

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 棒麴毒素多株抗體之裝備並將其應用於酵素連結免疫吸 附分析法及奈米金粒子免疫層析試紙
------------	--

執行計畫學生：王崧丞

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-029-B

研究期間：108年07月01日至109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 109年04月24日

行政院國家科學委員會補助 大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱：棒麴毒素多株抗體之裝備並將其應用於酵素連結免疫吸附分析法及奈米金粒子免疫層析試紙

執行計畫學生：王崧丞

學生計畫編號：108-2813-C-040-029-B

研究期間：108年7月1日至108年2月28日止，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3月31日

摘要 (Abstract)

棒麴毒素 (Patulin) 是一種對熱穩定的黴菌毒素，主要於受污染之蘋果及其再製品中被發現，由於 Patulin 會阻斷細胞的蛋白質合成、氧化物排除及人體多項重要代謝反應，且會造成腎、肝、腸、神經等人體器官的病變，還會導致免疫系統的失調，甚至致癌，因此世界各國都訂定了食品中 Patulin 的限制含量，其中台灣訂定限制含量於食用之蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品為 25 ppb，蘋果汁、蘋果漿及其發酵飲料為 50 ppb，供嬰幼兒食用之蘋果汁、蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品及嬰幼兒副食品為 10 ppb。民國 100 年衛生福利部食品藥物管理署抽驗了 10 項蘋果汁飲品的 Patulin 含量，發現陽性比例為 10%；民國 102 年再次抽驗了 24 件蘋果汁飲料，仍有 8% 陽性反應，濃度介於 19-22 ppm。現行用來檢測 Patulin 的方法有高效液相層析色譜法、氣相色譜法-串聯質譜及液相色譜法-串聯質譜，這些化學分析法通常具有繁複、費時、昂貴的檢驗步驟，並需要專業的技術人員才能執行，且樣品無法短時間完成分析等缺點，因此開發一快速、敏感的免疫檢測法來檢測食品中 Patulin 的殘留量是迫切且極為重要的。因此本計畫【子目標一】首先將 Patulin 衍生後結合載體蛋白質做為免疫抗原，注射入紐西蘭大白兔體內以製備能辨識 Patulin 的多株抗體。【子目標二】利用此 Patulin 專一性抗體建立一針對 Patulin 的酵素連接免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)。由於 ELISA 需要在實驗室中操作，為了開發適用於一般大眾的檢測方式，本計劃在【子目標三】開發快速免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip)，期望能快速並準確的檢驗出樣品中 Patulin 的殘留量，避免人們誤食含有 Patulin 的食品，導致身體的病變與傷害。而現階段我們成功得合成了 Patulin-SH 和 Patulin-CMO 衍生物，並利用此兩種衍生物成功得製備出多種免疫抗原，觀察實驗動物受這些抗原刺激的免疫反應後，歸納得知 CMO 法的確如先前預期的比 SH 法更適合用來進行 Patulin 的衍生及免疫抗原的合成，能產生專一性較高的抗體。

目錄 (Index)

主題	頁數
摘要	1
一, 結論	3
1.1 研究起源	3
1.2 棒麴毒素 (Patulin) 基本性質	3
1.3 棒麴毒素 (Patulin) 相關研究	4
1.4 酵素連結免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)	5
1.5 快速免疫層析試紙	6
1.6 研究動機及研究問題	7
二, 材料與方法	9
2.1 實驗藥品及動物	9
2.2 實驗儀器	10
2.3 實驗方法	10
2.3.1 製備不同棒麴毒素 (Patulin) 接合物	10
2.3.2 利用薄層層析法確認 Patulin-CMO 產物	13
2.3.3 測定 Patulin-CMO 產物和 Patulin-SH 產物之吸光值	13
2.3.4 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合	13
2.3.5 免疫小鼠及兔子	14
2.3.6 多株抗體的純化	14
2.3.7 以酵素連接免疫吸附分析法檢測樣品中 Patulin 的含量	15
2.3.8 樣品之製備	15
2.3.9 開發 Patulin 快速免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip)	16
三, 實驗結果	16
3.1 TLC 確認衍生物	16
3.2 Patulin-CMO 產物和 Patulin-SH 產物之吸光值	17
3.2 SDS-PAGE 確認抗原接合	18
3.3 抗體專一性測試	19

四, 討論	23
五, 參考文獻	25

一, 緒論 (Introduction)

1.1 研究起源

Patulin 主要出現在被黴菌感染的蘋果、梨子、葡萄及其加工品, 但也被發現在發霉的動植物飼料和起司中 (Pal et al., 2017), 且因其在酸性及高溫烹煮的環境下仍有穩定的結構, 使得繁複的食品加工過程仍不會降低它的生化毒性, 因此美國、日本、歐盟及世界各國規定了食品中 Patulin 的限制含量為 50 ppb, 台灣則規定食用之蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品限制含量為 25 ppb, 蘋果汁、蘋果漿及其發酵飲料為 50 ppb, 供嬰幼兒食用之蘋果汁、蘋果泥、熟漬蘋果等固態蘋果製品及嬰幼兒副食品為更低的 10 ppb。

酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 便具有快速、簡便且便宜等優點, 並同樣擁有良好的檢測靈敏度, 但是 ELISA 必需在實驗室中操作, 並且需要儀器才能判讀結果, 因此便於社會大眾使用的免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip) 更是極佳的選擇, 因此本計畫欲生產能辨識 Patulin 並具有高效價且敏感度高的專一性抗體, 應用在 ELISA 及 Immunochromatographic strip 的開發, 以達到大量且有效的篩檢市面上存在健康風險的相關產品, 以免民眾誤食, 導致身體的病變與傷害。

1.2 棒麴毒素 (Patulin) 基本性質

Patulin (Figure 1) 會抑制細胞中蛋白質的合成, 或是與生物體內常見的硫醇基形成共價鍵結, 藉此阻礙多種重要酵素的合成與修飾, 更會降低穀胱甘肽的抗氧化能力, 造成 DNA 的氧化傷害, 更因此導致癌症的發生及腫瘤的形成, 另外在組織病理學的研究上則發現 Patulin 除了會造成中樞及周邊神經的壞死、腎臟功能異常, 還會導致小腸絨毛崩解和胃潰瘍, 甚至在長期暴露 Patulin 後, 血液中會檢測出肝臟受損的指標物質, 而 Patulin 也會影響多種細胞激素的分泌及免疫組織器官的病變, 產生免疫失調的問題。

