

計畫編號：DOH92-DC-1057

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

開發台灣特有蛇種蛇毒檢驗試劑

研究報告

執行機構：國立中山大學生物醫學所

計畫主持人：張榮賢

研究人員：鄭蕙芬、陳青平

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

| | 頁 碼 |
|----------|-------|
| 一、 中文摘要 | (3) |
| 二、 英文摘要 | (4) |
| 三、 前言 | (5) |
| 四、 材料與方法 | (8) |
| 五、 結果 | (14) |
| 六、 討論 | (21) |
| 七、 結論與建議 | (24) |
| 八、 參考文獻 | (25) |
| 九、 圖表 | (29) |

共 (48) 頁

中文摘要

本計畫主要目的係在建立台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒快速檢驗試劑。 試劑組合以 Nitrocellulose membrane 為固定相，並於其上點放台灣眼鏡蛇 Cardiotoxin 3 及台灣雨傘節 β -bungarotoxin, 再以 HRP 標定抗體作為偵測試劑，以競爭方式在溶液中加入粗蛇毒為抗體結合競爭者，分析結果顯示當溶液中蛇毒濃度高於 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 時可有效抑制抗體和固定相抗原之結合反應。 分析此試劑組合架儲期，點放蛇毒之 Membrane 存放於 4-4 個月，HRP 標定抗體儲存於 -20-10 個月均未有明顯改變其偵測效果；兼顧靈敏度及反應時間，整體分析過程可於 1.5 小時內完成。

關鍵詞： 蛇毒、檢驗試劑、免疫點墨法、台灣眼鏡蛇毒、台灣雨傘節。

英文摘要

The aim of the present study is to establish a rapid diagnostic reagent for detecting *Naja naja atra* (Taiwan cobra) and *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait) venoms. The stationary phase of the kit was a nitrocellulose membrane in which the purified *N. naja atra* cardiotoxin 3 and *Bungarus multicinctus* β -bungarotoxin were dotted. The crude venom in solution was competed with the purified proteins on membrane for binding HRP-labeled anti- β -bungarotoxin antibodies or anti-cardiotoxin 3 antibodies. When the concentration of crude venom is higher than 0.1 $\mu\text{g/ml}$, the amount of antibodies bound with proteins on membrane is notably diminished. The reactivity of membrane's proteins is not significantly changed when it was stored at 4 °C on a dry state. In the meantime, the stability of HRP-labeled antibodies is up to 10 months. The overall detecting procedure could be finished within 1.5 hr without significantly altering the sensitivity.

Keywords: Snake venom, Diagnostic kit, Immunoblotting, *Naja naja atra*, *Bungarus multicinctus*.

前 言

本計劃係依據行政院衛生署疾病管制局 92 度科技發展研究重點「結合蛋白質體技術、單株抗體與酵素連結免疫螢光系統開發蛇種檢驗試劑」而釐定。計劃之目標則在開發台灣特有蛇種蛇毒之快速檢驗試劑。以酵素連結免疫反應試驗方法分析確認毒蛇咬傷已有多篇報告 (1-3)，其可行性亦可由被毒蛇咬傷人體血清中檢測出毒蛇蛋白而予以證實(4-6)，並且以酵素連結免疫反應試驗方法可正確區分 *Bothrops atrox* 及 *Lachesis muta muta* 兩種蛇毒也證實此方法之適用性(7)。

蛇毒蛋白內含多樣蛋白成分，台灣常見的毒蛇有眼鏡蛇、雨傘節、龜殼花、百步蛇、赤尾鮎、鎖鏈蛇；前兩者致死因子為神經毒，龜殼花、百步蛇及赤尾鮎蛇毒為出血毒，而鎖鏈蛇毒則兼具有神經毒與出血毒。為有效區分不同毒蛇咬傷，以利後續抗血清之治療，端賴正確快速的檢驗系統，因此利用其專一特有成份作為偵測目標，製備特異性極佳之抗體，將可有效達成此一目標。隨著蛋白質體技術的進步，以二維電泳、質譜分析及蛋白質定序，可有效分析鑑認蛇種蛇毒內所含有之專一性蛋白質成份。

在先前研究工作中，我們以台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒粗蛇毒免疫產生抗體，以直接酵素連結免疫反應試驗方法分析其與粗蛇毒之

免疫反應性，顯示此兩種抗體對兩種粗蛇毒具有交叉反應性，其他實驗室在檢測其他蛇毒蛋白也觀測到同樣結果(8-11)，更顯示專一標記蛋白質在鑑認系統的重要性。 分離純化台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒之成分可見其至少含有數十種以上蛋白質成分，但是截至目前對其成分之瞭解，主要集中在低分子量蛋白質之研究，台灣眼鏡蛇蛇毒中主要有神經毒素（Cobrotoxin），心臟毒素（Cardiotoxins）及 Phospholipase A₂ (12)，而在台灣雨傘節蛇毒則以神經毒 α -Bungarotoxin、 β -Bungarotoxin 及 Phospholipase A₂ 研究較為透徹(13)，這些成分總合佔有蛇毒蛋白中的成分至少 30~50%以上，比對蛋白質一級結構可見不同蛇種相同功能之蛋白在 amino acid sequence 有明顯差異(14-16)，因此如以此免疫製備抗體其抗體應可有效區分這兩種蛇種和其他台灣特有蛇種之蛇毒蛋白。 因此本計劃使用純化台灣眼鏡蛇心臟毒素 Cardiotoxin，以及臺灣雨傘節蛇毒神經毒 β -Bungarotoxin 作為抗原免疫產生抗體，開發快速檢驗試劑。

抗體的製備主要可分為單株抗體(Monoclonal antibody)及多源抗體(Polyclonal antibody)，單株抗體的製備來自融合瘤(Hybridoma)，而多源抗體則來自免疫動物(如兔子)所得，單株抗體優於多源抗體之處乃來自其特異性及預期源源不斷的抗體，然而單株抗體未必一定可以成功製備，且成功製備的單株抗體不一定具有高親和性。 另外解

決之道則可靠著結合不同抗原決定基片段之親和性管柱作為純化系統，將多源抗體予以單純化，也可達到類似單株抗体特異性的特點，在本計畫中我們也嘗試以分子生物的技术製備 Cardiotoxin 重組蛋白質及重組 β -Bungarotoxin Bchain 蛋白質並將之用於單純化抗體使之認知特定之抗原決定基。本計畫主要著眼點係在快速與簡便之檢測方法，因此首重應在減少其實驗步驟，ELISA plates 步驟較為煩瑣，因此計畫之進行擬以 Dot blotting 方式進行，我們以純化之蛇毒蛋白質製成檢測條狀之 Nitrocellulose membrane 為檢測工作平台(圖一)，將所欲檢測樣品與抗體先行混合再行加入與點有抗原之 Membrane 反應，如有競爭抗原存在，則抗體無法與 Membrane 上之抗原結合，如此便無法偵測其與抗體之反應。為達成上述目標，有如下方向可以進行 (1) 抗體的加入量必需予適當化，加入量愈小愈好，以免無法被競爭掉而與 Membrane 上抗原反應，但以不影響偵測靈敏度為原則。(2) 偵測抗體靈敏度必需予以提升，以 Horseradish peroxidase (HRP)標定之抗蛇毒蛋白抗體結合 Membrane 上之抗原後，使用高靈敏度呈色方法。(3) 將抗蛇毒蛋白抗體直接標上 Colloidal Gold 反應之，可省去呈色步驟。接續並評估各個試劑之架儲期與其簡便性，以達成開發快速檢測試劑的目標。

材料及方法

一、 材料

Protein A-HRP, Nitrocellulose membrane (購自 Bio-Rad 公司)

CNBr-activated Sepharose 4B, Protein A-Sepharose CL-6B, S-200 Sephacel, Sephadex G-50, SP-Sephadex C-25, His-Bind Resin (購自 Amersham Pharmacia biotech 公司)

Ammonium acetate, Sodium phosphate, Tris, Glycine, Sodium citrate, Tween-20, Sodium chloride, Sodium bicarbonate, H₂O₂ , NaIO₄, LB medium, NaOH (購自 Merck 公司)

Horseradish peroxidase (HRP), NaBH₄, Diaminobenzidine, Chloronaphthol (購自 Sigma Chemical Co.)

Colloidal gold (購自 Aurion 公司)

PVDF membrane (購自 Millipore 公司)

二、 蛇毒蛋白之純化

根據本實驗室先前發表方法(12,13), 由台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節蛇毒內分別純化 Cardiotoxin (CTX3)及 β -Bungarotoxin (β -Bgt), 以 SP-Sephadex C-25 進行離子交換樹脂分離。

台灣眼鏡蛇蛇毒 5 g 溶解於 10 ml 1% acetic acid , 通入 Sephadex G-50 (2 × 200 cm)管柱, 以 1% acetic acid 為洗滌液, 收集

分子量小於 20 kDa 之蛋白質冷凍乾燥 將上述蛋白質溶於 0.005 M Sodium phosphate (pH 7.0) 緩衝溶劑 2400 ml 改變內含鹽類濃度由 0 至 0.5 M 將蛇毒於 SP-Sephadex C-25 column (2.5 × 95 cm) 分離，收集 CTX3 並進一步以高壓液相層析管柱 SynChropak RP-P (4.6mm×25cm) 純化之。

台灣雨傘節蛇毒 1 g 溶於 10 ml 之 0.05 M Sodium acetate 緩衝溶劑(pH 5.8)，通入以同樣緩衝溶劑平衡之 SP-Sephadex C-25 管柱(2.5 × 95 cm)，首先利用同濃度緩衝溶劑洗滌，再經由兩次遞增濃度溶出：第一階段使用 0.05 M Sodium acetate (pH 5.8)，遞增鹽濃度至 0.5 M Sodium acetate (pH 7.0)；第二階段使用 0.5 M Sodium acetate (pH 7.0) 增加鹽濃度至 1 M Sodium acetate。 收集β-Bgt 冷凍乾燥，並進一步以高壓層析管柱 SynChropak RP-P (4.6mm × 25cm) 純化之。

二、製備抗體

將純化之蛇毒蛋白分別免疫兔子，將蛋白質與 Complete adjuvant 混合後以皮下注射，每週免疫一次，逐次增加抗原量(由 22.5 μg 遞增至 1539 μg)，最後一次免疫後隔九天取血，以 Immunodiffusion 分析是否免疫成功。

