

臺灣地區龜殼花及赤尾鮎蛇毒蛋白鑑別 與品管方法之建立

楊惠晴*、李政道

摘要

全世界被毒蛇咬傷人數高居不下，至今仍是熱帶及亞熱帶區域國家重要的特殊公衛議題，而抗蛇毒血清仍是目前治療毒蛇咬傷最有效的方法。因為全球製藥相關法規及規範要求日趨嚴謹，因此對於作為製造抗蛇毒血清原料的蛇毒蛋白有必要建立其原料鑑別規格及檢驗方法。本篇即是以高效能液相層析儀建立對龜殼花蛇毒及赤尾鮎蛇毒標準圖譜，找出其中可區別蛇種特異性的波峰，配合雙向免疫擴散試驗來鑑別蛇毒種類，並可藉此長期觀察野外毒蛇族群是否因地理分布或外來種而出現蛇毒蛋白成份分歧進而造成免疫抗原性改變，影響了抗蛇毒血清的有效性。

關鍵字：毒蛇咬傷、蛇毒、抗毒蛇血清、高效能液相層析、HPLC 層析圖譜資料庫

前言

在全球被毒蛇咬傷大部分案例多發生在亞洲、非洲及南美洲等地區[1]，全世界每年被毒蛇咬傷人數約在 42 萬人至 184 萬人之間，因此成為受到關注的公衛議題之一[2]。在臺灣毒蛇種類約有 23 種，但受傷者多為被龜殼花、赤尾鮎、飯匙倩、雨傘節、百步蛇及鎖鏈蛇等 6 種毒蛇所咬傷。依衛生福利部統計資料顯示，國內每年被毒蛇咬傷人數約 1,480 人，而常見毒蛇咬傷排行榜前 3 名分別是：赤尾鮎、龜殼花以及飯匙倩。目前對於治療毒蛇咬傷最有效方式為注射抗蛇毒血清，而製造抗蛇毒血清的最重要免疫抗原原料即為毒蛇的蛇毒蛋白。由於全球製藥相關法規及規範對於上游原料管制要求日趨嚴謹，為提升疾病管制署（以下簡稱疾管署）製藥品質並因應未來法規需求，疾管署必須先行建立蛇毒原料鑑別方法及檢驗規格。先前為瞭解疾管署所產製的「抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清」效能曾與西班牙瓦倫西亞生物醫學研究所(Instituto de Biomedicina de Valencia)進行合作研究[3]，主要研究成果為分析瞭解龜殼花和赤尾鮎的蛇毒組成。本研究依據該研究之高效能液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)圖譜為基礎，並結合疾管署 2013 年與宜蘭大學合作「開發抗臺灣蛇毒血清原料供應之技術與應用計畫」所取得之龜殼花及赤尾鮎單條毒蛇逐條進行蛇毒分析，依此方法找尋出具蛇種特異性(specificity)的波峰做為鑑別基準，建立標準蛇毒圖譜作為日後鑑別蛇毒之依據。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：楊惠晴*

E-mail：hcyang@cdc.gov.tw

投稿日期：2015 年 11 月 26 日

接受日期：2016 年 1 月 7 日

DOI：10.6524/EB.20161220.32(24).002

材料與方法

一、蛇毒

疾管署蛇毒採集是由所飼養之同種多隻毒蛇，混和後凍結乾燥而成，儲存於-20°C。宜蘭大學蛇毒採集於各地消防署捕獲毒蛇，為單隻毒蛇毒液，直接於室溫下放置至完全乾燥成結晶後再儲存於-20°C。

二、雙向免疫擴散試驗(double immunodiffusion test)

使用疾管署生產之抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清(批號 HC101-62B)、抗百步蛇毒血清(批號 AAC98-21B)、抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清(批號 NC101-28B)及抗鎖鍊蛇毒血清(批號 RC98-02B)，稀釋後進行實驗。試驗使用 1%瓊脂(SeaKem® ME Agarose)膠體，測試蛇毒則以 PBS 溶解成濃度 0.16 mg/mL 溶液。每個測試孔洞加入 20 µL 血清或蛇毒進行測試。放置超過 18 個小時後將膠體壓乾，以考馬斯藍(coomassie blue)染色觀察結果。

三、高效能液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)

