

計畫編號：DOH100-DC-1017

行政院衛生署疾病管制局 100 年度科技研究發展計畫

從具有高效價抗蛇毒多株 IgY 抗體的雞隻製備單鏈變異區片段(scFv)單株抗體的研究

研究報告

執行機構：台北醫學大學醫學檢驗暨生物技術系

計畫主持人：楊沂淵

研究人員：梁孟慧、高沛詩

執行期間：100 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署
同意

目錄

	頁碼
目錄	(1)
中文摘要	(2)
英文摘要	(4)
前言	(6)
材料與方法	(12)
結果	(23)
計劃重要研究成果及具體建議	(27)
參考文獻	(28)
圖與表	(33)
審查意見回覆	(43)

中文摘要

關鍵詞：抗蛇毒抗體免疫治療；免疫球蛋白 Y；單鏈變異區片段 (single chain variable fragment; scFv) 抗體；噬菌體展現抗體技術

利用抗蛇毒血清進行免疫治療是目前治療毒蛇咬傷唯一有效的方法。抗蛇毒抗體通常是由收集注射過減毒蛇毒蛋白的動物血清所製備的。不過動物血清製品會對人體產生有害的副作用。為了減少副作用，近年來科學家發現一種新的由雞產生的抗蛇毒抗體 IgY 可以排除血清治療之副作用，並可以有效地製備只含有對蛇毒蛋白有特異性的抗體製劑。與傳統從哺乳類血清中取得抗體的方法比較之下，母雞提供了一種更合乎衛生、更節省成本、更方便以及更大量的多株抗體的來源。除了多株抗體外，具有高特異性與結合能力的單株抗體在很多科學領域中更有價值，目前製備單株抗體的方法主要是以融合瘤方法 (hybridoma) 與噬菌體展現抗體技術 (phage display antibody technology)。一旦抗蛇毒蛋白的單株抗體能夠經由抗體製造技術的巨大改進而產生出來，它們將成為一種更高特異性與更高品質的抗體。

我們先前的研究利用減毒的蛇毒蛋白免疫雞隻，以刺激高效價的抗蛇毒 IgY 多株抗體的產生，目前已經從這些被免疫的雞隻所生產的雞蛋中大量純化這些 IgY 抗體並經由 ELISA、Western blotting 確認對蛇毒蛋白的結合特異性，確認雞隻有很強的抗體反應。我們於本計畫中，將雞隻犧牲，並且利用由施打 MI 以及 MI/GI 的雞脾臟共建構四個具有高 titer 的噬菌體展示抗體基因庫 (phage display antibody libraries)。從這些建構好的抗體基因庫中，大量篩選以及定性一系列的單鏈變異區片段 scFv 單株抗體。從其中

一個噬菌體展示抗體基因庫，我們目前找到五個不同的細胞株，他們表現非常大量的重組 scFv 抗體。基因定序結果也顯示表現 scFv 單株抗體的基因也都是免疫球蛋白的重鏈與輕鏈變化區基因。其中四個 scFv 抗體只辨識 MI 蛇毒蛋白，而不會辨識 GI 蛇毒蛋白。此外，初步的實驗結果顯示，這四個 scFv 單株抗體也可以部分抑制 MI 蛇毒蛋白的溶血作用。這些 scFv 單株抗體以及特異性 IgY 多株抗體都可以用來發展龜殼花咬傷的快速檢驗試劑。

English abstract

keywords: anti-venom immunotherapy; immunoglobulin Y; single chain variable fragment (scFv) antibodies; phage display antibody technology

Anti-venom immunotherapy is the only effective treatment against snake venom poisoning. Anti-venoms are usually hyperimmune sera collected from animals which bind and inactivate venom components. Products of animal serum can produce adverse side effects such as anaphylactoid reactions and serum sickness. In order to reduce the side effects of the antsnake venom therapy it is essential to obtain antivenom in a sufficiently pure form. Recently, a new avian source of antivenom that precludes these complications and an efficient method for preparing antivenoms composed solely of venom specific antibodies are described. Hens therefore produce a more hygienic, cost efficient, convenient and a plentiful source of antibodies, as compared to traditional method of obtaining antibodies from mammalian serum. In addition to polyclonal antibodies, monoclonal antibodies with higher specificities and binding affinities are particularly of interest and value in many scientific fields. Once the monoclonal anti-venom antibodies could be generated through the tremendous improvement in antibody-making technologies such as phage display antibody technology, they will provide a better specificity and quality of antibodies. Accordingly, not only could the use of horse and cell culture to produce antibodies be avoided, but the cost-effectiveness and high quality of antibody products could be achieved.

We previously immunized the chickens with inactivated snake venoms to elicit high titers of polyclonal anti-venom IgY antibodies, which have been quantitatively purified from the eggs laid by the immunized chickens. The purity of these polyclonal IgY antibodies are high as demonstrated by a major protein band with a molecular weight of 180 Kd on Coomassie blue stained SDS-PAGE.

Their binding specificity to venom proteins are in the process of being characterized and verified. Once a strong humoral IgY response is elicited and confirmed, these immunized chickens were sacrificed and their antigen-stimulated spleens were used for antibody library construction. In the present study, we continued the previous study to quantitatively screen and characterize a panel of monoclonal single chain variable fragment (scFv) antibodies from these established antibody libraries. Several scFv antibodies specifically recognized MI venom protein but not GI as shown by ELISA and Western blot analysis. Further, they exhibited partial neutralization activity against MI venom toxicity on RBC and mice.

前言

毒蛇咬傷屬於急症，最有效的治療方式是注射正確的抗蛇毒血清。目前世界各國抗蛇毒血清之製造多以減毒性蛇毒免疫馬匹，經採血分離出血清，純化精製得之。由於蛇毒具有地域性，以致不同地區之蛇毒有不同的抗原性(antigenic variation)，故抗蛇毒抗體往往由當地自行生產。目前本局利用各種減毒過的蛇毒免疫馬匹後，經採血及硫酸銨鹽沈澱精製等步驟，已生產四種抗蛇毒血清產品，分別為：(1)出血性抗蛇毒血清，可抗龜殼花及赤尾青竹絲，(2)神經性抗蛇毒血清，可抗雨傘節及飯匙倩，(3)抗百步蛇毒血清，(4)抗鎖鏈蛇毒血清，其中抗鎖鏈蛇毒血清產品今年已成功取得藥政處核發製造許可證明書。

毒蛇咬傷的臨床治療以使用的抗蛇毒血清最為有效。治療過程中，一旦馬血清蛋白(horse serum proteins)大量進入人體，經常誘發三種免疫副作用，即(1)補體反應(complement reaction)：馬免疫球蛋白之 Fc region 結合人體之補體受體所引發的發炎反應；(2)血清病(serum sickness)：大量的抗蛇毒血清蛋白誘發人體產生相對應抗體並形成複合物，而造成發炎、血管炎(vasculitis)、關節炎(arthritis)及腎炎(nephritis)等症狀；(3)過敏性休克(anaphylactic shock)：大量外來抗原引發人體 IgE 活化，造成呼吸衰竭等嚴重副作用[1,36]。另外目前生產抗蛇毒血清所使用馬匹需由國外進口，馬匹單價高，且需要寬闊場地進行飼養管理等工作，每年有關動物飼養相關費用約需新台幣 800 萬元，所以製造每一劑抗蛇毒血清成本至少新台幣 5700 元。且利用馬匹生產相關血清製劑過程需定期抽血，屬於侵入性的性質，在操作過程中對人員潛藏有極大的危險性。而實驗動物保育問題也日益受重視，因此開發符合經濟性、兼具安全性與有效性之新一代高效價抗蛇毒抗體有其重要性與必要性。

除了馬匹之外，羊亦是生產抗蛇毒血清的主要動物之一，因為照顧羊比馬匹容易且成本較低，但近來由於從羊身上發現傳染性海綿狀腦病愈來愈多，因此限制了其應用性。不僅哺乳類動物免疫抗原後，可產生相對應之抗體，自 1990 年代以來，已有學者成功從其它的脊椎動物如鴨、雞，被免疫抗原後，亦會產生抗體，除了可在血液中被檢測到外，這些抗體也會傳送到蛋的蛋黃部份，稱之為蛋黃免疫球蛋白(yolk immunoglobulins, IgY)，IgY 分子量約為 180 kDa，具有兩條輕鏈 (light chain) 與兩條重鏈 (heavy chain)，輕鏈分子量為 22-25 kDa，重鏈分子量為 67-70 kDa，具有四個固定區 (constant region; C region) (C_v 1-4) 比一般哺乳動物 IgG (C_γ 1-3) 多了一段[28]。此外，IgY 特殊的分子結構與哺乳類免疫球蛋白略有差異，以至於不會引發有害人體的補體反應[5]，也不會與類風濕性因子

(rheumatoid factor) 結合[7]，也不會與哺乳動物的 IgG 產生交互作用(cross reaction) [11]，因此使用 IgY 研發檢驗試劑能排除一般哺乳動物抗體之間的干擾反應。不過，它也無法與 protein A 或 protein G 結合的特性，也造成在純化 IgY 抗體過程中相當的不方便[19]。利用雞隻當作動物模式只需收集雞蛋，純化其中的 IgY 抗體就能夠以非侵入性的方式獲得多株抗體，而且 IgY 的純化步驟快速簡易。免疫雞隻過程中只需少量的抗原即可以引發可持續半年以上高效價且長效的 IgY 抗體[10]。若連續施打抗原，相對應之抗體更會高度集中於蛋黃中[38,39]。就製程而言，IgY 經由蛋黃中分離出，是一種不需經由採血即可得到的抗體，與抗蛇毒馬血清抗體相較，具有以下的優點：

(一)、安全性：蛋的 IgY 在結構上與哺乳類 IgG 相類似，兩者之不同在於後者 mRNA 選擇性切割(alternative splicing)之緣故，所表現出之免疫球蛋白較一般抗體分子在重鏈部分缺少約 60KDa 之 Fc 片段，也因此不易誘發上述之

補體反應。

(二)、專一性：雞所產生的 IgY 抗體對於哺乳類之 IgG 血緣關係較遠，故交叉性反應低，IgY 抗體不會與補體系統、類風濕因子和蛋白質 A 反應，故更可去除發生偽陽性的機率[9,14]。所以可建立靈敏、準確及檢測範圍寬廣的檢驗系統，進而提昇準確度。

(三)、易生產：禽類產蛋率高，且可經由蛋黃中輕易分離出，據統計一隻雞每個月可生產的 IgY 約為兔子的 10-20 倍。每一隻雞平均約每天生產一顆蛋，而一顆蛋中可以純化出約 50-100 mg 的 IgY，所以每隻雞每個月至少可取得 1.5 g 的 IgY，遠大於一般利用免疫老鼠與兔子等哺乳類動物血清中所能產生與取得的抗體的總量。

