

107 學年度(第五屆)

中山醫學大學

生物醫學科學學系研究成果發表會

會議手冊

2019. 05. 29~05. 31

議程表

日期與時間	活動主題	地點
5 月 29-30 日(星期三、四) 12:00-13:00	海報論文展演	正心樓 1 樓走廊 (總務處前)
5 月 31 日(星期五) 09:50-10:00	報到	正心樓 0315 教室
10:00-10:10	開幕(系主任致詞)	
10:10-11:30	口頭論文報告	
11:30-12:00	午餐	
12:00-12:15	頒獎 大合照	

摘要目錄

論文題目	頁次
海報論文	
1. 賴廷威/利用基因轉殖斑馬魚探討連接蛋白 26 突變造成聽損的成因	4
2. 鄒尚鏗/咖啡因(Caffeine)對 NaIO ₃ 誘導之視網膜色素上皮細胞氧化傷害的保護效果	5
3. 陳仕宏/探討 miR-145-5p 在非小細胞肺癌細胞產生 Pemetrexed 抗藥性的角色	6
4. 李玉齡/探討 L-type amino acid transporter 1 在肺癌幹細胞自我更新的角色	7
5. 陳禮彬/通過分析白色念珠菌中表達抑制和缺失系統構建的菌株來研究 H3K4 甲基化反作用調節者 Set1 和 Jhd2 的功能交互作用	9
6. 董俊仁/黑面將軍水萃液誘導活性氧化物質及細胞自噬抑制子宮肌瘤細胞株	10
口頭論文	
1. 連 怡/豬籠草 <i>Nepenthes miranda</i> 可能的藥性應用	12
2. 趙子惟/氟甲磺氯黴素之抗體製備與其應用於酵素連結免疫分析法和奈米金粒子免疫層析試紙分析法之開發	13
3. 洪宗蓮/T-2 毒素和萊克多巴胺與先鋒黴素 IV 抗體之製備與酵素免疫吸附分析法與免疫層析試紙之開發	14
4. 王思璵/氟滅菌單株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與免疫層析試紙之開發	16

利用基因轉殖斑馬魚探討連接蛋白 26 突變造成聽損的成因

Using Transgenic Zebrafish to Investigate the Mechanisms of Mutation in the Connexin26 Protein Causing Hearing Loss

學生：賴廷威 指導教授：楊建洲

中文摘要：

斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)常用於脊椎動物發育的動物模型,可以使用分子生物技術進行基因突變並建立基因轉殖魚來研究基因與疾病之間的機制。先前的文獻指出人類 *GJB2* 基因(CX26 protein)發生突變會產生非症候群聽力損失。我們實驗室發現人類 *GJB2* 基因與斑馬魚 *cx30.3* 基因具有高度同源性,因此我們認為斑馬魚可以用來當作人類非症候群聽力損失的疾病模型。同時我們實驗室依照先前發現的 *GJB2* 基因突變點建構出了斑馬魚 *cx30.3* 突變基因的表現質體(R186K 和 R186Q),並利用細胞模式表現斑馬魚 *cx30.3* 突變基因,但為了更進一步了解人類 CX26 的致病機制,本研究將利用斑馬魚做為模式動物來建立基因轉殖斑馬魚並進一步探討基因突變後造成的影響。我們首先使用之前製作的 *cx30.3* pLEGFP (R186K、R186Q 和 WT)質體,並利用專一表現在斑馬魚內耳及支持細胞的啟動子:*agr2*、*Tol2* 基因轉殖系統和使用顯微注射(microinjection)方法將基因送入斑馬魚胚胎中,並在斑馬魚孵化後確認內耳支持細胞有無表現 EGFP 螢光,來證實轉入的 *cx30.3* 是否存在,之後我們使用免疫螢光染色法(Immunofluorescence staining)來確認 Cx30.3 蛋白在細胞中的位置,並在最後使用行為分析,來確認 *cx30.3* 基因突變對斑馬魚內耳功能的影響。免疫螢光染色法結果顯示野生型(WT)和突變的 Cx30.3 蛋白都表現在細胞膜上。行為分析結果則是 *cx30.3* 突變斑馬魚在移動距離、移動速率、轉彎次數都顯著多於 WT 斑馬魚,而在轉彎角度則少於 WT 斑馬魚,因此我們的實驗結果初步證明 *cx30.3* 基因突變確實會對斑馬魚內耳功能產生影響。

