

計畫編號：MOHW109-CDC-C-114-000114

衛生福利部疾病管制署 109 年委託科技研究計畫

計畫名稱：利用 ELISA 建立製程內抗神經性蛇毒血漿力價測定方法  
Development of ELISA assay to measure the lethality-neutralizing titer of neurotoxic antiserum in the production process

109 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、劉若娟、熊佳駒

執行期間：109 年 01 月 01 日至 109 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣壹佰伍拾壹萬捌仟肆佰元整

\*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.....2

貳、本文

一、前言.....4

二、材料與方法.....6

三、實驗結果.....13

四、實驗討論.....24

五、結論與重要研究成果.....26

六、參考文獻.....27

七、圖次.....29

八、表次.....64

參、經費支用情形.....77

## 壹、摘要

### 一、中文摘要

關鍵字：小鼠活體試驗、抗蛇毒血清製造、酵素結合免疫吸附分析法、動物福祉

眼鏡蛇咬傷是台灣最重要的臨床蛇咬傷症狀之一。台灣疾病管制署已有幾十年利用馬匹生產製造抗蛇毒血清的經驗，有效的降低因眼鏡蛇咬傷中毒的死亡率。近年來動物倫理與福祉逐漸被重視，然而現今免疫馬匹的抗蛇毒血漿效價測試檢驗仍是依賴小鼠活體試驗。為了落實動物實驗 3Rs 原則要求，本計畫擬發展一種 ELISA 檢測方法，評估其取代傳統的小鼠活體試驗，用來測量在每次蛇毒抗原免疫後馬匹體內抗眼鏡蛇蛇毒抗體的效價。

首先，我們利用 RP-HPLC 成功的分離純化出五種主要的眼鏡蛇蛇毒蛋白質，同時依據主要蛇毒蛋白質氨基酸序列合成 79 段衍生胜肽片段。其次，我們透過疾病管制署獲得不同批號、已知致死中和效價的免疫馬血漿樣品。接著，我們利用這些純化的蛋白質和合成胜肽片段做為抗原，以 ELISA 檢測上述馬血漿樣品辨識這些抗原的效價(即特定抗體含量高低)，透過此方式評估比較各別蛋白質成分及其衍生胜肽與免疫馬血漿致死中和效價之關連性。我們發現蛇毒中的神經性蛇毒蛋白質(neurotoxin, NTX)，其馬血漿 ELISA 辨識效價與致死中和效價高度相關，且 NTX 的三段衍生胜肽也可有效區分高與低致死中和效價之馬血漿檢體。其中編號 NTX1-10 的衍生胜肽區分高效價與低效價馬血漿的效力最佳，AUC 為 0.9507，特異度為 89.47% 和敏感度為 96.88%。這些實驗數據指出針對 NTX 和三種 NTX 衍生胜肽所研發的馬血漿免疫辨識效價測定方法，具有高度潛力發展成抗體檢測 ELISA 試劑，可代替傳統小鼠活體試驗作為判定馬血漿效價是否足夠進行抗蛇毒血清製成的依據。

## 二、英文摘要

Keywords : mouse bioassay, antivenom production, ELISA, animal welfare

*Naja atra* envenomation is one of the most significant clinical snakebite concerns in Taiwan. The Taiwan Centers for Disease Control (CDC) has decades of experience in antivenom production, and the produced antivenom has successfully reduced the mortality rate of cobra envenoming. At present, the mouse bioassay is the only way to access the lethal toxin neutralization titer of antibodies against cobra venom in the plasma samples of hyper-immunized horses. However, recently, the ethical consideration for the use of mice in preclinical testing of antivenom has been raised: these bioassays will cause considerable suffering and damage the animal welfare for rodents. In order to follow the rule of 3Rs in using experimental animals, the guidelines for more ethical use of experimental animals, we plan to develop an *in vitro* ELISA assay to monitor the lethal toxin neutralization titer of plasma samples from horses during the immunization phase.

We first purified the five major protein components from *N. atra* venom and synthesized 79 peptides derived from two of the five major protein components. These proteins and peptides were used as antigens to develop an ELISA assay for detecting antibodies in plasma samples from hyper-immunized horses. Next, we obtained different batches of plasma samples of hyper-immunized horses, with known neutralizing ability against *N. atra* venom, from Taiwan CDC. The immunorecognition titers of these horse plasma samples against each venom antigen (i.e. 5 proteins and 79 peptides) were then evaluated. We found that among the 5 major protein components in *N. atra* venom, the immunorecognition titer against neurotoxin (NTX) has the highest potential to distinguish between horse plasma samples with high and low neutralizing titer. Similarly, among the 79 peptides, the immunorecognition titer against three NTX-derived peptides showed high potential to discriminate between horse plasma samples with high

and low neutralizing titer. Among them, the immunorecognition titer against NTX-derived peptide 1-10 displayed the strongest ability (AUC = 0.9507, 96.88% sensitivity and 89.47% specificity) to tell whether the hyper-immunized horse plasma samples have reached the criteria for antivenom production. Collectively, our data showed that an ELISA assay developed on the basis of measuring the immunoreactivity toward NTX and/or NTX-derived peptides is a simple and effective tool to monitor the lethal toxin neutralization titer of plasma samples from horses during the immunization phase.

## 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，有六種毒蛇幾乎供獻全部的台灣臨床毒蛇咬傷案例[2]，這六種台灣毒蛇分別為百步蛇(*Deinagkistrodon acutus*)、赤尾青竹絲(*Trimeresurus stejnegeri*)、龜殼花(*Protobothrops mucrosquamatus*)、鎖鏈蛇(*Daboia russelli siamensis*)、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，屬眼鏡蛇的蛇毒蛋白體最為單純且較容易分析。台灣眼鏡蛇蛇毒中最主要的三種蛋白質成分包含 Cytotoxins, Phospholipase A<sub>2</sub> 及 Neurotoxins，這三種蛋白質成分占據蛇毒 90%以上的相對含量[4, 7]。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, 8]。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。

抗蛇毒血清效價測定皆以小鼠活體試驗來確認，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)的動物活體試驗，作為測試血清致死中和效價之方法。目前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，希望可以取代小鼠活體試驗[9]。然而，很不幸地，這些方法都無法完全取代小鼠活體試驗且推展到實際應用面。因此，在無法找到有

效的取代方法情況下，為了顧及人類的健康與防疫，小鼠活體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[10]。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，接著以此 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可行好用的方法學。另外，使用 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 試劑取代傳統小鼠活體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，本計劃欲以蛇毒成分較為簡單的眼鏡蛇當作目標，將蛇毒各蛋白質成分都分離純化出來當作抗原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。另外，我們還會以蛇毒蛋白質的衍生胜肽來當作抗原來測試，不僅可以找出與致死中和效價最有相關性的胜肽片段，也可了解哪段抗原決定區與蛇毒之治療最有關聯性。

## 二、材料與方法：

### 2.1 實驗材料

#### 2.1.1 實驗藥品：

眼鏡蛇蛇毒(疾病管制署檢驗及疫苗研製中心分讓，批號 BmT960328)、乙腈(Acetonitrile, ACN, J.T. Baker, Center Valley, PA, USA)、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)、三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA, Merck, Darmstadt, Germany)、TOOLStart Blue Staining Reagent (BIOTOOLS, Taiwan)、17 段 Neurotoxin 合成胜肽、59 段 Cytotoxin 合成胜肽、3 段控制組合成胜肽、辛酸 (Octanoic acid, Sigma)、馬血漿(疾病管制署檢驗及疫苗研製中心分讓)、醋酸鈉 (Sodium acetate buffer, pH4.6)、磷酸鹽緩衝生理鹽水(Phosphate buffered saline, PBS, pH7.4)、5 種 RP-HPLC 分離蛇毒(NTX、PLA2、CTX、CRISP、SVMP)、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)、基質輔助雷射脫附飛行時間式串聯質譜儀基質液(MALDI-TOF matrix,  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix)、基質輔助雷射脫附飛行時間式串聯質譜儀 (Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI, Bremen, Germany)、MTP AnchorChip™ 600/384 TF target plates (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)、Vivaspin 500 (GE Healthcare)、Amicon Ultra 100K device (Millipore)、96 孔盤(Costar assay plate, CORING, ref 9018, USA)、SpectraMax M5 多功能微量盤分光光譜儀 (SpectraMax M5 Microplate Reader, San Jose, USA)

## 2.2 實驗方法

### 2.2.1 蛋白質分離純化

反向高效液相層析儀 (Reversed Phase High-performance liquid chromatography, RP-HPLC)分離純化眼鏡蛇蛇毒蛋白

取 1.5mg 眼鏡蛇蛇毒蛋白回溶於 0.1% TFA/ ddH<sub>2</sub>O 溶液，經過 10,000 g 離心沉澱去除雜質後，注入 RP-HPLC 系統的 C<sub>18</sub> 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 C<sub>18</sub> 管柱中的蛇毒蛋白被沖洗出來。依照 A280 圖譜進行蛋白質偵測，判斷樣品蒐集隻時間點，蒐集的樣品進行真空抽乾，保存於-20 度冰箱。

#### 離心濃縮裝置管柱分離純化

馬血漿以 10,000g 的轉速在 4°C 的環境下離心 30 分鐘，保留上清液，並將上清液稀釋 5 倍後加入 Vivaspin 500 和 Amicon Ultra 100K device 的管柱中，離心 10,000g、30 分鐘，進行樣品分離，分離後之樣品以 PBS 置換，重覆三次，最後保留於管柱中之樣品進行後續實驗。

#### 醋酸鈉-辛酸分離純化蛋白

取離心後的馬血漿加入 2 倍體積的 60 mM sodium acetate buffer (pH4.6)，放入攪拌子將其混合均勻，將辛酸 (辛酸：馬血漿=3：50) 緩慢的加入樣品中，在室溫作用 30 分鐘後，取出攪拌子後在 4°C 的環境下離心 4000g、30 分鐘，保留上清液。

### **2.2.2 蛋白質身份鑑定**

十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfated 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，並使用真空抽乾機將 100% ACN 抽乾。抽乾後樣品加入 10 mM DTT 置於 56°C 反應 1 小時後，加入 55 mM IAM 置於室溫反應 30 分鐘，再加入 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/40\%$  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 (Thermo Fisher) 分析軟體進行蛋白質的身分鑑定。

### **2.2.3 合成肽身分鑑定**

#### 樣品前處理

將七十九條合成肽分別回溶於 25% ACN，並點在 MTP AnchorChip

TM 600/384 TF target plates 上，靜置等待 25% ACN 揮發，取 0.2 $\mu$ l 的 matrix [( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix (2 mg/ml CHCA in 70% ACN/0.5% TFA)]點在乾燥的樣品上，待 matrix 乾掉後，放入基質輔助雷射脫附飛行時間式串聯質譜儀進行偵測。

#### 基質輔助雷射脫附飛行時間式串聯質譜儀(MALDI-TOF MS)分析

將 MTP AnchorChip TM 600/384 TF target plate 置入基質輔助雷射脫附飛行時間式串聯質譜儀(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)，系統設定為在正離子模式下具有 25%的雷射功率，可以在 600-4000Da 的質量範圍內自動得到所有圖譜，並在 100 shots/spectrum 中累積 1000 shots。在進行樣品偵測前，先進行質量校正，共有四條胜肽標準品在 matrix 中，分別為[Sar1, Thr8]-Angiotensin II (956.53 Da)、Angiotensin I (1296.69 Da)、Renin Substrate Tetradecapeptide (1758.93 Da) 和 Adrenocorticotrophic Hormone (Fragment 18-39, human) (2465.20 Da)。標準品校正後則可針對樣品進行偵測，再使用 FlexAnalysis v2.4 (Bruker Daltonics)進行分析。

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

取 NTX、PLA2、CTX、CRISP、SVMP 各 10 ng 或十七段神經毒素衍生胜肽、五十七段細胞毒素衍生胜肽和三段控制組胜肽各 100 ng 加入至編號為 9018 的 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 shaker 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；加入配置在 1%脫脂牛奶中的馬血漿樣品做偵測，放置在室溫中並在 shaker 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 1:20000 的比例做為偵測馬血漿內的抗體，放置在室溫中並在 shaker 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 shaker 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 SpectraMax M5 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。

## 2.2.5 馬血漿力價測試之動物實驗

### 抗蛇毒血漿力價判定之藥品配製

根據疾管署中和效價實驗方法，小鼠試驗分成對照組及實驗組，每組為三隻小鼠。對照組小鼠試驗其藥品配置如表九所示，取 5 mg/vial(檢定毒)加上 22 ml PBS 配製濃度為 0.23 mg/ml 的甲溶液，此時最小致死劑量 (MLD, Minimal lethal dose) 為 4，再以等差的方式將甲溶液稀釋成乙、丙、丁等溶液，在 37°C 水浴培養 60 分鐘，即可進行皮下小鼠注射，完成對照組配置。

實驗組小鼠其藥品配置，根據疾管署以 60 田中單位(Tanaka unit, T.U.) 做為馬血漿是否達到製程血漿之標準。藥品配置為：取 0.15 mL 的檢體和 0.3 mL 的 PBS、0.45 mL 的甲溶液混合，在 37°C 水浴培養 60 分鐘，進行皮下小鼠注射。

#### 抗蛇毒血漿力價判定之小鼠注射

以 1 mL 注射針筒及 26 號針進行小鼠注射，神經性蛇毒力價測定之注射部位為皮下注射，對照組及實驗組每組均注射三隻體重 11~14 g 健康公小鼠，觀察 24 小時紀錄死亡隻數、存活隻數及計算其效價。

### 三、實驗結果：

#### 3.1 RP-HPLC 純化獲得 5 種眼鏡蛇毒毒性蛋白質

已知眼鏡蛇蛇毒蛋白內有神經毒素(Neurotoxin, NTX)、磷脂酶 A2(Phospholipase A2, PLA2)、細胞毒蛋白(Cytotoxin, CTX)、富含半胱氨酸的分泌蛋白(Cysteine-rich secretory protein, CRISP)以及蛇毒金屬蛋白酶(Snake venom metalloproteinase, SVMP)等五種主要蛋白。欲獲得高純度之此五種蛋白質成分，使用 RP-HPLC 進行眼鏡蛇蛇毒分離純化的步驟，並測試 A 和 B 緩衝液在不同時間點的比例。由於促使蛋白質和管柱分離的條件是 B 緩衝液中的 ACN 比例增加，而每種蛋白質對於 ACN 的耐受性不同，則緩慢的增加 B 緩衝液的比例有助分離蛇毒內的蛋白質，表一為此實驗測試出的最佳條件。根據此 HPLC 緩衝液條件分離純化的眼鏡蛇蛇毒蛋白之圖譜(圖一)，收集到的這五組蛋白質樣品。接著，透過 SDS-PAGE 確認分子量和純度，這五種蛋白質的分子量皆與理論分子量相符，蛋白質純度介於 70-95%之間(圖二)。為了確認純化的蛋白質身分，將蛋白質條帶切下使用質譜儀進行偵測，並使用分析軟體進行蛋白身分鑑定，即確定分離純化的蛋白為所需求的五種蛋白質(表二)。根據蛋白質身分鑑定的結果，可以得知被沖洗出的蛇毒蛋白質依序為 NTX、PLA2、CTX、CRISP 和 SVMP(圖一)，純化後共得到 NTX、PLA2、CTX、CRISP 以及 SVMP 各 2.66 mg、1.94 mg、7.28

mg、0.56 mg 以及 0.24 mg (表三)。

### 3.2 合成 17 段神經毒素衍生胜肽、59 段細胞毒素衍生胜肽和 3 段控制組胜肽

已知眼鏡蛇蛇毒蛋白內有神經毒素(Neurotoxin, NTX)、磷脂酶 A2 (Phospholipase A2, PLA2)、細胞毒蛋白(Cytotoxin, CTX)、富含半胱氨酸的分泌蛋白(Cysteine-rich secretory protein, CRISP)以及蛇毒金屬蛋白酶(Snake venom metalloproteinase, SVMP)等五種主要蛋白質，其中又以 NTX、PLA2 以及 CTX 為主要蛋白質，而 NTX 和 CTX 蛋白質與臨床與動物實驗症狀最為相關，故選擇此兩種蛋白質為主要目標。為了找尋蛋白質胜肽片段與致毒效力最為相關，在挑選胜肽時則要覆蓋所有的胺基酸，且長度必須適中，不宜過長和過短，則挑選胜肽片段的方式為先使使用 UniProt 搜尋軟體，搜尋眼鏡蛇神經毒蛋白 Neurotoxin 以及 Cytotoxin 兩種蛇毒蛋白，符合這次相關的 Cytotoxin 是一個家族的蛋白，有 Cytotoxin 1 至 Cytotoxin 6 共六種蛋白；而符合這次相關的 Neurotoxin 有一種蛋白。挑選蛇毒目標胜肽的方法是透過 UniProt 找尋蛇毒蛋白之胺基酸序列，並將屬於訊號胜肽(signal peptide)的胺基酸移除，Cytotoxin 家族的蛋白移除了 signal peptide 後，皆為六十個胺基酸序列，胜肽設計以十五個胺基酸為長度，三個胺基酸為一個單位向後移動，則會產生出十六條長短不一的胜肽片段(表四)。由於 Cytotoxin 是屬



於家族蛋白，蛋白彼此之間有相似性，則挑選出的胜肽片段移除重複後，共有五十九條胜肽(表五)。Neurotoxin 根據上述的方法可以得到十七條胜肽片段(表六)。而三段控制組胜肽則為任意選的胺基酸序列(表七)。

### 3.3 以質譜學分析確認 79 段合成胜肽的序列正確性

CTX 和 NTX 蛇毒蛋白質的衍生胜肽和三段控制組的胜肽經 MALDI-TOF 分析後獲得各胜肽的質譜圖譜(圖三、圖四、圖五)，根據 MALDI-TOF 的結果，可以得知有七十七條胜肽的鑑定結果符合，其質量與理論分子量相同，誤差值在萬分之一以內，其中有兩條胜肽訊不佳(1-21 和 3-1，圖六)，並發現這兩條胜肽其結構不穩，容易降解，代表不宜作為檢測抗原的胜肽，依此在後續實驗與相關測試移除此兩條胜肽抗原。

### 3.4 建立微量馬血漿 IgG 純化之方法

血漿中許多含量豐富的蛋白質可能會於免疫辨認實驗中產生背景訊號干擾，影響結果判讀。因此本實驗嘗試多個方式進行馬血漿 IgG 純化，去除血漿中非 IgG 蛋白質。首先嘗試使用 Vivaspin 500 和 Amicon Ultra 100K 裝置。根據其使用手冊可以依照蛋白分子量大小不同進行蛋白質分離純化，我們選擇了孔徑大小為 100 kD 的離心濃縮裝置(因為抗體分子量為 150 kD 可以被保留，其餘小於 100 kD 的蛋白則會透過離心而被流出)，並取用

BC182 和 BC183 兩個由疾管署提供的馬血漿樣本進行測試。其次是利用醋酸鈉(Sodium acetate)- 辛酸組合方法，醋酸鈉可以針對血漿進行去脂，而辛酸是一種短鏈的脂肪酸，可以和血漿中的白蛋白或是非 Ig 蛋白結合並沉澱，如此則可以將抗體從血漿中純化出來，再透過離心濃縮裝置將醋酸鈉溶液移除置換成 PBS 溶液保存。利用上述兩種方法分離馬血漿樣本的產物，透過 SDS-PAGE 分析的結果可以看出經由離心濃縮裝置分離純化的樣品，其結果和未做處理的樣品並無太大差異，而透過辛酸沉澱得到的樣品則可看出有大部分蛋白因醋酸鈉-辛酸的作用而被沉澱去除，留下的主要蛋白質即為 IgG (Heavy chain 約 55 kD 位置, Light chain 約 25 kD 位置) (圖七)。因此後續實驗以醋酸鈉-辛酸沉澱之方法進行血漿抗體純化。

### **3.5 評估純化與未純化的馬血漿 IgG 在利用蛋白質 ELISA 檢測上的差異與影響**

透過 SDS-PAGE 的實驗結果可以比較編號 407-1070417 的馬血漿樣本經由醋酸鈉-辛酸沉澱而得到的編號 OA\_407-1070417 的樣本(此樣本為醋酸鈉-辛酸沉澱樣本)有大部分蛋白因醋酸鈉-辛酸的作用而被沉澱，留下的蛋白質主要為 IgG (圖八)。接下來利用 ELISA 分析比較醋酸鈉-辛酸純化前後的馬血漿對五種主要眼鏡蛇蛇毒蛋白的免疫辨識能力。實驗結果指出編號 407-1070417 馬血漿樣品經過醋酸鈉-辛酸沉澱前後的稀釋倍率訊號趨勢並

無太大的差異；編號 407-1070417 和編號 OA\_407-1070417 兩種馬血漿對於五種蛇毒蛋白的靈敏度一致，依序是 CTX、NTX、PLA2、CRISP 以及 SVMP。此結果表示馬血漿在沉澱前後對於免疫分析訊號呈現並無明顯影響(圖九)。因此，後續實驗皆以未沉澱之馬血漿直接稀釋進行測試。

### **3.6 以高效價馬血漿標準品測試確認後續利用蛋白質 ELISA 檢測測試馬血漿之稀釋倍率**

我們以序列稀釋之馬血漿對五種 HPLC 純化之眼鏡蛇蛇毒蛋白進行免疫辨識能力測試。實驗結果顯示，針對各個蛋白質的免疫辨識訊號皆隨著序列稀釋而遞減，都在 1：10000 稀釋倍率下有最高之訊號(圖十)。而此實驗的 HRP 系統所偵測出的數值介於 0-1 之間為理論線性範圍區間，馬血漿在 1：10000 稀釋倍率下，針對 CTX 和 NTX 的訊號值皆超過 1，以此稀釋倍率易造成未來測試時發生訊號過飽和的現象，產生分析上的誤差。因此，選用 1：20000 稀釋倍率來進行接下來的實驗測試。

### **3.7 以優化的 ELISA 檢測 27 個不同免疫時間點的馬血漿樣本對 5 種眼鏡蛇蛇毒毒性蛋白質的免疫親和力**

我們由疾病管制署檢驗及疫苗研製中心(以下簡稱該中心)獲得分讓的馬血漿樣本，這些樣本已經在小鼠身上測試過效價，依照該中心訂定之效價判

定標準得知抗體效價數值(表八)。總共有來自九匹馬(編號 351, 354, 356, 366, 401, 406, 407, 418 及 420)的五十一個已知效價之馬血漿樣本[19 個低抗體效價( $<60$ T.U.)與 32 個高抗體效價( $\geq 60$ T.U.)樣本]。將此五十一個已知效價之馬血漿樣本針對五種眼鏡蛇蛇毒毒性蛋白質(NTX, PLA2, CTX, CRISP, SVMP)進行 ELISA 測試。實驗結果指出在這五種蛋白質中, NTX、PLA2 和 CTX 其 ELISA 訊號相較於 CRISP 和 SVMP 為高(圖十一), 推測馬血漿樣品對前三者的抗體含量和/或免疫親和力較高。另外, 從實驗結果也可以發現, 除了編號 354 的馬匹 NTX 的免疫親和力較 CTX 強之外, 其餘馬匹在不同免疫時間點採集的血漿其免疫親和力由強至弱的順序為 CTX  $>$  PLA2  $>$  NTX (圖十二), 可以反映出在注射全眼鏡蛇蛇毒進馬匹時, 有可能因為 CTX 蛋白組成成份的比例較 PLA2 和 NTX 多, 促使 CTX 的免疫辨識效價較高, 進而有此趨勢。

### 3.8 評估純化與未純化的馬血漿 IgG 在利用胜肽 ELISA 檢測的差異與影響

根據 peptide-based ELISA 的實驗結果顯示, 純化前後的編號 407 馬血漿樣品在偵測十七段 NTX 衍生胜肽的趨勢是相同的, 都在 NTX1-8、NTX1-9 和 NTX1-10 有較高的訊號; 且未純化前的馬血漿其胜肽訊號較純化後的高, 兩者對於三段控制組的胜肽皆沒有太大的差異(圖十三)。而五十七條 CTX 衍生胜肽, 其 ELISA 結果相較於 negative control 幾乎無訊號, 趨近於

