

白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶的分离纯化及性质

陈夏, 余晓东*, 邓敏, 李卉, 林亦心, 和七一, 柳建平

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆市生物活性物质工程研究中心, 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 400047)

摘要: 用 DEAE-SephadexA-25、Sephadex-G-100 和 CM-SephadexC-50 三步柱层析分离法, 从白唇竹叶青 (*Trimeresurus albolabris*) 蛇毒中分离纯化出具有 5'-核苷酸酶活性的组分。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其分子量为 48.03kDa, HPLC 柱层析图谱为单一峰。该组分是一个糖蛋白, 以一磷酸腺苷 (AMP) 为底物时, 其酶活力为 330.33 $\mu\text{g Pi}/(\text{min} \cdot \text{mg})$; 而以二磷酸腺苷 (ADP) 为底物时, 其酶活力为 123.56 $\mu\text{g Pi}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。金属离子 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 对 5'-核苷酸酶活性有显著的抑制作用, EDTA 可完全抑制其酶活性。该酶的最适 pH 为 9, 最适温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 。该组分还具有抑制由 ADP 诱导的血小板聚集的生物功能。

关键词: 白唇竹叶青蛇毒; 5'-核苷酸酶; 分离纯化

中图分类号: Q502; Q959.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)04-0399-06

Purification and Characterization of 5'-nucleotidase from *Trimeresurus albolabris* Venom

CHEN Xia, YU Xiao-dong*, DENG Min, LI Hui, LIN Yi-xin, HE Qi-yi, LIU Jian-ping

(College of Life Science, Chongqing Normal University; Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance; Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing 400047)

Abstract: A 5'-nucleotidase was isolated and purified from the snake venom of *T. albolabris* using three steps of chromatography including DEAE-SephadexA-25, Sephadex-G-100 and CM-Sephadex C-50. Using SDS-PAGE and HPLC column chromatography the purified 5'-nucleotidase proved to be homogenous. It was a glycoprotein with a molecular weight of 48.03kDa. The enzymatic activities of the purified 5'-nucleotidase were 330.33 $\mu\text{g Pi}/\text{min mg}$ and 123.56 $\mu\text{g Pi}/\text{min mg}$ when using AMP (adenosine monophosphate) and ADP (adenosine diphosphate) as substrates, respectively. Metal ions, including Zn^{2+} , Fe^{3+} and Cu^{2+} , could inhibit 5'-nucleotidase activity, as did EDTA. Its optimum pH was nine and its optimum temperature was 50 $^{\circ}\text{C}$. It has a potent inhibitory effect on rabbit platelet aggregation induced by ADP.

Key words: *Trimeresurus albolabris*; Snake venom; 5'-nucleotidase; Isolation and purification

5'-核苷酸酶是一种磷酸酯酶, 主要分布于动植物细胞、细菌及动物毒液中 (Li, 2004)。它能水解 5'-单核苷酸, 产生核苷。为此, 作为一种工具酶, 已被广泛用于基因工程和核酸研究。同时, 该酶也具有重要的生物功能, 如在细胞生长发育、运动、纤维蛋白合成、神经传递、提高表皮或内皮屏障功能及淋巴细胞的黏附、再循环、免疫应答等方面均发挥重要的作用 (Colgan et al, 2006)。不同生物来源和同种生物不同组织细胞来源的 5'-核苷酸酶的理化、酶学性质和生物功能存在一定的差异 (Sträter, 2006)。尤其是从不同种蛇毒来源的 5'-

核苷酸酶在生物功能上显示出差异, 如从棕点竹叶青 (*Trimeresurus gramineus*) 蛇毒中分离出的 5'-核苷酸酶, 具有抑制由 ADP、花生四烯酸 (AA)、胶原蛋白、低浓度凝血酶和 Ionophor (A-23187) 诱导的血小板聚集的活性 (Ouyang & Huang, 1983); 从竹叶青 (*T. Stejnegeri*) 蛇毒分离出的 5'-核苷酸酶能抑制 ADP、AA、TMVA、凝血酶诱导的血小板聚集, 而且对 ADP 诱导的血小板聚集还有明显的解聚作用 (Yu et al, 1997); 眼镜蛇 (*Naja naja*) 毒的 5'-核苷酸酶具有抗凝血作用 (Dhananiya et al, 2006)。我们曾对我国重庆金佛山产的白唇竹叶青 (*T.*

