

海蜇毒素的分离纯化及其性质的初步研究

李联泰¹ 高健² 安贤惠¹ 许宁¹ 张晓磊¹ 阚飞¹

(¹淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 222005)

(²连云港职业技术学院 医药与化学工程系, 222006)

摘要 通过研究冻融海蜇触手, Sephadex G-10 凝胶过滤层析脱盐, SP Sephadex C-25 离子交换层析等分离纯化技术, 从海蜇 *Rhopilema esculentum* 触手中分离到 RE-5-6 毒素, 初步测定其分子量约为 66.2 kD 并对其性质进行了初步研究。结果表明, RE-5-6 具有下列性质。(1) 对鸡血表现出较强的溶血活性;(2) 可大大提高小白鼠的对热痛阈值即有明显的镇痛效果, 且镇痛作用随着注射浓度的增加而加强;(3) 对小白鼠皮肤和眼睛分别表现中度和轻度刺激性;(4) 对革蓝氏阴性菌大肠杆菌以及真菌白色念珠菌等有抑制作用。但未检测到丝氨酸蛋白酶抑制剂活性。

关键词 海蜇 毒素 溶血活性 刺激实验

中图分类号 Q959.132+.4; R93 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)01-0108-07

Preliminary study on isolation, purification and characteristics of a toxin from jellyfish

LI Lian-tai¹ GAO Jian² AN Xian-hui¹
XU Ning¹ ZHANG Xiao-lei¹ KAN Fei¹

(¹Huaihai Institute of Technology, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005)

(²Medicine and Chemical Engineering Department, Lianyungang Technical College, 222006)

ABSTRACT A toxin, named RE-5-6, was isolated, purified and characterized from the tentacles of *Rhopilema esculentum* by Sephadex G-10 gel filtration and SP Sephadex C-25. The molecular weight was 66.2 kD. RE-5-6 showed hemolytic activity to chicken blood; its analgesic effect to mice was significant and intensified with concentration increasing; it showed medium or low level stimulation the skin and eyes of mice; it also inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Candida albicans*. No serine protease inhibiting activity was revealed by the examination.

KEY WORDS Jellyfish *Rhopilema esculentum* Toxin Haemolytic activity
Stimulative test

生物毒素亦称天然毒素,是指动物、植物和微生物产生的对其他生物物种有毒害作用的化学物质,其资源丰富,化学结构多样,具有多种药用功能(陈红霞 2006)。占有地球生物种群数量 80% 以上的海洋生物,因其复杂而独特的生态环境,产生了大量化学结构新颖、生物活性特异和陆地生物无法比拟的海洋生物毒素等生物

江苏省高校自然科学基金项目(06KJD240012)、江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题基金项目(2006HS015)和连云港市 2005 年度支柱产业科技攻关项目(CN0540)共同资助

收稿日期:2007-11-23;接受日期:2008-04-07

作者简介:李联泰(1963-),男,博士,副教授,主要从事环境微生物及其活性物质研究。E-mail: l_lt2003@yahoo.com.cn, Tel:13851228972

活性物质(石建功等 1999,刘雪莉等 1997),其研究发展对于农业、畜牧、医学、药理学、环境和灾害防治等多方面亦有重要意义。本研究以海蜇触手为材料,分离纯化海蜇毒素,并对其部分性质进行探讨,以期在海蜇的综合开发利用提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

海蜇 *Rhopilema esculentum* 采集于江苏省盐城陈港海域,小白鼠购于南京医科大学实验动物中心。

1.2 指示菌

指示菌 1:鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 和鲁克氏耶尔森氏菌 *Yersinia ruckeri*。指示菌 2:大肠杆菌 *Escherichia coli*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和白色念珠菌 *Candida albicans*。上述菌种均由本实验室保存。

1.3 层析填料

Sephadex G-10、SP Sephadex C-25 均为 Amersham 产品。

1.4 方 法

1.4.1 海蜇触手样品(以下简写 RE)制备

参照 Hiroshi 等(2002)的方法(略有改动)。在盐城陈港海域捕捞海蜇若干,迅速剪取触手,塑料袋包装,置填有冰块 的泡沫箱快速送回实验室, $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。用前 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 快速解冻(尚有少量冰时拿出),纱布粗过滤,将滤液在 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 $20\ \text{min}$,取上清,冷冻干燥浓缩备用。

