

計畫編號：MOHW110-CDC-C-114-000109

衛生福利部疾病管制署 110 年委託科技研究計畫

計畫名稱：建立抗兩傘節蛇毒血漿製程內力價測定方法取代動物檢  
定實驗

Development of ELISA assay to measure the lethality-neutralizing titer of *Bungarus multicinctus* antiserum in the production process

110 年度全程研究報告

執行機構：長庚大學

計畫主持人：余兆松

研究人員：劉建均、羅際勝、廖彥鈞

執行期間：110 年 01 月 01 日至 110 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣壹佰伍拾捌萬柒仟元整

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵  
求本署同意\*

## 目錄

封面

目錄

壹、摘要

一、中文摘要.....1

二、英文摘要.....3

貳、本文

一、前言.....4

二、材料與方法.....7

三、實驗結果.....16

四、實驗討論.....25

五、結論與重要研究成果.....27

六、參考文獻.....28

七、圖次.....30

八、表次.....42

參、經費支用情形.....54

## 壹、摘要

### 一、中文摘要

關鍵字：小鼠體內試驗、抗蛇毒血清製造、酵素結合免疫吸附分析法、動物福祉、雨傘節蛇毒

台灣疾病管制署以小鼠體內試驗來檢測免疫馬匹的血漿效價，判定馬匹體內抗體受是否已達製造抗蛇毒血清的階段，此方法已經行之有年。然為遵循動物實驗取代、減量、優化的 3Rs 原則，我們計畫研發出一個使用酵素結合免疫吸附分析法 (ELISA) 來檢測馬血漿中抗雨傘節蛇毒血清效價的替代方法學，藉此優化血清製程並減少實驗動物的使用。

在本研究中，我們透過強陽離子交換樹脂 (Strong cation exchange, SCX) 與反向高效液相層析 (Reversed Phase High-performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) 分離純化出五種主要雨傘節蛇毒蛋白質，並量測各蛋白質成分之相對含量與 LD<sub>50</sub>，以此計算五種主要雨傘節蛇毒蛋白質的毒力分數 (Toxicity score)，依照毒力分數判斷  $\beta$ -BTX 和  $\alpha$ -BTX 為雨傘節蛇毒中主要致死性蛋白質。接著，我們利用生物資訊平台針對致死蛋白質之立體結構、親疏水性和 B 細胞表位等性質找出這兩個蛋白質可能的致毒位點，並合成出 11 段衍生胜肽。最後，以 2 個致死蛋白質以及 11 段衍生胜肽作為抗原開發為抗體檢測 ELISA 試劑。而在初步試劑優化測試中，以小量馬

血漿檢體試驗發現以 $\alpha$ -BTX、 $\beta$ -BTX 和 ABTX\_p81 作為抗原之抗體檢測 ELISA 試劑於高致死中和效價馬血漿所產生的免疫辨識訊號皆比低致死中和效價來的高，即表示這些抗體檢測 ELISA 試劑是有潛力作為抗雨傘節血清製程中致死中和效價的檢測方法。

## 二、英文摘要

Keywords : in-vivo murine assay, antivenom production, ELISA, animal welfare, *Bungarus multicinctus*

Taiwan CDC has been using in-vivo murine assay over decades in accessing antiserum titer among immunized horses. However, the necessity of the use of mice in preclinical testing for antivenom has been critiqued recently. In following the rules of 3Rs to maintain the welfare of model animals, we plan to develop an ELISA assay to monitor the titer of *Bungarus multicinctus* antiserum as an alternative protocol to reduce the suffering and damages of those rodents.

In this investigation, we have developed a two dimensional HPLC method to efficiently separate *B. multicinctus* venom into five major components. The relative abundance and LD<sub>50</sub> of each component were determined, and then used to calculate the toxicity score.  $\beta$ -BTX and  $\alpha$ -BTX are the toxic proteins having highest toxicity score among *B. multicinctus* venom proteins. Furthermore, we applied bioinformatics analysis to obtain the 3D structure of  $\beta$ -BTX and  $\alpha$ -BTX to predict their potential toxin-related epitopes, and then synthesize peptides derived from these predicted epitopes.  $\beta$ -BTX,  $\alpha$ -BTX and their derived peptides were used as antigens to develop antibody-detected ELISA for monitoring the horse antiserum potency. It was found that  $\beta$ -BTX,  $\alpha$ -BTX and one  $\alpha$ -BTX-derived peptide, ABTX\_p81, have the potential to discriminate whether the neutralization potency has reached to the criteria for large-scale harvesting. Antibody-detected ELISA based on these 3 antigens should be further evaluated using more horse plasma samples with known neutralization potency.

## 貳、本文

### 1.1 前言

#### 1.1.1、研究背景

台灣位於南太平洋地區，島上共有 40 多種蛇類棲息[1]，而其中，有六種毒蛇幾乎包辦了台灣所有的臨床毒蛇咬傷案例[2]，這六種台灣毒蛇分別為百步蛇(*Deinagkis trodonacutus*)、赤尾青竹絲(*Trimeresurus stejnegeri*)、龜殼花(*Protobothrops mucrosquamatus*)、鎖鏈蛇(*Daboiaurus seliisiamensis*)、雨傘節(*Bungarus multicinctus*)與眼鏡蛇 (*Naja atra*)，大約在每年的 5 月至 11 月間約有 1000 人在台灣被毒蛇咬傷[2, 3]。

在台灣六大毒蛇的毒液中，最主要的成分為蛋白質，而這六種毒蛇的蛇毒蛋白體已被分析且報導，使我們對蛇毒蛋白質有更進一步的了解[4-7]。在六種毒蛇之中，屬雨傘節的蛇毒的毒性最強。其中，雨傘節會分泌神經性蛇毒，被認為是台灣最毒的陸境毒蛇，alpha 和 beta bungarotoxin 為雨傘節蛇毒中最廣為人知的蛋白質成分，屬於神經毒素的一種，分別能夠攻擊乙醯膽鹼受體和突觸前神經末梢，造成痙攣、癱瘓、或是呼吸中止[8, 9]。在臨床上海蛇咬傷治療方面，台灣目前生產四種抗蛇毒血清來治療這六種毒蛇所造成的毒蛇咬傷，分別為用於治療雨傘節與眼鏡蛇咬傷的二價抗神經毒血清和用於治療赤尾青竹絲與龜殼花咬傷的二價抗出血毒血清，以及抗百步蛇

血清與抗鎖鏈蛇血清[1, 10]。擁有完整的抗蛇毒血清種類與供給使台灣因毒蛇咬傷而死亡的人數大幅下降。

目前，抗蛇毒血清效價測定皆以小鼠體內試驗來確認，基於實驗動物的 3Rs 原則-取代(Replacement)、減量(Reduction)及優化(Refinement)，因此預計開發試劑來取代傳統製程管制(in process control)的動物體內試驗，作為測試血清致死中和效價之方法。一些體外免疫試劑與雞卵胚胎試驗方法的相關研究開始被推動，希望可以取代小鼠體內試驗[11]。然而，非常不幸地，這些方法都無法完全取代小鼠體內試驗且推展到實際應用面。因此，在無法找到有效之取代方法的情況下，為了顧及人類的健康與防疫，小鼠體內試驗持續被應用於免疫後馬血漿效價檢測與血清生產之致死中和效價檢測。

先前的研究指出酵素結合免疫吸附分析法 (ELISA) 是一個非常有潛力、可用於檢測抗蛇毒血清中和效力之方法[12]。在此研究中，科學家先以小鼠體內試驗測定五批抗非洲毒蛇血清之 ED50，並以這五批抗蛇毒血清當作參考標準品來測試在 ELISA 平台上所得到之訊號強度，利用 ED50 與 ELISA 訊號強度來建立蛇毒中和效力之反應曲線，接著以這 ELISA 試劑與反應曲線來測試另外 38 批已用小鼠體內試驗得知 ED50 之抗蛇毒血清。從結果中得知以 ELISA 試劑測得的 ED50 與小鼠體內試驗測得的 ED50 有很好的相關性，表示 ELISA 可能會是一個偵測中和效力的好方法學。另外，用 ELISA

試劑來取代小鼠體內試驗除了可以減少小鼠的使用、顧及動物福祉，使用 ELISA 試劑也可減少檢測所需的時間與相對的成本花費，是一個非常符合經濟效益之方法。

### 1.1.2 研究目的

為了顧及動物的福祉及減少在抗蛇毒血清生產過程中的動物試驗使用，本計劃欲開發一個 ELISA 試劑取代傳統小鼠體內試驗來偵測馬匹在免疫後的致死中和效價，讓操作人員可以不需進行動物試驗即可得知馬匹體內之有效抗體量是否已達標準。有別於先前之研究用全蛇毒當作抗原來開發可檢測馬血漿內抗體效力之 ELISA，本計劃欲以兩傘節當作目標，將其蛇毒各蛋白質成分都分離純化出來，同時找出有可能之效價相關胜肽片段當作抗原來建立 ELISA，用於接下來測試哪幾個抗原的免疫辨識效價與致死中和效價最有相關性。

## 二、材料與方法：

### 2.1 實驗材料

#### 2.1.1 實驗藥品：

雨傘節蛇毒(批號 BmT960328)、磷酸鈉( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , Merck, Darmstadt, Germany)、氯化鈉( $\text{NaCl}$ , Thermofisher, Waltham, MA, USA)、丙酮(Acetone, J.T. Baker, Center Valley, PA, USA)、乙腈(Acetonitrile, ACN, J.T. Baker, Center Valley, PA, USA)、三氟乙酸(*Trifluoroacetic acid*, TFA, Merck, Darmstadt, Germany)、碳酸氫銨( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , Sigma, St. Louis MO, USA)、二硫蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT, Merck, Darmstadt, Germany)、碘乙醯胺(Iodoacetamide, IAM, Merck, Darmstadt, Germany)、胰蛋白酶(Trypsin, Promega, Madison, WI, USA)、TOOLStart Blue Staining Reagent (BIOTOOLS, Taiwan)、馬血漿、磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate *buffered* saline, PBS, pH7.4)、2 種 RP-HPLC 分離蛇毒(alpha-bungarotoxin、beta-bungarotoxin)、11 段 bungarotoxin 合成胜肽、Rabbit-anti-horse HRP conjugate antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA)、**Aqueous Tetramethylbenzidine Substrate (TMB substrate**, Clinical Science Products, Inc., USA)、硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , J.T Baker, USA)

#### 2.1.2 實驗動物

遠交系小鼠(Institute of Cancer research, ICR)

### 2.1.3 實驗儀器

反向高效液相層析儀 (Reversed Phase High-performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)、強陽離子交換樹脂之微型管柱 (Strong cation exchange, SCX tip column, GE Healthcare, USA)、反向高效液相層析儀管柱 (XBridge<sup>®</sup> Peptide BEH C18 OBD<sup>™</sup> Prep Column, Waters, USA)、96 孔盤 (Costar assay plate, CORING, ref 9018, USA)、96 孔盤震盪器 (micro mixer, MX4, FinePCR, Korea)、Synergy LX 多功能微量盤分光光譜儀 (Synergy LX Multi-mode Reader, BioTeck, USA)