(四)、較人道：因 IgY 是由蛋黃取得，不必經由抽血等侵入性步驟取得，而且 European Center for the Validation of Alternative Method 也建議使用蛋黃 IgY 抗體取代哺乳類抗體。

(五)、低成本：雞隻購買與飼養成本較低，且收取雞蛋比採血的人力需求也較低。

(六)、安定性高：已有文獻報告指出 IgY 若以液態形式儲存於 4°C 中，其安定性可達十年之久。

由目前 IgY 抗體相關的運用研究的文獻得知，被動免疫之實驗動物所分離出之 IgY 可對抗 rotavirus[16]、Enterotoxigenic E. coli [15]、Helicobacter pylori [29,31,32]、Dental caries [17]、Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus[38]、Streptococcus mutans[3]的感染，Motoi (2005) 等人以狂犬病毒的重組蛋白免疫母雞，將得到的 IgY 抗體與狂犬病毒對 BALB/c 小鼠進行中和效價試驗，結果發現 80IU/kg 劑量的抗體對 75% 的小鼠有保護效價，130IU/kg 劑量的抗體則對所有的小鼠皆有保

護效價[18]，此外，IgY 抗體亦可中和有毒動物之毒素，如 Thalley(1990)等人以響尾蛇蛇毒及黃蠍毒液免疫母雞，動物實驗結果得知 IgY 抗體具有良好的中和效價[32]，Devi (2002) 等人以 0.6 mg 的鎖鏈蛇蛇毒免疫母雞，於第 12-90 天間每顆蛋可純化出約 75-100 mg 的 IgY 抗體，且具有高度專一性與免疫活性[4,8]，Almeida(1998)等人以巴西的金矛頭蝮蛇毒和響尾蛇毒免疫來亨雞後，發現純化出的 IgY 抗體可以遮蔽住的 phospholipase A2 以阻止出血，且 1 ml 的抗體分別可中和 0.0675 mg 的金矛頭蝮蛇毒及 0.075mg 的響尾蛇毒[2]。另有非正式文獻指出，以響尾蛇蛇毒及青竹絲蛇毒免疫母雞，所純化出之 IgY 抗體的中和毒素效價分別比馬血清好 6.3 倍及 2 倍。目前澳洲的 Antiven 公司正在進行 *Pseudonaja nuchalis*、*Pseudonaja affinis*、*Pseudonaja inframacula* 三種蛇毒 IgY 抗體的測試，並已於 2004 年中申請核准動物用抗東部擬眼鏡蛇 IgY 抗體產品上市。

日前台灣疾管局血清疫苗研製中心所飼養馬批生產之抗龜殼花及赤尾鮎血清，長久以來，一直無法從馬匹獲得高效價之抗龜殼花血清，令人擔憂將會無法應付市面上的需求，為避免屆時市場供需失調，造成無謂傷亡，本計畫將開發抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒(出血性)IgY 抗體量產產程技術，期待能藉決上述所遭遇到的困擾。目前國內市場供應需求評估，國內一年約需 3500 劑抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒血清，依據疾管局血清疫苗研製中心先前「以雞蛋生產抗飯匙倩及抗雨傘節(神經性)IgY 抗體」的研究成果來預估，以抗蛇毒馬血清抗體之蛋白質濃度為 80 mg/ml(一劑為 1200 u)計算，一年需 60 公升馬血清(約為 3 匹馬之產量)，抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒雙價 IgY 抗體一劑需 $20 \text{ mg/ml} \div 170 \text{ u/ml}$ (平均效價) $\times 1200 \text{ u} = 140 \text{ mg}$ ，一隻雞隻一年最少可提供 $180 \text{ eggs} \div (140 \text{ mg} \div 50 \text{ mg/egg}) \doteq 64$ 劑，抗龜殼花及赤尾鮎蛇毒雙價 IgY 抗體的部分只需飼養 $3500 \div 64 \doteq 55$ 隻雞隻，故從飼養成本來比

較，雞 IgY 抗體遠較傳統馬血清的成本低及更具效益。

如上所述，抗體可經由抗原免疫而引發實驗動物(雞)體內免疫反應而取得，產生針對該抗原誘導出許多不同的抗體稱之為多株抗體 (polyclonal antibody)，這種多株抗體因為與抗原分子結合的抗原決定位 (antigenic determinant;epitopes) 均不同，每一批產生的抗體專一性和結合能力會有差異，品質不易控制，會造成實驗診斷的專一性受到干擾，而單株抗體 (monoclonal antibody) 只會辨認一種抗原決定位，所以研發專一性較高的單株抗體是必要的。1973 年，Jerrold Schwaber 融合老鼠骨髓瘤細胞與人類周邊血液淋巴細胞而產生可以同時分泌出老鼠與人類抗體的細胞[35]，1975 年，Köhler 和 Milstein 進一步利用 B 淋巴球細胞融合瘤技術製造出單株抗體[25]，他們將抗原打入老鼠體內產生免疫反應之後取出脾臟，內含有許多能分泌抗體的 B 淋巴球，其中也包含所施打的抗原相對應抗體的 B 淋巴球，與骨髓瘤細胞 (myeloma cell) 融合，培養可產生單株抗體的融合瘤細胞。利用融合瘤製造單株抗體的優點在於：只會辨認一種抗原決定位，專一性較高，但缺點是，從免疫動物到得到可以開始製造抗體細胞株的時間過長，細胞培養花費太高且不穩定，在動物細胞系統中不容易改造單株抗體等[33,40]，以及利用老鼠製造出單株抗體在人體內半衰期較短，且病人對於此不同種源的抗體會產生相對應的抵抗性抗體，因此效果有限[24]。在 1985 年 G. Smith 發表噬菌體展示法 (phage display) [37]，是從 phage library 篩選並放大特定專一性抗體片段的方法。將蛋白質或 peptides 的基因序列殖入噬菌體的基因組中，使噬菌體的鞘蛋白與特定蛋白質融合產生重組蛋白質 (fusion protein)，可在噬菌體表面表現此蛋白質，同時也保留噬菌體原本的感染能力[37]，和一般的基因工程重組蛋白質比較，噬菌體呈現系統的優點在於不需要個別表現、純化和分析蛋白質，利用適當的篩選方

式能快速得到特定的蛋白質基因序列。後來科學家發展了利用抗體基因庫 (antibody libraries) 的方式當為單株抗體來源的另一選擇，由抗體基因庫來篩選出所需的單株抗體，以噬菌體展示技術 (phage display technology)，重複篩選 (panning)，找出結合力最強的表現在鞘蛋白 pIII 和 pVIII 上的抗體片段 [21]。此展示系統的方法可替代融合瘤製造單株抗體上時間過長與花費較高的缺點，而且此法也可以較簡單地製造小分子單株抗體片段，如: single chain variable fragment (scFv) 與 antigen-binding fragment (Fab)，可取代原本大分子的抗體，其優點包括仍然可以與抗原專一結合，且只保留抗原決定位的抗體小片段，可達到降低分子量、提升穿透力，於體內造影診斷及免疫治療都有應用發展的可能性[20]。綜合以上優點，以噬菌體重組基因庫技術製造單株抗體，具有實驗操作簡易快速、所需材料便宜、產量容易增幅、專一性佳與抗體基因可長期保存 [41]。

因此本研究主要方向是運用二種蛇毒蛋白 (龜殼花蛇毒蛋白與赤尾鮫蛇毒蛋白)，並確認其濃度後，注射雞隻以建立免疫反應之模式，純化多株 IgY 抗體後，確認其體內產生高效價的抗體反應後，取其脾臟並進行 total RNAs 的純化，再進行 cDNA 的合成，並利用 PCR 技術擴增重鏈與輕鏈變異區 (heavy and light chain variable region) 基因來構築的抗體基因庫 (antibody library)，以使用來篩選帶有表現針對蛇毒蛋白特異性的 scFv 抗體的噬菌體，並測試與二種蛇毒蛋白的結合能力，期待這個技術將來可以應用到另外四種常見的蛇毒蛋白的特異性多株與單株抗體的製備。

材料與方法

一、蛇毒抗原之製備：以 pH6.8 之 1x PBS 將龜殼花蛇毒或赤尾鮎蛇毒配製成所需溶液，慢慢滴入 2.5% 戊乙醛 (glutaraldehyde; GA)，使蛇毒含有 GA 之最終濃度為 0.25%，充分混合 1 小時後，並置於 4°C 中過夜或直到需要使用為止。

二、雞隻之免疫模式：實驗雞將由養雞場購得。雞隻出生後第 150 天開始產蛋，可連續產蛋 6~8 個月，一隻雞在一年內約產 250-280 顆蛋。在進行免疫前，先收集 IgY 抗體及採血 2 ml 做為實驗對照組。各別免疫龜殼花蛇毒與免疫赤尾鮎蛇毒，無毒化之二種蛇毒和過濾過的 1x PBS 補足體積至 0.5 ml 均勻混合，以 3 ml 之塑膠針筒吸取，再以另一支針筒吸取等量 Freund's complete adjuvant，以三通管連接兩針筒，利用兩針筒的交互推拉充分混合均勻至呈現白色乳霜狀，於萊亨蛋雞的大腿部位以雞肉多點注射方式注射 3 至 5 處。之後每隔 1 至 2 週追加注射，第二次以後除了將 complete adjuvant 換成 incomplete adjuvant 之外，其餘試劑與第一次免疫用量相同。各免疫二隻雞，將於免疫隔週採蛋同時採集雞血後，置於室溫 2 小時，待完全凝血後以 3000 rpm 離心 10 分鐘，抽取上層血清於 -20°C 保存備用。並以 ELISA 測定抗體效價，並根據 ELISA 結果，日後將取較大量的 IgY 抗體進行動物中和試驗，檢測效價。總共進行至少 5 次免疫或直到需要抽取雞的脾臟 RNA 時。

三、多株 IgY 抗體純化：近年來以 polyethylene glycol (PEG)、沉澱法水稀釋法 (water dilution method; WD) 與 Dextran sulfate 沉澱法來萃取 IgY 的成本最低、回收率最佳且純度也相當高。依據疾管局血清疫苗研製中心 94 年及 95 年自行研究計畫之純化成果，持續使用硫酸銨沈澱法進行多價 IgY 抗

