

· 论 著 ·

发形霞水母触手提取物的蛋白稳定性及其溶血活性

常银龙,肖 良,郑杰民,王倩倩,张黎明(第二军医大学海医系海洋生物技术教研室,上海 200433)

[摘要] 目的 探讨不同环境因素和处理方法对发形霞水母(*Cyanea capillata*)触手提取物(tentacle extract, TE)蛋白稳定性及其溶血活性的影响。方法 结合蛋白浓度测定、溶血活性检测和 SDS-PAGE 分析等方法研究不同环境因素和处理方法对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响。结果 TE 溶血活性呈明显的剂量依赖关系,其半数溶血分数 $HU_{50} = 226 \mu\text{g/ml}$; 40℃ 水浴 1 h,能去除 TE 中大量杂蛋白,但仍保持显著溶血活性; TE 在 4℃ 放置 28 d,其溶血活性保持稳定,25℃ 下 3 d 内其溶血活性变化不明显; pH 值对 TE 溶血活性的影响呈钟形曲线,在 pH 6.0 ~ 11.0 之间活性相对稳定, pH 8.0 是 TE 保持溶血活性的最优 pH 条件;不同缓冲液对 TE 稳定性及其溶血活性影响显著,浓度大于 26% 的硫酸铵溶液对 TE 溶血蛋白具有良好的盐析作用。结论 40℃ 水浴 1 h 预处理可显著减少 TE 中非活性蛋白组分,并降低样品黏性; 4℃ 和 pH 8.0 是 TE 保持蛋白稳定性和溶血活性的最适条件;浓度大于 26% 的硫酸铵盐析有利于溶血蛋白组分富集。

[关键词] 发形霞水母;触手提取物;稳定性;溶血活性

[中图分类号] Q5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)06-0434-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.06.009

Protein stability and hemolytic activity of tentacle extract from the jellyfish *Cyanea capillata*

CHANG Yinlong, XIAO liang, ZHENG Jiemin, WANG Qianqian, ZHANG Liming(Department of Marine Biotechnology, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influencing factors of the protein stability and hemolytic activity of tentacle extract (TE) from the jellyfish *Cyanea capillata*. **Methods** Effects of various factors and treatments on the protein stability and hemolytic activity of TE were explored by protein detection, hemolytic assay and SDS-PAGE analysis. **Results** TE caused a significant and dose-dependent hemolytic effect, and the HU_{50} of TE against 0.5% erythrocyte suspensions from SD rats was 226 $\mu\text{g/ml}$. A 40℃ water bath for 1 hour could effectively remove the contaminating proteins in TE. TE retained hemolytic activity at 4℃ for 28 days but it was unstable when kept at 25℃ over 3 days. TE was active in the range from pH 6.0 to 11.0 and the optimum pH was 8.0. Various buffer solutions had significantly different effects on the stability and hemolytic activity of TE, and a good salting-out effect was observed on the hemolytic protein of TE while the concentration of ammonium sulfate solutions was greater than 26%. **Conclusion** A 40℃ water bath for 1 hour could effectively remove the contaminating proteins in TE and reduce its viscosity. The optimum conditions for maintaining stability and hemolytic activity of TE were 4℃ and pH 8.0. The salting-out effect from 26% and more ammonium sulfate solutions would be conducive to the enrichment of hemolytic protein.

[Key words] *Cyanea capillata*; tentacle extract; stability; hemolytic activity

水母属刺胞动物门,是一类低等的海洋浮游动物,广泛分布于全球各海域。水母蜇伤是最常见的海洋生物伤,可以产生多种局部或全身症状,全世界每年被水母蜇伤的患者数以万计,致死者亦不在少数,给滨海旅游、近海渔业和水下作业带来了极大的困扰^[1,2]。研究表明,水母毒素是结构新颖独特的肽类毒素,具有溶血活性、酶活性、神经毒性、皮肤坏

死和肌肉毒性、肝脏毒性以及心脏毒性等多种生物学活性^[1,3-5]。由于对热不稳定和易与分离介质黏附或自身聚集,水母毒素的分离纯化进展缓慢,明显落后于其他常见的生物毒素。

