

計畫編號：DOH98-DC-2001

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

開發抗龜殼花及赤尾鯛蛇毒雙價 IgY 抗體並建立  
ELISA 分析方法確效檢測其效價

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：江正榮

研究人員：李政道、楊素鈴、李國銘、楊尚樺、張靜如、莊佩珊

執行期間：98 年 1 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

## 目 錄

## 頁 碼

封面	(1)
目錄	(2)
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
前言	(5)
材料與方法	(10)
結果	(15)
討論	(23)
參考文獻	(25)
期末報告審查委員意見回覆	(28)

## 中文摘要

本局血清疫苗研製中心利用鴨子蛋黃精製純化所得之抗蛇毒免疫球蛋白(yolk immunglobulin : IgY)，已成功生產出高效價之單價抗飯匙倩、單價抗雨傘節和雙價抗雨傘節與抗飯匙倩IgY抗體且生產成本較低，所以本計畫的目的是利用已建立之方法來解決目前免疫馬匹龜殼花蛇毒無法達到高效價的瓶頸，進而發展出抗龜殼花及赤尾鮀蛇毒雙價IgY抗體。免疫結果發現龜殼花免疫後第10週達到最高點，為320田中單位。至於赤尾鮀蛇毒免疫第8週開始，第12週開始中和效價高於60田中單位(約207田中單位)，第24周達到最高點，為383田中單位。另為確定ELISA檢測系統可為快速篩選抗體機制時使用，並希望可作為動物抗體中和測定法和產程監測在建立產程檢驗系統方面的一項重要輔助工具，此次實驗亦完成了分析方法之確效：分析方法準確度之回收率和精密度分別可達90-115%和90%以上；線性的相關係數可達0.9以上；龜殼花LOD和LOQ分別為0.319和0.958；赤尾鮀LOD和LOQ分別為0.311和0.932。

關鍵字：抗蛇毒免疫球蛋白、硫酸銨沉澱法、龜殼花蛇毒、赤尾鮀蛇毒、雙向免疫擴散試驗、西方墨點法、動物中和測定、酵素連結免疫反應測定法

## Abstract

Recently, Vaccine Center has developed anti-Cobra monovalent venom, anti-Banded Krait monovalent venom and anti-Cobra-Banded Krait bivalent venom by using purified duck yolk immunoglobulin (IgY) with low cost benefit. In this study, we propose to use this technology to overcome the challenge of low neutralizing titer horse-derived *Trimeresurus mucrosquamatus* and *Trimeresurus gramineus stejnegeri* bivalent anti-venom. According to the immunization result, neutralization effect of duck anti-sera against *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom can reach the highest titer (320 Tanaka unit) at 10<sup>th</sup> week. In addition, after immunized the same duck with *Trimeresurus gramineus stejnegeri* snake venom at 8<sup>th</sup>, neutralization effect can be induce over 60 Tanaka unit at 12<sup>th</sup> week and reach the highest titer (383 Tanaka unit) at 24<sup>th</sup> week. Moreover, ELISA analysis system was confirmed that can be used for quick screening of antibody response and can be played as a critical auxiliary tool in neutralization assay and in-process monitoring. Analytical method validation was completed in this study, and its recovery rate and precision can reach 90-115% and over 90% respectively; Correlation coefficient of linearity can reach over 0.9; LOD and LOQ of *Trimeresurus mucrosquamatus* and *Trimeresurus gramineus stejnegeri* venom are 0.319, 0.958 and 0.311, 0.932 respectively.

Keyword: cobra, IgY, ammonium sulfate precipitation method, *Trimeresurus mucrosquamatus* and the *Trimeresurus mucrosquamatus* venom, Ouchterlony double diffusion, Western blotting, Brad-ford method, ICR mice model, ELISA validated system.

## 前言

毒蛇咬傷屬於急症，最有效的治療方式是注射正確的抗蛇毒血清。目前世界各國抗蛇毒血清之製造多以減毒性蛇毒免疫馬匹，經採血分離出血清，純化精製得之。由於蛇毒具有地域性，以致不同地區之蛇毒有不同的抗原性(antigenic variation)，故抗蛇毒抗體往往由當地自行生產。目前本局利用各種減毒過的蛇毒免疫馬匹後，經採血及硫酸銨鹽沈澱精製等步驟，已生產四種抗蛇毒血清產品，分別為：(1)出血性抗蛇毒血清，可抗龜殼花及赤尾青竹絲，(2)神經性抗蛇毒血清，可抗雨傘節及飯匙倩，(3)抗百步蛇毒血清，(4)抗鎖鏈蛇毒血清，其中抗鎖鏈蛇毒血清產品今年已成功取得藥政處核發製造許可證明書。

毒蛇咬傷的臨床治療以使用的抗蛇毒血清最為有效。治療過程中，一旦馬血清蛋白(horse serum proteins)大量進入人體，經常誘發三種免疫副作用，即(1)補體反應(complement reaction)：馬免疫球蛋白之Fc region結合人體之補體受體所引發的發炎反應；(2)血清病(serum sickness)：大量的抗蛇毒血清蛋白誘發人體產生相對應抗體並形成複合物，而造成發炎、血管炎(vasculitis)、關節炎(arthritis)及腎炎(nephritis)等症狀；(3)過敏性休克(anaphylactic shock)：大量外來抗原引發人體IgE 活化，造成呼吸衰竭等嚴重副作用(1)。另外目前生產抗蛇毒血清所使用馬匹需由國外進口，馬匹單價高，且需要寬闊場地進行飼養管理等工作，每年有關動

