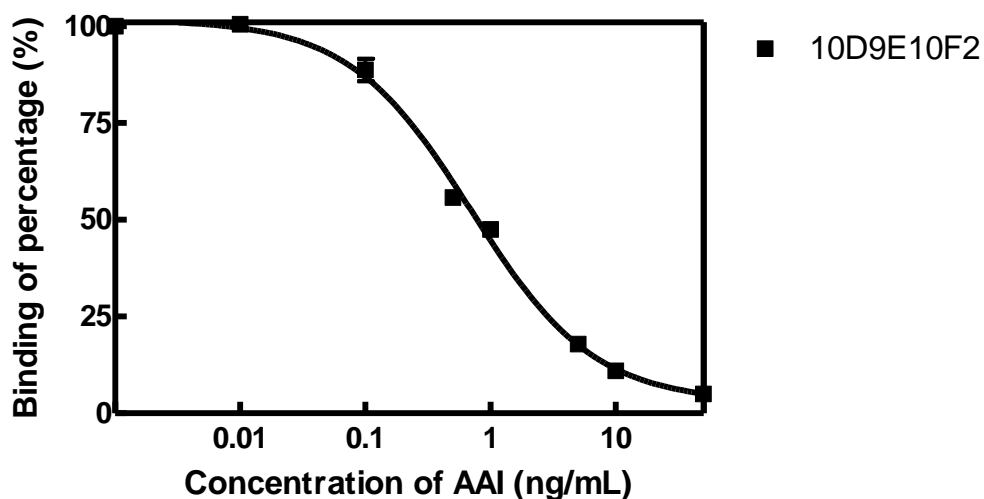


Figure 6. 利用 cdELISA 檢測腹水中單株抗體之效價及專一性

3.1.3 馬兜鈴酸單株抗體之交叉反應測試

以 cdELISA 的方法來測試馬兜鈴酸單株抗體 10D9E10F2 的專一性。馬兜鈴酸單株抗體對 AAI、AAII 及 AAI 和 AAII 混合物，其抑制 50% 的 AA-HRP 結合至抗體所需 AAI、AAII 與 AAI 及 AAII 混合物的濃度 (IC_{50}) 分別為 0.79 ng/mL、大於 50 ng/mL 及 1.32 ng/mL； A_0 分別為 1.552、1.469 及 1.388；此單株抗體對 AAII 和 AAI 及 AAII

混合物交叉反應率分別為小於 1% 及 60% (Figure 7.)。

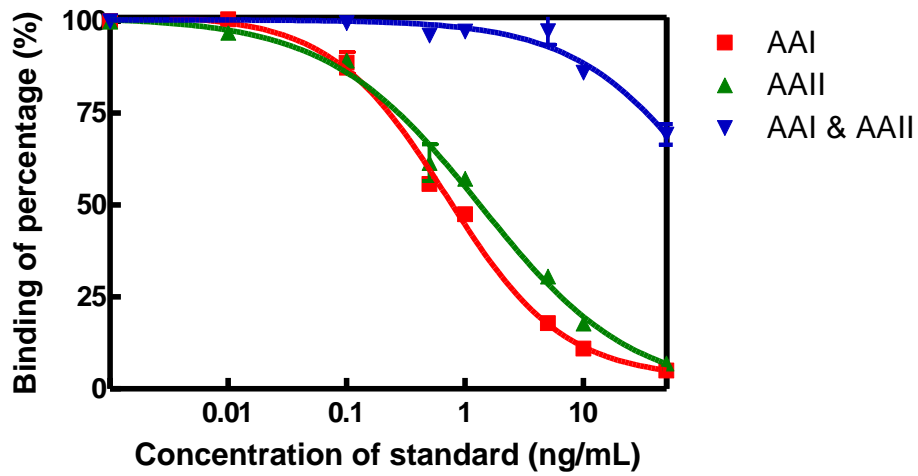


Figure 7. 利用 cdELISA 對 AAI、AAII 與 AAI 及 AAII 混合物進行交叉反應測試

3.2 鑑別抗體的特性

由細胞株 10D9E10F2 所分泌的單株抗體，利用 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit 測試 isotype 的結果得知，其為免疫球蛋白 G2a，Kappa-chain (Figure 8.)。

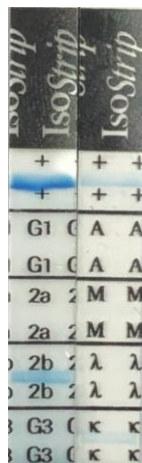


Figure 8. 利用 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit 測試 10D9E10F2