零，表示馬血漿針對 CTX 的衍生胜肽的免疫親和力較差(圖十四)，接下來之實驗則不再對此五十七條胜肽進行測試。根據圖十三之結果，純化後之馬血漿相較於純化前明顯降低，純化可能會影響馬血漿內之抗體，因此，後續實驗則以不純化之馬血漿進行測試。

### **3.9 以高效價(T.U.100)馬血漿標準品測試確認後續利用胜肽 ELISA 測試馬血漿之稀釋倍率**

由於 CTX 衍生胜肽於前次實驗 ELISA 結果得知其免疫親和力較差，此次實驗以 NTX 衍生胜肽作為主要測試材料。以序列稀釋之馬血漿(編號 407-1070417)對 17 條 NTX 衍生胜肽進行免疫辨識能力測試，實驗結果顯示，針對各條衍生胜肽的免疫辨識訊號皆隨著序列稀釋而遞減(圖十五)，都在 1：5000 稀釋倍率下有最高之訊號。此實驗的 HRP 系統所偵測出的數值介於 0-1 之間為理論線性範圍區間，而編號 407-1070417 的馬血漿在 1：5000 及 1:10000 的稀釋倍率下，針對 NTX1-10 的訊號值皆超過 1，以此稀釋倍率易造成未來測試時發生訊號過飽和的現象，產生分析上的誤差。因此，選用 1：20000 稀釋倍率來進行接下來的實驗測試。

### **3.10 以優化的 ELISA 檢測 27 個不同免疫時間點的馬血漿樣本對 76 段蛇毒蛋白衍生胜肽的免疫**

根據 3.8 的結果得知五十七條 CTX 衍生胜肽和三段控制組胜肽其 ELISA 結果幾乎無訊號，趨近於零，表示馬血漿針對 CTX 的衍生胜肽的免疫親和力較差。因此，接下來之實驗則不再對此五十七條胜肽進行測試。此次實驗系統性分析了五十一個已知效價之馬血漿樣本和十七段神經毒素衍生胜肽免疫親和力的結果(圖十六 ~ 圖二十一)，結果顯示 NTX1-8、1-9、1-10、1-16 和 1-17 這五段衍生胜肽的 ELISA 訊號相較於其他胜肽片段為高(圖十八 B 和 C、圖十九 A、圖二十一)。據此可以推斷馬血漿中的抗體對於這五段胜肽免疫效價較佳，但此免疫效價與中和效價是否相關需進一步驗證。

### **3.11 以 Pearson correlation 分析馬血漿對 5 種眼鏡蛇毒毒性蛋白質的免疫辨識效價和致死中和效價的關連性**

#### **3.11.1 馬血漿力價判定**

動物實驗可以順利進行的判讀依據是根據疾病管制署的判讀流程如下：

對照組判讀：對照組中大於等於 1MLD 的乙及丙組小鼠應全部死亡；而戊組的小鼠則至少需要有一隻小鼠存活，若有符合上述現象，則本次對照組力價可判定為“適”(表十)，且可進行下面的實驗組判讀，但無符合上述現象，則本次力價測試應重新進行。

實驗組判讀：以存活小鼠數目大於等於兩隻的最高稀釋倍數為該檢體的

抗體最高價計算標準。此次實驗若是三隻或兩隻小鼠存活則代表效價大於等於 60T.U.，若只有一隻或是零隻小鼠存活，效價則是小於 60 T.U. (表十一)。由衛生福利部疾病管制署提供之五十一個馬血漿樣品皆已進行過小鼠實驗並得知各別中和效價，但部分馬血漿保存時間超過一年，不確定長時間保存是否會影響馬血漿之效價。因此，我們從五十一個已知效價之馬血漿中抽取十五個樣品進行小鼠試驗，確認中和效價結果是否一致。

實驗結果指出，對照組結果皆符合判斷標準(表十)，顯示可以進行後續實驗組的結果判讀。在實驗組中，有七個馬血漿檢體力價大於等於 60 T.U.，有八個檢體力價小於 60 T.U.，此結果趨勢與疾管署提供的效價結果完全一致(表十二)。

### 3.11.2 篩選致死中和效價關連性最高的眼鏡蛇毒毒性蛋白質

仔細檢視衛生福利部疾病管制署所採用的馬血漿效價檢測方法後，我們認為此種效價測定結果無法確切量化，無法使用 Person correlation 迴歸分析。因此，我們改用二分類系統分析蛇毒毒性蛋白質的免疫辨識效價和致死中和效價之間的關連性。疾管署以 60 T.U. 做為馬血漿是否達到製程血漿之標準，我們將血漿分為兩組，一組為效價大於等於 60 T.U.，另一組為小於 60 T.U.。接下來我們針對兩組馬血漿的眼鏡蛇毒蛋白質和十七段神經毒素衍生胜肽之 ELISA 免疫辨識效價結果進行垂直散布圖分析，並

計算平均值和標準差，此結果可初步判斷各蛇毒蛋白質的免疫辨識效價對此兩組馬血漿之區辨能力。而我們進一步使用 ROC 曲線分析計算出靈敏性和特異性的數值，藉此找出最佳切點(cut-off)作為參考值，並計算曲線下方的面積(Area Under Curve, AUC)。ROC 曲線是一種用圖像方式呈現的二分類系統在特定的分類或閾值下的表現，圖形的縱軸為真陽性率，又稱敏感度(sensitivity)；橫軸為偽陽性率，以 1-特異度(specificity)做表示。敏感度是判斷陽性的機率，特異度則是作為判斷陰性的機率。判別 ROC 曲線的方式，對角線為一個參考線，若檢驗值剛好落在 ROC 曲線的對角線上，表示此樣品對於目標物沒有鑑別性。若 ROC 曲線愈往左上方移動，表示樣品對於目標物的敏感度愈高，且偽陽性率愈低，代表此樣品的鑑別力較佳；最靠近左上角的點是錯誤歸類最少的切點，其敏感度是最大且偽陽性率是最小的。除了根據 ROC 曲線的圖形判斷之外，曲線下方的面積(Area Under Curve, AUC)亦可用於判斷 ROC 曲線的鑑別力，若是 AUC 數值為 0.5，為無鑑別力；數值介於 0.7-0.8 為可接受的鑑別率；介於 0.8-0.9 為優良的鑑別率；介於 0.9-1.0 為極佳的鑑別率。

從分析結果得知 NTX、PLA2、CTX、CRISP 和 SVMP 這五種眼鏡蛇蛇毒蛋白質的 AUC 分別為 0.8692、0.5074、0.5082、0.7171 以



及 0.5715，其中以 NTX 的 AUC 最佳(圖二十二 D)屬於優良鑑別率，其次為 CRISP(圖二十三 C)屬於可接受的鑑別率，而 PLA2、CTX 和 SVMP 其 AUC 數值皆小於 0.6，則不考慮為相關連的蛋白質(圖二十二 E、F，圖二十三 D)。我們從此結果篩選出 NTX 為致死中和效價關連性最高的眼鏡蛇毒毒性蛋白質。

### **3.12 以 Pearson correlation 分析馬血漿對 76 段蛇毒蛋白衍生胜肽的免疫辨識效價和致死中和效價的關連性**

#### **3.12.1 篩選致死中和效價關連性最高的蛇毒蛋白衍生胜肽**

我們將兩組馬血漿與 17 段神經毒素衍生胜肽之 ELISA 免疫辨識效價結果進行垂直散布圖分析，從結果得到 17 段神經毒素衍生胜肽之 AUC 數值，發現 NTX1-1、1-2、1-3、1-4 和 1-5 這五條衍生胜肽的數值分別為 0.8676、0.8791、0.8528、0.8594 以及 0.8495(圖二十四 D、E、F，圖二十五 D、E)，皆介於 0.8-0.9，代表具有優良的鑑別率；而 1-8、1-9 和 1-10 的 AUC 數值分別是 0.8808、0.9391 和 0.9507(圖二十六 E、F，圖二十七 D)，NTX1-8 介於 0.8-0.9，代表具有優良的鑑別率，而 NTX1-9 和 1-10 皆高於 0.9，代表具有極佳的鑑別率。我們從此結果篩選出衍生胜肽片段 1-8、1-9 以及 1-10 是與致死中和效價關連性較高的衍生胜肽。

#### 四、實驗討論

本研究發現 NTX 蛋白質和其三段衍生胜肽的免疫辨識效價可有效區分五十一個高致死中和效價與低致死中和效價的馬血漿樣本，而 NTX 蛋白質的免疫辨識效價在區分高致死中和效價與低致死中和效價上，AUC 數值為 0.86，屬於優良鑑別率。另一方面，NTX 的三段衍生胜肽(編號 1-8、1-9、1-10)，其 AUC 數值各別為 0.88、0.93 和 0.97，分別屬於優良和極佳鑑別率，代表這些抗原的免疫辨識效價與致死中和效價有很高的關聯性，這些抗原是很好的中和效價判定之候選生物標記，未來有很高潛力利用這些抗原開發成 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。

本研究發現 NTX 和三段 NTX 衍生胜肽的免疫辨識效價與中和效價有很強的關聯性，但目前只有少量的馬血漿檢體進行測試且馬血漿檢體的效價高低比例數量懸殊，未來還需要收集更多的不同馬匹、不同免疫時間、不同效價高低的馬血漿檢體進行大規模的驗證，才可以更進一步確認 NTX 和其三段衍生胜肽的免疫辨識效價是否可作為判定馬血漿的致死中和效價之生物標記。

另一方面，研究結果發現三段 NTX 衍生胜肽(編號 1-8、1-9、1-10)的免疫辨識效價與抗蛇毒馬血漿的致死中和效價有關，代表這三段

NTX 衍生胜肽的在原蛋白質上的位置可能為 NTX 與其受體的結合位點，若能產生抗體或抗血漿專一性辨認結合這些位點，很有機會以此方法有效抑制眼鏡蛇蛇毒所引發的神經性毒性。

## 五、結論與建議

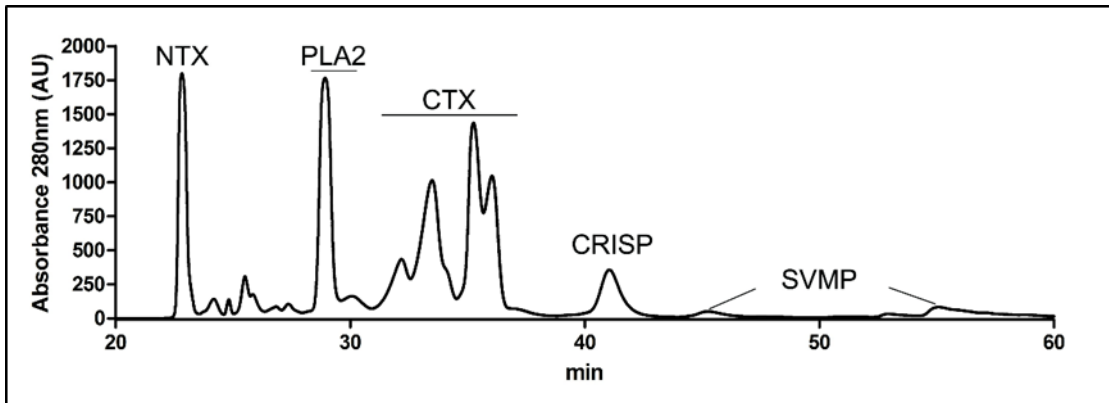
本計畫藉由疾病管制署提供的不同批號馬血漿檢體和眼鏡蛇蛇毒中的五個重要毒性蛋白質進行免疫辨識效價測試的評估，其中神經性蛇毒蛋白質(neurotoxin, NTX)的免疫辨識效價與致死中和效價顯現高度相關性，進而發現在 NTX 的衍生胜肽片段中，編號 NTX1-8、NTX1-9 以及 NTX1-10 的三段衍生胜肽也能有效區分高致死中和效價與低致死中和效價之馬血漿檢體，其中 NTX1-10 在二分類法統計分析顯示 AUC 數值為 0.950，屬於極佳的鑑別率，代表針對 NTX1-10 的免疫辨識效價能很精準地區分高致死中和效價低致死中和效價的馬血漿。本計畫提供的實驗數據指出針對 NTX 和三種 NTX 衍生胜肽所研發的馬血漿免疫辨識效價測定方法，具有高度潛力發展成抗體檢測 ELISA 試劑，可代替傳統小鼠活體試驗作為判定馬血漿效價是否足夠進行抗蛇毒血清製成的依據。

## 六、參考文獻

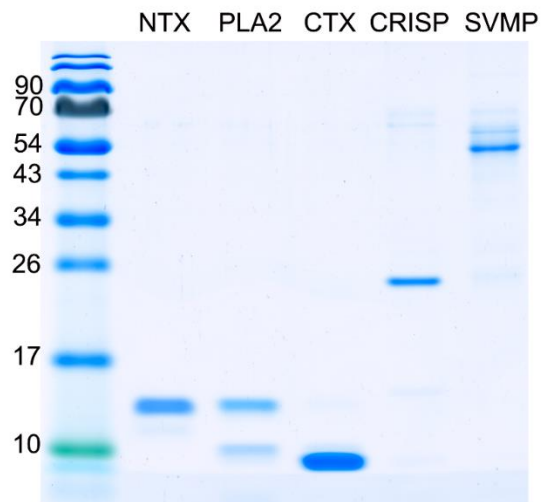
1. Liau MY, Huang RJ. Toxoids and antivenoms of venomous snakes in Taiwan. *J Toxicol-Toxin Rev.* 1997;16(3):163-75.
2. Hung DZ. Taiwan's venomous snakebite: epidemiological, evolution and geographic differences. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2004;98(2):96-101.
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.
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.
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.
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.
8. 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.
9. Sells PG. Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives. *Toxicon*. 2003;42(2):115-33.
  10. Theakston RD, Reid HA. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon*. 1979;17(5):511-5.
  11. Liu CC, You CH, Wang PJ, Yu JS, Huang GJ, Liu CH, et al. Analysis of the efficacy of Taiwanese freeze-dried neurotoxic antivenom against *Naja kaouthia*, *Naja siamensis* and *Ophiophagus hannah* through proteomics and animal model approaches. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(12):e0006138.
  12. Ramos HR, Junqueira-de-Azevedo Ide L, Novo JB, Castro K, Duarte CG, Machado-de-Avila RA, et al. A Heterologous Multiepitope DNA Prime/Recombinant Protein Boost Immunisation Strategy for the Development of an Antiserum against *Micrurus corallinus* (Coral Snake) Venom. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004484.

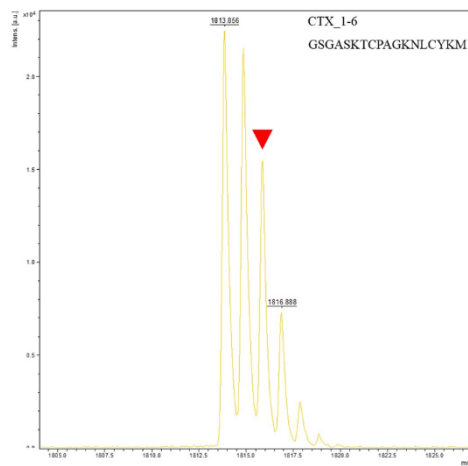
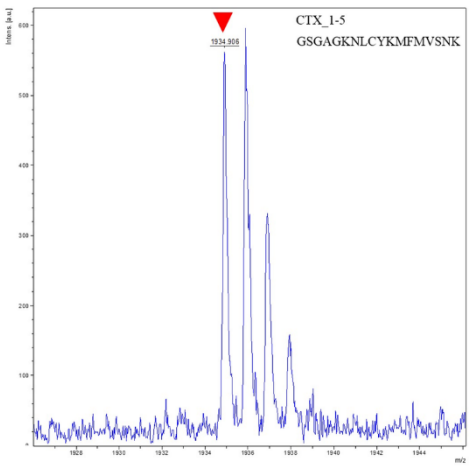
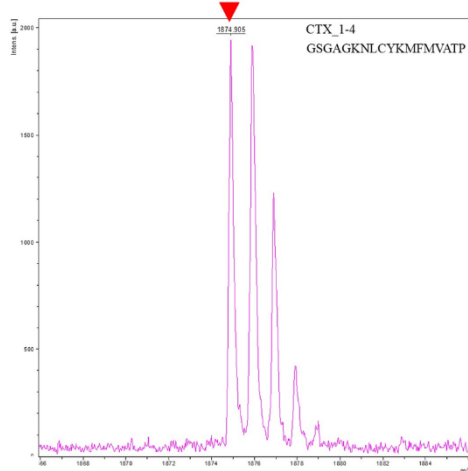
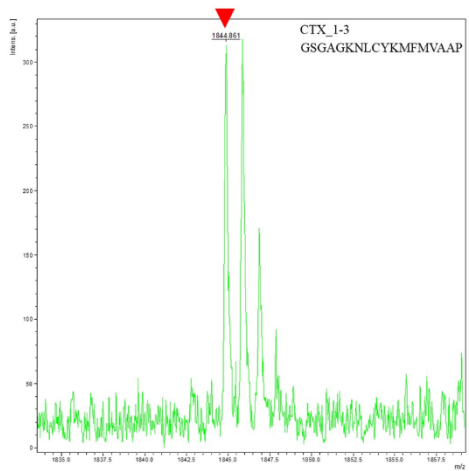
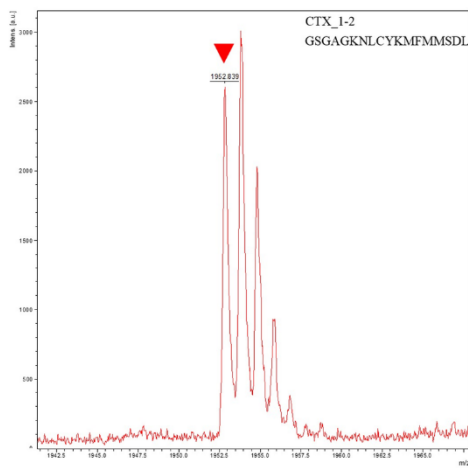
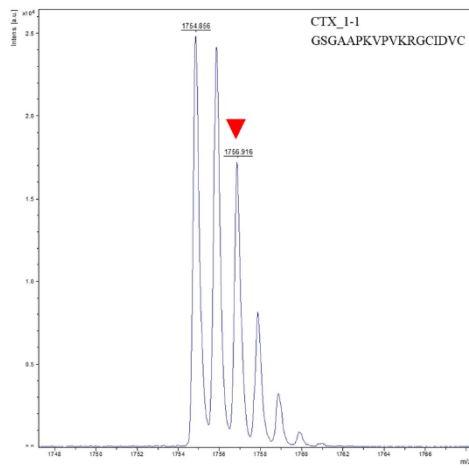
## 七、圖次



圖一、眼鏡蛇蛇毒蛋白經 RP-HPLC 分離之 A280 圖譜

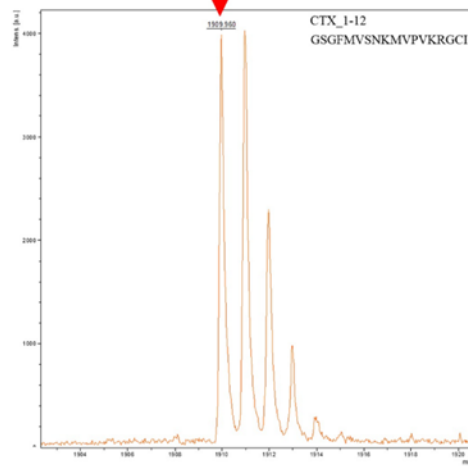
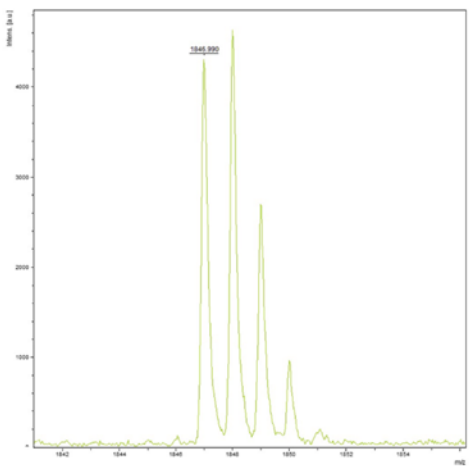
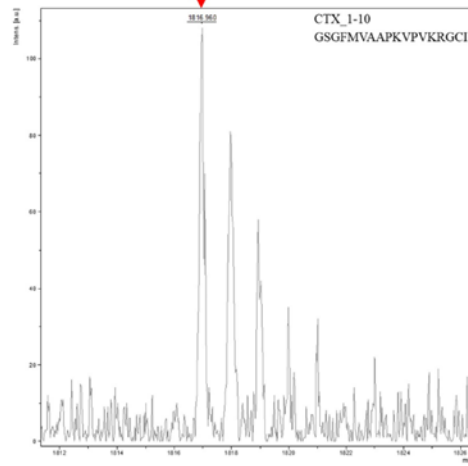
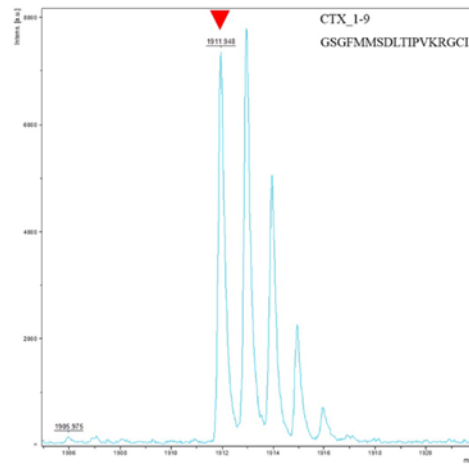
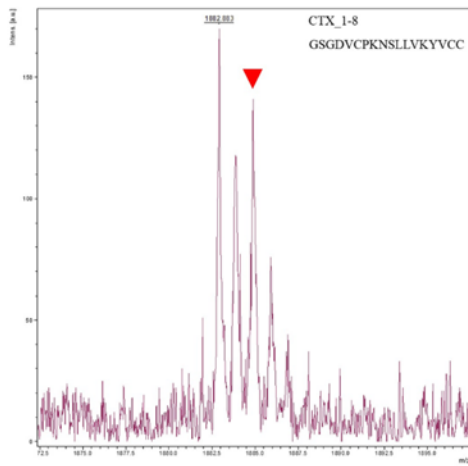
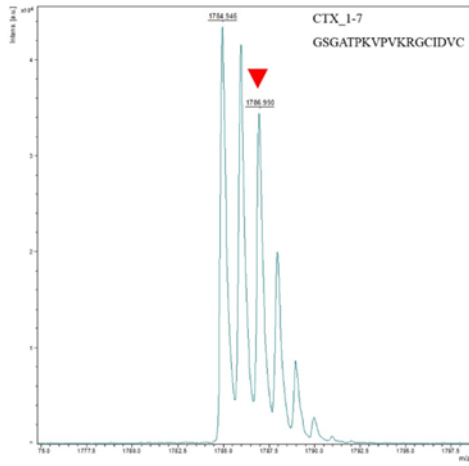