水母毒素粗毒样品主要有触手提取物(tentacle extract, TE)和刺丝囊毒素(crude nematocyst venom, cNV)两种,其中 TE 制备简便,可大量获取,且活性保持良好,这是其有利于毒素分离纯化的一面;但另一方面,TE 含有大量非毒性的组织蛋白,大大增加了分离纯化的复杂程度。我们试图通过改变各种理化参数,去除粗毒样品 TE 中的非毒性组织蛋白,并

[基金项目] 国家自然科学基金(41176126;81370833)。

[作者简介] 常银龙,硕士研究生, E-mail: donlone@yeah.net。

[通讯作者] 张黎明,教授,博士生导师, Tel: (021) 81871128, E-mail: lmzhang1969@163.com。

降低其黏性,以利于后续分离纯化工作的开展。本研究以容易检测的溶血活性为追踪手段,结合蛋白浓度测定、SDS-PAGE 分析等方法,改变样品所处的理化条件,以观察发形霞水母 (*Cyanea capillata*) TE 的蛋白稳定性,优化其保存和使用条件,为活性蛋白的分离纯化提供基础数据资料。

1 材料与方法

1.1 发形霞水母触手提取物的制备 新鲜发形霞水母(由集美大学水产学院洪惠馨教授鉴定)样品于 2011 年 6 月采自浙江省三门湾。TE 的制备方法见文献[6],Bradford 法测定 TE 的蛋白浓度^[7]。

1.2 溶血活性测定和 SDS-PAGE 分析 SD 大鼠(200~250 g)用 25% 乌拉坦腹腔注射麻醉(1.2 g/kg)。抽取大鼠尾静脉血,等体积 50 U 肝素生理盐水抗凝,用 PBS 洗涤数次,每次洗涤后 1 000 × g 离心 5 min,弃上清液,直至上清液清亮为止。红细胞与 PBS 按体积比 1:200(0.5%) 稀释成红细胞悬液。反应总体积 0.2 ml 红细胞悬液 0.1 ml,加入 0.1 ml TE(或处理后 TE)样品,另设加 0.1 ml PBS 的阴性对照组与加 0.1 ml 0.2 mg/ml SDS 的阳性对照组。37℃ 水浴 30 min,1 000 × g 离心 5 min,吸取上清液 150 μl 用酶标仪检测 A₄₁₅,计算溶血分数。溶血分数 = (样品管 A₄₁₅ - 阴性对照 A₄₁₅) / (阳性对照 A₄₁₅ - 阴性对照 A₄₁₅) × 100%。

将 TE 及其处理后的样品、蛋白标准 Marker 进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶分别采用 5% 积层胶和 12% 分离胶,单孔上样 20 μl,积层胶和分离胶电压分别采用 80 V 和 160 V,考马斯亮蓝快速染色法染色,0.25 mol/L KCl 溶液脱色。

1.3 不同环境因素和处理方法对 TE 溶血活性的影响

1.3.1 TE 溶血活性的剂量反应关系 TE 浓度梯度为 0.043、0.086、0.172、0.257、0.343、0.515、0.687、0.858、1.030、1.202、1.373、1.545 和 1.717 mg/ml,测定不同浓度 TE 样品的溶血活性。

