

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫名稱：魚腥藻毒素(Anatoxin-a)多株抗體之製備及酵素免疫分析法與奈米金粒子免疫層析試紙之開發 *
* ***** *

執行計畫學生： 劉玠澧
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-023-B
研究期間： 104年07月01日至105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 105年03月31日

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* 計畫 **魚腥藻毒素(Anatoxin-a)多株抗體製備及酵素** *
* : **免疫分析法與奈米金粒子免疫層析試紙之開發** *
* 名稱 *

執行計畫學生：劉玠澧

學生計畫編號：104-2815-C-040 -023-B

研究期間：104年7月1日至105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 105 年 3 月 28 日

摘要 (Abstract)

魚腥藻毒素 (Anatoxin-a, ATN) 因其毒性又稱非常快速致死的因子 (Very Fast Death Factor) (VFDF), 若不慎接觸或誤食用到過量 ATN 會造成嘔吐腹瀉, 甚至休克與心臟衰竭, ATN 存於各淡水中, 鑒於其高毒性及在分布普遍性, 各國皆把 ATN 列為水庫及河川湖泊的重點監控項目之中。然而 Anatoxin-a 之分子量為 165.232 Dalton, 為一小分子化合物。其分子量過小, 因此只具有抗原性 (Antigenicity) 而不具有免疫原性 (Immunogenicity)。若欲使小鼠或兔子產生對 Anatoxin-a 具有高度專一性之抗體, 則須對此小分子化合物進行修飾動作, 接合載體蛋白放大分子量形成有效抗原, 再對動物進行免疫以製備抗體。

由於 Anatoxin-a 上具有雙鍵氧及 CH_3 基團可用於修飾蛋白接合, 因此本計劃中先對 ATN 上的雙鍵氧進行 CMO 衍生法修飾, 再以 EDC/NHS 法與載體蛋白上的 NH_2 基團反應, 以製備免疫抗原免疫小鼠。另以 Anatoxin-a 結構上的 CH_3 基團使用 Formaldehyde 法與載體蛋白上的 NH_2 基團進行接合, 並用此法製備成的免疫抗原免疫紐西蘭大白兔。本計劃藉由 indirect competitive ELISA (ciELISA) 來觀察抗體的專一性。發現以 CMO 衍生後再接合 γ -globulin 免疫的第一對小鼠僅有二號小鼠產生出些微抗體, 但抗體效價與專一性極低且不穩定, 因此本研究以 Formaldehyde 法接合 BTG 免疫第二對小鼠。另以 Formaldehyde 法接合 γ -globulin 免疫兔子, 在第 13 周時進行抗體專一性測試, 未發現具有專一性抗體的產生, 所以本計畫改變免疫兔子的抗原, 先利用 EDA 法修飾 γ -globulin 上的 COOH 基團使之轉換成 NH_2 基團後, 再以 Formaldehyde 法將 EDA- γ -globulin 與 ATN 結合, 藉此增加載體蛋白表面上 ATN 數量, 提升小分子毒素被免疫系統抗原呈現的機會, 希望能誘發免疫反應產生具有高專一性的抗體。在 ciELISA 的測試中僅有以 CMO 衍生法接合 γ -globulin 施打的二號小鼠在 18 週時抗體 IC_{50} 達到 1000 ng/ml。因此未來會以此抗體作為後續抗原接合之分析, 並以 CMO 衍生法及其他接合法為未來研究方向, 開發出具有高度專一性能用以檢測 ATN 樣品之抗體以供大眾使用。

目錄 (Index)

主題	頁數
摘要	2
一，緒論	4
1.1 研究起源	4
1.2魚腥藻毒素 (Anatoxin-a) 基本性質	4
1.3魚腥藻毒素 (Anatoxin-a) 相關研究	5
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	7
1.6研究動機及研究問題	9
二，材料與方法	10
2.1 實驗藥品及動物	10
2.2實驗儀器	11
2.3實驗方法	12
2.3.1 製備不同魚腥藻毒素 (Anatoxin-a) 接合物	12
2.3.2 免疫小鼠及兔子	16
2.3.3 多株抗體的純化	16
2.3.5 製備奈米金粒子探針	18
2.3.6 免疫試紙的製備	18
三，實驗結果	19
3.1 抗體效價及專一性測試	19
四，討論	25
五，參考文獻	26

一，緒論 (Introduction)

1.1 研究起源

藻類毒素是由藍綠菌 (Cyanobacteria) 所產生的毒素，廣泛存在於世界上各大水體，其中淡水對所有陸生動植物尤其重要，因此藻類毒素的污染成為了生活中潛在的危險因子。在世界各國上有許多動物因飲用或誤觸含有大量藻毒素的水源，而導致死亡或是造成慢性肝炎與腎衰竭。藻類毒素當中以 Anatoxin-a(s) 毒性最強，其次為 Microcystin-LR、Microcystin-LA、Nodularin，Microcystin-YR 與 Microcystin-RR，毒性最弱為 Cylindrospermopsin，由於藻類毒素影響人體健康甚為嚴重，許多國家依據世界衛生組織 (WHO) 所建議的飲用水規範來制訂國家飲水用水的檢測標準進而達到預防誤食或誤觸的中毒風險。台灣於 2011 年時，南投三天內有五人死於急性中毒，不排除與 ATN 中毒有關。美國環保署於 2009 年公佈的飲水污染物候選名單 (Drinking Water Contaminant Candidate List) 中也包括 ATN 的存在，可見其對人類及生物的危害匪淺且影響範圍廣泛。

1.2 魚腥藻毒素 (Anatoxin-a) 基本性質

魚腥藻毒素 (Anatoxin-a)，IUPAC 命名 1-{9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-yl}ethan-1-one，分子量為 165.232 Dalton，是一種天然產生的淡水藻毒素，主要由淡水藍綠藻 (*Anabaena* 屬) 所產生。ATN 能夠刺激肌肉細胞上的乙醯膽鹼接受器，而引起肌肉收縮。同時又具有類似乙醯膽鹼的神經傳導功能，但由於無法被終止訊號的乙醯膽鹼脂酶分解，因此會造成神經麻痺甚至呼吸猝死 (Aronstam and Witkop, 1981)，近年來研究指出在老鼠的試驗中飲用含有 ATN 的水時造成癱瘓，震顫，輕度抽搐和死亡，時間約 2-7 分鐘，因此又稱其為非常快速致死的因子 (VFDF) (Carmichael and Gorham, 1978; Devlin et al., 1977)，老鼠半致死劑量約為 13.3 mg (Fitzgeorge et al., 1994)，有文獻指出人類在 ATN 中毒後的症狀為急性腸胃道疾病，如噁心、嘔吐、及腹瀉

等，嚴重時則會引發過敏休克甚至死亡，因此 ATN 對於人類日常生活造成的威脅甚鉅 (Schwimmer and Schwimmer, 1968 ; Behm, 2003)。在台灣雖未有明確對於 ATN 的規範，但近年來也有相關環境檢測計畫及單位，對其進行嚴密監控，可見其逐漸遭受重視。

