

行政院衛生署疾病管制局 九十二 年度科技研究計畫
成果報告

(自 92 年 3 月 至 92 年 12 月止)

計畫名稱：建立赤尾鮫毒蛇之毒腺細胞株

計畫編號：DOH 92-DC-1107

研究起訖：(年月日) 92年3月1日至92年12月31日

申請機構：國立台灣大學醫學院微生物學科所

主持人：許翠瑛

職 稱：副教授

聯絡電話：23123456

電子郵件：tyhsu@ha.mc.ntu.edu.tw

聯絡人：許翠瑛

傳 真：23915293

填表日期：92年12月6日

註:請依契約書第十一條之規定時程繳交，一式四份

目 錄

	頁碼
封面	
目錄	
摘要	
中文摘要	(1)
英文摘要	(2)
本文	
前言	(3)
材料與方法	(6)
結果	(14)
討論	(19)
結論	(23)
參考文獻	(24)
圖表	(26)
	共 (38) 頁

中文摘要

建立赤尾鮫毒腺細胞株，細胞可繼代培養並能分泌蛇毒，產生的蛇毒具有相當的毒力，以作為抗赤尾鮫血清疫苗及希望同時獲得蛇毒中多種重要的具生物活性蛋白用於疾病治療、診斷的工具及學術研究上的應用是此研究計劃主要的目的，目前已建立組織免疫染色法鑑別毒腺細胞，並應用磁珠的方法將毒腺上皮細胞自組織中分離得到，在最佳的條件下可獲得1萬個細胞。在進行13次毒腺細胞培養步驟中，發現赤尾鮫初級的毒腺細胞必須在有coating蛇皮的膠原蛋白之細胞培養盤才能附著，但蛇的腎臟細胞並不用coating。初級毒腺細胞可以維持長達1個月以上，但採用目前的培養條件無法生長，必須再添加其他物質。腎臟細胞則可達5代以上。在定性及定量分析毒腺細胞分泌物方面，建立Bio-Rad蛋白質含量分析以定量細胞培養液中蛋白質量的變化、用西方墨點法了解到毒腺細胞培養液、腎臟細胞培養液與對照細胞培養液有不同的分子呈現。酵素連結免疫吸附檢驗法(ELISA)初步的實驗，針對不同天數所收集的細胞培養液分析，有些細胞培養液的數據較對照組高。

Abstract

Development of venom gland cell culture from *Trimeresurus gramineus* (Taiwan green habu) to produce venom is important as an additional source to manufacture antivenom and as a source of useful biologically active molecules to become novel therapeutic agents, diagnosis and research tool. We use the immunohistochemistry to identify venom gland cell and under optimal condition ten thousand epithelial cells can be obtained from venom gland by magnetic purification method. Among thirteen attempts to culture the snake cells, we found that the epithelial gland cells can be successfully maintained in culture wells precoated with green habu skin collagen, and for cultivation of kidney cells precoating is not necessary. The cultures of epithelial cells can be maintained for more than 1 month, but cannot proliferate in CMRL 1066 plus 10% fetal bovine serum at 30 °C. The kidney cells can be maintained up to more than fifth passage. Using SDS-PAGE, western blotting and ELISA tested the presence of venom in the supernatant of epithelial cells and kidney cells. These results indicated that in the culture supernatant of epithelial cells there's different protein molecule expressed in SDS-PAGE and western blotting compared to that of control group. The culture supernatant of epithelial cells also contained various amount of venom at different days by ELISA assay .

前言

台灣地區常見的 6 種毒蛇分別屬於腹蛇科(viperidae)的赤尾鮫、龜殼花、百步蛇、鎖鏈蛇及蝙蝠蛇科(elapidae)的台灣眼鏡蛇與兩傘節，除赤尾鮫外其餘五種已被列為保育類動物[1]。利用蛇毒製造出抗蛇毒血清以治療被毒蛇咬傷的人，另外蛇毒的許多成分已被純化分析出來，有些成分則已應用在臨床治療及基礎醫學研究。為了能有源源不斷的蛇毒來源，且能避免持續捕捉毒蛇破壞生態環境，毒腺細胞株的建立是非常重要的。

毒蛇的毒腺是一種外分泌腺體細胞組成，為製造及儲藏毒液的場所[2,3]。此腺體由三部分構成，分別為(1)主毒腺(main gland)—後端膨大的部分，由結締組織構成，分為許多小葉(lobules); 每一小葉含有甚多單一或複式小管(simple or compound tubules)，每一小管由後向前方中央部集合，開口於毒管之後端，毒管前端開口於毒牙鞘(fang sheath)中。小管內襯以漿液性分泌上皮(mucous epithelium)。其細胞之高度會隨毒液分泌週期不同而改變[4]。(2)毒管(venom duct)，又分為 primary duct 及 secondary duct。(3)副腺體(accessory gland)，包於毒管外，為柱狀漿液性分泌上皮(serous epithelium)構成[2]。

