

計畫編號：DOH90-DC-1005

行政院衛生署疾病管制局九十年度委託研究計畫

建立台灣眼鏡蛇與台灣雨傘節蛇毒快速及高  
靈敏度酵素連結免疫反應試驗法

委 託 研 究 成 果 報 告

執行機構：國立中山大學生物醫學所

研究主持人：張榮賢

研究人員：張榮賢、林若慈、林思佑、朱苑萍

執行期間：90年2月12日至90年12月31日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

	頁 碼
一、 中文摘要	( 3 )
二、 英文摘要	( 4 )
三、 前言	( 5 )
四、 材料與方法	( 7 )
五、 結果	(12)
六、 討論	(17)
七、 結論與建議	(21)
八、 參考文獻	(22)
九、 圖表	(26)

共 ( 49 ) 頁

## 中文摘要

本計畫主要目的係建立鑑認台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒之快速及高靈敏度酵素連接免疫反應試驗法。 實驗進行方法主要使用 ELISA plates 及免疫墨點法，實驗結果發現以純化蛇毒蛋白免疫反應所得之抗體優於於粗蛇毒免疫之抗體，其中以台灣眼鏡蛇毒蛋白中之 Phospholipase A<sub>2</sub> 及 Cardiotoxin 及台灣雨傘節蛇毒β-Bungarotoxin 之抗體檢驗效果較佳，比較 ELISA plates 及免疫墨點法，以免疫墨點法較為簡便，如配合使用標定山葵過氧化酵素之蛇毒蛋白抗體實驗可在三小時內完成，顯示免疫點墨法較適合將來開發成檢驗試劑之組合成分。

關鍵詞：酵素連接免疫反應試驗法；免疫墨點法；台灣眼鏡蛇毒；台灣雨傘節蛇毒。

## 英文摘要

The aim of the present study is to establish a rapid and high sensitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) for detecting *Naja naja atra* (Taiwan cobra) and *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait) venom. The results of the immunoassay carrying out using ELISA plates and dot blotting revealed that the antibodies obtained by immunizing with crude venom had a higher cross-reactivity than those by immunizing with purified venom proteins. It was found that anti-*N. naja atra* cardiotoxin antibodies and anti-*N. naja atra* phospholipase A<sub>2</sub> antibodies showed a highest reactivity against *N. naja atra* venom. Alternatively, anti-*Bungarus multicinctus*  $\beta$ -bungarotoxin antibodies had a highest immuoreactivity toward *Bungarus multicinctus* venom. Comparing to ELISA plates, dot blotting had advantages on convenience and simplicity. Thus, dot blotting is suggested to be a better choice for preparing diagnostic kit for venom's assay.

Keywords: Enzyme-linked immunoassay; Dot blotting; *Naja naja atra* venom; *Bungarus multicinctus* venom.

## 前 言

本計劃之肇始，係依據行政院衛生署疾病管制局 90 度科技發展研究重點「開發快速測定病患被何種毒蛇咬傷之檢驗試劑」而釐定。本計劃之目標則在建立針對台灣眼鏡蛇與台灣雨傘節蛇毒之快速靈敏之酵素連結免疫反應試驗方法。以酵素連結免疫反應試驗方法分析確認檢驗毒蛇咬傷已有多篇報告 (1-3)，其可行性亦可由被毒蛇咬傷人體血清中檢測出毒蛇蛋白而予以證實(4-6)。

蛇毒蛋白內含多樣蛋白成分，台灣常見的毒蛇有眼鏡蛇、雨傘節、龜殼花、百步蛇、赤尾鮎、鎖鏈蛇，前兩者致死因子為神經毒，龜殼花、百步蛇及赤尾鮎蛇毒為出血毒，而鎖鏈蛇毒則兼具有神經毒與出血毒。為有效區分不同毒蛇咬傷，達到高靈敏之效果，端賴有特異性極佳之抗體，因此利用其主成分作為偵測目標，應較為可行。分離純化台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒之成分可見其至少含有數十種以上蛋白質成分，但是截至目前對其成分之瞭解，主要集中在低分子量蛋白質之研究，台灣眼鏡蛇蛇毒中主要有神經毒素 (Cobrotoxin)，心臟毒素 (Cardiotoxins) 及 Phospholipase A<sub>2</sub> (7)，而在台灣雨傘節蛇毒則以神經毒 $\alpha$ -Bungarotoxin、 $\beta$ -Bungarotoxins 及 Phospholipase A<sub>2</sub> 研究較為透徹(8)，這些成分總合佔有蛇毒蛋白中的成分至少 30~50% 以上，比對蛋白質一級結構可見不同蛇種相同功能之蛋白有明顯差異 (9-11)，如以此免疫製備抗體，此抗體應可有效區分不同種類之蛇毒蛋白，以酵素連結免疫反應試驗方法可有效區分 *Bothrops atrox* 及 *Lachesis muta muta* 兩種蛇毒證實此一想法之可行性(12)。

以粗蛇毒免疫產生抗體可能有如下缺點：(一) 由於每種蛋白質之免疫性不同，因此極可能造成非主成分之蛇毒蛋白之抗體含量反而

超過主成分之抗體，因而降低偵測之靈敏度；（二）由於蛇毒蛋白仍有不少成分尚未研究，因此可能在不同種類毒蛇之蛇毒成份含有蛋白質結構相同或相似之蛋白，其免疫產生之抗體將會產生交叉作用（Cross-reaction），因而降低偵測靈敏度(13-16)。基於上述之理由，使用純化蛋白作為抗原，可以預期應可增加偵測之靈敏度。

在本計畫中我們以台灣眼鏡蛇毒神經毒素（Cobrotoxin），心臟毒素（Cardiotoxins）及 Phospholipase A<sub>2</sub>，與台灣雨傘節蛇毒神經毒  $\alpha$ -Bungarotoxin 及  $\beta$ -Bungarotoxins 免疫產生抗體，以酵素連結免疫反應方式利用 ELISA plates 及 Dot blotting 方式進行分析，測試台灣眼鏡蛇毒及台灣雨傘節蛇毒之偵測靈敏度，以作為開發快速檢測台灣眼鏡蛇毒及台灣雨傘節蛇毒檢驗試劑之研究基礎。

# 材料及方法

## 一、 材料

Protein-HRP (購自 Bio-Rad 公司)

CNBr-activated Sepharose 4B, Protein A-Sepharose CL-6B, S-200 Sephacel, Sephadex G-50, SP-Sephadex C-25, His-Bind Resin (購自 Amersham Pharmacia biotech 公司)

Ammonium acetate, Sodium phosphate, Tris, Glycine, Sodium citrate, Tween-20, Sodium chloride, Sodium bicarbonate,  $H_2O_2$ ,  $NaIO_4$ , LB medium, NaOH (購自 Merck 公司)

Horseshoe peroxidase (HRP),  $NaBH_4$ , Diaminobenzidine, Chloronaphthol (購自 Sigma Chemical Co.)

ELISA plate (購自 Costar 公司)

PVDF membrane (購自 Millipore 公司)

ABTS (購自 Boehringer Mannheim GmbH 公司)

## 二、 蛇毒蛋白之純化

根據本實驗室先前發表方法(7,8), 由台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒內分別純化神經毒、心臟毒及 Phospholipase  $A_2$ , 以 SP-Sephadex C-25 進行離子交換樹脂分離。

台灣眼鏡蛇蛇毒 5g 溶解於 10 ml 1% acetic acid, 通入 Sephadex G-50 (2×200 cm)管柱, 以 1% acetic acid 為洗滌液, 收集分子量小於 20 kDa 之分別冷凍乾燥。 將上述分別溶於 0.005 M sodium phosphate (pH7.0) 緩衝溶劑 2400ml 改變內含鹽類濃度由 0 至 0.5 M 將蛇毒各於 SP-Sephadex C-25 column (2.5 X 95 cm) 分離, 收集 Cobrotoxin (CBTX)、Phospholipase  $A_2$  (PLA $_2$ )及 Cardiotoxin (CTX) 並進一以高壓

液相層析管柱 SynChropak RP-P (4.6mm×25cm)純化之。

台灣雨傘節蛇毒 1 g 溶於 10 ml 之 0.05 M 醋酸氨緩衝溶劑 (pH 5.8), 通入以同樣緩衝溶劑平衡之 SP-Sephadex C-25 管柱(2.5×95 cm), 首先利用同濃度緩衝溶劑洗滌, 在經由兩次遞增濃度溶出: 第一階段使用 0.05 M 醋酸氨 (pH 5.8), 遞增鹽濃度至 0.5M 醋酸氨 (pH 7.0); 第二階段使用 0.5 M 醋酸氨 (pH 7.0) 增加鹽濃度至 1 M 醋酸氨。收集 $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -Bgt) 及 $\beta$ -Bungarotoxin ( $\beta$ -Bgt)分別冷凍乾燥, 並進一步以高壓層析管柱 SynChropak RP-P (4.6mm×25cm)純化之。

## 二、製備抗體

將純化之蛇毒蛋白分別免疫兔子, 將蛋白質與 Complete adjuvant 混合後以皮下注射, 每週免疫一次, 逐次增加抗原量(由 22.5  $\mu$ g 遞增至 1539  $\mu$ g), 最後一次免疫後隔九天取血, 以 Immunodiffusion 分析是否免疫成功。此外也將台灣眼鏡蛇 cobrotoxin 以 Glutaraldehyde 修飾(17), 製備 Glutaraldehyde-modified cobrotoxin (GA-CBTX)作為免疫抗原。

## 三、親和性層析分離純化抗體

根據我們先前實驗步驟(18), 將連結有蛇毒蛋白之 CNBr-activated Sepharose 4B 充填成 1×12 cm 管柱充填成親和性層析管柱, 將經 30%~50% 硫銨沈澱及透析後之抗體通入, 以 10 mM Tris (pH 8.0)緩衝液平衡之管柱, 以 10mM Tris + 0.5M NaCl 將非特異性結合蛋白由管柱去除後, 再以 0.1 M Glycine (pH2.5)將吸附抗體洗出, 並以 0.1 M Tris (pH 8.0) 中和之, 透析後得到純化之抗體。

以 Protein-A-Sepharose CL-6B 純化抗體時, 首先將抗體溶液加入 1

M Tris (pH 8.0),使 Tris 終濃度為 0.1M Tris (pH 8.0)再加入管柱,以 100 mM Tris (pH 8.0)及 10 mM Tris (pH 8.0)分別沖洗 10 倍管柱體積,去除非特異性結合蛋白後,再以 50 mM Glycine(pH 3.0)將吸附抗體洗出,立即以十分之一體積 1M Tris (pH 8.0)中和之,透析後得到純化之抗體。

#### 四、以山葵過氧化酵素(Horseradish peroxidase, HRP)標定抗體

根據 Wilson 及 Nakane 方法(19)進行此實驗,將山葵過氧化酵素與  $\text{NaIO}_4$  混合後,在室溫反應 20 分鐘,再以醋酸透析一晚。取出山葵過氧化酶加入碳酸鈉, pH 調至 9~9.5,加入 8mg 抗體,在 4℃ 進行反應兩小時,以 S-200 Sephacel 管柱,進行膠過濾純化,收集在 280nm 及 403nm 均有吸收之蛋白質分劃。

