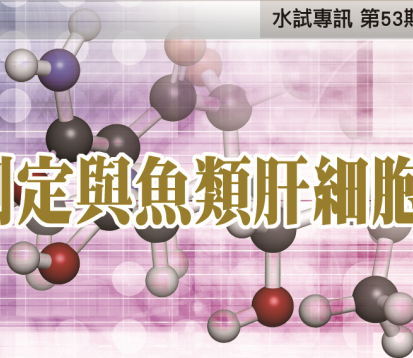


羧四環黴素殘留之測定與魚類肝細胞 檢測模型之應用



趙崇宇、郭錦朱、陳紫嫻

水產試驗所東港生技研究中心

前言

羧四環黴素 (oxytetracycline) 屬四環黴素類抗生素，用於對抗各類細菌感染，也是目前水產養殖業者使用最廣泛的抗生素。投藥方式為經口，劑量為每天 50 mg/kg 魚體重，連續投餵 3—5 日，停藥期 30 日，藥物殘留檢測部位為肌肉，於魚體的最大容許殘留量為 0.2 ppm。以下簡述羧四環黴素常用檢測法及體外培養魚類肝細胞模型之特性與未來之研究方向。

羧四環黴素的檢測

現行的檢測方式有酵素結合免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、毛細管電泳分析法 (capillary electrophoresis, CE) 及高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) (Önal, 2011)。

一、ELISA

ELISA 為透過專一性抗體 (一抗) 對抗原的結合作用，辨別抗原於樣品中存在與否，再藉著可由儀器偵測之抗體 (二抗)，辨認一抗或以可偵測之抗原與樣品競爭藉以定

量。使用何種定量方式則視實驗需求及選用的抗體為多株抗體 (polyclonal antibody) 或單株抗體 (monoclonal antibody) 而定，羧四環黴素抗體目前已有市售商品，唯價格略有差異。在羧四環黴素之實驗範例中，由於其屬小分子量抗原且為求抗體通用性，故直接法與抓取法較不適合，而建議使用間接法或競爭法進行。

(一) 直接法

直接使用帶有標記蛋白之抗體作為一抗，優點為步驟簡單，但須使用專一性高的抗體以避免雜訊，且抗體用途範圍狹窄以致成本過高，一般不使用。

(二) 間接法

使用帶標記蛋白之抗體作為二抗，辨認與抗原結合之一抗，優點為可放大偵測訊號及使用同一種二抗辨認不同一抗，但各種一抗之固定區片段須相同且能為二抗所辨認。

(三) 抓取法

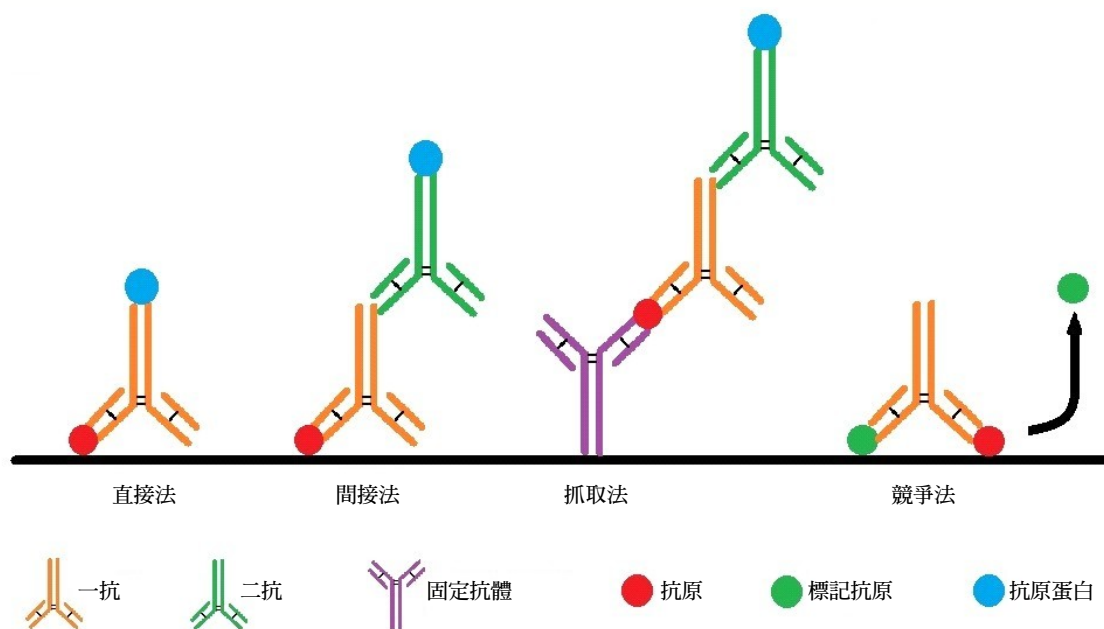
因為樣品量通常稀少且珍貴，故不固定抗原而利用固定抗體抓取溶液中游離抗原，再經如同間接法之步驟偵測訊號，優點為不必純化樣品中之抗原，但使用之一抗與固定抗體必須不互相干擾，二抗也不可辨認固定抗體，且抗原須有不同的抗原決定位以供固