1.3.2 温度对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 将 TE 分别在 4、25、40、60、80 以及 100℃ 条件下放置 60 min,然后 10 000 × g 离心 10 min,收集上清液,检测上清液的蛋白浓度、溶血活性并进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.3 放置时间对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 在 4℃ 和 25℃ 条件下,将 TE 分别放置 1、2、4、6、12、24 h 及 2、3、7、14、21 和 28 d,然后 10 000 × g 离心 10 min,收集上清液,检测上清液的蛋白浓度、溶血活性并进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.4 pH 值对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 将等量的 TE 分别在不同 pH 值(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的 PBS 中透析 10 h,然后 10 000 × g 离心 10 min,收集上清液,检测上清液的蛋白浓度、溶血活性并进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.5 缓冲液对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 将等量的 TE 分别用 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、20 mmol/L Na₂HPO₄(pH 8.0)、20 mmol/L HAc(pH 6.0)、20 mmol/L NH₄Ac(pH 6.0)、50 mmol/L Na₂HPO₄ + 1.5 mol/L (NH₄)₂SO₄(pH 7.0)、H₂O 等 6 种不同缓冲液透析 24 h,然后 10 000 × g 离心 10 min,收集上清液(上清液一)、沉淀,向沉淀加入等量 PBS 溶液,用移液器反复吹吸、混匀,所得样品用 PBS 再透析 24 h,10 000 × g 离心 10 min,收集上清液(上清液二)、沉淀,再加入等量 PBS 重悬(沉淀复溶物),检测上清液一、上清液二和沉淀复溶物的蛋白浓度、溶血活性并进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.6 硫酸铵溶液对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 将等量的 TE 分别用浓度为 15%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、35% 的硫酸铵溶液透析 24 h,10 000 × g 离心 10 min,收集上清液,沉淀加入等量 PBS 重悬,再用 PBS 透析 24 h 后,检测上清液和沉淀复溶物的蛋白浓度、溶血活性并进行 SDS-PAGE 分析。

1.4 数据分析 所有数据均使用 SPSS 18.0 统计软件分析处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的比较采用 *t* 检验,多组之间在方差齐性的基础上采用单因素方差分析,不同时相点和组间差异的整体比较采用重复测量设计的方差分析。

2 结果

2.1 TE 溶血活性的剂量反应关系 发形霞水母 TE 对大鼠红细胞有明显溶血活性,且随着 TE 蛋白浓度增加而溶血分数逐渐增大,溶血活性剂量反应曲线呈“S”形(图 1)。

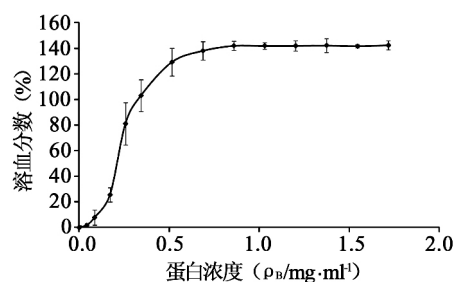


图 1 TE 溶血活性的剂量反应曲线

TE 的半数溶血分数 HU_{50} 为 $226 \mu\text{g/ml}$,TE 蛋白浓度为 $515 \mu\text{g/ml}$ 时 ,溶血分数达到最大值。但由于检测样品溶血活性时 ,测定阳性对照 SDS 的吸光度值低于样品的吸光度值 ,因此 ,按溶血分数公式计算会得到溶血分数大于 100% 的数值。

2.2 温度对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 图 2 (A、B) 是温度对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响。4、25℃ 条件下放置 60 min 对 TE 蛋白浓度和溶

血活性无影响;40℃ 条件下放置 60 min ,TE 蛋白浓度显著下降而溶血活性变化不大;60℃ 条件下放置 60 min ,TE 蛋白浓度显著下降 ,其溶血活性也降低近一半;80、100℃ 条件下放置 60 min ,TE 蛋白浓度下降幅度较 40、60℃ 时小 ,但溶血活性显著降低甚至丧失。SDS-PAGE 分析(图 2C) 表明 ,当温度高于 40℃ 时 ,相对分子质量 $> 72\ 000$ 的蛋白条带较 4、25℃ 时明显减少。

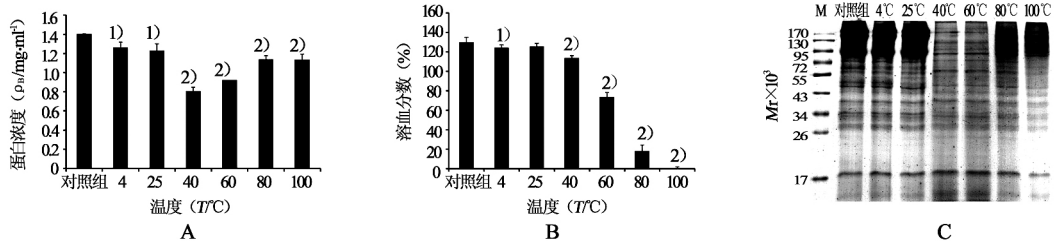


图 2 温度对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响

A. 蛋白浓度测定; B. 溶血活性检测; C. SDS-PAGE 分析($n = 3$,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,与对照组比较)

2.3 放置时间对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 4℃ 条件下(图 3A、B) ,随着放置时间的延长 TE 蛋白浓度逐渐降低 ,至 28 d 时 ,降低约 20% ,但 TE 溶血活性几乎保持不变 ,SDS-PAGE(图 3C) 显示其蛋白条带无明显变化。25℃ 条件下(图 4A、B) ,