物飼養相關費用約需新台幣800 萬元，所以製造每一劑抗蛇毒血清成本至少新台幣7900元。且利用馬匹生產相關血清製劑過程需定期抽血，屬於侵入性的性質，在操作過程中對人員潛藏有極大的危險性。而實驗動物保育問題也日益受重視，因此開發符合經濟性、兼具安全性與有效性之新一代高效價抗蛇毒抗體有其重要性與必要性。

除了馬匹之外，羊亦是生產抗蛇毒血清的主要動物之一，因為照顧羊比馬匹容易且成本較低，但近來由於從羊身上發現傳染性海綿狀腦病愈來愈多，因此限制了其應用性。不僅哺乳類動物免疫抗原後，可產生相對應之抗體，自1990年代以來，已有學者成功從其它的脊椎動物如鴨、雞，被免疫抗原後，亦會產生抗體，除了可在血液中被檢測到外，這些抗體也會傳送到蛋的蛋黃部份，稱之為蛋黃免疫球蛋白(yolkimmunoglobulins，IgY)，若連續施打抗原，相對應之抗體更會高度集中於蛋黃中(2,3)。就製程而言，IgY經由蛋黃中分離出(4)，是一種不需經由採血即可得到的抗體，與抗蛇毒馬血清抗體相較，具有以下的優點：

(一)、安全性：蛋的IgY在結構上與哺乳類IgG相類似，兩者之不同在於後者mRNA選擇性切割(alternative splicing)之緣故，所表現出之免疫球蛋白較一般抗體分子在重鏈部分缺少約60KDa之Fc片段，也因此不易誘發上述之補體反應。

(二)、專一性：鴨子IgY抗體對於哺乳類之IgG血緣關係較遠，故交叉性反應低，鴨子IgY抗體不會與補體系統、類風濕因子和蛋白質A反應，故更可去除發生偽陽性的機率。所以可建立靈敏、準確及檢測範圍寬廣的檢驗系統，進而提昇準確度。

(三)、易生產：禽類產蛋率高，且可經由蛋黃中輕易分離純化出(5,6)，據統計一隻雞每個月可生產的IgY約為兔子的10-20倍。

(四)、較人道：因IgY是由蛋黃取得，不是由抽血等侵入性步驟取得，而且European Center for the Validation of Alternative Method也建議使用蛋黃抗體取代哺乳類抗體。

(五)、低成本：鴨隻購買與飼養成本較低，且收取鴨蛋比採血的人需求也較低。

(六)、安定性高：已有文獻報告指出IgY若以液態形式儲存於4°C中，其安定性可達十年之久。

由目前IgY 抗體相關的運用研究的文獻得知，被動免疫之實驗動物所分離出之IgY 可對抗 rotavirus(7,8,9) 、Enterotoxigenic E. coli (10,11)、Helicobacter pylori (12,13)的感染，Motoi (2005) 等人以狂犬病毒的重組蛋白免疫母雞，將得到的IgY 抗體與狂犬病毒對BALB/c 小鼠進行中和效價試驗，結果發現80IU/kg 劑量的抗體對75% 的小鼠有保護效價，130IU/kg 劑量的抗體則對所有的小鼠皆有保護效價(14)，此外，

IgY抗體亦可中和有毒動物之毒素，如Thalley(1990)等人以響尾蛇蛇毒及黃蠍毒液免疫母雞，動物實驗結果得知IgY 抗體具有良好的中和效價(15)，Devi (2002) 等人以0.6 mg 的鎖鏈蛇蛇毒免疫母雞，於第12-90天間每顆蛋可純化出約75-100 mg的IgY抗體，且具有高度專一性與免疫活性(16)，Almeida(1998)等人以巴西的金矛頭蝮蛇毒和響尾蛇毒免疫來亨雞後，發現純化出的IgY抗體可以遮蔽住的phospholipase A2以阻止出血，且1 ml的抗體分別可中和0.0675 mg的金矛頭蝮蛇毒及0.075 mg的響尾蛇毒(2)。另有非正式文獻指出，以響尾蛇蛇毒及青竹絲蛇毒免疫母雞，所純化出之IgY 抗體的中和毒素效價比馬血清好6.3倍及2倍。目前澳洲的Antiven 公司正在進行Pseudonaja nuchalis、Pseudonajaaffinis、Pseudonaja inframacula三種蛇毒IgY抗體的測試，並已於2004年中申請核准動物用抗東部擬眼鏡蛇IgY抗體產品上市。

日前本局血清疫苗研製中心以飯匙倩與雨傘節蛇毒為免疫抗原，鴨子為免疫動物，已成功生產抗飯匙倩和抗雨傘節單價或雙價IgY抗體且具備高中和抗體效價。依據95年本中心自行研究計畫「開發以鴨蛋生產抗飯匙倩及抗雨傘節多價IgY 抗體（II）」結果發現，利用馬生產6000劑抗飯匙倩與雨傘節多價馬血清為基準，一匹馬每年飼養成本約180萬元，如果利用鴨子生產抗蛇毒IgY抗體，每隻鴨子收取第6至32週的蛋，大約可收180顆蛋，分別單獨生產抗飯匙倩蛇毒及抗雨傘節蛇毒抗體初步可節

省約85% 的經費。本局血清疫苗研製中心所飼養馬批生產之抗龜殼花及赤尾鯇雙價血清，常久以來，一直無法從馬匹獲得高效價之抗龜殼花血清，令人擔憂將會供不過於市面上需求，為避免屆時市場供應失調造成無謂傷亡，加上考量成本與人員安全等因素，本計畫將開發抗龜殼花及赤尾鯇蛇毒(出血性)雙價IgY抗體量產產程技術，期待能藉決上述問題並節省成本，達成開發品質更佳的抗蛇毒生物製劑產品的目標。

