

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000118

衛生福利部疾病管制署 107 年委託科技研究計畫

計畫名稱：不同飼養時期之鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒蛋白
安定性評估計畫

年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：國立屏東科技大學

計畫主持人：蔡添順

協同主持人：徐睿良、周映孜

研究人員：林妙儒、陳婉瑩、陳曉艷、廖信豪、陳圓、
謝昊宇、徐思瑩、葉沂萱、邱翊家

執行期間：107 年 7 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 148 萬元整

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應
事先徵求本署同意*

目 錄

頁 碼

封面	
目錄	1
中文摘要	2
英文摘要	4
壹、前言	7
貳、材料與方法	10
參、結果	19
肆、討論	24
伍、結論與建議	27
陸、計畫重要研究成果及具體建議	28
柒、參考文獻	29
捌、表一至表十一	33
玖、圖一至圖三十三	44
拾、期中報告審查意見回覆	77
拾壹、期末報告審查意見回覆	80
	共(82)頁

中文摘要(字數以不超過六百字為原則)

研究目的：

世界衛生組織建議蛇毒應採自飼養於良好設施與管理的動物設施中的毒蛇個體，然而長時間飼養的毒蛇蛇毒成份與毒性是否維持穩定品質，以及幼蛇與成蛇蛇毒成份與毒性如何呈現差異，至今均仍未有系統性的研究報導，而有待探討與確認。

研究方法：

將採自台灣地區的鎖鏈蛇及雨傘節圈養於經過國際認證的毒蛇動物房，相關飼養因子維持不變時，於不同飼養時期或年齡群，採其毒液以進行其蛇毒蛋白質體與毒理作用的比較分析。使用蛇毒蛋白濃度定量、蛇毒蛋白(二維)電泳分析(包含變性與非變性蛋白狀況)、層析質譜法，分析不同飼養時期或成蛇/幼蛇的蛇毒產量及濃度、毒力與成份之差異與變化。

主要發現：

本計畫已飼養鎖鏈蛇成體 11 隻、幼體 9 隻，以及雨傘節成體 10 隻。二種蛇的大多數個體體重均持續增加。鎖鏈蛇成蛇於飼養前、中、後期以及幼蛇所採集蛇毒的一維/二維電泳圖譜未呈現顯著差別；雨傘節成蛇亦有類似結果。二蛇種的蛇毒蛋白之層析質譜分析亦未發現明顯時期或年齡造成的顯著差異。除了鎖鏈蛇成蛇蛇毒之絲胺酸蛋白酶活性於飼養中期顯著較後期者高，以及鎖鏈蛇幼蛇蛇毒之金屬蛋白酶活性顯著較成蛇者為低以外，二蛇種的蛇毒半致死率、凝血活性、及酵素活性檢測(包括絲胺酸蛋白

酶、金屬蛋白酶、磷脂酶 A₂、L-胺基酸氧化酶、乙醯膽鹼酯酶)實驗結果亦未顯示其因飼養時間不同或年齡層不同而有明顯差異。

結論及建議事項：

鎖鏈蛇或雨傘節蛇毒毒力、成份及酵素活性基本上並未因飼養時間不同或年齡層不同而有明顯差異；這顯示二種蛇種蛇毒在這些方面具有一定程度的安定與不變性。建議後續可再就雨傘節成蛇和幼蛇以及台灣不同地理區蛇毒之毒性與蛋白質成份進行比較分析，並深入探討二種毒蛇蛇毒組成與功能，以及驗證更長的飼養期間是否仍可能造成蛇毒安定性的變化。

關鍵詞：毒蛇飼養、電泳、層析、蛋白質體、毒性、蛇毒變異

英文摘要(字數以不超過六百字為原則)

Purpose :

The World Health Organization recommends that snake venom be collected from the individuals keeping in well-equipped and managed animal facilities. Whether the composition and toxicity of snake venoms from snakes being fed for long time remain stable, or whether the composition and toxicity of snake venom from the young and adults differ, are yet to be explored and confirmed.

Methods and materials :

This project will collect Russel's vipers and banded kraits in the wild in Taiwan and make captive breeding in an internationally-certified venomous snake house, as the relevant feeding factors remain unchanged. By continuously collecting snake venoms from the snakes in different feeding periods or age, we can make comparisons on the compositions and toxicological effects of the venoms. The investigating methods for the compositions of venoms include determining the concentration of venom proteins, (two-dimensional) protein electrophoresis (in reduced or non-reduced conditions), chromatography, and mass spectrometry. The indicators for comparing the toxicity of venoms include the median lethal dose, procoagulating activity, and the activity of related enzymes (including protease, phospholipase, etc.). By comparing the yield / concentration, virulence and composition of venom samples collected in different feeding periods or from adult snakes / young snakes, we can investigate the differences and changes of venom stability.

Results :

We have raised 11 adults and 9 juveniles of eastern Russel's vipers, and 10 adult many-banded kraits. Most individuals of the two snakes continue to gain weight. The one (or two)-dimensional electrophoresis patterns of eastern Russel's vipers' venoms collected at early, middle, and late period of feeding history as well as juveniles were not significantly different; similar trends were also found for many-banded kraits. Chromatographic mass spectrometry analysis of venom proteins in the two species did not reveal significant effects of feeding period or age. Except that the serine protease activity of adult venom was significantly higher at middle period of feeding, and the metalloproteinase activity of juvenile venom was significantly lower than that of adults in eastern Russel's vipers, the median lethal dose, procoagulating activity and enzyme (including serine protease, metalloproteinase, phospholipase A₂, L-amino acid oxidase, and acetylcholinesterase) activity of the venoms in two species have not been shown to be different due to different feeding time or age groups.

Conclusion and suggest :

The virulence, composition and enzyme activity of eastern Russel's vipers and many-banded kraits are basically not significantly different due to different feeding time or age level, which shows that their venoms have a certain degree of stability and invariability. It is suggested that the snake venom of banded kraits with different ages and in different geographical areas of Taiwan can be further compared and analyzed, and the composition and function of the two snake venoms should be further explored. It can also be testified whether longer feeding periods (e.g., greater than 5 years) may cause changes in snake venom stability.

Key words : feeding venomous snakes, electrophoresis, chromatography, proteomics, toxicity, venom variation

壹、前言

疾病管制署現有之蛇毒血清凍晶注射劑包括抗百步蛇蛇毒血清凍晶注射劑、抗雨傘節及飯匙倩蛇毒血清凍晶注射劑、抗龜殼花及赤尾鯮蛇毒血清凍晶注射劑以及抗鎖鏈蛇毒血清凍晶注射劑等4種，每年挽救近千名被毒蛇咬傷的傷患(徐 等, 2013)。其製作過程中，必須自野外收集許多臺灣六大多蛇，包括百步蛇(*Deinagkistrodon acutus*)、龜殼花(*Probothrops mucrosquamatus*)、赤尾青竹絲(*Trimeresurus stejnegeri*)、鎖鏈蛇(*Daboia siamensis*)、雨傘節(*Bungarus multicinctus*)及眼鏡蛇(*Naja atra*)，以取得其蛇毒。這些蛇類主要來自各縣、市政府捕獲或送交收容單位所留置的毒蛇，再加以飼養以利持續採毒。現今世界許多蛇類族群均有明顯減少的趨勢(Reading et al., 2010)，例如鎖鏈蛇僅分布在台灣東部及南部地區(杜, 2004)，其野外族群呈現小族群零星化，自野外穩定收集此類毒蛇有其困難度與風險，亦恐有保育上之爭議。世界衛生組織(World Health Organization, 2018)已建議蛇毒採自飼養於良好設施與管理的動物設施中的毒蛇個體，而非一直從野外抓蛇、取毒、再野放於非原採集地而對其天然族群造成影響。而疾病管制署目前亦需持續至野外收容鎖鏈蛇及雨傘節等毒蛇並圈養於毒蛇室，以維持足夠的毒液採集量。

毒蛇飼養管理為抗蛇毒血清製程管理之源頭；健康、體質量佳之毒蛇方能生產質量俱佳之蛇毒(World Health Organization, 2018)，供進行後續相關實驗及備製抗蛇毒血清。為符合動物保護法中，不輕易犧牲動物及實驗動物之人道管理3R 原則與精神(reduction, replacement, refinement)，兼顧實驗動物管理小組的要求及提升飼育籠中毒蛇存活率，必須精進毒蛇繁養技術。疾病管制署106年度鎖鏈蛇及雨傘節委託繁養技術開發計畫之執行成果

(蔡, 2018)顯示，飼養箱基質及餌料之選擇、多樣化溫度與濕度區塊之提供、病菌及寄生蟲感染之管控，均是長期飼養毒蛇所必需的。鎖鏈蛇偏好較乾且較高溫的基質環境，且其成體及新生幼體均可以成功地以小白鼠長期餵養。雨傘節則偏好高濕基質，且時常深埋且活動於其中，部份個體能以每週餵食多隻小白鼠的方式長期餵養。當能進行長時期的飼養鎖鏈蛇及雨傘節時，飼養期間的蛇毒成份與毒性是否維持穩定品質，包含幼蛇與成蛇蛇毒成份與毒性如何呈現差異，是需要探討與確認的課題。

已知鎖鏈蛇類群的蛇毒成分可能包含(酸性或鹼性)磷脂酶A₂(phospholipase A₂; PLA₂)、蛇毒金屬蛋白酶(snake venom metalloproteinase; SVMP)、血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)、蛇毒絲氨酸蛋白酶(snake venom serine proteinase; SVSP)、L-胺基酸氧化酶(L-amino acid oxidase; LAAO)、凝血因子X似活化酵素 (coagulation factor X activating-like enzyme)或似C型凝集素蛋白(C-type lectin-like protein)等(Risch et al., 2009; Sharma et al., 2015; Tan et al., 2015; Mukherjee et al., 2016; 蔡, 2018)。雨傘節蛇毒成分則為磷脂酶A₂(D49型；如A chain of β-bungarotoxin)、三指型毒素(three finger toxin; 3-FTx；包含orphan類群, α-bungarotoxin, κ-bungarotoxin)，Kunitz型蛋白酶抑製劑(Kunitz-type protease inhibitors；如B chain of β-bungarotoxin)、L-胺基酸氧化酶、肽酶M8(peptidase M8; Pep M8)、蛇毒金屬蛋白酶、乙醯膽鹼酯酶(acetylcholinesterase; AchE)或富含半胱氨酸分泌蛋白(Cysteine-rich secretory protein; CRISP)等(Jiang et al., 2011; Ziganshin et al., 2015; Shan et al., 2016)。蛇毒成份的變異有必要進行因子探討，因為蛇毒引起的症狀與毒液組成和含量有高度相關(Gao et al., 2013)，並且關係到所生產的抗蛇毒血清產量及品質的穩定與否(World

Health Organization, 2018)。不同親緣、族群、地理區、棲地、個體、年齡、食性、體型大小、(性別)，與取毒頻度、季節、存放時間等內外在條件下所採集的蛇毒產量、成份與品質可能有差異(Willemse and Hattingh, 1978, 1980; Willemse et al., 1979; Chippaux et al., 1991; Mackessy, 1988; Daltry 1996; Saldarriaga et al., 2003; Antunes et al., 2010; Madrigal et al., 2012; Gao et al., 2013)。瞭解蛇毒變異來源因子，有助於瞭解蛇毒生態演化、毒理與抗蛇毒血清療效與適用性。在影響鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒成分的可能因子中，其蛇毒成份與毒性是否隨飼養時間而有變化，以及其幼蛇與成蛇蛇毒成份與毒性的差異性比較，至今均仍未有系統性的研究報導而將於本計畫中進行探討。

本計畫將採自台灣地區的鎖鏈蛇及雨傘節圈養於經過認證的毒蛇動物房，相關飼養因子維持不變時，於不同飼養時期採其毒液以進行其蛇毒蛋白的比較分析。使用蛇毒蛋白濃度定量、蛇毒蛋白(二維)電泳分析(包含變性與非變性蛋白狀況)、(逆相)層析法、質譜儀等鑑別蛇毒蛋白成分組成的分析方法，並且進行蛇毒致死率LD₅₀、凝血活性、蛋白酶活性、磷脂酶活性等比較蛇毒作用的檢測，以分析不同飼養時期或成蛇/幼蛇的蛇毒產量及濃度、毒力與成份之變化，藉以做為後續鑑別此二蛇種之蛇毒蛋白組成的重要依據，以維持抗蛇毒血清原料供應之品質與安定度。

貳、材料與方法

1. 鎖鍊蛇長期飼養試驗

1.1. 文件申請與動物採集

進行實驗動物使用申請(學校 IACUC)及保育類野生動物利用申請(農委會)。動物來源包括採自高雄、屏東或台東的鎖鏈蛇或雨傘節。

1.2. 蛇類照養/形質量測與蛇毒採集

首先將欲進行飼養試驗的蛇隻置於專門的蛇類形質記錄箱，記錄每一個體的基本形質資料[如：吻肛長(snout-vent length)、尾長(tail length)及體重]，並判別雌雄性別及生殖狀態(是否懷孕)。計算蛇類體重增加率，公式為：

$$\text{體重增加率} = 100\% \times [\text{最終體重(g)} - \text{初始體重(g)}] / \text{初始體重(g)}$$

實驗期間每 1-2 週(雨傘節每週 1 次、鎖鏈蛇兩週 1 次)進行餵食 ICR 小白鼠(購自樂斯科公司)並隨時提供飲水。定期(約每 2 週)量測計算蛇類體質量變化以及約每 2 個月進行一次蛇毒採取。執行時均遵照已建立的動物房毒蛇照養及採毒的標準作業流程(SOP)。所有人員均有穿著長筒膠鞋以進行安全防護。除了一人抓蛇外，其餘人員並未直接接觸蛇體。為確保能完全感知與控制蛇類動作，抓蛇者以蛇勾輔助抓蛇而未使用防咬手套(World Health Organization, 2018)。鎖鏈蛇蛇毒採取使用咬膜採毒法，雨傘節蛇毒採取使用毛細管套住毒牙輔助取毒(Mirtschin et al., 2006; Gao et al., 2011)。將每一採毒個體之蛇毒編號並單獨收集於單一器皿中，秤取每一採毒蛇類之新鮮未乾燥毒液濕重(含水重)後，以冷凍真空乾燥機進行冷凍乾燥程序。乾燥後秤取蛇毒乾重，並置於-20 °C 冷藏冰箱集中保存以利進行後續實驗。

1.3. 檢疫與驅蟲(參考 Chanhome et al., 2001)

新進蛇隻將進行 4 週檢疫期以檢視其健康狀態。持續飼養之蛇隻每 2 個月以餵食管灌餵驅蟲藥，以期去除體內寄生蟲。驅蟲藥包含 Metronidazole 及 Praziquantel 二種，購自民間動物醫院；由本校獸醫學院學生協助灌食藥劑，其劑量為 $0.1 \text{ mg} / \text{kg}$ 蛇重。此外，蛇類疾病診療將與屏科大工作犬訓練中心祈偉廉獸醫師合作進行。

1.4. 飼養裝置與環境因子基本設定

蛇類飼養於已通過 AAALAC International (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International) 國際認證的兩生爬行動物房內。動物房目前總地板面積約 110 平方公尺，包含準備室、監控/休息室、檢疫室、操作室、手術室、飼養室(A)、飼養室(B)、貯藏室以及清潔室。動物房內平時空氣溫度 $25\text{-}30^\circ\text{C}$ 、相對濕度 40-70 %，並以儀器隨時監控記錄。動物乃個別飼養在適合大小的訂製塑膠飼養箱內 [$638 \text{ mm} \times 425 \text{ mm} \times 166 \text{ mm}$ (31 L)]，箱蓋及箱壁上有孔洞以利通氣，箱內有隱蔽物及水盒。利用可卸式接合管系統將二個飼養箱側面連接成一體。二箱中共只放入一隻蛇，蛇可通過接合管在二個箱中自由移動選擇位置。改變二箱中的(基質)環境條件，提高環境豐富度，讓蛇自由活動並選擇其所偏好的環境。飼養箱放置在金屬製多層架上，二者之間為加熱片及隔熱塑膠片；藉由加熱片溫度控制系統，可提供飼養箱不同溫度區塊。各飼養室有通氣系統定時運作，以利新鮮氣體流通，其室內照明之光週期為 12L:12D。動物房經過特別設計，沒有可讓動物鑽入、躲藏或脫逃的縫隙或出口。

2. 蛇毒蛋白成分分析

2.1. 蛇毒蛋白定量

使用 Bio-Rad 試劑組進行蛇毒蛋白質定量。將 96 孔微量滴定盤中每槽加入 10 μ L 系列濃度蛋白質標準品(Bovine serum albumin, BSA; Sigma A8022)或蛇毒樣本。每槽再加 200 μ L protein assay dye，同時避免氣泡產生。輕拍滴定盤的一側，使添加的各成份均勻混合。靜置室溫 5 min。以 ELISA reader 測 OD₅₉₅。作圖畫出標準校正線，並決定蛇毒樣本的蛋白質濃度。

2.2. 蛇毒一維蛋白質電泳分析(SDS-PAGE)

鑄膠：組裝鑄膠套件，選擇所需的分離膠體濃度(例如鎖鏈蛇毒使用 12.5%、雨傘節蛇毒使用 15% SDS-PAGE)並進行配置。先配製並加入下層分離膠，加完後儘快在各膠體液面上方小心加入二次水，以壓平膠體液面。約 0.5~1 小時後，凝膠完成，倒出上層的水。配製並加入上層聚集膠體溶液，放置樣本梳(comb)，約 30 分鐘可完成凝膠。如未馬上使用，可用保鮮膜包覆放進 4 °C 中保存，期限為一週。

電泳：先取出膠片回溫，將 SDS 電泳緩衝液，倒入電泳槽的底部。接著把膠片放入並以電泳夾夾妥後，在電泳玻片的上方，加入電泳緩衝液。取適量的蛇毒樣本(50 μ g，約 0.4~1.6 μ L)加水至體積 21 μ L，再加入 7 μ L 的還原劑(4x Laemmli Sample buffer 與 2-Mercaptoethanol 以體積 9:1 配製)，混和均勻後於 100 °C 中煮 5 min；跑非還原膠片時則樣本加水至體積 21 μ L 再加入 7 μ L 的 4x Laemmli Sample buffer，混和均勻後於 100 °C 中煮 3 min，待冷卻後離心 30 秒，以微量尖管小心的注入膠體中的樣本槽。搭配分子量標準蛋白質(約 10 μ L)，作為蛋白質分子量參考的依據。將電泳槽上部的蓋子蓋上，確認正負極裝置正確，連接上電源供應器，定電壓先以 30 V 跑 30 min 讓樣本集中在樣本槽底部，接著再改以 110~150 V 進行 120 分鐘的電泳。待追蹤染料即將跑出膠片外，關掉電源，取出膠片中的膠體，以 Coomassie Brilliant Blue R-250 染液進行染色 30-60 分鐘，接著退染至肉眼可見膠片結

果並拍照。

2.3. 蛇毒二維蛋白質電泳分析(2-DE; 參考 Nawarak et al., 2003; Guércio et al., 2006; 黃，2014)

以二維電泳法進行不同飼養時期採集的蛇毒蛋白質成分分析。以 PROTEAN® i12™IEF System (Bio-rad)進行二維電泳，取二次水清洗聚焦盤(focusing tray)，平均置入蛇毒蛋白樣品($150\text{ }\mu\text{g}$)。撕去膠條背面的保護膜，膠面朝下緩慢入聚焦盤。完成後覆蓋 1 mL 磺油以防止膠條乾焦化。水合反應(rehydration)時，將電壓控制在 50 V ， 16 小時，使水合溶液及蛋白質樣品混合並吸入 IPG 膠條中；接著設定分為 S1-S4 四個階段，S1 設定 250 V ， 15 分鐘，其作用在於移去鹽類子及汙染物；S2 使用線性模式將電壓提升至聚集電壓(focusing voltage)；S3 為真正等電聚焦設定，設定電壓(4000 V)與累積電壓時間值($20000\text{ V}\cdot\text{hr}$)；S4 在於設定 500 V ，避免聚焦的蛋白質發生擴散，當反應完成後即進行膠條平衡反應[緩衝液含甘油及碘乙酰胺(Iodacetamide)]。接著製備 12.5% SDS-PAGE 用於鎖鏈蛇毒、 15% SDS-PAGE 用於雨傘節蛇毒，注入鑄膠架，於上層加入二次水壓平。待 30 分鐘後膠片即凝結完成，將膠條膠面朝前放入膠片之上方使與膠面完全接觸，將低融點 Agarose 液加滿膠片上緣以完成封膠步驟。待膠體均凝固後，進行電泳。跑膠用之緩衝溶液為 1X Tris/Glycine/SDS 之 running buffer，固定電壓 110 V ， 110 分鐘。完成後，取出膠片以 Coomassie brilliant blue R-250 染液進行染色 $30\text{-}60$ 分鐘，接著退染至肉眼可見膠片結果並拍照。

2.4. 蛋白質質譜鑑定(LC-MS/MS; 參考 Nawarak et al., 2003; Guércio et al., 2006; 黃，2014)

2.4.1. 藥品試劑

Iodoacetamide (IAM), Sodium dodecyl sulfate (SDS), Trichloroacetic acid (TCA), Octyl β-D-glucopyranoside 皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)；Formic acid (FA), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Ammonium bicarbonate (ABC) 皆購自 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)；Trypsin 購自 Promega (Madison, WI, USA)；Acetonitrile (ACN) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)。

2.4.2. 質譜儀及分析軟體

LCQ DECA XP MAX ion trap mass spectrometer 購自 Thermo Finnigan，Mascot Distiller、Mascot search engine V2.2 皆購自 Matrix Science。

2.4.3. Trichloroacetic acid (TCA)沉澱蛋白水解

首先將 100 μg 蛋白樣品以 60 μL 二次水回溶，加入 9.3 μL 的 7.5% SDS 和 0.7 μL 的 1 M 1,4-Dithiothreitol 水溶液，混合均勻後於 95 °C 加熱 5 分鐘，加熱後將其置於冰上待其降溫再加入 8 μL 的 0.5 M Iodoacetamide 水溶液於室溫下避光搖晃反應 30 分鐘，反應結束後加入 50 μL 的 50% (W/v)TCA 並置於冰上反應 30 分鐘。接著以轉速 14000 rpm 離心 25 分鐘，小心取出上清液，再加入 200 μL 的二次水，以轉速 14000 rpm 離心五分鐘，小心去除上清液，洗掉殘留的藥劑，此步驟重複共三次。將沉澱物以 100 μL 的 50 mM Ammonium bicarbonate 回溶並加入 5 μL 的 2% N-octyl-glucoside 幫助回溶。最後以 1:50 (酵素：蛋白)的比例加入 trypsin，放置于 37 °C 培養箱反應 16 小時。水解反應結束後將樣品凍乾，保存在 -20 °C。

2.4.4. LC-MS/MS 質譜分析

在分析試驗樣品前，以 100 pmol / μL BSA 水解產物為標準品進行測試，確認質譜儀的靈敏度及準確度狀態，且將訊號強度、背景值、真空度及噴灑狀態調整至最穩定的狀態在開始進行樣品分析。樣品以 5% ACN / 0.1%

FA 回溶，進樣體積為 5 μ L，採取自動進樣模式。下表為 HPLC (ESI)梯度設定：

時間 (分鐘)	流速 (mL/min)	5%ACN+0.1%FA (%)	95%ACN+0.1%FA (%)
0.00	0.200	95.00	5.00
30.00	0.200	70.00	30.00
40.00	0.200	70.00	30.00
55.00	0.200	30.00	70.00
65.00	0.200	20.00	80.00
69.00	0.200	20.00	80.00
70.00	0.200	95.00	5.00
80.00	0.200	95.00	5.00

將處理後的蛋白質樣品利用 LCQ DECA XP MAX ion trap mass spectrometer，液相層析質譜儀由軟體控制調整參數進行掃瞄。用 A 液(5% ACN / 0.1% FA)和 B 液(95% ACN / 0.1% FA)沖提逆相高效層析管柱(150 x 2.1mm, Kinetex 5u C18 100A)內的蛋白質樣品，首先將 5%的動相 B 從第 0 分鐘到 30 分鐘逐漸提高至 30%，而後第 30 分鐘至第 40 分鐘維持 30%動相 B，接著動相 B 在第 40 分鐘到 55 分鐘逐漸提升至 70%。接著用 10 分鐘的時間將動相 B 提高至 80%並沖提 4 分鐘，最後在 1 分鐘內將動相 B 降至起始濃度 5%並維持 10 分鐘以利于自動進樣時多次分析樣品。分析後 MS/MS 圖譜資料放入 MASCOT (Matrix Science)軟體中進行資料庫比對分析。選擇資料庫 NCBInr database，酵素 Trypsin，搜尋分類 Serpentes，固定修飾 Carbamidomethyl，可變修飾 oxidation，胜肽質量誤差 2.0 kD 等參數，進行比對工作。比對資料可藉由 MASCOT 計算出鑑定分數(離子分數>46)、胜肽比對覆蓋率、分子量、等電點等資訊來判斷蛋白質身分。

3. 半致死率(Median lethal dose; LD₅₀) (參考 Chang et al., 2013; Shan et al., 2016)

LD_{50} 的測定是取 6 組雄性 ICR 小白鼠(每組 4 隻)，進行腹腔注射 $100 \mu\text{L}$ 不同濃度的蛇毒(以 PBS 進行 2 倍數系列稀釋配製)。考量實驗動物減量(reduction)，將只隨機選擇其中 3 隻鎖鏈蛇成蛇、3 隻雨傘節成蛇、3 隻鎖鏈蛇幼蛇的蛇毒用在半致死率檢測中。記錄室溫下 24 小時後受測動物的死亡率，以 Reed and Muench method (Laurence and Hannah, 1938) 進行統計，以求出 LD_{50} 。

4. 凝血性(Procoagulating activity) (參考 Tan et al., 2015)

取 $200 \mu\text{L}$ 老鼠血漿(含有 3.2% sodium citrate)加入 $10 \mu\text{L}$ 蛇毒樣本($200 \mu\text{g}$ ，以 PBS 配製)。每 30 秒測量溶液之 OD_{405} 達 10 分鐘。凝血時間定義為吸光測量值比首兩次吸光測量值的平均值大 0.02 unit 的時間。

5. 蛇毒酵素活性分析

檢測並比較每隻蛇於整個飼養期的前期、中期、後期以及幼蛇之蛇毒酵素活性測定。考量二種蛇毒之主要酵素種類不同以及蛇毒量有限，本計畫檢測鎖鏈蛇毒之 4 種酵素(絲胺酸蛋白酶、金屬蛋白酶、磷脂酶 A₂、胺基酸氧化酶)活性，而檢測雨傘節蛇之 3 種酵素(磷脂酶 A₂、乙醯膽鹼酯酶、胺基酸氧化酶)活性。

5.1. 絲胺酸蛋白酶(SVSP) (參考 Sousa et al., 2017)