## 2.2 實驗方法

### 2.2.1 蛋白質分離純化

#### 強陽離子交換樹脂 (SCX) 分離雨傘節蛇毒蛋白質

取 100 µg 雨傘節蛇毒蛋白質回溶於 50µl 80mM NaCl/ 25% ACN/ 10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>；取 20µl SCX 樹脂加入至手做的小型管柱，並將小型管柱置放在離心機中，使用 25% ACN/ 10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液清洗樹脂 3 次，轉速為 400 rpm/min，離心 6 分鐘；再使用 300mM NaCl/ 25% ACN/ 10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液清洗樹脂 3 次，轉速為 500 rpm/min，離心 5 分鐘；最後使用 80mM NaCl/ 25% ACN/ 10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液清洗樹脂 3 次，轉速為 500 rpm/min，離心

5 分鐘。樹脂完成後，加入雨傘節蛇毒蛋白質至管柱中和樹脂進行結合，此步驟進行 2 次，轉速為 400 rpm/min，離心 6 分鐘，保留樣品，此為 flow through，又稱流出液；用 80mM NaCl/ 25% ACN/ 10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 洗滌 2 次，轉速為 400 rpm/min，離心 6 分鐘，將未完全結合在樹脂上的樣品清洗下來，保留液體和 flow through 混合均勻；用 300mM NaCl/ 25% ACN/ 10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 洗滌 2 次，轉速為 400 rpm/min，離心 6 分鐘，保留樣品，此為 elution，又稱沖提液。

### 蛋白質沉澱

雨傘節蛇毒蛋白質經過 SCX 分離後，樣品內擁有大量的鹽類以及 ACN，這些物質無法進入 RP-HPLC 的 C18 管柱中。使用 100% 丙酮加入至樣品中，使最終丙酮濃度為 80%，將樣品放置於 -20°C 至少 16 小時，再以轉速 13,000rpm 在 4°C 的環境離心 10 分鐘，並清除上清液，若有殘留的丙酮，則可使用真空乾燥機進行抽乾。

### RP-HPLC 分離純化雨傘節蛇毒蛋白

將乾燥後的 flow through 和 elution 樣品回溶於 0.1% TFA/ ddH<sub>2</sub>O 溶液，並進入 C18 管柱中。RP-HPLC 系統緩衝液分為 A 和 B 緩衝液兩種，A 緩衝液為 0.1% TFA/ ddH<sub>2</sub>O，B 緩衝液為 0.1% TFA/ 100% ACN，並設定在不同時間區間調整 A 和 B 緩衝液的比例，使結合在管柱上的雨傘節蛇毒蛋白

質被流洗出來。依照 A280 圖譜進行樣品蒐集，將蒐集的樣品進行真空抽乾。

### 2.2.2 蛋白質身份鑑定

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

配置 15% SDS-PAGE running gel 待凝固後再配置 4% stacking gel，將蛋白質樣品加入三分之一體積的 4 倍 sample buffer，以 95°C 加熱五分鐘再進行 SDS-PAGE 膠體電泳，以 TOOLSstart Blue Staining Reagent 進行蛋白質染色。

膠體內蛋白質酶作用

將欲知的蛋白質條帶切下後以 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/40\%$  ACN 交互進行洗滌，直至膠體上的染料顏色退去，並加入 100% ACN 使膠體脫水，使用真空抽乾機將 100% ACN 抽乾。抽乾後樣品加入 10mM DTT 置於 56°C 反應 1 小時後，加入 55mM IAM 置於室溫反應 30 分鐘，再加入 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/40\%$  ACN 進行洗滌，並加入 100% ACN 使膠體脫水，並使用真空抽乾機將剩餘 100% ACN 抽乾，加入 20 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin 在冰上反應，待 Trypsin 完全被膠體吸入且膠體呈透明狀，將多餘的 Trypsin 移出，加入 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  蓋過膠體放至 37°C 反應 16 小時，再加入 1% TFA/100% ACN 直至膠體縮小，即可將液體抽至新管進行真空抽乾。上機前將樣品回

溶於 0.1% FA，以 LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap) 進行偵測，再以 PD discover 1.4 (Thermofisher) 分析軟體進行蛋白的身分鑑定。

### 2.2.3 計算毒力分數 (Toxicity Score) 之動物實驗

#### HPLC 圖譜分析雨傘節蛇毒蛋白質之相對含量

運用 RP-HPLC 分離雨傘節蛇毒所記錄之吸光值訊號 (OD280) 圖譜，積分出各蛋白質峰值面積 (peak area)。計算出各目標蛇毒蛋白質所佔面積相對於整體面積之比例，推得個蛋白質的相對含量百分比。

#### SDS-PAGE 圖譜分析雨傘節蛇毒蛋白質之相對含量

以 TOOLSstart Blue Staining Reagent 染色之膠體電泳圖，以 ImageJ 積分分析各蛇毒分離液條帶之訊號，以積分訊號相對於整體訊號之比例，計算各蛇毒分離液佔全蛇毒蛋白質的相對百分比。

#### 雨傘節主要蛇毒蛋白質的半數致死劑量 (Median Lethal Dose, LD<sub>50</sub>)

選定體重範圍 (13-15 g) 範圍內之小鼠，以五隻為一組，皮下注射內含指定濃度蛇毒蛋白質的無菌食鹽水溶液 0.1 ml。待測的蛇毒蛋白質有雨傘節全蛇毒、 $\alpha$ -BTX、 $\beta$ -BTX、 $\gamma$ -BTX、MTX 與 NTL。上述蛇毒蛋白以五隻小鼠為一個單位，分別測試 3~6 個蛋白質濃度區間。觀察紀錄注射 24 小時後小鼠的死亡數量，使用 Probit analysis 來計算出 LD<sub>50</sub> (95%信賴區間)。

#### 根據毒力分數(Toxicity Score)挑選主要致死蛋白質

依下列計算式計算出各個待測蛋白質之毒力分數(Toxicity score) [14]，以毒力分數的方式來判斷待測蛋白質之致死貢獻度。

$$\text{Toxicity score} = \text{Abundance} / \text{LD}_{50}$$

#### 2.2.4 預測兩傘節蛇毒蛋白質立體結構

以 PyMOL 軟體模擬分析 alpha bungarotoxin( $\alpha$ -BTX)與 beta bungarotoxin( $\beta$ -BTX)之 3D 結構

從蛋白質資料庫 UniProt 中檢索 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 的胺基酸序列，並連結至歐洲蛋白質數據庫(Protein Data Bank in Europe, PDBe)下載此兩個主要致死蛋白質之立體結構檔案；將前述結構檔案以模擬軟體 PyMOL 開啟，進行蛋白質立體結構模擬與分析。

以表位分析工具(Epitope Analysis Tools)中的 B 細胞表位預測方法找出可能的 B 細胞表位

根據 Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 表位預測方法[14]，在表位預測分析平台(Immune Epitope Database, IEDB)上，針對 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 的蛋白質序列和 B 細胞結合表位進行交叉比對，挑選出可能性高的 2 至 4 段胜肽序列作為預選 B 細胞表位。

以表位分析工具(Epitope Analysis Tools)中的親疏水性指數找出可能的蛋白質外側表位

依據每個胺基酸的親疏水性不同，使得整體親水性較高的序列分佈在蛋白質的外側，疏水性較高的序列則分佈在蛋白質的內側，而分佈在外側的序列更容易產生抗原抗體反應。以 ProtScale 的方法，是根據不同胺基酸的親疏水性指數[2]，計算目標蛋白質 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 序列中親水性較高的 2 至 3 段序列作為預選蛋白質外側表位。

#### 比對各表位分析結果篩選出重複性高的衍生胜肽進行合成

結合前述實驗中找出的預選 B 細胞表位與預選蛋白質外側表位，兩者較為相近或是重疊的地方即是 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 兩個致死蛋白中最可能發生抗原抗體結合的區段；從這些表位中選出胜肽片段進行合成，再進入下一階段的實驗。

### **2.2.5 酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)**

#### 雨傘節蛇毒毒性蛋白質酵素免疫分析法

取 2 種雨傘節蛇毒毒性蛋白質( $\alpha$ -BTX 和 $\beta$ -BTX)各 10 ng 分別加入至 96 孔盤中，靜置在 4°C 環境中 16 小時；將孔盤內的液體取出並拍乾，加入 1% BSA 做為 blocking，放置在室溫中並在震盪器上搖晃 1 小時；將孔盤內的液體取出且拍乾，加入 PBST 洗滌 6 次，每次洗滌都需將盤子拍乾再加入液體；加入兩個高效價(效價大於等於 60 Takana Unit)和兩個低效價(小於 60 Takana Unit)之馬血漿，以 1：5,000、1：10,000、1：20,000、1：40,000、1：

50,000、1：80,000 和 1：100,000 的比例配置在 1%脫脂牛奶中做偵測，放置在室溫中並在震盪器上搖晃 1 小時；將孔盤內的液體取出且拍乾，加入 PBST 洗滌 6 次；加入配製在 1%脫脂牛奶的 Rabbit-anti-horse HRP conjugate antibody 以 1:20,000 的比例做為偵測馬血漿內的抗體，放置在室溫中並在震盪器上搖晃 1 小時；將孔盤內的液體取出且拍乾，加入 PBST 洗滌 6 次；加入 TMB substrate 放置在室溫中並在震盪器上避光搖晃 10 分鐘；加入 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，放至 Synergy LX 多功能微量盤分光光譜儀，並設定為可見光系統，波長為 450 和 540 nm。

#### 雨傘節蛇毒毒性蛋白質衍生胜肽酵素免疫分析法

取 11 段雨傘節蛇毒之衍生胜肽各 400 ng 分別加入至 96 孔盤中，靜置在 4°C 環境中 16 小時；將孔盤內的液體取出並拍乾，加入 1% BSA 做為 blocking，放置在室溫中並在震盪器上搖晃 1 小時；將孔盤內的液體取出且拍乾，加入 PBST 洗滌 6 次，每次洗滌都需將盤子拍乾再加入液體；加入兩個高效價和兩個低效價之馬血漿，以 1：500 的比例配置在 1%脫脂牛奶中做偵測，放置在室溫中並在震盪器上搖晃 1 小時；將孔盤內的液體取出且拍乾，加入 PBST 洗滌 6 次；加入配製在 1%脫脂牛奶的 Rabbit-anti-horse HRP conjugate antibody 以 1:20,000 的比例做為偵測馬血漿內的抗體，放置在室溫中並在震盪器上搖晃 1 小時；將孔盤內的液體取出且拍乾，加入 PBST

洗滌 6 次；加入 TMB substrate 放置在室溫中並在震盪器上避光搖晃 10 分鐘；加入  $2\text{N H}_2\text{SO}_4$  終止反應，放至 Synergy LX 多功能微量盤分光光譜儀，並設定為可見光系統，波長為 450 和 540nm。

### 三、實驗結果

#### 3.1 SCX 管柱和 RP-HPLC 分離純化獲得 5 種雨傘節蛇毒毒性蛋白質

已知雨傘節蛇毒蛋白質內有突觸前神經毒素(pre-synaptic neurotoxin，稱為 $\beta$ 神經毒素，亦稱 $\beta$ -bungarotoxin、 $\beta$ -BTX)和突觸後神經毒素(post-synaptic neurotoxin，稱為 $\alpha$ 神經毒素，亦稱 $\alpha$ -bungarotoxin、 $\alpha$ -BTX)兩種主要蛋白。根據先前的研究成果，可使用強陽離子交換樹脂(Strong cation exchange, SCX)將雨傘節蛇毒蛋白質成分中的 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 做初步的分離。在 80 mM NaCl 鹽濃度下， $\beta$ -BTX 會被吸附在樹脂上，而 $\alpha$ -BTX 則不會被吸附並在流出液(flow through)中，接著，再以 300 mM NaCl 鹽濃度之沖提液(Elution)將 $\beta$ -BTX 沖提回收[13]。