#### 五、直接酵素連結免疫反應試驗法

根據本實驗室先前發表方法修改而成 (18,20,21),將粗蛇毒或純化蛇毒蛋白 Coating 於 ELISA plate 上,於 37℃ 反應 3 小時,置於 4℃ 1 小時,以脫脂奶粉阻斷非特異吸附位子,分別加入不同濃度之抗體於 37℃ 反應 3 小時,置於 4℃ 1 小時,以 PBS-Tween 清洗 plate,再加入 HRP 標定之 HRP-ProteinA (3000×稀釋),同樣於 37℃ 反應 3 小時,置於 4℃ 1 小時,以 PBS-Tween 清洗 plate 3 次之後,加入呈色受質 ABTS/Citrate buffer (pH4.0) 內含  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,以 ELISA reader 測量 405nm 吸光值。

#### 六、雙抗體三明治酵素連結免疫反應試驗法

係根據本實驗室先前發表方法修改而成 (18,20,21),將抗體先 Coating 於 ELISA plate 上,於 37℃ 反應 3 小時,置於 4℃ 一晚,以脫

脂奶粉阻斷非特異吸附部位，此一 plate 即可備用偵測抗原。將不同濃度蛇毒蛋白加入預製含抗體之 ELISA plate，反應 37 °C、3 小時，4 °C、1 小時，以 PBS-Tween 清洗 plate 三次，加入山葵過氧化酶標定之抗體，同樣反應 37 °C、3 小時，4 °C、1 小時，以 PBS-Tween 清洗 Plate 三次後，加入呈色受質 ABTS/Citrate buffer (pH4.0)內含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反應，以 ELISA reader 測量 405nm 吸光值，分析其偵測靈敏度。

## 七、免疫點墨法 (Dot blotting)

其基本操作原理與酵素連結免疫反應實驗法相同，唯 ELISA plate 以 PVDF membrane 取代之，呈色受質為 Diaminobezidine + chloronaphthol (22)。將不同濃度之粗蛇毒及純化蛇毒溶液置入 Amersham Pharmacia biotech 公司製造之 Blot filtration manifolds，抽真空至溶液完全通過後，再加入 PBS 緩衝液 200 µl，再度抽真空至所有溶液通過 membrane，取下 membrane 以脫脂奶粉阻斷非特異吸附位子，分別加入不同濃度之抗體於 37 °C 反應 3 小時，置於 4 °C 1 小時，以 PBS-Tween 清洗 plate，再加 HRP 標定 ProteinA-HRP (3000×稀釋)，同樣於 37 °C 反應 3 小時，置於 4 °C 1 小時，以 PBS-Tween 清洗 3 次之後，加入呈色受質呈色。加抗體處也可以標有 HRP 之抗體為之，如此可以減少反應步驟及時間。

## 八、重組 Cobrotoxin 其突變蛋白之製備

根據我們先前發表方法將在 pET20b(+) CBTX cDNA 及突變之 CBTX DNA 片段以 *EcoRV* 及 *EcoRI* 切離後，裝入 pET30a(+)表現載體內，transform 入 *E.coli* BL21(DE3)，在將此菌種放入含 200 µg/ml

Ampicillin LB medium 中培養，在 37 至  $A_{550} = 8.0$ ，加入 1mM Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside，繼續培養 4 小時，將細胞離心收集，以 sonication 將細胞打破，取上清液通入 His-Bind Resin 純化，以水透析再分別冷凍乾燥，取是當蛋白質進行 SDS-PAGE 及 Western blotting 之分析。

#### 九、重組 $\beta$ -Bungarotoxin A 鏈及 B 鏈蛋白質及 $\alpha$ -Bungarotoxin 蛋白質之製備

根據本實驗室先前發表的方法(24,25)，將含有 $\beta$ -Bgt A 鏈及 B 鏈之 DNA fragments 裝入 pT7-7 或 pET32a(+)表現載體內，transform 入 *E.coli* BL21(DE3)，再將此菌種放入含 200  $\mu$ g/ml Ampicillin LB medium 中培養，在 37 至  $A_{550} = 8.0$ ，加入 1mM Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside，繼續培養 4 小時，將細胞離心收集打破，以 pT7-7 表現之 A 鏈及 B 鏈均存在 *E. coli* 之 Inclusion bodies 內，收集 Inclusion bodies 後根據我們先前發表方法以 2-Nitro-5-thiosulfonate (24)進行 Refolding，再以 SynChropak RP-P column 純化。 $\beta$ -Bgt 之 B 鏈 cDNA  $\alpha$ -Bgt 及  $\alpha$ -Bgt 之突變 DNA 片段另裝入 pET32a(+)表現載體內，表現蛋白為 Soluble form，再以 His-Bind Resin 純化之。

## 結 果

一、台灣眼鏡蛇與台灣雨傘節粗蛇毒免疫製備抗體與粗蛇毒之免疫反應性。

如圖 1 所示，將以粗蛇毒直接免疫兔子所取得之抗血清由 500 倍遞增至 8000 倍，再以酵素連結免疫反應鑑認分析，顯示隨著稀釋倍數增加，反應呈下降趨勢，稀釋至 8000 倍時仍有反應，而稀釋 500 倍與 1000 倍則無明顯之差異。為瞭解以粗蛇毒製備之抗體是否有交叉反應，取固定稀釋 2000 倍之抗血清，分別對台灣眼鏡蛇(*Naja naja atra*, NNA)與台灣雨傘節(*Bungarus multicinctus*, BM)粗蛇毒進行免疫反應，如圖 2A 所示 Anti-NNA 抗體其對台灣眼鏡蛇粗蛇毒反應靈敏度介於 0.01~0.001mg/ml 之間，但對較高濃度台灣雨傘節粗蛇毒(0.01mg/ml)則可顯示交叉反應性，如圖 2B 所示 Anti-BM 抗體對台灣雨傘節粗蛇毒也有相似之靈敏度，而對高濃度之台灣眼鏡蛇毒(>0.01mg/ml)亦呈交叉反應之現象。

二、純化蛇毒蛋白免疫製備抗體對粗蛇毒之免疫反應性

我們以台灣眼鏡蛇 Cobrotoxin (CBTX), Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 及 Cardiotoxin (CTX), 以及台灣雨傘節  $\alpha$ -Bungarotoxin ( $\alpha$ -Bgt) 及  $\beta$ -Bungarotoxin ( $\beta$ -Bgt)製備抗體，針對粗蛇毒進行酵素連結免疫反應，如圖 3A 所示 Anti- $\alpha$ -Bgt 抗體及 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體對台灣眼鏡蛇粗蛇毒之交叉反應在 0.1 mg/ml 時才會有明顯反應，相同狀況亦可見 Anti-CBTX 抗體，Anti-PLA<sub>2</sub> 抗體及 Anti-CTX 抗體在 0.1 mg/ml 之台灣雨傘節粗蛇毒濃度才對其產生交叉反應 (圖 3B)。 另一方面可見不同抗血清對粗蛇毒之反應性不同，如對台灣眼鏡蛇粗蛇毒之反應性 Anti-CTX 抗體

>Anti-PLA<sub>2</sub> 抗體> Anti-CBTX 抗體，而對台灣兩傘節粗蛇毒 Anti-β-Bgt 抗體>Anti-α-Bgt 抗體，此差異性除了反映在粗蛇毒中各種蛋白含量不同，亦可能反映出不同純化蛇毒蛋白質免疫產生抗體之效率或產生抗體量不同。

### 三、Anti-CBTX 及 Anti-glutaraldehyde modified cobrotoxin (GA-CBTX) 與 CBTX 及重組蛋白質免疫反應性

如圖 4 所示 Anti-CBTX 抗體對重組 CBTX 其免疫反應性均遜於 Native CBTX 之免疫反應性，如果將 CBTX 之 C-terminal 之雙硫鍵突變之後，則免疫反應性進一步下降，而(C4354S)CBTX 之反應性仍優於其它兩種雙硫鍵突變 CBTX、(C5560S)CBTX 及 (C43545560S) CBTX (圖 4A)。 Anti-GA-CBTX 抗體對 CBTX 及重組蛋白質免疫性大致與 Anti-CBTX 抗體相似，但三種雙硫鍵突變之 CBTX 蛋白與 Anti-GA-CBTX 抗體之反應差異較小(圖 4B)。

### 四、以親和性管柱層析法將 Anti-CBTX 抗體及 Anti-GA-CBTX 抗體分為兩分劃

為了進行抗體三明治酵素連結免疫反應試驗法，因此嘗試將抗體分為兩分劃，在上述實驗中與 Anti-CBTX 抗體及 Anti-GA-CBTX 抗體反應過程中可見(C4354S)CBTX 之反應優於其它兩種雙硫鍵突變蛋白質，因此以(C4354S)CBTX 作為第一道親和性管柱，不結合第一道親和性管柱之抗體再通過 CBTX 親和性管柱純化之，由圖 5A 可見 Anti-CBTX 抗體第一分劃(F1)之含量大於第二分劃(F2)之含量，而 Anti-GA-CBTX 抗體第一分劃(GA-F1)之含量則小於第二分劃(GA-F2)之含量。 進一步以此分離抗體分別針對 CBTX 及(C4354S)CBTX 進

行免疫鑑認反應（圖 6A 及圖 6B），可見無論由 Anti-CBTX 抗體或 Anti-GA-CBTX 抗體分離之分劃均可與 CBTX 反應，而由各種抗體分離之分劃僅有 F1 及 GA-F1 可認知(C4354S)CBTX，本實驗證實經由兩道親和性管柱確可將 Anti-CBTX 抗體及 Anti-GA-CBTX 抗體分為兩份劃。如將 Anti-CBTX 抗體 F1 分劃及 Anti-GA-CBTX 抗體 GA-F1 分劃，再與各種重組蛋白反應，可見此兩分劃也均可與重組 CBTX 及突變蛋白質反應（圖 7A 及 7B），但在 Anti-CBTX 抗體 F1 分劃反應依序如下 Re-CTBX>C4354S>C5560S,C43545560S，而在 Anti-GA-CBTX 分劃則為 Re-CBTx, C5560S> C4354S, C43545560S，此一事實顯示在兩種不同抗體內所含抗體譜群並不完全相同。

#### 五、 $\alpha$ -Bgt 及 $\beta$ -Bgt 免疫製備抗體和其抗原及重組蛋白之反應性

如圖 8 所示，Native  $\alpha$ -Bgt 之反應性均優於重組 $\alpha$ -Bgt 蛋白或 (C2933S)  $\alpha$ -Bgt 突變蛋白質，其中 (C2933S)  $\alpha$ -Bgt 其在 0.1 mg/ml 濃度有極佳反應性，一旦濃度下降其反應性則急遽明顯下降，而重組  $\alpha$ -Bgt 蛋白其反應性則遠低於 $\alpha$ -Bgt。

如圖 9 所示，以 pT7-7 表現之 A 鏈及 B 鏈經 Refolding 後產生之 Refolded 之 A 鏈及 B 鏈其與 $\beta$ -Bgt 抗體之反應性並不遜於 $\beta$ -Bgt，但唯一可惜者， $\beta$ -Bgt 經 Refolding 後之 A 鏈及 B 鏈之產率極差，因此大量製備有其困難，以 pET32a(+)表現之 B 鏈雖然以 soluble form 存在，可大量製備，但其與 $\beta$ -Bgt 抗體之反應性不佳。