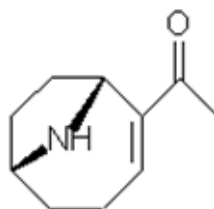


Figure.1 魚腥藻毒素(Anatoxin-a) 結構式

1.3 魚腥藻毒素 (Anatoxin-a) 相關研究

目前對於 ATN 的檢測法有高效能液相氣體層析偵測法 (HPLC)、液相層析質譜法 (LC/MS) (Harada et al., 1993)、薄層色層分析法 (TLC) (Pelander et al., 1996) 及氣相層析質譜法 (GC/MS) (Himberg et al., 1989) 等，不過礙於儀器昂貴與需專業人員操作且樣品的處理程序繁瑣，導致該檢測技術並不普遍，因此行政院環境檢驗所於 2011 年公告酵素聯結免疫酵素吸附分析法 (ELISA) 為一可行的辦法，此方法具有高專一性、靈敏度及便利性，且相較於前述的檢驗方法操作技簡易在成本上相對降低許多。

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進行樣品的檢測。其中一步驟為加入酵素的受質與酵素進行反應與呈色。呈色結果可利用肉眼觀察或是使用酵素免疫分析儀器對不同深淺之顏色進行定量分析，達到檢測樣品中是否含有某特定抗原和其含量是否超標。

酵素連結免疫分析法以操作發法的不同可區分為三種：

- (1) 直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay)
- (2) 非直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay)
- (3) 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和非直接競爭型酵素連結免疫分析法來做為檢測的方法，接下來簡單描述此兩種方法的原理。

直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法 (Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay , cd ELISA) (Figure. 2)

利用吸附法或是共價接合的特性使抗體連接到固相基質上，並且加入蛋白填補未被抗體填滿之基質空隙。接著加入樣品或抗原標準品、具酵素標定的抗原，最後加入酵素受質即可呈色。呈色結果顏色越淺代表樣品或抗原標準品中的抗原濃度越高。

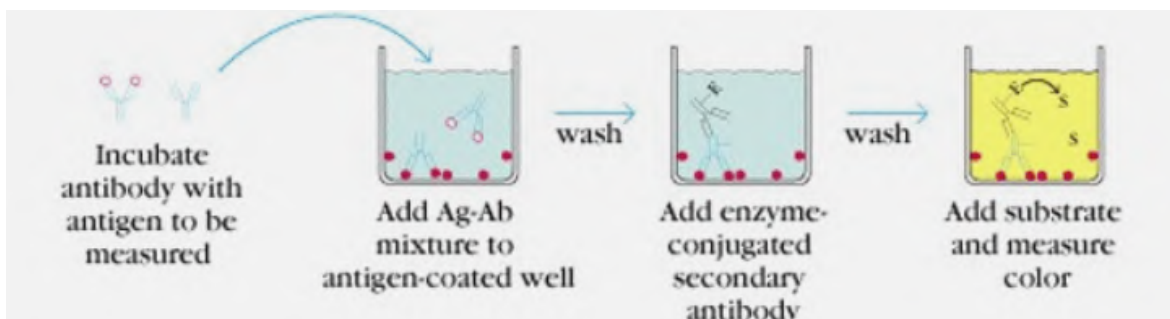


Figure. 2 直接競爭型酵素連結免疫吸附分析法

非直接競爭型酵素連結免疫分析法 (Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay) (Figure. 3)

利用載體蛋白與抗原所接合的複合物吸附於固相基質後加入蛋白填補未被此複合物填滿之基質空隙。填補完以後加入抗體，樣品或抗原標準品，而抗原標準品及樣品中的抗原會與固相基質上的抗原競爭抗體結合位，接著加入被酵素標記的二級抗體，使二級抗體辨識並結合抗體的 FC 區且放大訊號。最後加入酵素呈色物質即可呈色，呈色結果顏色越淺代表樣品或抗原標準品中的抗原濃度越高。

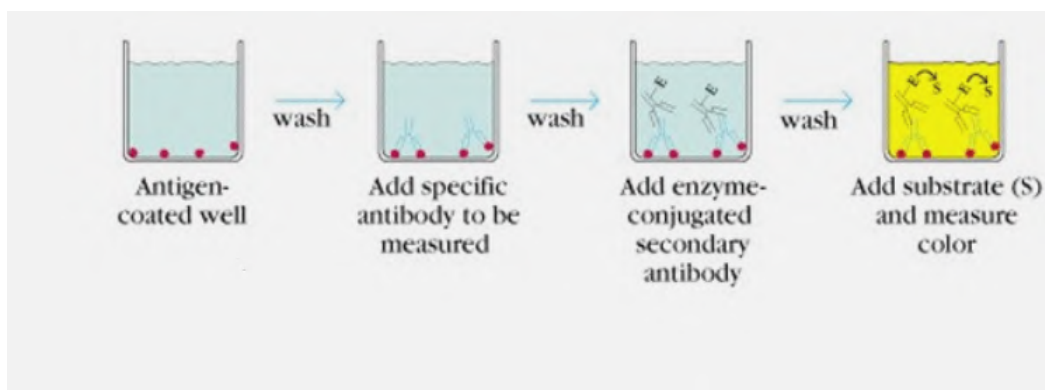


Figure. 3 非直接競爭型酵素連結免疫吸附分析

1.5 快速免疫層析試紙

快速免疫層析試紙 (Figure. 4) 是一種以膜為基質的免疫分析法 (membrane-based immunoassay)。這類分析法極為快速簡便且能以目視的方式判讀結果，其主要分析原理為將硝化纖維膜作為基質，並把抗原及作為控制組的二級抗體分別吸附在測試區與控制區膜上，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膜上進行層析，當樣品中含有抗原時，奈米金粒子會和樣品中的抗原結合，因此會在基質的膜上控制組區產生顏色，當樣品中不含抗原時，奈米金粒子探針則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。