随着放置时间的延长 TE 蛋白浓度逐渐降低 ,至 28 d 时 ,降低约 69% ,其溶血活性在 3 d 内保持不变 ,3 d 后开始降低 ,至 7 d 时 ,TE 基本无溶血活性 ,SDS-PAGE 显示其蛋白条带的数量和密度 7 d 后都略有下降(基本同图 3C)。

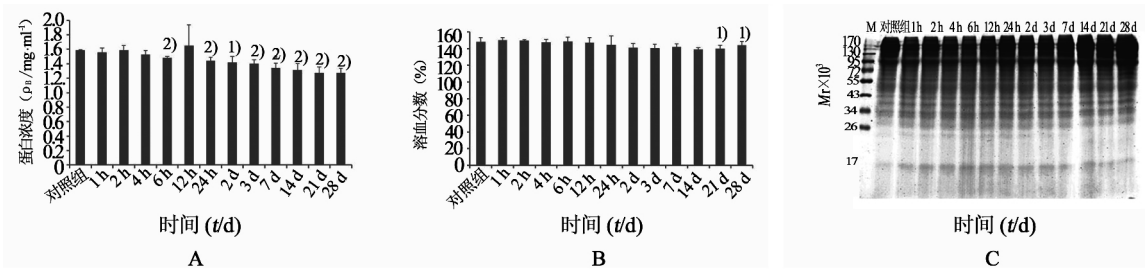


图 3 4℃ 条件下放置不同时间对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响

A. 蛋白浓度测定; B. 溶血活性检测; C. SDS-PAGE 分析($n = 3$,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,与对照组比较)

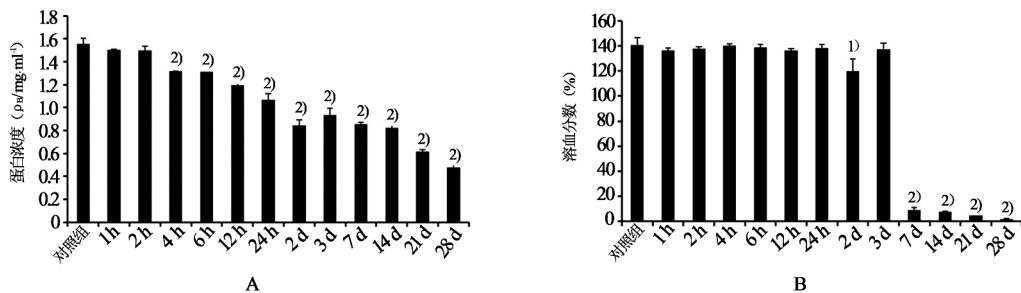


图 4 25℃ 条件下放置不同时间对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响

A. 蛋白浓度测定; B. 溶血活性检测($n = 3$,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,与对照组比较)

2.4 pH 对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响
在不同 pH 值条件下(图 5),TE 的蛋白浓度与溶血活性均呈钟形曲线。pH 6.0~11.0 范围内,TE 的溶血活性变化不大,pH 2.0~5.0 以及 pH 12.0 时

