

計畫編號：DOH92-DC-2017

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

開發以鴨蛋生產抗飯匙倩 IgY 抗體  
Development of cobra antivenin from the egg yolk of  
immunized ducks

## 研究報告

執行機構：血清疫苗研製中心

計畫主持人：江正榮、

研究人員：連偉成、楊素鈴、郭旭英、張瑞原

執行期間：92年1月1日至92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

中文摘要	3
英文摘要	4
前言	5
材料與方法	5
一、IgY 抗體製備	5
(一)蛇毒抗原之製備	5
(二)實驗鴨	5
(三)動物免疫方式	6
(四)動物免疫方式與時程	6
(五)鴨蛋收取	7
二、IgY 之萃取(extraction)及純化(purification)	7
(一)硫酸銨沈澱法(Ammonium sulfate salting out)	7
(二)親和性管柱純化(Affinity purify purification)	7
三、抗體效價測定法	7
(一)蛇毒抗原之毒力測定	7
(二)抗蛇毒血清效價測定	7
(三)毒力對照	7
(四)效價計算方式	8
四、IgY 抗體檢測系統	8
(一)蛋白質濃度之測定	8
(二)雙向免疫擴散試驗(Ouchterlony double diffusion)	8
(三)酵素連結免疫反應系統(ELISA)	8
(四)蛋白質電泳(SDS-PAGE)	8
(五)銀染色法(SILVER STAIN)	8
(六)西方墨點法(Western blot)	9
結果	9
一、蛇毒毒力測定	9
二、IgY 之萃取(extraction)及純化(purification)	9
(一)硫酸銨沈澱法之 SDS PAGE 結果	9
(二)親和性管柱純化圖譜	9
(三)銀染色法(SILVER STAIN)	9
三、抗體效價測定	10

(一)抗蛇毒血清效價測定.....	10
四、IgY 抗體檢測系統.....	11
(一)雙向免疫擴散試驗(Ouchterlony double diffusion) .....	11
(二)酵素連結免疫反應系統(ELISA).....	11
(三)西方墨點法(Western blotting).....	12
討論.....	12
參考文獻.....	15
圖次.....	17
表次.....	24

## 中 文 摘 要

目前本局製造之抗蛇毒血清是以減毒性的蛇毒免疫馬匹，經採血分離出血清，純化精製得之。該生產方式成本較高，且馬分離出之抗蛇毒血清蛋白常會引起患者補體調節免疫反應、血清病及過敏性休克等副作用。利用禽類蛋黃精製純化所得之抗蛇毒免疫球蛋白(yolk immunoglobulin : IgY)，不僅副作用較小且生產成本較低，所以本計畫的目的是以飯匙倩蛇毒為免疫抗原，鴨子為免疫動物，生產抗飯匙倩 IgY 抗體。首先使用硫酸銨沉澱法(Ammonium sulfate precipitation)進行初步純化，IgY  $\Delta$ Fc 純度可達到 96 % 以上，再進一步使用親和性管柱純化(Affinity column purification)，在低蛋白質濃度時就能達到好的中和效價。在檢驗 IgY 抗體專一性方面，在雙向免疫擴散試驗和西方點墨試驗法都獲得證實。為快速利用體外方式檢測抗體效價的變化情，我們亦建立 ELISA 檢測系統，以無毒化蛇毒免疫時，抗體約在 12-14 週達到最高，然後持續下降，約到 19 週以後中和效價降至最低點。另外動物免疫實驗結果顯示，以 1mg、2mg、3mg、5mg、10mg 每兩週無毒化蛇毒免疫鴨，在第 12 週開始收取鴨蛋萃取純化，IgY 抗體以 IgY Fc 為主，如要達到 60MLD 以上的效價時，在未利用親和性管柱純化時，建議蛋白質含量要在 30mg 以上，若以親和性管柱純化後的抗體，建議蛋白質含量要在 20mg 以上。

**關鍵字：**飯匙倩蛇毒、鴨子、IgY、硫酸銨沉澱法、親和性管柱純化

## 英文摘要

Up to the present, the antivenin is prepared and purified from blood of horses that immunized with detoxified venom in CDC. It is known that aggregation of proteins during antivenin production can result in complement mediated side effects, serum sickness and anaphylactic shock upon administration to human beings. The production of yolk immunoglobulin from avian has been found low cost and side effects. The aim of this study is to develop production process of cobra antivenin from the egg yolk of immunized ducks. The first step of purification used ammonium sulfate precipitation and the purity of IgY  $\Delta$ Fc can reach 96%. IgY  $\Delta$ Fc also had good minimal lethal dose (MLD) after the second purification step by using affinity column method. The specificity of IgY was confirmed by Ouchterlony double diffusion test and Western blotting. In order to quickly screen the neutralization titer of IgY  $\Delta$ Fc, we also developed ELISA system. The results showed that the neutralizing response of IgY  $\Delta$ Fc reach the peak at the 12<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> week, then it started to decline after the 19<sup>th</sup> week. According to the experimental data, the proper immunization program was to administrate duck with 1mg, 2mg, 3mg, 5mg and 10mg every two weeks separately, then it started to collect egg at the 12<sup>th</sup> week after first immunization. The main type of IgY after purification process is IgY  $\Delta$ Fc. In order to reach 60MLD, the results implied that it required at least 30mg of IgY  $\Delta$ Fc protein purified by ammonium sulfate precipitation, but the concentration of antibody purified by ammonium sulfate precipitation and affinity column method only need 20mg.

**Keyword: cobra, IgY, Duck, ammonium sulfate, affinity**

# 前 言

一般抗蛇毒血清之製做是將蛇毒減毒後免疫動物，再取得多價抗體 (polyclonal antibody) 以供醫療急救用。目前本局製造抗蛇毒血清是以減毒性的蛇毒免疫馬匹，經採血分離出血清，純化精製得之。由於馬匹飼養花費昂貴，以致抗蛇毒血清成本隨之提高，加上由馬分離出之抗蛇毒血清蛋白常會引起傷者補體調節免疫反應 (complement mediated side effects)、血清病 (serum sickness) 及過敏性休克 (anaphylactic shock) 等副作用，且必須考量動物保育之世界趨勢，因此開發一符合經濟性、安全性與有效性抗蛇毒免疫球蛋白必然是未來發展的重要方向。

禽類屬於較低等之脊椎動物，以鴨為例，母鴨除了血清含有抗體，這些抗體也會傳送到鴨蛋的蛋黃部份，它們被稱為蛋黃免疫球蛋白 (yolk immunoglobulin : IgY)，若連續施打抗原，相對應之抗體更會高度集中於蛋黃中。目前的動物實驗結果得知 IgY 可取代哺乳類因被動免疫細菌、病毒而產生之免疫球蛋白，響尾蛇毒亦可被 IgY 中和。此外 IgY 分子結構與哺乳類免疫球蛋白略有差異，以至於不會引發有害人體的補體反應。因此與由馬產生的抗蛇毒血清比較，鴨蛋純化所得之抗蛇毒免疫球蛋白不僅對患者副作用較小且生產成本較低。本計畫將以研發飯匙倩 IgY 抗體為主，並建立免疫球蛋白純化步驟，進而與馬匹之抗蛇毒血清做中和力價及蛇毒抗原結合性質之比較，若評估 IgY 效價良好，則更進一步探討以 IgY 方式生產其它抗蛇毒抗體並建立被動免疫抗體之生產模式。

## 材 料 與 方 法

### 一、IgY 抗體製備

#### (一) 蛇毒抗原之製備

- 1、無毒化蛇毒：以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液將飯匙倩蛇毒配製成 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，呈現乳白色膠狀，即可。
- 2、未無毒化蛇毒：以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液將飯匙倩蛇毒配製成 1mg/ml 溶液。

#### (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)，

小鴨出生後第 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。在蛇毒抗原免疫前，先收集 20 顆鴨蛋及採血 2ml 做為實驗對照組。

(三)動物免疫方式：

第一次免疫以與蛇毒同體積之 complete adjuvant 當作佐劑，以肌肉注射方式免疫，第二次以後之免疫以與蛇毒同體積之 incomplete adjuvant 當作佐劑，以皮下注射方式免疫。

(四)動物免疫方式與時程：

1、無毒化蛇毒：

(1)鴨號：F04 免疫時程

免疫注射時間(週數)	0	2	4	6	8	22
劑量(mg/duck)	1	2	3	5	10	5

(2)鴨號：G10、H02 免疫時程

免疫注射時間(週數)	0	2	4	6	8	12
劑量(mg/duck)	1	2	3	5	10	5

(3)鴨號：G11、H03 免疫時程

免疫注射時間(週數)	0	2	4	6	8	10
劑量(mg/duck)	3	2	2	2	2	2

2、未無毒化蛇毒：

(1)鴨號：F05、F06、F07、F08 免疫時程

免疫注射時間(週數)	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	29	33
劑量(mg/duck)	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

(F06 第 29、33 週末補強，F07 第 22 週末補強)

(2)鴨號：\*10 免疫時程

免疫注射時間(週數)	0	2	4	6	8	10	12
劑量(mg/duck)	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5

(3)鴨號：G12、G13、H04、H05 免疫時程

免疫注射時間(週數)	0	2	4	6	8	10	12
劑量(mg/duck)	1	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5

(由於 G12 在第 3 劑施打後死亡，其餘亦有不適現象，故第 4 劑後減量為 0.5 mg/duck，G12 無免疫蛋收集)

(4)鴨號：G14、G16、H06 免疫時程

免疫注射時間(週數)	0	2	4	6	8	12
劑量(mg/duck)	1	2	1	0.5	0.5	0.5

(兩劑施打後鴨隻皆有不適現象，且 G16 及 H06 在第 2 劑施打後死亡，故第 3 劑降為 1 mg/duck，但仍有不適現象，故第 4 劑後減量為 0.5 mg/duck、僅 G14 有免疫蛋收集)