#### 六、山葵過氧化酵素連接反應

將以親和性管柱純化之 Anti-CBTX 抗體與山葵過氧化酵素（HRP）

進行連接反應後，以膠過濾方式純化(圖 10)，前面的大波峰通時具有 280nm 及 403nm 波長的吸光，為 HRP 及抗體之連接體，RZ 的比值 (280nm/403nm)約為 0.3~0.4，顯示為 1:1 連接體，此一標定 HRP 之抗體可同時取代一級抗體及 HRP-Protein A，用於酵素連接免疫反應及免疫墨點法。

### 七、雙抗體三明治酵素連結免疫反應試驗

以親和性管柱分離成二分劃之 Anti-CBTX 抗體，將 F2 分劃抗體 Coating 於 ELISA Plates 之後，加入 CBTX 或台灣眼鏡蛇粗蛇毒，再加入標定有 HRP 之 F1 分劃抗體，呈色結果顯示對粗蛇毒其靈敏度可達  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$  mg/ml (圖 11)，而對純化之 CBTX 其靈敏度可達  $10^{-5}$ ~ $10^{-6}$  mg/ml，取一差距適可反應出 CBTX 在粗蛇毒 Total proteins 中所佔比例，無論如何這些結果顯示其靈敏度優於直接酵素連結免疫反應試驗。如以每 well coating 50  $\mu$ l 計之，對粗蛇毒靈敏度為 5 ng~0.5 ng 之間，以一靈敏度之提升或可歸因於減省加入 HRP-ProteinA 步驟所致。

### 八、免疫點墨偵測抗體和蛇毒蛋白之反應

如圖 12 所示，以免疫墨點法進行實驗顯示亦如 ELISA plates 一般僅有在高濃度之下，才會有交叉反應，在臺灣眼鏡蛇三種成分比較之下 CBTX, PLA<sub>2</sub> 及 CTX 抗體分別具有不同靈敏度，其中以 CTX 靈敏度較可達至  $10^{-4}$  mg/ml 如以 Apply sample 100  $\mu$ l 計之，可偵測靈敏度為 10 ng，但是在較高濃度台灣雨傘節蛇毒時亦可見交叉反應。如以  $\beta$ -Bgt 抗體和  $\alpha$ -Bgt 抗體相較，可見  $\beta$ -Bgt 抗體偵測靈敏度較優於  $\alpha$ -Bgt 抗體，就偵測靈敏度而言應介於  $10^{-2}$ ~ $10^{-3}$  mg/ml，以 Apply sample 100  $\mu$ l 計之，應在 1  $\mu$ g~100 ng 之間。

由於 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體及 Anti-CTX 抗體反應性較優於其他抗體，因此分別以 Protein A-Sepharose 6B (圖 13)純化抗體，再將所純化抗體標定 HRP，以膠過濾法予以純化(圖 14)，使用標定有 HRP 之抗體包括 HRP-CBTX 抗體，HRP-CTX 抗體，HRP- $\beta$ -Bgt 抗體進行免疫墨點法可見 HRP- $\beta$ -Bgt 抗體之偵測靈敏度可達 15 ng (圖 15)，而 Anti-CTX 抗體較 Anti-CBTX 抗體能有效區分台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節粗蛇毒，以此方法進行蛇毒檢測可減省一個步驟縮短分析時間。

## 討 論

本計畫主要目的係建立鑑認台灣眼鏡蛇毒及台灣雨傘節蛇毒之快速及高靈敏度酵素連結免疫反應試驗法，由於台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒蛋白內含多樣蛋白，如以粗蛇毒直接免疫，由於各蛋白之免疫性不同，可能因抗主要成份抗體含量不足而導致偵測靈敏度下降，甚或存在抗其他蛋白抗體也會增加抗體交叉作用的可能性，因此在本計畫中，我們主要以純化之台灣眼鏡蛇神經毒（Cobrotoxin），心臟毒（Cardiotoxin）及 Phospholipase A<sub>2</sub>，以及台灣雨傘節主成分之神經毒（ $\alpha$ -Bungarotoxin 及  $\beta$ -Bungarotoxin）製備抗體，以酵素連接免疫反應法及免疫墨點法分析抗體認知抗原之特異性，再以此抗體為檢驗基礎，區分台灣眼鏡蛇毒蛋白及台灣雨傘節蛇毒蛋白。

首先以台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節粗蛇毒免疫取得抗粗蛇毒之抗血清，以直接酵素連接免疫反應試驗分析其與粗蛇毒之免疫反應性，分別在 ELISA plate coating 0.1mg/ml 或 0.01mg/ml 之粗蛇毒，顯示在稀釋 8000 倍後無論是抗台灣眼鏡粗蛇毒血清或抗台灣雨傘節粗蛇毒血清均可與粗蛇毒產生免疫反應。無論以台灣眼鏡蛇或台灣雨傘節粗蛇毒 Coating 至 ELISA plate 上，兩種不同抗原皆可和二種抗體反應，其中台灣眼鏡蛇之粗蛇毒與雨傘節抗血清之反應約為與眼鏡蛇抗血清反應性之 25%，反之雨傘節之粗蛇毒與抗眼鏡蛇血清反應則約為抗雨傘節血清之 10%，顯示以粗蛇毒免疫確實會產生免疫交叉反應，但是反應之程度則略有差異，此一結果應是來自不同粗蛇毒內成分不同及各成分免疫性不同所致。

為了進一步瞭解此二抗血清之偵測靈敏度，使用  $10^{-1}$   $10^{-6}$  mg/ml

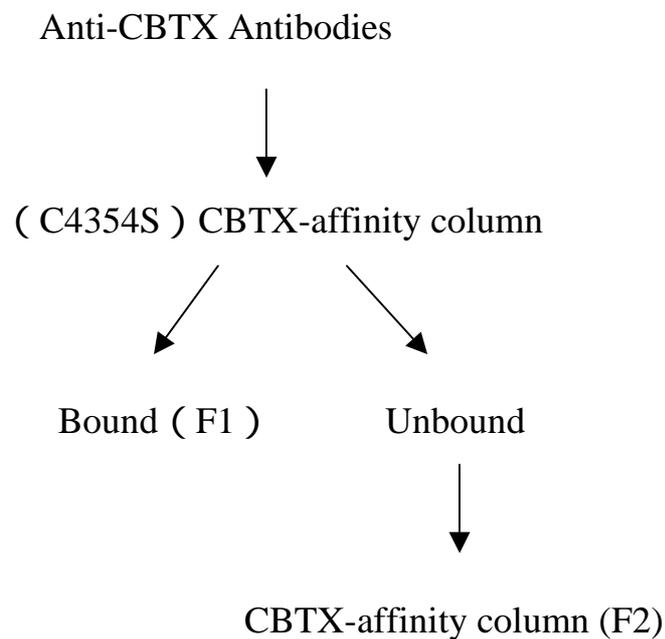
之粗蛇毒 coating 於 ELISA plate，使用稀釋 2000 倍之抗血清，以直接酵素連接免疫反應試驗法分析，其偵測靈敏度無論對台灣眼鏡蛇或台灣雨傘節均為  $10^{-3}$  mg/ml，如以每 well coating 50  $\mu$ l 計之，每 well 偵測靈敏度為 50ng。同樣實驗狀況下，顯示當 Coating 粗蛇毒為  $10^{-2}$ mg/ml 時，仍有微弱但足以觀察之免疫交叉反應，此外眼鏡蛇毒和抗雨傘節血清之免疫反應性大於雨傘節蛇毒和抗眼鏡蛇毒血清之免疫反應性。

為免除交叉反應之干擾，於是使用純化之蛇毒蛋白作為免疫抗原製備抗體，以台灣眼鏡蛇 CBTX，PLA<sub>2</sub> 及 CTX 免疫取得 Anti-CBTX 抗體，Anti-PLA<sub>2</sub> 抗體及 Anti-CTX 抗體分別分析其認知台灣眼鏡蛇毒之靈敏度，顯示其靈敏度均可達 50 ng/well，而對雨傘節蛇毒則需當蛇毒 Coating 濃度為 5000 ng/well 才有可觀測到之反應性，此事實反應出以純化蛇毒蛋白免疫所得抗體可有效去除交叉免疫反應提升偵測準確性。

另外也使用純化之台灣雨傘節  $\alpha$ -Bgt 及  $\beta$ -Bgt 免疫製備 Anti- $\alpha$ -Bgt 抗體及 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體，其對雨傘節粗蛇毒偵測靈敏度亦可達 50 ng/well，其中 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體之反應性優於 Anti- $\alpha$ -Bgt 抗體，兩種抗體對台灣眼鏡蛇粗蛇毒僅有極低的交叉免疫反應性。

為了能有效縮短酵素連結免疫反應時間，可採行雙抗體三明治酵素連接免疫反應試驗法，進行此一方法的最須突破處乃在於必須將抗體分為兩分劃，一為 Coating 蛋白，另一為標定有山葵過氧化酵素或同位素之抗體。欲達成此一目標必須有抗原性被部分破壞之抗原做為親和性管柱連接 Ligand，於是採行重組蛋白做為 Ligand。我們將先前由台灣眼鏡蛇蛇腺以 RT-PCR 放大之 Cobrotoxin cDNA，選殖入

pET30a(+)中，另外也以 Site-directed mutagenesis 方法製備(C4354S) CBTX, (C5560S)-CBTX 及突變二對 C-terminal 雙硫鍵之重組蛋白，以直接酵素免疫試驗法分析顯示 (C4354S) CBTX 其免疫反應性低於 CBTX，但優於其他兩種雙硫鍵突變之重組蛋白，因此以 (C4354S) CBTX 做為親和性管柱之 Ligand，將 Anti-CBTX 抗體分為二分劃，圖示如下



F1 的抗體認知 (C4354S) -CBTX 及 CBTX，但 F2 僅能認知 CBTX，而無法與 (C4354S) CBTX、(C5560S) CBTX 及突變二對 C-terminal 雙硫鍵之重組蛋白產生免疫反應，顯示以此方法，已成功將 Anti-CBTX 抗體分為二分劃。我們先前表現重組台灣眼鏡蛇 PLA<sub>2</sub> 或 CTX，均出現在 Inclusion bodies，由於 Refolding 產率不佳因此無法使用此二種重組蛋白做為親和性管柱 Ligand，將 Anti-PLA<sub>2</sub> 抗體及 Anti-CTX 抗體分為二分劃。

台灣雨傘節 $\alpha$ -Bgt 及 $\beta$ -Bgt 之 A 鏈與 B 鏈我們先前也已成功表現出

重組蛋白，因此也可模擬上述 CBTX 方式將 Anti- $\alpha$ -Bgt 抗體或 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體分為二分劃，由於以 pT7-7 表現載體表現 $\beta$ -Bgt 之 A 鏈及 B 鏈表現時出現於 Inclusion bodies 中，因此無法採用其做為親和性管柱之 Ligand，而試圖採用以 pET32a(+)表現 $\beta$ -Bgt 之 B 鏈或 $\alpha$ -Bgt 做為 Ligand，將兩者 cDNA 分別裝入 pET32a(+)中表現 Soluble 之重組蛋白，分析其免疫反應性分別為 $\alpha$ -Bgt 及 $\beta$ -Bgt 蛋白質之 20%及 4%，顯示重組 B chain 蛋白不適做為親和性管柱 Ligand，而 $\alpha$ -Bgt 亦不如重組 CBTX 與 Anti-CBTX 抗體之反應性，但是相較 B chain 之下，重組 $\alpha$ -Bgt 為較好之選擇，因此似可使用 $\alpha$ -Bgt 重組蛋白作為親和性管柱之 Ligand，將 Anti- $\alpha$ -Bgt 抗體分為二分劃，可惜 Anti- $\alpha$ -Bgt 抗體之偵測靈敏度不如 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體，進行雙抗體三明治酵素連接免疫反應法分析對雨傘節蛇毒之偵測靈敏度不佳。