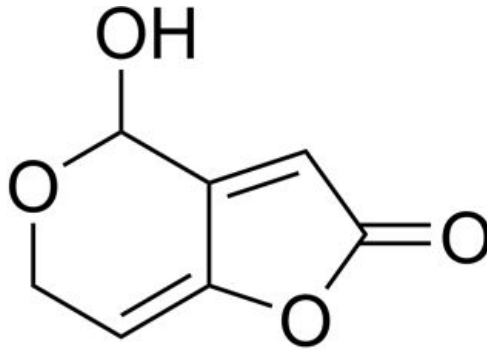


Figure 1. 棒麴毒素 (Patulin) 結構式

1.3 棒麴毒素 (Patulin) 相關研究

Patulin 化學名為 4-hydroxy-4H-furo[3,2-c]pyran-2(6H)-one，是由 *Penicillium* 及 *Aspergillus* 菌屬所分泌的二級代謝物，曾被做為抗微生物、抗癌藥物及普遍性的感冒藥使用，但會引起嚴重副作用及其具有生物毒性，現已被禁止使用。而 Patulin 也被 International Agency for Research on Cancer (IARC) 分類於 group 3 (尚不能確定其是否對人體致癌)，於細胞毒性的研究中發現 Patulin 會抑制轉錄起始因子的功能及內質網上鎂離子依賴型鈉鉀 ATP 幫浦的活性，導致蛋白質無法正確的合成和修飾 (Moulé et al., 1977)，還會改變細胞膜的通透性和膜電位的耐受度，使得細胞破裂死亡，也會與組胺酸、離胺酸的氨基側鏈及半胱胺酸的硫醇基進行親核性加成反應，促使蛋白質分子間形成交聯，藉此破壞多種重要酵素的運作、染色體互換及突變，更會與穀胱甘肽形成共價鍵結，降低穀胱甘肽的抗氧化能力，導致細胞內 ROS 和自由基的含量上升，進而引發細胞自噬及 DNA 的氧化傷害，而此種細胞傷害往往伴隨著組織器官的病變 (Fliege et al., 2000)。於組織病理學的研究上則發現 Patulin 會堆積在富含紅血球、白血球的器官中，例如：腎、肝、脾和肺，進而造成中樞及周邊神經的壞死 (Sabater-Vilar et al., 2004)，也有研究以大鼠為模式生物，發現 Patulin 會促使大鼠腎絲球的崩解，造成血液中鈉鉀離子濃度降低、尿素濃度上升、少尿、腎臟內出血等腎臟疾病 (McLaughlin et al., 2009)，甚至將小鼠長期暴露 Patulin 後，會影響小鼠肝臟 cytochrome P450 的基因表現，血液中也檢測出 ALT、AST、ALP、肌酸酐等肝臟受損的指標物質 (Al-Hazmi et al., 2014)。於免疫相關的研究顯示 Patulin 會大量減少巨噬細胞的 IL-10、IL-23、TGF- β 的分泌，且將小鼠短期暴露 Patulin 後會增加 Th2 cytokine 的含量且減少 Interferon- γ 的含量，並會引發過敏、氣喘及嗜酸性球增加，進而導致肺部發炎。若長期暴露還會促使漿細胞過度增生，胸腺小葉間隙擴大、纖維化，另外其樹突細胞粒線體會喪失內皺褶、細胞核內染色體裂解，導致細胞凋亡，影響

小鼠的免疫力。在人體周邊血檢體中，Patulin 能減少 IL-4、IL-13、IL-10、Interferon- γ 在單核球中的表現量，導致免疫缺陷等問題 (Pal et al., 2017)。有鑒於 Patulin 對於生物體的危害，因此開發一檢測法，用於檢測食品中 Patulin 的含量是必須的，但目前檢測 Patulin 的方法為 High performance liquid chromatography (HPLC)、Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) 及 Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) (Sforza et al., 2006)，這些方法並不適用於一般社會大眾使用，因此生產 Patulin 專一性多株抗體，並利用此一抗體開發 ELISA 及快速免疫層析試紙是迫切需要的。

Patulin 為一分子量 154.12 Dalton 的小分子黴菌毒素，只具有抗原性 (antigenicity) 而不具有免疫原性 (immunogenicity)，如果直接免疫實驗動物並不會誘發免疫反應，因此 Patulin 需要與一個載體蛋白質結合成具有免疫原性的抗原，才可以用於免疫實驗動物以製備 Patulin 抗體，並且建立一套專一性之 Patulin ELISA，進而開發 Patulin 快速免疫析試紙。McElroy 等人以 Patulin-hemiglutarate-BSA 作為免疫抗原在紐西蘭大白兔體內生產出辨識 Patulin 的多株抗體 (McElroy et al., 1993)；Sheu 等人使用 Patulin hemisuccinate-BSA、Patulin-hemisuccinate-EDA-BSA (water-soluble carbodiimide method)、Patulin-hemisuccinate-EDA-BSA (mixed anhydride method) 等三種免疫抗原在小鼠腹水中取得對 Patulin 有極高效價但專一性不佳的多株抗體 (Sheu et al., 1999)。由於以上文獻所製備出的抗體其敏感度皆未達到檢測限制含量之需求，因此本計畫欲透過其他蛋白質修飾之方法，以期提升抗體辨識 Patulin 的專一性，並開發適用於台灣現行法令之 Patulin ELISA 及快速免疫層析試紙。

1.4 酵素連結免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

酵素連結免疫分析法 (Figure 2) 的原理是利用抗原及抗體專一性結合的特性，檢測樣品中特定抗原的與否，透過酵素與受質的呈色反應，產生能被酵素免疫分析儀器定量之螢光物質，並藉由顏色的深淺來對抗原進行定量的分析，其具有快速、簡便、樣品準備不複雜且成本相較於 HPLC 與 GC-MS 低等優點，並同樣擁有良好的靈敏度。

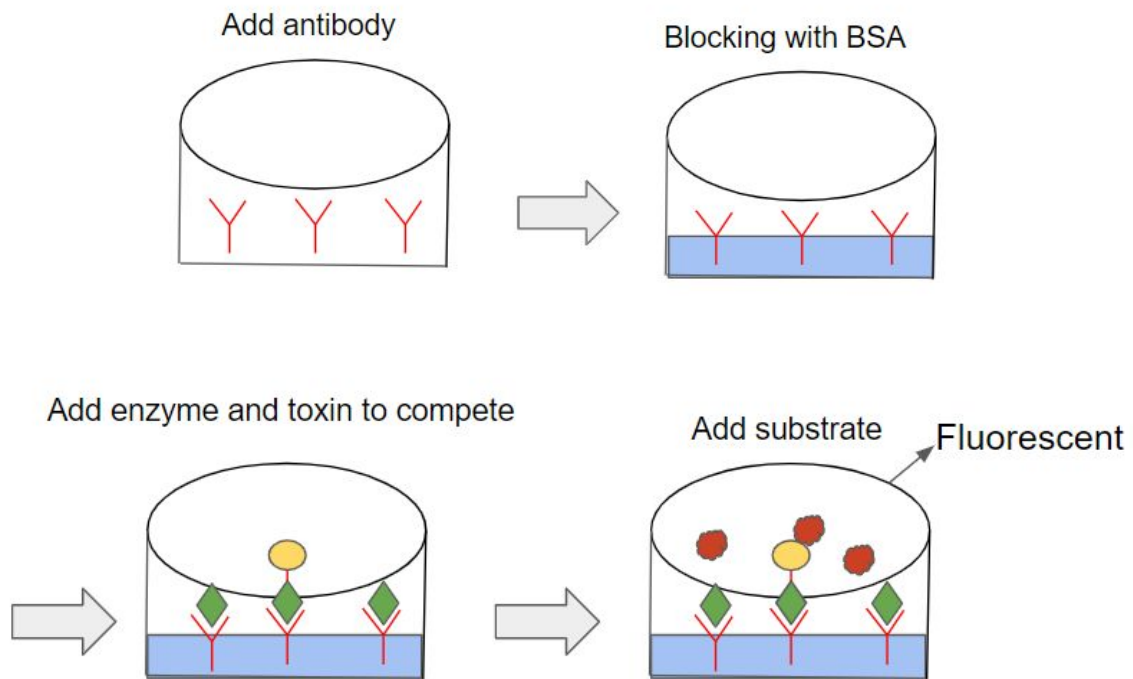


Figure 2. 直接競爭型酵素連結免疫分析法

1.5 快速免疫層析試紙

快速免疫層析試紙 (Figure 3A) 是一種以膜為基質的免疫分析法，分析結果極為快速簡易且能以肉眼判讀，其分析原理為將硝化纖維膜作為基質，並將抗原及作為抗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基質進行層析，當樣品中含有待測抗原時，奈米金粒子會和樣品中的抗原結合，因此會在基質的控制組區 (Control zone) 產生顏色，形成 Positive result，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 (Test zone) 及控制組區產生顏色，形成 Negative result (Figure 3B)，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。

