

中國醫藥大學營養研究所

Institute of Nutrition, China Medical University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：龍鳳娣 博士 (Feng -Di Lung, Ph.D.)

應用表面膜漿共振技術探討維生素 D3
與其多株抗體間之交互作用

**Interactions between cholecalciferol (vitamin D3)
and its polyclonal antibodies studied by surface
plasmon resonance technology**

研究生：張瓊文 (Chiung-Wen Chang)

中華民國九十二年七月

目

錄

第一章 前言	1
第二章 文獻探討	3
第一節 維生素D	3
第二節 抗原和抗體的製備	6
第三節 多株抗體的純化	8
第四節 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)	9
第五節 表面膜漿共振技術 (SPR)	10
5-1 SPR原理	10
5-2 生物感應器 BIAcore X biosensor	13
5-3 BIAcore X 儀器之組成	15
5-4 BIAcore X 儀器即時偵測之優點	20
第六節 食品中維生素 D ₃ 之檢測方法	21
6-1 高效能液相層析法 (HPLC)	21
6-2 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)	21
6-3 表面膜漿共振技術 (SPR)	21
第三章 材料與方法	22
第一節 實驗目的	22
第二節 抗原之製備	23
2-1 BSA 的陽離子化	23
2-2 cBSA 和 vitamin D ₃ 之結合反應	25
第三節 抗原之確認	27
3-1 蛋白質膠體電泳分析 (SDS-PAGE)	27
3-2 UV-分光光度計	29
第四節 抗體的製備及純化	30
4-1 實驗材料	30
4-2 抗體產生之實驗方法	30
4-3 多株抗體的純化	31
第五節 多株抗體的確認	34

5-1	點墨免疫分析法	34
第六節	利用 ELISA 來檢測多株抗體和維生素 D3	36
6-1	實驗儀器	37
6-2	實驗材料	37
6-3	實驗方法	37
第七節	利用 SPR 技術定量食品中維生素 D3	38
7-1	實驗儀器	38
7-2	實驗材料	38
7-3	實驗方法	39
第四章	結果與討論	41
第一節	抗原之確認	41
1-1	陽離子化反應之確認	41
1-2	Vitamin D3 和 cBSA 的結合反應之確認	42
第二節	抗體的純化及確認	46
2-1	點墨免疫分析法	46
第三節	利用 ELISA 來檢測多株抗體和維生素 D3	49
3-1	直接型 ELISA	49
3-2	競爭型 ELISA	50
第四節	利用 SPR 檢測標準品維生素 D3	52
4-1	感應晶片之製備	52
4-2	固定抗維生素D3之多株抗體及goat-anti rabbit Fc IgG antibody於CM5感應晶片	53
4-3	SPR方法標準曲線的製作	56
4-4	市售牛奶中維生素 D3 的萃取之確認	65
4-5	比較 HPLC、ELISA 和 SPR 和偵測維生素 D3 和 其多株抗體之結果	66
4-6	利用 BIAcoreX 儀器檢測牛奶中之維生素 D3	67
第五章	結論	75
	參考文獻	76

圖 目 錄

圖 2.1	各種維生素 D 的不同化學結構	3
圖 2.2	維生素 D ₃ 之合成圖	4
圖 2.3	原發性抗體反應的 4 個時期	7
圖 2.4	典型的免疫反應	7
圖 2.5	親合性管柱層析原理	8
圖 2.6	ELISA 之原理	9
圖 2.7	SPR 的偵測系統	10
圖 2.8	樣品造成感應晶片表面質量濃度的變化	11
圖 2.9	BIACORE X 進行即時性的分子間交互作用分析	12
圖 2.10	SPR 共振角度變化隨著溶液中待測物濃度改變而發生變化	14
圖 2.11	BIACore X 儀器中三大主要基本系統	15
圖 2.12	BIACore 之感應晶片主要構造	16
流程圖 3.1	陽離子化 BSA(cBSA)之合成	24
流程圖 3.2	cBSA-vitamin D ₃ complex 的合成	26
流程圖 3.3	多株抗體的純化過程	33
圖 3.2	ELISA 檢測維生素 D ₃ 與其多株抗體間作用	36
圖 3.3	感應晶片 CM5 中鍵合物之固定	39
圖 4.1	BSA 之 UV 分光光譜圖	41
圖 4.2	cBSA 之 UV 分光光譜圖	42
圖 4.3	維生素 D ₃ 之 UV 分光光譜圖	43
圖 4.4	cBSA 及 vitamin D 混合液之 UV 分光光譜圖	43
圖 4.5	cBSA- vitamin D complex 之 UV 分光光譜圖	43
圖 4.6	12% SDS PAGE 照相顯影圖	44
圖 4.7	BSA 蛋白質之胺基酸組成與序列	45
圖 4.8	點墨免疫分析方法設計圖	47
圖 4.9	點墨免疫分析方法照相顯影結果圖	47
圖 4.10	點墨免疫分析方法照相顯影結果圖	48

圖 4.11	點墨免疫分析方法照相顯影結果圖	48
圖 4.12	直接型酵素免疫分析法測得之曲線圖	49
圖 4.13	競爭型酵素免疫分析法測得之曲線圖	50
圖 4.14	直接型 ELISA	51
圖 4.15	競爭型 ELISA	51
圖 4.16	CM5 感應晶片表面之活化	52
圖 4.17	固定不同鍵合物於 CM5 感應晶片	53
圖 4.18	固定抗體於感應晶片表面之感應分析圖	54
圖 4.19	固定抗體於感應晶片表面之感應分析圖	55
圖 4.20	注入維生素 D3 標準品後經過 SPR 分析之感應分析圖	56
圖 4.21	SPR 分析不同濃度之維生素 D3 之曲線圖	58
圖 4.22	注入標準品後經過 SPR 分析的感應圖	59
圖 4.23	SPR 分析不同濃度之維生素 D3 之曲線圖	61
圖 4.24	注入標準品後經過 SPR 分析的感應圖	62
圖 4.25	SPR 分析不同濃度之維生素 E 和 抗維生素 D3 之多株抗體感應晶片表面作用的結果	64
圖 4.26	標準品維生素 D3 HPLC 層析譜圖	65
圖 4.27	萃取得到之維生素 D3 之 HPLC 層析譜圖	65
圖 4.28	標準品與多株抗體反應之感應分析圖	67
圖 4.29	市售奶粉中之維生素 D3 與多株抗體之感應分析圖	70

表 目 錄

表 2.1	不同之耦合方法其適用範圍	18
表 3.1	製備 12% SDS- PAGE 所需之材料	28
表 4.1	利用直接型酵素免疫分析法檢測抗維生素 D3 之多株抗體 與維生素 D3 之結果	49
表 4.2	利用競爭型酵素免疫分析方法檢測預混抗維生素 D3 之多株抗體與維生素 D3 之結果	50
表 4.3	標準品維生素 D3 和抗維生素 D3 之多株抗體以 BIAcore X 儀器檢測之結果	57
表 4.4	不同濃度之維生素 D 和 anti-NTX Ab 以 BIAcore X 儀器 檢測的結果	60
表 4.5	不同濃度之維生素 E 和 anti-vitamin D Antibody 在 BIAcore X 儀器檢測的結果	63
表 4.6	不同濃度之維生素 D 與其多株抗體作用後 RU 值之變化	68
表 4.7	市售奶粉稀釋後維生素 D3 之含量	69
表 4.8	不同濃度牛奶稀釋液與多株抗體作用後 RU 值的變化	71
表 4.9	BIAcoreX 儀器檢測稀釋後牛奶所含維生素 D3 之毫克數	72
表 4.10	計算稀釋後牛奶和以 BIAcore X 儀器檢測後其維生素 D3 含量	72
表 4.11	萃取後牛奶維生素 D3 經 BIAcoreX 儀器檢測後 RU 值	73
表 4.12	經計算後和萃取後之維生素 D 之比值	73
表 4.13	維生素 D3 經校正後含量	74

摘要

維生素 D 是人類飲食中必須維生素之一其對於正常的生長及發育是重要的，維生素 D 成人的建議量是每天 200-400IU。過多的維生素 D 對人體並無好處，而且可能導致毒性。而維生素 D 的缺乏則易導致鈣和磷的吸收不足，使得骨骼和牙齒礦化不足。因此，食品中正確標示維生素 D 的含量是重要且必要的。牛奶和強化牛奶是維生素 D 的主要來源，因此，正確標示其中維生素 D 的含量是很重要的，但是實際上測量牛奶中的維生素 D 含量時會受限於測量方法之敏感性、快速性和簡便性，因此，本研究擬開發一個新的檢測方法以定量食品中維生素 D 之含量。利用表面膜漿共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 技術分析生物分子之間相互作用的方法，已被廣泛應用在分析抗體與抗原之間的交互作用。此實驗中，我們計畫將多株抗體固定於 CM5 生物感應晶片上，並將待分析物注射入 BiacoreX 之生物感應器中，以監測抗原抗體兩者之間的交互作用。再根據抗原抗體兩者之間交互作用之感應圖及實驗數據，可繪製一個標準曲線圖，經由此標準曲線圖可以針對含有維生素 D3 的食品進行定量的檢測。具特異性的多株抗體是以維生素 D3 與 cBSA (是一個攜帶蛋白) 鍵結 (conjugated) 形成抗原後免疫至兔子體內。免疫後一週收集其抗血清 (antiserum) 並利用親合性層析方法純化出抗維生素 D3 之多株抗體。本實驗是利用經維生素 D 強化的奶粉進行萃取，利用 SPR 分析後所得之 response unit (RU) 和標準值作比對，得到一個比值約為 6.4。因此日後含有維生素 D3 之食品利用 BIACoreX 儀器進行檢測後，將 RU 值代入標準曲線之方程式中再除以 6.4 後，即可以初步定量出維生素 D3 的含量。利用 SPR 技術可提供一個定量強化牛奶中或其他乳製品中維生素 D 的一個具潛力性的方法。

Abstract

Vitamin D is one of the essential vitamins in the human diet and is important for normal growth and function. The recommended nutrition intake of vitamin D for an adult is 200 to 400 I.U. per day. Additional amounts of vitamin D do not confer benefits and may be toxic. However, a deficiency of this vitamin leads to inadequate absorption of calcium and phosphorus and faulty mineralization of bones and teeth. Fortified milk and milk products are major source of vitamin D₃. Actual methods for determining vitamin D in milk are limited in term of sensitivity, rapidity and simplicity. The objective of this study was to develop a new strategy for detecting interaction between vitamin D and its polyclonal antibodies. Specific antibodies were raised in rabbits against vitamin D using the cationized bovine serum albumin (cBSA) that was reported to be a suitable carrier protein for vitamin D. Anti-vitamin D polyclonal antibodies were recovered from rabbits sera by sequential affinity chromatographies. Surface plasmon resonance (SPR) technology has been applied for analyzing of biomolecular interaction between antigen and antibody. In this study, we immobilized the anti-vitamin D polyclonal antibodies on the surface of CM5 chip and detected their interactions with vitamin D. Interaction between antigen and antibody was detected, and data collected were used to establish which were be used to vitamin D₃ in food. SPR technology-based were developed to quantify vitamin D extracted from milk. This method offers a great potential for further quantification of vitamin D in fortified milk or other dairy products.

第一章 前言

骨質疏鬆症 (Osteoporosis) 是一種普遍存在年老女性或男性的臨床問題，可能會引起各種部位的骨折，因此會增加社會成本及降低個人生活品質[1]。骨質疏鬆症是一種低骨量及骨組織之顯微構造惡化的疾病。正常狀況下，由於不斷的骨骼重建活動破骨細胞 (osteoclast) 和成骨細胞 (osteoblast) 進行骨的再吸收 (bone resorption) 及骨的合成 (bone formation) 作用。然而停經後的婦女因為雌性素的缺乏，導致骨合成及再吸收作用失衡，使得骨質快速流失。為了降低骨質疏鬆症之發生，許多研究學者提出在生長發育期間需要建立個人的一個顛峰骨質量 (peak bone mass) 以有效預防骨質疏鬆症，以及治療老年晚期所發生的骨質疏鬆症。另外降低骨再吸收也是重要的，其預防的方法包括：飲食中補充維生素 D3 和鈣，藥物方面給予雌激素、雙磷酸鹽類和抑鈣激素 (calcitonin)。

維生素 D 在預防骨質流失和骨折方面是很重要的。維生素 D 慢性缺乏的狀況下，會導致不適當的骨礦化情形：在小孩子較常出現的是佝僂症 (rickets)，在成人則是骨軟化症 (osteomalacia) 及骨質疏鬆症 (osteoporosis)。嚴重的維生素 D3 缺乏會增加骨折的危險性[2]。

為了提供必須營養素以預防骨質的流失及維持身體之正常機能，在食品的強化上，以鈣的添加最為普遍，另外維生素D3、鎂和維生素 K也常被添加於食品中。食品中牛奶和強化牛奶都是維生素D3的主要來源。一般來說，成人的每日維生素D3建議攝取量在200-400IU，維生素D3的過多或缺乏都會造成不同的問題。

加拿大及美國約有 85%新鮮牛奶及乾燥後的奶粉都經過強化作用[3]。牛奶特別適合強化是因為維生素D會促進其中鈣和磷的吸收。添加量方面，不當或不正確的標示可能會造成攝食過量或不足的危險性，因此，強化牛奶及乳製品中維生素 D3 的正確定量應受到重視。近幾年來，有許多研究者致力於建立食物中脂溶性維生素的定量方法。檢測牛奶中維生素 D3 的含量技術是有些困難的因為牛奶中含有許多脂質、蛋白質和一些固醇類的物質，而這些化合物與維生素 D 之類似結構，可能會干擾分析的結果[4]。另外，維生素D對光、熱及氧化作用很敏感，因此，在樣品萃取或其他處理都可能會流失而影響分析、定量的準確性[5]。

定量食品或乳製品中維生素 D 的含量是重要且必要的。目前國內定

量維生素 D 的方法中，以參考國外之分析方法為主 [6]。因此，本實驗擬製備出抗維生素 D3 之多株抗體以開發更靈敏並具有專一性的方法，應用於檢測食品中維生素 D3 之含量。

本實驗的設計乃使用免疫學的方法，製備出抗維生素 D3 之多株抗體，以 ELISA 技術來建立一標準曲線，以供日後評估食品中維生素 D3 之含量。並應用表面膜漿共振技術(Surface Plasmon Resonance, SPR)來檢測抗原和抗體之間之交互作用，研發出定量維生素 D3 的檢測方法。一般來說，應用於實驗及臨床上之抗體，經常使用多株抗體當作工具，主要的原因是因為多株抗體的製作較容易、快速、便宜，且不需要經過細胞培養之步驟，而且其靈敏度亦相當高。其缺點為每次免疫後取得之抗體會有其個體上的差異，故無法保證每一批血清所含之多株抗體皆有相同效價。

BiacoreX 儀器所發展的 SPR 技術，其光源是以兩極真空管發射波長接近紅外線光的光線引發 SPR，此一光線會以一定的入射角之契形(wedge-shaped)光束落於感應晶片上。當 BiacoreX 儀器測量到入射光角的變化時，其電腦的程式軟體會自動計算角度的變化，並轉換以 RU(response unit)值為單位表示交互作用的情形。樣品經注射口被注射入到傳送液體之微射流系統，當待分析物(analyte)流過生物感應晶片的通路(channel)時會造成晶片表面上質量濃度的變化，而即時偵測樣品中待分析物與晶片上鍵合物(ligand)結合和解離的情形。因此本實驗設計即以此原理為基礎，利用製備之多株抗體和維生素 D3 之間的相互作用，研發出定量維生素 D3 之的檢測方法。

第二章 文獻探討

第一節 維生素D

雖然佝僂症 (rickets) 和骨軟化症 (osteomalacia) 在 17 世紀中期已經被發現，但在 20 世紀時，維生素 D2 和 D3 才被 Mellanby 和 McCollum 在以 rickets 為研究主題之實驗中發現[7]，在實驗中也發現魚肝油可能有抗佝僂症的活性。雖然這種疾病可能和遺傳有關，不過，在南美洲進行的實驗中指出，食品中添加維生素 D2 和 D3 均有大幅降低佝僂症的發生[8]。

維生素 D 是人體所需要的必須維生素，它具有維持身體正常機能，vitamin D₃ 的活化形式是 1,25-(OH)₂ D₃，其化合物有 9,10 secosteroids，有 5 個形式，包括：vitamin D₂，ergocalciferol；D₃，cholecalciferol；D₄，22,23-dihydroergocalciferol；D₅，sitosterol (24-ethylcholecalciferol) 以及 D₆，stigmasterol [9] (圖 2.1)。

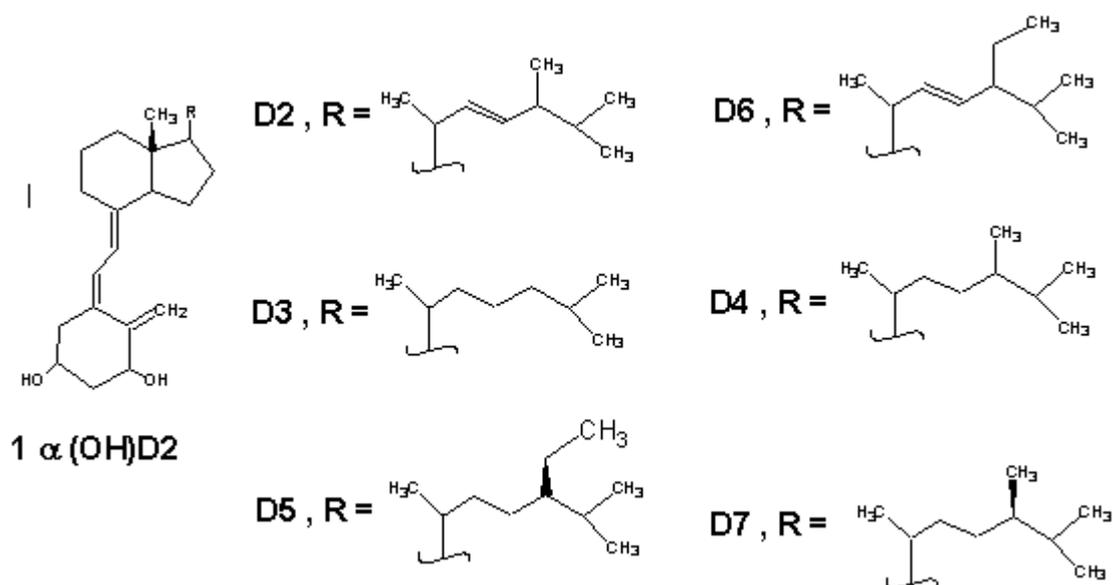


圖 2.1 各種維生素 D 的不同化學結構。維生素 D 的種類有 D₂ 到 D₇，ergocalciferol 是維生素 D₂，而維生素 D₆ 與 D₂ 只有在第 24 位置上具有不同的官能基。其他之化合物和維生素 D₃ 結構之相異處為在第 24 位置上不同的甲基或乙基。

維生素D3是體內鈣和磷的關鍵性調節者。在食品中含較少量的脂溶性維生素D(例如魚肝油和蛋黃),大多數的維生素D3是由皮膚表皮的馬氏層(Malpighian layer)製造的[10]。維生素D具有許多的形式,其中膽固醇會先形成7-dehydrocholesterol,是唯一無酵素參與的光分解反應的受質,反應過程中皮膚由於受到紫外線光線照射下會促使7-dehydrocholesterol B環的裂解而形成pre vitamin D3,接著在肝臟中的羥化(25-hydroxylase)將第25號的碳羥化後轉變成25(OH)-D3,是維生素D在體內的主要儲存形式。第二次羥化作用是在腎臟中,其羥化位於1 α 位置的碳,形成活性荷爾蒙1,25-(OH)₂D3,它是一種具高效力的激素,也稱為calcitriol(圖2.2)[11]。文獻報告中指出1,25-(OH)₂D3在血漿中的濃度為 20 – 60 pg/ml[12, 13]。

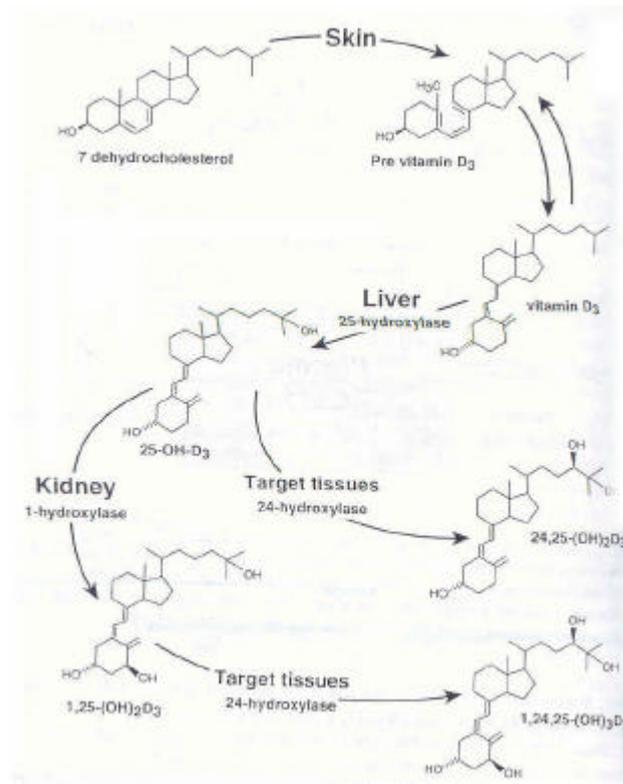


圖 2.2 維生素 D3 之合成圖[14]。

維生素D₃和副甲狀腺素 (Parathyroid hormone, PTH) 及抑鈣激素 (calcitonin) 共同調節體內血鈣及血磷的濃度。當低血鈣時副甲狀腺上的鈣的接受器 (calcium receptor) 會活化分泌PTH[15]，而增加腎臟中25(OH)₂D₃-1-hydroxylase酵素的活性[16-18]，相對地也會增加1,25(OH)₂D₃在循環中的濃度。1,25(OH)₂D₃促進小腸內的鈣和磷轉運到血漿中，以維持鈣磷的平衡。PTH和1,25(OH)₂D₃在骨頭中會活化骨鈣及磷的代謝[19,20]，在腎臟中會刺激尿鈣的再吸收並釋放至血液中[21]。因此PTH和1,25(OH)₂D₃會增加血鈣濃度，避免低血鈣引起的抽筋。

維生素D可促使飲食中鈣的吸收。患有佝僂症的雞隻給予維生素D或是1,25(OH)₂D₃後，可以增加其十二指腸中鈣的吸收及運送。在腸道腎臟及其他組織中唯一可以識別1,25(OH)₂D₃的特異性的接受器，稱為鈣攜帶蛋白calcium-binding protein(CaBP)，維生素D的狀態會影響到此蛋白質的生化活性[22]。文獻報告中指出，動物實驗中維生素D對骨骼生長具有影響，維生素D或是1,25(OH)₂D₃在高濃度下可能會刺激骨的成長。給予年幼的大鼠1,25(OH)₂D₃後2-3天會促使造骨細胞中膠原質的形成[23]。有許多研究報告中也指出維生素D的不足和血鈣血磷的濃度有關，並且會使得骨礦化的不足[24]。

食物中只有魚類、肝臟、乳品、蛋黃等少數食物中含有少量的維生素D，含量也不高，有些國家在乳品中額外添加維生素D。由於台灣緯度低，日照強，RDNA對維生素D建議攝取量不高，成年人僅一日5微克(200IU)，比英美等國家低。若較少接受日曬者，維生素D₃攝取增加至一日10微克(400IU)。在維生素D₃攝取過量會產生毒性，它會造成鈣質沉積在心臟、腎臟及動脈等軟組織上，造成心腎等器官的受損。造成中毒的劑量僅約50微克(2000IU)左右，約是建議攝取量的5~10倍而已，因此攝取魚肝油或維生素D的營養補充劑都注意劑量，避免危險。

近來有許多研究致力於研究維生素D的一些類似物，利用改變維生素D的結構來開發許多藥物，其中包括在過敏方面的藥物，維生素D的類似物在動物實驗中，具有降低淋巴球之分化及分泌腫瘤壞死因子 α 及interleukin-12之作用，且此化合物可有效治療因T-細胞所以起的免疫紊亂疾病[25]。其他研究報告指出將維生素D第10個碳上的甲基轉至第2個碳上而形成之另一維生素D類似物，可促使人類造骨細胞的礦化，建議此類似物可以作為在因雌激素缺乏老化或是接受類固醇治療患者，而導致的骨頭流失的治療性藥劑[26]。

第二節 抗原和抗體的製備

抗原上可誘生抗體之部位稱為抗原決定基 (epitope)，一個抗原通常具有多處決定基。傳統抗血清中含有多株抗體，分別對此抗原不同之決定基，因此稱為多株抗體。而體內抗體的產生須有抗原的誘發才會生成，通常要形成一個抗原需要有以下條件，才能形成一個好的免疫抗原，包括：1.此物質對於實驗動物必須是外來的，也就是實驗動物認定此物質是非自體；2.分子量必須夠大，通常抗原的分子量小於 1000Da 無法產生免疫反應，介於 1000 – 6000 Da 或許可以產生免疫反應，大於 6000Da 才能成為一個良好的免疫原；3.分子組成必須具複雜性。據這些特性後才產生良好的免疫反應。但是半抗原 (hapten) 無法獨自引起免疫反應，必須藉由鍵結到其他大分子攜帶蛋白 (carrier protein) 才能形成一個完全抗原。攜帶蛋白是一種大分子量的蛋白質，自己可以誘導免疫反應；其中最常用的兩種攜帶蛋白，為 BSA (Bovine Serum Albumin) 和 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)。這種免疫反應主要是將特定抗原 (hapten-carrier) 注射入動物體內，使動物體內的B細胞，產生多種抗體。而B細胞要產生免疫反應，需要T輔助細胞及抗原呈現細胞的幫助，T輔助細胞只認得攜帶蛋白，但B細胞產生的抗體則對半抗原及攜帶蛋白具有較高專一性及親和性，這樣作用下，將產生對半抗原其專一性的抗體。

