

計畫編號：DOH96-DC-1022

行政院衛生署疾病管制局 97 年度科技研究發展計畫

提升馬匹抗龜殼花蛇毒血清效價之研究

研究報告

執行機構：中臺科技大學生命科學研究所

計畫主持人：潘銘正

協同主持人：廖明一、楊敏瑜、林春福、吳正男、李憲明

執行期間：97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

目次

中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	5
材料與方法.....	7
結果.....	10
討論.....	15
結論與建議.....	16
計畫重要研究成果及具體建議.....	17
參考文獻.....	19

圖次

圖一、龜殼花蛇毒蛋白質之陽離子交換樹脂層析圖譜.....	21
圖二、AGID 測試結果.....	22
圖三、馬匹血清與粗毒之 ELISA 測試結果.....	23
圖四、馬匹血清與 Part. C 之 ELISA 測試結果.....	24
圖五、馬匹血清與 Fraction IX 之 ELISA 測試結果.....	25
圖六、血液培養基之中和試驗.....	26
圖七、馬匹的白血球數目變化.....	27
圖八、第一階段免疫後馬匹週邊循環白血球中細胞激素之表現量變化.....	28
圖九、第二階段免疫後馬匹週邊循環白血球中細胞激素之表現量變化.....	29
圖十、三種不同免疫策略對細胞激素產生之影響.....	30

表次

表一、龜殼花蛇毒初步純化後各個 Fraction 之毒性分析.....	31
-------------------------------------	----

表二、馬匹資料.....	32
表三、第一階段馬匹免疫模式.....	33
表四、馬匹血清之中和力價(第一階段).....	34
表五、第二階段馬匹免疫模式.....	35
表六、馬匹血清之中和力價(第二階段).....	36

摘 要

龜殼花抗毒血清是台灣需求量最高之抗蛇毒血清，每年須供應 3000 餘劑。此外，龜殼花抗毒血清之製備，亦是目前台灣各類抗蛇毒血清中，最難產製者。本計畫之目標即在改良龜殼花抗毒血清之生產，以確保抗毒血清之穩定供應，保障國人之生命安全。經由初步的免疫分析顯示，龜殼花之蛇毒抗原成分可能太過複雜，以致於馬匹免疫後，無法有效地針對毒性蛋白產生專一性的抗體，導致部分馬匹的中和力價無法提升。因此本計畫利用陽離子交換樹脂，純化龜殼花蛇毒之毒性蛋白，再取其中毒性較高之 Part. C 與非溶血性 Fraction IX 進行馬匹免疫，觀察其中和力價的變化。在免疫的過程中，亦同時針對馬匹進行寄生蟲、血液生化值、血球數等各項健康指標進行監測，以避免其他因素導致馬匹對蛇毒抗原免疫不良之情形發生，並藉由細胞激素的 PCR 半定量檢測，做為早期篩檢馬匹免疫效力之依據。此外，本計畫亦建立 ELISA、AGID 以及血液培養基之中和試驗等免疫測定方式，可在馬匹的免疫過程中，有效及快速地監測馬匹血清的抗體力價變化，以提昇檢測的效率，減輕現場人員的工作負擔。

關鍵詞：龜殼花、陽離子交換樹脂、中和力價、ELISA、AGID

Abstract

Trimeresurus mucroquamatus antivenin is the one of difficult produce in all of the antivenin in Taiwan, but it is the highest necessary in Taiwan at least for 3000 doses per year. The goal of this project is to find good procedure to produce high titer anti-*T. mucroquamatus* venom for stable supplies the antivenin to protect the Taiwan people's safety of life. The preliminary data shown the horse immunized the whole snake venoms could not promote the neutralization titer was the reason of complexity of venom too interfere the immune system of horse to recognized the toxic proteins. Therefore, we use cationic-ion exchange chromatography to purify the toxic proteins of *T. mucroquamatus* venom for immunize the horse with higher toxic hemolytic Part. C and non-hemolytic Fraction IX then monitor the neutralization titer activity. We also measure the horse healthy condition concerning with parasites, blood biochemical value, and blood total cell numbers for understanding these side effects whether influence horse immune response to purify toxic proteins of venom. In addition, the expressions of cytokines were analyzed by semi-quantitative PCR to monitor the horse immune response. Furthermore, we establish the ELISA, AGID and blood neutralization assays to determine the titer of venom in a more efficient way.

Key Words: *T. mucroquamatus*, cationic-exchange chromatography, neutralization titer, ELISA, AGID

前 言

我國自民國九十年起全面實施週休二日以來,國人從事休閒旅遊活動已愈來愈興盛,人們愈接近大自然便有更多的機會和周遭的動植物接觸,因此被毒蛇咬到的機會也隨之增加。目前國內醫學對於毒蛇咬傷,所採取的解救措施均以注射抗蛇毒血清來中和蛇毒抗原,而目前國內主要以血清疫苗研製中心來製作抗蛇毒血清,由於目前國內尚缺乏可用於鑑別病患被何種毒蛇咬傷之檢驗試劑,故多以製造混合之多力價抗蛇毒血清來施打病患,因此,各種抗蛇毒血清之製備,對於其中和力價之品質要求便顯得十分重要 (Lalloo *et al.*, 2003; Hodgson *et al.*, 2006; Winkel *et al.*, 2006)。

目前國內抗蛇毒血清之製備主要將蛇毒不活化後,採多次免疫的方式注射馬匹,由於蛇毒毒液成分複雜,非單一一種抗原,注射馬匹後極可能出現馬匹之中和力價不夠高之情形,而徒勞無功,嚴重影響各種蛇毒血清之製備,最終可能面臨抗蛇毒血清製劑不足之情形,對於人們生命安全將構成嚴重之威脅。因此對於蛇毒中能有效引起馬匹產生中和力價之抗原的分析、蛇毒有效抗原之 QC、中和力價體外快速檢測平台之建立、馬匹對於蛇毒免疫反應效能之早期篩檢及馬匹之蛇毒免疫注射策略之改進等等,均需逐一研究以解決即將面臨之困境。

由於龜殼花之蛇毒抗原成分相當複雜,其抗出血性蛇毒血清與抗赤尾鮫蛇毒血清一樣,是台灣需求量最高之抗蛇毒血清,每年須供應 3000 餘劑,然而其中抗龜殼花蛇毒馬血清之免疫產製,亦是目前台灣各類抗蛇毒血清中,最難生產者,生產過程中稍有不順利,即可能導致台灣地區面臨抗出血性蛇毒血清缺貨之危機,因此期藉由此計畫建立更有效之龜殼花蛇毒抗原檢定系統及抗龜殼花蛇毒血清效價檢定系

統，並進一步改良抗龜殼花蛇毒馬血漿免疫技術及研發快速檢定技術，期未來能應用於生產過程，俾穩定供應國內所需血清，以維護國人生命安全。

材料與方法

龜殼花蛇毒蛋白質之陽離子交換樹脂層析

HiPrep 16/10 CM FF 管柱先以 buffer A 平衡後，注入 5 mL 蛇毒蛋白 (20 mg/mL)，再以 40 mL 的 buffer A 沖洗 (20 mM Tris, pH 7.4; 10 mM NaCl) unbound proteins，結合於管柱上的蛋白最後以鹽類梯度沖出；鹽類梯度以 100 mL 的體積將高鹽之 buffer B (20 mM Tris, pH 7.4; 1 M NaCl) 濃度由 0% 提升至 100%。管柱流速為 0.5 mL/min，每管收集 2 mL。

經由陽離子交換樹脂層析所收集之樣品，分別以動物毒性測試、細胞毒性試驗或血液培養基之溶血試驗進行測試，收集具有毒性的部份 (Xu *et al.*, 1999; Mebs *et al.*, 2006; Wang, 2007)。