單株抗體之 isotype

3.3 製備奈米金粒子探針

為了建立一免疫層析試紙用於快速檢測馬兜鈴酸，本計畫將馬兜鈴酸單株抗體 10D9E10F2 與粒徑 40 nm 的奈米金接合作為探針，並利用全波長掃描，確認奈米金粒子探針與抗體接合的結果。由於有文獻指出峰值的高低與奈米金的粒徑大小有相關性，從 Figure 9. 得知未接和上抗體的奈米金粒子於 528 nm – 530 nm 時會出現一個峰值，而有與抗體接合的奈米金粒子探針於 525 nm 出現一個峰值。由於峰值的位移推論本計畫所接合的奈米金粒子探針有接合成功的。

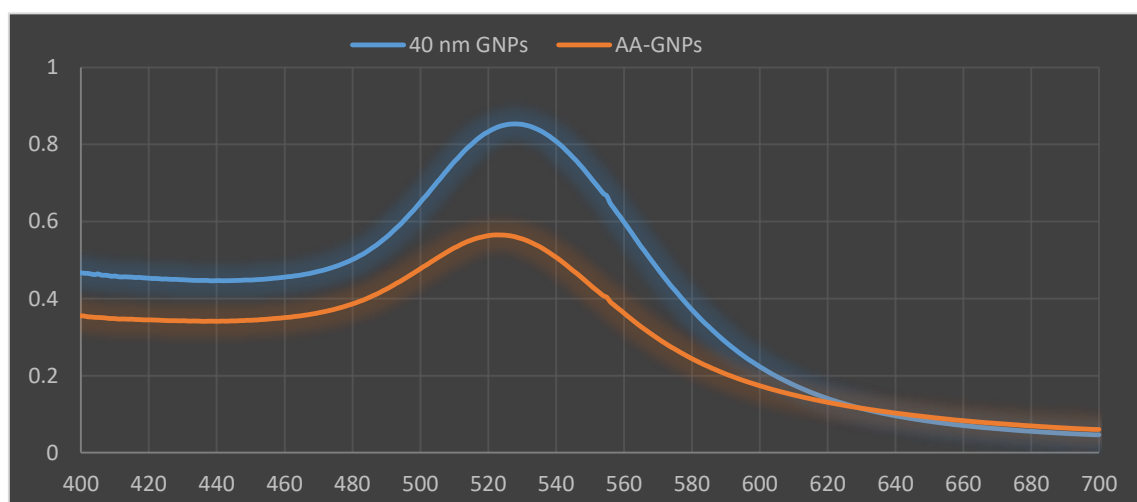


Figure 9. 奈米金之全波長圖

3.4 HPLC 標準曲線之建立

從 Figure 10. 顯示 AAI 標準品圖譜，從 AAI 會在 12.7 – 13.0 分鐘之間出現一個峰值，且峰值高度會隨著 AAI 的濃度下降而下降，計算其圖形面積並對照 AAI 濃度後，繪製標準曲線圖 (Figure 11.)，此標準曲線 R^2 值為 0.999，截距公式為 $y = 4715.88x + 20314.6$ 。