以免疫墨點法偵測台灣雨傘節粗蛇毒其靈敏度亦近似於以 ELISA plates 進行之實驗，但 membrane 之保存更優於 ELISA plates，其處理步驟亦較簡便，因此如欲開發蛇毒的檢驗試劑以 membrane 方式為之，將會是較便利的發展方式。

## 結論與建議

1. 本計畫以純化蛇毒蛋白免疫所得之抗體無論以 ELISA plates 或 PVDF membrane 的檢驗方式均優於粗蛇毒免疫之抗體，因此如要開發檢驗試劑應以純化蛇毒蛋白免疫所得抗體為優先考量。
2. 不同蛇毒蛋白免疫之抗體其偵測靈敏度不同，在台灣眼鏡蛇毒蛋白中以 PLA<sub>2</sub> 及 CTX 之抗體檢驗效果較佳。在台灣雨傘節毒蛋白以β-Bgt 抗體檢驗效果較好，將來開發檢驗試劑使用應以上述作為優先考量。
3. 為提升檢驗之靈敏度，可同時混和數種抗體作為偵測工具。
4. 比較 ELISA plates 及 PVDF membrane 方式，如欲開發簡便之偵測方式，以 PVDF membrane 較為方便。
5. 將來實際應用方式，可使用純化蛇毒吸附於 PVDF membrane 上做為工作平台，將樣品做為競爭者和抗體結合，依抗體被接合與否，進而影響其和 Membrane 上純化蛋白質結合，因而影響其呈色，以做為判定蛇毒蛋白之種類。

## 參考文獻

1. Theakston RD, Lloyd-Jones MJ, Reid HA: Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *Lancet* 1977; 24: 639-41.
2. Ho M, Warrell MJ, Warrell DA, Bidwell D, Voller A: A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snake bite. *Toxicon* 1986; 24:211-21.
3. Selvanayagam ZE, Gopalakrishnakone P: Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997). *Toxicon* 1999;37:565-86.
4. Viravan C, Veeravat U, Warrell MJ, Theakston RD, Warrell DA: ELISA confirmation of acute and past envenoming by the monocellate Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Am J Trop Hyg.* 1986; 35:173-81.
5. Li Q, Ownby CL: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for identification of venoms from snakes in *Agkistroon* genus. *Toxicon* 1994; 32:1315-25.
6. Bucher B, Canonge D, Thomas L, Tyburn B, Robbe-Vincent A, Choumet V, Bon C, Ketterle J, Lang J: Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. Research Group on Snake Bites in Martinique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:186-90.
7. Chang LS, Lin SR, Chang CC: Unfolding/folding studies on cobrotoxin from Taiwan cobra venom: pH and GSH/GSSG govern disulfide isomerization at the C-terminus. *Arch Biochem Biophys* 1998; 354:1-8.
8. Yang CC, Chang LS: Tryptophan modification of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes and presynaptic neurotoxins from snake venom. *J Protein Chem* 1984; 3:195-213.

9. Endo T, Tamiya N: Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venom. Snake Toxins (Harvey AL, ed.) 1991; pp. 165-222, Pergamon Press, New York.
10. Dufton MJ, Hider RC: The structure and pharmacology of elapid cytotoxins. Snake Toxins (Harvey AL, ed.) 1991; 259-302, Pergamon Press, New York.
11. Harris JB: Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. Snake Toxins (Harvey AL, ed.) 1991;. 91-130, Pergamon Press, New York.
12. Chavez-Olortegui C, Lopes CS, Cordeiro FD, Granier C, Diniz CR: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venoms. Toxicon 1993; 31: 417-25.
13. Khoo O, Pakmanee N, Chanhom L, Siprapat S, Omori-Satoh T, Sitprija VC: Cross-neutralization of Thai cobra (*Naja kaouthia*) and spitting cobra (*Naja siamensis*) venoms by Thai cobra antivenom. Toxicon 1997; 35: 1649-51.
14. Pamanee N, Khoo O, Wongtongkam N, Omori-Satoh T, Sitprija V: Efficacy and cross reactivity of Thai green pit viper antivenom among venoms of *Trimeresurus* species in Thailand and Japan. J Nat Toxins 1998; 7:173-83.
15. de Roodt AR, Dolab JA, Fernandez T, Sergre L, Hojos SE: Cross-reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. Toxicon 1998; 36:1025-38.
16. Bogarin G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, Guidolin R, Rojas G, Higashi HG, Gutierrez JM: Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. Toxicon 2000; 38:1429-41.

17. Chang LS, Lin SR, Yang CC: Refolding of Taiwan cobra neurotoxin: intramolecular cross-link affects its refolding reaction. *Arch Biochem Biophys* 2001; 387:289-96.
18. Chang LS, Kuo KW, Lin J, Lin SR, Chang CC: Analysis of conformation-independent epitope and conformational epitope in protein: a study on cobrotoxin from Taiwan cobra venom. *J Biochem* 1995; 117: 863-68.
19. Wilson MB, Nakane PK: Immunofluorescence and related staining techniques 1978; 215-24, Elsevier/North-Holl and Biomedical Press, The Netherlands.
20. Chang, LS, Lin J, Chang CC: Evidence showing a different repertoire of antibodies against unfolded cobrotoxin in anticobrotoxin and anti-reduced and S-carboxymethylated cobrotoxin antisera. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35:733-38.
21. Chang, LS, Lin J, Kuo KW, Lin SR, Chang CC: Characterization of epitopes in native and unfolded cobrotoxin: evidence showing an immunodominant C-terminal region related to the production of precipitating and non-precipitating antibodies against cobrotoxin. *J Biochem* 1995;118:686-92.
22. Young PR: an improved method for the detection of peroxidase conjugated antibodies on immunoblots. *J Virol Methods* 1989;24:227-36.
23. Chang LS, Chen KC, Wu BN, Lin SK, Wu PF, Hong YR, Yang CC: Expression and mutagenesis studies of cobrotoxin from Taiwan cobra. 1999;263:652-56.
24. Chang LS, Wu PF, Chang CC: cDNA sequence analysis and mutagenesis studies on the A chain of  $\beta$ -bungarotoxin from Taiwan banded krait. *J. Protein Chem* 1996;15:755-61.

25. Wu PF, Wu SN, Chang CC, Chang LS: Cloning and functional expression of B chains of  $\beta$ -bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait). 1998;334:87-92.

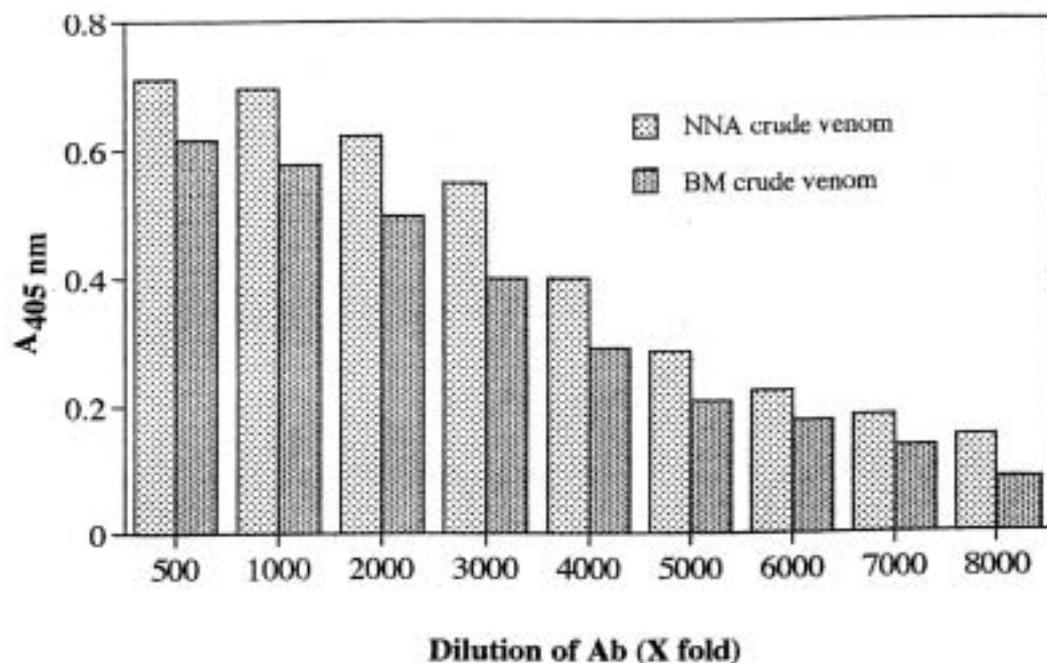


圖 1. 使用酵素連接免疫反應鑑認法分析台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節抗血清與粗蛇毒之反應性。

取 0.01 mg / ml 台灣眼鏡蛇粗蛇毒 (NNA crude vevom) 及台灣雨傘節粗蛇毒 coating 於 ELISA plates 後，加入不同稀釋倍數之抗血清偵測免疫反應性，每一數據為三重覆實驗平均所得。

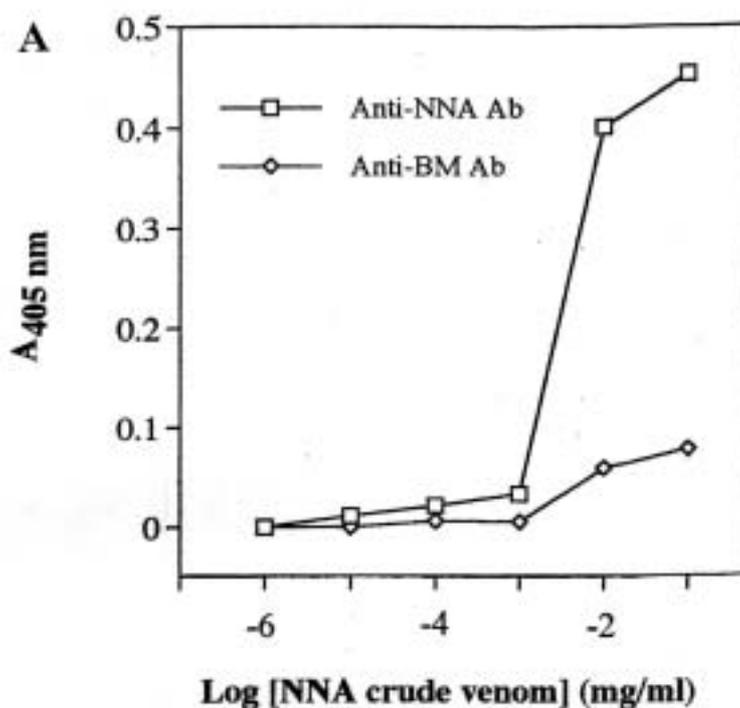
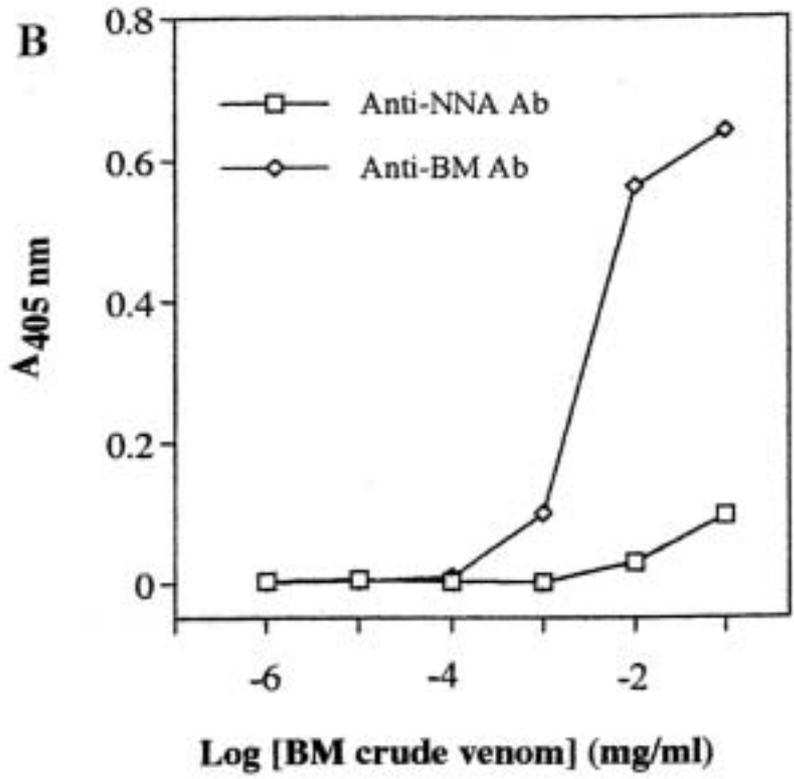