收稿日期: 2008-01-30; 接受日期: 2008-05-27

基金项目: 重庆市自然科学基金重点项目 (CSTC2006BA5032); 重庆市教委基金项目 (KJ080824)

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: yxd@cqu.edu.cn

albolabris) 蛇毒粗毒进行检测, 发现具有5'-核苷酸酶活性, 但目前对该蛇毒5'-核苷酸酶的研究还未曾见报道。为此, 本文从白唇竹叶青 (*T. albolabris*) 蛇毒粗毒中分离纯化该酶, 并对其理化和酶学性质及对家兔血小板聚集的作用进行研究, 现将我们的研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

白唇竹叶青毒蛇采自重庆金佛山; 健康家兔, 体重 $5\text{kg}\pm 20\text{g}$, 购于重庆腾鑫生物技术有限公司; DEAE-SephadexA-25、CM-SephadexC-50 和 Sephadex G-100(superfine) 购自 Amresham 公司; AMP 和 ADP 购自 Amresco 公司; 蛋白质 Markers 购自 Takara 公司; EDTA 和 PMSF 为 Sigma 公司产品; 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

Himac CR 22E 高速冷冻离心机(日本, Hitachi), Modul YOD-230 真空冷冻干燥机(美国, Thermo savant), PB-10 酸度计(德国, 赛多利斯), Biologic Duoflow 层析系统和 UNIVERSAL HOOD II S.N 凝胶成相系统(美国, Bio-rad), 高效液相色谱仪(HPLC) Waters600(美国, Waters), 8500 型紫外分光光度计(上海天美), LBY-NJ4 血小板聚集仪(北京普利生)。

1.3 白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶的分离纯化

白唇竹叶青蛇毒 0.5g 溶于 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 3mL (pH8.3) 中, 4°C 孵育过夜, 完全溶解后离心 10min (4°C , 5000r/min), 取上清, 上样于用同样缓冲液平衡好的 DEAE-SephadexA-25 柱, 用 $0-1\text{mol/L}$ NaCl 溶液线性梯度洗脱; 将具有 5'-核苷酸酶活性强的分离峰收集浓缩后, 上样于 Sephadex G-100 柱, 用 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.6) 洗脱; 再将得到的具有 5'-核苷酸酶活性强的分离峰收集浓缩后, 上样于 CM-SephadexC-50 柱, 用 0.01mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH5.8) 洗脱, 并用 $0-1\text{mol/L}$ NaCl 溶液线性梯度洗脱。每次收集的活性组分进行 Sephadex G-25 除盐、浓缩, 然后上一步色谱柱。

1.4 纯度鉴定和分子量的测定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定分子量: 分离胶浓度 15% , 浓缩胶浓度 5% , 电泳完后用考马斯亮蓝 R250 染色, 用含 25% 乙醇和 10% 冰醋酸的混合液脱色。

HPLC 柱层析: 取最后得到的样品 20mg , 溶于 $750\mu\text{L}$ 0.1% TFA 溶液, 4500r/min 离心 5min , 取上清液, 上样于用 0.1% TFA 溶液平衡过的 C_{18} 柱, 用 $0-66.5\%$ 乙腈(溶于 0.1% TFA 溶液) 梯度洗脱, 最后用 66.5% 乙腈 0.1% TFA 溶液洗脱。

1.5 糖蛋白测定

参照 Guang & Qi (1982) 方法进行。

1.6 5'-核苷酸酶、ADP 酶活力测定

参照 The Fourth Section of Yunnan Institute of Zoology (1976) 方法进行, 按 Jesudium et al (1976) 方法测定无机磷的生成。