毒蛇的毒液是毒腺細胞之分泌物，其顏色從無色到琥珀色，依據文獻的記載赤尾鮫平均咬物一次排毒液量約在 27.5mg。毒液中大約

80-90%是水，而其他部分則是由酵素、牲太、醣蛋白與少量其他物質所組成。蛇毒是由複雜和混合多種蛋白質所構成，就目前所知蛇毒蛋白大約是由 50 種到 60 種成分所構成，有些報告甚至可分離出多達 133 種蛋白質，以神經性蛇毒蛋白主要是由於阻斷神經肌肉之突觸前及後傳導而導致呼吸活動麻痺，出血性蛇毒蛋白則是與凝血系統、kallikrein 或補體作用，而導致血量喪失或是血栓最後導致循環衰竭。蛇毒蛋白主要可分為四類包括毒性物質、無毒性成分、酶及抑制酶的因子 [5,6,7]。赤尾鮫蛇毒已被研究的成分約有 26 種，其中 Trigramin 成分的發現及藥理的研究更與後來新型的抗血栓有重要的關係[8]。

目前自毒蛇培養出初級毒腺細胞總共有三篇報告，一篇是在蘇聯的研究[9]，自 *Vipera berus* 培養出具有分泌能力的上皮細胞，在電子顯微鏡下觀察到毒腺細胞與在活體內一樣呈現複雜的細胞間的連結結構及細胞膜的極性，用組織免疫學法也證實培養的分泌細胞具有合成蛇毒的作用，另外加入 carbochole，此為 M-cholinoreceptor 的作用劑，可以誘發細胞的分泌週期。另一篇是巴西所做的研究[10]，自 American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) 分離培養出毒腺細胞，總計自 65 條的毒蛇組織樣本中得到 23 個細胞株，最好的培養狀況是培養盤先附著一層蛇本身皮膚的膠原蛋白，毒腺細胞培養基為 CMRL 加入 10%的胎牛血清及其他的添加物，於 30°C 溫度下培養，

14%會有污染產生，75%可培養出細胞，這些上皮細胞分泌出的蛇毒濃度達到 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 。在英國的報告[11]自 *Bitis gabonica* 的毒腺細胞分離得到，初級細胞可維持 7 個月，形態為柱狀上皮細胞，以 immuno peroxidase 技術證明細胞能合成蛇毒，用 ELISA 的方法分泌蛇毒的量會達到至少 200ng/ml 。赤尾鮫毒蛇初級毒腺細胞培養則未有相關報告。

本研究第一年的工作著重於細胞培養技術及組織免疫學的方法分離鑑別出初級毒腺細胞，改變不同的培養條件或加入不同的刺激物質，配合酵素連結免疫吸附檢驗法偵測及定量毒腺細胞分泌蛇毒的量，以找出培養細胞的最適條件，用免疫轉漬法及高效能液相分析儀比較自蛇取得的蛇毒及毒腺細胞分泌的蛇毒質和量的變化。第二年是以前動物試驗評估毒腺細胞產生的蛇毒的抗蛇毒血清效價，實驗方法包括毒力測定、抗蛇毒血清中和力價試驗或是酵素連結免疫吸附檢驗法。希望建立適合的赤尾鮫毒腺細胞株，細胞可繼代培養並能分泌蛇毒，產生的蛇毒具有相當的毒力，以作為抗赤尾鮫血清疫苗之用，如此提供取得蛇毒的另一來源，除了確保蛇毒的品質外，可免除補蛇及養蛇的工作，日後延伸至其他保育類的毒蛇，更可落實維護生態環境的目的。

材料與方法

1. 赤尾鮫的來源向專門的捕蛇人購得。

2. 取毒腺前置作業

赤尾鮫餵食小白鼠 1 隻後，開始禁食 2 週，每週採毒連續 4 週，作為以後毒腺細胞分泌蛇毒比較用。第 5 週再餵食小白鼠 1 隻，再禁止餵食食物 3 至 4 週，此時毒腺就會充滿毒液，以利辨識毒腺。

3. 組織免疫學的方法以鑑定毒腺組織及細胞

(1)包埋切片的前置作業

(i)取赤尾鮫的毒腺組織

準備好滅菌之手術器械，與赤尾鮫一隻，利用手術刀以及鑷子，將位於頭部毒腺組織取出。

(ii)脫水

將組織放至於脫水盒中，利用 SHANDON CITADAL100 型脫水機脫水，此脫水機脫水步驟及原理，主要是利用漸進法，分別裝有 12 缸藥水，依序為第一缸福馬林作用時間一小時，第二缸 80%酒精作用時間一小時，第三缸為 90%酒精作用時間一小時，第五缸為 95%酒精作用時間為一小時 30 分鐘，第六缸為 95%酒精作用時間為一小時 30 分，第七缸為 95%酒精作用時間