$50 \mu\text{L}$ 的 $500 \mu\text{M}$ 顯色合成受質 benzoyl-arginyl-p-nitroanilide (L-BAPNA) (Sigma-Aldrich[®])、 $130 \mu\text{L}$ 的 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 與 $20 \mu\text{L}$ 毒液樣品($200 \mu\text{g}$)在 37°C 反應 40 分鐘，進行測量水解產物的 OD_{405} 。一個酵素活性單位(U)定義為每分鐘產物增減 $1.0 OD_{405}$ 所需酵素量。酵素比活性單位設

為 U / g protein。

5.2. 磷脂酶 A₂ (PLA₂) (參考 Antunes et al., 2010; Shan et al., 2016)

將蛇毒(1 μg)和緩地加入反應液(0.1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 7 mM Triton X-100, 0.265% soybean lecithin and 98.8 μM phenol red, pH 7.6)中，其中大豆卵磷脂 soybean lecithin 為受質。測量溶液之 OD₄₀₅ 達 2.5 分鐘(室溫)。一個酵素活性單位(U)定義為每分鐘產物增減 0.3 OD₅₅₈ 所需酵素量。酵素比活性單位設為 U / μg protein。

5.3. 金屬蛋白酶(MPs) (參考 Chang et al., 2013; Wang and Huang, 2002; Wang et al., 2004)

配製 100 μL 反應液包含毒液樣品(200 μg)及偶氮酪蛋白 azocasein (0.5 mg; in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)，於 37 °C 反應 90 分鐘。加入 200 μL 5% trichloroacetic acid 以終止反應。離心 1000 g, 5 分鐘。取 150 μL 上清液並以等體積 0.5 N NaOH 終止反應，測量水解產物的 OD₄₄₀。一個酵素活性單位(U)定義為每分鐘產物增減 1.0 OD₄₄₀ 所需酵素量。酵素比活性單位設為 U / g protein。另外的實驗則在加入 azocasein 前，先加入 10 mM EDTA 於室溫反應 30 分鐘，以檢測移除金屬離子對此酵素活性之影響。

5.4. 乙醯膽鹼酯酶(AChE) (參考 Chang et al., 2013)

使用 1.5 mM acetylthiocholine iodide 為受質[溶於 200 μL of 10 mM sodium phosphate (pH 7.5), 0.04 M MgCl₂, 0.2 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)]，與毒液樣品(1 μg)在 25 °C 反應，測量水解產物的 OD₄₀₅。產物 nitrobenzoate 的生成量(nmol)是由 molar absorption coefficient = $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 來計算。酵素比活性單位設為 μmol / min / mg protein。

5.5. L-胺基酸氧化酶(LAAO) (參考 Lu et al., 2018 ; Zaineb A-K et al., 2014)

將 100 μ L 反應液[50m M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 2.0 mM L-Leu, 2U/mL of horseradish peroxidase, 10 mM o-phenylenediamine] 含毒液樣品(200 μ g)在 37 °C 反應 60 分鐘，測產物之 OD₄₉₂。一個酵素活性單位(U)定義為每分鐘產生 1 nmol H₂O₂ 所需酵素量(molar extinction coefficient = 7.82×10^3 M⁻¹ cm⁻¹)。酵素比活性單位設為 U / mg protein。

6. 統計分析

以 one (or two)-way ANOVA 比較蛇毒酵素活性是否因飼養時間長短(前、中、後共三個時期；repeated measures ANOVA)或成幼蛇不同(前、中、後、幼蛇共四個時期；ANOVA)而有差異。

參、結果

1. 動物採集、形質量測、蛇毒樣本選擇：

已飼養鎖鏈蛇成體(計畫初始重量大於 100 克者) 11 隻、幼體(計畫初始重量小於 40 克者) 9 隻，以及雨傘節成體 10 隻。其形質量測與蛇毒採集結果如表一及表二。鎖鏈蛇方面，有一成體除外，其他個體體重均持續增加；成蛇體重增加率為 $32.8 \pm 31.3\%$ (mean \pm SD)，幼蛇體重增加率為 $123.4 \pm 47.8\%$ 。雨傘節方面，有一成體除外，其他個體體重均持續增加；體重增加率為 $30.7 \pm 28.7\%$ 。

收集每隻成蛇於整個飼養期的前期、中期、後期之蛇毒，以及幼蛇於飼養中期之蛇毒。由於計畫至今不及 6 個月，為能比較更長的飼養期間之蛇毒樣本蛋白組成差異性，因此納入本計畫案以前即已定期收取之同隻蛇的蛇毒樣本一同檢測比較，這可使比較的飼養時期超過一年以上。鎖鏈蛇用以比較的成體編號為 Dr316、Dr318、Dr320、Dr324、Dr338、Dr326，這些鎖鏈蛇個體多數自 2017 年 3 月開始(飼養前期)即以同本計畫之方式進行飼養及定期取毒，其飼養中期及後期則為 2017 年 12 月及 2018 年 9 月底。鎖鏈蛇幼體為 Dr350, Dr354, Dr360, Dr362, Dr368, Dr396，本計畫期間只取一次蛇毒。雨傘節用以比較的個體編號為 Bm1002、Bm1040、Bm1066、Bm1068、Bm1082、Bm1140、Bm1144、Bm1148、Bm1150，均為成體，這些雨傘節個體多數自 2017 年 8 或 10 月開始(飼養前期)即以同本計畫之方式進行飼養及定期取毒，其飼養中期及後期則為 2018 年 2 或 4 月及 2018 年 9 月底。

2. 一維及二維蛋白質電泳：

2.1. 鎖鏈蛇成蛇(例如 Dr316, Dr318, Dr320, Dr324)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的一維電泳圖譜(圖一至圖四)並未呈現顯著差別。鎖鏈蛇成蛇與幼蛇(例如上述蛇隻與幼蛇 Dr350, Dr354, Dr360, Dr362, Dr368, Dr396)蛇毒的一維電泳圖譜(圖一至圖四)之間亦無顯著差別。雨傘節成蛇(例如 Bm1002, Bm1040, Bm1066, Bm1144, Bm1148, Bm1150)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的一維電泳圖譜(圖五至圖七)並未呈現顯著差別。

2.2. 鎖鏈蛇(例如 Dr324, Dr316)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的二維電泳圖譜(圖八至圖十)之間亦未呈現顯著差別。鎖鏈蛇幼蛇(例如 Dr368)蛇毒的二維電泳圖譜(圖十一)與成蛇者之間亦未呈現顯著差別。雨傘節成蛇(例如 Bm1002)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的二維電泳圖譜(圖十二至圖十四)並未呈現顯著差別。

3. LC-MS/MS 質譜分析

3.1. 比較鎖鏈蛇成蛇(例如 Dr316, Dr318, Dr324, Dr338)於飼養前、中、後期之蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析所得之圖譜後，可發現各圖譜間具很高的相似度，僅各 peaks 之相對含量多寡有時具些許差別(圖十五至圖十八)。鎖鏈蛇成蛇(Dr324)與幼蛇(例如 Dr354, Dr360, Dr362, Dr368)蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜(圖十九)之間亦未呈現顯著差別。雨傘節(例如 Bm1082, Bm1144, Bm1148)於飼養前、中、後期之蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析之圖譜亦大致相似(圖二十一至圖二十三)；只有 Bm1002 之前期蛇毒層析圖譜略異於中後期者(圖二十)，但其一維電泳結果則未發現有明顯時期差異性(圖五、圖六)。

3.2. 上述鎖鏈蛇成蛇($n = 4$)於各飼養時期的蛇毒經層析質譜分析，可鑑

定到 20 種以上符合部份序列的蛋白質組成(表三至表五)。三個時期之間的主要蛋白成分差異不顯著，共包含 Kunitz-type serine protease inhibitor (KSPI)、Phosphodiesterase (PDE)、Phospholipase A₂ (PLA₂)、Snalec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)、Snake venom metalloprotease (SVMP)、Snake venom serine protease (SVSP)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)等蛋白類群(表七)。鎖鏈蛇幼蛇($n = 4$)蛇毒可鑑定出的蛋白種類亦同上述的成體蛇毒之蛋白類群。雨傘節成蛇($n = 4$)於各飼養時期的蛇毒經層析質譜分析，可鑑定到 22 種以上符合部份序列的蛋白質組成(表八至表十)。三個時期之間的主要蛋白成分差異亦不顯著，共包含 Acetylcholinesterase (AChE)、beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)、Cysteine-rich seceretory protein (CRISP)、Hyaluronidase、L-amino acid oxidase (LAAO)、Phospholipase A₂ (PLA₂)、Snake venom metalloprotease (SVMP)、TBP (proteins taking part in toxin biosynthesis)、Three finger toxin (3-FTx)、Vespryn 及其他等蛋白類群(表十一)。

4. 半致死率(LD_{50})：

鎖鏈蛇成蛇(Dr316, Dr318, Dr324)於飼養前、中、後期的蛇毒(repeated measure ANOVA: $F_{2,4} = 0.56, P = 0.61$)以及幼蛇(Dr350, Dr360, Dr368)蛇毒導致小白鼠半致死率的劑量之間並未有統計上顯著差異(ANOVA: $F_{3,8} = 0.64, P = 0.61$)，雖然飼養前期者之 LD_{50} 值略低些(圖二十四)。雨傘節成蛇(Bm1002, Bm1066, Bm1082)於飼養前、中、後期之蛇毒導致小白鼠半致死率的劑量之間則未有顯著差異(repeated measure ANOVA: $F_{2,4} = 0.08, P = 0.92$ ；圖二十五)。

5. 凝血性(Procoagulating activity)：

鎖鏈蛇成蛇(Dr316, Dr318, Dr 320, Dr324, Dr 326, Dr338)於飼養前、中、後期(repeated measure ANOVA: $F_{2,10} = 3.54, P = 0.069$)以及幼蛇(Dr362, Dr368, Dr396)的蛇毒，導致鼠血凝血時間之間並無顯著差異($F_{3,17} = 1.29, P = 0.31$)，雖然幼蛇者之凝血時間略長(圖二十六)。

6. 蛇毒酵素活性分析：

6.1. 絲胺酸蛋白酶(SVSP)

鎖鏈蛇成蛇(Dr316, Dr318, Dr 320, Dr324, Dr 326, Dr338)蛇毒絲胺酸蛋白酶活性於飼養中期顯著較後期者高(repeated measure ANOVA: $F_{2,10} = 18.03, P = 0.0005$)，而幼蛇蛇毒之 SVSP 活性值並無特別偏低或偏高的情況(ANOVA: $F_{3,20} = 3.71, P = 0.029$ ；圖二十七)。

6.2. 磷脂酶(PLA_2)

鎖鏈蛇成蛇(Dr316, Dr318, Dr 320, Dr324, Dr 326, Dr338)於飼養前、中、後期(repeated measure ANOVA: $F_{2,10} = 0.025, P = 0.96$)以及幼蛇(Dr350, Dr354, Dr360, Dr362, Dr368, Dr396)的蛇毒磷脂酶 PLA_2 活性之間未有顯著差異(ANOVA: $F_{3,20} = 2.52, P = 0.087$ ；圖二十八)，雖然幼蛇者略偏低。雨傘節成蛇(Bm1002, Bm1040, Bm1066, Bm1068, Bm1082, Bm1140, Bm1144, Bm1148, Bm1150)於飼養前、中、後期的蛇毒磷脂酶 A_2 活性之間亦未有顯著差異(repeated measure ANOVA: $F_{2,16} = 0.004, P = 0.99$ ；圖二十九)。

6.3. 金屬蛋白酶(MPs)

因為試驗中有比較加入 EDTA 之效應，因此在此使用 two-way (二因子：不同年齡或飼養時期以及有無 EDTA) ANOVA 進行統計檢定。鎖鏈蛇成蛇

(Dr316, Dr318, Dr 320, Dr324, Dr 326, Dr338)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的金屬蛋白酶MPs活性之間未有顯著差異(repeated measure ANOVA: $F_{2,25} = 4.43, P = 0.023$)，但幼蛇(Dr350, Dr354, Dr360, Dr362, Dr368, Dr396)者顯著較低(ANOVA: $F_{3,40} = 6.54, P = 0.0011$)。於加入EDTA後酵素活性則顯著下降(ANOVA: $F_{1,40} = 267.76, P < 0.0001$)，二個因子之間不具有顯著交互作用(ANOVA: $F_{3,40} = 0.084, P = 0.97$)。如圖三十所示。

6.4. 乙醯膽鹼酯酶(AChE)

雨傘節成蛇(Bm1002, Bm1040, Bm1066, Bm1068, Bm1082, Bm1140, Bm1144, Bm1148, Bm1150)於飼養前、中、後期的蛇毒乙醯膽鹼酯酶活性之間不具有顯著差異(repeated measure ANOVA: $F_{2,16} = 2.48, P = 0.12$ ；圖三十一)。

6.5. L-胺基酸氧化酶(LAAO)

鎖鏈蛇成蛇(Dr316, Dr318, Dr 320, Dr324, Dr 326, Dr338)於飼養前、中、後期(repeated measure ANOVA: $F_{2,10} = 0.35, P = 0.71$)所採蛇毒以及與幼蛇(Dr350, Dr354, Dr360, Dr362, Dr368, Dr396)蛇毒之L-胺基酸氧化酶活性之間未有顯著差異(ANOVA: $F_{3,20} = 0.47, P = 0.71$ ；圖三十二)。雨傘節成蛇(Bm1002, Bm1040, Bm1066, Bm1068, Bm1082, Bm1144, Bm1148, Bm1150)於飼養前、中、後期的蛇毒蛇毒之L-胺基酸氧化酶活性之間亦未有顯著差異($F_{2,14} = 0.81, P = 0.46$ ；圖三十三)。

肆、討論

1. 動物飼養狀況評估

計畫執行期間，多數飼養蛇隻均能持續增加體質量，鎖鏈蛇幼蛇體重更是快速增加(增加率平均為 123.4%)。鎖鏈蛇及雨傘節中，各有一隻個體(Dr324, Bm1256)於計畫期間體重減少，其中鎖鏈蛇已經祈偉廉獸醫師診療判斷可能是病原菌感染呼吸道造成體況不佳而體重減輕，已進行二週抗生素(每天一針)施打療程，目前仍在恢復中。而體重減少的雨傘節個體則可能是較敏感且只有偶而能自行進食，需人為嘗試誘食以增加其進食量。

體重減少的雨傘節個體(Bm1256)，由於總飼養時間不夠長(未達半年)，其蛇毒並未進行蛋白組成或活性檢測。體重減少的鎖鏈蛇(Dr324)蛇毒則有進行蛋白組成與活性檢測，其於飼養後期體重才有減少情況，此時期所採蛇毒的蛋白組成(例如電泳圖譜)與酵素活性(包含磷脂酶 A₂、絲胺酸蛋白酶、金屬蛋白酶、L-胺基酸氧化酶)，並無明顯異於(低於)其他蛇隻者。體重無法持續增加的個體是否影響蛇毒蛋白活性，仍需要較多的樣本數進行驗證。

此外，鎖鏈蛇幼蛇及雨傘節蛇毒量較少，但本計畫執行時，仍可有效使用所採毒量以完成主要的實驗因子檢測與比較。若有足夠多的蛇隻可採毒，則可考量合併多隻蛇的蛇毒液以累積足夠毒液量。然而鎖鏈蛇野外族群量小，可能無法有效率收集到多量的幼蛇。若需穩定且足夠的樣本數，則可進行繁殖飼養計畫。

2. 蛇毒安定性評估

由結果可知，除了鎖鏈蛇成蛇蛇毒絲胺酸蛋白酶活性於飼養中期顯著較後期者高，以及鎖鏈蛇幼蛇的金屬蛋白酶活性顯著較成蛇者為低以外，已

進行的鎖鏈蛇或雨傘節蛇毒半致死率、凝血活性、蛋白質電泳分析、層析質譜分析及酵素活性檢測實驗結果並未顯示其因飼養時間不同或年齡層不同而有明顯差異。這顯示二種蛇種蛇毒在這些方面具有一定程度的安定性。許多因子可能影響蛇毒產量、成份與品質(Willemse and Hattingh, 1978, 1980; Willemse et al., 1979; Chippaux et al., 1991; Mackessy, 1988; Daltry 1996; Saldarriaga et al., 2003; Antunes et al., 2010; Madrigal et al., 2012; Gao et al., 2013)，其中蛇毒成份與毒性是否隨飼養時間而有變化，以及其幼蛇與成蛇蛇毒成份與毒性的差異性比較，以往未有系統性的研究報導而於本計畫中進行探討並得知解答。確認各因子對蛇毒安定性的影響，將有助於瞭解蛇毒生態演化、毒理與抗蛇毒血清療效與適用性。未來可探討更長的飼養期間(例如大於 5 年)是否仍可能造成蛇毒安定性的變化。

3. 不同國家(地理區)蛇毒蛋白質成份比較

本研究之鎖鏈蛇(包含成幼蛇)的蛇毒蛋白經層析質譜分析，可鑑定到的主要蛋白成分包含 Kunitz-type serine protease inhibitor (KSPI)、Phosphodiesterase (PDE)、Phospholipase A₂ (PLA₂)、Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)、Snake venom metalloprotease (SVMP)、Snake venom serine protease (SVSP)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)等蛋白類群(表七)。此與其他地理區(例如斯里蘭卡、印度、巴基斯坦、緬甸、泰國等地; Risch et al., 2009; Sharma et al., 2015; Tan et al., 2015; Mukherjee et al., 2016)的鎖鏈蛇蛇毒成份仍有待後續比較與探討。此外，雨傘節成蛇的蛇毒可鑑定到的主要蛋白質類群包含 Acetylcholinesterase (AChE)、beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)、Cysteine-rich seceretory protein (CRISP)、Hyaluronidase、L-amino acid oxidase (LAAO)、Phospholipase A₂ (PLA₂)、Snake

venom metalloprotease (SVMP)、TBP (proteins taking part in toxin biosynthesis)、Three finger toxin (3-FTx)、Vespryn 及其他。此與大陸或東南亞地區者(Jiang et al., 2011; Ziganshin et al., 2015; Shan et al., 2016)則大致相似，細部差異處則有待後續探究。

4. LC-MS/MS 分析前是否進行 trypsin 作用

本研究的 LC-MS/MS 分析是在進行 trypsin 作用之後進行(參考 Risch et al., 2009; Sharma et al., 2015; Tan et al., 2015; Ziganshin et al., 2015; Mukherjee et al., 2016; Shan et al., 2016)；然而，Villalta et al. (2012)及 Sanz et al. (2018)進行台灣鎖鏈蛇、龜殼花、赤尾青竹絲蛇毒蛋白質體分析時，並不經過 trypsin 的作用來進行的。後續的實驗可將蛇毒樣本不經過 trypsin 作用而進行 LC-MS/MS 分析，以利於與相關文獻研究做比較。

伍、結論與建議

計畫執行期間，多數飼養蛇隻均能正常照養並持續增加體質量，鎖鏈蛇幼蛇體重更是快速增加。已進行的鎖鏈蛇或雨傘節蛇毒半致死率、凝血活性、蛋白質電泳分析、層析質譜分析及酵素活性檢測實驗結果顯示鎖鏈蛇或雨傘節蛇毒毒力、成份及酵素活性基本上不因飼養時間或年齡而不同，而有一定程度安定與不變性。本計畫建立各種指標來分析飼養期間蛇毒安定性的變化，將對疾病管制署製造抗蛇毒血清的基本原料(蛇毒)管控提供實證文獻支持，有助於增進其後續研發品質並具體應用於其他種毒蛇的蛇毒安定性管控。本計畫飼養鎖鏈蛇幼蛇可以快速增加体重，且成蛇和幼蛇蛇毒毒性比較，有助瞭解抗蛇毒血清療效。建議後續可再就雨傘節成蛇和幼蛇以及不同局部地理區(例如台灣北、中、南、東部地區)蛇毒之毒性與蛋白質成份進行比較分析與蒐集後續文獻紀錄。未來可探討更長的飼養期間(例如大於 5 年)是否仍可能造成蛇毒安定性的變化。

陸、計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫執行期間，多數飼養蛇隻均能正常照養並持續增加體質量，鎖鏈蛇幼蛇體重更是快速增加。
2. 已進行的鎖鏈蛇或雨傘節蛇毒半致死率、凝血活性、蛋白質電泳分析、層析質譜分析及酵素活性檢測實驗結果並未顯示其因飼養時間不同或年齡層不同而有明顯差異。這顯示二種蛇種蛇毒在這些方面具有一定程度的穩定性。
3. 建議後續可再就雨傘節成蛇和幼蛇以及不同局部地理區(例如台北、中、南、東部地區)蛇毒之毒性與蛋白質成份進行比較分析與蒐集後續文獻紀錄。未來可再深入探討其蛇毒組成與功能以及驗證更長的飼養期間(例如大於 5 年)是否仍可能造成蛇毒安定性的變化。藉以做為後續鑑別此二蛇種之蛇毒蛋白組成的重要依據，並維持抗蛇毒血清原料供應之品質與安定度。

柒、參考文獻

- Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. 2010. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 56: 1443–1458.
- Sanz L, Quesada-Bernat S, Chen PY, Lee CD, Chiang JR, Calvete JJ. 2018. Translational venomics: Third-generation antivenomics of anti-Siamese Russell's Viper, *Daboia siamensis*, antivenom manufactured in Taiwan CDC's Vaccine Center. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 3: 66; <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020066>
- Chang HC, Tsai TS, Tsai IH. 2013. Functional proteomic approach to discover geographic variations of king cobra venoms from Southeast Asia and China. *Journal of Proteomics* 89: 141–153.
- Chanhome L, Jintakune P, Wilde H, Cox MJ. 2001. Venomous snake husbandry in Thailand. *Wilderness and Environmental Medicine* 12: 17–23.
- Chippaux J-P, Williams V, White J. 1991. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29: 1279–1303.
- Daltry JC, Wüster W, Thorpe RS. 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature* 379: 537–540.
- Finney DJ. 1949. The adjustment for a natural response rate in probit analysis, *Annals of Applied Biology* 36: 187–195.
- Gao JF, Qu YF, Zhang XQ, He Y, Ji X. 2013. Neonate-to-adult transition of snake venomics in the short-tailed pit viper, *Gloydius brevicaudus*. *Journal of Proteomics* 84: 148–157.
- Gao JF, Qu Y-F, Zhang X-Q, Ji X. 2011. Within-clutch variation in venoms from hatchlings of *Deinagkistrodon acutus* (Viperidae). *Toxicon* 57: 970–977.
- Guércio RAP, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, Ricart CAO. 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science* 4: 11.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology* 11: 714–719.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1978. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in bioassays. *Environmental Science & Technology* 12: 417.
- Jiang Y, Li Y, Lee W, Xu X, Zhang Y, Zhao R, Zhang Y, Wang W. 2011. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC Genomics* 12: 1. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/1>
- Laurence R. and Hannah M.M. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27: 493–497.

- Lu WG, Hu LL, Yang J, Sun XY, Yan HJ, Liu JM, Chen J, Cheng XL, Zhou Q, Yu Y, Wei J-F, Cao P. 2018. Isolation and pharmacological characterization of a new cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bungarus multicinctus* snake venom. *Journal of Ethnopharmacology* 213: 311–320.
- Mackessy SP. 1988. Venom ontogeny in the pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia* 1988: 92–101.
- Madrigal M, Sanz L, Flores-Díaz M, Sasa M, Núñez V, Alape-Girón A, et al. 2012. Snake venomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal of Proteomics* 77: 280–297.
- Mirtschin PJ, Dunstan N, Hough B, Hamilton E, Klein S, Lucas J, Millar D, Madaras F, Nias T. 2006. Venom yields from Australian and some other species of snakes. *Ecotoxicology* 15, 531–538.
- Mukherjee AK, Kalita B, Mackessy SP. 2016. A proteomic analysis of Pakistan *Daboia russelii russelii* venom and assessment of potency of Indian polyvalent and monovalent antivenom. *Journal of Proteomics* 144: 73–86.
- Nawarak J, Sinchaikul S, Wu C-Y, Liau M-Y, Phutrakul S, Chen S-T. 2003. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis* 24: 2838–2854.
- Reading CJ, Luiselli LM, Akani GC, Bonnet X, Amori G, Ballouard JM, Filippi E, Naulleau G, Pearson D, Rugiero L. 2010. Are snake populations in widespread decline? *Biology Letters* doi: 10.1098/rsbl.2010.0373.
- Risch M, Georgieva D, von Bergen M, Jehmlich N, Genov N, Arni RK, Betzel C. 2009. Snake venomics of the Siamese Russell's viper (*Daboia russelii siamensis*) — Relation to pharmacological activities. *Journal of Proteomics* 72: 256–269.
- Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, Gutiérrez JM. 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42: 405–411.
- Shan LL, Gao JF, Zhang YX, Shen SS, He Y, Wang J, Ma XM, Ji X. 2016. Proteomic characterization and comparison of venoms from two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) from China. *Journal of Proteomics* 138: 83–94.
- Sharma M, Das D, Iyer JK, Kini RM, Doley R. 2015. Unveiling the complexities of *Daboia russelii* venom, a medically important snake of India, by tandem mass spectrometry. *Toxicon* 107: 266–281.
- Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, Freitas-de-Sousa LA, Mourão RHV, Chalkidis HM, Valente RH, Moura-da-Silva AM. 2017. Functional proteomic analyses of

- Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *Journal of Proteomics* 159: 32–46.
- Tan NH, Fung SY, Tan KY, Yap MKK, Gnanathasan CA, Tan CH. 2015. Functional venomics of the Sri Lankan Russell's viper (*Daboia russelii*) and its toxinological correlations. *Journal of Proteomics* 128: 403–423.
- Villalta M, Pla D, Yang SL, Sanz L, Segura A, Vargas M, Chen PY, Herrera M, Estrada R, Cheng YF, Lee CD, Cerdas M, Chiang JR, Angulo Y, León G, Calvete JJ, Gutiérrez JM. 2012. Snake venomics and antivenomics of *Protobothrops mucrosquamatus* and *Viridovipera stejnegeri* from Taiwan: Keys to understand the variable immune response in horses. *Journal of Proteomics* 75: 5628–5645.
- Wang WJ, Huang TF. 2002. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thrombosis and Haemostasis* 87: 641–650.
- Wang, WJ, Shih, CH, Huang, TF. 2004. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324: 224–230.
- Willemse GT, Hattingh J, Karlsson RM, Levy S, Parker C. 1979. Changes in composition and protein concentration of puff adder (*Bitis arietans*) venom due to frequent milking. *Toxicon* 17: 37–42.
- Willemse GT, Hattingh J. 1978. Snake venom instability. *Zoologica Africana* 13: 293–303.
- Willemse GT, Hattingh J. 1980. Effect of drying and storage on electrophoretic properties of venom from puff adders (*Bitis arietans*) and Cape cobras (*Naja nivea*). *Herpetologica* 36: 170–174.
- World Health Organization. 2018. WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins.
- Zaineb A-K, Jed J, Houcemeddine O, Maram M, Imen A, Raoudha Z-K, Amine B, Amen AE, Hafedh M, Najet S-A, Youssef G, Mohamed EA, Naziha M. 2014. A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom: Purification, biochemical and molecular characterization. *Toxicon* 89: 32-44.
- Ziganshin RH, Kovalchuk SI, Arapidi GP, Starkov VG, Hoang AN, Nguyen TTT, Nguyen KC, Shoibonov BB, Tsetlin VI, Utkin YN. 2015. Quantitative proteomic analysis of Vietnamese krait venoms: Neurotoxins are the major components in *Bungarus multicinctus* and phospholipases A2 in *Bungarus fasciatus*. *Toxicon* 107: 197–209.
- 杜銘章。2004。蛇類大驚奇。遠流出版事業股份有限公司。台北市。
- 徐亞莉、吳佳蓉、周祖楨、謝文欽、鄭雅芬、江正榮。2013。臺灣抗蛇毒血清製造之回顧與展望。*疫情報導* 29: 64–69。