進行免疫動物之前，首先需先了解免疫系統的基本特性：當外來侵入物進入生物體內時會引起體內一連串的防禦機制，而免疫反應具有四種基本特性：專一性 (specificity)，多樣性 (diversity)，記憶性 (memory) 及自我及非自我的辨識力 (self/nonself recognition)。在專一性方面在免疫系統對每一個抗原均能使體內淋巴球活化，並產生特殊蛋白質，稱之為抗體。抗體本身構成一種蛋白質，稱免疫球蛋白 (immunoglobulins)。每個抗體分子至少有兩個與表頂結合的相同位置，其組成為 4 條多肽鏈 (polypeptide chains) 以化學鍵構成一 Y 型分子：兩條相同的 light chain 和兩條相同的 heavy chain，Y 分子的尖端區，功能上擔任抗原結合位置，是抗體和特定抗原辨識並作專一性結合的位置。

利用抗體(或抗原)對其互補之另一半進行特異性檢測的方法已應用多年。以免疫分析方法(immunoassay)進行定量的工作是一種有利之分析工具。多株抗體是利用免疫一些動物例如兔子或山羊後所產生的抗體。從其血清中純化出immunoglobulin(IgG)後可應用於生物性的測試[27]。多株抗體製程較簡單，將目標抗原與佐劑(adjuvant) 混合後打入動物體內，經數次免疫收集血清，此種方式產生的抗體即為多株抗體它們為許多不同種類的抗體製造細胞產物，因此他們對於抗原之專一性與親合力有些不同[28]。

當身體第一次接觸到某抗原時(ex:cBSA-vit D complex)，體內具專一性特定淋巴球會選擇性的被活化，增殖形成一效應的細胞株，所產生的反應稱之為初級免疫反應。由最初與抗原接觸到產生最大量效應細胞株，約有 5~10 天延遲期圖 2.3，在這段時間內被活化的特定淋巴球正大量增殖，並活化效應 T cell 及分泌抗體的漿細胞。之後，當個體再次接觸到相同的抗原時，圖 2.5 其會使具免疫力的淋巴球立即增殖(約 3~5 天)，能產生更快速的回應，稱為次級免疫反應，次級免疫反應維持的時間較初級免疫反應時間持久，產生之抗體也比初級反應產生的更有效的與抗原結合並清除之圖 2.4 [29]。

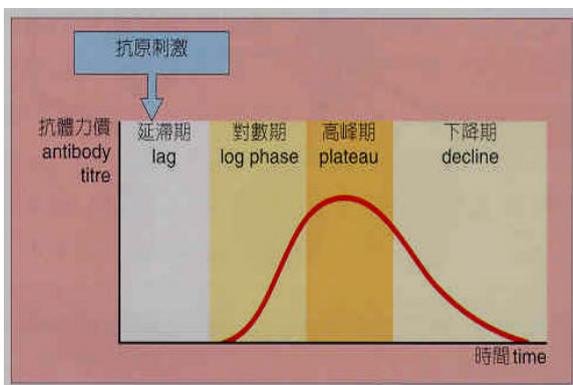


圖2.3 原發性抗體反應的4個時期。當體內受到抗原刺激後，抗體之反應有4個時期，分別為lag phase：此階段體無法測出。log phase：抗體效價對數上升。plateau：抗體效價穩定 decline：抗體被代謝或清除[29]。

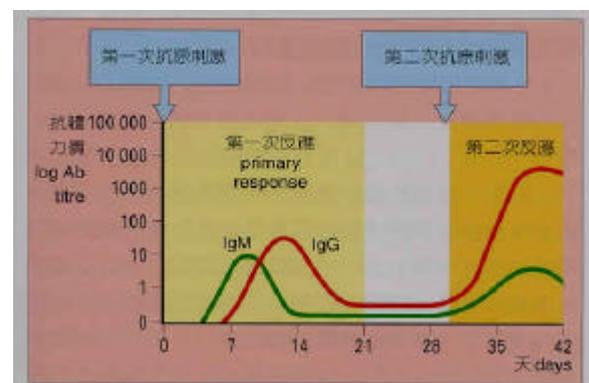


圖2.4 在典型的免疫反應中，第二次抗原刺激所產生之抗體產生反應比第一次抗原刺激為快 持續的時間較長，力價較高，而且IgG的含量較多（第一次反應中IgM會先出現接著IgG才出現）[29]。

第三節 多株抗體的純化

所收集之抗血清，包括許多不同之抗體，因此會干擾標的抗原(維生素 D3)與其抗體之反應，因此，需要利用親合性管柱純化出抗維生素 D3 之多株抗體，移除對維生素 D3 不具特異性的抗體。

在文獻中抗體的純化方法大都是利用親合性管柱層析法[30-33]。其原理如(圖2.4)，固定相為一個具有專一性親和基團(A)之固相擔體，流動相為溶離緩衝液。當樣本通過管柱時，與親和基團間有專一性作用的分子(B)會結合到固定相上，而非專一性分子(X)則隨著流動相流出管柱。滯留在固定相上的分子(B)，可用酸、鹼、或具專一性之游離分子溶離之。實驗中所得之抗維生素D3之多株抗體的抗血清利用親合性管柱層析之方法進行抗體之純化，分別經過3個管柱分析：protein A/G column、cBSA-sepharose column 和cOVA vitamin D3 sepharose column 後所得的溶液，其已去除了IgG、IgA和 anti-cBSA antibody後進行冷凍乾燥濃縮成粉末及濃縮液，進一步進行點墨免疫分析法的確認。

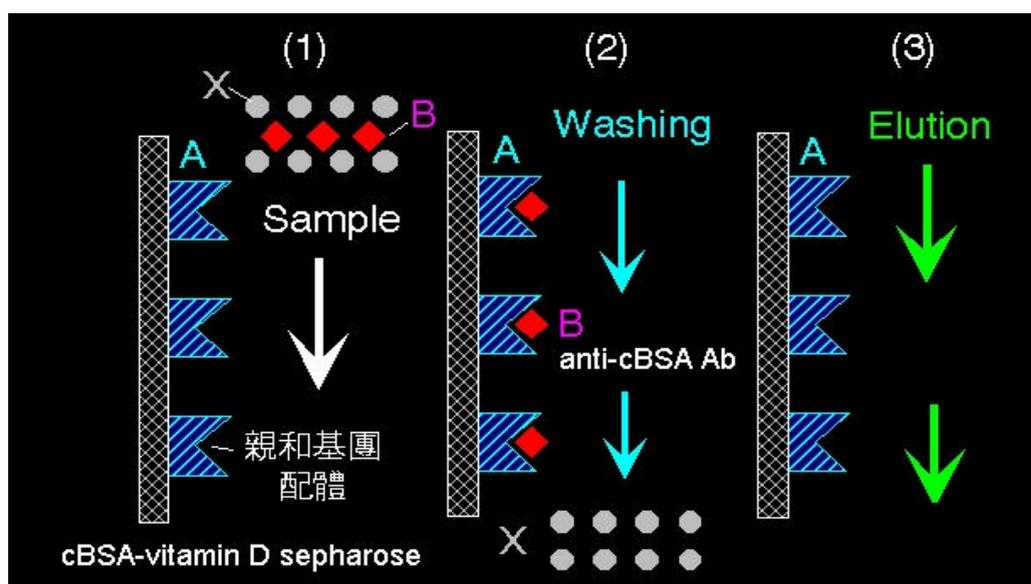


圖 2.5 親合性管柱層析原理。(1)利用 cBSA sepharose 當成是親合性的配體，當樣品通過時 anti-cBSA antibody 會與 cBSA sepharose 形成專一性的結合。(2)以緩衝液清洗後所收集的為非專一性分子(X)，會隨著流動相流出管柱，將 X 收集後可進行另一種管柱之純化步驟。(3)與親和基團間有專一性作用的分子(B)會結合且滯留在固定相上，可用酸、鹼、或具專一性之游離分子溶離之。(參考莊榮輝老師 <http://www.brc.ntu.edu.tw/~juang/>)

第四節 酵素連結免疫吸附分析法

(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)

原理

酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)是將抗體或抗原結合於固相上，加入抗原或抗體進行專一性的結合後，利用具有酵素標示的二級抗體或抗原進行結合反應，其二級抗體上所結合的過氧化酶(peroxidase)會和受質(substrate)之間產生專一性的酵素反應進而呈色。此一呈色反應在特定之波長下偵測其吸收值後，若吸光值越高，則表示此一具有酵素連結的抗體與其抗原之間的結合濃度越高。

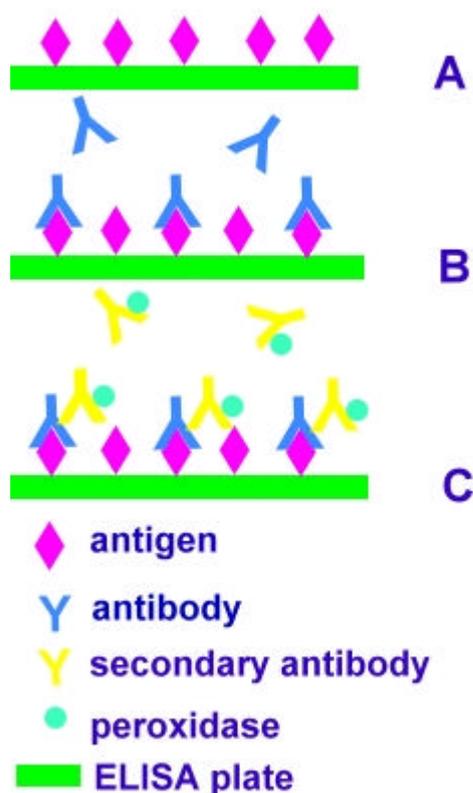


圖 2.6 ELISA 之原理。A 圖為將抗原固定於 ELISA 平盤上。B 圖為加入會和抗原專一性結合之抗體。C 圖待抗體抗原結合為一複合物時，再加入具有酵素標示之二級抗體，均勻混合反應，在加入會和酵素進行呈色之受質進行呈色反應。

第五節 表面膜漿共振技術 (Surface Plasmon Resonance, SPR technology)

5-1 SPR原理

BIACORE X儀器為Biacore AB公司所研發之儀器，應用表面漿體共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR)技術即時地偵測生物分子與分子之間的相互作用情形。表面漿體共振技術 (SPR technology)使用單一波長之雷射引發表面漿體之共振現象後，造成反射光角度的變化 (圖2.7)。

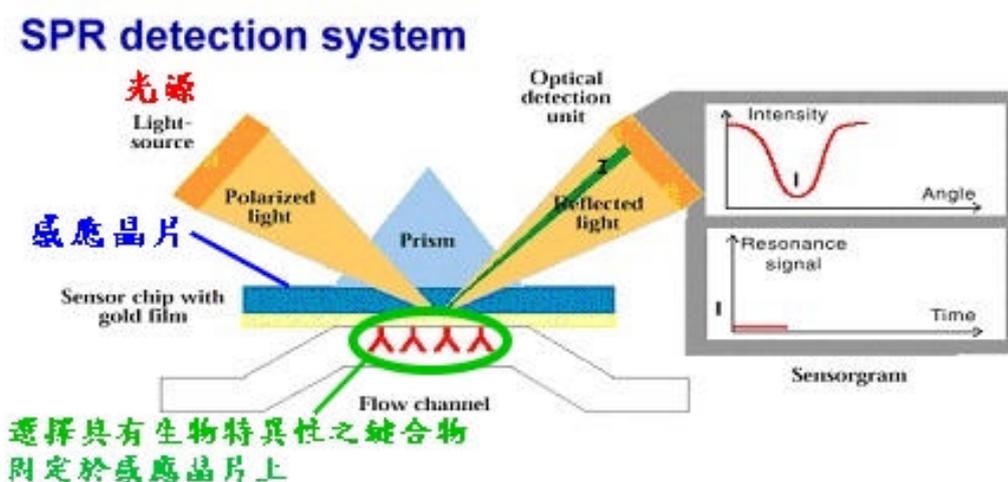


圖 2.7 SPR 的偵測系統。SPR 光束由光源發射後，經由玻璃稜鏡進行傳導，當整個光束被傳導到達感應晶片之金屬箔層界面時，會由於光束的電子震盪與金屬箔層內的金屬原子產生共振作用 (resonance reaction)，並且在特定的反射角範圍內會引起反射強度的急遽變化，SPR 一詞因此而得。而此因共振作用所產生之反射角又稱為共振角 (resonance angle)。當光線到達金屬箔層時會發生全反射的狀況，並且有部分能量會被傳遞進入非照射端的介質中，造成反射光角度的變化。SPR 共振角度所對應的訊息連續對時間做圖，可得到一感應圖 (sensorgram)，其縱軸為共振單位，橫軸為時間，以秒為單位 (圖摘錄自 BIA technology Handbook)。

BIACoreX是一種以親和性(affinity)為主體的生物感測器，以固定化的方式，選擇具有生物特異性的鍵合物(ligand)以共價結合的方式結合在感應晶片聚葡萄糖間質(dextran)的表面上，靠著流體系統的循環下，以控制流速將待測物注射到感應晶片表面。當分析物與鍵合物有相互作用的發生，表面質量濃度的改變，進而影響折射率的變化，而SPR的光學反應也即時感應並且表現於感應圖(sensorgram)上。即時反應出樣品與晶片上固定之物質結合及解離情形(圖2.8)。

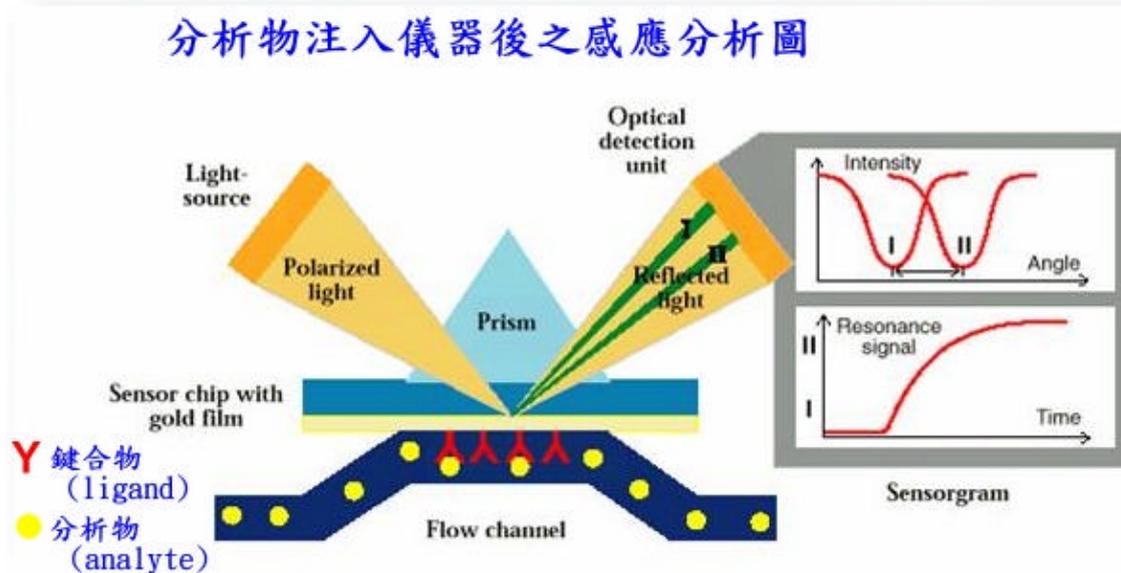


圖 2.8 樣品造成感應晶片表面質量濃度的變化。當分析物(analyte)被注入，經由微射流系統將樣品送至感應晶片表面時，樣品中的分析物會和感應晶片上固定的物質(ligand)相互作用的發生，表面質量濃度的改變，進而影響折射率的變化，而SPR的光學反應也即時感應並且表現於感應圖(sensorgram)上(圖摘錄自BIATECHNOLOGY Handbook)。

當BIACORE 在進行即時性的分子間交互作用分析時，當受測物與感應晶片表面之鍵合物正在進行結合（association）作用時，會出現一段上升的曲線。當結合的情形時間發生的越快時，且RU值變化越高時，則表示受測物和晶片表面之鍵合物有較好的親合力（higher affinity），反之，若結合情形發生的時間慢，且RU值變化較不明顯時，表示受測物和感應晶片上表面之鍵合物間親合力不佳。當受測物和感應晶片上的鍵結物正進行解離（dissociation）作用時，會出現一段下降曲線。當解離的時間越長，表示受測物和感應晶片上的鍵結物有較好的特異性（specific），因此不容易發生解離。反之若解離情形的時間越快，表示受測物和感應晶片上的鍵結物特異性不佳（圖2.9）。

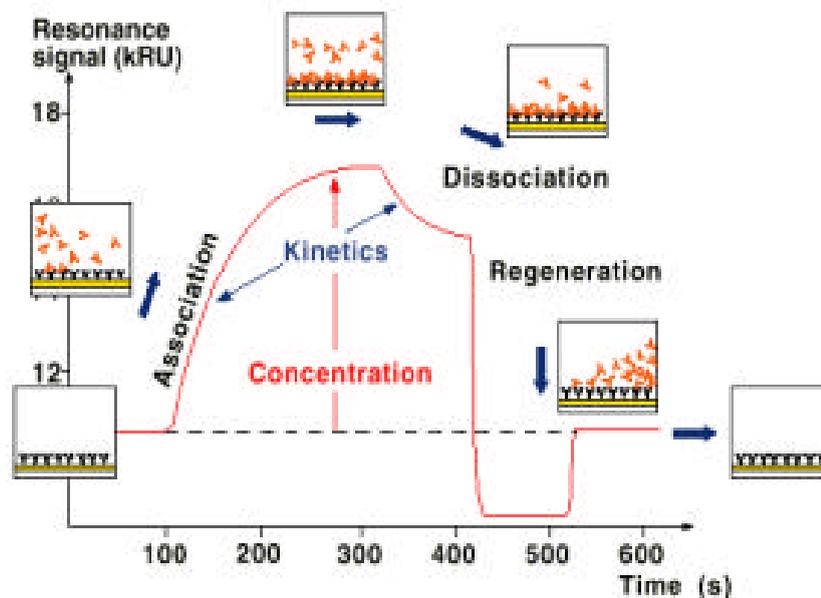


圖 2.9 BIAcore X 進行即時性的分子間交互作用分析。受測物與感應晶片表面之鍵合物正在進行結合（association）作用時，會出現一段上升的曲線。當結合的情形時間發生的越快時，且RU值變化越高時，則表示受測物和晶片表面之鍵合物有較好的親合力（higher affinity），當受測物和感應晶片上的鍵結物正進行解離（dissociation）作用時，會出現一段下降曲線。當解離的時間越長，表示受測物和感應晶片上的鍵結物有較好的特異性（specific），因此不容易發生解離。

5-2 生物感應器 BIAcore X biosensor

生物感應器為分析分子與分子間之交互作用有利的技術，在一些臨床的分析或是生化方面的研究特別重要[34]。生物感測器 BIAcore X 利用表面膜漿共振技術的原理進行檢測。當光束由光源發射後，經由玻璃稜鏡進行傳導，當整個光束被傳導到達感應晶片之金屬表面時，會由於光束與的電子震盪和晶片表面的金屬薄層內的金屬原子產生共振作用 (resonance reaction)，並且在特定的反射角範圍內會引起反射程度的急劇變化。當光線到達金屬薄層時會發生全反射的狀況，並且有部分能量會被傳遞進入非照射端的介質中。當非照射面因介質組成濃度或成分發生改變時，會是光的折射係數發生變化，並會將此變化反應到共振角度上。由於光線穿透的強度只會達感應晶片表面附近，因此產生的訊號並不會穿過檢體的溶液。且由於檢體的溶液或其反應試劑在遠離光線的區域並不會發生反應，因此可避免因溶液本身所產生的突然上升的訊號，此一效應稱為 bulk effect。

金屬面鄰接的介質部分之有效回應距離約距金屬表面 300 nm 左右，又由於折射係數值隨該有效距離內之溶液的濃度而改變，因此 SPR 技術可以用來定量靠近感測面表面之待測物濃度，而不需預先做任何的標示 (labelling)。

影響 SPR 的共振角度變化的原因最主要是由於非照射面，即反應層介質的折射係數的不同，在即時性偵測系統的 BIA 中，介質的反射係數會隨著其溶液的濃度而發生變化。反應作用發生時電子吸收能量，導致在特定的反射角範圍內，反射強度急劇驟減，達到最小。這種最小化發生時的角度稱為共振角(圖 2.10 : a)，共振角度隨著非照射面金屬箔層鄰近介質的折射係數(refractive index)之不同而有所變化(圖 2.10 : b)，因此，當環境介質因組成、濃度或組成改變時，例如，待測物結合到感應晶片表面之鍵合物時，所導致的折射係數變化則可以藉由共振角度位移變化偵測出。所得的曲線為感應曲線圖(圖 2.10 : c)

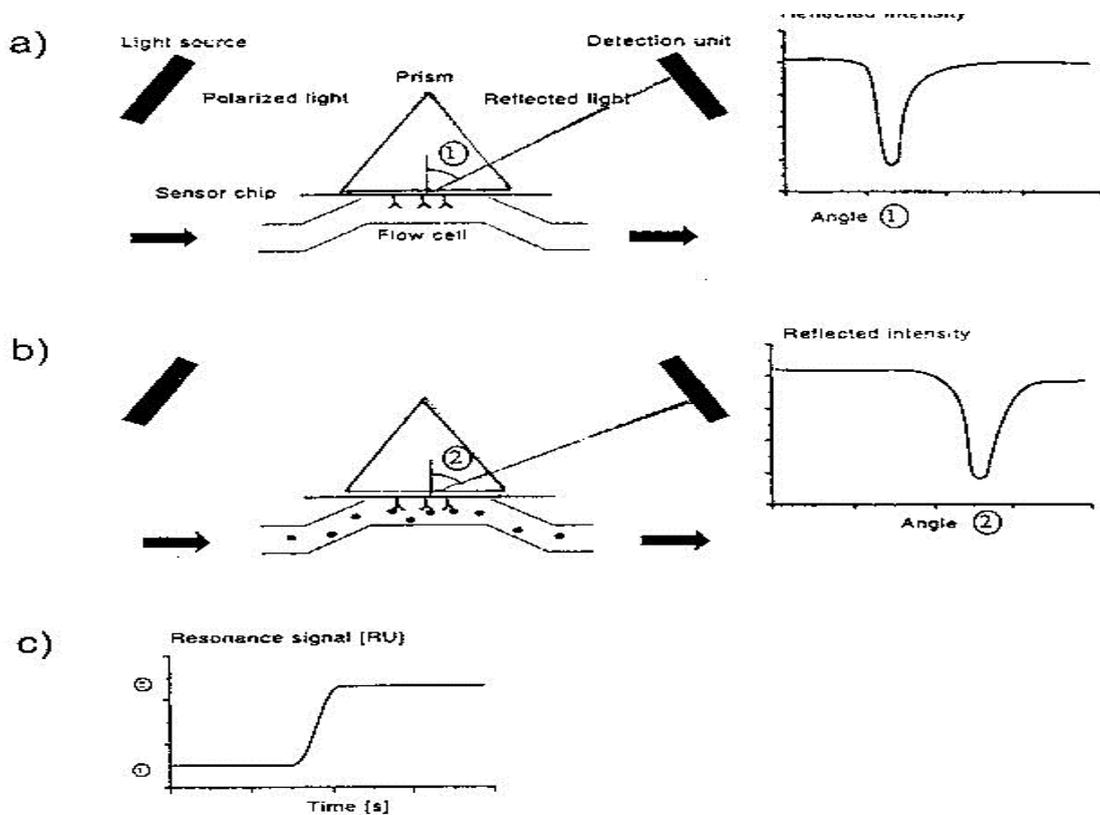


圖 2.10 SPR 共振角度變化隨著溶液中待測物濃度改變而發生變化。(a) 表示反應作用發生時電子吸收能量，導致在特定的反射角範圍內，反射強度急劇驟減，達到最小。這種最小化發生時的角度稱為共振角。(b) 共振角度隨著非照射面金屬箔層鄰近介質的折射係數 (refractive index) 之不同而有所變化。(c) 當環境介質因組成、濃度或組成改變時，例如，待測物結合到感應晶片表面之鍵合物時，所導致的折射係數變化則可以藉由共振角度位移變化偵測出。所得的曲線為感應曲線圖 (圖摘錄自 BIA technology Handbook)。

5-3 BIAcore X 儀器之組成

BIAcore 生物分子相互作用分析系統是用在探測分子間相互作用的生物感測器。其也是一種以親合性 (affinity) 為主體的生物感應器 [35]，利用具有生物特異性的鍵合物 (ligand) 以共價結合的方式固定至感應晶片的聚葡萄糖 (dextran) 表面。在以電腦控制微射流系統 (IFC) 的流速，將樣品送達感應晶片的表面。當樣品中特定的分析物和感應晶片表面的鍵合物發生專一性作用後，會造成感應晶片上質量濃度的改變，進一步影響到折射率的變化，並即時反應在感應分析圖上 (sensorgram)。分析物的選擇性和鍵合物 (ligand) 的結合具有專一性，並且可分析複合物之交互作用。而這些反應必須依賴著 BIAcoreX 三大主要的基本系統[36]：1.感應晶片表面系統 2. SPR 之光學系統 3. 液體傳送之微射流系統(圖 2.11)