1.7 金属离子对酶活力的影响

各种金属离子盐 (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{3+}) 配成 5mmol/L , 与等体积酶溶液 ($300\mu\text{g/mL}$) 混合, 37°C 保温 1h 后稀释成 $50\mu\text{g/mL}$, 然后测定其 5'-核苷酸酶活性(以 AMP 为底物)。EDTA 作用于酶后, 再加入过量金属离子, 37°C 保温 1h , 检测 5'-核苷酸酶活性。以不加任何离子的一组作为对照组, 酶活力设为 100% 。

1.8 抑制剂对酶活性的影响

4 种化学抑制剂(苯甲脒、 β -巯基乙醇、PMSF 和 EDTA) 分别配成 5mmol/L 溶液, 分别与等体积酶溶液 ($300\mu\text{g/mL}$) 混合, 37°C 保温 1h 后稀释成 $50\mu\text{g/mL}$, 然后测定 5'-核苷酸酶活性(底物为 AMP)。以不加任何试剂的一组作为对照组, 酶活力设为 100% 。

1.9 pH 对酶活性的影响

不同 pH 缓冲液体系组成如下: 20mmol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH4.0-5.0); 20mmol/L 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液 (pH6.0-7.0); 50mmol/L Tris-盐酸缓冲液 (pH8.0-9.0); 50mmol/L 碳酸氢钠-氢氧化钠缓冲液 (pH10.0-11.0), 所有缓冲液均含有 0.5mmol/L CaCl_2 和 10mmol/L NaCl 以维持相同盐浓度。样品分别与上述缓冲液混合, 室温作用 1h , 再测定其 5'-核苷酸酶活力(AMP 为底物)。以最高酶活力定义为 100% , 计算其他不同 pH 条件下的相对酶活力, 以 pH 与酶的相对活力作图。

1.10 温度对酶活性的影响

样品置不同温度 (10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 和 80°C) 下保温 1h , 然后在同样温度下测定其 5'-核苷酸酶活性(AMP 为底物)。以最高酶活力定义为 100% , 计算其他不同温度条件下的相对酶活力, 以温度与酶的相对活力作图。

1.11 血小板聚集实验

富血小板血浆的制备: 新鲜的兔血收集于硅烷化的塑料管内, 并以 3.8% 柠檬酸钠 9:1 (V/V) 抗凝, 室温离心 10 min (1000 r/min), 取上层液即为富血小板血浆 (PRP)。剩余血液继续离心 15 min (3000 r/min), 分离出贫血小板血浆 (PPP), 作为测定时的对照或调节 PRP 中的血小板数。

血小板聚集性测定: 按 Born 氏比浊法原理, 采用 LBY-NJ4 血小板聚集仪进行测定。测定结果按下式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照最大聚集百分率} - \text{加抑制剂最大聚集抑制百分率})}{\text{对照最大聚集百分率}} \times 100\%$$

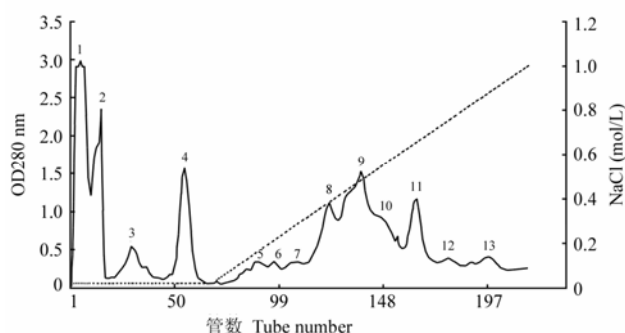


图 1 DEAE-SephadexA-25 柱色谱图

Fig. 1 DEAE-SephadexA-25 ion exchange chromatograms

层析柱: 2.0cm×60cm; 流速: 24mL/h; 每管收集体积: 4mL。
Column volume: 2.0cm×60cm; flow rate: 24mL/h; liquid volume of each tube: 4mL.

