论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0932-05

尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体纯化及生物活性研究

曹宇亮[1,2],张 雷[1],刘明华[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院急救部[1];313000 浙江 湖州,解放军第98医院急诊科[2])

[摘要] **目的** 通过实验纯化出特异性尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体并检测其生物活性。**方法** 以尖吻蝮蛇蛇毒免疫新西兰兔,利用Econo-Pac Protein A kit及CNBr activated sepharose 4B凝胶对兔源性抗蛇毒血清抗体进行纯化,制备特异性尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体,经Western blot和ELISA方法对抗体进行评价,通过出血抑制实验及致死性保护实验评价抗体的生物活性。**结果** 成功纯化出特异性抗尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体,ELISA检测抗体效价>3 200,Western blot证实多克隆抗体能识别蛇毒中大多数毒素蛋白,出血抑制实验证实该抗体能有效抑制蛇毒所致的皮下出血,在致死性保护实验中,该抗体对$2LD_{50}$和$4LD_{50}$蛇毒分别起到100%和54%的保护作用。**结论** 纯化获得的尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体具有较好特异性和生物活性。

[关键词] 尖吻蝮蛇;多克隆抗体;抗体纯化

[中图法分类号] R392.7; R945; R996.3 [文献标志码] A

Purification and biological activity of polyclonal antibodies against *Deinagkistrodon acutus* venoms

Cao Yuliang[1,2], Zhang Lei[1], Liu Minghua[1] ([1]Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Emergency, No. 98 Hospital of PLA, Huzhou, Zhejiang Province, 313000, China)

[**Abstract**] Objective To purify specific polyclonal antibodies against *Deinagkistrodon acutus* venoms for new antivenom research. Methods New Zealand white rabbits were immunized with *Deinagkistrodon acutus* venom. The IgG fraction was purified by affinity chromatography with the Econo-Pac Protein A Kit. Specific antibodies were purified by immuno-affinity chromatography with CNBr activated sepharose 4B. Then the polyclonal antibodies were tested by ELISA and Western blotting to evaluate its immunocompetence. Antibody biological activity of the polyclonal antibodies was evaluated by lethality neutralization assay and neutralization of venom hemorrhagic activity. Results Through this way, we successfully prepared specific polyclonal antibodies against *Deinagkistrodon acutus* venoms. ELISA showed the antibody titers higher than 3 200. Western blotting indicated that the polyclonal antibodies specifically recognized the most protein of *Deinagkistrodon acutus* venoms. Neutralization of venom hemorrhagic activity demonstrated the polyclonal antibodies effectively neutralized subcutaneous hemorrhage induced by *Deinagkistrodon acutus* venoms. In the lethality neutralization assay, the polyclone antibodies provided 100% and 54% protection against $2LD_{50}$ and $4LD_{50}$ dose *Deinagkistrodon acutus* venoms respectively. Conclusion The specific polyclonal antibodies against *Deinagkistrodon acutus* are purified successfully with good specificity and bio-activity.

[**Key words**] *Deinagkistrodon acutus*; polyclonal antibodies; antibody purification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071537), the Tackling Project of Science and Technology of Chongqing (CSTC2010AC5026), and the Clinical Innovative Foundation of Third Military Medical University (2009XLC15). Corresponding author: Liu Minghua, E-mail: mhliu4cq@gmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81071537);重庆市科技攻关计划项目(CSTC2010AC5026);第三军医大学临床创新基金(2009XLC15)

[通信作者] 刘明华,E-mail: mhliu4cq@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1427.002.html(2014-01-02)

尖吻蝮蛇(*Deinagkistridon acutus*),主要分布在中国的南方地区,是我国十大毒性最强毒蛇之一。尖吻蝮蛇蛇毒主要为血液毒,其主要毒素成分多属丝氨酸蛋白酶、金属蛋白酶和磷脂酶 A2(phospholipase A2)家族,部分蛋白质可能属于去整合素家族[1]。中毒后的主要临床表现为组织炎症水肿、坏死、出血不凝等。目前尖吻蝮蛇咬伤患者的治疗主要依靠抗蛇毒血清,作为毒蛇咬伤的特效药物,在蛇伤的治疗中起到了关键作用,但是在治疗的同时,它还会引起严重的不良反应,急性的有过敏性休克、荨麻疹、低血压、哮喘和血栓性静脉炎等,发病率大概在 20%[2]。迟发性的Ⅲ型变态反应包括:寒战、发热、关节酸痛和皮疹[3]。引起这些不良反应的主要原因是:蛇毒免疫马所产生的抗体 IgG 是一种高度糖基化的免疫球蛋白,具有高致敏性,另外,马血清中的一些成分在抗蛇毒血清的残留也是原因之一,抗蛇毒血清的纯度不高也导致了治疗效果下降[4]。