1.4.2 Sephadex G-10 除盐

凝胶 Sephadex G-10 按李建武等(1994)方法处理、装柱(凝胶体积约 $18\ \text{ml}$),上样,超纯水平衡洗脱,流速 $0.3\ \text{ml}/\text{min}$,连接核酸蛋白检测仪,检测,收集 A_{280} 大于 0.03 的部分。

1.4.3 SP-sephadex C25 离子交换层析

凝胶 SP-sephadex C25 按李建武等(1994)方法处理、装柱($12\ \text{mm}\times 15\ \text{mm}$),连接 Biologic Duoflow 蛋白质层析系统,缓冲液 A: $0.05\ \text{mol}/\text{L}$ Tris-HCl, $\text{pH}\ 7.8$ 。缓冲液 B:含 $0.8\ \text{mol}/\text{L}$ NaCl 的缓冲液 A。流速 $1.0\ \text{ml}/\text{min}$,平衡,自动进样,梯度洗脱,根据预实验结果,出现峰时 Hold(即在该盐浓度时保持一定时间),至峰谷时继续,各峰单独收集。

1.4.4 2%红细胞制备

参考刘善庭等(2003)的方法,取新鲜鸡血置于含柠檬酸钠(终质量分数为 $0.38\ \%$)的离心管中, $2\ 000\ \text{r}/\text{min}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 $5\ \text{min}$,将沉淀反复用生理盐水洗涤若干次,至上清液不再呈现红色为至,将洗涤好的红细胞加生理盐水稀释成 $10^7\sim 10^8$ 个/ ml 的悬浮液备用。

1.4.5 溶血活性检测

参照刘善庭(2003)的实验方法,检测每次分离收集的各峰的溶血活性。取红细胞悬浮液 $100\ \mu\text{l}$,样品溶液 $30\ \mu\text{l}$,用生理盐水补足至 $1.6\ \text{ml}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 $30\ \text{min}$, $2\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 $5\ \text{min}$,取上清液 $400\ \mu\text{l}$ 于 24 孔 Costar 孔酶标板,重复 3 次,在 BioTek Synergy HT 酶标仪上测定其 $540\ \text{nm}$ 吸光值(以生理盐水替代样品为对照)。溶血活性以 A_{540} 大小来表示, A_{540} 越大,说明溶血活性越强。

1.4.6 小白鼠刺激性实验

购买 25 日龄小白鼠,体重 $18\sim 22\ \text{g}$,均为雌性。小白鼠的热痛觉、皮肤刺激和眼睛刺激等实验方法及评判标准均参考王心如等(2003)的方法,每个处理 3 只小白鼠。

(1)小白鼠的热痛觉实验 将一大烧杯置于 $55\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中预热 $10\ \text{min}$,再把小白鼠放入烧杯

底部同时秒表记时,观察小白鼠的活动,记录小白鼠自放入烧杯至添后足所需时间即为该小白鼠的痛阈值,实验选用痛阈值在3 s到30 s之间的个体。腹腔注射样品(以生理盐水为对照)0.5 ml,分别在给药后15 s、30 s和60 s测定其痛阈值,当痛阈值超60 s时记60 s。再计算用药后痛阈值提高百分率。

痛阈值提高的百分率/ $\%$ =(用药后的痛阈值-用药前的痛阈值)/用药前的痛阈值 $\times 100\%$

痛阈值提高百分率比对照组提高100%以上为有明显镇痛效果。

(2)小白鼠的皮肤刺激实验 用药前24 h剪掉小白鼠脊柱右侧毛发,去毛范围约8 mm \times 8 mm,观察记录小白鼠皮肤情况,正常个体将0.1 ml样品溶解液(对照组用生理盐水,采用异体对照)直接涂抹在去毛皮肤上,用1 cm \times 1 cm的玻璃纸覆盖,再用无刺激性胶布加以固定,敷用4 h后用温水清除处理部位残留受试物,之后分别在1、6和12 h时观察处理部位皮肤反应状况。

(3)小白鼠的眼刺激实验 用药前先观察并记录小白鼠角膜、虹膜及结膜情况。正常个体将样品20 μ l滴入小白鼠右眼结膜囊内(对照组用生理盐水,采用异体对照),使受试物后小白鼠眼睛被动闭合8~10 s,观察给样品后6、12和24 h,小白鼠眼的局部反应情况。