核苷酸酶活性。将峰 III 合并收集后, 在 Sephadex G-25 上脱盐后进行检测。

2.4 5'-核苷酸酶的纯度

纯化后的 5'-核苷酸酶组分作 SDS-PAGE, 其结果如图 4 所示, 呈现为单一条带。测得相对分子量约为 48.03 kDa。

将 CM-SephadexC-50 层析后的第 III 峰所得样品上 HPLC 层析后, 其色谱结果如图 5 所示, 在 10-12min 时洗脱下一个单一的蛋白峰。

2.5 糖蛋白测定结果

聚丙烯酰胺凝胶电泳后的条带切成两份, 分别用考马斯亮兰和过碘酸-Schiff's 试剂染色, 条带呈粉红色, 且位置与考马斯亮兰染色位置一致, 表明它是糖蛋白。

2.6 5'-核苷酸酶、ADP 酶活力测定结果

以 AMP 为底物时 5'-核苷酸酶活力为 330.33 μg

2 结果

2.1 DEAE-SephadexA-25 柱色谱结果

分离图谱如图 1 所示, 共分离出 13 个峰, 其中峰 I 的 5'-核苷酸酶活性最强, 将峰 I 收集并在 Sephadex G-25 上脱盐浓缩后做进一步纯化。

2.2 Sephadex G-100 柱色谱结果

分离图谱如图 2 所示, 共得 3 个峰, 其中峰 II 具有 5'-核苷酸酶活性。将峰 II 合并收集, 浓缩后做进一步纯化。

2.3 CM-SephadexC-50 柱色谱结果

分离图谱如图 3 所示, 共得 3 个峰, 其中峰 III 具 5'-

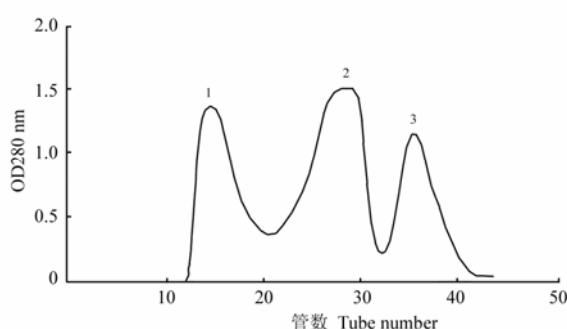


图 2 Sephadex-G-100 柱色谱图

Fig. 2 Sephadex-G-100 gel filtration chromatograms

层析柱: 1.0cm×100cm; 流速: 6mL/min; 每管收集体积: 3mL。
Column volume: 1.0cm×100cm; flow rate: 6mL/min; liquid volume of each tube: 3mL.

Pi/ (min · mg), 以 ADP 为底物时 5'-核苷酸酶活力为 123.56 μg Pi/ (min · mg)。

2.7 金属离子和抑制剂对酶活力的影响

金属离子及抑制剂对 5'-核苷酸酶活力的影响 (AMP 为底物) 结果如表 1 所示, Zn²⁺、Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 对 5'-核苷酸酶活性有显著的抑制作用, EDTA 完全抑制了该酶的活力。

2.8 pH 对酶活性的影响

pH 对白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶活性的影响 (AMP 为底物) 结果见图 6, 显示其该酶的最适 pH 为 9。

2.9 温度对酶活性的影响

温度对白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶活性的影响 (AMP 为底物) 结果见图 7, 显示该酶的最适温度为 50℃。

2.10 血小板聚集测定结果

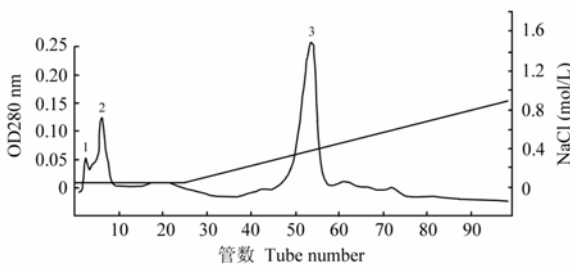


图 3 CM-SephadexC-50 柱色谱图

Fig. 3 CM-SephadexC-50 ion exchange chromatograms

层析柱: 2.0cm×30cm; 流速: 20mL/h; 每管收集体积: 3mL。
Column volume: 2.0cm×30cm; flow rate: 20mL / h; liquid volume of each tube: 3mL.