研制更高效、更安全的抗蛇毒血清是目前研究的热点,例如,单克隆抗体的制备和重组单链抗体基因片断(scfv fragments)的研究[5],多抗原表位肽段免疫原设计及 DNA 免疫[6],这些研究都是针对蛇毒中的某一种毒素成分进行免疫学研究,有一定的局限性。目前通过蛇毒中单一毒素成分制备单抗或多抗进行抗原、抗体研究较多,而如何制备一种特异性的、针对尖吻蝮蛇蛇毒各种毒素成分的多克隆抗体,国内暂无文献报道。本实验拟通过动物免疫及多步骤纯化,获得特异性抗尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体,该抗体能有效地识别蛇毒中的主要毒素成分,从而为全面筛选尖吻蝮蛇蛇毒抗原片断奠定基础,为新型抗蛇毒血清的研究提供可能。

1 材料与方法

1.1 材料

尖吻蝮蛇蛇毒冻干粉购自江西鹰潭蛇场。完全佐剂(CFA)和不完全佐剂(IFA)、HRP 标记羊抗兔 IgG/HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) 购自 Sigma 公司。TMB(四甲基联苯胺)底物溶液购自南京探求生物技术有限公司。Econo-Pac Protein A kit 购自美国 Bio-Rad 公司。溴化氢活化凝胶(CNBr Activated Sepharose 4B)购自美国 Pharmacia 公司。96 孔可拆酶标板购自美国 Costar 公司。DAB 显色试剂盒购自生工生物工程有限公司。新西兰兔(雄性,4 只,4 月龄,体质量 2.5 ~ 3 kg)及 BALB/c 小鼠(60 只,雌雄各半,8 周龄,体质量 18 ~ 20 g)由本校实验动物中心提供。本实验所用的试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 新西兰兔蛇毒免疫 用生理盐水稀释尖吻蝮蛇蛇毒冻干粉至 50 μg/mL,无菌滤器(0.22 μm)过滤除菌。0.5 mL (25 μg)蛇毒与等体积的完全弗氏佐剂(CFA)乳化,皮下注射至新西兰兔双侧腋窝及腹股沟。每间隔 2 周,1 mL(50 μg)蛇毒与等体积的不完全弗氏佐剂(IFA)乳化皮下注射免疫,共免疫 3 次,第 1 次采用 CFA,后 2 次采用 IFA,每次蛇毒免疫后 7 d,抽血测定抗体滴度。

1.2.2 间接 ELISA 法测定兔血清蛇毒抗体滴度 尖吻蝮蛇冻干粉用抗原包被液(0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH = 9.6)稀释至 0.2 μg/mL,酶标板每孔加入 100 μL,4 ℃过夜,洗涤液(PBS,pH = 7.4, 0.05% Tween-20)洗板。每孔加入封闭液(PBS pH = 7.4,2% BSA, 0.05% Tween-20)150 μL,37 ℃孵育 1 h,用洗涤液洗板。将兔血清用抗体稀释液(PBS,pH = 7.4,1% BSA 0.05% Tween-20)稀释至适当的浓度,每孔 100 μL,加到酶标板孔内,以免疫前兔血清作为阴性对照,以抗体稀释液作为空白对照,37 ℃孵育 30 min 后洗板,每孔加入 TMB 底物溶液 100 μL,避光显色 15 min 后,每孔加入 50 μL 终止液(2 mol/L H_2SO_4)终止显色反应,酶标仪 450 nm 波长读取各孔光密度值。