咖啡因(Caffeine)對 NaIO₃ 誘導之視網膜色素上皮細胞氧化傷害的保護效果

Protective effects of Caffeine on Sodium Iodate-induced Retinal Pigment Epithelial Cell damage

學生：鄒尚鎔 指導教授：楊建洲 張元衍

中文摘要：

老年性黃斑部病變(Aged-related macular degeneration, AMD)是一種隨著年齡增長而視網膜中央逐漸退化的疾病。關於 AMD 形成的機制目前尚未完全探明，但在多項文獻中指出：AMD 形成初期都有一個共同的徵狀：視網膜色素上皮(Retinal pigment epithelial, RPE)的損傷，並且這個損傷主要來自於氧化傷害造成(S. Khandhadia et al, 2010)。

咖啡因(Caffeine)是植物中參與化學防衛機制的化合物，可中和蟲咬留下的化學成分，並且在人體中也被證實具有包含抗癌症、抗氧化等多種效果(Devasagayam YP, et al. 1996 ; Chung KT, et al. 1998)，並且能夠通過簡單擴散通過血腦障壁(Brain blood barrier)，已經被許多研究用來探討對腦部的保護效果(Xuesong Chen et al, 2010; McCall AL et al, 1982)。因此，本研究將分別利用 *in vitro* 與 *in vivo* 的方式，通過細胞與小鼠模型來探討NaIO₃是否可誘導RPE產生氧化損傷，並探討咖啡因對於RPE氧化傷害是否具有延緩或保護的效果。首先，我們將先對ARPE19細胞株預先添加咖啡因，再加入NaIO₃誘導氧化傷害，以Western blot及ELISA，來評估其對於ARPE19細胞氧化損傷的保護效果。接著，我們以BALB/c品系小鼠為模型，先以尾靜脈注射NaIO₃ (40 mg/ kg)，之後每日腹腔注射或食物添加咖啡因的方式，於7天後觀察咖啡因對RPE及整體視網膜的影響。

我們目前的研究結果，已經成功以 NaIO₃ 誘導 ARPE19 細胞產生 autophagy，並誘使細胞死亡；在小鼠模型試驗中，我們通過 H&E 染色及 OCT、眼底攝影，觀察到 NaIO₃ 誘導了 RPE 及其周邊細胞的缺損，並且使整個視網膜的結構也發生改變。未來我們將以咖啡因來進行研究，探討咖啡因對於 RPE 氧化損傷的保護效果及機制，以及對視網膜各層組織以及脈絡膜血管層的影響。

AMD 的形成，至今尚未發展出有效的治療方式，僅能依賴額外補充一些保健食品來達到延緩 AMD 惡化的效果。因此，我們希望探討是否可藉由適當的補充咖啡因，來達到延緩 AMD 的形成。

探討 miR-145-5p 在非小細胞肺癌細胞產生 Pemetrexed 抗藥性的角色

The involvement of miR-145-5p in pemetrexed resistant non small cell lung cancer cells

學生：陳仕宏 指導教授：張文瑋

中文摘要：

肺癌為 106 年國人癌症死亡的首位，其中非小細胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)佔了肺癌的 85%。Pemetrexed 是一種被用於治療非小細胞肺癌細胞的第一線化療用藥，屬於葉酸抑制劑。Pemetrexed 主要的作用機制是阻斷非小細胞肺癌去氧核糖核酸的合成，而長期使用 Pemetrexed 藥物治療非小細胞肺癌可能會導致抗藥性的產生，並導致癌症的復發。本研究主要目標為探討非小細胞肺癌對 Pemetrexed 藥物產生抗藥性的分子機制。透過 A549 非小細胞肺癌細胞株與其 Pemetrexed 抗藥細胞 A400 的比較，我們首先發現 miR-145-5p 在 A400 肺癌細胞中表現量較低，而 miR-145-5p 是一種廣為人知的腫瘤抑制性微小 RNA。而當我們將 miR-145-5p 的核苷酸類似物(mimic)以轉染的方式送入 A400 肺癌細胞後，使其 miR-145-5p 高表現，發現 A400 細胞對於 Pemetrexed 的敏感性增加了；反之，當 A549 肺癌細胞內的 miR-145-5p 表現受到抑制，則使 A549 肺癌細胞對於 Pemetrexed 產生抗藥性。另外，透過 A400 肺癌細胞與 A549 肺癌細胞的比較，以及 miR-145-5p 目標基因預測網站資料，我們發現有 3 種可能的 miR-145-5p 目標基因，分別為 IGF1R(insulin-like growth factor receptor-1)、BMI1(B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog)以及 Sp1。當 A549 肺癌細胞的 miR-145-5p 表現被抑制時，此三種基因的表現量會增加；反之，在 A400 肺癌細胞使 miR-145-5p 表現增加時，則會使這些基因的表現受到抑制。從這些研究我們發現，miR-145-5p 的下調對於非小細胞肺癌產生 Pemetrexed 抗藥性中扮演著重要的角色。未來，我們將會利用 3 端非編碼區報導基因的方式來研究 IGF1R, BMI1 或 Sp1 是否為 miR-145-5p 之直接目標基因。此外，我們也將探討當使 A549 肺癌細胞的 BMI1 或 Sp1 高表達時，是否使其產生 Pemetrexed 抗藥性。總而言之，本研究結果發現，miR-145-5p 對於非小細胞肺癌產生 Pemetrexed 抗藥性扮演重要角色，而 miR-145-5p 之表現可能成為非小細胞肺癌中 Pemetrexed 治療效果的指標。