## (五)鴨蛋收取：

免疫後第 5 週後開始收取鴨蛋，使用蛋白蛋黃分離器將蛋黃分離出來。一棵鴨蛋重約 60-70g，鴨蛋黃體積約 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。

## 二、IgY 之萃取(extraction)及純化 ( purification)

### (一)硫酸銨沉澱法(Ammonium sulfate salting out)

將蛋黃分離出來後，經過 Delipidization、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salting out、Dialysis 及 Concentration 等步驟完成 IgY 初步純化。

### (二)親和性管柱純化(affinity column method)

進一步純化使用 CNBr-Activated Sepharose 與 Native cobra venom protein 進行 Coupling，得到 Affinity matrix，此時再加入鴨子抗飯匙倩蛇毒抗體進行 Affinity isolation，收集 Elution 出的抗體，再經過 Dialysis、Concentration 等步驟完成 IgY 親和性管柱純化。

## 三、抗體效價測定法

### (一)蛇毒抗原之毒力測定

將蛇毒以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液稀釋成三種等差稀釋液，每一種稀釋液由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻，每支 0.2ML。觀察 48 小時，紀錄死亡隻數並求出最低致死劑量(minimal lethal dose，MLD)。

### (二)抗蛇毒血清效價測定

將抗蛇毒血清以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液稀釋成三種等差稀釋液，每一種稀釋液取 0.6mL 與每 0.2mL 含 4MLD 之上述蛇毒溶液 0.6mL 混合，於 37 放置 60 分鐘後，以進行中和試驗。再由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻，每隻 0.2mL。觀察 48 小時，紀錄死亡隻數及存活隻數，並計算其效價。

### (三)毒力對照

測定抗蛇毒血清中和效價之同時，另以 0.5、1.0 及 1.5MLD 之蛇毒溶液，由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻方法與(一)同，注射 1.0 及 1.5MLD 之小白鼠應全部死亡。



#### (四)效價計算方式

$$\text{效價(MLD/mL)} = 4\text{MLD}/0.2\text{mL} \times \text{血清稀釋倍數}$$

### 四、IgY 抗體檢測系統

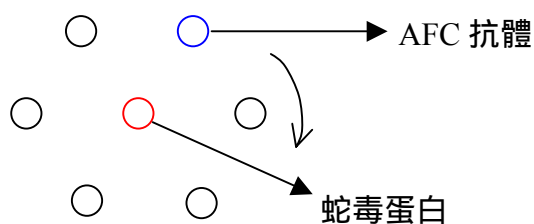
#### (一)蛋白質濃度之測定

取樣品及 Bovine Serum Albumin 之標準液  $50\mu\text{m}$ ，至入 96 孔微量盤中，加入 Bradford reagent  $150\mu\text{m}$ ，震盪 30 秒，於波長 595nm 測定其吸光值。

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

中間 well 內為蛇毒蛋白抗原，環繞的六個 well 內均為抗體，但濃度自右上第一個 well 起，以順時針方向作二倍稀釋遞減。

各抗體均可見清楚沉澱線(precipitation line)。



#### (三)酵素連結免疫反應系統(ELISA)

純化的 IgY, IgY( $\Delta$ Fc)抗體均先調整濃度至 1mg/ml 再作稀釋。抗原:蛇毒蛋白 500ug/well。一級抗體:將 AFC 抗血清和純化抗體作 1000x, 10000x 稀釋。二級抗體: HRP conj. rabbit Anti-duck IgY, 5000x 稀釋。

#### (四)蛋白質電泳(SDS-PAGE)

純化之樣品以 8%梯度的正十二烷硫酸鈉 - 聚丙烯醯胺膠體，在電壓 200 伏特之下做電泳分離 90 - 120 分鐘，之後以 Coomassie blue 染色方式分析蛋白質電泳的情況。

#### (五)銀染色法(SILVER STAIN)

純化之樣品經過蛋白質電泳後，將 IgY 樣品加入同體積之 sample buffer，混合均勻後置於沸水浴中 10 分鐘，之後迅速放在冰上冷卻。將樣品 loading 至各 well 內進行電泳，1.5 小時後拿出膠片，浸泡於 50 % Methanol 1 小時。將膠片浸入銀染溶液中，置於平台振盪器，振盪 15 分鐘，再以純水洗膠片 5 分鐘。再將膠片浸於呈色溶液中，置於平板振盪器上輕微振盪，待被染色的蛋白質出現時，即停止呈色動作，再

將膠片以大量純水沖洗後，以 50 % Methanol 停止反應約 30 分鐘。之後將膠片浸於純水中，並觀察染色情形。

#### (六)西方墨點法(Western blot)

純化之樣品經過蛋白質電泳後，利用 Semi - phor 半乾式轉移槽，將蛋白質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蛇毒抗體於纖維膜上，在 37 保溫箱中作用 2 小時，以 0.1% Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之 HRP - conjugated goat anti - mouse IgY 抗體，在 37 保溫箱中作用 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。

## 結 果

### 一、蛇毒毒力測定

使用 ICR 小鼠做飯匙倩蛇毒毒力測定，1MLD 的蛇毒劑量為 0.06 mg/mL。

### 二、IgY 之萃取( extraction )及純化 ( purification )

#### (一) 硫酸銨沉澱法之 SDS PAGE 結果(Fig1)

鴨蛋每顆約可產生 50-100mg 抗飯匙倩 IgY 抗體，而目前純化後約可得到 96% 純度之抗飯匙倩 IgY( $\Delta$ Fc) 抗體。

#### (二) 親和性管柱純化圖譜(Fig2 和 Fig3)

如 Fig2 可知，洗出後之產物為我們所需之產物，進行 SDS-PAGE，以 blue stain 來觀察抗體純度。在親和性管柱純化後可得到純度 > 99% 之抗飯匙倩 IgY $\Delta$ Fc 抗體。

如 Fig3 可知，洗出後之產物為我們所需之產物，去做銀染色。

#### (三) 銀染色法(SILVER STAIN)

如 Fig4 5 6 7 可知，可見 62KD IgY HEAVY CHAIN, 38KD IgY Fc HEAVY CHAIN, 28KD LIGHT CHAIN。而馬血清主要為 IgG, 50KD 是 HEAVY CHAIN, 25KD 是 LIGHT CHAIN。由圖比較 IgY、IgY Fc、親和性管柱純化 IgY 及親和性管柱純化 IgY Fc 時，等量之抗體蛋白質其 62KD 的量有變少的趨勢，可證實親和性管柱的純化效益。在未親和性管柱純化時 62KD 和 38KD 之 Band 下一小條 Band，可能是

在萃取 IgY 鹽析步驟時產生的小分子，在進一步親和性管柱純化後就不會產生。在 28KD 的 Band 顏色較淺，應該是 LIGHT CHAIN 聚集很多的原因。

### 三、抗體效價測定

#### (一)抗蛇毒血清效價測定

##### 1、無毒化蛇毒：

F04、G10 和 H02 之免疫計畫每兩週免疫劑量為 1mg、2mg、3mg、5mg、10mg。F04 在 10mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 為  $20 \leq X < 40$ ；在 19.23 mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 為  $X < 48.75$ ，推估當 IgY-Fc 蛋白質濃度為 30mg/ml 時，MLD 應可為 60。親和性管柱純化之 IgY-Fc 蛋白質濃度為 18.9mg/ml 時，MLD 可達 60。而在免疫後 19-25 週時，在 32.57 mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 還是小於 20，抗體力價已明顯下降。G10 在 30.83mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 為  $40 \leq X < 60$ ，不過在 H02 在 28.29mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 為  $60 \leq X$ ，這證明 IgY-Fc 蛋白質濃度為 30mg/ml 時，MLD 應可為 60，不過 H02 之 MLD 還不到 60，表示在純化技術上還有進步空間，而樣品數少也可能造成樣品的不一致性，未來還要在多做幾次重複試驗以驗證。G10 在親和性管柱純化之 IgY-Fc 蛋白質濃度為 19.39mg/ml 時，MLD 可達 60，跟 F04 狀況相同，而 H02 在親和性管柱純化之 IgY-Fc 蛋白質濃度為 14.26mg/ml 時，MLD 為  $40 \leq X$ ，所以親和性管柱純化後，IgY-Fc 蛋白質濃度還是需要在 20mg/ml 時，MLD 才能達到 60。

G11 和 H03 之免疫計畫每兩週免疫劑量為 3mg、2mg、2mg、2mg、2mg。G11 在 27.71mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 為  $40 < X < 60$ ，不過 H03 在 32.50mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 為  $60 \leq X$ ，而親和性管柱純化之 IgY-Fc 蛋白質濃度為 17.22mg/ml 時，MLD 為  $60 \leq X$ ，未來還要在多做幾次重複試驗及比較以驗證何者免疫計畫較好。

##### 2、未無毒化蛇毒：

F05 在 10mg/ml 和 19.49mg/ml 蛋白質濃度的 IgY-Fc，MLD 都為  $20 < X$ 。而親和性管柱純化之 IgY-Fc 蛋白質濃度為 32.23mg/ml 時，MLD 為  $X < 40$ ，而 F06、F07、F08 大多都小於 20。

\* 10 和 H04 IgY-Fc 蛋白質濃度分別為 31.28mg/ml 和 32.75mg/ml 時，MLD 都為  $X < 40$ ，效果都不如免疫無毒化蛇毒。而 \* 10 親和性管柱純化之 IgY-Fc 蛋白質濃度為 26.63mg/ml 時，MLD 為

