

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 ： 名 稱	芬普尼單株抗體之製備並將其應用於酵素免疫連結吸附 分析法及奈米金粒子免疫層析試紙之開發
-----------------	--

執行計畫學生：鐘明耀

學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-030-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27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:芬普尼(Fipronil)單株抗體之製備並將其應用於酵素免疫
分析法及奈米金粒子免疫層析試紙之開發

執行計畫學生：鐘明耀

學生計畫編號：NSC108-2813-C-040 -030 -B

研 究 期 間：108 年 7 月 1 日至 109 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：109 年 3 月 31 日

摘要 (Abstract)

芬普尼 (Fipronil) 為一種苯基吡唑類殺蟲型農藥，常用於螞蟥、白蟻、甲蟲、蟑螂、扁蟲、蜜蜂等昆蟲的殺蟲劑。經國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 研究發現，Fipronil 具有致癌性。因此我國政府訂定 Fipronil 的限制含量，於包莖菜類、茄子為 30 ppb；蛋類為 10 ppb；紅豆為 2 ppb；玉米、米類、芒果、小黃瓜、茶葉為 1 ppb。我國衛生福利部食品藥物管理署報告中指出於 2008–2011 年間共有 54 件農作物含有過量的 Fipronil，更於 2019 年 2 月 17 日查出含有 Fipronil 的雞蛋流入市面。因此本研究欲利用抗原-抗體專一性結合的特性，開發一快速免疫檢測分析方法來檢測雞蛋、蛋製品及農產品中 Fipronil。由於 Fipronil 是分子量為 437.14 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 Fipronil 免疫小鼠及兔子並不足以引發免疫反應，因此 Fipronil 需要與載體蛋白質結合成具有免疫原性的抗原，本研究將 Fipronil 結合載體蛋白質做為免疫抗原，並用於免疫實驗動物以製備 Fipronil 的專一性抗體。本研究以 Carbodiimide 法將 Fipronil 與載體蛋白質 γ -globulin 接合為具有免疫原性的抗原，並以此抗原透過腹腔注射的方式注射入 BalB/c 小鼠內，藉此產生對 Fipronil 具有專一性之抗體。本研究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) 發現小鼠於免疫後第 9 週已成功製備出對 Fipronil 具有專一性之抗體，但其抗體的敏感度仍不足以應用於檢測食品中 Fipronil 的含量，所以持續加強免疫小鼠，而在免疫後第 43 週利用 cdELISA 檢測小鼠血清發現其一號小鼠及二號小鼠血清中抗體抑制 50% Fipronil-酵素接合物與抗體接合所需的抗原濃度 (IC_{50}) 分別為 2.87 ng/mL 及 6.18 ng/mL。因此本研究利用一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 Fipronil 具有專一性的細胞株，但經過篩選後，本研究沒有得到對芬普尼具有專一性的單株抗體的細胞株。因此本研究未來的方向將會持續的觀察二號小鼠所產生的抗體對芬普尼的專一性，並再進行一次融合瘤實驗，期望能夠提高製備出具有良好專一性的單株抗體。另外本研究也免疫一隻紐西蘭大白兔，免疫後第 31 週利用 cdELISA 檢測大白兔血清發現其 IC_{50} 為 169 ng/mL，其 IC_{50} 仍高於限制含量，其專一性及敏感性也不佳，因此本研究會持續監測紐西蘭大白兔血清中是否具有 Fipronil 專一性抗體，並透過加強免疫使紐西蘭大白兔中 Fipronil 的抗體效價及專一性提升。

目錄(Index)

主題	頁數
摘要	2
一、緒論	6
1.1 研究起源	6
1.2 芬普尼 (Fipronil) 基本性質	7
1.3 芬普尼 (Fipronil) 相關研究	7
1.4 酵素連結免疫分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)	8
1.5 快速免疫層析試紙	9
1.6 研究動機及研究問題	10
二，材料與方法	12
2.1 實驗藥品及動物	12
2.2 實驗儀器	13
2.3 實驗方法	14
2.3.1 製備不同芬普尼 (Fipronil) 接合物	14
2.3.2 免疫小鼠	15
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	16
2.3.5 細胞融合法	16
2.3.6 單株抗體之篩選	17
三、實驗結果	17

3.1 SDS-PAGE 確認抗原接合	17
3.2 利用 cdELISA 檢測 Fipronil 專一性抗體之效價及專一性	18
3.2.1 小鼠血清對於 Fipronil 專一性抗體之效價及專一性測試	18
3.2.2 芬普尼單株抗體之效價及專一性比較	19
3.2.3 紐西蘭大白兔血清對於 Fipronil 專一性抗體之效價及專一性測試	20
四、討論	21
五、參考文獻	23

一、緒論 (Introduction)