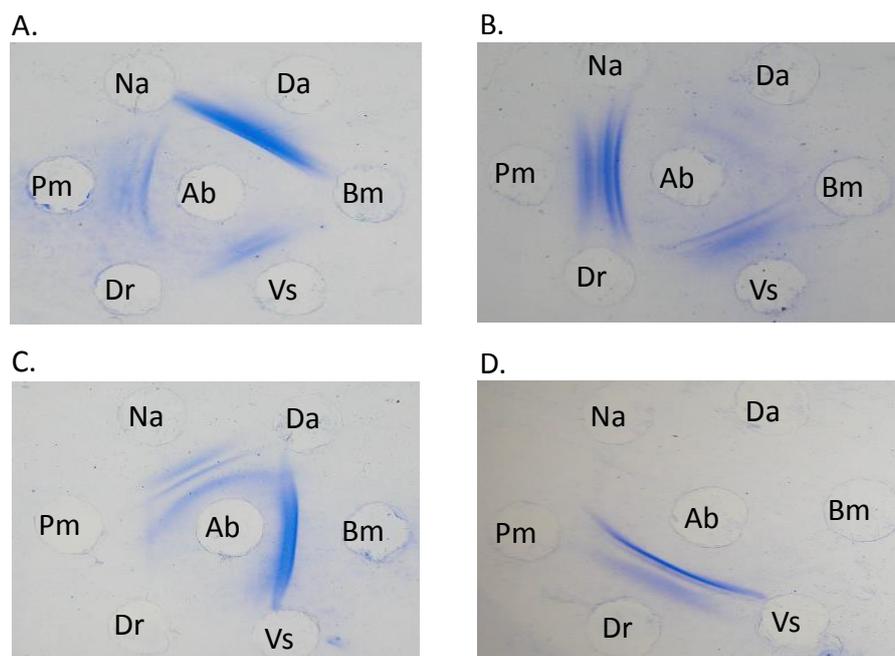
所使用儀器為 Waters 626 multisolvent delivery system、Waters 717plus autosampler、Waters 2487 dual λ absorbance detector 及分析軟體 Empower；管柱為 C18 型，管徑 4.6 mm，管柱長 250 mm，顆粒大小 5 µm，孔徑 300 Å。移動相溶液 A 為 0.1% 三氟醋酸(trifluoroacetic acid)水溶液，溶液 B 為含 0.1% 三氟醋酸之乙腈(acetonitrile)。分析蛇毒溶於 95% 溶液 A 及 5% 溶液 B 中；注入分析體積為 100 µL，移動向流速為 1 mL/min。分析條件為：(1) 龜殼花蛇毒— 0–5 分鐘維持 95% 溶液 A 及 5% 溶液 B，而後依線性比例在 5–15 分鐘將溶液 B 由 5% 提高至 25%，15–75 分鐘溶液 B 由 25% 提高至 45%，75–85 分鐘溶液 B 由 45% 提高至 70%，85–105 分鐘溶液 B 由 70% 提高至 100%；溶液 A 相對於溶液 B 逐漸減少，兩者合計為 100%。(2) 赤尾鮎蛇毒— 0–5 分鐘維持 95% 溶液 A 及 5% 溶液 B，而後依線性比例在 5–10 分鐘將溶液 B 由 5% 提高至 25%，10–50 分鐘溶液 B 由 25% 提高至 38%，50–85 分鐘溶液 B 由 38% 提高至 100%；溶液 A 相對於溶液 B 逐漸減少，兩者合計為 100%。以波長 215 nm 測定層析後蛋白質吸光值。

四、十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

收集蛇毒以高效能液相層析分離出特定時間區段溶液處理後做為電泳樣本，使用市售 12% 的 NuPAGE® Bis-Tris gel，電泳條件為電壓 200V、電流 40 mA，電泳時間 70 分鐘，以考馬斯藍染色觀察結果。

結果

六種蛇毒凍乾粉末或乾燥結晶看起來大多是白色或偏黃，無法由外觀特徵辨識種類，考量這項因素，因此進行高效能液相層析和雙向免疫擴散試驗檢驗，雙重確認蛇毒樣品的正確性。本項試驗先以疾管署所產抗蛇毒血清針對 6 種疾管署所飼養毒蛇蛇毒的試驗結果作為分析基準(圖一)。