為一小時 30 分，第八缸為 Xylene 作用時間為一小時 30 分，第九缸為 Xylene 作用時間為一小時 30 分，第十缸為 Xylene 作用時間為一小時 30 分，第十一缸為蠟作用時間為一小時，第十二缸為蠟作用時間為一小時，之後按 AUTOSTAR 即啟動

(2) Hematoxylin 和 Eosin Y 染色

將已經脫水完成的組織塊，放於包埋盒中，利用經過 56°C 溶過的蠟，將蠟油滴入包埋盒中，直到整個盒內經以充滿蠟油，置於室溫冷卻，之後放於 -20°C 冰箱內約 30 分鐘，取出放於切片機切片，切片時先將包埋塊前面多餘的蠟切除，通常會先以 20mm 切，切到組織已經出現，改以 5mm 切片，切出來的切片以竹棒黏貼到冰水處，在冰水中連續切片，用玻片將切片撈至 44°C 溫水中使之完全展開，再利用玻片將切片撈起晾乾，置於 42°C overnight，完成後，放入第一缸 Xylene 中脫蠟 4-6 分鐘，第二缸無水酒精 4 分鐘，第三缸清水洗 2 分鐘，第四缸放 Hematoxylin 中染 3 分鐘，第五缸水洗 2 分鐘，第六缸放入 Eosin Y 染色，第七缸水洗 2 分鐘，第八缸酒精洗 3 分鐘，第十缸 Xylene 再洗 5 分鐘，完成後封片置於顯微鏡觀察並拍照

(3) Immunostain

取上述之玻片(上有切片之樣品)，在 Xylene 中浸泡 3-4 次

每次 5 分鐘，確定石蠟已完全溶解，在行脫水與復水動作，依序是放入 100%酒精 2 次，90%酒精，85%酒精，75%酒精，50%酒精，水以及 PBS 中各 2 分鐘，滴上 5%的 Pepsin Working solution 儲存於 37°C 20 分鐘，之後置於室溫冷卻，再以 PBS 洗兩次每次 2 分鐘，接下來染色：

(i)滴上 3% H_2O_2 靜置 10 分鐘，以 PBS 洗三次，每次 3 分鐘

(ii)Serum blocking: 除去非專一性的其他背景，使用買來的 kit

Reagent A 靜置 10 分鐘，之後以 PBS 洗三次，每次 3 分鐘

(iii)存放 1 級抗體(Keratin,Pan Ab-3)來源 Mouse Mab: 將樣品上

滴上 1 級抗體 1 小時，之後以 PBS 洗三次，每次 3 分鐘

(iv)在滴入 2 級抗體(Reagent B)內含 biotin 和 1 級抗體的 Avidin

結合, 靜置 10 分鐘，之後以 PBS 洗三次，每次 3 分鐘

(v)完成後封片置於顯微鏡觀察並拍照。

(4)Dynabead stain

與 immunostain 方法一樣，除了步驟(iii)是以 coating

Keratin,Pan Ab-3 的 dynabead 作用 1 小時，之後以 PBS 洗三次，

每次 3 分鐘，而後直接封片置於顯微鏡觀察並拍照。

4. 蛇皮的膠原蛋白製備

取一條蛇皮，剝取內側組織，剪成一小段一小段，懸浮於 10ml

的 0.25% 醋酸溶液中，於 4°C 下攪拌 48 小時，用 1000g 離心 2 小時，取上清液，加到 100k 的 Centriplus YM-100，離心 3000g，200 分鐘，4°C，膜上的液體，用 1ml 的 0.25% 醋酸洗膜，取濾液，加到 50K 的 Centriplus YM-50 中，離心 3000g，75 分鐘，4°C，取留在膜上的蛋白質，用 3ml 的 0.25% 溶出膜上的蛋白質，保存於塑膠小管中。

5. 蛋白質含量測定方法

製備蛋白質標準稀釋液(BSA)：完全解凍 1000 ug/mL 的標準液，再以純水將其配製成一系列含 20-100 ug/mL 之標準稀釋液。取 20-100 ug/mL 的 5 個濃度之標準稀釋液各 100uL 置於試管，每個濃度 2 支。檢體稀釋液及純水(為對照組)各取 100 uL 2 支與標準稀釋液同時操作。用 DC protein assay (Bio-Rad) 測標準稀釋液與檢體稀釋液蛋白質含量。