三、親和性層析分離純化抗體

根據我們先前實驗步驟(17-19)，將連結有蛇毒蛋白之 CNBr-activated Sepharose 4B 充填成親和性層析管柱，將經 30%~50% Ammonium sulfate 沈澱及透析後的抗體通入，以 10 mM Tris (pH 8.0) 緩衝液平衡管柱，以 10 mM Tris (pH 8.0) + 0.5 M NaCl 將非特異性結合蛋白由管柱去除後，再以 0.1 M Glycine (pH 2.5)將吸附抗體洗出，並以 0.1 M Tris (pH 8.0) 中和之，透析後得到純化之抗體。

以 Protein-A-Sepharose CL-6B 純化抗體時，首先將抗體溶液加入 1 M Tris (pH 8.0),使 Tris 終濃度為 0.1 M 再加入管柱,以 100 mM Tris (pH 8.0)及 10 mM Tris (pH 8.0)分別沖洗 10 倍管柱體積，去除非特異性結合蛋白後，再以 50 mM Glycine (pH 3.0)將吸附抗體洗出，立即以十分之一體積 1M Tris (pH 8.0)中和之，透析後得到純化之抗體。

四、以山葵過氧化酵素(Horseradish peroxidase, HRP)標定抗體

根據 Wilson 及 Nakane 方法(20)進行此實驗，將山葵過氧化酵素與 NaIO_4 混合後，在室溫反應 20 分鐘，再以醋酸透析一晚。取出山葵過氧化酶加入碳酸鈉，pH 調至 9~9.5，加入 8 mg 抗體，在 4 進行反應兩小時，以 S-200 Sephacel 管柱，進行膠過濾純化，收集在 280nm 及 403nm 均有吸收之蛋白質分劃。

五、製備 Gold-labeled 之抗體

根據 Shyu 等人方法 (21)進行，將抗體(1 mg/ml)溶於水中，再加入 10 ml 調過 pH 之 Colloidal gold 溶液中(10 ml Colloidal gold 加入 70 μ l K_2CO_3 調 pH)，溫和攪拌反應 4 分鐘後，加入 10 % BSA 1 ml，繼續反應 30 min，離心 14,500 rpm 45 分鐘後，將沉澱物以 1 ml PBS 重新懸浮，加入 20 μ l 2 % PEG 增加抗體製劑的穩定性。

將 200 μ l gold-labeled 抗體混合 4 ml PBS，與標有蛇毒蛋白之 Membrane 反應 1 hr，直接目視即可看見粉紅色反應色帶，如果呈色不夠明顯，再以 Photochemical silver staining 方式增強其靈敏度，使用的 kit 為 Inten SE BL (Amersham Pharmacia biotech)。

六、 免疫點墨法 (Dot blotting)

呈色受質為 Diaminobezidine + Chloronaphthol (22)或使用冷光受質 SuperSignal WestPico Chemiluminescent substrate (Pierce Co.)。將不同濃度之粗蛇毒及純化蛇毒溶液置入 Amersham Pharmacia biotech 公司製造之 Blot filtration manifolds，將蛋白質吸附於 Nitrocellulose membrane 或 PVDF membrane，抽真空至溶液完全通過後，再加入 PBS 緩衝液 200 μ l，再度抽真空至所有溶液通過 Membrane，取下 Membrane 以脫脂奶粉阻斷非特異吸附部位，分別加入不同濃度之抗體於 37 反應 2 小時，以 PBS-Tween 清洗 plate，再

加 ProteinA-HRP (3000×稀釋),同樣於 37 °C 反應 2 小時,以 PBS-Tween 清洗 3 次之後,加入呈色受質呈色。 加抗體處也另以標有 HRP 之抗體為之,如此可以減少 Protein A-HRP 反應步驟。

七、重組 CTX3 蛋白之製備

根據我們先前發表方法(23)將在 pET20b(+) CTX3 cDNA,以 PCR 方式產製具有 *EcoRV* 及 *EcoRI* 切位之 CTX3 cDNA 後,裝入 pET30a(+) 表現載體內, transform 入 *E.coli* BL21(DE3),在將此菌種放入含 200 µg/ml Ampicillin LB medium 中培養,在 37 °C 至 $A_{550} = 8.0$,加入 1mM Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside,繼續培養 4 小時,將細胞離心收集,以 Sonication 將細胞打破,取上清液通入 His-Bind Resin 純化,以水透析再分別冷凍乾燥,取適量蛋白質進行 SDS-PAGE 及 Western blotting 之分析。

八、重組β-Bungarotoxin B chain 蛋白之製備

根據本實驗室先前發表的方法(24,25),將含有β-Bgt B chain 之 DNA fragments 裝入 pET32a(+)表現載體內, transform 入 *E.coli* BL21(DE3),再將此菌種放入含 200 µg/ml Ampicillin LB medium 中培養,在 37 °C 至 $A_{550} = 8.0$,加入 1mM Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside,繼續培養 4 小時,將細胞離心收集打破,β-Bgt 之 B chain 表現蛋白

為 Soluble form , 以 His-Bind Resin 純化之。

結果

一、以 Protein A-HRP 偵測抗原及抗體反應

我們先前的研究工作，顯示以台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節粗蛇毒免疫所得的抗體，可產生交叉反應，因而降低其反應的靈敏度，因此改用純化的台灣眼鏡蛇 CTX3 及台灣雨傘節 β -Bgt 分別免疫產生抗體，由於 β -Bgt 具有高神經毒性，因此先以 *p*-bromophenacyl bromide 修飾降低其毒性，再用以免疫兔子產生抗體。

將免疫所取得血清以 Protein A-affinity column 純化其內所含有 IgG，由 Anti- β -Bgt 抗血清中純化每 ml 可取得 14.5 mg IgG，而由 Anti-CTX-3 抗血清中每 ml 產率為 13.3 mg IgG。為測試此 IgG 確實可分別認知台灣眼鏡蛇毒，台灣雨傘節粗蛇毒及純化的 CTX3 與 β -Bgt，我們首先以 Protein A-HRP 作為分析抗原及抗體反應的偵測劑，如圖二所示以 0.2 mg/10 ml 的抗體濃度與點放有不同濃度蛋白質的 Nitrocellulose membrane 反應，可見其偵測靈敏度可達約 0.015 μ g，而 Anti-CTX3 抗體或 Anti- β -Bgt 抗體均只在高濃度粗蛇毒，才產生非特異性反應，如 Anti- β -Bgt 抗體只有在 15 μ g 台灣眼鏡蛇粗蛇毒才會與其產生交叉反應，同樣 Anti-CTX-3 抗體只有在 15 μ g 台灣雨傘節蛇毒時才會產生反應，但交叉反應之呈色程度還是低於 Anti- β -Bgt 抗體和台灣雨傘節蛇毒反應或 Anti-CTX3 抗體和台灣眼鏡蛇蛇毒反

應。

二、以 HRP 標定之抗體偵測蛇毒蛋白質

由於在 Blotting 過程中，每加入一次試劑，必須要將上一階段試劑予以清洗以免影響下一階段之反應，如以 Protein A-HRP 為偵測試劑則加入一級抗體反應後需再清洗去除抗體，才能加入 Protein A-HRP，此時 Protein A-HRP 僅會和 Membrane 上的抗體反應，而不會受到溶液中抗體的干擾影響其有效反應濃度，因此如能以 HRP 標定抗體代替，至少可減省 3~4 hr 的反應時間。如圖三所示以 HRP 分別標定抗體後，以膠過濾方式分離，前面大波峰同時具有 280 nm 及 403 nm 波長的吸收，為 HRP 及抗體的連接體，Rz 比值(280 nm/403 nm)約為 0.3~0.4 顯示為 1:1 連接體，此一標定 HRP 抗體可同時取代一級抗體及 Protein A-HRP。

將抗體-HRP 與點有抗原的 Membrane 進行反應，如圖四所示 Anti- β -Bgt Ab-HRP 其靈敏度可達 0.015 μ g 抗原蛋白，但使用相同濃度 Anti-CTX3-Ab-HRP，其靈敏度則約有 10 倍差距，僅達 0.15 μ g，但可見此二種標定 HRP 之抗體其非特異性反應如 Anti- β -Bgt-Ab-HRP 與台灣眼鏡蛇粗蛇毒或 Anti-CTX3-Ab-HRP 與台灣雨傘節蛇毒非特異性反應均明顯降低。

在呈色反應時主要以 Diaminobenzidine/Chloronaphthol 為之，並另以冷光方式以 X 光底片呈影檢測，由圖五所示其呈現強度確實比呈色方式為佳，同時在靈敏度反應上也確實比呈色反應好，但是由於冷光方式必須在暗房壓片呈影，對開發成為簡便之檢測試劑有其不利點。

Gold-labeled 抗體用於偵測抗原之反應時，由於其與抗原之反應可直接目測粉紅色色帶觀測得之，因此可進一步減省呈色步驟反應，將 Anti- β -Bgt 抗體及 Anti-CTX3 抗體分別和 Colloidal gold 溶液反應後，分別製得 Gold-labeled Anti- β -Bgt 抗體及 Anti-CTX3 抗體。將此抗體製劑和點有抗原之 Membrane 反應，由圖六可見其與粗蛇毒之反應靈敏度為 1.5 μg ，而 Anti-Bgt 抗體與台灣雨傘節蛇毒之特異反應優於 Anti-CTX3 抗體和台灣眼鏡蛇毒反應性，此外 Gold-labeled Anti-CTX3 抗體的穩定性亦較 Gold-labeled Anti- β -Bgt 抗體穩定性差，擺置二個月後即可見有抗體沉澱產生。

進一步以競爭性方式，評估 Gold-labeled Anti- β -Bgt 抗體之適用性，如圖七所示，將 Membrane 上點有 1.5 μg 台灣雨傘節粗蛇毒後，分別在溶液中加入 200 μl 抗體製劑及不同濃度台灣雨傘節粗蛇毒(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，在 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 粗蛇毒存在下時，其呈色強度仍較對照組為弱，可見本分析方法能有效檢測溶液中是否含有台