1.2.3 兔血清 IgG 纯化 通过 ELISA 检测,当超免新西兔血清中抗蛇毒抗体滴度达到≥32 000 时,进行心脏采血,血液 4 ℃ 过夜,分离血清。IgG 纯化通过 Econo-Pac Protein A kit 进行(该部分按操作手册进行),简述如下:20 mL 结合液预冲脱盐柱,然后加入 1∶10 稀释的兔血清(用 PBS 稀释)3 mL,加入 4 mL 结合液析出,此为预处理的血清,用 10 mL 结合液平衡 Protein A 柱,加入预处理血清 2 mL,结合液冲洗 A 柱,用 10 mL 析出液(elution buffer)洗脱结合的 IgG;用 20 mL PBS 平衡脱盐柱,加入 A 柱析出液后,再加入 PBS 析出,完成析出液的中和、脱盐和更换 buffer,重复上述步骤至所有血清样品处理完毕。

1.2.4 多克隆抗体免疫亲和层析纯化 通过采用 CNBr-activated sepharose 4B beads 免疫亲和层析的方法,去除 IgG 中与蛇毒抗原不相关的抗体。本实验根据指导手册进行,步骤如下:CNBr-activated sepharose 4B 凝胶用 1.0 mmol/L HCl (pH = 3.0)浸泡至完全膨胀,尖吻蝮蛇冻干粉溶于耦合液(coupling buffer)中(0.1 mol/L $NaHCO_3$, pH = 8.3),将凝胶与蛇毒溶液 4 ℃ 混合搅拌过夜,使蛇毒抗原与凝胶充分结合,用耦合液冲掉未结合蛇毒,封闭液(1.0 mol/L tris-HCl, pH = 8.0)4 ℃封闭过夜,用 0.1 mol/L 醋酸钠(pH = 4.0)和 0.1 mol/L tris-HCL (0.5 mol/L NaCl, pH = 8.0)交替冲洗凝胶后装柱。将 Econo-Pac Protein A kit 纯化的 IgG 滤柱,PBS 冲洗未结合 IgG,与凝胶结合的 IgG 用 0.1 mol/L 甘氨酸(pH = 2.8)析出,析出液用 1.0 mol/L tris-HCl(pH = 8.0)中和,用蛋白超滤管超滤浓缩,置换 PBS 缓冲液, -70 ℃保存备用。

1.2.5 尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体评价

1.2.5.1 间接 ELISA 法测定抗体滴度 按前述方法测定多克隆抗体抗体滴度,以免疫前兔血清作为阴性对照,以抗体稀释液作为空白对照,37 ℃孵育 30 min,洗板后,每孔加入 TMB 底物溶液 100 μL,避光显色 15 min 后,每孔加入 50 μL 终止液(2 mol/L H_2SO_4)终止显色反应,酶标仪 450 nm 波长读取各孔光密度值。

1.2.5.2 Western blot 分析 取尖吻蝮蛇蛇毒作为抗原进行 12% SDS-PAGE,电转至 0.22 μm 硝酸纤维素膜(nitrocellulose

membrane),用封闭液(TBS, 0.1% Tween-20,5% 脱脂牛奶)室温封闭 1 h,用 TBS-T 洗膜 3 遍,与 1∶500 稀释的多克隆抗体 4 ℃ 孵育过夜,TBS-T 洗膜 3 遍,与 1∶10 000 稀释的二抗(HRP 标记羊抗兔二抗)室温孵育 1 h,TBS-T 洗膜 6 遍,加入 DAB 显色液显色 30 s。

1.2.5.3 体外出血中和实验 用 PBS 将蛇毒配成不同浓度,分别皮内注射至 BALB/c 小鼠背部,每只 0.1 mL,24 h 后,处死小鼠,剥除背部皮肤,测量皮肤内侧出血斑直径,致直径为 10 mm 出血斑的蛇毒剂量定义为最小出血剂量(minimum hemorrhagic dose, MHD)。尖吻蝮蛇蛇毒的最小出血剂量为 4 μg。将 10 MHD 蛇毒与等体积的多克隆抗体配成 100 μL 溶液,混匀后放入 37 ℃温箱内孵育 30 min,然后皮内注射 BALB/c 小鼠背部皮肤(实验组),阳性对照组注射 10 MHD 蛇毒,阴性对照组注射 PBS,每组 4 只,24 h 后处死小鼠,测量皮肤内侧出血斑直径。