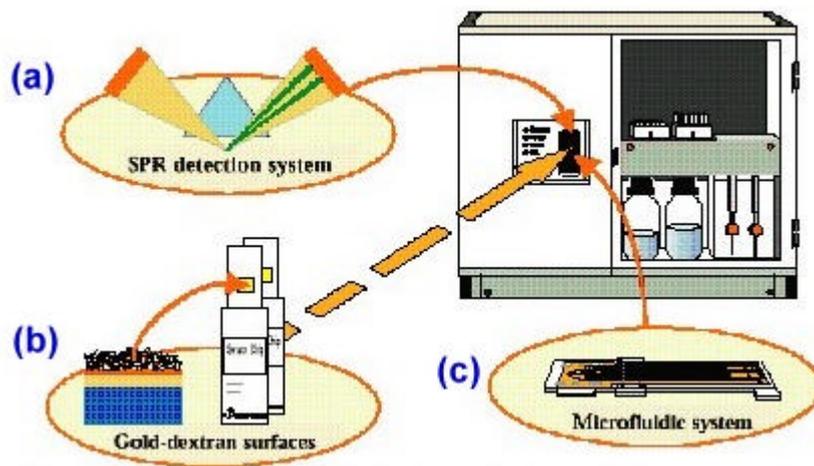


圖 2.11 BIAcore X 儀器中三大主要基本系統。(a) SPR 光學系統 (b) 感應晶片表面系統以及 (c) 液體傳送之微射流系統 (Microfluidic system ; Integrated Fluidic Cartridge, IFC) (圖摘錄自 BIA technology Handbook)

5-3-1 感應晶片表面系統

感應晶片是 BIA 即時訊號的傳遞者，其主要構造構造可以分為四個主要部分 [37]，包括玻璃稜鏡層 (glass prism layer)、金箔層 (golden film)、連接層 (linker layer) 和專一反應層 (specific layer)，專一反應層是由 carboxymethyl group 所構成，其晶片結構如 (圖 2.12)。

金箔層具有化學不活潑的性質且和 SPR 有很好的反應，其表面有專一反應層其和金箔表面以共價鍵結，其是提供生物分子固定用。其具有 4 種功能：(1) 利用已知的化學特性將生物分子固定 (2) 增加表面的結合能力，以增加靈敏性。(3) 提供親水性環境，可適合大多數生物反應時交互作用。(4) 提供表面較低的非特異性鍵結，因此具有非常高的專一性結合。在感應晶片的非照射面與溶液接觸後開始相互作用，透過 SPR 的產生來偵測生物分子在晶片表面的濃度變化。因此實驗的成功與否和選擇適合的鍵合物 (ligand)、感應晶片與固定方法都有很大的相關性。

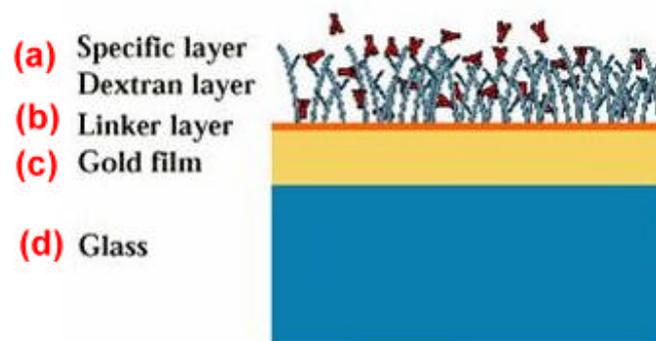


圖 2.12 BIAcore 之感應晶片主要構造可分為四部份。(a) 部分為專一反應層 (specific layer)，其專一性反應層是由 carboxymethyl dextran 所組成。(b) 部分為連接層 (linker layer)。(c) 部分為金箔層 (gold film)。(d) 部分為玻璃稜鏡層

(一) 鍵合物 (ligand) 的選擇

鍵合物的選擇必須注意的首先是專一性 (specificity) 要高，因為專一性高的鍵合物對於溶液中眾多的分子才具有篩選的功能；此外是再生的穩定性 (regeneration stability) 要好 [38]，當反應作用完成後，感應晶片表面必須經過再生作用，也就是要將受測物去除，才能針對另一樣品作分析，在這樣的過程中，鍵合物仍然要繼續保持本身原來的活性；另外，固定於晶片上之鍵合物的純度應該愈純愈好，需要有 90% pure 及均質性以避免有非專一性的結合 (non-specificity binding)，其濃度在於 0.5 and 5 mg/ml。另外其鹽類濃度要低於 200 mM，且不含有可能會反應的化合物例如 Tris, glycine 或再進行胺基共價結合反應時 BSA。最後鍵合物的大小 (size) 要能愈小愈好，因為鍵合物的感應圖反應會與本身的質量成正比的關係，所以如果鍵合物較大則會降低待測物與它產生反應的 RU 值。

(二) 感應晶片 (sensor chip)

除了鍵合物之選擇外，選擇適當的感應晶片也是相當重要的，不同的感應晶片適合不同的目的，然而所有都是運用相同的光學原理，但最重要的是選擇適合的固定化模式。本篇實驗中所使用的是 CM5 之感應晶片。

CM5 感應晶片是一般實驗上較常被使用的晶片，其應用範圍如表 2.1，其專一性反應層是由 carboxymethyl dextran 所組成，其提供了相當好的親水性環境，再根據鍵合物的性質和研究上的需要可以選擇不同的化學方法進行耦合 (coupling)。在 BIAcore 系統中其固定的方式，以利用胺類偶合法 (amine coupling) 最常使用 [3940]，尤其在蛋白質與蛋白質之交互作用中。主要原因是因為大部分的蛋白質具有胺類的官能基，因此可以和 CM5 sensor chip 中的 carboxymethyl dextran 經活化後的 COO⁻ 形成醯胺鍵。

表 2.1 不同之耦合 (coupling) 方法其適用範圍。Amine coupling 的方法最常使用於蛋白質與蛋白質之間之交互作用

Biomolecules	Amine	Thiol	Aldehyde	Streptavidin-biotin
acidic peptides/proteins	-	+	-	(#)
neutral peptides/proteins	+	(+)	(#)	(#)
basic peptides/proteins	+	(+)	(#)	(#)
nucleic acids	-	-	-	#
polysaccharides	-	-	-	#

+ recommended, (+) acceptable, - unsuitable, # requires ligand modification

(三) 生物分子的固定

將生物分子固定於感應晶片表面時，首先必須活化晶片之表面，CM5 感應晶片表面之 carboxymethyl dextran 活化，是利用 0.05M NHS (N-hydroxysuccinimide)/0.2M EDQ (N-ethyl-N-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride) 活化，接著利用胺類偶合的方式，將生物分子固定於感應晶片表面。胺類偶合法 (amine coupling) 是利用胺基的氮原子未配位電子去進行所謂的親合性取代的反應。使用胺類偶合法有幾個變數要注意的，分別是：PH 值、鍵合物的濃度和反應時間，若鍵合物是酸性蛋白質，則氮原子質子化的結果會降低固定時的效率；如果被固定的胺基剛好是鍵合物的活性區 (active site)，則會導致整個反應活性的降低，因此若能將這些變數加以控制，則在設計相互作用的研究上是相當有力且簡便的工具。本篇研究中是以此種感應晶片來偵測抗體和抗原之間的相互作用。

5-3-2 SPR 光學系統

BIAcore X 儀器其光線來源是一個高效能接近紅外線光的兩極真空管發射出來，光源是以一定入射角的楔形(wedge-shaped) 照射，光將注射焦點落於感應晶片上。當 SPR 的反應被監測到時，電腦內附的程式軟體會自動的計算因為待測物濃度不同而改變的角度，也就是共振角度，其原理已在 4-1 中做了詳細的描述。

5-3-3 液體傳送系統

液體傳送系統是一個具有精確的幫浦與微射流卡夾 (integrated fluidic cartridge) 簡稱 IFC。BIAcore X 是一種半自動的生物感應器。當欲分析的樣品是以人工的方式注射進入後，會被保留在具有溫度控制 (一般控制於 25) 的標準的微射流盤的樣品通路 (sample loop) 內，並藉由全自動的微射流系統使分析物達到感應晶片表面。IFC 的表面有精密正確的凹槽，藉由機器的幫助使它與感應晶片的流路 (Flow cell, Fc) 接觸，Fc 只需少量的樣品傳送於感應晶片的表面即可進行分析，IFC 和瓣膜的操作可以很快的改變樣品與緩衝液於感應晶片表面和有能力去控制樣品接觸於表面時間的正確性與再生性。

5-4 BIAcore X 儀器即時偵測之優點

BIAcore X 是利用表面膜漿共振技術(SPR)的技術，來偵測分子與分子之間相互作用的儀器[40,41]，這是一個非侵入性的光學測量技術，能夠測量生物在感應晶片表面上質量濃度的變化。BIAcoreX 主要的特色就是運用表面薄膜共振技術(Surface Plasmon Resonance, SPR)在不需要任何標定物[42]的狀態下，可以在低濃度 (10^{-6} g/ml 到 10^{-11} g/ml) 下分析任何兩種生物分子之間相互結合或解離的情形，並可進行即時性的偵測 [43]。此技術之應用範圍很廣其中包括：生化上的基本研究、生物分子應用於藥物的設計研發[44]、蛋白質之間的相互作用[45,46]、親合力[47]以及濃度的測量[48]，以及篩選欲探討的分子及分子間之交互作用。

BIAcoreX 為一半自動的生物感測系統，符合樣品數量多、分析快速、精準的研究需求。它有著以下幾個優點：(1) 即時監測[43]；也就是立即顯示反應分子結合和解離的情形，另外追尋它們之間發生的相互作用，對於引導實驗條件的建立是很有用(2) 不需任何標定物的分析方法[42]；BIAcoreX 利用 SPR 的光學原理，直接偵測反應表面上生物分子因相互作用而結合、解離所導致的質量改變，不需先做分子純化及標定的繁雜過程。(3) 自訂的生物特異性反應表面[49]；因為具備多種的反應晶片，可以針對反應分子的種類選擇適當的感應片，在利用系統內建立的表面固定程序，制定出具有生物特異性的結合表面。(4) 欲分析之樣品僅須微量即可檢測[50]；BIAcoreX 利用獨特設計的超微量液體匯流卡(Integrated Fluidic Cartridge, IFC；微射流系統)，所需的樣品體積極少，同時由電腦精確的控制分子與分子之反應時間及流速(5) 快速分析[51]；即時的分析相互作用，一般分析的時間為 2~10 分鐘即可，晶片表面的再生也是同樣的快速。(6) 高靈敏度且同步之偵測；靈敏度依待測物的分子量而異，待測物分子量大於 2000 Dalton，靈敏度高達 10^{-9} ~ 10^{-12} M。

第六節 食品中維生素 D3 之檢測方法

6-1 高效能液相層析法 (HPLC)

在國內偵測食品中維生素 D 的方法，目前藥物食品檢驗局是參考 2000 年美國藥典中，營養補充品篇中所提出之方法進行測試，首先將含有維生素 D 之藥錠磨碎，加入 hexane 進行重複萃取的步驟後，利用室溫下真空乾燥將萃取後產物進行濃縮，再利用層析法分析標準品及萃取後的產物，記錄層析圖譜及吸收峰的高度後，帶入所制定的公式： $1.09C(L/D)(r_u/r_s)$ 中可計算出維生素 D 的含量，其中 1.09 是目前計算維生素 D 含量公式中的相關因子，C 是進行萃取前維生素 D 的濃度 ($\mu\text{g/ml}$)，L 是標示的維生素 D (μg)，D 是分析後維生素 D 的濃度 ($\mu\text{g/ml}$)， r_u 和 r_s 分別為分析後及標準品維生素 D 層析圖譜中吸收峰的高度[6]。

6-2 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)

ELISA 免疫分析方法一般常用在檢驗血清或血漿 25-hydroxyvitamin D3[52]，另外檢測 1,25-dihydroxy vitamin D 是利用放射線免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 進行測定[11]。本實驗設計是將維生素 D3 固定在 ELISA 的平盤上，利用直接型及競爭型 ELISA 免疫分析方法來檢測維生素 D3 與其多株抗體之專一性。

6-3 表面膜漿共振技術 (SPR technology)

利用 SPR 技術來偵測維生素 D 與其多株抗體之交互作用中，利用將抗維生素 D3 之多株抗體固定於感應晶片上，先進行標準品的分析，其偵測出之 RU 值繪製成標準曲線， R^2 值為 0.97，顯示抗體及抗原之親合性。將含有維生素 D3 之食品，實驗中選用市售之奶粉以緩衝液溶解後，進行真空過濾，利用 SPR 分析後所得之結果，推算出一方程式可進一步推算出維生素 D3 之含量。

第三章 材料與方法

第一節 實驗目的

活性維生素 D 代謝物在慢性缺乏的狀況下，會導致不適當的骨礦化情形：在小孩子較常出現的疾病為佝僂症（rickets），在成人的症狀則是骨軟化症（osteomalacia）及骨質疏鬆症（osteoporosis）。嚴重之維生素 D 缺乏會導致鈣的吸收不良和骨軟化症，以及增加骨折的危險性。過量的維生素 D 會產生毒性，它會造成鈣質沉積在心臟、腎臟及動脈等軟組織上，造成心腎等器官的受損。因此維生素 D 之過量與不足都會造成健康上之影響。有鑑於此，正確地定量食品或乳製品中維生素 D₃ 的含量是重要且必要的。目前國內所使用定量食品中維生素 D₃ 之方法，行政院衛生署藥物食品檢驗局正參考 2000 年美國藥典之檢測方法，其是使用 HPLC 進行定量，此方法在進行純化分析前需要經過萃取較繁雜的步驟。因此，本實驗之研究目的為建立一個簡便且具專一性之檢測方法來定量食品中之維生素 D₃ 含量，利用表面膜漿共振技術 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 及 ELISA 免疫分析方法來正確定量食品中維生素 D₃ 的含量。實驗之策略為製備抗維生素 D₃ 之多株抗體，並以 SPR 偵測多株抗體與維生素 D₃ 之間的分子間交互作用，利用繪製出之標準曲線圖，進一步定量食品中維生素 D₃ 的濃度。實驗之設計，首先利用有機化學合成方法將維生素 D₃ 與攜帶蛋白 (carrier protein) BSA 結合後形成一複合物，此複合物為免疫之抗原，將此抗原注射入兔子體內，以誘發免疫反應後，製備出具有專一性的多株抗體。所製備出的多株抗體可利用不同的親和性管柱層析法從血清中去除其他的抗體後，進一步純化獲得抗維生素 D₃ 之多株抗體。純化出之多株抗體可應用表面膜漿共振技術 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 及酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA) 檢測此多株抗體與維生素 D₃ 標準品之間的交互作用，並繪製出標準曲線圖。利用所繪製出之標準曲線圖，可進一步用來定量食品中維生素 D₃ 的含量。SPR 不僅可提供分子內交互作用的重要資訊外，也發展成為定量牛奶或其他乳製品中的 vitamin D₃ 之含量極有潛力的方法。

第二節 抗原之製備

維生素D3與攜帶蛋白結合反應 (cBSA-vitamin D3 complex) 的製備，包括攜帶蛋白 (carrier protein) 的陽離子化 (cBSA) 以及cBSA與維生素D3之結合反應。

2-1 BSA 的陽離子化 (Cationization)

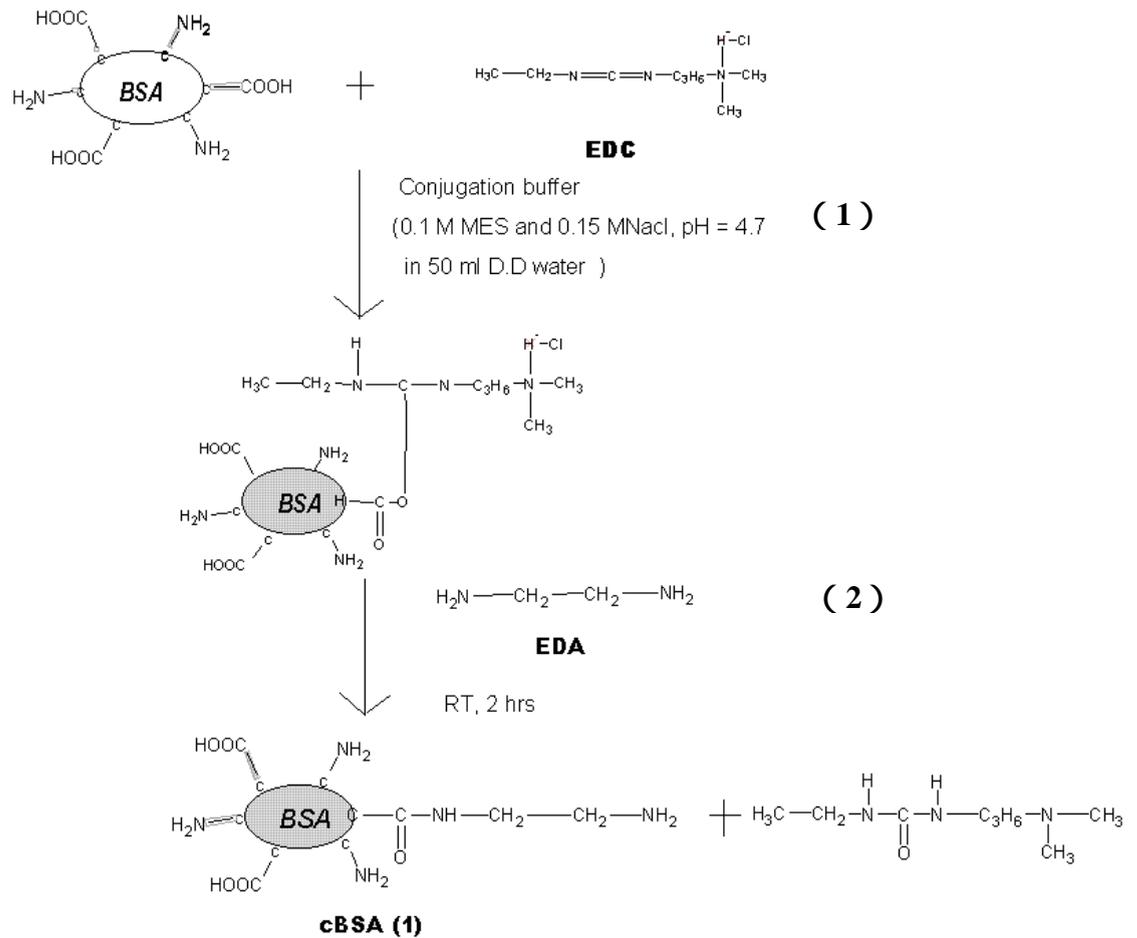
維生素 D3 的分子量為 384.7 KD 為一半抗原 (hapten) 無法獨自引起免疫反應，必須藉由鍵結到其他大分子攜帶蛋白 (carrier protein) 才能形成一個完全抗原，BSA 是一攜帶蛋白其需要先進行陽離子化後，才可以和維生素 D 結合，陽離子化後之 BSA 稱之為 cBSA。

2-1-1 材料

進行陽離子化時所配置的 conjugation buffer，所用試劑為 2-N-Morpholino-ethanesulfonic acid (MES) 購自 SIGMA Lot 29H5428 及 sodium chloride (NaCl) 購自 MERCK, pH 4.7。攜帶蛋白 (carrier protein) 7.5 % Bovine Albumin Fraction V Solution (BSA) 購自 GIBCO。另外還有 Ethylendiamin (EDA) 及 Ethylendiammoniumdichlorid (EDC)。

2-1-2 實驗方法

BSA 須先進行陽離子化後才能和維生素 D 鍵結在一起，首先配置結合之緩衝溶液 (conjugation buffer) 50 ml，將 2 mg BSA 加入 200 μ l 之結合之緩衝溶液中，同時在製備另一管 48mg EDA 及 10mg EDC 溶於 500 μ l 結合之緩衝溶液，將 2 管混合後，室溫下反應 1~2 小時，即可將 BSA 陽離子化如流程圖 3.1。BSA 上之羧基端 (COO⁻) 其帶負電，其會和 EDC 的碳氮雙鍵結合後，加入 EDA 後會取代 EDC 和 EDA 與羧基結合的位置。



流程圖 3.1. 陽離子化 BSA(cBSA) 之合成。(1) 結合反應 (conjugation), BSA 和 EDC 已加入之 conjugation buffer 進行結合後, 再進行 (2) 陽離子化反應(cationization)。

2-2 陽離子化的 BSA (cBSA) 和維生素 D3 之結合反應

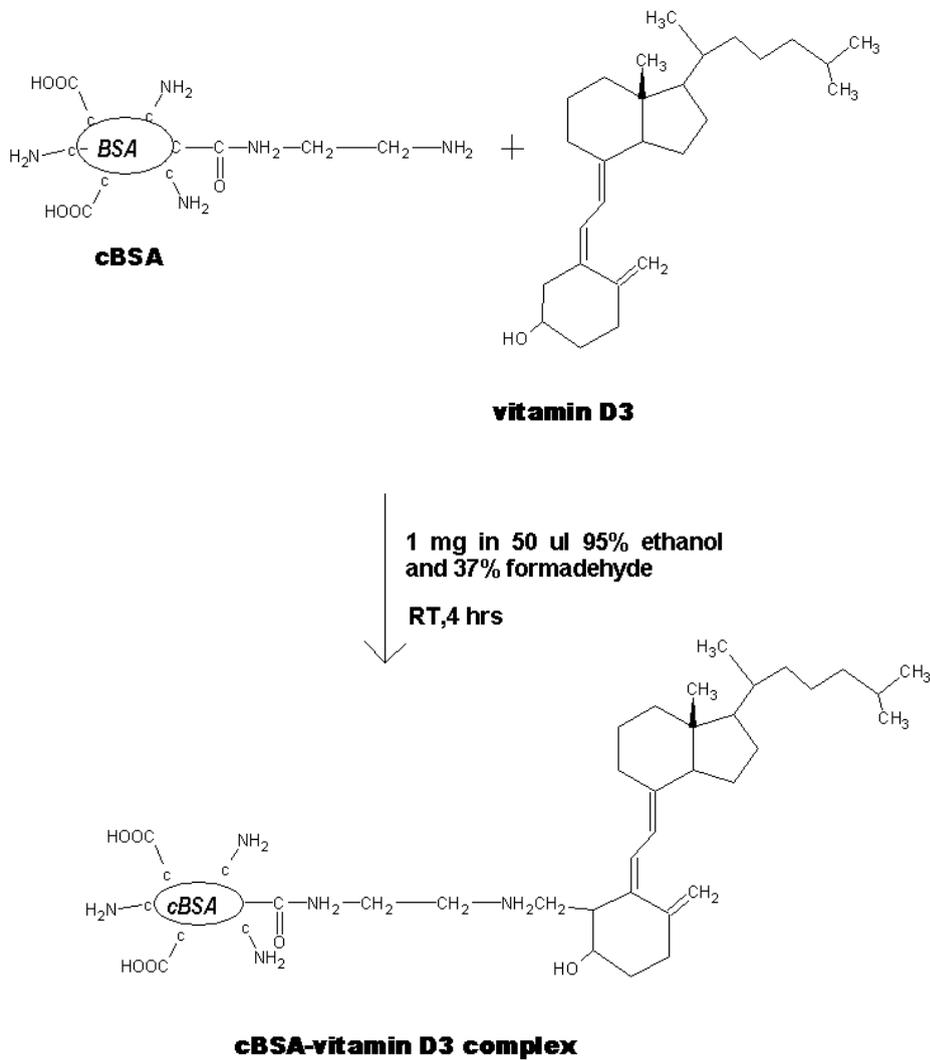
經陽離子化的 BSA 和維生素 D3 可進行結合反應,形成一個 cBSA 和維生素 D3 的複合物。維生素 D3 是一種親脂性的固醇類,因此,可溶解於 95% 乙醇,再利用加入的甲醛 formaldehyde 所提供之碳基將 cBSA 和維生素 D3 鍵結,而形成 cBSA-vitamin D3 complex, 作為免疫反應之抗原。

2-2-1 實驗材料

Vit D (Vit D₃, cholecalciferol)購自 Alexis Biochemicals , 37% formaldehyde 購自 TEDIA , 99.5% Ethanol 購自 NASA。

2-2-2 實驗方法

稱取 200 µg 合成好之 cBSA , 溶於 200 µl 的結合之緩衝溶液中, 加入 50 µl , 37% formaldehyde , 再加入 10 mg (200 µg x 50 倍) 維生素 D (以每 1 mg 溶於 50 µl 95% alcohol 的比例), 室溫下反應 4 個小時後, 由於 cBSA 上之官能基為強力拉電子基其胺基 (NH₂) 會和加入的 formaldehyde 官能基上的碳基結合而形成 cBSA-vitamin D complex 流程圖 3.2。將合成之 cBSA-vitamin D complex 之反應混合液進行冷凍乾燥後, 液體體積濃縮到約 1-2 ml。



流程圖 3.2 cBSA-vitamin D₃ complex 的合成。維生素 D₃ 溶解於 95% 乙醇中, 再加入 37% formaldehyde (CH₂O), 於室溫下反應 4 小時後, cBSA 即和維生素 D₃ 結合而形成 cBSA-vitamin D₃ complex。

第三節 抗原之確認

所合成之抗原須經確認後才能注射至動物體內,因此經由化學合成後之 cBSA-vitamin D3 complex, 利用 SDS-PAGE 以及 UV-可見光分光光度計進行確認。