黃聖傅。2014。不同培養條件對癩瘋樹懸浮細胞生成脂肪酸及蛋白質的影響。屏科大生物科技系碩士學位論文。

蔡添順。2018。106 年度鎖鏈蛇及雨傘節委託繁養技術開發計畫研究報告。
衛生福利部疾病管制署。

表一、鎖鏈蛇基本資料。

編號	捕獲地	吻肛長(cm)	尾長(cm)	性別	計畫初始體重(g)	目前體重(g)	體重增加率(%)	採集毒液鮮重 (2018/7/29)	採集毒液鮮重 (2018/9/25)
成蛇									
Dr316	屏東枋山	64.7	13.1	公	250.8 (2018.7.25量測)	306.1 (2018.12.03量測)	22.0	0.1380	0.1689
Dr318	屏東枋山	62.7	13.1	公	321.4 (2018.7.25量測)	353.4 (2018.12.03量測)	10.0	NA	0.1800
Dr320	高雄小港	63.3	13.7	公	190.8 (2018.7.25量測)	226.8 (2018.12.03量測)	18.9	0.1412	0.1494
Dr324	高雄小港	62.9	9.7	公	250.5 (2018.7.25量測)	218.2 (2018.12.03量測)	-12.9	0.1366	0.1226
Dr326	高雄小港	65.8	14.3	公	358.8 (2018.7.25量測)	385.1 (2018.12.03量測)	7.3	0.1830	0.2516
Dr338	台東	71.3	10.2	母	278.6 (2018.7.25量測)	308.6 (2018.12.03量測)	10.8	0.2060	0.1753
Dr394	高雄小港	38.4	4	公	52.5 (2018.7.6量測)	84.2 (2018.12.03量測)	60.4	0.0425	0.0520
Dr398	高雄小港	46.9	7.2	母	105.8 (2018.7.16量測)	176.2 (2018.12.03量測)	66.5	0.0963	0.1378
Dr402	高雄杉林	54	8.8	母	131.7 (2018.7.25量測)	252.8 (2018.12.03量測)	92.0	0.0705	0.1007
Dr404	高雄左營	55.3	8.3	公	129 (2018.7.10量測)	196.4 (2018.12.03量測)	52.2	0.0448	0.1452
Dr406	屏東枋寮	52.4	8.3	公	104 (2018.7.16量測)	139.2 (2018.12.03量測)	33.8	0.0808	0.1120
幼蛇									
Dr350	屏東枋寮	20.7	3.2	公	31 (2018.7.25量測)	58 (2018.12.03量測)	87.1	NA	0.0339
Dr354	屏東枋寮	22	3.7	母	28.4 (2018.7.25量測)	49 (2018.12.03量測)	72.5	NA	0.0289
Dr360	高雄小港	21.7	4	母	31.2 (2018.7.25量測)	56.4 (2018.12.03量測)	80.8	NA	0.0267
Dr362	屏東枋寮	19.9	3.9	母	29.3 (2018.7.25量測)	65.4 (2018.12.03量測)	123.2	NA	0.0296
Dr368	高雄小港	24	3.6		37 (2018.7.25量測)	92.6 (2018.12.03量測)	150.3	NA	0.0345
Dr396	高雄小港	39.1	6.9	公	39.3 (2018.7.6量測)	94.2 (2018.12.03量測)	139.7	NA	0.0374
Dr408	高雄小港	18.9	2.7		6 (2018.7.25量測)	18.8 (2018.12.03量測)	213.3	NA	0.0097
Dr410	屏東枋寮	20.5	3.2		15 (2018.8.3量測)	27 (2018.12.03量測)	80.0	NA	0.0078
Dr412	屏東枋寮	21.8	3.3		12 (2018.8.3量測)	31.6 (2018.12.03量測)	163.3	NA	0.0213

表二、雨傘節基本資料。

編號	捕獲地	吻肛長(cm)	尾長(cm)	性別	計畫初始體重(g)	目前體重(g)	體重增加率(%)	採集毒液鮮重 (2018/7/29)	採集毒液鮮重 (2018/9/25)
Bm1002	高雄大寮	112.3	16.5	公	622.2 (2018.7.16量測)	929.2 (2018.12.03量測)	49.3	0.0362	0.0611
Bm1040	高雄鳳山	97.5	13.1	公	174.3 (2018.7.25量測)	247.4 (2018.12.03量測)	41.9	0.0392	0.0395
Bm1066	屏科	54.9	8	母	105.5 (2018.7.25量測)	154.2 (2018.12.03量測)	46.2	0.0386	0.0248
Bm1068	屏科	49.4	7.7	公	106.3 (2018.7.25量測)	175 (2018.12.03量測)	64.6	0.0241	0.0213
Bm1082	高雄橋頭	89.4	13.9	公	131.3 (2018.7.25量測)	224.4 (2018.12.03量測)	70.9	0.0617	0.0309
Bm1140	高雄仁武	123.2	12.5	公	474.3 (2018.7.25量測)	592.4 (2018.12.03量測)	24.9	0.0990	0.0906
Bm1144	高雄仁武	111.4	14.1	公	611.7 (2018.7.16量測)	635.2 (2018.12.03量測)	3.8	0.0615	0.1001
Bm1148	高雄鳥松	100.8	15	公	424.5 (2018.7.16量測)	472.8 (2018.12.03量測)	11.4	0.0584	0.0630
Bm1150	高雄左營	108.3	14.8	公	550.2 (2018.7.16量測)	626.8 (2018.12.03量測)	13.9	0.0673	0.0983
Bm1256	高雄杉林	106.6	14.8	公	279.4 (2018.7.25量測)	224.6 (2018.12.03量測)	-19.6	0.0422	0.1125

表三、鎖鏈蛇成蛇(n = 4; merged)於飼養前期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成綜合列表。

Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
gi 1446208327	102640	phosphodiesterase, partial [Borikenophis portoricensis]	53	2.3	
gi 586829527	98000	phosphodiesterase [Macrovipera lebetina]	95	5.1	
gi 602672078	74194	zinc finger protein 397-like [Python bivittatus]	49	0.9	
gi 602633075	57543	chromobox protein homolog 2 [Python bivittatus] coagulation factor X activating enzyme heavy chain, RVV-X-heavy chain=metalloproteinase with disintegrin	56	1.7	
gi 251204	50053	(platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains [Vipera russelli=Russell's viper, Siamensis, venom, Peptide, 429 aa]	250	13.5	<i>Daboia russellii</i>
gi 311223820	29480	RVV-V gamma-like protein precursor [Daboia siamensis]	111	12.7	<i>Daboia russellii siamensis</i>
gi 109254994	29288	phosphodiesterase, partial [Sistrurus catenatus edwardsi]	73	6	<i>Sistrurus catenatus edwardsi</i>
gi 311223822	29162	serine alpha-fibrinogenase-like protein precursor [Daboia siamensis]	54	4.3	<i>Daboia russellii siamensis</i>
gi 313191710	28882	putative serine protease nikobin [Vipera berus nikolskii]	53	4.3	<i>Vipera nikolskii</i>
gi 134129	26849	RecName: Full=Factor V activator RVV-V alpha; AltName: Full=Russel's viper venom FV activator alpha; Short=RVV-V alpha; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP	71	13.1	<i>Daboia russellii siamensis</i>
gi 300490478	18566	P31 alpha subunit [Daboia russelii limitis]	103	11.4	
gi 300490470	18441	P68 alpha subunit [Daboia siamensis]	67	30.4	
gi 300490480	17640	P31 beta subunit [Daboia russelii limitis]	66	12	
gi 67043477	17355	C-type lectin-like protein subunit 3 [Daboia siamensis]	94	8.8	<i>Daboia russellii siamensis</i>
gi 33243080	17118	C-type lectin CTL-8, partial [Bitis arietans]	68	8.8	<i>Bitis arietans</i>
gi 64453	16400	phospholipase a2 [Daboia russelii]	80	7.2	<i>Daboia russelii</i>
gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	103	22.1	<i>Daboia russellii siamensis</i>
gi 1408314	14458	phospholipase A2 acidic subunit, PLA2-I subunit A [Vipera aspis, zinnikeri, venom, Peptide, 122 aa]	56	12.3	<i>Vipera aspis</i>
gi 1345182	14414	Cb I alpha=heterodimeric neurotoxin acidic subunit alpha [Pseudocerastes fieldi=false horned vipers, venom, Peptide, 122 aa]	58	12.3	<i>Pseudocerastes persicus</i>
gi 58177210	11398	Chain A, Crystal Structure Of Vr-1, A Vegf-F From A Snake Venom	46	9.4	<i>Daboia russelii russelii</i>
gi 68708	7187	venom basic proteinase inhibitor II - Russell's viper	63	15	<i>Daboia russelii</i>
gi 227633	6078	phospholipase A2 Ia	56	23.5	<i>Vipera aspis</i>
gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	142	70.6	<i>Daboia russelii russelii</i>

表四、鎖鏈蛇成蛇(n = 4; merged)於飼養中期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成綜合列表。

Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
gi 1446208327	102640	phosphodiesterase, partial [Borikenophis portoricensis]	51	2.3	
gi 586829527	98000	phosphodiesterase [Macrovipera lebetina]	135	5.8	
gi 1258500178	96436	Chain A, Snake Venom Phosphodiesterase (pde)	65	2.9	
gi 71727519	71883	RVV-X-heavy chain [Daboia russelii]	278	11.5	<i>Daboia russelii</i>
gi 602633075	57543	chromobox protein homolog 2 [Python bivittatus] coagulation factor X activating enzyme heavy chain, RVV-X-heavy chain=metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains [Vipera russelli=Russell's viper, Siamensis, venom, Peptide, 429 aa]	51	1.7	
gi 251204	50053	RVV-V gamma-like protein precursor [Daboia siamensis]	250	13.5	<i>Daboia russelii</i>
gi 109254994	29288	phosphodiesterase, partial [Sistrurus catenatus edwardsi]	73	6	<i>Sistrurus catenatus edwardsi</i>
gi 313191710	28882	putative serine protease nikobin [Vipera berus nikolskii]	54	4.3	<i>Vipera nikolskii</i>
gi 300490478	18566	P31 alpha subunit [Daboia russelii limitis]	103	11.4	
gi 300490470	18441	P68 alpha subunit [Daboia siamensis]	107	24.1	
gi 300490480	17640	P31 beta subunit [Daboia russelii limitis]	66	12	
gi 67043477	17355	C-type lectin-like protein subunit 3 [Daboia siamensis]	94	8.8	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 33243080	17118	C-type lectin CTL-8, partial [Bitis arietans]	68	8.8	<i>Bitis arietans</i>
gi 64453	16400	phospholipase a2 [Daboia russelii]	80	7.2	<i>Daboia russelii</i>
gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	103	22.1	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 1408314	14458	phospholipase A2 acidic subunit, PLA2-I subunit A [Vipera aspis, zimnikeri, venom, Peptide, 122 aa]	56	12.3	<i>Vipera aspis</i>
gi 1345182	14414	Cb I alpha=heterodimeric neurotoxin acidic subunit alpha [Pseudocerastes fieldi=false horned vipers, venom, Peptide, 122 aa]	59	12.3	<i>Pseudocerastes persicus</i>
gi 68708	7187	venom basic proteinase inhibitor II - Russell's viper	63	15	<i>Daboia russelii</i>
gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	142	70.6	<i>Daboia russelii russelii</i>

表五、鎖鏈蛇成蛇(n = 4; merged)於飼養後期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成綜合列表。

Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
gi 538259853	98407	phosphodiesterase [Protobothrops flavoviridis]	49	1.9	
gi 586829527	98000	phosphodiesterase [Macrovipera lebetina]	63	1.4	
gi 602659969	93015	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3 isoform X3 [Python bivittatus]	49	2.1	
gi 71727519	71883	RVV-X-heavy chain [Daboia russelii]	314	9	<i>Daboia russelii</i>
gi 1311938278	71272	DSAIP, partial [Daboia siamensis]	48	1.3	
gi 602633075	57543	chromobox protein homolog 2 [Python bivittatus] coagulation factor X activating enzyme heavy chain, RVV-X-heavy chain=metalloproteinase with disintegrin	63	1.7	
gi 251204	50053	(platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains [Vipera russelli=Russell's viper, Siamensis, venom, Peptide, 429 aa]	148	5.4	<i>Daboia russelii</i>
gi 311223820	29480	RVV-V gamma-like protein precursor [Daboia siamensis]	50	6.2	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 311223822	29162	serine alpha-fibrinogenase-like protein precursor [Daboia siamensis]	69	4.3	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 313191710	28882	putative serine protease nikobin [Vipera berus nikolskii]	55	4.3	<i>Vipera nikolskii</i>
gi 1488399624	27684	induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 homolog, partial [Pseudonaja textilis]	46	17.3	
gi 134129	26849	RecName: Full=Factor V activator RVV-V alpha; AltName: Full=Russel's viper venom FV activator alpha; Short=RVV-V alpha; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP	51	7.2	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 67043473	18781	C-type lectin-like protein subunit 1 [Daboia siamensis]	56	15.8	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 300490478	18566	P31 alpha subunit [Daboia russelii limitis]	133	11.4	
gi 300490470	18441	P68 alpha subunit [Daboia siamensis]	87	30.4	
gi 300490480	17640	P31 beta subunit [Daboia russelii limitis]	53	12	
gi 67043477	17355	C-type lectin-like protein subunit 3 [Daboia siamensis]	144	20.9	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 33243080	17118	C-type lectin CTL-8, partial [Bitis arietans]	47	8.8	<i>Bitis arietans</i>
gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	138	22.1	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 1408314	14458	phospholipase A2 acidic subunit, PLA2-I subunit A [Vipera aspis, zinnikeri, venom, Peptide, 122 aa]	63	12.3	<i>Vipera aspis</i>
gi 1345182	14414	Cb I alpha=heterodimeric neurotoxin acidic subunit alpha [Pseudocerastes fieldi=false horned vipers, venom, Peptide, 122 aa]	90	12.3	<i>Pseudocerastes persicus</i>
gi 159883522	9779	trypsin inhibitor-3 precursor [Daboia siamensis]	46	10.7	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 159883542	9680	trypsin inhibitor-6 precursor [Daboia siamensis]	70	22.6	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 68708	7187	venom basic proteinase inhibitor II - Russell's viper	63	15	<i>Daboia russelii</i>
gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	166	70.6	<i>Daboia russelii russelii</i>

表六、鎖鏈蛇成蛇($n = 4$; merged)於飼養各時期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成之聯集總表(按蛋白質家族歸類)。

Protein families	Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
Kunitz-type serine protease inhibitor (KSPI)	gi 159883522	9779	trypsin inhibitor-3 precursor [Daboia siamensis]	46	10.7	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Kunitz-type serine protease inhibitor (KSPI)	gi 159883542	9680	trypsin inhibitor-6 precursor [Daboia siamensis]	70	22.6	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Kunitz-type serine protease inhibitor (KSPI)	gi 68708	7187	venom basic proteinase inhibitor II - Russell's viper	63	15	<i>Daboia russelii</i>
Phosphodiesterase (PDE)	gi 1446208327	102640	phosphodiesterase, partial [Borikenophis portoricensis]	53	2.3	
Phosphodiesterase (PDE)	gi 538259853	98407	phosphodiesterase [Protobothrops flavoviridis]	49	1.9	
Phosphodiesterase (PDE)	gi 586829527	98000	phosphodiesterase [Macrovipera lebetina]	95	5.1	
Phosphodiesterase (PDE)	gi 1258500178	96436	Chain A, Snake Venom Phosphodiesterase (pde)	65	2.9	
Phosphodiesterase (PDE)	gi 109254994	29288	phosphodiesterase, partial [Sistrurus catenatus edwardsi]	73	6	<i>Sistrurus catenatus edwardsi</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 64453	16400	phospholipase a2 [Daboia russelii]	80	7.2	<i>Daboia russelii</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	103	22.1	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 1408314	14458	phospholipase A2 acidic subunit, PLA2-I subunit A [Vipera aspis, zinnikeri, venom, Peptide, 122 aa]	56	12.3	<i>Vipera aspis</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 1345182	14414	Cb I alpha=heterodimeric neurotoxin acidic subunit alpha [Pseudocerastes fieldi=false horned vipers, venom, Peptide, 122 aa]	58	12.3	<i>Pseudocerastes persicus</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 227633	6078	phospholipase A2 Ia	56	23.5	<i>Vipera aspis</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	142	70.6	<i>Daboia russelii russelii</i>
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 67043473	18781	C-type lectin-like protein subunit 1 [Daboia siamensis]	56	15.8	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 300490478	18566	P31 alpha subunit [Daboia russelii limitis]	103	11.4	
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 300490470	18441	P68 alpha subunit [Daboia siamensis]	67	30.4	
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 300490480	17640	P31 beta subunit [Daboia russelii limitis]	66	12	
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 67043477	17355	C-type lectin-like protein subunit 3 [Daboia siamensis]	94	8.8	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 33243080	17118	C-type lectin CTL-8, partial [Bitis arietans]	68	8.8	<i>Bitis arietans</i>
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 71727519	71883	RVV-X-heavy chain [Daboia russelii]	278	11.5	<i>Daboia russelii</i>
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 1311938278	71272	DSAIP, partial [Daboia siamensis]	48	1.3	
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 251204	50053	coagulation factor X activating enzyme heavy chain, RVV-X-heavy chain=metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains [Vipera russelli=Russell's viper, Siamensis, venom, Peptide, 429 aa]	250	13.5	<i>Daboia russelii</i>
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 311223820	29480	RVV-V gamma-like protein precursor [Daboia siamensis]	111	12.7	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 311223822	29162	serine alpha-fibrinogenase-like protein precursor [Daboia siamensis]	54	4.3	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 313191710	28882	putative serine protease nikobin [Vipera berus nikolskii]	53	4.3	<i>Vipera nikolskii</i>
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 134129	26849	RecName: Full=Factor V activator RVV-V alpha; AltName: Full=Russel's viper venom FV activator alpha; Short=RVV-V alpha; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP	71	13.1	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	gi 58177210	11398	Chain A, Crystal Structure Of Vr-1, A Vegf-F From A Snake Venom	46	9.4	<i>Daboia russelii russelii</i>

表七、鎖鏈蛇幼蛇(n = 4; merged)於飼養前期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成之聯集總表(按蛋白質家族歸類)。

Protein families	Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
Kunitz-type serine protease inhibitor (KSPI)	gi 68708	7187	venom basic proteinase inhibitor II - Russell's viper	68	15	<i>Daboia russellii</i>
Phosphodiesterase (PDE)	gi 1446208327	102640	phosphodiesterase, partial [Borikenophis portoricensis]	55	2.3	
Phosphodiesterase (PDE)	gi 586829527	98000	phosphodiesterase [Macrovipera lebetina]	73	3.1	
Phosphodiesterase (PDE)	gi 1258500178	96436	Chain A, Snake Venom Phosphodiesterase (pde)	58	1.7	
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 64453	16400	phospholipase a2 [Daboia russelii]	86	7.2	<i>Daboia russellii</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	171	22.1	<i>Daboia russellii siamensis</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 1408314	14458	phospholipase A2 acidic subunit, PLA2-I subunit A [Vipera aspis, zinnikeri, venom, Peptide, 122 aa]	72	12.3	<i>Vipera aspis</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 1345182	14414	Cb I alpha=heterodimeric neurotoxin acidic subunit alpha [Pseudocerastes fieldi=false horned vipers, venom, Peptide, 122 aa]	65	12.3	<i>Pseudocerastes persicus</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	181	70.6	<i>Daboia russellii russellii</i>
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 300490470	18441	P68 alpha subunit [Daboia siamensis]	95	24.1	
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 67043477	17355	C-type lectin-like protein subunit 3 [Daboia siamensis]	265	20.9	<i>Daboia russellii siamensis</i>
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 67043479	17256	C-type lectin-like protein subunit 4 [Daboia siamensis]	118	15.8	<i>Daboia russellii siamensis</i>
Snaclec (C-type lectin and C-type lectin-like protein)	gi 33243080	17118	C-type lectin CTL-8, partial [Bitis arietans]	68	8.8	<i>Bitis arietans</i>
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 71727519	71883	RVV-X-heavy chain [Daboia russelii]	225	9	<i>Daboia russellii</i>
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 251204	50053	coagulation factor X activating enzyme heavy chain, RVV-X-heavy chain=metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains [Vipera russelli=Russell's viper, Siamesis, venom, Peptide, 429 aa]	271	10	<i>Daboia russellii</i>
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 300490458	18923	factor X activator light chain 2 [Daboia siamensis]	52	15.8	
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 311223820	29480	RVV-V gamma-like protein precursor [Daboia siamensis]	77	12.7	<i>Daboia russellii siamensis</i>
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 311223822	29162	serine alpha-fibrinogenase-like protein precursor [Daboia siamensis]	63	4.3	<i>Daboia russellii siamensis</i>
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 313191710	28882	putative serine protease nikobin [Vipera berus nikolskii]	49	4.3	<i>Vipera nikolskii</i>
Snake venom serine protease (SVSP)	gi 134129	26849	RecName: Full=Factor V activator RVV-V alpha; AltName: Full=Russel's viper venom FV activator alpha; Short=RVV-V alpha; AltName: Full=Snake venom serine protease; Short=SVSP	74	13.1	<i>Daboia russellii siamensis</i>
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	gi 58177210	11398	Chain A, Crystal Structure Of Vr-1, A Vegf-F From A Snake Venom	49	28.1	<i>Daboia russellii russellii</i>

表八、雨傘節成蛇(n = 4; merged)於飼養前期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成綜合列表。

Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
gi 565320051	193714	hypothetical protein L345_03129 [Ophiophagus hannah]	51	1	
gi 126035640	71224	metalloproteinase [Bungarus multicinctus]	83	3.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 126035635	70381	metalloproteinase, partial [Bungarus fasciatus]	53	1.8	<i>Bungarus fasciatus</i>
gi 619856644	69455	acetylcholinesterase [Echis coloratus]	92	8.2	
gi 1488402607	67441	acetylcholinesterase, partial [Pseudonaja textilis]	161	11.3	
gi 1389604	65195	acetylcholinesterase [Bungarus fasciatus]	142	7.2	<i>Bungarus fasciatus</i>
gi 476539530	63715	ACN-Sut-1, partial [Suta fasciata]	135	7.4	
gi 68304016	59374	L-amino acid oxidase precursor [Oxyuranus scutellatus]	188	5.8	<i>Oxyuranus scutellatus</i>
gi 126035649	59116	L-amino acid oxidase [Bungarus multicinctus]	147	11.2	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 1446201963	58899	L-amino acid oxidase 1, partial [Spilotes sulphureus]	72	3.5	
gi 1487322793	55329	hyaluronidase-2-like isoform X1 [Notechis scutatus]	53	3.4	
gi 190195341	27353	cysteine-rich secretory protein Bc-CRPb [Bungarus candidus]	46	7.6	<i>Bungarus candidus</i>
gi 30172003	27141	cysteine-rich venom protein [Naja atra]	131	6.7	<i>Naja atra</i>
gi 6523113	15880	beta-bungarotoxin A3 chain, partial [Bungarus multicinctus]	55	11.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	49	9.8	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 1431755	14235	Chain A, Structure Of Beta2-Bungarotoxin: Potassium Channel Binding By Kunitz Modules And Targeted Phospholipase Action	85	21.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 67196	14221	phospholipase A2 (EC 3.1.1.4) beta bungarotoxin chain A1 - many-banded krait (tentative sequence)	68	8.3	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 5763974	11953	cardiotoxin-like protein [Bungarus multicinctus multicinctus]	46	8.7	<i>Bungarus multicinctus multicinctus</i>
gi 4200133	10283	neurotoxin-like protein [Bungarus multicinctus]	54	11.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 229404	8559	toxin alpha,bungaro	138	17.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 350798	7494	toxin Bbeta2,bungaro	63	15	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	62	70.6	<i>Daboia russelii russelii</i>

表九、雨傘節成蛇(n = 4; merged)於飼養中期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成綜合列表。