我們即利用此方法初步分離雨傘節蛇毒，流出液與沖提液分別以 SDS-PAGE 進行分析(圖一)，流出液在~12 kDa 的部分有一個主要的條帶(band)，推測其很有可能是 $\alpha$ -BTX；而在沖提液中有兩個主要的條帶，分別位於~12 kDa 和~15 kDa 的位置，推測為 $\beta$ -BTX 的 A chain 和 B chain。

為了更有效分離雨傘節蛇毒蛋白質，我們進一步使用 RP-HPLC 分離已經藉由 SCX 初步分離的流出液與沖提液中的蛇毒蛋白質。首先，測試 A 和 B 緩衝液在不同時間點的比例來達到最佳的分離效果，並找出最佳的 RP-HPLC 分離條件(表一)。根據此 RP-HPLC 條件分離已經 SCX 純化的流出液

與沖提液(圖二)，於流出液樣本中收集到 14 個分離管樣本(fractions)；而在沖提液樣本中則收集到 15 個分離管樣本。

將這兩組樣本收集的分離管樣本透過 SDS-PAGE 確認各個分離管樣本中所含蛋白質的分子量和純度(圖三)，為了確定這些純化的蛋白質身分，將這些蛋白質條帶由電泳膠中切下，以酵素水解後使用質譜儀進行偵測，並使用分析軟體進行蛋白身分鑑定。如表二所示，在流出液分離管樣本的鑑定結果中，2 號分離管樣本為  $\gamma$ -bungarotoxin ( $\gamma$ -BTX)蛋白質，3 和 4 號分離管樣本為 Muscarinic toxin (MTX)蛋白質，5 號分離管樣本為主要的 $\alpha$ -BTX 蛋白質，9 號分離管樣本為 Neurotoxin-like (NTL)蛋白質；而在沖提液分離管樣本的鑑定結果中(表三)，4 至 9 以及 11 號分離管樣本皆為 $\beta$ -BTX。未來即可使用上述二維液相層析分離方法來純化雨傘節蛇毒中的  $\alpha$ -BTX、 $\beta$ -BTX、 $\gamma$ -BTX、MTX 和 NTL 蛋白質。

### 3.2 雨傘節蛇毒蛋白質之半數致死劑量 (LD<sub>50</sub>)

為了獲知雨傘節蛇毒中各主要蛋白質組成之半數致死劑量 (LD<sub>50</sub>)，我們進行小鼠致死性試驗，以皮下注射之方式注射蛇毒蛋白質至小鼠體內，觀察其 24 小時內的存活率。

雨傘節全蛇毒以 0.03、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18  $\mu\text{g/g}$  六個不同濃度

進行注射，在每組總數為五隻的小鼠之中，24 小時觀察後死亡的小鼠數目為 0、0、2、3、5、5 隻(表五)，經過 Probit analysis 之後計算出全蛇毒的 LD<sub>50</sub> 為 0.102 µg/g (0.075 - 0.124, 95% CI) (表四)。

α-BTX 以 0.18、0.20、0.22、0.24、0.26、0.28 µg/g 六個不同濃度進行注射，在每組總數為五隻的小鼠之中，24 小時觀察後死亡的小鼠數目為 0、0、2、4、5、5 隻 (表六)，經過 Probit analysis 之後計算出 α-BTX 的 LD<sub>50</sub> 為 0.225 µg/g (0.208 - 0.240, 95% CI) (表四)。

β-BTX 以 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 µg/g 六個不同濃度進行注射，在每組總數為五隻的小鼠之中，24 小時觀察後死亡的小鼠數目為 0、1、2、4、5、5 隻 (表七)，經過 Probit analysis 之後計算出 β-BTX 的 LD<sub>50</sub> 為 0.029 µg/g (0.02 - 0.036, 95% CI) (表四)。

針對 γ-BTX、MTX 與 NTL 這三個蛇毒成份，於初步測試 (n =1) 時，以 0.25、0.3、0.35、0.4、0.5 µg/g 的濃度進行小鼠試驗，此三個雨傘節蛇毒分別在 0.25、0.4、0.5 µg/g 的濃度不會造成小鼠死亡，以此結果得知三個蛋白質的 LD<sub>50</sub> 皆大於 0.25 µg/g。經過初步計算，以此 LD<sub>50</sub> 所計算出之 Toxicity score 遠大於我們預期主要致死蛋白質之設定(Relative toxicity of whole venom > 5%)，為符合動物實驗之 3R 原則，我們不再進行大規模小鼠試驗 (n = 5) 以測得 γ-BTX、MTX 與 NTL 這三個雨傘節蛇毒蛋白質精確的 LD<sub>50</sub>。

因此，其 LD<sub>50</sub> 標註為 >0.25、>0.4、>0.5 μg/g (表四)。

### 3.3 雨傘節蛇毒蛋白質的相對含量百分比

為了解各雨傘節蛇毒蛋白質在雨傘節全蛇毒中之含量比例，我們對於前次實驗中 HPLC 和 SDS-PAGE 結果分別進行積分。計算各蛋白質成分峰值區間的積分面積佔所有峰值區間總面積的比例，α-BTX 佔 13.3%、β-BTX 佔 65.9%、γ-BTX 佔 5.4%、MTX 佔 7.9%、NTL 佔 6.33% (表四)。

### 3.4 以毒力分數(Toxicity Score)找出主要致死蛋白質

為了有效的估算各雨傘節蛇毒蛋白質的致死性，需要綜合考慮蛇毒蛋白質的半數致死劑量與在全部蛇毒中的含量百分比，因此我們引進了毒力分數公式，即  $Toxicity\ score = Abundance / LD_{50}$ 。

依此公式，算出雨傘節全蛇毒的毒力分數為 980，待測蛇毒蛋白質依毒力分數排序為 β-BTX、α-BTX、γ-BTX、MTX、NTL，數值為 2239、59、22、20、13(表四)。其中 β-BTX 的毒力分數最高，是全蛇毒的 2 倍多，α-BTX 次之，佔全蛇毒的 5%左右，β-BTX、α-BTX 為毒力分數最高的兩個雨傘節蛇毒蛋白質成分，即挑選此兩個蛋白質進行後續實驗分析。

### 3.5 雨傘節致死蛋白質立體結構

為了了解 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 兩個致死蛋白質的立體結構，我們運用蛋白質數據庫的資料(Uniport)進行兩個蛋白質的立體結構分析，結果如圖四。 $\alpha$ -BTX 一共由 74 個胺基酸組成，主要結構包含五個 $\beta$ 折板( $\beta$ -sheet)，由 N 端先經過兩個成對的折板，緊接著又是三個緊密排列的折板，接著就到 C 端，折板結構由雙硫鍵支撐 (圖四 A)； $\beta$ -BTX 則是由兩個次單位組成，分別為 A chain 和 B chain，前者由 120 個胺基酸組成，後者由 61 個胺基酸構成，兩個次單位蛋白質由一雙硫鍵 C<sub>42</sub>(A)-C<sub>79</sub>(B)相連接 (圖四 B) 形成一個主要蛋白質即為 $\beta$ -BTX，接下來的段落中都將會把兩個次單位獨立分析。

### 3.6 以 B 細胞及親疏水性方法尋找效價相關表位

為了找到致死蛋白質與致死中和效價最相關的蛋白質表位，我們使用了 B 細胞表位分析以及親水性表位分析兩種方法進行相關表位的篩選以及預測，容易與 B 細胞形成抗原抗體結合的表位表示它容易被免疫系統辨識而產生效價；親水性較高的表位則多位於致死蛋白質的外側，容易成為結合的目標。

使用 Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 的方法分析後，篩選出 B 細胞結合性分數大於 0.5 的數段蛋白質表位，稱為 B 細胞預選表位，其中 $\alpha$ -BTX 預測出的表位共有四段 (圖五 A)； $\beta$ -BTX 的 A chain 共有四段 (圖五 B)； $\beta$ -BTX 的 B chain 共有三段 (圖五 C)。各個表位的編號、胺基酸的序

列、組成以及長度如表八。將這十一個 B 細胞預選表位以紅色標記標示在立體結構上(圖六至圖八)，可得知 B 細胞預選表位多位在結構上之彎折處。

在親疏水性分析中，我們運用 Parker 等人於 1986 年所提出的各別胺基酸的親疏水性數值。在 ProtScale 網站上，以 15 個胺基酸序列為單位，進行蛋白質親水性表位的加權分析，得到的每段序列的親水性指數如圖九所示。根據親水指數的高低，在 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 的 A、B chain 上分別找出了 2、3、2 段親水性較高的表位，稱為親水性預選表位。各個表位如表九所示，它們的長度皆為 15 個胺基酸。

我們將所有的親水性預選表位標記在立體結構上，確認它們都位於蛋白質的外側(圖十至圖十二)。 $\alpha$ -BTX 與 $\beta$ -BTX 皆為小分子的蛋白質，幾乎沒有不在表面的結構，但上述之親水性預選表位仍普遍分布在蛋白質的邊緣或是外側結構凸出處，與其親水性質相符。

### 3.7 預選表位決定欲合成胜肽序列

我們結合分析前述預測的 11 個 B 細胞預選表位與 7 個親水性預選表位，取其重疊程度最高的序列來作為日後要加以合成研究的衍生胜肽，總共 11 條(表十)。每段胜肽的長度皆為 15 個胺基酸，針對 $\alpha$ -BTX 決定合成 4 條胜肽，分別有和 B 細胞預選表位與親水性預選表位重疊的序列所構成的 ABTX\_p27 與 ABTX\_p81 以及將 B 細胞預選表位延長至 15 個胺基酸長度

的 ABTX\_p46 與 ABTX\_p66；針對 $\beta$ -BTX-A chain 決定合成 4 條胜肽，分別為結合 B 細胞預選表位與親水性預選表位的序列的 BBTX-A1\_p54、BBTX-A1\_p80 和 BBTX-A1\_p129 以及由 B 細胞預選表位 BBTX\_A\_B01 加長的 BBTX-A1\_p37；針對 $\beta$ -BTX-B chain 決定合成 3 條胜肽，分別為屬於 B 細胞預選表位與親水性預選表位皆有出現的序列的 BBTX-A2\_p27 與 BBTX-A2\_p61 以及來自 B 細胞預選表位 BBTX\_B\_B02 BBTX-A2\_p47，以上共十一條欲合成胜肽的立體結構位置以紅色標記標示在立體結構上(圖十三至圖十五)。

### 3.8 以馬血漿樣品測試確認後續利用蛋白質 ELISA 檢測之稀釋倍率

從免疫雨傘節蛇毒的馬匹身上得到的馬血漿，經小鼠動物實驗後，分為效價小於 60 田中單位(Tanaka unit, T.U.)的低效價馬血漿(Low Potency, LP)以及大於等於 60 田中單位的高效價馬血漿(High Potency, HP)兩類。從馬血漿中隨機選出兩個低效價和兩個高效價的馬血漿樣品，編號 401-1081230 和 406-1070417 為低效價馬血漿的組別，編碼為 LP-3 和 LP-7；編號 354-1090512 和 407-1070417 為高效價馬血漿的組別，編碼為 HP-9 和 HP-22。從圖十六的結果得知低效價和高效價的馬血漿樣品無論在 $\alpha$ -BTX 或 $\beta$ -BTX 的免疫辨識能力測試中，皆在 1：5,000 的稀釋倍率下有最高之訊號，且免疫辨識訊號接隨著序列稀釋而遞減。編號 HP-9 的馬血漿樣品在 1：10,000 稀釋倍率