圖二、眼鏡蛇蛇毒蛋白經 RP-HPLC 純化之 SDS-PAGE 結果

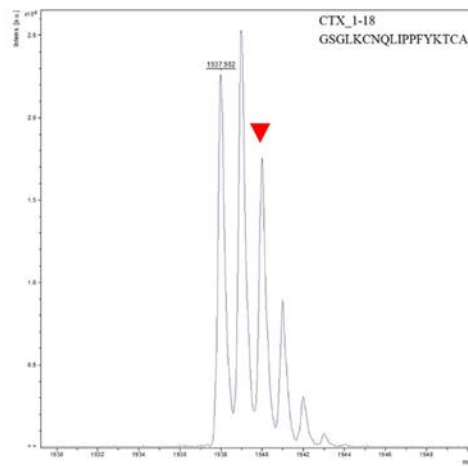
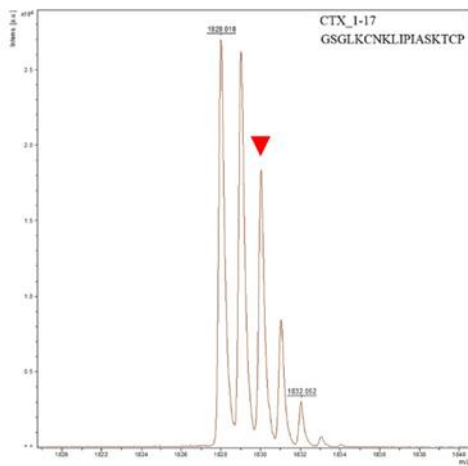
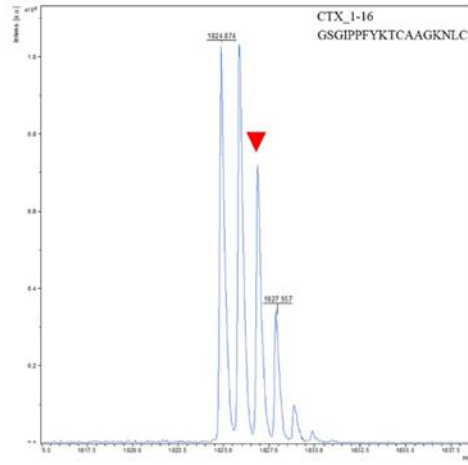
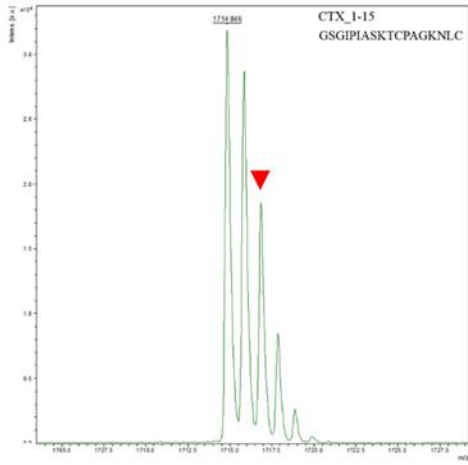
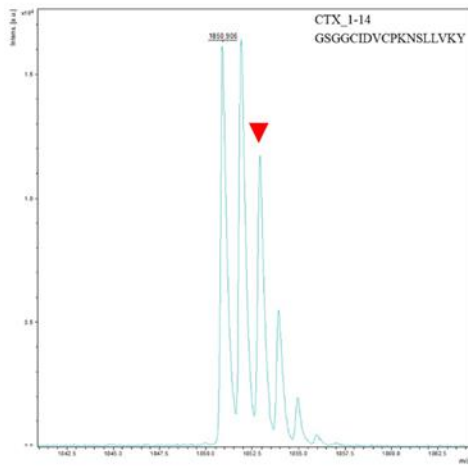
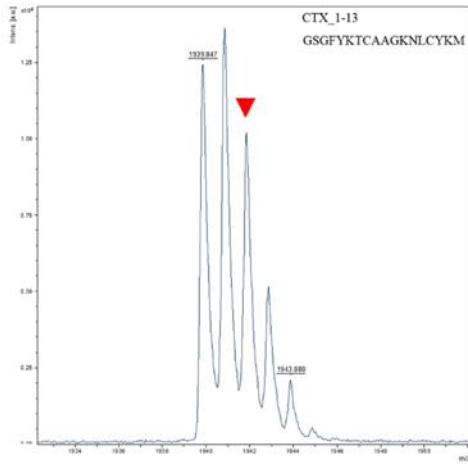


continued

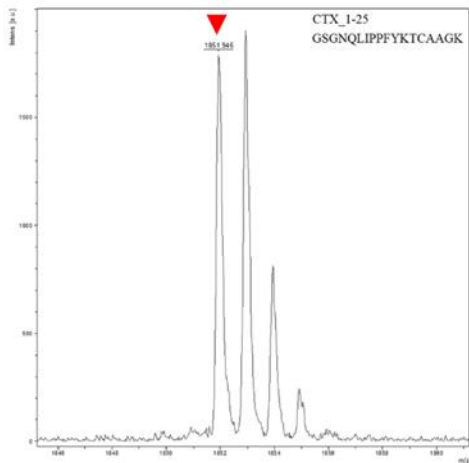
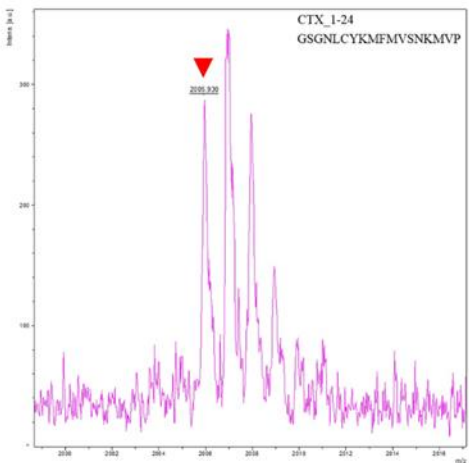
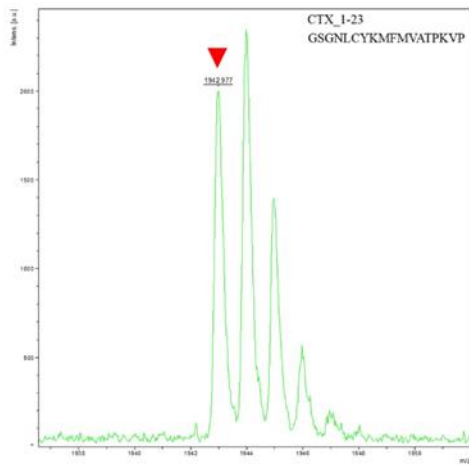
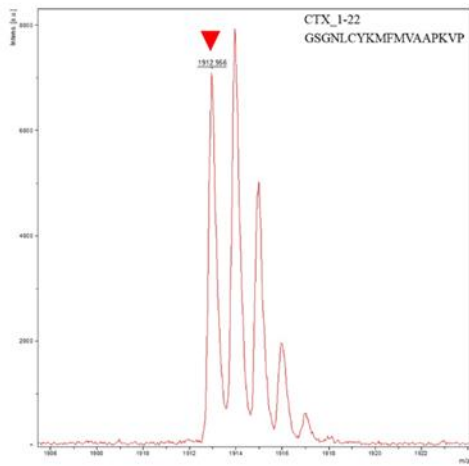
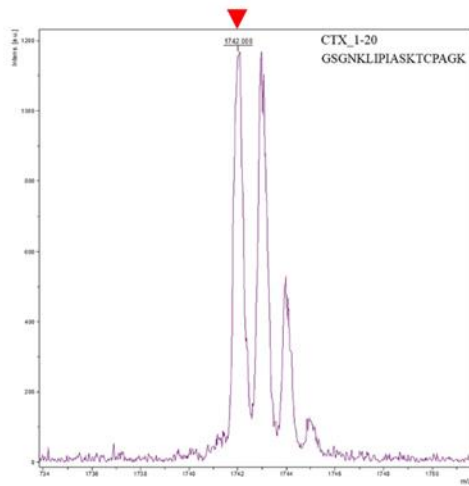
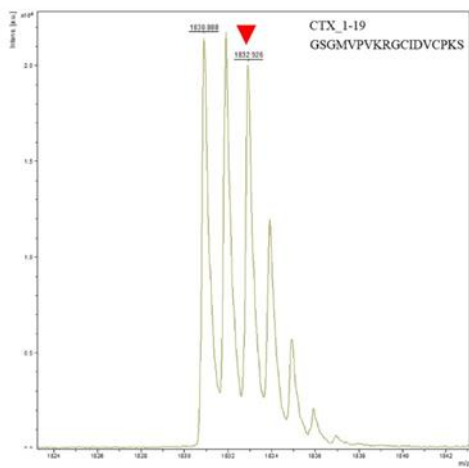




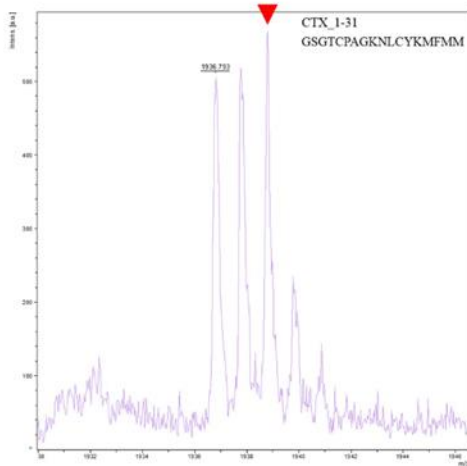
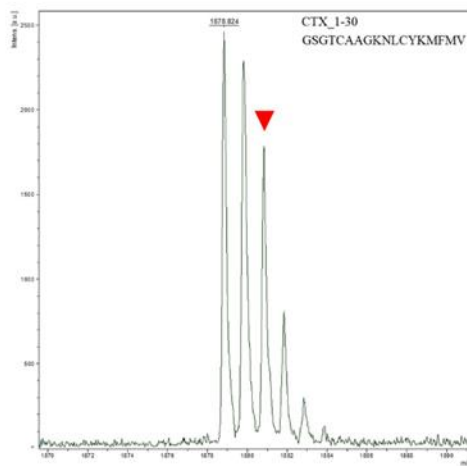
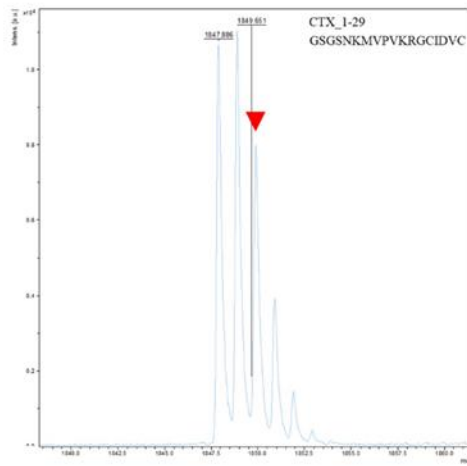
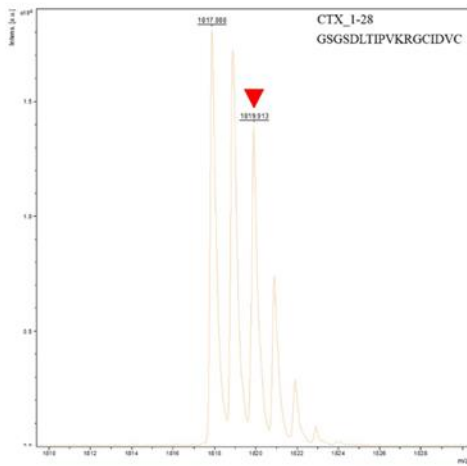
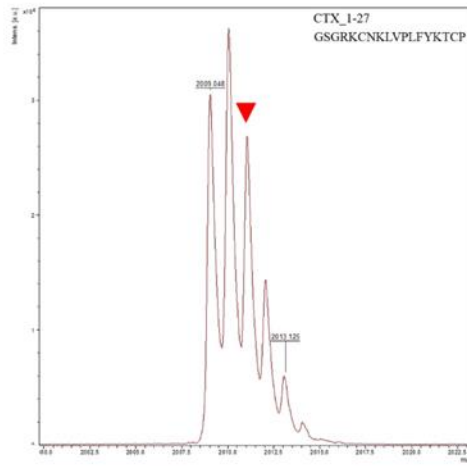
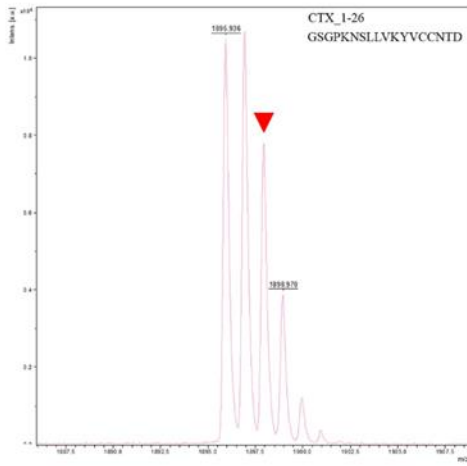
continued



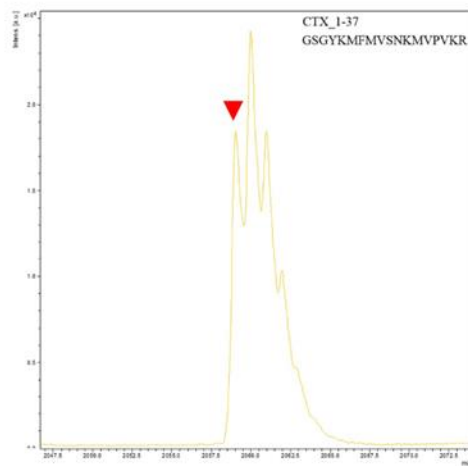
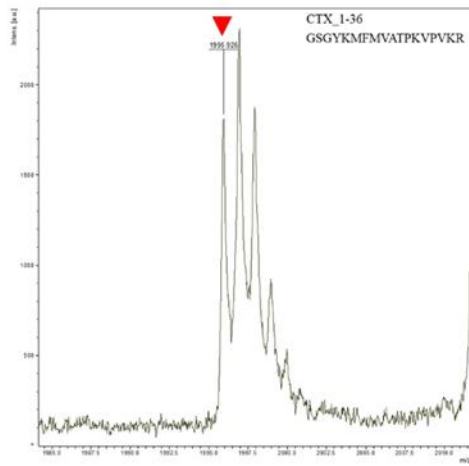
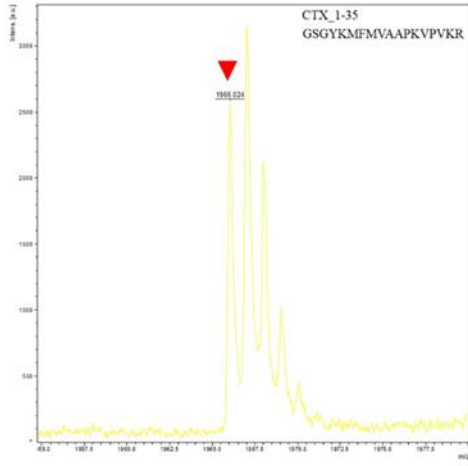
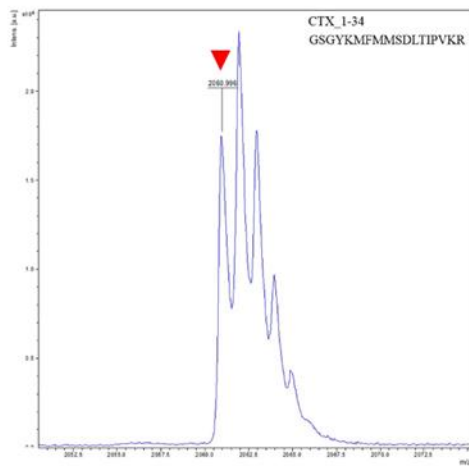
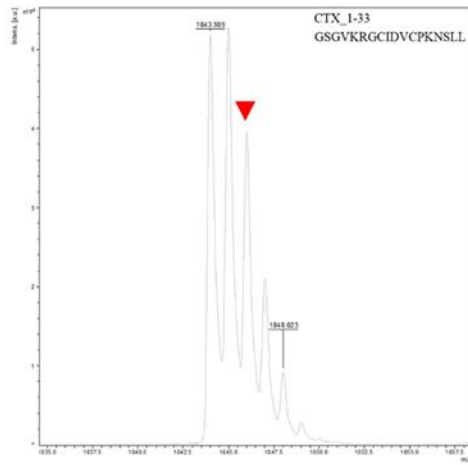
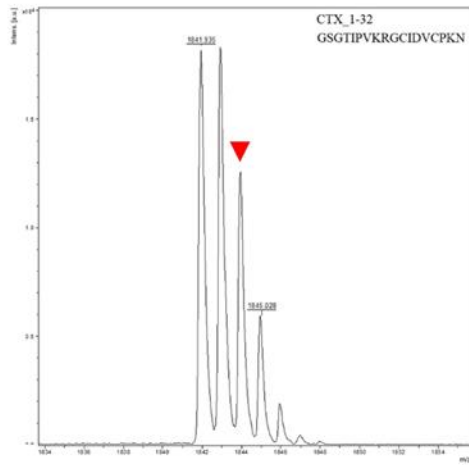
continued



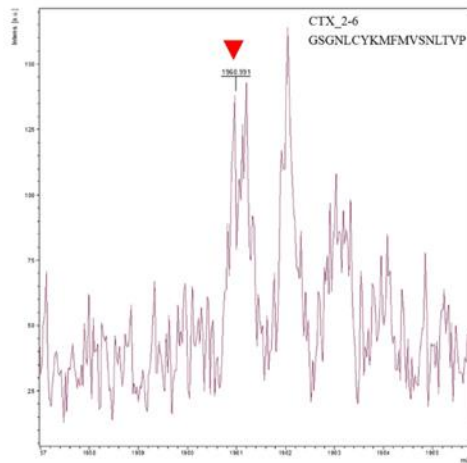
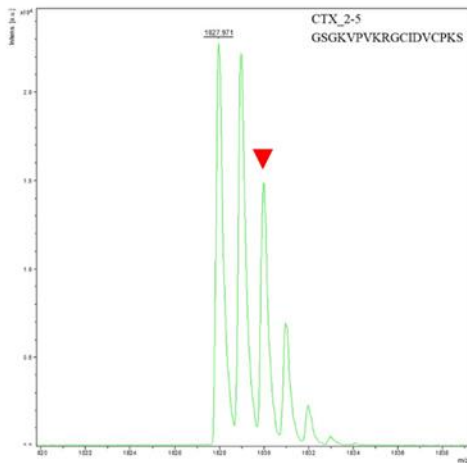
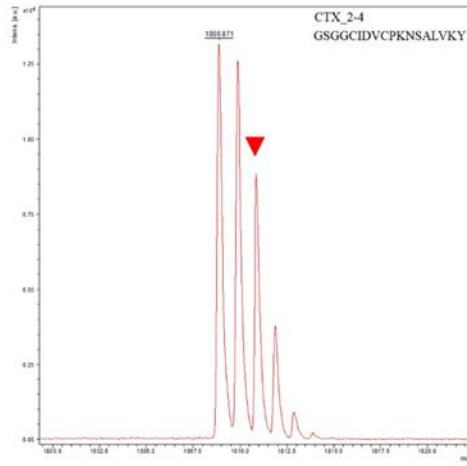
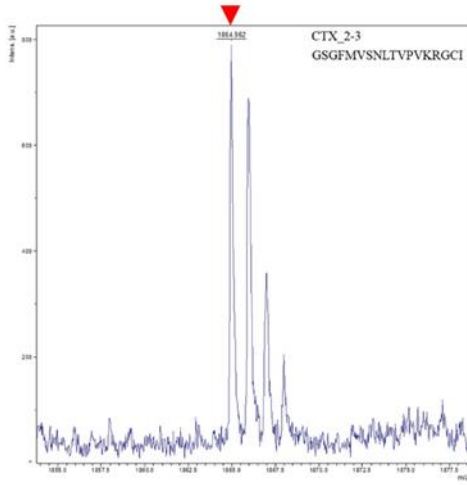
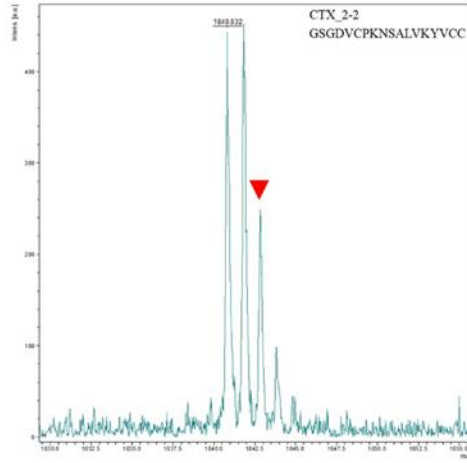
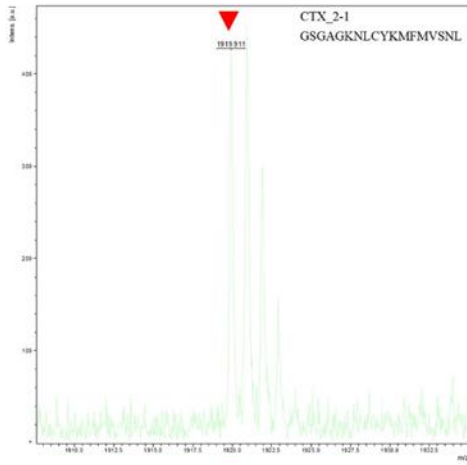
continued



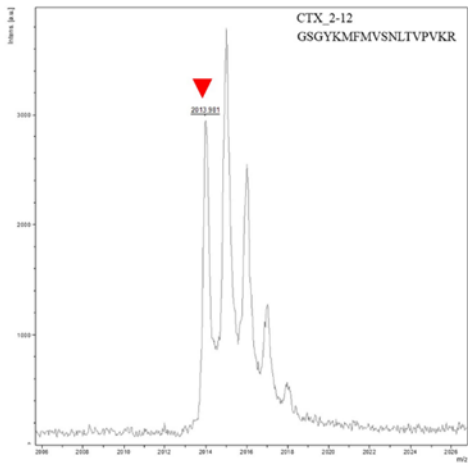
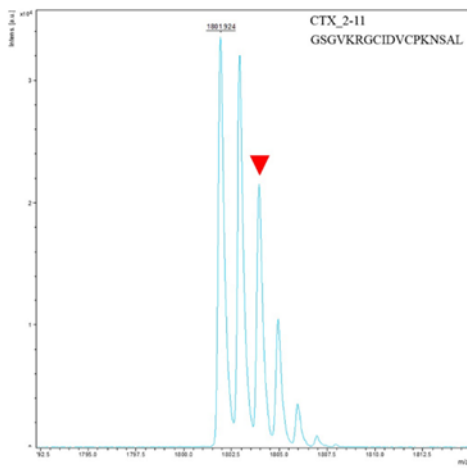
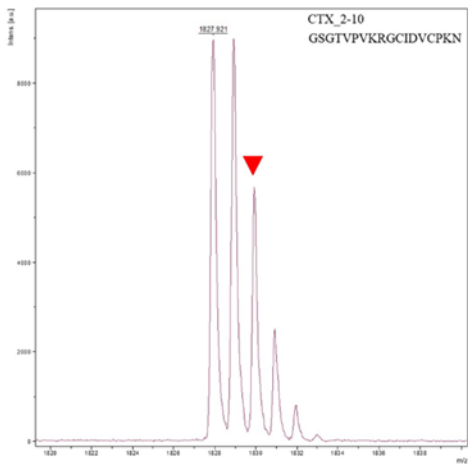
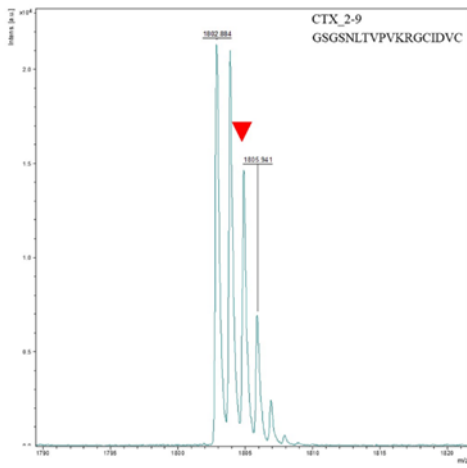
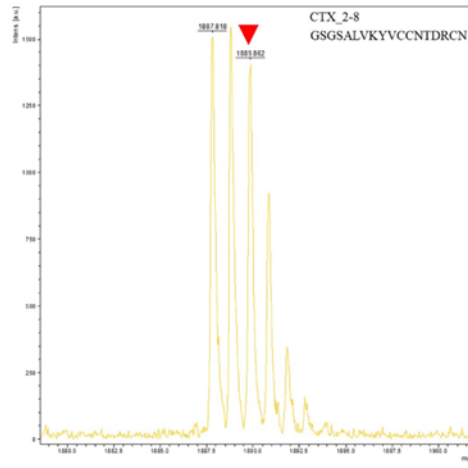
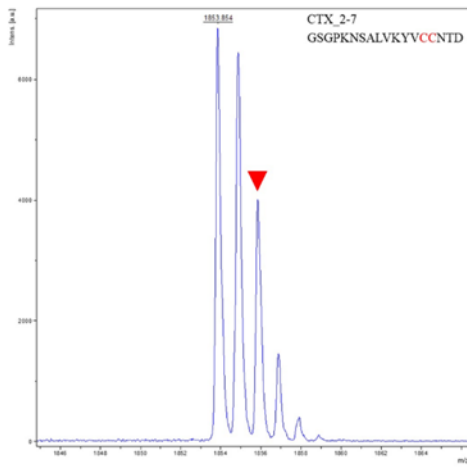
continued