血液培養基之中和試驗

將馬匹血清的系列稀釋 5 μ L 與等體積的粗毒 (0.625 mg/ml) 混合後反應 1 小時後，加入血液培養基中，24 小時後觀察溶血圈的直徑，若溶血圈的直徑小於 3 mm，則判定為陽性。出現陽性結果的最高血清稀釋倍率即為該抗體的中和力價。

ELISA 試驗

龜殼花蛇毒 (粗毒或純化毒之 Part. C 與 fraction IX) 以 PBS 緩衝液 (1.47 mM KH_2PO_4 ; 7.7 mM Na_2HPO_4 ; 2.7 mM KCl; 137 mM NaCl) 透析後，將蛋白質濃度稀釋為 0.1 mg/mL，然後在 96 孔 ELISA plates (Reacti-BindTM amine-binding, maleic anhydride 96-well plates) 的各個 well 中加入 100 μ L 的蛇毒樣品 (0.1 mg/mL) 室溫靜置 1 小時，進行 coating

反應，再以 200 μ l 的 Wash buffer (10 mM Tris, pH 7.0; 300 mM NaCl; 0.05% Tween-20) 進行清洗，重複清洗四次。清洗後，每個 well 加入 200 μ l 的 Blocking buffer (10 mM Tris, pH 7.0; 300 mM NaCl; 5% skim milk) 在室溫下緩慢搖晃 (50 rpm) 1 小時，進行 blocking 反應，再以 200 μ l 的 Wash buffer 進行清洗，重複清洗四次。清洗後，加入 100 μ L 之 5000 倍稀釋馬匹血清 (以 Blocking buffer 稀釋) 在室溫下搖晃 (100 rpm) 1 小時，再以 200 μ l 的 Wash buffer 進行清洗，重複清洗四次。清洗後，加入 100 μ L 之 1000 倍稀釋 anti-horse IgG peroxidase conjugate (以 Blocking buffer 稀釋) 在室溫下搖晃 (100 rpm) 1 小時，再以 200 μ l 的 Wash buffer 進行清洗，重複清洗四次。經清洗後加入 100 μ L 之 ABTS 受質呈色，再以 ELISA reader 測定 OD₄₀₅ 的吸光值。

寄生蟲蟲卵檢查

試驗採用浮游法及馬糞直接檢查等方式進行，主要在每次進行馬匹免疫後，以手伸入肛門採集部分糞便，將馬匹之糞便取定量加入飽和食鹽水至滿出液面，靜置 30 分鐘後，以蓋玻片沾取液面，置於載玻片上於顯微鏡下觀察有無寄生蟲蟲卵。另取少量糞便直接加上生理鹽水，置於載玻片後鏡檢。

血液生化值

為監測馬匹的健康情形，以避免其他因素導致馬匹對蛇毒抗原免疫不良之情形發生，故進行各試驗馬匹的血液生化值測定。測定項目包括：ALB, ALKP, ALT, AMYL, BUN, Ca, CHOL, CREA, GLU, PHOS, TBIL, TP, GLOB, HCT, HGB, MCHC, WBC, GRANS, L/M, PLT 等項目，以瞭解馬匹的健康狀態(Angulo *et al.*, 1997)。

細胞激素分析

本試驗將採用細胞激素分析 (Cytokine assay) 進行馬匹免疫後之細胞激素變化之偵測。此方法可快速反應出抗原對馬匹免疫機制的影響，故本計劃透過細胞激素 mRNA 的變化量來評估體液性免疫與細胞性免疫的變化。於免疫後的特定時間點收集含抗凝劑之全血，以 1500g 離心 5 分鐘，將 buffy coat 取出，以 TRIZOL RNA 萃取試劑組分離出 RNA，並以隨機引子進行反轉錄，將 RNA 轉為 cDNA 後進行細胞激素的分析。細胞激素的分析採用 RT-PCR 方式進行，首先由 Genbank 中搜尋出來自馬之 IL-4、IL-12、IL-10、IFN- γ mRNA 序列，並設計出適當的引子如下表，同時以 β -actin 做為半定量之對照組：

	FORWARD primer	REVERSE primer	Size (bp)
IL-4	CAAAACGCTGAACAACCTCA	TTGAGGTTTCCTGTCCAGTCC	198
IL-10	CAAGCCTTGTCGGAGATGAT	GAAGGCACTCTTCACCTGCT	198
IL-12	CCTGCAATACCCCTGAAGAA	TGTCAGTGGACCAAATTCCA	201
IFN- γ	TTAACAGCAGCACCAGCAA	GCAGGCAGGATGACCACTAT	204

在 50 μ L 的反應物中加入下列反應物 5 μ L 10X PCR buffer, 0.2mM dNTP mix of each, 0.5 μ M forward primer 和 reverse primer, 1.25 u Taq DNA Polymerase, 以下列溫度條件進行 PCR 反應 (94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min., 56 $^{\circ}$ C 1 min., 72 $^{\circ}$ C 1.5 min., 25 cycles)，最後以 DNA 電泳後，將電泳結果以 β -actin 的產物濃度對照換算出細胞激素的相對量。

結 果

蛇毒純化與馬匹免疫

龜殼花之蛇毒抗原成分相當複雜，除毒性蛋白外，尚有其他多種不具毒性之蛋白成分，甚至在採集的過程中，會出現龜殼花口腔菌叢的汙染。目前部份馬匹免疫龜殼花蛇毒後，中和力價無法提升，可能肇因於所激發之免疫反應，是以不具毒性之蛋白成分或污染物為主，而無法針對毒性蛋白產生有效抗體，導致中和力價無法提升。針對此一可能性，本計畫利用陽離子交換樹脂進行龜殼花蛇毒之初步純化，先移除部份不具毒性的成分後，再收取毒性較高之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）進行馬匹免疫（圖一、表一），觀察成分較為單純之純化毒是否能有效提升馬匹之中和力價。本計畫已於上一年度先行針對舊有馬匹進行相關的免疫測試，所得的實驗數據有下列幾項：

- 一、以高中和力價之馬匹血清針對初步純化蛇毒進行西方墨點分析時，可於 Part. C（出血性）中偵測得明顯信號，Part. D（神經性）也可測得微弱信號。相較之下低中和力價之馬匹血清僅在 Part. C 測得微弱信號，而主要的訊號則出現於不具毒性之 Part. A 中。
- 二、AGID 的實驗結果與西方墨點分析的結果類似。針對 Part. C（出血性）高中和力價血清之免疫反應較低中和力價血清為佳；而針對不具毒性之 Part. A 則反之。
- 三、將龜殼花蛇毒經由陽離子交換樹脂純化後再進行免疫，可大幅提升舊有馬匹的中和力價；而施打蛇毒全抗原的馬匹，力價則無明顯變化。

上述舊有馬匹的實驗結果顯示龜殼花蛇毒之抗原成分可能太過複雜，

導致部分馬匹的中和力價無法提升。但上一年度所測試的舊有馬匹，皆為原有製程免疫後的馬匹，在實驗之前已免疫龜殼花及赤尾鮫之粗毒，且其力價低於生產標準之 60 田中單位。為排除其他因子的干擾，本年度則進一步針對新進馬匹，進行免疫測試，並比較不同免疫模式的差異。新進馬匹共七匹（表二），除了負對照之編號 331 馬匹外，其餘區分為三組：第 1 組免疫未純化之粗毒，試驗馬匹兩匹（馬匹編號為 328 及 329）；第 2 組免疫先免疫純化之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）4 次後，再施打粗毒，試驗馬匹兩匹（馬匹編號為 330 及 334）；第 3 組先免疫純化之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）2 次後，再施打粗毒，試驗馬匹兩匹（馬匹編號為 332 及 333）（表三）。試驗馬匹每二週免疫一次，逐次提高劑量，並於第一次免疫後，每隔二週採取少量血清，採取少量血清測試其中和力價（表四）。免疫後各馬匹之力價均有明顯上升，但組別間並無明顯差異，大部分馬匹之力價介於 40~60 田中單位之間，僅有第 3 組（先施打純化毒 2 次，再施打粗毒）編號 333 的馬匹到達 60 田中單位（已達龜殼花抗蛇毒血清之生產標準）。為了持續抗體的誘發，於上述的第一階段免疫結束後，間隔四週，再以粗毒進行第二階段的免疫。除了編號 330 已死亡的馬匹外，其餘各組馬匹皆以粗毒進行免疫，每二週免疫一次，並逐次提高劑量（表五）。第二階段免疫後，除原本已達生產標準之第 3 組編號 333 的馬匹外，第 1 組編號 329 馬匹之力價亦達 60 田中單位（表六）。在新馬的兩階段免疫過程中，免疫粗毒與純化毒的組別間並無顯著差異，顯示免疫原對於馬匹抗龜殼花蛇毒血清效價的影響並不顯著。