$40 \leq X < 60$ ，效果還是不如免疫無毒化蛇毒。

### 3、蛇毒免疫綜合比較：

在接近 20mg/ml 蛋白質濃度的 IgY Fc 來做比較，無毒化蛇毒免疫之 F04 MLD 為  $20 < X \leq 40$ ；未無毒化蛇毒免疫之 F05 MLD 為  $X < 20$ 、F08 MLD 為  $X < 20$ 。所以無毒化蛇毒免疫會得到較好的免疫效果。

在接近 30mg/ml 蛋白質濃度的 IgY Fc 來做比較，無毒化蛇毒免疫之 G10 MLD 為  $40 < X < 60$  H02 MLD 為  $60 \leq X$  G11 MLD 為  $40 < X < 60$  H03 MLD 為  $60 \leq X$ ；未無毒化蛇毒免疫之 H04 MLD 為  $X < 40$  H05 MLD 為  $X < 40$ 、\* 10 MLD 為  $X < 40$ ，所以無毒化蛇毒免疫會得到較好的免疫效果。

以第一次免疫後取蛋週數之 MLD 比較，以無毒化蛇毒免疫時，從 Tab12 得知，12~14 週採蛋的雖比 8~10 採蛋的 MLD 低，不過 12~14 週之樣品數不多，還需再做多次實驗證明，而從 Tab15 得知，19-25 週採蛋的甚至 MLD 還小於 20，在對照 ELISA 圖時，無毒化蛇毒，總體來說，都在 12-14 週抗體力價可達到最高。

以未無毒化蛇毒免疫時，總體來說，未無毒化蛇毒免疫時比無毒化蛇毒免疫時之 ELISA 都較低，這也符合動物中和試驗結果，未來還需再加強 ELISA 的檢驗技術，以確定抗體檢測知準確，且未來還需做免疫蛇毒後鴨子的抗體消長圖，以得知鴨子的蛇毒血清持續時間。

無毒化蛇毒免疫建議使用每兩週免疫劑量為 1mg、2mg、3mg、5mg、10mg。從 12~14 週開始採蛋，在未親和性 IgY Fc 的蛋白質濃度應為 30mg/ml，在親和性管柱純化之 IgY Fc 蛋白質濃度應為 20mg/ml。

## 四、IgY 抗體檢測系統

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

由 Fig8 可知，各抗體均可見清楚沉澱線(precipitation line)，可見本實驗之 IgY 抗體對蛇毒有專一性。

### (二)酵素連結免疫反應系統(ELISA)

#### 1、測試 F04、F05、F06、F07 和 F08 是否對飯匙倩蛇毒有反應

由 Fig9 可知，這試驗證明鴨子免疫飯匙倩蛇毒可以產生抗飯匙倩的抗體。

#### 2、測試各別鴨子之無毒化抗飯匙倩蛇毒 IgY 及 IgY Fc 之消長

F04 之 IgY Fc 在 12 週達到高點，後來就持續下降。G10 之

IgY Fc 則在 14 週達到高點，後來就維持一個持平狀態。H02 之 IgY Fc 在 14 週達到高點，後來有下降不過在 19 週時又上升，其原因可能是當初在做時所用的 2 抗是以 IgY 為主，所以會以 IgY 較高，不過後來使用以 IgY Fc 為主的 2 抗後，ELISA 效價就以 IgY Fc 較高。G11 之 IgY Fc 在 6 週達到高點。H03 之 IgY Fc 在 6 週達到高點，後來就持續下降。總體來說，都在 12-14 週抗體力價可達到最高，這也符合動物中和試驗結果。

### 3、測試各別鴨子之未無毒化抗飯匙倩蛇毒 IgY 及 IgY Fc 之消長

F05 之 IgY Fc 則在 13 週達到高點，在 22 週時又有上升，這與在 Tab 5 中得知 19-25 週採蛋的 MLD 還可達到  $20 \leq X < 40$  之結果符合。F06 之 IgY Fc 在 13 週達到高點。F07 之 IgY Fc 在 11 週達到高點，後來就維持一個持平狀態。F08 之 IgY Fc 在 12 週達到高點。\*10 之 IgY Fc 在 9 週達到高點 H04 之 IgY Fc 在 6 週達到高點 H05 之 IgY Fc 在 6 週達到高點。總體來說，未無毒化蛇毒免疫時比無毒化蛇毒免疫時之 ELISA 都較低，這也符合動物中和試驗結果。

綜合以上無毒化和未無毒化之結果，未無毒化蛇毒免疫時比無毒化蛇毒免疫時之 ELISA 都較低。無毒化蛇毒免疫建議使用每兩週免疫劑量為 1mg、2mg、3mg、5mg、10mg。從 12~14 週開始採蛋。

### (三)西方墨點法(Western blot)

由 Fig22、23、24、25 得知，抗飯匙倩 IgY 抗體及傳統抗飯匙倩馬血清都會認抗飯匙倩蛇毒。

## 討 論

毒蛇咬傷的急救方式以注射正確的抗蛇毒血清最為有效。急救過程中，一旦馬血清蛋白(horse serum proteins)進入人體，常引發三種副作用，即(1)抗補體反應(anticomplement 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<sup>(1)</sup>；(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<sup>(3)</sup>。另外目前生產抗蛇毒血清首先需從國外進口馬匹，且需要寬闊場地進行飼養管理等工作，每年有關動物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約為新台幣 5700 元；且由於利用馬匹生產相關血清製劑過程屬於侵犯性的性質，動物保育問題也必須加以考量，因此開發符合經濟性、安全性與有效性之新一代高效價抗蛇毒抗體有其重要性。

哺乳類動物免疫抗原之後，可產生相對應之抗體。其它的脊椎動物如鴨、雞，其被免疫後，除了在血清中可產生免疫球蛋白，並會傳送到蛋的蛋黃內，使之含有高濃度的抗體，故又被稱為蛋黃免疫球蛋白( yolk immunoglobulins)，簡稱 IgY。因此就製程而言，IgY 可經由蛋黃中分離出，是一種不需經由採血即可得到的抗體。鴨蛋之 IgY 在結構上與哺乳類 IgG 相類似，並可分為兩種形式：IgY 與 IgY( Fc)。前者之分子量大約 180KDa，後者約為 120KDa，兩者之不同在於後者在抗體分子之結構上仍包含二個重鏈(heavy chain)與二個輕鏈(light chain)部分，不過由於 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，也因此不會引發上述之抗補體反應。由文獻結果得知，被動免疫之實驗動物所分離出之 IgY 可對抗 rotaviruses 及 Enterotoxigenic E. coli 的感染，然而 IgY 應用於抗蛇毒免疫球蛋白的相關文獻卻極少，Thalley 及 Carroll (1990) 等人以響尾蛇蛇毒( Crotalus atrox rattlesnake venom )免疫母雞，動物實驗結果証實 IgY 的中和毒素效價良好。

親和性管柱純化系統時，是先使用飯匙倩蛇毒去附著於膠體上，然後再抓取專一性抗體，所以利用 Silver stain 檢測 IgY 純化技術純度方面，發現等量之抗體蛋白質其 62KD 相對的量有變少的趨勢，可能是 IgY Fc 的蛇毒的親和性比 IgY 好。

用飯匙倩蛇毒抗原進行最適免疫劑量分析時，以無毒化蛇毒和未無毒化蛇毒進行不同免疫方式比較時，在同樣為 10mg/ml 蛋白質濃度的 IgY 來做比較，無毒化蛇毒免疫之 F04 MLD 為  $20 \leq X < 40$ ；未無毒化蛇毒免疫之 F05 MLD 為  $X < 20$ 。無毒化蛇毒免疫效果較好的原因，可能是因為無毒化所免疫的抗原量較多的原因，而且利用 glutaraldehyde 無毒化時，可能該試劑鍵結於抗原可能造成免疫加成效應，未無毒化的蛇毒因為還有毒性，所以免疫劑量不能多，例如 G12、G16、H06 都在免疫後沒多久死亡，所以不建議使用未無毒化的蛇毒免疫。不過還需要再經過多次的重覆試驗和比較才能確定最佳免疫時程。

抗蛇毒 IgY Fc 要達到 60MLD 以上的效價時，在未親和性管柱純化時，建議蛋白質含量要在 30mg 以上，未來將進一步證實此結論，甚至精確計算出標準劑量，另外將以凍結乾燥或其他方式得到高濃度且純度高之 IgY Fc。以親和性管柱純化後的抗體，建議蛋白質含量要在 20mg 以上，經過親和性管柱純化後，單位抗體力價明顯上升，不過利用親和性管柱純化，

相對成本會提高。未來將大量生產以利精確地計算其相對劑量。

有關建立 ELISA 檢驗系統方面，主要目的是利用體外方式快速篩選 IgY Fc 中和效價，初步此系統所用的 2<sup>nd</sup> 抗是以 IgY 為主，所以檢測 IgY Fc 的效果不是十分顯著，接著利用 IgY Fc 為主的 2<sup>nd</sup> 抗，檢驗的靈敏度就增加。雖然整個檢驗結果趨勢和動物中和實驗結果大致符合，不過系統的變異性和穩定度仍待加強。未來對整個系統所需試劑將進一步修正改善，使此檢驗系統成為產程監測的一項好工具，甚至提供未來標準劑量建立的一項參考指標。