體純化，方法如下：蛋黃及蛋白分離→蛋黃水解→抗體吸附→抗體溶出→鹽析→透析→測定→濃縮。我們將此純化步驟應用到 Dextran sulfate 沉澱法萃取出來的 IgY 抗體。收集免疫前和每次免疫後的雞蛋。使用蛋白蛋黃分離器將蛋黃分離出來。一顆雞蛋重約 60-70g，蛋黃體積約 10~15 ml。簡述如下：分離蛋黃和蛋白，放蛋黃在濾紙上，先用針頭在蛋黃膜上戳一小洞，再用 10 ml 針筒吸取蛋黃液 10 ml，用 4 倍體積的 1X TBS 稀釋蛋黃液後，每 ml 再加入 120 μl/ml 10% 的 dextran sulphate 溶液，充分混合後室溫中靜置 30 分鐘，再加入 2 M CaCl₂ 沉澱蛋黃中的脂質，混合後室溫中靜置 30 分鐘，7000 rpm 離心 25 min 取上清液，用 1X TBS 補足體積至 100 ml，以 stir bar 混合並分次加入 20 g 的 anhydrous sodium sulfate，室溫中靜置 30 分鐘，沉澱水溶液中的 IgY，7000 rpm 離心 25 分鐘後，保留沉澱物，再用 10 ml 1X TBS 溶解沉澱物，之後用 8 ml saturated sodium sulfate solution 再次沉澱，以 7000 rpm 離心 25 分鐘保留沉澱物，再用 5 ml 1X TBS 溶解，經由 10% 聚丙醯氨膠體電泳分析。

四、分析 IgY 抗體對不同蛇毒之專一性：

(1) 使用雙向免疫擴散試驗(Ouchterlony double diffusion)，依形成的抗原-抗體複合物之沈澱線圖，可檢驗 IgY 抗體是否對蛇毒具有專一性，其原理為可溶性抗原與已知可溶性抗體分別加入相鄰的瓊脂糖凝膠板上的小孔內，在電解質存在下讓它們相互向對方擴散。當兩者在最適當比例處相遇時，即形成一條清晰的沈澱線

(2) 以西方墨點法(western blotting)比較 IgY 及抗蛇毒馬血清對蛇毒抗原之結合種類，作定性分析。取蛇毒蛋白進行 10% 聚丙醯氨膠體電泳，將蛇毒蛋白樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，用含 5% 脫脂奶粉的 1X PBS blocking buffer 作用 1 小時後，移除 blocking buffer 以 0.1% Tween20/PBS

(PBST)清洗之後，分別加入稀釋比例 1:10000 的未免疫至免疫第五次之純化 IgY 作用 1 小時，再以 1X PBST 清洗，每次 5 分鐘，共四次，然後加入以稀釋比例 1:10000 的 HRP-conjugated donkey anti-chicken IgY antibody，作用 1 小時，以 0.1% PBST 清洗三次來清除未結合之抗體，加入呈色劑 DAB，震盪 5~10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

(3) 以酵素結合免疫分析法 (ELISA) 測試結合效果: 將二種蛇毒蛋白分別以 1 µg/ml，37°C 1 小時，固定在 96 well plate，移除未固定的蛋白溶液，加入 3% 的 BSA 來阻斷多餘的空間，於 37°C 1 小時後，去掉 3% 的 BSA，用 1X PBST 清洗 3 次，分別加入不同稀釋比例的未免疫至免疫第五次之純化 IgY，作用 1 小時於 37°C 反應，再用 1X PBST 清洗 6 次，加入已稀釋比例 1:10000 的 HR-conjugated donkey-anti-chicken IgY antibody，於 37°C 反應 1 小時，再用 1X PBST 清洗 6 次，加入呈色劑 TMB，以波長 450 nm 下測量吸光值，分別觀察抗體與蛇毒蛋白抗原結合能力的效價。

六、測定 IgY 中和蛇毒之效價：

將 IgY 抗體以生理食鹽水稀釋為不同濃度後與 2LD₅₀ 之蛇毒液混和均勻後，置於 37°C 恆溫箱內反應，靜置作用 1 小時，再以皮下注射體重約 20 克之 ICR 小鼠，觀察 24 小時，並紀錄動物死亡數目，計算抗體效價。

七、檢測抗體效價之安定性：

將 IgY 抗體置於 -20°C 冰箱中保存至少一年，進行動物中和試驗，計算抗體效價，藉以評估其安定性。

八、建構雞隻 cDNA 資料庫：

(1) 抽取脾臟 RNA: 將雞隻犧牲後取脾臟，測量大小及重量。切割成 0.5 cm²

大小不等的肉塊置於微量離心管中，於液態氮中降溫。取出事先備好的研鉢及研杵，移除微量離心管，僅留脾臟留置研鉢中，邊倒碎邊加液態氮將組織肉塊研磨成粉末狀。將脾臟組織粉末加到 Trizol reagent（每 0.1g 的組織加 1ml 的 Trizol reagent）混合均勻靜置 5 分鐘，加入 200 μ l chloroform vortex 10 秒，靜置 3 分鐘，用 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液至新的微量離心管中，加入 500 μ l isopropanol alcohol 均勻混合，用 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 離心 15 分鐘，加入 1 ml 75% ethanol 震盪洗滌 RNA，用 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 離心 15 分鐘，丟棄上清液將 RNA 溶於 20 μ l RNase-free H₂O，再用 RNase-free H₂O 稀釋 10 倍，在波長 260 nm 下測量吸光值，便可預估 RNA 的濃度。

(2) RNA 反轉錄成 cDNA（Reverse transcription-polymerase chain reaction；RT-PCR）

取 10~30 μ g 的 total RNA 加入 2 μ l oligo dT，用 RNase-free H₂O 將體積補足至 27 μ l，70 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘後，再加入 80 U RNase inhibitor，3 μ l dNTP（25 mM），5 μ l DTT（0.1 M），5 μ l 10X MMLV RT Buffer，20 U MMLV Reverse Transcriptase，最後用 RNase-free H₂O 把體積補足到 50 μ l，於 37 $^{\circ}$ C 反應 60 分鐘，把 mRNA 反轉錄成 cDNA，最後加入 RNase H 1 μ l（1 U/1 μ l）於 37 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘。

九、抗蛇毒蛋白之 scFv 抗體基因庫建立

(1) 合成分別含有 long linker 與 short linker 重鏈變異區（V_H）與輕鏈變異區（V_L）

取 0.25 μ g 雞隻的 cDNA，再分別加入 30 pmole 相對應的 primer，再加入 4 μ l 2.5 mM dNTP，5 μ l 10X PCR buffer，Taq DNA polymerase 2.0X Master Mix Red（Ampliqon III, USA），再用 ddH₂O 補體積到 50 μ l，PCR 條件為 94 $^{\circ}$ C 15 秒，55 $^{\circ}$ C 15 秒和 72 $^{\circ}$ C 90 秒，重複 30 個循環，最後再 72 $^{\circ}$ C、10

分鐘，再利用 1% 洋菜膠 (agarose) 電泳進行分析，並將 agarose 上 DNA 片段割下，經由 GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit (GE Healthcare,UK) 以膠萃取方式進行 DNA 純化。

(2) 連結重鏈與輕鏈 (overlap extension)

分別取純化後的第一次 PCR 產物 100 ng V_H (long linker or short linker) 與 V_L DNA 片段，加入 60 pmole CSC-F 及 CSC-B primer，4 μl 2.5mM dNTP，5 μl 10X PCR buffer，Taq DNA polymerase 2.0X Master Mix Red (Ampliqon III, USA)，再用 ddH₂O 補體積到 50 μl，PCR 條件為 94 °C 15 秒，56 °C 15 秒和 72 °C 120 秒，重複 25 個循環，最後再 72 °C 10 分鐘，再利用 1% 洋菜膠 (agarose) 電泳進行分析，經由 GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit (GE Healthcare,UK) 以膠萃取方式進行 DNA 純化。

(3) digest insert DNA and vector DNA

取 68.4 U 限制酵素 *Sfi*I (Bio-labs, USA) 作用於 1.9 μg 750bp 的 full-length scFv 片段，加上 6μl NEB buffer 2，6μl 10X BAS，總體積為 60 μl。另外取 60 U 限制酵素 *Sfi*I 作用於 10 μg pComb 3X vector，加上 10 μl NEB buffer 2，10 μl 10X BAS，總體積為 100 μl。將 insert DNA 與 vector DNA 置於 50 °C 作用 5 小時，insert DNA 產物用 2% 洋菜膠 (agarose) 電泳進行分析，而 vector DNA 產物用 1% 洋菜膠 (agarose) 電泳進行分析，之後將 agarose 上 insert 與 vector DNA 片段割下，經由 GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit (GE Healthcare,UK) 以膠萃取方式進行 DNA 純化。純化分別含有 short or long linker 的全長 scFv 片段與 pComb 3X vector，最後再以 1% 洋菜膠 (agarose) 分析結果。

(4) 連接(ligation)

取 0.6 μg 有 short or long linker 的全長 scFv 片段與 1.2 μg pComb 3X vector

片段混合，加入 30 U 的 T4 ligase (Bio-labs, USA)，6 μ l ligase buffer，在用 ddH₂O 補到總體積為 60 μ l，在 16°C 下作用 16 小時。之後產物用 ddH₂O 補足體積至 100 μ l，加入 220 μ l 95% ethyl alcohol，10 μ l 3 M sodium acetate，在 -80°C 靜置 1 小時，以 12000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液，加入 1 ml 冰 75% ethyl alcohol vortex 2 秒，以 12000 rpm 離心 10 分鐘，抽乾 ethyl alcohol 置於 37°C 烘箱中烘乾，以 40 μ l ddH₂O 回溶。

(5) 細胞轉形(Transformation)與抗體基因庫(antibody library)的建構

先製備 5 ml 的 SOC 培養液，於 37°C 的培養箱中預溫。另外準備好乾淨的 gap cuvette，用錫箔紙包裹，冰到 -80°C 冰箱中預冷。接著取 20 μ l 的 ligation 產物加入 300 μ l Competent cell (XL-1 Blue *E.coli*) (Efficiency 1×10^8) 中混合均勻，置於冰上 1 分鐘，將此混合物改放在冰的 gap cuvette 中，用 electroporation 的方式做細胞轉形，條件為 2.5 kV、25 μ F、200 ohms，電極後用預溫過的 1 ml 的 SOC broth 將 cuvette 內的內容物沖出，剩餘的 SOC 培養液做第二次到第五次的沖洗，將全部 5 ml 收集好置於試管中，在 37°C 下以 150 rpm 培養 1 小時，在加入 10 ml SB 培養液 (20 μ g/ml ampicillin、10 μ g/ml tetracycline)，先取出 100 μ l、10 μ l、1 μ l 三種體積，分別均勻塗抹在含有 50 μ g/ml ampicillin 的固態培養皿，置於 37°C 培養箱中隔夜觀察，並計算轉型細胞效率，估算出抗體基因庫的大小。其餘剩下約 15 ml 培養液則的置於 37°C 培養 1 小時後，補齊 ampicillin 濃度使其最終濃度為 50 μ g/ml，在 37°C 培養 1 小時之後，加入 100 μ l 的 Wild type helper phage VCSM13 (10^8 pfu/ μ l)，感染 10 分鐘後，將此菌液混入預溫過 37°C 的 100 ml SB broth (50 μ g/ml ampicillin 與 10 μ g/ml tetracycline) 中大量培養，2 小時後加入 kanamycin 使最終濃度達到 70 μ g/ml，於 37°C 250 rpm 震盪培養過夜。隔天離心先預冷至 4°C，再將前日 115 ml 的培養液先用 4500 rpm 的轉速 4