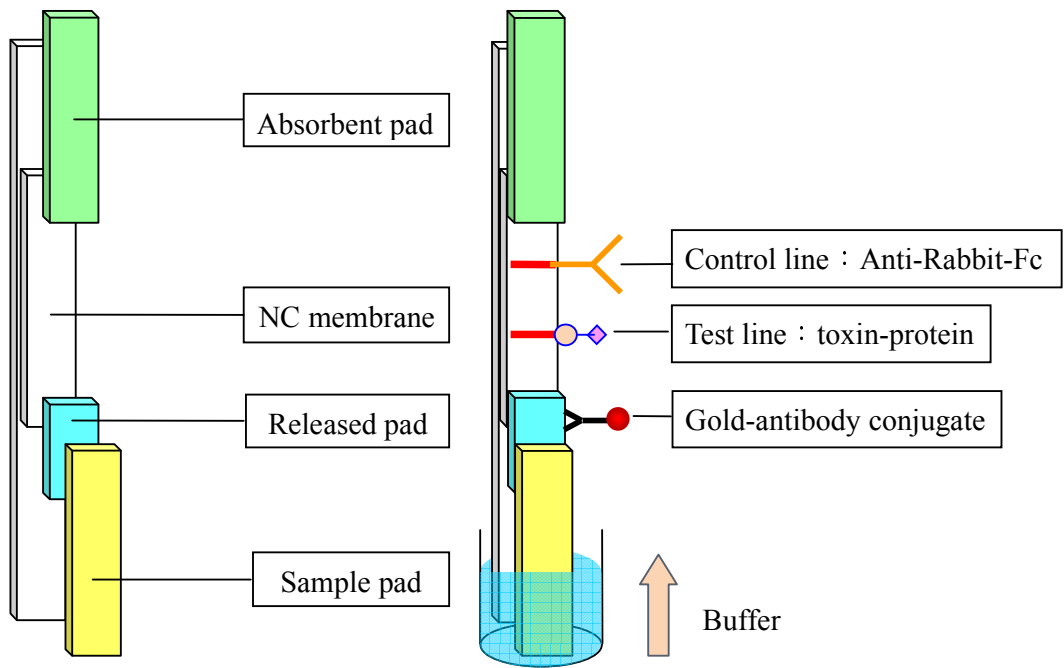


Figure. 4A 免疫層析試紙組成份

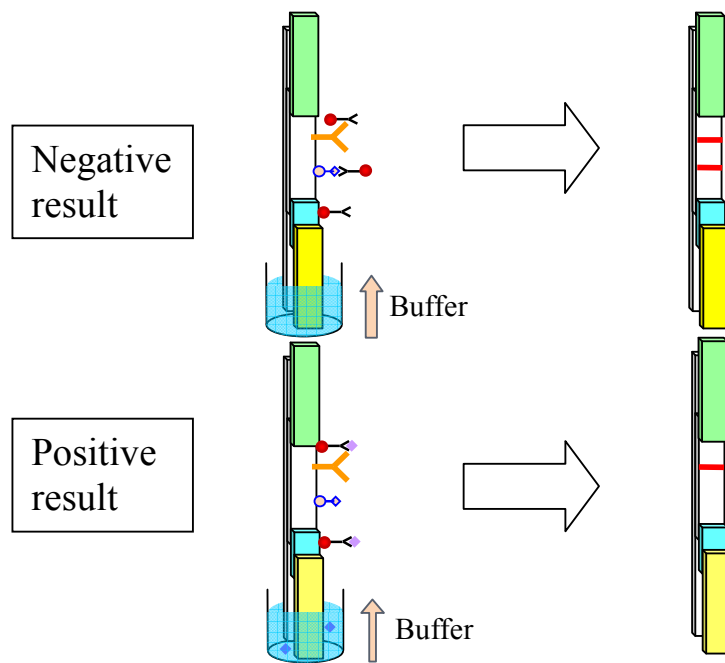


Figure. 4B 分析結果

1.6 研究動機及研究問題

日前用於檢測的方法除了高效液層析法 (HPLC) 以及 Ligand-Binding assay 等等，前者雖具有高靈敏度但儀器昂貴操作繁瑣因此並不普及，後者雖具有高靈敏度但是專一性不強且易受其他物質的干擾，相比之下酵素免疫聯結吸附法 (ELISA) 具有高度專一性及便利性而有著更好的優勢，因此本計畫打算製備出對 ATN 具有專一性的多株抗體並用以開發一套 ELISA 系統來檢測 ATN 且更進一步開發出快速免疫層析試紙 (Immunochromatographic strip) 供一般民眾使用。

本計畫分為三個子目標：

【子目標一】：製備專一性 ATN 的多株抗體。

- 製備免疫抗原
- 將免疫抗原打入兔子產生免疫反應 (Immunization)
- 多株抗體的純化

【子目標二】：建立酵素聯結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA) 方式檢測樣品中 ATN 的含量。

- 直接競爭型 ELISA (Direct Enzyme-linked immunosorbent Assay)
- 非直接競爭型 ELISA (Indirect Enzyme-linked immunosorbent Assay)

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

- 製備抗體奈米金粒子探針
- 製備免疫試紙
- 以 ELISA 及快速免疫層析試紙分析樣品中 ATN 之含量

二、材料與方法 (Materials and Methods)

2.1 實驗藥品及動物

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

Ammonium persulfate

Bovine serum albumin (BSA)

Carbonyldiimidazole

Coomassie Brilliant Blue R-250

Freund's complete adjuvant

N, N, N',N'-tetramethylethylenediamine

γ -globulin

Thyroglobulin from bovine thyroid (BTG)

Sodium bicarbonate

Sodium nitrite

Tris

下列藥品購自 Merck (Darmstadt, Germany)

Acetic acid

polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)

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 ALDRICH

N,N-dimethylaniline

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

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

Horseradish peroxidase (HRP)

下列藥品購自 MDBio, Inc.

(+/-)-Anatoxin A Fumarate

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

Microtiter plates 購自 Nunc (Roskild, Demark)

BALB/c 小鼠購於國家動物中心

紐西蘭大白兔購自大宗畜牧場

2.2 實驗儀器

Auto strip washer	Bio TEK INSTRUMENT ELx50
Centrifuge	HERMLE Z323K
Hot plate	Fargo HMS-102
Incubator	LAB-LINE
Microplate reader	Molecular Device E max
pH meter	METTLER TOLEDO MP220
Refrigerator	SHOCKLOCK Vortex GENIE Vortex-2

2.3 實驗方法

2.3.1 製備不同 ATN 接合物

由於 ATN 屬小分子化合物，只具有抗原性而沒有免疫原性，故必須以載體蛋白接合放大其分子量，因為結構上僅有雙鍵氧與甲基所以本計劃參考 (Burkin, et al., 2002) 先利用 CMO 衍生再以 EDC/NHS 法與載體蛋白接合及參考 (Zhang et al., 2006) 的方法以 Formaldehyde 法直接與載體蛋白作用，以 γ -globulin 作為載體蛋白與 ATN-CMO 和 ATN 接合，產生出具有刺激免疫反應的抗原 ATN-CMO- γ -globulin (Figure. 5) 與 ATN- γ -globulin (Figure. 6)