當以特殊抗原免疫母鴨，每個鴨蛋可生產出約 50-70 毫克的 IgY Fc 抗體，而針對抗原專一性之分子佔其中之 20-30%。若與免疫後之兔子比較，兔子每二週採血量約 15-20 毫升，其抗體含量只相當於一個鴨蛋蛋黃免疫球蛋白的三分之一或是一顆雞蛋免疫球蛋白的含量，而在相同時間，免疫母鴨或母雞可得到 12-15 顆蛋。據估計若以高抗原性之抗原 (immunogenic antigen) 免疫母雞，在一年的期間內，一隻免疫過母雞所生產的專一性抗體約同於 120 隻兔子的產量。依次類推，大型哺乳類動物，如馬，其一年可抽取 30 公升的全血(血清含量約 15 公升)，則略等於 7-10 隻母雞。另外在保存方面，IgY 以液態形式在 4℃ 中其安定性可達 10 年的時間。故以 IgY 製造生產抗蛇毒之免疫球蛋白若能研發成功，將可能取代現有之抗蛇毒馬血清，大大減低各種抗蛇毒血清之製造成本，從而節約公帑支出，及便於抗蛇毒抗體成為臺灣普及之醫療急救用品。

評估以鴨蛋生產 IgY 抗體效益，目前本局一年生產 5000-6000 劑之抗飯匙倩蛇毒血清，而以鴨蛋生產抗飯匙倩蛇毒 IgY 抗體，一劑約需 30mg IgYΔFc 抗體才可達到馬血清一劑 60MLD 的標準，目前一顆鴨蛋約可生產 50-100mg 抗飯匙倩總 IgY 抗體，而蛇毒免疫後 IgYΔFc 之量為總 IgY 抗體之四分之三，所以一顆鴨蛋約可生產 66mg 之 IgYΔFc 抗體，而檢驗之純化技術約可純化 IgYΔFc 至 95% 以上，所以一顆蛋約可生產 2 劑之抗飯匙倩蛇毒 IgYΔFc 抗體。一隻鴨一年可產 250-280 顆鴨蛋，免疫後約只有 8 週時間所產的蛋可以用來生產抗體，另考量各種外在因素以一年生產 50 顆有效蛋計，一年一隻鴨約可生產 100 劑之抗飯匙倩蛇毒 IgYΔFc 抗體，而要達到一年的生產量，只需要 60 隻以上的鴨子，而未來的實驗可以著眼於蛇毒免疫的補強，相信可以更降低飼養鴨子的隻數。不過除此之外還需考量一個免疫計畫所需使用的蛇毒量，一隻鴨子約需 15mg，60 隻鴨子就需 900mg；而馬基礎免疫加四次補強免疫計畫約需 240mg，而一年約需馬匹 4 隻，所以總蛇毒量需要 960mg。所以從飼養成本和免疫蛇毒量來比較，鴨 IgY 抗體比起傳統馬血清的成本都相對降低很多。

未來實驗工作將著重於 1、無毒化飯匙倩蛇毒免疫計畫的比較及再驗

證；2、免疫蛇毒後鴨子的抗體消長試驗；3、IgY Fc 濃縮技術之建立；4、IgY Fc 純化技術之修正；5、IgY Fc 量產技術之建立；6、IgY Fc 凍結乾燥技術之建立；7、成本效應分析等等。抗蛇毒 IgY Fc 抗體還需要長期的研究與發展，以取代馬之抗蛇毒血清。若評估 IgY 效價良好，則更進一步探討以 IgY 方式生產其他抗蛇毒抗體並建立被動免疫抗體之生產模式。

## 參 考 文 獻

- 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.
- Parrisg, H. M. and Hayes, R. H. 1970. Hospital management of pit viper venenations. *Clinical Toxicology* 3 (3) : 501-511
- Thalley, B. S. and Carroll, S. B. 1991. Rattlesnake and Scorpion antivenoms from the egg yolk of immunized hens. *Bio/Technology* 8 : 934-938.
- Victor, C. 2002. Duck antibodies for IVD applications. *IVD Technology*, April : 31-34.
- Bartz, C. R., Conklin, R.H., Tunstall, C. B., and J. H. Stesele. 1980. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* 142 : 439-441.
- Hiraga, C., Kodama, Y., Sugiyama, T., and Y. Ichikawa. 1990. Preventive of human rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 64 : 118-123.
- Yolken, R. H. , Leister, F., Wee, S.-B., Miskuff, R., and S. Vonderfecht. 1988. Antibodies to rotaviruses in chicken , egg : a potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption , *Pediatrics* 81 : 291-295.
- 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.
- Akita, E. M. and S. Nakai, 1992 Isolation and purification of immunoglobulins from egg yolk. *J. Food Sci.* 57, 629.
- Ambrosius, H. and D. Hadge, 1984 Rapid method of extraction of antibodies from hen yolk. *J. Immunol. Methods* 72, 421
- Hassl, A. and H. Aspöck, 1988 Purification of yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel



- filtration. *J. Immunol. Methods* 110, 225.
- Hatta, H., Kim, M. and T. Yamamoto, 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibodies " IgY " .*Agric.Biol. Chem.* 54, 2531.
- Polson, A., Von Wechmar, M. B. and M. H. V. Van Regenmortel,..1985 Improvements in the isolation of IgY from the yolk of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Inves.* 14, 323.
- Polson, A. 1990. Isolation of IgY from the yolk of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.* 19, 253-258.
- Antonio Verdoliva, Giancarlo basile, Giorgio Fassina (2000) Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J. Chromatography B.* 749 : 233-242.
- Akita ,E. M., and S. Nakai .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.

## 圖次

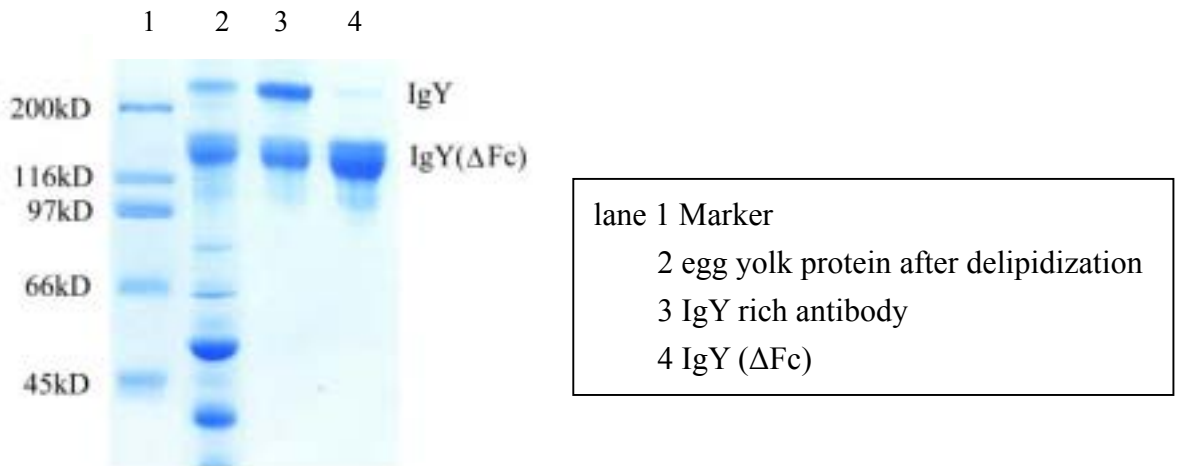


Fig1 : 利用 SDS-PAGE 分析硫酸銨沉澱法純化各產物的純度.

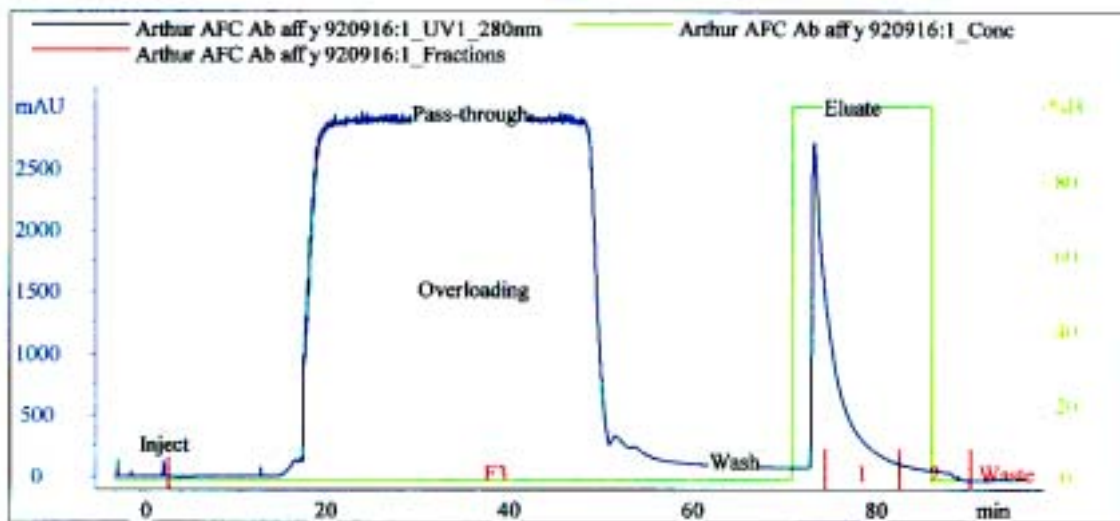


Fig2 : IgY 親和性管柱純化圖譜

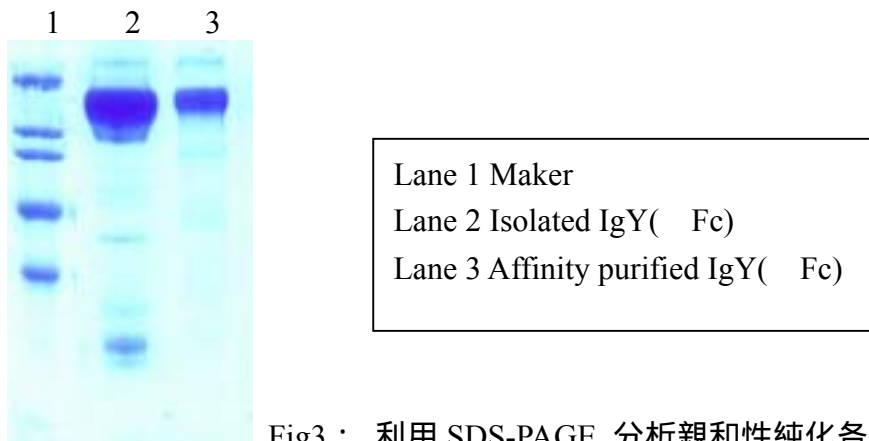


Fig3 : 利用 SDS-PAGE 分析親和性純化各產物的純度.