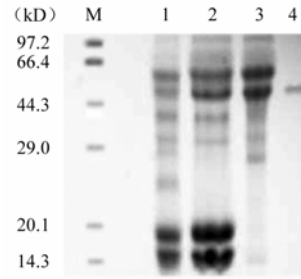


图 4 白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 4 SDS-PAGE pattern of the 5'-nucleotidase of snake venom (*Trimeresurus albolabris*)

泳道 M: 蛋白质 marker; 1: 粗毒样品; 2: DEAE-SephadexA-25 第 1 峰样品; 3: Sephadex G-100 第 2 峰样品; 4: CM-SephadexC-50 第 3 峰样品。样品上样量分别为 40、40、40 和 6μg。

Lane M: protein marker; 1: crude venom; 2: the first peak after DEAE-SephadexA-25; 3: the second peak after Sephadex G-100; 4: the third peak after CM-SephadexC-50. Each sample is 40, 40, 40, 6μg.

表 1 金属离子及抑制剂对白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶活力 (μg Pi/min mg) 的影响 (n=3, mean±SD)

Tab. 1 Effect of metal ions and inhibitors on the activity of 5'-nucleotidase (μg Pi/min mg) from snake venom (*Trimeresurus albolabris*)

对照	金属离子 (5mmol/L)					抑制剂(5mmol/L)			
	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Zn ²⁺	Fe ³⁺	Cu ²⁺	EDTA	PMSF	β-巯基乙醇	苯甲胺
100	98.4±0.7	106.8±2.3	3.2±1.0*	37.6±1.0*	0*	0*	91.8±3.1	113±2.8	97±0.6

The values represent the mean±SD, n=3, * P<0.01. Student-t analysis.

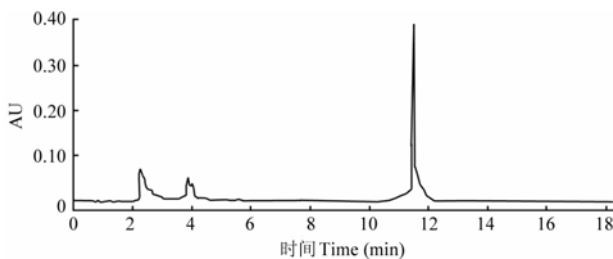


图 5 HPLC 柱层析色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of 5'-nucleotidase

层析柱: 分析型 C18 柱; 流速: 2mL/min。
Column: C18 analysis; flow rate: 2mL/min.

白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶对 ADP (20 μmol/L) 诱导的家兔血小板聚集具有明显的抑制作用。抑制率与所用 5'-核苷酸酶剂量相关(图 8)。

3 讨论

通过 DEAE-SephadexA-25、Sephadex-G-100 和 CM-SephadexC-50 三步柱层析法, 我们从我国产的

白唇竹叶青蛇毒中首次分离纯化出了 5'-核苷酸酶组分(图 1, 2, 3), SDS-PAGE 和 HPLC 层析结果皆提示该组分为单一组分(图 4, 5), 其表观分子量为 48.03kDa, 属糖蛋白。其理化和酶学性质实验表明, 该 5'-核苷酸酶组分与竹叶青属的其他蛇毒来源的 5'-核苷酸酶有较多相似点, 如它们皆为糖蛋白, 其酶活性能被 EDTA 抑制, Zn²⁺对其酶活性皆有明显抑制作用; 也有不同处, 如 Fe³⁺离子不能完全抑制白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶的活性, 而能完全抑制竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶活性。在最适 pH 方面, 白唇竹叶青蛇毒的 5'-核苷酸酶为 9, 与竹叶青蛇毒中分离出的 5'-核苷酸酶相似 (Yu et al, 1996), 但与从眼镜蛇(*Najm naja atra*)蛇毒中分离的 5'-核苷酸酶 (最适 pH 为 6.5—7.0) 和从蝮蛇(*Agkistrodon blomhoffii*)蛇毒中分离的 5'-核苷酸酶 (最适 pH 为 6.8—6.9) 不同。不同种属的蛇毒 5'-核苷酸酶的这些异同点可能与它们所处的分类种属亲缘关系有