探討 L-type amino acid transporter 1 在肺癌幹細胞自我更新的角色

L-type amino acid transporter regulates self-renewal capability in lung cancer stem cells

學生：李玉齡 指導教授：張文瑋

中文摘要：

肺癌，是國人因為癌症而死亡的最常見原因之一，近數十年來在臺灣地區的肺癌病人有顯著增加的趨勢。癌症幹細胞(cancer stem cells)，為癌症細胞中有一群具有自我更新和分化能力的細胞，其在腫瘤生成和抗藥性扮演著重要的角色。L-type amino acid transporter 1 (LAT1)，主要轉運大分子支鏈胺基酸和芳香族中性胺基酸，其中包括必需胺基酸：leucine。近年來研究發現，LAT1 在許多癌症中都有較高的表現量，並且可藉由抑制 LAT1 表現量來抑制癌細胞的生長。本研究首先發現肺癌細胞株 A549 之 Pemetrexed 抗藥性細胞 A400 細胞中自我更新相關基因及 LAT1 的表現較 A549 細胞為高，因此我們推測 LAT1 可促進肺癌幹細胞的自我更新能力。不論藉由抑制劑或 shRNA，LAT1 的抑制皆能有效抑制 A400 細胞中自我更新相關基因的表現和癌症球體(tumorsphere)的形成，這些結果顯示 LAT1 在肺癌幹細胞的自我更新能力中扮演著重要角色。為更進一步探討 LAT1 在肺癌幹細胞所扮演的角色，western blot 結果顯示抑制 LAT1 會使 mTOR 和 Akt 磷酸化程度下降。先前文獻指出，處理以可穿透細胞之 Leucine 類似物 (L-Leucyl-L-Leucine methyl ester, Leu-Leu-OMe) 可以增加 mTORC1 signaling 的活性，因此我們以 Leu-Leu-OMe 處理 LAT1 表現受抑制之肺癌細胞，結果顯示，Leu-Leu-OMe 確實可以增加 mTOR 的活性並回復 LAT1 所抑制的肺癌球體形成能力。未來我們將在 LAT1 表現受抑制之肺癌細胞中過度表現穩定活化態之 Akt，以此探討 Akt 在 LAT1 調控肺癌幹細胞自我更新中所扮演的角色。總結而言，LAT1 可能是藉由 PI3K/AKT/mTOR 路徑來調控肺癌幹細胞的自我更新，且 LAT1 的抑制可能可以做為肺癌病患的潛在治療策略。

Abstract

Lung cancer is the leading cause of death among cancers in Taiwan in 2017. Cancer stem cells (CSCs) are a subpopulation of cancer cells with self-renewal and differentiation capabilities and play an important role in tumor initiation and drug resistance. The L-type amino acid transporter 1 (LAT1/SLC7A5) is a membrane transporter, which delivers neutral amino acids into cells, such as leucine and phenylalanine. Recent studies indicate that LAT1 is highly expressed in a variety of cancers, such as prostate, breast, gastric and lung cancers, and inhibition of LAT1 reduces cell proliferation. In this study, we first discovered that the CSC activity of pemetrexed-resistant A549 cells (called A400) was higher than the parental A549 cells, including the increased number of tumorspheres and the upregulation of Bmi1, Sox2, Oct4, and c-Myc. We also found that SLC7A5 expression in A400 cells was higher in comparison to A549 cells. LAT1 inhibition by a LAT1 inhibitor JPH203 or specific shRNAs led to a significant decrease in tumorsphere formation and downregulation of Bmi1, Sox2, Oct4, and c-Myc. These data show that LAT1 plays an important role in self-renewal in lung CSCs. Then, western blot was performed to investigate the role of LAT1 in lung CSCs. As the data showed, not only mTOR but also Akt activity declined after the inhibition of LAT1. We further treated LAT1-inhibited A400 cells with Leu-Leu-OMe, a cell-permeable leucine derivative, and the results showed that Leu-Leu-OMe did promote mTOR phosphorylation and recover the CSC activity in A400