3-1 蛋白質膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

3-1-1 實驗材料

配置膠體的材料如表 3.1。分別為 Tris-HCl (Tris-hydroxymethyl methylammouium chloride)購自 Biochemical, 30% acrylamide/Bis 購自 Bio-Rad, Ammonium Persulfate (APS) 購自 SIGMA, A-3678, Sodium dodecyi sulfate (SDS) 購自 M&J scintek, TEMED 購自 platinum plus 及 bromophenol blue R250 購自 AMRESCO。

3-1-2 實驗方法

首先先將電泳玻片以 70% 乙醇洗淨擦乾, 利用表 3.1 之配方將 separating gel 配置好後注入, 厚度為 0.75 mm 之兩片電泳玻片內, 加入二次水或酒精將膠體壓平, 約 10-15 分鐘待膠凝固後將水層輕輕倒掉, 加入已配置好的 stacking gel, 迅速將梳子 (comb) 插入尚未凝固的膠體中, 待膠體凝固後才將梳子抽起, 並用 running buffer 將每個孔洞沖洗乾淨, 避免膠體的殘留。同時, 處理蛋白質的樣品, 將蛋白質之標準品 (protein marker) 或欲分析之樣品分別以 1:1 之比例和 sample buffer 混合後, 在 98 加熱 5 分鐘後, 迅速冷卻並進行離心。分析樣品配製的濃度為 BSA 15 mg/ml 稀釋為 1/4000, cBSA 及 cBSA-vitamin D complex 分別注入 12 μ l, 將 running buffer 加滿內槽後加少許於外槽, 將電壓設定於 80 伏特進行 200 分鐘。

當電泳膠跑完後, 將膠片小心的取下後至於染色劑 coomassile blue R250 中染色 30 分鐘後, 將膠片取出後放入退染劑中進行退染, 退染後的膠片再以照相系統將結果儲存。

表 3.1 製備 12% polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE 所需之材料。

12% polyacrylamide	5 ml (一片)	10 ml (二片)
H ₂ O	1.675 ml	3.35
1.5 M Tris (pH=8.8)	1.25 ml	2.5 ml
Bis/acrylamide	2.0 ml	4.0 ml
10 %APS	25 ml	50 ml
10 % SDS	25 ml	100 ml
TEMED	40 ml	10 ml
5% stacking gel	5 ml (一片)	10 ml (二片)
H ₂ O	3.05 ml	6.1 ml
0.5 M Tris (pH=6.8)	1.25 ml	2.5 ml
Bis/acrylamide	0.665 ml	1.33 ml
10 %APS	30 ml	60 ml
10 % SDS	50 ml	100 ml
TEMED	10 ml	20 ml

3-2 UV-分光光度計

3-2-1 實驗材料

Ultraviolet-visible spectrophotometry 購自 HITACHI U-2001, BSA 標準品購自 Bio-Red, 石英管, 欲分析的樣品, 包括: BSA、cBSA、cBSA-vitamin D complex 以及 vitamin D 購自 Alexis Biochemicals。

3-2-2 實驗方法

將所合成之 cBSA 和維生素 D3 及反應形成 cBSA 和維生素 D3 複合物 (cBSA-vitamin D complex)。利用 UV-分光光度計, 以不同化合物其最大吸收峰會有所不同來確認。首先將機器暖機 30 分鐘後, 將裝有結合之緩衝溶液之石英管先進行空白試驗, 並將儀器歸零後, 在測定每一個欲分析的樣品, 每測量完一個樣品後需要以二次水清洗石英管後, 再測定下一個樣品。

第四節 抗體的製備及純化

4-1 實驗材料

實驗用完全佐劑 (complete Freund adjuvant, CFA) 購自 GIBCOBRC 和不完全佐劑 (incomplete Freund adjuvant, IFA) 購自 SIGMA F5506 , 另外進行親合性管柱所使用到的管柱有 protein A/G(Protein A/G Disposable Columns Sample Kit)購自 PIERCE , cBSA sepharose column 及 cOVA sephrose column 所用到了材料試劑包括 : CNBr (CNBr-activated sepharose TM 4B) 購自 Amersham Pharmacia Biotech AB , (Hydrochloric Acid, HCl) 購自三德藥品 , (SODIUM bicarbonate, NaHCO_3) , (Natriumchlorid, NaCl) 購自 MERCK , (Tris-hydroxymethyl methylammouium chloride, Tris-HCl) 購自 Biochemical , (acetic acid, Acetate) 購自 TEDIA , (Potassium phosphat, Monobasic, PBS)。

4-2 抗體產生之實驗方法

免疫的方法是根據 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)之規範，首次免疫反應其抗原須加入完全佐劑 (complete Freund adjuvant , CFA) , 佐劑的加入後如何提升免疫反應能不清楚，但有 2 種機制常被探討。佐劑可以保護快速崩解之抗原，另外也可以延長抗原暴露在免疫系統中之活性，進而可以產生大量之抗體。另一機制提出佐劑可以活化免疫系統細胞 [53]。

初次免疫將所合成之抗原 0.5 ml 加入完全佐劑 0.5 ml , 注射 3 周後，進行第二次的免疫也就是次級免疫，將抗原 0.5 ml 加入不完全佐劑 IFA 0.5 ml , 注射後 7 天進行採血，13 週後抗體的產量達最高峰，每隔 3 週注射一次，進行兔子的皮下採血，首先先拍打兔耳後以酒精噴之，以針頭(10ml 針筒,長針)斜針向下約取 10ml 血液(若無法一次取得 10ml,則由耳朵外部往內再取一次，或採另外一耳)，採血後得到的血液至於試管中，1000 rpm 迅速離心。取上清液至微量試管中，以 1000 rpm, 4 進行 3 次離心，直到沒有血漿等沉澱物，取上層血清(透明黃色)，於 -80 下儲存。此血清為純化前之多株抗體。

4-3 多株抗體的純化

所收集之抗血清須進一步進行純化,實驗中所使用的之方法為親合性管柱的層析方法,親合性管柱的層析方法是一種方便且專一純化蛋白質的方法,利用製備固相的免疫支持物(spAg)這是一種可和抗原成共價結合之惰性支持物。將免疫吸附物堆置於管柱中,並使抗體混合物在生理條件下通過該管柱,抗原的抗體會流在管柱內,而未結合的抗體及被洗去[54]。純化多株抗體之親合性管柱分別為 protein A/G column: 主要是去除血清中之 IgG 及 IgA, cBSA sephrose column: 去除血清中 anti cBSA antibodies, 最後一個管柱為 cOVA sephrose column: 可以結合住 anti -Vit D3 antibodies。以下逐一介紹上述之三個不同之親合性管柱。

4-3-1 protein A/G column

protein A/G column 之製備是購買商業套組,於實驗進行前將套組中之 Protein A/G Gel slurry 回溫至室溫,取出一乾淨之管柱以二次水潤濕,再將墊片放入管柱中,加入二次水後,以套組中的過濾管將墊片往下壓,此步驟之目的為潤濕墊片並趕走氣泡,接著將套組中的 Protein A/G Gel slurry 搖晃均勻後倒入管柱內約 5 cc,放入第二塊墊片後,於墊片上面加入二次水,此步驟之目的為隔絕空氣,protein A/G column 便製作完成,將管柱存放於 4 °C 的冰箱中靜置 30 分鐘。

4-3-2 cBSA sephrose column

將活化之 CNBr (CNBr-activated sepharose) 緩慢加入裝有 1mM HCl 200 ml 燒杯中緩慢搖晃 15 分鐘,使活化之 CNBr 膨脹後,填入管柱後,將管柱中之 HCl 要去除,以少量耦合之緩衝溶液 (coupling buffer) 將剩餘 HCl 洗乾淨,耦合之緩衝溶液是一種催化劑可將 cBSA 和 sepharose 結合在一起。

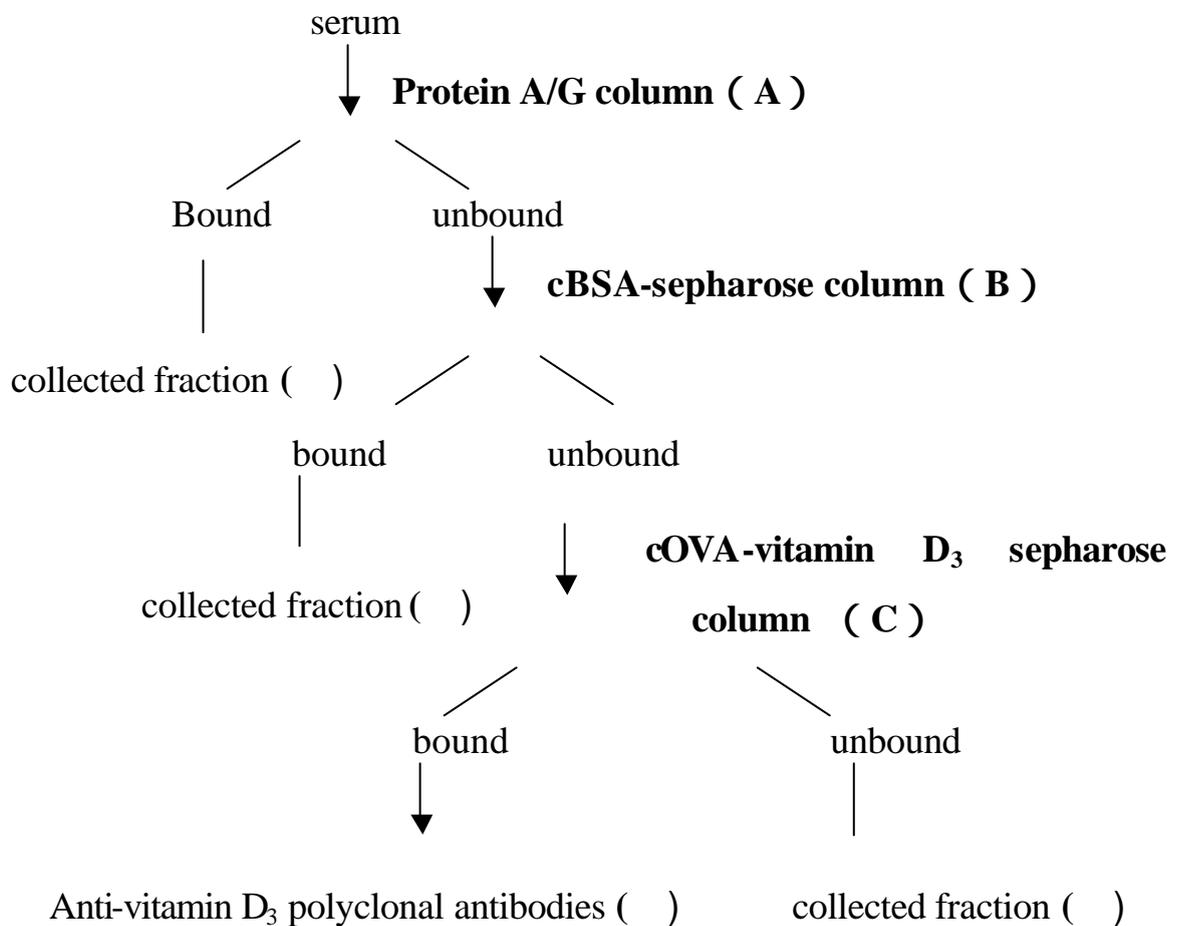
以 5ml 耦合之緩衝溶液加入 20 mg cBSA 進行反應至隔夜後和已膨脹的活化之 CNBr 充分混合,回填入管柱中,以 20 ml 耦合之緩衝溶液清洗,加入 0.2M acetate + 0.5M NaCl 20 ml, pH4.0,

清洗 3 次後，在加入 0.1 M Tris-HCl+ 0.5 M NaCl 20ml，pH8.0 清洗 3 次，最後將管柱內充滿結合之緩衝溶液 (binding buffer)，製備好的 cBSA sepharose column 於 4℃ 下儲存。

4-2-3 cOVA sepharose column

製備方法同 3-3-2 方法，其中不同的部分在 5ml 耦合之緩衝溶液加入 20 mg cOVA 反應至隔夜其餘步驟均相同。

所收集之血清先通過 protein A/G column 中，收集其濾液，收集的濾液進行冷凍乾燥將體積濃縮後，濃縮好的樣品加入結合之緩衝溶液至 10 ml 後進行第二個管柱 cBSA sepharose column，將 10 ml 的收集液重複 3 次通過此管柱，確保 anti-cBSA antibody 都結合在管柱上，並收集濾液，並且以結合之緩衝溶液充分沖洗管柱。將所收集之濾液再通過第三個管柱 cOVA sepharose column，重複 2 次每次所加入的體積為管柱的高度，才能有效的捉住 anti-vitamin D antibodies，最後利用 1 倍 20 ml PBS 清洗管柱，重複兩次，將所結合在管柱內的抗體洗提出來。收集濾液進行冷凍乾燥如流程圖 3.3。



(Final product)

流程圖 3.3 多株抗體的純化過程。將所收集的血清經過 protein A/G column(A)後收集其濾液，進行冷凍乾燥後，再通過 cBSA-sepharose column(B), 收集其濾液，最後通過 cOVA-vitamin D₃ sepharose column (C), 所結合到管柱上的抗體在利用 1 倍 PBS 洗提下來即為抗維生素 D₃ 之多株抗體。

第五節 多株抗體的確認

5-1 點墨免疫分析法 (Dot immunoblot assay)

1960年放射性免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA) 在測量生物分子中的複合物被重視。這個方法用來定量評估藥物、蛋白質非蛋白質荷爾蒙、核酸和抗原與抗體間交互作用。在1970年和1980年經修正後保留RIA的特異性及靈敏性以酵素和鍵和物或鍵合物結合分子代替放射性的物質，而結合的數量可以測得酵素的活性。這種修飾的方法稱為酵素連結免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)。優點是利用會產生顏色的受質其顏色的改變可以容易去定量酵素的反應。而最近ELISA的修飾中包括使用不同吸附的材料和方法來測定酵素反應，這種修飾法稱為點墨免疫分析法 (Dot immunobinding assay) 或是 Dot blot assay。這種分析是利用蛋白質吸附在膜上，且用呈色來定量，這種反應可在膜上看見。點墨免疫分析法需要有酵素標示的抗體或抗原其會和結合在膜上的抗原結合，隨後結合的物質須以試劑洗去。點墨免疫分析法中抗原是首先吸附在膜的表面，以blocking buffer將非專一性蛋白質住，洗淨後移除過多的已被蓋住的蛋白質。加入有酵素標示的二級抗體，形成酵素連結抗體抗原的複合物。

5-1-1 實驗材料

TBS buffer : (20 mM Tris- 500 mM NaCl pH 7.5)

TTBS : (20 mM Tris-500 mM NaCl 0.05 % Tween 20)

blocking solution (3 % gelatin in TBS)

Antibody Buffer (1 % gelatin in TTBS)

First-antibody (100 ml antibody buffer 1~ 10 μg / ml)

Second-antibody (1 : 2000 anti-rabbit peroxidase)

DAB (10 mg /15 ml TBS)

filter paper (Bio-Rad)

NC - membrane (nitrocellulose membrane using hydridot manifold

5-1-2 實驗方法

配置不同之抗原濃度包括 cBSA、cOVA 和 cBSA-Vit D 或 cOVA – Vit D complex 原始濃度為 $6\mu\text{g/ml}$ ，首先將 cBSA、cOVA 進行 2 倍之序列稀釋濃度分別為 (6 、 3 、 1.5 、 0.75 、 0.375 、 0.187 、 0.093 、 0 $\mu\text{g/ml}$)，cBSA-Vit D 或 cOVA – Vit D complex 序列稀釋的濃度為 ($1/300$ 、 $1/600$ 、 $1/1200$ 、 $1/2400$ 、 $1/4800$ 、 $1/9600$ 、 $1/19200$)，先將 2 張過濾紙和 NC membrane 以 TBS 潤濕約 3 分鐘，於平盤上放入 2 層之過濾紙最後一層加上 NC membrane，再利用 $200\mu\text{l}$ TBS 再次潤濕，以真空抽氣除去 TBS，於每個 well 加入 $300\mu\text{l}$ 抗原 cBSA、cOVA 和 cBSA-Vit D complex 進行緩慢抽真空至液面乾掉即可，再以 TBS buffer 清洗每個 well，清洗完後將 TBS 除去，取出 membrane 放入 blocking solution 緩慢搖動 30~60 分鐘，取出 membrane 後，以 TTBS 清洗 5 分鐘 2 次後再將 membrane 放入 first antibody solution 反應至隔夜，取出以 TTBS 清洗 5 分鐘 2 次，去除未結合的一級抗體，再放入有二級抗體之緩衝液中反應至隔夜，TTBS 清洗 5 分鐘 2 次後，以 TBS 洗去 membrane 上的 Tween-20，最後加入呈色劑 DAB 反應至隔夜，觀察其呈色結果。

第六節 利用 ELISA 來檢測多株抗體和維生素 D3

實驗所使用之直接型及競爭型 ELISA 免疫分析方法，為偵測抗體與抗原反應的一種方法，將具特異性之抗原（維生素 D3）固定在固相支持物上，加入抗體（抗維生素 D3 多株抗體）後，再利用具有酵素標示的二級抗體會和受質作用後呈色(圖 3.2)。此分析方法之優點為所使用具酵素標示之二級抗體，可偵測多種不同的抗體[55]。

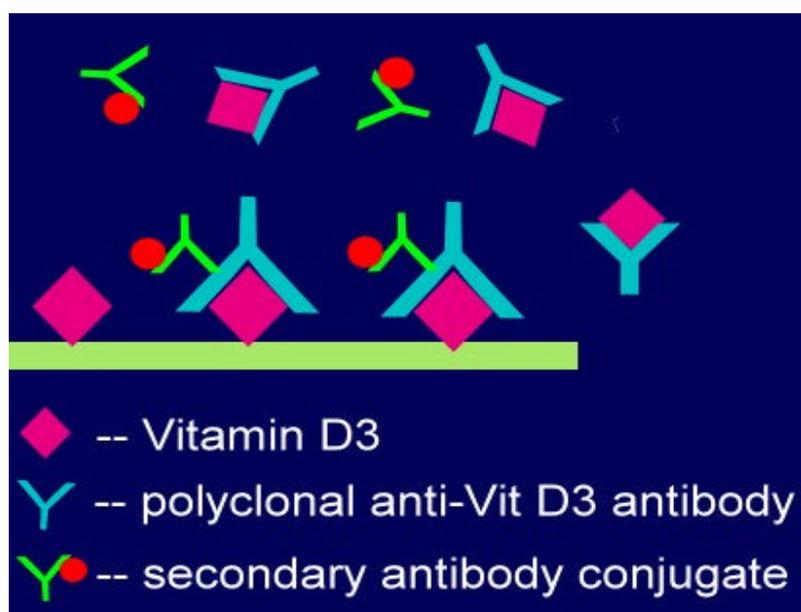


圖 3.2 ELISA 檢測維生素 D3 與其多株抗體間作用。將維生素 D3 固定於支持物表面，加入已預混之維生素 D3 與其多株抗體後，再加入具有酵素標示之二級抗體使其呈色後，在 450 nm 波長下觀察其結果。

6-1 實驗儀器

ELISA reader (MR 7000 & Dynex MRX) 購自 Dynatech, USA.

6-2 實驗材料

抗維生素 D3 之多株抗體, Vit D3 購自 Alexis Biochemicals, blocking solution (3 % gelatin in TBS), TTBS (20 mM Tris-500mM NaCl 0.05 % Tween 20), ammonium bicarbonate buffer 和 anti-rabbit IgG peroxidase conjugate 皆購自 SIGMA, 另外 osteomark[®] ELISA kit 之套組中, chromogen reagent 及 stopping reagent 購自 Ostex International, Inc., Seattle.

6-3 實驗方法

加入 100 μ l 之維生素 D3 至有 96 孔洞的孔盤中, 於室溫下反應至隔夜後, 在每個孔洞內加入 250 μ l blocking solution, 室溫下反應 2 個小時, 將孔盤內未接上維生素 D3 的位置覆蓋住, 將預先混合好的 100 μ l 維生素 D3 和 100 μ l 抗維生素 D3 抗體加入 well 反應 90 分鐘, 以 330 μ l ammonium bicarbonate buffer 清洗 5 次後, 加入 10 μ l anti-rabbit IgG peroxidase conjugate 於室溫下反應 90 分鐘後再以 ammonium bicarbonate buffer 清洗 5 次, 加入 200 μ l 呈色物質 chromogen reagent 後會成淺藍色後, 以 stopping reagent 混合後, 靜置 5 分鐘後呈黃色, 再以 ELISA reader 設定於 450 nm 進行讀數。

第七節 利用 SPR 技術定量食品中維生素 D3

感應晶片在固定鍵合物之前,須將感應晶片表面的 carboxymethyl dextran 活化,本實驗所固定的鍵合物為抗維生素 D3 之多株抗體及 goat-anti rabbit Fc IgG antibody,分析物為維生素 D3,利用分析物和鍵合物之間之交互作用來建立一標準曲線。

7-1 實驗儀器

BIACore 購自 biacore AB, Pharmacia Inc., Sweden

7-2 實驗材料

感應晶片 CM5, HBS buffer(0.01 M HEPES,0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% polysorbate 20(v/v pH 7.4,) , 以及 amine coupling kit : NHS(N-hydroxysuccinimide) , EDC (1-Ethyl-3-(3-DIMETHYLAMINO-PROPYL)CARBODIIMIDE 及 Ethanolamine hydrochloride pH 8.5 皆購自 biacore AB, Pharmacia Inc., Sweden.

7-3 實驗方法

7-3-1 感應晶片之製備

(a) 感應晶片的活化

所使用之感應晶片為 CM5,在進行晶片的活化之前,必須讓感應晶片有一段時間穩定,其 RU 的變化穩定下才能進行活化,再利用電腦軟體系統選擇 amine coupling 的模式下進行生物感應晶片之活化,以 HBS buffer 通過微射流系統之流速為 5 μ l/min,注入 35 μ l NHS 0.05M/ EDC 0.2M (50 : 50, v/v), 進行感應晶片表面 carboxymethylated dextran 之活化。

(b) 感應晶片表面鍵合物之固定

取 70 μl 抗維生素 D3 之多株抗體 (注入之體積設定於 50 μl) 溶於 10 mM sodium acetate buffer , pH 4.5 後 , 在晶片活化後 3 分鐘內注入至微射流系統後 (圖 3.3) , RU 值會有明顯的上升情形。

(c) 感應晶片之去活化

取 55 μl (注入之體積設定於 35 μl) 0.1 M Ethanolamine hydrochloride 注入微射流系統中 , 將感應晶片中未和抗體 (anti-vitamin D3 polyclonal antibodies 和 goat anti-rabbit Fc IgG) 結合之 COOH 官能基覆蓋住 , 約需經歷 7 分鐘 , 待整個流程結束後 , 即完成了晶片的活化、固定及去活化。此時要讓晶片以 HBS buffer 通過微射流系統 , 使其 RU 值穩定 , 將穩定後之 RU 值扣除未進行活化前之 RU 值。

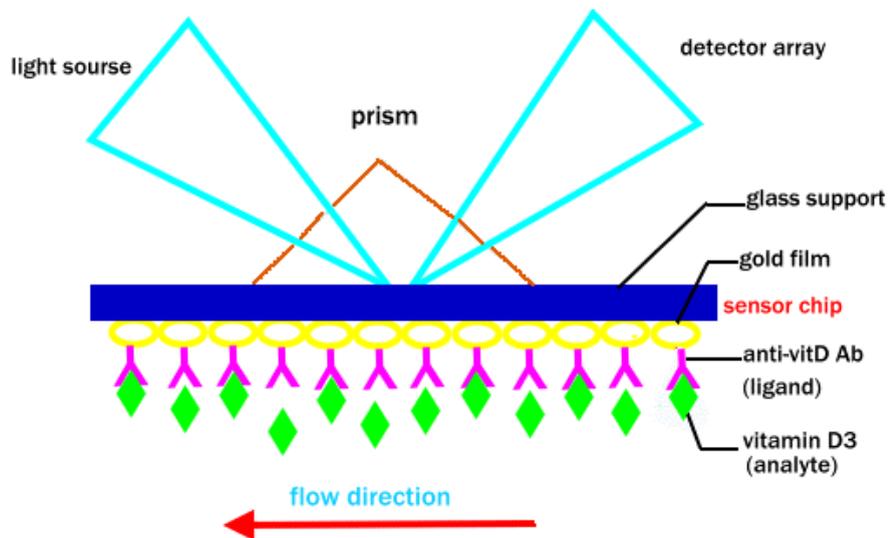


圖 3.3 感應晶片 CM5 中鍵合物之固定。感應晶片活化後 , 注入鍵合物 (ligand) , 本實驗中之鍵合物為抗維生素 D3 之多株抗體 , 再進行感應晶片之去活化後即可進行樣品之分析 , 分析物 (analyte) 為維生素 D3。

7-3-2 檢測流程

(1) 儀器之設定

在進行實驗之前一天須先以固定有 anti-vitamin D3 polyclonal antibodies 或 coat-anti-rabbit Fc IgG 晶片放入儀器中,以 HBS buffer 通過微射流系統中且溫度在 25 °C 下至隔夜,流速設定在 1 $\mu\text{l}/\text{min}$,使儀器內部呈現穩定的平衡狀態。隔日,進行實驗的前一個小時將流速調至 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 後,注入 70 μl 的緩衝溶液(HBS buffer)觀察其 RU 的變化,直到注入之緩衝液不會造成感應分析圖 RU 的變化後,表示儀器對系統中固定流速的緩衝液與注入的緩衝液不會造成 RU 的變化,即可進行實驗。