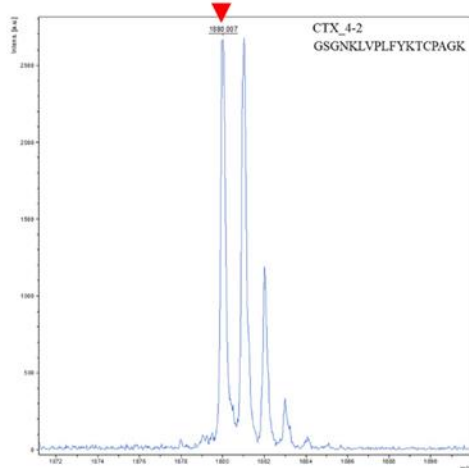
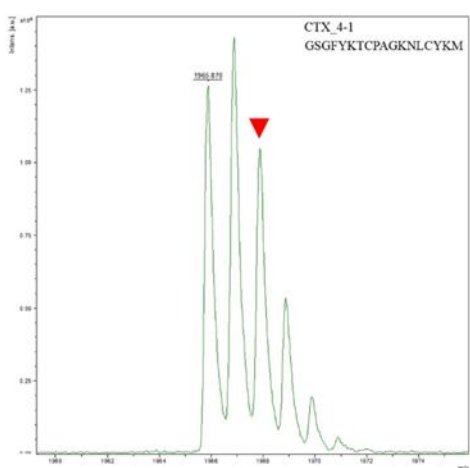
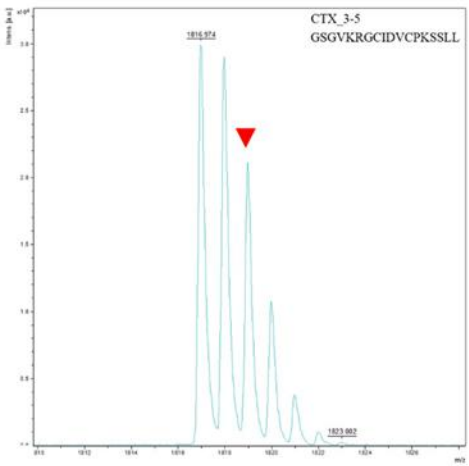
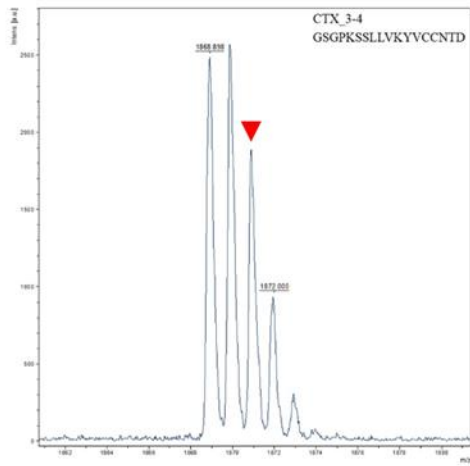
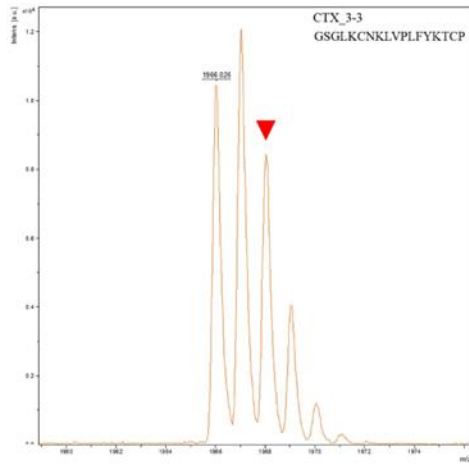
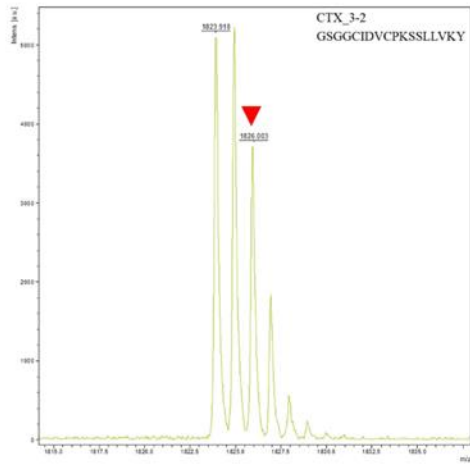
continued



continued

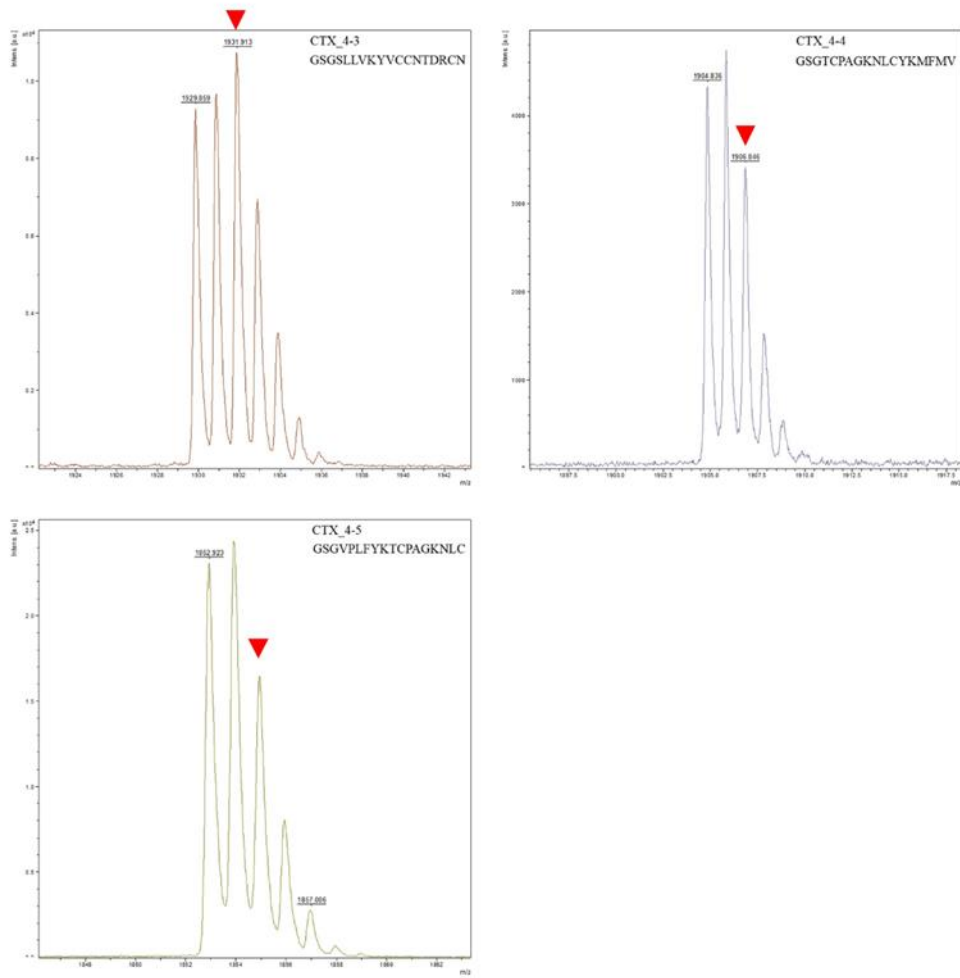


continued

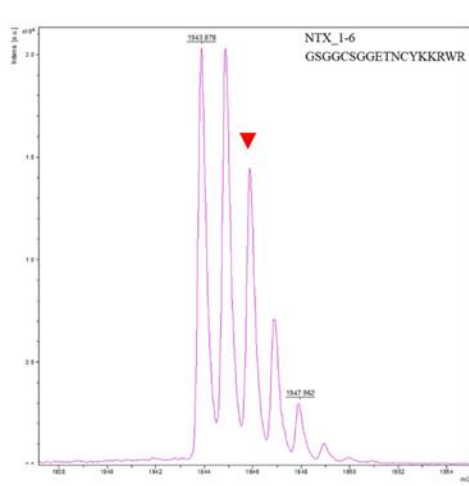
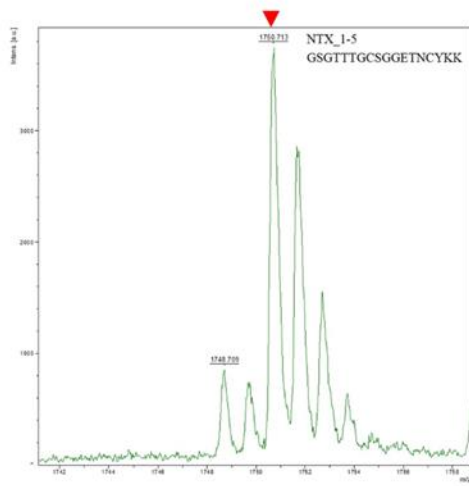
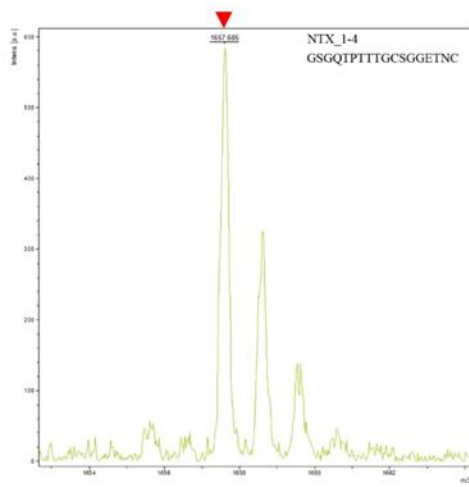
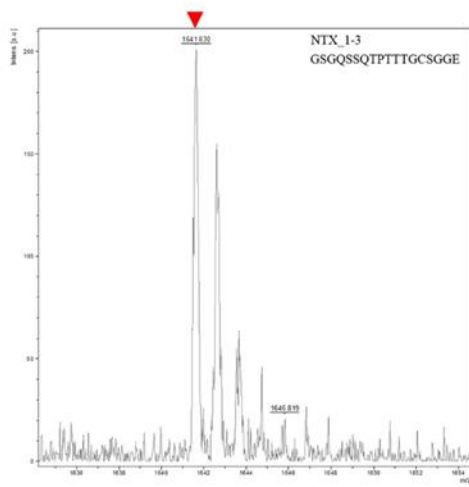
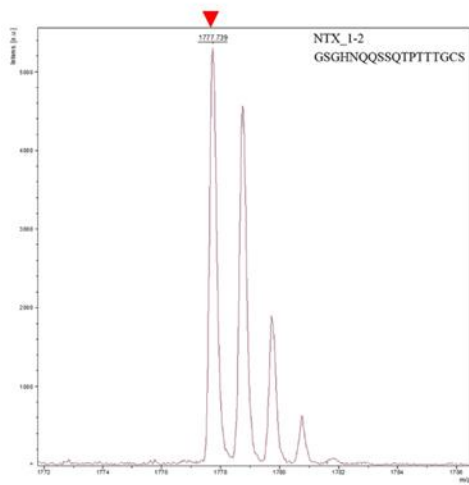
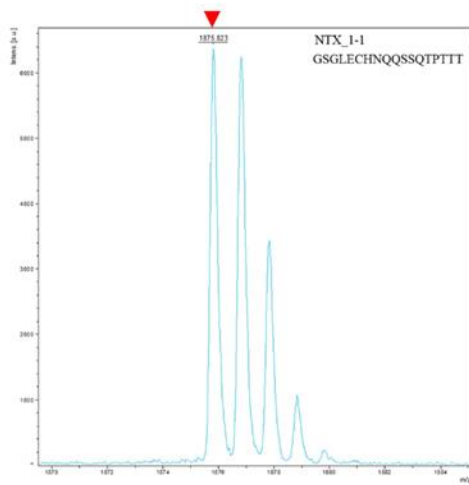


continued

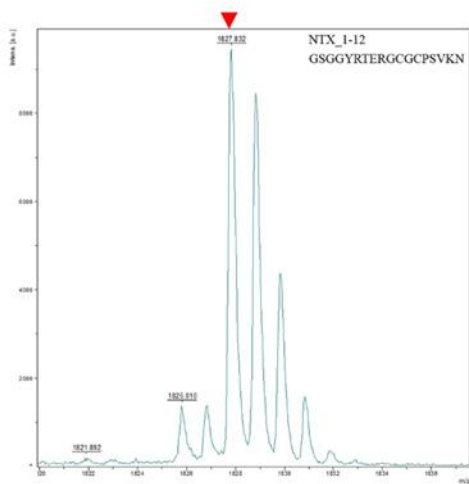
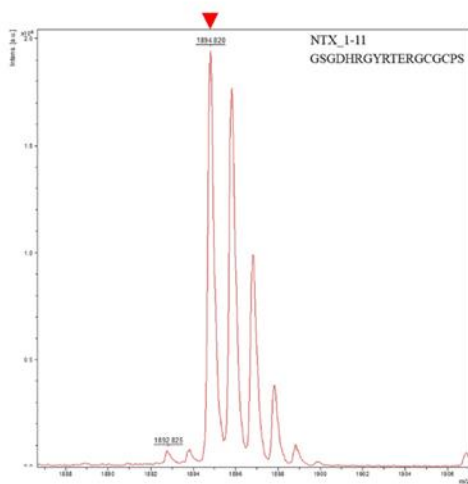
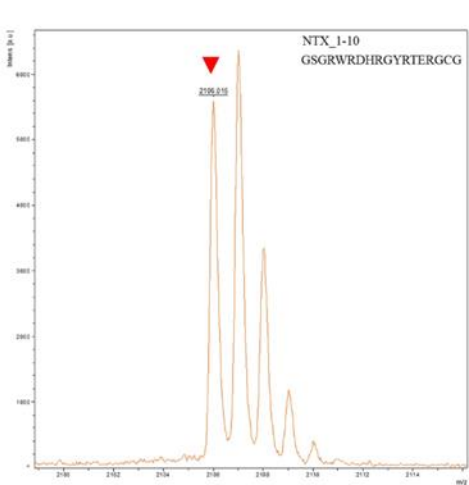
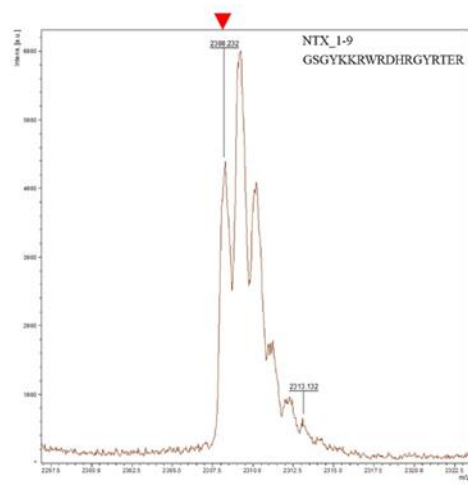
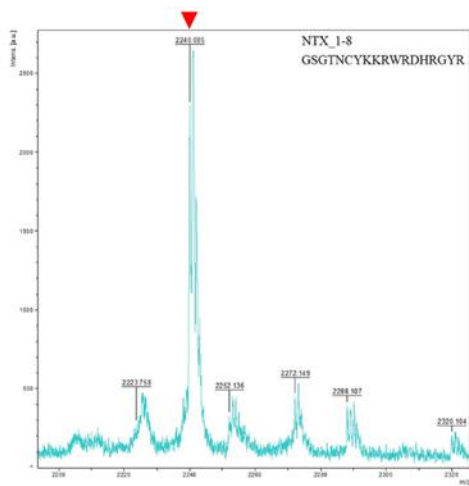
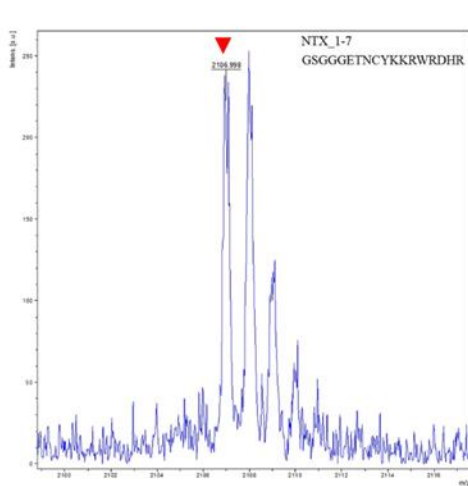