圖一、雙向免疫擴散沉澱試驗測試 4 種抗蛇毒血清與 6 種蛇毒反應結果

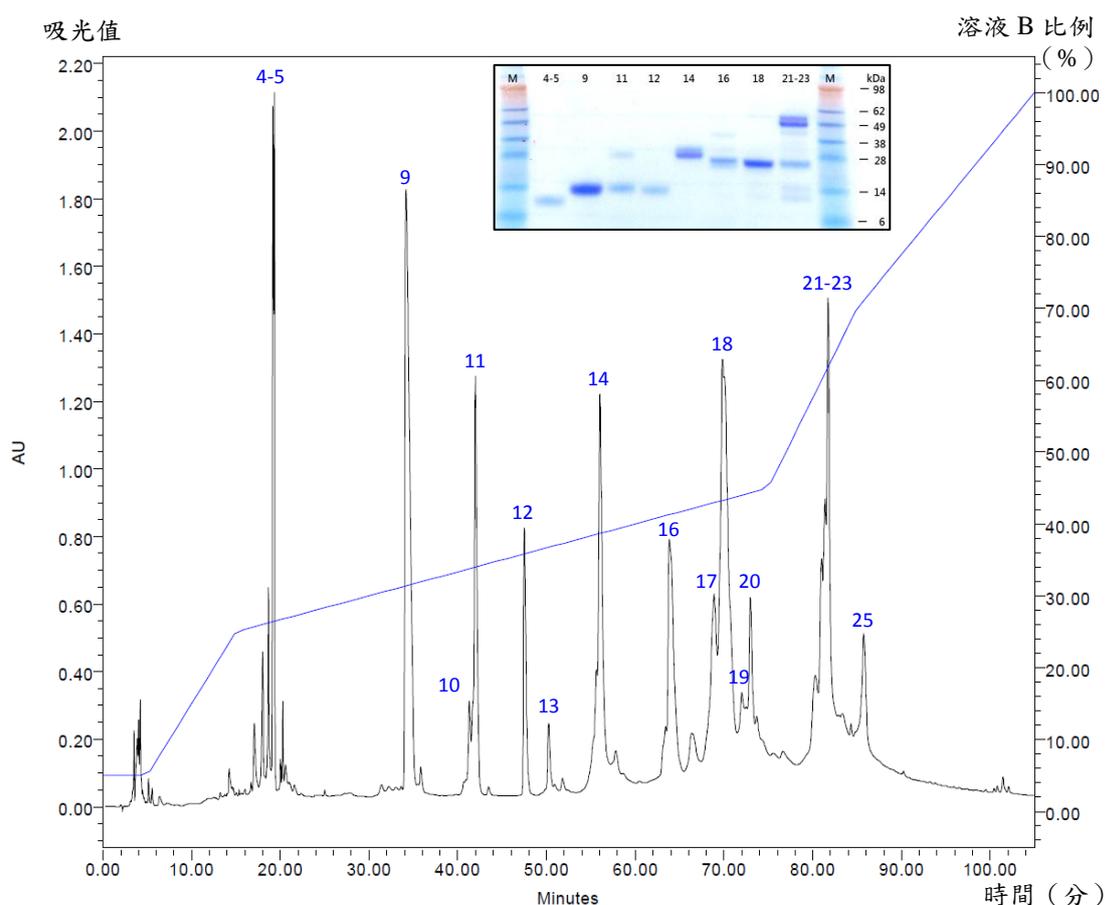
註 1：圖中 Ab 為加入抗蛇毒血清位置；圖 A 為抗百步蛇毒血清，圖 B 為抗龜殼花及赤尾
 鮎蛇毒血清，圖 C 為抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清，圖 D 為抗鎖鍊蛇毒血清。

註 2：Na：飯匙倩蛇毒，Da：百步蛇毒，Pm：龜殼花蛇毒，Bm：雨傘節蛇毒，Dr：鎖
 鍊蛇毒，Vs：赤尾鮎蛇毒。

由實驗結果可以發現，抗百步蛇毒血清除了對於百步蛇毒有明顯免疫作用後沉澱外，對於龜殼花蛇毒和赤尾鮎蛇毒也有作用，只是沉澱量不如對百步蛇毒來的多；同樣相似的狀況也出現在抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清，除了對於龜殼花蛇毒和赤尾鮎蛇毒有明顯免疫作用沉澱，也對百步蛇毒有作用。這樣的結果可能因為這 3 種毒蛇同樣具有出血性毒性，故產生交叉反應(cross-reactivity)。另外 2 種蛇毒血清，抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清和抗鎖鍊蛇毒血清就僅對於所針對的蛇毒產生免疫沉澱作用，沒有對其他種蛇毒產生交叉反應。

在確立上述結果作為基準後，對於宜蘭大學所採集的 46 個龜殼花蛇毒和 7 個赤尾鮎蛇毒開始進行試驗(data not shown)；試驗結果可以確認蛇毒種類與外管標示一致。宜蘭大學所採集的龜殼花蛇毒除了與抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清和抗百步蛇毒血清有作用外，47 個蛇毒也都與抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清有些許作用產生沉澱，這點與疾管署龜殼花蛇毒不同。而赤尾鮎蛇毒的試驗結果與疾管署赤尾鮎蛇毒測驗結果一樣，和抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清和抗百步蛇毒血清產生反應。

使用先前疾管署與西班牙瓦倫西亞生物醫學研究所合作時所使用的高效能液相層析條件進行相同試驗[3]，但因疾管署的儀器與管柱和該研究有所不同，無法以同樣條件得到相似結果，故重新調整移動相溶液條件（詳見材料與方法 3）得龜殼花蛇毒圖譜（圖二）和赤尾鮎蛇毒圖譜（圖三）。因調整後 2 種蛇毒變成使用不同的條件，故可以明顯區分 2 種蛇毒的不同(data not shown)。