灣雨傘節蛇毒。

三、以 β -Bgt 或 CTX-3 親和性管柱純化之抗體作為檢測試劑

由於上述抗體係以 Protein- A 管柱純化,所純化之抗體為血清中 Total IgG,因此推想 CTX3 抗體反應不佳是否由於特異性抗體所佔比例不高所致,因而改用 β -Bgt 親和性管柱或 CTX3 親和性管柱分別純化血清中抗體。結果顯示在 Anti- β -Bgt 血清及 Anti-CTX3 血清中分別純化得到抗體產率為 5.5 mg/ml 及 2.2 mg/ml,此一事實似乎顯示 Total IgG 反應不佳應與特異性抗體量不同相關。將此抗體(200 μ g/10 ml)與點有蛇毒蛋白之 Membrane 反應可見其反應性及特異性均較以 Protein-A 管柱純化之抗體好(圖八)。

以 HRP 標定此特異性抗體進行反應,如圖九所示其靈敏度對粗蛇毒為 0.015 μ g,但對純化蛇毒反應性反而不如對粗蛇毒,如對 β -Bgt 為 0.15 μ g,但對 CTX3 則在 1.5 μ g,此一事實可能反應出此兩種抗體對抗原具有不同親和性。進一步以 Gold-labeled 抗體進行反應如 Silver-enhancing 試劑增加其反應可見其靈敏度為 1.5 μ g (圖十),但對純化蛇毒則可進一步提高至 0.015 μ g,以競爭性反應為之與對照組相對,可見在 0.1 μ g/ml 粗蛇毒存在下可有效影響 Gold-labeled 抗體和抗原之反應 (圖十一)。

如以 HRP-label 抗體進行同樣之競爭性實驗，以呈色方式為之(圖十二)，可見在 1 $\mu\text{g/ml}$ 粗蛇毒蛋白存在下，和對照組相較可有效區分溶液中是否含有蛇毒蛋白，比較 CTX3 抗體及 β -Bgt 抗體，可見 β -Bgt 抗體之靈敏度優於 CTX3 抗體。 如以純化之 CTX3 或 β -Bgt 代替粗蛇毒點放至 Membrane 上時，以粗蛇毒作為競爭者進行相同反應，可見 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 粗蛇毒濃度時能有效區分溶液中是否含有台灣雨傘節或台灣眼鏡蛇粗蛇毒(圖十三)。 若以冷光受質呈影時，其強度比之呈色方式為強，但靈敏度並未有進一步提高(圖十四)。

四、反應條件及儲存條件之評估

為評估反應時間是否能進一步縮短，將點放 CTX3 及 β -Bgt 的 Membrane 和 Anti-CTX3 Ab-HRP 或 Anti- β -Bgt Ab-HRP 反應不同時間後予以呈色，如圖十五所示反應時間由 0.5、1、1.5 及 2 hr 相較，1 hr 即可有不錯呈色效果，顯然利用競爭方式為之，加上呈色所需時間，可在 1.5 hr 左右觀測其結果，以競爭方式為之其靈敏度並沒有因延長反應時間而有進一步增加。

將 Membrane 點放純化蛇毒蛋白後保存於 PBS 溶液或乾燥以保鮮袋保存於 4、4 個月後，分析其與標定 HRP 或標定 Colloidal Gold 抗體之反應，結果和新鮮製備的 Membrane 並沒有明顯反應性的差異(圖十六)，顯然此種保存條件足夠確保 Membrane 之可用性。

在上述使用的 Membrane 均為 Nitrocellulose membrane，因此乾燥後再與抗體反應前，只要再以 PBS buffer 浸潤即可使用。我們也另以 PVDF membrane 進行同樣實驗，PVDF 在點放蛋白質前須以 Methanol 浸潤，才可吸附水溶液及蛋白質樣品，如同 Nitrocellulose membrane 進行同樣檢測步驟，其靈敏度劣於 Nitrocellulose membrane 之結果，僅達 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 樣品濃度。如果乾燥後以 Methanol 浸潤，再以 PBS 浸潤後與 HRP 標定抗體反應，其靈敏度進一步下降，同時 Membrane 也呈現高背景值的呈色效果。

五、以 CTX3 及 β -Bgt B chain 重組蛋白分離認知不同抗原決定基之抗體

如圖十七所示，驗孕試紙的基本原理乃在於利用認知不同抗原決定基之抗體，其中之一為 Gold-labeled 抗體，當樣品溶液加入時，其結合樣品同時移行，由於樣品也可同時結合另一抗體，因此此時在另一抗體所在位置會呈現色帶。一般進行此實驗時，均使用兩種認知不同抗原決定基之單株抗體，但本計畫中則製備 CTX3 重組蛋白及 β -Bgt Bchain 重組蛋白，利用其將抗體分成認知不同抗原決定基之分劃。將 Anti- β -Bgt 抗體先通過 B chain 重組蛋白親和性管柱，不結合的部分再通過 β -Bgt 親和性管柱(圖十八)，將此抗體分為兩分劃以 Western blotting 分析(圖十九)，可見經由此步驟，可將此抗體區分為

認知 β -Bgt B chain 抗體及 A chain 抗體，B chain 抗體約佔總抗體量 (47.7%)。將 CTX3 的 cDNA 以突變方式去除其碳端一對雙硫鍵 (C54-C59 突變為 Ser)，其後以 *EcoR* V 及 *EcoR* I sites 裝載入 pET30a(+) 表現，將抗體先行通過重組 CTX3 (C5459S) 親和性管柱，不結合抗體再以 CTX3 親合性管柱純化，其中會與重組 CTX3(C5459S) 親和性管柱結合之抗體佔所有抗體比例為 22%。如圖二十所示，結合重組蛋白之抗體確實可與重組蛋白反應，但未與 CTX-3(C5459S) 結合之抗體仍可與高濃度 CTX-3(C5459S) 反應。

討論

本計畫主要目的係在建立快速及方便的蛇毒檢驗試劑，比較使用 Membrane 的固定相，以 Nitrocellulose membrane 的使用效果優於 PVDF membrane，主要的根本原因在於 PVDF membrane 以水溶液浸潤前均需以 Methanol 浸潤，如果點放有蛋白質的 Membrane 乾燥後，再以 Methanol 浸潤可能會影響蛋白質和抗體之反應性。在 Membrane blocking 步驟中使用脫脂奶粉作為 Blocking 試劑，由於再度以 Methanol 浸潤可能使其蛋白質變性，因而與抗體產生非特異性反應而呈高背景呈色，此一事實使得 PVDF membrane 並不適用於此試劑組合之開發。Nitrocellulose membrane 易於乾燥，也易於使用水溶液予以再浸潤和抗體試劑進一步反應，這些優點使 Nitrocellulose membrane 為固定相最佳化之選擇。

使用 HRP 或 Colloidal gold 標定抗體，實驗結果顯示 HRP 抗體靈敏度優於 Colloidal gold 標定抗體，此外 Colloidal gold 的保存架儲期也不如 HRP 標定抗體。HRP 標定抗體可保存在 -70°C ，在本計畫中我們已有 10 個月的保存過程仍有極佳反應性，但 Colloidal gold 標定抗體則要保存在 4°C ，且架儲期只有半年左右，因此增加 Colloidal gold 標定抗體的穩定性，才可能有效提升其適用性。與 HRP 抗體比較兩者實用性，HRP 標定抗體尚需呈色步驟，而 Colloidal gold 標定

抗體則可隨反應時間增長由粉紅色色帶觀測是否有反應，兩者相較似乎 Gold-label 抗體也有實用價值，但其製劑的不穩定性則為其缺憾。以 HRP 標定抗體反應，其反應可以呈色或冷光受質壓片觀察，冷光受質壓片可使訊號增強，但其有效靈敏度並未超越呈色方法，考慮壓片過程需要於暗房中進行，此一不方便性反應使用呈色方式便利性的優勢。

以 Protein A 管柱或特異性蛋白結合之親和性管柱純化抗體，但 Protein A 管柱純化者為血清中的 Total IgG，其他 IgG 的干擾使得抗體製劑反應性不佳，因此就開發檢驗試劑觀點視之，以特異性蛋白之親和性管柱純化抗體有其必要性。

在本計畫中我們也證明使用分子生物方式製備重組蛋白，可將抗體分成認知不同抗原決定基之抗體分劃，為將來開發如驗孕試劑組合提供基礎準備工作。具有高親和性的抗體是此試劑組合成功的必要條件，比較 β -Bgt 抗體和 CTX3 抗體，顯示 β -Bgt 抗體和 β -Bgt 結合之親和性優於 CTX3 抗體和 CTX3 之結合反應，此一事實是否反應出免疫過程個體的差異性，或者 β -Bgt 較易誘導高親和性之抗體，均有待將來進一步之探索。

在本研究中我們偵測的靈敏度，對純化蛇毒以非競爭型方式偵測靈敏度大約在 0.015 μ g/ml 也就 15 ng/ml，若以競爭型式為之則靈

敏度約在 0.1 $\mu\text{g/ml}$, Hung 等人(26)的論文指出其偵測台灣眼鏡蛇粗蛇毒靈敏度在 1 ng/ml 。 我們方法與其方法的差異性，在於其用非競爭型方式 ELISA，其實驗流程至少需要 6hr 以上，而我們使用 Dot blotting 方法為之，實驗步驟可在 1.5 hr 完成檢驗，而且 ELISA 處理過程遠比 Dot blotting 繁複，因此相較之下我們使用 Dot blotting 的方式確已達成快速檢驗試劑的初步目標。

結論與建議

1. 使用 Nitrocellulose membrane 為固定相，並以 HRP 標定之特異性抗體作為檢測試劑，此種試劑組合已達到快速檢驗試劑的開發目標。
2. 使用上述組合，以競爭方式為之，可在 1.5 小時內完成測試樣品溶液內是否含有蛇毒蛋白。
3. 在本計畫期限內測試點放蛋白質的 Nitrocellulose membrane 架儲期可超過 4 個月以上的穩定性，而 HRP 標定抗體超過 10 個月以上的穩定性。
4. Gold-labeled 抗體穩定性尚待克服，如能增加其穩定性，以其作為檢驗試劑組合的可行性是可被期待的。
5. 本研究顯示可結合重組蛋白及蛇毒蛋白，將抗體分為認知不同抗原決定基之抗體分劃，對將來開發如驗孕試劑方式組合試劑，提供了基礎準備事項，也提供除使用單株抗體外另一可行的思考方向。