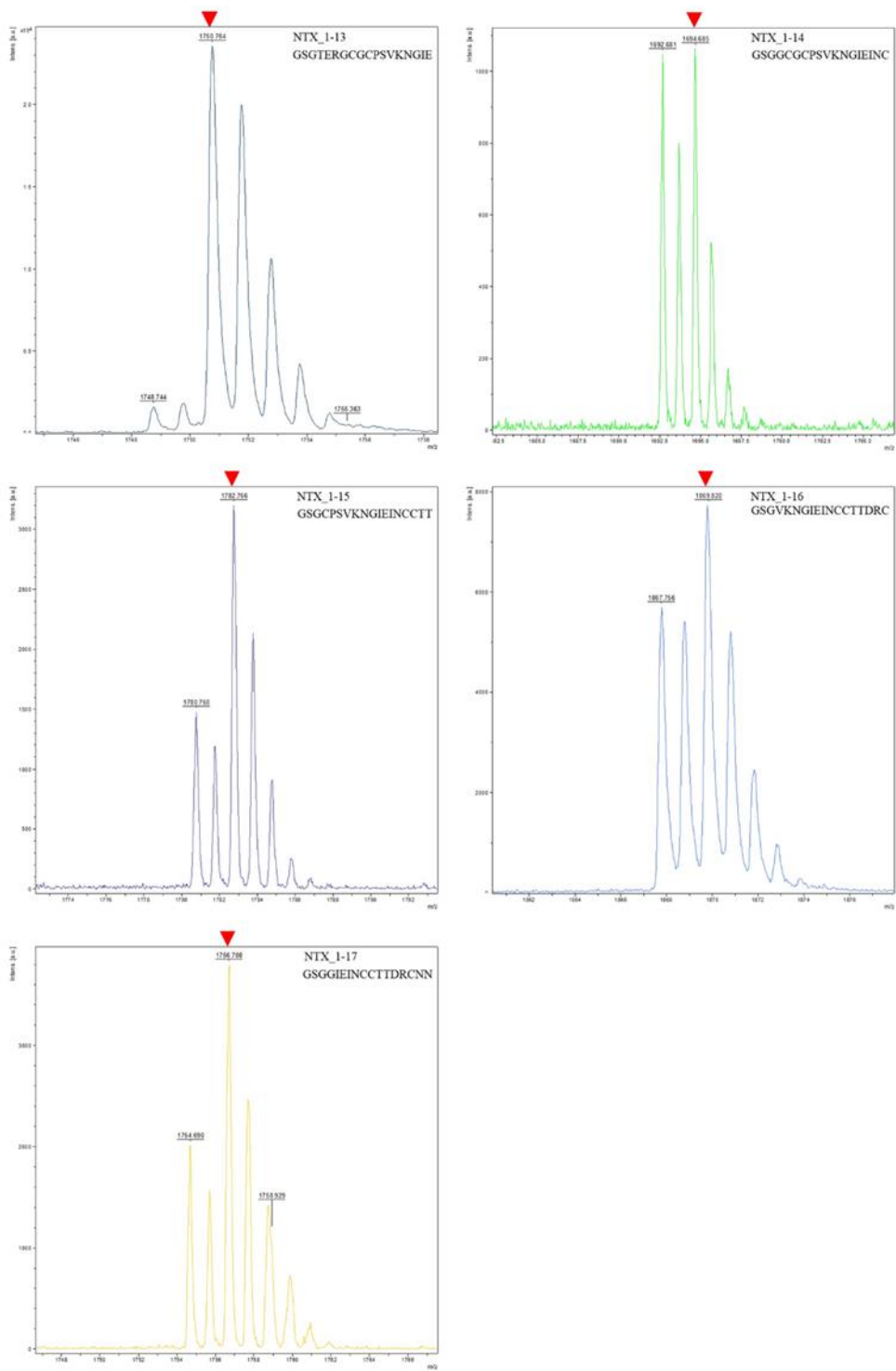
圖三：CTX 胜肽之 MALDI-TOF 圖譜



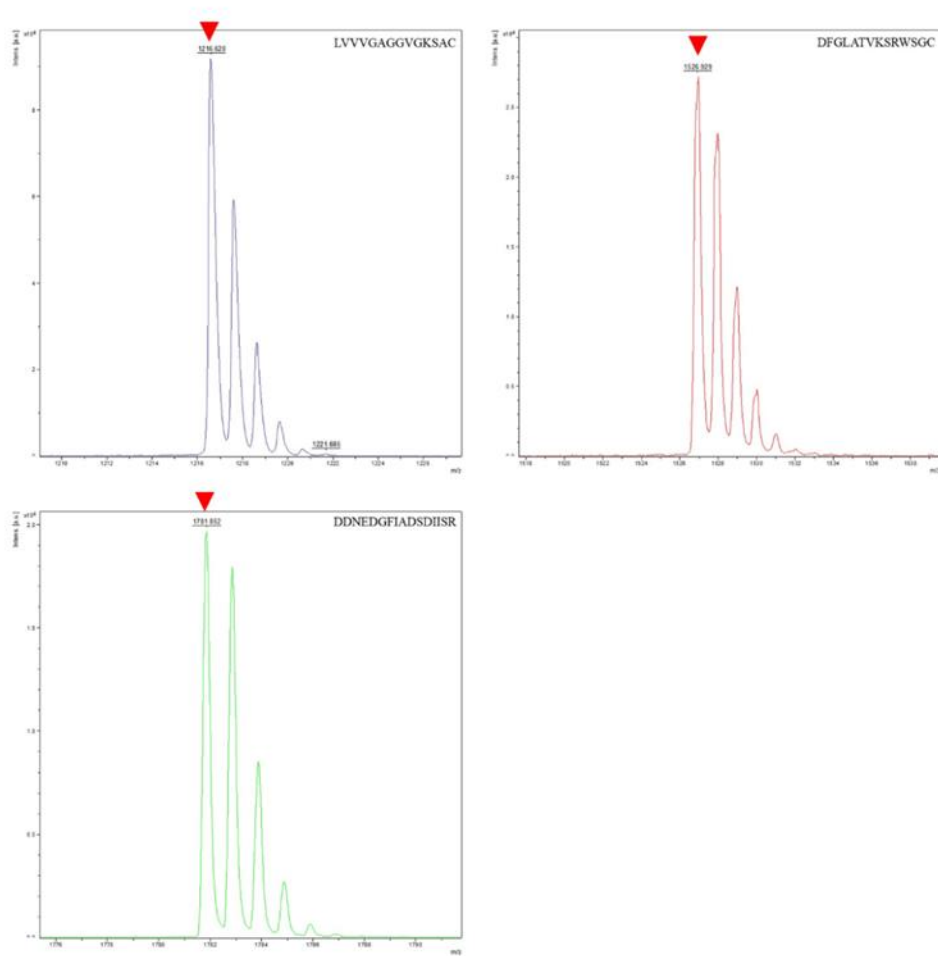
continued



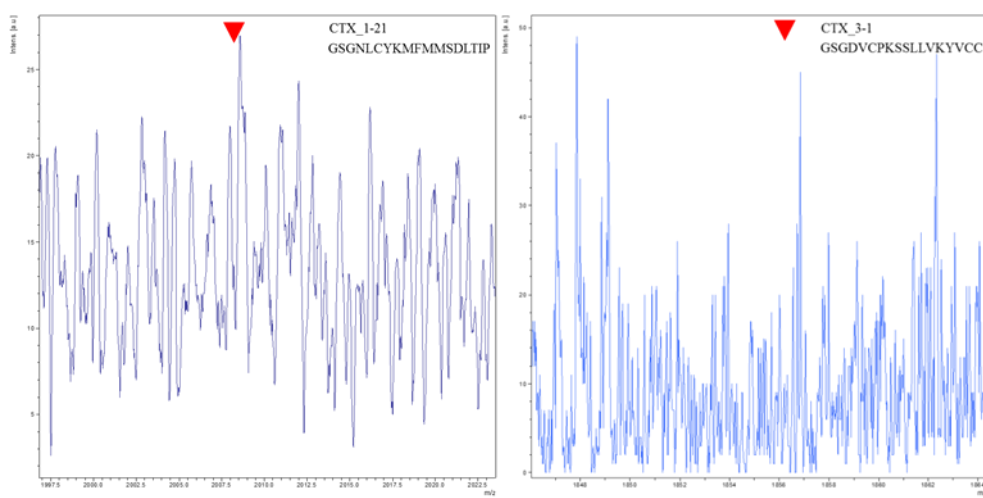
continued



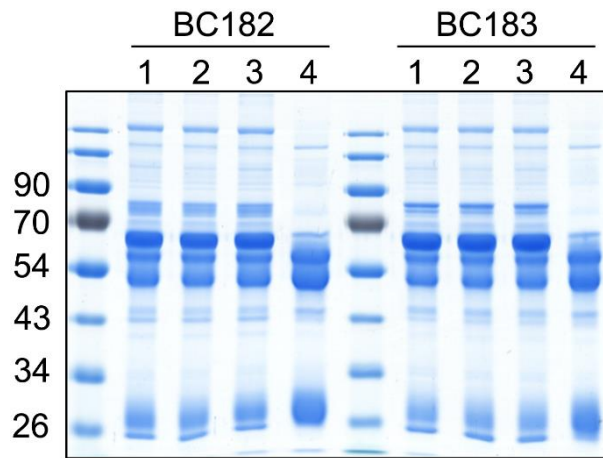
圖四：NTX 胜肽之 MALDI-TOF 圖譜



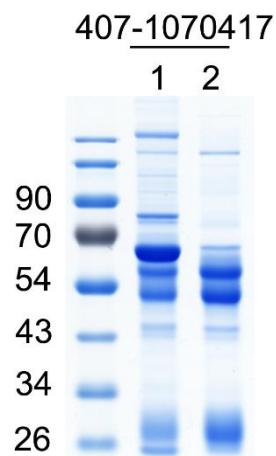
圖五：3 條控制組胜肽之 MALDI-TOF 圖譜



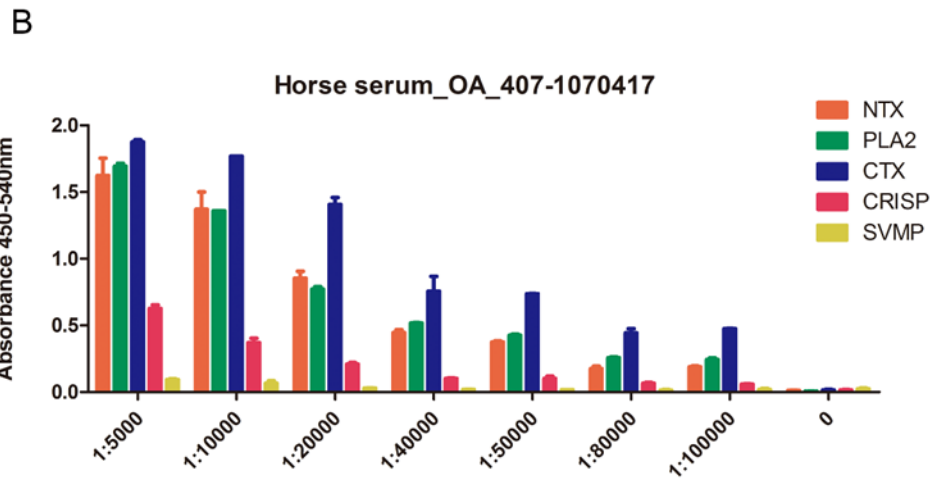
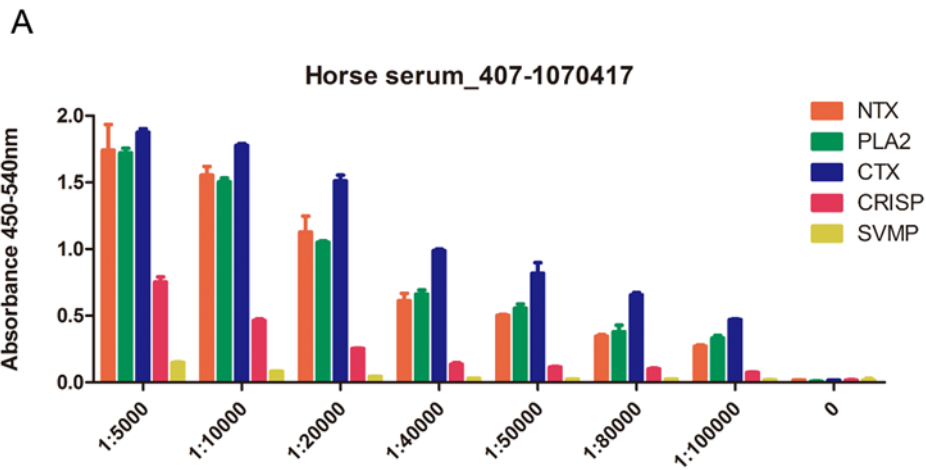
圖六：CTX1-21 和 CTX3-1 之 MALDI-TOF 圖譜



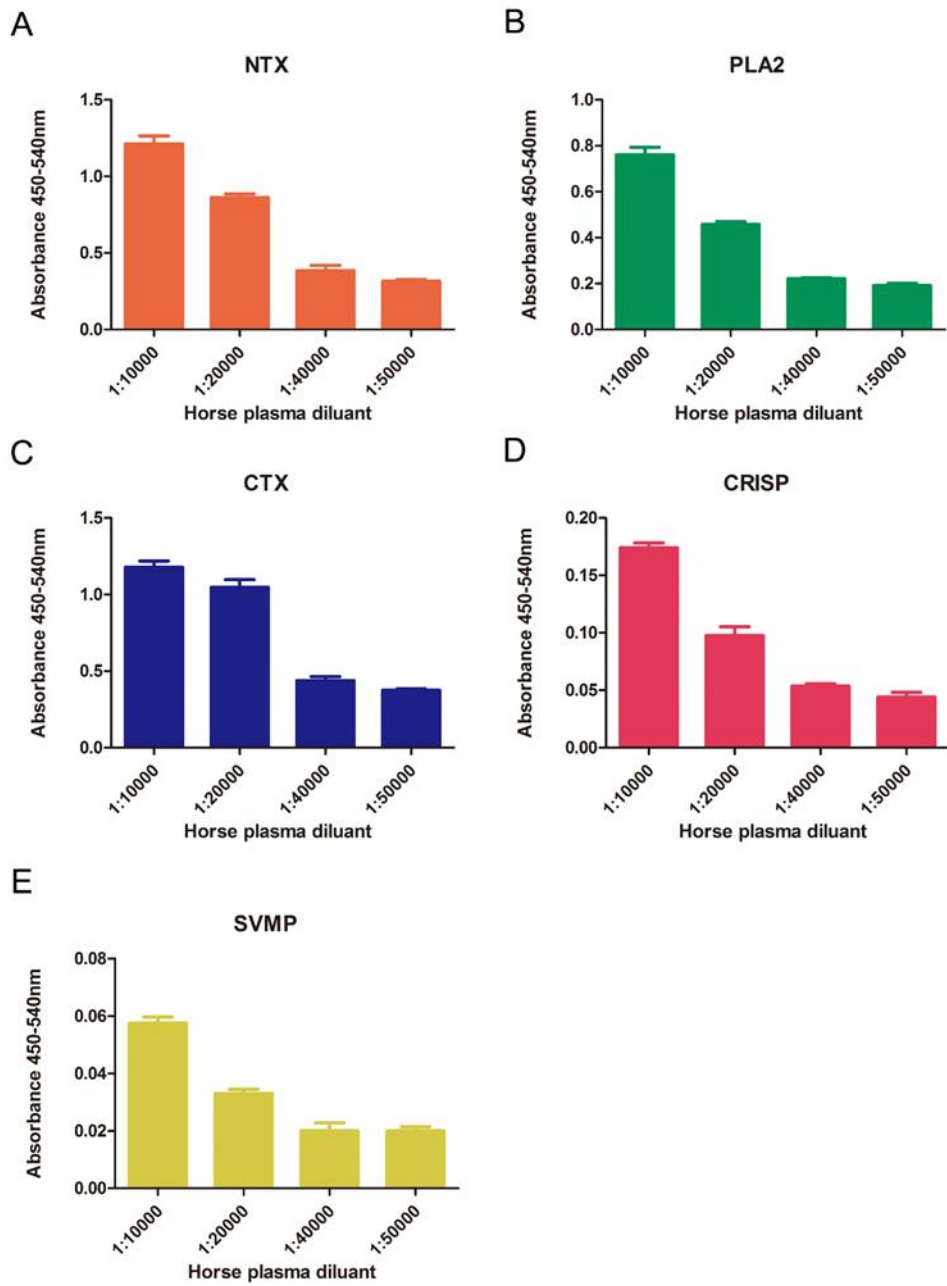
圖七：以 SDS-PAGE 比較不同純化抗體方法的效果。1：原馬血漿樣本(10  $\mu\text{g}$ )；2：Amicon Ultra 100K device (Millipore)管柱純化之樣本(10  $\mu\text{g}$ )；3：Vivaspin500 column(GE) 管柱純化之樣本(10  $\mu\text{g}$ )；4：醋酸鈉-辛酸純化之樣本(10  $\mu\text{g}$ )



圖八：以 SDS-PAGE 評估醋酸鈉-辛酸純化馬血漿抗體的效果。1：純化前馬血漿樣本(10  $\mu\text{g}$ )；2：醋酸鈉-辛酸純化後馬血漿樣本(10  $\mu\text{g}$ )。

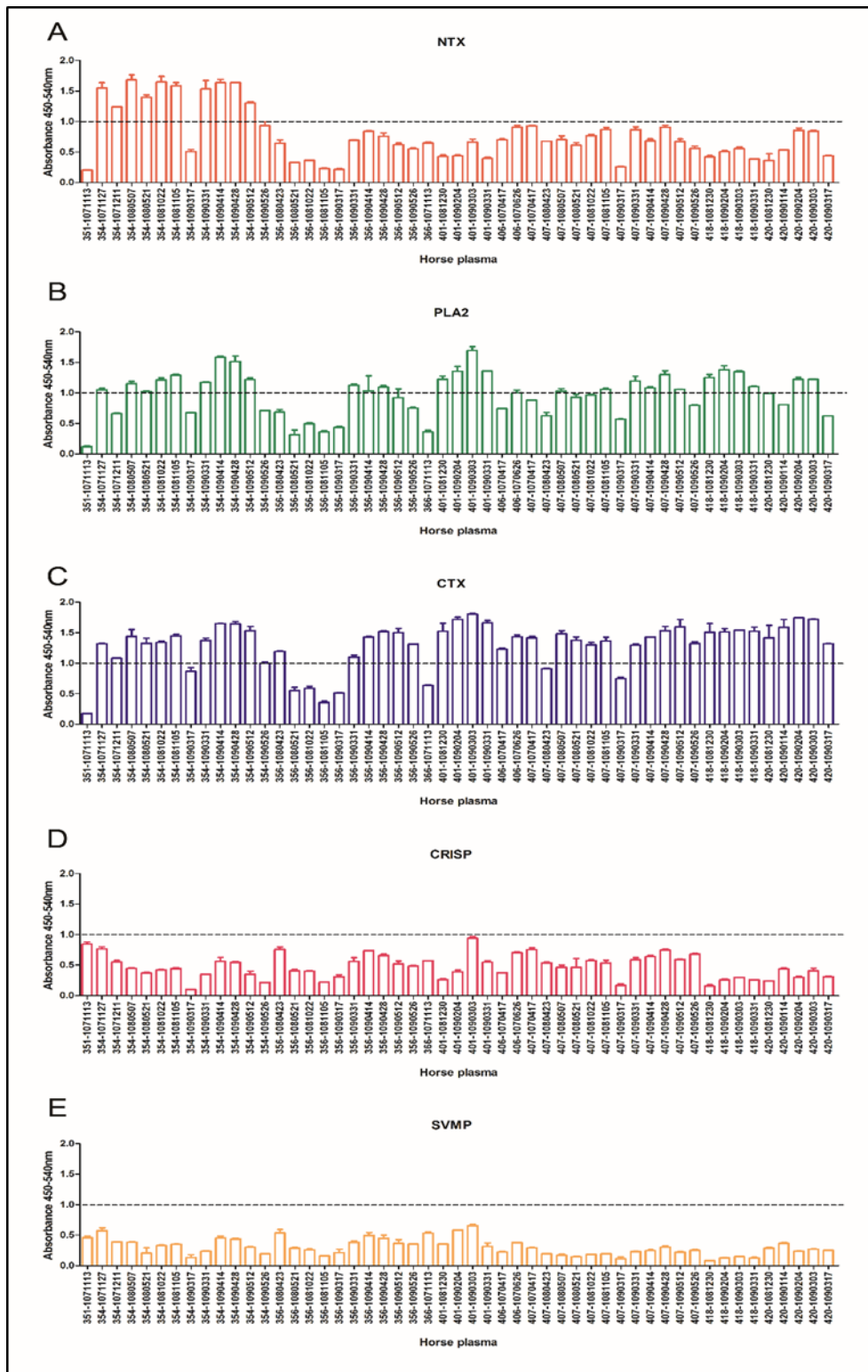


圖九、透過 ELISA 比較五種 HPLC 純化之眼鏡蛇蛇毒蛋白和純化前後之馬血漿在七種不同稀釋條件下之訊號強度。A：馬血漿編號 407-1070417，B：馬血漿編號 OA\_407-1070417

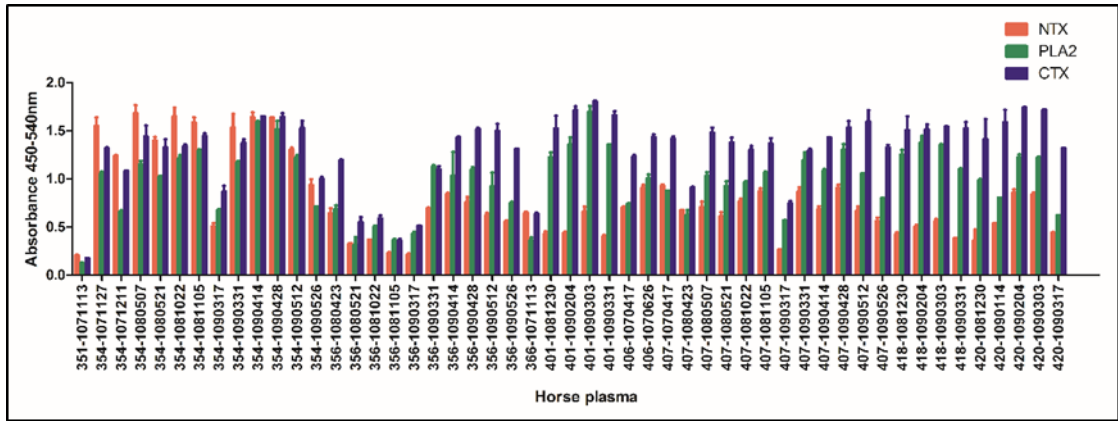


圖十：透過 ELISA 比較五種 HPLC 純化之眼鏡蛇蛇毒蛋白在不同稀釋倍率條件下之訊號強度，A：NTX；B：PLA2；C：NTX；D：CRISP；E：SVMP。

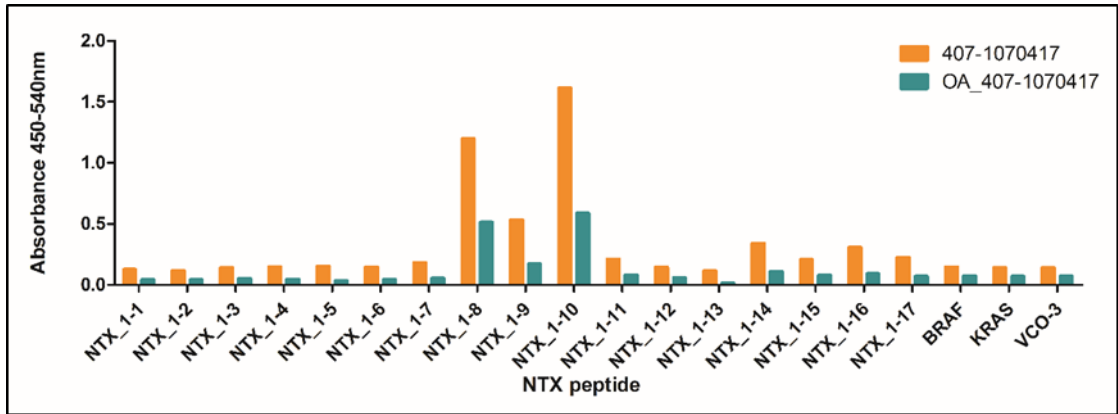




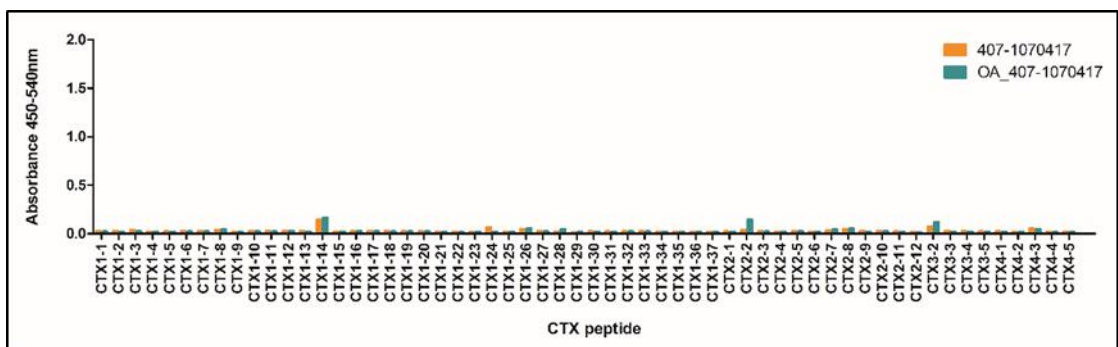
圖十一：51 個已知效價之馬血漿對 5 種眼鏡蛇蛇毒毒性蛋白之免疫親和力分析。A：NTX；B：PLA2；C：CTX；D：CRISP；E：SVMP。



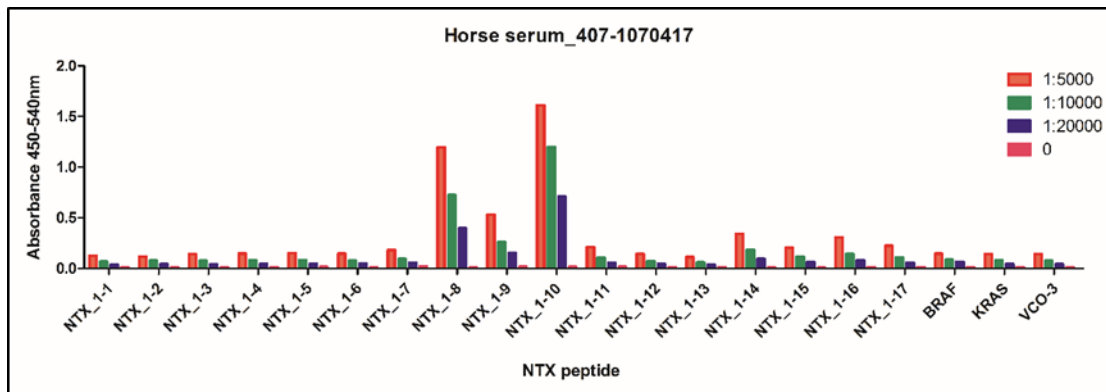
圖十二：比較 51 個已知效價之馬血漿對 NTX、PLA2 和 CTX 眼鏡蛇蛇毒毒性蛋白之免疫親和力分析。



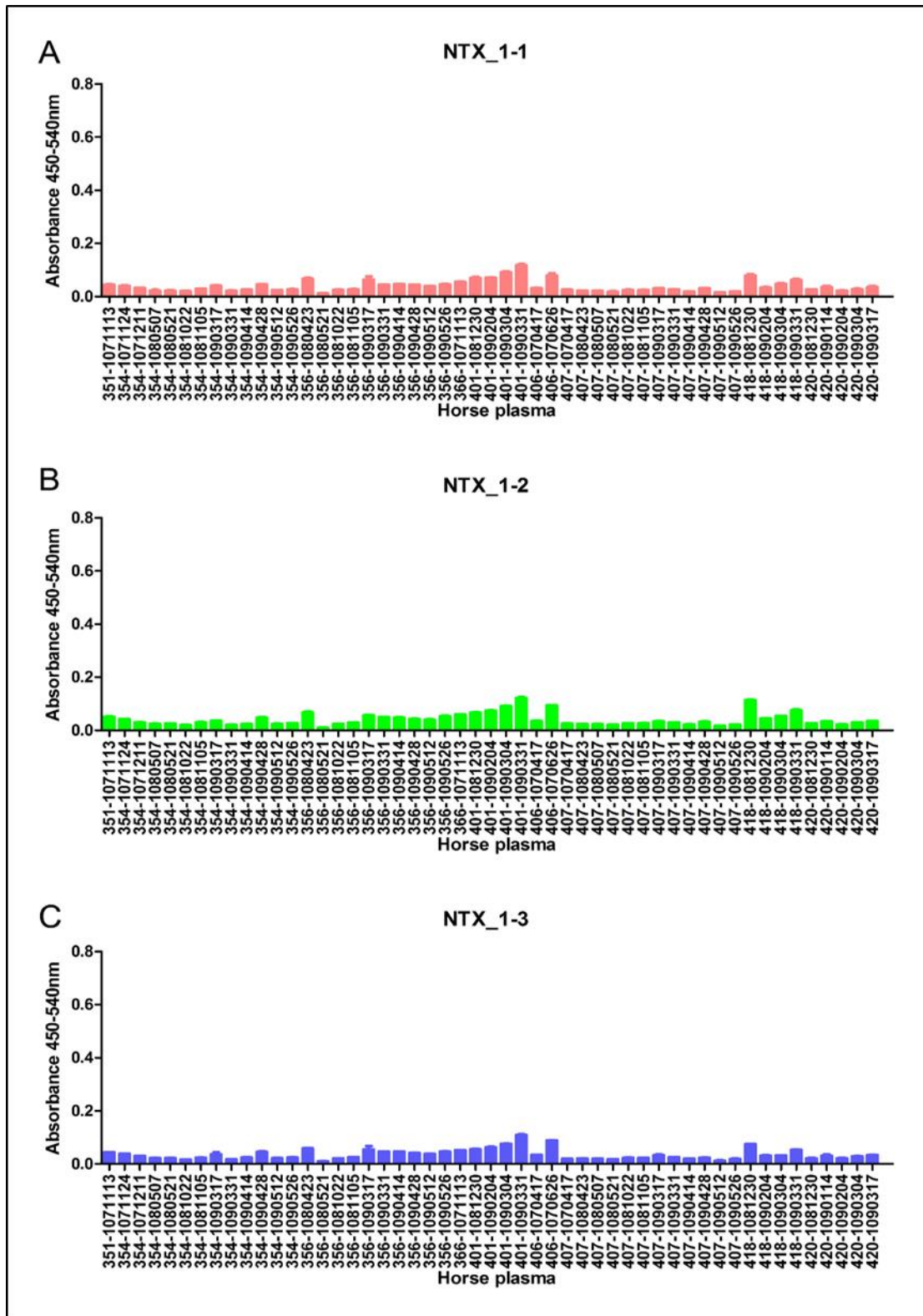
圖十三：純化前後馬血漿對 17 段 NTX 衍生胜肽和 3 段控制組胜肽片段之 ELISA 訊號分析。



