

抗尖吻蝮蛇毒卵黄抗体口服给药保护剂的研究*

张迎锋, 和七一, 刘锦花, 陈典成, 罗 聪, 余晓东

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室 重庆市生物活性物质工程研究中心
教育部活性物质生物技术工程研究中心 毒蛇养殖与深加工协同创新中心, 重庆 401331)

摘要:【目的】比较硫糖铝和5种糖类对抗尖吻蝮蛇(*Deinagkistrodon acutus*)毒卵黄抗体(IgY)的保护作用,为开发抗尖吻蝮蛇毒IgY口服制剂提供依据。【方法】通过免疫白来航鸡(*Gallus domesticus*),从所产鸡蛋中制备抗尖吻蝮蛇毒IgY。在不同pH值(2.0,3.0)条件下,于IgY中加入相同剂量的保护剂,用ELISA法测定IgY活性;在pH值为2.0且加入条件下,加入等于或高于胃内正常质量浓度的胃蛋白酶,后加入不同剂量的硫糖铝,再用ELISA法测定IgY抗体活性;用不同剂量的保护剂与IgY混合后灌胃小鼠(*Mus musculus*),在不同时间点(1.5,2.5,3.5 h)取血,采用ELISA和Western法测定血清中的IgY活性。【结果】在pH值为2.0和3.0条件下,硫糖铝对IgY抗体活性的保护效果均为最佳;在pH值为2.0且加入不小于胃内正常的胃蛋白酶质量浓度的条件下,体积分数在30%以上的硫糖铝均可提高IgY活性;IgY灌胃后的小鼠血清中,体积分数为50%的硫糖铝可有效保护IgY活性。【结论】加入硫糖铝作保护剂后能有效提高IgY对胃酸和胃蛋白酶的抵御作用。

关键词:蛇毒;卵黄抗体;保护剂;硫糖铝;抗体活性;尖吻蝮蛇

中图分类号:Q939.91;R392.5

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2017)02-0102-05

尖吻蝮蛇(*Deinagkistrodon acutus*)又称五步蛇,属蝰蛇科(Viperidae)蝰亚科(Viperinae)蝰属(*Deinagkistrodon*),是中国10大毒蛇之一,主要分布在中国南部、老挝、越南北部^[1-2]。该蛇蛇毒多属磷脂酶A₂、丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶家族,少部分蛋白质属于去整合素家族。尖吻蝮蛇毒属于血液循环毒,被咬伤后主要引起出血、水肿、局部坏死甚至死亡^[3]。如今用于治疗毒蛇咬伤的特异性抗体是通过免疫马得到的多克隆抗体,这种方法的优点是产量较大,但是存在费用高、周期长、产量低、有副作用等不足^[4]。因此,寻找低伤害、低成本、高产量且安全性好的高效解毒剂是当代相关科研人员的重要任务。

卵黄抗体(IgY)是存在于禽类、爬行类和两栖类血清中主要的免疫球蛋白^[5]。用鸡(*Gallus domesticus*)做免疫宿主比其他哺乳动物有优势,如非侵略性、效价持久、低保守性、少量抗原可诱导高效的免疫反应等^[6]。鸡IgY的分子量为180 kD左右,等电点值为6.5~7.5,含氮量约为14.8%,耐反复冻融,热稳定性好^[7],是一种极富前景的蛇毒解毒剂资源。为此,本研究比较硫糖铝和5种糖类对抗尖吻蝮蛇(*Deinagkistrodon acutus*)毒卵黄抗体(IgY)的保护作用,为开发抗尖吻蝮蛇毒IgY口服制剂提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验动物为154 d龄,每只质量为1 kg的健康市售白来航鸡6只,第三军医大学动物实验中心提供的每只质量为20 g健康昆明SPF小鼠15只,本实验室冻存尖吻蝮蛇毒。