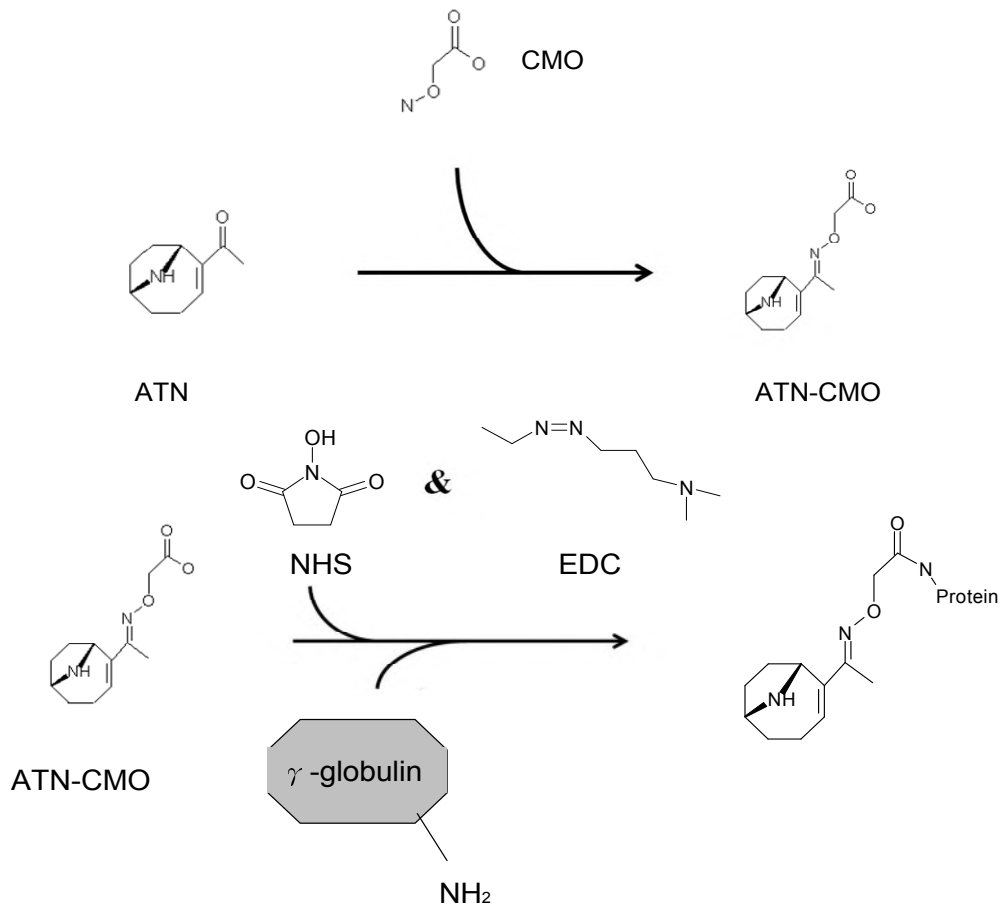


Figure. 5 免疫抗原 ATN-CMO- γ -globulin 的簡易製備流程

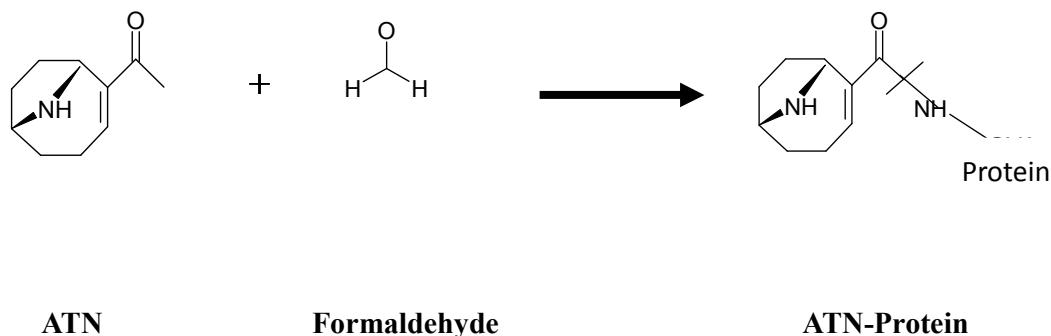


Figure. 6 ATN 利用 Formaldehyde 法製備的的簡易製備流程

2.3.1-1 將 ATN 衍生 CMO

秤取 1 mg 的 ATN 溶於 1 mL reflux solution (pyridine : Methanol : ddH₂O = 1 : 4 : 1) 及 2 mg 的 CMO 溶於 1 mL reflux solution，混合均勻，置於回流裝置中，加熱至 60°C，反應 2.5 小時，置於室溫中反應 24 小時。反應完成後，以減壓濃縮將溶液抽乾，在加入 1 mL pH = 8 的 ddH₂O 及 3 ml benzene 回溶。

2.3.1-2 將 ATN-CMO 以 EDC/NHS 法與 γ -globulin 接合作為免疫抗原

取 ATN-CMO (0.5 mg - 1 mg)，溶於 0.14 mL DMF 中，緩慢加入 EDC (1.6 mg in 0.04 mL DMF) 與 NHS (1 mg in 0.04 mL DMF)，置於室溫下反應 4 小時，再以 0.1 M carbonate buffer (pH = 9.6) 0.4 mL 溶解 2 mg γ -globulin 加入先前反應完成的溶液中 (含有 ATN-CMO 0.5mg - 1 mg、EDC 1.6 mg、NHS 1 mg)，於室溫下反應 2 小時後，置於 4°C 冰箱反應 16-18 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

2.3.1-3 將 ATN 以 Formaldehyde 法與載體蛋白 γ -globulin 接合做為免疫抗原

取 ATN 0.25 mg，溶於 0.25 ml 0.1M Sodium Acetate 中，及 γ -globulin 1 mg 溶於 0.2 mL 0.1M Sodium Acetate 中，再緩慢加入 ATN (0.1 mg in 0.1 mL 0.1 M Sodium Acetate) 與 0.04 mL 37% Formaldehyde，避光置於室溫下反應 72 小時後，置於 4°C 冰箱反應 16-18 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS

中透析三次。

2.3.1-4 以 EDA (Ethylenediamine, 乙二胺) 修飾 γ -globulin

秤取 100 mg γ -globulin 溶於 6 mL ddH₂O 中，再秤取 48 mg EDA 溶於 480 μ l ddH₂O 中，將其緩慢加入至 6 mL ddH₂O (含有 100 mg γ -globulin) 中，再秤取 150 mg EDC 溶於 ddH₂O 後緩慢加入至 6.48 mL ddH₂O (含有 100 mg γ -globulin、48 mg EDA) 中，利用 1 N HCl 調整 pH 值至 pH = 5.5，室溫攪拌 2 小時。秤取 100 mg EDC 溶於 ddH₂O 後緩慢加入至 6.48 mL ddH₂O (含有 100 mg γ -globulin、48 mg EDA、150 mg EDC) 中，在室溫下攪拌反應一個晚上，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次後凍乾備用。

2.3.1-5 將 ATN 以 Formaldehyde 法與載體蛋白 EDA- γ -globulin 接合做為免疫抗原

取 ATN 0.25 mg，溶於 0.1 ml 0.1 M Acetate Buffer (pH = 4.4)，及 0.25 mL ddH₂O 回溶凍乾的 2.5 mg EDA- γ -globulin，在緩慢加入 ATN (0.1mg in 0.1 ml 0.1 M Acetate Buffer)，並與 0.04 ml 37% Formaldehyde，在室溫避光攪拌 96 小時後，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