## 材料與方法

一、蛇毒抗原之製備：於免疫前一天以0.1M pH6.8 之PBS將龜殼花蛇毒或赤尾鯇蛇毒配製成1% 溶液，慢慢滴入2.5% 戊乙醛(glutaraldehyde；GA)，使蛇毒含有GA 之最終濃度為0.25%，充分混合1小時後，使其呈現乳白色膠狀即可，並置於4°C 中過夜。

二、實驗鴨：由畜產試驗所宜蘭分所，改良繁殖之二品種改鴨(俗稱大改鴨)，鴨隻出生後第150天開始產蛋，可連續產蛋6~8個月，一隻鴨在一年內約產250-280顆鴨蛋。在進行免疫前，先收集IgY抗體及採血2ml做為實驗對照組。

三、建立抗龜殼花及赤尾鯇IgY抗體鴨子免疫模式：參考馬匹免疫模式，先先使用無毒化之龜殼花蛇毒，每兩週基礎免疫鴨子一次，並於第八週基礎免疫時，同時以無毒化之赤尾鯇蛇毒免疫，之後每隔兩週同時以兩種蛇毒進行一次補強免疫，免疫三隻鴨子，基本於免疫隔週採蛋，另外取血清以ELISA測定抗體效價，並根據ELISA結果，取較大量的IgY抗體進行動物中和試驗，檢測效價。免疫模式如下表

週數	0	2	4	6	8	10	11	12	14	16	17	18	19	20	22	24	25	26	28	30	31
龜殼花蛇毒(mg)	3	5	8	12	3	3	—	3	3	3	—	3	—	3	3	—	—	3	3	—	
赤尾鯇蛇毒(mg)	—	—	—	—	0.5	1	—	1.5	2	2	—	2	—	3	3	3	—	2	2	—	
IgY純化	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	
血清收集	✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓		✓		✓		x		x			x	

四、鴨蛋收取時程：使用蛋白蛋黃分離器將蛋黃分離出來。一顆鴨蛋重約60-70 mg，蛋黃體積約15~20 ml。平均每顆蛋分離出IgY 與IgY $\Delta$ Fc 總量比，免疫前：IgY : IgY $\Delta$ Fc=1:1，免疫後IgY : IgY $\Delta$ Fc=1 : 3。而樣品為IgY時內含有的IgY $\Delta$ Fc約為40%，而樣品為IgY $\Delta$ Fc時內含有的IgY $\Delta$ Fc約為95%以上。

五、多價IgY 抗體純化(17,18,19,20)：近年來以polyethylene glycol (PEG) 及沉澱法水稀釋法(water dilution method ; WD )萃取IgY的成本最低、回收率最佳。依據本中心94年及95年自行研究計畫之純化成果，持續使用硫酸銨沈澱法進行多價IgY抗體純化，方法如下：蛋黃及蛋白分離→蛋黃水解→抗體吸附→抗體溶出→鹽析→透析→測定→濃縮。

六、IgY 抗體蛋白質濃度測定：將經硫酸銨沈澱法純化之IgY抗體以Amicon Ultra-15Centrifugal Filter Devices 進行抗體濃縮，再以Bradford reagent 測試抗體蛋白質濃度：先用二次蒸餾水將2 mg/ ml 之Bovine Serum Albumin (BSA) 標準液進行序列稀釋，取測試樣品及標準液各50  $\mu$ l，置入96孔微量盤中，至少3重複。分別加入Bradford reagent 150  $\mu$ l，震盪30秒。以ELISA吸光儀 (Molecular Device, SPECTRA MAX 340pc) 讀取波長595 nm吸光值，以得到蛋白質濃度。

七、分析IgY 抗體對不同蛇毒之專一性：

(1) 使用雙向免疫擴散試驗(Ouchterlony double diffusion)，依形成的抗原-抗體複合物之沈澱線圖，可檢驗IgY 抗體是否對蛇毒具有專一性，其原理為可溶性抗原與已知可溶性抗體分別加入相鄰的瓊脂糖凝膠板上的小孔內，在電解質存在下讓它們相互向對方擴散。當兩者在最適當比例處相遇時，即形成一條清晰的沈澱線。

(2) 以西方墨點法(western blotting )比較IgY 及抗蛇毒馬血清對蛇毒抗原之結合種類，作定性分析。蛇毒蛋白經過蛋白質電泳後，利用Semi-phor半乾式轉移槽，將蛇毒蛋白樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入5%脫脂奶粉溶液於纖維膜上，震盪30 分鐘後以0.1% Tween20/PBS清洗之後加入經過適當稀釋的IgY 抗體及抗蛇毒馬血清於纖維膜上，在37°C 保溫箱中作用2小時，以0.1% Tween 20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之HRPconjugatedgoat anti—mouse IgY抗體，在37°C 恆溫箱中作用1小時，以0.1%Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。將TMB置於纖維膜上，震盪5~10分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

## 八、建立ELISA分析方法確效系統 (21,22)：

(1) 建立ELISA方法:以蛇毒蛋白為黏覆之抗原。首先於96孔微量滴定盤上，黏覆經黏覆緩衝液適當稀釋之純化蛇毒蛋白，4 °C隔夜反應。實驗前使用ELISA 清洗儀，以0.05% Tween20 / PBS (PBST20)清除