1.1 研究起源

Fipronil 為農藥的一種，在中國又名氟蟲腈，在犬貓的產品中又名蚤不到。常用於螞蟥、白蟻、甲蟲、蟑螂、扁蟲、蜜蜂等昆蟲的殺蟲劑。因使用 Fipronil 進而污染到土壤或水，並殘留於植物或水中，使動物或人食用到含有 Fipronil 的食品而造成危害。經美國國際癌症研究署 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 研究發現，Fipronil 具有致癌性，為第二類致癌物 (對人類很可能有致癌性)，半衰期長達 8 個月，長期暴露於 Fipronil 會引起甲狀腺良性和惡性的腫瘤產生。而在懷孕期間接觸 Fipronil 時，會造成胎兒發展延緩，而長期暴露於 Fipronil 的環境下也影響生育能力，可能存在減少交配、生育能力下降、產子數減少和降低受孕機會的風險 (EPA 2005)。

由於 Fipronil 為第二類致癌物，半衰期長達 8 個月，過度攝取易造成腸胃道刺激、影響胚胎生殖系統發育，造成畸胎、流產，甚至有增加甲狀腺良性和惡性腫瘤的產生風險，可能也具有神經毒性。通過阻斷 GABA-gate 氯離子通道和 GluCl 通道來破壞中樞神經系統 (Lu et al., 2017)。

Fipronil 可被作為殺蟲劑使用，因此蛋農將其噴灑於養雞場而達到除蟲的效果，但造成雞隻所產下的雞蛋含有 Fipronil，而這些含有 Fipronil 雞蛋經由市場賣給民眾，使民眾食入含有 Fipronil 污染的雞蛋，進而增加民眾罹癌之機率。歐盟食品安全局早已規定，禁止在食用動物養殖過程中使用殺蟲劑 Fipronil，國內在 2018 年時由農委會公布彰化地區有三個養雞場的 Fipronil 含量超標，並且在 2019 年 2 月 17 日又查出含有 Fipronil 的雞蛋再度流入市面。顯示檢測雞蛋中 Fipronil 的殘留量已刻不容緩。

1.2 芬普尼 (Fipronil) 基本性質

芬普尼 (Fipronil) 化學名為 ([5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1 H-pyrazole-3-carbonitrile) 分子量為 437.14 Dalton (Figure 1)，是 Rhone-Poulenc Agro 在 1989 年開發的新型廣效型殺蟲劑，對於許多已對環戊二烯類、菊酯類、氨基甲酸酯類殺蟲劑產生抗藥性的害蟲都有極高的敏感性，且使用需求量小、藥效持續性長 (Jian et al., 2001)，且可被作為殺蟲劑使用，因此蛋農違法將其作為雞隻除蟲之藥品。

在 2017 年時在歐洲發生 Fipronil 污染的雞蛋和蛋製品的蔓延，經歐盟委員會確認，遭殺蟲劑 Fipronil 污染的雞蛋已經擴散至香港、瑞士及 15 個成員國。約 700,000 個雞蛋被認為已經在英國貨架上市，顯示 Fipronil 的殘留量是一個值得關注的議題，因此我國訂定 Fipronil 的限制含量，於玉米、米類、芒果、小黃瓜、茶葉為 1 ppb，包莖菜類、茄子為 30 ppb，紅豆為 2 ppb，蛋類為 10 ppb。

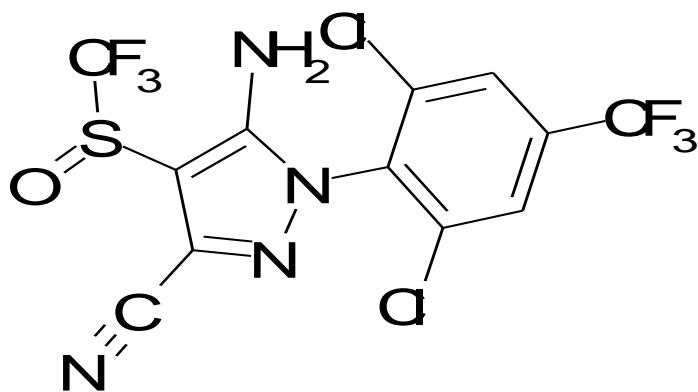


Figure 1：芬普尼(Fipronil) 結構式

1.3 芬普尼 (Fipronil) 相關研究

目前最常用來檢測 Fipronil 的技術是利用 HPLC (Bobe et al., 1998) 及氣相層析質譜法 (Vilchez et al., 2001)，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

殘留量的方法，所以利用 ELISA 檢測 Fipronil 殘留量是另一可行的辦法 (Liu et al., 2007)。

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

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之特性，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發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)，三明治型酵素連結免疫分析法 (Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)，本研究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。

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

ELISA 的優點為樣品準備較不複雜且進行實驗的時間較為快速，成本的開銷也相對於 HPLC 或是 GC-MS 來的低，儘管 ELISA 的準確性不會比 HPLC 及 GC-MS 來的好，不過卻是一個相對較為廉價且實用的檢測方式。(Figure 2)