°C 離心 20 分鐘，取上清液到滅菌過的棕色離心瓶內，加入 4% PEG-8000 和 3% NaCl，置於 37°C 混合 10 分鐘使其完全溶解，移至冰上靜置 30 分鐘，再以 9000 rpm 4°C 離心 20 分鐘，倒掉上清液保留沉澱物並將棕色離心瓶倒置在吸水紙上 10 分鐘，使水分瀝乾，再以 2 ml 1X PBS 重新溶解噬菌體沉澱物，分裝於微量離心管中，以 12000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，取上清液到新的微量離心管中儲存於 -20°C。

十、抗蛇毒蛋白之 scFv 的基因庫的篩選 (panning and amplification)

前一天先準備約 10 ml 的 XL-1 Blue E. coli strain，另外分別將先前用來免疫雞的二種蛇毒蛋白固定 0.5 µg/well 在 ELISA 96 孔洞盤上，置於 4°C 冰箱中。隔天移除沒有固定的蛋白溶液，加入 200 µl 3% BSA，置於 37°C 阻斷 1 小時後，移除阻斷 3% BSA 溶液，以 1X PBST 清洗 3 次後，加入 100 µl (約 $10^8 \sim 10^9$ pfu/µl) 建立好的蛇毒蛋白 scFv 噬菌體基因庫，於 37°C 反應 2 小時，移除重組噬菌體以 1x PBST 反復沖洗約 50 下，清洗 10 次，加入 100 µl 噬菌體 elution buffer (pH=2.2)，在室溫下 10 分鐘再用沖洗的方式把 elute 的噬菌體洗出，吸到新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 6 µl 2 M Tris base (pH=9.1) 中和試劑中和它，接著取前一天先準備的 E. coli XL-1 blue 2ml 於 15ml 離心管中，把全部析出的噬菌體共 106 µl 加入，在室溫下感染 15 分鐘，再加入 10 ml 預熱至 37°C 過的 SB broth (含有 20 µg/ml ampicillin 與 10 µg/ml tetracycline)，取出 100 µl、10 µl、1 µl 三種體積，分別均勻塗抹在含有 50 µg/ml ampicillin 的固態培養皿，置於 37°C 培養箱中，隔夜觀察。其餘剩下約 12 ml 培養液置於 37°C 培養 1 小時後，補齊 ampicillin 濃度，使其最終濃度為 50 µg/ml。37°C 培養 1 小時之後，加入 100 µl Wild type helper phage VCSM13 (10^8 pfu/µl) 感染 10 分鐘後，將此菌液混入預溫過 37°C 的 100 ml SB broth (50 µg/ml ampicillin、10 µg/ml tetracycline) 中大量培養，2 小時後加入

kanamycin 使最終濃度達到 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，於 37°C 轉速為 250rpm 的培養箱震盪隔夜培養。第三天，將培養液 4000 rpm 4°C 離心 20 分鐘，上清液移至新得離心瓶，加入 4% PEG-8000 和 3% NaCl，置於 37°C 混合 10 分鐘使其完全溶解，移至冰上靜置 30 分鐘，再以 9000 rpm 4°C 離心 20 分鐘，移除上清液保留沉澱物並將棕色離心瓶倒置在吸水紙上 10 分鐘，使水分瀝乾，再以 2 ml 1X PBS 重新溶解噬菌體沉澱物，分裝於微量離心管中，以 12000 rpm 4°C 離心 10 分鐘，取上清液到新的微量離心管中儲存於 -20°C。

十一、抗蛇毒蛋白 scFv 抗體的表現

將經過四次 panning 篩選後，帶有重組抗體噬菌體基因庫萃取出來，經電泳確認後，取出 0.1 μg total DNA 以 electroporation 的方式送入勝任細胞 (Competent cells) (TOP 10 F' *E.coli*) 中，電擊後以 1 ml 預溫過之 SOC 培養液將電擊管內的勝任細胞沖出，取 10 μl 、1 μl 分別均勻塗抹在含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 的 LB 固態培養基，置於 37°C 培養箱中，培養 16 小時，隔天觀察菌落生長情況，且挑菌養在 1 ml 培養液中 LB broth (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin)。第三天，以 LB broth (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin) 放大至 30ml，直到在波長 600 nm 下的吸光係數介於 0.4~0.6 間。再利用 1 mM IPTG 在 37°C 誘導抗蛇毒蛋白 scFv 抗體的片段大量表現，表現過夜後，將菌液以 3500 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液後，沉澱物用含有 1X PBS 或 6 M urea 的 His binding buffer 0.12 ml 回溶。利用重複冷凍、解凍 (或超音波震盪器) 將細胞打破，並以 12000 rpm 離心 10 分鐘將打破之菌體沉澱下來，取上清液經由 10% 聚丙醯氨膠體電泳和西方墨點法分析抗體片段的表現。

十二、抗蛇毒蛋白 scFv 抗體的純化

50% 的 Ni²⁺ beads 約每 μl 可純化 20-40 μg 的 scFv 抗體，所以估算出所需的

Ni²⁺beads，把超音波震盪器處理過的細胞 lysate 與 50% 的 Ni²⁺beads，以上下反轉的方式均勻混合 30 分鐘，3500 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液，置新試管中保留，加入 Ni²⁺beads 五倍體積的 His 清洗緩衝液混合均勻後，3500 rpm 離心 10 分鐘除去上清液，置新試管中保留，清洗兩次後加入 His elution 緩衝液混合均勻（加的量視蛋白表現的情況而定）以上下反轉的方式均勻混合 30 分鐘，3500 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液，置新試管中保留，elute 兩次後，剩下的 Ni²⁺beads 加入等體積的 His 結合緩衝液日後可重複使用。

十三、以西方墨點法分析 scFv 抗體與蛇毒蛋白抗原之結合力

依據序列分析結果挑出不同群組的序列片段，以西方墨點法(western blotting)比較 scFv 抗體, IgY 及抗蛇毒馬血清對蛇毒抗原之結合種類作定性分析。取蛇毒蛋白進行 10% 聚丙醯氨膠體電泳，將蛇毒蛋白樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，用含 5% 脫脂奶粉的 1x PBS blocking buffer 作用 1 小時，用 1x PBS/0.1% Tween20 (PBST) 清洗每次 5 分鐘，共四次之後，分別加入稀釋比例 1:5000 純化的 scFv 抗體，未免疫至免疫第五次之純化 IgY 或抗毒馬血清作用 1 小時，再以 1xPBST 清洗，再以稀釋比例 1:5000 加入 goat anti-chicken IgY light chain antibodies 或 anti-horse IgG antibodies，室溫作用 1 小時，再用 1x PBST 清洗，每次 5 分鐘，共四次，最後再以稀釋比例 1:5000 加入 horse radish peroxidase-conjugated donkey anti-goat antibodies 室溫作用 1 小時，再用 1x PBST 清洗三次來清除未結合之抗體，最後加入 DAB 呈色反應，震盪 5~10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

十四、以酵素結合免疫分析法 (ELISA) 測試 scFv 與蛇毒蛋白結合效果

將二種蛇毒蛋白分別以 1 µg/ml，37°C 1 小時，固定在 96 孔洞上，移除未

固定的蛋白溶液，加入 3% 的 BSA 阻斷多餘的空間，於 37°C 1 小時後，去掉 3% 的 BSA，用 1x PBST 清洗 3 次，加入已稀釋 125X、625X 不同稀釋比例的純化的 scFv 抗體，未免疫至免疫第五次之純化 IgY 或抗毒馬血清，置於 37°C 作用 1 小時，再用 1x PBST 洗 6 次，加入已稀釋比例 1:5000 goat anti-chicken IgY light chain antibodies 37°C 1 小時，再用 1x PBST 洗 6 次，再加入已稀釋比例 1:5000 的 HRP-conjugated donkey anti-goat antibodies 37°C 1 小時，再用 1x PBST 洗 6 次，加入呈色劑 TMB 以波長 450 nm 測量吸光值，分別觀察抗體與蛇毒蛋白抗原結合能力的效價。

十五、抗蛇毒蛋白 scFv 抗體的蛋白基因序列分析

挑選出可表現抗蛇毒蛋白 scFv 抗體蛋白的細胞株，抽取 DNA 加以定序。使用 ompseq.primer 分析，定序所加入的 primer 最終濃度為 10 pmole，出來的結果可使用 BioEdit 軟體比對，並分析 scFv 抗體蛋白基因與雞免疫球蛋白的 germline 基因之間的差異。

十六、分析 scFv 抗體對不同蛇毒之專一性

使用雙向免疫擴散試驗(Ouchterlony double diffusion)，依形成的抗原-抗體複合物之沈澱線圖，可檢驗 scFv 抗體是否對蛇毒具有專一性，其原理為可溶性抗原與已知可溶性抗體分別加入相鄰的瓊脂糖凝膠板上的小孔內，在電解質存在下讓它們相互向對方擴散。當兩者在最適當比例處相遇時，即形成一條清晰的沈澱線

十七、測定 scFv 抗體中和蛇毒之效價

將 20 mg/ml 之純化的 scFv 抗體或 IgY 抗體以生理食鹽水稀釋為不同濃度後與 2LD50 之蛇毒液混和均勻後，置於 37°C 恆溫箱內反應，靜置作用 1 小時，

再以皮下注射體重約 20 克之 ICR 小鼠，觀察 24 小時，並紀錄動物死亡數目，計算抗體效價。

十八、檢測純化的 scFv 抗體或 IgY 抗體之安定性

將純化的 scFv 抗體或 IgY 抗體置於-20°C 冰箱中保存至少一年，進行動物中和試驗，計算抗體效價，藉以評估其安定性。

十九、以 BAP 進行 scFv 中和蛇毒溶血試驗

取 scFv 抗體(1 μ g/ μ l)以 1 \times PBS 作 2 倍序列稀釋(2⁰~2⁷)，與等體積龜殼花蛇毒蛋白溶液(2.5 μ g/ μ l)混和均勻後，置於 37°C 恆溫箱內靜置作用 1 小時，取 2 μ l 混合液滴在 blood agar plate(BAP)上，置於 37°C 恆溫箱內靜置作用 24 小時後觀察。