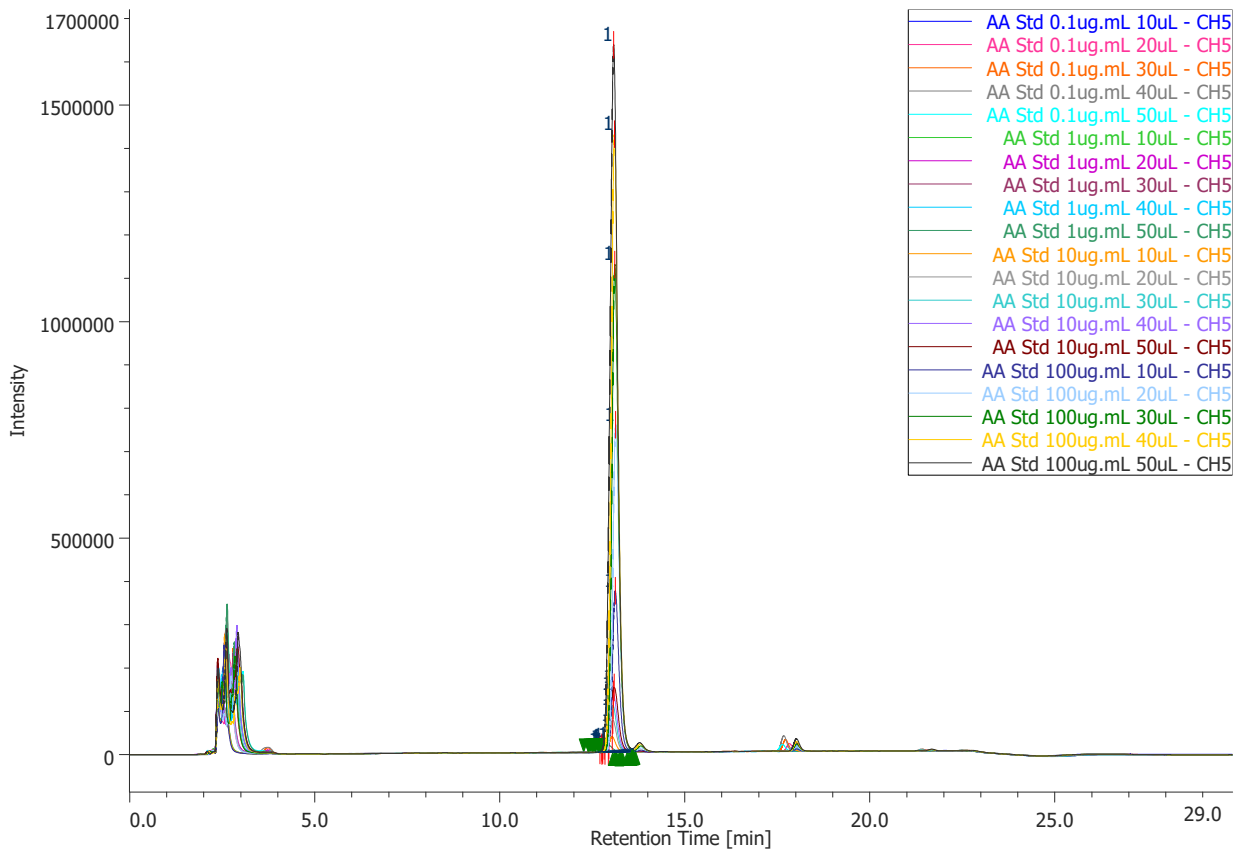


Figure 10. HPLC 之 AAI 圖譜

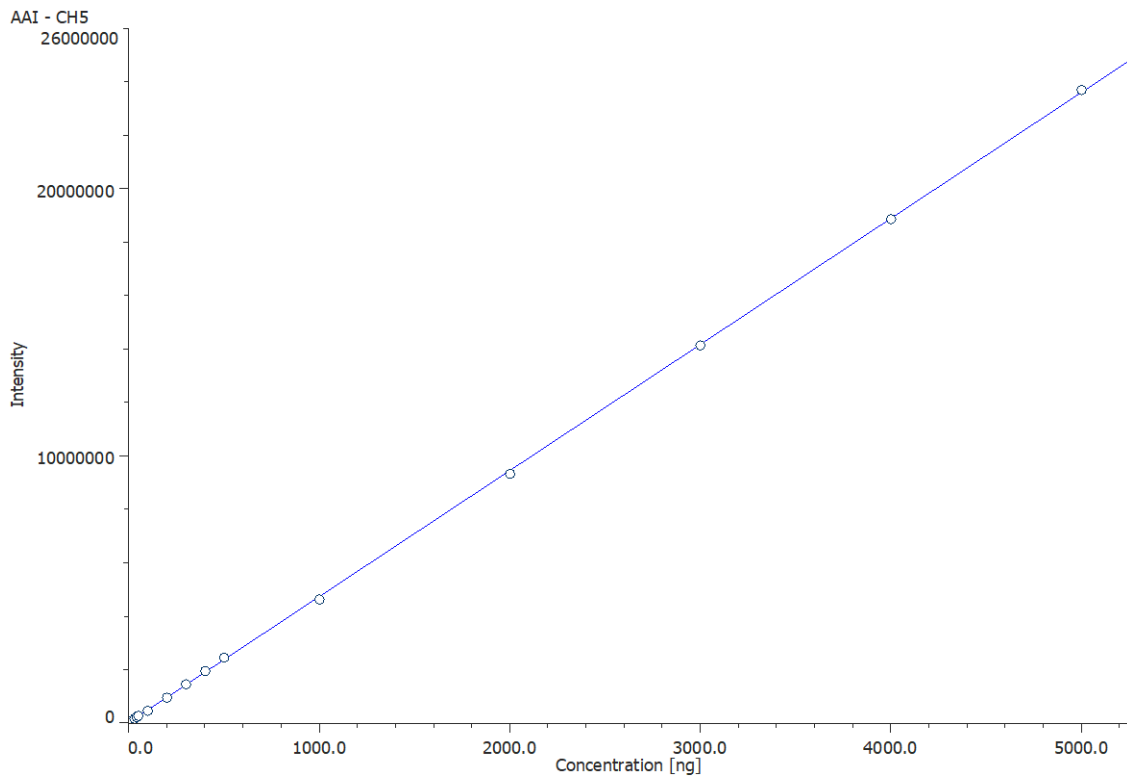


Figure 11. HPLC 之 AAI 標準曲線

3.5 樣品分析

3.5.1 酵素連結免疫吸附分析法檢測中草藥樣品中馬兜鈴酸含量

本計畫於仿間超市收集含有中草藥成分之瘦身茶包及瘦身保健藥物、並收集診所開立之中草藥藥方，共 20 個中草藥樣品。並利用馬兜鈴酸單株抗體 10D9E10F2 所建立之 cdELISA 檢測此 20 個中草藥樣品馬兜鈴酸的含量，結果如表一所示，本計畫發現中草藥樣品中馬兜鈴酸含量介於 32 ng/g – 2473 ng/g 之間，且陽性率為 100%，本實驗亦同時檢測控制組樣品玉米粉來確認檢測的正確性，從結果可以得知玉米粉並未檢出馬兜鈴酸（表一），因此可以確認本實驗馬兜鈴酸 cdELISA 檢測的正確性。

表一、中草藥樣品中馬兜鈴酸的檢測量 (ND 為未檢出，所有樣品皆檢測兩次以上)

編號	樣品種類	ELISA (ng/ml)	ELISA (ng/g)
1	中藥丸	103 ± 1	1547 ± 8
2	中藥丸	2 ± 0.1	32 ± 1.5
3	中藥丸	20 ± 0.5	298 ± 7
4	中藥丸	89 ± 17	1333 ± 258
5	中藥丸	108 ± 24	1619 ± 363
6	中藥丸	27 ± 1	405 ± 15
7	中藥粉	2 ± 0.2	32 ± 2
8	中藥粉	164 ± 8	2473 ± 124