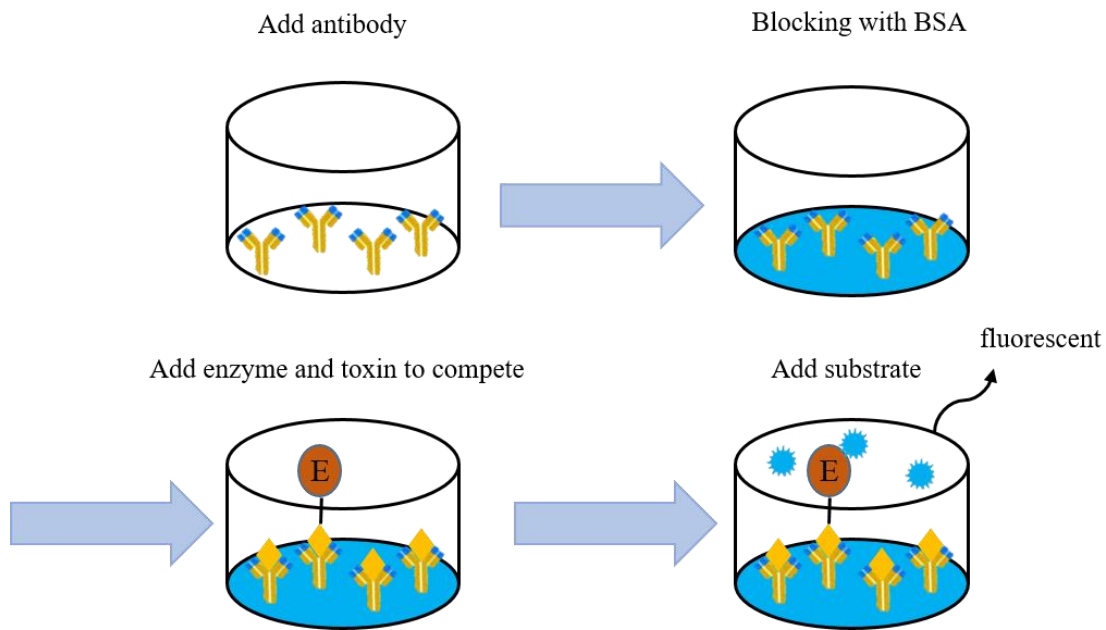


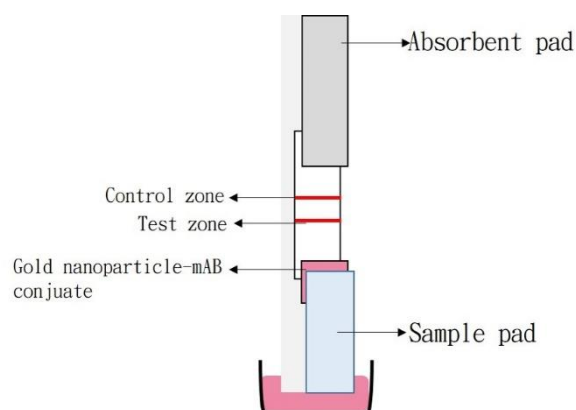
Figure 2：直接競爭型酵素連結免疫分析法

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。

(Figure 3)

(A)



(B)

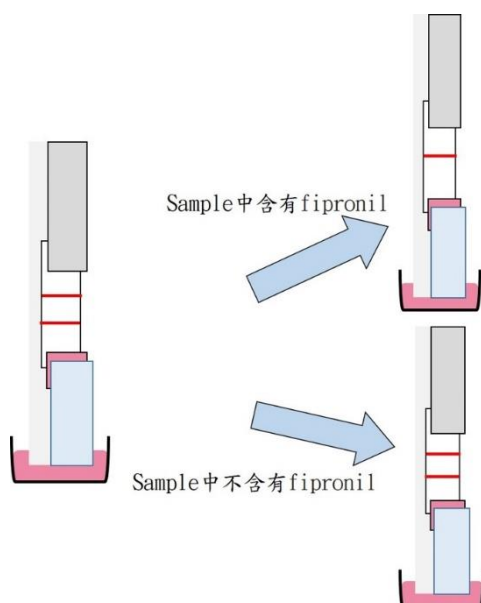


Figure 3 : (A) 免疫層析試紙組成份與 (B) 分析結果。

1.6 研究動機及研究問題

目前檢測 Fipronil 的方法主要有高效液相層析色譜分析法 (HPLC High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 及氣相層析質譜法 (Gas chromatography–mass spectrometry, GC-MS)，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。本研究希望能夠建立出快速檢測

Fipronil 的檢測方法，利用 ELISA 在偵測的靈敏度上優於上述方法，且操作較為快速、簡便。因此製備出高敏感度與高專一性的 Fipronil 抗體以開發 ELISA，再以此 Fipronil 抗體開發快速免疫層析試紙，對於檢測市面上雞蛋或其他使用雞蛋所製作出的產品及其它可能會有 Fipronil 殘留的產品是迫切需要的。

因此本研究分成三個子目標：

【子目標一】：製備專一性 Fipronil 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 Fipronil 的含量

-樣品製備

-直接競爭型 ELISA

-非直接競爭型 ELISA

【子目標三】：開發 Fipronil 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

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

Freund's complete adjuvant

Bovine serum albumin (BSA)

1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide (EDC)

N-hydroxysuccinimide (NHS)

Polyethylene Glycol 1500 (PEG-1500)

HAT medium supplement (50X)

HT medium supplement (50X)

γ -globulin

Sodium periodate (NaIO_4)

Sodium acetate

Tris

Coomassie Brilliant Blue R-250

Sodium bicarbonate

下列藥品購於 Merck (Darmstadt, Germany)

polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)

Acetate acid

Sodium carbonate

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

aqueous Hydrochloric Acid (HCl)

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Methanol

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

Horseradish peroxidase (HRP)

下列藥品購於 Toronto Research Chemicals Inc.