(2) 標準品(維生素 D3)的製備

將維生素 D3 配成 9.675 μM 溶於 70% 乙醇中,在以 HBS buffer 進行序列稀釋分別為 6.4、54.2、33.2、2.35、1.5、1.125 μM 後注入以固定有 anti-vitamin D3 polyclonal antibodies 的感應晶片上,每一個樣品以注入之體積為 70 μl (設定於 50 μl),流速設定為 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 後進行分析,當樣品注入後 RU 值會上升,當 10 分鐘後樣品注射完畢後利用高速的緩衝液沖洗微射流系統後,非專一性的物質便會被沖洗下來,當其感應圖上之 RU 值回到未注入樣品前的值時,便可以進行下一個樣品的分析。

(3) 市售牛奶的製備

將含有較高量的維生素 D 的奶粉(安怡長青高鈣脫脂奶粉),市售牛奶取 0.5711 g 溶於 10 ml HBS buffer 中,經過真空過濾將較大分子的除去後,稀釋 1/8 後其維生素 D 的含量為 1.425 ng/ μl ,每次實驗進行注入之體積為 70 μl ,因此其含量為 99.75 ng,此濃度為 stock solution 其餘樣品進行序列稀釋。

(4) 萃取市售牛奶中維生素

取 25g 牛奶中置於 250 ml 燒杯中,在加入 50 ml ethanolic pyrogallol solution 及 15 ml KOH solution 緩慢搖動混合至隔夜此步驟為皂化,皂化完成後之產物移至 500 ml 分液漏斗,再加入 40 ml 二次水、20 ml 乙醇及 50 ml hexane 將殘留於燒杯中的物質萃取乾淨,在利用 50 ml hexane 移除水層重複 3 次,收集 3 次的萃取物並利用 60 ml ethanolic pyrogallol solution 清洗,再利用無水硫酸鈉將 hexane 層中水層移除,以真空乾燥將樣品濃縮約剩下 5 ml 後,以吹氮氣的方式除去有機溶劑。

第四章 結果與討論

第一節 抗原之確認

1-1 陽離子化反應之確認

根據Jean.*et al.* (1999) 研究中指出，作者之實驗設計為陽離子化之BSA (cBSA) 的產物以逆向電極10 % native PAGE來確認，電泳之通電方向為正極至負極。作者以2 mg BSA和不同量之EDA，分別是72、48、24、12和6 mg反應後，發現以48 mg EDA，往負極移動的速率比其他濃度之EDA快，表示在這種濃度下陽離子化之BSA (cBSA) 可得較高的產率，而EDA的濃度越低時，陽離子化程度會降低，相對的當高濃度EDA並不會增加陽離子化的反應。而EDC的量(0.72到10 mg)對於陽離子化反應並沒有影響。因此根據以上的實驗結果，本實驗設計以48 mg EDA來與BSA進行陽離子化的反應。

陽離子化之BSA的產物利用UV-可見光分光光度計及12% SDS-PAGE來進行確認。利用有機化學合成之cBSA以UV-可見光分光光度計，不同化合物其最大吸收峰會有所不同來確認，首先，將BSA在200-400 nm波長範圍內進行掃描，結果發現其最大吸收波長為238 nm如(圖4.1)，在相同條件下將所合成之cBSA進行掃描cBSA的最大吸收峰都是在238 nm(圖4.2)。

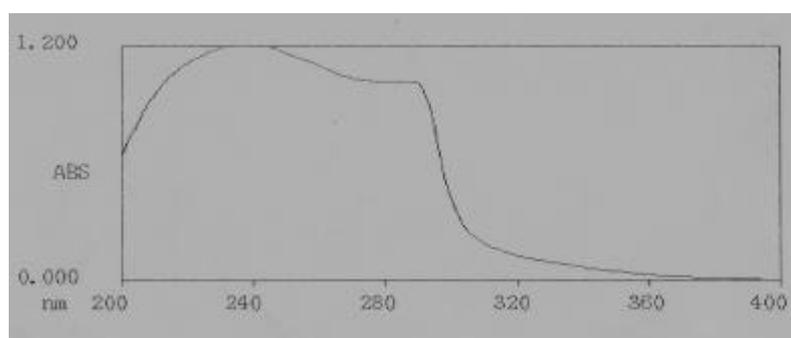


圖 4.1 BSA 之 UV 分光光譜圖。在波長範圍 200-400nm 掃描 BSA 後，在 238 nm 偵測到最大吸光值。

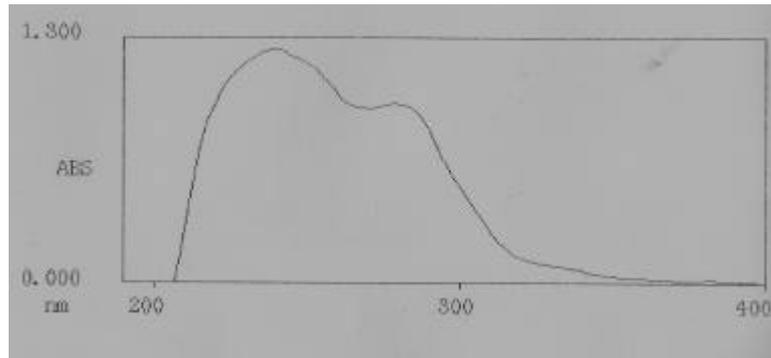


圖 4.2 cBSA 之 UV 分光光譜圖。在波長範圍 200-400nm 掃描 cBSA 樣品後，在 238 nm 偵測到最大吸光峰。

比較圖 4.1 及 4.2 的結果，BSA 與 cBSA 之光譜圖很類似，均在 238 nm 偵測到最大吸光峰。推究其原因可能有二，第一、因為 BSA 和 cBSA 之結構很相近，第二、此二者之差異性為電荷之不同，而 UV-可見光分光光度計是利用物質分子或離子團對紫外線及可見光的特定吸收光譜來分析的定性及定量方法，因此無法分辨出因電荷不同所造成的差異性。

1-2 Vitamin D3 和 cBSA 的鍵合反應之確認

1-2-1 UV-可見光分光光度計

確認 Vitamin D3 和 cBSA 的鍵合反應所形成之 cBSA-維生素 D3 鍵合物 (cBSA-vitamin D complex)，以 UV-可見光分光光度計進行波長設定於 200-400 nm 範圍之分別掃描維生素 D3 之標準品、cBSA、維生素 D3 和 cBSA 之混合物、以及合成之 cBSA-維生素 D3 鍵合物。首先針對維生素 D3 之標準品，以 UV-可見光分光光度計進行波長設定於 200-400 nm 範圍之掃描，結果發現維生素 D3 之標準品其最大吸收波長在 265 nm (圖 4.3) [5152]；維生素 D3 和 cBSA 之混合物經由 UV-可見光分光光度計掃描，結果分別在 238 nm 和 265 nm 的波長發現 2 個吸收峰 (圖 4.4)。實驗中抗原 cBSA 和 vitamin D3 經反應形成 cBSA-維生素 D3 鍵合物，進行相同條件之掃描，結果發現雖然其最大吸收也在 238 nm (與 BSA 最大吸收峰之波長相同)及 265 nm 左

右(與 vitaminD 最大吸收峰之波長相同),但在這兩個波長下,有不同吸收峰的形態,根據此結果推論 cBSA 已經和維生素 D 鍵結(圖 4-5)。

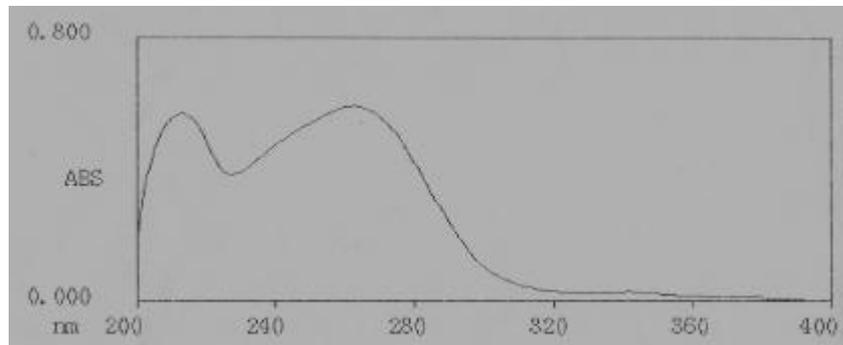


圖 4.3 維生素 D3 之 UV 分光光譜圖。在 265 nm 偵測到最大吸收峰

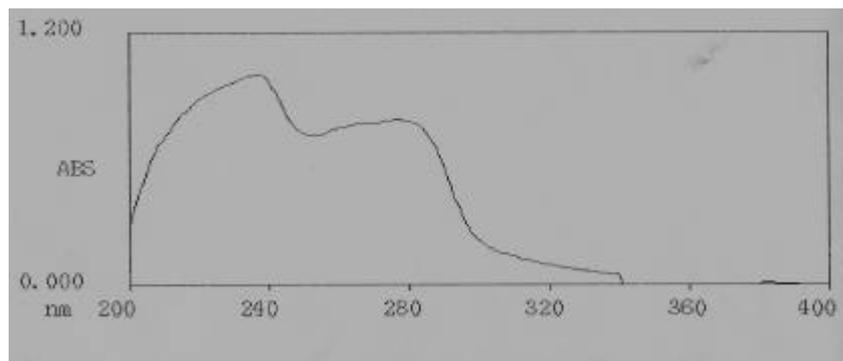


圖 4.4 cBSA 及 vitamin D 混合液之 UV 分光光譜圖。分別在 238 nm 和 265nm 偵測到最大及較大吸收峰。

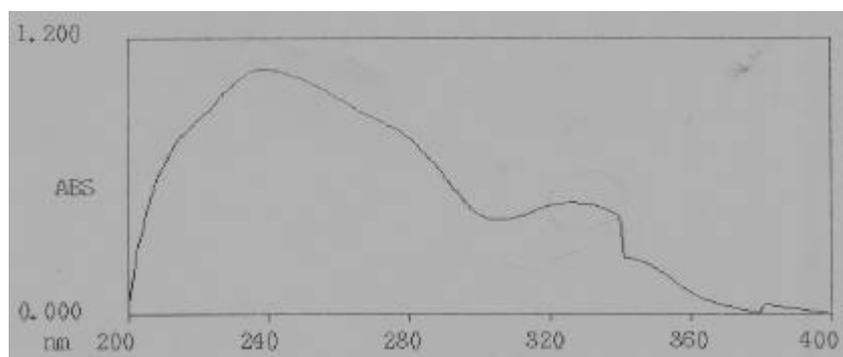


圖 4.5 cBSA- vitamin D complex 之 UV 分光光譜圖。在 238 nm 和 265 nm 偵測到最大及較大吸收峰。

1-2-2 SDS-PAGE

取出 15 μ l 蛋白質標準品、15 μ l 濃度 0.15 mg/ml 與 15 μ l 濃度 0.075 mg/ml 之 BSA，15 μ l 濃度 2.85g/ml 之 cBSA 進行 80 伏特 200 分鐘之電泳分析後進行照相顯影圖 (圖 4.6)。Lane 1 是蛋白質標準品其分子量由上至下分別是 97 kDa、66.2 kDa、45 kDa、31 kDa、20.1 kDa 和 14.4 kDa，Lane 2 和 Lane 3 為不同濃度之 BSA 標準品，Lane 4 為 cBSA，Lane 5 為 cBSA-vitamin D complex。

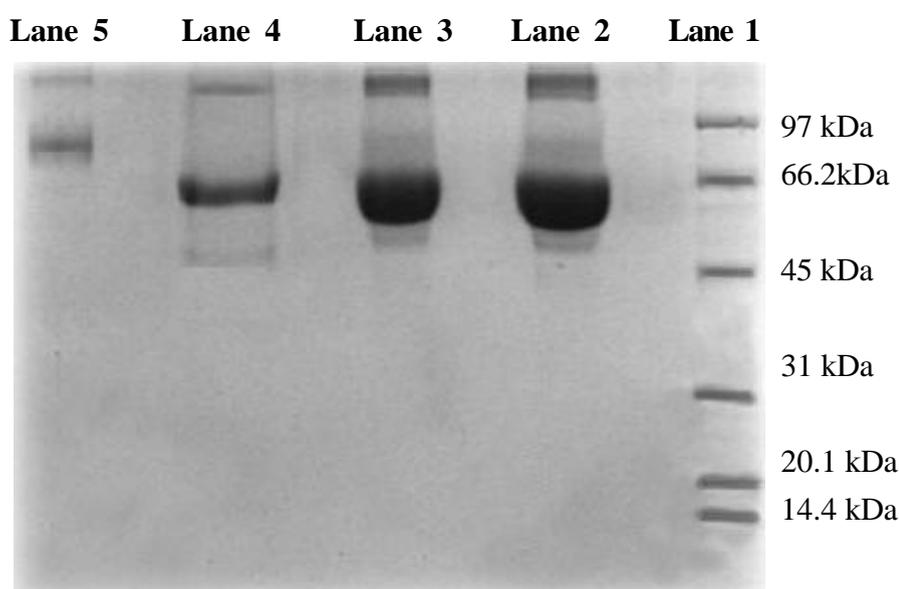


圖 4.6 12% SDS PAGE 照相顯影圖。Lane 1 為蛋白質之標準品，Lane 2 和 Lane 3 均為 BSA，Lane 4 為所合成之 cBSA，Lane 5 為 cBSA 和維生素 D3 之複合物。

根據 SDS PAGE 照相顯影圖之 Lane 1 中分子量為 97 kDa、66.2kDa 之間的距離約為 8 mm，換算 1mm 約為 3.875 kDa，已知 Lane 2 及 Lane 3 之 BSA 分子量約為 66.2 kDa，推算出 Lane 4 中 cBSA 的分子量約為 68.1 kDa，並推算出 Lane 5 cBSA-vitamin D complex 的分子量約為 85.45 kDa。利用上述各個產物之分子量，可大約估計 BSA 的 COOH 官能基上接上 EDA 及維生素 D3 的數目，其計算方法如下：

1. EDA MW = 0.06 Da vitamin D MW=0.3847 Da
2. cBSA (BSA + nEDA-nH₂O) -vitamin D

$$(66.2 + 0.06n - 0.018n) + (0.3847n) = 85.45 \text{ kDa}$$

$$n = 45.4$$

BSA 是一個由 607 個胺基酸所組成之蛋白質(圖 4.7)，其序列上有 96 個具有 COOH 官能基的胺基酸，可以被 EDC 所活化後接上一個分子量約為 60 Da 的 EDA 分子。而經由實驗結果顯示大約有 45 個 COOH 被活化且接上 EDA，相同地大約有 45 個維生素 D3 和 cBSA 結合而形成 cBSA-vitamin D complex。

```

1      60
MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF
61      129

DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCQEKQEP

130      180
ERNECFLSHK DDSPDLPKPK PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY

190      240
ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCA SIQKFG ERALKAWSVA

250      300
RLSQKFPKAE FVEVTKLVTD LTKVHKECCH GDLLCADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE

310      360
CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVK NYQEAKDAFL GSFLYEYSRR

370      420
HPEYAVSVLL RLAKEYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL KHLVDEPQNL IKQNCDQFEK

430      480
LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP CTE DYLSLIL

490      540
NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP

550      600
DTEKQIKKQT ALV ELLKHKP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDEKAC FAVEGPKLVV

607 STQTALA

```

圖 4.7 BSA 蛋白質之胺基酸組成與序列

第二節 抗體的純化及確認

本實驗中所收集之抗血清是利用親合性管柱層析之方法進行純化。分別經過3種不同管柱其中包括：protein A/G column、cBSA-sepharose column 和cOVA vitamin D sepharose column後，最後所收集到的血清為抗維生素D3之多株抗體，通過的第一個管柱可以結合住IgG和IgA，所收集的血清再通過第二個管柱此管柱可以結合 anti-cBSA antibody，最後將血清通過第三個管柱此管柱可以結合 anti-vitamin D3 antibody，再利用1倍的PBS將抗體洗提下來後濃縮成粉末及濃縮液，進一步進行點墨免疫分析法確認。

2-1 點墨免疫分析法 (Dot immunoblotting assay)

將所純化後的抗維生素 D3 之多株抗體經由點墨免疫分析法進行確認，抗原 (cBSA、cOVA 和 cBSA-vitamin D complex) 之原始濃度為 6 g/ml，在分別序列稀釋後成 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 等濃度，另外 cBSA-vitamin D complex 序列稀釋成 1/300, 1/600, 1/1200, 1/2400, 1/4800, 1/9600 等濃度下 (圖 4.8)，在本實驗設計中把 cBSA-vitamin D complex 以進行序列稀釋成為 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 等濃度，但沒有看到結果 (圖 4.9)，因此將 cBSA-vitamin D complex 進行 1/300, 1/600, 1/1200, 1/2400, 1/4800, 1/9600 等濃度進行序列稀釋[30]。呈色後所得的結果在 1/9600 濃度下有看到反應 (圖 4.10)，因此利用第二次的抗血清再以同樣方法進行實驗，結果在 1/600 看到呈色反應 (圖 4.11)。此結果也可以說明所純化出的抗體已去除 anti-cBSA antibody，此抗體在血清中佔很大之比例，因此所純化出之抗體為抗維生素 D3 之多株抗體。

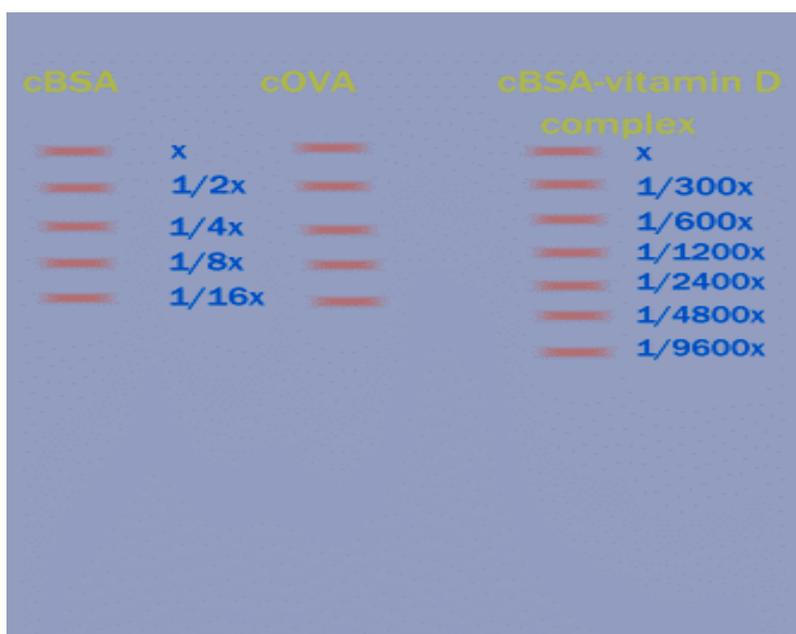


圖 4.8 點墨免疫分析方法設計圖。設計將抗原 cBSA、cOVA 和 cBSA-vitD complex，以原始濃度 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 進行序列稀釋加在膜上，進行分析確認。

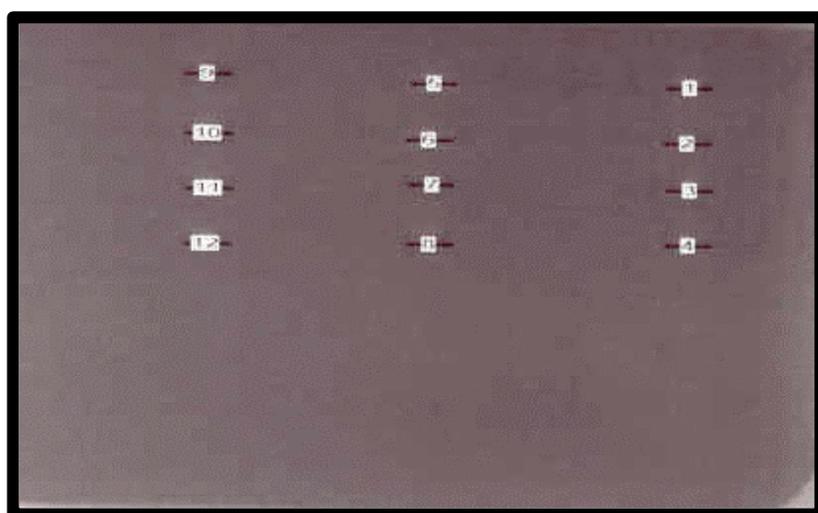


圖 4.9 點墨免疫分析方法照相顯影結果圖。將抗原 cBSA、cOVA 和 cBSA-vitD complex 都進行 1/2 序列稀釋後，呈色反應後並沒有看到結果。

根據圖 4.9 的結果顯示當 cBSA-vitD complex 也以 1/2 序列稀釋後並沒有看到結果，因此將 cBSA-vitD complex 之原始濃度以 1/300 進行序列稀釋至 1/9600 進行實驗，結果如圖 4.10 及 4.11。

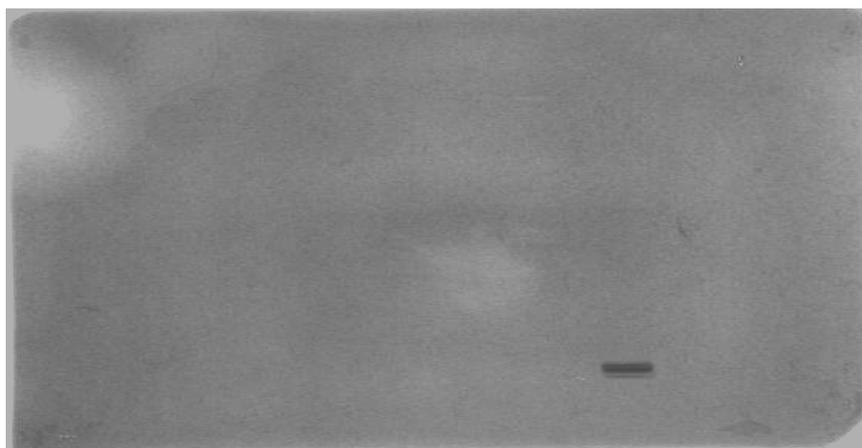


圖 4.10 點墨免疫分析方法照相顯影結果圖。結果顯示在 cBSA-vitD complex 1/9600 的濃度下有呈色的情形。

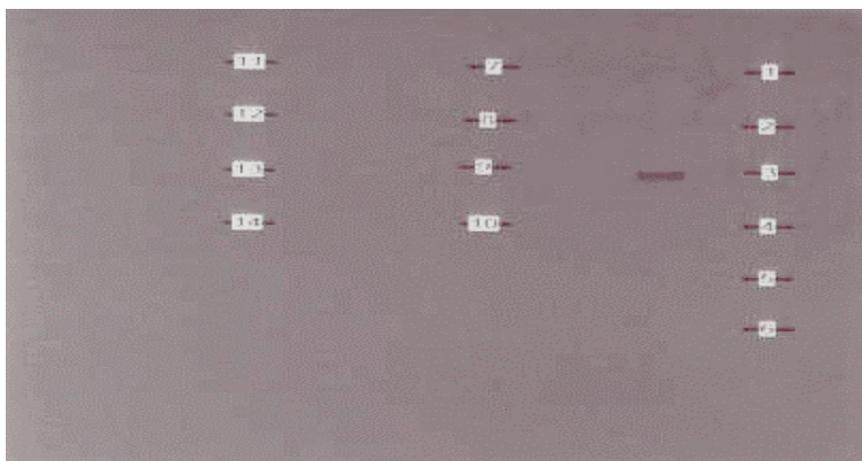


圖 4.11 點墨免疫分析方法照相顯影結果圖。結果顯示在 cBSA-vitD complex 1/600 的濃度下有呈色的情形。

圖 4.10 和 4.11 分別為兩次不同時間點所收集之抗血清，經由純化後之多株抗體進行點墨免疫分析方法之照相顯影結果圖，圖 4.10 為濃度 $6\mu\text{g/ml}$ 之 cBSA-vitD complex 稀釋成 1/9600 的濃度下與抗血清作用產生呈色的情形，圖 4.11 在 $6\mu\text{g/ml}$ cBSA-vitD complex 稀釋成 1/600 的濃度下有呈色的情形，發現不同之時間點所純化出的多株抗體其效價也不相同，此結果可驗證多株抗體之特性。另外推論於親合性管柱層析過程中，其中 IgG、IgA 及 anti-cBSA antibody 已被去除，因為抗維生素 D3 之多株抗體中如果還包含其它抗體，則在點墨免疫分析的結果圖中，cBSA 和 COVA 的抗原位置上將會有呈色的情形。證實利用親合性管柱進行抗體純化後，已成功地分離出抗維生素 D3 之多株抗體。

第三節 利用 ELISA 來檢測多株抗體和維生素 D3

3-1 直接型 ELISA

將維生素 D3 固著於 ELISA 平盤微孔中,分別加入不同濃度之抗維生素 D3 之多株抗體(10 $\mu\text{g/ml}$, 序列稀釋為 1/2, 1/4, 1/8, 1/16), 最後加入有酵素標示的二次抗體(anti-rabbit IgG peroxidase)均勻混合後,再與其受質作用呈色反應後,測得之 OD 值整理於表 4.1, 並根據表 4.1 繪製出標準曲線圖(圖 4.12)。

表 4.1 利用直接型酵素免疫分析法檢測抗維生素 D3 之多株抗體與維生素 D3 之結果

多株抗體之濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD ^a
10	1.086 \pm 0.0462
5	1.047 \pm 0.0046
2.5	1.0458 \pm 0.0541
1.25	0.964 \pm 0.0681
0.625	0.9205 \pm 0.022