9	中藥粉	2.5 ± 0.03	37 ± 0.4
10	中藥粉	4 ± 0.2	64 ± 3
11	中藥粉	15 ± 0.2	225 ± 3
12	中藥粉	101 ± 14	1519 ± 208
13	中藥粉	104 ± 4	1559 ± 60
14	中藥粉	61 ± 3	916 ± 38
15	瘦身茶包	52 ± 6	786 ± 86
16	瘦身茶包	76 ± 1	1146 ± 20
17	瘦身茶包	95 ± 3	964 ± 41
18	瘦身茶包	44 ± 3	661 ± 50
19	湯藥	1430 ± 41	
20	湯藥	373 ± 0.2	
Control	玉米粉	ND ^a	ND ^a

四、 討論

由於華人食用中草藥養身及治病已有千年歷史，長久下來中草藥被認為是性溫且副作用低的良藥，而馬兜鈴酸是藥草本身的成分，並不像其他黴菌毒素，是因為被黴菌感染而產生的毒素，早年中藥方中有許多含有馬兜鈴科的植物，這些藥方的效用有保養補身、降火、減肥、保肝、治療感冒及婦科疾病、還有治療多種炎症等。但近年來，已有文獻指出馬兜鈴酸與腎臟病變和尿道癌有關。台灣於西元 2003 年已宣布禁用含有馬兜鈴酸的中草藥 (如: 馬兜鈴、關木通、天仙藤、青木香及廣防己)，而 IARC 於西元 2008 年將利用馬兜鈴屬植物製作的草藥列為第 1 類致癌物，並將馬兜鈴酸類的天然混合物列入 2A 類致癌物。因此本計畫希冀利用抗體-抗原之間具有專一性的特性，製備單株抗體來建立一套快速且靈敏的檢測方式及建立一套穩定且靈敏的免疫分析系統，並應用於檢測中草藥中馬兜鈴酸的含量。