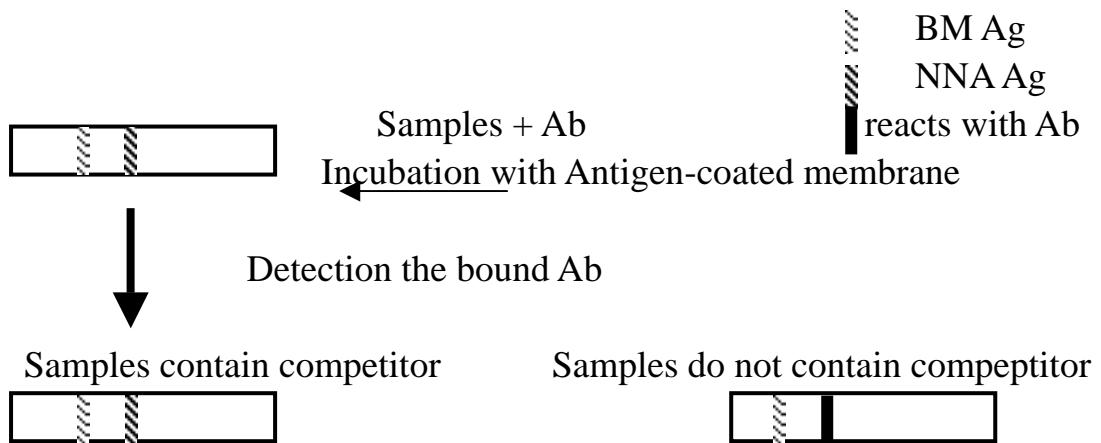
參考文獻

1. Theakston RD, Lloyd-Jones MJ, Reid HA: Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. *Lancet* 1977; 24: 639-41.
2. Ho M, Warrell MJ, Warrell DA, Bidwell D, Voller A: A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snake bite. *Toxicon* 1986; 24:211-21.
3. Selvanayagam ZE, Gopalakrishnakone P: Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997). *Toxicon* 1999;37:565-86.
4. Viravan C, Veeravat U, Warrell MJ, Theakston RD, Warrell DA: ELISA confirmation of acute and past envenoming by the monocellate Thai cobra (*Naja kaouthia*). *Am J Trop Hyg.* 1986; 35:173-81.
5. Li Q, Ownby CL: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for identification of venoms from snakes in *Agkistroon* genus. *Toxicon* 1994; 32:1315-25.
6. Bucher B, Canonge D, Thomas L, Tyburn B, Robbe-Vincent A, Choumet V, Bon C, Ketterle J, Lang J: Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. Research Group on Snake Bites in Martinique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91:186-90.
7. Chavez-Olortegui C, Lopes CS, Cordeiro FD, Granier C, Diniz CR: An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venoms. *Toxicon* 1993; 31: 417-25.
8. Khoo O, Pakmanee N, Chanhom L, Spiprapat S, Omori-Satoh T, Sitprija VC: Cross-neutralization of Thai cobra (*Naja kaouthia*) and spitting cobra (*Naja siamensis*) venoms by Thai cobra antivenom. *Toxicon* 1997; 35: 1649-51.

9. Pamanee N, Khow O, Wongtongkam N, Omori-Satoh T, Sitprija V: Efficacy and cross reactivity of Thai green pit viper antivenom among venoms of *Trimeresurus* species in Thailand and Japan. *J Nat Toxins* 1998; 7:173-83.
10. de Roodt AR, Dolab JA, Fernandez T, Sergre L, Hojos SE: Cross-reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. *Toxicon* 1998; 36:1025-38.
11. Bogarin G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, Guidolin R, Rojas G, Higashi HG, Gutierrez JM: Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 2000; 38:1429-41.
12. Chang LS, Lin SR, Chang CC: Unfolding/folding studies on cobrotoxin from Taiwan cobra venom: pH and GSH/GSSG govern disulfide isomerization at the C-terminus. *Arch Biochem Biophys* 1998; 354:1-8.
13. Yang CC, Chang LS: Tryptophan modification of phospholipase A₂ enzymes and presynaptic neurotoxins from snake venom. *J Protein Chem* 1984; 3:195-213.
14. Endo T, Tamiya N: Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venom. *Snake Toxins* (Harvey AL, ed.) 1991; pp. 165-222, Pergamon Press, New York.
15. Dufton MJ, Hider RC: The structure and pharmacology of elapid cytotoxins. *Snake Toxins* (Harvey AL, ed.) 1991; 259-302, Pergamon Press, New York.
16. Harris JB: Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Snake Toxins* (Harvey AL, ed.) 1991; 91-130, Pergamon Press, New York.
17. Chang LS, Kuo KW, Lin J, Lin SR, Chang CC: Analysis of conformation-independent epitope and conformational epitope in

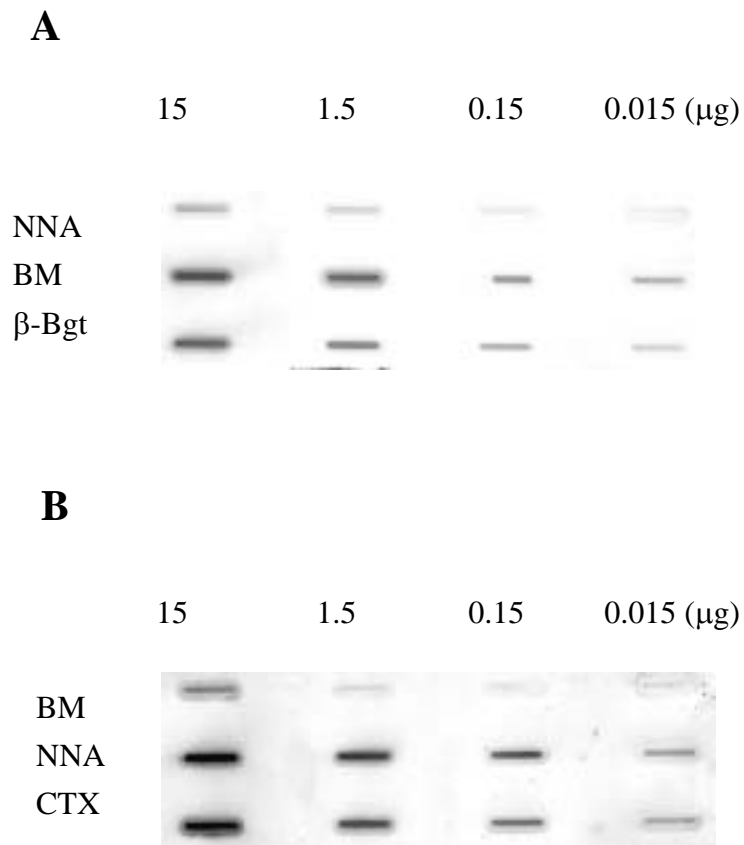
- protein: a study on cobrotoxin from Taiwan cobra venom. *J Biochem* 1995; 117: 863-68.
18. Chang, LS, Lin J, Chang CC: Evidence showing a different repertoire of antibodies against unfolded cobrotoxin in anticobrotoxin and anti-reduced and S-carboxymethylated cobrotoxin antisera. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35:733-38.
 19. Chang, LS, Lin J, Kuo KW, Lin SR, Chang CC: Characterization of epitopes in native and unfolded cobrotoxin: evidence showing an immunodominant C-terminal region related to the production of precipitating and non-precipitating antibodies against cobrotoxin. *J Biochem* 1995;118:686-92.
 20. Wilson MB, Nakane PK: *Immunofluorescence and related staining techniques* 1978; 215-24, Elsevier/North-Holl and Biomedical Press, The Nertherlands.
 21. Shyu RH, Shyu HF, Liu HW, Tang SS: Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon* 2002; 40:255-58.
 22. Young PR: an improved method for the detection of peroxidase conjugated antibodies on immunoblots. *J Virol Methods* 1989;24:227-36.
 23. Chang LS, Wu PF, Lin J: cDNA sequence analysis and expression of cardiotoxins from Taiwan cobra. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:116-21.
 24. Chang LS, Wu PF, Chang CC: cDNA sequence analysis and mutagenesis studies on the A chain of β -bungarotoxin from Taiwan banded krait. *J. Protein Chem* 1996;15:755-61.
 25. Wu PF, Wu SN, Chang CC, Chang LS: Cloning and functional expression of B chains of β -bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait). *Biochem J* 1998;334:87-92.

26. Hung DZ, Liao MY, Lin-Shiau SY: The clinical significance of venom detection in patients of cobra snakebite. *Toxicon* 2003; 41: 409-415.



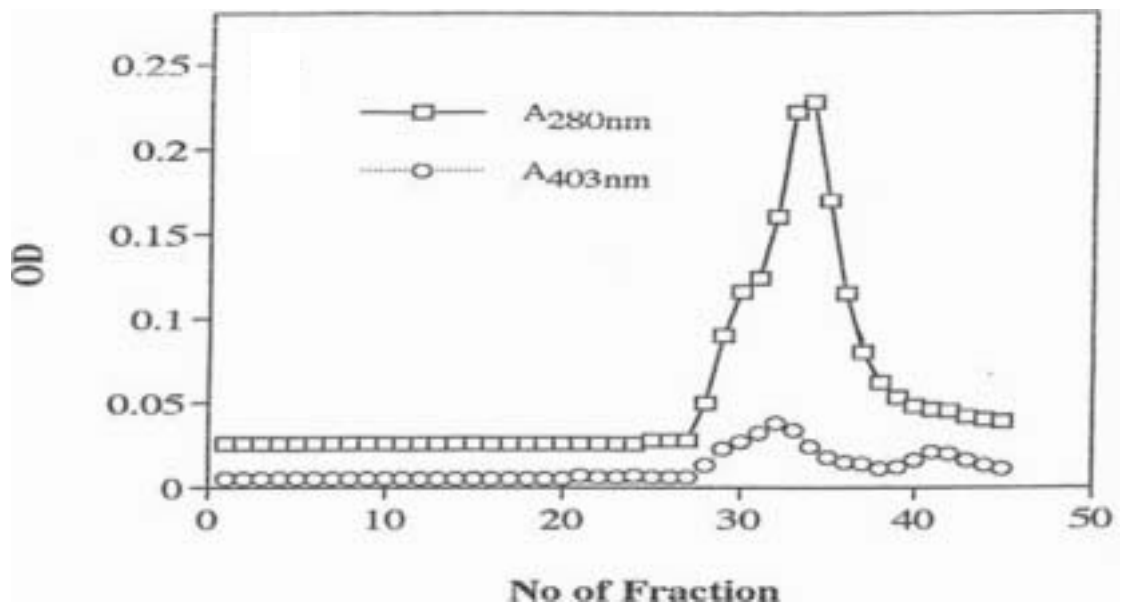
圖一、以競爭型方式分析在 Nitrocellulose membrane 上抗原和在溶液中的抗原競爭與抗體結合。

BM, *Bungarus multicinctus* crude venom; NNA, *Naja naja atra* crude venom; Ag, Antigen ; Ab, Antibody.