馬匹血清之力價監測

為監測馬匹血清的抗體力價變化，本計畫使用 ELISA、AGID 以及血液

培養基之中和試驗等三種方法針對第一階段的馬匹血清進行測定。

一、AGID 試驗

AGID 的實驗也顯示所有實驗馬匹均具有正常的免疫能力，除了負對照組之未免疫馬匹（編號 331）外，其餘各組馬匹於第四次免疫後，其血清皆可與 Part. C（出血性）產生明顯的沉澱線，並有逐次增高的趨勢（圖二）。針對 Part. C（出血性）的 AGID 結果，在不同處理的各組馬匹之間並無明顯的差異，僅有編號 334 的馬匹訊號較為微弱（圖二）。各組馬匹針對 Part. B 所產生的反應則隨免疫模式的不同而有所差異，其中免疫粗毒之馬匹（編號 328 與 329）以及先施打純化毒 2 次，再免疫粗毒之馬匹（編號 332 與 333），分別由第一次免疫及第三次免疫即開始接觸粗毒中的 Part. B 抗原，所以免疫四次後的血清即可與 Part. B 產生沉澱線，第六次免疫後的訊號則更為明顯；第 2 組之馬匹（編號 330）於第五次免疫才開始接觸粗毒中的 Part. B 抗原，所以第四次免疫後的血清僅出現微弱的交叉反應信號，要到第六次免疫後的血清才出現明顯的信號（圖二）。針對 Part. A 的部份，僅有第六次免疫後的 332 馬匹血清（中和力價小於 20 田中單位）可與 Part. A 抗原產生明顯的沉澱線，其他馬匹不論力價高低皆無訊號出現（圖二），此一結果顯示 Part. A 的反應強弱與中和力價之間並無直接的關聯性。至於 Part. D 的部份，各組馬匹皆無明顯信號產生（圖二）。

二、ELISA 試驗

由馬匹血清與粗毒之 ELISA 結果顯示，所有實驗馬匹均具正常的免疫能力，除負對照組之未免疫馬匹外，其餘各組馬匹於免疫後，抗體的結合力價皆有明顯的上升（圖三）。接續於粗毒之測試後，則分別利用純化毒之 Part. C（出血性毒）及 Fraction IX（神經性毒）針對馬匹

血清進行測定。Part. C 之 ELISA 結果與粗毒一致，且其趨勢與小鼠之中和力價測試吻合，中和力價較高之血清其 ELISA 訊號也隨之增強。依據此一趨勢，未來可利用 ELISA 的方式進行快速的檢測，監測血清力價的變化（圖四）。Fraction IX 的測試亦呈現力價逐次增高的趨勢，但其數值與中和力價較不吻合（圖五）。

三、血液培養基之中和試驗

上述的 ELISA 實驗與 AGID 實驗僅能偵測抗體與抗原的結合能力，並無法直接反應中和力價的高低。因此，本計畫利用血液培養基，建立簡便的體外分析方法，以測定中和力價的高低。首先將馬匹血清經由系列稀釋後，與等體積的粗毒混合反應，然後加入血液培養基中，觀察溶血圈的直徑，以判定其中和力價。血液培養基之中和試驗結果顯示，各組馬匹於免疫後，其中和力價均有明顯的提升，其中以編號 333 及 329 的馬匹力價較高，此一結果與小鼠之中和力價試驗吻合（圖六）。

馬匹之健康監測

為監測馬匹的健康情形，以避免其他因素導致馬匹對蛇毒抗原免疫不良之情形發生，故進行馬匹的血液生化值測定，以瞭解馬匹的健康狀態。此外由於寄生蟲所誘發之寄生蟲免疫反應，將影響對蛇毒蛋白的特異性免疫發生，故此計劃亦同時監測寄生蟲對免疫的影響。由血液的檢測結果發現馬匹的白血球數目在免疫過程中會有起伏（圖七）。以第一接段的免疫為例，當白血球數目達到高峰的兩週後，中和力價亦隨之攀升至最高點（圖七、表四）。依據此一趨勢，未來可利用 ELISA 的方式進行快速的檢測，監測血清力價的變化。

細胞激素之影響評估

一、細胞激素整體變化量之分析

為有效了解馬匹經蛇毒蛋白免疫後，所誘發之免疫機轉，故針對 IL-4、IL-12、IFN- γ 等細胞激素之表現量進行分析。在第一階段的免疫過程中，於免疫 3 週後，除 332 馬匹外，各試驗組之細胞激素皆比未免疫之對照組(331)來的高，332 馬匹也顯示具較低之抗體力價（圖八）。類似的結果也出現在第 7 週與第 11 週之檢體中（圖八）。但在第二階段的免疫中，除 334 馬匹外，皆未明顯見到細胞激素的變化（圖九）。

二、不同免疫方式對細胞激素表現量之影響

本計劃利用不同免疫時程進行免疫，在免疫後 3 週時，第 1 組(全程給予全毒)相對於第 2 組(先免疫純化毒 4 次，再免疫全毒)與第 3 組(先免疫純化毒 2 次，再免疫全毒)具有較高的細胞激素表現量，尤其是 IFN- γ （圖八），此結果可能是因為未純化之全毒具有較多與複雜的抗原決定位，且部份成份或許具有特定之佐劑功效。不過在第 7 週後即未見明顯的差異（圖八）。

三、不同免疫方式對免疫機轉之影響

細胞激素 IL-4 可主導體內免疫系統趨向體液性免疫，並有助中和性抗體產生，各馬匹之 IL4 分析結果相對於對照組皆沒有明顯的提昇，反而是在主導細胞性免疫反應的 INF- γ 部份在免疫初期即大幅上昇，是否因此影響中和性抗體的產生，可再深入探討。

討 論

為了快速檢定馬匹血清的抗體力價，本計畫建立 ELISA 的檢測平台。以馬匹血清與純化毒 Part. C 所進行的 ELISA 分析顯示，ELISA 的信號與中和力價之變化趨勢吻合，中和力價較高之血清其 ELISA 訊號也隨之增強。依據此一趨勢，未來可利用 ELISA 的方式進行快速的檢測，監測血清力價的變化。

目前中和力價之檢測，皆是利用小鼠進行測試。此一試驗為抗毒血清的標準檢測方法，但操作較為耗時、繁瑣，必須犧牲一定數目的小鼠。因此本計畫以血液培養基之中和試驗，建立一個較為快速、簡易的方式。利用血液培養基之中和試驗可先行初步的篩選，剔除力價較低的樣品，後續僅須針對力價明顯提升的樣品，進行小鼠的中和力價檢定。如此可減少許多不必要的操作、減輕現場人員的工作負擔以及避免小鼠的無謂犧牲。

由血液的檢測結果發現馬匹的白血球數目及顆粒球數目在免疫過程中會有起伏。當白血球數目及顆粒球數目達到高峰的兩週後，中和力價亦隨之攀升至最高點。依據此一關聯性，未來可將白血球的數目做為指標，監測力價的變化。