Fipronil

下列材料購於購於 Nunc (Roskild, Demark)

Microtiter plates

下列試劑購於 Neogen Corp. (Lexington, KY)

3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, K-Blue)

下列動物購於國家動物中心

BALB/c 小鼠

下列動物購於大宗畜牧場

紐西蘭大白兔

2.2 實驗儀器

設備名稱	廠牌及型號
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
Refrigerator	SHOCKLOCK
Hot plate	Fargo HMS-102

2.3 實驗方法

2.3.1 製備不同芬普尼 (Fipronil) 接合物

由於 Fipronil 為小分子化合物，分子量為 437.14 Dalton，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，本研究利用 Liu 等人直接將 Fipronil 與載體蛋白質 γ -globulin 接合，產生出具有刺激免疫反應的抗原 (Liu et al., 2007)。

2.3.1.1 使用 Carbodiimide 法將 Fipronil 與載體蛋白質 γ -globulin 接合

將 EDC 溶液 (1 mg EDC 溶於 10 μ l DMSO) 和 NHS 溶液 (0.5 mg NHS 溶於 5 μ l 的 DMSO) 加入 Fipronil 溶液 (1 mg Fipronil 溶於 100 μ L DMSO)，在室溫下反應兩小時。將此混和物緩慢的加入 γ -globulin 溶液 (2 mg γ -globulin 溶於 200 μ l 0.1 M Carbonate buffer, pH 9.6) 中，於室溫反應兩個小時後，利用 1 L 0.01 M PBS 進行透析三天後，即可得 Fipronil- γ -globulin。(Figure 4)

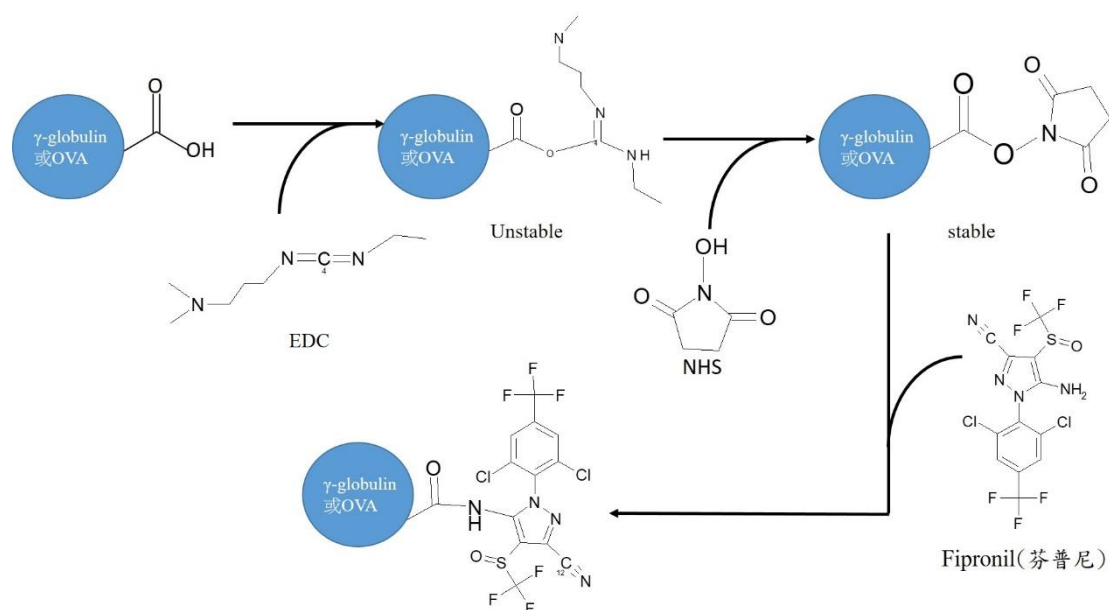


Figure 4 : Fipronil 利用 Carbodiimide 法接合示意圖

2.3.1.2 使用 NaIO_4 法將 Fipronil 與辣根過氧化氫酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 接合

將 HRP 溶液 (4 mg HRP 溶於 600 μl $\text{D}_2\text{H}_2\text{O}$) 加入 NaIO_4 溶液 (21.39 mg NaIO_4 溶於 1000 μl $\text{D}_2\text{H}_2\text{O}$)，在室溫下反應三十分鐘。並利用 1 L 1 mM Acetate buffer 進行透析一天後，利用 0.2 M Carbonate buffer 將 pH 調至 9.5 後，將此溶液緩慢的加入 Fipronil 溶液 (0.5 mg Fipronil 溶於 100 μl DMSO) 中，於室溫反應四個小時後，將 NaBH_4 溶液 (4 mg 的 NaBH_4 溶於 1000 μl $\text{D}_2\text{H}_2\text{O}$) 加入此混合物中，於室溫反應一個小時後，利用 1 L 0.01 M PBS 進行透析三天後，即可得 Fipronil-HRP。(Figure 5)