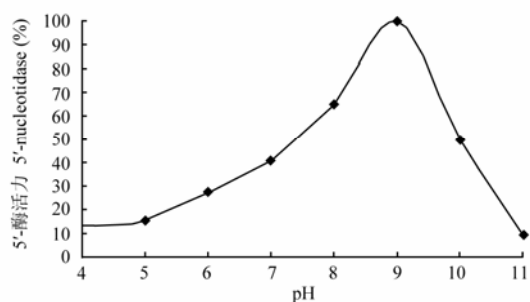


图 6 pH 对白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶活力的影响 (mean±SD, n=3)

Fig. 6 Effect of pH on the activity of 5'-nucleotidase from snake venom (*Trimeresurus albolabris*) (mean±SD, n=3)

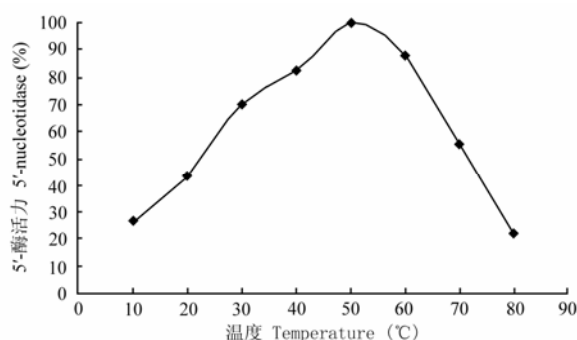


图 7 温度对白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶活力的影响 (mean±SD, n=3)

Fig. 7 Effect of temperature on the activity of 5'-nucleotidase from snake venom (*T. albolabris*) (mean±SD, n=3)

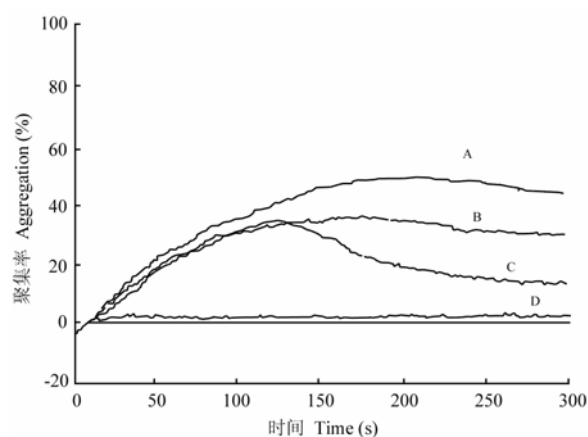


图 8 白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶对 ADP (20µmol/L) 诱导的家兔血小板聚集的影响(mean±SD, n=3)

Fig. 8 The effect of *T. albolabris* 5'-nucleotidase on rabbit platelet aggregation induced by ADP (20µmol/L)(mean±SD, n=3)

A: 对照, 未加 5'-核苷酸酶; B、C、D: 加 5'-核苷酸酶 (分别为 25, 50 和 100 µg/mL)。

A: control, absence of 5'-nucleotidase; B, C and D: 5'-nucleotidase with respectively 25, 50 and 100 µg/mL.