未黏覆之抗體3次，然後以1% BSA/PBS 進行Block，37 °C 反應半小時，清洗3次後，加入以PBST 20適當稀釋之待測或對照組抗蛇毒抗體IgY 樣品，放置於37 °C保溫箱中二小時。清洗3 次，再加入兔子抗鴨二次抗體馬山葵過氧化酵素複合體(Rabbit anti-duckIgG HRP)於37 °C保溫箱中反應一小時，清洗3次。最後，在每孔中加入100ml OPD(o-phenylenediamine dihydrochloride)酵素受質體，放置於室溫暗處，呈色反應25分鐘，以ELISA吸光儀讀取波長450 nm及650 nm吸收值。

(2) ELISA分析方法確效其主要工作為①精密度測試②準確性測試③線性範圍測試④最低偵測極限LOD(Limit of detection) ⑤最低偵測定量LOQ(Limit of quantiation)。

#### ①. 建立 ELISA 系統之準確度

準確度代表用該方法所得之分析結果與真值接近之程度。依下式計算其回收率。回收率(%)=[(2 倍混合液濃度)-檢品濃度]/標準品濃度\*100% 。確效指標為其平均回收率(%)範圍應在95%-105%之間。

#### ②. 建立 ELISA 系統之精密度

對 IgY 重複多次進行分析所得結果的再現性，以標準差或相對標準差(relative standard deviation ;RSD)的方式表示。計算 RSD

值，不超過 5%。

③. 建立 ELISA 系統之線性關係

測出分析方法的線性範圍，線性回歸系數( $r^2$ )值必須在 0.95 以上。

④. 建立 ELISA 系統之最低偵測極限 LOD(Limit of detection)

測出分析方法的最低偵測極限濃度。確效指標為 RSD 小於 5% 以下

⑤. 建立 ELISA 系統之低偵測定量 LOQ(Limit of quantitation)

測出分析方法的最低定濃度。確效指標為線性回歸系數( $r^2$ )值必須在 0.95 以上。

九、測定 IgY 中和蛇毒之效價：將 20 mg/ml 之 IgY 抗體以生理食鹽水稀釋為不同濃度後與 4MLD 之蛇毒液混和均勻後，置於 37°C 恒溫箱內反應，靜置作用 1 小時，再以皮下注射體重 12~14 克之 ICR 小鼠，觀察 48 小時，並紀錄動物死亡數目，計算抗體效價。公式為：效價 (MLD/ml)(田中單位)(U) = 4 MLD/0.2 ml × IgY 稀釋倍數。

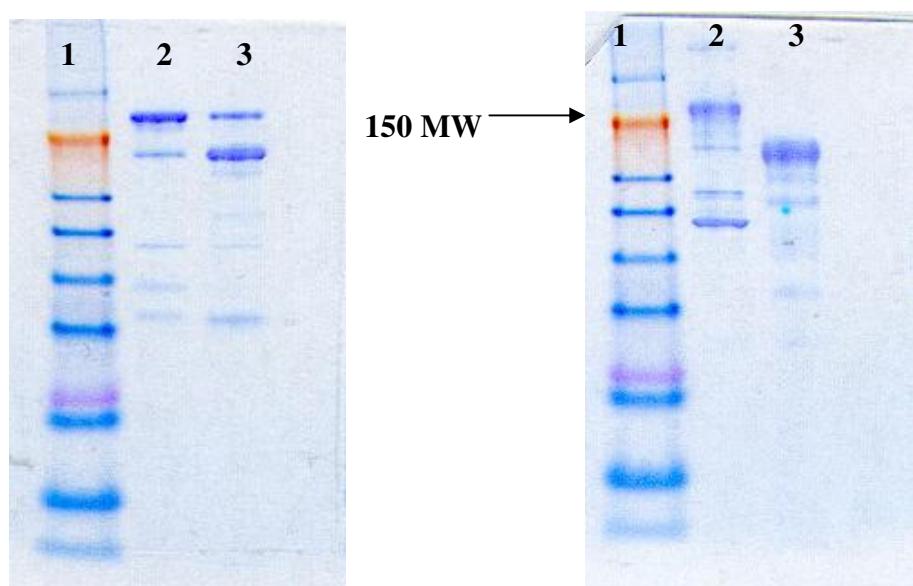
## 結果

### (一) 抗龜殼花及赤尾鯛蛇毒血清、IgY 抗體製備

收集三隻鴨子 0 至 19 週抗龜殼花及赤尾鯛蛇毒雙價之血清與 0 至 31 週之 IgY 抗體。

### (二) 以 SDS-PAGE 與 western blotting 方法偵測硫酸銨沉澱法純化出的 IgY 抗體。

Western blotting



- 1. Marker
- 2. egg yolk protein after salting out
- 3. isolated IgY ( $\Delta$  Fc)