小分子化合物的免疫檢測系統建立不易，主要因為小分子化合物分子量太小，若直接免疫實驗動物，將無法引發免疫反應。為了解決此問題，本計畫根據之前生產馬兜鈴酸多株抗體的經驗，發現馬兜鈴酸上具有常用的活性基團羧基 (-COOH)，因此可利用 carbodiimide 法將馬兜鈴酸與載體蛋白質 BTG 以莫耳分率比 980:1 進行接合，並利用此蛋白質接合物免疫 BalB/c 小鼠。

本計畫再利用 cdELISA 檢測小鼠血清中是否有對馬兜鈴酸專一性之

抗體，從結果得知 (Figure 4.)，於免疫後第 37 週時，一號小鼠及二號小鼠血清中已有對馬兜鈴酸高專一性的抗體，此兩隻小鼠血清對於馬兜鈴酸之 IC_{50} 分別為 21 ng/mL 及 25 ng/mL， A_0 分別為 1.155 及 1.237，由於一號小鼠血清中抗體的效價略低於一號小鼠，因此本計畫選用二號小鼠進行融合瘤實驗，並經過兩次 limiting dilution 步驟，得到了 9 個細胞株會分泌馬兜鈴酸專一性的單株抗體，其中 10D9E10F2 細胞中分泌的抗體與其他細胞株所分泌的抗體相較起來，專一性及效價雖然差異不大但細胞生長速度較其他細胞株快，因此將此細胞株應用於小鼠腹水的製備，將 10D9E10F2 細胞株注射入小鼠體內，於三週後進行腹水蒐集並純化，利用 cdELISA 檢測腹水中單株抗體對於馬兜鈴酸的專一性，其 IC_{50} 為 0.79 ng/mL， A_0 為 1.552 (Figure 6.)，因此本計畫利用此細胞株建立出具有高靈敏度的 cdELISA。

為了增加馬兜鈴酸單株抗體 10D9E10F2 結合至 ELISA 固相基質的效率，我們會先將 anti-mouse-Fc antibody 吸附在固相基質上，再加入馬兜鈴酸單株抗體 10D9E10F2，這樣能明顯增加馬兜鈴酸單株抗體吸附至固相基質的量，除此之外，一個好的 AA-HRP 的接合物可以提升 cdELISA 的靈敏度，本計畫嘗試了不同的接合方式並測試馬兜鈴酸及 HRP 於不同莫耳分率所形成的接合物的效果，結果發現以 carbodiimide 法並以莫耳分率為 16:1 所接合之 AA 及 HRP，可以達到最高的靈敏度及顯色效果。

在測試馬兜鈴酸單株抗體 10D9E10F2 與 AAI、AAII 與 AAI 及 AAII 混合物之交叉反應中，抑制 50% 的 AA-HRP 結合至抗體所需 AAI、AAII 與 AAI 及 AAII 混合物的濃度 (IC_{50}) 分別為 0.79 ng/mL、大於 50 ng/mL 及 1.32 ng/mL； A_0 分別為 1.552、1.469 及 1.388 (Figure 7.)，其對 AAI 及 AAII 混合物交叉反應率高達 60%，但對於 AAII 的交叉反應率小於 1%。本計畫推測 AAII 與 AAI 兩者結構上的差別為 AAII 多了一個甲基 (-CH₃)，因此本計畫所生產之馬兜鈴酸單株抗體辨識 AAI 的效果較 AAII 佳。

本計畫以 cdELISA 進行中草藥樣品的分析，由於以 HPLC 及 TLC 為檢測方法來檢測樣品需要繁瑣的前處理，因此本計畫希望利用專一性高的單株抗體直接檢測未經純化的樣品萃取液中的馬兜鈴酸含量。樣品的萃取方式以 0.01 M PBS 溶液萃取，而利用 PBS 萃取可以免除有機溶劑的干擾影響結果。

本計畫所建立的 cdELISA 檢測中草藥樣品的結果，於 20 樣中草藥樣品，其馬兜鈴酸含量介於 32 ng/g – 2473 ng/g 之間 (表一)，於台灣不得檢出的規範下，其陽性率為 100%，由此得知中草藥受到馬兜鈴酸的污染狀況是非常嚴重的。