圖二、以 Protein A-HRP 作為偵測試劑方式分析 Anti- β -Bgt 抗體及 Anti-CTX3 抗體與台灣眼鏡蛇粗蛇毒、台灣雨傘節粗蛇毒及純化蛇毒之反應性。

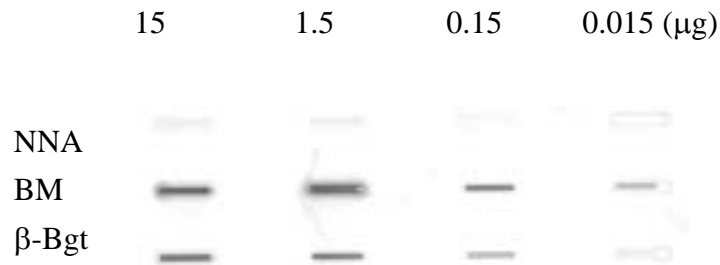
BM, *Bungarus multicinctus* crude venom; NNA, *Naja naja atra* crude venom; β -Bgt, β -bungarotoxin; CTX3, Cardiotoxin 3。A 和 B 分別與 Anti- β -Bgt 抗體及 Anti-CTX3 抗體反應。



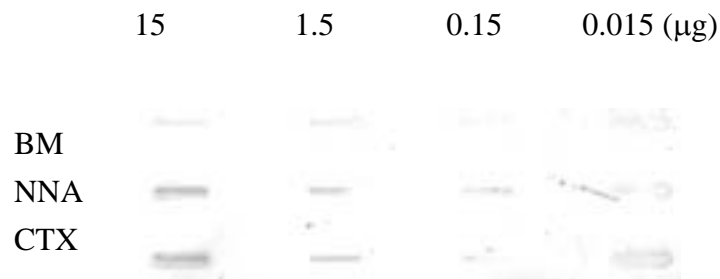
圖三、山葵過氧化酵素和以 Protein A 管柱純化之 Anti-β-Bgt 抗體連接反應後，以 S-200 管柱進行純化。

反應物放入 S-200 管柱 (2.8 cm × 110 cm)，流速為 50 ml/hr，每一分劃收集 10 ml。

A

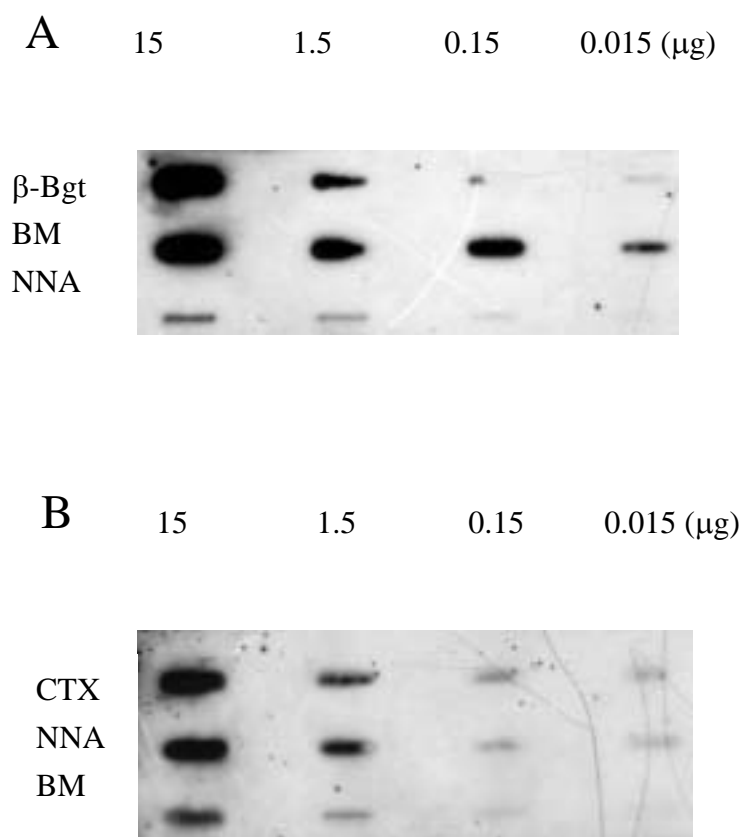


B



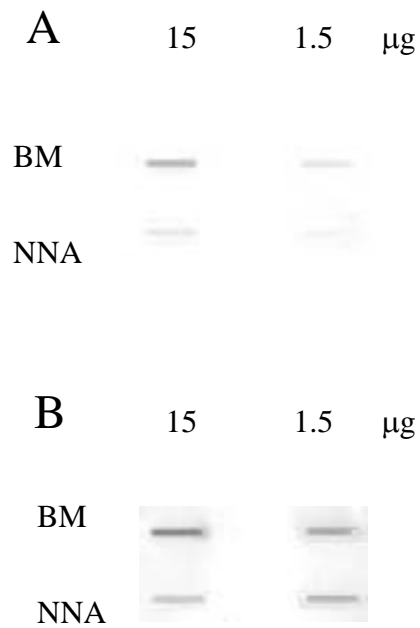
圖四、以 HRP 標定之抗體分析其與台灣眼鏡蛇、台灣雨傘節粗蛇毒及純化蛇毒蛋白之反應性。

抗體和抗原之反應以 Diaminobenzidine + Chloronaphthol 呈色。



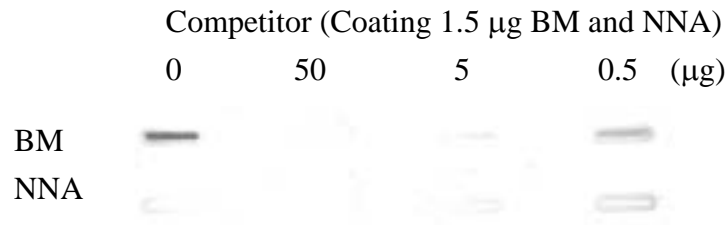
圖五、以冷光壓片方式呈現抗原和 HRP 標定抗體之反應。

A 及 B 分別為 Anti- β -Bgt Ab-HRP 及 Anti-CTX3 Ab-HRP 和不同濃度抗原之反應。

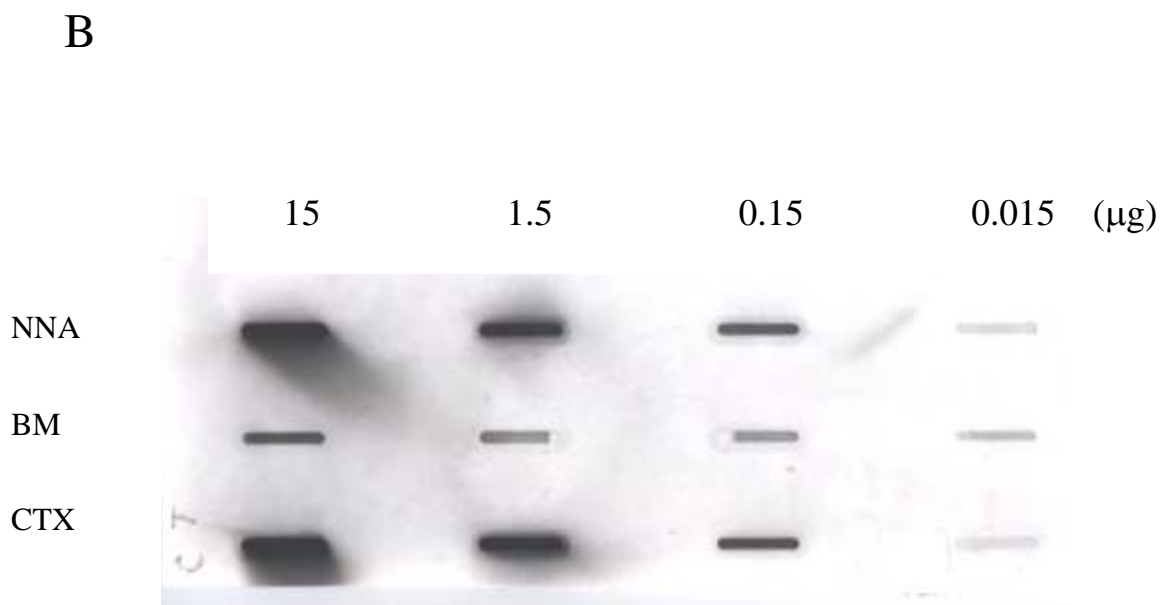
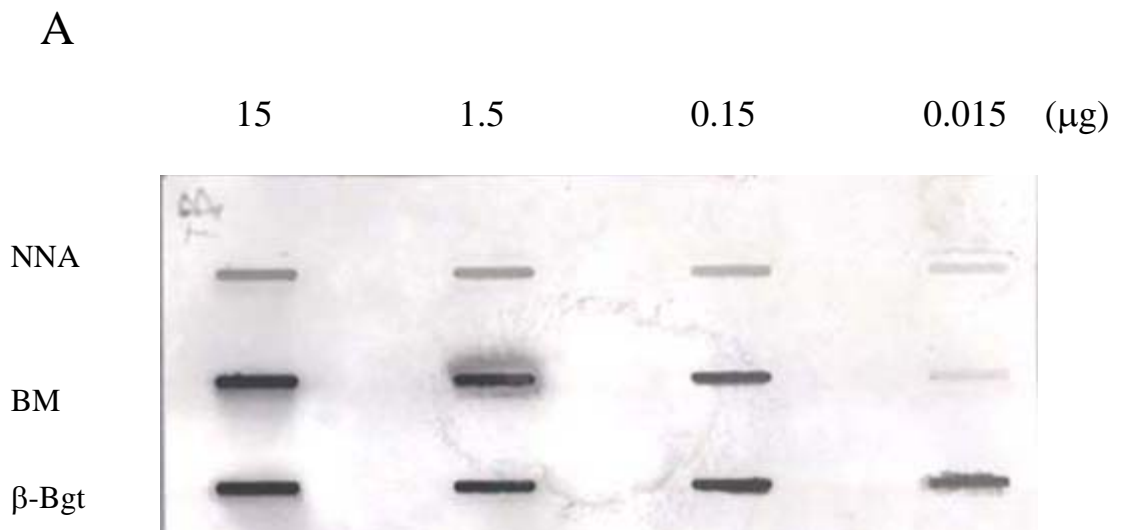