圖 2. 分析台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節抗血清與粗蛇毒之交叉反應性。

將不同濃度之(A)台灣眼鏡蛇粗蛇毒(B)台灣雨傘節粗蛇毒 coating 於 ELISA plates 後，加入固定濃度之抗血清 (2000 倍稀釋)，偵測其免疫反應性，每一數據為三重覆實驗平均所得。



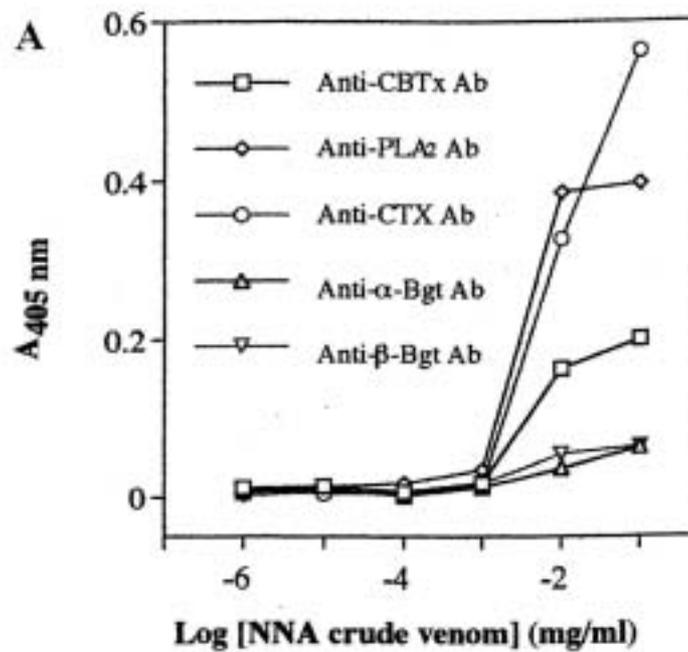
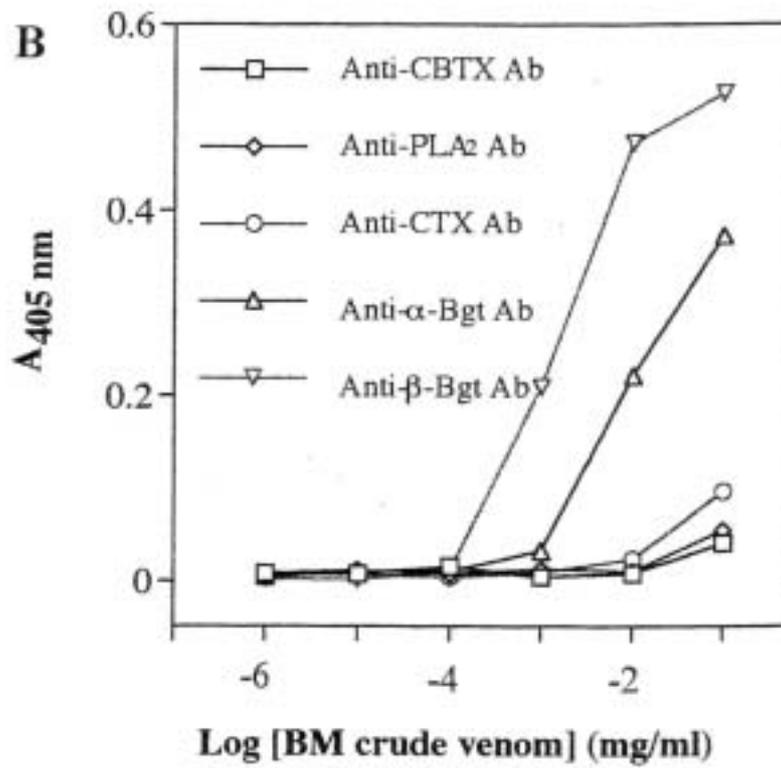


圖 3.分析純化蛇毒蛋白之抗血清與台灣眼鏡蛇粗蛇毒及台灣兩傘節粗蛇毒之免疫反應性。

將不同濃度之(A)台灣眼鏡蛇粗蛇毒(B)台灣兩傘節粗蛇毒 coating 於 ELISA plates 後，加入固定濃度之抗血清 (2000 倍稀釋)，偵測其免疫反應性，每一數據為三重覆實驗平均所得。CBTX, cobrotoxin; PLA<sub>2</sub>, phospholipase A<sub>2</sub>; CTX, cardiotoxin; α-Bgt, α-Bungarotoxin; β-Bgt, β-Bungarotoxin。



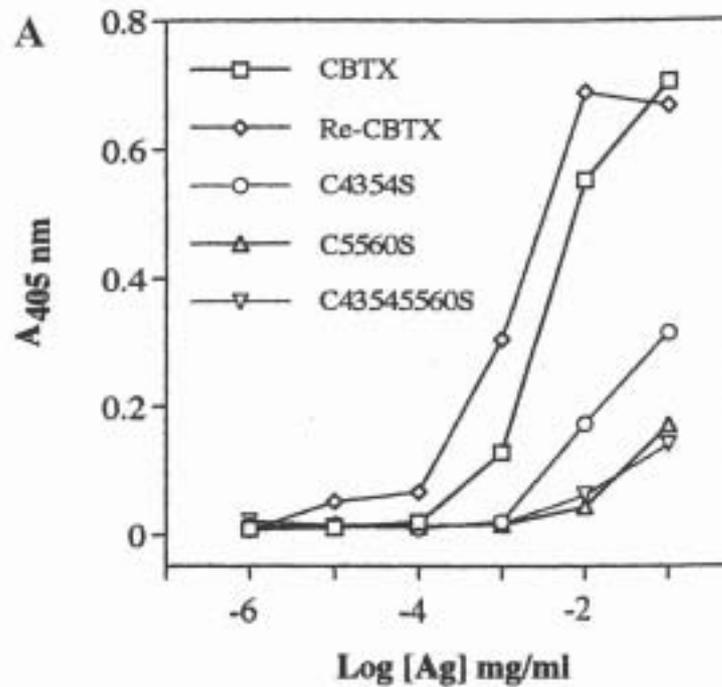
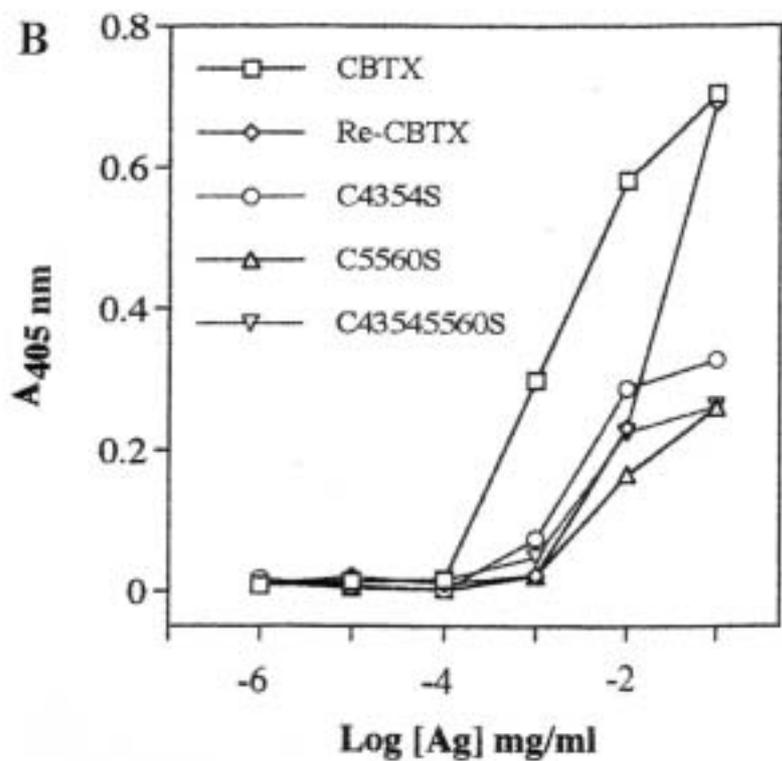


圖 4. 分析 Anti-cobrotoxin 抗體及 Anti-GA-cobrotoxin 抗體與 Cobrotoxin 及重組蛋白之免疫反應性。

將不同濃度之蛋白質 coating 於 ELISA plates 後，加入 (A) Anti-cobrotoxin 抗體及 (B) Anti-GA-cobrotoxin 抗體，偵測抗原抗體免疫反應性，每一數據為三重覆實驗平均所得。