- 1. Marker
- 2. 馬血漿
- 3. 抗毒血清原液

結論：硫酸銨沉澱法可以進一步純化出 IgY ( $\Delta$ Fc) 抗體。

### (三) 以雙向免疫擴散試驗證實其專一性。

#### 1. 雙向免疫擴散試驗(Ouchterlony double diffusion)

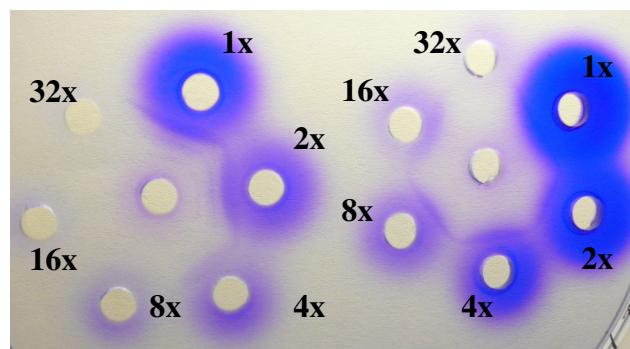
抗龜殼花及赤尾鯇蛇毒雙價 IgY 抗體與馬血清雙向免疫擴散試

驗之比較，龜殼花出現明顯的沉澱線，但是赤尾鯇卻不明顯。結

果仍顯示 IgY 抗體具有其專一性。

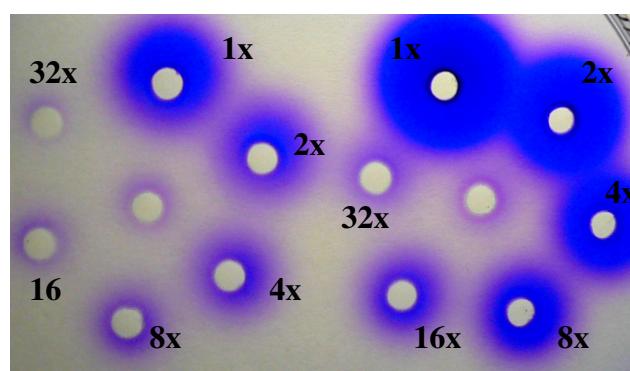
馬血清：1X 為 40 mg/ml，IgY 抗體：1X 為 20.14 mg/ml，

龜殼花 (Ag)：1 mg/ml。



馬血清：1X 為 40 mg/ml，IgY 抗體：1X 為 19.54 mg/ml，

赤尾鯇 (Ag)：1 mg/ml



馬血清

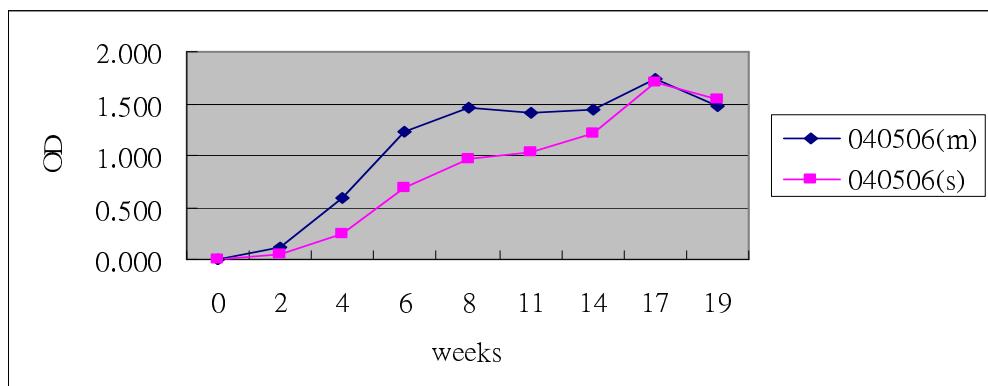
IgY 抗體

#### (四) 以 Brad-ford 方法檢測其 IgY 蛋白質濃度。

初步結論：收集製備的 IgY 可清楚定量蛋白質濃度，每一毫升約有 10-30 mg 蛋白質，大約收集 40mg 進行相關實驗。

#### (五) 以 ELISA 方式檢測鴨子血清中和蛇毒效價

由於鴨子血液不好採集，所以只有採到第 19 週的數據。由龜殼花的結果發現，血清的中和效價於第 8 週達到頂點，的確比蛋（第 10 週）來的早，此結果與 95 年本中心開發生產抗飯匙倩及抗雨傘節多價 IgY 抗體的結果相符合。

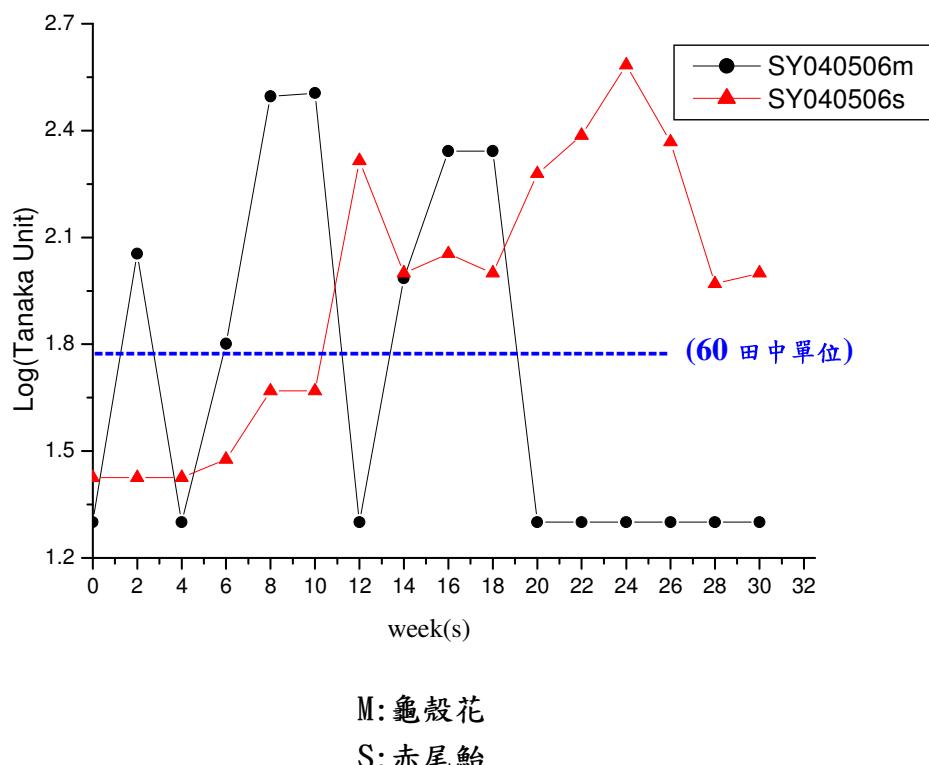


M: 龜殼花

S: 赤尾鯮

(六) ICR mice model 證實抗龜殼花及赤尾鯇蛇毒雙價 IgY 抗體具有其中和蛇毒功能。

龜殼花免疫後第2週其中和力價就達到60田中單位以上，第10週達到最高點，為320田中單位。但不知何故自20週開始降至20田中單位始終無法上升。至於赤尾鯇蛇毒免疫第8週開始，第12週開始中和效價高於60田中單位（約207田中單位），第24周達到最高點，為383田中單位。第25週不免疫且劑量開始降低，效價亦下降，最後維持於100田中單位左右。