6. 初級毒腺細胞培養

毒蛇用乙醚麻醉後，用中性清潔劑洗淨，再用百分之七十的酒精浸泡 20 分鐘，將蛇放入無菌操作箱中處理。取蛇頭，將頭皮輕輕剝離，取出毒腺，而後毒腺組織在培養基中切成 1mm 片狀，經膠原蛋白酵素 (1mg/ml)、hyaluronidase type IV-S (150 U/ml)及 soybean trypsin inhibitor type I-S (0.1mg/ml)的處理，細胞即可分

離，再將細胞放入 96 或 48 孔培養盤中培養，每星期更換培養基三次，細胞每 2 至 3 星期以 1：2 比例稀釋繼代培養。另外，可用 0.25% trypsin-0.02%Versene 使細胞自培養皿表面脫離。培養盤或瓶需先用赤尾鯨膠原蛋白處理，使細胞附著。另外取蛇的腎臟組織作相同的處理以作為對照組。

7. 分離毒腺細胞

毒蛇用乙醚(50-100ml)麻醉，用止血鉗夾住嘴巴，用中性清潔劑洗淨 10 分鐘，百分之七十的酒精浸泡 10 至 15 分鐘，將蛇放入無菌操作箱中處理，用剪刀將蛇頭與蛇身分離，取出毒腺在 5ml 含分解媒的培養基(CHS medium)中切成 1mm 片狀，於室溫下，消化 45 分鐘，用 100um BD Falcon Cell strainer (細胞篩子)，取過濾液 1000g 離心 7 分鐘，取沉澱細胞，用 5ml 的 0.1%BSA-PBS 溶液將細胞打散，1000g 離心 7 分鐘，取沉澱細胞，用 5ml 的 0.1%BSA-PBS 溶液將細胞打散，1000g 離心 7 分鐘，取沉澱細胞，用 2ml 的 0.1%BSA-PBS 溶液將細胞打散，計算細胞數。加入已 coating 好的 dynal beads (beads:cell 為 5:1)，將細胞懸浮液與 dynal beads 混合液放入細胞培養管中(約 1.5ml)，於 2-8°C(將 tube 放在冰上)，輕微轉動 30 分鐘，將細胞懸浮液與 dynal beads 混合液，改放於 1.5ml 微量離心管，貼於磁座，3 分鐘後，將沒有

吸附的物質放入另一個 tube(B)中，另外培養。懸浮 bead/cell rosettes 於 1.0ml PBS/0.1%BSA。1.5ml 微量離心管，貼於磁座，3 分鐘後，將沒有吸附放入 tube(B)中，另外培養。最後一次將細胞懸浮於 300ul 的 CMRL/1%FCS 中，取出 25ulbead/cell rosettes 於正立的顯微鏡下觀察 beads 與細胞結合的情形。加入 200U(4ul) releasing buffer 到 bead/cell rosettes solution。將細胞懸浮液與 dynal beads 混合液，於室溫下，輕微轉動 15 分鐘。將 pipetment 轉到 150ul，進行 pipette 8 次以上。將 1.5ml 微量離心管，貼於磁座，而後將液體吸出，放入已事先 coating 好含 10%FCS 的 CMRL1066 培養液中。剩餘的 bead/cell rosettes 再加入 200ul CMRL/1%FCS，pipette 5 次以上，貼於磁座，將細胞吸出，加入已 coating 好含 10%FCS 的培養液中。計算細胞數目。將細胞 seeding 在 96 well plate 中，每個 well 的量是 100ul。

9. SDS-聚丙醯胺凝膠電泳檢測

SDS 將 Running gel 先行配置，利用 BIO-RED 配膠系統，之後凝結後，再將上層膠 staging gel 倒入凝集，形成一片完整的膠，樣品先以 60 度溫度加熱 5 分鐘，加入 sample loading dye，之後將此混合物 loading 到膠的孔洞內，內有加入 TANK Buffer，使可加電流 100v 跑電泳，之後，以 coomassie blue 染色 30 分鐘，Destain solution I 30

分鐘, Destain solution II 整晚, 觀察後始可封膠。赤尾鮫蛇皮的內側組織是以 8% SDS-聚丙醯胺凝膠電泳檢測, 而赤尾鮫蛇毒蛋白和細胞上清液則用 10% SDS-聚丙醯胺凝膠電泳檢測。

10. 西方墨點分析法(Western blotting)