1.4.7 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性检测

参照安贤惠等(2006)方法,依次在24孔Costar孔酶标板上加入Tris-HCl(0.05 mol/L pH 7.8)410 μ l,胰蛋白酶(Trypsin)50 μ l,样品20 μ l,室温下准确静置5 min,加发色底物苯甲酰-L-精氨酸硝酸还原酶氯氢化物(NBLAN)40 μ l,迅速震荡均匀,用酶标仪在405 nm处扫描3 min,每30 s检测1次,观察酶促动力学变化。以缓冲液代替样品为对照,通过比较趋势线斜率检测丝氨酸酶抑制剂活性。当样品趋势线斜率小于对照组时表明有该活性,反之则无。

1.4.8 抗菌活性检测

采用抑菌圈法(沈萍等 1999)。将7种指示菌制成约A600=0.06的菌悬液,然后分别取100 μ l指示菌1和指示菌2涂布于2216E和LB培养基上,用微量移液器取20 μ l的样品浸润滤纸(直径4 mm、2层),将滤纸片放于涂有菌悬液的培养基上,以无菌水为对照。指示菌1和指示菌2分别置28 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C培养,6 h后及时观察抑菌效果。抗菌活性用抑菌圈直径表示(数值等于抑菌圈外径减滤纸直径),当抑菌圈直径分别小于0.3、0.3~0.5、0.5~1.0、1.1~1.5和大于1.5 mm时分别记为“+/-”,“+”,“++”,“+++”和“++++”,无抗菌活性用“ \emptyset ”表示。

1.4.9 分子量测定

参照周先碗等(2003)SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件有改进。

2 结果

2.1 海蜇触手制备液(RE)经SP Sephadex C-25离子交换层析分离结果

将G-10脱盐后的样品经抽滤、脱气,用SP Sephadex C-25离子交换树脂层析分离,结果如图1。共收集7个峰,分别标记为1、2、3、4、5、6和7。

2.2 RE经SP Sephadex C-25分离峰溶血活性检测结果

海蜇触手处理液经SP Sephadex C-25分离得到的7个峰,其溶血活性检测结果如表1。

由表1可见,第5个分离峰(命名为RE-5)具有较强的溶血活性,经SPSS11.0软件分析,RE-5的溶血活性与对照、其他峰相比达到极显著水平,进而对其继续分离纯化。

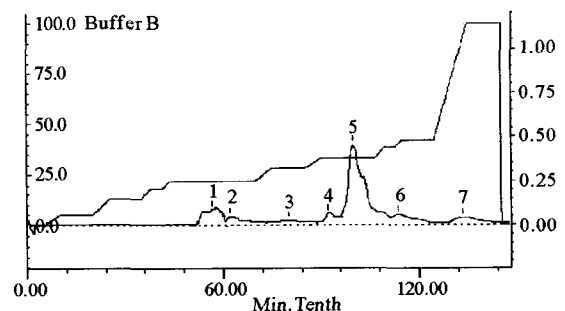


图1 RE经SP Sephadex C-25离子交换层析分离结果
Fig.1 The peaks achieved from *Rhopilema esculenta* by Sp Sephadex C-25

表 1 RE 经 SP Sephadex C-25 分离峰溶血活性检测结果

Table 1 Hemolytic activity of different peaks of *Rhopilema esculenta* by SP Sephadex C-25

溶血活性 Hemolytic activity/ A_{540}		RE 经 SP Sephadex C-25 分离峰 The peaks of <i>Rhopilema esculenta</i> by SP Sephadex C-25							
		CK(对照)	1	2	3	4	5	6	7
重复	I	0	0.012	0.004	0.002	0.002	0.121	0.005	0.002
Repeat	II	0	0.015	0.004	0.001	0.003	0.117	0.003	0.003
measure	III	0	0.013	0.003	0.003	0.003	0.118	0.004	0.002
平均	Average	0	0.013	0.004	0.002	0.003	0.119	0.004	0.002

2.3 RE-5 经 SP Sephadex C-25 离子交换层析再分离结果

制备 RE-5 浓缩、脱盐后,再经 SP Sephadex C-25 离子交换层析分离,结果如图 2。共收集 7 个峰,分别命名为 RE-5-1、RE-5-2、RE-5-3、RE-5-4、RE-5-5、RE-5-6 和 RE-5-7。图 2 中简写为 1、2、3、4、5、6 和 7。