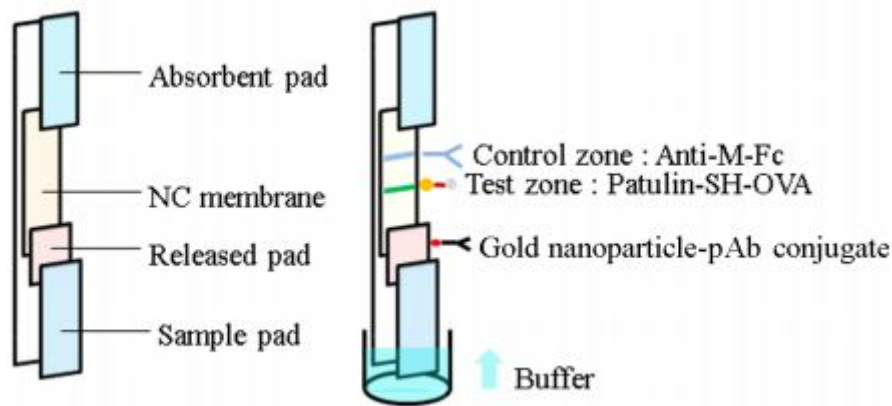


Figure 3A. 免疫層析試紙組成示意圖

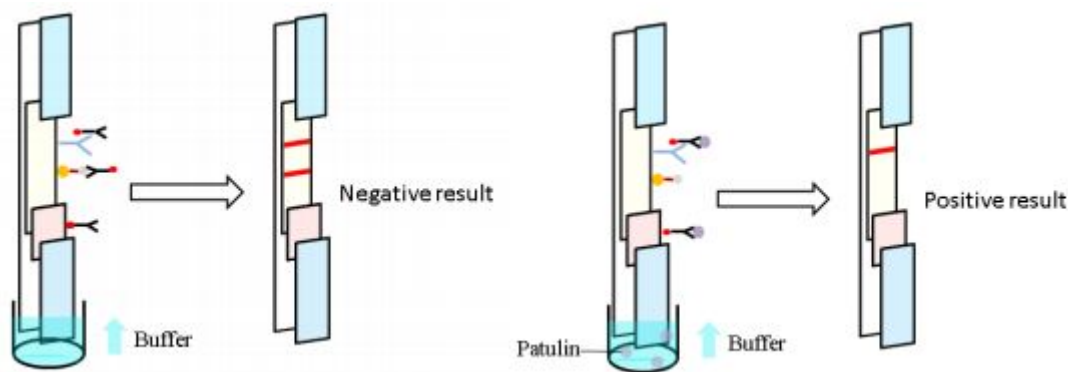


Figure 3A. 免疫層析試紙分析結果

1.6 研究動機及研究問題

Patulin 充斥在我們的生活中，以本國果汁銷售額每年達到 2000 億元且每年每人平均消費 108 公升飲品的規模而言，果汁儼然成為人們生活中的必要飲品，這也代表多數民眾處在 Patulin 的高風險環境下，衛生福利部食品藥物管理署於民國 100 年抽驗了 10 項蘋果汁飲品的 Patulin 含量，發現陽性比例為 10%；民國 102 年再次抽驗了 24 件蘋果汁飲料，仍有 8% 陽性反應，濃度介於 19-22 ppb，可見 Patulin 在國人食用相關產品時潛在著極大的威脅；歐盟調查 4,633 件蘋果汁檢體，有 57.4% 檢體呈現陽性，其中有 40 件超出限制含量 50 ppb；Watanabe 等人研究日本蘋果汁市場 188 件產品，結果有 4.8% 檢體呈現陽性，濃度介於 6-15 ppb；Harris 等人追查美國密西根州市售蘋果汁 493 件，結果有 18.7% 的產品含有 Patulin，其中有 11 項超出限制含量 50 ppb；香港消費者委員會在 2017 年八月稽查 40 項果汁飲品後，其 Patulin 陽性率為 5% 且其含量高於限制含量兩倍；美國食品藥品監督管理局 (Food and drug administration, FDA) 在 2018 年三月及五月分別檢測出多項市售果汁產品 Patulin 含量

超標，其中包括超出限制含量 4 倍，而目前用來檢測 Patulin 的方法包括高效液相層析色譜法、氣相色譜法-串聯質譜及液相色譜法-串聯質譜及放射性同位素標定法，但是這些方法都需要相當繁複的樣品純化和檢測流程，費時又昂貴，因此開發一迅速、簡便且具有高敏感度的檢測方法是迫切需要的。

酵素連接免疫吸附分析法具有快速、簡便且便宜等優點，並同樣擁有良好的檢測靈敏度，但是 ELISA 必需在實驗室中操作，並且需要儀器才能判讀結果，因此便於社會大眾使用的免疫層析試紙更是極佳的選擇，因此本計畫欲生產能辨識 Patulin 並具有高效價且敏感度高的專一性抗體，應用在 ELISA 及 Immunochromatographic strip 的開發，以達到大量且有效的篩檢市面上存在健康風險的相關產品，以免民眾誤食，導致身體的病變與傷害。

我們將此研究計畫分為三個子目標：

【子目標一】：製備專一性 Patulin 的多株抗體

- 製備免疫抗原
- 將免疫抗原打入紐西蘭大白兔產生免疫反應
- 多株抗體的純化

【子目標二】：建立酵素連接免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA) 方式檢測樣品中 Patulin 的含量

- 直接競爭型 ELISA
- 非直接競爭型 ELISA
- 樣品之製備

【子目標三】：開發Patulin快速免疫層析試紙(Immunochromatographic strip)

- 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

下列藥品購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)

Sodium bicarbonate	Ammonium persulfate
Ovalbumin (OVA)	Coomassie Brilliant Blue R-250
Freund's complete adjuvant	Patulin
N, N, N',N'-tetramethylethylenediamine	Bovine thyroglobulin (BTG)
Bovine serum albumin (BSA)	Ethylenediamine (EDA)
Carboxymethoxylamine (CMO)	Tris
Toluene	Ethyl acetate
Formic acid	Sodium sulfate
Succinic anhydride (SH)	Pyridine

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)
Acetic acid
TLC Silica gel 60 F254

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

aqueous Hydrochloric Acid (HCl)
Methanol

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

2' Ab (Goat anti-rabbit IgG-HRP)
Horseradish peroxidase (HRP)

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, K-Blue) 購自 Neogen Corp. (Lexington, KY)

BALB/c 小鼠購於國家動物中心

紐西蘭大白兔購於大宗畜牧場

2.2 實驗儀器

Centrifuge	HERMLE Z323K
Vortex	GENIE Vortex-2
Auto strip washer	Bio TEK INSTRUMENT ELx50
Microplate reader	Molecular Device E max
Incubator	LAB-LINE
Refrigerator	DU 800 UV/Visible Spectrophotometer
Hot plate	Fargo HMS-102

2.3 實驗方法

2.3.1 製備不同棒麴毒素 (Patulin) 接合物

由於 Patulin 為分子量 154.12 Dalton 的小分子黴菌毒素，只具有抗原性但不具有免疫原性，因此 Patulin 需要與一個載體蛋白質結合成具有免疫原性的抗原。由於 Patulin 不具有接合載體蛋白質之常用活性基團 (-COOH 及 -NH₂)，但 Patulin 具有可以進行修飾之酮基 (C=O)，因此本計畫欲以 CMO 衍生 Patulin 上的酮基，再接合載體蛋白質 (EDA-BTG) (Figure 4)，使其成為具有刺激免疫反應的抗原。