為了發展一個分析法能夠更快速且即時的應用於檢測中草藥樣品馬兜鈴酸的含量上，本計畫之後也想利用馬兜鈴酸單株抗體 10D9E10F2 來建立一個以奈米金粒子為標記的快速免疫層析試紙，其操作方法比

cdELISA 簡便而省時，且能在實驗室以外的地方使用。本計畫已利用 15 μg 馬兜鈴酸單株抗體與粒徑 40 nm 的奈米金粒子接合作為探針，往後欲將 AA-BSA (莫耳分率比 19:1) 及 anti-mouse-Fc 畫於孔徑 15 μm 的 NC membrane 上，用以建立一快速且敏感的馬兜鈴酸快速免疫層析試紙。

本計畫為了確認馬兜鈴酸酵素連結免疫吸附分析法及快速免疫層析試紙，因此建立 HPLC 檢測法用於檢測樣品，馬兜鈴酸 HPLC 檢測法流動相為甲醇/去離子水 (60:40, v/v)，流速為 1 mL/min，為了穩定流動相所以於甲醇及去離子水中加入 0.05% TFA (Trifluoroacetic acid)，目前已建立 AAI 標準曲線，其 R^2 為 0.999，未來將可以用於確認酵素連結免疫吸附法及快速免疫層析試紙的正確性上。

本計畫所建立之酵素連結免疫吸附分析法可用於市面上中草藥樣品的測試，往後將致力於快速免疫層析試紙的製備上，希冀不久的將來可讓社會大眾免於馬兜鈴酸的危害。

五、 參考文獻

- Agrawal, P., & Laddha, K. (2017) Development of validated high-performance thin layer chromatography for quantification of aristolochic acid in different species of the Aristolochiaceae family. *J Food Drug Anal*, 25(2), 425-429.
- Cao, Z., Zhao, H., Cui, Y., Zhang, L., Tan, G., Wang, B., & Li, Q. X. (2014) Development of a sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of paclobutrazol residue in wheat kernel. *J Agric Food Chem*, 62(8), 1826-1831.
- Chang, S. Y., Weber, E. J., Sidorenko, V . S., Chapron, A., Yeung, C. K., Gao, C., Mao, Q., Shen, D., Wang, J., Rosenquist, T. A., Dickman, K. G., Neumann, T., Grollman, A.P., Kelly, E. J., Himmelfarb, J., Eaton, D. L. (2017) Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity. *JCI Insight*, 2(22).
- Ioset, J. R., Raelison, G. E., & Hostettmann, K. (2003) Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. *Food Chem Toxicol*, 41(1), 29-36.
- Leenaars, M., & Hendriksen, C. F. (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*, 46(3), 269-279.
- Li X.W., Morinaga O., Tian M., Uto T., Yu J., Shang M.Y., Wang X., Cai S.Q., Shoyama Y. (2013) Development of an Eastern blotting technique for the visual detection of aristolochic acids in Aristolochia and Asarum species by using a monoclonal antibody against aristolochic acids I and II. *Phytochem Anal*, 24(6), 645-653.
- Li, X. W., Yokota, S., Wang, D., Wang, X., Shoyama, Y., & Cai, S. Q. (2014) Localization of aristolochic acid in mouse kidney tissues by

immunohistochemistry using an anti-AA-I and AA-II monoclonal antibody. *Am J Chin Med*, 42(6), 1453-1469.

Liu, H., Su, J., Liang, X., Zhang, X., He, Y. J., Huang, H. Q., Ye, J., Zhang, W. D. (2011) Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicine Longdan Xiegan Pill by HPLC-DAD-ESI-MS. *J Pharm Anal*, 1(1), 1-7.

Shang, M. Y., Tian, M., Tanaka, H., Li, X. W., Cai, S. Q., & Shoyama, Y. (2011) Quality control of traditional chinese medicine by monoclonal antibody method. *Curr Drug Discov Technol*, 8(1), 60-65.

Song, R. J., Pu, F. P., Zhou, J., Sun, J. B., Zeng, P., & Zhang, Q. (2014) Three-phase hollow fiber liquidphase microextraction based on a magnetofluid for the analysis of aristolochic acids in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci*, 37(13), 1622-1631.

Yu, F. Y., Lin, Y. H., & Su, C. C. (2006) A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting carcinogenic aristolochic acid in herbal remedies. *J Agric Food Chem*, 54(7), 2496-2501.

廖振凱、陳雅吟、賴銘南、游明謙 (2011) 「誤用馬兜鈴科植物為中藥材之省思」 *J Chin Med*, 22(3,4), 185-193