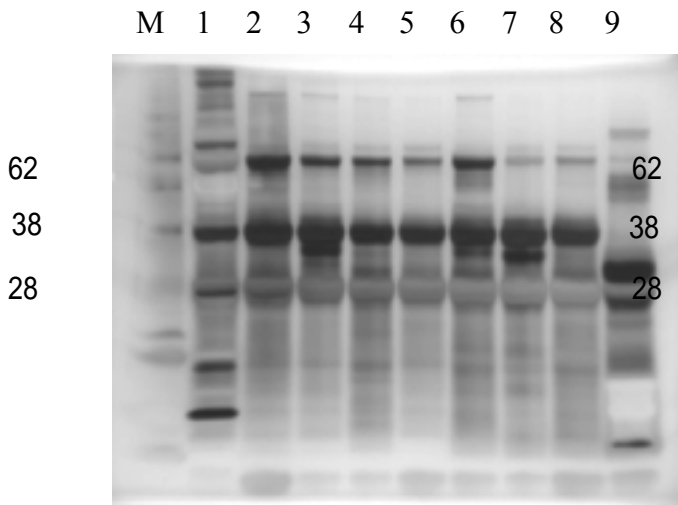


Fig4 : (LaneM : Marker ; Lane1 : F04 Serum ; Lane2 : F04 IgY ; Lane3 : F04 IgY Fc ; Lane4 : F04 親和性管柱純化 IgY ; Lane5 : F04 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane6 : G11 IgY ; Lane7 : G11 IgY Fc ; Lane8 : G11+H03 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane9 : 馬血清)

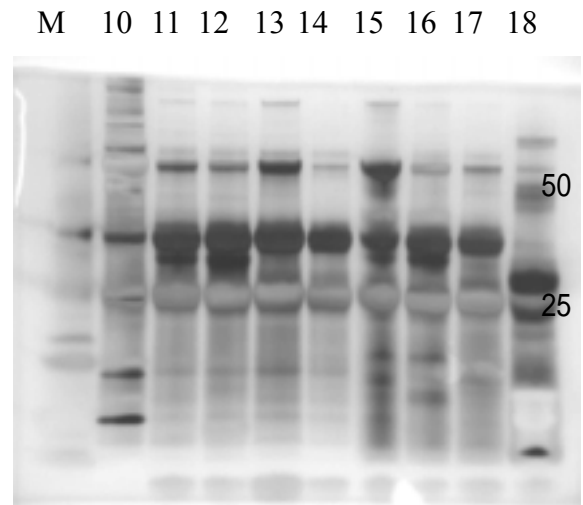


Fig5 : (LaneM : Marker ; Lane10 : F05 Serum ; Lane11 : F05 IgY ; Lane12 : F05 IgY Fc ; Lane13 : F05 親和性管柱純化 IgY ; Lane14 : F05 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane15 : H03 IgY ; Lane16 : H03 IgY Fc ; Lane17 : G11+H03 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane18 : 馬血清)

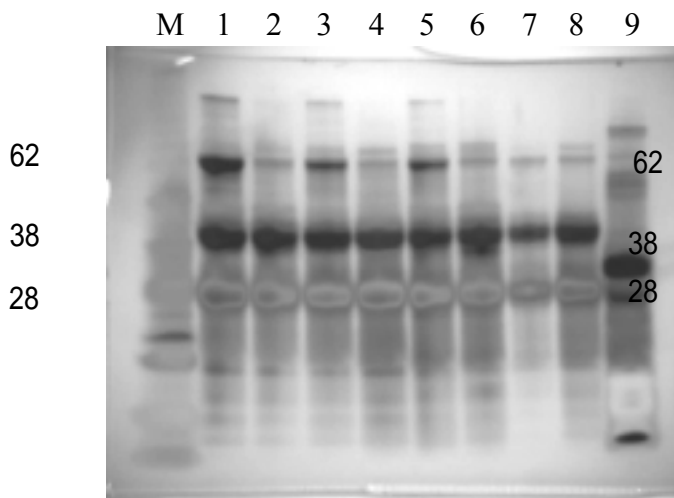


Fig6 : (LaneM : Marker ; Lane1 : G10 IgY ; Lane2 : G10 IgY Fc ; Lane3 : G10 親和性管柱純化 IgY ; Lane4 : G10 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane5 : \* 10 IgY ; Lane6 : \* 10 IgY Fc ; Lane7 : \* 10 親和性管柱純化 IgY ; Lane8 : \* 10 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane9 : 馬血清)

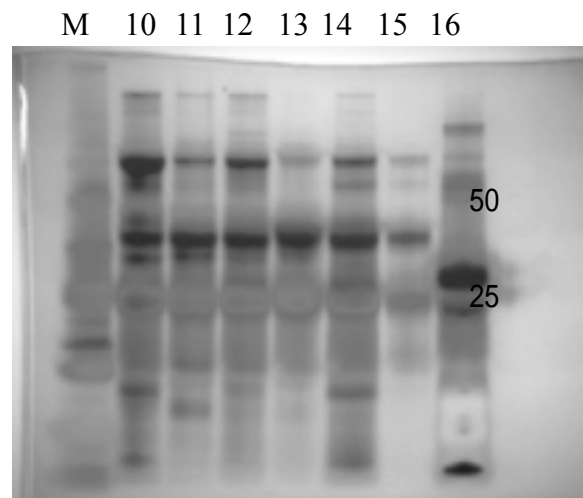


Fig7 : (LaneM : Marker ; Lane10 : H04 IgY ; Lane11 : H04 IgY Fc ; Lane12 : H05IgY ; Lane13 : H05 IgY Fc ; Lane14 : H04+H05+ \* 10 親和性管柱純化 IgY ; Lane15 : H04+H05+ \* 10 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane16 : 馬血清)

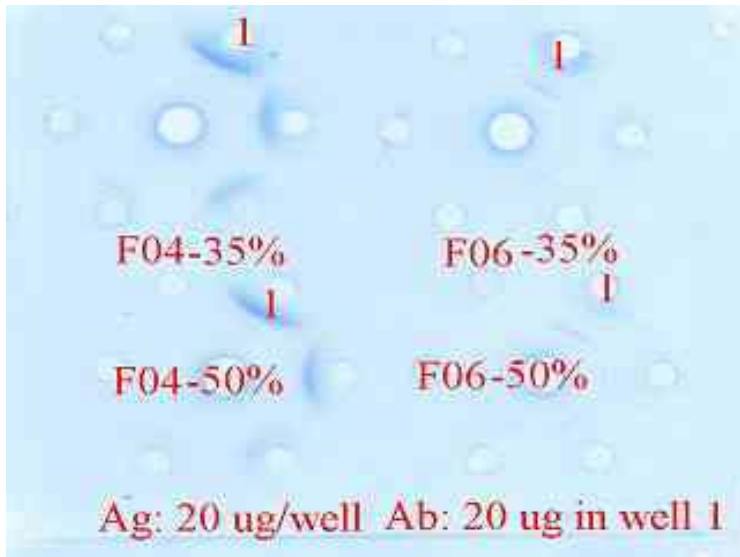


Fig8 : IgY 雙向免疫擴散試驗

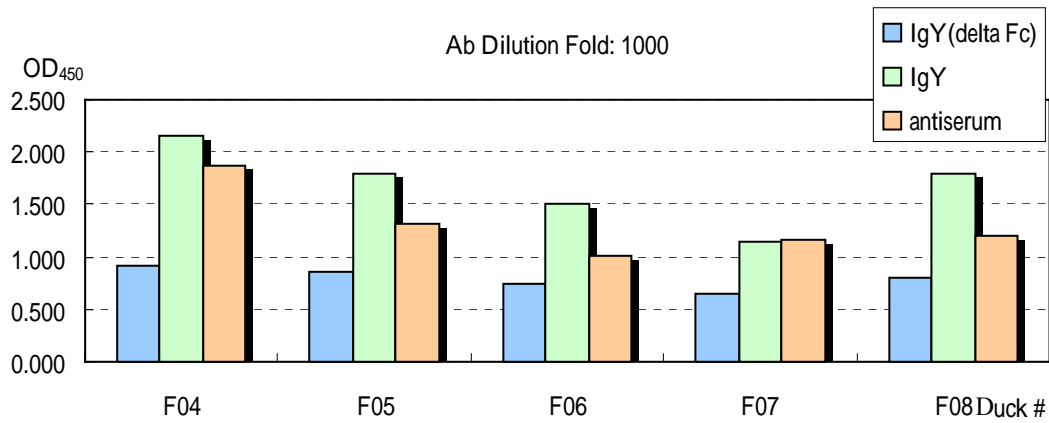


Fig9 : IgY、IgY ΔFc、 antiserum 之 ELISA

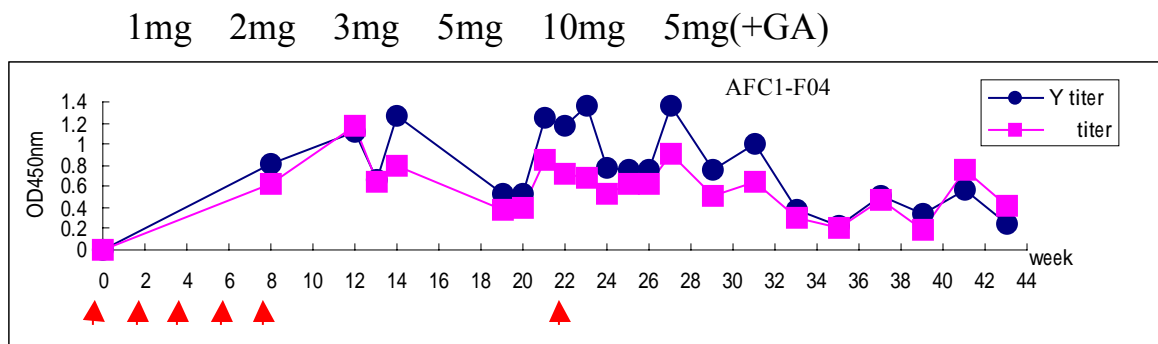


Fig10 : F04 之 IgY、IgY ΔFc 之 ELISA

1mg 2mg 3mg 5mg 10mg 5mg(+GA)