二十、以 ICR 小鼠為動物模式進行純化的重組 scFv 抗體中和蛇毒毒性試驗

龜殼花之 LD50 為 3 g/kg，依照小鼠體重計算 2LD50 的劑量。該劑量與等體積的不同的純化重組 scFv 抗體混合均勻，並以 PBS 補體積至 150 μ l，置於 37°C 恆溫箱內，靜置作用 1 小時後，以腹腔注射到 ICR 小鼠，觀察 24 小時。

結果

1. 重鏈與輕鏈變化區(variable regions)基因的 RT-PCR 結果。

RT-PCR 的結果顯示雞免疫球蛋白的重鏈以及輕鏈的變異區(variable region) 可以被放大出來，(A)圖的 1, 2 以及 3 分別是含有 short linker 的重鏈、含有 long linker 的重鏈以及輕鏈變異區的 350 個 bp 的 PCR 產物，(B)圖的 lanes 1 與 2 分別是含有 short linker 與 long linker 的 750 個 bp 的單鏈變異區片段 (single chain variable fragment)。

2. 抗蛇毒蛋白之 scFv 抗體基因庫建立與篩選 (panning and amplification)

如表 1 與 3 所呈現的結果。

3. 隨機抽取篩選後的細胞株 DNA 的分析。

篩選含有 short linker 的抗體基因庫後，分別於第 3 次與第 4 次篩選後，隨機抽取多個大腸桿菌的重組 DNA，並於 agarose gel 上分析。結果顯示，除了 3S 中的 lane 11 的 DNA 檢體外，其餘的 DNA 之分子量都與先前已知含有 scFv 抗體基因的重組 DNA 相同(圖二)。我們進一步用 Sfi I 限制酶分析，結果顯示這些重組 DNA 確實都含有 scFv 基因片段(圖三)。

4. 隨機抽取篩選後的細胞株重組 scFv 抗體的 SDS-PAGE 與 Western blot 分析。

為了確定這些含有 scFv 基因片段的大腸桿菌可以表現 scFv 抗體蛋白，我們經由 IPTG induction 後，發現不同的大腸桿菌表現的 scFv 的輻不盡相同，

而且他們的分子量也有所差異(圖 4)，這些結果可以推測它們應該還有不同的 scFv 抗體基因序列。值得一提的是，這些可能的 anti-MI scFv 抗體的表現量(lanes 1-12)出乎意料它多數比我們先前所分離的 anti-OmpA scFv 抗體(lane 15)多出許多。

5. 三個重組 scFv 抗體對 MI 蛇毒蛋白的辨識能力。

利用這些具有細菌表現的重組 scFv 抗體進一步測試是否可以與在 western blot 上的 MI 蛇毒蛋白結合。結果顯示，3 個細胞株(3S10, 4S09 與 4S15)可以辨認到 MI 蛇毒蛋白的一個主要的蛋白並呈現相同的辨識模式(pattern)(圖 5)。因此，可以推測這 3 個 scFv 抗體辨識同一個 MI 的蛇毒蛋白，不過目前還不確定它真正的 identity；我們也不確定這 3 個 scFv 抗體是否辨認相同的抗原決定位(epitope)。

6. 抗蛇毒蛋白 scFv 抗體之重鏈與輕鏈變異區基因序列分析

在第 3 次及第 4 次 panning 完後，隨機挑選多個細菌株來作 scFv 抗體基因定序。如同圖 6 與圖 7 分別顯示它們的重鏈與輕鏈變異區基因中 Framework 與 CDR 區域的序列，這些結果顯示，不同的抗體基因在 CDR 區域的變化比 Framework 區域的變化化大。如 4S09 之 scFv 與 germlines 比較。此外，不同的 scFv 抗體如 4S09 與 4S15 的 CDR1、CDR2 與 CDR3 區域之相似性相當高，因為這一個抗體結合 MI 蛇毒蛋白的 pattern 很相似(圖 5)。因此，這種分析結果也表示 CDR 區域對於抗原結合的能力佔有相當的重要性。除此之外，4S09 與 4S15 的 scFv 抗體分別由不同的重鏈變化區基因與相同的輕鏈變化區基因配對而成(表 2)，這種結果顯示輕鏈變化區基因對於這兩種 scFv 抗體結合 MI 蛇毒蛋白的能力是比重鏈變化區基因來得重要。

7. 重組 scFv 抗體對 MI 蛇毒蛋白在 ELISA plates 的特異性結合能力。

一系列不同濃度 scFv 抗體用來測試它們結合固定在 ELISA plate 上 MI 蛇毒蛋白的能力，結果顯示 3S10、4S1、4S9、4S15 以及 3L6 都有很好的效果，他們的結合能力與 polyclonal anti-MI IgY 相當。而且他們也不會與 negative control 的 BSA 抗原結合，更展示了他們非常高的特異性。

8. 重組 scFv 抗體的表現、純化與分析。酵素結合免疫分析法 (ELISA) 與西方墨點法分析五個純化的 scFv 抗體對 MI 與 GI 蛇毒蛋白抗原之結合能力。

利用 anti-his column 來純化 3S10、4S1、4S9、4S15 與 3L6 的 scFv 抗體分子，我們可以得到非常大量而且純度非常高的結果(圖 9)。初步估計，大約每 100 ml 的大腸桿菌培養液，可以產生 1 mg 的 scFv 抗體蛋白分子，這是相當難得一見的超高產量的結果。我們進一步利用 anti-chicken light chain 抗體來確認這些 scFv 抗體分子的 identity。ELISA 的結果(圖 10)顯示除了 3L6 外，其餘 4 個 scFv 抗體分子，在一系列不同濃度測試下，展現了對 MI 蛇毒蛋白非常良好的特異性結合能力，並且對 GI 的蛇毒蛋白幾乎完全沒有結合。圖 11 的實驗，基本上與圖 5 相同，所不同者為本次實驗是利用純化的 anti-MI scFv 抗體分子，而圖 5 則使用含有相同 scFv 抗體的 total cellular lysate。所得到的結果大致相同，他們都辨識一個分子量大約 36 kD 的蛇毒蛋白，不過我們目前還需要更進一步確認為何有其他蛋白也被這些 scFv 抗體辨識到。

9. 以 BAP 進行純化的重組 scFv 抗體抑制 MI 蛇毒蛋白的溶血作用 scFv 中和蛇毒溶血試驗

目前結果顯示，龜殼花蛇毒蛋白(2.5 μ g)會造成直徑約 7 mm 的溶血圈，而原

倍的 scFv 抗體分子(1 μ g)能夠縮小該溶血圈至 3~4 mm。然而在控制組「只滴 scFv 抗體分子」的結果，也形成了大約 3~4 mm 的溶血圈。未來將進一步確定 scFv 蛋白衝提緩衝液以及其他不相關的 scFv 抗體分子是否也會造成同樣結果。

10. 以 ICR 小鼠為動物模式進行純化的重組 scFv 抗體中和蛇毒毒性試驗

目前初步結果，scFv 能夠延緩蛇毒蛋白對小鼠造成的死亡。未來將進一步，設計三組控制組--「只打蛇毒」、「只打 scFv 之蛋白洗提緩衝液」以及「打其他不相干 scFv 抗體分子」-- 並將樣本數增加到三重複。

計畫重要研究成果及具體建議

我們利用由施打 MI 以及 MI/GI 的雞脾臟，共建立了四個具有高 titer 的噬菌體展示抗體基因庫 (phage display antibody libraries)。首先從其中一個噬菌體展示抗體基因庫，經過三或四回的 panning 後，從隨機篩選的 15 個細胞株中，歸納為五種不同的細胞株，他們表現非常大量的重組 scFv 抗體。其中四個 scFv 抗體只辨識 MI 蛇毒蛋白，而不會辨識 GI 蛇毒蛋白。此外，初步的實驗結果顯示這四個 scFv 也可以部分抑制 MI 蛇毒蛋白的溶血作用。我們將持續地利用另外三個已經建構好的噬菌體展示抗體基因庫，來篩選更多具有特異性的 anti-MI 與 anti-GI 重組 scFv 抗體，這些 scFv 單株抗體以及前一年度計畫所產生的特異性 IgY 多株抗體都可以用來發展龜殼花咬傷的快速檢驗試劑。龜殼花與赤尾鮫的蛇毒蛋白成分相當複雜，經由本計劃所找到的特異性 anti-MI 與 anti-GI 的多株 IgY 與重組 scFv 單株抗體，希望未來主管衛生醫藥當局應該善加利用，落實快速檢驗試劑的發展與量產。

參考文獻

1. Akita, E. M. and S. Nakai, (1992). Isolation and purification of immunoglobulins from egg yolk. *J. Food Sci.* 57, 629
2. Almeida, C. M., Kanashiro, M. M., Rangel, F. B., Mata, M. F., Kipnis, T. L. and Silva W. D. (1998). Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec.* Nov 21;143(21):579-84
3. Bartz, C. R., Conklin, R.H., Tunstall, C. B., and J. H. Stesele. (1980). Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* 142: 439-441
4. Cama, V. A. and Sterling, C. R. (1991). Hyperimmune hens as a novel source of anti-Cryptosporidium antibodies suitable for passive immune transfer. *J Protozool.* Nov-Dec; 38(6):42S-43S
5. Carlander, D., H. Kollberg, P. E. Wejaker, and A. Larsson. (2000). Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res* 21:1-6.
6. Daugherty, P. S., G. Chen, M. J. Olsen, B. L. Iverson, and G. Georgiou. (1998). Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng* 11:825-832.
7. Davalos-Pantoja, L., J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez, and R. Hidalgo-Alvarez. (2000). A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J Biomater Sci Polym Ed* 11:657-673.
8. Devi, C. M., Bai, M. H., Krishnan, L.K. (2002). Development of viper-venom antibodies in chicken egg yolk and assay of their antigen binding capacity. *Toxicon* 40: 857-861.
9. Devi, C. M., Bai, M. H., Lal A.V., Umashankar, P. R., Krishnan, L.K. (2002). An improved method for isolation of anti- viper venom antibodies from