取下已經跑完電泳的膠, 接下來取出電泳夾, 黑色面為負級, 依序放入 2 張泡棉, 濾紙, 膜, 濾紙, 2 張泡棉。放入電泳槽內, 還要加放冰在裡面, 25mA 通電跑電泳, 進行 Transfer 1 小時完後, 取出膜, 其他可以不要, 加入 Amino Black stain solution 觀察直到 band 出現為止。用乾淨的水沖洗乾淨加入 5% milk block 膜 1 小時。取出膜放入已經剪好的塑膠袋, 加入經過之 5% milk 稀釋過的 1 級抗體, overnight。取出膜經過 TBST 洗三次每次 10 分鐘

11. 酵素連結免疫吸附檢驗法(Enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA)偵測及定量毒腺細胞分泌的蛇毒量。[11,12,13]

(1) 抗原附著的 ELISA：將 100 μ l 的赤尾鮫毒腺細胞或是腎臟細胞(作為對照組)培養之上清液 coating 於 96 孔的 ELISA 平盤中, 於 4 $^{\circ}$ C 的溫度放置 1 晚, 同時也用赤尾鮫粗蛇毒(濃度 0.1 至 1000 μ g/ml) coating 作一標準曲線, 以 3% 牛的白蛋白(bovine serum albumin)阻斷非特異吸附因子, 37 $^{\circ}$ C 的溫度下作用 1 小時, 以 PBS-Tween 清洗平盤 3 次之後, 再加入 100 μ l 馬的抗赤

尾鮫及龜殼花多價抗血清(稀釋倍數為 16000), 37°C 的溫度下作用 1 小時, 以 PBS-Tween 清洗平盤 3 次之後, 加入 100 μ l 的 1:1000 稀釋濃度之 peroxidase-anti horse (Fab)2 conjugate , 37 °C 的溫度下作用 1 小時, 加入 100ul TMB: 3,3',5,5,-tetramethyl bezidine (TMB), 37°C 的溫度下作用 30 分鐘, 用 2M 的 H₂SO₄ 終止反應, 以酵素連結免疫吸附檢驗法判讀儀測量 450 nm 吸光值。

(2) 抗體附著的 ELISA : 將 100 μ l 的不同稀釋馬的抗赤尾鮫及龜殼花多價抗血 coating 於 96 孔的 ELISA 平盤中, 於 4°C 的溫度放置 1 晚, 以 PBS-Tween 清洗平盤 3 次, 之後以 5% 脫脂牛奶(skim milk)阻斷非特異吸附因子, 37°C 的溫度下作用 1 小時, 再以 PBS-Tween 清洗平盤 3 次之後, 加入赤尾鮫粗蛇毒(濃度 0.1 至 1000 μ g/ml) 作用不同時間以找出適合的標準曲線, 以 PBS-Tween 清洗平盤 3 次之後, 加入 100 μ l 的 1:1000 稀釋濃度之 peroxidase-anti horse (Fab)2 conjugate , 37°C 的溫度下作用 1 小時, 加入 100ul TMB: 3,3',5,5,-tetramethyl bezidine (TMB), 37 °C 的溫度下作用 30 分鐘, 用 2M 的 H₂SO₄ 終止反應, 以酵素連結免疫吸附檢驗法判讀儀測量 450 nm 吸光值。

結果

自赤尾鮫蛇皮的內側組織製備供毒腺細胞附著的基質

蛇皮的內側組織溶於 0.25%醋酸，經離心去除無法溶解的雜質，所得的上清液稱為原液，取部分液體中和後，經 SDS-page 分析，見圖一的第一槽主要有 4 條 band 分子量大約分別是在 130Kd、85-124 Kd 之間，接近 51Kd 及 39Kd。原液經過 Centriplus YM-100 濃縮管(分子量超過 100Kd 會通過濃縮管內的濾膜)，圖一的第二槽為留在 Centriplus YM-100 濾膜上層的液體，依舊為 4 條 band，但將 Centriplus YM-100 濾膜切出，用 0.25%醋酸溶出濾膜內的蛋白質，電泳結果顯示一條主要 130Kd 的 band (lane 5)，另外把通過 Centriplus YM-100 的濾液並無任何 band 呈現(lane 3)，但是再經 Centriplus YM-50(分子量超過 50Kd 會通過濃縮管內的濾膜，分子量介於 100Kd 與 50Kd 之間則留在濾膜的上層)的步驟，電泳分析在 51Kd 有一條 band。於電泳的實驗皆會用牛皮的膠原蛋白第一型(分子量為 130Kd)及胎牛血清(分子量為 67Kd)作為對照標準。

毒腺組織及毒腺細胞的鑑定

取出赤尾鮫毒腺組織，切片後用 Haematoxylin 和 Eosin Y (深粉紅色)染色，見圖二，Haematoxylin 與 DNA 及 RNA 有很強的親和力，