圖十四：純化前後馬血漿對 57 段 CTX 衍生胜肽之 ELISA 訊號分析。

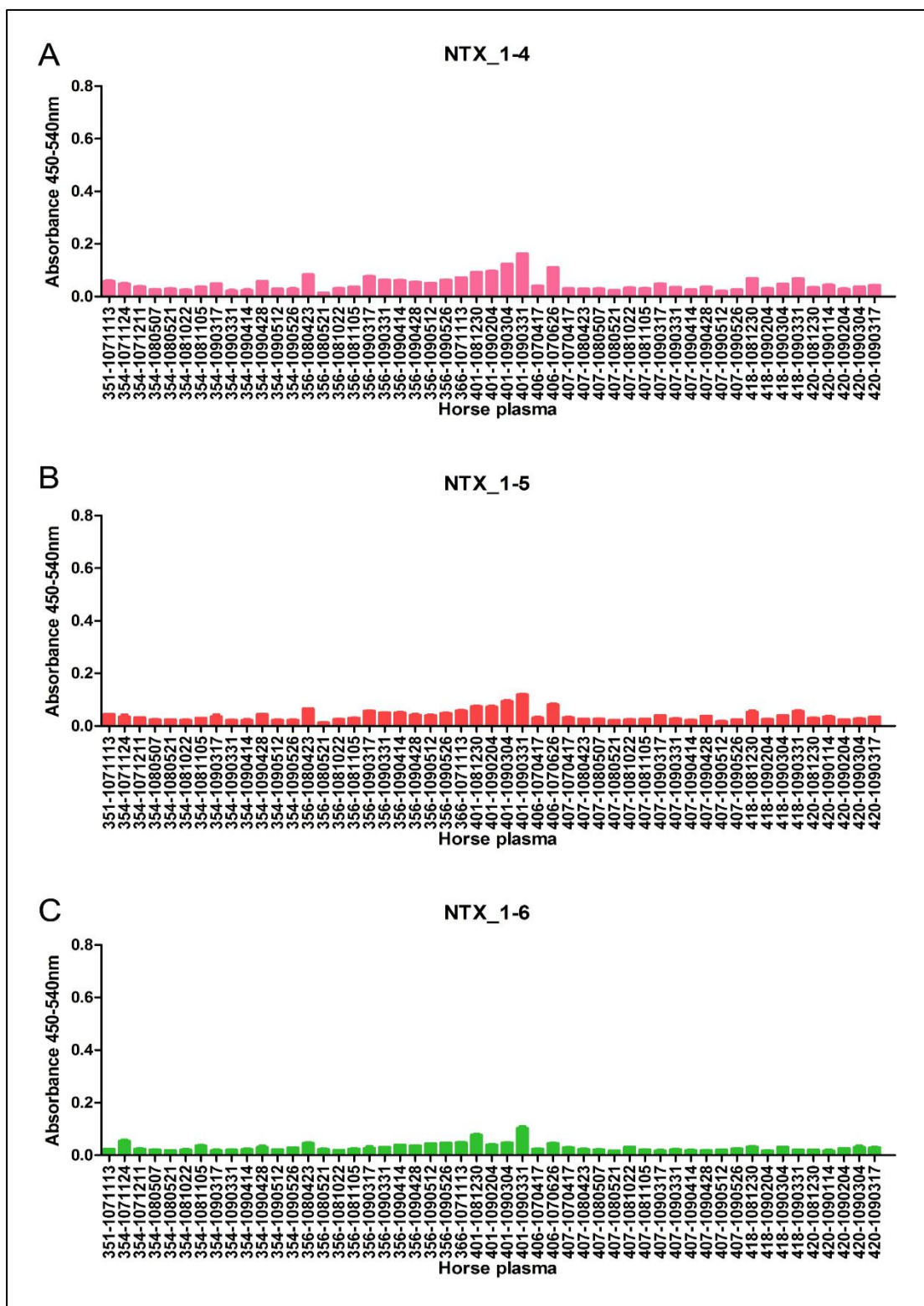


圖十五：利用 ELISA 針對高效價馬血漿標準品對 17 段 NTX 衍生胜肽訊號和 3 段控制組胜肽在不同稀釋倍率條件下之訊號強度分析。



圖十六：51 個馬血漿樣本和 NTX 衍生胜肽片段之免疫親和力分析。

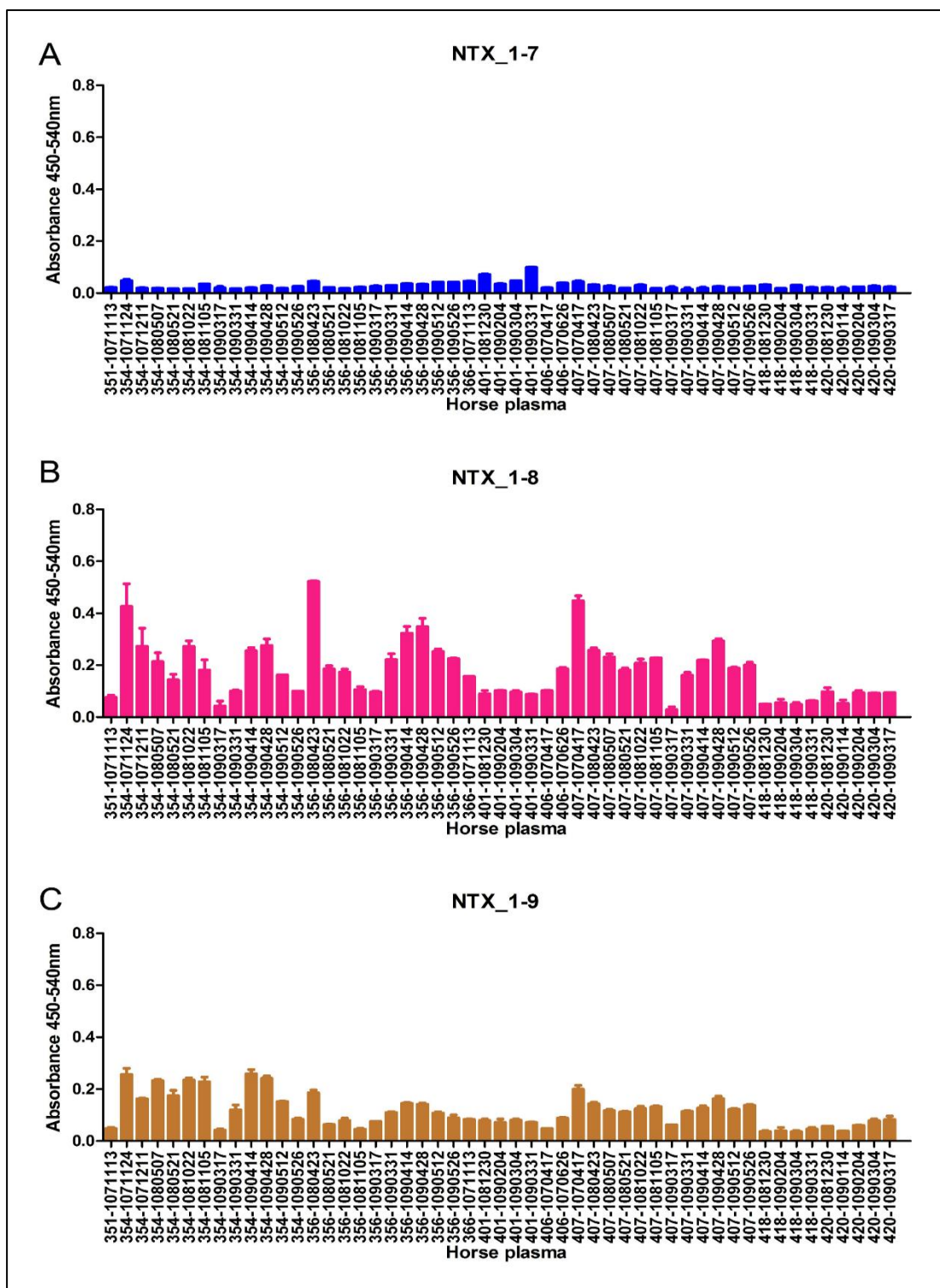
A：NTX1-1；B：NTX1-2；C：NTX1-3。



圖十七：51 個馬血漿樣本和 NTX 衍生胜肽片段之免疫親和力分析。

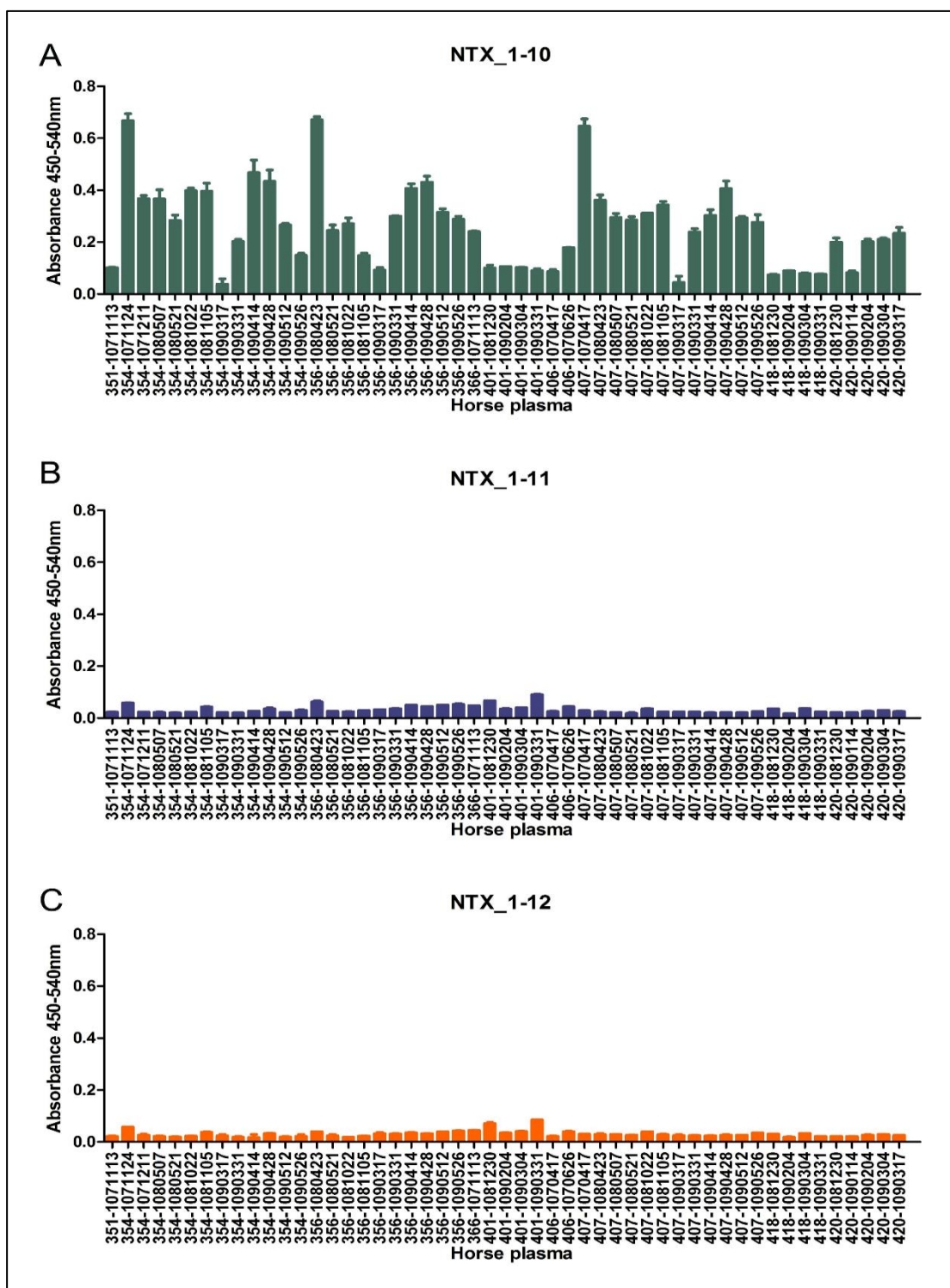
A : NTX1-4 ; B : NTX1-5 ; C : NTX1-6 。





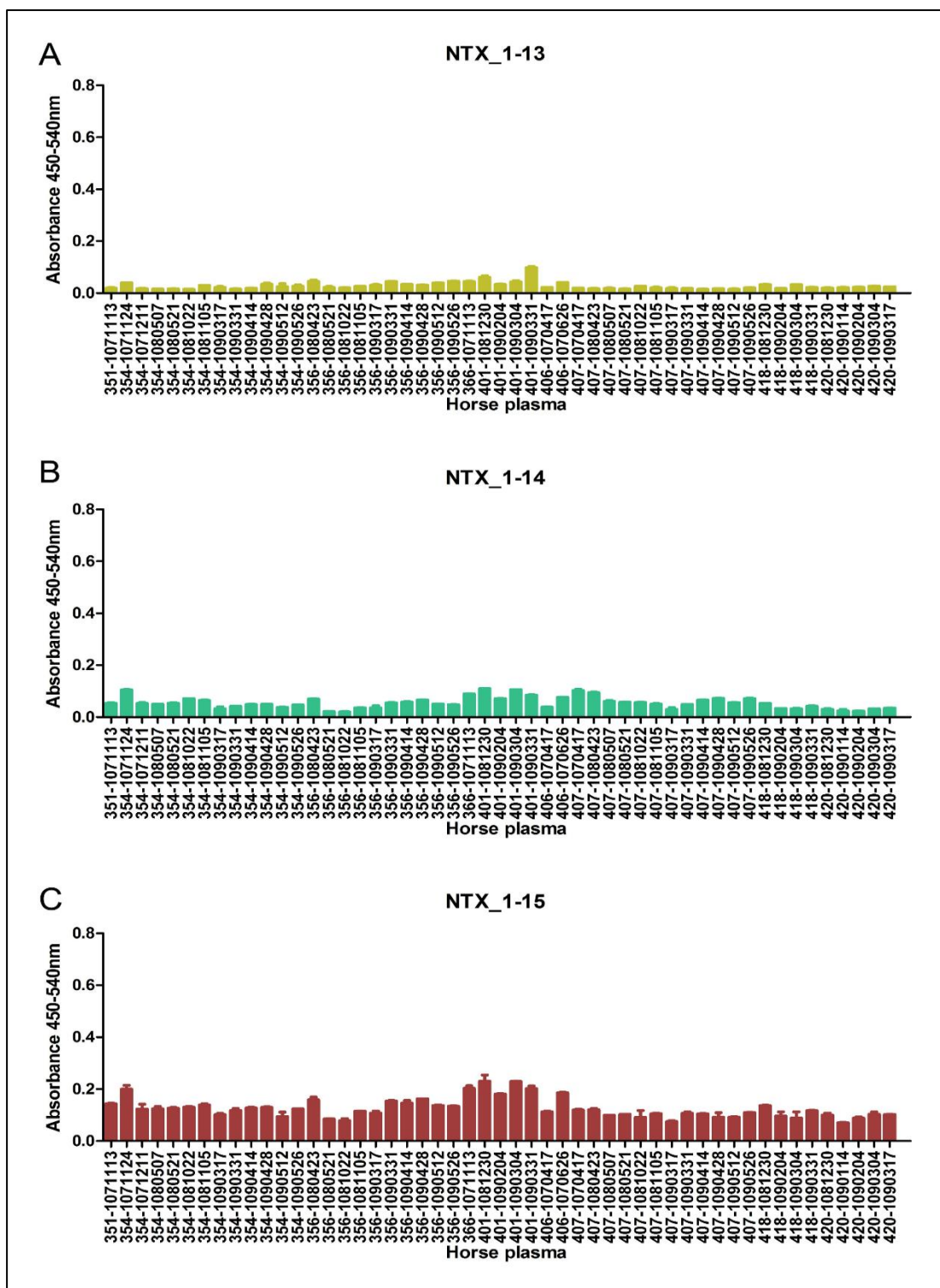
圖十八：51 個馬血漿樣本和 NTX 衍生胜肽片段之免疫親和力分析。

A：NTX1-7；B：NTX1-8；C：NTX1-9。



圖十九：51 個馬血漿樣本和 NTX 衍生胜肽片段之免疫親和力分析。

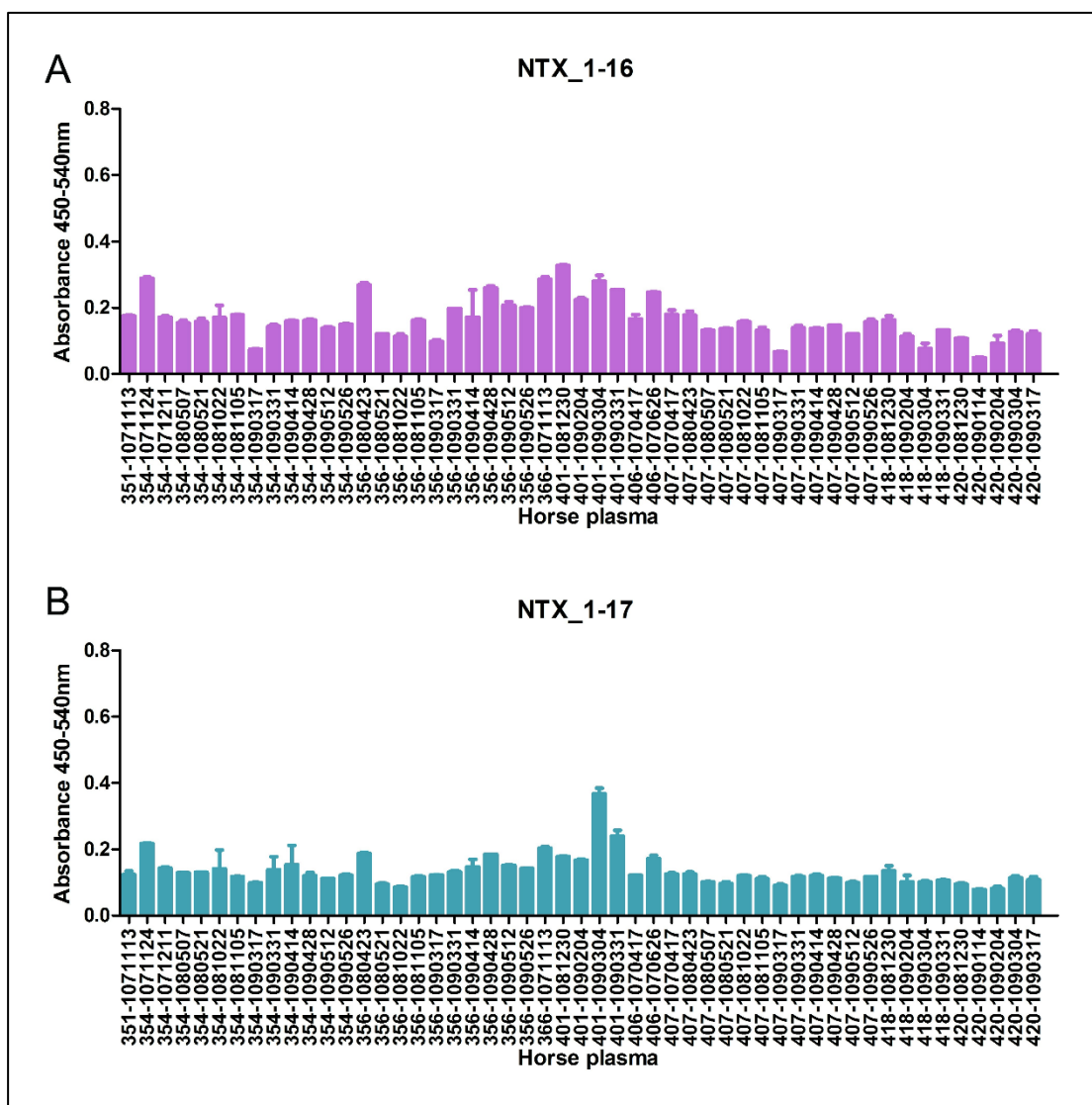
A：NTX1-10；B：NTX1-11；C：NTX1-12。



圖二十：51 個馬血漿樣本和 NTX 衍生胜肽片段之免疫親和力分析。

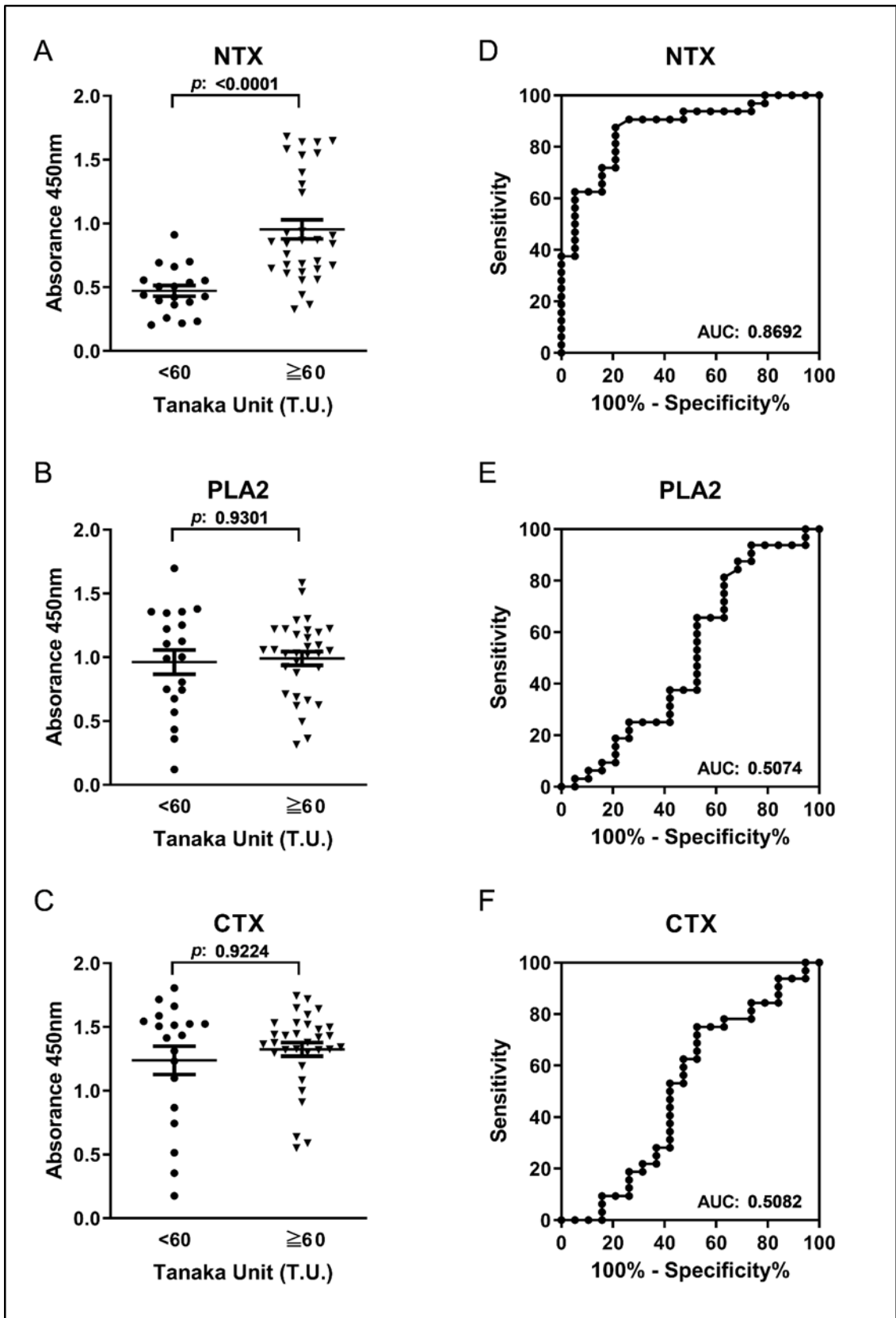
A : NTX1-13 ; B : NTX1-14 ; C : NTX1-15 。