主要试剂有弗氏佐剂、PVDF膜(Sigma公司),脱脂奶粉、TMB显色液(鼎国生物公司),兔抗鸡酶标二抗(EarthOx公司),葡萄糖、蔗糖、菊糖、海藻糖及乳糖(西亚试剂公司),硫糖铝(旭东药业公司)。其他试剂为市售分析纯。主要仪器有灌胃针(上海埃斯埃公司),Bio-Rad 550酶标仪、Mini-PROTEAN电泳仪、凝胶成像系统

* 收稿日期:2016-03-05 修回日期:2016-09-03 网络出版时间:2017-03-13 11:08

资助项目:重庆市社会民生科技创新专项(No. cstc2015shmszx120052);重庆市自然科学基金(No. cstc2014YykfA110019);重庆市林业局渝林科研(2015-5);重庆师范大学基金(No. 14XYY022);国家级大学生创新创业训练计划(No. 201410637006)

第一作者简介:张迎锋,女,研究方向为动物毒素与药物研发,E-mail:932743669@qq.com;通信作者:余晓东,教授,E-mail:yxd@cqnu.edu.cn

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20170313.1108.054.html

(Bio-Rad 公司),96 孔板(Corning Incorporated 公司),涡旋振荡仪(IKA 公司)。

1.2 方法

1.2.1 蛇毒蛋白含量测定 称一定量尖吻蝮蛇粗毒溶于灭菌生理盐水,用 BCA 法测蛇毒含量,并将之稀释至 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 抗尖吻蝮蛇毒 IgY 的制备 将乳化好的尖吻蝮蛇蛇毒,注射在每只鸡的胸、腹部、双翼、背部及肌肉等处,初次免疫用完全弗氏佐剂,免疫剂量为 0.293 mg ,第 14,35 和 56 d 用不完全弗氏佐剂乳化进行加强免疫,免疫剂量分别为 $0.586, 1.172$ 和 1.172 mg 。每天收集鸡蛋并编号。用辛酸去脂与硫酸铵盐析法制备高纯度的抗尖吻蝮蛇毒 IgY。

1.2.3 IgY 效价测定与标记 将尖吻蝮蛇毒用抗原包被液稀释为 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,包被 96 孔酶联板, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,依次加入稀释比例为 $1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:7500, 1:10000, 1:15000$ 和 $1:20000$ 的 IgY, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h 后加入 HRP 酶标兔抗鸡 IgY 工作液(按 $1:10000$ 稀释), $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TMB 显色, 20 min 后加入 $50 \mu\text{L}$ 浓度为 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸终止反应,酶标仪读取 OD_{450} 值。阴性对照为免疫前提取的 IgY。

1.2.4 不同 pH 条件下硫糖铝和 5 种糖类对特异性 IgY 的保护作用研究 1) pH 2.0 实验组:在用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调节至 pH 2.0 的 PBS 缓冲液中加入 IgY,使之终质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别加入质量分数均为 30% 的葡萄糖、蔗糖、菊糖、海藻糖、乳糖和体积分数为 30% 的硫糖铝。以未加糖和硫糖铝的 IgY 液为对照。ELISA 法测定 IgY 效价;用 PBS 缓冲液稀释为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 值为 7.0 的 IgY 效价作对照,计算 IgY 的剩余抗体活性。2) pH 3.0 实验组:在用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸调节至 pH 3.0 的 PBS 缓冲液中加入 IgY,使之终质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,其余按照 pH 2.0 实验组的方法操作。

上述实验液 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 维持 2 h 后立即用 NaOH 调 pH 至 7.0,ELISA 法测定 IgY OD_{450} 值。以测定的 IgY OD_{450} 值与对照 IgY OD_{450} 值之比计算 IgY 的剩余抗体活性,用 AR 表示。