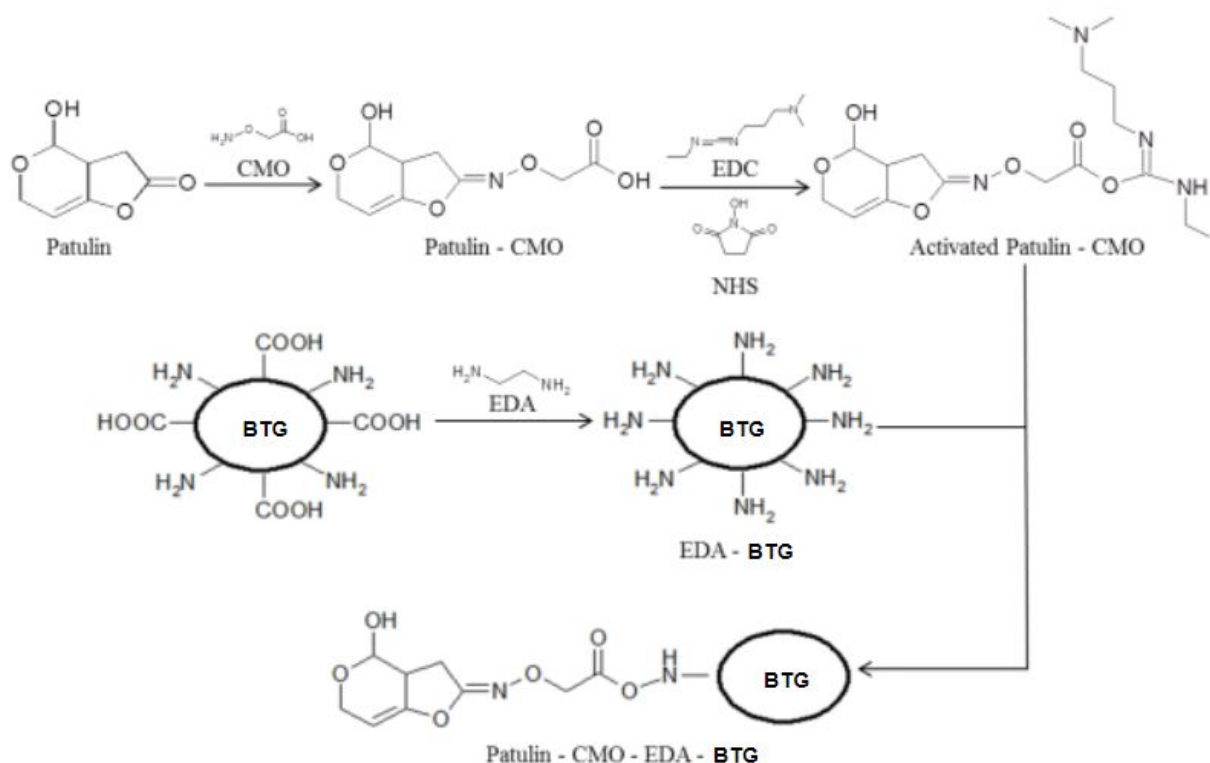


Figure 4. 免疫抗原 Patulin-CMO-EDA-BTG 合成示意圖

2.3.1.1 製備棒麴毒素 (Patulin) 衍生物 Patulin-CMO

秤取 2 mg Patulin 溶於 1 mL reflux solution (Pyridine : Methanol : d_2H_2O , 1 : 4 : 1, v/v/v), 再秤取 4 mg CMO 溶於 3 mL reflux solution, 將 CMO 溶液緩慢加入 Patulin 溶液中, 於 65°C 避光均勻攪拌反應 3 小時後, 再於室溫避光均勻攪拌反應 36 小時後即可得 Patulin-CMO。

2.3.1.2 製作棒麴毒素 (Patulin) 衍生物 Patulin-SH

秤取 2 mg Patulin 溶於 320 ul Pyridine, 再秤取 4 mg Succinic anhydride 溶於 80 ul Pyridine, 將 SH 溶液緩慢加入 Patulin 溶液中, 於 37°C 均勻攪拌反應 60 小時後, 即可得 Patulin-SH。

2.3.1.3 利用 EDA (Ethylenediamine) 修飾 Bovine thyroglobulin (BTG) 成 EDA-BTG

將 4 mg BTG 和 6 mg 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) 溶於 1 mL 去離子水中, 再加入 100 ul 10% EDA, 並以 1 N HCl 將溶液調至 pH 5.5, 並於室溫攪拌反應 2 小時後, 再加入 3 mg EDC, 於室溫攪拌反應 16 小時, 最後以 1 L 0.01 M PBS 透析三天後, 即可得 EDA-BTG。

2.3.1.4 以 Carbodiimide 法將 Patulin-CMO 與 EDA-BTG 接合成

Patulin-CMO-EDA-BTG, 作為免疫抗原

將 1 mg Patulin-CMO 溶於 200 uL Methanol, 並緩慢加入 EDC (3 mg EDC 溶於 30 uL Methanol) 及 N-hydroxysuccinimide (NHS) (2 mg NHS 溶於 20 uL Methanol), 室溫攪拌反應兩小時後, 將 1 mg 或 2 mg 或 4 mg EDA-BTG 分別溶於 100 ul 或 200 ul 或 400 ul 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6), 並將 Patulin-CMO 混合液緩慢加入 BTG 溶液中, 室溫攪拌反應 16 小時後, 以 1 L 0.01 M PBS 透析三天後, 即為免疫抗原 Patulin-CMO-EDA-BTG。

2.3.1.5 將 Patulin-CMO 與 Ovalbumin (OVA) 接合成 Patulin-CMO-OVA, 作為覆被抗原

將 1 mg Patulin-CMO 溶於 200 uL Methanol, 並緩慢加入 EDC (3 mg 溶於 30 uL Methanol) 及 NHS (2 mg NHS 溶於 20 uL Methanol), 室溫攪拌反應兩小時後, 將 8 mg OVA 溶解於 800 ul 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6), 並將 Patulin-CMO 混合液緩慢加入 OVA 溶液中, 室溫攪拌反應 16 小時後, 以 1 L 0.01 M PBS 透析三天後, 即為 Patulin-CMO-OVA。

2.3.1.6 將 Patulin-CMO 與 HRP (Horseeradish peroxidase) 接合成 Patulin-CMO-HRP

將 1 mg Patulin-CMO 溶於 200 uL Methanol, 並緩慢加入 EDC (3 mg 溶於 30 uL Methanol) 及 NHS (2 mg NHS 溶於 20 uL Methanol), 室溫攪拌反應兩小時後, 將 8 mg HRP 溶解於 800 ul 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6), 並將 Patulin-CMO 混合液緩慢加入 HRP 溶液中, 室溫攪拌反應 16 小時後, 以 1 L 0.01 M PBS 透析三天後, 即為 Patulin-CMO-HRP。

2.3.1.7 以 Carbodiimide 法將 Patulin-SH 與 BTG 接合成 Patulin-SH-BTG, 作為免疫抗原

將 1 mg Patulin-SH 溶於 200 uL Methanol, 並緩慢加入 EDC (3 mg EDC 溶於 30 uL Methanol) 及 N-hydroxysuccinimide (NHS) (2 mg NHS 溶於 20 uL Methanol), 室溫攪拌反應兩小時後, 將 2 mg BTG 溶於 200 ul 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6), 並將 Patulin-CMO 混合液緩慢加入 BTG 溶液中, 室溫攪拌反應 16 小時後, 以 1 L 0.01 M PBS 透析三天後, 即為免疫抗原 Patulin-CMO-BTG。

2.3.1.8 將 Patulin-SH 與 HRP (Horseeradish peroxidase) 接合成 Patulin-SH-HRP

將 1 mg Patulin-SH 溶於 200 uL Methanol, 並緩慢加入 EDC (3 mg 溶於 30 uL Methanol) 及 NHS (2 mg NHS 溶於 20 uL Methanol), 室溫攪拌反應兩小時後, 將 8 mg HRP 溶解於 800 ul 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6), 並將 Patulin-SH 混合液緩慢加入 HRP 溶液中, 室溫攪拌反應 16 小時後, 以 1 L 0.01 M PBS 透析三天後, 即為 Patulin-SH-HRP。