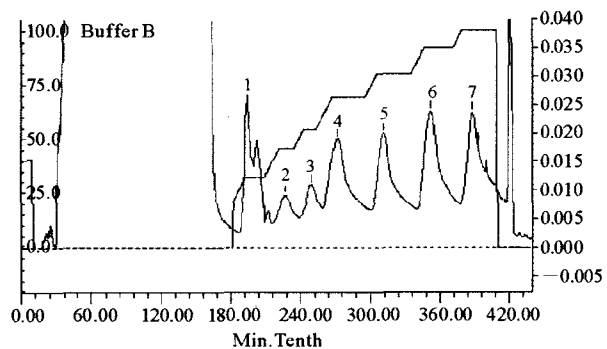


图 2 RE-5 经 SP Sephadex C-25 离子交换层析分离结果
Fig. 2 The peaks achieved from RE-5 by SP Sephadex C-25

2.4 RE-5 经 SP Sephadex C-25 离子交换层析分离峰溶血活性检测结果

RE-5 再次经 SP Sephadex C-25 分离后收集到 7 个峰,其溶血活性检测结果如表 2。

表 2 RE-5 经 SP Sephadex C-25 分离峰溶血活性检测结果

Table 2 Hemolytic activity of different peaks of RE-5 by SP Sephadex C-25

溶血活性 A_{540} Hemolytic activity / A_{540}		RE-5 经 SP Sephadex C-25 分离峰 The peaks of RE-5 by SP Sephadex C-25							
		CK(对照)	RE-5-1	RE-5-2	RE-5-3	RE-5-4	RE-5-5	RE-5-6	RE-5-7
重复	I	0	0.005	0.003	0.002	0.015	0.014	0.211	0.012
Replicate	II	0	0.006	0.001	0.003	0.013	0.013	0.203	0.015
	III	0	0.007	0.001	0.004	0.011	0.012	0.209	0.013
平均	Average	0	0.006	0.002	0.003	0.013	0.013	0.208	0.013

由表 2 可见,RE-5-6 具有较强的溶血活性,RE-5-4、RE-5-5 和 RE-5-7 也有一定溶血活性。SPSS11.0 分析表明,RE-5-6 的溶血活性极显著高于其他峰,RE-5-4、RE-5-5 和 RE-5-7 极显著高于对照。

2.5 RE-5-6 对小白鼠热痛觉的影响

收集 RE-5-6,冷冻干燥,生理盐水溶解备用。将小白鼠随机分为 3 组,其中 1 组为对照。两个实验组给药浓度(RE-5-6 溶液蛋白质含量)分别为 0.39 和 0.78 mg/ml,每组 3 只,结果如表 3。

表3 RE-5-6对小白鼠痛阈提高百分率(%)
Table 3 Elevated percentage of limited time of RE-5-6 to mouse

处 理 Treatment		对 照 Control			RE-5-6					
					0.39			0.78		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
15 min	阈 值 提 高 百 分 率	76	56	68	160	159	150	186	201	216
30 min	Elevated percentage	71	56	64	165	159	150	186	205	216
60 min	of limited time	75	53	60	155	150	152	186	211	216

从表3中可以看出,注射RE-5-6后小鼠的痛阈明显提高,表明RE-5-6可使小鼠对热痛反应变得迟钝,且有随着样品浓度的增加其作用增强的趋势。

2.6 RE-5-6对小白鼠的皮肤刺激效果

实验选用皮肤表皮完好,均无红斑,水肿,隆起,焦痂等异常现象的小鼠,结果见表4。

表4 RE-5-6对小白鼠皮肤刺激得分及强度评价
Table 4 Irritant degree of RE-5-6 to mice skin

处 理 Treatment		对 照 Contro			RE-5-6 溶液/mg/ml Solution of RE-5-6					
					0.39			0.78		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
刺 激 强 度 积 分 Irritant degree	1h	0+0	0+0	0+0	0+0	0+0	0+0	1+1	1+0	1+1
	6h	0+0	0+0	0+0	1+0	1+1	1+0	1+2	2+1	1+2
	24h	0+0	0+0	0+0	1+1	1+1	1+0	1+2	2+1	2+2
刺 激 强 度 综 合 评 价 Comprehensive evaluation		无 None			轻度 Mild			中度 Moderate		