## (七) 建立 ELISA 分析方法確效系統：

### (1) ELISA 分析方法準確度之回收率：

準確度代表用該方法所得之分析結果與真值接近之程度。依下式

計算其回收率。回收率(%)=[(2 倍混合液濃度)-檢品濃度]/標準品

濃度\*100% 。

龜殼花		混合 OD <sub>450</sub> 值	Sample OD <sub>450</sub> 值	回收率	%RE
SY04	1	2.020	1.803	97.7	2.3
	2	2.046		99.9	0.1
	3	2.035		99.0	1.0
	4	2.090		103.8	3.8
	5	2.036		99.0	1.0
	6	2.002		96.1	3.9

稀釋 1000 倍的標準品 OD<sub>450</sub> 值 : 2.290

赤尾鮧		混合 OD <sub>450</sub> 值	Sample OD <sub>450</sub> 值	回收率	%RE
SY04	1	1.943	1.660	102.8	2.8
	2	1.962		104.5	4.5
	3	1.946		103.0	3.0
	4	2.010		109.0	9.0
	5	1.993		107.4	7.4
	6	1.851		94.3	5.7

稀釋 1000 倍的標準品 OD<sub>450</sub> 值 : 2.166

初步結論：ELISA 分析方法準確度之回收率可達 90–115%。

### (2) ELISA 分析方法之精密度：

對 IgY 重複多次進行分析所得結果的再現性，以標準差或相對標

準差(relative standard deviation;RSD)的方式表示。

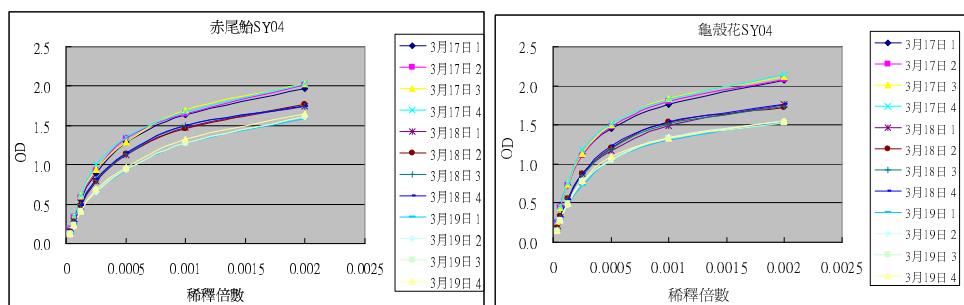
Assay #	Anti-Mucrosquamatus IgY OD <sub>450</sub>		Anti-Gramineus IgY OD <sub>450</sub>	
	龜殼花	SY04	赤尾鯛	SY04
1	1	1.588	1	1.464
	2	1.617	2	1.499
	3	1.607	3	1.496
	4	1.597	4	1.535
	5	1.619	5	1.589
	6	1.603	6	1.555
	Mean	1.605	Mean	1.523
	SD	0.012	SD	0.045
	%CV	0.8	%CV	3.0
2	7	1.599	7	1.563
	8	1.638	8	1.606
	9	1.540	9	1.619
	10	1.545	10	1.612
	11	1.559	11	1.638
	12	1.566	12	1.641
	Mean	1.574	Mean	1.613
	SD	0.037	SD	0.028
	%CV	2.4	%CV	1.8
3	13	1.446	13	1.235
	14	1.412	14	1.277
	15	1.458	15	1.280
	16	1.453	16	1.282
	17	1.464	17	1.308
	18	1.505	18	1.329
	Mean	1.456	Mean	1.285
	SD	0.030	SD	0.032
	%CV	2.1	%CV	2.5
Overall,n=18		Overall,n=18		
	Mean	1.545	Mean	1.474
	SD	0.071	SD	0.146
	%CV	4.6	%CV	9.9