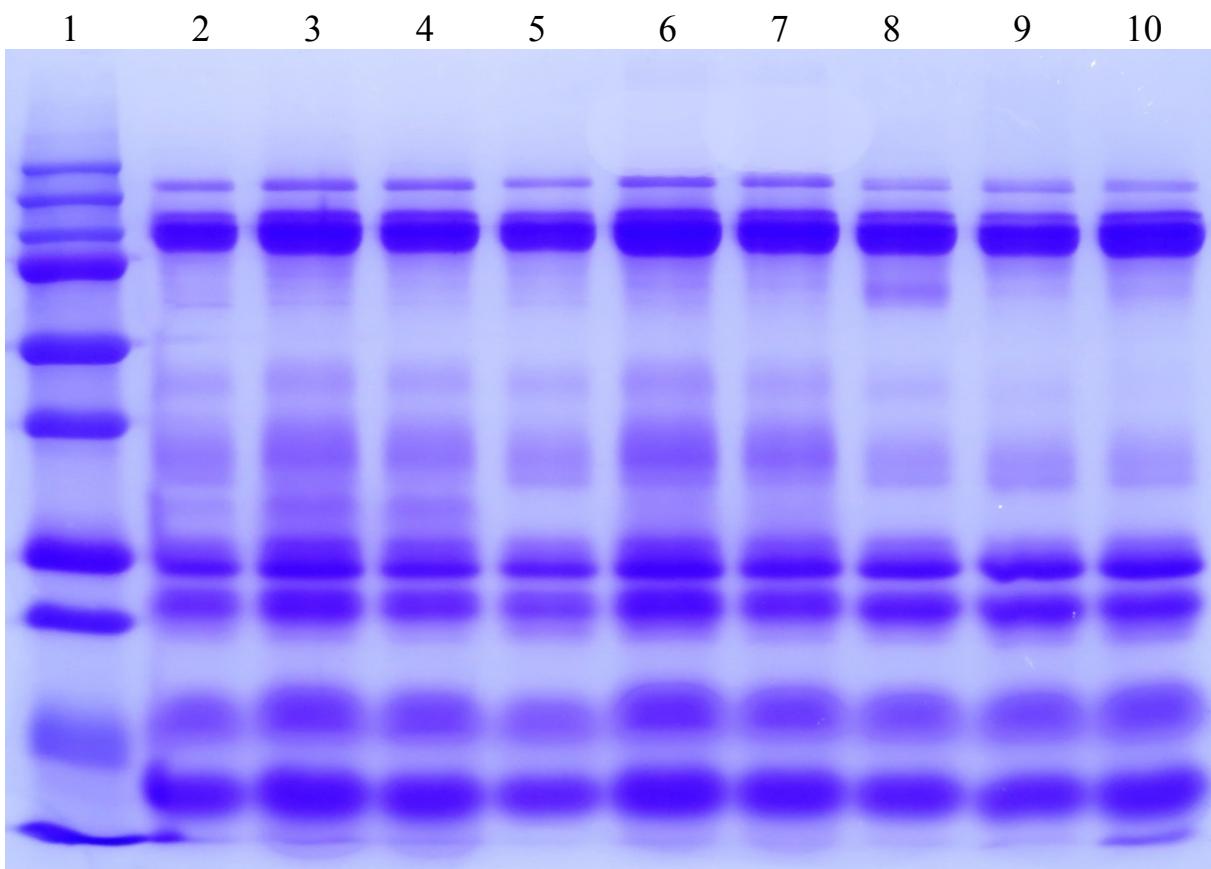
Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
gi 126035640	71224	metalloproteinase [Bungarus multicinctus]	70	2.1	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 619856644	69455	acetylcholinesterase [Echis coloratus]	74	9.7	
gi 1488402607	67441	acetylcholinesterase, partial [Pseudonaja textilis]	98	11.3	
gi 1389604	65195	acetylcholinesterase [Bungarus fasciatus]	207	10	<i>Bungarus fasciatus</i>
gi 698375421	65176	Acetylcholinesterase transcript 2 [Opheodrys aestivus]	57	8.7	
gi 476539530	63715	ACN-Sut-1, partial [Suta fasciata]	116	7.4	
gi 126035649	59116	L-amino acid oxidase [Bungarus multicinctus]	178	14.3	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 1446201963	58899	L-amino acid oxidase 1, partial [Spilotes sulphureus]	116	8.3	
gi 565311191	37329	Protein maelstrom-like protein, partial [Ophiophagus hannah]	48	2.5	
gi 30172003	27141	cysteine-rich venom protein [Naja atra]	95	6.7	<i>Naja atra</i>
gi 338855350	24891	vespryn [Crotalus adamanteus]	47	4.1	<i>Crotalus adamanteus</i>
gi 62474	17140	precursor polypeptide (AA-25 to 120) [Bungarus multicinctus]	55	9.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 1301240237	16091	hypothetical protein [Micrurus lemniscatus lemniscatus]	48	6.8	
gi 24459190	16045	beta bungarotoxin A1 chain, partial [Bungarus candidus]	53	10.2	<i>Bungarus candidus</i>
gi 6523113	15880	beta-bungarotoxin A3 chain, partial [Bungarus multicinctus]	60	11.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	67	9.8	<i>Daboia russelii siamensis</i>
gi 350799	14410	toxin Abeta3,bungaro	97	20	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 1431755	14235	Chain A, Structure Of Beta2-Bungarotoxin: Potassium Channel Binding By Kunitz Modules And Targeted Phospholipase Action	56	21.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 67196	14221	phospholipase A2 (EC 3.1.1.4) beta bungarotoxin chain A1 - many-banded krait (tentative sequence)	47	8.3	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 1287229952	12265	hypothetical protein, partial [Micrurus lemniscatus carvalhoi]	45	9.7	
gi 32363235	12087	RecName: Full=Thaicobrin	47	8.3	<i>Naja kaouthia</i>
gi 5763974	11953	cardiotoxin-like protein [Bungarus multicinctus multicinctus]	54	15.5	<i>Bungarus multicinctus multicinctus</i>
gi 4200133	10283	neurotoxin-like protein [Bungarus multicinctus]	60	11.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 4200129	10026	neurotoxin-like protein [Bungarus multicinctus]	52	10.5	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 229404	8559	toxin alpha,bungaro	120	17.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 350798	7494	toxin Bbeta2,bungaro	76	15	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	97	70.6	<i>Daboia russelii russelii</i>

表十、雨傘節成蛇(n = 4; merged)於飼養後期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成綜合列表。

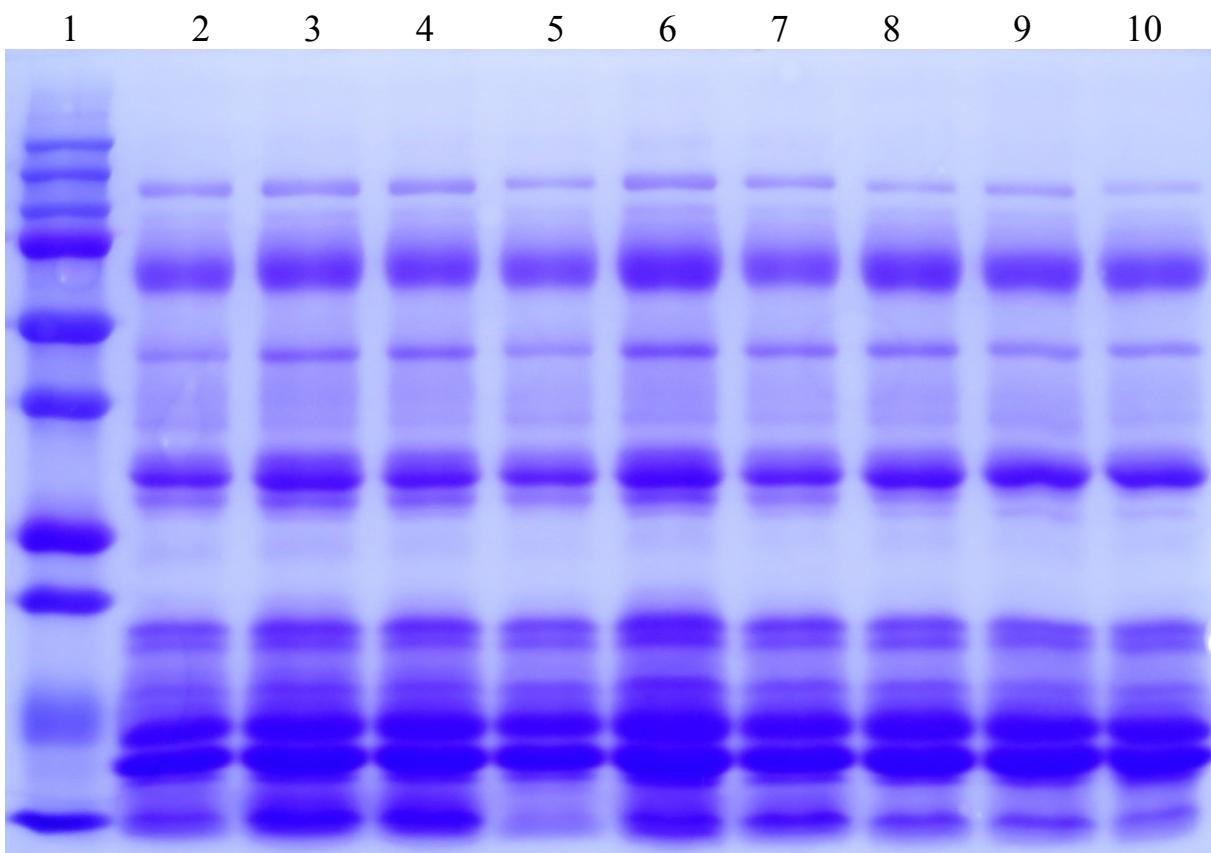
Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
gi 619856644	69455	acetylcholinesterase [Echis coloratus]	56	4.3	
gi 387015852	69424	Ezrin-like [Crotalus adamanteus]	58	2.7	
gi 1389604	65195	acetylcholinesterase [Bungarus fasciatus]	127	10	<i>Bungarus fasciatus</i>
gi 68304016	59374	L-amino acid oxidase precursor [Oxyuranus scutellatus]	108	8.3	<i>Oxyuranus scutellatus</i>
gi 126035649	59116	L-amino acid oxidase [Bungarus multicinctus]	279	16.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 1446201963	58899	L-amino acid oxidase 1, partial [Spilotes sulphureus]	97	8.3	
gi 1487354593	38465	cathepsin B [Notechis scutatus]	46	4.7	
gi 565311191	37329	Protein maelstrom-like protein, partial [Ophiophagus hannah]	47	2.5	
gi 602635616	33612	chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase isoform X3 [Python bivittatus]	48	3.4	
gi 30172003	27141	cysteine-rich venom protein [Naja atra]	89	6.7	<i>Naja atra</i>
gi 158605255	21301	vespryn isoform 1 [Cryptophis nigrescens]	61	8.9	<i>Rhinoplocephalus nigrescens</i>
gi 62474	17140	precursor polypeptide (AA-25 to 120) [Bungarus multicinctus]	66	9.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 24459190	16045	beta bungaratoxin A1 chain, partial [Bungarus candidus]	50	10.2	<i>Bungarus candidus</i>
gi 6523113	15880	beta-bungarotoxin A3 chain, partial [Bungarus multicinctus]	62	11.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 350799	14410	toxin Abeta3,bungaro	54	20	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 1431755	14235	Chain A, Structure Of Beta2-Bungarotoxin: Potassium Channel Binding By Kunitz Modules And Targeted Phospholipase Action	90	21.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 67196	14221	phospholipase A2 (EC 3.1.1.4) beta bungarotoxin chain A1 - many-banded krait (tentative sequence)	84	21.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 4200133	10283	neurotoxin-like protein [Bungarus multicinctus]	58	11.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 62482	10281	unnamed protein product [Bungarus multicinctus]	70	18.4	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 5420371	10278	k-6 bungarotoxin [Bungarus multicinctus]	46	8	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 229404	8559	toxin alpha,bungaro	139	17.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 350798	7494	toxin Bbeta2,bungaro	82	15	<i>Bungarus multicinctus</i>
gi 68705	7428	beta-1 bungarotoxin chain B, major component - many-banded krait	52	11.7	<i>Bungarus multicinctus</i>

表十一、雨傘節成蛇(n = 4; merged)於飼養各時期所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相層析質譜分析(HPLC-ESI-Ion trap-MS/MS)所鑑定到符合部份序列的蛋白質組成之聯集總表(按蛋白質家族歸類)。

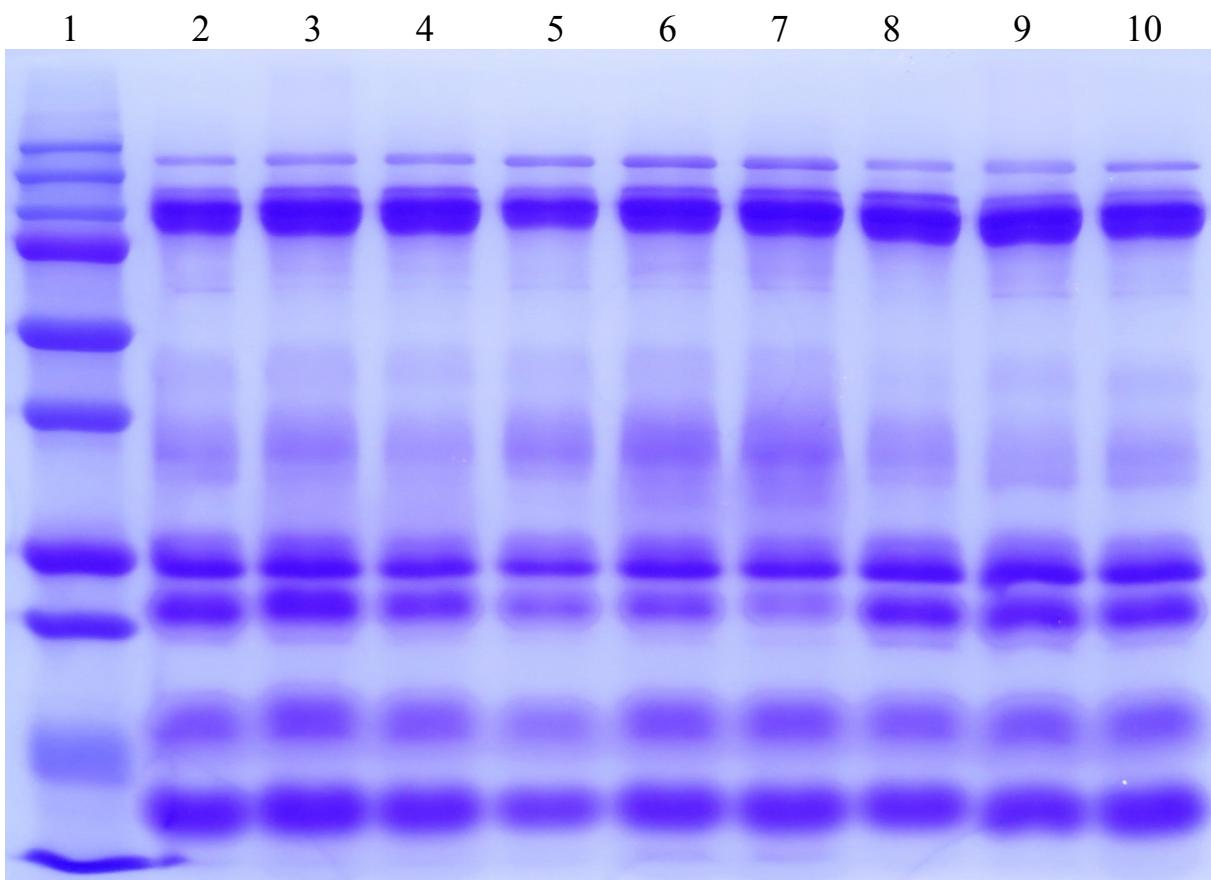
Protein families	Accession no.	Molecular Weight	Protein description	Protein score	Protein coverage	Homology with protein from
Acetylcholinesterase (AchE)	gi 619856644	69455	acetylcholinesterase [Echis coloratus]	92	8.2	
Acetylcholinesterase (AchE)	gi 1488402607	67441	acetylcholinesterase, partial [Pseudonaja textilis]	161	11.3	
Acetylcholinesterase (AchE)	gi 1389604	65195	acetylcholinesterase [Bungarus fasciatus]	142	7.2	<i>Bungarus fasciatus</i>
Acetylcholinesterase (AchE)	gi 698375421	65176	Acetylcholinesterase transcript 2 [Opheodrys aestivus]	57	8.7	
beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)	gi 24459190	16045	beta bungarotoxin A1 chain, partial [Bungarus candidus]	53	10.2	<i>Bungarus candidus</i>
beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)	gi 6523113	15880	beta-bungarotoxin A3 chain, partial [Bungarus multicinctus]	55	11.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)	gi 350799	14410	toxin Abeta3,bungaro	97	20	<i>Bungarus multicinctus</i>
beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)	gi 1431755	14235	Chain A, Structure Of Beta2-Bungarotoxin: Potassium Channel Binding By Kunitz Modules And Targeted Phospholipase Action	85	21.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)	gi 67196	14221	phospholipase A2 (EC 3.1.1.4) beta bungarotoxin chain A1 - many-banded krait (tentative sequence)	68	8.3	<i>Bungarus multicinctus</i>
beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)	gi 350798	7494	toxin Bbeta2,bungaro	63	15	<i>Bungarus multicinctus</i>
beta-Bugarotoxin (beta-Bgt)	gi 68705	7428	beta-1 bungarotoxin chain B, major component - many-banded krait	52	11.7	<i>Bungarus multicinctus</i>
Cysteine-rich secretory protein (CRISP)	gi 190195341	27353	cysteine-rich secretory protein Bc-CRPb [Bungarus candidus]	46	7.6	<i>Bungarus candidus</i>
Cysteine-rich secretory protein (CRISP)	gi 30172003	27141	cysteine-rich venom protein [Naja atra]	131	6.7	<i>Naja atra</i>
Hyaluronidase	gi 1487322793	55329	hyaluronidase-2-like isoform X1 [Notechis scutatus]	53	3.4	
L-amino acid oxidase (LAAO)	gi 68304016	59374	L-amino acid oxidase precursor [Oxyurana scutellatus]	188	5.8	<i>Oxyurana scutellatus</i>
L-amino acid oxidase (LAAO)	gi 126035649	59116	L-amino acid oxidase [Bungarus multicinctus]	147	11.2	<i>Bungarus multicinctus</i>
L-amino acid oxidase (LAAO)	gi 1446201963	58899	L-amino acid oxidase 1, partial [Spilotes sulphureus]	72	3.5	
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 37927193	14467	Chain A, Crystal Structure Of Rv4RV7 COMPLEX	49	9.8	<i>Daboia russelii siamensis</i>
Phospholipase A2 (PLA2)	gi 298351761	1954	RecName: Full=Phospholipase A2 1; Short=PLA21; Short=svPLA2; AltName: Full=Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase	62	70.6	<i>Daboia russelii russelii</i>
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 126035640	71224	metalloproteinase [Bungarus multicinctus]	83	3.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
Snake venom metalloprotease (SVMP)	gi 126035635	70381	metalloproteinase, partial [Bungarus fasciatus]	53	1.8	<i>Bungarus fasciatus</i>
TBP (proteins taking part in toxin biosynthesis)	gi 1487354593	38465	cathepsin B [Notechis scutatus]	46	4.7	
Three finger toxin (3-FTx)	gi 5763974	11953	cardiotoxin-like protein [Bungarus multicinctus multicinctus]	46	8.7	<i>Bungarus multicinctus multicinctus</i>
Three finger toxin (3-FTx)	gi 4200133	10283	neurotoxin-like protein [Bungarus multicinctus]	54	11.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
Three finger toxin (3-FTx)	gi 5420371	10278	k-6 bungarotoxin [Bungarus multicinctus]	46	8	<i>Bungarus multicinctus</i>
Three finger toxin (3-FTx)	gi 4200129	10026	neurotoxin-like protein [Bungarus multicinctus]	52	10.5	<i>Bungarus multicinctus</i>
Three finger toxin (3-FTx)	gi 229404	8559	toxin alpha,bungaro	138	17.6	<i>Bungarus multicinctus</i>
Vespryn	gi 338855350	24891	vespryn [Crotalus adamanteus]	47	4.1	<i>Crotalus adamanteus</i>
Vespryn	gi 158605255	21301	vespryn isoform 1 [Cryptophis nigrescens]	61	8.9	<i>Rhinoplocephalus nigrescens</i>
Vespryn	gi 32363235	12087	RecName: Full=Thaicobrin	47	8.3	<i>Naja kaouthia</i>
Other	gi 387015852	69424	Ezrin-like [Crotalus adamanteus]	58	2.7	
Other	gi 476539530	63715	ACN-Sut-1, partial [Suta fasciata]	135	7.4	



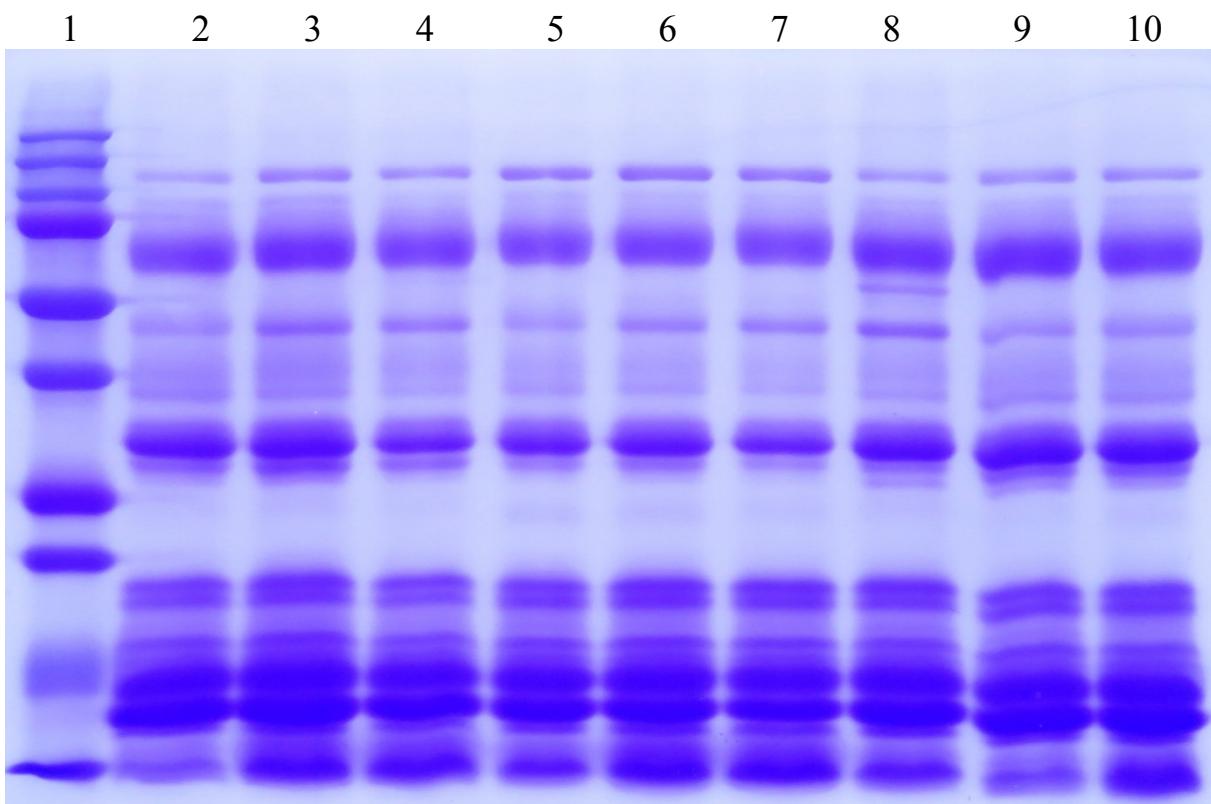
圖一、鎖鏈蛇成蛇(Dr316, Dr318)於飼養前、中、後期所採集蛇毒，以及幼蛇(Dr350, Dr354, Dr360)於飼養前期所採集蛇毒的一維電泳之非還原膠圖譜。Lane 1 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa。Lane 2-4 為編號 Dr316 蛇隻於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 5-7 為 Dr318 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 8-10 分別為 Dr350, Dr354, Dr360 於飼養前期之蛇毒蛋白圖譜。



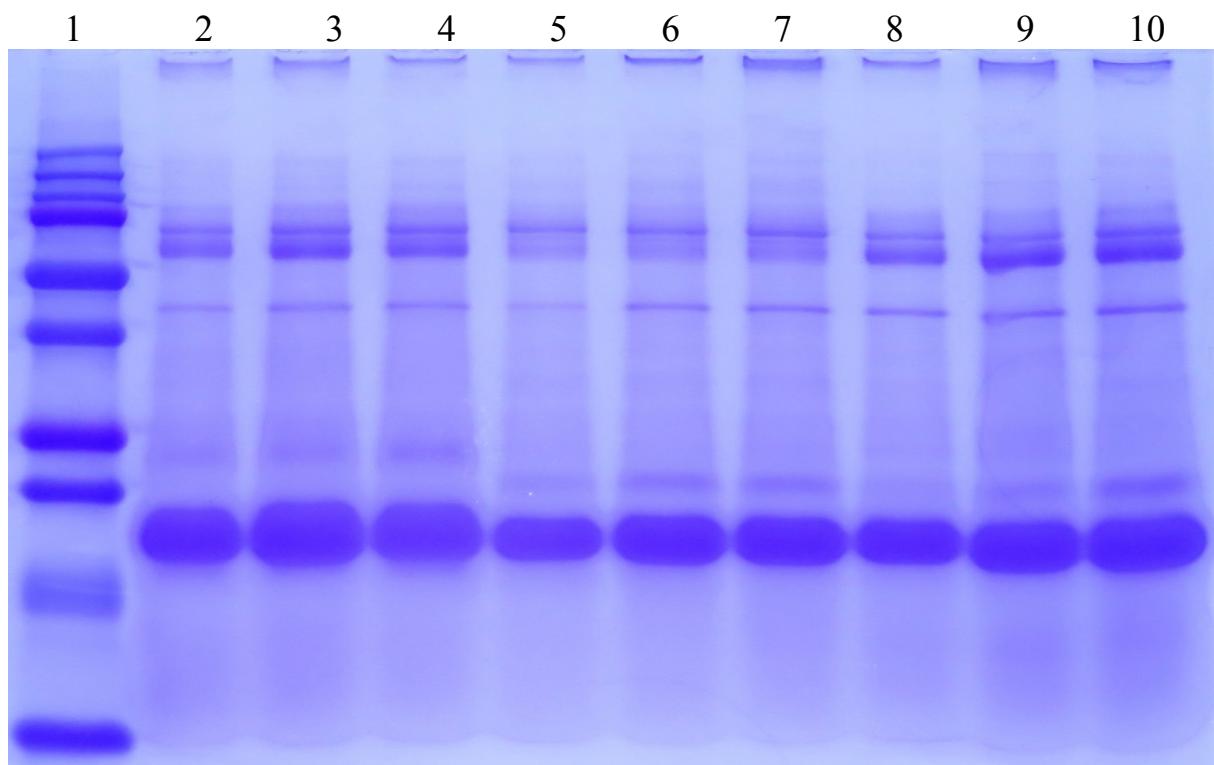
圖二、鎖鏈蛇成蛇(Dr316, Dr318)於飼養前、中、後期所採集蛇毒，以及幼蛇(Dr350, Dr354, Dr360)於飼養前期所採集蛇毒的一維電泳之還原膠圖譜。Lane 1 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa。Lane 2-4 為編號 Dr316 蛇隻於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 5-7 為 Dr318 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 8-10 分別為 Dr350, Dr354, Dr360 於飼養前期之蛇毒蛋白圖譜。



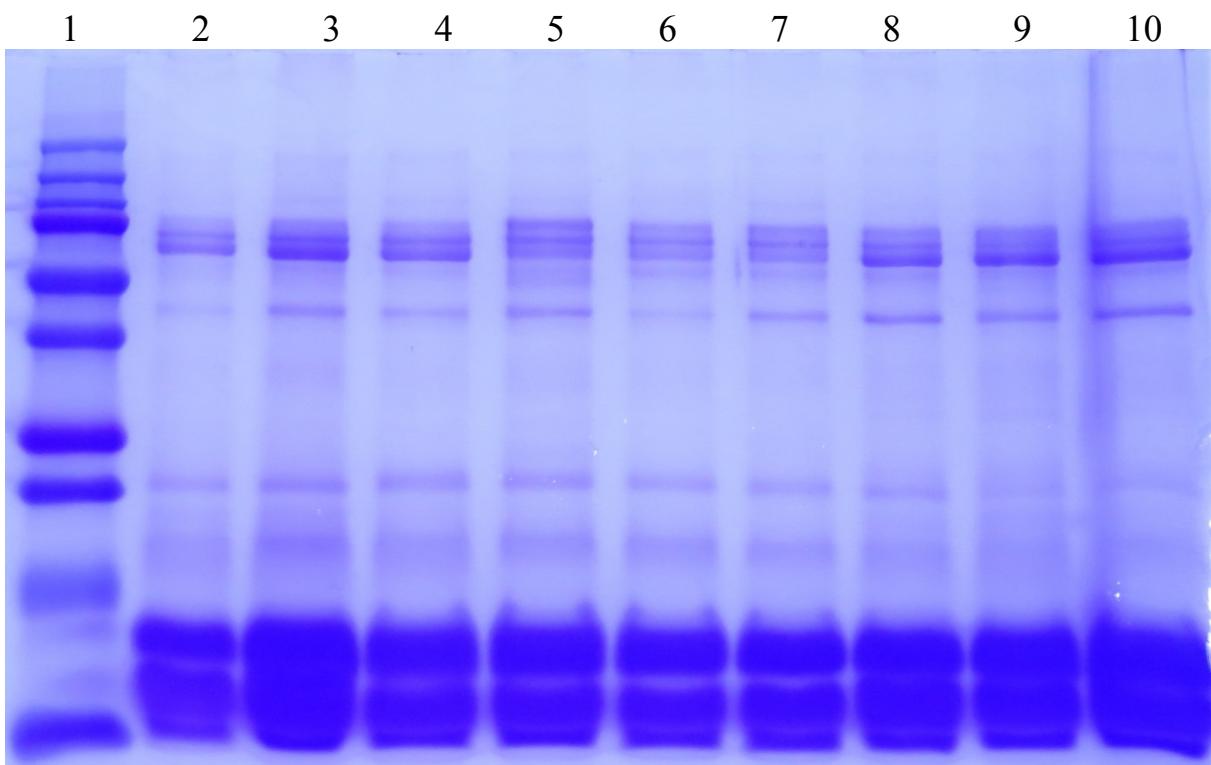
圖三、鎖鏈蛇成蛇(Dr320, Dr324)於飼養前、中、後期所採集蛇毒，以及幼蛇(Dr362, Dr368, Dr396)於飼養前期所採集蛇毒之一維電泳之非還原膠圖譜。Lane 1 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa。Lane 2-4 為編號 Dr320 蛇隻於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 5-7 為 Dr324 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 8-10 分別為 Dr362, Dr368, Dr396 於飼養前期之蛇毒蛋白圖譜。