2.3.2 利用薄層層析法確認 Patulin-CMO 產物

取 1 uL Patulin 標準品 (1 mg/mL, 溶於 Methanol) 與 1 uL Patulin-CMO (溶於 Methanol) 點於薄層層析片 (TLC Silica gel F254) 上, 並利用展開液 (Toluene : Ethyl acetate : Formic acid, 5 : 4 : 1, v/v/v) 進行展開, 待展開完成後, 置於波長 254 nm 的 UV 光源下觀察結果。

2.3.3 測定 Patulin-CMO 產物和 Patulin-SH 產物之吸光值

取 4 uL Patulin 標準品 (1 mg/mL, 溶於 Methanol) 與 4 uL Patulin-CMO (溶於 Methanol) 及 4 uL Patulin-SH (溶於 Methanol) 分別加入 1000 uL d_2H_2O 中均勻混和, 再將此溶液至於石英管中, 利用 DU 800 UV/Visible Spectrophotometer 測定全波長吸光值。

2.3.4 利用 SDS-PAGE 確認抗原之接合

2.3.4.1 製作 0.75 mm 10% 的下層解析膠體

取 4000 ul d_2H_2O , 3300 ul 30% Acrylamide, 2500 ul 1.5 M Tris pH 8.8, 100 ul 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 ul 10% Ammonium persulfate (APS) 與 8 ul N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 混合均勻後加入玻璃片中待其凝固。

2.3.4.2 加入酒精將下膠壓平

2.3.4.3 製作 0.75 mm 5% 的上層膠體

取 1,700 ul d_2H_2O , 415 ul 30% Acrylamide, 315 ul 1.0M Tris pH 6.8, 25 ul 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 25 ul 10% APS 與 2.5 ul TEMED, 混合均勻後加入玻璃

片中並放入齒梳待其凝固。

2.3.4.4 製作蛋白質樣本

取一定濃度所要檢測的蛋白質，加入 4 倍 SDS (8 ml 10% SDS, 9 ml Glycerol, 1,250 ul 2M pH 6.8 Tris, 15% 2-Mercaptoethanol) 並平衡體積使每一管樣品體積相同，之後在 100°C 水中加熱 5 分鐘使蛋白質四級結構變性。

2.3.4.5 進行 SDS-PAGE

將樣品注入膠體後，把膠體放入 running buffer (19.2 mM glycine, 0.1% SDS, 2.5 mM Tris base) 中使用電源供應器使樣品通過膠體，等到樣品線移動至膠體底部時即可將膠取出，使用 Coomassie Brilliant Blue (48.4 ml d₂H₂O, 41.6 ml Methanol, 10 ml Acetic Acid, 0.1 g Brilliant Blue R) 進行染色 15 分鐘，之後使用 Destain buffer (100 ml d₂H₂O, 100 ml Acetic acid, 400 ml Methanol) 進行退染，最後使用掃描器擷取影像。

2.3.5 免疫小鼠及兔子

2.3.5.1 注射免疫抗原至 BALB/c 小鼠體內使其產生免疫反應 (Immunization)

為了使 BALB/c 小鼠產生對 Patulin 具有專一性的抗體，我們將 Patulin-CMO-EDA-BTG (0.05 mg 溶於 200 ul 0.01 M PBS)，加入等體積的費氏完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant) 混合均勻，再以腹腔注射方式將混合物打入小鼠體內。二週後進行加強免疫動作，取同樣的免疫抗原 Patulin-CMO-EDA-BTG (0.05 mg 溶於 200 ul 0.01 M PBS) 注射入小鼠腹部，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 Patulin 的專一性抗體。

2.3.6 多株抗體的純化

2.3.6.1 小鼠多株抗體的純化

將採集到的小鼠血液 (約 100 ul/次)，經由高速冷凍離心機直接離心 13,000 rpm 4°C 15 分鐘，離心完後取其上清液即為血清，並保存於 -20°C 冰箱中。

2.3.7 以酵素連接免疫吸附分析法檢測樣品中 Patulin 的含量

2.3.7.1 直接競爭型 ELISA (cdELISA)

在 96 孔盤中加入 100 ul 的純化後的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋), 於 37°C 環境作用 1 小時後, 以 washing buffer (0.05% Tween 20 於 0.01 M PBS 中) 洗去未反應物質。再加入 200 ul 的 blocking buffer (0.1% BSA 於 0.01 M PBS 中), 於 37°C 環境作用 30 分鐘後, 以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 50 ul 不同濃度的 Patulin 標準品或待測樣品, 並同時加入 50 ul Patulin-CMO-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋), 於 37°C 環境作用 1 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應物質。最後加入 100 ul TMB substrate, 於室溫避光反應 20 分鐘後, 加入 100 ul 1 N HCl 終止反應。並以 ELISA reader 測量波長 450 nm-650 nm 的吸光值。

2.3.7.2 非直接競爭型 ELISA (ciELISA)

在 96 孔盤中加入 100 ul Patulin-CMO-OVA (以 0.01 M PBS 稀釋), 於 37°C 環境中反應 1 小時, 以 washing buffer 洗去未反應物質。再於 96 孔盤中加入 200 ul blocking buffer, 置於 37°C 環境中反應 30 分鐘後, 以 washing buffer 洗去未反應物質。加入 50 ul 不同濃度的 Patulin 標準品, 並同時加入 50 ul 純化後的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋), 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 ul Rabbit anti-mouse IgG-HRP (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。最後加入 100 ul TMB substrate, 於室溫避光反應 20 分鐘後, 加入 100 ul 1 N HCl 終止反應。並以 ELISA Reader 測量波長 450 nm-650 nm 吸光值。

2.3.8 樣品之製備

取 5 g 蘋果汁或蘋果泥置於 50 mL 離心管中, 加入 10 mL Ethyl acetate, 於 Vortex 上震盪 1 分鐘後, 以 3,000 rpm 離心 3 分鐘。上層液移至 50 mL 離心管, 下層液再重複上述萃取步驟一次, 合併上層液並加入 2 mL 1.5% Sodium carbonate 溶液, 於 Vortex 上震盪 1 分鐘後, 以 3,000 rpm 離心 3 分鐘, 上層液移至另一 50 mL 離心管, 下層液再以 5 mL Ethyl acetate 萃取後, 合併上層液並加入 1 g Sodium sulfate, 於 Vortex 上震盪 1 分鐘後, 以濾紙過濾, 於 40°C 水浴, 減壓濃縮至 1~2 mL 後, 於 40°C 水浴並以氮氣吹乾, 殘留物以 0.5 mL Acetic acid (pH 4.0) 溶液回溶, 最後以針筒過濾器過濾,

即可利用 ELISA 及免疫層析試紙分析樣品中 Patulin 含量。

2.3.9 開發 Patulin 快速免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip)

2.3.9.1 合成奈米金粒子

配製 1 mM HAuCl₄ (19.69 mg HAuCl₄ 溶於 50 mL d₂H₂O), 加熱攪拌至沸騰後加入 5 mL 1% trisodium citrate 還原劑 (0.05 g trisodium citrate 溶於 5 mL d₂H₂O), 持續沸騰 5 分鐘即為所需之奈米金粒子, 將合成好的奈米金粒子靜置於室溫冷卻後, 置於 4°C 冰箱備用。

2.3.9.2 製備奈米金粒子探針

將 Patulin 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad 上 (5 ul /strip), 並於 37°C 環境下烘乾。再將 0.25 ul Patulin-CMO-OVA 和 0.25 ul Anti-rabbit-Fc antibody (0.2 mg/ml) 分別點於 NC membrane (孔徑為 15 um, 黏附於塑膠片上, 5 mm×75 mm) 的 Test line 及 Control line 的位置, 並置於 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 (大約重約 2 mm)。並將 sample pad 再疊於 conjugate release pad 上 (約重疊 6 mm)。最後將 absorbent pad (5 mmx27 mm) 置於 strip 的另一端。在 96 孔盤中, 加入 200 ul 欲檢測樣品及不同濃度的 Patulin 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 TLC 確認衍生物