初步結論：根據不同 well 、不同 plate 、不同天所做的實驗結果，如果其 CV 值低，表示其方法之精密度高，本方法其精密度可達 90% 以上。

### (3) ELISA 分析方法之線性的相關係數：

測出分析方法的線性範圍，線性回歸系數( $r^2$ )值必須在 0.95 以上。

龜殼花	稀釋倍 數	3月17日				3月18日				3月19日			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
SY04	0.002	2.071	2.075	2.120	2.144	1.765	1.721	1.733	1.763	1.534	1.555	1.526	1.546
	0.001	1.760	1.794	1.833	1.826	1.493	1.544	1.514	1.542	1.311	1.340	1.327	1.328
	0.0005	1.454	1.484	1.505	1.510	1.172	1.211	1.200	1.229	1.042	1.057	1.042	1.097
	0.00025	1.134	1.104	1.128	1.180	0.871	0.870	0.851	0.869	0.725	0.764	0.778	0.790
	0.00012	0.730	0.723	0.735	0.751	0.554	0.560	0.558	0.544	0.468	0.484	0.488	0.489
	5												
	0.00006	0.463	0.452	0.446	0.460	0.322	0.332	0.321	0.324	0.291	0.287	0.289	0.281
赤尾鮎	0.00003	0.248	0.257	0.248	0.266	0.180	0.187	0.173	0.170	0.139	0.152	0.151	0.146
	125												
赤尾鮎	稀釋倍 數	3月17日				3月18日				3月19日			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
SY04	0.002	1.964	2.011	2.026	2.036	1.745	1.770	1.747	1.739	1.586	1.610	1.612	1.641
	0.001	1.630	1.642	1.697	1.672	1.476	1.465	1.502	1.497	1.274	1.277	1.274	1.319
	0.0005	1.283	1.332	1.291	1.346	1.122	1.136	1.144	1.147	0.923	0.946	0.937	0.963
	0.00025	0.887	0.934	0.935	1.003	0.792	0.793	0.805	0.812	0.666	0.655	0.666	0.689
	0.00012	0.560	0.580	0.601	0.611	0.476	0.484	0.491	0.488	0.406	0.402	0.412	0.412
	5												
	0.00006	0.318	0.340	0.338	0.350	0.281	0.277	0.281	0.277	0.225	0.211	0.235	0.230
赤尾鮎	0.00003	0.174	0.184	0.179	0.186	0.152	0.155	0.153	0.147	0.121	0.117	0.120	0.118
	125												



初步結論：ELISA 分析方法之線性的相關係數可達 0.9 以上

(4) 測出分析方法的最低偵測極限濃度。

確效指標為 RSD 小於 5% 以下。測出分析方法的最低定濃度。確效指標為線性回歸系數( $r^2$ )值必須在 0.95 以上。

龜殼花		SY04		赤尾鯛		SY04	
		SLOPE	R <sup>2</sup>			SLOPE	R <sup>2</sup>
3 月 17 日	1	1.7904	0.9519	3 月 17 日	1	1.9837	0.9403
	2	1.8215	0.9402		2	2.0146	0.9309
	3	2.1512	0.9497		3	2.0411	0.9248
	4	1.8617	0.9551		4	1.6936	0.9417
3 月 18 日	1	1.7781	0.9293	3 月 18 日	1	1.7712	0.9375
	2	1.7844	0.9670		2	1.7836	0.9333
	3	1.7811	0.9624		3	1.7855	0.9465
	4	1.8136	0.9646		4	1.7771	0.9469
3 月 19 日	1	1.5665	0.9565	3 月 19 日	1	1.5725	0.8922
	2	1.5845	0.9492		2	1.5972	0.9025
	3	1.5530	0.9431		3	1.5916	0.8909
	4	1.5744	0.9585		4	1.6294	0.8975
Mean		1.7550	0.9523	Mean		1.7701	0.9238
SD		0.170	0.011	SD		0.167	0.022
%CV		9.7	1.1	%CV		9.4	2.4
LOD		0.319		LOD		0.311	
LOQ		0.958		LOQ		0.932	

初步結論：龜殼花 LOD : 0.319 及 LOQ : 0.958。

赤尾鯛 LOD : 0.311 及 LOQ : 0.932。

## 討 論

IgY目前已成為抗蛇毒血清藥物研製的另一個重要方向，該方向的研究亦成就了抗蛇毒血清在蛇毒診斷、治療等方面的應用奠定了新的理論應用基礎。本局經過多年的努力已成功生產出高效價之單價抗飯匙倩、單價抗雨傘節和雙價抗雨傘節與抗飯匙倩IgY抗體（神經性）且成本較傳統以馬匹生產方式便宜，抗鎖鏈蛇IgY抗體初步亦有不錯的效價，所以決定挑戰目前需求量最高但產程最常遇到困難瓶頸的出血性抗龜殼花及赤尾鯇產品。以馬匹生產該產品，通常龜殼花免疫後第8-12週達到40田中單位，而鴨子實驗則在第10週達到最高點320田中單位，比馬匹高出許多，但11週休息不免疫，抗體效價（第12週）就下降，和馬匹情況類似。至於赤尾鯇蛇毒通常在龜殼花達到40田中單位後開始免疫（約第8週以後），第12-14週抗體效價開始上升，而鴨子實驗從第8週免疫開始，第12週開始中和效價高於60田中單位（約207田中單位），第24周達到最高點383田中單位。馬匹實驗自從赤尾鯇效價上升之後往往龜殼花效價就無法突破40田中單位，在鴨子實驗發現即使赤尾鯇效價上升，龜殼花效價仍能維持高效價約9周左右，之後才發現龜殼花效價降至谷底無發回升，和馬批實驗一樣。可能是赤尾鯇與龜殼花互相競爭，慢慢的完全壓制龜殼花的結合，當赤尾鯇效價達到某依程度時，龜殼花則完全無法引起抗體反應。由以上結果得知如何找出最佳的免疫時程是發展此產品最

關鍵的地方，未來將著這方向繼續努力開發研究。

Kowalczyk (1985) 等人證實位於卵細胞的IgY受體會結合所有的 IgY抗體，然後從母雞的血液中運送至雞蛋中(12)，Lobbedey and Schlatterer (2003) 使用ELISA檢測法發現鴨蛋蛋黃中具有專一性IgY抗體的存在，且在後代的血液中亦可被發現(14)，上述報告證實血清中具有一定濃度的IgY抗體存在。本中心研究亦發現血液中的抗體會比卵黃還要早被檢測到，由此更能確定ELISA檢測系統可為快速篩選抗體機制時使用，並可作為動物抗體中和測定法和產程監測在建立產程檢驗系統方面的一項重要輔助工具。此次實驗ELISA分析方法準確度之回收率和精密度分別可達90-115%和90%以上，進一步證實我們建立之ELISA檢測系統的可信度，或許此方法也可應用於目前馬匹生產抗蛇毒血清產品的一項抗體篩選工具。