从表4中可以看出,RE-5-6对小白鼠皮肤具有刺激作用,且刺激作用随着样品浓度的升高而增强,在RE-5-6溶液蛋白质含量为0.39和0.78 mg/ml时分别表现为轻度和中毒刺激。

2.7 RE-5-6对小白鼠的眼刺激效果

选用角膜、虹膜及结膜完好,均无混浊,充血,肿胀,分泌物等异常现象的小白鼠,结果如表5。

表5 RE-5-6对小白鼠眼刺激得分及强度评价
Table 5 Irritant degree of RE-5-6 to mice eyes

处 理 Treatment		对 照 Control			RE-5-6 溶液/mg/ml Solution of RE-5-6					
					0.39			0.78		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
刺 激 强 度 积 分 Irritant degree	6h	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0+
		0+0	0+0	+0+0	0+0	0+0	0+0	0+0	0+0	0+0
	12h	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0	0+0+0+	0+0+0+	0+1+0+	0+1+0+
	0+0	0+0	0+0	0+0	+0+0	0+0	0+1	0+1	1+1	
	24h	0+0+0+	0+0+0+	0+0+0+	0+1+0+	0+1+0+	0+1+0+	0+1+0+	0+1+1+	0+1+1+
		0+0	0+0	0+0	0+1	1+1	0+1	0+2	1+1	1+1
刺 激 强 度 评 价 Comprehensive evaluation		无 None			无 None			轻度 Mild		

由此可见,RE-5-6 对小白鼠眼有微弱的刺激作用,但在低浓度时无刺激作用。

2.8 RE-5-6 的抑菌活性

按方法 1.4.8 检测 RE-5-6 的抑菌活性,结果见表 6。

2.9 RE-5-6 的丝氨酸蛋白酶抑制剂活性检测

本研究未检测到 RE-5-6 的丝氨酸蛋白酶抑制剂活性(数据略)。

2.10 RE-5-6 的分子量测定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱如图 3,由此可见 RE-5-6 分子量约为 66.2 kD。

3 讨论

(1)本研究通过 Sephadex G-10 除盐和两次 SP-sephadex C25 分离纯化,得到了在 SDS-PAGE 中显示单一条带的毒素 RE-5-6,表明该方法可以得到纯度较高的产品。同 Yu 等(2007)、Sanchez 等(2006)、Bailey 等(2005)、Wiltshire 等(2000)、Carrette 等(2004)和 Ramasamy 等(2005)在海蜇毒素研究中所用方法相比,作者所用技术简便经济,效果良好。

(2)实验发现,通过 SP-sephadex C25 从海蜇触手分离出来的溶血毒素 RE-5-6 不仅具有明显的镇痛作用而且对革兰氏阴性、阳性菌以及真菌等表现出程度不一的抑菌活性。这在其他毒素蛇毒、蜂毒和蝎毒等动物毒素(余晓东 2001a)以及芋螺毒素、海葵毒素和海洋藻类毒素等海洋生物毒素(余晓东 2001b;傅余强等 2002;尹伊伟等 2004)中未见报道,说明该毒素具有开发为抑制疼痛和抗微生物感染药物的潜能。当然本研究还有许多工作尚待进一步深入,如鉴定该毒素的结构、功能及作用机理、有效剂量等。

(3)海蜇在我国江苏等地建立了规模较大的养殖基地,为人们提供了很好的食用海蜇资源。而目前对海蜇的利用一般只限于对海蜇皮腌制后的食用,对其他部分则任由其分化流失,既污染了环境(尤其是海洋水环境),又造成了生物资源的浪费。水母的触手上分布着刺丝囊,是腔肠动物所特有的,其中含有大量的毒素成分(宋杰军等 1996;于华等 2003),对其提取、鉴定、改性并应用于水产生物药物(如杀虫、杀菌和抗病毒等),对提高水产品质量、提高农业生物资源利用率和减少污染等均具有重要意义。

表 6 RE-5-6 的抑菌活性

Table 6 Antimicrobial activity of RE-5-6

指示菌株 Microbes	RE-5-6 抑菌活性 Antimicrobial activity of RE-5-6
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	++++
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	+/-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	+
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	+++
鲁克氏耶尔森菌 <i>Yersinia ruckeri</i>	-
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	-
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	-