- chicken egg yolk. *J. Biochem. Biophys. Methods* 51: 129-138
10. Gassmann, M., P. Thommes, T. Weiser, and U. Hubscher. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J* 4:2528–2532.
 11. Hadge, D. and H. Ambrosius, (1984). Evolution of low molecular weight immunoglobulins-IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol Immunol*, 21(8):p.699-707.
 12. Hanes, J., L. Jermutus, S. Weber–Bornhauser, H. R. Bosshard, and A. Pluckthun. (1998). Ribosome display efficiently selects and evolves high–affinity antibodies in vitro from immune libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14130–14135.
 13. Hansen, P., J. A. Scoble, B. Hanson, and N. J. Hoogenraad. (1998). Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *Journal of Immunological Methods* 215:1–7.
 14. Hassl, A. and H. Aspöck, (1988). Purification of yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Methods* 110: 225.
 15. Hatta, H., Kim, M. and T. Yamamoto, (1990). A novel isolation method for hen egg yolk antibodies “IgY”. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2531.
 16. Hatta, H., Tsuda, K., Akschi, S., Kim, M., Yamamoto, T. and Ebina, T. (1993). Oral passive immunization effect of antihuman rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1077-1081.
 17. Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., Hirasawa, M., Katz, J., Childers, N. K. and Michalek, S. M. (1997). Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 31(4):268-74

- 18.Hiraga, C., Kodama, Y., Sugiyama, T., and Y. Ichikawa. (1990). Preventive of human rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 64 : 118-123
- 19.Hoffman, N. G., A. B. Sparks, J. M. Carter, and B. K. Kay. (1996). Binding properties of SH3 peptide ligands identified from phage–displayed random peptide libraries. *Mol Divers* 2: 5–12.
- 20.Holliger,P. and P.J. Hudson, (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* 23 (9): 1126-36.
- 21.Jacobsson,K. and L.Frykberg, (1995).Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display. *Biotechniques* 18(5):p.878-85
- 22.Jaenisch, R. and B.Mintz, (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(4): 1250-4.
- 23.Kiecke, M. C., B. K. Cho, E. T. Boder, D. M. Kranz, and K. D. Wittrup. (1997). Isolation of anti–T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng* 10:1303–1310.
- 24.Kipps, T.J.,et al., (1985). Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *J Exp Med* 161(1): 1-17.
- 25.Kohler, G., and C. Milstein. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497.
- 26.Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpern, J., and Roth T.F. (1985). Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology.* 54(4): 755-762.
- 27.Larsson, A., Wejaker, P.-E., Fosberg. P. -O., Lindahl, T. (1992). Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J. Immunol. Methods* 156: 79-83.
- 28.Lestreille, J., et al., (1995).Dexamethasone improves the efficacy of

- granisetron in the first 24 h following high-dose cisplatin chemotherapy. *Support Care Cancer*, 3(5): 307-12.
- 29.Lobbedey, L. and Schlatterer B. (2003). Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccinees and in serum of their offspring. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*. 50(2): 81-5
- 30.Parrisg, H. M. and Hayes, R. H. (1970). Hospital management of pit viper venenations. *Clinical Toxicology* 3 (3): 501-511
- 31.Polson, A. (1990). Isolation of IgY from the yolk of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.* 19: 253-258
- 32.Polson, A., Von Wechmar, M. B. and M. H. V. Van Regenmortel, (1985). Improvements in the isolation of IgY from the yolk of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Inves.* 14: 323
- 33.Rader, C. (2001). Antibody libraries in drug and target discovery. *Drug Discov Today* 6: 36-43.
- 34.Schade, R., W. Burger, T. Schoneberg, A. Schniering, C. Schwarzkopf, A. Hlinak, and H. Kobilke. (1994). Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex* 11: 75-84.
- 35.Schwaber, J. and E.P. Cohen, (1973). Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental type. *Nature* 244(5416): 444-7.
- 36.Shin, J. -H., Yang, M., Nam, S.W., Kim, J. T., Myung, N. H., Bang, W. -G., Roe, I. H. (2002). Use of egg yoke-derived immunoglobulin as an alternate to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9,5: 1061-1066

37. Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315–1317.
38. Sugita-Konishi, Y., Shibata, K., Yun, S. S., Hara-Kudo, Y., Yamaguchi, K. and Kumagai, S. (1996). Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* May; 60(5):886-8
39. Sutherland, S. K. (1997). Serum Reactions. An analysis of commercial antivenoms and the possible role of anticomplementary activity in de-novo reactions to antivenoms and antitoxins. *Med. J. Aust.* 1: 613-615
40. Winter, G., and C. Milstein. (1991). Man-made antibodies. *Nature* 349:293–299.
41. Woof, J.M. and D.R. Burton, (2004). Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immuno* 14(2): 89-99.
42. Yokoyama, H., Peralta, R.C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y. (1991). Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity.* 60 (3): 998-1007.

圖與表

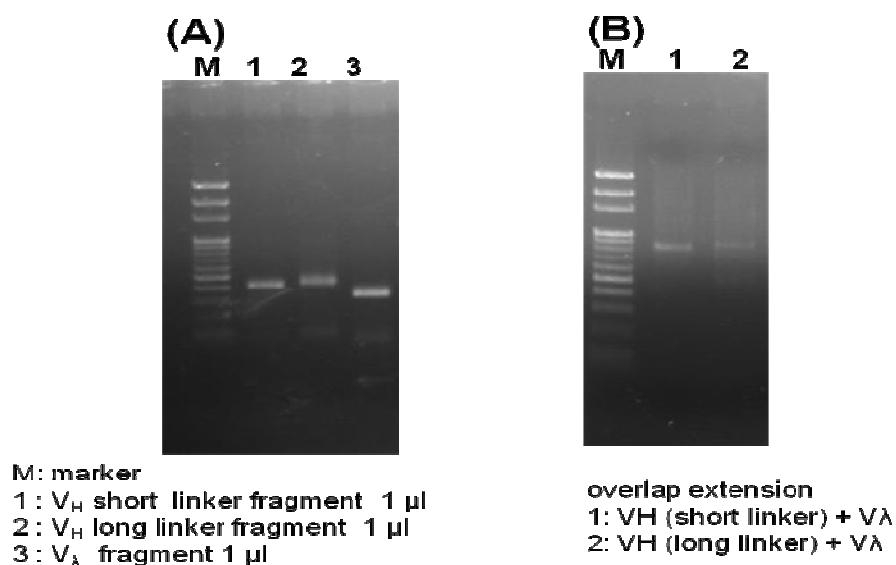


圖 1. 重鏈與輕鏈變化區(variable regions)基因的 RT-PCR 結果。

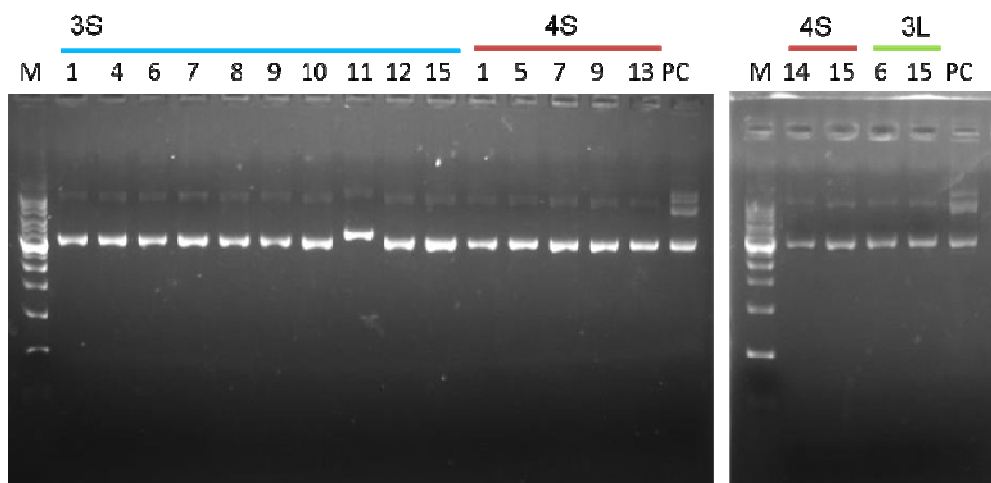


圖 2. 隨機抽取篩選後的細胞株 DNA 的分析，沒有經過限制酶處理。

M : 1 kB marker 2 μl

Sample : 2 μl

3S : Short-linker library after 3rd panning

4S : Short-linker library after 4th panning

3L : long-linker library after 3rd panning

Lane number : 之前隨機挑菌的編號

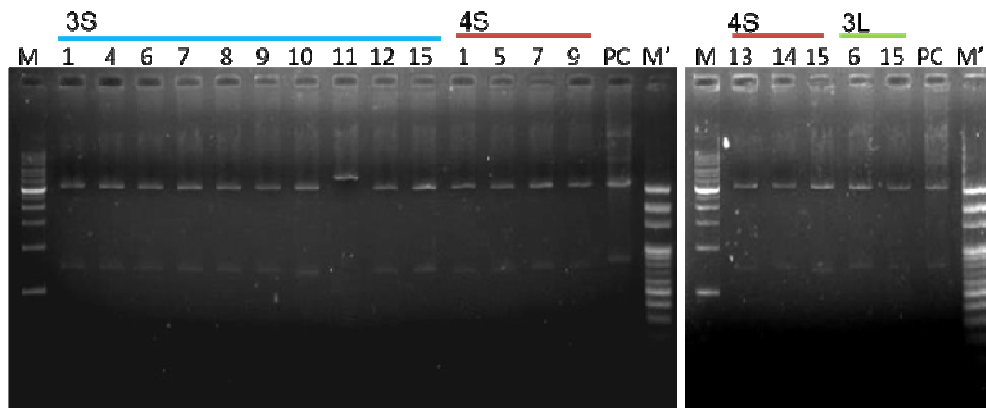


圖 3. 隨機抽取篩選後的細胞株 DNA 的分析，並經過限制酶處理。

M : 1 kb markers 2 μ l

M' : 100 bp markers 2 μ l

Sample : 10 μ l/each

3S : Short-linker library after 3rd panning

4S : Short-linker library after 4th panning

3L : long-linker library after 3rd panning

Lane number : 之前隨機挑菌的編號

PC : positive control (OVTA1-1002 L15)

