

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以酵素免疫分析法及高效液相層析法分析台灣食品及農作物中伏馬鐮孢毒素的含量與分佈

Analysis of fumonisins in foods and feeds in Taiwan with ELISA and HPLC

計畫編號：NSC 89-2313-B-040-002

執行期限：88年11月1日至89年10月31日

主持人：余豐益 中山醫學院生命科學系

共同主持人：劉秉慧 慈濟醫學院毒理學研究所

計畫參與人員：程偉政 中山醫學院生命科學系

一、中文摘要

本研究主要利用伏馬鐮孢毒素的多株抗體開發出直接與非直接競爭型酵素免疫分析法來分析伏馬鐮孢毒素，在直接競爭型酵素免疫分析法中，毒素濃度導致50%抑制抗體鍵結到FmB1-HRP(IC₅₀)的濃度為分別為0.5 ng/ml的FmB1和0.75 ng/ml的FmB2，此分析方法最低偵測限制可達0.05 ng/ml。在非直接競爭型酵素免疫分析法中，游離毒素導致50%抑制抗體到固相抗原FmB1-OVA的濃度分別為1.2 ng/ml的FmB1和1.5 ng/ml的FmB2。利用直接競爭型酵素免疫分析法分析12個玉米及玉米相關產品，大部份的樣品均含有微量的毒素污染(低於50 ppb)，尤其以一雞飼料污染227 ppb較為嚴重。

關鍵詞：抗體、伏馬鐮孢毒素、酵素免疫分析法

Abstract

Using polyclonal antibodies against fumonisins, a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dc-ELISA) and an indirect competitive ELISA were developed for characterization of the antibodies and for analysis of the toxin in the corn samples. In the dc-ELISA, the concentration causing 50% inhibition of binding of FmB1-HRP to the antibody by FmB1 and FmB2 were found to be 0.5 ng/ml and 0.75 ng/ml, respectively. The detection

limit was found to be 0.05 ng/ml. In the idc-ELISA, the concentration causing 50% inhibition of binding of antibody to the solid-phase FmB1-OVA by free FmB1 and FmB2 were found to be 1.2 ng/ml and 1.5 ng/ml, respectively. Twelve naturally contaminated corn samples and corn related products were analyzed by the dc-ELISA. Most of the corn samples were contaminated with low level of fumonisin (<50 ppb). One of the chicken feeds was contaminated with 227 ppb of fumonisins

Keywords: Antibodies, fumonisin, ELISA

二、緣由與目的

伏馬鐮孢毒素(Fumonisin)是由南非研究者在1988年所發現的真菌毒素(3)，主要由常見感染作物的鐮孢菌(*Fusarium moniliforme*)所產生；此類真菌毒素泛存於玉米、高粱、水稻及甘蔗等經濟作物中。目前已有11種類似物被發現，伏馬鐮孢毒素B1(FmB1)是伏馬鐮孢毒素中最常見的一種毒素，此類真菌毒素已經被證實是一種癌症的促進物(cancer promoter)，食用遭受此類毒素污染的食品及飼料會導致人類及動物體的許多疾病包括人類的食道癌(esophageal cancer)，豬的肺水腫(pulmonary edema in swine)、的腦神經錯亂(equine leukoencephalomalacia)等(2, 3, 5)。國際癌症研究協會(International

Agency for Research on Cancer)將鐮孢菌(*F. moniliforme*)所產生的毒素評定為 2B 族群，也就是可能是人類致癌物(a possible human carcinogen)(4)，目前已有國家對於伏馬鐮孢毒素在食品及飼料中設有 1 ppm 的含量限制(regulatory level)，因此在世界上已經引起一股研究熱潮。

由於伏馬鐮孢毒素對於人類及動物體健康有高度潛在的威脅，許多化學分析方法例如高效液相層析法(HPLC)和薄層層析法(TLC)已經被廣泛地用來分析食品及飼料中的毒素含量(7, 9)。但是這些方法都非常耗時及耗費，因此不利於大量分析篩選樣品。隨著免疫化學技術的發展，利用免疫化學分析法來分析此類毒素已獲得美國分析化學學會的認可，並已經被許多研究者所採用，本研究即是利用已經生產出來的伏馬鐮孢毒素多株抗體來開發專一性高而且敏感的酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)來分析伏馬鐮孢毒素(1, 8, 10)，由於 ELISA 具有高靈敏度、速度快及可大量分析樣品等優點。因此本研究主要是利用酵素免疫分析法，針對目前台灣食品中及農作物中遭受伏馬鐮孢毒素的污染做一分析調查。