^a OD 值是以 meanOD \pm SD 來表示

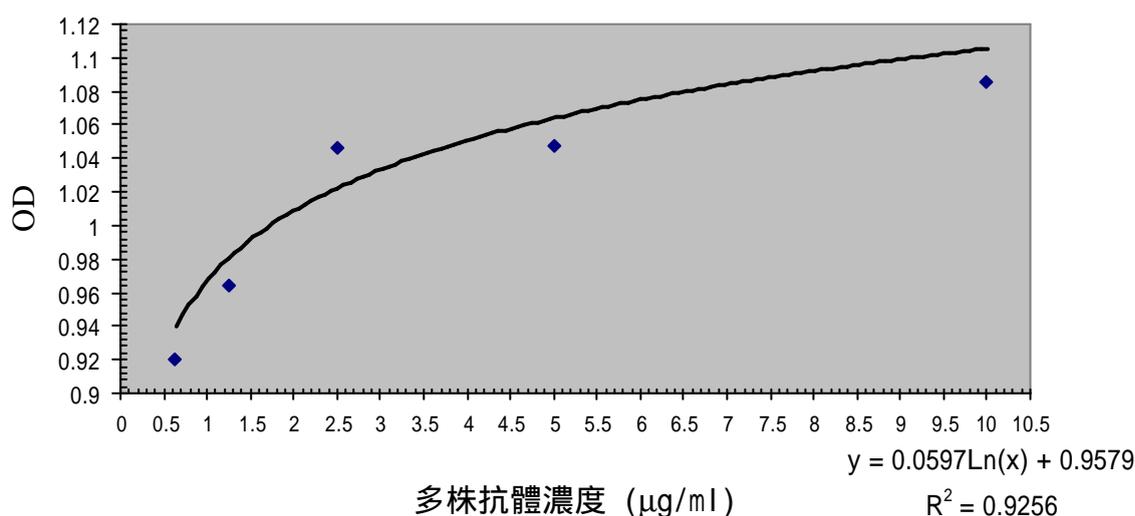


圖 4.12 直接型酵素免疫分析法測得之曲線圖。根據 4-1 所得到 OD 值和不同濃度的抗維生素 D3 之多株抗體, 利用 Excel 軟體作圖, 得到一曲線圖 R^2 為 0.92。

3-2 競爭型 ELISA

競爭型免疫分析方法來偵測抗原和抗體之相關性，將維生素 D3 固著於 ELISA 平盤微孔中，進行隔夜反應後，加入不同濃度之維生素 D3 (濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$ ，序列稀釋為 1/2, 1/4, 1/8) 和抗維生素 D3 之多株抗體(濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$)預混一個小時，最後加入有酵素標示的二次抗體與其受質作用進行呈色反應後，偵測之 OD 值，整理於表 4.2。並根據表 4.2 繪製出標準曲線圖 (圖 4.13)。

表 4.2 利用競爭型酵素免疫分析方法檢測預混抗維生素 D3 之多株抗體與維生素 D3 之結果

維生素 D 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	多株抗體濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD ^a
10	10	1.222 \pm 0.0225
5	10	1.283 \pm 0.0514
2.5	10	1.346 \pm 0.0732
1.25	10	1.374 \pm 0.012

^a OD 值是以 meanOD \pm SD 來表示

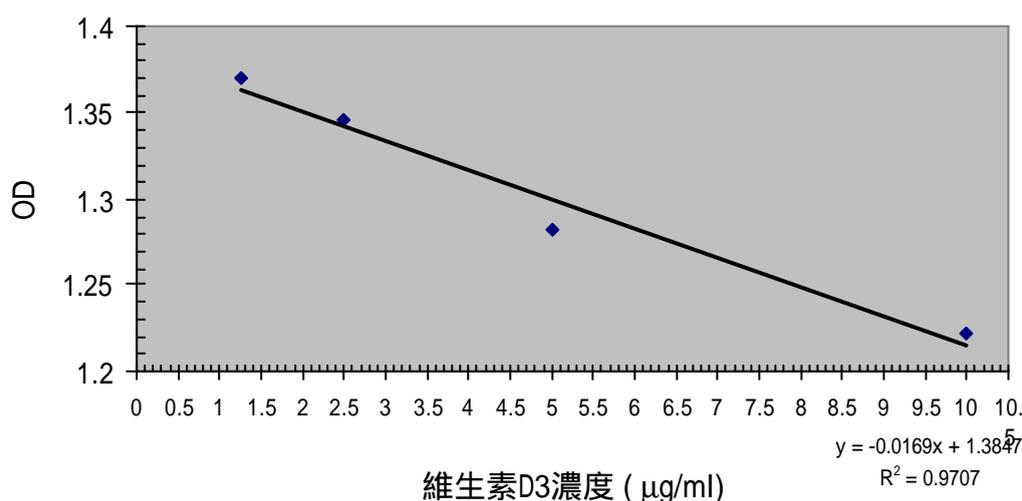


圖 4.13 競爭型酵素免疫分析法測得之曲線圖。根據表 4.2 所得到之 OD 值和欲混之維生素 D 及抗維生素 D3 之多株抗體濃度，利用 Excel 軟體作圖，可得到一趨勢圖其 R^2 為 0.97。

利用直接型及競爭型酵素免疫方法檢測維生素 D3 標準品與其多株抗體之反應結果，並探討此二種方法之可行性及準確性。直接型酵素免疫方法方面，其反應過程如圖 4.14，當維生素 D3 固著於 ELISA 平盤上後，多株抗體會和抗原（維生素 D3）有專一性之結合，當兩者之結合量越多時所測得之 OD 值其數值也越大。實驗結果顯示當抗維生素 D3 之多株抗體濃度越高時，所測得之 OD 值也越大(如圖 4.12)，推論抗維生素 D3 之多株抗體濃度增高時，和維生素 D3 結合的量也增多。

競爭型酵素免疫方法方面，其反應過程如圖 4.15，當維生素 D3 濃度越高時，其和多株抗體的結合數目相對增加，因此會剩餘較少之多株抗體和平盤上之維生素 D3 結合，所測到之 OD 值會越低。圖 4.13 之實驗結果也得到一致結果，顯示維生素 D3 之濃度和測到之 OD 值呈現負相關。

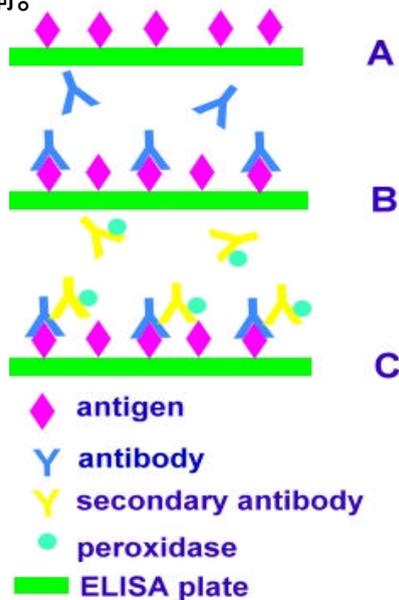


圖 4.14 直接型 ELISA。將維生素 D3 固定於平盤表面，在加入不同濃度之多株抗體後，和二級抗體混合均勻後再加入受質進行呈色。

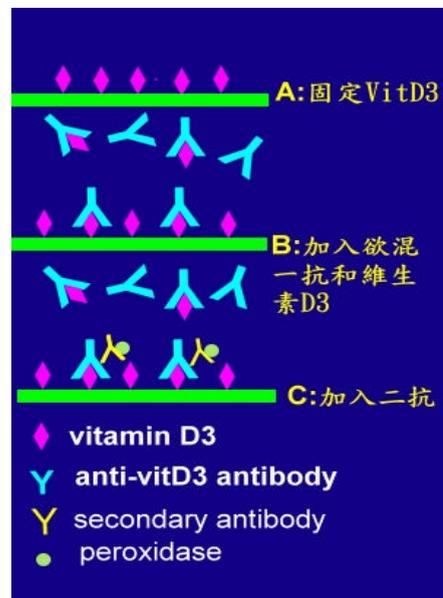


圖 4.15 競爭型 ELISA。將維生素 D3 固定於平盤表面，將維生素 D3 與其多株抗體預混後再加入平盤內反應，之後和二級抗體混合均勻再加入受質進行呈色。

根據以上結果發現利用直接型及競爭型酵素免疫方法檢測維生素 D3 與其多株抗體之反應均具其可行性。直接型酵素免疫方法中可以進一步證明抗體和抗原結合之專一性，競爭型之免疫分析方法檢測之結果，其 R^2 值為 0.97 較接近於 1，可以建立一標準曲線，可應用於含有維生素 D3 之食品進行定量檢測。

第四節 利用表面膜漿共振技術檢測標準品維生素 D3

4-1 感應晶片之製備：活化、固定抗體與去活化過程

感應晶片的製備，包括晶片表面的活化、鍵合物 (ligand) 的固定與去活化反應 (圖4.16)。

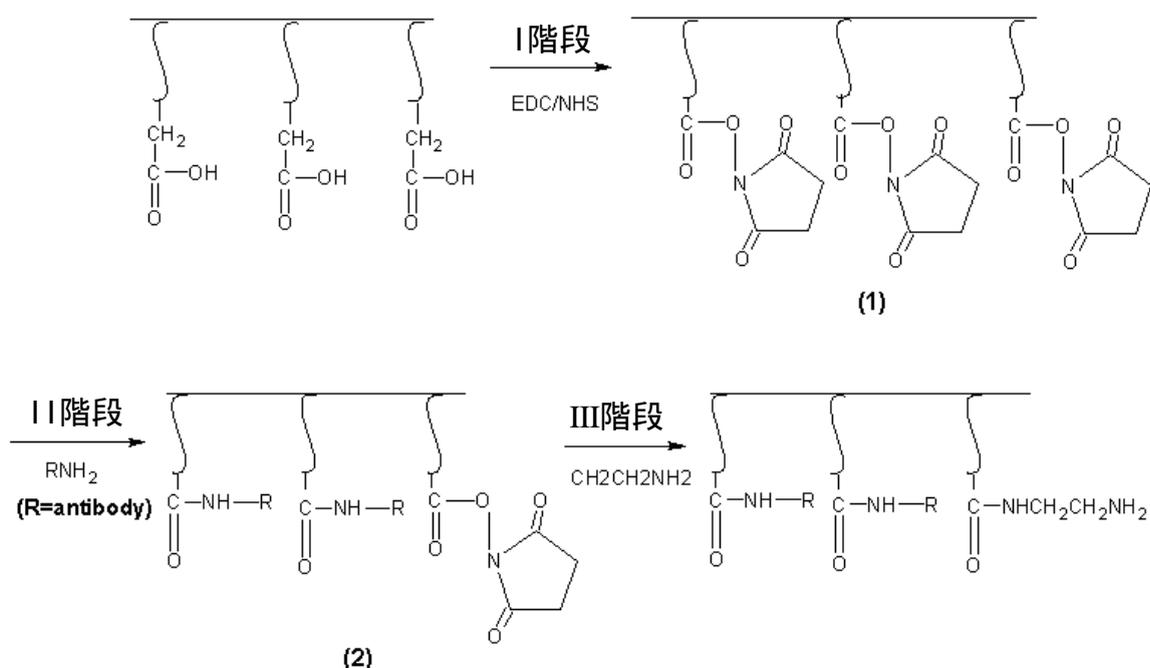


圖 4.16 CM5 感應晶片表面之活化、抗體之固定及感應晶片表面之去活化。圖中標示 I 之階段為感應晶片表面之活化反應 (activation): 利用活化試劑 NHS (0.05 M) / EDC (0.2 M) (50 : 50 v/v) 使感應晶片表面上羧基的碳原子上產生親電子 (electrophilic) 的狀態(1), 而趨向於親核 (nucleophilic) 之胺基反應形成醯胺鍵 (amide bond) (2)。圖中標示為 II 的階段為進行感應晶片表面上鍵合物的固定反應 (immobilization): 本實驗中將抗維生素 D3 之多株抗體固定於晶片表面, 感應晶片上之官能基呈現活化狀態(1), 多株抗體中的親核之胺基 NH_2 會與感應晶片表面上已活化 methylcarboxyl 之官能基, 缺電子的羧基之碳原子 ($-\text{C}$) 產生共價鍵結。III 的階段為感應晶片之去活化 (deactivation): 注入 0.1M ethanolamine hydrochloride 將感應晶片上已被活化之官能基, 但未鍵結上抗維生素 D3 之多株抗體之官能基覆蓋, 此一過程為感應晶片之去活化。

4-2 固定抗維生素D3之多株抗體及goat-anti rabbit Fc IgG antibody於CM5感應晶片

實驗之策略為(一) 將抗維生素D3之多株抗體固定於晶片上，分析物為維生素D3，(二) 將goat-anti rabbit IgG antibody固定於感應晶片上，注入抗維生素D3之多株抗體與goat-anti rabbit IgG antibody進行結合反應後，將系統設定在不清洗的模式下，不具專一性之部分會慢慢解離，再注入標準品維生素D3與抗維生素D3之多株抗體進行結合如(圖4.17)

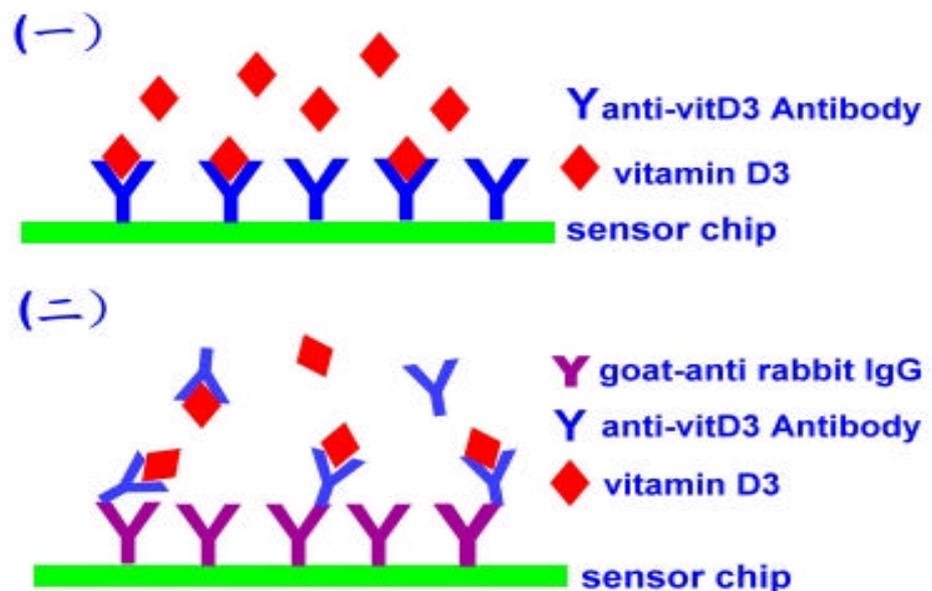


圖4.17 固定不同鍵合物於CM5感應晶片。(一)為固定抗維生素D3之多株抗體於感應晶片上，分析物是維生素D3。(二)固定goat-anti rabbit IgG antibody於感應晶片上後先注入抗維生素D3之多株抗體，再注入不同濃度之維生素D3。

4-2-1 固定抗維生素D3之多株抗體於CM5感應晶片

根據圖4.15之感應晶片之活化、感應晶片之固定及表面之去活化過程。本實驗設計之一是將抗維生素D3之多株抗體固定於CM5之感應晶片表面(圖4.18)。固定抗體於感應晶片表面之感應分析圖中其中I的階段為感應晶片的活化反應，II的階段為感應晶片表面多株抗體之固定，III的階段為感應晶片表面的去活化反應。

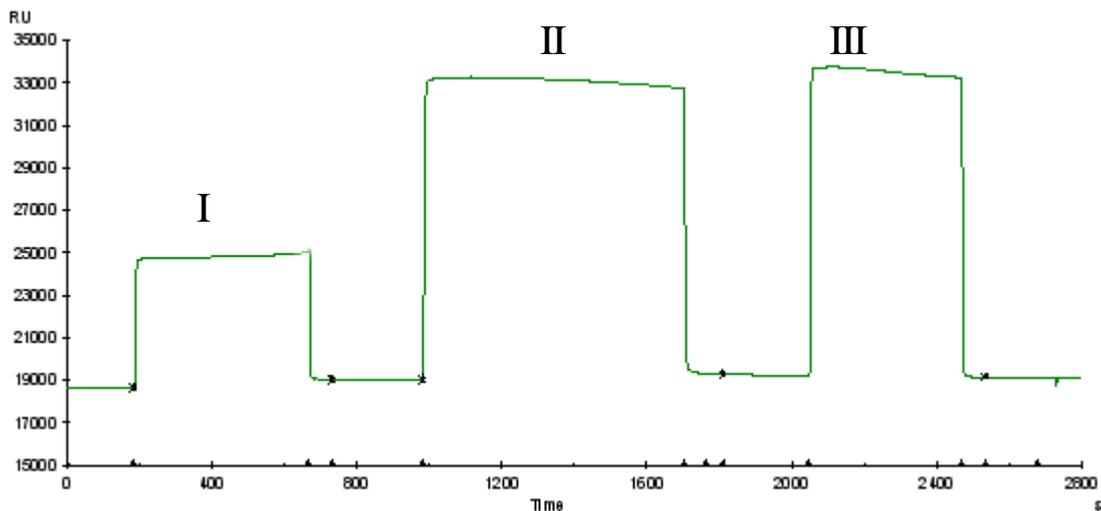


圖4.18 固定抗體於感應晶片表面之感應分析圖。感應晶片之製備包括：表面之活化(activation)、抗體之固定(immobilization)與表面之去活化作用(deactivation)。感應分析圖之縱軸為RU(resonance unit)值，橫軸為時間(秒)。圖中標示為I的階段為感應晶片的活化反應：取35 μ l的NHS(0.05M)/EDC(0.2 M)(50:50 v/v)均勻混合後，注入微射流檢測系統中。圖中標示II的階段為感應晶片表面多株抗體之固定：在感應晶片活化後3分鐘內，將50 μ l抗維生素D3之多株抗體(1.1 mg溶解於1 ml 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.5)注入微射流系統中，以完成抗體之固定反應。圖中標示III的階段為感應晶片表面的去活化反應：取55 μ l, 0.1M之ethanolamine hydrochloride注入微射流系統以後，覆蓋住感應晶片上尚未與抗維生素D3之多株抗體鍵結之官能基，藉以避免任何不當的吸附(non-specific binding)。當晶片表面固定化完成後，觀察到RU值在固定反應之前後總共增加了393RU。

感應晶片於固定多株抗體後其RU值總共增加了393 RU，經過了24小時使其系統穩定後，進行分析物之分析。

4-2-2 固定goat-anti rabbit Fc IgG antibody於CM5感應晶片
實驗上另一設計是將感應晶片上固定上goat-anti rabbit Fc IgG antibody，其活化、固定及去活化過程均和3-1相同。

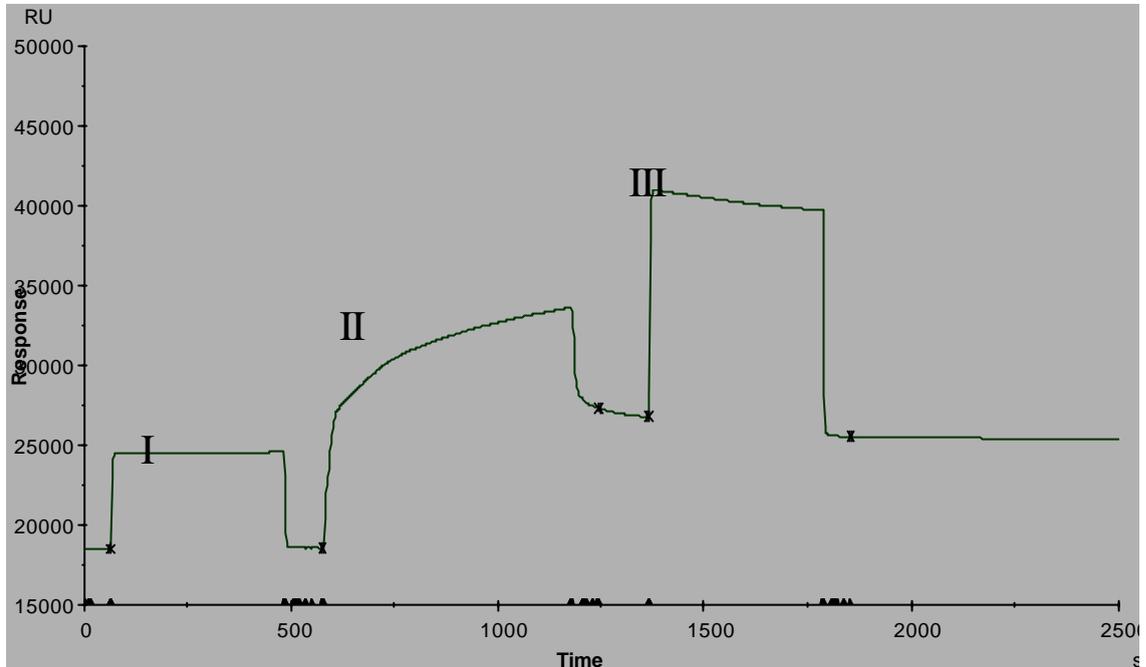


圖4.19 固定抗體於感應晶片表面之感應分析圖。感應晶片之製備包括：表面之活化 (activation)、抗體之固定 (immobilization) 與表面之去活化作用 (deactivation)。感應分析圖之縱軸為RU (resonance unit) 值，橫軸為時間 (秒)。圖中標示為I的階段為感應晶片的活化反應：取35 μ l 的NHS (0.05M) /EDC (0.2 M) (50 : 50 v/v) 均勻混合後，注入微射流系統中。圖中標示II的階段為感應晶片表面goat anti-rabbit Fc IgG antibody之固定：在感應晶片活化後3分鐘內，將50 μ l goat anti-rabbit Fc IgG antibody (100 μ g溶解於1 ml 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.5) 注入微射流系統中，完成抗體之固定反應。III的階段為感應晶片表面之去活化反應：取55 μ l 0.1M ethanolamine hydrochloride注入微射流系統中以後，覆蓋住感應晶片上尚未與coat anti-rabbit Fc IgG antibody結合，藉以避免任何不當的吸附 (non-specific binding)。當晶片表面固定化完成後，觀察到RU值在固定反應之前後總共增加了6299 RU。

感應晶片於固定多株抗體後其RU值總共增加了6299 RU，經過了24小時使其系統穩定後，進行分析物之分析。

4-3 SPR方法標準曲線的製作

4-3-1 SPR 分析標準品維生素 D3 和抗維生素 D3 多株抗體之交互作用

維生素D3標準品之起始濃度為9.675 μM ，經由序列稀釋至0.75 μM 後，取出70 μl 注入流速設定於5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的微射流系統中，當樣品流經固定有抗維生素D3之多株抗體的感應晶片時，會造成RU值的變化，且隨著濃度的增加，RU值也有上升的情形（圖4.20）。

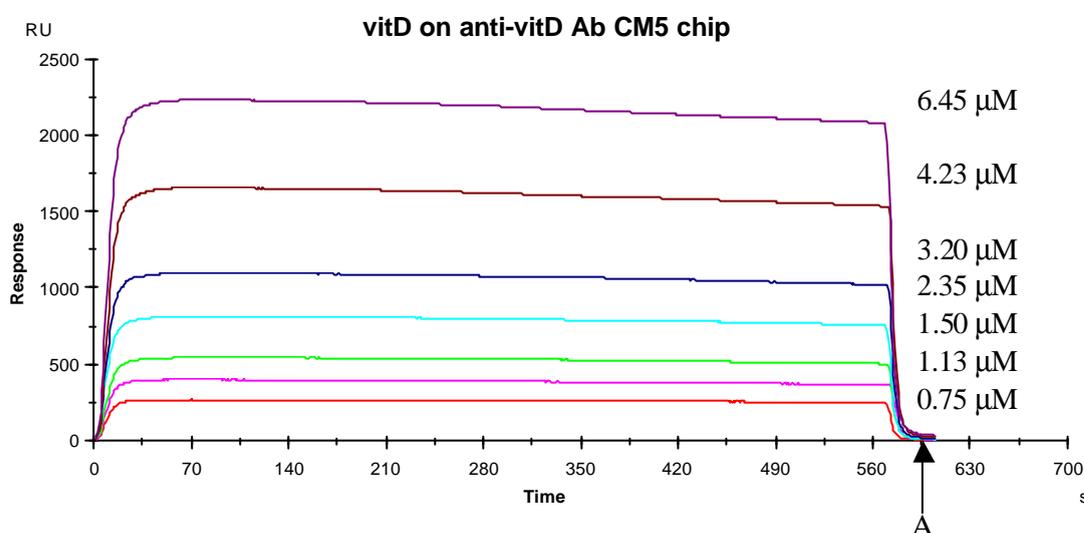


圖 4.20 利用 SPR 分析維生素 D3 標準品之感應分析圖。不同濃度之維生素 D3 其會和感應晶片上的多株抗體進行結合，當注射完成時系統中的緩衝溶液會以高速的流速清洗感應晶片表面，使非專一性結合的部分洗去，因此 RU 值又會回到剛注射時的值。

不同濃度之維生素 D3 其會和感應晶片上的多株抗體進行結合，當維生素 D3 濃度越高時，經由儀器檢測出之 RU 值也越高，維生素 D3 和抗維生素 D3 多株抗體進行結合反應時，需要用 15 mM 的 NaOH 進行感應晶片表面之再生作用（regeneration），才能使感應晶片回到基礎線（baseline）。

經由 BIAcore X 儀器檢測後，所得到之感應圖後，分析數據將結果整理於表 4.3。再利用 Excel 軟體繪製成圖（圖 4.21）。

表 4.3 標準品維生素 D3 和抗維生素 D3 之多株抗體以 BIAcore X 儀器檢測之結果

標準品維生素 D 濃度(μM) ^a	RU ^b
0.75	8.5
1.125	7
1.5	12.2
2.35	12.4
3.2	16.8
4.23	18.9
6.45	34.6
9.675	44.7