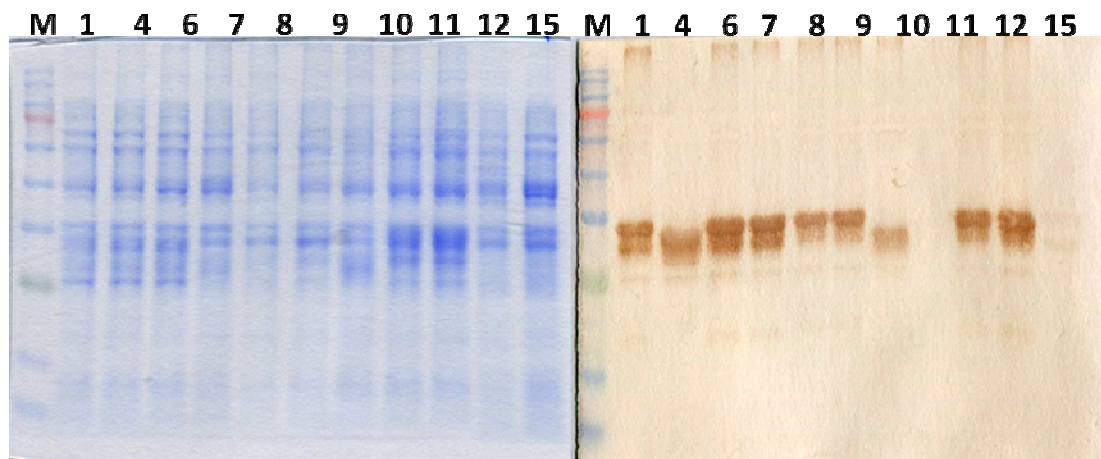


圖 4. 隨機抽取篩選後的細胞株重組 scFv 抗體的 SDS-PAGE 與 Western blot 分析。

M: pre-stained protein markers

Lane number : 之前隨機挑菌的編號 after the 3rd panning

PC : OmpA

1^oAby : Goat anti-chicken light chain 1 : 3000

2^oAby : Donkey anti-Goat IgG conjugated HRP 1 : 3000

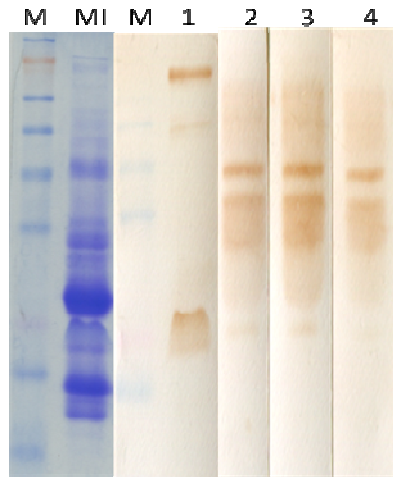


圖 5. 三個重組 scFv 抗體對 MI 蛇毒蛋白的辨識能力。

M : pre-stained protein markers

MI : 龜殼花 10 μ g

1^oAby :

1 : anti-MI poly IgY 1:3000

2 : 3S10 sup (after sonication) 1 : 10

3 : 4S09 sup (after sonication) 1 : 10

4 : 4S15 sup (after sonication) 1 : 10

2^oAby : 1 : Donkey anti-chicken IgY conjugated HRP 1 : 3000

2 ~ 4 : Goat anti-chicken light chain 1 : 3000

3^oAby : 2 ~ 4 : Donkey anti-Goat IgG conjugated HRP 1 : 3000

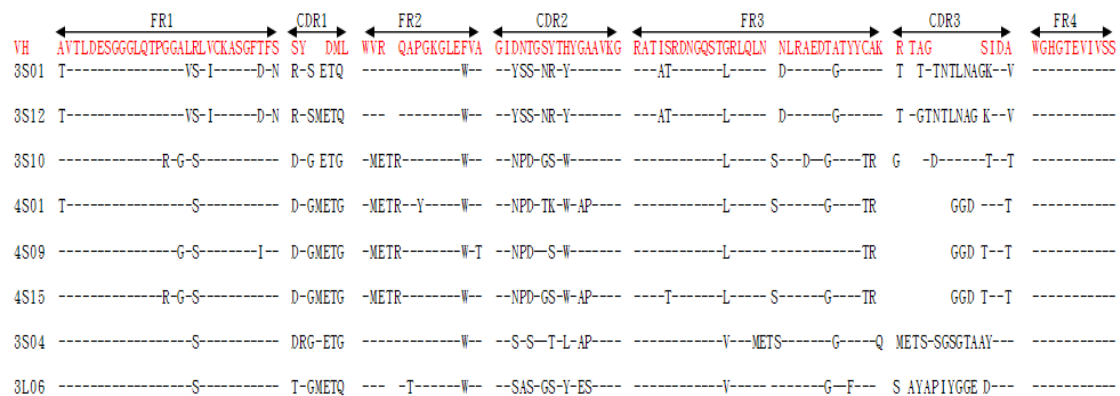


圖 6. scFv 的重鏈變異區基因分析

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	
VL	ALIQPSSVSANPGGTVKITC	SGDSS YYG	WYQQKAPGSAVPT	V IY	DNTNRPS	NIPSRFSGSKSGSTAILTIITGVRADNAVYYC	ASTDSSSTAG I	FGAGTILTVL
3S01	-----E-----	--TKRN--	-----S-----	SS-K--	-----Q-E-E--F-	G---TTGNV-MET	-----	-----
3S12	G-----E-----	--TKRN--	-----S-----	SS-K--	-----Q-E-E--F-	G---TTGNV-MET	-----	-----
3S15	---X---P-E-----	--TKRN--	-----S-----	SS-K--	-----Q-E-E--F-	G---TTGNV-MET	-----	-----
3S10	-----L-----	--GGG-N-	-----S-----	W-DK--	D-----S-----	QVE-E--	G-R--Y	VG-----
4S01	-----L-----	--GA GN-	-----S-V--MET-	W-DK--	-----T--S-----	Q--E--	G-R--	TYV-MET---A---
4S09	-----L-----	--GG GN-	-----S-----	W-DK--	D-----S-----	QVE-E--	G-R--	-YVG -
3S04	-----L-R-E-----	--S-G-S-	-----S-G--L--	Y-DK--	D-----T--S-----	Q-E-E--	GGY-N-	GG-----
3L06	-----E-----	--GSRD--	-----S-----	--R--	D-----A-----	Q--E--F-	G-Y-TTNG	--

圖 7. scFv 的輕鏈變異區基因分析

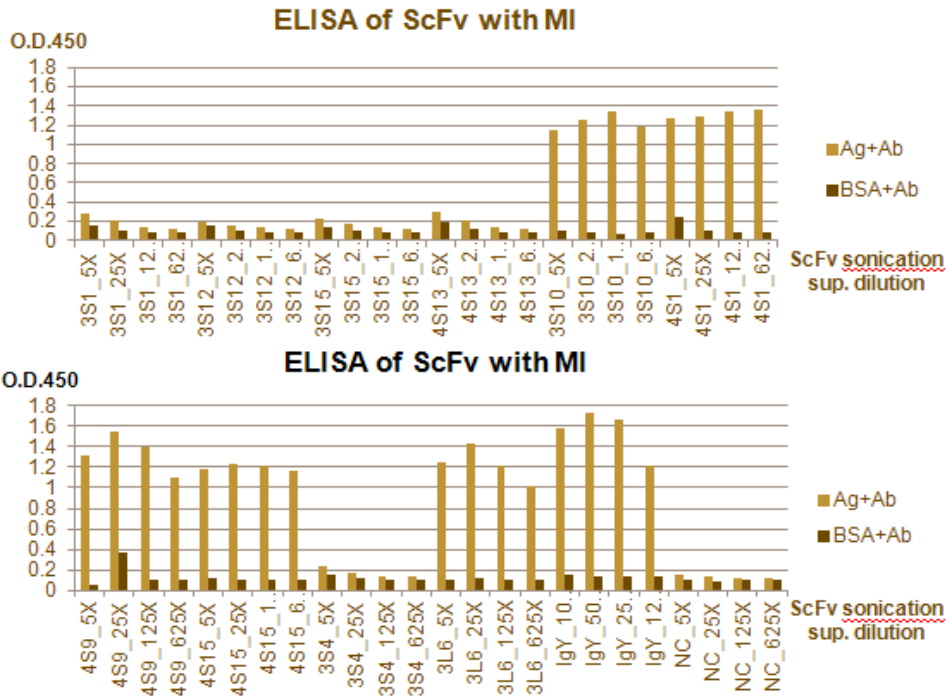


圖 8. 重組 scFv 抗體對 MI 蛇毒蛋白在 ELISA plates 的特異性結合能力。

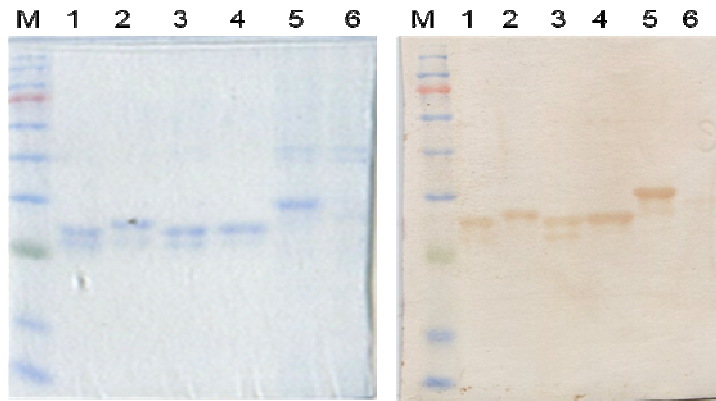


圖 9. 五個重組 scFv 抗體的表現、純化與分析。

M: pre-stained protein markers

1: 3S10 E2

2: 4S1 E2

3: 4S9 E2

4: 4S15 E2

5: 3L6 E1

6: OmpA E1

(sample 1 μ l / well)