2.3.1-6 將 ATN 以 Formaldehyde 法與 OVA (Ovalbumin, 卵清白蛋白) 接合作為覆被抗原

取 ATN 0.1 mg，溶於 0.1 ml 0.1M Sodium Acetate 中，及 OVA 0.8 mg 溶於 0.16 mL 0.1M Sodium Acetate 中，再緩慢加入 ATN (0.1 mg in 0.1 mL 0.1M Sodium Acetate) 與 0.04 mL 37% Formaldehyde，避光置於室溫下反應 72 小時後，置於 4°C 冰箱反應 16 - 18 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

2.3.1-7 將 ATN 以 Formaldehyde 法與 HRP (Horseradish peroxidase, 辣根過氧化氫酶) 接合

取 ATN 0.15 mg，溶於 0.1 ml 0.1M Sodium Acetate 中，及 HRP 1.2 mg 溶

於 0.2 mL 0.1 M Sodium Acetate 中，再緩慢加入 ATN (0.1 mg in 0.1 mL 0.1 M Sodium Acetate) 與 0.04 mL 37% Formaldehyde，避光置於室溫下反應72 小時後，置於 4°C 冰箱反應 16 - 18 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

2.3.1-8 將 ATN 以 Formaldehyde 法與 BTG (Thyroglobulin from bovine thyroid) 接合做為免疫抗原

取 ATN 0.5 mg，溶於 0.1 ml 0.1 M Sodium Acetate 中，及 BTG 4 mg 溶於 0.4 mL 0.1 M Sodium Acetate 中，再緩慢加入 ATN (0.1 mg in 0.1 mL 0.1 M Sodium Acetate) 與 0.04 mL 37% Formaldehyde，避光置於室溫下反應 72 小時後，置於 4°C 冰箱反應 16-18 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

2.3.1-9 將 ATN 以 Formaldehyde 法與 OVA (Ovalbumin，卵清白蛋白) 再以 EDC/NHS法 與 HRP (Horseradish peroxidase，辣根過氧化氫酵素) 接合

取 ATN 0.25 mg，溶於 0.1 ml 0.1 M Acetate Buffer 中，及 OVA 1 mg 溶於 0.1 mL 0.1 M Acetate Buffer 中，再緩慢加入 ATN (0.1 mg in 0.1 mL 0.1 M Sodium Acetate) 與 0.04 mL 37% Formaldehyde，避光置於室溫下反應 96 小時。再取 HRP 2 mg 溶於 0.2 mL 0.1 M Acetate Buffer 緩慢加入 EDC (4 mg in 0.04 mL 0.1M Acetate Buffer) 與 NHS (3 mg in 0.03 mL 0.1M Acetate Buffer)，置於室溫反應 30 分鐘後，再將其加入先前 0.24 ml (0.25 mg ATN 與 1 mg OVA)，於室溫反應 2.5 小時，置於 4°C 冰箱反應 16 - 18 小時，之後在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析三次。

2.3.2 注射免疫抗原至紐西蘭大白兔體內使其產生免疫反應 (Immunization)

為了使紐西蘭大白兔產生對 ATN 的專一性抗體，將 ATN- γ -globulin (0.5 mg 的 γ -globulin 溶於 0.7 mL 0.01 M PBS)，並加入等體積的完全佐劑 (Complete Freund's adjuvant) 混合均勻，將混合物以表皮注射的方式注入兔子體內，約注射 10 - 20 個位置。四週後，進行加強免疫的動作，取 ATN- γ -globulin (0.5 mg 的 γ -globulin 溶於 0.7 mL 0.01 M PBS)，並加入等體積的不完全佐劑 (Incomplete Freund's adjuvant) 混合均勻，以皮下注射的方式注射於兔子的四肢與頸部。第五週後即可對兔子耳朵進行動脈採血，並使用 ELISA 進行檢測血清中是否產生了 ATN 的專一性抗體。

2.3.3 多株抗體的純化

將採集之兔子血液，待其凝固後插入竹籤，放置 4°C 環境中隔夜使血液黏附在竹籤上，移除血液中凝結的血塊後以冷凍高速離心機離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C，離心完後取上清液 (血清)，並計算體積。加入與血清相同體積之 100% Ammonium sulfate 沉澱血清內的蛋白質，混合均勻後靜置 30 分鐘後，再以冷凍高速離心機離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C。離心完畢後去除上清液，加入一半體積的 ddH₂O 回溶沉澱物，再加入一半體積之 70% Ammonium sulfate，靜置 30 分鐘後，離心 8,000 rpm 20 分鐘 4°C，重複此步驟直到沉澱物變為純白。將沉澱物以一半體積 ddH₂O 回溶並置入透析袋，在 4°C 下於 2 L 的 0.01 M PBS 中透析 3 次。透析完畢後取出，以 0.01 M PBS 補回原體積，分裝並保存於 -20°C 冰箱備用，即為純化好的多株抗體。

2.3.4 酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA)

2.3.4-1 直接競爭型 ELISA (cd ELISA)

在 96 孔盤中加入 0.1 mL 的純化後抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋), 於 37°C 環境反應 1 小時後, 以 washing buffer (0.05% Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應物質。再加入 0.17 mL 的 blocking buffer (0.1% BSA in 0.01 M PBS), 37°C 環境反應 30 分鐘後, 以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 0.05 mL ATN 毒素標準品 (1~2000 ng/mL), 再加入 0.05 mL ATN-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋), 置於 37°C 環境反應 1 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應物質。最後加入 0.1 mL TMB substrate, 於室溫避光反應 15 分鐘後, 加入 0.1 mL 1 N HCl 終止反應。以 ELISA Reader 測量波長 450 nm-650 nm 的吸光值。

2.3.4-2 非直接競爭型 ELISA (ci ELISA)

在 96 孔盤中加入 100 μ L ATN-OVA (以 0.01 M PBS 稀釋), 置於 37°C 環境中反應 1 小時, 以 washing buffer (0.05 % Tween 20 in 0.01 M PBS) 洗去未反應物質。再加入 170 μ L blocking buffer (0.1 % BSA in 0.01 M PBS), 置於 37°C 環境中反應 30 分鐘。以 washing buffer 洗去未反應物質。加入 50 μ L 不同濃度的 ATN 標準品 (1~2000 ng/mL) 及 50 μ L 純化過的抗體 (以 0.01 M PBS 稀釋), 置於 37°C 環境中反應 1 小時後, 以 washing buffer 洗去未反應物質。接著加入 100 μ L Goat anti-rabbit IgG-HRP (以 0.01 M PBS 稀釋), 置於 37°C 環境中反應 1 小時, 再以 washing buffer 清洗盤子兩次。最後加入 100 μ L TMB substrate, 置於室溫避光反應 15 分鐘後, 加入 100 μ L 1 N HCl 終止反應。最後利用 ELISA Reader 測量波長 450 nm-650 nm 吸光值。

2.3.5 製備奈米金粒子探針

將 ATN 之多株抗體以 1 mL Boric acid-Borax buffer(2 mM, pH 8.0)稀釋。取 5 µg 透析完畢的 ATN 多株抗體，並緩慢的加入 2 mL 奈米金粒 (直徑大約 40 nm)，於室溫反應 1 小時。加入 0.35 mL 10% (w/v) BSA (以 0.45 µm 的過濾膜過濾) 將金粒子上未接合的位置填滿，置於室溫混合 30 分鐘。然後離心 14,000 rpm 30 分鐘，最後將奈米金粒子沉澱物回溶於 180 µL Tris buffer (20 mM, pH 8.0, 含 1% BSA 和 0.1% sodium azide)，置於 4°C 保存備用。