下，針對 $\alpha$ -BTX 訊號值接近 2，有可能造成測試時發生訊號過飽和的現象，導致分析上的誤差，所以選用 1:20,000 的稀釋倍率進行後續的實驗測試。從 ELISA 的初步結果可以得知高效價馬血漿針對 $\alpha$ -BTX 和 $\beta$ -BTX 的訊號皆介於 0.5 至 1；低效價馬血漿訊號皆小於 0.5，初步判斷 $\alpha$ -BTX 和 $\beta$ -BTX 此兩種毒性蛋白質有區分低效價和高效價的馬血漿樣品的能力。

### 3.9 以馬血漿樣品測試確認後續利用衍生胜肽 ELISA 檢測之稀釋倍率

針對11段雨傘節蛇毒之衍生胜肽進行酵素免疫分析的結果見圖十七，我們在96孔盤中加入400 ng的胜肽量並針對以1:500為稀釋倍率的馬血漿LP-3、LP-7、HP-9和HP-22做偵測。結果可以得知透過高劑量的胜肽樣品以及高稀釋倍率的馬血漿樣品，在此11條衍生胜肽中，只有ABTX\_p81有較明顯的訊號，其餘10段衍生胜肽結果幾乎無訊號，趨近於0，表示馬血漿樣品針對此10段衍生胜肽的免疫親和力較差。因此，後續實驗不再對此10段胜肽進行測試。從測試結果中得知高效價馬血漿的訊號皆高於1，低效價馬血漿的訊號皆小於1，據此可推測ABTX\_p81有區分高效價和低效價馬血漿的能力。

接著，我們進行 ABTX\_p81 條件優化，分別加入 100 ng、200 ng 和 400 ng 等三種不同量的 ABTX\_p81 在 96 孔盤中，選取 HP-22 馬血漿做為測試的樣品，分別稀釋成 1:500、1:1,000 和 1:2,000 等三個不同濃度，以觀察此衍生胜肽的最佳偵測條件。從圖十八結果得知，無論哪種稀釋條件，

ABTX\_p81 皆有顯著的訊號生成，考慮 HRP 系統的理论线性範圍區間，選擇以 400 ng 的胜肽量和 1:2,000 的馬血漿稀釋倍率做為日後偵測 ELISA 的條件。

#### 四、實驗討論

本研究利用毒力分數評估雨傘節蛇毒中的主要致毒蛋白質成分，並預期以 ELISA 檢測針對主要致毒蛋白質的抗體免疫辨識效力能反應在小鼠體內的致死中和效價。在此一年的研究計畫結果中，以毒力分數計算推估 alpha-bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX) 和 beta-bungarotoxin ( $\beta$ -BTX) 為雨傘節蛇毒的主要致死蛋白質，並以此兩個蛋白質建立成抗體檢測之 ELISA 試劑，初步以測試了兩個高致死中和效價與兩個低致死中和效價的馬血漿檢體，如預期地，高效價之馬血漿對兩個主要致毒蛋白質有較高的免疫辨識效力。

另一方面，以致死蛋白質的衍生胜肽來檢測致死中和效價的部分，此兩個主要致毒蛋白質經由軟體和立體結構的評估分析所選出的 11 段衍生胜肽，經由初步判斷只有一條衍生胜肽 ABTX\_p81 可被馬血漿辨識產生可辨認之免疫辨識訊號，且這條衍生胜肽在區分高效價與低效價馬血漿上也是具有潛力的，在初步建立以其當作抗原的抗體檢測 ELISA 試劑測試上，兩個高效價馬血漿所產生的免疫辨識皆比兩個低效價馬血漿來的高。此研究結果初步證實我們的假說，以毒力分數判定出的主要致毒蛋白質(或其衍生胜肽)來當作抗原開發成抗體檢測 ELISA 是非常有機會用於檢測馬血漿的致死中和效價，判定是否可以對免疫馬匹進行大量採血製造血清。

但由於目前只有使用少量的馬血漿檢體進行測試，後續還需要使

用更多的馬血漿檢體驗證此三個抗原的免疫辨識效價與致死中和效價是否有很高的關聯性以及是否能做為很好的中和效價判定之候選生物標記，並開發成 antibody-detection ELISA 試劑來檢測抗蛇毒馬血漿製程內的致死中和效價，取代傳統小鼠活體試驗，保護動物福祉。

## 五、結論與建議

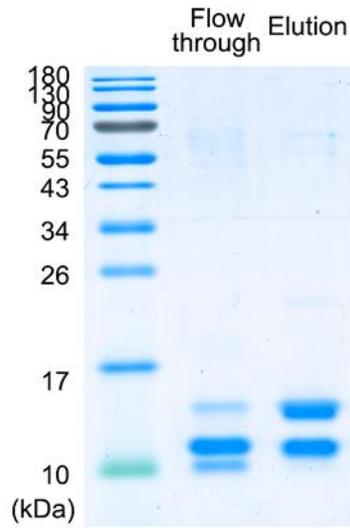
本一年期的計畫已建立兩傘節蛇毒蛋白質的二維分離純化方法、評估兩傘節蛇毒主要成分的毒力分數、分析蛇毒蛋白質的致毒位點、建立開發以主要致毒蛋白質(或其衍生胜肽)當作抗原之抗體檢測 ELISA 試劑，初步也以少量馬血漿檢體證實以 $\alpha$ -BTX、 $\beta$ -BTX 和 ABTX\_p81 作為抗原之抗體檢測 ELISA 試劑是有望作為致死中和效價的檢測方法，取代傳統動物試驗、維護動物福祉。後續則須在收集大量馬血漿檢體進行更嚴謹之檢測試驗，確認這些抗體檢測 ELISA 試劑作為致死中和效價的檢測方法之可行性。

## 六、參考文獻

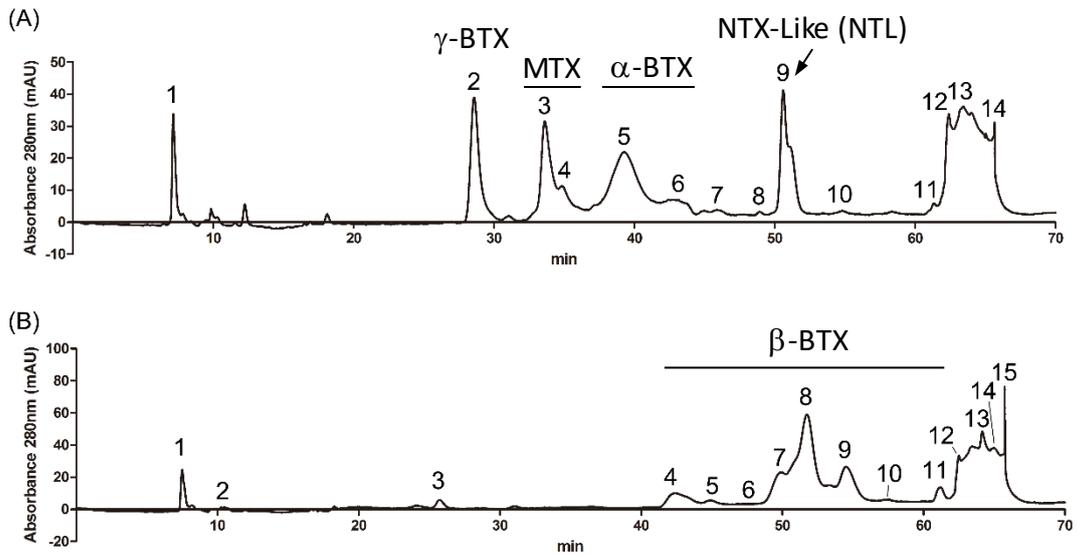
1. Liao MY, Huang RJ. Toxoids and antivenoms of venomous snakes in Taiwan. *J Toxicol-Toxin Rev.* 1997;16(3):163-75.
2. Hung DZ. Taiwan's venomous snakebite: epidemiological, evolution and geographic differences. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(2):96-101. Epub 2004/02/18.
3. Chang KP, Lai CS, Lin SD. Management of poisonous snake bites in southern Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci.* 2007;23(10):511-8.
4. Liu CC, Lin CC, Hsiao YC, Wang PJ, Yu JS. Proteomic characterization of six Taiwanese snake venoms: Identification of species-specific proteins and development of a SISCAPA-MRM assay for cobra venom factors. *J Proteomics.* 2018;187:59-68. Epub 2018/06/22.
5. Chen PC, Huang MN, Chang JF, Liu CC, Chen CK, Hsieh CH. Snake venom proteome and immuno-profiling of the hundred-pace viper, *Deinagkistrodon acutus*, in Taiwan. *Acta Trop.* 2019;189:137-44. Epub 2018/10/01.
6. Tan KY, Tan NH, Tan CH. Venom proteomics and antivenom neutralization for the Chinese eastern Russell's viper, *Daboia siamensis* from Guangxi and Taiwan. *Sci Rep.* 2018;8(1):8545. Epub 2018/06/06.
7. Huang HW, Liu BS, Chien KY, Chiang LC, Huang SY, Sung WC, et al. Cobra venom proteome and glycome determined from individual snakes of *Naja atra* reveal medically important dynamic range and systematic geographic variation. *J Proteomics.* 2015;128:92-104. Epub 2015/07/22.
8. Wu PF, Wu SN, Chang CC, Chang LS. Cloning and functional expression of B chains of beta-bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded

- krait). *Biochem J.* 1998;334 ( Pt 1):87-92. Epub 1998/08/07.
9. Hannan S, Mortensen M, Smart TG. Snake neurotoxin alpha-bungarotoxin is an antagonist at native GABA(A) receptors. *Neuropharmacology.* 2015;93:28-40. Epub 2015/01/31.
  10. Chieh-Fan C, Tzeng-Jih L, Wen-Chi H, Hua-Wei Y. Appropriate Antivenom Doses for Six Types of Envenomations Caused by Snakes in Taiwan. *J Venom Anim Toxins.* 2009;15(3):479-90.
  11. Sells PG. Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives. *Toxicon.* 2003;42(2):115-33. Epub 2003/08/09.
  12. Theakston RD, Reid HA. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon.* 1979;17(5):511-5. Epub 1979/01/01.
  13. Liu CC, Yang YH, Hsiao YC, Wang PJ, Liu JC, Liu CH, et al. Rapid and Efficient Enrichment of Snake Venoms from Human Plasma Using a Strong Cation Exchange Tip Column to Improve Snakebite Diagnosis. *Toxins.* 2021;13(2).
  14. Laustsen AH, Lohse B, Lomonte B, Engmark M, Gutiérrez JM. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon.* 2015;104:43-5.