1^o Aby: Goat anti-chicken light chain 1: 3000

2^o Aby: Donkey anti-Goat IgG 1: 5000

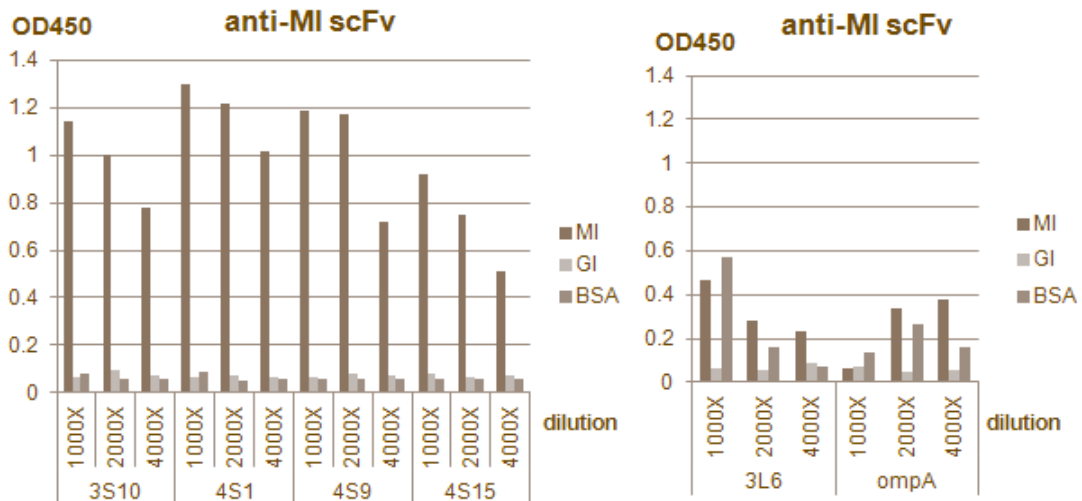


圖 10. 五個純化的 scFv 抗體對 MI 與 GI 蛇毒蛋白的 ELISA 分析。

1^o Ab: anti-MI scFv ; ompA as negative control

2^o Ab: Goat anti chicken light chain 1: 3000

3^o Ab: Donkey anti Goat conjugated HRP 1: 5000

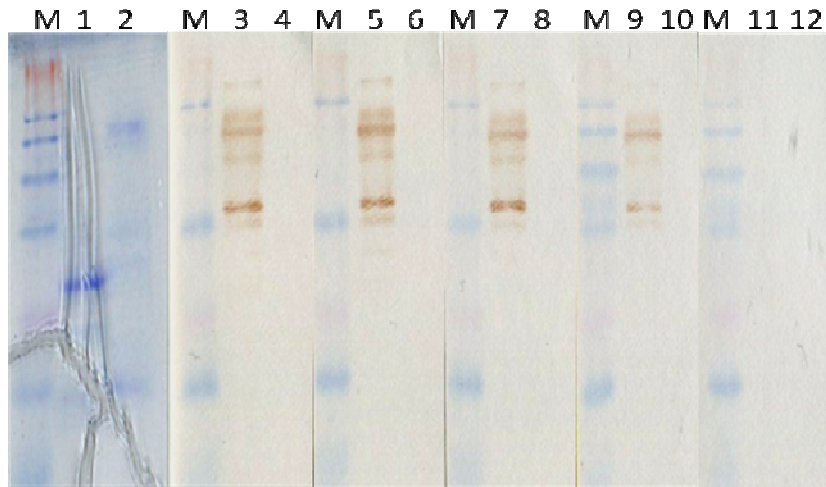


圖 11. 五個純化的 scFv 抗體對 MI 與 GI 蛇毒蛋白的 western blot 分析。

Lane 1.3.5.7.9.11: MI 5 μ g (9 月跑的膠)

Lane 2.4.6.8.10.12: GI 5 μ g (9 月跑的膠)

1[°] Aby:

Lane 9.10: #3S10 anti-MI scFv 1 : 1000

Lane 11.12: #4S1 anti-MI scFv 1 : 1000

Lane 13.14: #4S9 anti-MI scFv 1 : 1000

Lane 15.16: #4S15 anti-MI scFv 1 : 1000

Lane 17.18: #3L6 anti-MI scFv 1 : 1000

2[°] Aby:

Lane 9 - 18: Goat anti-chicken light chain 1: 3000

3[°] Aby:

Lane 9 - 18: Donkey anti-Goat IgG 1: 5000

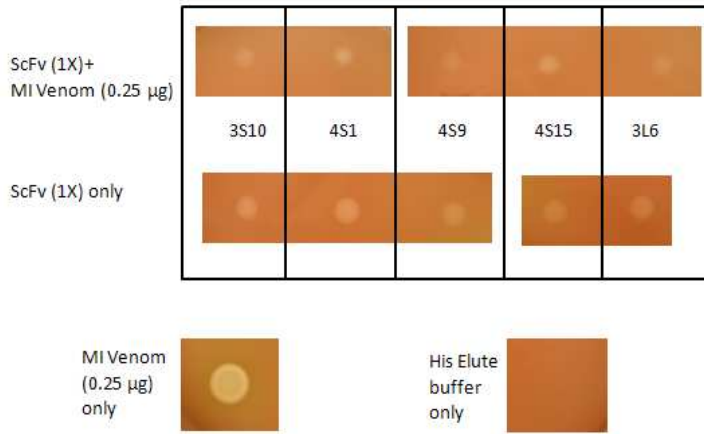
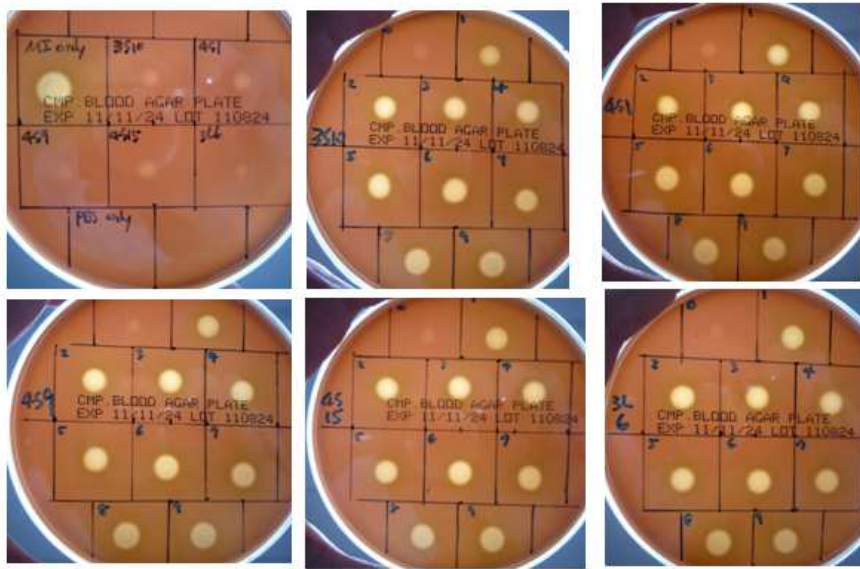


圖 12. 純化的重組 scFv 抗體抑制 MI 蛇毒蛋白的溶血作用。

S-link	Eluted phage (CFU/ μ l)	Amplified phage (PFU/ μ l)	L-link	Eluted phage (CFU/ μ l)	Amplified phage (PFU/ μ l)
origin	—	4×10^7	origin	—	1×10^7
1st	3.7×10^4	$> 10^{10}$	1st	6.8×10^4	$> 10^{10}$
2nd	8.1×10^3	2×10^{10}	2nd	8.0×10^3	3×10^{10}
3rd	2.1×10^5	$> 10^{10}$	3rd	1.2×10^5	$> 10^{10}$
4th	7.4×10^4	$> 10^{10}$	4th	9.8×10^4	$> 10^{10}$

表 1. 所建構的原始噬菌體展現抗體基因庫結果以及四次篩選的噬菌體含量 (titer)(MI-immunized 雞)。Eluted 出來的 phage titer 於第二次 panning 會略微下降，而第三與第四次在略微上升，而 amplified 的 phage 則大略皆為大於 10^{10} 。

VH		The same seq. clones
3S1	5/18	3S1、3S6、3S7、3S8、3S9
3S12	4/18	3S12、3S15、4S13、4S14
3S10	1/18	3S10
4S1	3/18	4S1、4S5、4S7
4S9	1/18	4S9
4S15	1/18	4S15
3S4	1/18	3S4
3L6	2/18	3L6、3L15

VL		The same seq. clones
3S1	5/18	3S1、3S6、3S7、3S8、3S9
3S12	1/18	3S12
3S15	1/18	3S15
4S13	2/18	4S13、4S14
3S10	1/18	3S10
4S1	3/18	4S1、4S5、4S7
4S9	2/8	4S9、4S15
3S4	1/18	3S4
3L6	2/18	3L6、3L15

表 2. 篩選後 scFv clone 的分類

MI	Eluted phage (CFU/ μ l)	Amplified phage (PFU/ μ l)
origin		1.9×10^7
1 st	1.2×10^5	$>10^{10}$
2 nd	9.0×10^3	$>10^{10}$
3 rd	7.4×10^3	$>10^{10}$
4 th	1.8×10^5	

GI	Eluted phage (CFU/ μ l)	Amplified phage (PFU/ μ l)
origin		1.9×10^7
1 st	3.2×10^5	$>10^{10}$
2 nd	2.5×10^4	$>10^{10}$
3 rd	9.0×10^4	$>10^{10}$
4 th	9.7×10^4	

表 3. 所建構的原始噬菌體展現抗體基因庫結果以及四次篩選的噬菌體含量 (titer)(MI/GI-immunized 雞)。目前正在進行 screening, scFv expression, purification and characterization 的實驗。

MI (10 µg/µl)	Each scFv (µl)	1×PBS (µl)	Total volume (µl)	Die in
23	23 × 5	12	150	31 min
23	—	127	150	23 min

表 4. 純化的重組 scFv 抗體延長 MI 蛇毒蛋白對小鼠的致死速率。

Mouse weight: 38 g

MI LD₅₀: 3 µg/g body weight; Doses: 2×LD₅₀: 228 µg MI

計畫名稱: 從具有高效價抗蛇毒多株 IgY 抗體的雞隻製備單鏈變異區片段(scFv)單株抗體的研究

1. 可供本局採行或參考之部分：

- (1) 此報告中製備單鏈變異區片段(scFv)單株抗體之技術，若受託單位能將技術移轉至本局，將可應用於其他部分。
- (2) scFv 抗體的中和效果目前還不是很清楚，另外動物實驗結果很重要，目前尚未看到抗體在老鼠體內的作用，需等到老鼠的結果才能判斷這些抗體的效用。
- (3) 雖然得到的單株抗體中和效果不是十分好，但具特異性，可以利用於檢驗試劑的開發。
- (4) 已得到可認識龜殼花和赤尾鮫蛇毒蛋白的抗體，可供做鑑別診斷的未來發展。
- (5) 溶血性試驗可進一步確認，抗體抑制蛇毒活性的能力，宜再加以討論。

2. 需修正之部分：

- (1) 動物中和試驗需多試幾次。
- (2) 中和試驗部分可嘗試用其它方法來証實。
- (3) 報告中最好不要用"似乎"等字眼，應該要確定或排除。

審查意見之回覆

1. 可供本局採行或參考之部分：

感謝委員的意見。

2. 需修正之部分：

- (1) 動物中和試驗需多試幾次。

感謝委員的建議。我們會再大量純化單株抗體以進行動物中和試驗。

(2) 中和試驗部分可嘗試用其它方法來証實。

體外試驗的部分目前仍以血液培養基(blood agar plate, BAP)為實驗材料來測試單株抗體中和溶血能力。而體內試驗會以 ICR 小鼠做為動物模式來進行。

(3) 報告中最好不要用”似乎”等字眼，應該要確定或排除。

感謝委員的建議。