2.3.6 免疫試紙的製備

先將 ATN 的抗體-奈米金粒子探針點至 conjugate release pad (5µL/strip)，於 37°C 環境下烘乾。再將 0.25 µL 的 ATN-OVA 和 0.25 µL 的 Anti-rabbit-Fc antibody (0.2 mg/mL) 分別點於 NC membrane (孔徑為 15 µm, 黏附於塑膠片上, 5 mm × 75 mm) 上的 Test line 以及 Control line 的位置，置於 37°C 環境下烘乾 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 × 27 mm) 置於 strip 的另一端 (Figure. 4A)

三、實驗結果

3.1 利用 indirect competitive ELISA 確定抗體效價及專一性

3.1.1 Anatoxin-a-CMO-EDC/NHS- γ -globulin 作為抗原免疫小鼠

本計畫利用 indirect competitive ELISA 來進行抗體效價及專一性測試，一號小鼠的血清從 pre-immune 採集至第 12 周，及二號小鼠的血清從 pre-immune 採集至第 22 周進行抗體效價的檢測。由下圖 Figure. 7 可以發現在 pre-immune 時，第一、二號小鼠的抗體效價都相對較低，經過約 4 週的抗原施打後，小鼠免疫系統受到抗原的刺激有顯著性的提升，而在第 12 周時老鼠的抗體效價稍稍降低，因此本研究決定以抗原混和不完全佐劑來進行加強免疫，在隨後幾週的血清測試後不僅有回升至先前的水平，並於 22 周達到高峰。因此可以確定此抗原為有效抗原，能成功誘發小鼠的免疫系統產生專一性抗體。

Indirect competitive ELISA for Anatoxin-a titer

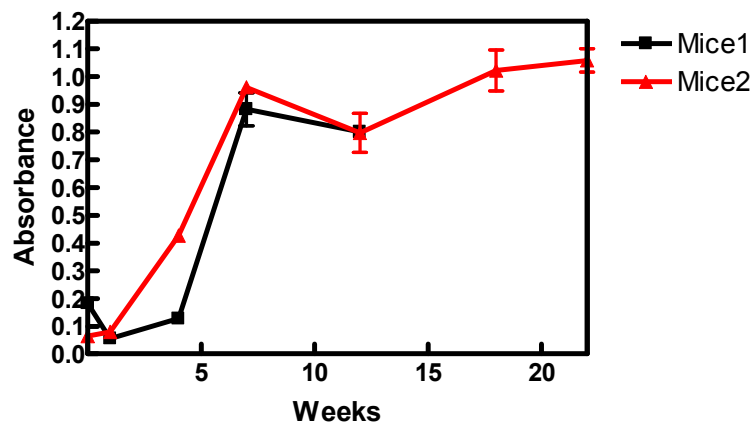
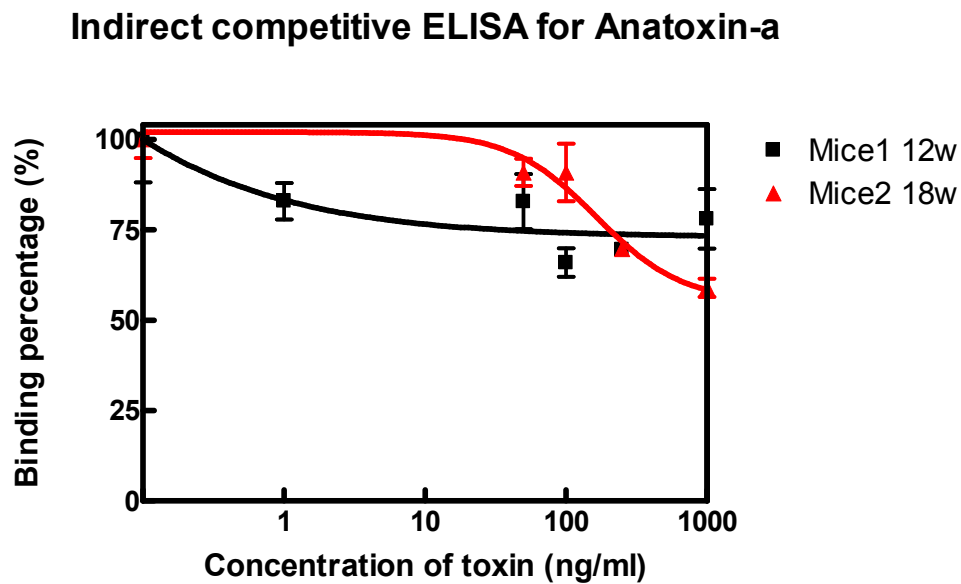


Figure. 7 利用 indirect competitive ELISA (ciELISA) 對一、二號小鼠進行抗體效價測試

由此圖顯示兩隻小鼠免疫前抗體效價在相對低點，而免疫後抗體效價有著顯著的提升，因此可以確認此抗原為有效抗原。

再以 indirect competitive ELISA 來進行抗體的專一測試，第一號小鼠雖在效價上有著別於 pre-immune 時的提升，然而在其專一性測試中其結果不甚不理想，無明確的競爭情形因而無法確認其 IC₅₀ 位置 (Figure. 8)。第二號小鼠在第 6 周的血清的專一性測試中就有發現些許的競爭情形，第 12 周以不完全佐劑進行加強免疫後，在隨後第 16 周及第 18 周進行抗體專一性測試時，在高濃度的毒素標準品中出現顯著的競爭 IC₅₀ 約 1000 ng/ml，但在後續幾週的血清測試中，雖效



價仍穩定成長，抗體專一性卻越來越差直至 24 周時以無法檢測到其專一性。

Figure. 8 利用 indirect competitive ELISA (ciELISA) 對一號小鼠第 12 周及二號小鼠第 18 周血清進行抗體專一性測試

由上圖可以看到一號小鼠的抗體並無顯現專一性。二號小鼠則可以毒素不同濃度高低而呈現梯度差，IC₅₀ 約為 1000 ng/ml 左右，依曲線的走勢其結合率應還能藉由提高毒素濃度而下降。但其抗體專一性仍不足以用於檢測用途，因此本研究嘗試不同接合法及載體蛋白接合 Anatoxin-a。

3.1.2 Anatoxin-a-Formaldehyde-BTG 作為抗原免疫小鼠

本研究利用 indirect competitive ELISA 來進行抗體的效價測試，採用第三、四號小鼠從 pre-immune 至第 11 週的血清進行測試。由 Figure. 9 可以得知這對老鼠在免疫初期效價維持低點，直到第四周後才有顯著的提升，而四號小鼠在第 8 周時出現抗體效價降低之情形，但仍於每週進行加強免疫，使效價在第十一週時回升。在此判斷可能為老鼠免疫週期較短，而在進行加強免疫時，抗原並未完全注射入腹腔之中，也可能因為老鼠個體差異所導致。