1.2.5 硫糖铝对胃蛋白酶裂解的保护作用观察 1) pH 值为 2.0 的正常胃蛋白酶质量浓度组:在 PBS 缓冲液(pH 值为 2.0)中加入 IgY 和 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胃蛋白酶,再分别加入体积分数为 10%,30%,50% 和 70% 的硫糖铝,使溶液中 IgY 和胃蛋白酶终质量浓度分别为 $1, 0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,以不加硫糖铝的 IgY 为对照, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 维持 4 h 后立即用 NaOH 调 pH 值至 7.0,ELISA 法测定 IgY OD_{450} 值。2) pH 值为 2.0 的高胃蛋白酶质量浓度组:按照 pH 值为 2.0 的正常胃蛋白酶质量浓度组的方法操作,但使胃蛋白酶终质量浓度达 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

当 pH 值为 2.0 时,加入等于或高于正常胃内质量浓度的胃蛋白酶,再加入不同体积分数的硫糖铝溶液,用 ELISA 法测 IgY 的抗体效价;用 PBS 缓冲液稀释为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、pH 值为 7.0 的未经胃蛋白酶处理的 IgY 效价为对照,计算 IgY 的剩余抗体活性,以 AR 表示。以测定的 IgY OD_{450} 值与对照 IgY 的 OD_{450} 值之比计算 IgY 的剩余抗体活性,用 AR 表示。

1.2.6 ELISA 法检测 IgY 灌胃小鼠血清中 IgY 效价 将小鼠随机分为 A,B,C,D,E 等 5 组,每组 3 只小鼠。其中,A,B,C 组为实验组,分别用含 50,100,200 mg 的抗尖吻蝮蛇毒 IgY(均含体积分数为 50% 的硫糖铝)进行灌胃,对照组 D 组灌入 200 mg 抗尖吻蝮蛇毒 IgY,对照组 E 组灌入相同体积 PBS 缓冲液。灌胃后 1.5,2.5,3.5 h 后分别取血,分离血清。用间接 ELISA 法检测血清中 IgY 效价,以 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗原包被液包被 96 孔酶标板, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 包被过夜,以制备的小鼠血清作为一抗,A,B,C 组小鼠血清作为阳性对照,分别以 $1:1, 1:10, 1:100$ 进行稀释;D,E 组的小鼠血清作为阴性对照,也分别以 $1:1, 1:10, 1:100$ 进行稀释;其他具体的步骤与检测抗尖吻蝮蛇毒 IgY 效价的 ELISA 步骤相同。

1.2.7 Western 法检测抗尖吻蝮蛇毒 IgY 灌胃小鼠血清中 IgY 的活性 将小鼠随机分为 4 组,每组均为 3 只。将 $10 \mu\text{g}$ 尖吻蝮蛇毒经 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,用质量分数为 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入到用含体积分数为 30% 的硫糖铝的 100 mg 抗尖吻蝮蛇毒 IgY、含体积分数为 50% 的硫糖铝的 100 mg 抗尖吻蝮蛇毒 IgY、100 mg 抗尖吻蝮蛇毒 IgY 灌胃 2.5 h 后采集的血清中,依次分别作为 A,B,C 组;同时作为对照组,将蛇毒加入到与上述 IgY 溶液相同体积生理盐水中,作为 D 组; $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。以 $1:5000$ 稀释的兔抗鸡 HRP-IgY 为二抗,室温反应 1 h,ECL 显色并拍照。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学处理,组间比较采用单因素方差分析,当 $p < 0.05$ 时视统计结果有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 测定 IgY 效价

以方阵滴定法确定 ELISA 的最佳抗原包被质量浓度为 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, IgY 稀释比例为 1:2 000, 酶标二抗工作比例为 1:10 000, IgY 的 ELISA 效价为 1:15 000。

2.2 不同 pH 条件下硫糖铝和 5 种糖对特异性 IgY 的保护作用

在 pH 值为 2.0 和 3.0 条件下, 加入硫糖铝保护剂后 IgY 的剩余抗体活性均有明显提高, 且具有统计学意义 ($p < 0.05$), 而加入糖类保护剂组对 IgY 的保护作用与对照组相比差异无统计学意义(图 1、图 2)。