cells. Thus, we hypothesized that LAT1 regulates lung CSCs through PI3K/AKT/mTOR pathway. In the future, we will perform the overexpression of constitutively active form of Akt with LAT1 inhibition to demonstrate the involvement of Akt in the LAT1 mediated self-renewal of lung CSCs. In conclusion, LAT1 regulates self-renewal of lung CSCs through PI3K/Akt/mTOR pathway and its inhibition may offer an effective therapeutic strategy in lung cancer patients.

通過分析白色念珠菌中表達抑制和缺失系統構建的菌株來研究H3K4甲基化反作用調節者Set1和Jhd2的功能交互作用

Study of the functional interaction of the counteracting H3K4 methylation modulators Set1 and Jhd2 by analyzing strains constructed with the expression-repressible and deletion system in *Candida albicans*.

學生：陳禮彬 指導教授：謝家慶

中文摘要：

Candida albicans 是一種無完整性週期的自然二倍體生物。做為一個伺機性人類真菌病原菌，*C. albicans* 能夠引發表層的感染或導致免疫功能低下患者的高死亡率的全體性念珠菌症，並已知是最常見的院內感染。*C. albicans* 的形態可塑性為其致病機制中重要的致病能力。我們實驗室先前已經表明有絲分裂細胞週期的演化保守性正向調節因子，Skp1-Cullin-1/Cdc53-F-box (SCF)^{Cdc4} 泛素連接酶在 *C. albicans* 的酵母菌形態到菌絲形態轉換中的負向調控上扮演一個新的角色。我們先前已經透過親和力純化鑑定 *C. albicans* Jhd2 為一個 *C. albicans* Cdc4 相關蛋白。而且我們也發現 *C. albicans* JHD2 為一個組蛋白 H3 第四賴氨酸 (H3K4) 去甲基酶，並能夠抑制細胞聚集以及生物膜形成。另外，*C. albicans* SET1 已知編碼 H3K4 甲基轉移酶，且有助於侵襲性念珠菌病的發病機制。近年來作用於 H3K4 甲基化的兩個相反功能調節者 Set1 和 Jhd2 在 *Saccharomyces cerevisiae* 中調節染色質的動態及轉錄之複雜性已經被了解。然而，JHD2 和 SET1 之間藉調節 H3K4 甲基化及轉錄之功能性相互作用導致外表型變化，特別是致病性特徵的改變在 *C. albicans* 中仍是難以捉摸的。

我的目的是研究 SET1 和 JHD2 如何透過相互作用以改變 H3K4 甲基化來影響致病力相關基因的表達以及白色念珠菌相關外表型的改變。我利用我們實驗室新建立的系統 (Lai, et al., 2016)，建構出一個基因缺失而另一個基因表達可受抑制的 *C. albicans* 品系。而我主要專注於建構 JHD2^{-/-} SET1 Tet-off^{-/-} 品系，在此品系中 JHD2 被剔除，且 SET1 的表達可透過多西環素 (Dox) 抑制。在存在 Dox 的情況下，該品系可模擬 JHD2 和 SET1 基因的共同缺失情形。而在不存在 Dox 的情況下，該品系可表現出 JHD2 缺失但是 SET1 過量表達的情形。我將透過測定在抑制和去抑制條件下 H3K4 的甲基化，並評估外表型結果和相關基因的表達可能的改變，來做為 SET1 和 JHD2 之間功能性相互作用的研究結果。

黑面將軍水草液誘導活性氧化物質及細胞自噬抑制子宮肌瘤細胞株

Anti-Uterine fibroids activity of *Strobilanthes cripus* water extracts is mediated by the induction of reactive oxygen species and autophagy