参考文献:

- Chandrarajan J, Klein L. 1976. Determination of inorganic phosphorus in the presence of organic phosphorus and high concentrations of proteins [J]. *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2): 407-412.
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73) [J]. *Purinergic Signalling*, **2**: 351-360
- Dhananjaya BL, Nataraju A, Rajesh R, Gowda CDR, Sharath BK, Vishwanath BS, D'Souza CJM. 2006. Anticoagulant effect of *Naja naja* venom 5'-nucleotidase: demonstration through the use of novel specific inhibitor, vanillic acid [J]. *Toxicon*, **48** (4): 411-421.
- Guan LF, Qi ZW. 1982. Study on a thrombin-like enzyme from the venom of *Agkistrodon Halyspallas*-I. Purification and characterization of physicochemical and enzymatic properties [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **14** (4): 303-307. [管利丰, 戚正武. 1982. 蝮蛇 (*Ahallys Pallas*) 蛇毒类凝血酶的研究. I. 分离纯化及理化酶学性质的鉴定. *生物化学与生物物理学报*, **14** (4): 303-307.]
- Li XB. 2004. The research progress of 5'-nucleotidase [J]. *Foreign Medical Sciences Section of Pathophysiology and Clinical Medicine*, **24** (2): 122-124. [李晓波. 2004. 5'-核苷酸酶的研究进展. *国外医学·生理、病理科学与临床分册*, **24** (2): 122-124.]
- Ouyang C, Huang TF. 1983. Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom [J]. *Toxicon*, **21** (4): 491-501.
- Oyama E, Takahashi H. 2007. Distribution of low molecular weight platelet aggregation inhibitors from snake venoms [J]. *Toxicon*, **49** (3): 293-298.
- Sträter N. 2006. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships [J]. *Purinergic Signalling*, **2**: 343-350.

关, 值得进一步探讨。温度对白唇竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶的影响实验表明, 最适温度在 50°C 左右 (图 7), 并且在 50°C 作用 30 min 活性不变, 提示它是一个热稳定性蛋白。

蛇毒中的抗凝血因子很多, 直接作用于血小板从而发挥促凝和抗凝血作用的组分也不少 (White, 2005; Oyama & Takahashi, 2007)。蛇毒 5'-核苷酸酶通过作用于血小板发挥抗凝血功能。Ouyang & Huang (1983) 对棕点竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶的研究以及 Yu et al (1997) 对竹叶青蛇毒 5'-核苷酸酶的研究结果表明, 蛇毒 5'-核苷酸酶通过作用于血小板发挥抗凝血功能。血小板聚集实验表明从白唇竹叶青蛇毒得到的 5'-核苷酸酶组分也能抑制由 ADP 诱导的家兔血小板血浆的聚集, 且抑制率与 5'-核苷酸酶的量呈正相关 (图 8), 但其抗血小板聚集的详细分子机制不清楚, 还有待于进一步研究。

- The Fourth Section Of Yunnan Zoology Institute. 1976. Studies on snake venoms and their utilization I. Estimation of enzymatic activities of the snake venoms in China[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **8**(2): 157. [云南动物研究所第四室. 1976. 蛇毒的研究和利用. I. 我国常见的蛇毒酶活力的测定. *生物化学与分子生物学学报*, **8**(2): 157.]
- White J. 2005. Snake venoms and coagulopathy [J]. *Toxicon*, **45** (8): 951-967.
- Yu XD, Huang LN, Xiong YL. 1996. The study of *Trimersesurus stejnegeri* snake venom—the separation and purification of its 5'-nucleotidase [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science Edition)*, **13**(4): 42-48. [余晓东, 黄立农, 熊郁良. 1996. 竹叶青(*Trimersesurus stejnegeri*)蛇毒——对5'-核苷酸酶的分离纯化及理化和酶学性质研究. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, (4): 42-48.]
- Yu XD, Huang LN, Xiong YL. 1997. The mechanism of 5'-nucleotidase purified from *Trimersesurus stejnegeri* snake venom on platelet aggregation [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science Edition)*, **14**(2): 61-68. [余晓东, 黄立农, 熊郁良. 1997. 竹叶青(*Trimersesurus stejnegeri*)蛇毒5'-核苷酸酶对血小板聚集功能的抑制机制研究. *重庆师范大学学报(自然科学版)*, **14**(2): 61-68.]