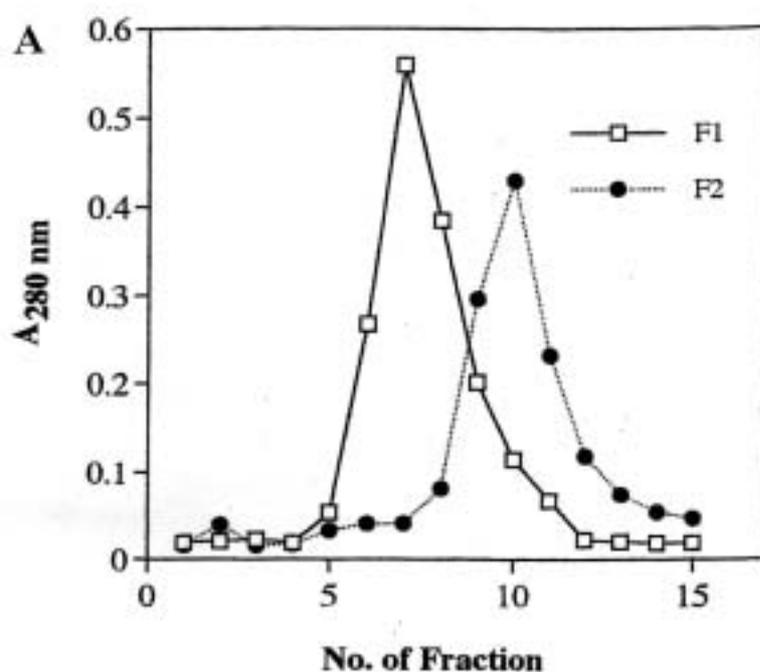
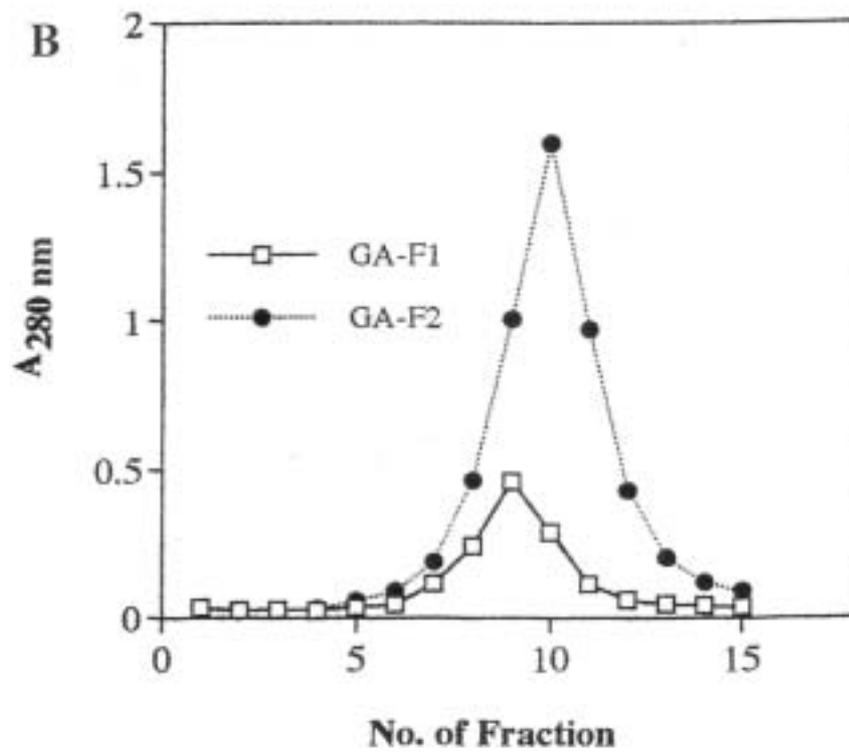


圖 5.以親和性層析管柱純化 Anti-cobrotoxin 抗體及 Anti-GA-cobrotoxin 抗體。

將 (A) Anti-cobrotoxin 抗體及 (B) Anti-GA-cobrotoxin 抗體分別通過 (C4354S) Cobrotoxin 親和性層析管柱及 Cobrotoxin 親和性層析管柱，將此兩種抗體分離成二個純化抗體分割 F<sub>1</sub> 及 F<sub>2</sub>。F<sub>1</sub> 抗體可特異認知 cobrotoxin 之 N-terminal 部分，而 F<sub>2</sub> 抗體則認知完整的 C-terminal 結構。GA-cobrotoxin, glutaraldehyde-modified cobrotoxin。



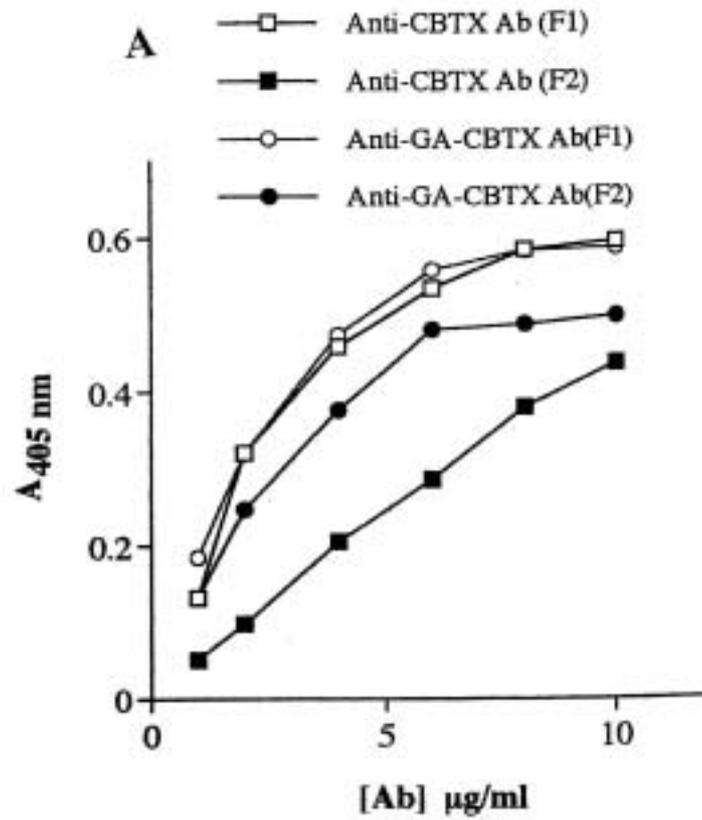
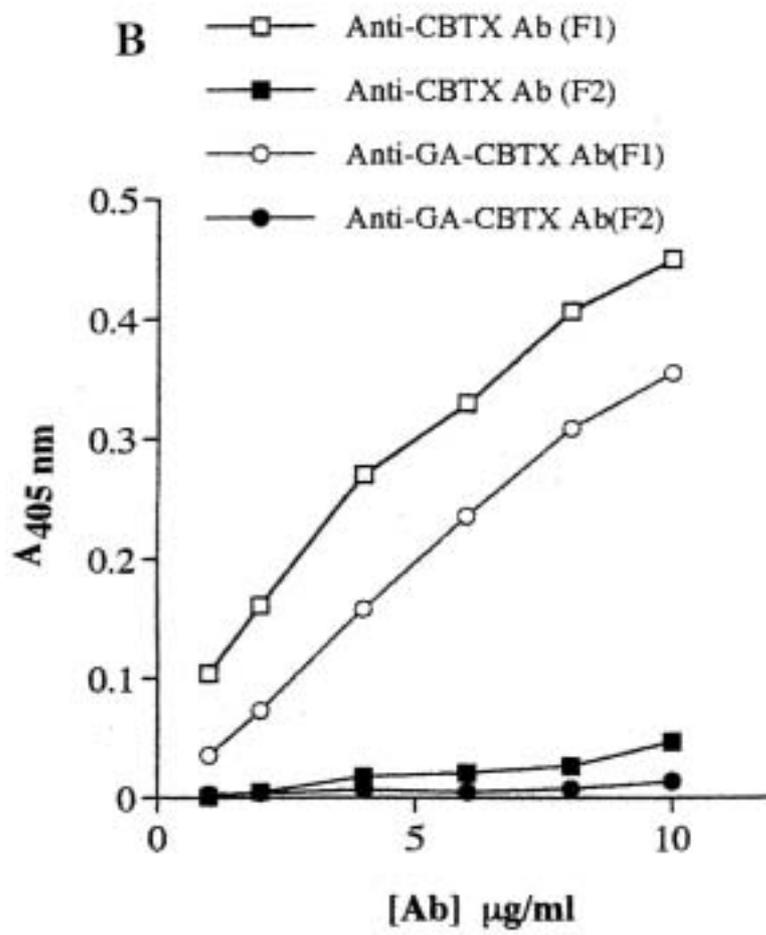


圖 6. 以親和性層析管柱純化 Anti-cobrotoxin 抗體及 Anti-GA-cobrotoxin 抗體與 cobrotoxin 及重組 (C4354S) cobrotoxin 之免疫反應性

(A) 取 0.01 mg/ml 之 50  $\mu\text{l}$  cobrotoxin 或 (B) (C4354S) cobrotoxin coating 於 ELISA plates 後，分別加入不同濃度  $F_1$  及  $F_2$  分割之抗體 (由圖五純化所得)，每一數據為三重覆實驗平均所得。



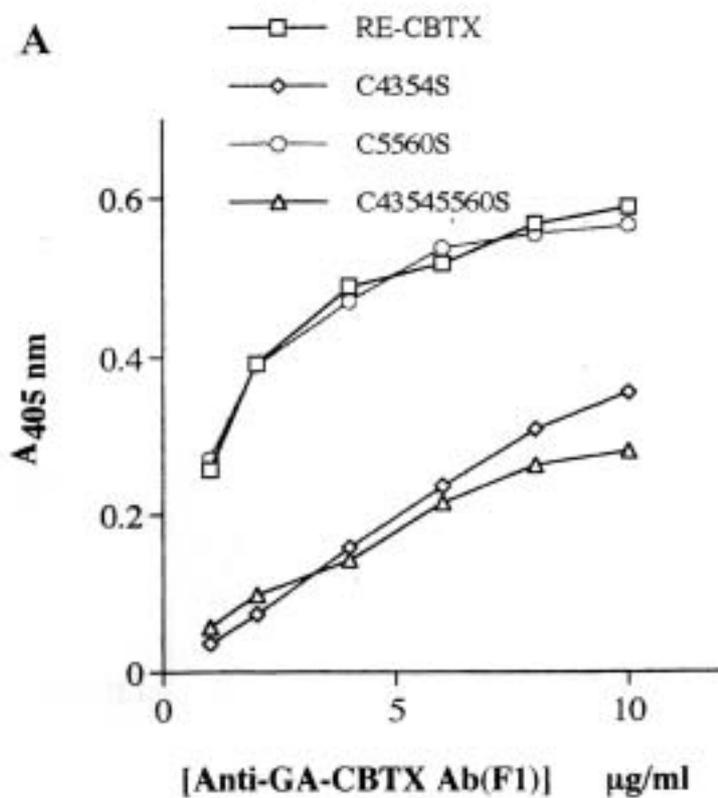
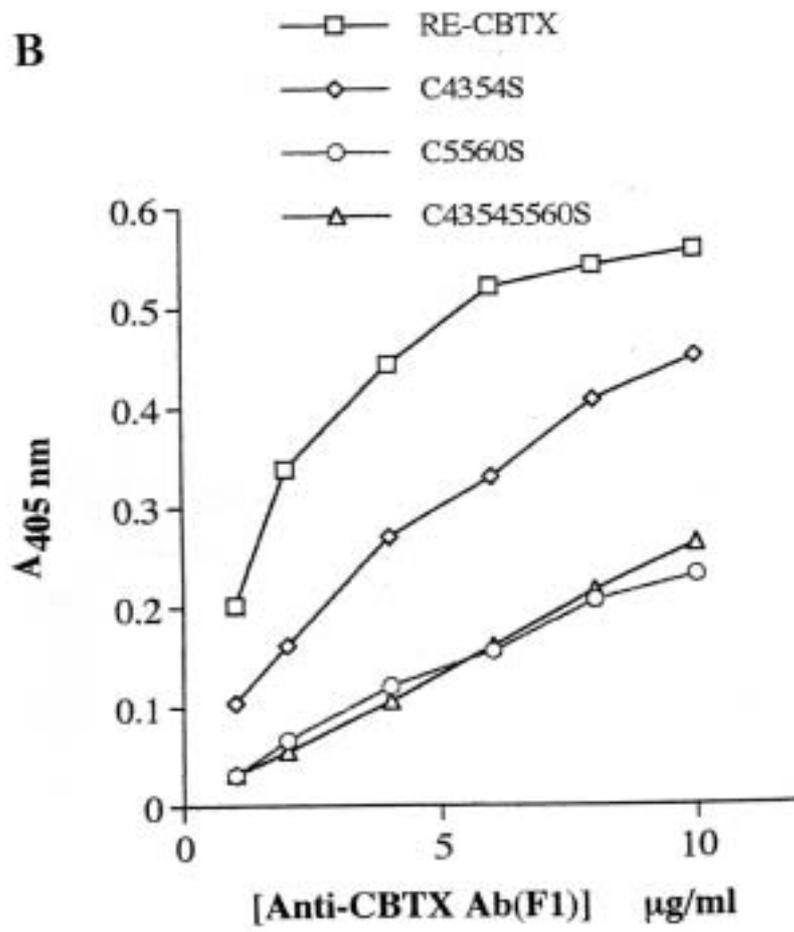