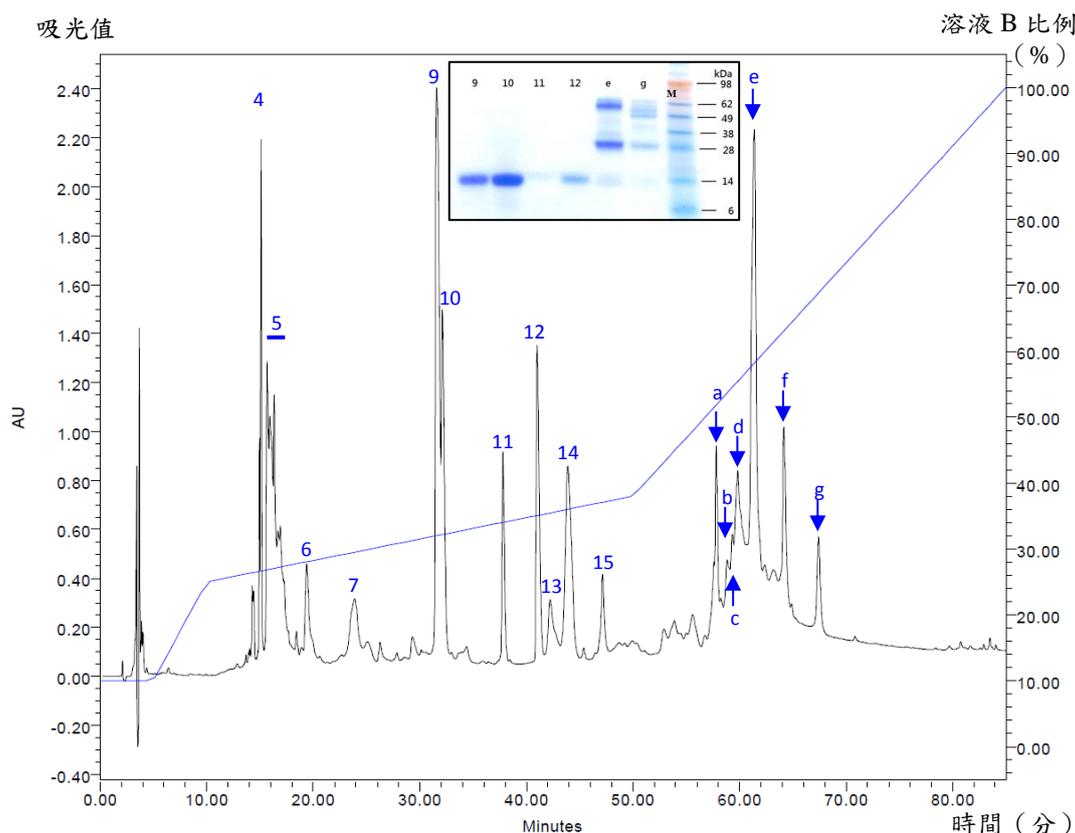
圖二、龜殼花蛇毒的高效能液相層析圖譜

註 1：左側縱軸為蛇毒層析後蛋白質吸光值(A₂₁₅)，橫軸為時間，右側縱軸為移動相溶液 B 比例。黑線為龜殼花蛇毒層析結果，圖中數字編號參考文獻[3]之龜殼花蛇毒 HPLC 圖譜所編號。

註 2：右上方框 SDS-PAGE 為對應龜殼花蛇毒 HPLC 圖譜中波峰編號分析結果。

先前的研究已確定龜殼花蛇毒和赤尾鮫蛇毒的蛋白質組成。蛇毒液金屬蛋白酶(snake venom metalloprotease [SVMP])、磷脂酶 A₂(phospholipase A₂ [PLA₂])及絲氨酸蛋白酶(serine protease [SP])在這 2 種蛇毒組成含量占前 3 名，比例也相似。

SVMP 的毒理作用主要在破壞止血機制，可以分類成四大類(classes)，而龜殼花蛇毒有 class I (PI) SVMP 而赤尾鮫蛇毒無，故可用龜殼花蛇毒的 HPLC 層析圖譜(HPLC chromatogram)中波峰編號 17–20 當作區別出蛇種的特異性波峰；而所得赤尾鮫蛇毒的 HPLC 層析圖譜的後三分之一區段與瓦倫西亞生物醫學研究所之圖譜波形不相似，但依層析時間及 SDS-PAGE 所得蛋白質分子量結果，推測圖三波峰編號 a–g 為 class III (PIII) SVMP。