定抗體及一抗辨認，另外小分子抗原因易發生抗體間立體屏障而不適用。

(四) 競爭法

將標記抗原固定，以可辨認之抗體結合之，再加入樣品，使其中抗原與標記抗原競

爭抗體之抗原結合位，偵測時以訊號小於控制組值的量進行判讀，亦可固定抗原後依次加入標記抗原與樣品，其優點與抓取法相同，但無抗體間干擾疑慮，須另備標記抗原工序。



ELISA 示意圖

二、CE

電泳為利用分析物所帶電性及分子大小的不同，分離分析物的方式。在電泳過程中，因電流產生之熱能造成溶液擾動，會降低電泳分離的效率，為減少此一效應，電泳時多半會使用穩定用介質（例如膠體電泳所用之凝膠）作為離子通道的電阻，或以毛細管作為離子通道使熱能擾動的影響減小。分離完畢後之定量方式與 HPLC 分離後之定量方式雷同，故於後項併述。與 HPLC 不同之處在

於毛細管電泳的分離效果較好且時間較快、不須使用但也無法處理大量樣品。在經四環黴素之實驗範例中，因毛細管電泳分析之特性，故適用之場合為少量樣品之實驗，細胞模型代謝實驗即為其適用實例。

三、HPLC

HPLC 屬液相層析之一，透過使用不同固定相（即管柱）和移動相（溶劑）分離樣品中之各式分子，而後依需求以各式適合方式分析分離出樣品溶液，常用的分析方式有

紫外光光譜、紅外光光譜、螢光光譜、光二極陣列、質譜儀等 (亦可用於毛細管電泳後樣品之檢測分析)。

與 CE 分離方式相比, HPLC 分離方式的優點為可一次分離較大量樣品, 但相較之下解析度較差, 適用場合為大量或內含相似物較少的樣品。

四、常用於 CE、HPLC 生化分析之檢測儀與其適用範圍

(一) 光譜儀

將成分複雜的光分解為光譜線的科學儀器, 可對物質的結構和成分進行觀測、分析和處理, 具有分析精度高、測量範圍大、速度快和樣品用量少等優點。在液相層析中應用最廣泛的檢測器為利用光二極體陣列的光譜儀, 具紫外光、可見光或紅外光吸收基團的樣品皆適用, 在 HPLC 中以紫外光基團為主要偵測對象。

(二) 螢光光譜儀

以紫外光或可見光為光源照射具有螢光特性的物質, 藉由測量其發射的螢光強度進行定性或定量分析的儀器。適用具螢光特性的物質。其偵測極限低於光譜儀。

(三) 質譜儀

用來測量質譜的儀器, 是將樣品分子打散成片段, 並經離子化使之帶電荷, 依荷質比不同以分析樣品種類。可用來分析同位素成分、有機物構造、元素成分及氣相離子的豐富度等。其偵測極限遠低於光譜儀。

檢測方式比較

在此比較上述各項檢測方式之優劣及其

適用時機。

一、ELISA

ELISA 優點為測定速度快、偵測極限低、對樣品具高度專一性、可用於活細胞實驗中; 缺點為必須使用抗體 (昂貴且製備不易)、不可用於未知樣品的分析、無法分離樣品中各化合物。