本計劃利用 ciELISA 進行抗體專一性測試，在 Figure. 10 可以明顯看到三號小鼠在毒素樣品濃度約 1000 ng/ml 時，抗體結合率約為 50%，但是梯度曲線並未隨著毒素樣品濃度增高而降低，曲線端呈水平狀並未有再向下延伸之趨勢，因而推定三號老鼠略有一些對 ATN 具有專一性之抗體，但表現量及專一性皆不夠高，所以並未因毒素樣品梯度而有漸層產生。本研究推測倘若繼續加高毒素樣品之濃度或許能再使抗體與載體蛋白的結合率下降，但其專一性仍不高所以無所助益。相對於三號老鼠，四號老鼠更呈不規則分佈，因此本研究認為四號老鼠並無產生對 ATN 具有專一性的抗體。

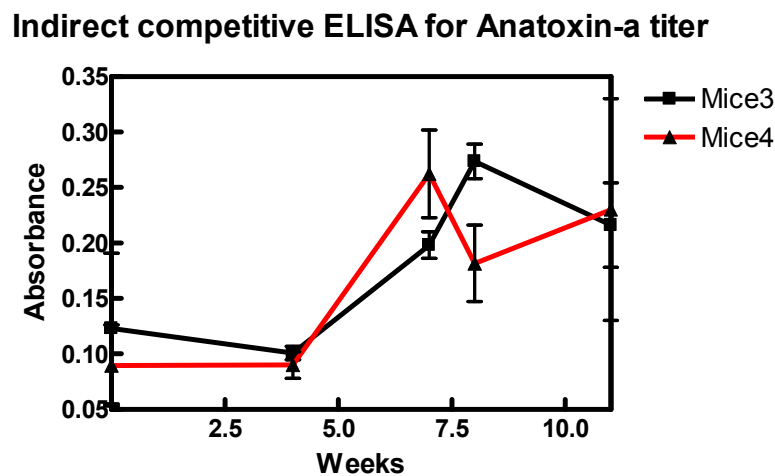


Figure. 9 利用 indirect competitive ELISA (ciELISA) 對三、四號小鼠進行抗體

效價測試

由上圖得知在免疫初期及後期抗體效價有顯著性的差異，雖在隨後幾周有些微的波動但極可能是因為免疫小鼠時操作不慎導致抗原注入量有所差異。所以本研究認為此抗原仍為有效抗原，將在後續幾周持續免疫小鼠並追蹤抗體效價及專一性。

Indirect competitive ELISA for Anatoxin-a

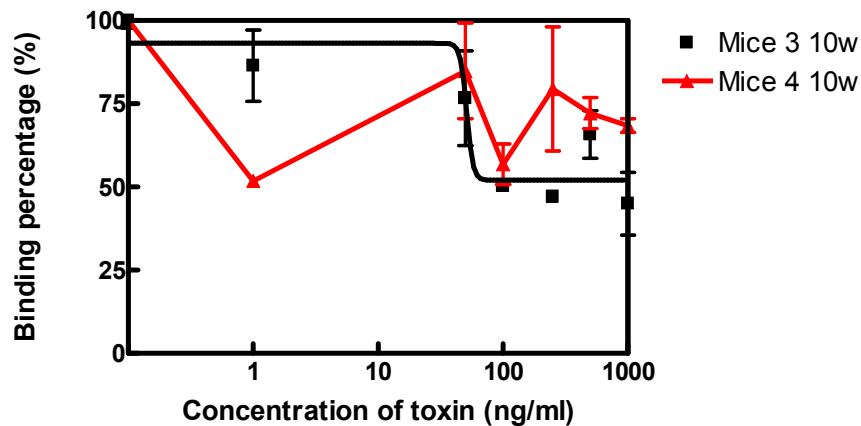


Figure. 10 利用 indirect competitive ELISA (ciELISA) 對三、四號小鼠第 11 周血清進行抗體專一性測試

由上圖明顯可見三號小鼠抗體專一性呈不規折鋸齒狀，無任何專一性表徵。四號小鼠則對於毒素樣品濃度達 50 ng/ml 以上時有些微反應，而在更高濃度的競爭之下吸光值並沒有更低，表示抗體專一性不足但有抗體產生的可能。

3.1.3 Anatoxin-a-Formaldehyde- γ -globulin 作為抗原免疫兔子

本研究採用 pre-immune 至第二十週的紐西蘭大白兔血清來進行抗體的效價測試，由 Figure. 11 結果中可以看到抗體的效價除第六週有突然的高峰外，各週大至上呈現穩定並無太大的波動，但在十六週時抗體效價遽降因而在十九週時再次混以不完全佐劑加強免疫。但二十週採血檢測時仍未發現其效價回升可能原因為此次注射採用皮下注射法因而反應時間較慢，或在兔子血液抗體純化的過程中出現疏失，而本計畫認為後者可能性較大。

由 Figure. 12 圖中看到兔子抗體在第二十週時，依毒素樣品梯度抗體結合率呈線性，在此圖 IC_{50} 約在毒素樣品 1500 ng/ml 與 2000 ng/ml 之間。因此本計畫認為在第十四週時以 ATN-EDA- γ -globulin 為一有效抗原，推測增加載體蛋白上的 ATN 表現量對於抗體的專一性是有所幫助的。本計畫欲再以 ATN 接合 EDA- γ -globulin 並調整其接合比例，多增加 ATN 的比重來在對兔子進行免疫，期望促使兔子的抗體專一性提升，並藉此抗體建立一套多株抗體之酵素連結免疫吸附分析系統及快速層析免疫試紙的開發。