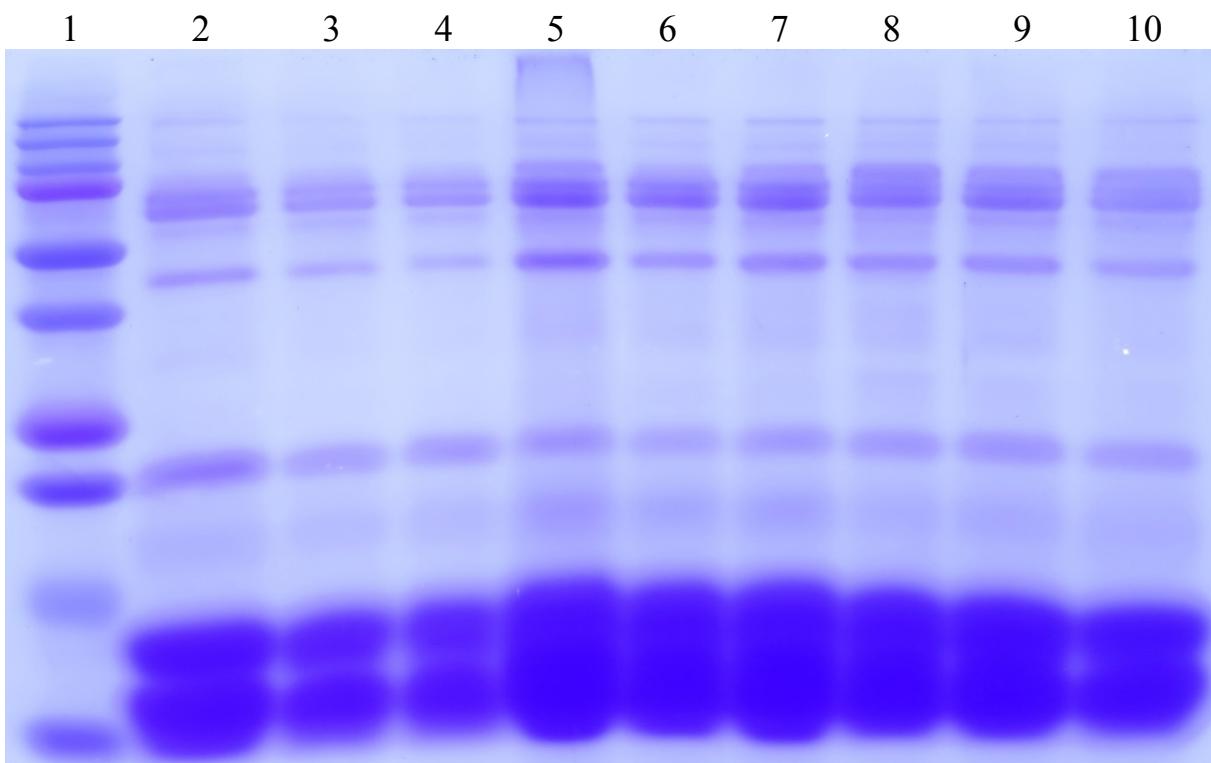
圖四、鎖鏈蛇成蛇(Dr320, Dr324)於飼養前、中、後期所採集蛇毒，以及幼蛇(Dr362, Dr368, Dr396)於飼養前期所採集蛇毒的一維電泳之還原膠圖譜。Lane 1 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa。Lane 2-4 為編號 Dr320 蛇隻於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 5-7 為 Dr324 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 8-10 分別為 Dr362, Dr368, Dr396 於飼養前期之蛇毒蛋白圖譜。



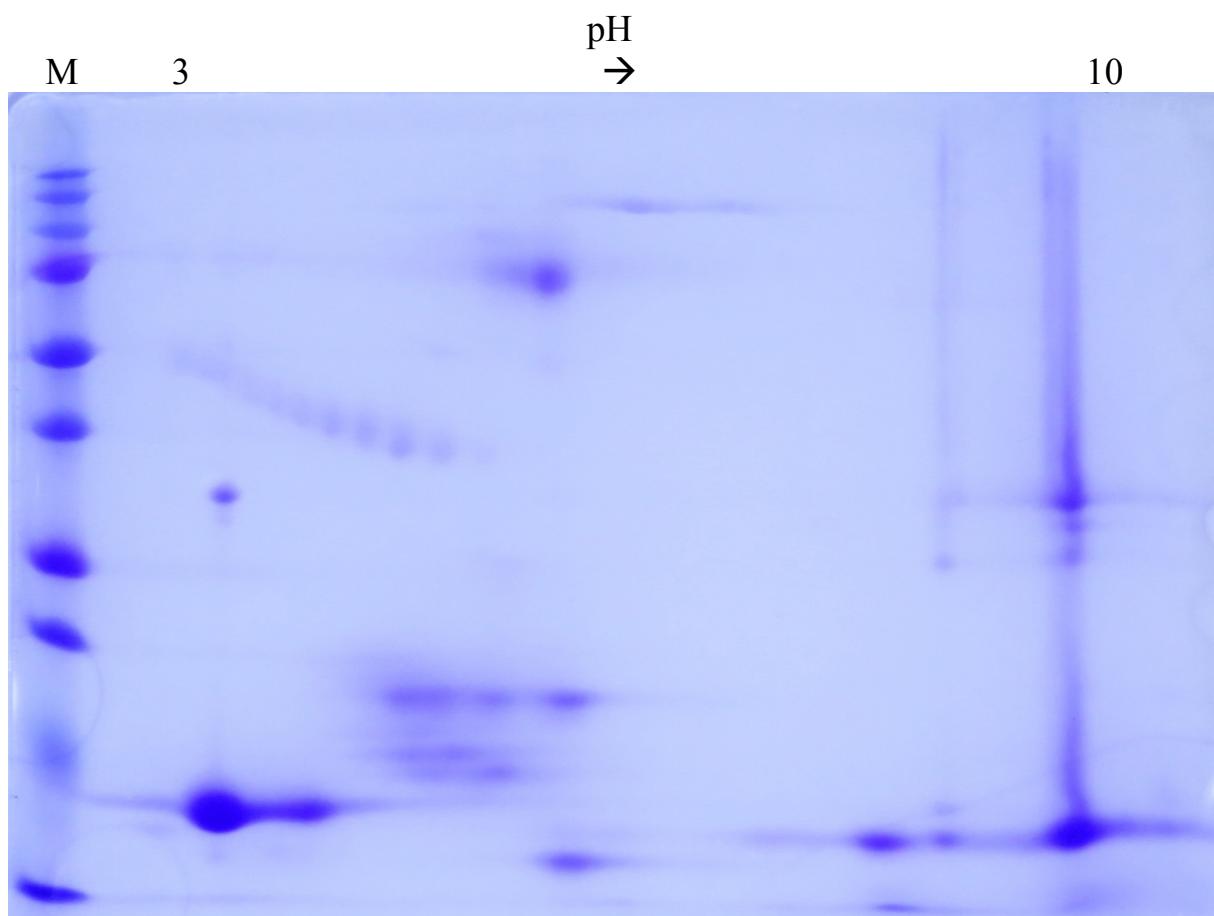
圖五、雨傘節成蛇(Bm1002, Bm1040, Bm1066)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的一維電泳之非還原膠圖譜。Lane 1 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa。Lane 2-4 為編號 Bm1002 蛇隻於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 5-7 為 Bm1040 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 8-10 為 Bm1066 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜。



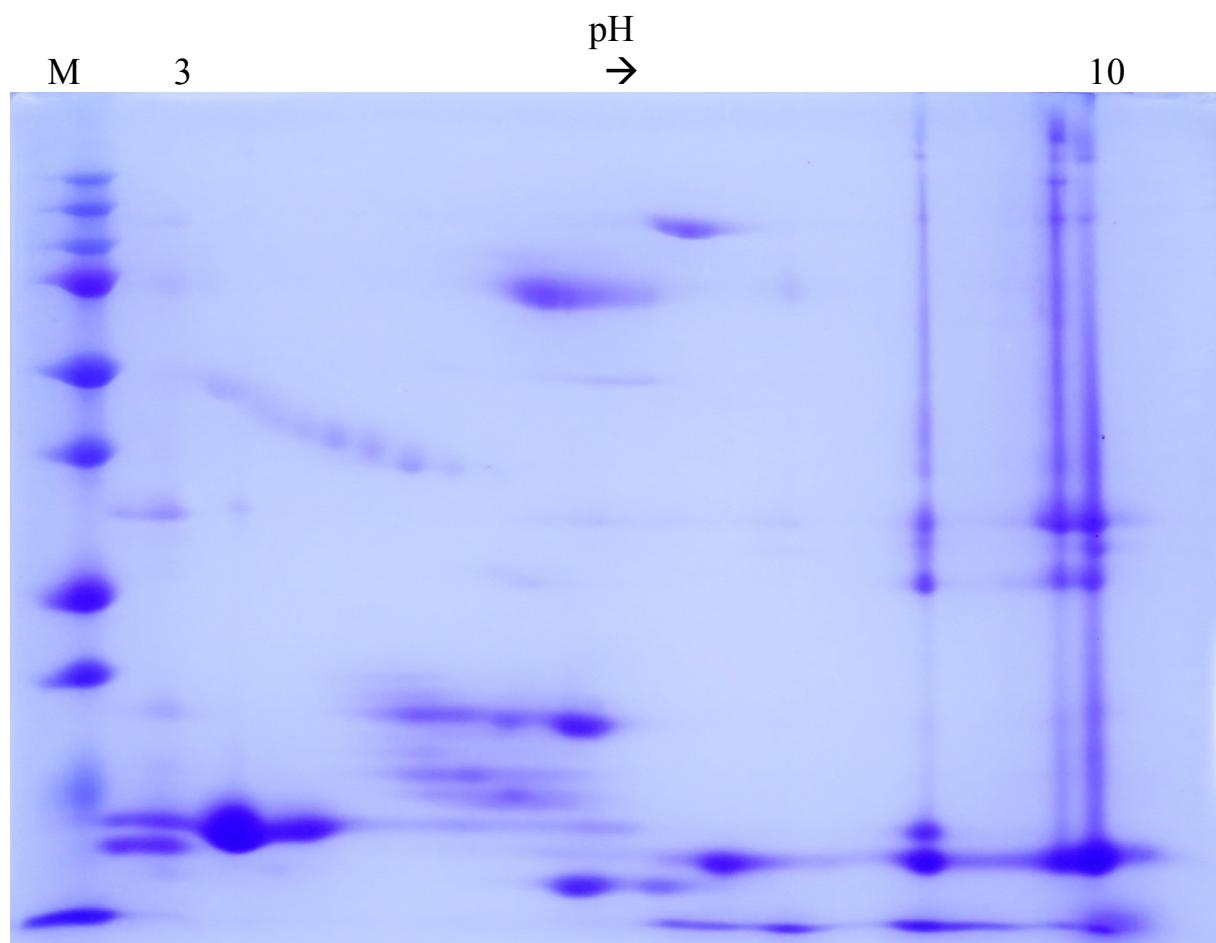
圖六、雨傘節成蛇(Bm1002, Bm1040, Bm1066)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的一維電泳之還原膠圖譜。Lane 1 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa。Lane 2-4 為編號 Bm1002 蛇隻於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 5-7 為 Bm1040 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 8-10 為 Bm1066 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜。



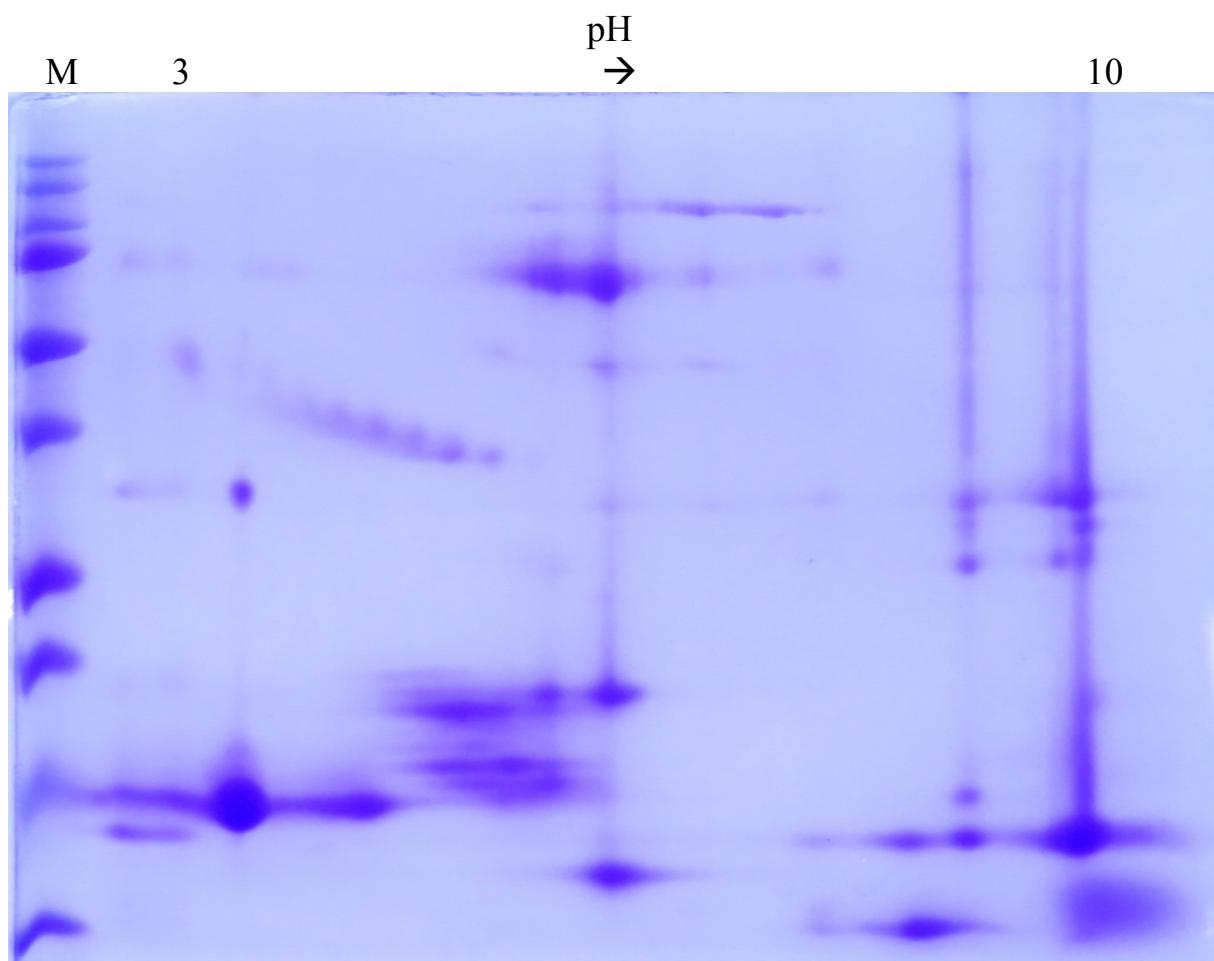
圖七、雨傘節成蛇(Bm1144, Bm1148, Bm1150)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的一維電泳之還原膠圖譜。Lane 1 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa。Lane 2-4 為編號 Bm1144 蛇隻於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 5-7 為 Bm1148 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜，Lane 8-10 為 Bm1150 於飼養前、中、後期之蛇毒蛋白圖譜。



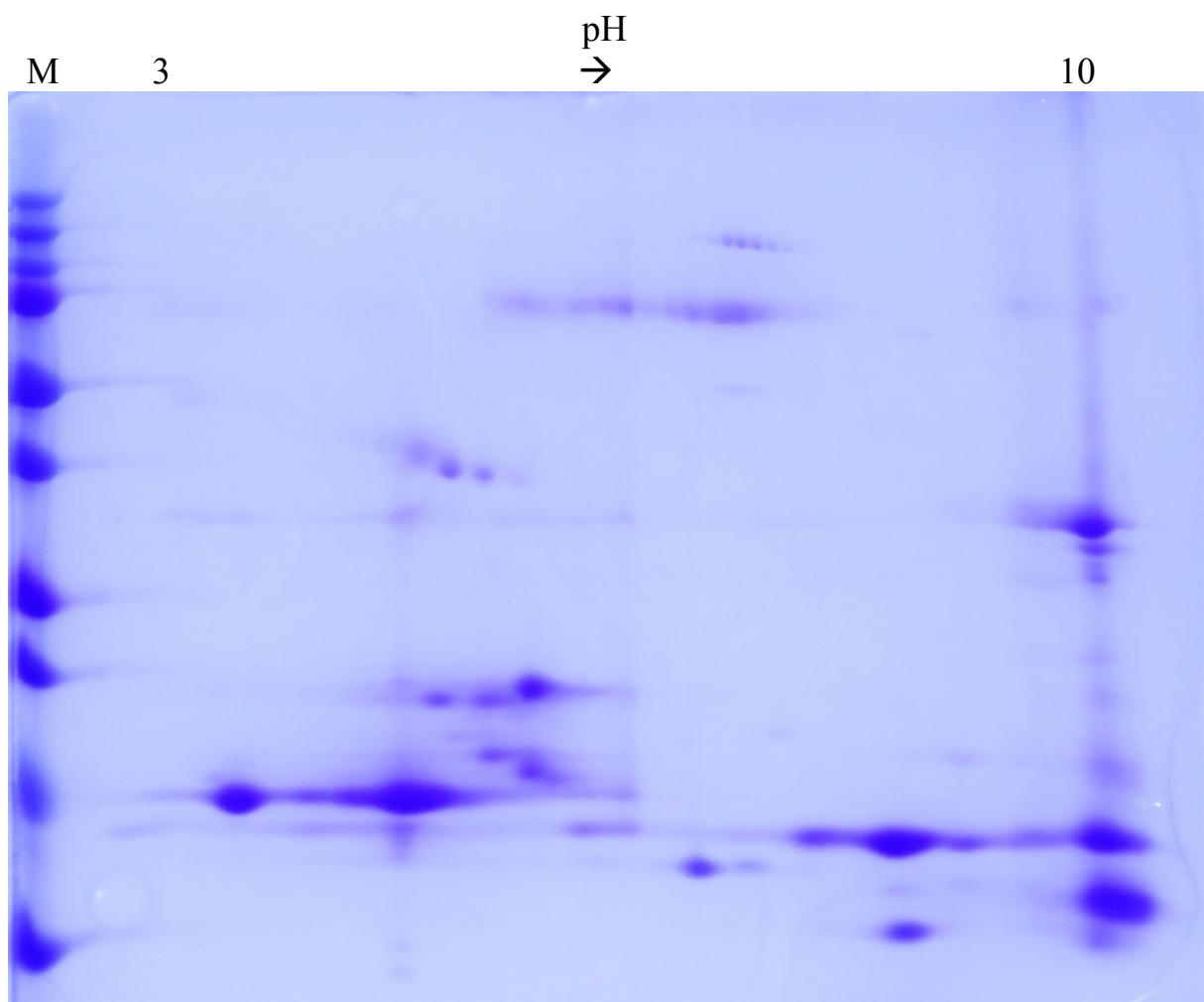
圖八、鎖鏈蛇成蛇(Dr324)於飼養前期所採集蛇毒的二維電泳圖譜。M 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 10 kDa。



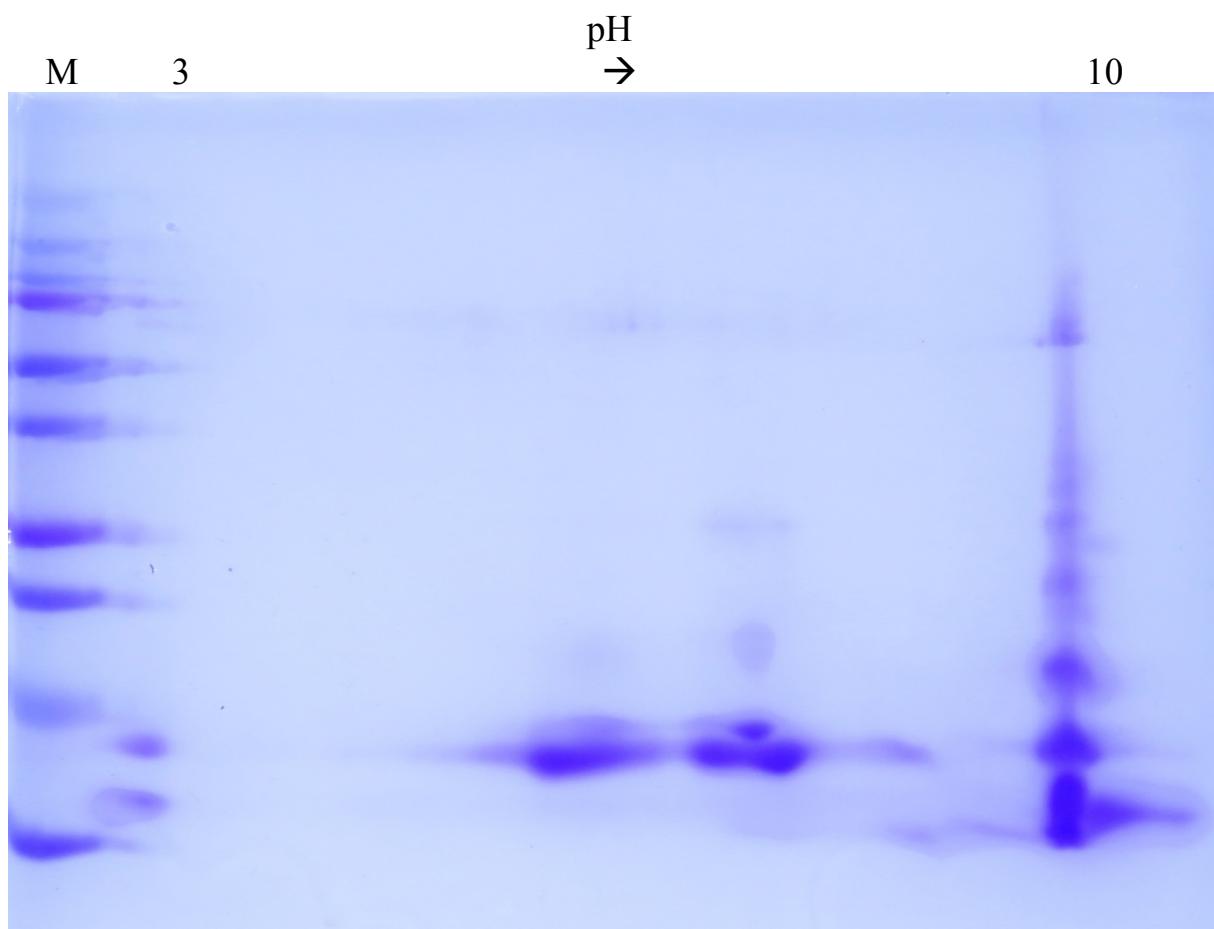
圖九、鎖鏈蛇成蛇(Dr324)於飼養中期所採集蛇毒的二維電泳圖譜。M 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 10 kDa。



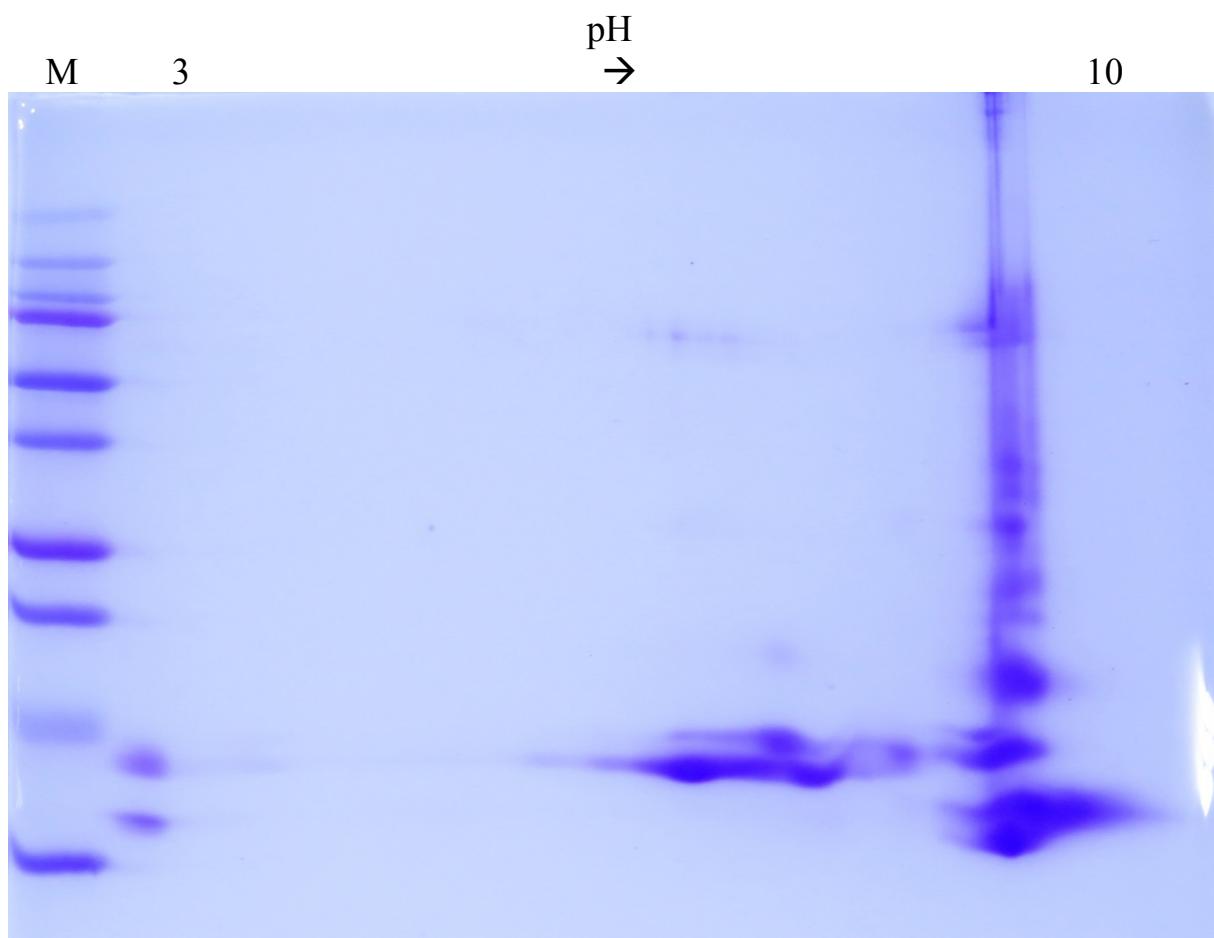
圖十、鎖鏈蛇成蛇(Dr324)於飼養後期所採集蛇毒的二維電泳圖譜。M 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 10 kDa。