溶血活性显著下降甚至完全丧失,pH 8.0 是 TE 保持溶血活性的最优 pH 条件。强酸尤其是强碱性条件下,TE 蛋白浓度显著下降。

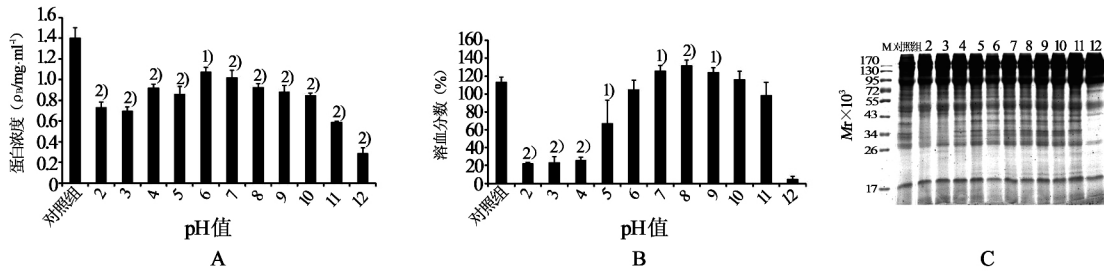


图 5 pH 值对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响

A. 蛋白浓度测定; B. 溶血活性检测; C. SDS-PAGE 分析($n = 3$, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 与对照组比较)

2.5 缓冲液对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响
图 6(A、B) 是缓冲液对 TE 上清液一蛋白稳定性及其溶血活性的影响。经 6 种缓冲液透析 24 h 后,TE 蛋白浓度都明显下降,其中 50 mmol/L

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 1.5 \text{ mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7.0) 缓冲液透析后的 TE 浓度下降最为明显,蛋白浓度趋向于 0 (0.056 mg/ml)。各组缓冲液透析后的上清液一无溶血活性。图 6C 为上清液一的 SDS-PAGE 图。

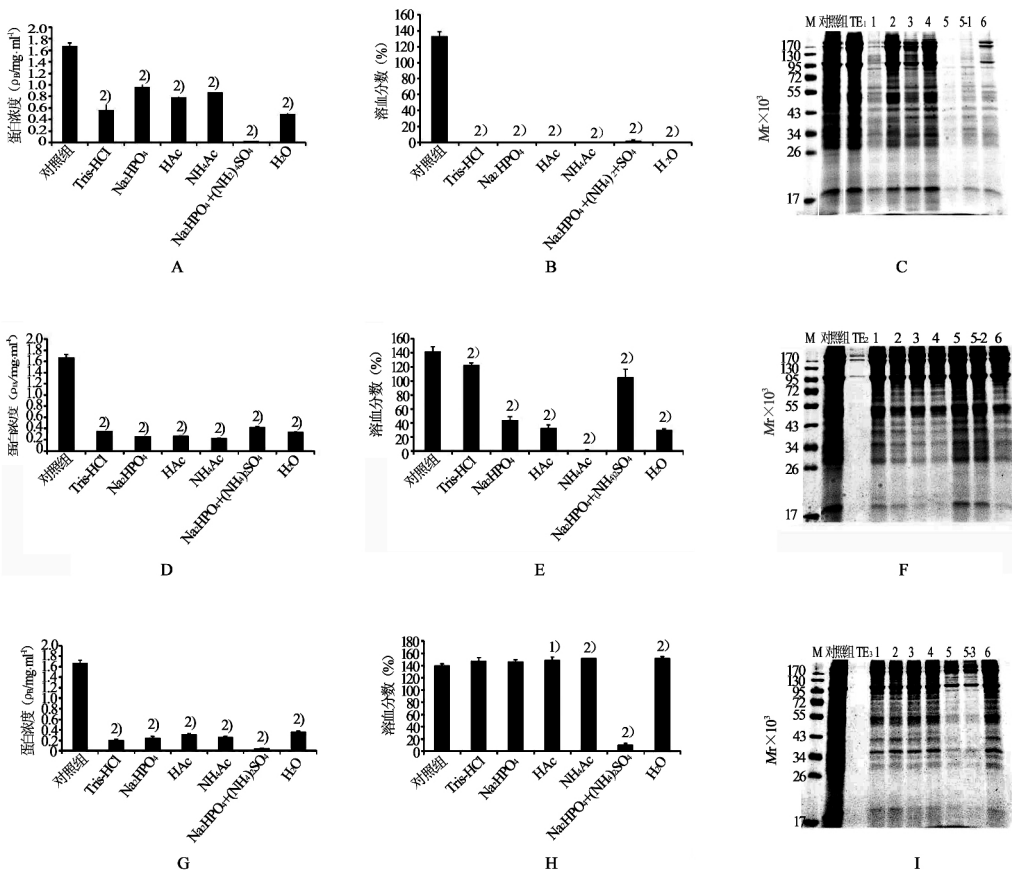


图 6 不同缓冲液对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响

A、D、G. 蛋白浓度测定; B、E、H. 溶血活性检测; C、F、I. SDS-PAGE 分析; 图中 1、2、3、4、5、6 分别代表 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、20 mmol/L Na_2HPO_4 pH 8.0、20 mmol/L HAc pH 6.0、20 mmol/L NH_4Ac pH 6.0、50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 1.5 \text{ mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0 和 H_2O ($n = 3$, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 与对照组比较)