由於此次之 cytokine 分析方法並非僅對於蛇毒部份進行專一性分析，故馬匹健康狀況與各類感染的發生，會造成 cytokine 整體表現量的提升，此現象同時可在未免疫蛇毒馬匹(NO. 331)的細胞激素表現量中觀察到。第一階段免疫完成後，各組馬匹的細胞激素表現量均比正控制組(抗蛇毒血清量產中馬匹 319)為低，此現象或許可說明為何中和抗體力價均比編號 319 馬匹不良(圖十)。三種免疫策略所產生之中和抗體力價與細胞激素的變化似乎無明顯關聯性(圖十)。

結論與建議

1. 免疫粗毒與純化毒的組別間並無顯著差異，顯示免疫原對於馬匹抗龜殼花蛇毒血清效價的影響不顯著。建議未來可針對馬匹的品系及不活化劑進行探討。
2. 馬匹血清與純化毒 Part. C 所進行的 ELISA 分析顯示，ELISA 的信號與中和力價之變化趨勢吻合，中和力價較高之血清其 ELISA 訊號也隨之增強。依據此一趨勢，馬匹血清與純化毒 Part. C 之 ELISA 分析可以做為馬匹免疫是否成功之早期診斷指標。但由於 ELISA 分析所需之蛇毒蛋白取得不易，幾乎已全用於馬匹免疫之用，故在 ELISA 中無法進行大量之最終稀釋濃度及最高靈敏度分析，因此做為抗蛇毒血清生產指標之 ELISA 標準操作流程(SOP)，將有待足量之蛇毒蛋白提供來加以進行，同時也可確認本試驗方法的靈敏度與檢測範圍。

97 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：提升馬匹抗龜殼花蛇毒血清效價之研究

主持人：潘銘正 計畫編號：DOH96-DC-1022

1. 計畫之新發現或新發明

(1). 馬匹清之 ELISA 檢測

為了快速檢定馬匹血清的抗體力價，本計畫建立 ELISA 的檢測平台。以馬匹血清與純化毒 Part. C 所進行的 ELISA 分析顯示，ELISA 的信號與中和力價之變化趨勢吻合，中和力價較高之血清其 ELISA 訊號也隨之增強。依據此一趨勢，未來可利用 ELISA 的方式進行快速的檢測，監測血清力價的變化。

(2). 血液培養基之中和試驗

目前中和力價之檢測，皆是利用小鼠進行測試。此一試驗為抗毒血清的標準檢測方法，但操作較為耗時、繁瑣，必須犧牲一定數目的小鼠。因此本計畫以血液培養基之中和試驗，建立一個較為快速、簡易的方式。利用血液培養基之中和試驗可先行初步的篩選，剔除力價較低的樣品，後續僅須針對力價明顯提升的樣品，進行小鼠的中和力價檢定。如此可減少許多不必要的操作、減輕現場人員的工作負擔以及避免小鼠的無謂犧牲。

(3). 白血球的數目變化與力價之關聯性

由血液的檢測結果發現馬匹的白血球數目及顆粒球數目在免疫過程中會有起伏。當白血球數目及顆粒球數目達到高峰的兩週後，中和力價亦隨

之攀升至最高點。依據此一關聯性，未來可將白血球的數目做為指標，監測力價的變化。

參考文獻

Angulo Y, Estrada R, Gutierrez JM. 1997. Clinical And Laboratory Alterations In Horses During Immunization With Snake Venoms For The Production Of Polyclonal (crotalinae) Antivenom. TOXICON. 35 : 81-90.

Hodgson WC, Wickramaratna JC. 2006. Snake venoms and their toxins: An Australian perspective Wayne C. Hodgson, Janith C. Wickramaratna. Toxicon. 48 : 931-940.

Laloo DG, David R, Theakston G. 2003. Snake Antivenoms. Journal of Toxicology Clinical Toxicology. 41 : 277-290.

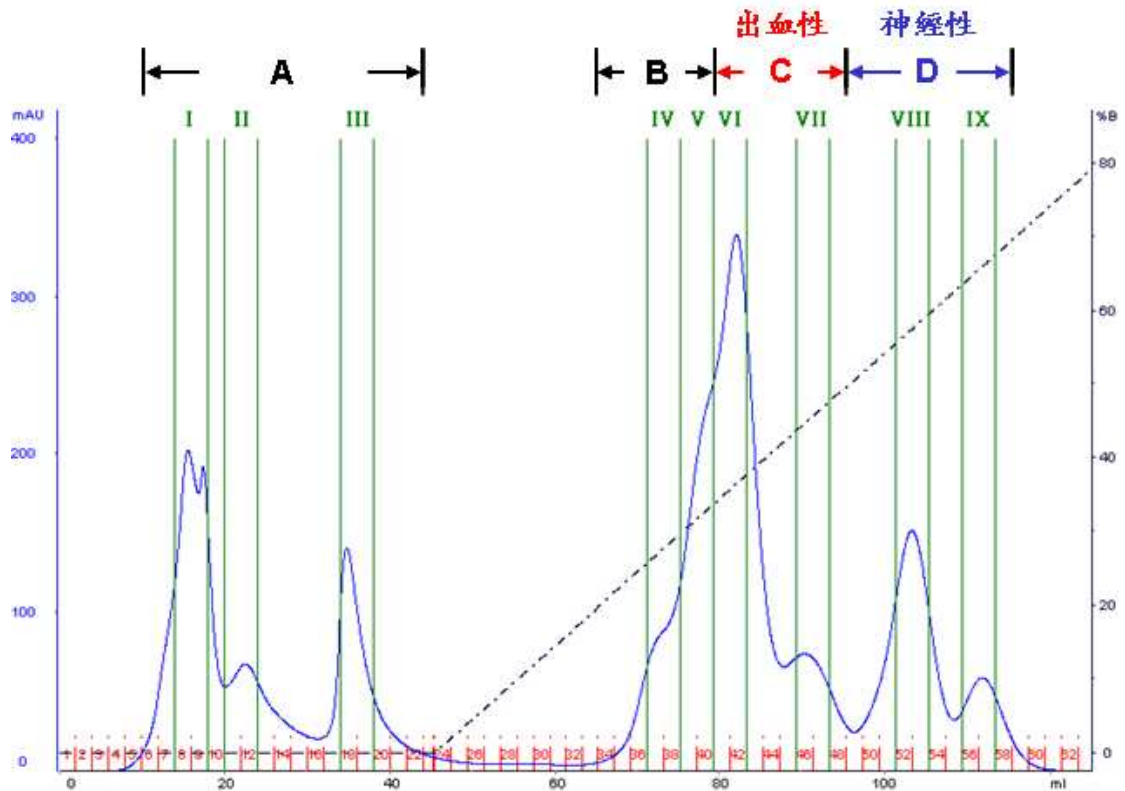
Mebs, D. Kuch, U. Coronas, F. I. Batista, C. V. Gumprecht, A. and Possani, L. D. 2006. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhaermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A2 myotoxin. Toxicon. 47(7):797-811.

Miao, B. L. Liao, M. Y. Huang, R. J. Chen, S. W. Chen, T. K., and Chang, S. C. 1990. Preparation of toxoid from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. Chinese Medical J. 46: 1-6.