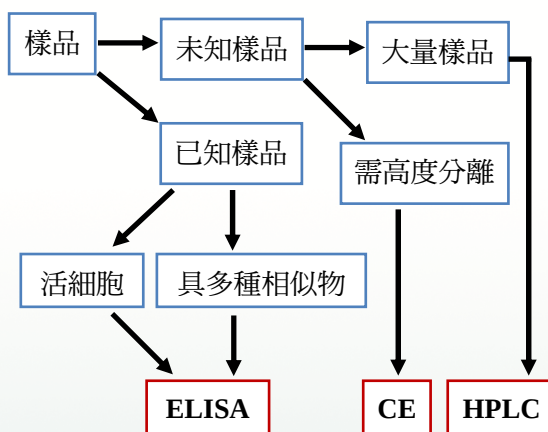
二、CE

CE 優點為分離效果佳且速度快; 缺點為無法分析大量樣品。

三、HPLC

HPLC 優點為可大量分離樣品、固定相及移動相製備較 CE 容易、操作方式較 CE 簡單; 缺點為解析度較 CE 略差。

以下以簡易流程圖示各檢測方式之適用使用時機:



體外細胞模型應用於魚類肝細胞代謝研究

體外細胞培養模型可分為自魚體取出組織進行培養之原代培養與使用現有細胞株之

細胞培養二大類。差別在於原代培養之細胞較接近所使用樣品生物當下生理狀態且細胞會出現老化現象 (aging)，而細胞株則因其通用性而廣為利用，某些細胞株甚至因經過誘導而有幹細胞化 (或癌化) 現象，因此具有不朽 (immortal) 的特性。在最廣泛使用的哺乳類 (常用小鼠與大鼠) 細胞模型中，除藥效檢測與篩選性狀 (例如發育相關研究) 等用途外，甚至可以投入醫療工具應用 (利用細胞支架製造如耳朵等特定器官)。以此為先例，於魚類中可用以測量肝細胞代謝抗生素等藥物之速率，提供動力學以外，對魚體之藥物殘留與代謝之研究。

魚類細胞培養研究中，較廣受注目的部分為原代培養細胞對各類藥物的代謝能力、各類藥物對細胞代謝的影響等。以羧四環黴素殘留而言，已有許多針對其抗菌能力 (Elia et al., 2014) 與對肝、腎影響之研究 (Pesonen et al., 2000)，而有關細胞層級代謝與排出部分的研究則相對匱乏。若欲進行相關研究，以適用性而言，羧四環黴素代謝部分實驗因須符合魚體實際之生理狀態，以原代培養細胞較佳，至於分離細胞與純化方式前人已有許多研究成果可供參考 (Pesonen et al., 2000; Klaunig, 1984)。

若欲使用經分離後之原代細胞或購得之細胞株為實驗工具，其培養及繼代方式與一般哺乳類動物無甚大差異，適用之培養液已可於市面購得，各廠商產品名稱與配方雖不盡相同，然皆須包含必需胺基酸、糖分源 (一般為葡萄糖)、緩衝系統 (酸鹼緩衝系統如磷酸及碳酸系統；離子緩衝系統如鹽類及螯合劑，EDTA 等)、血清 (較常使用胎牛血清及

馬血清)，其濃度與 pH 值可參閱期刊所載文章之實驗方法 (Bickley et al., 2009; Connolly et al., 2015; Uchea et al., 2015) 或各藥廠配方逕行比較效果後參酌使用。

結語

欲利用體外細胞模型進行藥物代謝及殘留測定實驗，為求實驗準確性須注意使用之細胞株與欲研究魚體品種是否相符，亦可利用原代培養針對各發育階段魚體代謝差異進行研究；測定方式則依照使用之藥物特性選定，若為一般抗生素類藥物，因投藥量非微量，以 ELISA 及 HPLC 較為適合，一般情況以 HPLC 較佳，理由在於經 HPLC 分離之樣品尚可用以針對其代謝產物特性進行後續研究，但若僅需測定代謝速率且需要大量組別數據進行統計則以 ELISA 較適合。

以本篇欲使用體外細胞模型進行羧四環黴素代謝殘留測定實驗為例，為求接近實驗用魚體生理狀態，選用原代培養方式取魚肝細胞經分離純化後，投以羧四環黴素，並於不同時間點使用 ELISA 測定其羧四環黴素殘留量及其主要代謝產物 4-epioxytetracycline 生成量，做出羧四環黴素代謝速率曲線，此法將可用於日後其他藥品代謝速率實驗之參考。