2.3 硫糖铝对胃蛋白酶裂解的保护作用

图 3 显示, 在 pH 2.0 时, 正常胃蛋白酶质量浓度 ($0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与高胃蛋白酶质量浓度 ($0.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 条件下, 体积分数为 10% 的硫糖铝作为保护剂与对照组相比差异无统计学意义, 而体积分数为 30% 以上的硫糖铝与对照组相比能明显提高 IgY 的剩余抗体活性, 且具有统计学意义 ($p < 0.05$)。

2.4 间接法 ELISA 检测抗尖吻蝮蛇毒 IgY 灌胃后小鼠血清中 IgY 效价的变化

灌胃后 1.5, 2.5, 3.5 h 时取血分离得到的血清经间接 ELISA 检测 IgY 效价的变化情况, 结果显示灌胃后 2.5 h 取血分离得到的各组血清中 IgY 效价达到最高, 与对照组的差异在 $p < 0.01$ 水平上具有统计学意义, 且加入保护剂各组灌胃后血清中 IgY 活性有明显提升(图 4)。

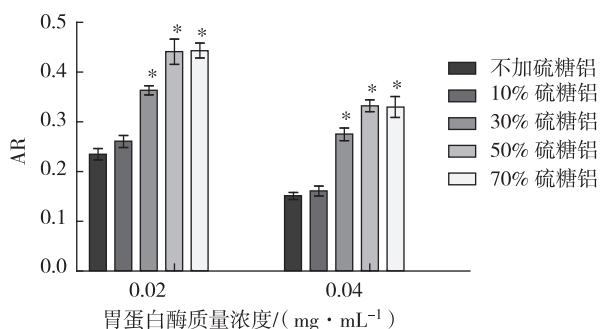


图 3 pH 2.0 正常和高胃蛋白酶质量浓度下加入不同体积分数硫糖铝后 IgY 的剩余抗体活性

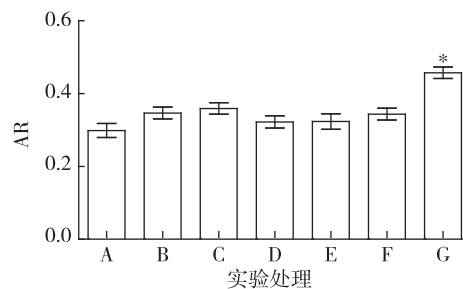
Fig. 3 The remnant antibody activity of IgY containing various volume fraction of sucralfate under pH 2.0, normal or abnormal pepsin mass concentration

2.5 Western 法检测用抗尖吻蝮蛇毒 IgY 灌胃后小鼠血清中 IgY 的活性

图 5 显示, C 组(含 100 mg IgY)和 D 组(对照组)均未检测出 IgY 活性, B 组(含 100 mg IgY, 并加入体积分数为 50% 的硫糖铝)的 IgY 活性最高。

3 讨论

对于蛋白质、多肽、核酸等生物大分子药物而言, 一般多采用注射给药, 特点是起效快, 生物利用度高, 但患



注: A 为不加保护剂处理; B~F 分别为质量分数均为 30% 的葡萄糖、蔗糖、菊糖、海藻糖、乳糖; G 为体积分数为 30% 的硫糖铝; * 表示与对照组相比差异具有统计学意义 ($p < 0.05$), 下同。

图 1 pH 2.0 条件下加入不同种保护剂后 IgY 剩余抗体活性

Fig. 1 The remnant antibody activity of IgY containing various protectant under pH 2.0