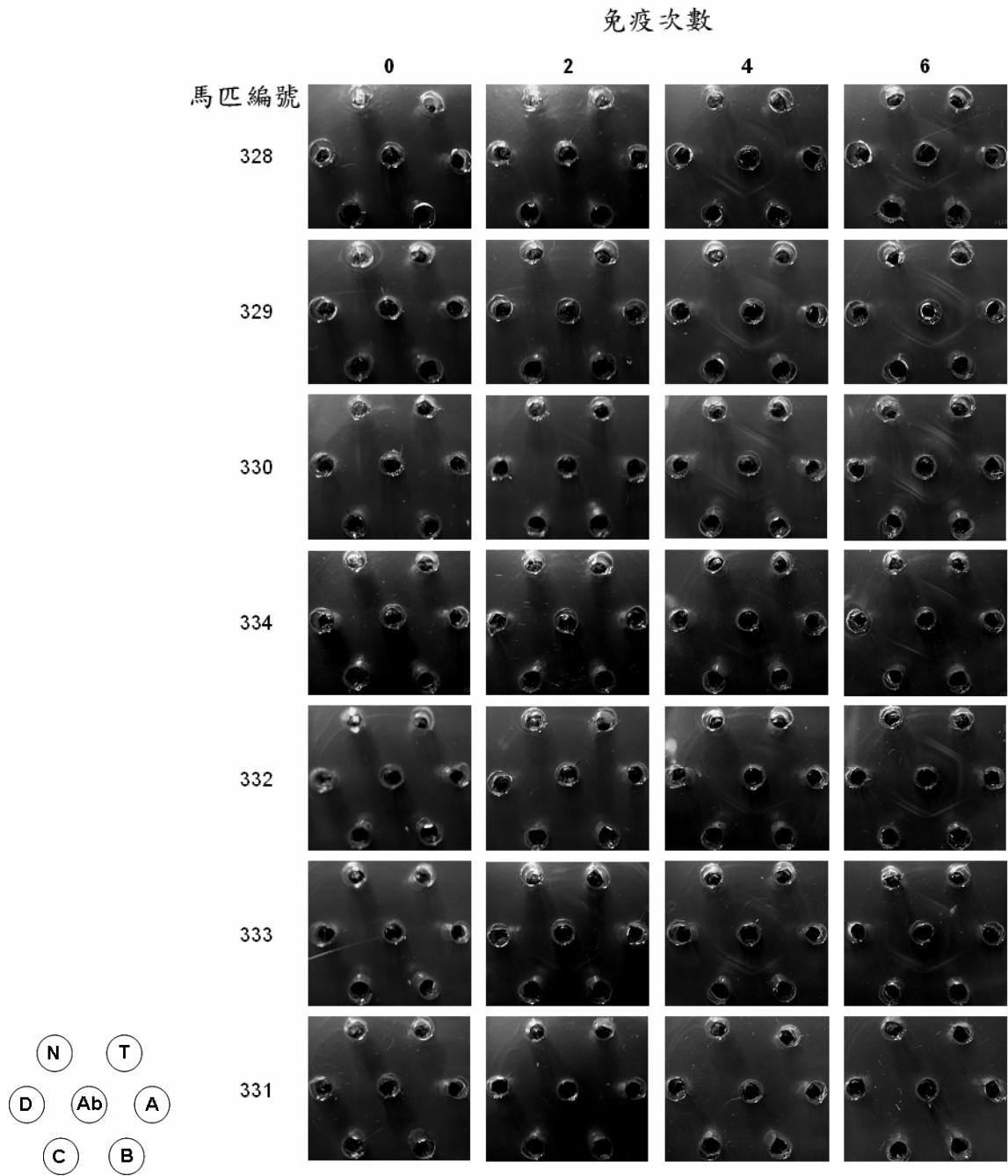
Wang WJ. 2007. Purification and functional characterization of AAV1, a novel P-III metalloproteinase, from Formosan *Agkistrodon acutus* venom. Biochimie. 89 : 105–115.

Winkel KD, Mirtschin P, Pearn J. 2006. Twentieth century toxinology and antivenom development in Australia. *Toxicon* 48. 738–754.

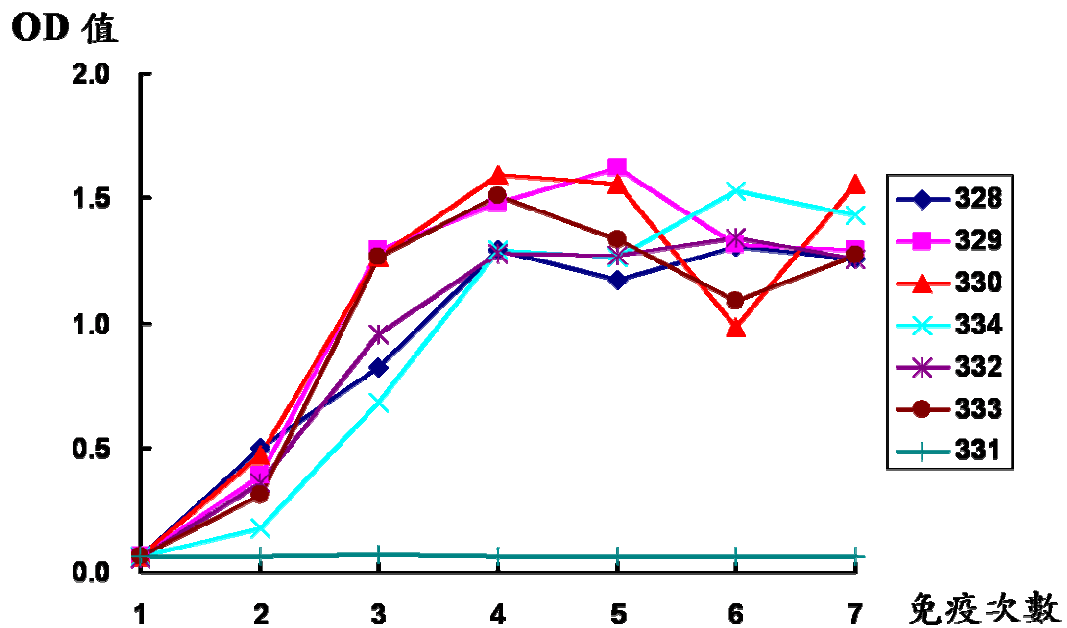
Xu, T. R. Wang, W. Y. Meng, Q. X. Huang, Y. H. Lu, Q. M. and Xiong, Y. L. 1999. A Novel Myotoxin from the Venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*. 31(5): 483-488.



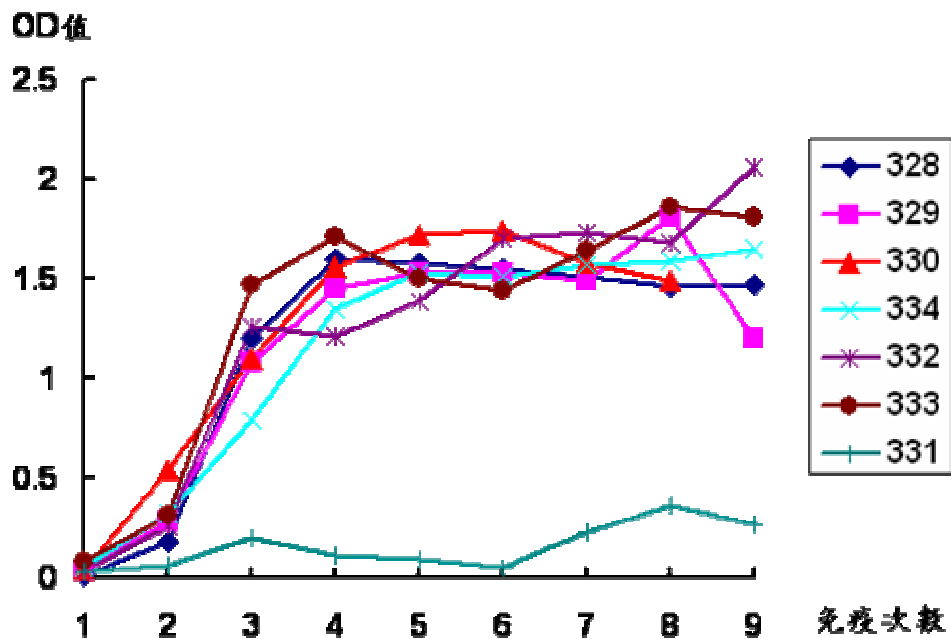
圖一、龜殼花蛇毒蛋白質之陽離子交換樹脂層析圖譜。HiPrep 16/10 CM FF 管柱先以 buffer A 平衡後，注入 5 ml 蛇毒蛋白(20 mg/ml)，再以 40 ml 的 buffer A 沖洗 unbound proteins，結合於管柱上的蛋白最後以鹽類梯度沖出；鹽類梯度以 100 ml 的體積將高鹽之 buffer B 濃度由 0% 提升至 100%。管柱流速為 0.5 ml/min，每管收集 2 ml。圖中羅馬數字為 Fraction number；為了後續操作的方便，進一步依據毒性的性質及強弱，將陽離子交換樹脂層析所收集之樣品區分為 4 個劃分 Part. A-D；橫座標上方數字為 tube number；下方數字為體積；左側縱座標為 OD₂₈₀ 之吸光值；右側縱座標為 Buffer B 之濃度(%)。Buffer A：20 mM Tris (pH 7.4), 10 mM NaCl；Buffer B：20 mM Tris (pH 7.4), 1 M NaCl。