1.2.5.4 多克隆抗体对小鼠中和保护实验 尖吻蝮蛇 LD_{50} 测定采用 Bliss 简化概率单位法[7],采用不同剂量的蛇毒皮下注射 BALB/c 小鼠,24 h 后观察小鼠死亡数,计算出尖吻蝮蛇蛇毒的 LD_{50}。将多克隆抗体(50 mg/kg)、超免兔血清(100 μL/g)分别与 2 倍或 4 倍 LD_{50} 的尖吻蝮蛇蛇毒相混合,37 ℃ 孵育 30 min,另设 PBS 空白对照组(将 PBS 与蛇毒孵育),每组 8 只 BALB/c 小鼠,雌雄各半。每组小鼠背部皮下注射相应的溶液,观察 24 h 后,统计存活数。

2 结果

2.1 超免新西兰兔血清抗体 ELISA 检测

新西兰兔每次免疫后 1 周,用 ELISA 方法测定血清蛇毒抗体滴度,检测结果见图 1。其中阴性兔血对照 $D(450)$ 值为 0.201,空白对照为 0.122。阳性判定标准为血清样品 $D(450)$ 值 >0.4,且样品 $D(450)$ 值/阴性血清 ≥2.1。从图中可见,第 1 次免疫后血清中蛇毒抗体滴度水平较低,曲线平缓,第 2、3 次免疫后血清中的抗体水平迅速增高。第 3 次免疫后 1 周,新西兰兔血清蛇毒抗体稀释到 1∶128 000 时,$D(450)$ 值为 0.642,兔血清中蛇毒抗体滴度 >128 000。

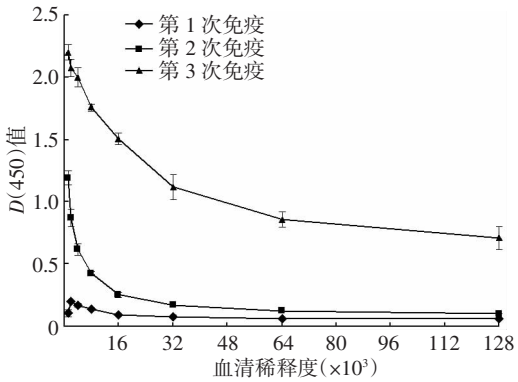
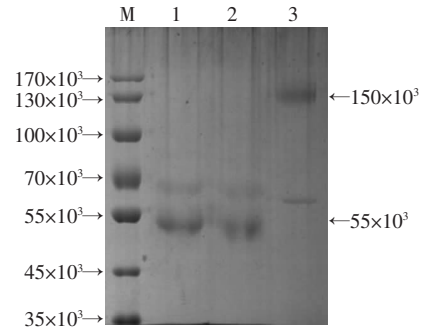


图 1 ELISA 法测定蛇毒抗体滴度

2.2 纯化 IgG SDS-PAGE 电泳

当 IgG 经还原上样缓冲液处理后,在 50×10^3 的位置可见明显的蛋白条带,未经二硫苏糖醇(dtt)处理的蛋白条带则位于约 150×10^3 处,与 IgG 蛋白电泳条带位置相吻合,其他位置未见蛋白杂带出现,抗体纯化纯度较高(图 2)。

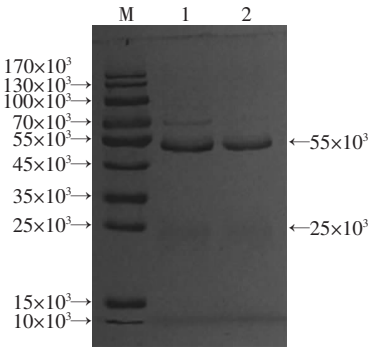


M:蛋白标准;1:15 μL 样品还原 buffer 处理;2:10 μL 样品还原 buffer 处理;3:样品经非还原 buffer 处理

图 2 纯化兔血清 IgG 12%SDS-PAGE 电泳结果

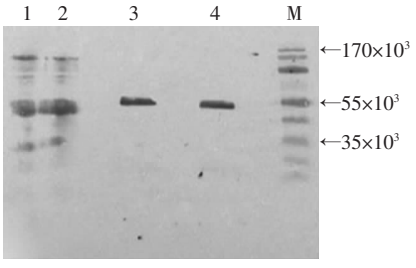
2.3 多克隆抗体 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 分析