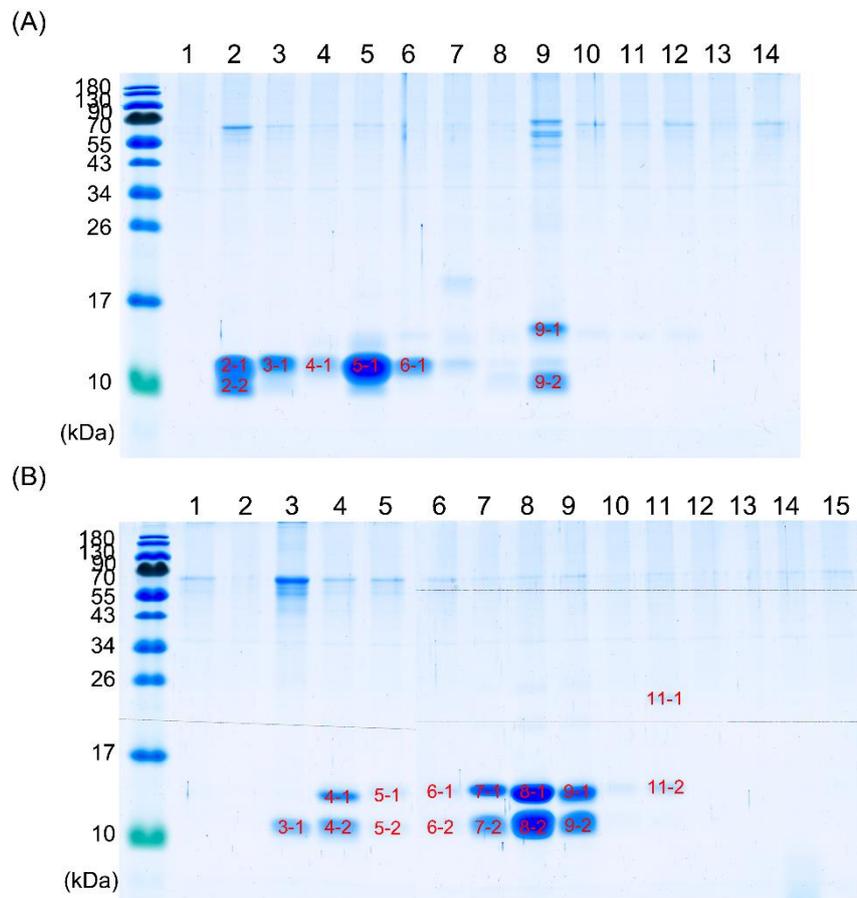
## 七、圖次



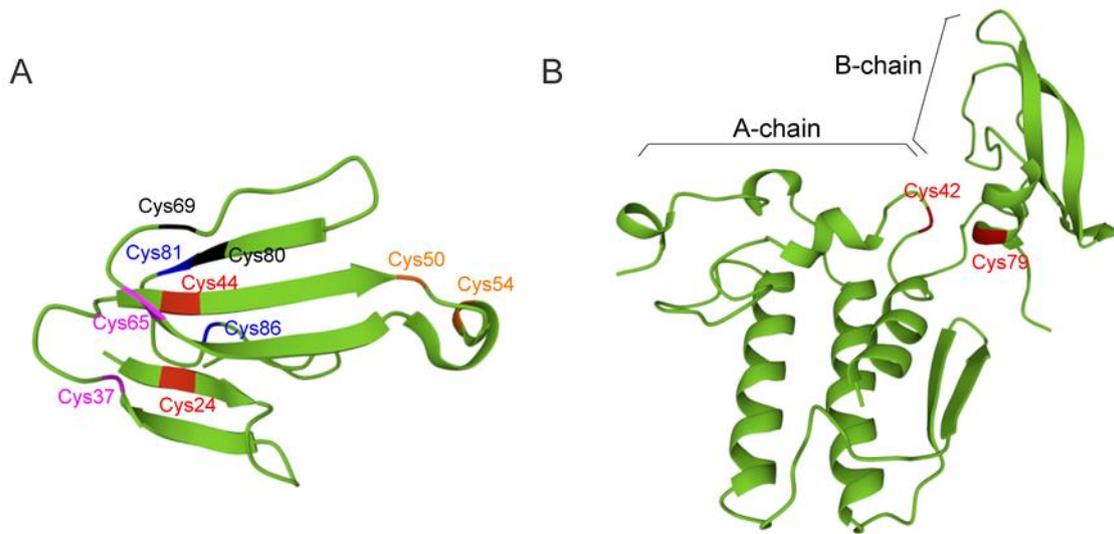
圖一、雨傘節蛇毒蛋白質經 SCX 管柱分離純化，使用丙酮做蛋白質沉澱。



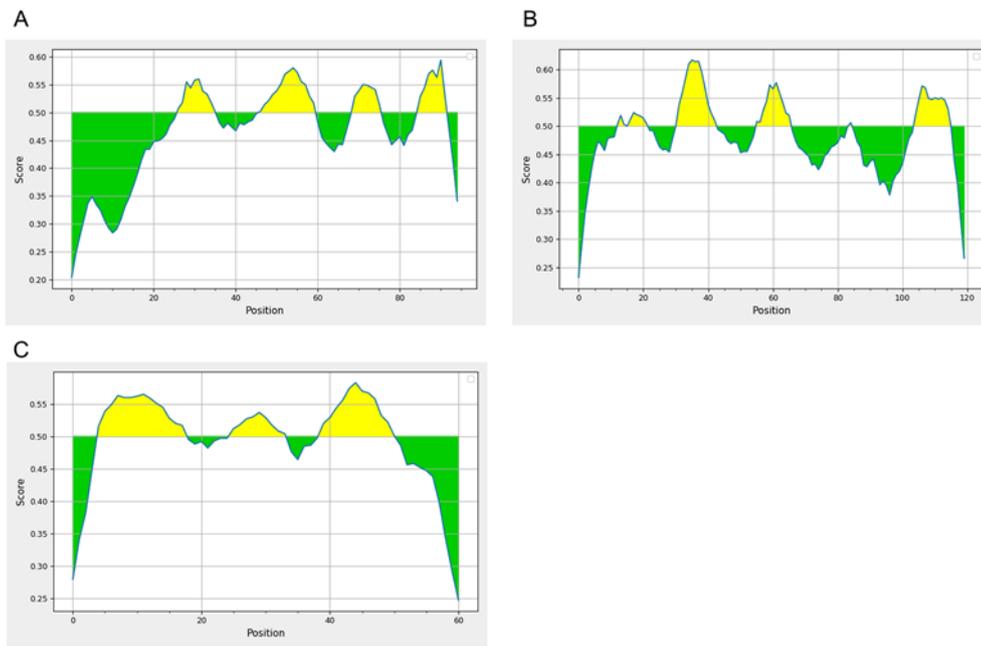
圖二、雨傘節蛇毒蛋白質經 RP-HPLC 分離之 A280 圖譜。A：流出液樣本 (Flow through)，B：沖提液樣本(Elution)



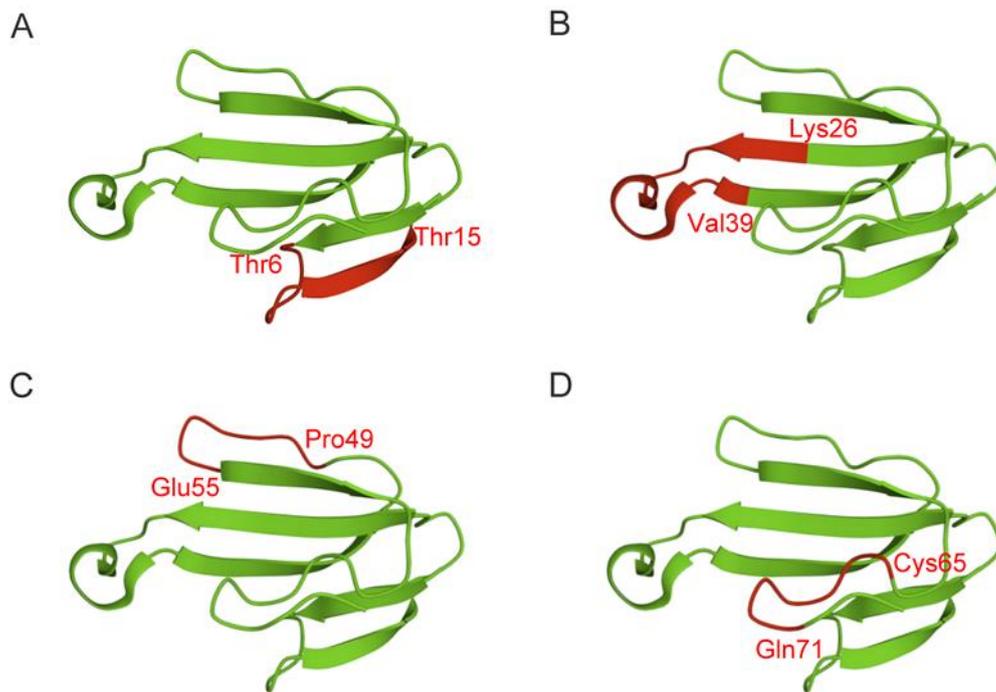
圖三、雨傘節蛇毒蛋白質經 RP-HPLC 純化之 SDS-PAGE 結果。A：流出液樣本(Flow through)，B：沖提液樣本(Elution)。



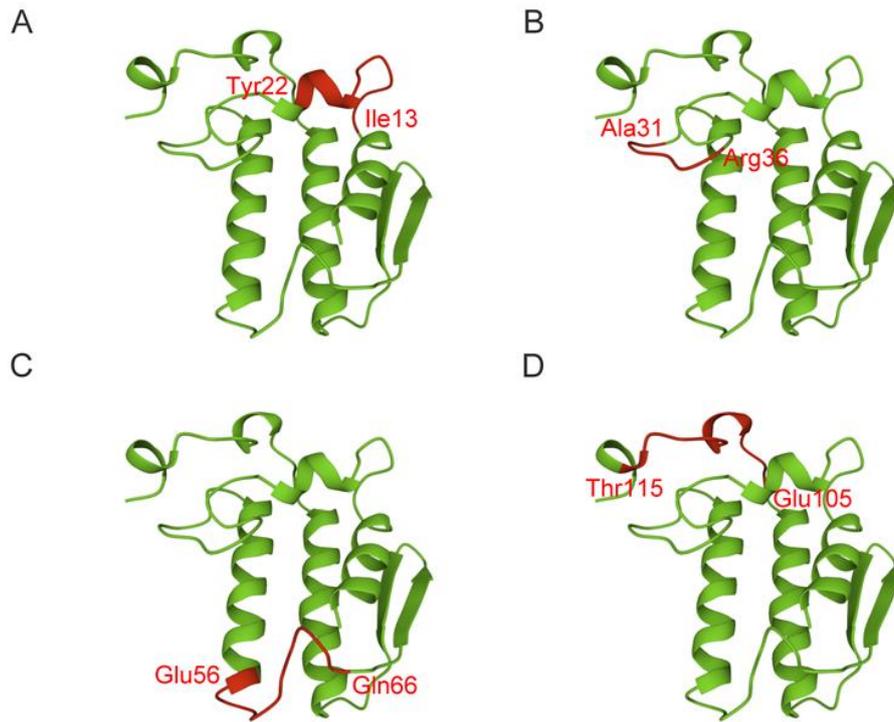
圖四、 $\alpha$ -BTX 與  $\beta$ -BTX 之立體結構。A： $\alpha$ -BTX 之立體結構與雙硫鍵位置，圖中以同色標出的兩段序列即為結構中的雙硫鍵， $\alpha$ -BTX 共有五個雙硫鍵，分別為 C<sub>24</sub>-C<sub>44</sub>(紅色)、C<sub>37</sub>-C<sub>65</sub>(粉紅色)、C<sub>50</sub>-C<sub>54</sub>(橘色)、C<sub>69</sub>-C<sub>80</sub>(黑色)、C<sub>81</sub>-C<sub>86</sub>(藍色)。B： $\beta$ -BTX 之立體結構與雙硫鍵位置，圖中標示的是連接兩次單位的雙硫鍵(C<sub>42</sub>(A)-C<sub>79</sub>(B)、紅色)。