圖六、以 Colloidal gold 標定之抗體和台灣眼鏡蛇及台灣雨傘節粗蛇毒反應。

A: 使用 Gold-labeled Anti- β -Bgt 抗體 ; B: 使用 Gold-labeled Anti-CTX3 抗體 , 兩種抗體均以 Protein A-column 純化。

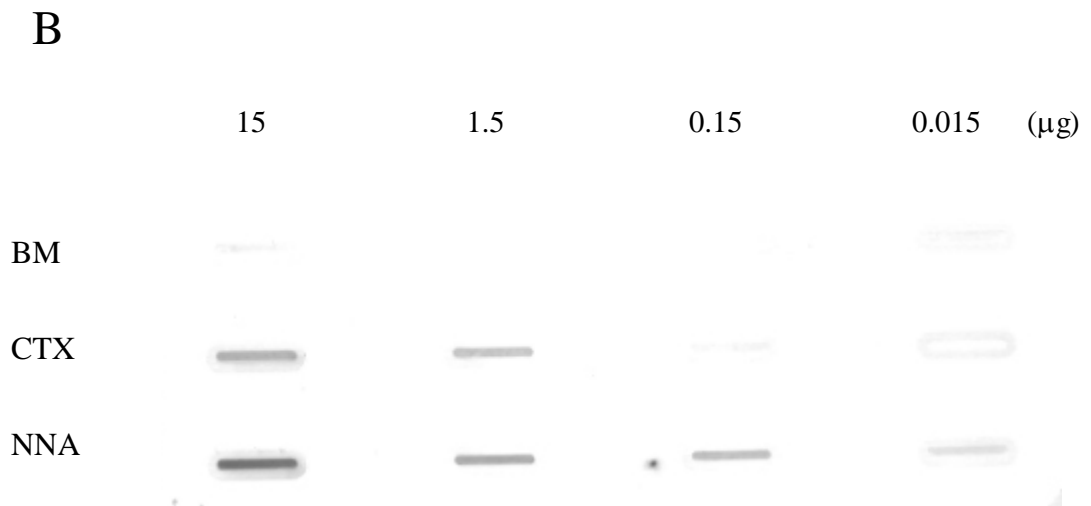
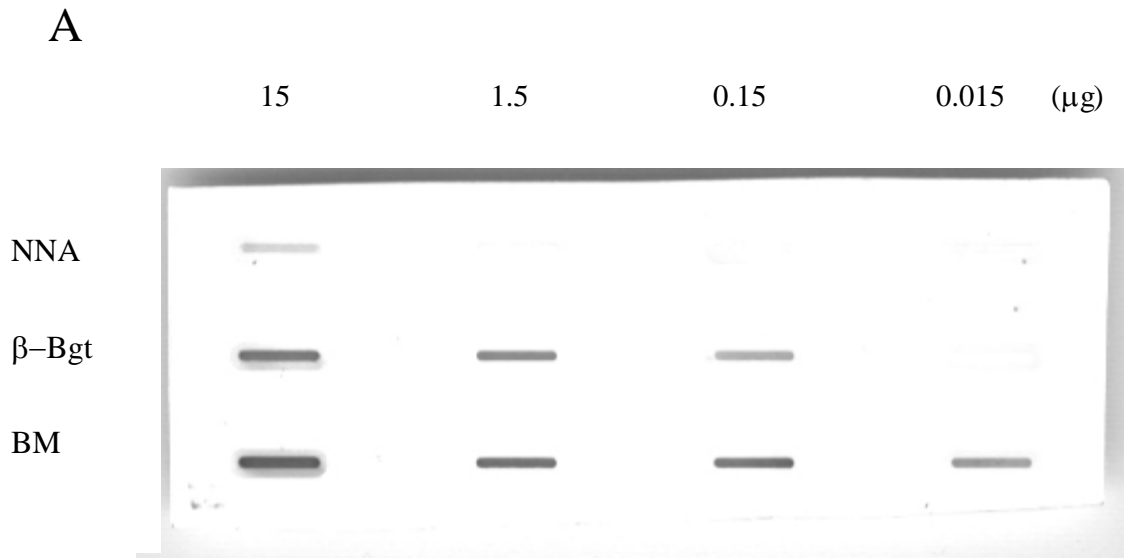


圖七、以競爭型方式分析在不同濃度台灣雨傘節蛇毒溶液中，
Gold-labeled Anti- β -Bgt 抗體和 Membrane 上蛇毒之反應性。
Gold-label 抗體反應後，Membrane 以 IntenSE BL 增加其靈敏度。



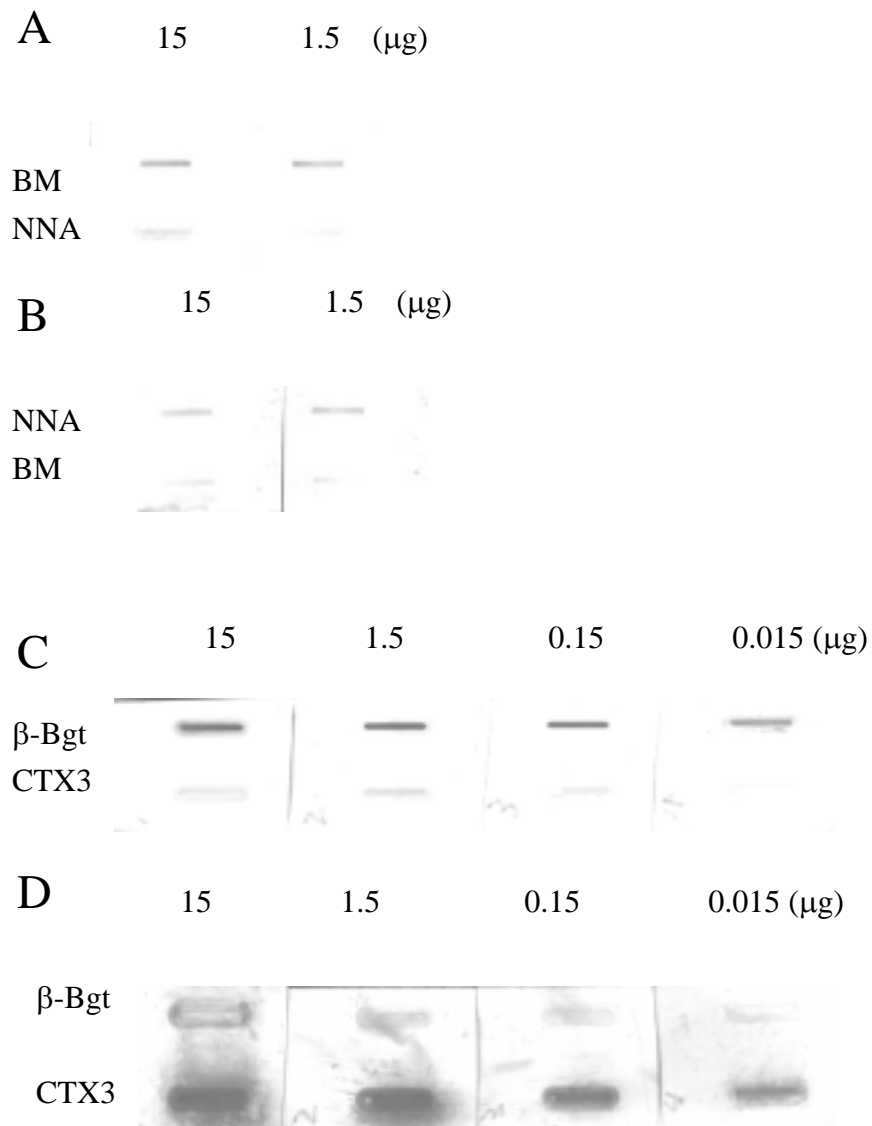
圖八、以特異性親和性管柱純化之抗體，與台灣雨傘節粗蛇毒、台灣眼鏡蛇粗蛇毒及純化蛇毒蛋白反應，以 Protein A-HRP 作為偵測試劑。