经 Econo-Pac Protein A kit 纯化的 IgG 抗体液,通过免疫亲和层析进一步纯化,去除与蛇毒不能结合的抗体部分,即获得所需的特异性尖吻蝮蛇多克隆抗体,对多克隆抗体进行 12% SDS-PAGE 电泳分析(图 3),在 55×10^3 位置出现明显的蛋白条带,在 25×10^3 位置,蛋白条带弥散、色泽淡,但仍隐约可见,与 IgG 电泳条带相吻合。Western blot 分析见图 4,当蛇毒抗原未经二硫苏糖醇(DTT)处理,多克隆抗体能与尖吻蝮蛇蛇毒中大部分蛋白相结合,当蛇毒经 DTT 处理,则只在 55×10^3 位置出现印迹条带,多克隆抗体特异性的与蛇毒分子中 55×10^3 大小的蛋白结合。



M:蛋白标准;1、2:多克隆抗体样品

图 3 尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体 12% SDS-PAGE 蛋白电泳结果



1、2:蛇毒抗原经非还原 buffer 处理;3、4: 蛇毒抗原经还原 buffer 处理;M:蛋白标准

图 4 尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体 Western blot 分析

2.4 抗体活性检测

2.4.1 抗体库抗体滴度测定 通过间接 ELISA 法测定尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体滴度结果见图 5。其中阴性对照 $D(450)$ 值为 0.108 5，空白对照为 0.072 5，当抗体库稀释至 1∶3 200 时，$D(450)$ 值为 0.409 5，可见抗体滴度 >3 200。

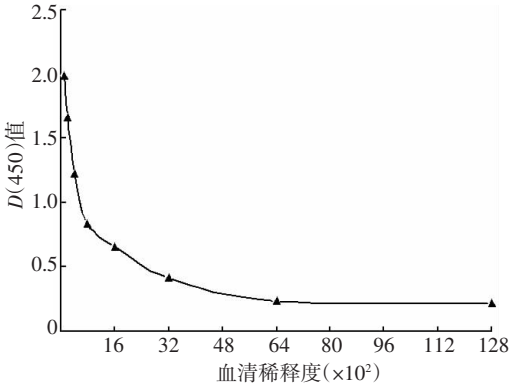


图 5 ELISA 法测定尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体滴度

2.4.2 尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体体外出血中和实验 皮内分别注射蛇毒、抗体与蛇毒混合液，24 h 后测量小鼠皮肤内侧出血斑大小，结果如图 6 所示，在阳性对照组，出血斑直径达到 2 cm，出血斑颜色很深，而在实验组，出血斑直径大约为 0.6 cm，出血斑颜色很淡，可见该抗体能有效的中和尖吻蛇毒所致的出血效应。在阴性对照组未见出血斑。

2.4.3 致死性中和保护实验 采用 Bliss 简化概率单位法，得出尖吻蝮蛇蛇毒的 LD_{50} 为 4.67 g/kg。将多克隆抗体按小鼠体质量 50 μg/g 分别与 $2LD_{50}$ 和 $4LD_{50}$ 尖吻蝮蛇蛇毒孵育后，注射 BALB/c 小鼠，在当蛇毒剂量为 $2LD_{50}$ 时，多克隆抗体对小鼠的保护性达到 100%，当蛇毒达到 $4LD_{50}$ 时，保护性达到 54%。而对应的超免兔血清组的保护性则分别为 100%、38%。在对照组（PBS 与 $2LD_{50}$、$4LD_{50}$ 蛇毒孵育）没有小鼠幸存。