本計劃將 Patulin 的標準品及 Patulin 的衍生物分別點在 TLC 片上, 已展開液 (Toluene : Ethyl acetate : Formic acid, 5 : 4 : 1, v/v/v) 進行展開, 並於 254 nm 波長下觀察結果 (Figure 5)。TLC 片結果顯示其展開後的點高度有差異, 代表極性改變且 Patulin 結構產生變化, 形成 Patulin 衍生物, 因此得知經由此方法衍生是可行的, 並利用此衍生物進行免疫抗原的合成。

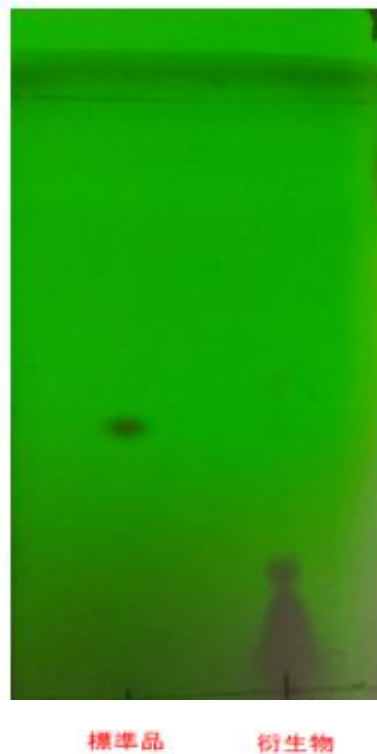


Figure 5. 利用 TLC 觀察是否有衍生成功

由左至右分別比較 Patulin 標準品、Patulin 衍生物兩者之間的極性變化。由結果得知衍生物的極性產生變化，故此衍生法能成功衍生出 Patulin 衍生物。

3.2 Patulin-CMO 產物和 Patulin-SH 產物之吸光值

本計劃將 Patulin 標準品與 Patulin-CMO 及 Patulin-SH 利用 DU 800 UV/Visible Spectrophotometer 測定全波長吸光值 (Figure 6)。測定結果顯示 Patulin-CMO 及 Patulin-SH 約在波長 255 nm 有最高之吸光，而 Patulin 標準品則是在 277 nm 有最高之吸光，代表指兩種方法的確使 Patulin 的結構發生改變，因此得知此兩種方法是可行的。

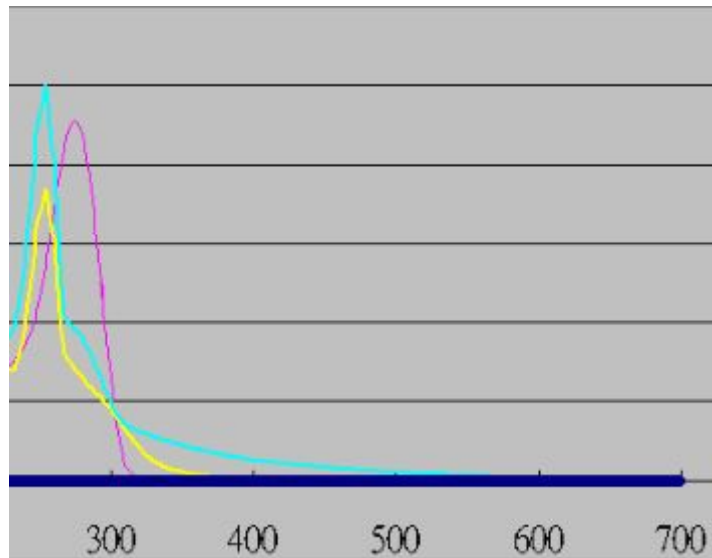


Figure 5. 測定全波長吸光值觀察是否有衍生成功

黃色曲線、淺藍色曲線、紫色曲線、深藍色曲線分別為 Patulin-CMO、Patulin-SH、Patulin 標準品及 Control (d_2H_2O)。由結果發現衍生物的結構發生改變，故得知此衍生法是可行的。

3.3 SDS-PAGE 確認抗原接合

為了確認 Patulin-CMO 和載體蛋白的接合是否成功，本計劃使用 SDS-PAGE 觀察毒素-蛋白結合物和原始蛋白分子量的差異，用以確定 Patulin-CMO 是否有接合上載體蛋白。利用 EDC/NHS 法接合 HRP 及 OVA，其 SDS-PAGE 結果 (Figure 7) 顯示接合物的訊號位置較原始蛋白略高了一些，由此可知蛋白接合後分子量較接合前略大，可推測蛋白接合是成功的，故本研究將此蛋白分別用來作為直接競爭型 ELISA 的競爭性毒素-酵素接合物及非直接競爭型 ELISA 的覆被抗原。

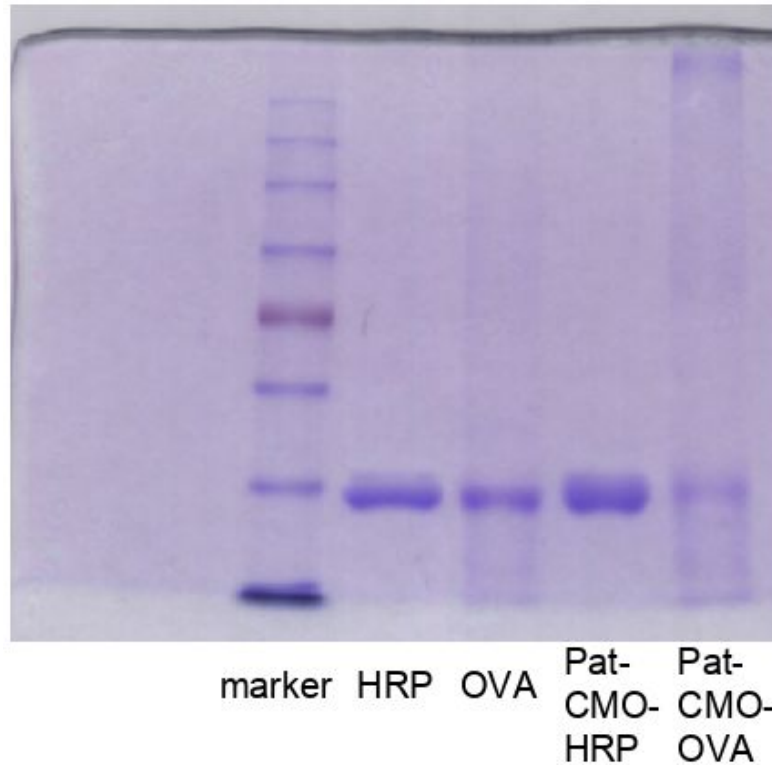


Figure 7. 利用 SDS-PAGE 確認 EDC/NHS 法接合 Patulin 與 HRP 及 OVA 的接合情形

由左到右第一行為 marker，第二行為 HRP 標準品，第三行為 OVA 標準品，第四行為 Patulin-CMO-HRP 接合物，第五行為 Patulin-CMO-OVA 接合物。由結果得知 HRP 及 OVA 和 Patulin 接合後的蛋白帶相對於 HRP 標準品及 OVA 標準品的蛋白質帶位置來得高，因此可知 Patulin-CMO 有接合到 HRP 及 OVA。

3.4 抗體專一性測試

本計劃為尋找能有效刺激紐西蘭大白兔產生高專一性抗體的抗原，因此先使用 Balb/c 小鼠進行多種免疫抗原測試，若觀察到某一抗原能使小鼠產生高專一性抗體時，再將此抗原施打入紐西蘭大白兔體內，便能使其大量產生高專一性的抗體。