圖三、赤尾鮫蛇毒的高效能液相層析圖譜

註 1：左側縱軸為蛇毒層析後蛋白質吸光值(A₂₁₅)，橫軸為時間，右側縱軸為移動相溶液 B 比例。黑線為赤尾鮫蛇毒分析結果，圖中數字編號參考文獻[3]之赤尾鮫蛇毒 HPLC 圖譜所編號，英文小寫編號則為本次實驗自行編號。

註 2：右上方框 SDS-PAGE 為對應赤尾鮫蛇毒圖譜中波峰編號分析結果。

在龜殼花和赤尾鮫蛇毒中 PLA₂ 具有多種蛋白質異形體(isoforms)，主要是以在 PLA₂ 蛋白質中第 49 個胺基酸為離胺酸(lysine, K)的 K49-PLA₂ 或天門冬氨酸(aspartic acid, D)的 D49-PLA₂ 形式存在，且兩者含量比例相近，在圖二和圖三層析圖譜波峰編號均為 9–12，其中除波峰編號 11 外，波峰 9、10、12 在兩種層析條件下均不重疊(data not shown)；雖然已知龜殼花蛇毒含 Trimucrotoxin D49-PLA₂ (圖二波峰編號 11)而赤尾鮫蛇毒無[3]，但在赤尾鮫蛇毒圖譜仍發現波峰 11(D49-PLA₂)且與龜殼花蛇毒的 Trimucrotoxin D49-PLA₂ 圖譜波峰重疊，故此特性無法在層析圖譜區分。

SP 作用主要為影響血液凝固，而赤尾鮫蛇毒的 SP 複雜性比龜殼花蛇毒高，因此層析圖譜上形成多個峰[3]，但因含量佔僅蛇毒蛋白約 10%，不如 SVMP(43%)和 PLA₂(~23%)來得多，故在每個波峰高度都不高。本篇實驗赤尾鮫蛇毒層析圖譜(圖三)僅能比對出 SP 蛋白波峰 13、15；相反的，龜殼花蛇毒 SP 複雜性低故層析分離波峰數少，龜殼花蛇毒層析圖譜(圖二) SP 蛋白波峰 14 吸光值高，與赤尾鮫蛇毒 SP 不重疊。

兩種出血性蛇毒除 SVMP、PLA₂、SP 三者蛋白質含量佔整體蛋白超過 10%，其餘蛋白含量都太低，於層析圖譜不易做為鑑別比對，但在赤尾鮎蛇毒有點值得一提，就是相對於龜殼花蛇毒，赤尾鮎蛇毒含有多量的胜肽(peptides)，佔蛇毒蛋白約 16%（圖三波峰編號 4、5、7），在整體圖譜中屬於易辨別的特徵之一。