因此主要上色的是細胞核、核糖體及粗內質網這些酸性結構，以紫藍色呈現。Eosin Y 是和鹼性結構結合主要是染細胞質呈現深粉紅色。

圖二(B)是赤尾鮫毒腺組織的免疫組織染色，呈現褐色的地方為上皮細胞，是分泌蛇毒蛋白的部位，同時也確認 1 級抗體(Keratin, Pan Ab-3)對赤尾鮫毒腺細胞具專一性。圖三(1)為將此 1 級抗體附著於 dynabead 上，顯現毒腺組織的上皮細胞也能被 dynabead 染上。(2)為毒腺組織經酵素消化，過篩，毒腺細胞與附著 Pan-Keratin 之 dynabead 結合的情形。

毒腺細胞與腎臟細胞的分離及培養

圖四為毒腺組織塊經剪刀弄碎，經酵素消化，圖中的(A)有許多肌肉組織、肌細胞及毒腺細胞，經培養 1 天，更換培養液後，呈現不同形狀的細胞，見圖四的(B)，因為最初的實驗，24 孔平盤為先 coating 牛皮的膠原蛋白第一型，但毒腺細胞無法附著，經過一段時間(22 天)的培養，最後長滿纖維母細胞，見圖四的(C)。而後用改 coating 自赤尾鮫蛇皮的內側組織分離得到的蛋白質，及用 dynabead 分離出純度較高的毒腺細胞，細胞能貼附於 96 孔平盤中，並維持 41 天以上，但細胞並無增殖的情形。

圖五為腎臟經剪刀弄碎，經酵素消化，因為腎臟細胞數量較毒腺

細胞多很多，不需要 coating 培養瓶細胞就能附著，細胞維持上皮細胞形狀一段時間，大約 7 至 14 天，而後逐漸被纖維母細胞包圍，最後都成為細長形的纖維母細胞，細胞會增殖，目前可達 5 代以上，並保存一批赤尾鮫腎臟細胞於液態氮桶中。

毒腺細胞分泌物以 SDS-page 及西方轉漬法分析

圖六的結果顯示，赤尾鮫蛇毒蛋白的分子量在 85Kd 以下居多，而分析不同時間收集的赤尾鮫毒腺細胞培養液，第六槽為對照細胞培養液，分子量 81 至 51Kd 的蛋白質表現最多，第十四槽為胎牛血清對照，因此細胞培養液中含有大量的胎牛血清蛋白質，分析第 7、10、18 及 21 天所收集的毒腺細胞培養液，發現 51Kd 以下有數種蛋白質表現，每次 loading 的量為 2.63ug 至 4.7ug 的蛋白質量。

圖七應用西方轉漬法分析第 1、2、5 及 7 天所收集的毒腺細胞培養液(CMRL1066 為基底的培養液)，loading 的量為 0.79ug 至 0.92ug 的蛋白質量；第 2 及 5 天毒腺細胞培養液(RPMI1650 為基底的培養液)，loading 的量為 0.84ug 及 0.86ug 的蛋白質量；不同量的赤尾鮫蛇毒，loading 的量為 0.062ug 及 0.031ug 的蛋白質量，發現細胞培養液可被製備自馬抗龜殼花及赤尾鮫蛇毒多株抗血清(經 150 倍的稀釋)分辨認。疾病管制局製造的抗赤尾鮫與龜殼花蛇毒血清在圖七中顯示

有辨識赤尾鮎蛇毒的作用。

毒腺細胞分泌物質以酵素連結免疫吸附檢驗法分析

圖八及圖九是將赤尾鮎粗蛇毒稀釋成不同倍數 coating 於 ELISA 平盤，加入固定倍數(100X,1000X,10000X)之馬抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒多株血清(CDC 製造的抗蛇毒血清)，再以酵素連結免疫反應鑑認分析，發現隨者稀釋倍數增加，反應並無下降的趨勢，反而是受帶有 peroxidase 之 antihorse (Fab)₂ 的 IgG 稀釋倍數的影響而下降。

若是將馬抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒多株血清稀釋成不同倍數 coating 於 ELISA 平盤，加入不同濃度的赤尾鮎粗蛇毒，加入固定倍數帶有 peroxidase 之 antihorse (Fab)₂ 的 IgG，再以酵素連結免疫反應鑑認分析，發現隨者赤尾鮎粗蛇毒稀釋倍數增加，反應並無下降的趨勢，見圖十，但是吸光值隨馬抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒多株血清稀釋倍數增加而遞減。

圖十一是將固定馬抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒多株血清的濃度，coating 於 ELISA 平盤，加入不同濃度的赤尾鮎粗蛇毒，加入固定濃度之帶有 peroxidase 之 antihorse (Fab)₂ 的 IgG，再以酵素連結免疫反應鑑認分析，隨者赤尾鮎粗蛇毒稀釋倍數增加，反應有下降的趨勢，但吸光值下降的情形與赤尾鮎粗蛇毒稀釋倍數並非直線線性的關係