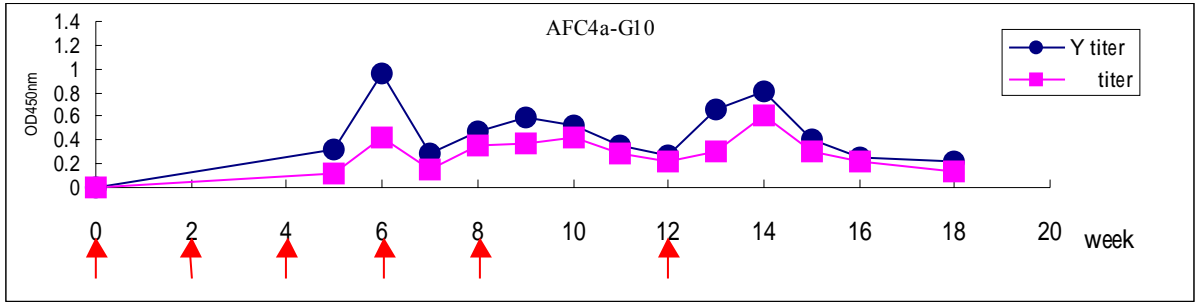


Fig11 : G10 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

1mg 2mg 3mg 5mg 10mg 5mg(+GA)

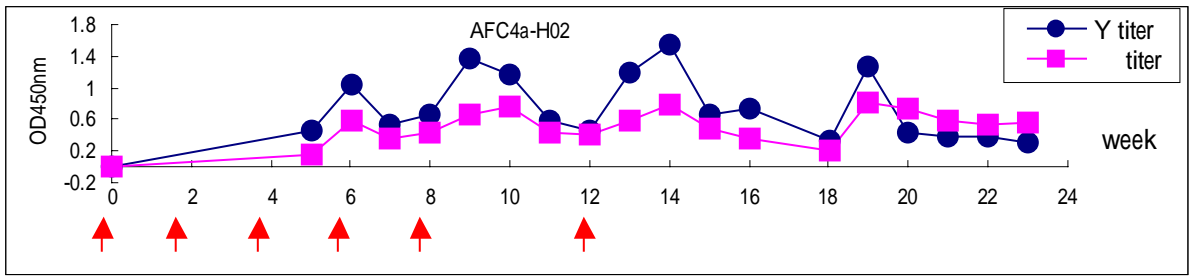


Fig12 : H02 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

3mg 2mg 2mg 2mg 2mg 2mg(+GA)

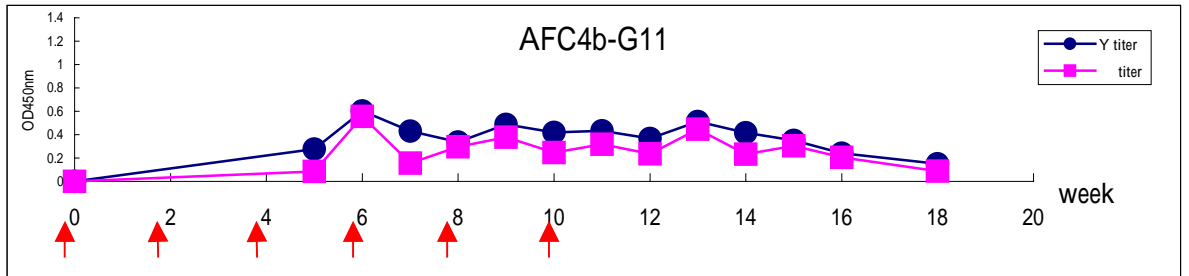


Fig13 : G11 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

3mg 2mg 2mg 2mg 2mg 2mg(+GA)

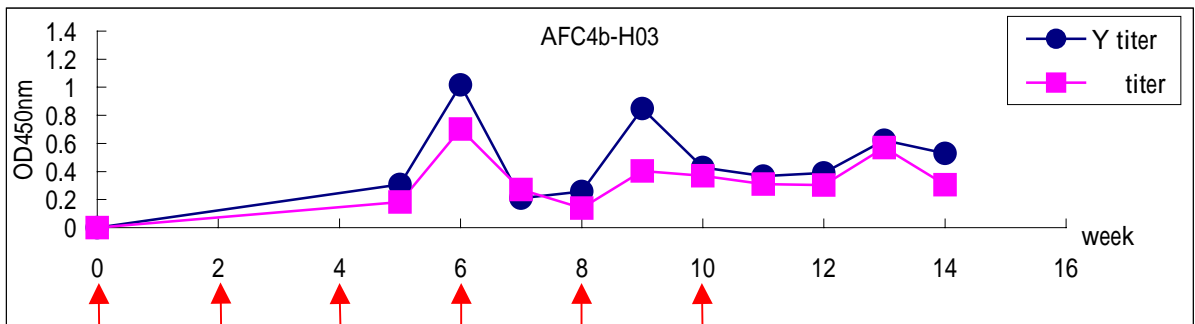


Fig14 : H03 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

2mg 1mg 1mg 1mg...

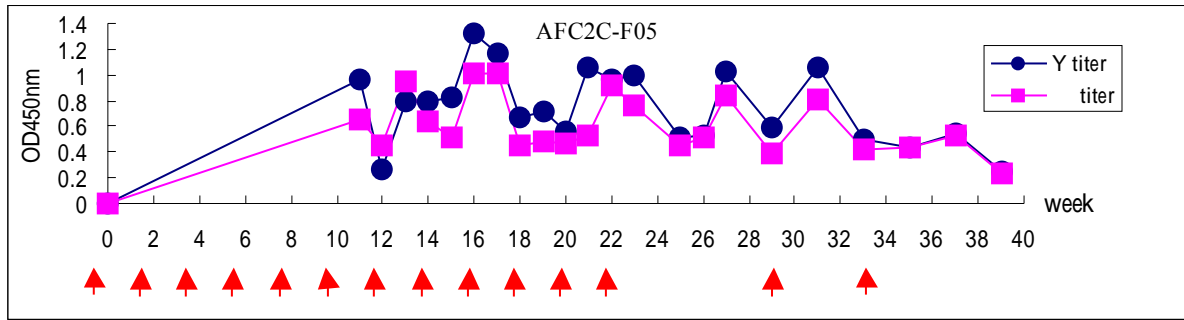


Fig15 : F05 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

2mg 1mg 1mg 1mg...

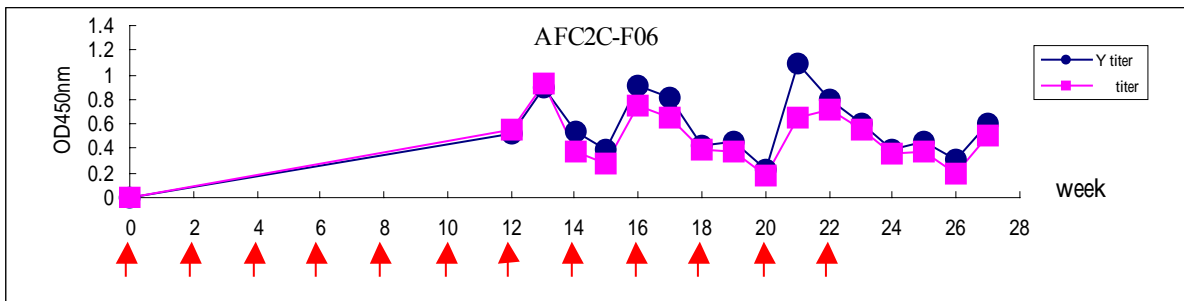


Fig16 : F06 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

2mg 1mg 1mg 1mg...

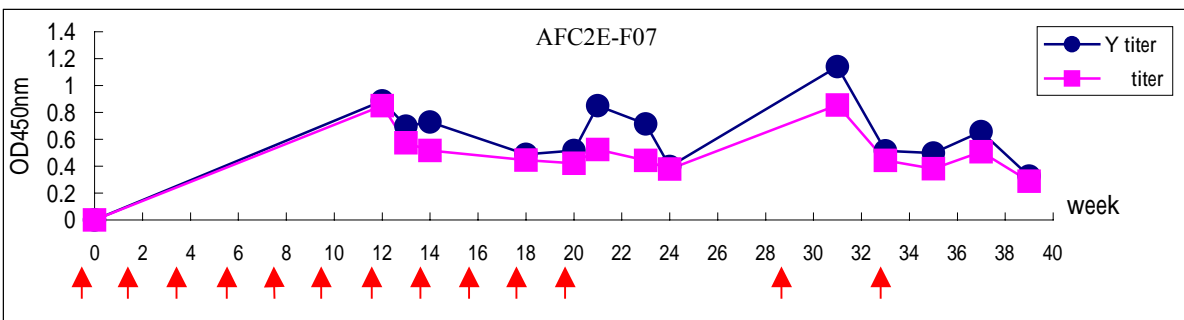


Fig17 : F07 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

2mg 1mg 1mg 1mg...