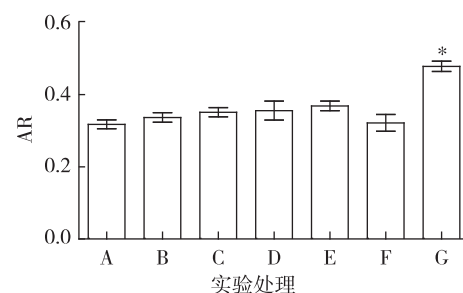
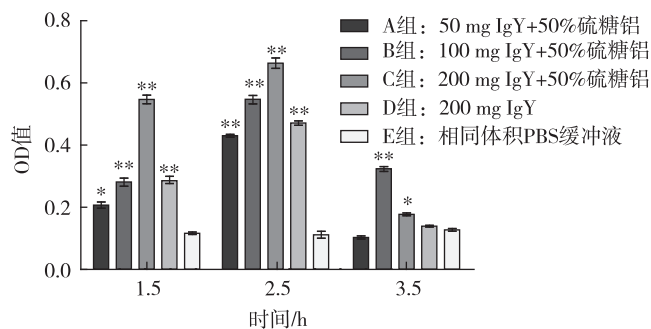


图 2 pH 3.0 条件下加入不同种保护剂后 IgY 剩余抗体活性

Fig. 2 The remnant antibody activity of IgY containing various protectant under pH 3.0



注: * 表示与 E 组相比在 $p < 0.05$ 水平上具有统计学意义, ** 表示与 E 组相比在 $p < 0.01$ 水平上具有统计学意义。

图 4 灌胃后 1.5, 2.5, 3.5 h 时小鼠血清中 IgY 的剩余抗体活性

Fig. 4 The remnant antibody activity of 1.5, 2.5, and 3.5 h after intraperitoneal administration in mice plasma

者使用不便,顺应性差^[8];而口服给药又因胃酸和胃蛋白酶会对药物结构造成破坏,导致药物无法有效发挥作用。随着越来越多的大分子药物被开发并应用于临床,为之寻找合适的载体和保护剂引起了研究者极大的关注。1990年,国外学者 Thalley 和 Carroll^[9]首次从鸡卵黄中提纯出了抗蛇毒 IgY。由于该抗体具有良好的中和效果,因而越来越多的研究人员开始了抗蛇毒 IgY 的研究。抗蛇毒 IgY 对蛇毒引起的水肿、肌溶、凝血、出血、坏死等毒性作用均有良好的中和效果,被认为是可能替代抗蛇毒血清的新型解毒剂,但是至今抗蛇毒 IgY 的研究还主要停留于实验室研究阶段,应用于临床的例子十分罕见。本研究主要对 IgY 的口服给药途径进行探究,为之寻找合适的保护剂,以期实现口服制剂的开发,这对于推进抗蛇毒 IgY 的临床应用甚至实现抗蛇毒 IgY 的口服预防都具有重要的研究意义。

Shimizu 等人^[10]对 IgY 在酸性条件下稳定性的研究结果显示,在 pH 值为 3.5 或更低的条件下,IgY 的活性迅速减小,当 pH 值低于 3.0 时,IgY 活性不可逆地完全消失。Hatta 等人^[11]的研究显示,在胃蛋白酶的作用下,IgY 会被快速降解。因此寻找到有效的抗酸和抗胃蛋白酶降解的 IgY 保护剂才能使之在口服给药中发挥药效。郭丽媛等人^[12]的研究表明,硫糖铝可显著降低酸性条件和胃蛋白酶对 IgY 活性的破坏作用。Lee 等人^[13]的研究显示,添加体积分数为 50% 的山梨醇可以完全遏制 pH 值为 3.0 的酸性条件对 IgY 的破坏。由昭红等人^[14]的研究表明,一定剂量的蔗糖与乳糖均可在胃蛋白酶处理时提高特异性 IgY 的稳定性。本研究选用 5 种糖类和硫糖铝作为保护剂,实验结果表明,在 pH 值为 2.0 和 3.0 条件下,体积分数为 30% 的硫糖铝相较于质量分数为 30% 的糖类对 IgY 的剩余抗体活性均有较强的保护作用。进一步研究在等于或高于正常胃蛋白酶质量浓度条件下,体积分数在 30% 以上的硫糖铝对 IgY 剩余抗体活性的保护作用较好,其中体积分数为 50% 的硫糖铝保护效果最优。而进一步对小鼠进行灌胃并用间接 ELISA 法检测血清中 IgY 剩余活性的实验表明,在 2.5 h 时小鼠血清中 IgY 的效价达到最高,加入体积分数为 50% 的硫糖铝的各实验组 IgY 活性相较于不加保护剂组有明显提升。用 Western 法进一步证明,加入体积分数为 30%,50% 的硫糖铝作为保护剂的 IgY 组均能检测到完整分子形式的卵黄抗体,而未添加保护剂组则没能检测到抗体形式,说明硫糖铝在小鼠体内对 IgY 起到了一定的保护作用。