图 6(D、E) 是缓冲液对 TE 上清液二蛋白稳定性及其溶血活性的影响。经 6 种缓冲液透析、离心等处理获得的上清液二, 它们的蛋白浓度范围为 0.2 ~ 0.5 mg/ml; 溶血活性以 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 组最强, 其次是 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 1.5 \text{ mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7.0) 组, 再次是 20 mmol/L Na_2HPO_4 (pH 8.0) 组和 20 mmol/L NH_4Ac (pH 6.0) 组, 但 20 mmol/L HAc (pH 6.0) 组几乎没有溶血活性。SDS-PAGE (图 6F) 显示, 6 组上清液二的高亮蛋白条带与 TE 基本一致。

图 6(G、H) 是缓冲液对 TE 沉淀复溶物蛋白稳定性及其溶血活性的影响。6 组沉淀复溶物的蛋白浓度都 < 0.36 mg/ml; 除 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 1.5 \text{ mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7.0) 组外, 其他沉淀复

溶物都有很强的溶血活性; SDS-PAGE (图 6I) 显示 6 组沉淀复溶物的高亮蛋白条带与 TE 分布一致, 但条带总数明显减少。

2.6 硫酸铵溶液对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响 图 7(A、B) 是硫酸铵溶液对 TE 上清液蛋白稳定性及其溶血活性的影响。硫酸铵浓度在 15% ~ 24% 之间, 上清液溶血活性随着硫酸铵浓度的增加而增强, 当硫酸铵浓度达到 26% 时, 上清液蛋白浓度突然显著下降, 此时溶血活性也几乎消失。28% ~ 35% 硫酸铵溶液透析获得的上清液基本无蛋白条带。硫酸铵溶液对 TE 沉淀蛋白浓度和溶血活性的影响则正好与上清液相反(图 7D、E、F)。综合分析可知, 浓度 > 26% 的硫酸铵溶液对 TE 中的溶血蛋白具有良好的盐析作用。