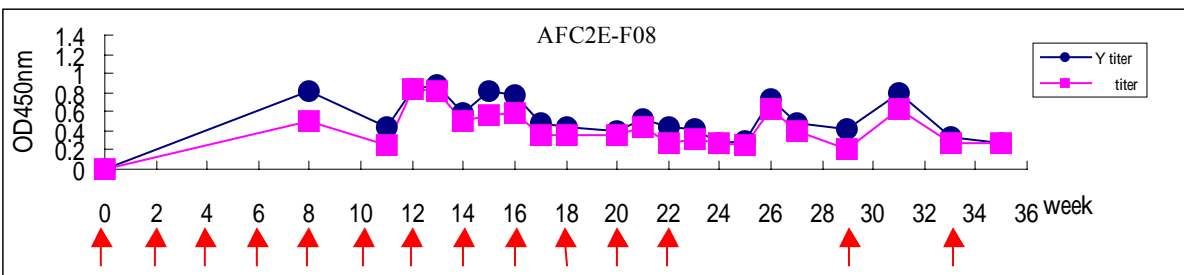


Fig18 : F08 之 IgY、 IgY  $\Delta$ Fc 之 ELISA

1mg 1mg 1mg 1mg 0.5mg 0.5mg 0.5mg...

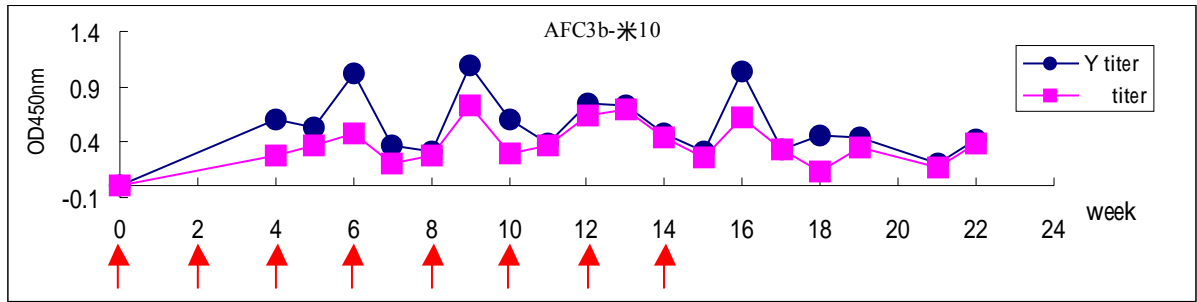


Fig19 : \* 10 之 IgY、IgY ΔFc 之 ELISA

1mg 1mg 1mg 0.5mg 0.5mg 0.5mg...

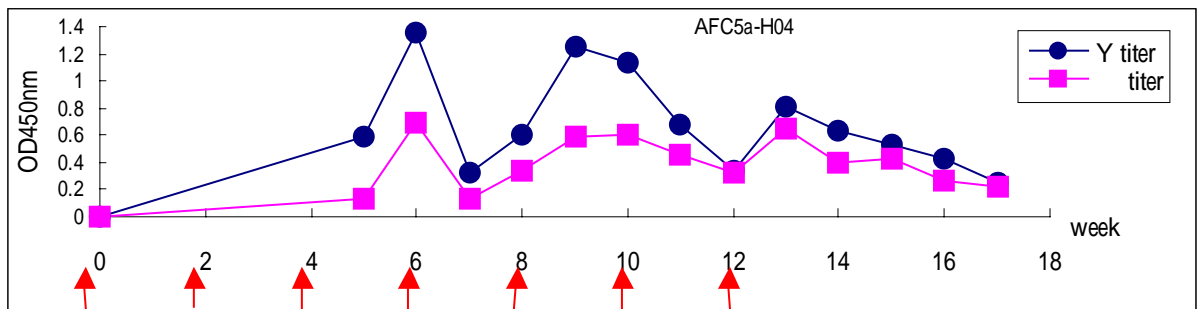


Fig20 : H04 之 IgY、IgY ΔFc 之 ELISA

1mg 1mg 1mg 0.5mg 0.5mg 0.5mg...

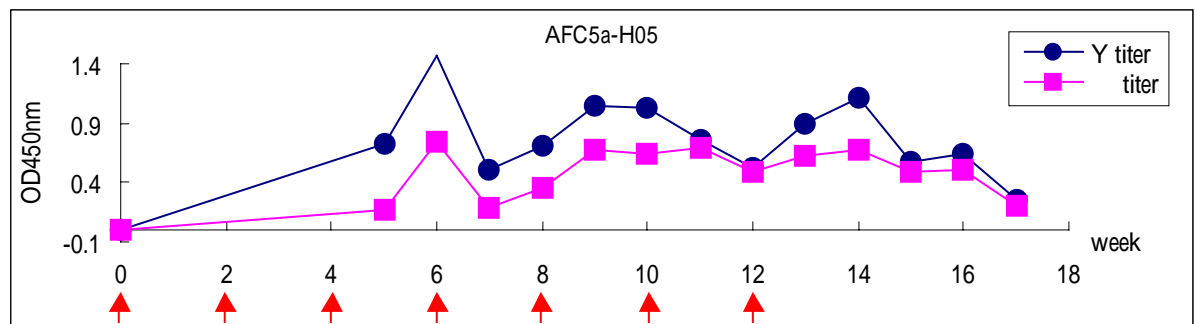


Fig21 : H05 之 IgY、IgY ΔFc 之 ELISA

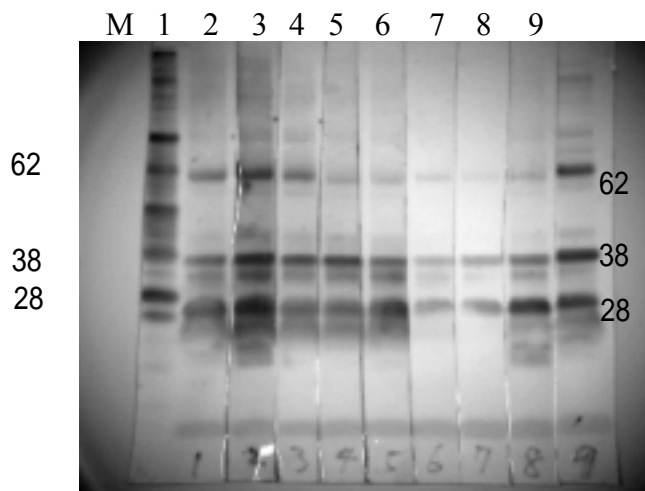


Fig22 : (LaneM : Marker ; Lane1 : F04 Serum ; Lane2 : F04 IgY ; Lane3 : F04 IgY Fc ; Lane4 : F04 親和性管柱純化 IgY ; Lane5 : F04 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane6 : G11 IgY ; Lane7 : G11 IgY Fc ; Lane8 : G11+H03 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane9 : 馬血清)

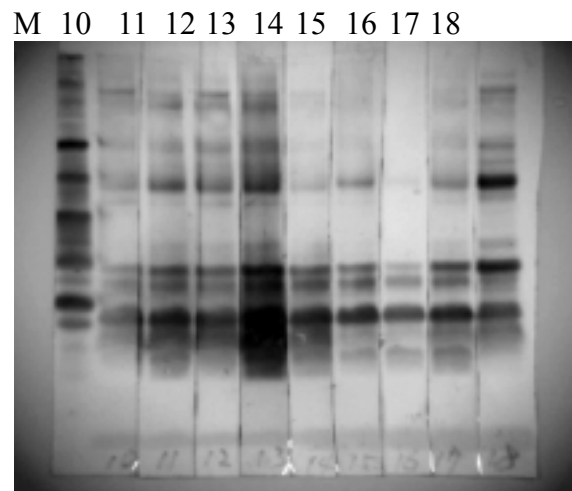


Fig23 : (LaneM : Marker ; Lane10 : F05 Serum ; Lane11 : F05 IgY ; Lane12 : F05 IgY Fc ; Lane13 : F05 親和性管柱純化 IgY ; Lane14 : F05 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane15 : H03 IgY ; Lane16 : H03 IgY Fc ; Lane17 : G11+H03 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane18 : 馬血清)

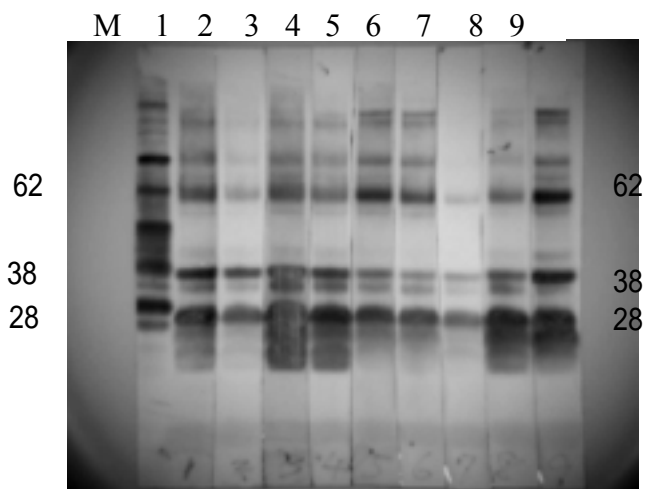


Fig24 : (LaneM : Marker ; Lane1 : G10 IgY ; Lane2 : G10 IgY Fc ; Lane3 : G10 親和性管柱純化 IgY ; Lane4 : G10 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane5 : \* 10 IgY ; Lane6 : \* 10 IgY Fc ; Lane7 : \* 10 親和性管柱純化 IgY ; Lane8 : \* 10 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane9 : 馬血清)