^a 維生素 D 之起始濃度為 9.675 μM

^b 表示樣品注入完成後，微射流系統以高流速沖洗晶片表面後，不具專一性的部分會被洗去，所得之 RU 是具專一性和固定之鍵合物結合之物質，RU 則是最後清洗完之 RU 和注射前之 RU 差異

利用表面膜漿共振技術（Surface Plasmon Resonance, SPR）檢測固定於感應晶片上之抗維生素 D3 之多株抗體和維生素 D3 標準品之間交互作用，其感應分析圖如圖 4.20，觀察發現當維生素 D3 濃度越高時，其因為質量濃度變化所反應出的 RU 值也相對的提高，當樣品（維生素 D3）注射完之後，系統將以緩衝液高流速沖洗感應晶片表面，此時不具專一性的部分會被洗去，而感應晶片所固定之抗維生素 D3 之多株抗體和維生素 D3 具專一性結合部分所呈現之 RU 值即為 RU，如圖 4.20 A 部分。

根據表 4.3 中所列之不同濃度維生素 D3 及 RU 值，利用 Excel 軟體繪製出的標準曲線圖，結果發現其兩者具有劑量上之關係，且其 R^2 為 0.98。

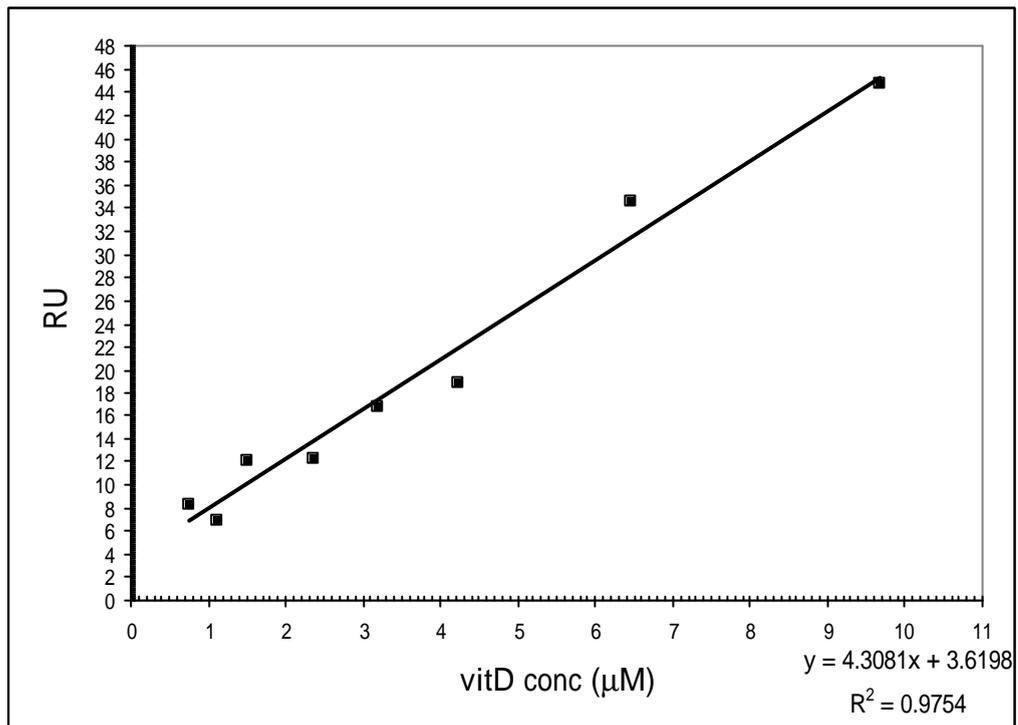


圖 4.21 SPR 分析不同濃度之維生素 D3 之曲線圖。序列稀釋原始濃度 9.675 mM 維生素 D3 後，進行檢測，將檢測後的 RU 值和維生素 D3 的濃度以 Excel 軟體繪圖。

利用不同濃度之維生素 D3 和 RU 所建立之標準曲線，可得到一方程式為 $y=4.3081x + 3.6198$ ，利用此方程式，日後可以進行市售食品中維生素 D3 含量之檢測，

4-3-2 SPR 分析標準品維生素 D3 和 anti-NTX 抗體之交互作用
實驗中須更進一步確定抗原及抗體之間的專一性,我們利用標準品維生素 D3 和一個對維生素 D3 不具專一性的抗體 anti-NTX antibody 進行抗原及抗體的交互作用。實驗中發現雖當維生素 D3 濃度越高,測到之 RU 值也越高如(圖 4.22)。

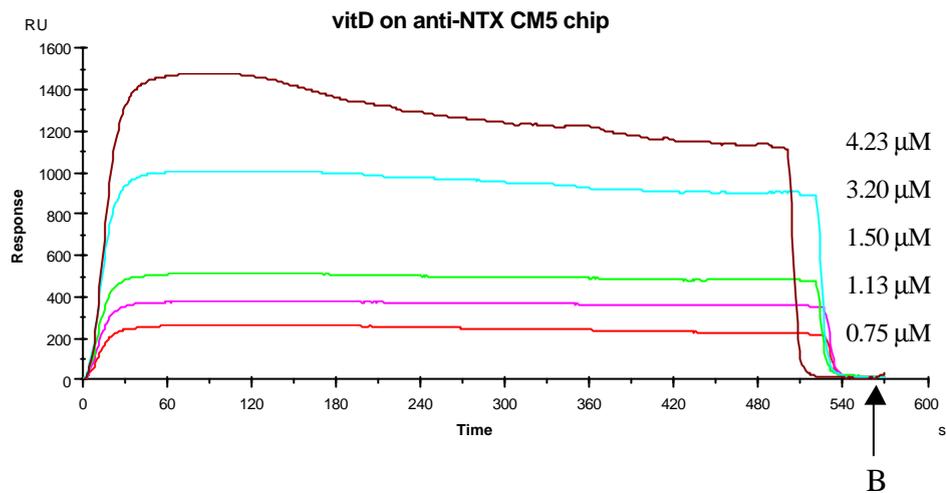


圖 4.22 注入標準品後經過 SPR 分析之感應圖(sensorgram), 不同濃度之維生素 D 和 anti-NTX antibody 反應, 當注射完成時系統中的緩衝溶液會以高速的流速清洗感應晶片表面, 使非專一性結合的部分洗去, 因此 RU 值又會回到剛注射時的值。

當樣品注射完成, 微射流系統利用高速的緩衝溶液(HBS buffer) 清洗感應晶片表面, 非專一性的部分會被沖洗掉, 最後所呈現的 RU 值如(圖 4.22, B 部分)。將所測得之結果整理於表 4.4。

經由 BIAcore X 儀器檢測後，所得到之感應圖後，分析數據將結果整理於表 4.3。

表 4.4 不同濃度之維生素 D 和 anti-NTX Ab 以 BIAcore X 儀器檢測的結果。

維生素 D 濃度(μM) ^a	RU ²
control	0.2
0.75	17.8
1.125	22.9
1.5	21.2
2.35	22.4
3.2	22.7
4.23	29.5

^a維生素 D 之起始濃度為 4.23 μM

^b表示樣品注入完成後，微射流系統以高流速沖洗晶片表面後，不具專一性的部分會被洗去，所得之 RU 是具專一性和固定之鍵合物結合之物質，RU 則是最後清洗完之 RU 和注射前之 RU 差異

不同濃度之維生素 D3，經由 BIAcore X 儀器檢測後，當樣品注射完成後，在正常模式下 (normal wash) 以高速之緩衝溶液沖洗感應晶片表面後，所得之 RU 值，並沒有隨著濃度的增加而 RU 值增大，反而停留在 RU 約 22 的數值左右，顯示維生素 D3 對於其他抗體之結合能力較抗維生素 D 之多株抗體較低，且其呈現之 RU 值推測可能為不當之吸附所造成。而當維生素 D 的濃度在 4.23 μM 時，感應分析圖之曲線其結合情形有下降的情形，更可以進一步的說明維生素 D3 和其他的抗體並不具有專一性的結合。

表 4.4 所得之結果利用 Excel 軟體繪製出格線圖如圖 4.23, 發現濃度和 RU 值的變化並沒有相關性。

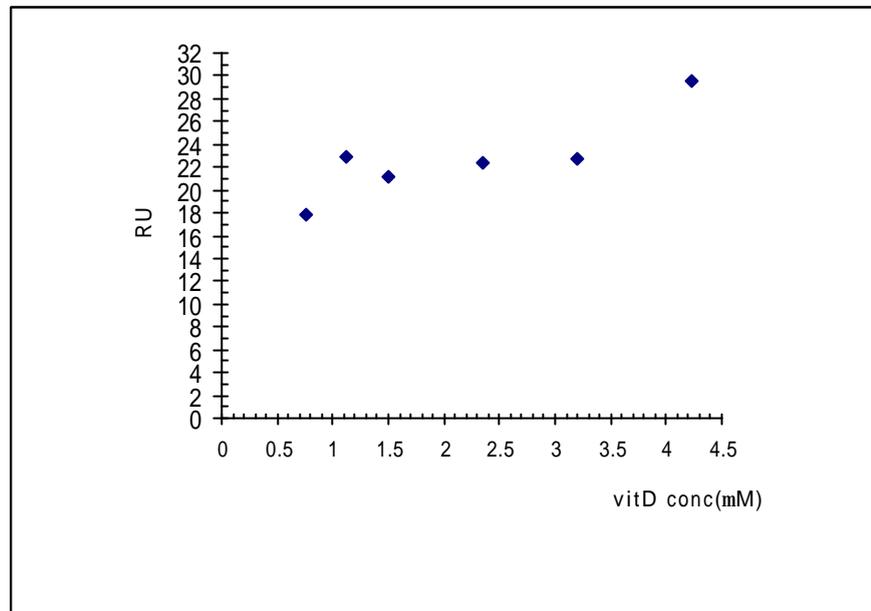


圖 4.23 以 SPR 技術所建立之維生素 D3 之標準曲線圖。將 4.23 μM 維生素 D3 進行序列稀釋，取出 70 μl 注入固定有 anti-NTX antibody 之感應晶片之微射流系統中，流速設定於 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 進行檢測，所得到之 RU 值和維生素 D3 的濃度以 Excel 軟體繪圖，其中 X 軸為維生素 D 的濃度，Y 軸為所得之 RU 值。

利用 BIAcore X 儀器檢測後發現標準曲線圖並未呈現一線性相關，當維生素 D3 之濃度增高，經由儀器所檢測出之 RU 值並未隨著增高，由圖 4.23 也可以發現抗原及抗體之間並未呈現劑量相關性，因此維生素 D3 的濃度改變，並不會影響其和 anti-NTX antibody 的結合，由此結果更可進一步說明了實驗中的抗原(維生素 D3) 不會和其他抗體有專一性反應。

4-3-3 SPR 分析維生素 E 和抗維生素 D3 之多株抗體之交互作用

維生素 E 之原始濃度 $79.8 \mu\text{M}$ 以 70 % 乙醇序列稀釋後，分別注入固定有抗維生素 D3 之多株抗體之感應晶片表面，樣品注射完成後，微射流系統會以高流速來清洗感應晶片表面，不具專一性結合的部分會被沖洗掉，所呈現之感應分析圖如圖 4.24。

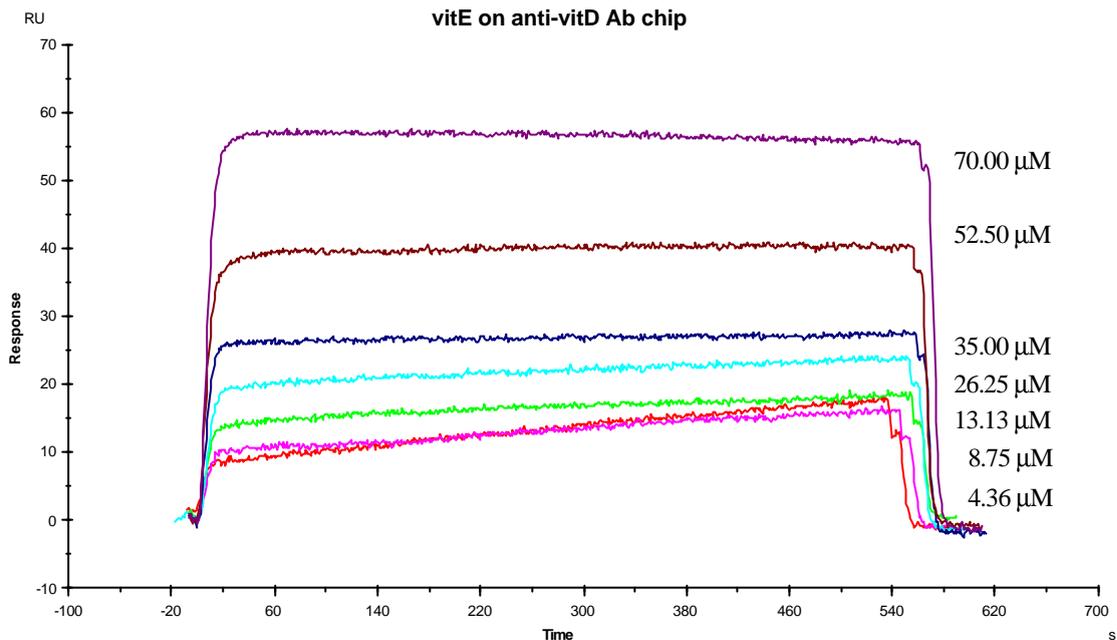


圖 4.24 注入維生素 E 後經過 SPR 分析之感應圖 (sensorgram)。BIAcore X 儀器檢測不同濃度之維生素 E 和固定於感應晶片上之抗維生素 D3 之多株抗體之交互作用，當維生素 D3 注射完成後，微射流系統中的緩衝溶液會以高速的流速清洗感應晶片表面，使非專一性結合的部分洗去，其 RU 值會回到未注射樣品時之 RU。

不同濃度之維生素 E，經由 BIAcore X 儀器檢測後，微射流系統以高速緩衝溶液沖洗感應晶片表面後，與抗維生素 D3 之多株抗體不具專一性的部分會解離後，所得到的 RU 值為專一性結合的部分如 (表 4.5)。

經由 BIAcore X 儀器檢測後，所得到之感應圖後，分析數據將結果整理於表 4.5。

表 4.5 不同濃度之維生素 E 和 anti-vitamin D Antibody 在 BIAcore X 儀器檢測的結果。

vitamin E conc.(μM) ^a	RU ₁ ^b	RU ₂ ^c
4.36	-1.3	0.4
8.75	-0.7	-0.4
13.125	2.2	0.7
26.25	0.5	-0.9
35	1.8	1.2
52.5	1.1	0.9
70	2.7	1.8

^a維生素 E 標準品原始濃度為 70 μM

^b RU 為當樣品注射完經由微射流系統清洗後之 RU 值和未注射前之 RU 值差異，RU₁ 則是第一次實驗的結果

^c RU₂ 則是第二次實驗的結果

由表 4.5 中可得知維生素 E 和抗維生素 D3 之多株抗體之結合能力非常弱，所偵測出之 RU 值甚至有負值的情形。即使將維生素 E 的濃度提高至 70 μM 後其和感應晶片上之多株抗體的結合能力仍然很低，結果顯示其他抗原(如維生素 E)和抗維生素 D3 之多株抗體並不具有專一性結合能力。

不同濃度的維生素 E 和 RU 利用 Excel 軟體作圖如(圖 4.25), 其濃度和所反應的 RU 值並未成正比, 因此可知抗維生素 D3 之多株抗體和其他的反應物質並不具有抗原抗體間的專一性。

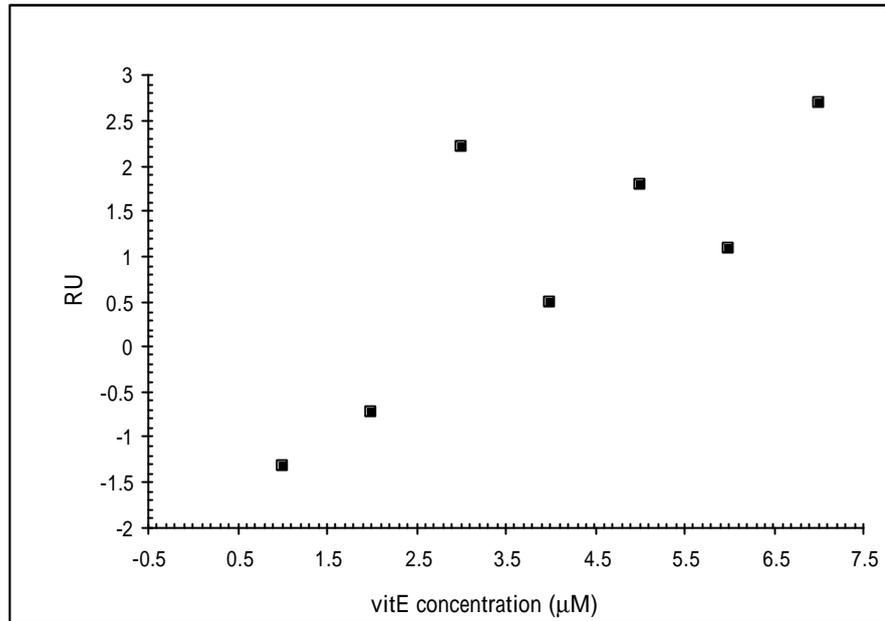


圖 4.25 以 SPR 技術所建立之維生素 DE 之標準曲線圖將 70 µM 維生素 E 進行序列稀釋後, 注入 BIAcore X 儀器之微射流系統中進行檢測, 檢測後的 RU 值和維生素 E 的濃度以 Excel 軟體繪圖, 其中 X 軸為維生素 E 的濃度, Y 軸為所得之 RU 值。

根據前述兩種對照方法所檢測的結果發現維生素 D3 和 anti-NTX antibody 並沒有專一性, 而我們所製備的抗體其和其他物質也不具專一性 (例如: 維生素 E)。因此標準品維生素 D3 和抗維生素 D3 之多株抗體進行 BIAcore X 儀器分析後, 當維生素 D3 的濃度越高時, 其和抗維生素 D3 之多株抗體的結合力量也越強, 結果顯示維生素 D3 與其多株抗體具專一性結合後, 最後需要以 15 mM 的 NaOH 進行感應晶片表面之再生作用 (regeneration), 才能使感應晶片回到基礎線 (baseline)。

4-4 市售牛奶中維生素 D3 的萃取之確認

牛奶中富含有許多蛋白質、礦物質及維生素，而其中以脂溶性維生素其因為不溶於水的特性，需要以有機溶劑來進行萃取。根據 7-3-2 之萃取方法所得到之維生素 D3，必須和維生素 D3 之標準品進行比對確認，因此先將維生素 D3 標準品以高壓液相層析儀 (HPLC) 在波長 265nm 下，移動相為 acetonitrile/methanol (90:10)，流速設定於 1.5 ml/min，進行實驗[56]，其在 9.15 分鐘有一吸收峰 (圖 4.26)。再將所萃取的維生素 D3 利用相同方法進行分析也發現，在 8.97 分鐘有一吸收峰 (圖 4.27)。

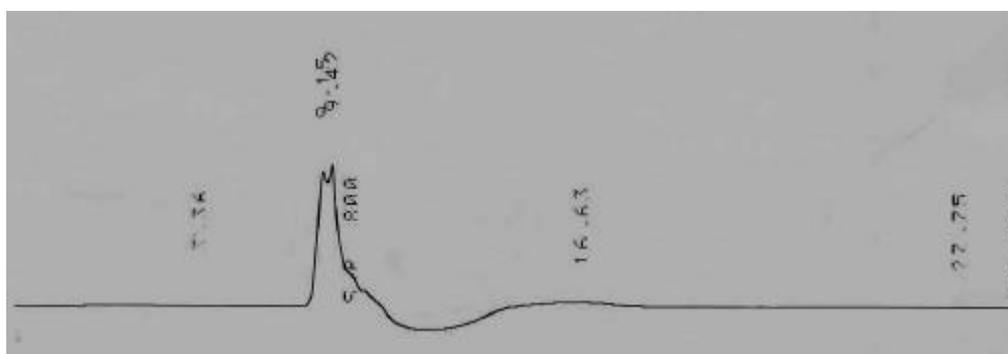


圖 4.26 標準品維生素 D3 HPLC 層析譜圖。

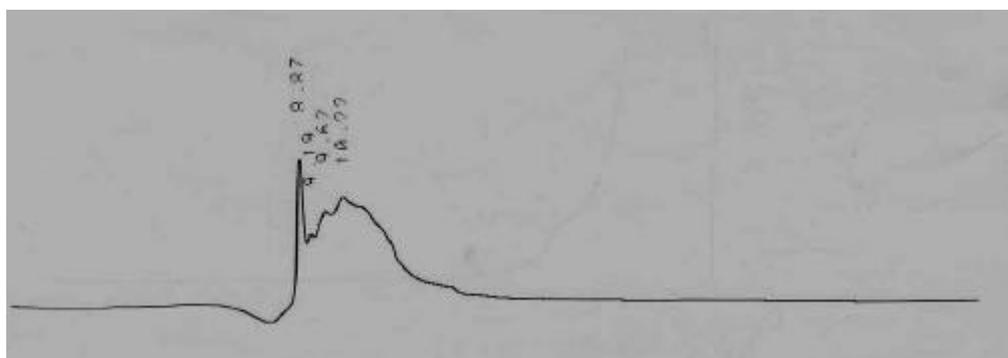


圖 4.27 萃取得到之維生素 D3 之 HPLC 層析譜圖。萃取市售奶粉其中之維生素 D3 後，以 HPLC 分析發現於 8.87 分鐘有最大吸收峰。

圖 4.26 中為維生素 D3 標準品之層析譜圖，在 9.15 分鐘有一吸收波長，而萃取後所得到之維生素 D3，其層析譜圖在 8.87 分鐘也有一吸收峰，此吸收峰面積較大的原因推測可能含有其他化合物可能包括其他脂溶性維生素 A、E 和 K。

4-5 比較 HPLC、ELISA 和 SPR 方法偵測維生素 D3 和其多株抗體之結果

在國內偵測食品中維生素 D3 的方法，目前藥物食品檢驗局是參考 2000 年美國藥典中，營養補充品篇中所提出之方法進行測試，首先將含有維生素 D3 之藥錠磨碎，加入 hexane 進行重複萃取的步驟後，利用室溫下真空乾燥將萃取後產物進行濃縮，再利用層析法分析標準品及萃取後的產物，記錄層析圖譜及吸收峰的高度後，帶入所制定的公式： $1.09C(L/D)(r_u/r_s)$ 中可計算出維生素 D 的含量 [10]。

ELISA 免疫分析方法一般常用在檢驗血清或血漿中 25-hydroxyvitamin D3，本實驗設計是將維生素 D3 固定在 ELISA 的平盤上，利用直接型及競爭型 ELISA 免疫分析方法來檢測維生素 D3 與其多株抗體之專一性。結果顯示直接型 ELISA 分析方法中，所得結果 R^2 為 0.92，此一方法可以證明抗原及抗體之專一性。競爭型 ELISA 免疫分析方法中，利用維生素 D3 與其多株抗體先欲混反應後在加入平盤中，發現所加入之維生素 D3 濃度越高其 OD 值就越小，根據實驗結果可繪製出一標準曲線， R^2 為 0.97。

利用 SPR 技術來偵測維生素 D3 與其多株抗體之交互作用中，利用將抗維生素 D3 之多株抗體固定於感應晶片上，先進行標準品的分析，其偵測出之 RU 值繪製成標準曲線， R^2 值為 0.97，顯示抗體及抗原之專一性。將含有維生素 D3 之食品，實驗中選用市售之奶粉以緩衝液溶解後，進行真空過濾，利用 SPR 分析後所得之結果，推算出一方程式可進一步推算出維生素 D3 之含量。

目前國內一般利用 HPLC 的定量維生素 D 的方法是根據國外的方法進行測試中，而在純化之前的萃取步驟，其耗費時間較長且萃取後之化合物可能還含有其他成分，因此準確性可能須進一步評估。另外 ELISA 免疫分析方法中，目前均使用在檢體 25-hydroxyvitamin D3 的定量，實驗中首先將維生素 D3 固定在平盤上，此一方法可應用於食品中維生素 D3 的定量，但其固定維生素 D 在 ELISA 平盤上具有其難度在，並且平盤上所固定的聚合物 polystyrene 的均質性不一致，使得實驗的重複性不高。因此本實驗策略將以表面膜漿共振 (SPR) 技術進行維生素 D3 的定量。利用 SPR 進行分析，優點為樣品的製備只須將待測物以緩衝溶液溶解後，再進行序列稀釋即可進行分析，具有分析時間短，感應晶片可重複使用，可降低成本及人力。

4-6 利用 BIAcoreX 儀器檢測牛奶中之維生素 D3

4-6-1 標準品測定

將抗維生素 D3 之多株抗體先注入固定有 goat anti-rabbit Fc IgG 之感應晶片上，儀器之注入的模式設定為不清洗的模式 (non wash)，當樣品注入結束後，再注入不同濃度之維生素 D3 標準品，最後再利用 50 mM NaOH 進行感應晶片表面之再生作用 (regeneration)，反應偵測之結果紀錄於感應分析圖 (圖 4.28)。