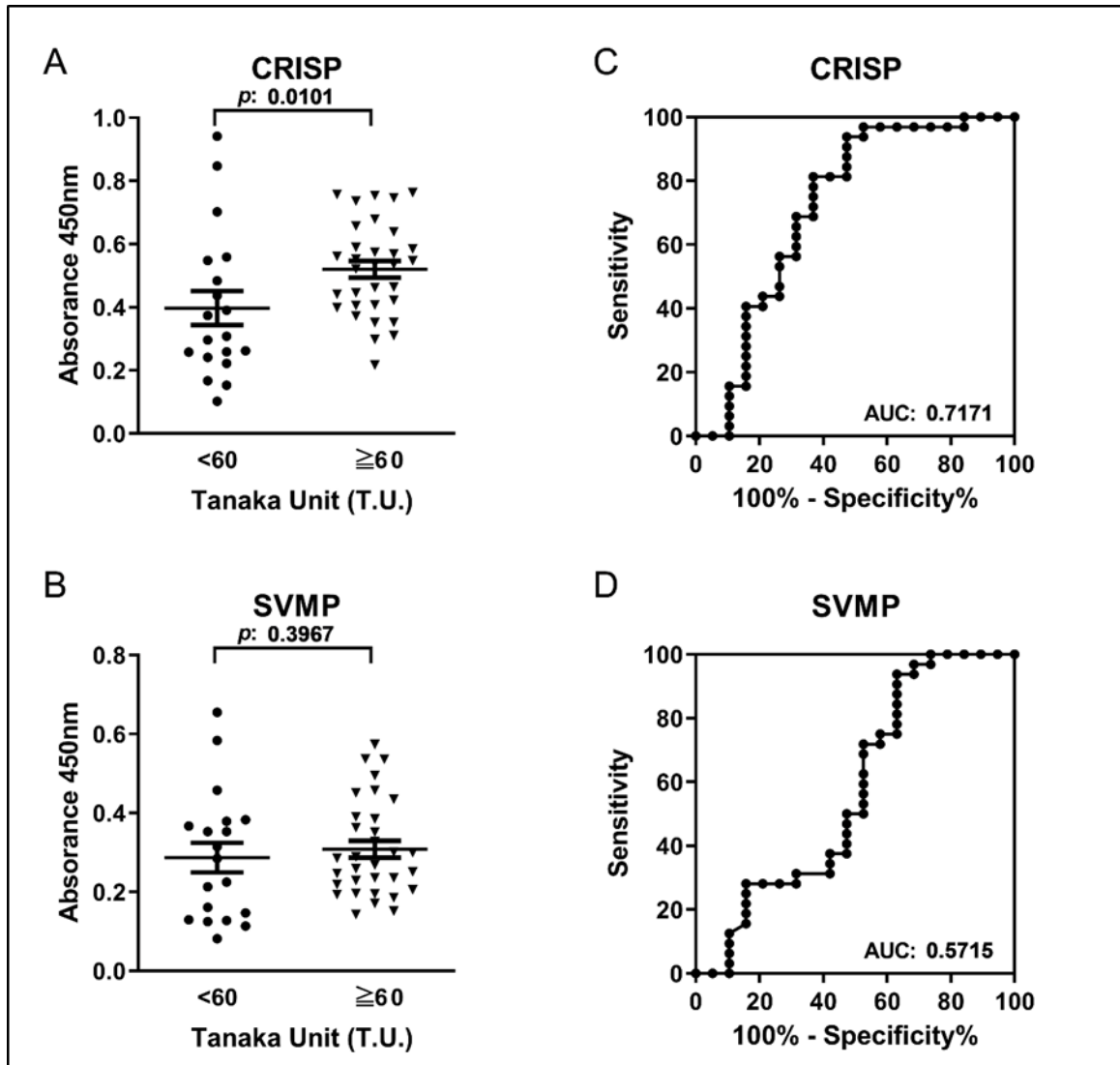


圖二十一：51 個馬血漿樣本和 NTX 衍生胜肽片段之免疫親和力分析。

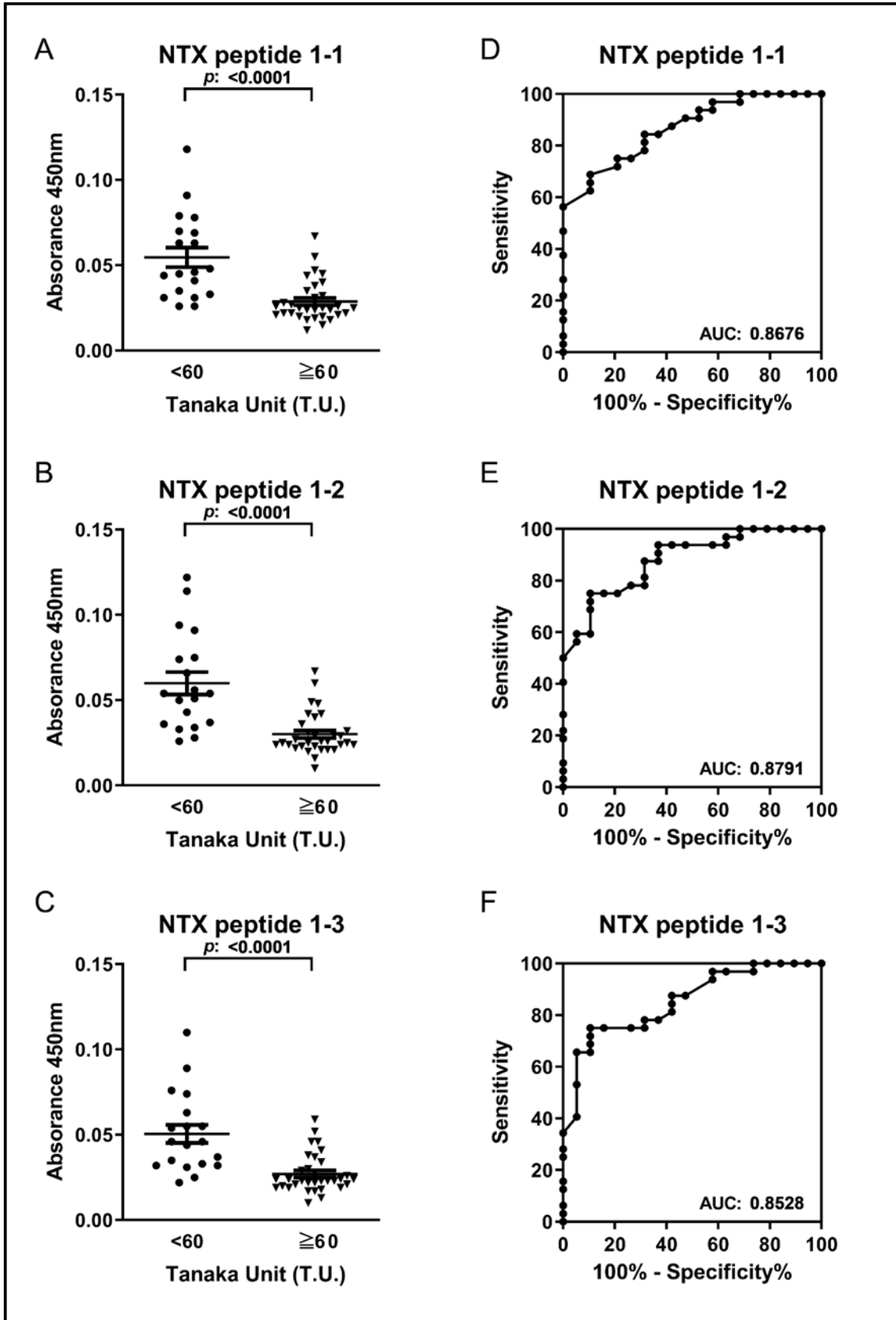
A：NTX1-16；B：NTX1-17。



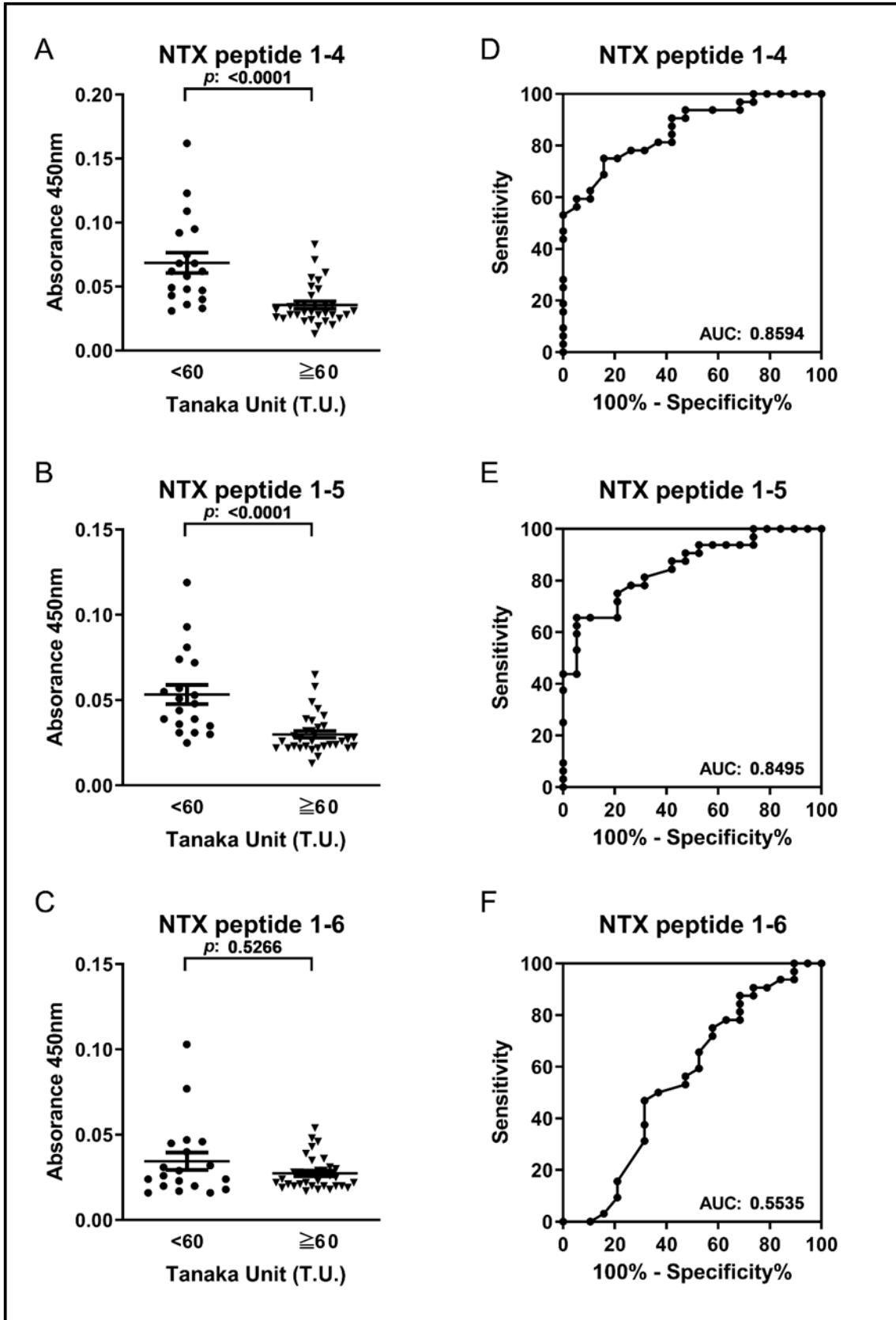
圖二十二：NTX、PLA2 和 CTX 之垂直散布圖和 ROC 曲線。



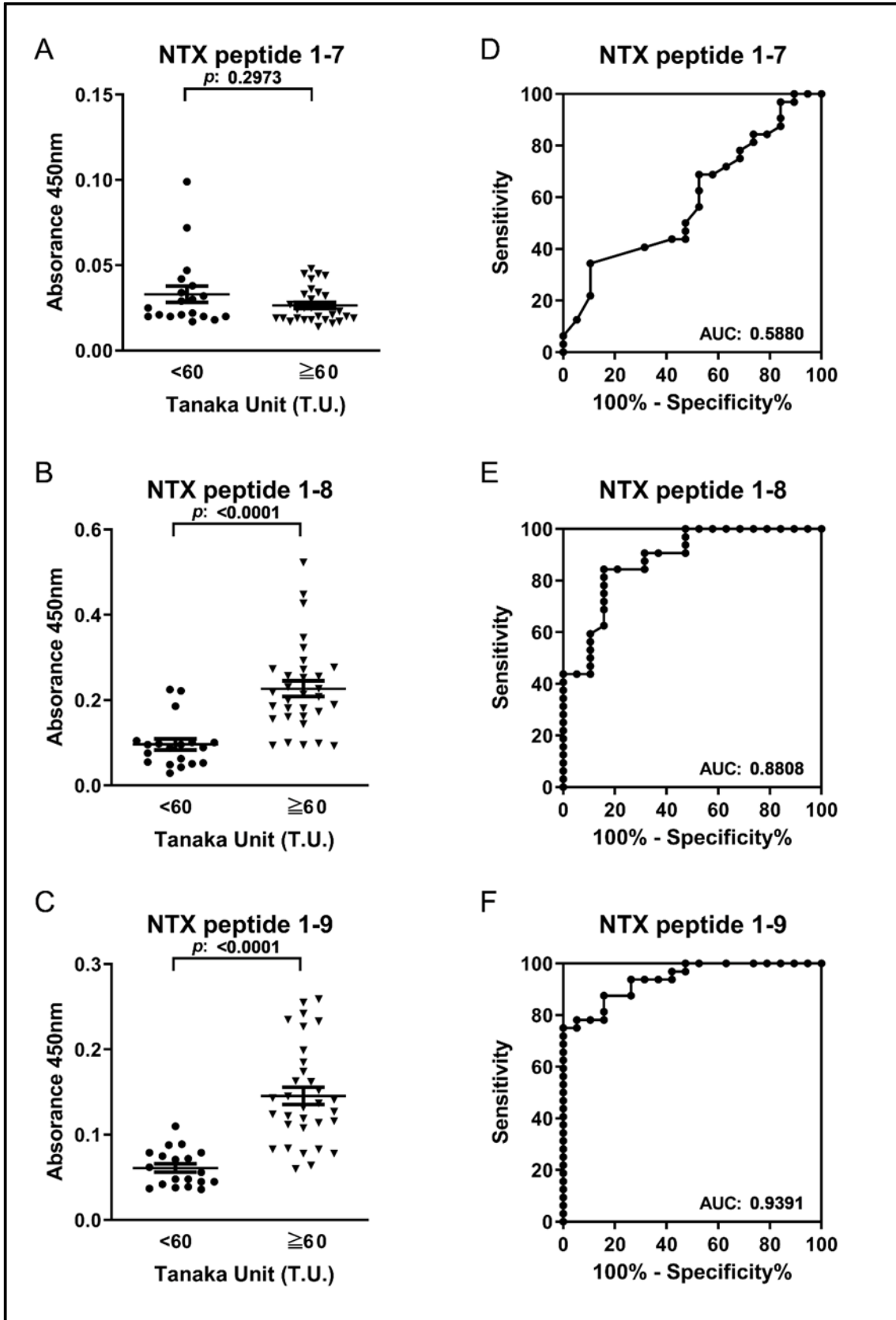
圖二十三：CRISP 和 SVMP 之垂直散布圖和 ROC 曲線。



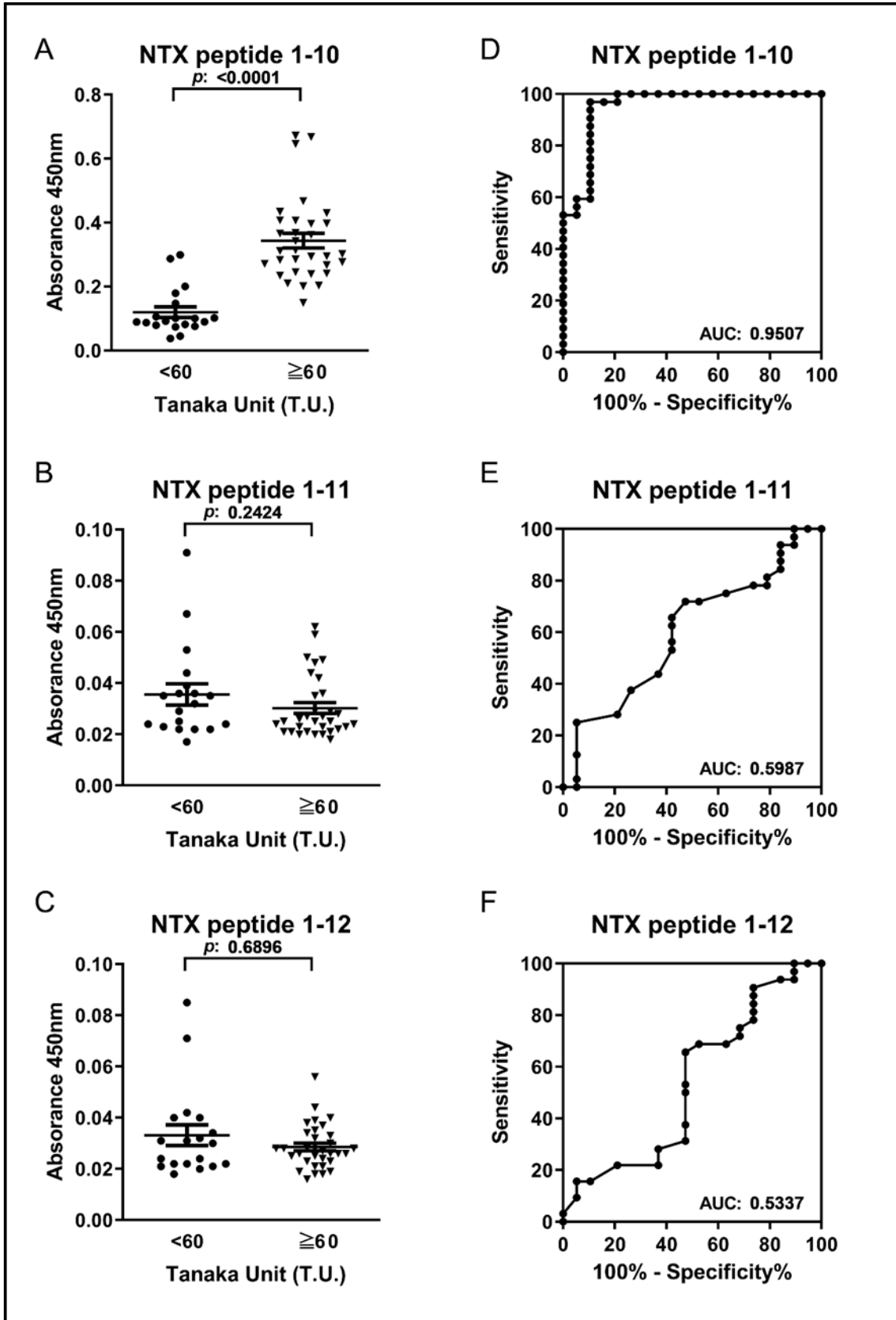
圖二十四：NTX1-1、1-2 和 1-3 之垂直散布圖和 ROC 曲線。



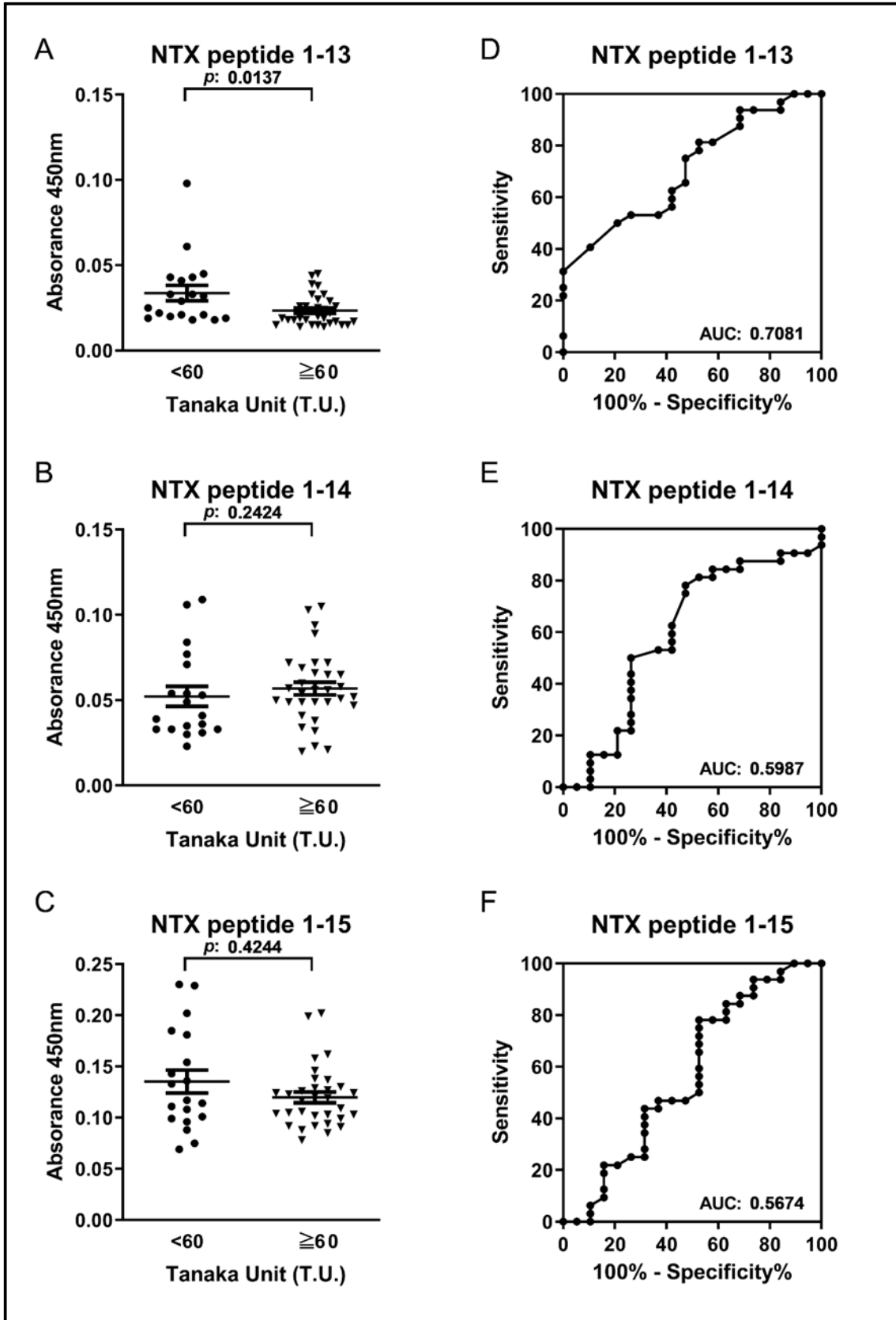
圖二十五：NTX1-4、1-5 和 1-6 之垂直散布圖和 ROC 曲線。



圖二十六：NTX1-7、1-8 和 1-9 之垂直散布圖和 ROC 曲線。

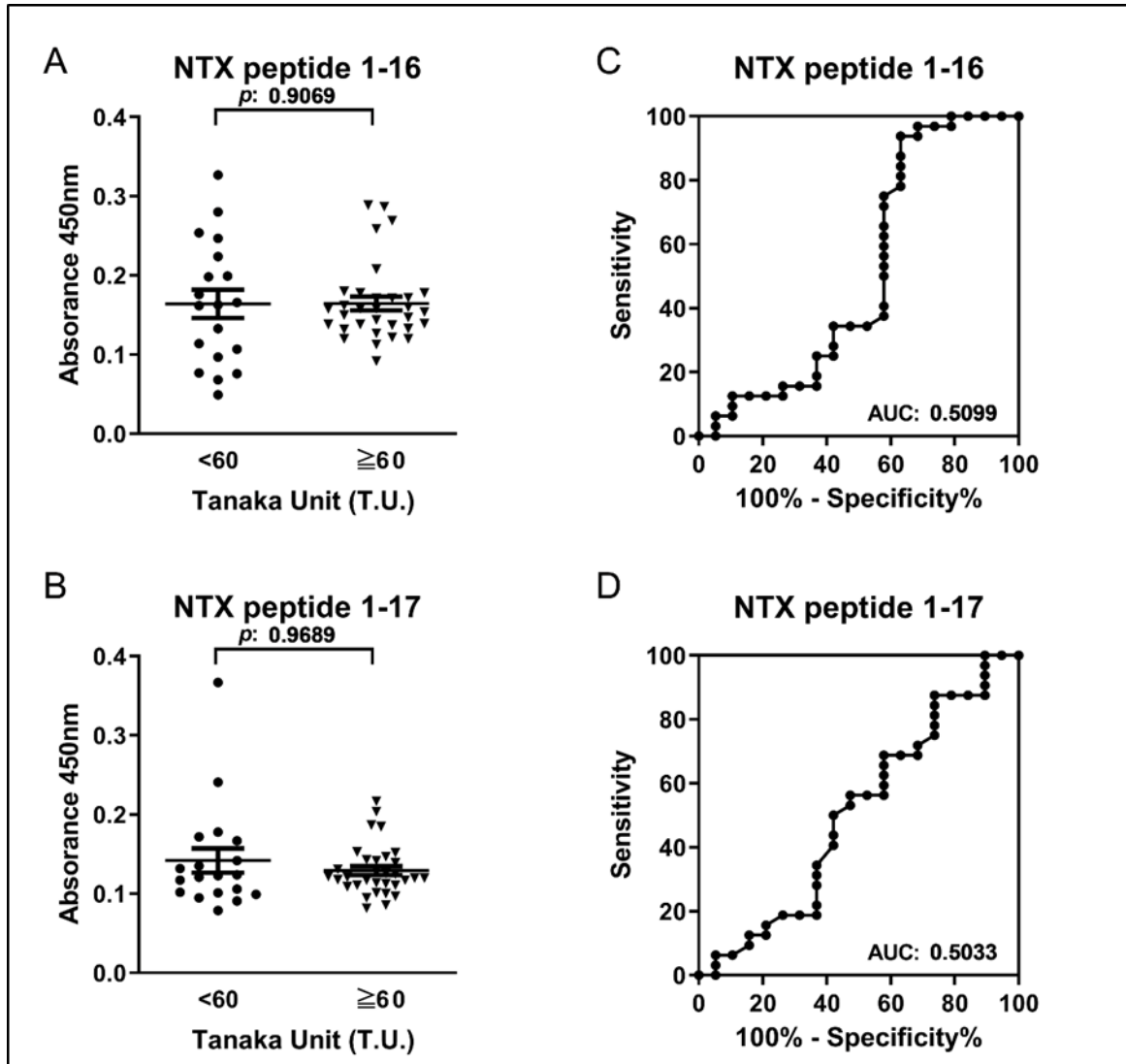


圖二十七：NTX1-10、1-11 和 1-12 之垂直散布圖和 ROC 曲線。



圖二十八：NTX1-13、1-14 和 1-15 之垂直散布圖和 ROC 曲線。





圖二十九：NTX1-16 和 1-17 之垂直散布圖和 ROC 曲線。

## 八、表次

表一：反向高效液相層析儀之 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(%)        |
|-----------|----------------------------|-----------------|
| time(min) | 0.1%TFA/ddH <sub>2</sub> O | 0.1%TFA/100%ACN |
| 0         | 95                         | 5               |
| 3         | 95                         | 5               |
| 5         | 90                         | 10              |
| 11        | 84                         | 16              |
| 15        | 72                         | 28              |
| 47        | 59                         | 41              |
| 52        | 48                         | 52              |
| 55        | 20                         | 80              |
| 56        | 0                          | 100             |
| 57        | 0                          | 100             |
| 59        | 95                         | 5               |
| 60        | 95                         | 5               |