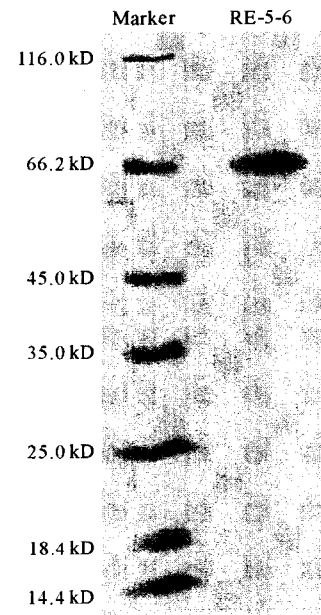


图 3 RE-5-6 电泳

Fig. 3 The electrophoresis graph

参 考 文 献

- 于华,刘希光,刘松,邢荣娥,李鹏程. 2003. 水母毒素的研究现状. 海洋科学, 27(11): 27~29
 王心如,周宗灿. 2003. 毒理学实验方法与技术. 北京: 人民卫生出版社
 尹伊伟,王朝晖,江天久, 骆育敏. 2004. 海洋藻类毒素的生态毒理学研究. 海洋环境科学, 23(2): 78~80

- 安贤惠,梁建国,李卫国,徐春花,吕毅,王旭,董靖,张崇星,张克云. 2006. 中国对虾中抗菌短肽的分离纯化及功能分析. 中国水产科学, 13(6):1 012~1 016
- 刘雪莉,钱伯初. 1997. 日本海洋天然活性物质研究简况. 中国海洋药物, 16(1):45
- 刘善庭. 2003. 药理学实验. 北京:中国医药科技出版社, 117~118
- 李建武,肖能庚,余瑞元,袁明秀,陈丽蓉,陈雅蕙,陈来同. 1994. 生物化学实验原理和方法. 北京:北京大学出版社, 36~46
- 沈萍,范秀容,李广武. 1999. 微生物学实验(第3版). 北京:高等教育出版社
- 宋杰军,毛庆武. 1996. 海洋生物毒素学. 北京:北京科学技术出版社
- 余晓东. 2001a. 当代生物毒素研究特点和发展趋势. 重庆师范学院学报(自然科学版), 18(1):25
- 余晓东. 2001b. 芋螺毒素 Conotoxins 的研究进展. 重庆师范学院学报(自然科学版), 18(4): 83~91
- 陈红霞. 2006. 生物毒素的医药应用研究进展. 生物技术, 16(1):84~86
- 周先碗,胡晓倩. 2003. 生物化学仪器分析与实验技术. 北京:化学工业出版社, 180~186
- 傅余强,顾谦群,方玉春,管华诗. 2000. 海洋生物中蛋白质、肽类毒素的研究新进展. 中国海洋药物杂志, (2):45~50
- Bailey, P. M., Bakker A. J., Seymour J. E. *et al.* 2005. A functional comparison of the venom of three Australian jellyfish: *Chironex fleckeri*, *Chiropsalmus* sp., and *Carybdea xaymacana* -on cytosolic Ca^{2+} , haemolysis and *Artemia* sp. lethality. *Toxicon*, 45(2):233~242
- Carrette, T., and Seymour, J. 2004. A rapid and repeatable method for venom extraction from Cubozoan nematocysts. *Toxicon*, 44(2):135~139
- Hiroshi, N., Kyoko, T., and Masahiro, N. 2002. A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (Sea Wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(1):97~102
- Ramasamy, S., Isbister, G. K., Seymour, J. E. *et al.* 2005. Pharmacologically distinct cardiovascular effects of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom and a tentacle-only extract in rats. *Toxicology letters*, 155 (2): 219~226
- Sanchez-Rodriguez, J., Torrens, E., and Segura-Puertas, L. 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytoly-sins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch. Toxicol.* 80(3):163~168
- Wiltshire, C. J., Sutherland S. K., Fenner P. J. *et al.* 2000. Optimization and preliminary characterization of venom isolated from 3 medically important jellyfish: The box (*Chironex fleckeri*), irukandji (*Carukia barnesi*), and blubber (*Catostylus mosaicus*) jellyfish. *Wilderness Environ. Med.* 11(4):241~250
- Yu, H., Li, C., Li, R. *et al.* 2007. Factors influencing hemolytic activity of venom from the jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye. *Food Chem. Toxicol.* 45(7):1 173~1 178