學生：董俊仁 指導教授：張文瑋

中文摘要：

子宮肌瘤是生長於子宮內的良性腫瘤，是最廣泛的婦科疾病之一，約有 20%-80% 之女性會在 40 至 50 歲前罹病。黑面將軍是星馬地區傳統醫學所使用之草藥，多用於癌症、糖尿病、子宮肌瘤等治療，其被證實具有抗癌、抗血管新生等效用，而本研究將探討其抑制子宮肌瘤細胞株生長之機轉。

首先，本研究證實黑面將軍水草液可以抑制大鼠子宮肌瘤細胞株 ELT3-Luc 之生長，並呈現濃度依賴性。在分子層次上，透過西方墨點法確認 ELT3-Luc 細胞內自噬標誌 LC3-II、ATG5-ATG12 複合體會隨著水草液的處理而上升；相反地，細胞凋亡標誌如 caspase3 則否。本研究也進一步使用不同抑制劑處理細胞，結果顯示活性氧化物質抑制劑 N-acetyl-cysteine (NAC) 能全面性地回復黑面將軍水草液所導致的 ELT3-Luc 細胞生長抑制效果，而 caspase3 抑制劑 z-VAD 及自噬體抑制劑 chloroquine (CQ) 則無法回復或只能部分回復。因此我們推論黑面將軍水草液藉由誘導活性氧化物質的生成，以增強細胞自噬的進行，導致細胞的生長抑制。然而詳細抑制機轉尚未明瞭，未來將會進一步探討活性氧化物質、細胞週期、細胞自噬及水草液所誘導的生長抑制效果之間的關係。

Abstract

Uterine fibroids (UF), the benign tumors of the uterus, are one of the most common diseases among women in the 40s and early 50s. UF may lead to heavy bleeding, pelvic pressure, pain, or even reproductive dysfunction. The percentage of women who suffered from UF is up to about 20% to 80%. *Strobilanthes cripus* (also called peach kaca or black face general, BFG) is a traditional medication in Singapore and Malaysia. It's used for the treatment of tumor, diabetic, and uterine fibroids. Several scientific studies have confirmed that the extraction of BFG displays anti-cancer, anti-oxidant, and anti-angiogenic activities. However, how BFG extraction influences uterine fibroids is yet to be elucidated. Firstly, BFG water extracts inhibited the proliferation of a rat uterine fibroid cell line, ELT3-Luc. To further investigate the underlying molecular mechanisms of anti-UF activity of BFG extracts, western blot was performed to check the markers of apoptosis or autophagy. As the data showed, the expression of cleaved caspase 3 was not changed in ELT3-Luc cells after the treatment of BFG extracts. In contrast, the indicative marker of autophagy, LC3-II, and the autophagosome elongation factor, ATG5-ATG12 complex was increased. With the combination of N-acetyl-cysteine (NAC), a reactive oxygen species (ROS) inhibitor, the growth of ELT3-Luc cells was totally recovered after treatment of BFG extracts whereas the effect of chloroquine, an inhibitor in autolysosome activity, was partial. In conclusion, we clearly demonstrated the growth inhibition effect of BFG water extracts in a rat UF cell line which is associated with the induction of ROS and autophagy. In the future, we will further dissect the links among ROS, autophagy, and the cell proliferation inhibition induced by BFG extracts in ELT3-Luc cells.

豬籠草 *Nepenthes miranda* 可能的藥性應用

Potential pharmacological activities of *Nepenthes miranda* extracts

學生：連 怡 指導教授：黃晟洋

中文摘要

Nepenthes miranda 是一種能捕食昆蟲的植物也是一種民族藥用植物，其含有許多具藥理活性的萃取物。利用不同溶劑例如：甲醇、乙醇、丙酮和蒸餾水萃取 *N. miranda* (Nm) 的葉子、莖及捕蟲籠，我們得到了許多不同的萃取物，並且研究其是否具有抗氧化、抗菌性、抗癌和抗發炎活性。利用 DPPH 自由基清除試驗、FRAP 鐵降低抗氧化能力試驗、Folin-Ciocalteu 法和 AlCl_3 法分析，我們發現 100% 莖的丙酮萃取物 (Nm-s-a) 的抗氧化活性、總酚和總類黃酮含量最高。此外，我們發現莖萃取物對三種致病菌，*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 也表現出最好的抗菌活性。通過瓊脂-孔擴散測定法測定的 Nm-s-a 抑菌圈直徑為 9-29 mm，並且其抑菌圈直徑長度：*Escherichia coli* > *Staphylococcus aureus* > *Pseudomonas aeruginosa*。同時，Nm-s-a 也能抑制 *P. aeruginosa* SSB 結合到 DNA (IC_{50} 為 10.2 $\mu\text{g/mL}$)，為了證明 Nm-s-a 對腫瘤的細胞毒性，將不同濃度的 Nm-s-a 加入小鼠黑素瘤細胞(B16F10)，在 125 $\mu\text{g/mL}$ 的濃度下，Nm-s-a 處理後的黑色素瘤細胞幾乎全部死亡。傷口癒合試驗也顯示 Nm-s-a 會抑制 B16F10 的遷移。這些結果顯示，Nm 萃取物其抗菌和抗癌的能力在醫學領域中可能具有藥用潛力。