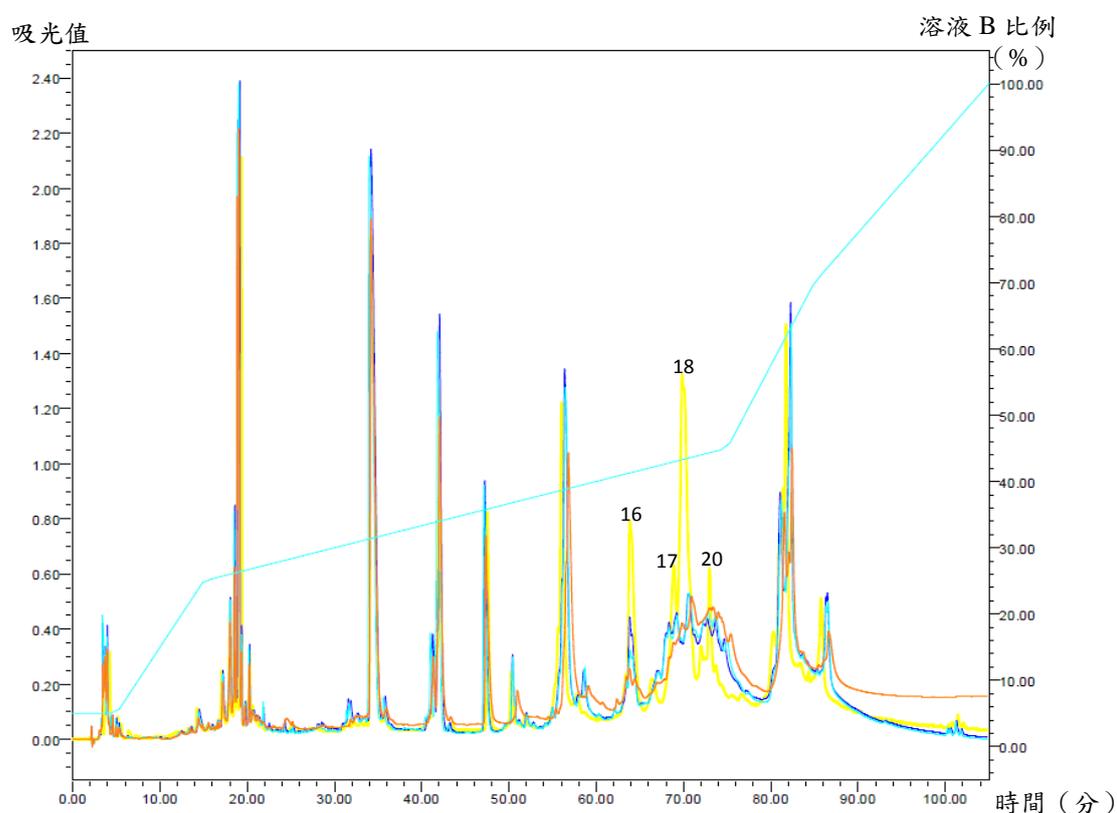
討論

疾管署蛇毒為同日收集所飼養多條蛇毒液，當日即凍結乾燥製備成免疫馬匹用毒，故單批批量大，可以貯用多時；而 2013 年疾管署與宜蘭大學合作之「開發抗臺灣蛇毒血清原料供應之技術與應用計畫」，主要是為調查同種蛇在不同性別、體重、體長或不同地理區域毒液是否有差異，因此蛇毒樣品為單條蛇毒液；但因毒液量少，使用凍結乾燥會損耗太多蛇毒，故採自然風乾。兩種不同的製備方式之蛇毒，以相同重量濃度進行高效能液相層析試驗，圖譜中整體吸光值高度相近，這表示兩者蛇毒脫水後蛋白質含量相近。但宜蘭大學所採集龜殼花蛇毒在雙向免疫擴散試驗與抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清有反應，但疾管署龜殼花蛇毒與抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清無反應，這個差異可能在 2 者蛇毒的製備方式不同、貯存時間長短不同或同種蛇之間個體差異。另外先前實驗結果[3]亦指出疾管署所產不同批抗血清對龜殼花蛇毒的 Trimucrotoxin D49-PLA₂ 反應有差異，故總結該差異可能和龜殼花蛇毒具有 Trimucrotoxin D49-PLA₂ 也有相關。未來如能找出不同地區龜殼花蛇毒之間的差異或許可作為馬匹免疫調劑之參考。

蛇毒非單一純化物，進行高效能液相層析試驗時並無標準品可以比對，故本篇實驗主要目標找尋具區別出蛇種的特異性波峰做為鑑別，並累積層析圖譜資料。彙整實驗結果可發現對於龜殼花蛇毒，HPLC 層析圖譜波峰編號 9、10、12、13、14、17–20（圖二）可用來鑑別該蛇種；而赤尾鮎蛇毒則是 HPLC 層析圖譜波峰編號 5、7、9、10、12、13、14、a–g（圖三）。但在實驗過程發現龜殼花蛇毒於溶解度不佳，波峰編號 16–20 可能因蛇毒溶解狀況不良或析出而於圖譜中無法辨識（圖四）。赤尾鮎蛇毒 PIII SVMP 總量和複雜性相較於龜殼花蛇毒來的高，雖然不能作為區別出蛇種的特異性波峰，但在整體層析圖譜中仍屬於易辨別的特徵之一。

在確立龜殼花蛇毒和赤尾鮎蛇毒 2 種高效能液相層析結果後，對於宜蘭大學 46 個龜殼花蛇毒及 7 個赤尾鮎蛇毒以相同條件分析，並其中取較多量之蛇毒進行複試；加上以約每 5 次檢測穿插 1 次疾管署蛇毒重複檢測，共累計 65 次龜殼花蛇毒及 9 次赤尾鮎蛇毒分析結果。以統計方法分析龜殼花蛇毒和赤尾鮎蛇毒於層析圖譜特定波峰出現時間（表一和表三），發現每個波峰出現時間變異係數均小於 1.75%，這代表用層析圖譜波峰出現時間可做為鑑別蛇種之用；但在波峰下面積，意即個種蛇毒蛋白質含量，變異係數都在 20%–60% 之間，變異性很大（表二和表四）。故高效能層析圖譜適合做為定性，但不適合做為定量。另外，46 個龜殼花蛇毒樣本中出現 4 種圖譜中有多或少波峰的特別例外(data not shown)，其 1 種例外圖譜有 7 條龜殼花蛇毒都出現層析波峰編號 9(PLA₂)變成雙

重峰，這有可能是 PLA₂ 的蛋白質異形體(isoforms)。而 7 個赤尾鮫蛇毒樣本中也有出現 3 種圖譜有多或少波峰的特別例外(data not shown)。