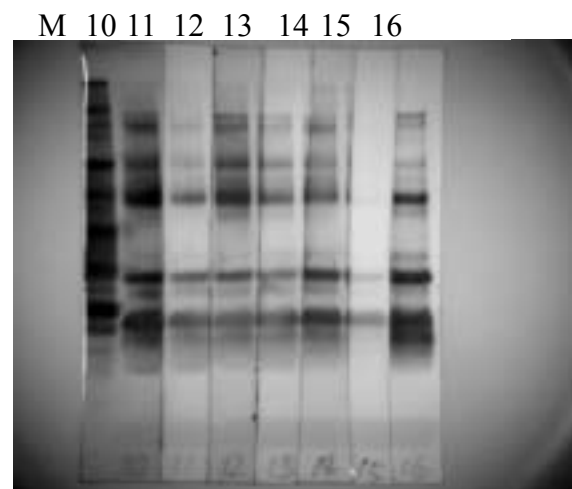


Fig25 : (LaneM : Marker ; Lane10 : H04 IgY ; Lane11 : H04 IgY Fc ; Lane12 : H05 IgY ; Lane13 : H05 IgY Fc ; Lane14 : H04+H05+ \* 10 親和性管柱純化 IgY ; Lane15 : H04+H05+ \* 10 親和性管柱純化 IgY Fc ; Lane16 : 馬血清)



# 表 次

Tab1 : F04 之 Anti-cobra IgY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後 採蛋時間
F04	serum		20≤ X	
F04	IgY	10	20≤ X<40	7-8 週
F04	IgY Fc	10	20≤ X<40	7-8 週
F04	IgY	19.31	20< X≤ 40	8-10 週
F04	IgY	19.31	X<48.75	8-10 週
F04	IgY Fc	19.23	20< X≤ 40	8-10 週
F04	IgY Fc	19.23	X<48.75	8-10 週
F04	親和性管柱純化 IgY	29.76	40≤ X<60	8-10 週
F04	親和性管柱純化 IgY Fc	18.90	60≤ X	8-10 週
F04	IgY	19.17	X<40	12-14 週
F04	IgY Fc	19	X< 40	12-14 週
F04	IgY	49.79	X<20	19-25 週
F04	IgY Fc	32.57	X<20	19-25 週

Tab2 : G10 之 Anti-Cobra Duck IgY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後 採蛋時間
G10	IgY	30.83	40≤X<60	5-7 週
G10	IgY Fc	28.54	40<X<60	5-7 週
G10	親和性管柱純化 IgY	20.53	60≤X	5-7 週
G10	親和性管柱純化 IgY Fc	19.39	60≤X	5-7 週

Tab3 : H02 之 Anti-cobra igY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後 採蛋時間
H02	IgY	28.29	40<X<60	5-7 週
H02	IgY Fc	28.29	60≤X	5-7 週
H02	親和性管柱純化 IgY	14.97	X<20	5-7 週
H02	親和性管柱純化 IgY Fc	14.26	40≤X	5-7 週

Tab 4 : G11 與 H03 之 Anti-Cobra Duck IgY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後 採蛋時間
G11	IgY	29.07	X<40	5-7 週
G11	IgY Fc	27.71	40< X<60	5-7 週
H03	IgY	31.86	X<40	5-7 週
H03	IgY Fc	32.50	60≤ X	5-7 週
G11+H03	親和性管柱純化 IgY	6.64	X<20	5-7 週

G11+H03	親和性管柱純化 IgY Fc	6.62	20≤ X<40	5-7 週
G11+H03	親和性管柱純化 IgY Fc	17.22	60≤X	5-7 週

Tab 5 : F05 之 Anti-cobra igY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後採蛋時間
F05	Serum		X<20	
F05	IgY	10	X<20	7-8 週
F05	IgY Fc	10	X<20	7-8 週
F05	IgY	19.46	20<X≤ 40	10-12 週
F05	IgY Fc	19.49	X<20	10-12 週
F05	親和性管柱純化 IgY	11.16	40≤ X	10-12 週
F05	親和性管柱純化 IgY Fc	32.23	X<40	10-12 週
F05	IgY	49.5	X<40	19-25 週
F05	IgY Fc	47.36	20≤ X<40	19-25 週

Tab 6 : F06 之 Anti-cobra igY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後採蛋時間
F06	Serum		X<20	7-8 週
F06	IgY	8.49	X<20	7-8 週
F06	IgY Fc	6.34	X<20	7-8 週

Tab 7 : F07 之 Anti-cobra igY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後採蛋時間
F07	Serum		X<20	7-8 週
F07	IgY	10	X<20	7-8 週
F07	IgY Fc	10	X<20	7-8 週

Tab 8 : F08 之 Anti-cobra igY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後採蛋時間
F08	serum		X<20	7-8 週
F08	IgY	10	X<20	7-8 週
F08	IgY Fc	10	X<20	7-8 週
F08	IgY	19.17	X<20	9-10 週
F08	IgY Fc	19.00	X<20	9-10 週
F08	親和性管柱純化 IgY	21.43	60≤ X	10-12 週
F08	親和性管柱純化 IgY Fc	18.23	60≤ X	10-12 週

Tab9 : \* 10、H04、H05 之 Anti-Cobra Duck IgY 效價

鴨號	備註	Conc(mg/ml)	效價 (MLD/ml)	第一次免疫後採蛋時間
* 10	IgY	61.58	X<40	5-11 週
* 10	IgY Fc	31.28	X<40	5-11 週

* 10	親和性管柱純化 IgY	18.21	60≤ X	4-8 週
* 10	親和性管柱純化 IgY Fc	26.6	40≤ X<60	4-8 週
H04	IgY	29.85	X<40	5-7 週
H04	IgY Fc	32.75	X<40	5-7 週
H05	IgY	32.98	X<40	5-7 週
H05	IgY Fc	31.57	X<40	5-7 週
H04+H05+ * 10	親和性管柱純化 IgY	8.16	20≤ X<40	5-7 週
H04+H05+ * 10	親和性管柱純化 IgY	15.77	40≤ X	5-7 週
H04+H05+ * 10	親和性管柱純化 IgY Fc	23.13	X<40	5-7 週

Tab10：以接近 20(19-21.43)mg/ml 蛋白質濃度之 MLD 比較 (第一次免疫後 12 週內)

抗體種類 \ 鴨隻	無毒化蛇毒免疫			未無毒化蛇毒免疫			
	F04	G10	G11+H03	F05	F08	* 10	H04+H05+ * 10
IgY	20<X≤40			20<X≤40	X<20		
IgY Fc	20<X≤40			X<20	X<20		
親和性管柱純化 IgY		60≤X			60≤X	60≤X	
親和性管柱純化 IgY Fc	60≤X	60≤X	60≤X		60≤X		X<40

Tab11：以接近 30(28.29-32.98)mg/ml 蛋白質濃度之 MLD 比較 (第一次免疫後 12 週內)

抗體種類 \ 鴨隻	無毒化蛇毒免疫					未無毒化蛇毒免疫			
	F04	G10	H02	G11	H03	F05	H04	H05	* 10
IgY		40≤X<60	40<X<60	X<40	X<40		X<40	X<40	
IgY Fc		40<X<60	60≤X	40<X<60	60≤X		X<40	X<40	X<40
親和性管柱純化 IgY	40≤X<60		60≤X						
親和性管柱純化 IgY Fc		60≤X	60≤X			X<40			

Tab12：免疫無毒化蛇毒以接近 20(19-21.43)mg/ml 蛋白質濃度，第一次免疫後取蛋週數之 MLD 比較

無毒化之鴨隻 \ 週數	週數												
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
F04	IgY					X<48.75				X<40			
	IgY Fc					X<48.76				X<40			
	親和性管柱純化 IgY Fc					60≤X							
	親和性管柱純化 IgY			60≤X									
	親和性管柱純化 IgY Fc			60≤X									

Tab13：免疫未無毒化蛇毒以接近 20(19-21.43)mg/ml 蛋白質濃度，第一次免疫後取蛋週數之 MLD 比較

未無毒化之鴨隻 \ 週數	週數						
	4~8	9	10	11	12	13	14
F05	IgY					20<X≤40	
	IgY Fc					X<20	

F08	IgY		X<20				
	IgY Fc		X<20				
	親和性管柱純化 IgY			60≤X			
	親和性管柱純化 IgY Fc			60≤X			

Tab14：免疫無毒化蛇毒以接近 30(28.29-32.98)mg/ml 蛋白質濃度，第一次  
免疫各取蛋週數之 MLD 比較

無毒化之鴨隻	週數	5	6	7	8	9	10	11~18	19~25
		F04	IgY Fc						
	親和性管柱純化 IgY				40≤X<60				
G10	IgY	40≤X<60							
	IgY Fc	40<X<60							
H02	IgY	40<X<60							
	IgY Fc	60≤X							
G11	IgY	X<40							
	IgY Fc	40<X<60							
H03	IgY	X<40							
	IgY Fc	60≤X							

Tab15：免疫未無毒化蛇毒以接近 30(28.29-32.98)mg/ml 蛋白質濃度，第一  
次免疫各取蛋週數之 MLD 比較

未無毒化之鴨隻	週數	4	5	6	7	8~9	10	11	12
		F05	親和性管柱純化 IgY Fc						X<40
* 10	IgY Fc		X<40						
H04	IgY		X<40						
	IgY Fc		X<40						
H05	IgY		X<40						
	IgY Fc		X<40						