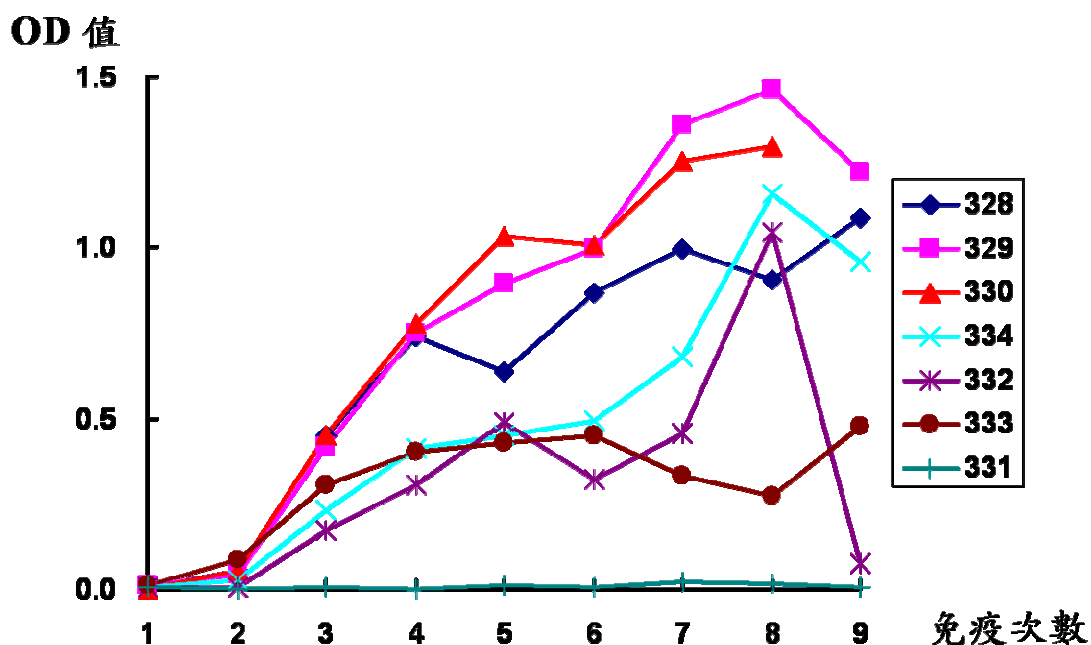
圖二、AGID 測試結果。T：未純化之粗毒；A, B, C, D 分別標示 4 個不同的劃分。N 代表陰性對照組。Ab 為馬血清。平板的成分為 0.8% Noble agar, 10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl。粗毒及 A、B、C、D 四個畫分的使用量為 100 $\mu\text{g}/\text{well}$ (加入 10 μl 濃度為 10 mg/ml 的樣品)；抗體的使用量則為 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ 。



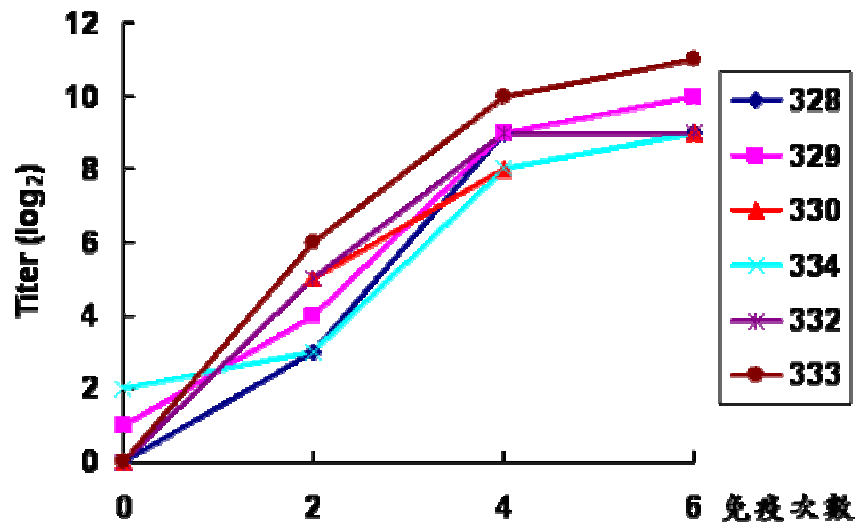
圖三、馬匹血清與粗毒之 ELISA 測試結果。編號 328 及 329 的馬匹施打未純化之粗毒；編號 330 及 334 的馬匹先施打純化之 Part. C (出血性) 與 Fraction IX (神經性) 四次後，再免疫粗獨；編號 332 及 333 的馬匹先施打純化之 Part. C (出血性) 及 Fraction IX (神經性) 兩次後，再以未純化之粗毒進行免疫；編號 331 的馬匹則為未免疫之負對照組。每個 well 以 10 μg 龜殼花粗毒進行 coating。所測試之馬匹血清為 5000 倍稀釋；anti-horse IgG peroxidase conjugate 則為 1000 倍稀釋。



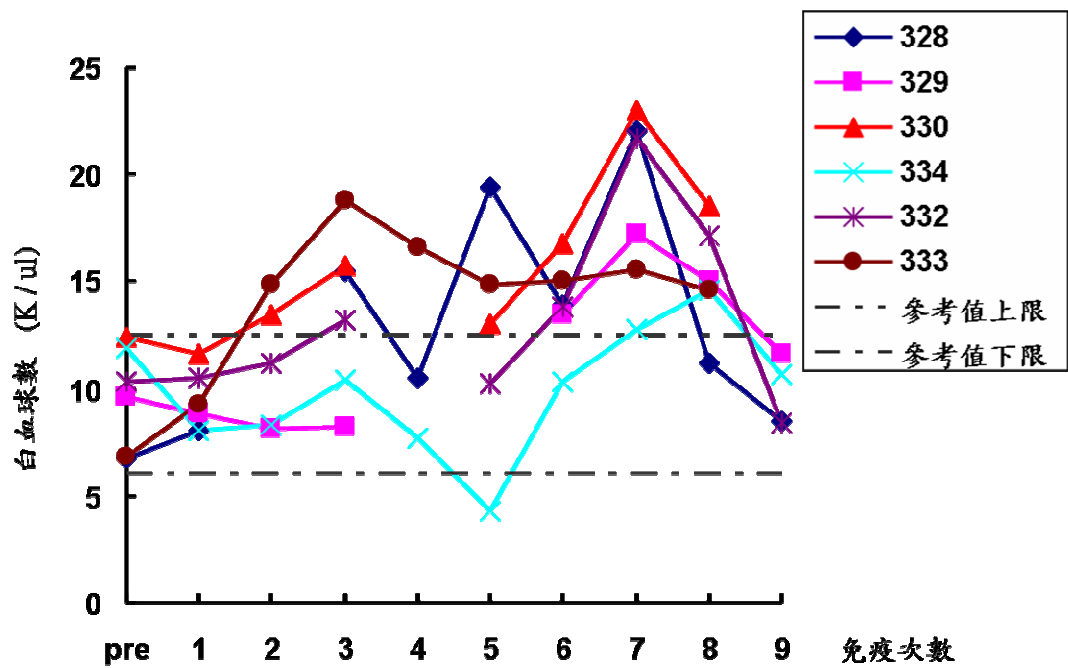
圖四、馬匹血清與 Part. C 之 ELISA 測試結果。編號 328 及 329 的馬匹施打未純化之粗毒；編號 330 及 334 的馬匹先施打純化之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）四次後，再免疫粗獨；編號 332 及 333 的馬匹先施打純化之 Part. C（出血性）及 Fraction IX（神經性）兩次後，再以未純化之粗毒進行免疫；編號 331 的馬匹則為未免疫之負對照組。每個 well 以 10 μ g Part. C 進行 coating。所測試之馬匹血清為 5000 倍稀釋；anti-horse IgG peroxidase conjugate 則為 1000 倍稀釋。