本計劃分別利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 及直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來測試抗體對 Patulin 的專一性，測試結果發現直接競爭型 ELISA (cdELISA) 的抗體與抗原專一性辨識的效果較強，可能是因為覆被抗原 Patulin-CMO-OVA 的化學合成效率不佳，導致抗體無法有效的結合，而產生抗體結合效率較差的實驗結果，因此本計劃往後便採用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來測試抗體對 Patulin 的專一性。

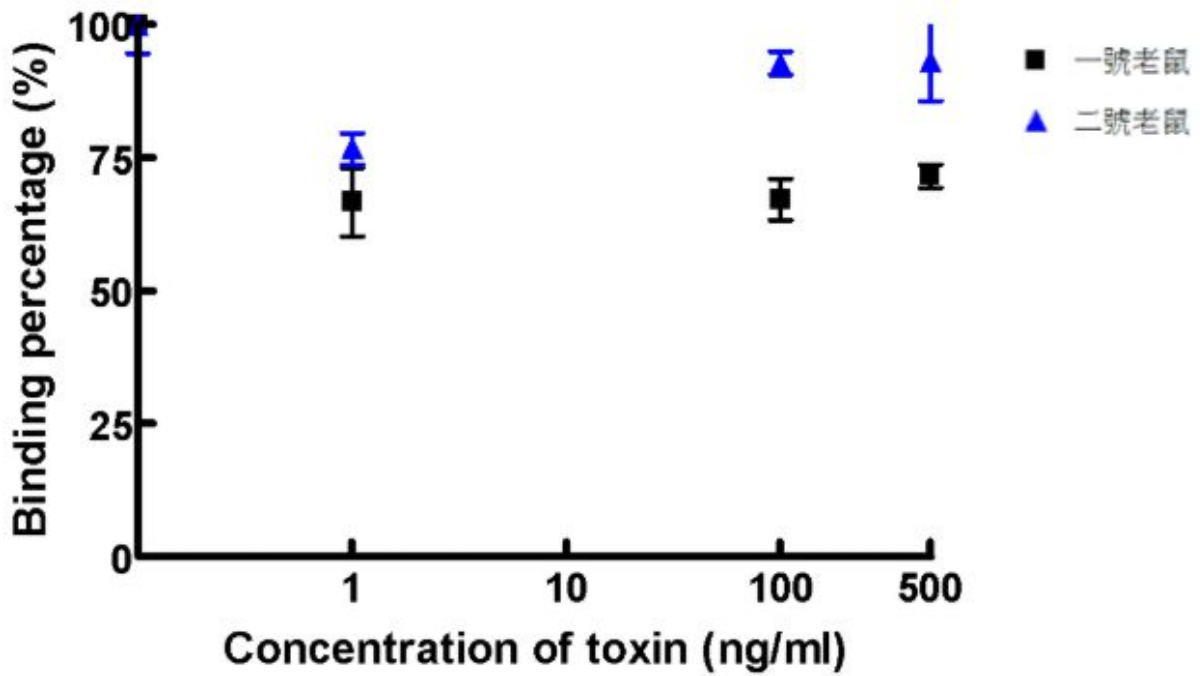


Figure 8. 利用非直接競爭型 ELISA (ciELISA) 對免疫 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:2, w/w) 老鼠所產生的抗體進行專一性測試

由此圖推測覆被抗原與一號老鼠及二號老鼠體內的抗體結合力不佳，形成競爭效果極差的實驗結果

3.4.1 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:2, w/w) 作為抗原免疫小鼠

本計劃首先採用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 來測試抗體對 Patulin 的專一性，發現注射此抗原的小鼠能產生 IC_{50} 約為 100 ng/ml 的抗體，代表此免疫抗原能有效的刺激小鼠的免疫反應，但此檢測的靈敏度並未達到我國檢測食品中 Patulin 含量的標準。

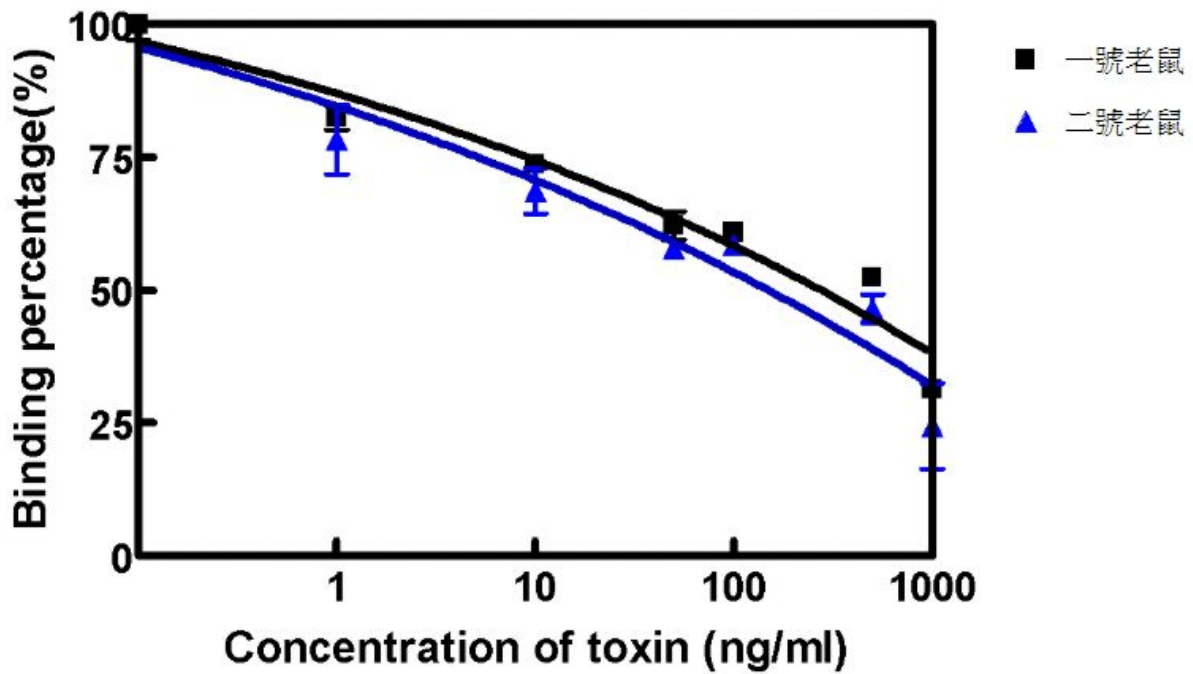


Figure 9. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對免疫 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:2, w/w) 老鼠所產生的抗體進行專一性測試

由此圖可看出一號老鼠與二號老鼠具有專一性辨識 Patulin 的抗體，但未達到本計劃所需求的檢測靈敏度。

3.4.2 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:1, w/w) 及 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:4, w/w) 作為抗原免疫小鼠

由於本計劃希望製備更高專一性的抗體，因此改變毒素與蛋白的接合比例做為另一種免疫抗原去刺激小鼠的免疫反應，從直接競爭型 ELISA (cdELISA) 的結果可看出不論是免疫 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:1, w/w) 的一號老鼠或是免疫 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:4, w/w) 的二號老鼠，所產生的抗體在辨識 Patulin 的專一性上都極差，無法從圖中求得 IC_{50} ，代表此兩種抗原都不能刺激小鼠引發強烈的免疫反應來產生高專一性的抗體。

3.4.3 Patulin-SH-BTG (1:2, w/w) 作為抗原免疫小鼠

經過使用 CMO 法衍生 Patulin 並接合載體蛋白做為免疫抗原後，發現此法不能產生足夠高度專一性辨識 Patulin 的抗體，而過去的文獻大多採用 Succinic anhydride 法衍生 Patulin 去接合載體蛋白做為免疫抗原，因此本計劃也希望能透過此法產生高專一性的抗體，從直接競爭型 ELISA (cdELISA) 的結果可看出免疫 Patulin-SH-BTG (1:2, w/w) 的一號老鼠與二號老鼠，所產生的抗體辨識 Patulin 的能力比先前免疫 Patulin-CMO-EDA-BTG (1:2, w/w) 時更差，無法從圖中求得 IC_{50} ，顯示出 CMO 法製得的免疫抗原比 SH 法製得的免疫抗原更適合去刺激鼠兔的免疫反應，有更高的機會能使動物產生出高專一性的抗體。