总之,加入硫糖铝作保护剂后能有效提高 IgY 对胃酸和胃蛋白酶的抵御作用,但其中具体的保护作用机制及体内的疗效、安全性等方面还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] HUANG S, HE S, PENG Z, et al. Molecular phylogeography of endangered sharp-snouted pitviper (*Deinagkistrodon acutus*; Reptilia, Viperidae) in Mainland China[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2007, 44(3): 942-952.
- [2] 覃公平. 中国毒蛇学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1998.
- [3] 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.
- [4] 王文文, 和七一, 刘刚, 等. 卵黄抗体(IgY)及其在蛇伤治疗中的研究进展[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2015, 32(6): 46-52.
- [5] LITMAN G W, ANDERSON M K A, RAST J P. Evolution of *Agkistrodon acutus* by two-dimensional electrophoresis combined with two-dimensional liquid chromatography[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2006, 37(2): 169-173.
- [6] WANG W W, HE Q Y, LIU G, et al. Immunoglobulin of egg yolk (IgY) and its research progress on treatment of snakebite[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2015, 32(6): 46-52.

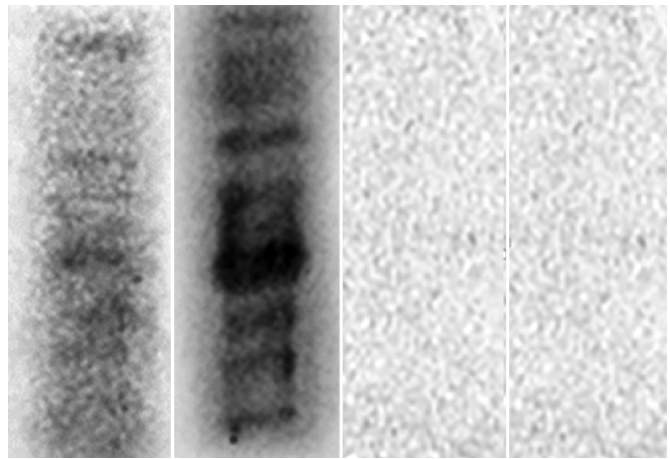


图5 灌胃后 3.5 h 小鼠血清中 IgY 剩余抗体活性的免疫印迹分析
A 组:100 mg IgY+30% 硫糖铝 B 组:100 mg IgY+50% 硫糖铝 C 组:100 mg IgY D 组:对照组

图 5 The remnant antibody activity of 3.5 h after intraperitoneal administration in mice plasma by western blot analysis