三、材料與方法

本研究所使用的抗體主要來自美國威斯康辛大學麥迪生分校 Prof. Fun Sun Chu 實驗室。伏馬鐮孢毒素與載體蛋白質(ovalbumin)之接合物是利用 glutaraldehyde 方法，毒素連接到酵素(horseradish peroxidase)則利用 water soluble carbodiimide 的連接方法。

利用上述伏馬鐮孢毒素的接合物來開發非直接競爭型酵素免疫分析法與直接競爭型酵素免疫分析法來分析食品、玉米及飼料中伏馬鐮孢毒素的含量。玉米樣品主要採自台南縣產地，食品樣品主要購自地

區超商，分別取 10g 樣品材料加入 100 ml 萃取液(CH₃CN/H₂O, 1/1)，振盪二小時後，取上清液以磷酸緩衝液稀釋後，再以直接競爭型酵素免疫分析法加以分析。

四、結果與討論

抗體的定性

非直接競爭型酵素免疫分析法與直接競爭型酵素免疫分析法被用來決定抗體的專一性。在直接競爭型酵素免疫分析法中，毒素濃度導致 50% 抑制抗體鍵結到 FmB1-HRP(IC₅₀)的濃度為分別為 0.5 ng/ml 的 FmB1 和 0.75 ng/ml 的 FmB2，結果在圖一，此抗體對 FmB1 和 FmB2 的相對交叉反應在直接競爭型酵素免疫分析法中分別是 100 (FmB1)和 66(FmB2)，所以此抗體對 FmB1 比 FmB2 有較高的親合力，此一分析方法用來偵測伏馬鐮孢毒素最低可偵測到約 0.05 ng/ml。在非直接競爭型酵素免疫分析法中，FmB1-OVA 被注入於微孔盤中當作固相抗原中，游離毒素導致抑制抗體鍵結到固相抗原的結果在圖二。毒素濃度導致 50% 抑制抗體到固相抗原 FmB1-OVA 分別為 1.2 ng/ml 的 FmB1 和 1.5 ng/ml 的 FmB2。此抗體對 FmB1 和 FmB2 的相對交叉反應在非直接競爭型酵素免疫分析法中是分別是 100 (FmB1)和 80 (FmB2)。

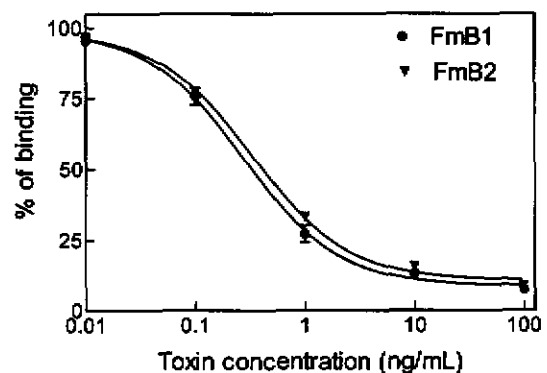


Figure 1. 直接競爭型酵素免疫分析法分析伏馬鐮孢毒素抗體對 FmB1 和 FmB2 的交叉反應結果。伏馬鐮孢毒素濃度導致 50% 抑制抗體鍵結到 FmB1-HRP(IC₅₀)的濃度為分別為 0.5 ng/ml 的 FmB1 和 0.75 ng/ml 的 FmB2。

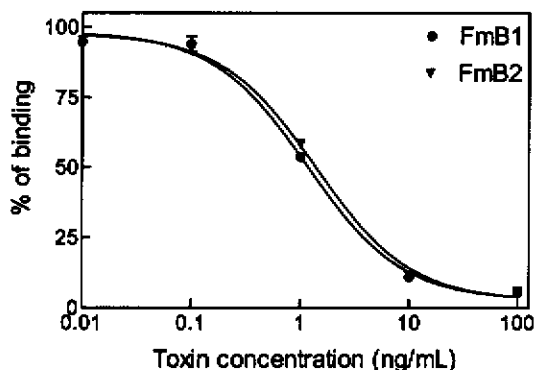


Figure 2. 非直接競爭型酵素免疫分析法分析伏馬鑷孢毒素抗體對 FmB1 和 FmB2 的交叉反應結果。伏馬鑷孢毒素濃度導致 50% 抑制抗體鍵結到 FmB1-OVA 的濃度為分別為 1.2 ng/ml 的 FmB1 和 1.5 ng/ml 的 FmB2。