圖 7.偵測以親和性層析管柱純化之 Anti-cobrotoxin 抗體及 Anti-GA-cobrotoxin 抗體與重組 cobrotoxin 蛋白及 C-terminal 雙硫鍵突變蛋白之反應性。

(A) Anti-cobrotoxin 抗體(F<sub>1</sub>) (B) Anti-GA-cobrotoxin 抗體(F<sub>1</sub>)，每一數據為三重覆實驗平均所得。



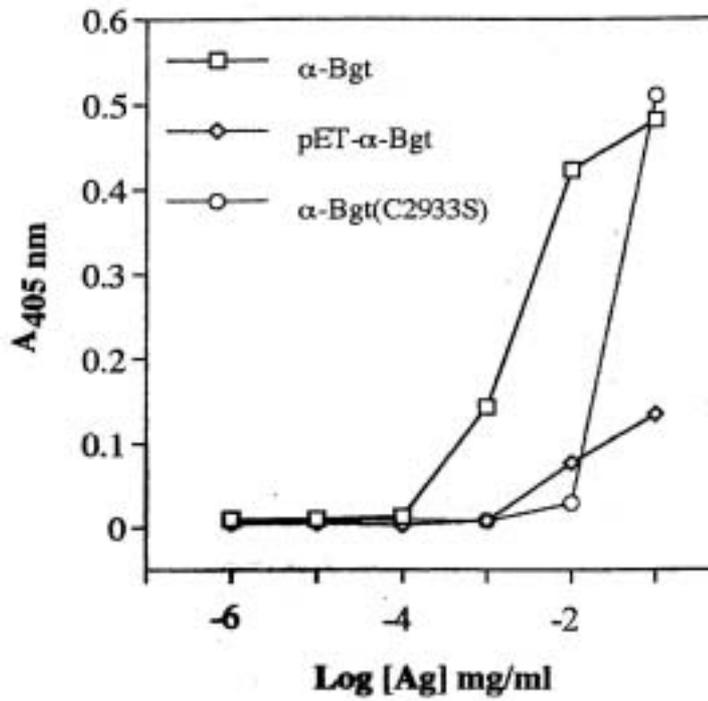


圖 8.偵測 $\alpha$ -Bungarotoxin 抗血清與 $\alpha$ -Bungarotoxin，重組蛋白及突變蛋白之反應性。

抗血清濃度為稀釋 2000 倍，不同濃度抗原 coating 於 ELISA plates，每一數據為三重覆實驗平均所得。

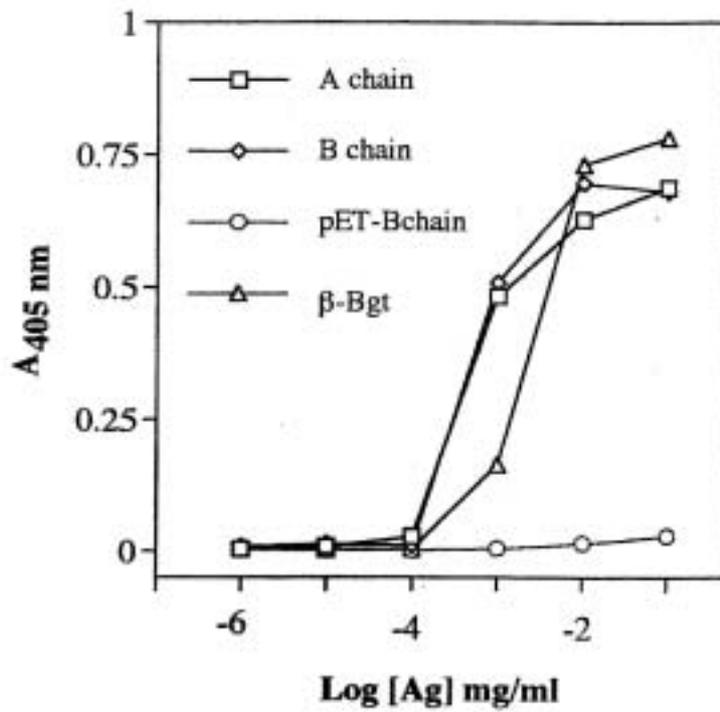


圖 9.偵測β-Bungarotoxin 抗血清與β-Bungarotoxin 及重組蛋白 A 鏈，B 鏈及含 fusion 蛋白 B 鏈之反應性

β-Bungarotoxin 抗血清濃度為稀釋 2000 倍，每一數據為三重覆實驗平均所得。

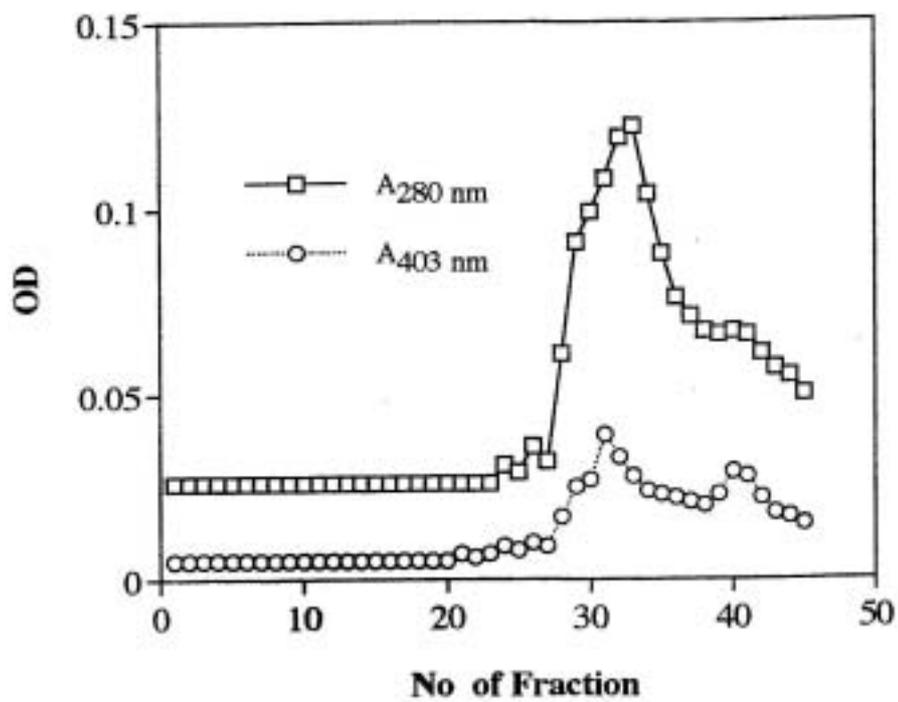


圖 10.山葵過氧化酶與 Anti-cobrotoxin 連接反應後，以 S-200 管柱進行純化。

反應混合物放入 S-200 管柱 (2.8 cm × 110 cm)，流速為 50 ml / hr，每一分劃收集 10 ml。

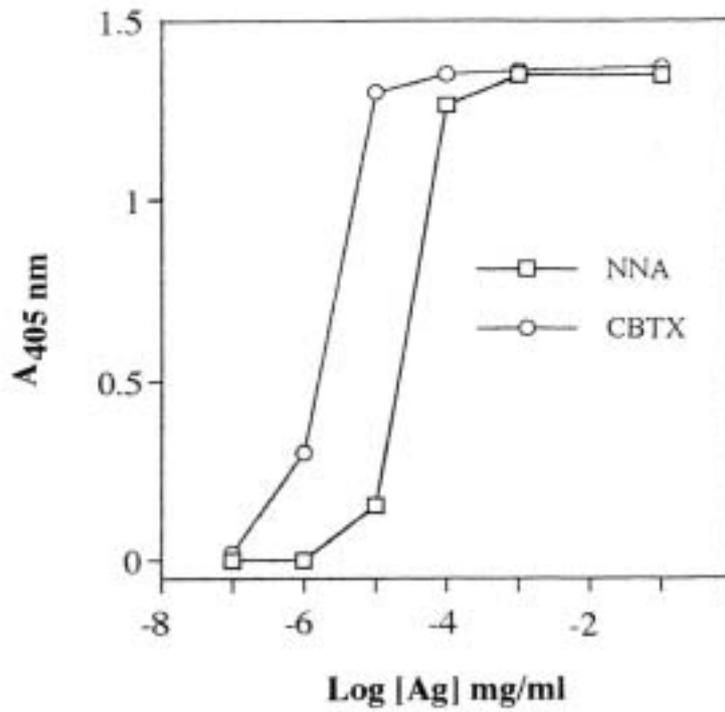


圖 11.以雙抗體三明治酵素連結免疫反應試驗分析台灣眼鏡蛇組蛇毒及純化 CBTX 之免疫反應性。

HRP 標定之 Anti-CBTX 抗體，稀釋 100 倍後使用。

A

Cobrotoxin    NNA  
                  Venom        BM  
                                  venom        mg/ml



B

PLA2            NNA        BM  
                  Venom        venom        mg/ml