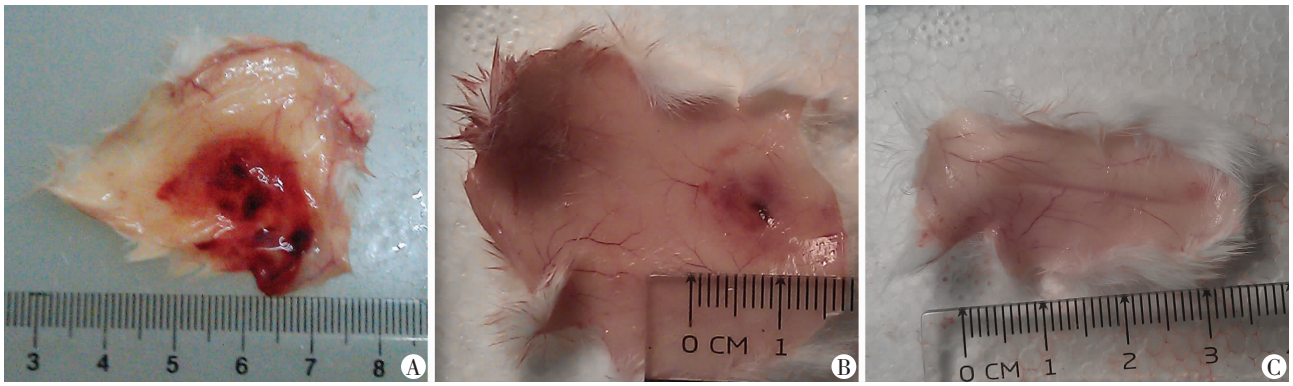
3 讨论

蛇毒是由许多不同的蛋白、酶、碳水化合物、脂类和生物活性肽构成的混合物，成分极为复杂。蛇毒的主要生物学功能是帮助蛇捕食和消化食物，以及对抗竞争对手[8]。尖吻蝮蛇蛇毒的主要成分包括金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、磷脂酶 A2 以及去整合素家族，其中金属蛋白酶的致出血性最强，这也是导致尖吻蝮蛇咬伤后出现出血、水肿、组织坏死的主要原因。

目前，为了获得高滴度抗蛇毒抗体，用蛇毒免疫动物的方案有多种不同的版本[9]，de-Abreu 等[10]成功地用 25 μg 的蛇毒免疫新西兰兔获得满意的抗体滴度。在本研究中，首次免疫采用完全弗氏佐剂（CFA），随后的加强免疫采用不完全佐剂（IFA），首次免疫，尖吻蝮蛇粗毒的剂量为 25 μg，加强免疫的剂量增加至 50 μg，采用上述免疫方案，就足以产生高滴度的抗体，经过 3 次免疫，新西兰兔血清中抗蛇毒抗体滴度达到了 128 000。一般说来，采用粗毒免疫动物时，大分子量的蛇毒蛋白成分具有更好的免疫原性。尖吻蝮蛇蛇毒蛋白/亚基的相对分子质量主要在（10 ~ 30）× 10^3，此外也有相对分子质量高于 97 × 10^3 和低于 10 × 10^3 的蛋白质存在[11]。蛇毒的主要活性成分处于中等分子量，具有较好的免疫原性。

血清中 IgG 抗体的提纯，较传统的方法是采用硫酸或辛酸沉淀法。在本实验中，所采用 Econo-Pac Protein A kit 亲和层析法，与硫酸铵或辛酸沉淀法相比较，亲和层析纯化抗体具有纯度高，抗体免疫活性好的特点，这是因为 protein-a 具有 5 个同源的免疫球蛋白结合结构域，并且都可以独立的与 IgG 的 Fc 片段结合，而对血清中的其他蛋白结合能力很弱[12]。从蛋白电泳结果我们也可以看出，胶片上除了 IgG 蛋白条带外，无明显的杂带。

经亲和层析纯化的 IgG 抗体中，仍含有许多与蛇毒不相关的抗体，通过免疫亲和层析（Immunoaffinity Chromatography）方法，将蛇毒与 CNBr-activated sepharose 4B 凝胶耦合，纯化的 IgG 滤过凝胶从而将能与蛇毒抗原相结合的抗体成分纯化出来，最大程度的除掉



A：阳性对照组；B：实验组；C：阴性对照组

图 6 尖吻蝮蛇多克隆抗体与 10 MHD 蛇毒孵育后注射小鼠皮内出血中和实验结果

了多克隆抗体中与蛇毒不相关的抗体,从而保证了多克隆抗体的特异性。

尖吻蝮蛇毒主要为血液毒,金属蛋白酶(metalloproteinase)是其中的一种重要成分,该酶具有溶解纤维蛋白原、细胞基底膜,引起细胞凋亡、凝血素激活、抑制血小板聚集的活性,也是导致动物死亡的主要原因[13]。在出血中和实验中,小鼠皮肤出血斑的出现主要为金属蛋白酶所致,在实验组,皮肤出血斑的面积明显减小,出血斑的颜色变淡,说明多克隆抗体能有效的中和出血。在致死性中和保护实验中,当抗体剂量为50 μg/g时,能有效的中和$2LD_{50}$蛇毒剂量,对$4LD_{50}$也能提供54%的保护性,该多克隆抗体具有良好的生物活性。