Abstract

Nepenthes are plant carnivorys. Prior to this work, the antibacterial, antioxidant, and anticancer properties of *Nepenthes* remain unclear. In this study, we prepared different extracts from leaves, stems, and pitchers of *N. miranda* (Nm) and investigated their pharmacological activities. The inhibitory effect of Nm extracts on the SSB, a protein required for bacterial DNA replication, was also studied. To evaluate extraction efficiency, different solvents such as methanol, ethanol, acetone, and distilled water were individually used for Nm extract preparations. The stem extract (Nm-s) had the highest antioxidation activity and the polyphenols content. Nm-s also displayed broad range of antibacterial activities against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The inhibition zones of Nm-s obtained by 100% acetone (Nm-s-a) ranged from 8.5 to 28 mm and were in the following order: *E. coli* > *S. aureus* > *P. aeruginosa*. Nm-s-a could inhibit the activity of *P. aeruginosa* SSB with IC_{50} of 10.2 $\mu\text{g/mL}$. After incubating with 125 μg Nm-s-a, B16F10 melanoma cells were almost dead assessed by trypan blue assay. The wound healing assay further showed that Nm-s-a also inhibited B16F10 cell migrations. Taken together, these results indicated that Nm extract exhibited strong antibacterial and anticancer potentials for medical applications.

氟甲磺氯黴素之抗體製備與其應用於酵素連結免疫分析法和奈米金粒子免疫層析試紙分析法之開發 Production of Antibodies and Their Application to ELISA and Gold Nanoparticle Immunochromatographic Strip for Florfenicol

學生：趙子惟 指導教授：余豐益

中文摘要

氟甲磺氯黴素 (Florfenicol, FF)，為一種廣效型抗生素。由於 FF 對多種革蘭氏陽性與陰性菌的抑菌效果顯著，因此被廣泛應用於畜禽、水產養殖業及養蜂業中多種傳染病的治療，又因為被廣泛的應用，動物體內常有殘留。然而許多研究指出，高劑量的 FF 會導致男性生殖毒性，如睪丸萎縮，精子細胞的減少，得到間質細胞瘤的風險增加，因此本實驗欲利用抗體與抗原之間的專一性，建立了一套可以快速檢測食品中 FF 殘留量之分析法。本實驗先使用 Succinic anhydride (SH) 將 FF 衍生為 FF-SH，再利用薄層層析法 (TLC) 進行確認與純化，衍生後產物再與牛的甲狀腺球蛋白 (Bovine thyroglobulin, BTG) 進行接合。本實驗使用 FF-SH-BTG 作為抗原注射入紐西蘭大白兔體內，進而產生對 FF 有專一性之多株抗體；由 ELISA 結果顯示其抑制 50 % FF 多株抗體結合至 FF-SH-HRP 所需的 FF 濃度 (IC₅₀) 為 4.04 ng/mL，本實驗進一步使用此多株抗體開發出免疫層析試紙，而此免疫試紙之檢測極限值為 5 ng/mL；此外本實驗為了製備出對 FF 高度專一性之單株抗體，也以 FF-SH-BTG 作為抗原來免疫小鼠，由 ELISA 結果顯示三隻小鼠血清中抗體的 IC₅₀ 分別為 1.61、2.3 和 0.094 ng/mL，且三隻皆已犧牲進行融合瘤實驗，但並未篩選出可分泌對 FF 專一性抗體的細胞株。本實驗利用 FF 多株抗體開發之兩種檢測分析法，皆比目前使用之 high-performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) 等分析法簡單並且容易操作，希望可以提供給大眾使用並為食品安全盡一份心力。