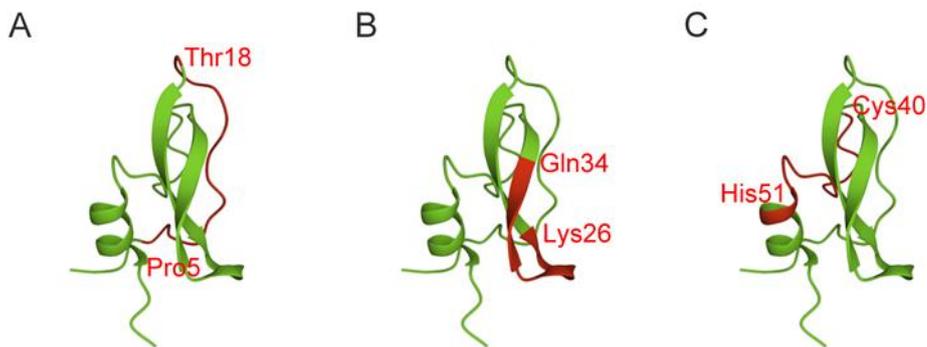
圖五、使用 Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 進行 B 細胞表位預測。A： $\alpha$ -BTX，共篩選出四段預選表位，以黃色標示。B： $\beta$ -BTX-A chain，共篩選出四段預選表位，以黃色標示。C： $\beta$ -BTX-B chain，共篩選出三段預選表位，以黃色標示。



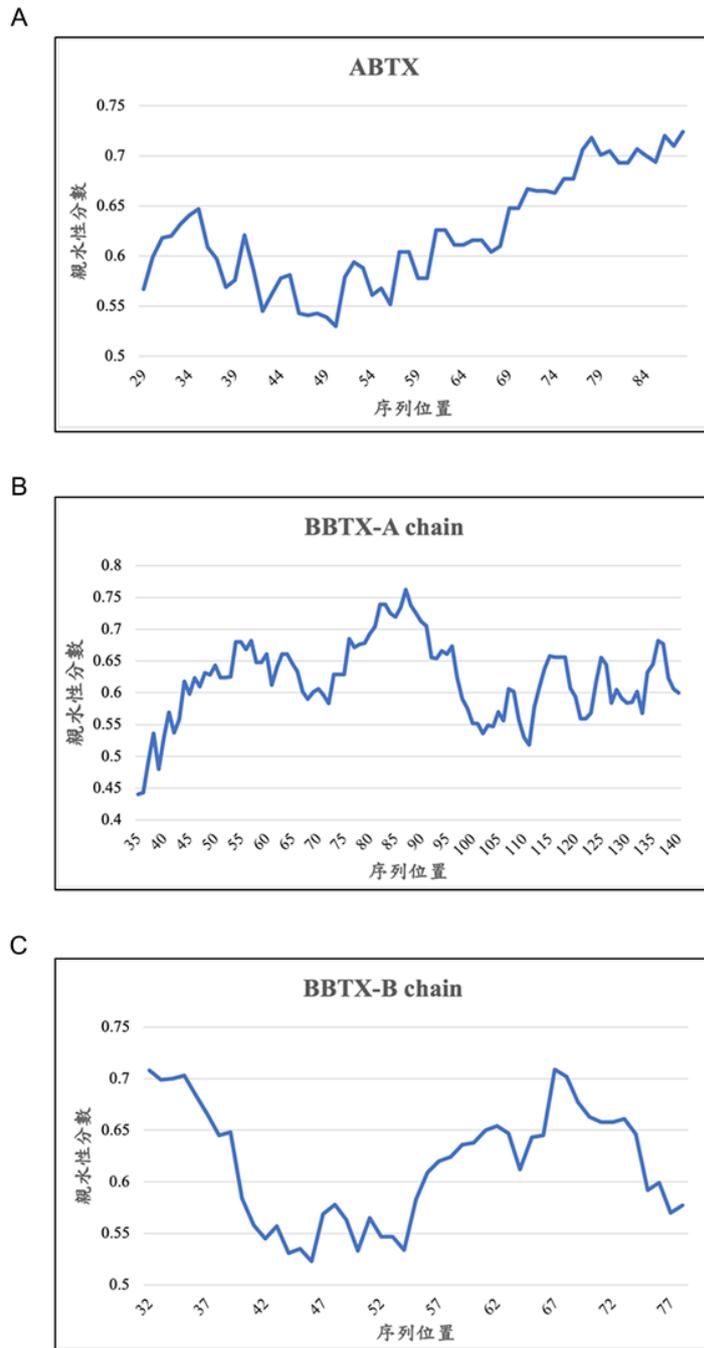
圖六、 $\alpha$ -BTX 之 B 細胞預選表位之立體位置。A：ABTX\_B01 與 B：ABTX\_B02 包含蛋白質部分折板結構以及兩折板間的大角度彎折處，為紅色標示處 C：ABTX\_B03 與 D：ABTX\_B04 則是在胺基酸鏈上的彎折處，為紅色標示處。其中以 ABTX\_B03 的彎折角度最大。



圖七、 $\beta$ -BTX A chain 之 B 細胞預選表位之立體位置。A：BBTX\_A\_B01，  
B：BBTX\_A\_B02，C：BBTX\_A\_B03，D：BBTX\_A\_B04 皆位於螺旋結  
構的末端，且多包含有螺旋結構與彎折結構，紅色標示處。

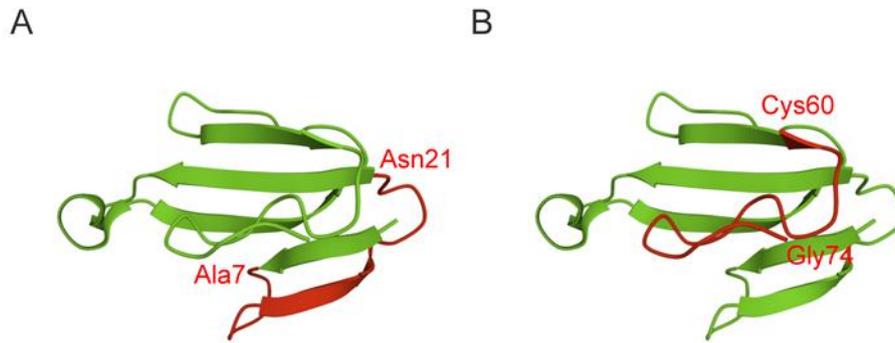


圖八、 $\beta$ -BTX B chain 之 B 細胞預選表位之立體位置。A：BBTX\_B\_B01，  
分佈在近 N 端的胜肽長鏈上，B：BBTX\_B\_B02，在兩個折板結構之間的  
轉折處，C：BBTX\_B\_B03，靠近 C 端的螺旋結構一端，皆為紅色標示處。

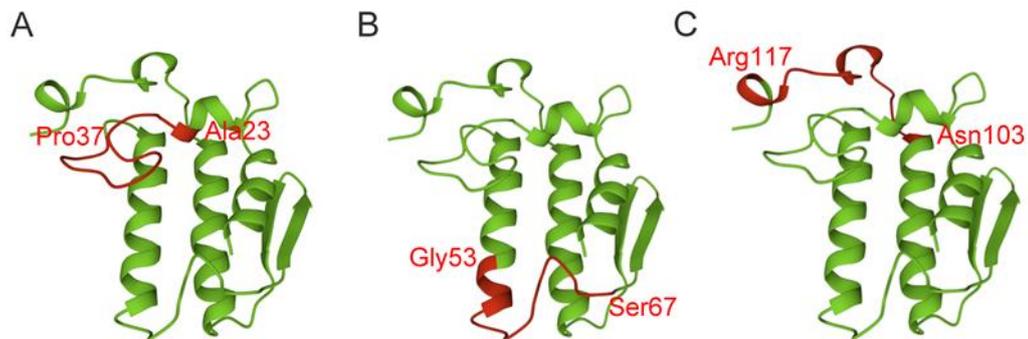


圖九、 $\alpha$ -BTX 和  $\beta$ -BTX 之親疏水性表位預測。胺基酸序列的親水性分數，橫軸為序列位置，代表以該位置的胺基酸為中心點，向前後各延伸 7 個胺基酸，得到全長共 15 個胺基酸的序列，其對應的數值為該序列的親水性分

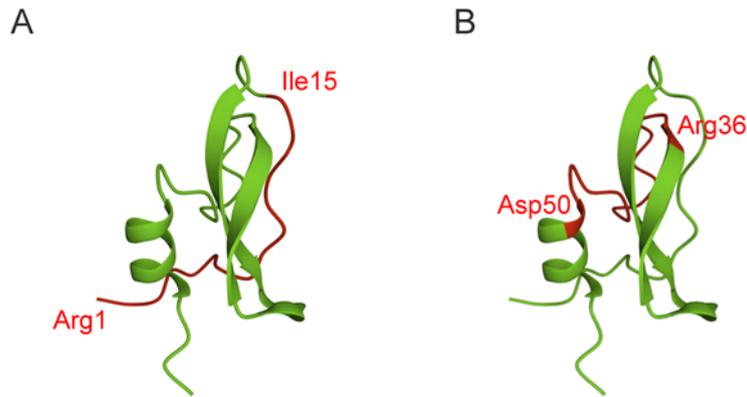
數，數值越高表示該段序列親水性越高。A： $\alpha$ -BTX，B： $\beta$ -BTX\_A chain，  
C： $\beta$ -BTX\_B chain。



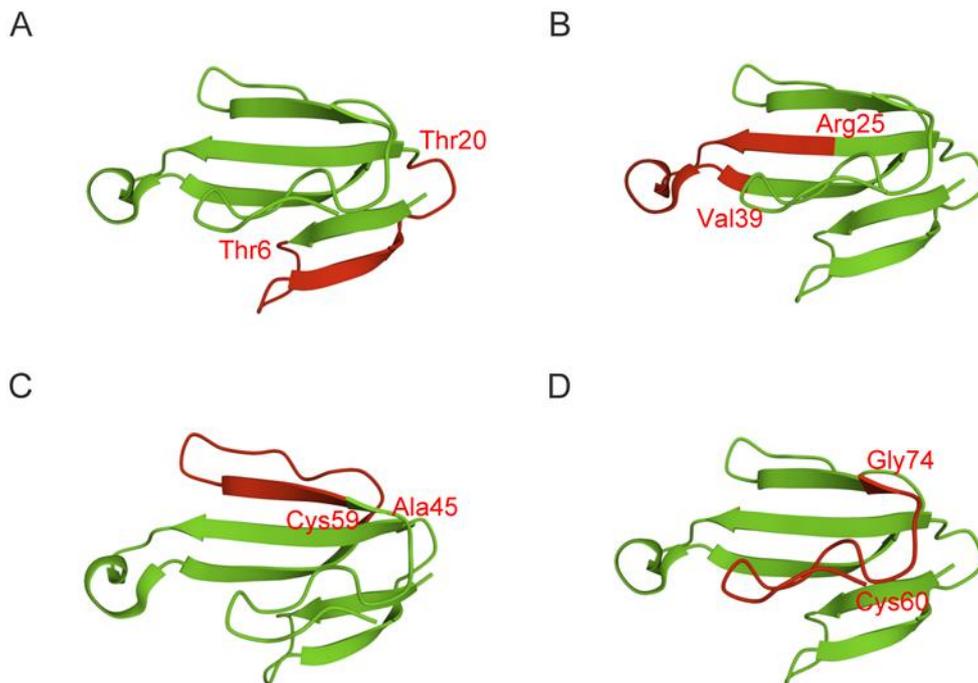
圖十、 $\alpha$ -BTX 的親水性預選表位立體位置。A：ABTX-H01 的中心位在 N 端的外側折板上，B：ABTX-H02 的中心位直接位於 C 端，為紅色標示處。