抗体是研究基因功能的重要工具,制备高效价、高特异性的抗体是研究相关致病基因表达、定位和生物功能不可或缺的工具。目前针对蛇毒中单一毒素成分制备相应的抗体,进行蛇毒抗原筛选,虽然这种研究针对性强,但由于蛇毒成分的复杂性和存在许多的未知性,因此存在一定的局限性。而特异性的多克隆抗体具有更广泛的"抗体谱",在抗原筛选中,避免了因部分抗体成分的缺失,而导致重要抗原片断不能被筛选出来,Meinke 等[14]利用多克隆抗体,从幽门螺旋杆菌全蛋白组中筛选候选抗原124个,其中发现了许多新抗原。利用全蛇毒免疫动物,最大限度地保证了多克隆抗体中抗蛇毒抗体多样性,本研究所纯化出的特异性多克隆抗体,通过Western blot证实,能识别蛇毒中大多数蛋白,包括了蛇毒中的主要毒素成分,这在由多种毒素成分构成的蛇毒抗原片断筛选研究中有着重要的意义。

本研究成功的通过免疫及多步骤纯化方法,获得了特异性抗尖吻蝮蛇蛇毒多克隆抗体,该抗体具有良好的特异性和生物活性,为下一步的尖吻蝮蛇蛇毒保护性抗原筛选和新型多价抗蛇毒抗体的研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Liu Q, Zhang X, Yin W, *et al*. A catalog for transcripts in the venom gland of the *Agkistrodon acutus*: identification of the toxins potentially involved in coagulopathy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 341(2): 522-531.

[2] Schaeffer T H, Khatri V, Reifler L M, *et al*. Incidence of immediate hypersensitivity reaction and serum sickness following administration of Crotalidae polyvalent immune Fab antivenom: a meta-analysis[J]. Acad Emerg Med, 2012, 19(2): 121-131.

[3] Otero-Patino R, Segura A, Herrera M, *et al*. Comparative study of the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated [IgG and F(ab')2] antivenoms, in Bothrops asper bites in Colombia[J]. Toxicon, 2012, 59(2): 344-355.

[4] Lavonas E J. Antivenoms for snakebite: design, function, and controversies[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2012, 13(10): 1980-1986.

[5] Gutierrez J M, Leon G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead[J]. Biologicals, 2011, 39(3): 129-142.

[6] Arce-Estrada V, Azofeifa-Cordero G, Estrada R, *et al*. Neutralization of venom-induced hemorrhage by equine antibodies raised by immunization with a plasmid encoding a novel P-Ⅱ metalloproteinase from the lancehead pitviper Bothrops asper[J]. Vaccine, 2009, 27(3): 460-466.

[7] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 154-169.

[8] Stone S F, Isbister G K, Shahmy S, *et al*. Immune response to snake envenoming and treatment with antivenom; complement activation, cytokine production and mast cell degranulation[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(7): e2326.

[9] Leon G, Sanchez L, Hernandez A, *et al*. Immune response towards snake venoms[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2011, 10(5): 381-398.

[10] de-Abreu V A, Leite G B, Oliveira C B, *et al*. Neurotoxicity of Micrurus altirostris (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits[J]. Clin Toxicol (Phila), 2008, 46(6): 519-527.

[11] 黄春洪, 孔毅, 吴杰连, 等. 尖吻蝮蛇毒素组双向电泳和二维液相色谱研究[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(2): 169-173.

[12] 周亚丽, 劳兴珍, 袁玲, 等. 免疫球蛋白结合结构域的研究进展[J]. 药物生物技术, 2012, 19(3): 274-277.

[13] Fox J W, Serrano S M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases[J]. Toxicon, 2005, 45(8): 969-985.

[14] Meinke A, Storm M, Henics T, *et al*. Composition of the ANTIGENome of Helicobacter pylori defined by human serum antibodies[J]. Vaccine, 2009, 27(25/26): 3251-3259.

(**收稿**: 2013-11-18;**修回**: 2013-12-06)

(编辑 栗 嘉)