Abstract

Florfenicol (FF) is a synthetic and broad-spectrum antibiotic belonging to the fenicol drug family. It is widely used in poultry, livestock and aquaculture. Due to the residue concerns of FF in animals and the potential drug resistance of bacteria, FF is strictly regulated in many countries. FF was also reported with male reproductive toxicity and might cause testicular atrophy, decrease sperm cells production and increase the risk of Leydig cell tumors. Therefore, developing a rapid and sensitive detection method for screening the level of FF is urgent. First, FF was derivatized with succinic anhydride (SH) and the result was confirmed by thin layer chromatography (TLC). Then, the FF-SH was coupled with bovine thyroglobulin (BTG) and New Zealand rabbit was immunized with FF-SH-BTG to produce anti-FF antibody. The results of cdELISA from rabbit antiserum showed that the concentration causing 50% inhibition (IC₅₀) of binding of FF-horseradish peroxidase (FF-HRP) to the antibody by FF was calculated to be 4.08 ng/mL. The gold nanoparticle immunochromatographic strips (immuno-strip) were developed based on the antibody described above. In addition, the visual detection limit of immuno-strip was 5 ng/mL. To produce the monoclonal antibody for FF, the Balb/c mice were immunized and the spleens of these mice were used to fuse with the myeloma cells for screening the hybridoma. In the cdELISA, the IC₅₀ values of FF-antibody in three mice serum were calculated to be 1.61, 2.3 and 0.094 ng/mL, respectively. However, we didn't screen the cell that can secrete FF antibody. The ELISA and immuno-strip we established are more convenient and rapid than HPLC to detect the FF contamination in foods.

T-2 毒素和萊克多巴胺與先鋒黴素 IV 抗體之製備與酵素免疫吸附分析法與免疫層析試紙之開發 Production of Antibody and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Strip for T-2 toxin, Ractopamine and Cephalixin

學生：洪宗蓮 指導教授：余豐益

中文摘要

T-2 toxin (T-2) 是鐮刀菌真菌所產生的代謝物，容易存在於溫帶的糧食穀物與未保存良好之加工品中，動物與人會誤食被污染之食物，有研究證明 T-2 toxin 具有細胞毒性、抑制免疫反應與 DNA 和 RNA 合成等；萊克多巴胺 (Ractopamine, Rac) 是一種人工合成苯乙醇胺類的乙型受體 (β -receptor) 興奮劑，用於人類醫療上須過高的劑量，但添加於飼料中，低劑量的 Rac 便可使動物的脂肪合成降低並且增加肌肉生長，俗稱瘦肉精，研究指出 Rac 導致心臟相關症狀，包括心跳過速、心律不整或心悸等；先鋒黴素 IV (Cephalixin, Cex) 是一種乙內醯胺類抗生素 (Beta-lactam antibiotics)，利用抑制細菌細胞壁的合成，達到抗菌效果，經常被業者使用於經濟動物上，若過量使用 Cex 將殘留在動物產品內，而造成消費者產生過敏反應或腸胃疾病等。因此，本研究利用抗體與毒素抗原之專一性，希望建立一套快速且靈敏檢測 T-2、Rac 與 Cex 的方法。T-2 與 Cex 部分，利用抗 T-2 與 Cex 多株抗體開發了酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 與免疫層析試紙分析法 (immunochromatographic strip)；Rac 部分，與載體蛋白接合後作為抗原來免疫小鼠，利用直接競爭型酵素連結免疫吸附法 (direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA) 檢測老鼠血清，其抑制 50 % 抗體結合至抗原-酵素接合物所需的 Rac 濃度 (IC_{50}) 為 39 ppb，接著將小鼠犧牲取出脾臟細胞與骨髓瘤細胞融合，篩選出融合瘤細胞株 (6G8F4F2) 來分泌抗 Rac 單株抗體，其 IC_{50} 為 19.7 ppb。本研究已成功分別建立檢測 T-2、Rac 與 Cex 的方法，但仍須改進其靈敏度，以利篩檢食品中殘留之毒素。

Abstract

T-2 toxin (T-2) is a metabolite produced by the *Fusarium* fungus. It is easily found on a variety of grain in the temperate zones and the processed food which stored poorly. Human and animal may consume the contaminated food. Many studies have shown that T-2 toxin may lead the cytotoxicity and immunosuppression, and inhibit DNA or RNA synthesis. Ractopamine (Rac) is a synthetic beta-receptor agonist, belong to phenylethanolamine. As a human drug, Rac needs an extremely high dose. But for animal feed additive, low doses of Rac can reduce fat synthesis and increase muscle growth. Rac has been reported that may cause heart-related symptoms, including tachycardia, arrhythmia and palpitations. Cephalixin (Cex) is a beta-lactam antibiotics that inhibits the synthesis of cell wall for bacterial and then has the effect of antibacterial. Cex is often used in livestock. Excessive use of Cex may remain in the animal product that will cause consumers to have allergic reactions or gastrointestinal diseases. Therefore, using these specific antibodies to establish a rapid and sensitive method for detecting individual T-2, Rac and Cex is the purpose in present study. In the T-2 and Cex sections, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and an immunochromatographic strip were developed using anti-T-2 and Cex polyclonal antibodies, respectively. About the Rac, Rac was conjugated with carrier protein as an antigen for immunizing mice. The anti-Rac antiserum was detected by direct competitive enzyme-linked