A: 與 Anti-β-Bgt Ab 反應；B: 與 Anti-CTX3 Ab 反應。



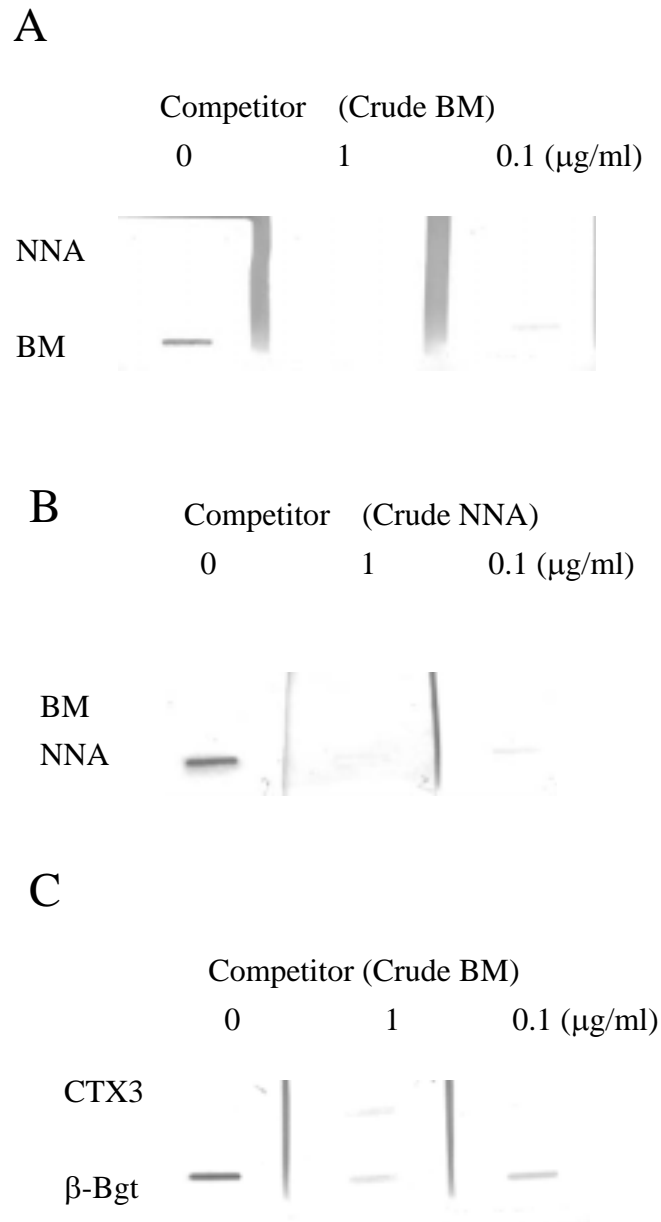
圖九、以特異性親和性管柱純化之抗體，再標定 HRP 作為偵測試劑與台灣雨傘節粗蛇毒、台灣眼鏡蛇粗蛇毒及純化蛇毒蛋白反應。

A: 以標定 HRP Anti-β-Bgt Ab 反應； B: 以標定 HRP 之 Anti-CTX3 Ab 反應。



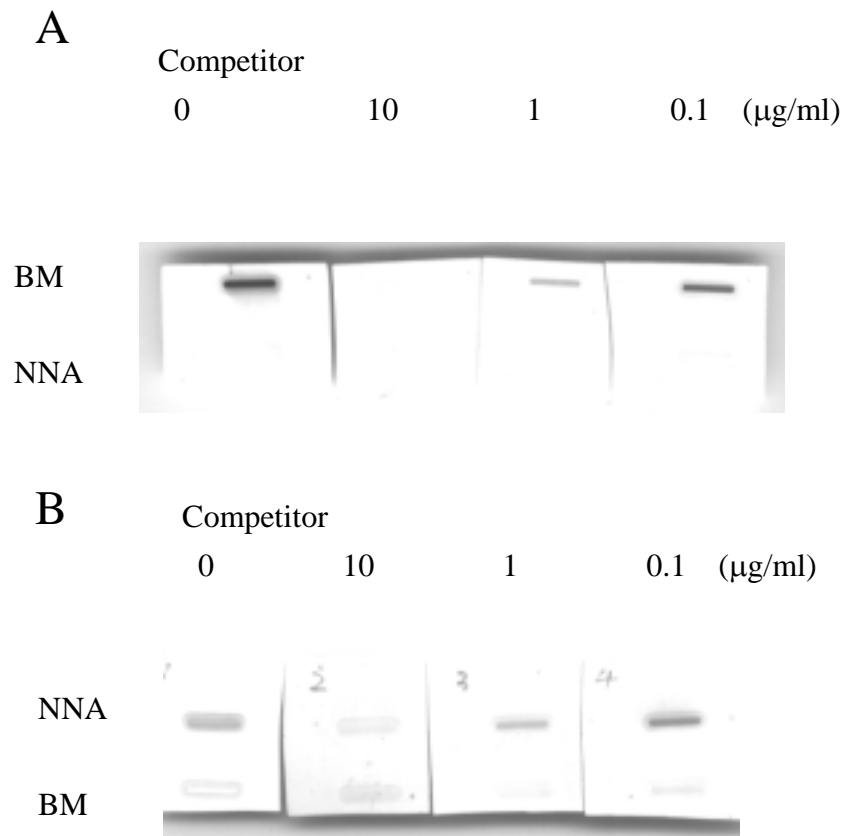
圖十、以特異性親和性管柱純化之抗體，再標定 Colloidal gold 作為偵測試劑與台灣眼鏡蛇粗蛇毒、台灣雨傘節粗蛇毒及純化蛇毒之反應性。

A, C: Gold-labeled Anti-β-Bgt Ab ; B, D: Gold-labeled Anti-CTX3 Ab。



圖十一、以競爭方式分析標定 Colloidal gold 抗體與台灣眼鏡蛇粗蛇毒、台灣雨傘節粗蛇毒及純化蛇毒之反應性。

A, C : Gold-labeled Anti- β -Bgt Ab ; B: Gold-labeled Anti-CTX3 Ab。



圖十二、以競爭方式分析 HRP 標定抗體在不同濃度粗蛇毒溶液中，和 Membrane 上的蛇毒反應性。

Membrane 上蛇毒濃度為 $1.5 \mu\text{g}$ ，而溶液中蛇毒濃度分別為 $0.1 \mu\text{g/ml}$ ， $1 \mu\text{g/ml}$ 及 $10 \mu\text{g/ml}$ 。A: HRP 標定 Anti- β -Bgt 抗體；B: HRP 標定 Anti-CTX3 抗體。

A Competitor (crude BM)
0.1 1 10 0 ($\mu\text{g/ml}$)

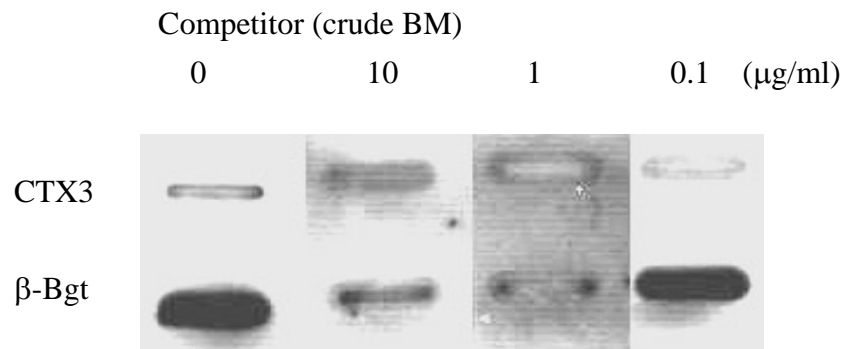


B Competitor (crude NNA)
0.1 1 10 0 ($\mu\text{g/ml}$)

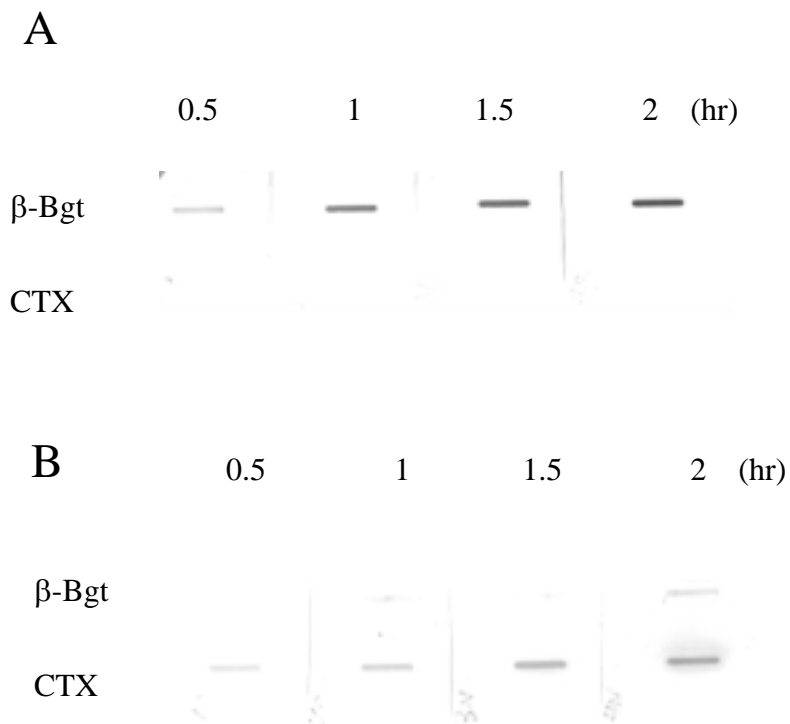


圖十三、以競爭方式分析 HRP 標定抗體，在不同濃度粗蛇毒溶液中中和 Membrane 上 β -Bgt 及 CTX3 之結合反應。

Membrane 蛇毒濃度為 $1.5 \mu\text{g}$; A:HRP 標定 Anti- β -Bgt 抗體 ; B: HRP 標定 Anti-CTX3 抗體。