- of antigen binding receptors[J]. Annual Review of Immunology, 1999, 17(3): 109-147.
- [6] LI X, WANG L, ZHEN Y, et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review[J]. Journal of Animal Science & Biotechnology, 2015, 6(1): 1-10.
- [7] 陈阿琴, 杨志刚, 俞颂东. 卵黄免疫球蛋白及其应用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(3): 28-31.
CHEN A Q, YANG Z G, YU S D. Progress of research on immunoglobulin of yolk and its application[J]. China Journal of Veterinary Medicine, 2005, 39(3): 28-31.
- [8] 李亨芬, 邹金, 白如玉, 等. M 细胞模型及其在生物大分子药物口服递药研究中的应用[J]. 药学报, 2011(12): 1429-1435.
LI H F, ZOU J, BAI R Y, et al. M cell model and its applications in the research of biological macromolecular pharmaceutical oral drug delivery[J]. Pharmaceutical Journal, 2011(12): 1429-1435.
- [9] THALLEY B S, CARROLL S B. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens[J]. Nature Biotechnology, 1990, 8(10): 934-938.
- [10] SHIMIZU M, NAGASHIMA H, HASHIMOTO K. Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1993, 106(2): 255-261.
- [11] HATTA H, TSUDA K, AKACHI S, et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(3): 450-454.
- [12] 郭丽媛, 吴金英, 黄伟, 等. 硫糖铝对幽门螺杆菌 VacA IgY 的保护作用的动物实验评价[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(11): 988-992.
GUO L Y, WU J Y, HUANG W, et al. Evaluation on protective effects of sucralfate on *H. pylori*-VacA-IgY in animal experiments [J]. Chinese Journal of Microecology, 2010, 22(11): 988-992.
- [13] LEE K A, CHANG S K, LEE Y J, et al. Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution [J]. Journal of biochemistry and molecular biology, 2002, 35(5): 488-493.
- [14] 由昭红, 姜中其, 王娜, 等. 抗 ET EC F18+ 菌毛特异性 IgY 的稳定性研究[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(2): 5-8.
YOU S H, JIANG Z Q, WANG N, et al. Studies on the stability of the anti-ET EC F18+ pili specific IgY [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2006, 40(2): 5-8.

Research on Protectant for Immunoglobulin Yolk against the Venom of *Deinagkistrodon acutus*

ZHANG Yingfeng, HE Qiyi, LIU Jinhua, CHEN Diancheng, LUO Cong, YU Xiaodong
(Animal Toxin Group, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Breeding and Deep Processing of Venomous Snakes, College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] This study compared the protective effect of sucralfate and five kinds of sugars (glucose, sucrose, synanthrin, trehalose, lactose) on activities of Anti-*Deinagkistrodon acutus* venom IgY in order to build a base for developing the oral IgY. [Methods] Antibodies against *D. acutus* venom came from eggs immunized with the snake venom which were laid by white leghorn hens (*Gallus domesticus*). Under different pH values (2.0, 3.0), all protectants at the same concentrations were added into IgY solutions, and then activities of IgY in the mixture solutions were determined by ELISA. Under the same pH(2.0), Pepsin in the normal or over-normal concentrations in mouse (*Mus musculus*) stomach and the sucralfate in various concentrations were added into IgY solutions, finally the activities of IgY in the mixture solutions were determined by ELISA. Using the different concentrations of sulcralfate to mix with IgY solution, then we gave mice the mixture solutions by oral administration, and at the different time points (1.5, 2.5, 3.5 h) we took the blood of the mice and measured the activities of IgY in the serum using ELISA and Western blot. [Findings] The results showed that under pH 2.0 and 3.0, the protection effects of sucralfate were higher than all of the other sugar protectants. Under pH 2.0 and the normal or over-normal concentrations of pepsin, more than 30% (V/V) concentrations of sucralfate may effectively protected IgY's activities. Following oral administration, 50% (V/V) sucralfate concentration may effectively protected IgY's activities in mice serum. [Conclusions] Addition of sucralfate as a protective agent can effectively improve the resistance of IgY to gastric acid and pepsin.

Keywords: snake venom; egg yolk antibody; protectant; sucralfate; antibody activity; *Deinagkistrodon acutus*