(r 約在 0.6 以下)，若是將赤尾鮎粗蛇毒濃度以自然對數處理，線性回歸後 r 值接近 0.9。

將不同時間所收集的毒腺細胞培養液與腎臟細胞培養液用 ELISA 的方法測定含有的赤尾鮎蛇毒蛋白質量，算出每毫升培養液的蛇毒量，並用此量作為分子除以細胞培養液每毫升的總蛋白質含量，得到的數據作為毒腺細胞分泌蛇毒量的變化，結果呈現在圖十二及十三。

討論

依據文獻記載[9], 毒蛇毒腺的細胞培養條件, 最好是用蛇皮所純化而得的膠原蛋白作為 coating 於細胞培養盤的基質, 較為適合毒腺細胞附著, 主要是取得蛇類的膠原蛋白第一型為 coating 物質, 我們嘗試用牛皮純化的膠原蛋白第一型取代, 結果是毒腺細胞不能吸附, 但腎臟細胞會吸附, 進一步發現腎臟細胞根本不需要 coating 細胞就能貼上細胞培養瓶平盤。事實上, 剝離自蛇皮內之基質蛋白質是由 4 種大小不同的分子組成, 由圖一可見, 依照目前由濃縮管的分離出膠原蛋白第一型的方法在一批蛇皮內基質蛋白質原液大約可獲得十分之一量的蛇膠原蛋白。由於所獲得的膠原蛋白純度還不夠, 因此在培養毒腺細胞直接是用原液, 離心, 經濃縮管, 取上清液, 測蛋白質含量, 每 1mm^2 細胞培養瓶平盤覆蓋 $0.1\mu\text{g}$ 蛋白質。

毒腺組織是由不同的細胞所組成, 依據 Duarte 氏的報告[9]來自 *C. d. terrificus* 毒腺組織片直接培養可發現 6 種不同形態的細胞, 其中大約有 30% 是具有分泌能力的上皮細胞, 這些細胞在幾次繼代培養後會被類似纖維母細胞所入侵而消失。在我們初次實驗將赤尾鮫的毒腺組織片, 經酵素處理使細胞分離, 在培養時間也發現細胞也被類似纖維母細胞所入侵而消失; 對照實驗於腎臟細胞也有類似的情形。但是經由免疫磁珠分離所得的毒腺細胞培養至今並無此現象。

細胞形狀的維持主要是靠三種 cytoplasmic filament，亦即為 actin filaments、microtubules 及 intermediate filament，其中 intermediate filament 具有組織專一性，像上皮細胞的 intermediate filament 就被稱為 keratin filament，而肌肉細胞則稱為 desmin filament[16]。Keratin 家族最先是由 Moll 氏所分類[17]，目前已有 20 多種 keratin 被發現 [16]，為了確認毒腺上皮細胞，因此用能辨識 keratin 的抗體以分離出具有分泌能力的上皮細胞，經由傳統 H&E 染色及組織免疫染色法證實 keratin 的抗體會與毒腺細胞結合，圖二即是呈現這樣的結果。我們並將此 keratin 的抗體吸附於磁珠上，圖三顯示與組織內的毒腺細胞結合的情形良好，另外與分離而得的毒腺細胞也能結合。

至目前為止總計進行 13 次毒腺細胞培養的試驗，進行到細胞有四次為用牛皮膠原蛋白第一型 coating 的細胞平盤培養，毒腺細胞無法附著。另四次用有 coating keratin 抗體的磁珠分離細胞，其中二次分別培養 12 天及 30 天因污染而結束實驗，目前還有二批毒腺細胞依舊維持，細胞雖無法增殖，但持續收集細胞培養液，以作進一步分析。所觀察到細胞的型態呈現在圖四，與 Duarte 氏所呈現的細胞相似的有三種包括三角形細胞、類似上皮細胞及及空泡狀細胞(vacuolated cell)。三次用磁珠分離細胞出在最好的情形可獲得到約 10000 上皮細胞，而目前有一批細胞已維持 45 天以上。