圖四、4 次疾管署同批號龜殼花蛇毒的高效能液相層析疊合圖譜。

註：左側縱軸為蛇毒層析後蛋白質吸光值(A₂₁₅)，橫軸為時間。黃色線層析曲線為有分析出波峰編號 16、17、18、20 的結果，橘、藍、淡青色層析曲線則為另外 3 次未分析出波峰編號 16、17、18、20 的結果。

表一、龜殼花蛇毒高效能液相層析圖譜的各個波峰出現時間分析表

波峰編號	平均值 (秒)	標準差 (秒)	變異係數	95%信賴區間 (秒)		樣本數 (個)
4	18.949	0.276	1.46%	18.881	– 19.017	65
5	19.125	0.270	1.41%	19.058	– 19.192	65
9	34.103	0.364	1.07%	34.013	– 34.193	65
10	41.235	0.328	0.80%	41.150	– 41.320	60
11	41.980	0.394	0.94%	41.881	– 42.079	63
12	47.273	0.280	0.59%	47.202	– 47.344	62
13	50.591	0.571	1.13%	50.446	– 50.736	62
14	56.458	0.530	0.94%	56.327	– 56.590	65
16	63.994	0.389	0.61%	63.892	– 64.096	58
17	69.272	0.333	0.48%	69.121	– 69.424	21
18	70.573	0.498	0.71%	70.346	– 70.800	21
19	72.242	0.938	1.30%	71.612	– 72.872	11
20	73.228	0.993	1.36%	72.678	– 73.778	15
21	81.388	0.216	0.26%	81.332	– 81.444	60
22	82.025	0.190	0.23%	81.963	– 82.087	39
23	82.287	0.212	0.26%	82.233	– 82.340	62
25	86.373	0.317	0.37%	86.294	– 86.452	64

表二、龜殼花蛇毒高效能液相層析圖譜的各個波峰所占面積比例分析表

波峰編號	平均值	標準差	變異係數	95%信賴區間			樣本數 (個)
4	3.59%	1.38%	38.42%	3.25%	—	3.94%	63
5	5.21%	1.31%	25.10%	4.88%	—	5.54%	63
9	21.37%	6.12%	28.63%	19.84%	—	22.90%	64
10	2.64%	1.44%	54.61%	2.26%	—	3.01%	60
11	7.71%	3.45%	44.69%	6.84%	—	8.59%	62
12	4.89%	2.15%	43.97%	4.34%	—	5.44%	61
13	1.96%	0.72%	36.64%	1.78%	—	2.14%	62
14	12.39%	3.92%	31.67%	11.41%	—	13.37%	64
16	5.92%	3.15%	53.31%	5.08%	—	6.76%	57
17	6.23%	2.43%	38.94%	5.13%	—	7.34%	21
18	10.03%	3.87%	38.62%	8.27%	—	11.79%	21
19	2.91%	0.95%	32.57%	2.27%	—	3.54%	11
20	6.10%	2.00%	32.83%	4.99%	—	7.21%	15
21	6.05%	2.38%	39.34%	5.43%	—	6.67%	59
22	5.78%	3.17%	54.85%	4.75%	—	6.81%	39
23	11.03%	4.15%	37.63%	9.97%	—	12.09%	61
25	7.20%	3.83%	53.22%	6.23%	—	8.16%	63

表三、赤尾鮫蛇毒高效能液相層析圖譜的各個波峰出現時間分析表

波峰編號	平均值 (秒)	標準差 (秒)	變異係數	95%信賴區間 (秒)			樣本數 (個)
2	14.266	0.015	0.10%	14.254	—	14.279	8
3	14.931	0.155	1.04%	14.812	—	15.051	9
4	15.085	0.147	0.98%	14.971	—	15.198	9
5-1	15.709	0.124	0.79%	15.614	—	15.805	9
5-2	15.964	0.124	0.78%	15.868	—	16.060	9
5-3	16.374	0.154	0.94%	16.256	—	16.493	9
5-4	16.739	0.181	1.08%	16.600	—	16.878	9
5-5	16.972	0.219	1.29%	16.804	—	17.140	9
5-6	17.314	0.219	1.27%	17.131	—	17.497	8
6	19.332	0.236	1.22%	18.746	—	19.917	3
7	24.457	0.420	1.72%	24.135	—	24.780	9
9	31.607	0.178	0.56%	31.459	—	31.756	8
11	37.789	0.026	0.07%	37.757	—	37.821	5
12	40.951	0.123	0.30%	40.857	—	41.046	9
13	42.711	0.269	0.63%	42.486	—	42.936	8
14	44.012	0.105	0.24%	43.931	—	44.093	9
15	47.335	0.108	0.23%	47.252	—	47.418	9
a	57.730	0.053	0.09%	57.690	—	57.771	9
b	58.911	0.057	0.10%	58.867	—	58.955	9
c	60.032	0.453	0.76%	59.684	—	60.381	9
d	60.681	0.521	0.86%	60.280	—	61.082	9
e	61.408	0.193	0.31%	61.259	—	61.556	9
f	63.928	0.900	1.41%	63.237	—	64.620	9
g	67.417	0.034	0.05%	67.391	—	67.443	9