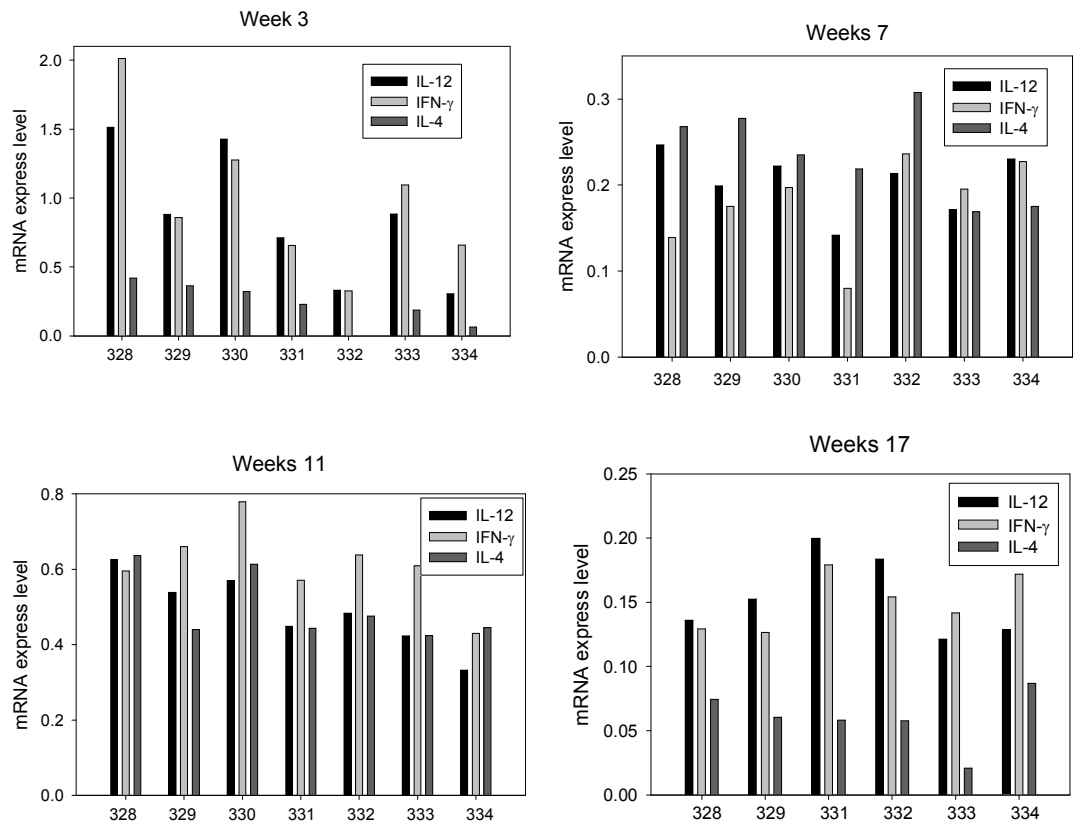
圖五、馬匹血清與 Fraction IX 之 ELISA 測試結果。編號 328 及 329 的馬匹施打未純化之粗毒；編號 330 及 334 的馬匹先施打純化之 Part. C (出血性) 與 Fraction IX (神經性) 四次後，再免疫粗獨；編號 332 及 333 的馬匹先施打純化之 Part. C (出血性) 及 Fraction IX (神經性) 兩次後，再以未純化之粗毒進行免疫；編號 331 的馬匹則為未免疫之負對照組。每個 well 以 10 μ g Fraction IX 進行 coating。所測試之馬匹血清為 5000 倍稀釋；anti-horse IgG peroxidase conjugate 則為 1000 倍稀釋。



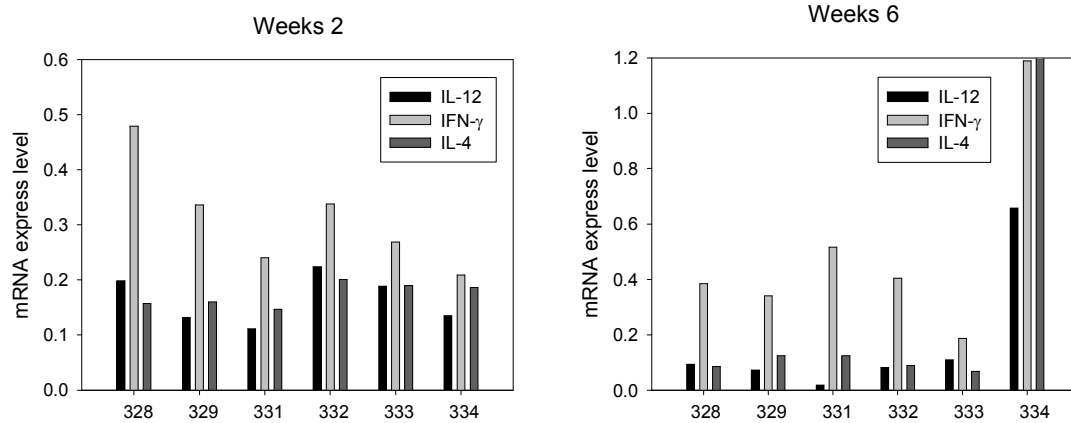
圖六、血液培養基之中和試驗。各組馬匹血清的系列稀釋液與粗毒反應 1 小時後，加入血液培養基中，24 小時後觀察溶血圈的直徑，若溶血圈的直徑小於 3 mm，則判定為陽性。