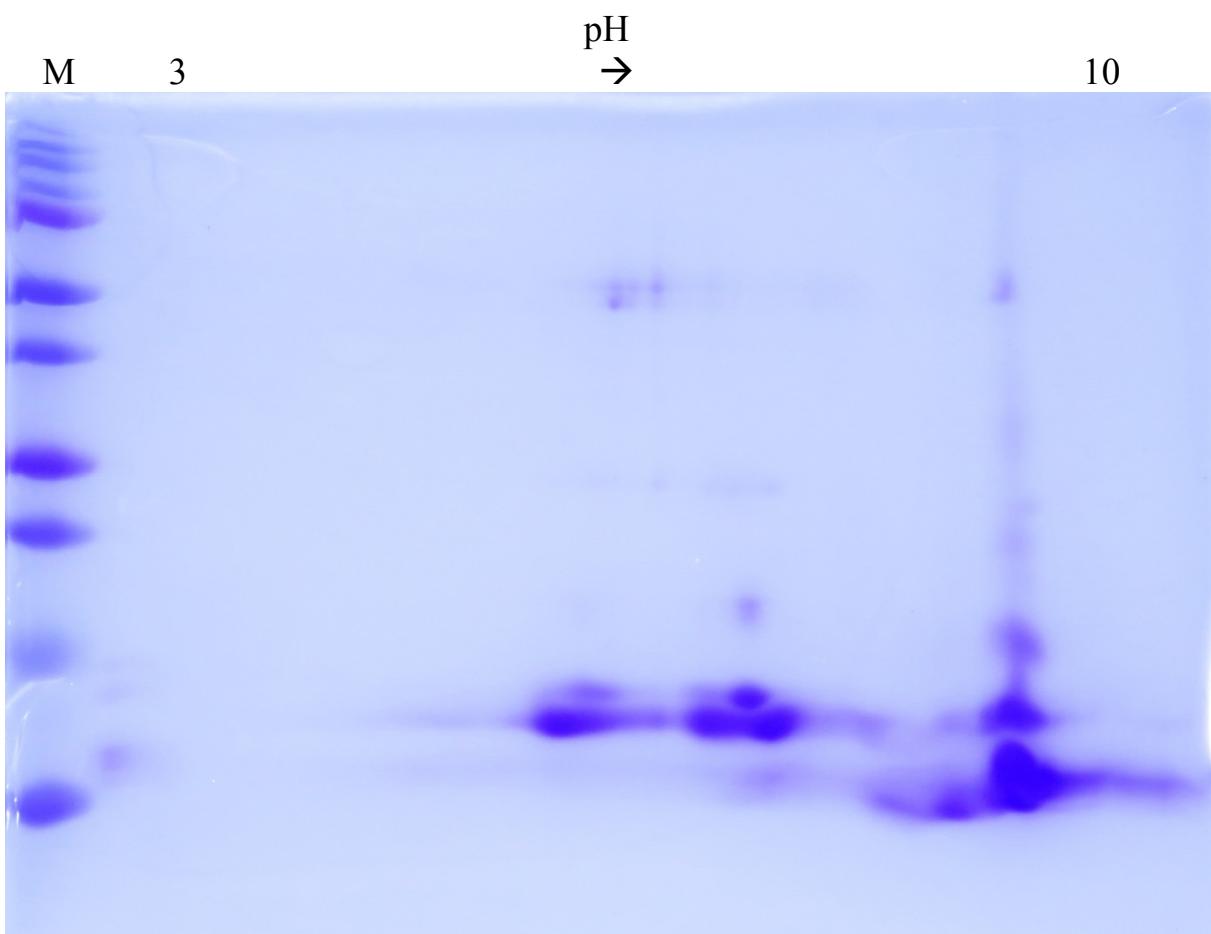
圖十一、鎖鏈蛇幼蛇(Dr368)蛇毒的二維電泳圖譜。M 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa。



圖十二、雨傘節成蛇(Bm1002)於飼養前期所採集蛇毒的二維電泳圖譜。M為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa。

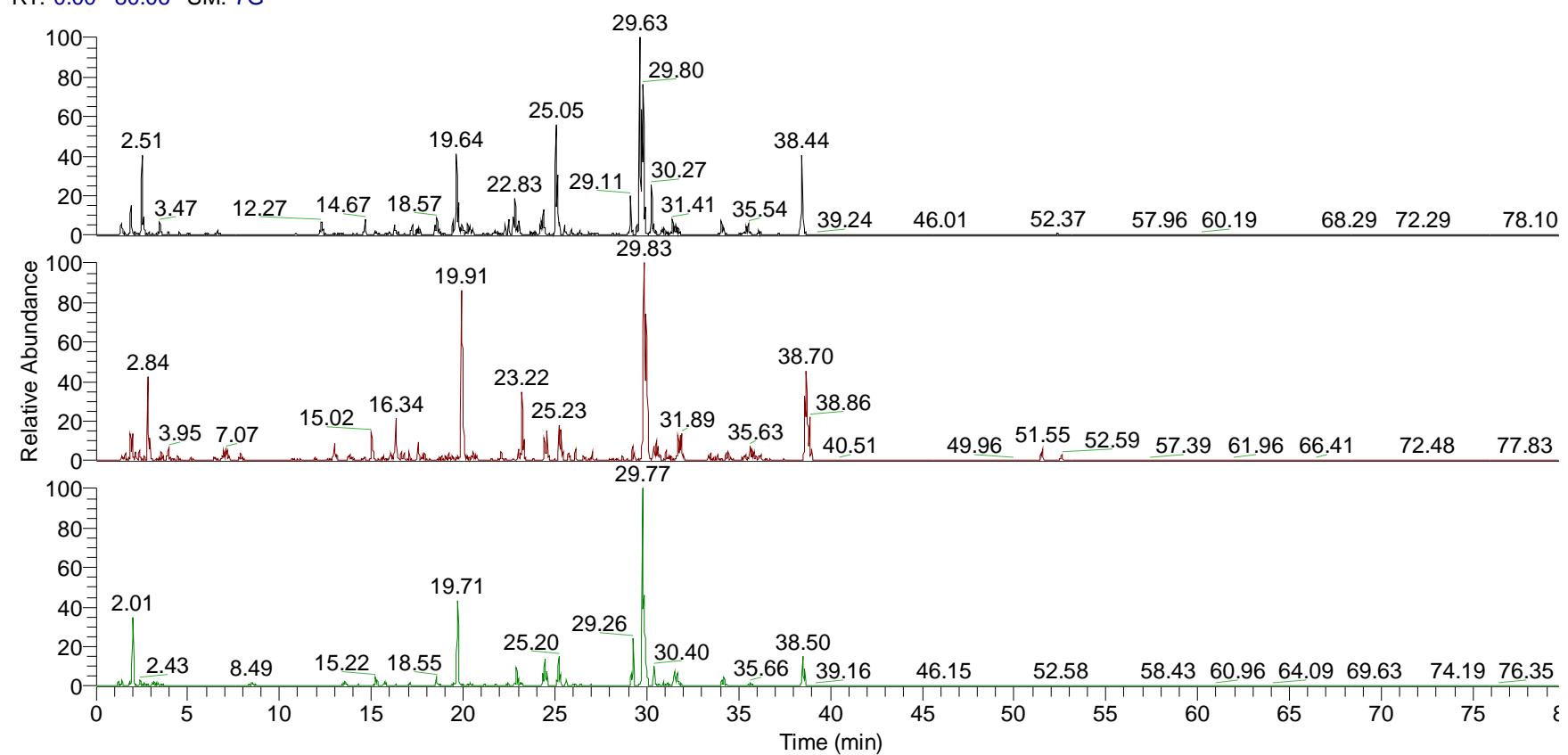


圖十三、雨傘節成蛇(Bm1002)於飼養中期所採集蛇毒的二維電泳圖譜。M為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa。



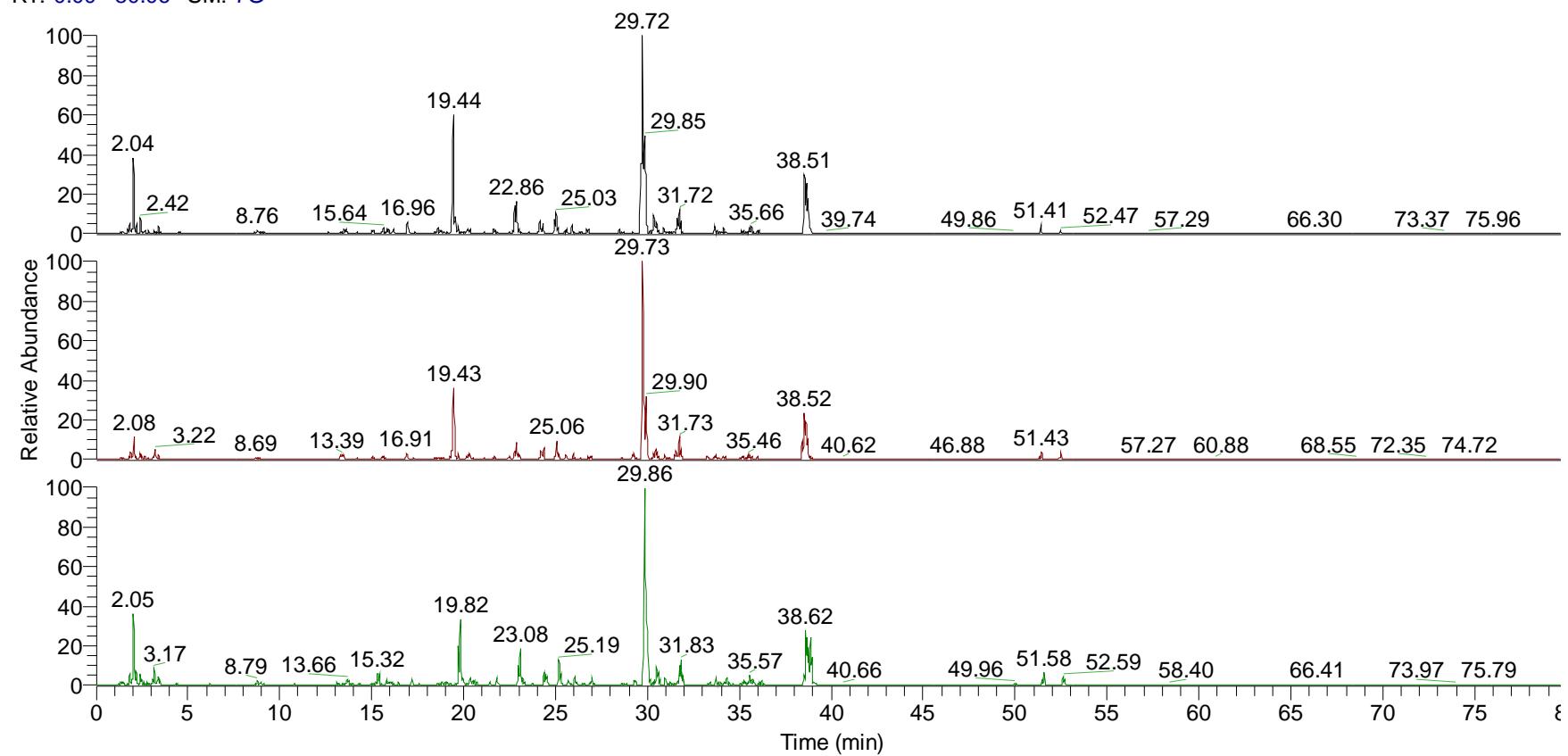
圖十四、雨傘節成蛇(Bm1002)於飼養後期所採集蛇毒的二維電泳圖譜。M 為分子量 marker，由上而下為 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa。

RT: 0.00 - 80.06 SM: 7G



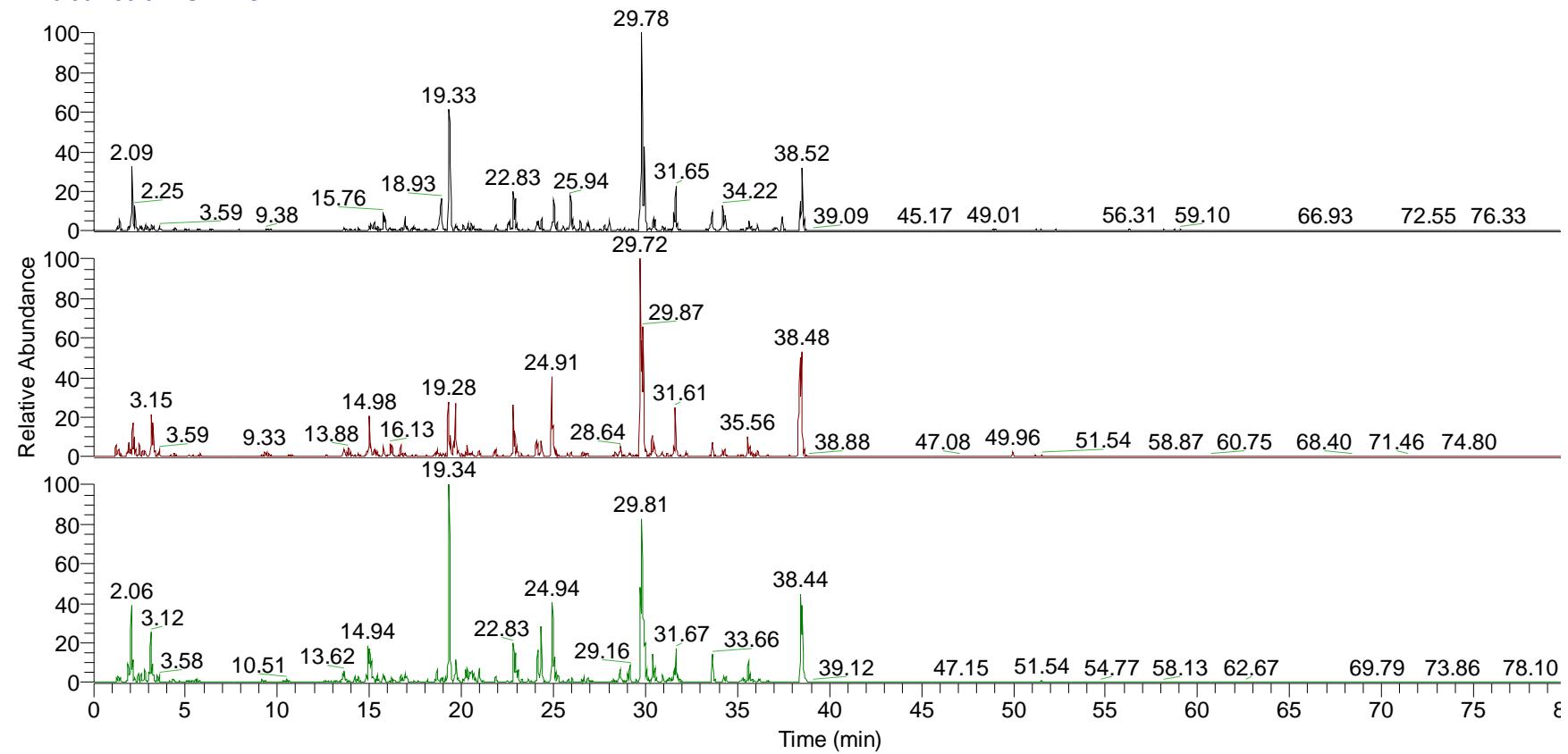
圖十五、鎖鏈蛇成蛇(Dr316)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。

RT: 0.00 - 80.06 SM: 7G



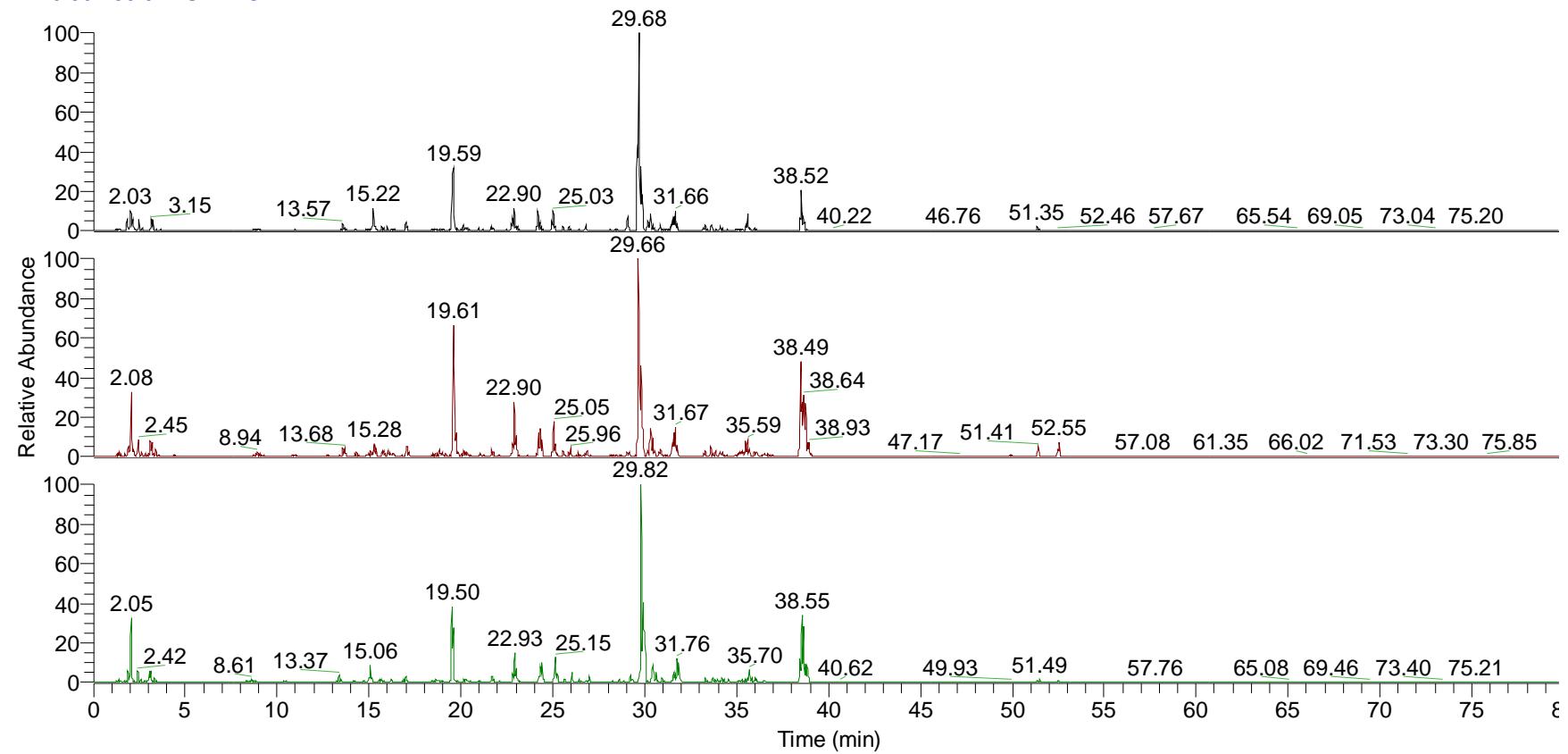
圖十六、鎖鏈蛇成蛇(Dr318)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。

RT: 0.00 - 80.04 SM: 7G



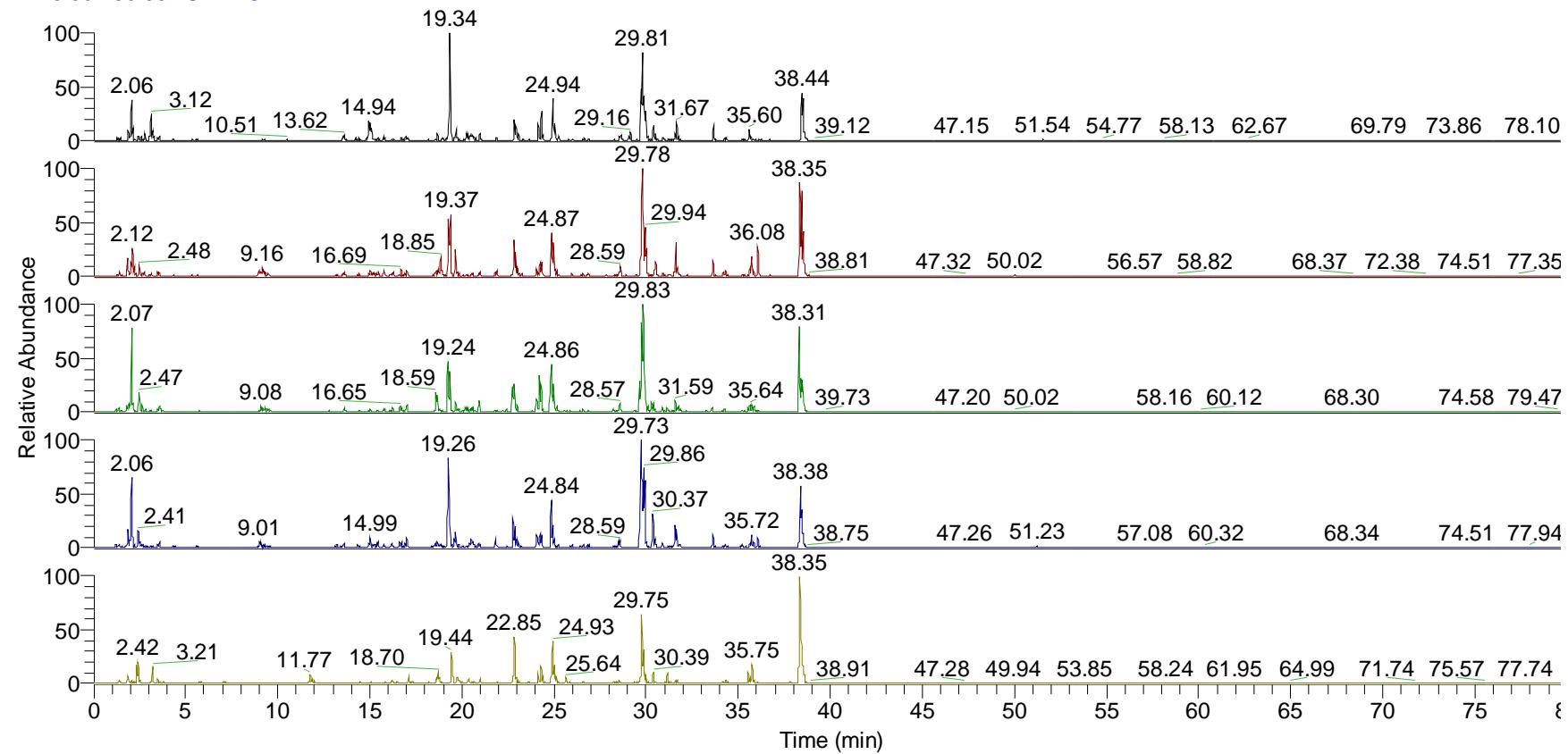
圖十七、鎖鏈蛇成蛇(Dr324)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。