在細胞分泌蛋白的測定方面，在定性的結果赤尾鮫蛇毒蛋白的分子量在 85Kd 以下居多，隨者濃度的不同，band 的強度也不同，在細胞培養液的電泳圖呈現 51Kd 以下有數種蛋白質表現，85Kd 至 51Kd 的蛇毒分子可能被胎牛血清蛋白給遮蔽，而在西方轉漬法的結果發現用市售的抗赤尾鮫與龜殼花蛇毒血清為辨識蛇毒蛋白的抗體發現赤尾鮫 30ng 就可被辨識，細胞培養液的部分在 175Kd 有明顯的 band，但是 51Kd 以下卻無 band，可能的原因可能適(1)用於西方轉漬法分析之細胞培養液的蛋白質量太少，圖六用於測量的蛋白質量是圖七的 5 倍。(2)這次的上清液是來自未經磁珠分離的細胞，細胞太雜，相對分泌性的上皮細胞少，可測得的蛇毒蛋白就更少。(3)細胞上清液的血清蛋白含量高，不利於蛇毒蛋白分子的移動。

在定量方面用 ELISA 的方法，圖八、圖九及圖十顯示抗赤尾鮫與龜殼花蛇毒血清與蛇毒蛋白結合不好，專一性不夠，不論是用赤尾鮫蛇毒蛋白或是抗赤尾鮫與龜殼花蛇毒血清 coating ELISA 平盤都無法找出很好的線性關係。勉強用固定的抗赤尾鮫與龜殼花蛇毒血清抗及 peroxidase 之 antihorse (Fab)² 的 IgG，測得不同濃度的赤尾鮫蛇毒蛋白與吸光度才呈自然對數的變化，見圖十一。將一批毒腺細胞的培養液用 ELISA 方法分析則連續培養 20 天後，赤尾鮫蛇毒蛋白似乎才有增加的情形。在對照組腎臟細胞培養液則是隨培養天數，赤尾鮫蛇毒

蛋白呈不規則的變化。在這 ELISA 的方法穩定性不夠，辨識赤尾鮭蛇毒蛋白專一性不夠，加上只測試一批毒腺細胞的培養液，還要作更多的實驗才能確定自毒腺分離出的初級細胞是否具分泌蛇毒蛋白的能力。

結論

綜合目前的結果確定培養平盤 coating 赤尾鮎蛇皮內層的基質蛋白是毒腺細胞需要的條件，藉由免疫磁珠法的方法可以有效的分離出具有分泌能力的毒腺上皮細胞，雖然這些初級細胞無法增殖，但由 SDS-page 與西方轉漬法分析培養毒腺細胞培養液，與對照培養液比較有些不同的蛋白質呈現，但與真正的蛇毒蛋白相似的比例有多少，必需進一步實驗。另外 ELISA 實驗中辨識蛇毒蛋白的抗體的專一性也需要再改進，以增加對毒腺細胞分泌蛇毒蛋白在量化的數據上能更清楚表現。

參考文獻

- 1、動植物保育法
2. 郭耀文、林有啟、張曾源和劉鴻文 蛇毒蛋白之分泌及其可能-毒腺細胞之細胞株學說。醫學研究 1996; 16(6):355-363.
3. Brown RS, Brown MB, Bdolah A, Kochva E. Accumulation of some secretory enzymes in venom glands of *Vopera palaestinae*. 1975; 229(6):1675-1679.
4. Kochva E The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. Toxion 1987; 5(1):65-106.
5. Francis SMJ. Snake venoms. Drugs 1997:54 suppl 3:1-10.
6. Theakston RDG and Kamiguti A list of animal toxins and some other natural products with biological activity. Toxicon 2002;40:579-651 .
7. Tu AT Overview of snake venom chemistry. Nature Toxin 1996;37-62.
8. Ouyang C, Teng CM and Huang TF Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. Toxicon 1992;30(9):945-966.
9. Ouyang C, Teng CM and Huang TF Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. Toxicon 1992;30(9):945-966.
10. Golubkov VS, Lezhnev EI, Bezgina EN, Moshkov DA. Primary culture of epithelial secretory cells from venom gland of common adder *Vipera berus*. [Russian] Tsitologiya 2001; 43(5):453-461.
11. Duarte MM, Montes de Oca, Diniz CR. Fortes-Dias CL Primary

- culture of venom gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*. 1999; 37(12):1673-82.
12. Sells PG, Hommel M, Theakston RD. Venom production in snake venom gland cells cultured in vitro. *Toxicon*. 1989; 27(11):1245-9.
 13. Selvanayagam ZE and Gopalakrishnakone P Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997). *Toxicon* 1999;37:565-586.
 14. Labrousse H, Nishikawa AK, Bon C and Avrameas S. Development of rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring venom antigens after an experimental snake bite. *Toxicon* 1988;26(12):1157-1167.
 15. Theakston RDG, Jane Lloyd-Jones M and Reid HA. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *Nature* 1977;24:639-641.
 16. Hudson DL. Keratins as markers of epithelial cells. *Methods in Molecular biology* 2001;188:157-169.
 17. Moll R, Franke WW, Schiller DL et. al. The catalog of human keratins: patterns of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells. *Cell*. 1982;31:11-24.