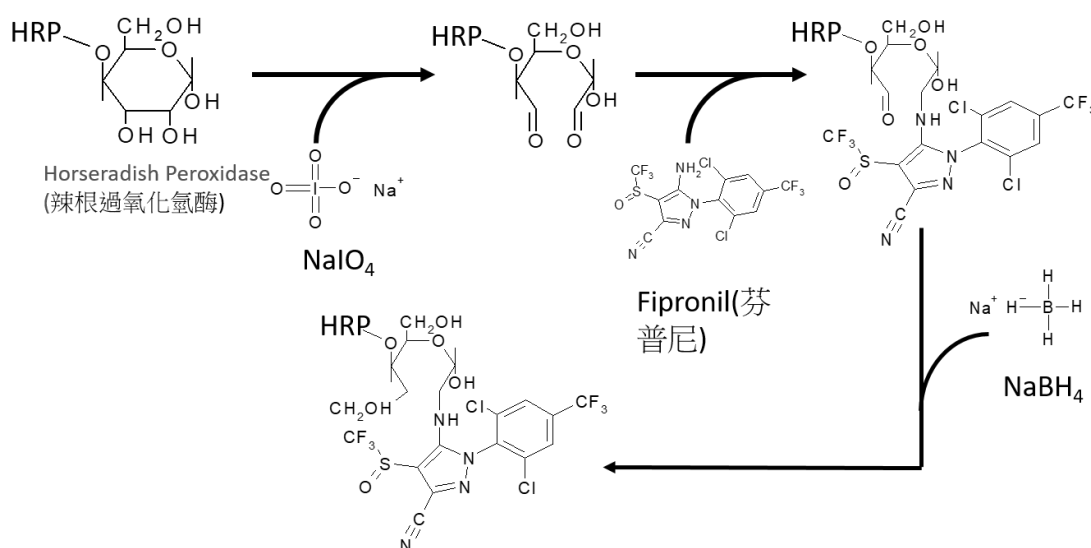


Figure 5 : Fipronil 利用 NaIO_4 法接合 HRP 示意圖

2.3.2 免疫小鼠

製備好的抗原 (Fipronil- γ -globulin) 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 cdELISA 檢測是否產生 Fipronil 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 μL /次)，經由高速冷凍離心機直接離心

13,000 rpm 4°C 30 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 環境作用 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 小鼠或大白兔血清 (以 0.01 M PBS 稀釋)，於 4°C 環境作用 overnight 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 環境作用 30 分鐘。以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 50 μ L Fipronil 標準品 (0.1 – 100 ng/ml)，並同時加入 50 μ L Fipronil-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋)，置於 37°C 環境反應 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 Fipronil 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 cdELISA 測試 medium 中是否有 Fipronil 抗體。

2.3.6 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。

三、實驗結果

3.1 SDS-PAGE 確認抗原接合

為了確定 Fipronil 和載體蛋白質之間的接合效果，本研究使用 SDS-PAGE 觀察 Fipronil 和載體蛋白質接合前後之分子量的變化，用以比較接合效果。利用 Carbodiimide 法接合 γ -globulin，從 SDS-PAGE 上的結果表示 (Figure 6)，其蛋白的訊號較未接合的略高一些，因此可知接合後的蛋白分子量較未接合前大一些，由此可知本研究的蛋白抗原有接合成功，因此利用此接合成功的蛋白抗原來免疫小鼠。

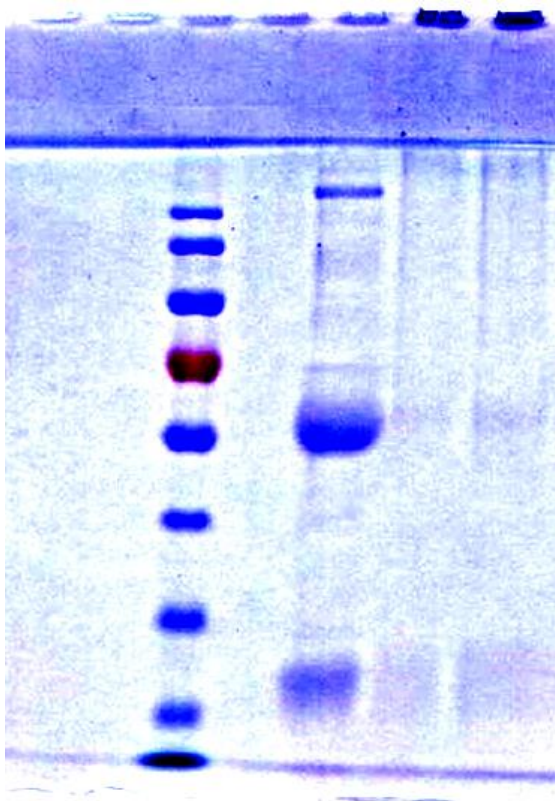


Figure 6：利用 SDS-PAGE 確認使用 Carbodiimide 法接合 γ -globulin 的接合情形

從左至右第一行為 Marker，第二行為 γ -globulin 標準品，第三行為 Fipronil- γ -globulin（蛋白含量為 $5\mu\text{g}$ ），第四行為 Fipronil- γ -globulin（蛋白含量為 $10\mu\text{g}$ ）。由結果可知 Fipronil 有成功接合上 γ -globulin， γ -globulin 和 Fipronil 接合後其蛋白質帶（protein band）相較於 γ -globulin 標準品的蛋白質帶（protein band）略高一些，故 γ -globulin 有成功與 Fipronil 接合。