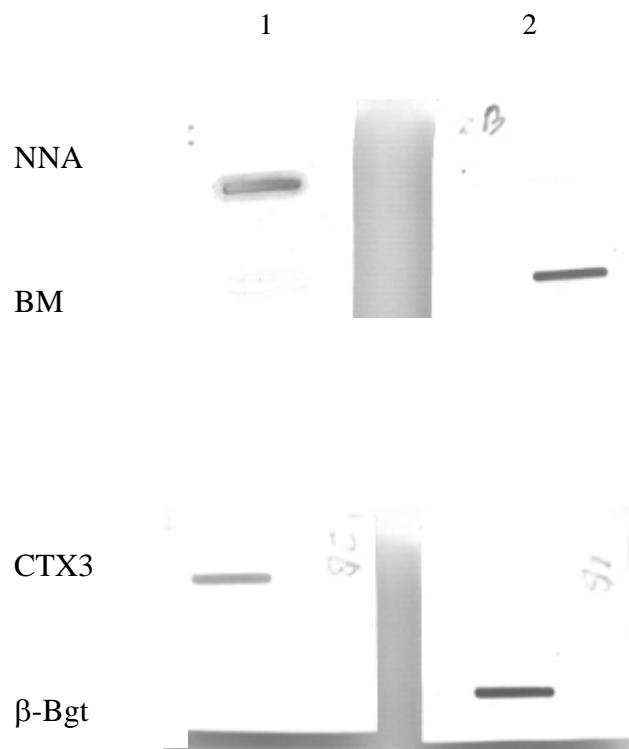


圖十四、以冷光壓片方式呈現在不同濃度粗蛇毒存在下
Anti-β-Bgt 抗體和β-Bgt 之反應性。



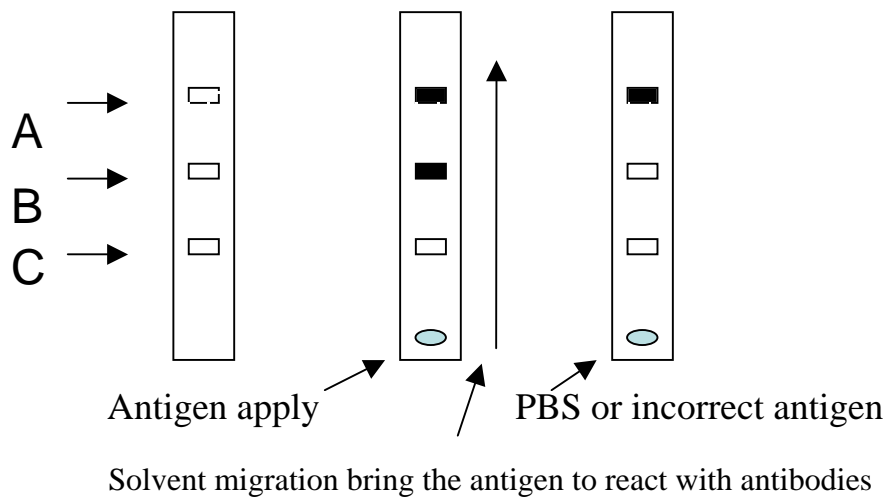
圖十五、以 HRP 標定抗體和 β -Bgt 及 CTX3 反應，比較不同反應時間之呈色效果。

A: Anti- β -Bgt 抗體 ; B: Anti-CTX3 抗體。



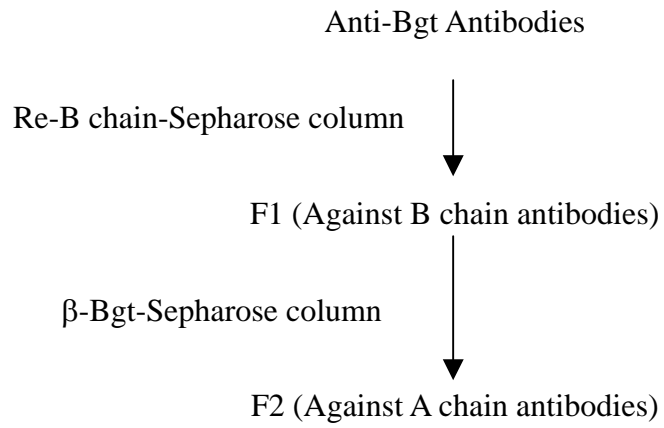
圖十六、放置四個月後點放有粗蛇毒與純化蛇毒之 Membrane 和標定 HRP 抗體之反應性。

1,3: 與標定 HRP 之 Anti-CTX3 抗體反應 ; 2, 4: 與標定 HRP 之 Anti-β-Bgt 抗體反應。

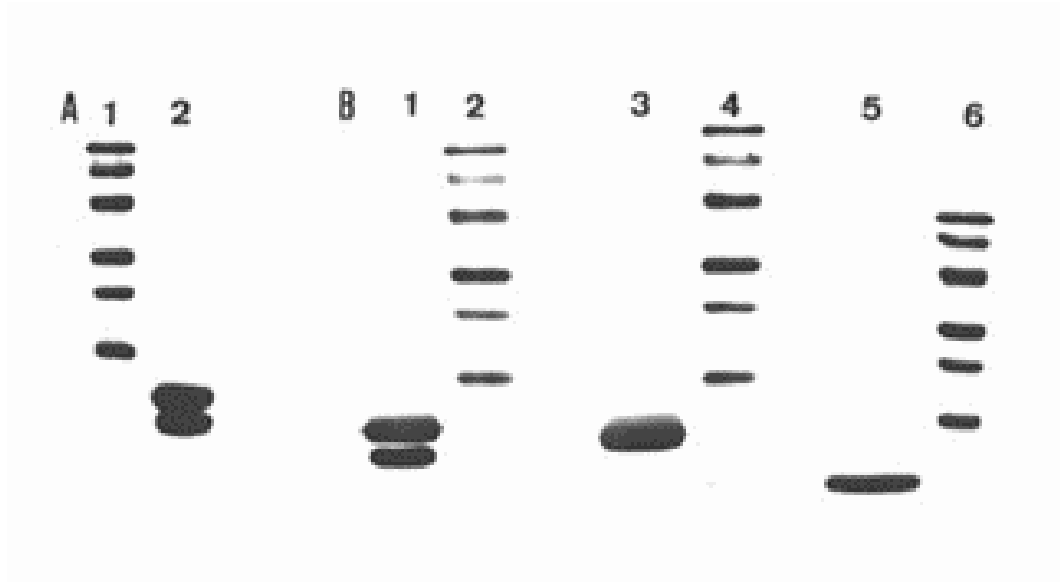


圖十七、驗孕試劑組合之免疫層析法。

A: Goat anti-rabbit IgG Ab ; B: Rabbit anti-Snake venom protein epitope-A Ab ; C: Rabbit anti-Snake venom protein epitope-B Ab。

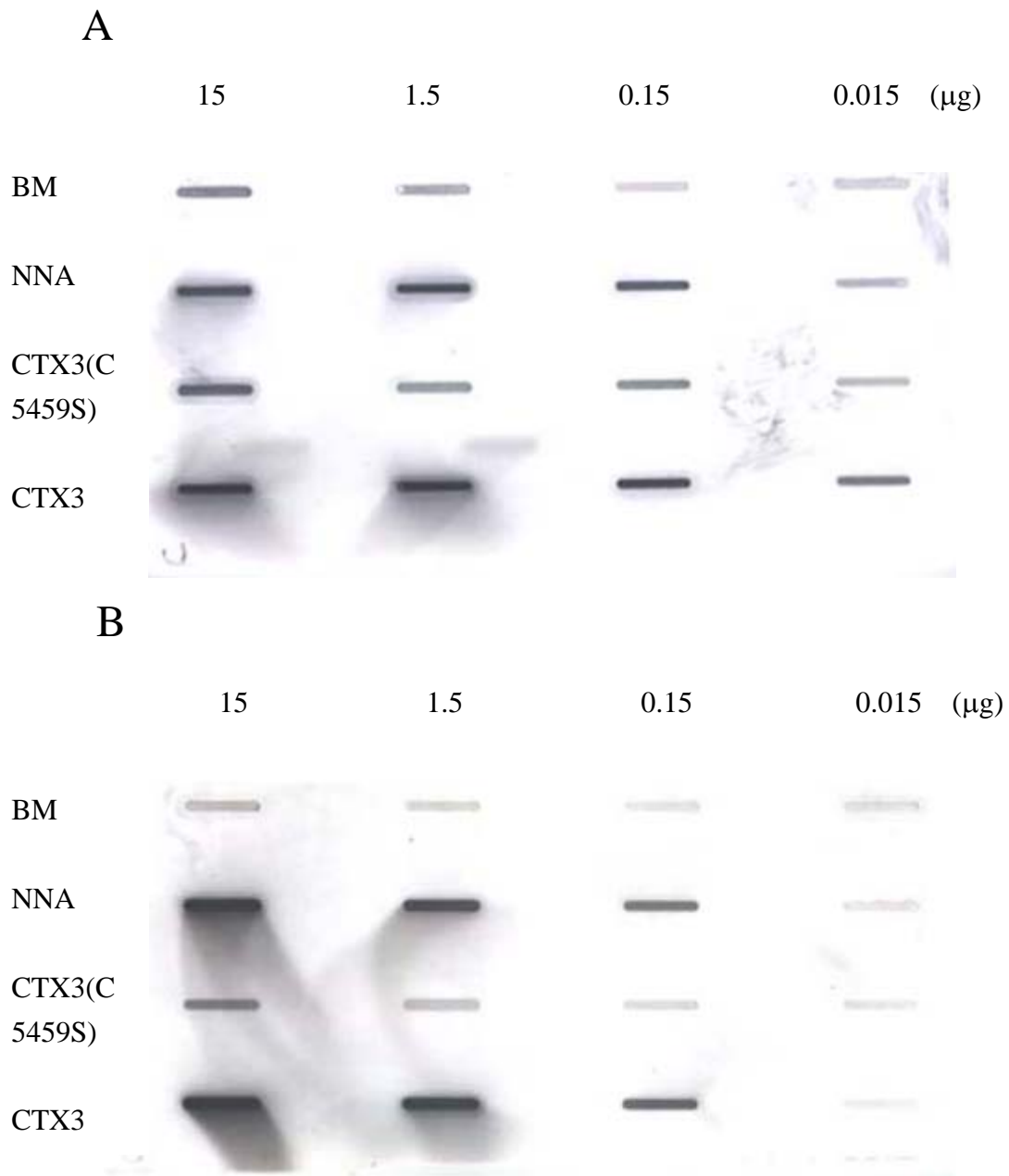


圖十八、以將 Anti- β -Bgt 抗體分別通過 B chain 重組蛋白及 β -Bgt 親和性管柱分離得到 F1 及 F2 兩分劃。



圖十九、以 Western blotting 分析利用重組 B chain 蛋白和 β -Bgt 親和性管柱將 Anti- β -Bgt 抗體分為兩分劃之作用特異性。

A: SDS-PAGE analysis ; B: 以 Anti- β -Bgt 抗體進行 Western blotting 分析 ; C: 以 Anti-A chain 抗體進行 Western blotting 分析 ; D: 以 Anti-B chain 抗體進行 Western blotting 分析。



圖二十、 Anti-CTX3 抗體以 CTX3(C5459S)重組蛋白及 CTX3 親和性管柱分為兩分劃後和 CTX3 及 CTX3(C5459S)之反應性。
 A: 所用抗體為以 CTX3(C5459S)重組蛋白親和性管柱分離之抗體; B: 所用抗體為以 CTX3 親和性管柱分離之抗體。