RT: 0.00 - 80.04 SM: 7G

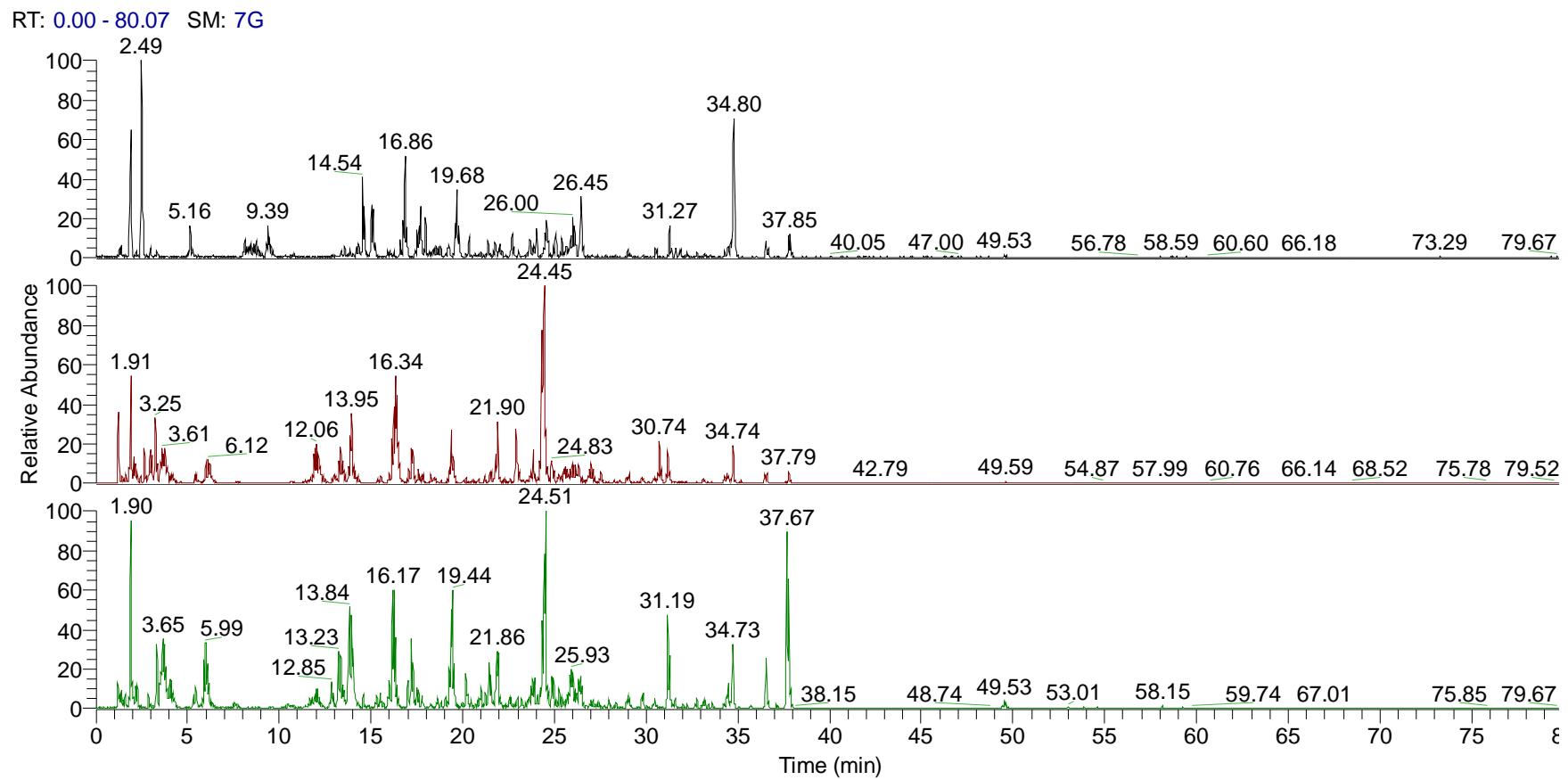


圖十八、鎖鏈蛇成蛇(Dr338)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。

RT: 0.00 - 80.05 SM: 7G

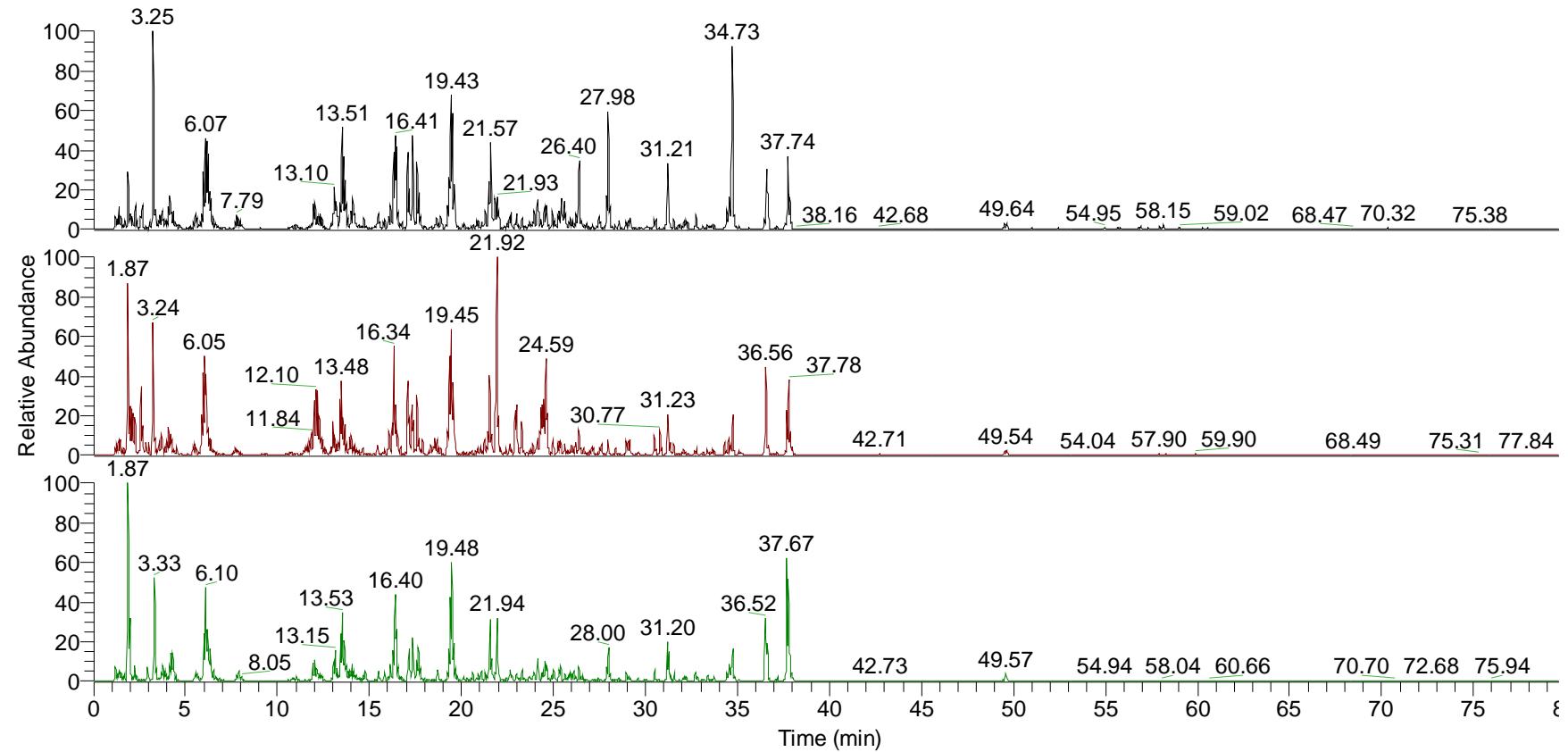


圖十九、由上而下依序為鎖鏈蛇成蛇(Dr324)與幼蛇(Dr354, Dr360, Dr362, Dr368)於飼養期間所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜。

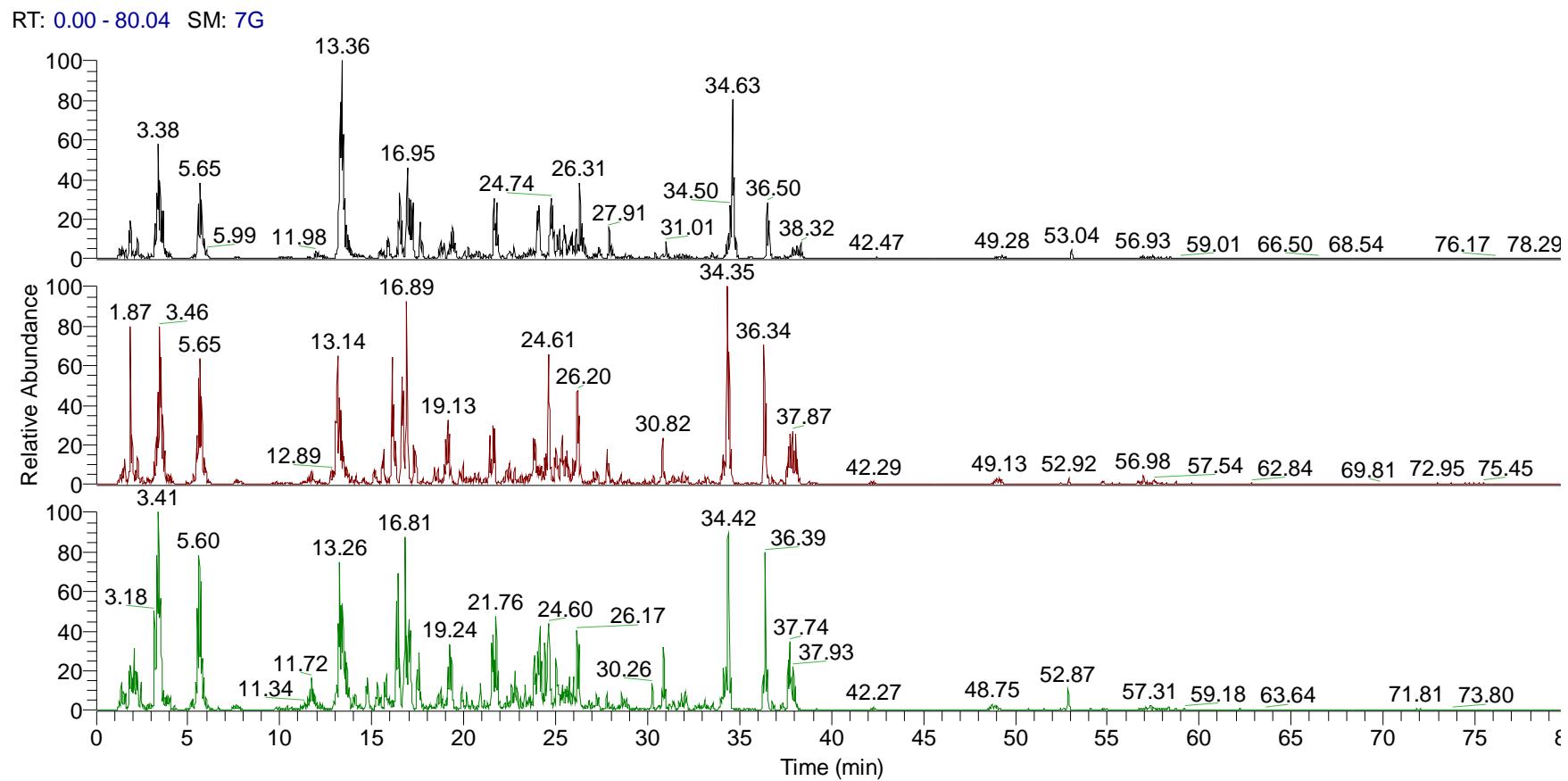


圖二十、雨傘節成蛇(Bm1002)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。

RT: 0.00 - 80.02 SM: 7G

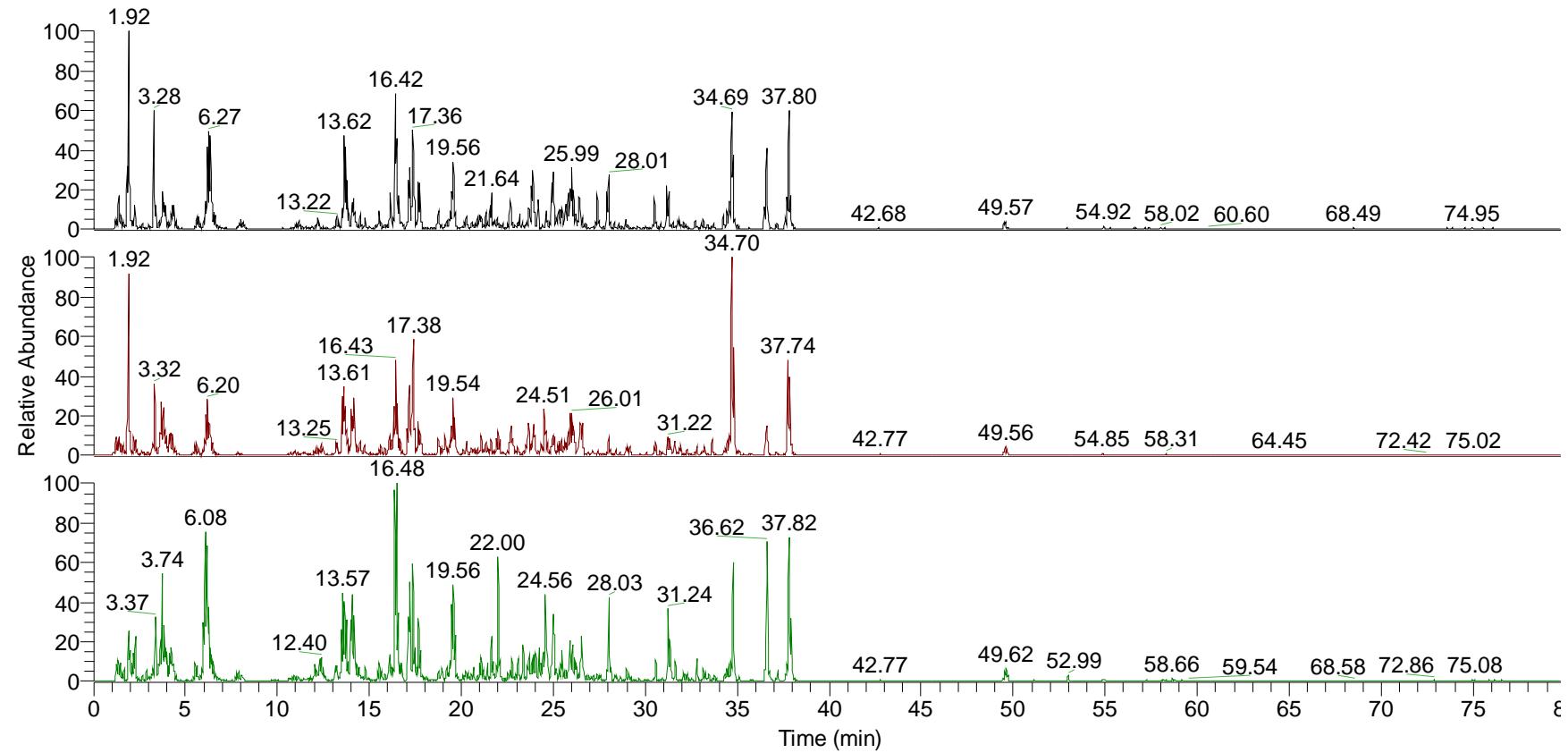


圖二十一、雨傘節成蛇(Bm1082)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。

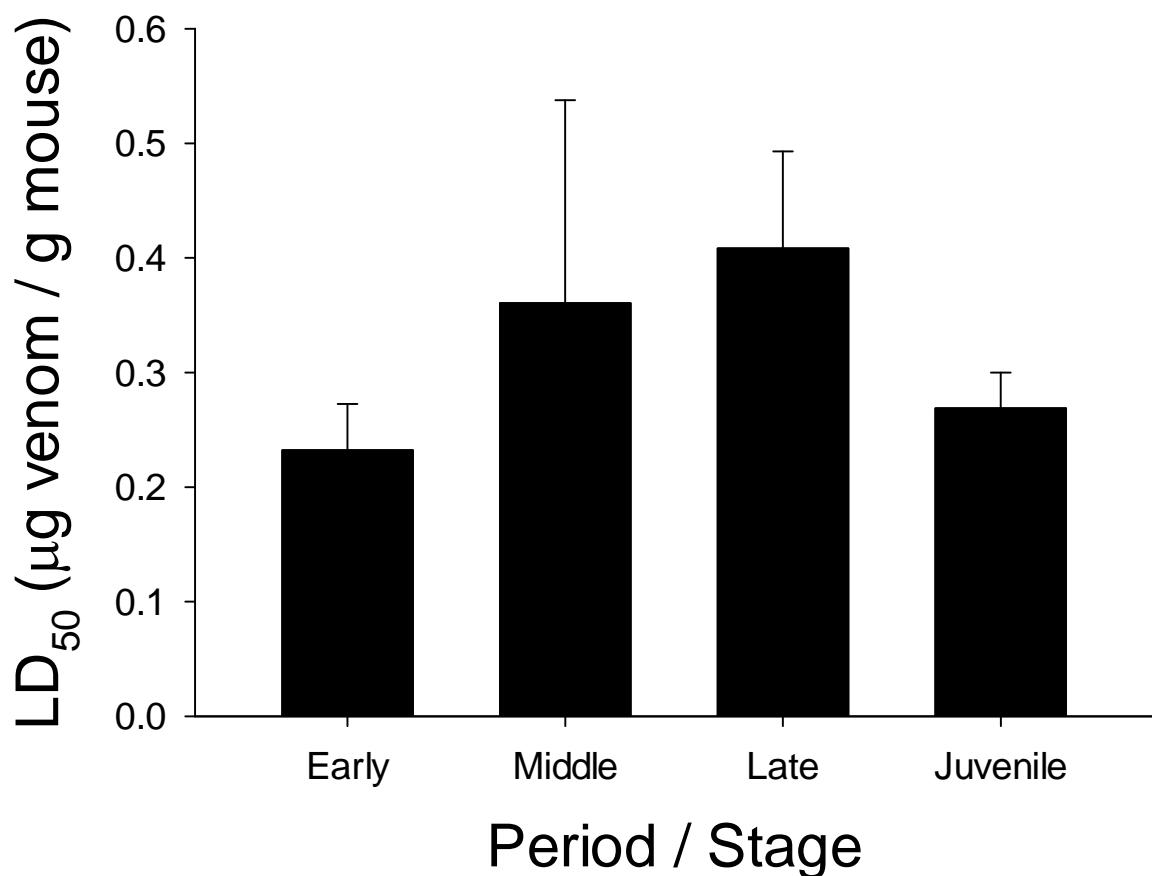


圖二十二、雨傘節成蛇(Bm1144)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。

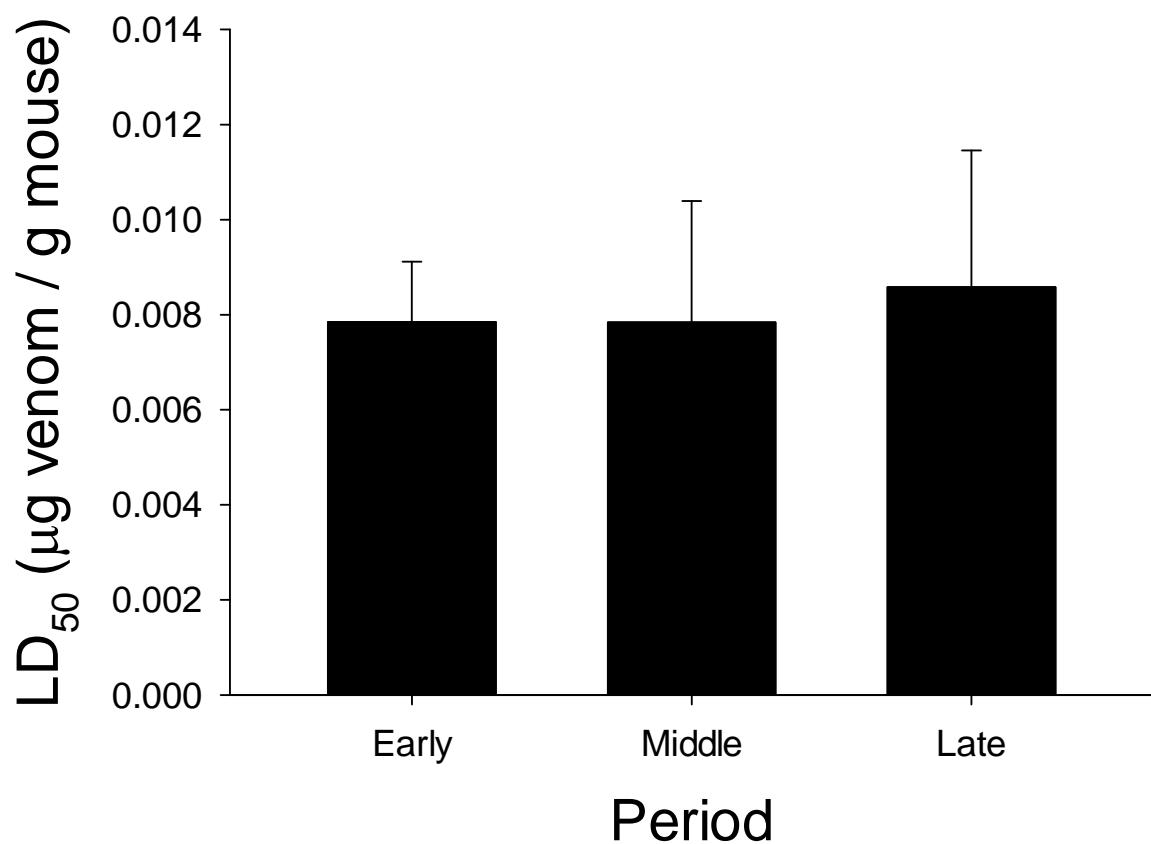
RT: 0.00 - 80.06 SM: 7G



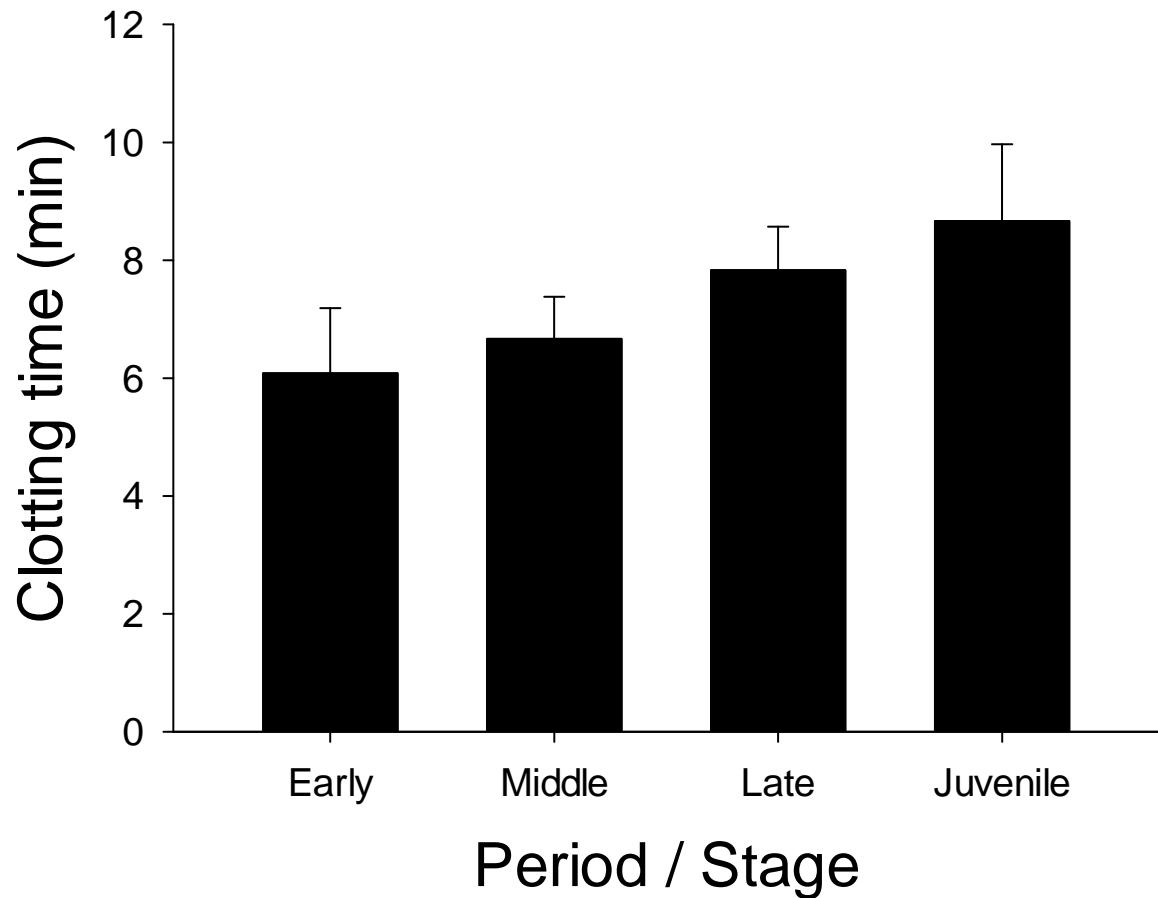
圖二十三、雨傘節成蛇(Bm1148)於飼養前、中、後期(由上而下)所採集蛇毒經 trypsin 作用後，進行液相管柱層析之圖譜比較。



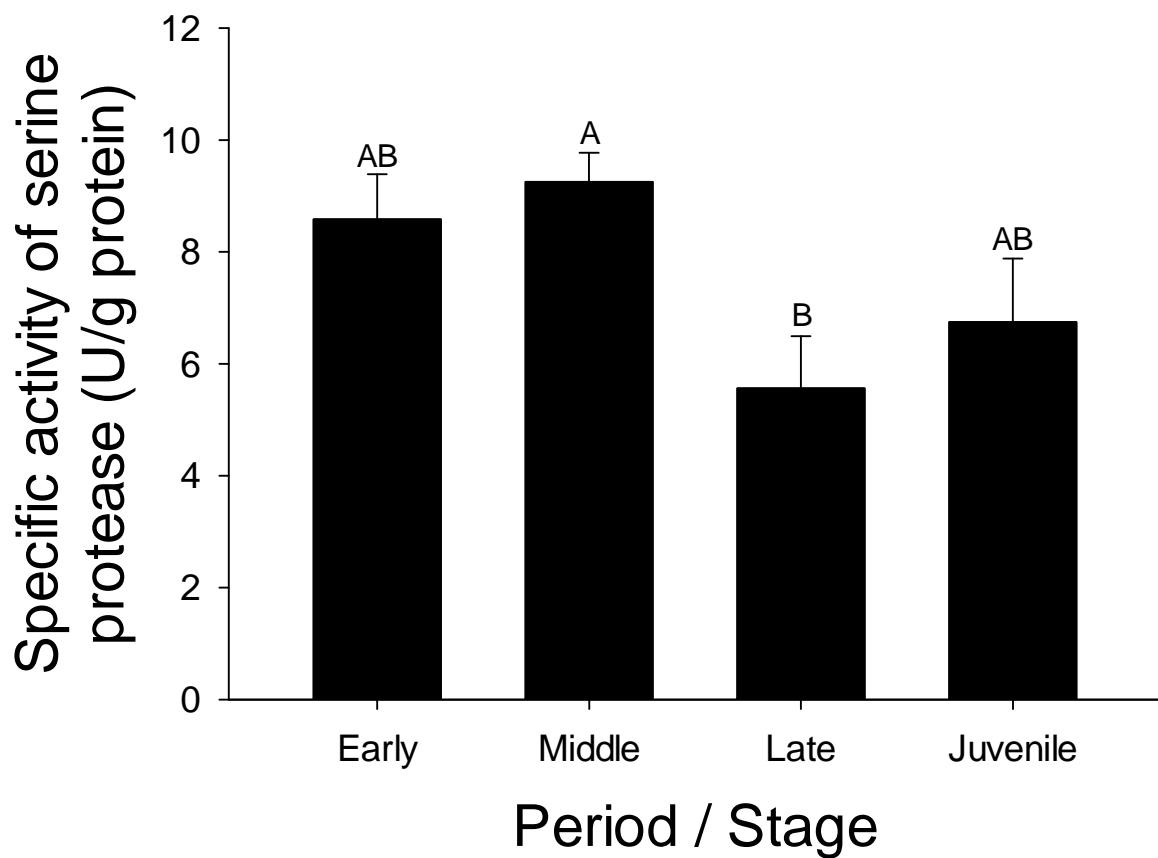
圖二十四、鎖鏈蛇成蛇(n=3)於飼養前、中、後期以及幼蛇(n=3)於飼養前期所採集蛇毒對於小白鼠半致死劑量比較。柱高及誤差線表示 mean ± SE。