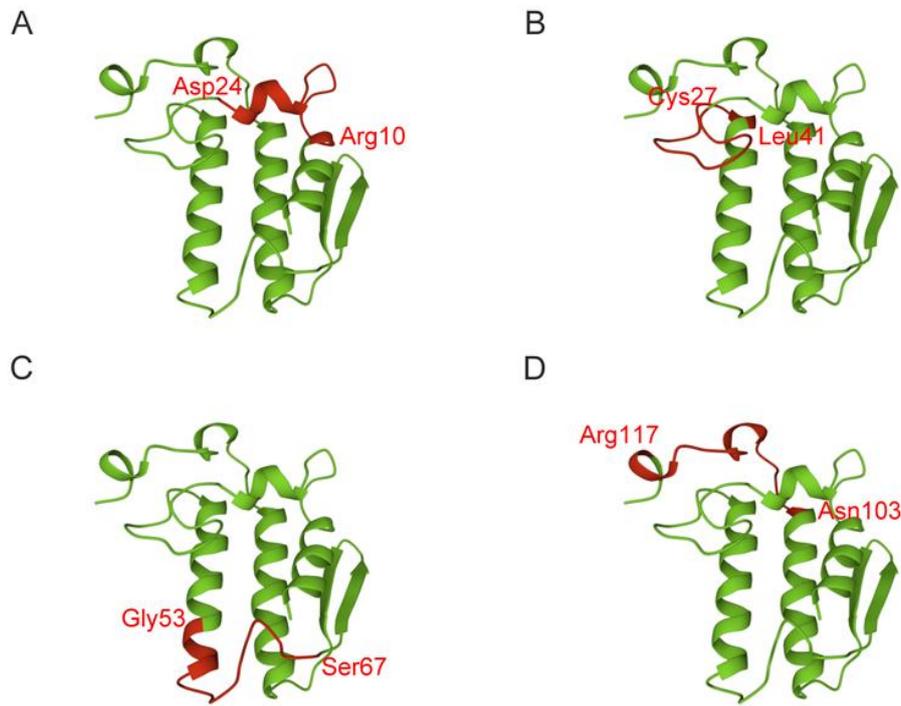
圖十一、 $\beta$ -BTX-A chain 的親水性預選表位立體位置。A：BBTX-A-H01，B：BBTX-A-H02，C：BBTX-A-H03 的預選表位多位於蛋白質外部的結構彎折處，與 B 細胞預選表位重疊，為紅色標示處。



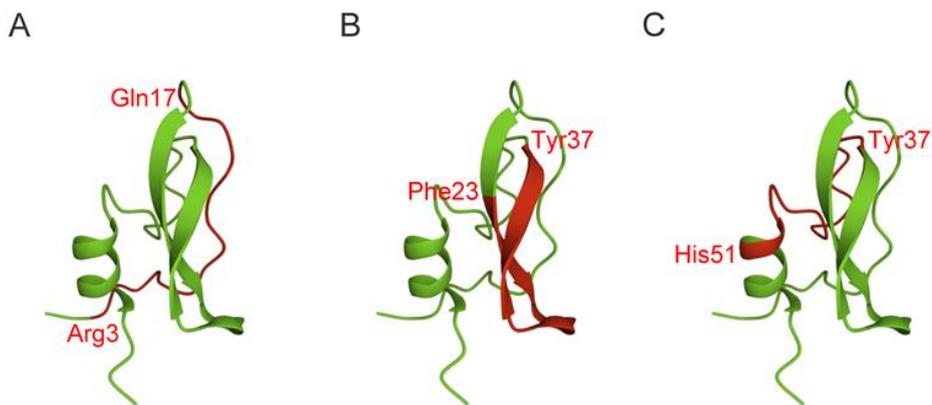
圖十二、 $\beta$ -BTX-B chain 的親水性預選表位立體位置。A：BBTX-B-H01 位於 N 端，B：BBTX-B-H02 位於螺旋結構與折板結構的交界彎折處，此兩個表位與 B 細胞預選表位屬於高度重疊，為紅色標示處。



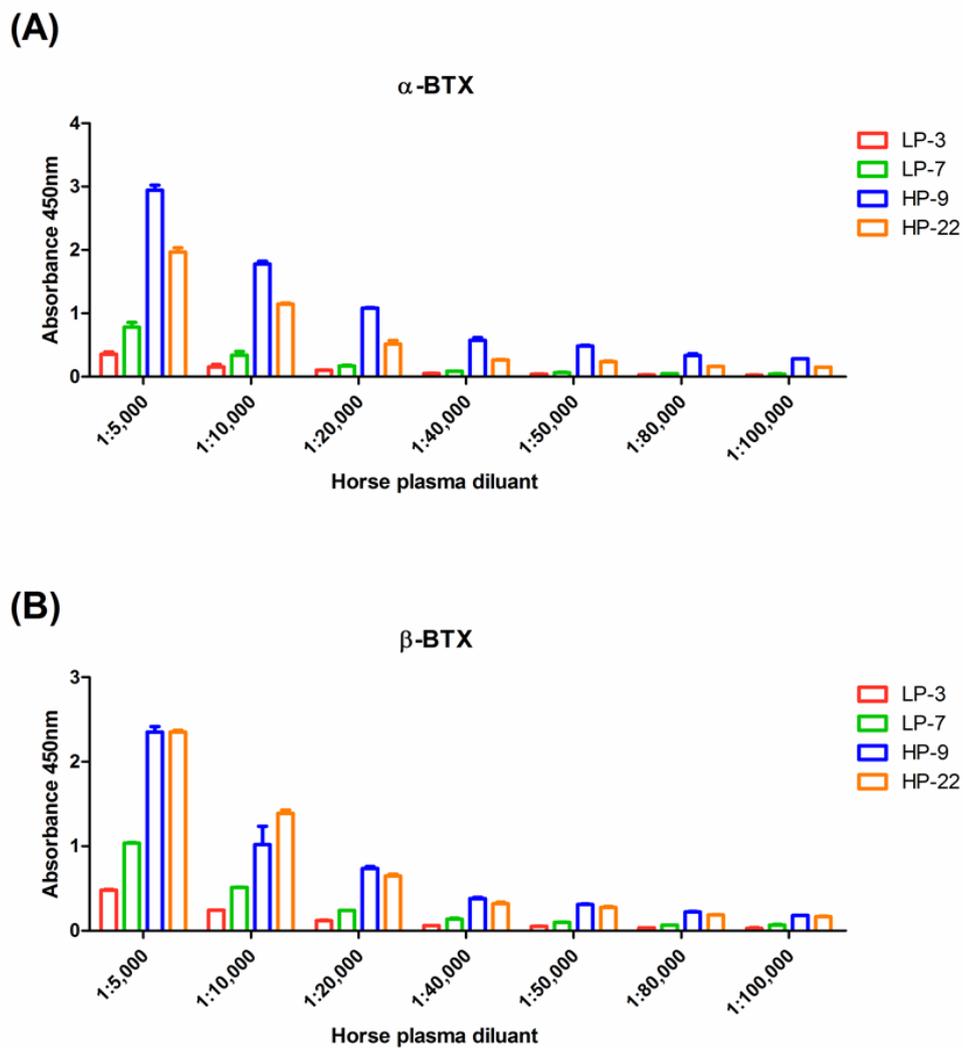
圖十三、 $\alpha$ -BTX 欲合成胜肽立體結構位置。A：ABTX\_p27，B：ABTX\_p46，C：ABTX\_p66，D：ABTX\_p81，紅色標示處為序列起始和終止的胺基酸及其位置。



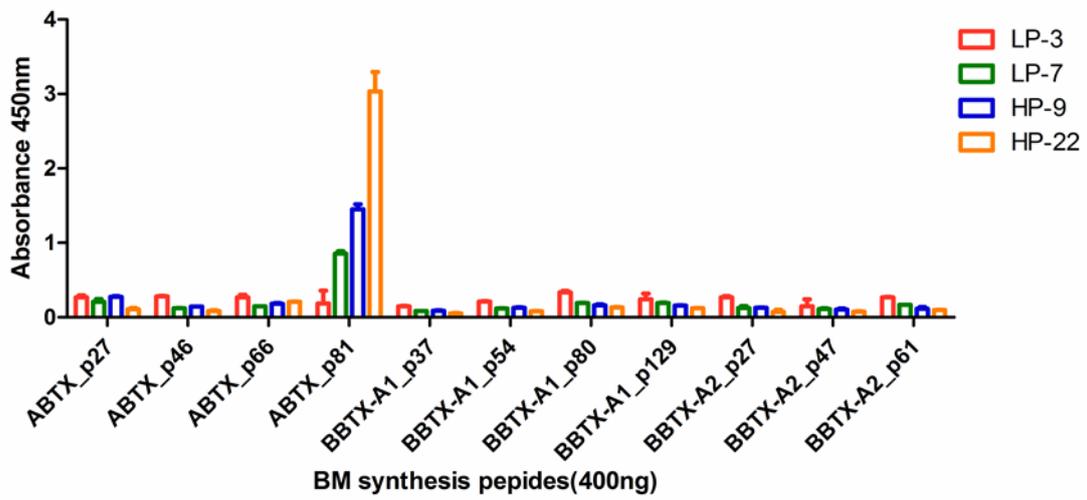
圖十四、 $\beta$ -BTX 欲合成胜肽立體結構位置。A：BBTX-A1\_p37，B：BBTX-A1\_p54，C：BBTX-A1\_p80，D：BBTX-A1\_p129，紅色標示處為序列起始和終止的胺基酸及其位置。