3.2 利用 cdELISA 檢測 Fipronil 專一性抗體之效價及專一性

3.2.1 小鼠血清對於 Fipronil 專一性抗體之效價及專一性測試

本研究利用 Fipronil- γ -globulin 作為免疫抗原免疫 BalB/c 小鼠，並於免疫後第 43 週，利用 cdELISA 對小鼠血清進行抗體的效價及專一性測試，由 Figure 7 可知，一號小鼠及二號小鼠血清中對 Fipronil 之 IC_{50} 分別為 2.87 ng/mL 及 6.18 ng/mL ， A_0 (Control，無 Fipronil 競爭) 分別為

0.97 及 0.92，因為一號小鼠專一性與二號小鼠相近，但一號小鼠效價略高於二號小鼠，因此本研究選用一號小鼠進行融合瘤實驗。

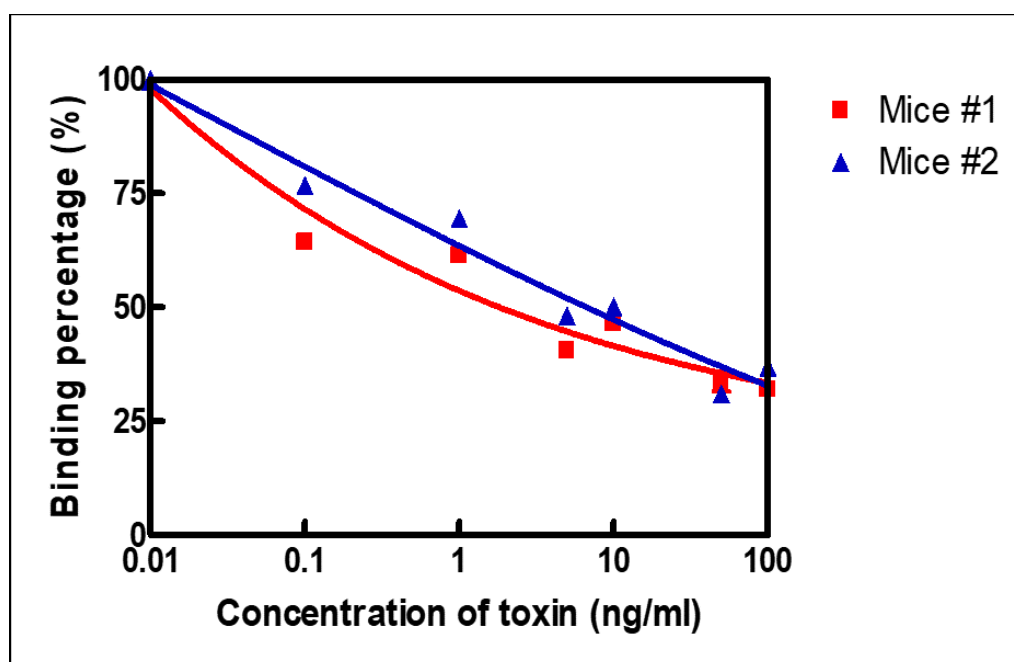


Figure 7：利用 cdELISA 對免疫 Fipronil 小鼠之血清進行抗體效價及專一性測試

3.2.2 芬普尼單株抗體之效價及專一性比較

本研究於第 44 週加強免疫三次後 (Figure 8)，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 Fipronil-HRP 及 Fipronil 標準品來篩選細胞培養液中是否有對 Fipronil 具有專一性的抗體，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，沒有得到任何 1 個 well 中的培養液具有高度專一性抗體之反應，因此本研究沒有成功製備出對芬普尼具有專一性的單株抗體。