直接競爭型酵素免疫分析法分析回收率測試

將 FmB1 毒素的標準品加入磨碎的玉米中再以 CH₃CN/H₂O 萃取液萃取，在毒素濃度 50 到 1000 ng/ml 之間，此直接競爭型酵素免疫分析法的分析回收率達到 85% 左右(數據沒有附上)，此證實這個分析方法可以用在樣品分析上。

分析玉米及玉米相關產品中伏馬鑷孢毒素的含量

為了測試直接競爭型酵素免疫分析法分析效果，直接競爭型酵素免疫分析法被用來玉米樣品及相關產品。分析所得結果在表一。大部份的分析樣品皆含有微量的毒素污染，其中以一個雞飼料污染的較為嚴重達 227 ppb。其他的樣品污染含量均低於 50 ppb，其中家福玉米片更是無法測得其遭受污染。此結果顯示此毒素污染台灣玉米及玉米產品情形並不是非常嚴重。一般而言，對伏馬鑷孢毒素設有限制控制含量的國家其控制標準大部份為 1 ppm，因此此結果顯示台灣食品及農作物污染情形仍然在容許範圍內。但是由於篩選的數量並不是很多，如果要進一步深入了解伏馬鑷孢毒素污染的情形，唯有持續而且有系統的加以分析監測。

表一. 直接競爭型酵素免疫分析法分析樣品中伏馬鑷孢毒素的含量

樣品	ELISA (ng/g)
1. 玉米	31±5
2. 玉米	18±2
3. 玉米	34±4
4. 玉米	22±5
5. 玉米粉 corn starch	34±5
6. 雞飼料	227±43
7. 雞飼料	49±4
8. 妙鷹玉米仁	21±6
9. 家福玉米片	ND
10. 微他參 Vitamax	35±4
11. 家樂福三合一麥片	32±2
12. 雀巢向陽麥片	21±2

ND-not detected

五、計畫成果自評

本研究的主要目的是建立酵素免疫分析法來快速檢測分析台灣食品及農作物遭受此類毒素污染的情形，由於此伏馬鑷孢毒素的抗體具有很高專一性，因此一直接競爭型酵素免疫分析法具有相當好的分析敏感度，可用來大量分析樣品。利用此一方法分析樣品，由於樣品僅含少量毒素污染，因此本研究無法利用 HPLC 方法加以分析樣品，因為 HPLC 方法本身有其偵測限制。本研究由於取樣與時間受到一些限制，樣品數量並不是很多，此一分析結果仍然無法全盤了解分析台灣食品及農作物遭受此類毒素污染的情形，如果未來能夠與食品衛生及農政單位互相配合，當可使此一伏馬鑷孢毒素的分析方法更具有成效。

六、參考文獻

1. Azcona-Olivera, J.I., M.M. Abouzid, R. D. Plattner, W. P. Norred, and J. J. Pestka.

1992. Generation of antibodies reactive fumonisins B1, B2, and B3 by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:169-173.
2. Chu, F. S., and G. Y. Li. 1994. Simultaneous occurrence of fumonisins B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from people Republic of China in regions high in esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:847-852.
 3. Gelderblom, W.C.A., K. Jasiwicz, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, R. M. Horak, Vleggar, and N. P. J. Kriek. 1988. Fumonisins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1806-1811.
 4. IARC. 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents. Heterocyclic aromatic and mycotoxin; IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human, IARC, Lyon.
 5. Thiel, P. G., W. F. O. Marasas of, E. W. Sydenham, G. S. Shephard, W. C. A. Gelderblom. 1992. The implication of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animals health. *Mycopathologia* 119:3-9.
 6. Tseng, T. C., and C. Y. Liu. 1997. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based Foodstruffs in Taiwan market. *Mycopathologia.* 137 (1):57-61.
 7. Ware, G. M., O. Francis, S. S. Kuan, P. Umrigar, A. Carman, L. Carter, G. A. Bennett. 1993. Determination of fumonisin B1 in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal lett.* 26:1751-1760.
 8. Yu F. Y. and F. S. Chu, 1996. Production and characterization of antibodies against fumonisin B1. *J. Food Prot.* 59:992-997.
 9. Yu F. Y. and F. S. Chu, 1998. Analysis of fumonisins and *Alternaria alternata* toxin by liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. AOAC Int.* 81:749-756.
 10. Yu F. Y. and F. S. Chu, 1999. Production and characterization of monoclonal antibodies against fumonisin B1. *Food and Agricultural Immunology* 11:297-306.
 11. Yu, F.-Y. and F. S. Chu. 1999. Production and characterization of monoclonal anti-anti-idiotypic antibodies against fumonisin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4815-4820.