表四、赤尾鮎蛇毒高效能液相層析圖譜的各個波峰所占面積比例分析表

波峰編號	平均值	標準差	變異係數	95%信賴區間		樣本數 (個)
2	0.74%	0.30%	40.60%	0.46%	- 1.02%	7
3	0.73%	0.21%	28.70%	0.55%	- 0.90%	8
4	2.95%	0.42%	14.31%	2.60%	- 3.30%	8
5-1	3.24%	0.55%	17.08%	2.78%	- 3.70%	8
5-2	4.45%	1.03%	23.12%	3.59%	- 5.31%	8
5-3	2.88%	0.64%	22.14%	2.35%	- 3.42%	8
5-4	1.66%	0.54%	32.53%	1.21%	- 2.11%	8
5-5	2.04%	0.48%	23.67%	1.64%	- 2.45%	8
5-6	1.42%	0.45%	31.69%	1.04%	- 1.79%	8
6	2.94%	1.76%	59.89%	-1.43%	- 7.32%	3
7	10.84%	8.17%	75.40%	4.01%	- 17.67%	8
9	14.59%	3.67%	25.16%	11.20%	- 17.99%	7
11	1.84%	0.79%	42.87%	0.86%	- 2.82%	5
12	8.22%	2.53%	30.79%	6.10%	- 10.33%	8
13	1.59%	0.70%	43.74%	1.01%	- 2.18%	8
14	8.17%	1.71%	20.94%	6.74%	- 9.60%	8
15	2.40%	0.68%	28.46%	1.83%	- 2.97%	8
a	3.95%	1.33%	33.70%	2.84%	- 5.06%	8
b	2.61%	0.78%	30.01%	1.96%	- 3.27%	8
c	3.61%	1.63%	45.10%	2.25%	- 4.98%	8
d	3.50%	1.83%	52.33%	1.97%	- 5.03%	8
e	8.80%	4.39%	49.96%	5.12%	- 12.47%	8
f	4.66%	2.44%	52.47%	2.61%	- 6.70%	8
g	2.96%	0.30%	10.00%	2.71%	- 3.21%	8

可能因毒蛇的個體差異，或因生存環境不同所造成如食物類型、溫度、濕度等不同，使毒液成分有差異，故有圖譜中仍存有差異。例如有 7 條龜殼花蛇毒都出現層析波峰編號 9(PLA₂)變成雙重峰，有可能為 PLA₂ 的蛋白質異形體；而相反的，除疾管署赤尾鮎蛇毒層析圖譜有出現波峰編號 10(PLA₂)外，宜蘭大學所提供蛇毒均無此波峰。已有文獻指出因地理環境隔離及獵物生態(preyn ecology)的差異，造成赤尾鮎毒液中 PLA₂ 出現多種蛋白質異形體 [4]。故長期累積蛇毒 HPLC 層析圖譜資料庫除可以辨別凍乾蛇毒種類外，亦可長期觀察野外毒蛇族群是否因地理分布或外來種而出現蛇毒蛋白成份分歧，這亦有助觀察疾管署產製抗蛇毒血清的效力是否能有效涵蓋存在於本土的蛇毒。

本研究初步利用高效能液相層析方式找出兩種出血性蛇毒的差異作為蛇毒鑑別，未來希望累積更多資料建立資料庫，除發展出更精準的鑑別方式，並可藉由分離出之蛋白來製備單株抗體，發展毒蛇咬傷蛇種辨別試劑或治療藥物[5]，更期待其他潛在性實用價值能有效開發。

參考文獻

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med* 2008; 5(11): 1591–604.
2. World Health Organization. Rabies and envenomings. A neglected public health issue. Available at: http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf.
3. Villalta M, Pla D, Yang SL, et al. Snake venomomics and antivenomics of *Protobothrops mucrosquamatus* and *Viridovipera stejnegeri* from Taiwan: keys to understand the variable immune response in horses. *J Proteomics* 2012; 75(18): 5628–45.
4. Tsai IH1, Wang YM, Chen YH, et al. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. *Biochem J* 2004; 377: 215–23.
5. Clot-Faybesse O, Juin M, Rochat H, et al. Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralization. *FEBS Lett* 1999; 458(3): 313–8.