C

Cardiotoxin    NNA        BM  
                  venom        venom        mg/ml



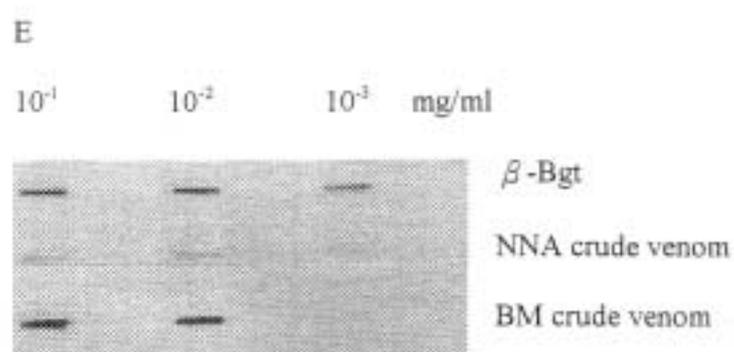
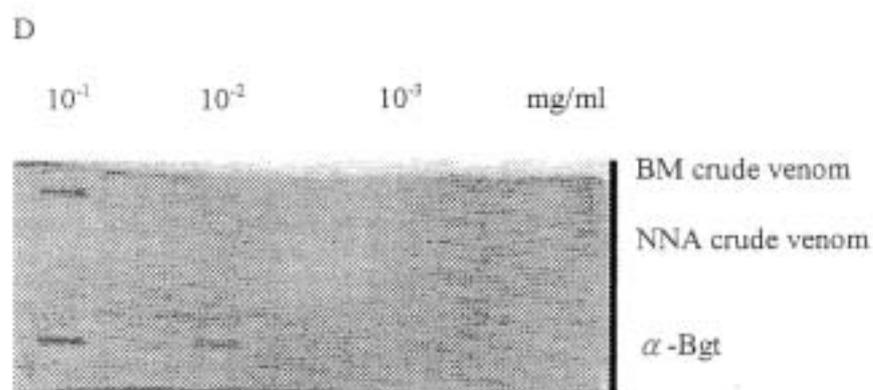
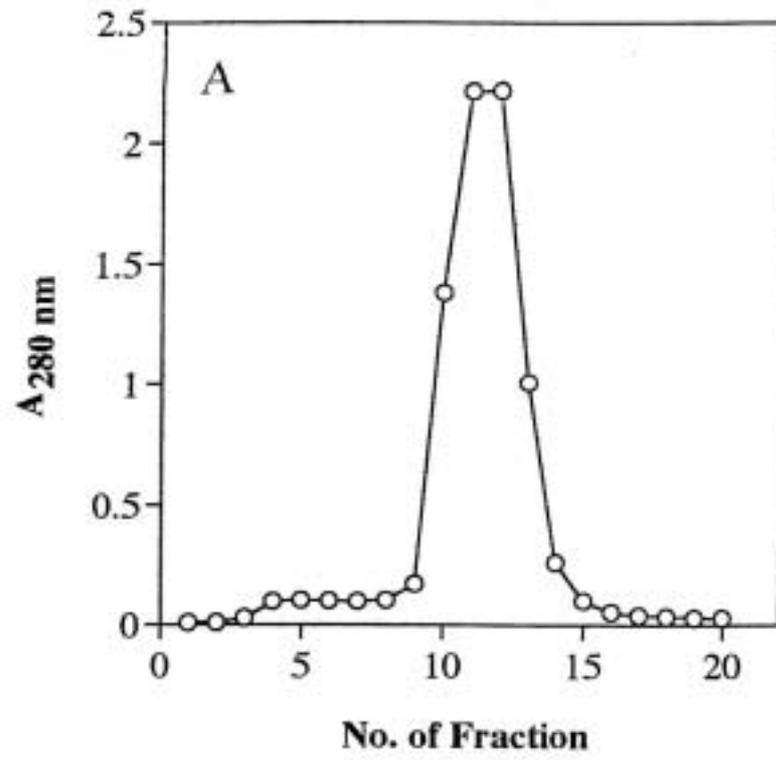


圖 12. 以免疫點墨法偵測抗體與純化蛇毒蛋白，台灣眼鏡蛇及台灣兩傘節粗蛇毒之反應。

使用(A) Anti-cobrotoxin 抗體 (B)Anti-PLA2 抗體 (C) Anti-cardiotoxin 抗體 (D)Anti- $\alpha$ -Bungarotoxin 抗體(E) Anti- $\beta$ -Bungarotoxin 抗體進行反應。



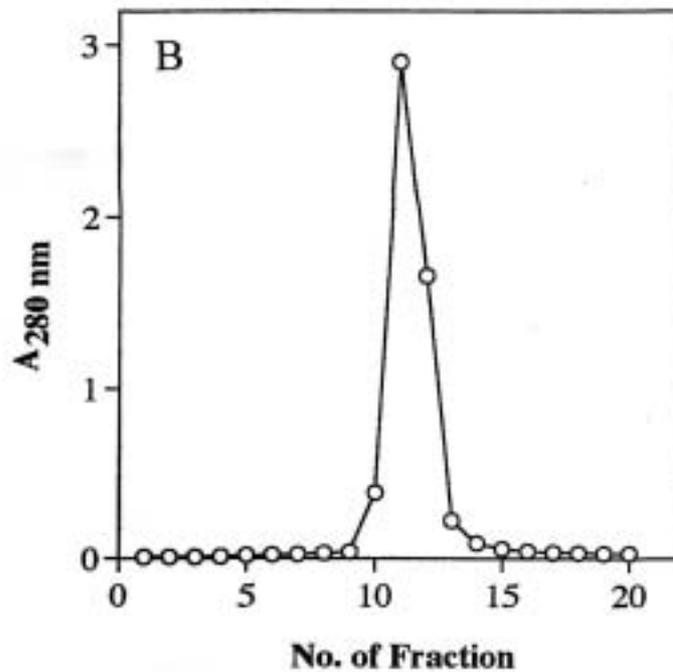
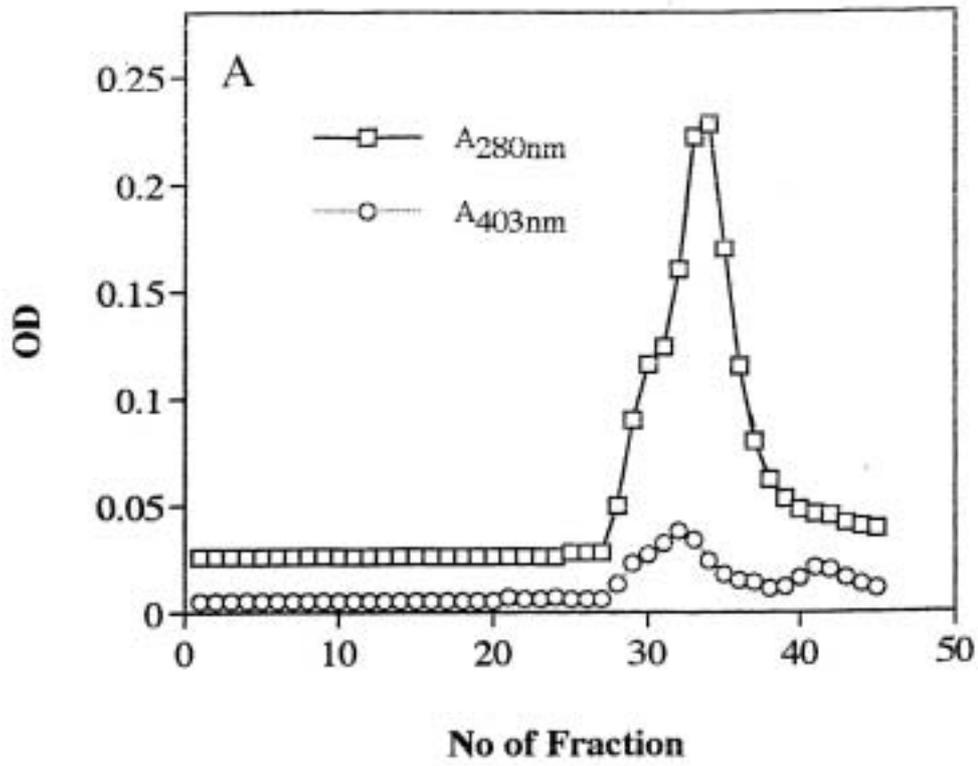


圖 13. 以 Protein A 親和性管柱純化 Anti-CTX 抗體及 Anti-β-Bgt 抗體。

將 (A) Anti-CTX 抗血清及 (B) Anti-β-Bgt 抗血清分別通過 Protein A-Sepharose CL-6B 親和性層析管柱，在 280 nm 偵測，收集蛋白質分割冷凍乾燥。



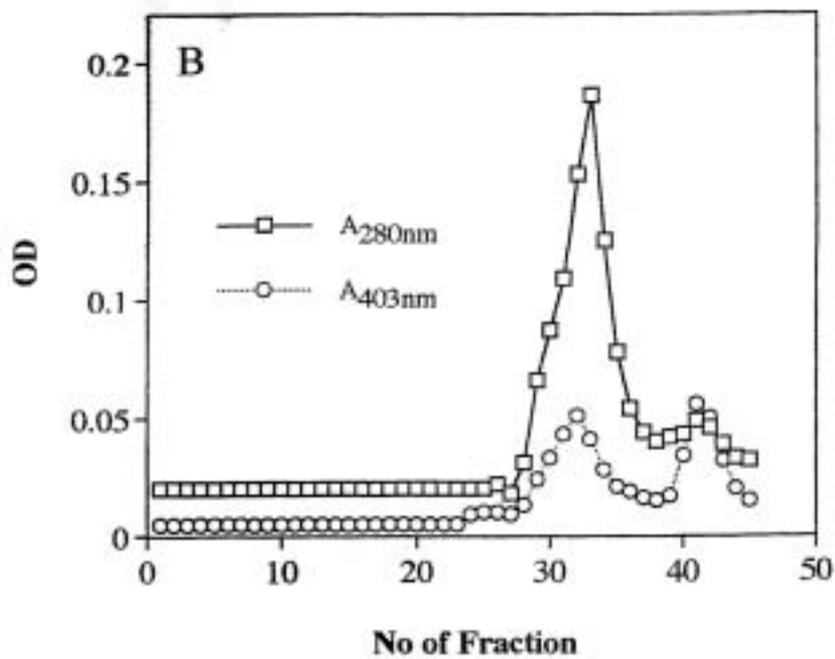


圖 14. 山葵過氧化酶與 Anti-CTX 抗體或 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體連結反應後，以 S-200 Sephacel 管柱純化。

Anti-CTX 抗體與 HRP 的反應混合物(A)或 Anti- $\beta$ -Bgt 抗體與 HRP 的反應混合物(B) 放入 S-200 管柱 (2.8 cm $\times$ 110 cm)，流速為 50 ml/hr，每一分劃收集 8 ml。

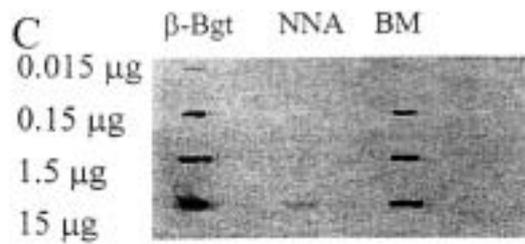
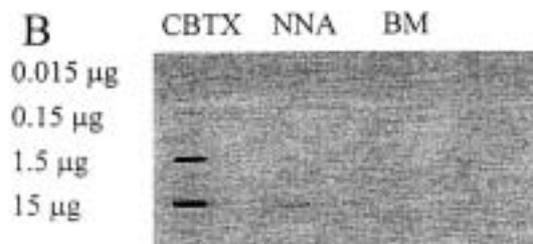
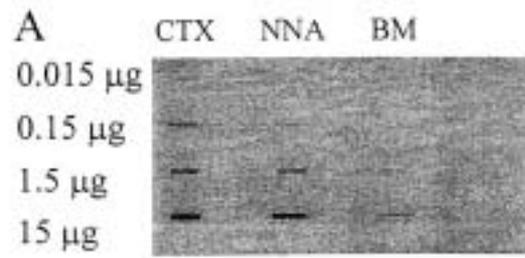


圖 15. 以標定 HRP 之抗體用於免疫墨點法偵測粗蛇毒及純化蛇毒之免疫反應性。

使用(A)HRP-Anti-CTX 抗體，(B)HRP-Anti-CBTX 抗體及(3)HRP-Anti- $\beta$ -Bgt 抗體進行反應；此一偵測不需再使用 HRP-Protein A。