immunosorbent assay (cdELISA), and the concentration causing 50% inhibition (IC₅₀) of binding the Ractopamine-horseradish peroxidase (Rac-HRP) to the antibody is 39 ppb. The anti-Rac monoclonal antibody was produced from a hybridoma, 6G8F4F2, which was generated by the fusion of mouse spleen cells with the myeloma cells, and the IC₅₀ is calculated to be 19.7 ppb. In this study, we have successfully established the methods for detecting T-2, Rac and Cex, respectively. However, it is still necessary to improve the sensitivity of the assay methods to screen the residues of toxins in the food.

氟滅菌單株抗體之製備及酵素免疫吸附分析法與免疫層析試紙之開發

Production of Monoclonal Antibody and Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Strip for Flumequine

學生：王思璦 指導教授：余豐益 楊建洲

中文摘要

氟滅菌 (Flumequine, Flu) 是用於治療革蘭氏陰性細菌細菌感染的合成抗生素，而殘留在食品中的抗生素會增加細菌的抗藥性，並對公共衛生造成威脅。為了保護消費者的健康，根據我國衛生福利部之動物用藥殘留標準規定，Flu 在魚肉以及家禽、家畜的肌肉和肝臟相關製品中，不得檢出超過 500 ng/mL；家禽家畜的腎臟相關製品中，不得檢出超過 3000 ng/mL；家禽家畜之脂肪相關製品中，不得檢出超過 1000 ng/mL；牛乳與山羊乳中，不得檢出超過 50 ng/mL。因此，一個快速且方便的檢測方式是需要。本研究利用 Carbodiimide 方法，將 Flu 與牛甲狀腺球蛋白接合，使 Flu 具有免疫原性，並以此蛋白作為抗原對 BALB/c 小鼠進行免疫，製備出可辨識 Flu 的多株抗體，再以此抗體開發可以檢測 Flu 的直接競爭型酵素連結免疫吸附法 (Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay, cdELISA)，其抑制 50% 抗體結合至抗原-酵素接合物所需的 Flu 濃度 (IC_{50}) 為 48.8 ng/mL。本研究已成功利用 Flu 多株抗體建立具有靈敏性的 ELISA，可用於檢測食品中殘留的 Flu，降低對社會的危害。未來將改善多株抗體的靈敏度及特異性，利用融合瘤技術開發 Flu 單株抗體，並利用此單株抗體開發快速免疫層析試紙 (immunochromatographic strip, immunostrip)。

Abstract

Flumequine (Flu) is a synthetic antibiotic used to treat bacterial infections. The presence of antibiotic residues can increase the proliferation of antibiotic-resistant pathogens and threats to public health. In order to protect consumer health, the maximum residue limits (MRLs) of Flu was established by the standards for veterinary drug residue limits in foods at 500 ng/mL in livestock and poultry for muscle and liver products, at 3000 ng/mL for kidney products, at 1000 ng/mL for fat products, at 50 ng/mL for milk products, and at 500 ng/mL in fish for muscle products. To test samples for the presence of Flu, a rapid and convenient screening method is required. Flu was conjugated with thyroglobulin from bovine thyroid (BTG) by carbodiimide method. The polyclonal antibody (pAb) against Flu was produced using Flu-BTG conjugates as the immunogen to immune the BALB/c mice. A competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay (cdELISA) was developed based on the antiserum describe above. The results of cdELISA indicated that the concentration causing 50% inhibition (IC_{50}) of binding of Flu-horseradish peroxidase (Flu-HRP) by the antibodies by Flu were calculated to be 48.8 ng/mL. We have successfully generated the polyclonal antibody and developed the cdELISA for Flu. In the future, we will improve the specificity and sensitivity of antibody, produce monoclonal antibody for Flu by hybridoma technique, and develop an immunochromatographic strip based on the monoclonal antibody.