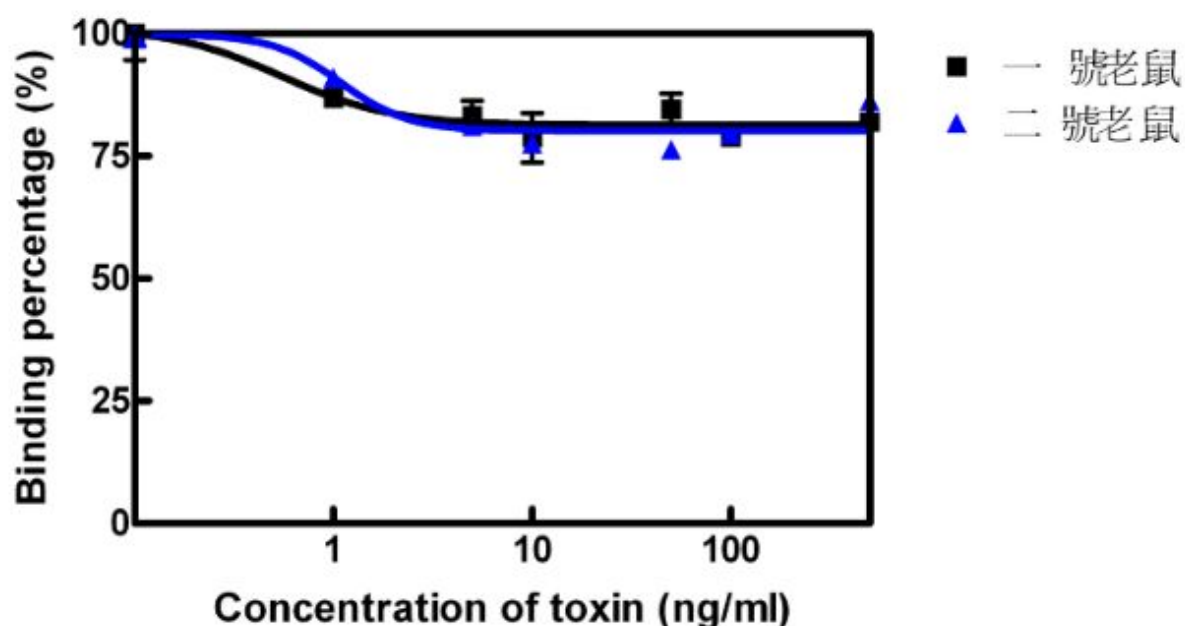


Figure 12. 利用直接競爭型 ELISA (cdELISA) 對免疫 Patulin-SH-BTG (1:2, w/w) 老鼠所產生的抗體進行專一性測試

由此圖可知不論是一號小鼠還是二號小鼠抗體的專一性都不佳，代表 SH 法不適合用來製備 Patulin 的免疫抗原。

四，討論

Patulin 為小分子黴菌毒素，只具有抗原性而不具有免疫原性，需要與載體蛋白結合才能做為免疫抗原，用於注射實驗動物以產生 Patulin 抗體，因此化學合成的步驟及產率極為重要，必須要嘗試多種的載體蛋白及多種的接合比例，以求得最合適的免

疫抗原選擇，本計劃有鑑於過去的文獻所使用的 SH 法製備之免疫抗原無法產生足夠高度專一性的 Patulin 抗體，故嘗試採用 CMO 法製備免疫抗原。

在 TLC 片的檢測顯示 Patulin 以 CMO 法衍生可得到極性改變之 Patulin 衍生物，故得知此衍生法是可行的 (Figure 5)，再透過 EDC/NHS 法接合 HRP、OVA 及載體蛋白 EDA-BTG 來製備免疫抗原，最後藉由 SDS-PAGE 檢測反應結果，確認蛋白的接合是成功的。

本計劃最初使用毒素蛋白比例為 1:2 (w/w) 去接合免疫抗原，但從 cdELISA 的結果可發現此抗原用於刺激小鼠所產生出的抗體雖具有 IC_{50} 約為 100 ng/ml 的檢測靈敏度，但仍未達本國食品檢測 Patulin 的標準 10 ng/ml，本計劃推測可能因為 Patulin 的結構極為簡單且分子量極小，導致免疫反應的產生不易，因此本計劃改變毒素與蛋白的接合比例為 1:1 (w/w) 及 1:4 (w/w) 去合成免疫抗原，期望能改善抗體專一性不足的問題。

本計劃接著使用毒素蛋白比例分別為 1:1 (w/w) 與 1:4 (w/w) 去接合免疫抗原，但從 cdELISA 的結果可發現此兩種抗原用於刺激小鼠所產生出的抗體的專一性比先前所產生的抗體更差，由此可歸納出以 CMO 法衍生後，毒素接合載體蛋白的最佳比例為 1:2 (w/w)，能產生出專一性最高的抗體。

因為過去的文獻大多使用 SH 法衍生 Patulin 再接合載體蛋白來製備免疫抗原，故本計劃也嘗試此法來製備免疫抗原，期望能引發小鼠強烈的免疫反應，產生高專一性的抗體，但從 cdELISA 的結果觀察到利用 SH 此刺激小鼠所產生的抗體專一性比 CMO 法更差，歸納得知 CMO 法的確如先前預期的比 SH 法更適合用來進行 Patulin 的衍生及免疫抗原的合成。

在未來的實驗中，本計劃預先想克服目前實驗上的困難，本計劃欲同時利用 SH 法與 CMO 法所製備的免疫抗原刺激鼠兔的免疫反應，或是利用不同的接合法來接合 Patulin 載體蛋白質，例如：Glutaraldehyde，或是利用不同的載體蛋白質去接合 Patulin，例如： γ -globulin，期望透過新的免疫抗原使實驗動物產生更好的專一性抗體，使本計劃能夠利用此專一性抗體建立一套酵素連結免疫吸附分析系統，並期望進入下一階段的研究，利用小鼠的脾臟細胞及融合瘤細胞的融合技術，來製備可專一性辨識 Patulin 的單株抗體，並藉由單株及多株抗體來開發適用於台灣現行檢測標準之快速免疫層析試紙，以達到大量且有效的篩檢市面上可能受到 Patulin 汙染的相關產品，以免食品中 Patulin 的殘留導致民眾身體的傷害。

五, 參考資料

1. Pal S, Singh N, Ansari KM (2017). Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicol Res-UK*, 6, 764–771.
2. Moulé Y, Hatey F (1977). Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from *Byssoschlamys nivea*. *Febs Lett*, 74, 121-125.
3. Fliege R, Metzler M (2000). Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles. *Chem Res Toxicol*, 13, 363-372.
4. Sabater-Vilar M, Maas RF, De Bosschere H, Ducatelle R, Fink-Gremmels J (2004). Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. *Mycopathologia*, 158, 419-426.
5. McLaughlin J, Lambert D, Padfield PJ, Burt JP, O'Neil CA (2009). The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in caco-2 cells. *Toxicol in Vitro*, 23, 83-89.
6. Al-Hazmi MA (2014). Patulin in apple juice and its risk assessments on albino mice. *Toxicol in Health*, 30, 534-545.
7. Sforza S, Dall'asta C, Marchelli R (2006). Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 25, 54-76.
8. McElroy LJ, Weiss CM (1993). The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate. *Can J Microbiol*, 39, 861-863.
9. Sheu F, Lee O, Shyu YT (1999). The synthesis of antigens and the production of antibodies against patulin derivatives. *J Food Drug Anal*, 7, 65-72.