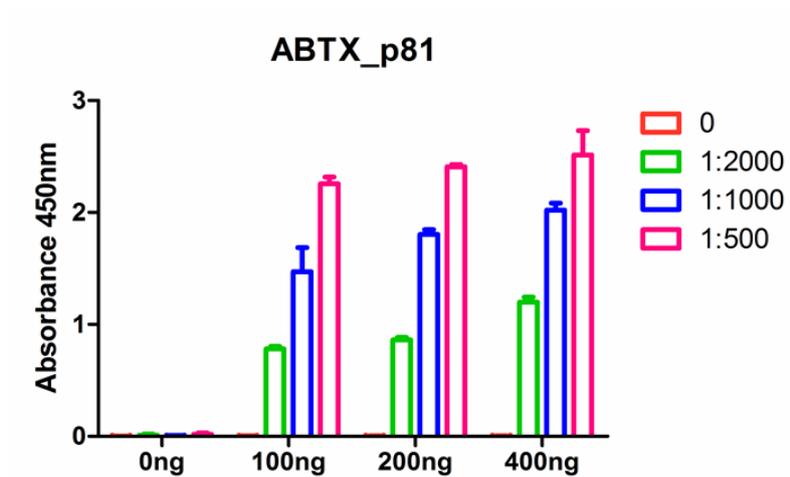
圖十五、 $\beta$ -BTX 欲合成胜肽立體結構位置。A：BBTX-A2\_p27，B：BBTX-A1\_p47，C：BBTX-A2\_p61，紅色標示處為序列起始和終止的胺基酸及其位置。



圖十六、透過ELISA比較兩種HPLC純化之雨傘節蛇毒蛋白在不同稀釋倍率條件下之訊號強度。A： $\alpha$ -BTX，B： $\beta$ -BTX。



圖十七、透過ELISA比較11段雨傘節蛇毒蛋白之衍生胜肽在1:500稀釋倍率條件下之訊號強度。



圖十八、雨傘節蛇毒蛋白質之衍生胜肽ABTX\_p81的ELISA條件測試。

## 八、表次

表一：RP-HPLC 之 A 和 B 緩衝液在不同時間區間所佔比例

	A 緩衝液(%)	B 緩衝液(%)	流速
Time (min)	0.1%TFA/ddH <sub>2</sub> O	0.1%TFA/100%ACN	mL/min
0	95	5	0.7
3	95	5	0.7
7	82	18	0.7
51	69	31	0.7
54	50	50	0.7
55	20	80	0.7
56	0	100	0.7
57	0	100	0.7
59	95	5	0.7
60	95	5	0.7

表二、流出液樣本之膠體內蛋白水解之身分鑑定。

	Accession	Description	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
2-1	Q9YGJ0	Gamma-bungarotoxin OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3NO5I_BUNMU]	89	9.8	8.13
	P15818	Long neurotoxin homolog OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3NO4H_BUNMU]	87	9.7	7.96
2-2	P15818	Long neurotoxin homolog OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3NO4H_BUNMU]	87	9.7	7.96
	Q9YGJ0	Gamma-bungarotoxin OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3NO5I_BUNMU]	89	9.8	8.13
3-1	Q8JFX7	Muscarinic toxin BM14 OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3NOHE_BUNMU]	103	11.4	8.12
4-1	Q8JFX7	Muscarinic toxin BM14 OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3NOHE_BUNMU]	103	11.4	8.12
	Q9PW19	Toxin BMLCL OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3NOH_BUNMU]	103	11.3	7.43

5-1	P60615	Alpha-bungarotoxin OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3L21A_BUNMU]	95	10.3	7.97
	P60616	Alpha-bungarotoxin isoform V31 OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3L21V_BUNMU]	95	10.3	7.97
6-1	P60616	Alpha-bungarotoxin isoform V31 OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3L21V_BUNMU]	95	10.3	7.97
	P60615	Alpha-bungarotoxin OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [3L21A_BUNMU]	95	10.3	7.97
9-1	Q9PU97	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A7 chain (Fragment) OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=2 SV=1 - [PA2B7_BUNMU]	137	15.1	7.68
9-2	Q7ZT13	Neurotoxin-like protein pMD18-NTL1/2/4/5 OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=3 SV=1 - [3SO95_BUNMU]	86	9.8	7.83

表三、沖提液樣本之膠體內蛋白水解之身分鑑定。

	Accession	Description	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
3-1	Q9YGI8	Short neurotoxin homolog NTL4 OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=3 SV=1 - [3SO3_BUNMU]	86	9.5	9.11
4-1	Q90251	Acidic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A6 chain (Fragment) OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=2 SV=1 - [PA2A6_BUNMU]	137	15.1	7.15
	Q9PTA1	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A-AL1 chain (Fragment) OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [PA2BA_BUNMU]	138	15.2	7.71
4-2	P00989	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH2_BUNMU]	85	9.6	8.66
	P43445	Short neurotoxin homolog OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=3 SV=1 - [3SO7_BUNMU]	83	9.5	8.57
5-1	Q9PTA1	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A-AL1 chain (Fragment) OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [PA2BA_BUNMU]	138	15.2	7.71

	Q90251	Acidic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A6 chain (Fragment) OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=2 SV=1 - [PA2A6_BUNMU]	137	15.1	7.15
5-2	P00989	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH2_BUNMU]	85	9.6	8.66
	P00987	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B1 chain, major component OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH1_BUNMU]	85	9.6	8.68
6-1	P00617	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A1 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B1_BUNMU]	147	16.2	7.47
	P00618	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B2_BUNMU]	145	16.3	7.99
	Q90251	Acidic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A6 chain (Fragment) OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=2 SV=1 - [PA2A6_BUNMU]	137	15.1	7.15
6-2	P00989	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH2_BUNMU]	85	9.6	8.66
7-1	P00618	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B2_BUNMU]	145	16.3	7.99

	P00617	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A1 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B1_BUNMU]	147	16.2	7.47
7-2	P00987	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B1 chain, major component OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH1_BUNMU]	85	9.6	8.68
	P00989	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH2_BUNMU]	85	9.6	8.66
8-1	P00617	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A1 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B1_BUNMU]	147	16.2	7.47
	P17934	Acidic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A4 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=2 SV=1 - [PA2A4_BUNMU]	147	16.2	6.14
8-2	P00987	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B1 chain, major component OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH1_BUNMU]	85	9.6	8.68
	P00989	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH2_BUNMU]	85	9.6	8.66
	Q9PTA1	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A-AL1 chain (Fragment) OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=1 - [PA2BA_BUNMU]	138	15.2	7.71

9-1	P00619	Acidic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A3 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2A3_BUNMU]	147	16.2	6.81
	P00618	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B2_BUNMU]	145	16.3	7.99
	P00617	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A1 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B1_BUNMU]	147	16.2	7.47
9-2	P00987	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B1 chain, major component OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH1_BUNMU]	85	9.6	8.68
	P00989	Kunitz-type serine protease inhibitor homolog beta-bungarotoxin B2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [VKTH2_BUNMU]	85	9.6	8.66
11-1	None				
11-2	P00617	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A1 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B1_BUNMU]	147	16.2	7.47
	P00618	Basic phospholipase A2 beta-bungarotoxin A2 chain OS=Bungarus multicinctus OX=8616 PE=1 SV=2 - [PA2B2_BUNMU]	145	16.3	7.99

表四、兩傘節蛇毒蛋白質之毒力分數

Protein	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Relative abundance(%)	Toxicity Score	Relative toxicity of whole venom
<i>B. multicinctus</i> venom	0.102 (0.075 - 0.124)	100%	980	100%
α-BTX	0.225 (0.208 - 0.24)	13.30%	59	6.02%
β-BTX	0.029 (0.02 - 0.036)	64.90%	2239	228.37%
γ-BTX	>0.25	5.40%	<22	<2.24%
MTX	>0.4	7.90%	<20	<2.04%
NTL	>0.5	6.33%	<13	<1.33%

表五、皮下注射雨傘節全蛇毒之小鼠存活數量

Dose ( $\mu\text{g/g}$ )	Death	Total
0.03	0	5
0.06	0	5
0.09	2	5
0.12	3	5
0.15	5	5
0.18	5	5

表六、皮下注射  $\alpha$ -BTX 之小鼠存活數量

Dose ( $\mu\text{g/g}$ )	Death	Total
0.18	0	5
0.20	0	5
0.22	2	5
0.24	4	5
0.26	5	5
0.28	5	5

表七、皮下注射  $\beta$ -BTX 之小鼠存活數量

Dose ( $\mu\text{g/g}$ )	Death	Total
0.01	0	5
0.02	1	5
0.03	2	5
0.04	4	5
0.05	5	5
0.06	5	5

表八：針對  $\alpha$ -BTX 及  $\beta$ -BTX 的 B 細胞表位預測之 11 段預選表位之編號、  
胺基酸序列範圍、組成及長度。

表位編號	序列範圍	序列組成	長度
$\alpha$ -BTX			
ABTX_B01	27-36	TATSPISAVT	10
ABTX_B02	47-60	KMWCD AFCSSRGKV	14
ABTX_B03	70-76	PSKKPYE	7
ABTX_B04	86-92	CNPHPKQ	7
$\beta$ -BTX-A chain			
BBTX_A_B01	40-49	IPCEKTWGEY	10
BBTX_A_B02	58-63	AGGSGRPIDALDR	13
BBTX_A_B03	83-93	EKKHKCNPKTQ	11
BBTX_A_B04	132-142	EYIEGHKNIDT	11
$\beta$ -BTX-B chain			
BBTX_B_B01	29-42	PDCDKPPDTKICQT	14
BBTX_B_B02	50-58	KPSAKRCVQ	9
BBTX_B_B03	64-75	CNGNGNHFKSDH	12

表九、 $\alpha$ -BTX 和  $\beta$ -BTX 的親水性預選表位之 7 段預選表位之編號、胺基酸序列範圍、組成及長度。

表位編號	序列範圍	序列組成	長度
$\alpha$ -BTX			
ABTX_H01	28-42	ATSPISAVTCPPGEN	15
ABTX_H02	81-95	CSTDKCNPHPKQRPG	15
$\beta$ -BTX-A chain			
BBTX_A_H01	50-64	ADYGCYCGAGGSGRP	15
BBTX_A_H02	80-94	GDAEKKHKCNPKTQS	15
BBTX_A_H03	129-143	NSEYIEGHKNIDTAR	15
$\beta$ -BTX-B chain			
BBTX_B_H01	25-39	RKRHPDCDKPPDTKI	15
BBTX_B_H02	60-74	RYGGCNGNGNHFKSD	15

表十：11 段欲合成的衍生胜肽之蛇毒蛋白質來源、胜肽編號、胜肽在蛋白質序列中的位置範圍、胺基酸組成及長度。

胜肽編號	序列範圍	序列組成	長度
$\alpha$ -BTX			
ABTX_p27	27~41	TATSPISAVTCPPGE	15
ABTX_p46	46~60	RKMWCDAFCSSRGKV	15
ABTX_p66	66~80	AATCPSKKPYEEVTC	15
ABTX_p81	81~95	CSTDKCNPHPKQRPG	15
$\beta$ -BTX-A chain			
BBTX-A1_p37	37~51	RYTIPCEKTWGEYAD	15
BBTX-A1_p54	54~68	CYCGAGGSGRPIDAL	15
BBTX-A1_p80	80~94	GDAEKKHKCNPKTQS	15
BBTX-A1_p129	129~143	NSEYIEGHKNIDTAR	15
$\beta$ -BTX-B chain			
BBTX-A2_p27	27~41	RHPDCDKPPDTKICQ	15
BBTX-A2_p47	47~61	FYYKPSAKRCVQFRY	15
BBTX-A2_p61	61~75	YGGCNGNGNHFKSDH	15

參、經費支用情形

項目	本年度核定金額	支用狀況
人事費	600,000	依人事成本支出(109年1月至11月)， 已使用 75%
業務費	796,000	已使用 99 %
管理費	191,000	已使用 0% (待計畫總期程結束後由校方一併收取)