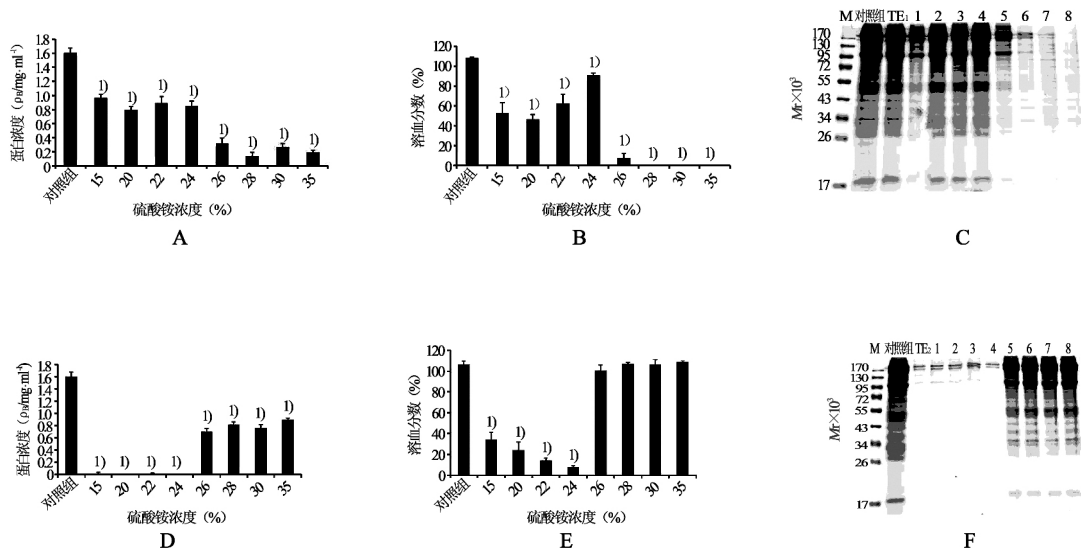


图 7 15% ~ 35% 硫酸铵溶液对 TE 蛋白稳定性及其溶血活性的影响

A、D. 蛋白浓度测定, B、E. 溶血活性检测, C、F. SDS-PAGE 分析; 图中 1、2、3、4、5、6、7、8 分别代表浓度为 15%、20%、22%、24%、26%、28%、30%、35% 的硫酸铵溶液 ($n = 3$, $^{11} P < 0.01$ 与对照组比较)

3 讨论

水母粗毒样品主要有刺丝囊毒素和触手提取物两种。刺丝囊毒素是水母蜇伤中毒的直接毒性成分, 常用于水母蜇伤中毒机制及其防治研究^[8]。本课题组提出触手提取物可作为刺丝囊毒素替代品^[6], 用于水母蜇伤中毒、水母毒素纯化与鉴定等研究。通过改变所用处理条件, 可以降低触手提取物杂蛋白浓度和黏性, 使其样品量大、活性易于保持的特点突显出来, 从而为水母毒素活性蛋白组分的分离纯化、水母蜇伤防治研究提供一条新的途径。

在 0.52 mg/ml 浓度以内, TE 的溶血活性呈

“S”形曲线, 具有明显的剂量依赖性, 与冯金华等^[9]报道的剂量反应关系一致。温度对水母毒素的溶血活性影响显著, 比如从箱形水母 (*Carybdea alata*, 也称海黄蜂) 中提取的毒液, 其溶血活性在 45℃ 时急剧下降, 煮沸后活性消失^[10]; 37℃ 时, 地中海水母 *Rhopilema nomadica* 的毒液没有溶血活性^[11], 因此, Nomura 等^[12]报道, 箱水母 (*Carybdea alata*) 蜇伤中毒后最有效的现场处理方法是用水浸泡蜇伤部位。温度对 TE 稳定性影响的观察结果耐人寻味, 40℃ 水浴 60 min 时, TE 溶血活性变化不大, 但蛋白浓度降低显著, SDS-PAGE 显示几条高亮的大分子蛋白条带密度明显下降, 说明 40℃ 水浴 1 h 预处理可以减少 TE 中非活性蛋白组

分,并降低样品黏性。温度低于 40℃ 时,溶血活性、蛋白浓度以及 SDS-PAGE 蛋白条带变化都不大;温度高于 40℃ 时,溶血活性迅速下降,60℃ 水浴 60 min 溶血活性下降一半,至 80、100℃ 时几乎消失,但此时蛋白浓度反而高于 40℃ 时的浓度值。笔者推测,40℃ 时蛋白浓度下降最为明显的原因可能与触手组织中含有大量的蛋白酶有关,40℃ 可能是这些蛋白酶催化作用的适宜温度。4℃ 条件下放置 28 d 蛋白浓度略有下降,但溶血活性几乎没有下降,25℃ 条件下放置 28 d 时蛋白浓度较 4℃ 放置下降明显,溶血活性在 3 d 内基本保持不变,提示水母溶血蛋白在一定时间内可在常温(25℃)进行纯化,不必担心温度条件所致的溶血蛋白活性消失。pH 值对 TE 溶血活性的影响呈钟形曲线,pH 8.0 是 TE 保持溶血活性的最优 pH 条件,pH 6.0~11.0 范围内,TE 的溶血活性变化不大。另外,强酸尤其是强碱性 pH 会导致 TE 大量的蛋白沉淀出现,SDS-PAGE 显示,沉淀去除的主要部分是相对分子质量(M_r)为 26 000~43 000 的蛋白,而对溶血蛋白的影响并不明显。

