

# 蟹檢測試劑之開發

報告人：林育如 助理研究員（製劑研究組）

## 壹、緒言

蟹試劑 (Limulus ameobocyte lysate test, LAL test) 是一種高度靈敏和專一性的內毒素檢測方法，廣泛用於製藥工業、醫院、醫療設備製造等相關產業。蟹英文俗名為 horseshoe crab，故亦有人翻譯為馬蹄蟹。外觀長得很像帶著阿兵哥鋼盔的蟹，但分類學上它卻比較接近蜘蛛，在動物學的分類中，蟹屬於螯肢動物亞門，肢口綱，與蜘蛛同屬螯肢動物亞門。蟹的祖先約在四億年前出現在地球（當時約屬古生代泥盆紀），但直到現今，蟹的外型卻一直沒有什麼太大的變化，因此，它也被冠上的「活化石」的封號。目前全世界約剩下四種類的蟹，多分佈於美國東岸與亞洲東岸為主。台灣海域具有蟹資源，以金門及澎湖沿海數量較多。「澎湖海洋生物研究中心」已完成棲地調查，目前約 2 萬隻以上。市售之蟹試驗主要可分為凝膠法、比濁法及顯色法。本計畫主要以開發凝膠檢測試劑為主。

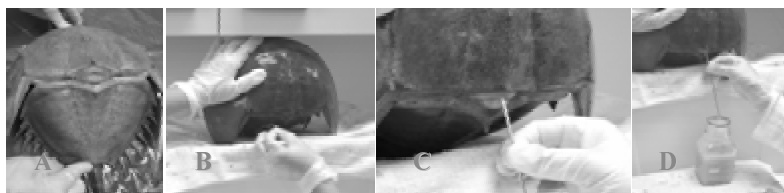
## 貳、材料與方法

所有器械及玻璃器皿需經 180°C，4 小時乾熱滅菌，且所需耗材及水均需為無熱原等級。製備 Limulus ameobocyte lysate：取蟹魚秤重，於採血位置用優碘擦拭，在以 70% EtOH 擦拭。取 14G 的注射針於心臟部位採血（圖一），將 100ml 血液滴入玻璃瓶內與等體積抗凝劑（0.125% N-ethylmaleimide in 3% sterile pyrogen free saline）混合均勻後離心。去除上清液，以 3% NaCl 清洗二次。移除上清液後每 ml 的變形細胞加入 3ml 的無熱原水混合均勻，使細胞脹破。置於 4°C 作用 24 小時。離心去除細胞碎片，即為 Limulus ameobocyte lysate。冷凍乾燥：取 Limulus ameobocyte lysate 與冷凍保存液 1:1 混合。置入冷凍保存瓶中（一個反應 0.1ml，目前使用 2ml，20 個反應），並放入冷凍乾燥機中，進行冷凍乾燥（封瓶機的步驟：-20°C，4 小時；-10°C，4 小時；-5°C，4 小時；0°C，4 小時；4°C，8 小時，共 24 小時）。蟹檢測試劑凝膠反應：取不同濃度之標準內毒素與自製之蟹檢測試劑，置於 37°C 作用一個小時後判讀是否具有凝集反應，並與市售之蟹檢測試劑（Cape cod®）比較。

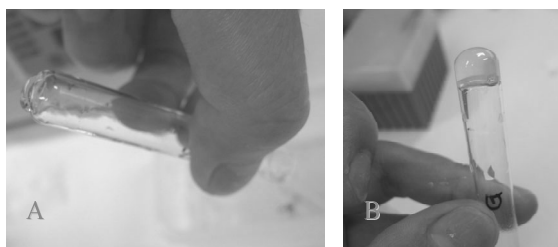
## 參、結果與討論

蟹的個體差異大，依「澎湖海洋生物研究中心」提供或經由漁民捕獲蟹的體型約從一公斤至四公斤。經數次實驗結果，我們估計一尾成熟蟹一次可抽取約體重 1/10 重量的血液。每 100ml 可分離到約 2~4ml 的變形細胞。將標準內毒素序列稀釋，與自製之蟹檢測試劑，置於 37°C 作用一個小時後判讀是否具有凝集反應，並與市售之蟹檢測試劑（Cape cod®）比較。測得目前生產之蟹試劑靈敏度

可達 0.05 EU/ml (圖二)。因此推估現階段每 ml 細胞可供 30~60 次試驗。我們初步發現蠱除了個體差異外，蠱試劑的靈敏度似乎也與季節有相關性。部分個體萃取所得的 *Limulus ameobocyte lysate* 容易發生凝集反應，我們調整鹽濃度為 6% NaCl，可以減少自發性凝集反應。因此，未來將進一步探討季節，溫度，賀爾蒙等因子對蠱試劑靈敏度的影響。取 *Limulus ameobocyte lysate* 與冷凍保存液 1:1 混合，置入冷凍保存瓶中，以冷凍乾燥機進行冷凍乾燥 (圖三)。我們已完成蠱試劑冷凍乾燥製程 (含水量為 1.34%)，未來將測試冷凍乾燥後之穩定性及保存期限。



圖一、A.蠱的外觀， B.用優碘擦拭，及70% EtOH擦拭取， C.以14G的注射針於心臟部位採血，D. 蠱的血液呈藍色



圖二、將標準內毒素序列稀釋，與自製之蠱檢測試劑，置於37℃作用一個小時後判讀是否具有凝集反應，測得目前生產之蠱試劑靈敏度可達0.05 EU /ml。A為對照組，B為凝集反應陽性。



圖三、取 *Limulus ameobocyte lysate* 與冷凍保存液 1:1 混合，以冷凍乾燥機進行冷凍乾燥