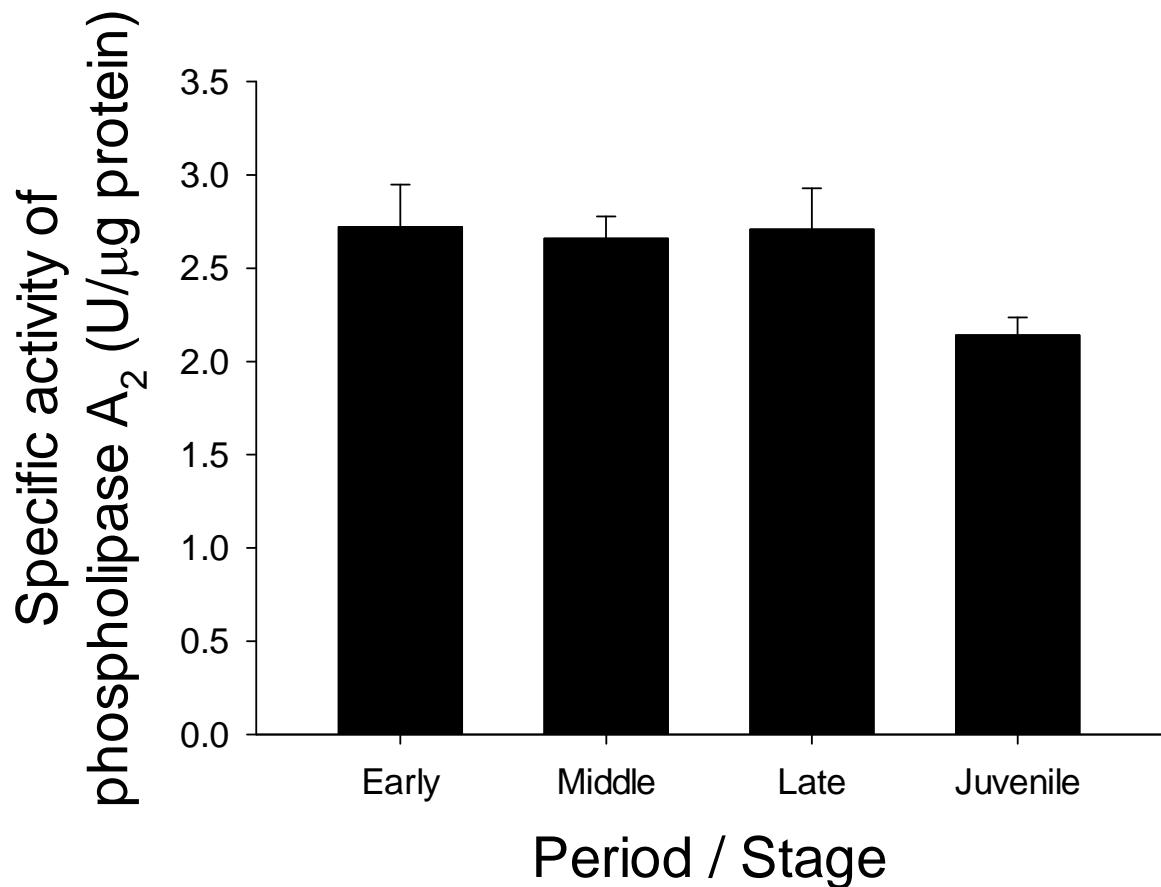
圖二十五、雨傘節成蛇($n=3$)於飼養前、中、後期所採集蛇毒對於小白鼠半致死劑量比較。柱高及誤差線表示 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 。



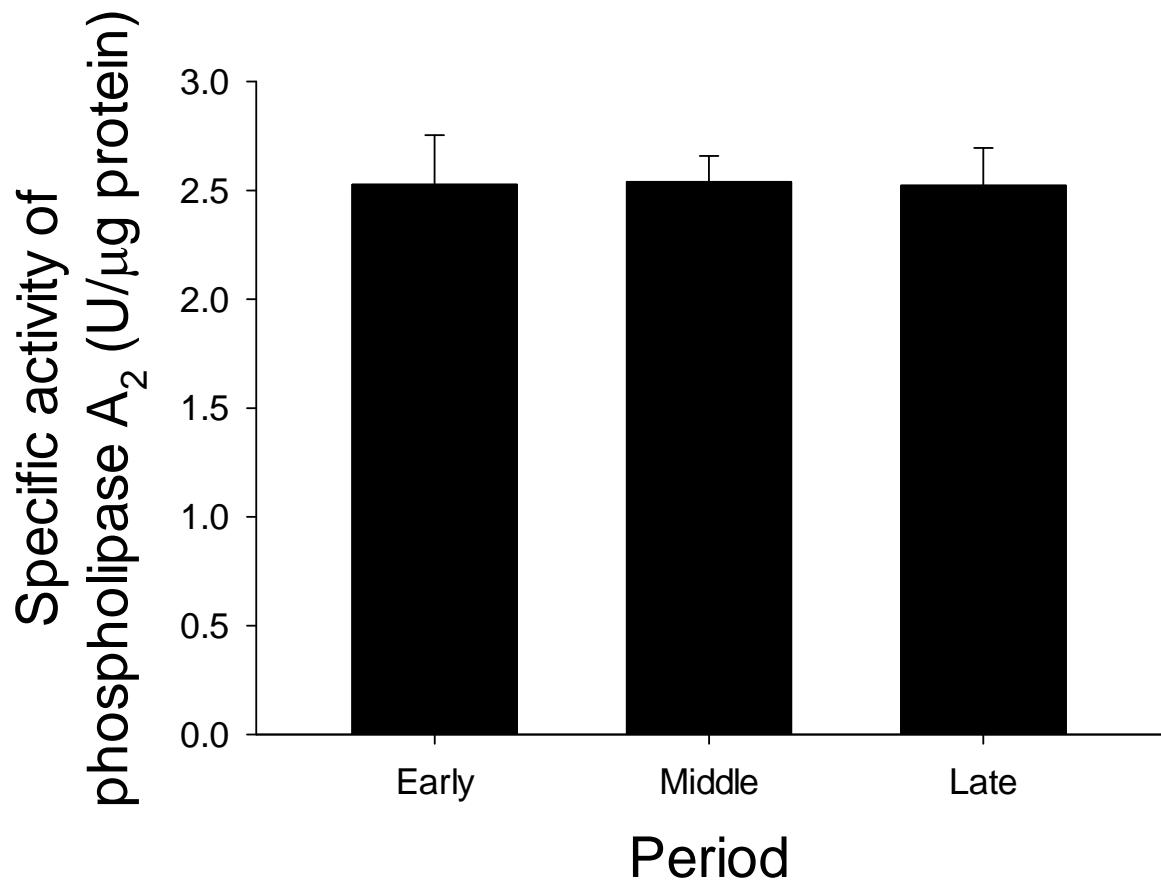
圖二十六、鎖鏈蛇成蛇($n=6$)於飼養前、中、後期所採集蛇毒以及幼蛇($n=3$)的蛇毒導致鼠血凝血的時間比較。柱高及誤差線表示 $mean \pm SE$ 。



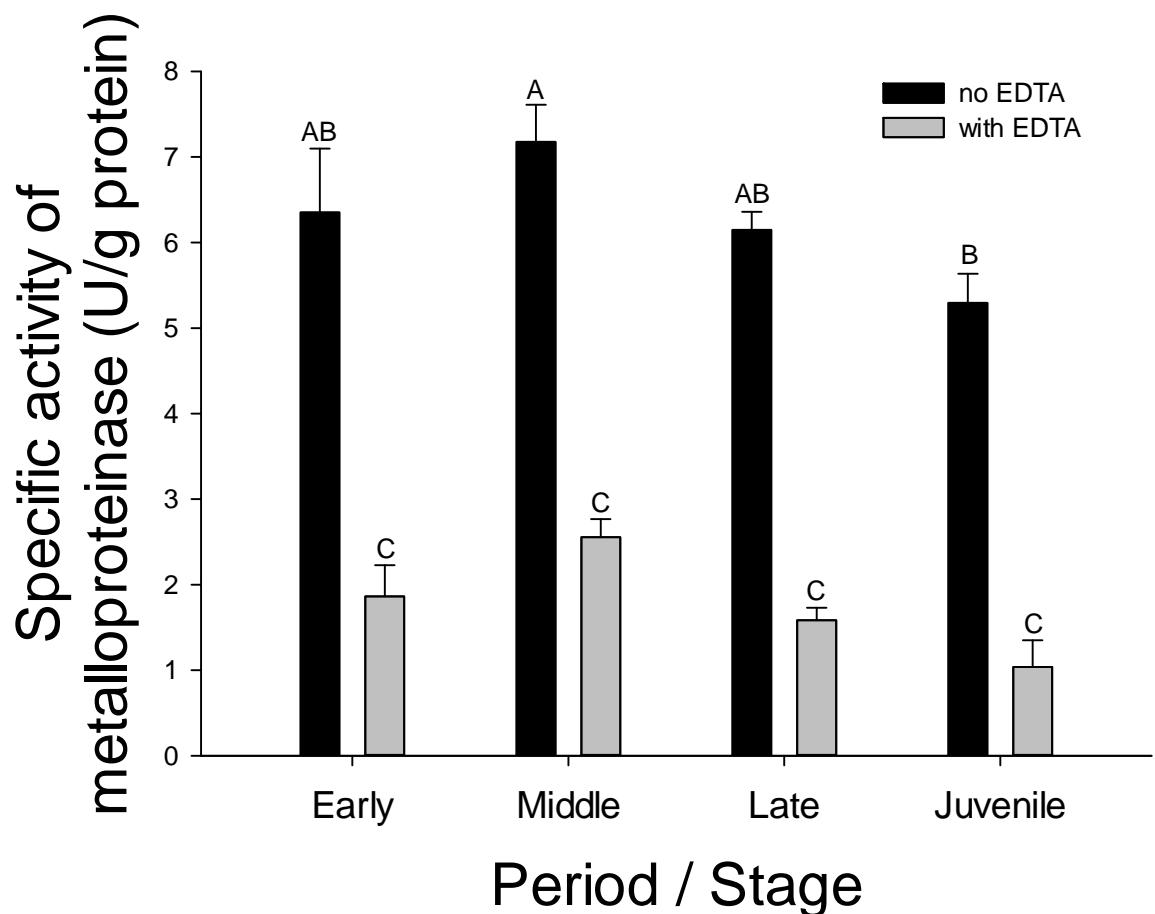
圖二十七、鎖鏈蛇成蛇($n=6$)於飼養前、中、後期以及幼蛇($n=6$)於飼養前期所採集蛇毒的絲氨酸蛋白酶活性比較。柱高及誤差線表示 $mean \pm SE$ 。柱上方英文字母完全不同者之間具顯著差異。



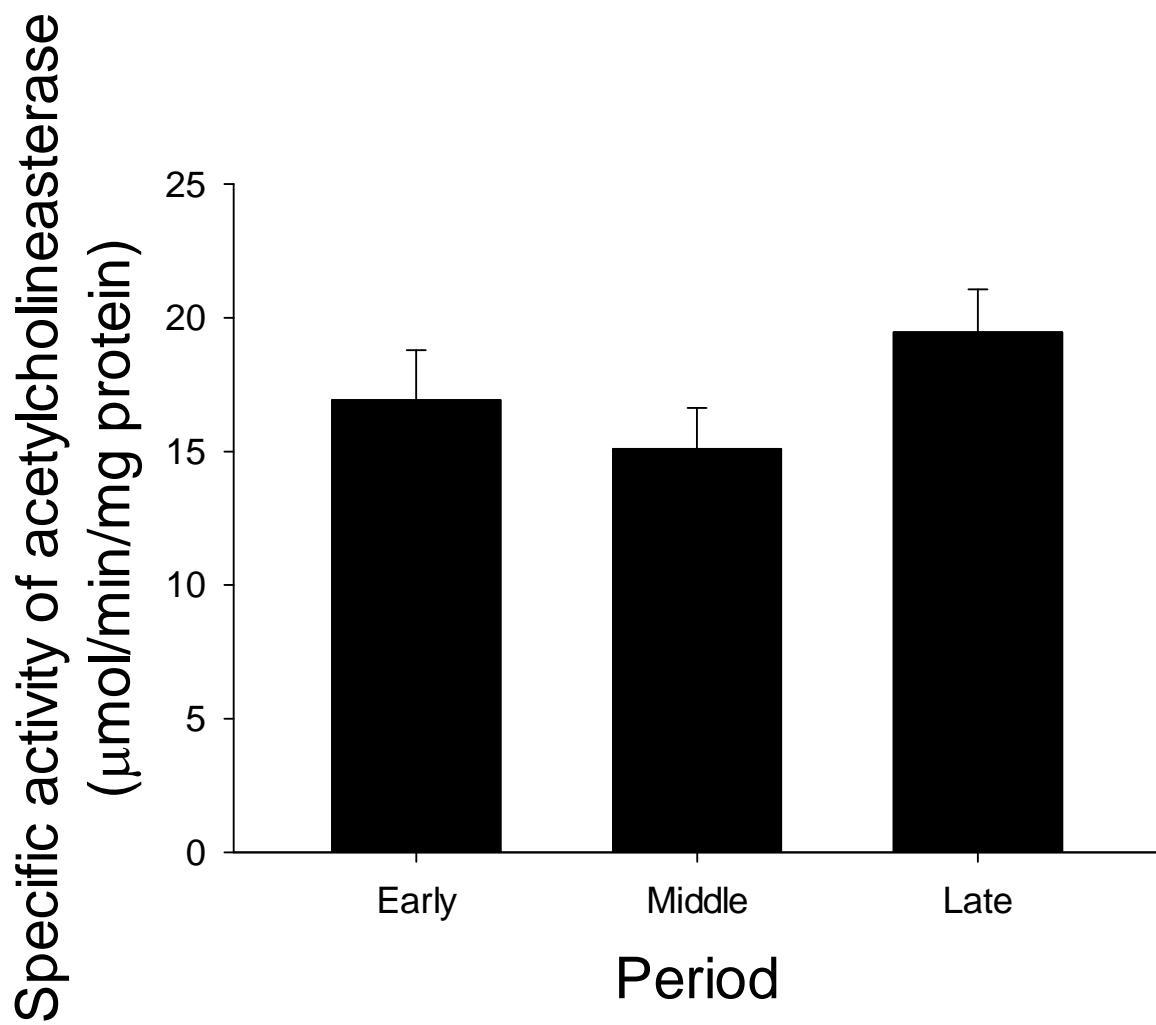
圖二十八、鎖鏈蛇成蛇($n=6$)於飼養前、中、後期以及幼蛇($n=6$)於飼養前期所採集蛇毒的磷脂酶A₂活性比較。柱高及誤差線表示 mean \pm SE。



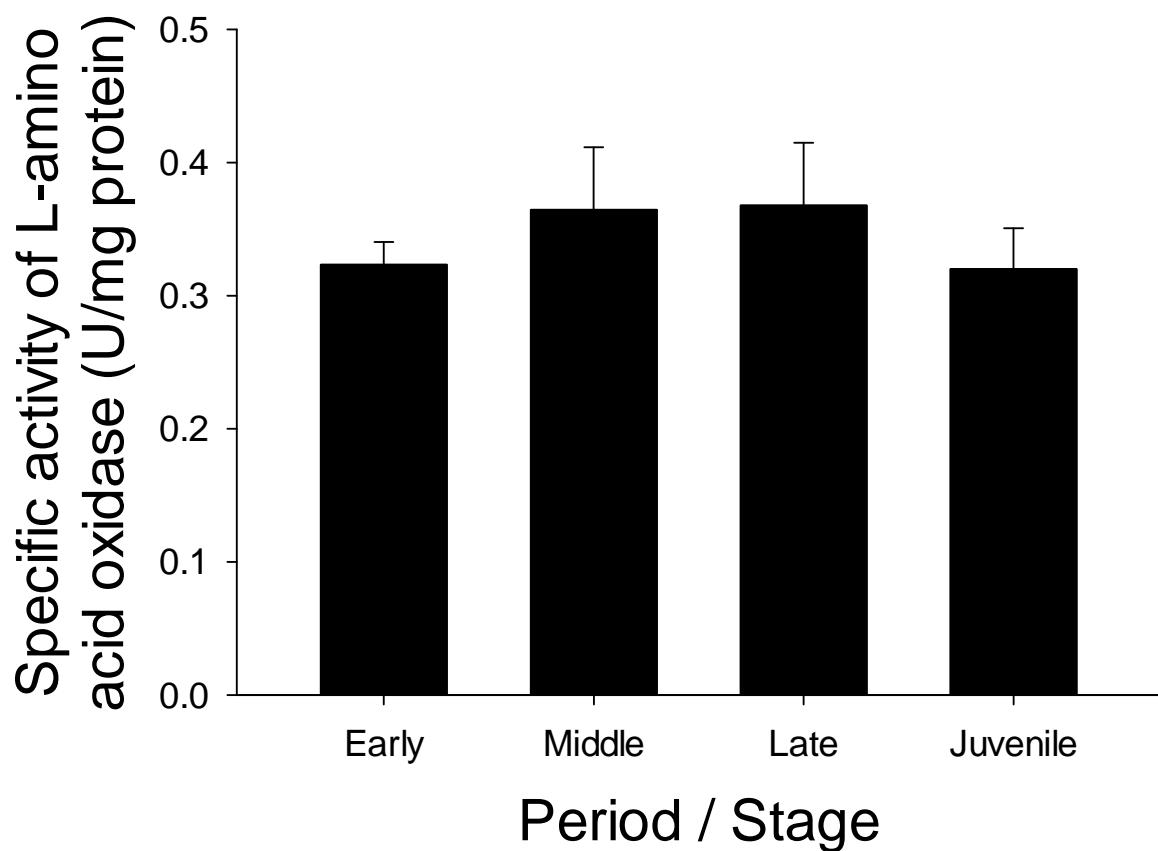
圖二十九、雨傘節成蛇(n=9)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的磷脂酶 PLA₂ 活性比較。柱高及誤差線表示 mean ± SE。



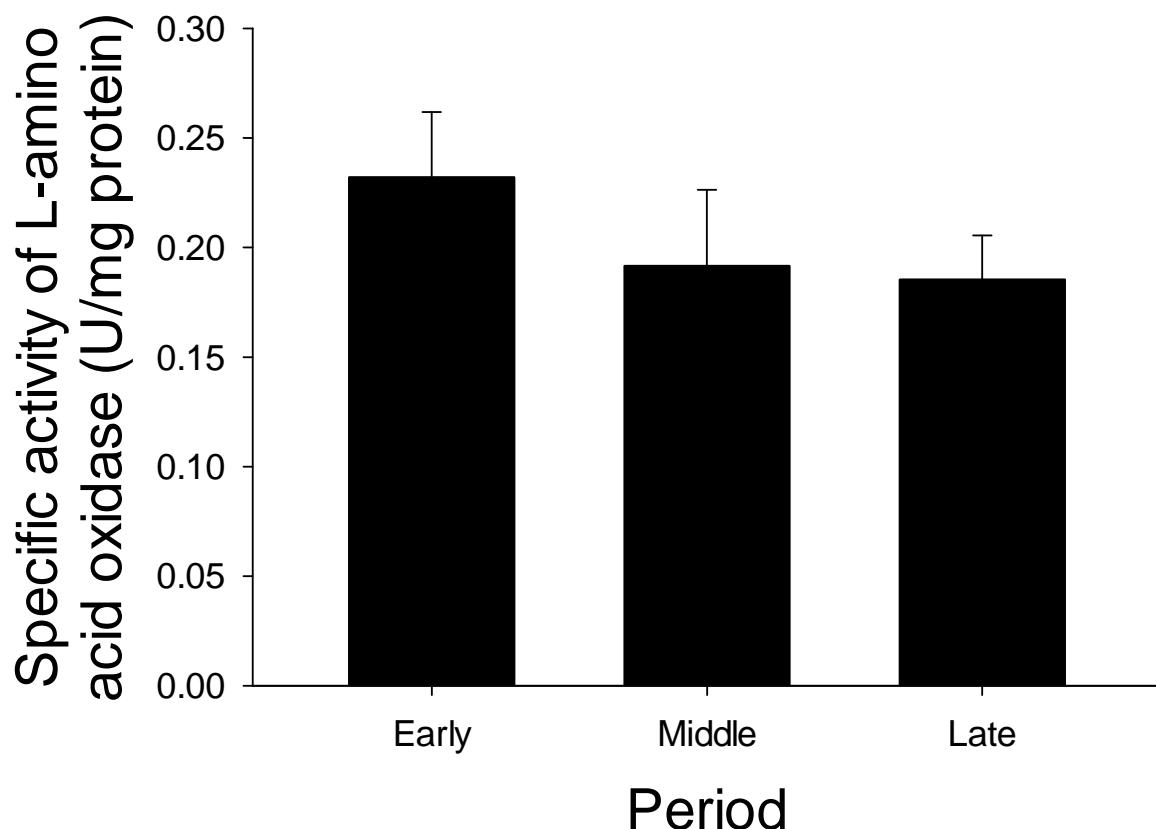
圖三十、鎖鏈蛇成蛇($n=6$)於飼養前、中、後期以及幼蛇($n=6$)於飼養前期所採集蛇毒的金屬蛋白酶於有無加入 EDTA 時之活性比較。柱高及誤差線表示 $mean \pm SE$ 。柱上方英文字母完全不同者之間具顯著差異。



圖三十一、雨傘節成蛇($n=9$)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的乙醯膽鹼酯酶 AChE 活性比較。柱高及誤差線表示 $mean \pm SE$ 。



圖三十二、鎖鏈蛇成蛇($n=6$)於飼養前、中、後期以及幼蛇($n=6$)於飼養前期所採集蛇毒的 L-胺基酸氧化酶活性比較。柱高及誤差線表示 $mean \pm SE$ 。



圖三十三、雨傘節成蛇($n=8$ ；Bm1140 毒量不夠而未檢測)於飼養前、中、後期所採集蛇毒的 L-胺基酸氧化酶活性比較。柱高及誤差線表示 $mean \pm SE$ 。

疾病管制署 107 年度科技研究發展計畫

期中報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000118

計畫名稱：不同飼養時期之鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒蛋白安定性評估計畫

委員一

順序	審查意見	答復說明
1	此計畫需自野外捕捉蛇類樣品，執行不易。	謝謝委員指導。已有收集到接近計畫預期的蛇隻數。
2	幼蛇之毒量少，無法完成所有檢測項目，不知有否方法可再增加幼蛇數量？	謝謝委員指導。鎖鏈蛇野外族群量小，可能無法有效率收集到多量的幼蛇。若需穩定且足夠的樣本數，則可進行繁殖飼養計畫。已補充於期末報告討論章節。

疾病管制署 107 年度科技研究發展計畫

期中報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000118

計畫名稱：不同飼養時期之鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒蛋白安定性評估計畫

委員二

順序	審查意見	答復說明
1	有關毒蛇體重無法持續增加的因素，請於期末報告中說明探討。	謝謝委員指導。鎖鏈蛇及雨傘節中，各有一隻個體(Dr324, Bm1256)於計畫期間體重減少(請見期末報告結果章節)，其中鎖鏈蛇已經祈偉廉獸醫師診療判斷可能是病原菌感染呼吸道造成體狀不佳而體重減輕，已進行二週抗生素(每天一針)施打療程。而體重減少的雨傘節個體則可能是較敏感且只有偶而能自行進食，需人為嘗試誘食以增加其進食量。請見期末報告討論章節。
2	有關蛋白質成分分析可以以體重無法持續增加的個體去進行比較，了解體重是否也會影響蛇毒蛋白活性。	謝謝委員指導。體重減少的鎖鏈蛇(Dr324)之蛇毒有進行實驗檢測，已核對過其蛇毒蛋白組成或活性，但並無明顯偏離其他個體者(請見期末報告討論章節)。欲探討”體重無法持續增加的個體是否影響蛇毒蛋白活性”，仍需較多的樣本數進行驗證。

疾病管制署 107 年度科技研究發展計畫

期中報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000118

計畫名稱：不同飼養時期之鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒蛋白安定性評估計畫

委員三

順序	審查意見	答復說明
1	工作進度執行如預期，內容確實。	謝謝委員指導與肯定。
2	報告中進行分析，其中各圖所代表的意義、變化，請於內文中概略再說明。	謝謝委員指導。已於期末報告內文中說明各圖表的意義或進行討論。
3	鎖鏈蛇幼蛇及雨傘節蛇毒量較少問題，請問如何因應？請於期末報告中再詳細補充。	謝謝委員指導。鎖鏈蛇幼蛇及雨傘節蛇毒量較少，但仍可完成主要的實驗因子檢測與比較。若有足夠多的蛇隻可採毒，則可考量合併多隻蛇的蛇毒液以累積足夠毒液量。請見期末報告討論章節。

疾病管制署 107 年度科技研究發展計畫

期末報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000118

計畫名稱：不同飼養時期之鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒蛋白安定性評估計畫

委員一

順序	審查意見	答復說明
1	計畫主持人依約完成工作項目，與預期進度相符。	謝謝委員指導與肯定。
2	成果為鎖鏈蛇或雨傘節蛇毒毒力、成份及酵素活性不因飼養時間或年齡而不同，因而有一定程度不變性，其對未來具體應用為何及延伸探討為何，建議可多著墨。	謝謝委員指導。已於第 27, 28 頁中加入建議未來具體應用及延伸探討之描述。
3	報告最後建議未來可以探討更長飼養時間(例如大於 5 年)云云，是否有任何文獻或此次研究結果所暗示或顯示的嗎？否則只像任意提出之研究方向，而無科學基礎。	謝謝委員指導。由於目前計畫中所比較的蛇毒來自飼養期間未超過 2 年的毒蛇，若將結果延伸至更長飼養時間者，可能有適用的問題。因為延伸結果超過計畫之飼養時間以外，屬於外插法的論證，而不能完全保證同樣結果亦能套用符合。這樣的論述並非研究結果有所暗示或顯示。

疾病管制署 107 年度科技研究發展計畫

期末報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000118

計畫名稱：不同飼養時期之鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒蛋白安定性評估計畫

委員二

順序	審查意見	答復說明
1	建立各種指標來分析飼養期間蛇毒安定性的變化，的確對本署製造抗蛇毒血清的基本原料—蛇毒管控有很好的工具，且能增進品質。	謝謝委員指導與肯定。
2	有關液相層析的圖譜似乎有改善的空間，可試著不經過 trypsin 的作用。請參考(1) J. Proteomics, 2012 Oct 22; 75(8): 5628-45 for (龜殼花). (2) Trop. Med. Infec. Dis. 2018 Jun 15; 3(2) for 鎖鏈蛇。	謝謝委員指導。已於第 26 頁加入相關討論：本研究的 LC-MS/MS 分析是在進行 trypsin 作用之後進行(參考 Risch et al., 2009; Sharma et al., 2015; Tan et al., 2015; Ziganshin et al., 2015; Mukherjee et al., 2016; Shan et al., 2016)；然而，Villalta et al. (2012)及 Sanz et al. (2018)進行台灣鎖鏈蛇、龜殼花、赤尾青竹絲蛇毒蛋白質體分析時，並不經過 trypsin 的作用來進行的。後續的實驗可將蛇毒樣本不經過 trypsin 作用而進行 LC-MS/MS 分析，以利於與相關文獻研究做比較。

疾病管制署 107 年度科技研究發展計畫

期末報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW107-CDC-C-114-000118

計畫名稱：不同飼養時期之鎖鏈蛇及雨傘節蛇毒蛋白安定性評估計畫

委員三

順序	審查意見	答復說明
1	本計畫飼養鎖鏈蛇幼蛇可以快速增加体重，且成蛇和幼蛇蛇毒毒性比較，將有助瞭解抗蛇毒血清療效，另雨傘節成蛇和幼蛇毒性比較，建議後續可進行分析或蒐集文獻紀錄。	謝謝委員指導與肯定。已於第 27, 28 頁中加入後續探討比較雨傘節成蛇和幼蛇毒性之描述。
2	不同地理區蛇毒蛋白質成份之比較，建議將雨傘節蛇分布於中、北部地區蛇毒納入比較分析。	謝謝委員指導。已於第 27, 28 頁中加入後續探討比較不同地理區蛇毒蛋白質成份之描述。
3	本計畫工作進度、項目均已如預期執行，成效良好。	謝謝委員指導與肯定。