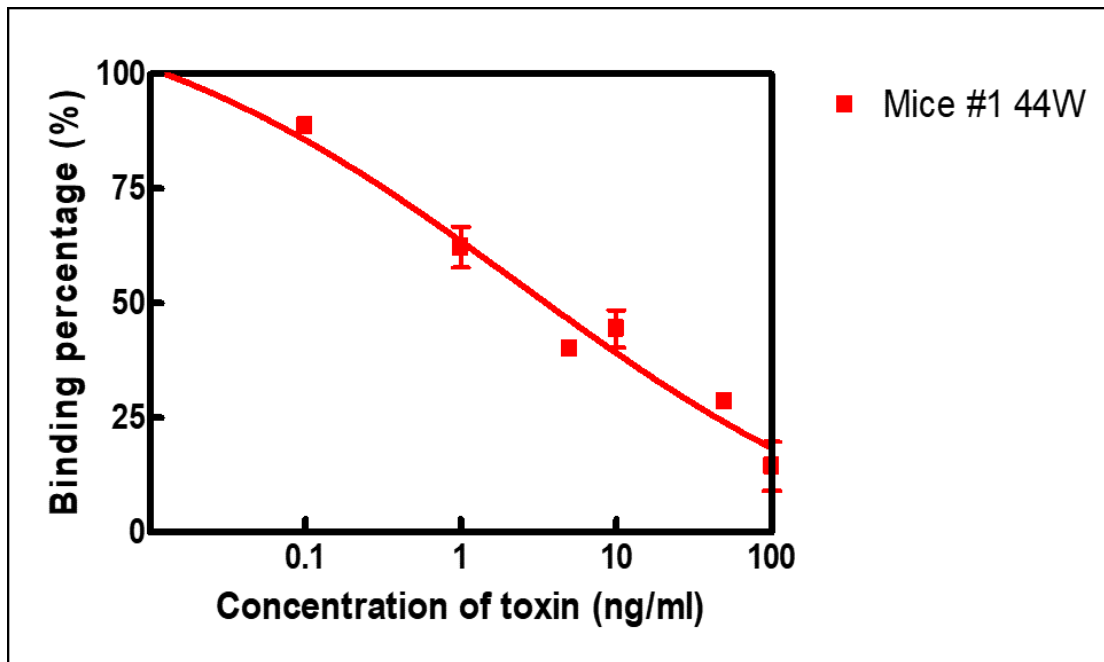


Figure 8：利用 cdELISA 對加強免疫 Fipronil 小鼠之血清進行抗體效價及專一性測試

從結果可知，本研究於第 44 週加強免疫三次後，利用 cdELISA 對加強免疫 Fipronil 小鼠之血清進行抗體效價及專一性測試，得到一號小鼠血清中對 Fipronil 之 IC_{50} 為 3.23 ng/mL， A_0 (Control，無 Fipronil 競爭)為 0.989，因此本研究利用此血清作為篩選細胞培養液中是否有對芬普尼具有專一性的抗體的 Control，但經過 960 個 well 的篩選過程後，沒有得到任何 1 個 well 中的培養液具有高度專一性抗體之反應。

3.2.3 紐西蘭大白兔血清對於 Fipronil 專一性抗體之效價及專一性測試

本研究利用 Fipronil- γ -globulin 作為免疫抗原免疫紐西蘭大白兔，並於免疫後第 31 週，利用 cdELISA 對兔子血清進行抗體的效價及專一性測試，由 Figure 9 可知，血清中對 Fipronil 之 IC_{50} 為 169 ng/mL， A_0 (Control，無 Fipronil 競爭)為 1.032，其 IC_{50} 仍高於限制含量，其專一性及敏感性也不佳，因此本研究會持續監測紐西蘭大白兔血清中是否具有 Fipronil 專一性抗體，並透過加強免疫使紐西蘭大白兔中 Fipronil 的抗體效價及專一性提升。