改变 TE 所处的缓冲液环境会导致大量的蛋白沉淀出现,说明 TE 蛋白易受缓冲液的影响而不稳定,水母毒素蛋白的不稳定性是阻碍其分离纯化的主要难点之一^[4]。本研究组采用的 6 种透析缓冲液全部都出现沉淀,并且溶血蛋白也一并沉淀下来,采用 PBS 复溶后部分沉淀重新溶解,遗憾的是大部分溶血蛋白不能够被重新溶解,仍存在沉淀中。尽管沉淀部分溶血活性非常强烈,且 SDS-PAGE 显示沉淀中的蛋白条带要比 TE 少很多,但如何在保持溶血活性的前提下有效重新溶解蛋白沉淀,进入下一步的色谱分离仍是个难题。李荣锋等^[13]利用硫酸铵分级沉淀法对沙蜚(*Stomolophus meleagris*)毒素粗提液进行初步分离纯化,从 50% 硫酸铵沉淀中纯化得到抗氧化活性蛋白 SmP90。本研究中一个有趣的现象是缓冲液 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 1.5 \text{ mol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 7.0) 可以将溶血蛋白“沉淀”,但又可以被 PBS 很好地重新溶解,笔者利用硫酸铵分级沉淀和透析相结合的方法处理 TE,通过“沉淀”作用实现大量富集溶血蛋白组分,发现浓度 >26% 的硫酸铵溶液对 TE 中的溶血蛋白具有良好的盐析作用。

总之,TE 蛋白稳定性及其溶血活性受各种环境因素的影响显著,40℃ 水浴 1 h 预处理可以减少 TE 中非活性蛋白组分,并降低样品黏性;4℃ 和 pH 8.0 的理化环境是 TE 保持蛋白稳定性和溶血

活性的最适条件;浓度 >26% 的硫酸铵溶液可大量富集溶血蛋白组分,纯化前的预处理和纯化过程中保持最适理化条件,有利于进一步分离纯化溶血蛋白。

【参考文献】

- [1] Tibballs J. Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy[J]. *Toxicon*, 2006, 48(7): 830-859.
- [2] Kang C, Munawir A, Cha M, et al. Cytotoxicity and hemolytic activity of jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomae) venom [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2009, 150(1): 85-90.
- [3] Helmholz H, Ruhnau C, Schutt C, et al. Comparative study on the cell toxicity and enzymatic activity of two northern scyphozoan species *Cyanea capillata* (L) and *Cyanea lamarckii* (Peron & Leslieu) [J]. *Toxicon*, 2007, 50(1): 53-64.
- [4] Brinkman DL, Burnell JN. Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins [J]. *Toxicon*, 2009, 54(8): 1162-1173.
- [5] Suput D. *In vivo* effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon*, 2009, 54(8): 1190-1200.
- [6] Xiao L, He Q, Guo YF, et al. *Cyanea capillata* tentacle-only extract as a potential alternative of nematocyst venom: its cardiovascular toxicity and tolerance to isolation and purification procedures [J]. *Toxicon*, 2009, 53(1): 146-152.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [8] Rocha J, Peixe L, Gomes NCM, et al. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds—an overview of the last decade and future steps for bioprospecting [J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 1860-1886.
- [9] Feng J, Yu H, Xing R, et al. Partial characterization of the hemolytic activity of the nematocyst venom from the jellyfish *Cyanea nozakii* kishinouye [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(6): 1750-1756.
- [10] Chung JJ, Ratnapala LA, Cooke IM, et al. Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom [J]. *Toxicon*, 2001, 39(7): 981-990.
- [11] Gusmani L, Avian M, Galil B, et al. Biologically active polypeptides in the venom of the jellyfish *Rhopilema nomadica* [J]. *Toxicon*, 1997, 35(5): 637-648.
- [12] Nomura JT, Sato RL, Ahern RM, et al. A randomized paired comparison trial of cutaneous treatments for acute jellyfish (*Carybdea alata*) stings [J]. *Am J Emerg Med*, 2002, 20(7): 624-626.
- [13] Li R, Yu H, Xing R, et al. Isolation, identification and characterization of a novel antioxidant protein from the nematocyst of the jellyfish *Stomolophus meleagris* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51(3): 274-278.

【收稿日期】 2013-11-25 【修回日期】 2014-07-07

【本文编辑】 李睿曼