由於本中心為生物製劑製造廠，最重要的考量因素為成本效益，因此我們比較以鴨蛋或馬血清生產抗蛇毒血清可節省不少所需經費。另外考量馬血清製程中，對馬匹及工作人員都有較高的危險性並且目前世界動物保育的方向都不建議使用馬匹來從事生產生物製劑，所以基於成本、人員安全及動物保育三方面，利用鴨子生產抗蛇毒IgY抗體，未來仍值得我們進一步繼續去開發研究。

## 參考文獻

1. Sutherland, S.K. 1997 Serum Reactions. An analysis of commercial antivenoms and the possible role of anticomplementary activity in de-novo reactions to antivenoms and antitoxins. *Med. J. Aust.* 1: 613-615
2. Almeida, C.M., Kanashiro, M.M., Rangel, F.B., Mata, M.F., Kipnis, T.L. and Silva W.D. 1998 Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet. Rec.* Nov 21;143(21):579-84
3. Cama, V.A. and Sterling, C.R. 1991 Hyperimmune hens as a novel source of anti-Cryptosporidium antibodies suitable for passive immune transfer. *J Protozool.* Nov-Dec; 38(6):42S-43S
4. Akita, E.M. and Nakai, S., 1992 Isolation and purification of immunoglobulins from egg yolk. *J. Food Sci.* 57: 629
5. Hassl, A. and Aspock, H. 1988 Purification of yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Methods* 110, 225
6. Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibodies “IgY”. *Agric. Biol. Chem.* 54:2531
7. Bartz, C.R., Conklin, R.H., Tunstall, C.B., and Stesele, J.H. 1980 Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* 142: 439-441.
8. Yolken, R. H., Leister, F., Wee, S. B., Miskuff, R. and Vonderfecht, S. 1988 Antibodies to rotaviruses in chicken egg: a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption, *Pediatrics* 81:291-295.
9. Hiraga, C., Kodama, Y., Sugiyama, T., and Ichikawa, Y. 1990 Preventive of human rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 64: 118-123.

- 10.Hideaki Yokoyama., Robert C., et al (1991) Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Escherichia coli infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity*. 60 (3): 998-1007
- 11.Akita, E. M. and Nakai, S. 1993 Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from egg laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. *J. Immunological Methods*. 160:207-214.
- 12.Sugita-Konishi, Y., Shibata, K., Yun, S.S., Hara-Kudo, Y., Yamaguchi, K. and Kumagai, S. 1996 Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem*. May; 60(5):886-8
- 13.Shin, J.H., Yang, M., Nam, S.W., Kim, J.T., Myung, N.H., Bang, W.G., Roe, I.H. 2002 Use of egg yoke-derived immunoglobulin as an alternate to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 5: 1061-1066
- 14.Motoi, Y., Inoue, S., Hatta, H., Sato, K., Morimoto, K. and Yamada, A. 2005 Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in Escherichia coli. *Jpn J Infect Dis.* Apr;58(2):115-8
- 15.Thalley, B.S. and Carroll, S.B. 1991 Rattlesnake and Scorpion antivenoms from the egg yolk of immunized hens. *Bio/Technology* 8: 934-938
- 16.Devi, C.M., Bai, M.H. and Krishnan, L.K. 2002 Development of viper-venom antibodies in chicken egg yolk and assay of their antigen binding capacity. *Toxicon* 40: 857-861
- 17.Ambrosius, H. and Hadge, D. 1984 Rapid method of extraction of antibodies from hen yolk. *J. Immunol. Methods* 72:421

- 18.Hassl, A. and Aspock, H. 1988 Purification of yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Methods* 110:225.
- 19.Polson, A. 1990 Isolation of IgY from the yolk of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.* 19:253-258.
- 20.Antonio Verdoliva, Giancarlo basile, and Giorgio Fassina 2000 Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J. Chromatography B.* 749:233-242.
- 21.Lindsey, C.Y., Pace-Templeton, J.G., Millard, C.B., Wannemacher, R.W., and Hewetson, J.F. 2006 Validation of ELISA for the determination of anti-ricin immunoglobulin G concentration in mouse sera. *Biologicals* 34: 33-41.
- 22.Lobbedey, L. and Schlatterer B. 2003 Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccinees and in serum of their offspring. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 50(2):81-5

## 期末報告審查委員意見回覆

1.由於OD與稀釋倍數線性研究為0.9以上，未達預期之0.95以上，可考慮多做幾個稀釋倍數濃度，找出最佳線性範圍。

答覆：龜殼花的r<sup>2</sup>是0.9523但赤尾胎的r<sup>2</sup>只有0.923，如果橫軸的稀釋倍數取log來計算，龜殼花與赤尾胎的r<sup>2</sup>可分別達到0.9913和0.9819。本中心會參考委員意見，採用更多的稀釋倍數，使檢驗方法具更佳的線性關係與說服力。

2.報告中提到”純化之蛇毒抗體”濃度、準確度之計算採用之”2倍混合液濃度”及回收率研究中提到之1000倍稀釋”標準品之相關性，宜再說明。

答覆：不管是檢體或是標準品，進行試驗實會稀釋許多不同的倍數，但不同稀釋倍數所呈現之OD值如果都在線性範圍之內，為減少誤差，我們都會以稀釋1000倍所得到之OD來計算其回收率。