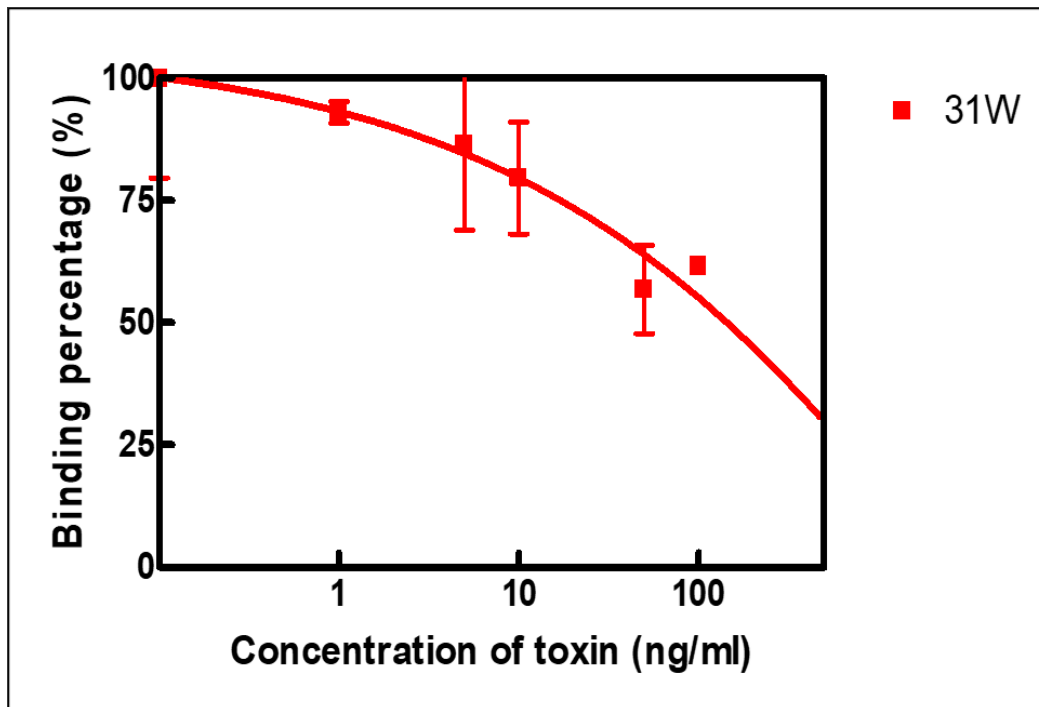


Figure 9: 利用 cdELISA 對免疫 Fipronil 兔子之血清進行抗體效價及專一性測試

四、討論

由於 Fipronil 為一種新型廣效型殺蟲劑，對於許多已對環戊二烯類、菊酯類、氨基甲酸酯類殺蟲劑產生抗藥性的害蟲都有極高的敏感性，且使用需求量少、藥效持續性長，且可被作為殺蟲劑使用，因此蛋農違法將其作為雞隻除蟲之藥品。但經 IARC 研究發現，Fipronil 具有致癌性，為第二類致癌物，長期暴露於 Fipronil 會引起甲狀腺良性和惡性的腫瘤產生。因此本研究希望利用抗原-抗體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，並應用於檢測市面上雞蛋或其他使用雞蛋所製作出的產品及其它可能會有 Fipronil 殘留的產品。

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

研究利用 Fipronil 上活性基團胺基 (-NH₂) 並使用 Carbodiimide 法來接合蛋白上的羧基 (-COOH)，將 Fipronil 與載體蛋白質 γ -globulin 以莫耳分率 343:1 進行接合，以達到製備抗原的目的 (Figure 4)，並利用此蛋白質接合物來免疫 BalB/C 小鼠及紐西蘭大白兔。

本研究利用 Carbodiimide 法使 Fipronil 接合至載體蛋白質 γ -globulin，並藉由 SDS-PAGE 的結果得知此抗原接合成功，因此利用此抗原來免疫小鼠及紐西蘭大白兔。

本研究利用 cdELISA 檢測小鼠血清中是否有對 Fipronil 專一性之抗體，從結果可知，於免疫後第 43 週時，一號小鼠及二號小鼠血清中已有對 Fipronil 高專一性的抗體，此兩隻小鼠血清對於 Fipronil 之 IC₅₀ 分別為 2.87 ng/mL 及 6.18 ng/mL，A₀ 分別為 0.97 及 0.92，因為一號小鼠專一性與二號小鼠相近，但一號小鼠效價略高於二號小鼠，因此本研究選用小號小鼠進行融合瘤實驗，但經過 960 個 well 的篩選後，沒有得到任何 1 個 well 中的培養液具有高度專一性抗體之反應，因此本研究沒有成功製備出對芬普尼具有專一性的單株抗體。此外，本研究還利用 cdELISA 檢測紐西蘭大白兔血清中是否有對 Fipronil 專一性之抗體，從結果中得知，在其免疫後第 31 週已產生對 Fipronil 專一性之抗體，因此本研究利用此抗原來免疫小鼠或兔子皆是有效的。

在未來的實驗中，本研究會持續監測紐西蘭大白兔血清中是否具有 Fipronil 專一性抗體，並透過加強免疫使紐西蘭大白兔中 Fipronil 的抗體效價及專一性提升。另外，本研究會持續的觀察二號老鼠所產生的抗體對 Fipronil 的專一性，接下來本研究想利用 DCC/NHS 法及 Glutaraldehyd 法來接合 Fipronil，期望免疫小鼠可以產生更好的專一性及抗體效價，使本研究再進行一次融合瘤實驗，期望能夠提高製備出具有良好專一性的單株抗體，並將其成功的應用於 Fipronil 快速免疫檢測系

統，以便於一般社會大眾可隨時隨地的檢測食品的農藥殘留，對社會的食安問題盡一份心力。

五、參考文獻

- de Medeiros HC, Constantin J, Ishii-Iwamoto EL, Mingatto FE (2015) Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. *Toxicol Lett* 236:34–42
- Godinho AF, de Oliveira Souza AC, Carvalho CC, Horta DF, De Fraia D, Anselmo F, Chaguri JL, Faria CA (2016) Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the GABAA receptor level, in rats. *Physiol Behav* 165:28–34
- Liu X, Yan C, Dong J, Yu X, Xu D (2007) Poly- and Monoclonal Antibody-Based ELISAs for Fipronil. *J Agric Food Chem* 55:226–230
- Qian Y, Wang C, Wang J, Zhang X, Zhou Z, Zhao M, Lu C (2017) Fipronil-induced enantioselective developmental toxicity to zebrafish embryo-larvae involves changes in DNA methylation. *Sci Rep* 7:2284
- Wang K, Vasylieva N, Wan D, Eads DA, Yang J, Tretten T, Barnych B Li J, Li QX, Gee SJ, Hammock BD, Xu T (2019) Quantitative Detection of Fipronil and Fipronil-Sulfone in Sera of Black-Tailed Prairie Dogs and Rats after Oral Exposure to Fipronil by Camel Single-Domain Antibody-Based Immunoassays. *Anal Chem* 91(2):1532–1540
- Fipronil; Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food (2005) AGENCY: Environmental Protection Agency (EPA).