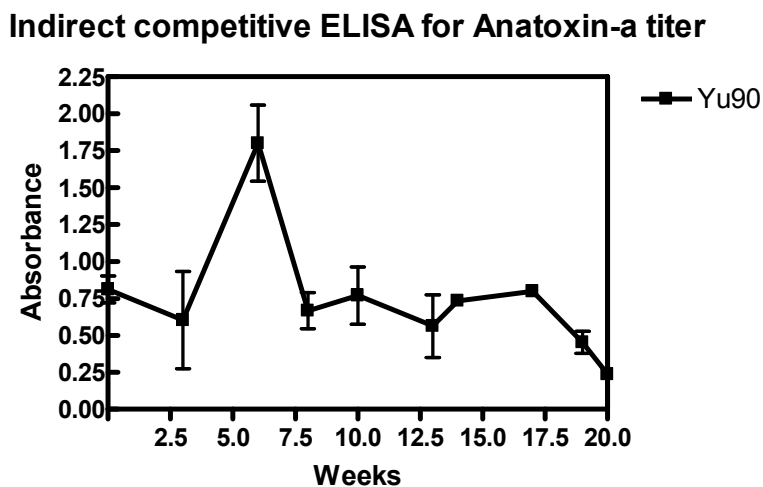


Figure. 11 利用 indirect competitive ELISA (ciELISA) 對 90 號兔子進行抗體效價測試

由此圖可見抗體的效價除第六週外，其他週大至上呈現穩定並無太大的波動。

Indirect competitive ELISA for Anatoxin-a

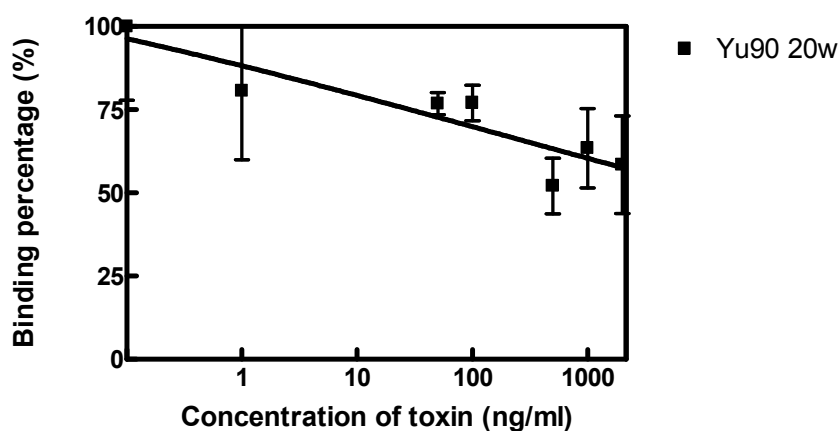


Figure. 12 利用 indirect competitive ELISA (ciELISA) 對 90 號兔子第 20 週血清進行抗體專一性測試

此圖顯示兔子抗體 IC₅₀ 約在毒素樣品 1500 ng/ml 與 2000 ng/ml 之間，推測 ATN-EDA- γ -globulin 為一有效抗原。

四、討論

小分子毒素的免疫檢測系統的建立實屬不易，主因小分子毒素由於分子量太小，雖具抗原性但並無法單獨誘發免疫反應使動物產生對其具有專一性的抗體。而為此問題通常會先將小分子毒素與載體蛋白進行接合，以期待在免疫系統在抗原呈現時能將部份毒素片段呈現以產生對其專一性的抗體。但 Anatoxin-a 比起其他小分子毒素其分子量又更小，所以相對被抗原呈現之機率又更之為低，因此在本研究起初先以 CMO 做為橋樑放大其分子大小，再與載體蛋白接合藉此期望增加抗原呈現的機率以產生專一性的抗體，在 Figure. 8 可看到其抗體 IC₅₀ 約在 1000 ng/ml。然而這種以小分子毒素接合橋樑的衍生方法所耗費的時間及金錢是非常可觀的，所以本研究改以 Formaldehyde 法利用 Anatoxin-a 上的 CH₃ 基團直接與載體蛋白接合再用以免疫動物。其結果可從 Figure. 10 得知三號小

鼠雖在高濃度有競爭，但並不足以推定此小鼠有產生對 Anatoxin-a 有專一性的抗體產生，也有可能是因為相對高的毒素樣品濃度所導致的現象，且三號小鼠還在免疫實驗初期，還需再加以觀察才能加以定論，所以無法確定此法是否真能奏效。另外再紐西蘭大白兔的實驗當中雖也以 Formaldehyde 法接合抗原來免疫，但並無成功產生專一性之抗體，在隨後以 EDA 法修飾 γ -globulin 後，雖抗體效價降至新的低點，先前也已說明可能為其他原因所造成的，但其抗體卻出現對 Anatoxin-a 有所專一性的反應，其 IC_{50} 約在 1500 ng/ml 至 2000 ng/ml。雖然並無法用以建立一套多株抗體之酵素連結免疫吸附分析系統，但可說明此實驗方向應為可行的。所以本研究在此歸納兩項結論，無論是放大 Anatoxin-a 的分子量或是增加載體蛋白上的表現量，都能增加其被抗原呈現的機會，在未來本研究會朝這兩個方向研究並加以結合。所以未來本研究會以 (Antonio et al., 1997) 所提到的 6-Aminohexanoic Acid 分子，利用其含有 CH_3 與 $COOH$ 基團的特性來做為橋梁，接合 Anatoxin-a 與 EDA- γ -globulin 來作為免疫抗原嘗試，希望能成功使紐西蘭大白兔的抗體 IC_{50} 降至 1 ng/ml 以下以建立一套多株抗體隻酵素連結免疫吸附分析系統，與快速層析免疫試紙來供普羅大眾使用，避免國人使用因藍綠藻污染的水源而導致 Anatoxin-a 中毒事件的發生，並繼續研究及探討希望能找出更適合的橋梁，能在一端接合多個小分子毒素且另一端能與載體蛋白作為接合，藉此大增小分子毒素的暴露率，增加產生高專一性抗體的成功率。

五、参考文献

- Aronstam, R. S., & Witkop, B. (1981). Anatoxin-a interactions with cholinergic synaptic molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(7):4639-4643
- Carmichael, W. W., & Gorham, R. P. (1978). Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 21:285-295
- Devlin, J. P., Edwards, O. E., Gorham, P. R., Hunter, N. R., Pike, R. K., & Stavric, B. (1977). Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.* 55(8):1367-1377
- Fitzgeorge R. B., Clark S. A., & Keevil C. W. (1994). Routes of intoxication. In: *First International Symposium on Detection Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins*, G.A. Codd, T.M. Jeffries, C.W. Keevil and E. Potter, Ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. p. 69-74.
- Schwimmer, M., & Schwimmer D. (1968). Medical aspects of phycology. In: *Algae, Man, and the Environment*, D.F. Jackson, Ed. Syracuse University Press, New York, NY. p. 279-358.
- Behm D. 2003. Coroner cites algae in teen's death. *Milwaukee Journal Sentinel*. September 6.
- Harada, K.-I., Nagai, H., Kimura, Y., Suzuki, M., Park, H. -D., Watanabe, M. F., Luukkainen, R., Sivonen, K., & Carmichael, W. W. (1993) Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a neurotoxin from cyanobacteria. *Tetrahedron* 49, 9251-9260.
- Pelander, A., Ojanpera, I., Sivonen, K., Himberg, K., Waris, M., Ninivaara, K. & Vuori, E. (1996) Screening for cyanobacterial toxin in bloom and strain samples by thin layer chromatography. *Wat. Res.* Vol. 30, No. 6, pp. 1464-1470.
- Himberg, K. (1989) Determination of anatoxin-a, the neurotoxin of *Anabaena flos-aquae* cyanobacterium, in algae and water by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom.* 481, 358-362.
- Burkin, A. A., Kononenko, G. P., & Soboleva, N. A., Group-Specific Antibodies against Zearalenone and Its Metabolites and synthetic Analogs Applied *Biochemistry and Microbiology* March 2002, Volume 38, Issue 2, pp 169-76
- Antonio, A., Jaime, P., & Angel, M. (1997) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. 1. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (4), pp 1486-1494