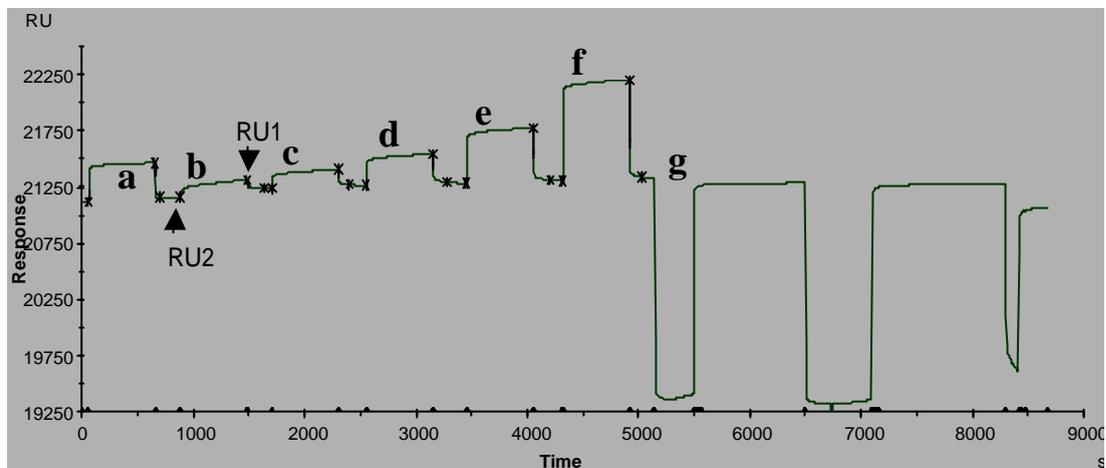


圖 4.28 標準品與多株抗體反應之感應分析圖 (sensorgram)。首先將抗維生素 D3 之多株抗體注入固定有 goat anti rabbit Fc IgG antibody 之感應晶片 (a)，注入模式設定於不清洗的模式 (non wash) 後，將不同濃度之維生素 D3 注入微射流系統中，反應後所產生不同的訊號分別為 (b、c、d、e 和 f)，最後再利用 50 mM NaOH 進行感應晶片表面之再生作用 (g)，使 RU 值回到實驗未注射入樣品前的基礎線。

抗維生素 D3 之多株抗體注入固定有 goat anti rabbit Fc IgG antibody 之感應晶片中，如圖 4.28 中 a 階段，將系統設定於不清洗的模式下後所得之 RU 值增加為 80.1RU 後，再注入不同濃度之維生素 D3，分別為圖 4.28 中 b、c、d、e 和 f 階段，分別紀錄樣品注射後完成的 RU 值 (RU1) 及在不清洗模式後具專一性的部分之 RU 值 (RU2)，最後再利用 50 mM NaOH 進行感應晶片之再生作用 (g)。

利用所得到之感應分析圖，其 RU 值之變化，結果整理於表 4.6。首先將抗維生素 D3 之多株抗體注入固定有 goat anti rabbit Fc IgG antibody 之感應晶片上，當注入完成後其 RU 較為注入前上升了 419.2 RU，樣品注入完成後在不清洗的模式下，不具專一性之抗體會逐漸解離，最後未解離和抗原結合的則是具專一性的部分，RU 增加了 80.1RU。

表 4.6 不同濃度之維生素 D 與其多株抗體作用後 RU 值之變化

維生素 D 濃度 (μM)	RU1 ^a	RU2 ^b
2.225	164.9	58.4
3.125	217.6	42
4.18	312.4	40.7
6.25	419.2	39.8
9.375	634.6	39.4
12.75	865.3	42.1

^a當樣品注射完成後之 RU 值 (圖 4.25, ?RU1)

^b樣品注射完成後之 RU 值以不清洗模式下所得之 RU 值 (圖 4.25, ?RU2)

根據實驗結果，在此提出一個公式，將表 4.6 所得的 ?RU1 和 ?RU2 值帶入公式中 $y=ax+bk$ ，公式中之 $y=?RU1$ 、 $x=?RU2$ ， k = 維生素 D3 之濃度，舉例來說：維生素 D 在 $6.25\mu\text{M}$ 濃度下時，所得之 ?RU1 為 419.2，而 RU2 為 40.7，代入 $y=ax+bk$ 後，所得到的公式為 $419.2 = 40.7a + 6.25b$ 。另外維生素 D3 在 $9.375\mu\text{M}$ 濃度下時，將 ?RU1 代入 634.6，而 RU2 代入 39.8，所得到的公式為 $634.6 = 39.8a + 9.375b$ ，根據此兩個方程式中所求出之 a、b 值，再以相同的代法將實驗所得之 ?RU1 和 RU2 代入公式中，將所求出之 a、b 值加以平均後得到 a 值為 0.186 而 b 值為 68.37，所以此維生素 D 之標準方程式為 $y= 0.186x + 68.37k$ 。

4-6-2 市售牛奶中維生素 D 的分析

由市售奶粉中取出 571.1 mg，溶於 10 ml 的 HBS buffer 中，經過真空過濾將較大分子除去後，稀釋成 1/8 之濃度後，將此濃度的溶液作為 stock solution，分別序列稀釋至 1/16 之濃度，其維生素 D3 的含量為 1.425 ng/μl，每次實驗進行時取出 70 μl 注入微射流系統中，其中維生素 D 含量為 99.75 ng，稀釋後其維生素 D 含量整理於表 4.7。

表 4.7 市售奶粉稀釋後維生素 D3 之含量

市售奶粉 (mg/ml)	維生素 D3 含量 (ng) ^a
7.1	99.75
3.55	49.89
1.77	24.93
0.88	12.47
0.44	6.234

^a稀釋奶粉中維生素 D3 之含量

將序列稀釋後的奶粉經由計算後所得到，不同濃度之牛奶稀釋樣品所含之維生素 D3 的量也不同，表 4.7 中維生素 D3 的含量是取 70 μl 之樣品中維生素 D3 的含量，實驗是以 70 μl 注入 BIAcore X 儀器後進行檢測，收集數據並進行分析。

在 BIAcore X 儀器，首先注入抗維生素 D3 之多株抗體至固定有 goat anti-rabbit Fc antibody 之感應晶片上，注入的模式設定於不清洗的模式 (non wash)，當多株抗體注入結束後，再注入不同濃度之牛奶稀釋液，當樣品均注射完成後，以 50mM NaOH 進行感應晶片表面之再生作用 (regeneration)，使 RU 值回到未注射樣品前之 RU 值，反應偵測之結果紀錄於感應分析圖 (圖 4.29)。

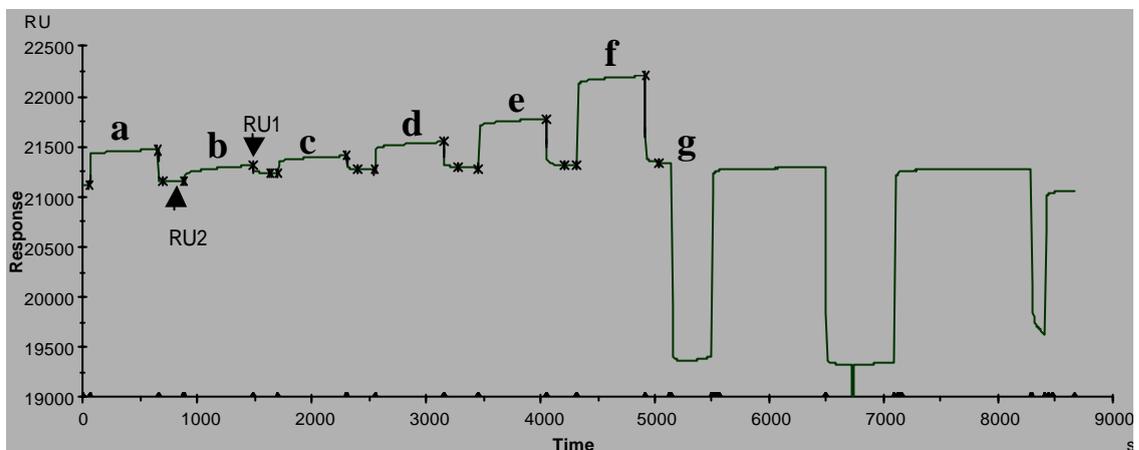


圖 4.29 市售奶粉中之維生素 D3 與多株抗體之感應分析圖。首先將抗維生素 D3 之多株抗體注入固定有 goat anti rabbit Fc IgG antibody 之感應晶片 (a)，注入模式設定於不清洗的模式 (non wash) 後，將不同濃度之奶粉稀釋液注入微射流系統中，反應後所產生不同的訊號分別為 (b、c、d、e 和 f)，最後再利用 50 mM NaOH 進行感應晶片表面之再生作用 (g)，使 RU 值回到未注射入樣品前的基礎線。

抗維生素 D3 之多株抗體注入固定有 goat anti rabbit Fc IgG antibody 之感應晶片中，如圖 4.29 中 a 階段，將系統設定於不清洗的模式下後所得之 RU 值增加為 211.3RU 後，再注入不同濃度之牛奶稀釋液，分別為圖 4.29 中 b、c、d、e 和 f 階段，分別紀錄樣品注射後完成的 RU 值 (RU1) 及在不清洗模式後具專一性的部分之 RU 值 (RU2)，最後再利用 50 mM NaOH 進行感應晶片之再生作用 (g)。

將抗維生素 D3 之多株抗體注入固定有 goat anti rabbit Fc IgG antibody 之感應晶片上，當注入完成後，RU 值較注入前上升了 323.3 RU，再注入含有維生素 D3 的牛奶稀釋樣品，注入完成後在不清洗的模式下，不具專一性之抗體會逐漸解離，最後牛奶中之維生素 D3 和抗維生素 D3 之多株抗體結合的則是具專一性的部分（圖 4.29, ?RU2），RU 值增加了 211.3RU。將所觀察到 RU 值的變化整理於表 4.8。

表 4.8 不同濃度牛奶稀釋液與多株抗體作用後 RU 值的變化

稀釋後牛奶濃度 (mg/ml)	RU1 ^a	RU2 ^b
7.1	964.8	184.8
3.55	606.6	165.2
1.77	399.5	143.9
0.88	271.1	107.8
0.44	178.1	32.1

^a當樣品注射完成後之最高點之 RU 值（圖 4.29, ?RU1）

^b樣品注射完成後之 RU 值以不清洗模式下所得之 RU 值
（圖 4.29, ?RU2）

根據表 4.8 中所得之 ?RU1 及 ?RU2 值帶入由標準品維生素 D3 之計算公式 $y = 0.186x + 68.37k$ 中換算出牛奶中的維生素 D3 之濃度 (K)，y 帶入 RU1 之數值，x 則帶入 RU2 之數值，計算出 k 值（牛奶中維生素 D3 之濃度），再利用所換算出的濃度計算出維生素 D3 微克數。計算結果整理於表 4.9。

表 4.9 BIAcoreX 儀器檢測稀釋後牛奶所含維生素 D3 之毫克數。

奶粉濃度 (mg/ml)	維生素 D 濃度 ^a (μ M)	維生素 D3 含量 ^b (μ g)
7.1	13.6	0.3664
3.55	8.4228	0.2268
1.77	5.4575	0.14
0.88	3.67192	0.0988
0.44	2.517	0.06778

^a利用 ?RU1 及 ?RU2 代入 $y = 0.186x + 68.37k$ 公式中之 x 和 y ，計算出 k (維生素 D3 之濃度)。

^b 根據 k 值進一步計算維生素 D3 之毫克數。

比較以 BIAcoreX 儀器檢測後牛奶中所含維生素 D3 的含量和經計算後牛奶所含之維生素 D3 的含量，結果整理如表 4.10

表 4.10 計算稀釋後牛奶和以 BIAcore X 儀器檢測後其維生素 D3 含量

奶粉濃度 (mg/ml)	維生素 D3 含量 ^a (ng)	維生素 D3 含量 ^b (ng)
7.1	99.75	366.4
3.55	49.89	226.8
1.77	24.93	140
0.88	12.47	98.8
0.44	6.234	67.78

^a計算稀釋後奶粉中維生素 D3 之含量

^b BIAcore X 儀器檢測後稀釋後牛奶中維生素 D3 之含量

利用所檢測出之 RU 值，帶入由標準品所建立之方程式，推算市售奶粉中維生素 D3 之含量，結果發現利用 BIAcore X 之生物感應器推算之毫克數遠大於實際上之奶粉中維生素 D3 之含量，結果整理於表 4.10，可能原因可能是市售奶粉為一混合物，實驗中只經過濾等前處理，也許有許多之大分子物質無法被排除，使樣品在流經感應晶片表面會有些許的不當黏附，而反應出之 RU 值會有誤差存在。因此我們將市售的牛奶進行進一步的萃取後，進行檢測。所得之 RU 值如表 4.11

表 4.11 萃取後牛奶之維生素 D3 經 BIAcoreX 儀器檢測後 RU 值

萃取後之 D3(mg/ml)	RU
0.025	5.3
0.05	11.6
0.1	29.4
0.2	55.4
0.4	170.7

將所得到之 RU 值帶入標準品之直線方程式 $y = 4.3081x + 3.6198$ 中之 y 值，換算出 x 值(即為表 4.12 中之 B 值)，另外將計算之維生素 D 的含量(表 4.12 中之 A 值)和檢測出的含量(表 4.12 中之 B 值)之比值，可得到一數值約為 6.4 如表 4.12。

表 4.12 經計算後和萃取後之維生素 D 之比值。

維生素 D3 (mg/ml)	A. ^a (μg)	B. ^b (μg)	ratio(B/A)
0.025	0.014	0.092	6.57
0.05	0.028	0.16	5.71
0.1	0.06	0.35	5.83
0.2	0.11	0.63	5.7
0.4	0.224	1.86	8.3

^a 萃取後的維生素 D 中其原始濃度含有 0.224 μg

^b 表 4.11 所得之 RU 值帶入 $y = 2.5107x - 3.2776$ 所換算的值

表 4.13 維生素 D3 經校正後含量

奶粉濃度 (mg/ml)	維生素 D3 含量 ^a (ng)	維生素 D3 含量 ^b (ng)	校正後含量 ^c (ng)
7.1	99.75	366.4	57.05
3.55	49.89	226.8	35.31
1.77	24.93	140	21.80
0.88	12.47	98.8	15.38
0.44	6.234	67.78	10.55

^a 計算稀釋後奶粉中維生素 D3 之含量

^b BIAcore X 儀器檢測後稀釋後牛奶中維生素 D3 之含量

^c 將^b之數值除以 6.4 後所得的值

因此我們提出了一個假說：假設市售奶粉中維生素 D3 的標示為正確的，經由儀器檢測出的含量需要代入標準品公式中計算出維生素 D3 的含量後，再將此含量除以一經推算後的數值 6.4 後所得之含量和實際上所標示的含量差異在 ±10 ng 之間如表 4.13，另外牛奶中濃度越高進行檢測時和實際上標示的差距越大，實驗結果中奶粉的濃度約為 0.4-1.8 mg/ml 時和標示上的值約相近，因此利用 BIAcore X 儀器在低濃度下檢測結果較為準確，當牛奶濃度越高時可能其他非專一性的物質含量越高，在進行檢測時可能會造成較大的誤差。

第五章 結論

骨質疏鬆症在現今社會之以不容忽視，此發生之症狀也有年輕化之趨勢，除了運動以外飲食也是一重要因素之一，隨著社會形態之改變外食之機會增加，所造成之結果也就是營養之不均衡，經過國民營養調查結果顯示國人之鈣的攝取量普遍不足，而鈣在體內之運送需要具活性之維生素 D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) 之輔助，因此維生素 D 之攝取量對於成長中之孩童建構一個強健的骨骼來說便顯得非常重要，維生素 D 的來源有來自食物中及經紫外線曝曬後也會產生，而維生素 D 之過多或不足都會產生問題，因此如何去定量食品中之維生素 D3 是重要且必要的。而食物中之維生素 D 又以牛奶中較為常見，目前國內使用定量食品中之維生素 D 是利用 HPLC 技術來進行檢測，其檢測方法較為繁雜，因此本實驗擬應用表面膜漿共振技術 (Surface Plasmon Resonances, SPR) 來檢測牛奶中之維生素 D3 之含量，以提供一個更具簡便且具專一性之檢測方法。

首先以製備抗維生素 D3 之多株抗體後，經一系列之純化確認後，利用 SPR 技術來檢測牛奶中維生素 D3 和多株抗體之間之交互作用。首先先以多株抗體和維生素 D3 之間進行反應，利用實驗所得之 RU 值來建立一維生素 D3 之標準曲線進行定量。首先將建立一維生素 D3 之標準曲線其方程式為 $y = 0.186x + 68.37k$ ，將待測之牛奶利用儀器檢測後所得之 RU 值帶入方程式中，可計算出的維生素 D3 之濃度 k 值後，再換算成為毫克數後，除以實驗中所推算出的比值 6.4 後，所得到之含量和實際含量約有 ± 10 ng 之差。因此日後含有維生素 D3 之食品利用 BIAcore 儀器進行檢測後，將 RU 換算成克數後再除以一比值後，即可以初步定量出維生素 D3 的含量。

本實驗設計利用免疫學之方法先製備出多株抗體後，利用 SPR 所發展出之 BIAcore X 儀器進行檢測，可得到一標準方程式，對於定量食品中維生素 D3 的檢測方法提供了一個初步的結果，藉此結果可應用於日後食品中維生素 D3 的定量。

參考文獻

1. Srivastava M, Deal C. Osteoporosis in elderly: prevention and treatment. *Clin Geriatr Med* 2002; 18(3): 529-555.
2. Kinyamu HK, Gallagher JC, Rafferty KA, Balhorn KE. Dietary calcium and vitamin D intake in elderly women: effect on serum parathyroid hormone and vitamin D metabolites. *American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 67(2): 342-348.
3. Webb AR, Pilbeam C, Anafin HN, Holick M. An evaluation of the realize contribution of exposure to sunlight and of diet of the circulating concentration of 25-hydroxy-vitamin D in an elderly nursing home population in Boston. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990; 51: 1075-1081.
4. Agarwal VK. Liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milk. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* 1987; 71: 19-24.
5. Renken SA, and Warthesen JJ. Vitamin D stability in milk. *J. Food Sci* 1993; 58: 552-556.
6. The United States Pharmacopeia , The National Formulary 「 Nutritional Supplements 」 2000: 2312-2346 United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, Md. U.S.A.
7. E Mellanby. An experimental investigation on rickets. *Lancet I* 1919; 4985: 407-412.
8. Henderson JE, Goltzman D. In *The Osteoporosis Primer*. 2000: p88-90. Cambridge university press.
9. Napoli JL, Fivizzani MA, Schnoes HK, DeLuca HF. Synthesis of vitamin D₅: its biological activity relative to D₃ and D₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979 ; 197: 119-125.
10. 潘淑芬 編譯, *醫學生物化學* 2001 : p199. 藝軒圖書出版社 .
11. Clivea DR, Sudhakerb D, Giacherioc D, Guptad M, Schreiberd MJ, Sackrisona JL, MacFarlanea GD. Analytical and clinical validation of a radioimmunoassay for the measurement of 1,25 Dihydroxy Vitamin D. *Clinical Biochemistry* 2002; 35: 517-521.

12. Hartwell D, Hassenger C, Christensen C. Effect of vitamin D₂ and D₃ on the serum concentrations of 1,25 (OH)₂D₂ and 1,25(OH)₂D₃ in normal human subjects. *Acta Endocrinol* 1987; 115 : 378–384.
13. Cross HS, Peterlik M, Reddy GS, Schster I. Vitamin D metabolism in human colon adenocarcinoma-derived Caco-2 cells: expression of 25-hydroxyvitamin D₃–1-alpha-hydroxylase activity and regulation of side-chain metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997; 62: 21–28.
14. Michael F, Holick, PhD, MD. In *Vitamin D*. 1999: p42. Humana press.
15. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R & Kifor O. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575–580.
16. Omdahl JL, Gray RW, Boyle IT, Knutson J, DeLuca HF. Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. *Nat New Biol* 1972; 237(71): 63-64.
17. Fraser DR and Kodicek E. Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyroid hormone. *Nature - New Biology* 1973; 241(110): 163-166.
18. Garabedian M, Holick MF, Deluca HF, Boyle IT. Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69(7): 1673-1676.
19. Carlsson A. Tracer experiments on the effect of vitamin D on the skeletal metabolism of calcium and phosphorus. *Acta Physiol Scand* 1952; 26: 212-220.
20. Garabedian M, Tanaka Y, Holick MF, Deluca HF. Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in thyroparathyroidectomized rats. *Endocrinology* 1974; 94(4): 1022-1027.
21. Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74(2): 507-13.
22. Wasserman RH, Fullmer CS. Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitaminD. *Ann. Rev Physiol.* 1983; 45: 375-90.

- 23 . Hock JM, Gunness-Hey M, Poser J, Olson H, Bell NH, Raisz LG. Stimulation of undermineralized matrix formation by 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in long bones of rats. *Calcif Tissue Int* 1986; 38(2): 79-86.
24. Underwood J L & DeLuca H F. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am. J. Physiol* 1984; 246: E493–E498.
25. Zügel U, Steinmeyer A, Giesen L and Asadullah K. A Novel Immunosuppressive 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Analog with Reduced Hypercalcemic Activity. *Journal of Investigative Dermatology* 2002; 119: 1434.
26. Shevde NK, Plum LA, Margaret CD, Yamamoto H, Pike JW, and DeLuca HF. A potent analog of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ selectively induces bone formation. *PNAS* 2002; 99: 13487–13491.
27. Emanuel PA, Dang J, Gebhardt JS, Aldrich J, Garber Eric AE, Kulaga H, Stopa P, Valdes JJ, Amanda DS. Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detection. *Biosensors & Bioelectronics* 2000; 14: 751–759.
28. 林穎正、周昆達、陳甫倫、莊文博、楊明杰和藍敏瑛 , 生物化學 . 1995 : p60 . 合記圖書出版社 .
29. 王聖予、陳建和編譯 , 免疫學第五版 2000 : p150-151. 藝軒圖書出版社
30. J.Jean, C. Turcotte, R. E. Simard and I. Fliss. Production and characterization of polyclonal antibodies against cholecalciferol (vitamin D₃) . *Journal of Immunological Methods* 1999; 223 (2) : 155-163.
31. Narhi LO, Caughey DJ, Horan TP, Kita Y, Chang D, Arakawa T. Fractionation and characterization of polyclonal antibodies using three progressively more chaotropic solvents. *Anal Biochem* 1997; 253(2): 246-252.
32. Olivier GA, Dintingera T, Blanchardb D, Telliera C. Functional mimicry between anti-Tendamistat antibodies and α -amylase. *Journal of Immunological Methods* 2002; 269: 29-37.

33. Werblin T and MAGE R. A screening assay for rapid and quantitative measurement of immunoglobulins and anti-immunoglobulins in unknown sera. *Journal of Immunological Methods* 1977; 16: 337-350.
34. Scheller F, Schubert F, Pfeiffer D, Hintsche R, Dransfeld I, Renneberg R, Wollenberger U, Riedel K, Pavlova M, Kuhn M et al. Research and development of biosensors. A review *Analyst* 1989; 114(6): 653-662.
35. Fagerstam LG, Frostell-Karlesson, Persson B and Ronnberg I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *Journal of Chromatography* 1992; 597: 397-410.
36. BIA technology handbook, edition June 1994. TC information ab, Uppsala, Sweden.
37. Cunningham BC and Wells JA. Comparison of a Structural and a Functional Epitope. *J Mol Biol* 1993; 234(3): 554-563.
38. Fagerstam LG, Frostell-Karlesson, Persson B and Ronnberg I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *Journal of Chromatography* 1992; 597: 397-410.
39. BIA technology handbook, edition June 1994. TC information ab, Uppsala, Sweden.
40. Thompson NL, Lagerholm BC. Total internal reflection fluorescence applications in cellular biophysics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997; 5: 58-64.
41. Stenberg E, Persson B, Root H and Urbanuczky C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled protein. *Journal of Colloid and Interface Science* 1991; 143 (2) : 513-526.
42. Malmqvist M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature* 1993 ; 361 (14) : 186-187.
43. Johne B, Gadnell M and Hansen K. Epitope mapping and binding of monoclonal antibodies studied by real time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance. *Journal of immunological methods* 1993; 160: 191-198.
44. Volpi D and Ballinari D. BIA technology for new anticancer drug discovery. *BIA journal* 1997: 15-16.

45. Cunningham BC and Wells JA. Comparison of structural and a functional epitope. *Journal Molecular Biochemistry* 1993; 234: 554-563.
46. Bartley TD, Hunt RW and Fox GM. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase,. *Nature* 1994; 368 (7) : 558-560.
47. Stenhag K, Nilsson P, Larsson A and Uhlen M. Detections of oligonucleotide probe affinities using surface plasmon resonance: A means for mutational scanning. *Biochemistry* 1997; 246: 34-44.
48. Karlsson R, Fagerstam L, Nilshans H and Persson. Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. *Journal of immunological Methods* 1993; 166: 75-84.
49. Lofas S and Johnsson B. A novel hydrogel Matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficiene covalent immobilization of ligand. *J. Chem. SOC., Chem. Commun* 1990: 126-1528.
50. BIA applications handbook, edition June 1994. TC information ab, Uppsala, Sweden.
51. BIA technology handbook, edition June 1994. TC information ab, Uppsala, Sweden.
52. Enzyme Binding Protein Assay for the quantitative determination of 25-Hydroxyvitamin D. *Biomedica* : Cat. No. BI-20442
53. Stills HF, Jr. and Michael Q. The use of freund's complete adjuvant bailey from LAB ANIMAL 1991 ; 20, Number 4
54. 王聖予、陳建和編譯, 免疫學第五版2000:p388. 藝軒圖書出版社.
55. Reed R, Holmes D, Weyers J, Jones A. partical skills in Biomolecular science. Addison Wesley Longman 1997: 98-99.
56. Renken SA and Warthsen JJ. Vitamin D stability in milk. *Journal of Food Science* 1993; 58:552-555.