表二、膠體內蛋白水解之身分鑑定

| Protein fraction | Accession | Description  | Coverage | Peptides | MW [kDa] |
|------------------|-----------|--|----------|----------|----------|
| 1                | P60770    | Cobrotoxin   | 27.71    | 4        | 9.3      |
| 2                | P00598    | Acidic phospholipase A2 1                                | 76.03    | 11       | 16.0     |
|                  | A4FS04    | Acidic phospholipase A2 natratoxin                       | 67.23    | 9        | 13.2     |
| 3                | P60304    | Cytotoxin 1  | 71.6     | 12       | 9.0      |
|                  | P80245    | Cytotoxin 6  | 71.6     | 12       | 9.0      |
|                  | P60301    | Cytotoxin 3  | 71.6     | 13       | 9.0      |
|                  | P01442    | Cytotoxin 2  | 71.6     | 13       | 9.0      |
|                  | P01443    | Cytotoxin 4  | 71.6     | 13       | 9.1      |
|                  | P07525    | Cytotoxin 5  | 96.67    | 13       | 6.8      |
|                  | Q98956    | Cytotoxin 1b   | 71.6     | 8        | 8.9      |
| 4                | Q7T1K6    | Cysteine-rich venom protein natrin-1                     | 82.01    | 17       | 26.9     |
| 5                | D3TTC2    | Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin          | 47.31    | 34       | 69.1     |
|                  | D3TTC1    | Zinc metalloproteinase-disintegrin-like kaouthiagin-like | 41.15    | 30       | 66.2     |
|                  | D6PXE8    | Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atrase-B         | 42.5     | 28       | 66.2     |

表三、眼鏡蛇毒蛋白各成分之濃度與總量

|       | conc.(mg/ml) | volume( $\mu$ l) | total (mg) |
|-------|--------------|------------------|------------|
| NTX   | 5.324        | 500              | 2.66       |
| PLA2  | 3.87         | 500              | 1.94       |
| CTX   | 14.554       | 500              | 7.28       |
| CRISP | 1.126        | 500              | 0.56       |
| SVMP  | 0.484        | 500              | 0.24       |

表四、Cytotoxin 蛋白家族經篩選所產生的胜肽片段

| Cytotoxin 1     |              | Cytotoxin 2     |              | Cytotoxin 3     |              |
|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| sequence        | name         | sequence        | name         | sequence        | name         |
| LKCNKLIPIASKTCP | P60304.1~15  | LKCNKLVPLFYKTCP | P01442.1~15  | LKCNKLVPLFYKTCP | P60301.1~15  |
| NKLIPIASKTCPAGK | P60304.4~18  | NKLVPLFYKTCPAGK | P01442.4~18  | NKLVPLFYKTCPAGK | P60301.4~18  |
| IPIASKTCPAGKNLC | P60304.7~21  | VPLFYKTCPAGKNLC | P01442.7~21  | VPLFYKTCPAGKNLC | P60301.7~21  |
| ASKTCPAGKNLCYKM | P60304.10~24 | FYKTCPAGKNLCYKM | P01442.10~24 | FYKTCPAGKNLCYKM | P60301.10~24 |
| TCPAGKNLCYKMFMM | P60304.13~27 | TCPAGKNLCYKMFMV | P01442.13~27 | TCPAGKNLCYKMFMV | P60301.13~27 |
| AGKNLCYKMFMMSDL | P60304.16~30 | AGKNLCYKMFMVSNL | P01442.16~30 | AGKNLCYKMFMVATP | P60301.16~30 |
| NLCYKMFMMSDLTIP | P60304.19~33 | NLCYKMFMVSNLTVP | P01442.19~33 | NLCYKMFMVATPKVP | P60301.19~33 |
| YKMFMMSDLTIPVKR | P60304.22~36 | YKMFMVSNLTVPVKR | P01442.22~36 | YKMFMVATPKVPVKR | P60301.22~36 |
| FMMSDLTIPVKGCI  | P60304.25~39 | FMVSNLTVPVKRGCI | P01442.25~39 | FMVATPKVPVKGCI  | P60301.25~39 |
| SDLTIPVKGRCIDVC | P60304.28~42 | SNLTVPVKRCIDVC  | P01442.28~42 | ATPKVPVKGRCIDVC | P60301.28~42 |
| TIPVKGRCIDVCPKN | P60304.31~45 | TVPVKGRCIDVCPKN | P01442.31~45 | KVPVKGRCIDVCPKS | P60301.31~45 |
| VKRCIDVCPKNSLL  | P60304.34~48 | VKRCIDVCPKNSAL  | P01442.34~48 | VKRCIDVCPKSSLL  | P60301.34~48 |
| GCIDVCPKNSLLVKY | P60304.37~51 | GCIDVCPKNSALVKY | P01442.37~51 | GCIDVCPKSSLLVKY | P60301.37~51 |
| DVCPKNSLLVKYVCC | P60304.40~54 | DVCPKNSALVKYVCC | P01442.40~54 | DVCPKSSLLVKYVCC | P60301.40~54 |
| PKNSLLVKYVCCNTD | P60304.43~57 | PKNSALVKYVCCNTD | P01442.43~57 | PKSSLLVKYVCCNTD | P60301.43~57 |
| SLLVKYVCCNTDRCN | P60304.46~60 | SALVKYVCCNTDRCN | P01442.46~60 | SLLVKYVCCNTDRCN | P60301.46~60 |
| Cytotoxin 4     |              | Cytotoxin 5     |              | Cytotoxin 6     |              |
| sequence        | name         | sequence        | name         | sequence        | name         |
| RKCNKLVPLFYKTCP | P01443.1~15  | LKCNKLVPLFYKTCP | P07525.1~15  | LKCNQLIPPFYKTCA | P80245.1~15  |

|                 |              |                 |              |                 |              |
|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| NKLVPLFYKTCPAGK | P01443.4~18  | NKLVPLFYKTCPAGK | P07525.4~18  | NQLIPPFYKTCAAGK | P80245.4~18  |
| VPLFYKTCPAGKNLC | P01443.7~21  | VPLFYKTCPAGKNLC | P07525.7~21  | IPPFYKTCAAGKNLC | P80245.7~21  |
| FYKTCPAGKNLCYKM | P01443.10~24 | FYKTCPAGKNLCYKM | P07525.10~24 | FYKTCAAGKNLCYKM | P80245.10~24 |
| TCPAGKNLCYKMFVM | P01443.13~27 | TCPAGKNLCYKMFVM | P07525.13~27 | TCAAGKNLCYKMFVM | P80245.13~27 |
| AGKNLCYKMFMVSNL | P01443.16~30 | AGKNLCYKMFMVSNK | P07525.16~30 | AGKNLCYKMFMVAAP | P80245.16~30 |
| NLCYKMFMVSNLTVP | P01443.19~33 | NLCYKMFMVSNKMVP | P07525.19~33 | NLCYKMFMVAAPKVP | P80245.19~33 |
| YKMFMVSNLTVPVKR | P01443.22~36 | YKMFMVSNKMVPVKR | P07525.22~36 | YKMFMVAAPKVPVKR | P80245.22~36 |
| FMVSNLTVPVKRGCI | P01443.25~39 | FMVSNKMVPVKRGCI | P07525.25~39 | FMVAAPKVPVKRGCI | P80245.25~39 |
| SNLTVPVKRGCIDVC | P01443.28~42 | SNKMVPVKRGCIDVC | P07525.28~42 | AAPKVPVKRGCIDVC | P80245.28~42 |
| TVPVKRGCIDVCPKN | P01443.31~45 | MVPVKRGCIDVCPKS | P07525.31~45 | KVPVKRGCIDVCPKS | P80245.31~45 |
| VKRGCIDVCPKNSAL | P01443.34~48 | VKRGCIDVCPKSSLL | P07525.34~48 | VKRGCIDVCPKSSLL | P80245.34~48 |
| GCIDVCPKNSALVKY | P01443.37~51 | GCIDVCPKSSLLVKY | P07525.37~51 | GCIDVCPKSSLLVKY | P80245.37~51 |
| DVCPKNSALVKYVCC | P01443.40~54 | DVCPKSSLLVKYVCC | P07525.40~54 | DVCPKSSLLVKYVCC | P80245.40~54 |
| PKNSALVKYVCCNTD | P01443.43~57 | PKSSLLVKYVCCNTD | P07525.43~57 | PKSSLLVKYVCCNTD | P80245.43~57 |
| SALVKYVCCNTDRCN | P01443.46~60 | SLLVKYVCCNTDRCN | P07525.46~60 | SLLVKYVCCNTDRCN | P80245.46~60 |

表五、Cytotoxin 家族蛋白經篩選所產生的 59 段胜肽片段

| peptide name | sequence         | derived from |       |       |       |       |       | position |     |
|--------------|------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|-----|
|              |                  | CTX 1        | CTX 2 | CTX 3 | CTX 4 | CTX 5 | CTX 6 | start    | end |
| CTX_1-1      | AAPKVPVKRGCIDVC  |              |       |       |       |       | v     | 28       | 42  |
| CTX_1-2      | AGKNLCYKMFMMSDL  | v            |       |       |       |       |       | 16       | 30  |
| CTX_1-3      | AGKNLCYKMFMVAAAP |              |       |       |       |       | v     | 16       | 30  |
| CTX_1-4      | AGKNLCYKMFMVATP  |              |       | v     |       |       |       | 16       | 30  |
| CTX_1-5      | AGKNLCYKMFMVSNK  |              |       |       |       | v     |       | 16       | 30  |
| CTX_1-6      | ASKTCPAGKNLCYKM  | v            |       |       |       |       |       | 10       | 24  |
| CTX_1-7      | ATPKVPVKRGCIDVC  |              |       | v     |       |       |       | 28       | 42  |
| CTX_1-8      | DVCPKNSLLVKYVCC  | v            |       |       |       |       |       | 40       | 54  |
| CTX_1-9      | FMMSDLTIPVKRGC   | v            |       |       |       |       |       | 25       | 39  |
| CTX_1-10     | FMVAAPKVPVKRGC   |              |       |       |       |       | v     | 25       | 39  |
| CTX_1-11     | FMVATPKVPVKRGC   |              |       | v     |       |       |       | 25       | 39  |
| CTX_1-12     | FMVSNKMVPVKRGC   |              |       |       |       | v     |       | 25       | 39  |
| CTX_1-13     | FYKTCAAGKNLCYKM  |              |       |       |       |       | v     | 10       | 24  |
| CTX_1-14     | GCIDVCPKNSLLVKY  | v            |       |       |       |       |       | 37       | 51  |
| CTX_1-15     | IPIASKTCPAGKNLC  | v            |       |       |       |       |       | 7        | 21  |
| CTX_1-16     | IPPFYKTCAAGKNLC  |              |       |       |       |       | v     | 7        | 21  |
| CTX_1-17     | LKCNKLIPIASKTCP  | v            |       |       |       |       |       | 1        | 15  |
| CTX_1-18     | LKCNQLIPPFYKTCA  |              |       |       |       |       | v     | 1        | 15  |
| CTX_1-19     | MVPVKRGCIDVCPKS  |              |       |       |       | v     |       | 31       | 45  |

|          |                  |   |   |   |    |    |
|----------|------------------|---|---|---|----|----|
| CTX_1-20 | NKLIPIASKTCPAGK  | v |   |   | 4  | 18 |
| CTX_1-21 | NLCYKMFMMSDLTIP  | v |   |   | 19 | 33 |
| CTX_1-22 | NLCYKMFMVAAAPKVP |   |   | v | 19 | 33 |
| CTX_1-23 | NLCYKMFMVATPKVP  |   | v |   | 19 | 33 |
| CTX_1-24 | NLCYKMFMVSNKMVP  |   |   | v | 19 | 33 |
| CTX_1-25 | NQLIPPFYKTCAAGK  |   |   | v | 4  | 18 |
| CTX_1-26 | PKNSLLVKYVCCNTD  | v |   |   | 43 | 57 |
| CTX_1-27 | RKCNKLVPLFYKTCP  |   |   | v | 1  | 15 |
| CTX_1-28 | SDLTIPVKRGCIDVC  | v |   |   | 28 | 42 |
| CTX_1-29 | SNKMVPVKRGCIDVC  |   |   | v | 28 | 42 |
| CTX_1-30 | TCAAGKNLCYKMFMV  |   |   | v | 13 | 27 |
| CTX_1-31 | TCPAGKNLCYKMFMM  | v |   |   | 13 | 27 |
| CTX_1-32 | TIPVKRGCIDVCPKN  | v |   |   | 31 | 45 |
| CTX_1-33 | VKRGCIDVCPKNSLL  | v |   |   | 34 | 48 |
| CTX_1-34 | YKMFMMSDLTIPVKR  | v |   |   | 22 | 36 |
| CTX_1-35 | YKMFMVAAAPKVPVKR |   |   | v | 22 | 36 |
| CTX_1-36 | YKMFMVATPKVPVKR  |   | v |   | 22 | 36 |
| CTX_1-37 | YKMFMVSNKMVPVKR  |   |   | v | 22 | 36 |
| CTX_2-1  | AGKNLCYKMFMVSNL  |   | v | v | 16 | 30 |
| CTX_2-2  | DVCPKNSALVKYVCC  |   | v | v | 40 | 54 |
| CTX_2-3  | FMVSNLTVPVKRGCI  |   | v | v | 25 | 39 |
| CTX_2-4  | GCIDVCPKNSALVKY  |   | v | v | 37 | 51 |
| CTX_2-5  | KVPVKRGCIDVCPKS  |   |   | v | 31 | 45 |



|          |                 |   |  |   |   |    |    |
|----------|-----------------|---|--|---|---|----|----|
| CTX_2-6  | NLCYKMFVSNLTV   | v |  | v |   | 19 | 33 |
| CTX_2-7  | PKNSALVKYVCCNTD | v |  | v |   | 43 | 57 |
| CTX_2-8  | SALVKYVCCNTDRCN | v |  | v |   | 46 | 60 |
| CTX_2-9  | SNLTVPVKRGCIDVC | v |  | v |   | 28 | 42 |
| CTX_2-10 | TVPVKRGCIDVCPKN | v |  | v |   | 31 | 45 |
| CTX_2-11 | VKRGCIDVCPKNSAL | v |  | v |   | 34 | 48 |
| CTX_2-12 | YKMFVSNLTVPVKR  | v |  | v |   | 22 | 36 |
| CTX_3-1  | DVCPKSSLLVKYVCC |   |  | v | v | 40 | 54 |
| CTX_3-2  | GCIDVCPKSSLLVKY |   |  | v | v | 37 | 51 |
| CTX_3-3  | LKCNKLVPLFYKTCP | v |  | v |   | 1  | 15 |
| CTX_3-4  | PKSSLLVKYVCCNTD |   |  | v | v | 43 | 57 |
| CTX_3-5  | VKRGCIDVCPKSSLL |   |  | v | v | 34 | 48 |
| CTX_4-1  | FYKTCPAGKNLCYKM | v |  | v | v | 10 | 24 |
| CTX_4-2  | NKLVPLFYKTCPAGK | v |  | v | v | 4  | 18 |
| CTX_4-3  | SLLVKYVCCNTDRCN | v |  | v | v | 46 | 60 |
| CTX_4-4  | TCPAGKNLCYKMFV  | v |  | v | v | 13 | 27 |
| CTX_4-5  | VPLFYKTCPAGKNLC | v |  | v | v | 7  | 21 |

表六、Neurotoxin 蛋白經篩選所產生的 17 段胜肽片段

| peptide name | sequence         | derived from<br>NTX | position |     |
|--------------|------------------|---------------------|----------|-----|
|              |                  |                     | start    | end |
| NTX_1-1      | LECHNQQSSQTPTTT  | v                   | 1        | 15  |
| NTX_1-2      | HNQQSSQTPTTTGCS  | v                   | 4        | 18  |
| NTX_1-3      | QSSQTPTTTGCSGGE  | v                   | 7        | 21  |
| NTX_1-4      | QTPTTTGCSGGETNC  | v                   | 10       | 24  |
| NTX_1-5      | TTTGCSGGETNCYKK  | v                   | 13       | 27  |
| NTX_1-6      | GCSGGETNCYKKRWR  | v                   | 16       | 30  |
| NTX_1-7      | GGETNCYKKRWRDHR  | v                   | 19       | 33  |
| NTX_1-8      | TNCYKKRWRDHRGYR  | v                   | 22       | 36  |
| NTX_1-9      | YKKRWRDHRGYRTER  | v                   | 25       | 39  |
| NTX_1-10     | RWRDHRGYRTERGCG  | v                   | 28       | 42  |
| NTX_1-11     | DHRGYRTERGCGCPS  | v                   | 31       | 45  |
| NTX_1-12     | GYRTERGCGCPSVKN  | v                   | 34       | 48  |
| NTX_1-13     | TERGCGCPSVKNNGIE | v                   | 37       | 51  |
| NTX_1-14     | GCGCPSVKNNGIEINC | v                   | 40       | 54  |
| NTX_1-15     | CPSVKNNGIEINCCTT | v                   | 43       | 57  |
| NTX_1-16     | VKNNGIEINCCTTDRC | v                   | 46       | 60  |
| NTX_1-17     | GIEINCCTTDRCNN   | v                   | 49       | 62  |

表七、3 段控制組胜肽

| peptide name | sequence         |
|--------------|------------------|
| Control-1    | DFGLATVKSRWSGC   |
| Control-2    | LVVVGAGGVGKSAC   |
| Control-3    | DDNEDGFIADSDIISR |

表八：51 個已知效價之馬血漿樣品

| 馬匹編號-抽血日    | 效價         | 馬匹編號-抽血日    | 效價        |
|-------------|------------|-------------|-----------|
| 351-1071113 | <20        | 401-1090303 | <20       |
| 354-1071127 | >100       | 401-1090331 | <20       |
| 354-1071211 | >140       | 406-1070417 | 40-60     |
| 354-1080507 | >100       | 406-1070626 | 40-60     |
| 354-1080521 | >100       | 407-1070417 | >100      |
| 354-1081022 | >80        | 407-1080423 | 100       |
| 354-1081105 | >80        | 407-1080507 | 100       |
| 354-1090317 | <60        | 407-1080521 | 100       |
| 354-1090331 | >100       | 407-1081022 | >80       |
| 354-1090414 | >120       | 407-1081105 | >80       |
| 354-1090428 | >160       | 407-1090317 | <40       |
| 354-1090512 | ≤ 120      | 407-1090331 | <80 / >60 |
| 354-1090526 | <100 / >60 | 407-1090414 | 120       |

|             |            |             |           |
|-------------|------------|-------------|-----------|
| 356-1080423 | 60         | 407-1090428 | 120       |
| 356-1080521 | 80         | 407-1090512 | 80        |
| 356-1081022 | >60        | 407-1090526 | 60        |
| 356-1081105 | $\leq 40$  | 418-1081230 | <40       |
| 356-1090317 | <20        | 418-1090204 | $\leq 40$ |
| 356-1090331 | <60        | 418-1090303 | <20       |
| 356-1090414 | 80-100     | 418-1090331 | <20       |
| 356-1090428 | <100 / >60 | 420-1081230 | 40        |
| 356-1090512 | 60         | 420-1090114 | $\leq 40$ |
| 356-1090526 | <40        | 420-1090204 | 60-80     |
| 366-1071113 | 80         | 420-1090303 | >80       |
| 401-1081230 | <40        | 420-1090317 | 100       |
| 401-1090204 | $\leq 40$  |             |           |

---

表九：小鼠試驗之對照組藥品配製：

| 5 mg/vial(檢定毒)+22ml(PBS)=0.23mg/ml (甲：4MLD) |         |                 |        |
|---|---------|-----------------|--------|
| 甲 (mL)                                      | PBS(mL) | 單位蛇毒量(mg/ml)/組別 | MLD 倍數 |
| 0.3   | 0.5     | 0.085/乙         | 1.50   |
| 0.2   | 0.6     | 0.057/丙         | 1.00   |
| 0.2   | 0.8     | 0.045/丁         | 0.80   |
| 0.1   | 0.7     | 0.028/戊         | 0.50   |

表十：小鼠試驗之對照組

| 組別 | 動物死亡存活結果 | 判定結果 |
|----|----------|------|
|    | 觀察 24 小時 |      |
| 乙  | DDD      | 適    |
| 丙  | DDD      | 適    |
| 丁  | DDD      | 適    |
| 戊  | SSS      | 適    |

表十一：小鼠試驗結果之力價判定依據

| 組別         | 小鼠存活與否 |     |     |     |
|------------|--------|-----|-----|-----|
|            | DDD    | DDS | DSS | SSS |
| C          |        |     |     |     |
| 判讀效價(T.U.) | <60    |     | ≥60 |     |

\*D: Death, S: Survival

表十二：15 個馬血漿樣品進行小鼠試驗之結果

| 檢體編號          | 組別 | 動物死亡存活結果 | 力價判定結果(T.U.) |       |
|---------------|----|----------|--------------|-------|
|               |    | 觀察 24 小時 | 實驗室          | 疾管署   |
| BC354-1081022 | C  | SSS      | ≥60          | >80   |
| BC354-1081105 | C  | SSS      | ≥60          | >80   |
| BC354-1090317 | C  | DDD      | <60          | <60   |
| BC354-1090331 | C  | SSS      | ≥60          | >100  |
| BC356-1081022 | C  | SSS      | ≥60          | >60   |
| BC356-1081105 | C  | DDD      | <60          | ≤40   |
| BC356-1090317 | C  | DDD      | <60          | <20   |
| BC406-1070417 | C  | DDS      | <60          | 40-60 |
| BC406-1070626 | C  | DDS      | <60          | 40-60 |
| BC407-1070417 | C  | SSS      | ≥60          | >100  |
| BC407-1081022 | C  | SSS      | ≥60          | >80   |
| BC407-1081105 | C  | SSS      | ≥60          | >80   |
| BC407-1090317 | C  | DDD      | <60          | <40   |
| BC420-1081230 | C  | DDD      | <60          | 40    |
| BC420-1090114 | C  | DDD      | <60          | ≤40   |

### 參、經費支用情形

| 項目  | 本年度核定金額 | 支用狀況                       |
|-----|---------|----------------------------|
| 人事費 | 478,400 | 依人事成本支出(109年1月至10月)，已使用82% |
| 業務費 | 846,200 | 已使用90%                     |
| 管理費 | 193,800 | 已使用0%(待計畫總期程結束後由校方一併收取)    |
|     |         |                            |
|     |         |                            |