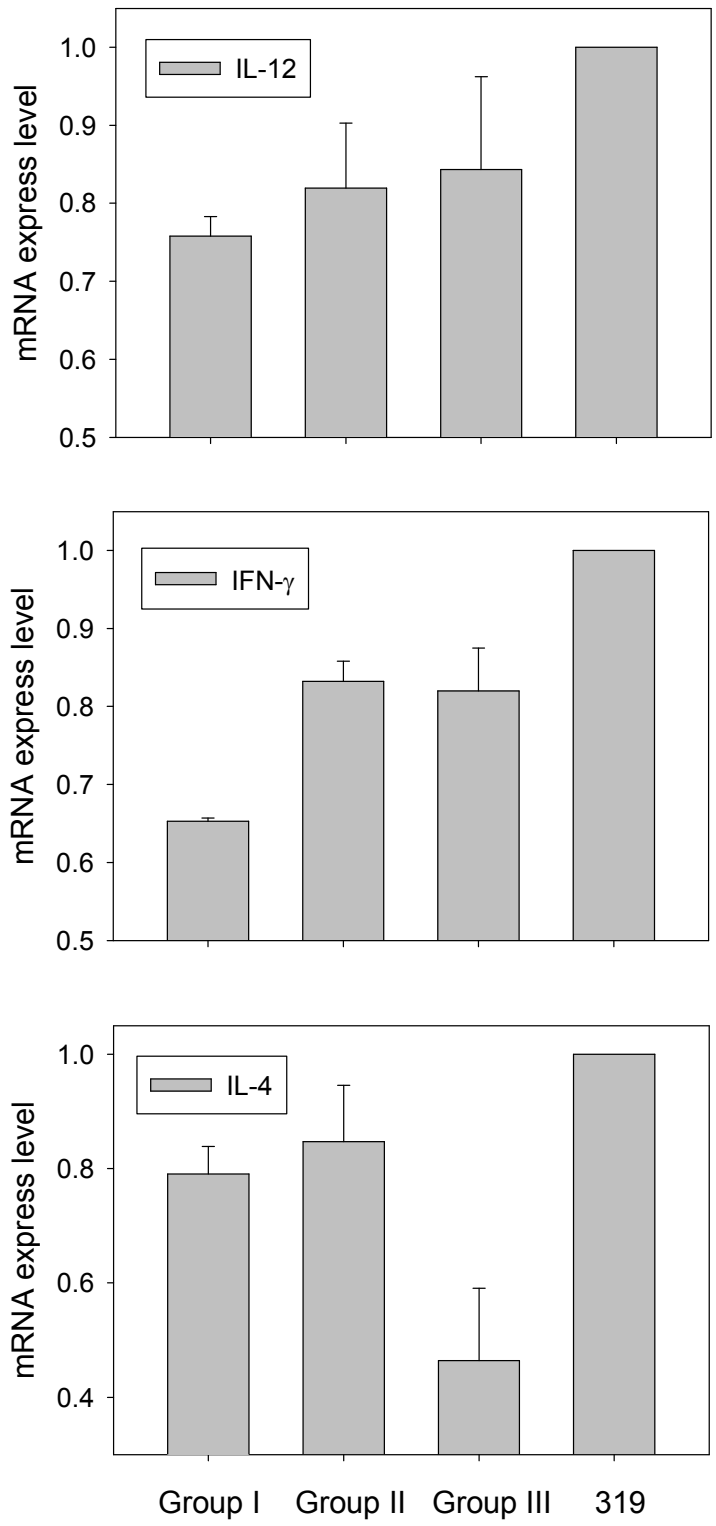
圖七、馬匹的白血球數目變化。



圖八、第一階段免疫後馬匹週邊循環白血球中細胞激素之表現量變化（圖中 mRNA 表現量為相對於 β -actin 之比值）。



圖九、第二階段免疫後馬匹週邊循環白血球中細胞激素之表現量變化（圖中 mRNA 表現量為相對於 β -actin 之比值）。



圖十、三種不同免疫策略對細胞激素產生之影響。

表一、龜殼花蛇毒初步純化後各個 Fraction 之毒性分析

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
溶血試驗	-	-	-	-	-	+	+	-	-
LD ₅₀ (μg / 0.2 ml)	ND	ND	ND	ND	133	21	60	91	28

羅馬數字為陽離子交換樹脂層析之 Fraction number。溶血試驗中的+號代表該樣品可產生溶血圈；-號則代表該樣品不會造成溶血。毒性分析中的 ND 代表該樣品不具毒性。

表二、馬匹資料

馬匹 組別	馬匹 編號	性別	結紮	品種	體重 (公斤)	年齡	來源
1	328	male	yes	APH	570	5-6 Y	USA
1	329	male	yes	APH	580	5-6 Y	USA
2	330	male	yes	QH	570	6 Y	USA
2	334	male	yes	Half Draft	660	4-5 Y	USA
3	332	male	yes	Spotted Draft	680	4-5 Y	USA
3	333	male	Yes	AQH	550	4-5 Y	USA
對照組	331	male	yes	AQH	560	5-6 Y	USA

APH: American Paint horse

AQH: American Quarter horse

QH: Quarter horse.

表三、第一階段馬匹免疫模式

馬匹組別	1			2		3	
	粗毒	粗毒	C	IX	粗毒	C	IX
第一次免疫	3 mg	-	5 mg	1 mg	-	5 mg	1 mg
第二次免疫	5 mg	-	10 mg	2 mg	-	10 mg	2 mg
第三次免疫	8 mg	-	15 mg	3 mg	8 mg	-	-
第四次免疫	12 mg	-	20 mg	4 mg	12 mg	-	-
第五次免疫	15 mg	15 mg	-	-	15 mg	-	-
第六次免疫	20 mg	20 mg	-	-	20 mg	-	-
第七次免疫	25 mg	25 mg	-	-	25 mg	-	-
第八次免疫	30 mg	30 mg	-	-	30 mg	-	-

試驗馬匹共分成 1-3 三組，其中第 1 組注射蛇毒全抗原；第 2 組免疫先免疫純化之 Part. C (出血性) 與 Fraction IX (神經性) 4 次後，再施打粗毒；第 3 組先免疫純化之 Part. C (出血性) 與 Fraction IX (神經性) 2 次後，再施打粗毒。試驗馬匹每二週免疫一次，免疫位置為背部，共 10 個點，每一位置注射 0.1 mL (免疫的抗原種類與劑量如表所示)。

表四、馬匹血清之中和力價（第一階段）

馬匹組別	1		2		3	
馬匹編號	328	329	330	334	332	333
免疫前力價	ND	ND	ND	ND	ND	ND
第一次免疫後力價	ND	ND	ND	ND	ND	ND
第二次免疫後力價	ND	ND	ND	ND	ND	ND
第三次免疫後力價	ND	ND	ND	ND	ND	ND
第四次免疫後力價	<20	20	20	20	<20	60
第五次免疫後力價	40	20	≤40	<20	<20	≤40
第六次免疫後力價	40	40	40	<20	<20	40
第七次免疫後力價	40	40	40	≤40	<40	<40
第八次免疫後力價	40-60	40-60	≤60	<40	40-60	≥60
第九次免疫後力價	≤40	≤60		≤40	<40	≤60

力價單位為田中單位

試驗馬匹共分成 1-3 三組，其中第 1 組注射蛇毒全抗原，馬匹編號 328 與 329；第 2 組免疫先免疫純化之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）4 次後，再施打粗毒，馬匹編號 330 與 334；第 3 組先免疫純化之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）2 次後，再施打粗毒，馬匹編號 332 與 333。

表五、第二階段馬匹免疫模式

馬匹組別	1	2	3
免疫抗原	粗毒	粗毒	粗毒
第一次免疫	10 mg	10 mg	10 mg
第二次免疫	12 mg	12 mg	12 mg
第三次免疫	15 mg	15 mg	15 mg
第四次免疫	20 mg	20 mg	20 mg
第五次免疫	25 mg	25 mg	25 mg

第二階段的免疫。除了編號 330 已死亡的馬匹外，其餘各組馬匹皆以粗毒進行免疫，每二週免疫一次，並逐次提高劑量。免疫位置為背部，共 10 個點，每一位置注射 0.1 mL（免疫的抗原種類與劑量如表所示）。

表六、馬匹血清之中和力價（第二階段）

馬匹組別	1		2	3	
馬匹編號	328	329	334	332	333
第一次免疫後力價	ND	ND	ND	ND	ND
第二次免疫後力價	ND	ND	ND	ND	ND
第三次免疫後力價	<40	40	<40	<40	<60
第四次免疫後力價	40	40	40	<40	40-60
第五次免疫後力價	≤40	≥60	40	<40	≥60

力價單位為田中單位

試驗馬匹共分成 1-3 三組，其中第 1 組注射蛇毒全抗原，馬匹編號 328 與 329；第 2 組免疫先免疫純化之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）4 次後，再施打粗毒，馬匹編號 334；第 3 組先免疫純化之 Part. C（出血性）與 Fraction IX（神經性）2 次後，再施打粗毒，馬匹編號 332 與 333。