

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01219

不同技术处理的钝齿短浆蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性的效果

陈晓, 姜沛宏, 林华娟

广东省水产品加工与安全重点实验室, 水产品深加工广东普通高等学校重点实验室, 广东海洋大学 食品科技学院, 广东 湛江 524088

摘要:钝齿短浆蟹(*Thalamita crenata*)淋巴液可以中和麻痹性贝毒(PSP)的毒性, 这个信息为 PSP 的降毒研究提供重要依据, 但是淋巴液处理方法是否对其毒性中和效果有影响尚不清楚。本研究采用小鼠腹腔注射法, 以淋巴液的 PSP 毒性中和效果为指标, 探讨抗凝剂、提取方法和冻存条件等淋巴液处理方法对其 PSP 毒性中和效果的影响, 为蟹淋巴液的制备提供科学依据。分析结果显示, 不同抗凝剂对淋巴液的 PSP 毒性中和效果有不同程度的影响, 其中 EDTA 抗凝剂对淋巴液的 PSP 毒性中和效果最好, 相对于对照组(小鼠致死时间在 5 min 左右), PSP-EDTA-淋巴液组的小鼠均存活。低浓度 EDTA (5 mmol/L)即可起到抗凝作用并保持淋巴液较好的 PSP 毒性中和效果, EDTA 浓度过高反而对 PSP 毒性中和效果产生抑制作用。在低浓度 EDTA 条件下, 针头抽取淋巴液的 PSP 毒性中和效果明显优于组织破碎法。EDTA 浓度为 5 mmol/L 时, 在针头抽取淋巴液组中, 67%的小鼠致死时间超过 30 min。相比之下, 组织破碎提取的淋巴液组的小鼠致死时间均分布在 8.1~24 min。另外, 蔗糖对淋巴液的冻存起到较好的抗冷冻保护作用。以上结果表明淋巴液处理方法对其麻痹性贝毒毒性中和效果有较大影响。

关键词:钝齿短浆蟹; 麻痹性贝毒(PSP); 淋巴液; 毒性中和效果

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1219-06

麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning toxin, PSP)是一类由产毒甲藻或一些蓝藻产生, 可通过食物链蓄积于贝类、鱼虾蟹等海洋生物, 以石房蛤毒素为基本分子骨架的四氢嘌呤毒素。常见毒素成分主要有石房蛤毒素(STX)、新石房蛤毒素(neoSTX)、膝沟藻毒素 1~4 (GTx1, 2, 3 & 4)、磺酰氨基毒素 1~2 (C1 & C2)等。分布于我国沿海的产毒甲藻主要有塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)和微小亚历山大藻(*A. minutum*)。产毒甲藻为一类浮游生物, 近年来, 由于人为污染导致海洋环境发生激烈变化, 由浮游生物导致的赤潮发生频率不断上升, 其中经常伴随有产毒甲藻^[1-2]。分析广东省近 30 年来贝类中毒事件的变化趋势结果发现,

从 1995 年开始广东省的贝类中毒事件不管从中毒起数还是中毒人数均呈明显上升趋势, 这个结果与赤潮发生频率的上升趋势基本一致^[3]。麻痹性贝毒安全问题成为贝类乃至整个水产品产业发展的主要瓶颈之一。目前对于麻痹性贝毒的中毒治疗尚无理想的解毒措施, 在贝类养殖海域建立麻痹性贝毒安全监控体系仍然是国际认可的有效预防手段, 但是监控体系中涉及的高效液相色谱和酶联免疫等先进贝毒检测技术均需要贝毒标准品。然而由于毒源材料紧缺和分离纯化技术等因素的制约, 目前我国尚未能自主制备贝毒标准品。另一方面, 大量的研究结果发现, 一些海洋生物对麻痹性贝毒有一定的耐受性, 其中, 螃蟹对麻痹性贝毒等海洋毒素的耐受机理引起了许多学者的兴趣。对于螃蟹耐受麻

收稿日期: 2013-01-26; 修订日期: 2013-05-23.

基金项目: 广东省国际合作项目(粤科规划字[2012]98 号); 农业部现代农业产业技术体系建设专项(贝类, 47).

作者简介: 陈晓(1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品安全控制研究. E-mail: zhihanxiaoxiao@126.com

通信作者: 林华娟, 副教授, 博士, 主要从事食品安全控制以及农产品高值化利用. E-mail: huaJuanlin@vip.163.com

痹性贝毒的机理,目前主要有两种看法,对于铜铸熟若蟹等能蓄积大量麻痹性贝毒的毒蟹,其毒素耐受机理可能是基于其肌肉神经细胞对麻痹性贝毒的高耐受力^[4-6];而相对于蓄毒能力较差的螃蟹,其毒素耐受机理主要是基于其体内某些蛋白质能结合毒素而使其毒性下降,从而表现出一定的毒素耐受性^[6-8]。前期研究结果表明,分布于南海海域的火红皱皮蟹(*Leptodius exaratus*)、钝齿短浆蟹(*Thalamita crenata*)和大额蟹(*Metopograpsus latifrons*)等潮间蟹淋巴液具有不同程度的中和麻痹性贝毒毒性作用。与 PSP 阳性对照组相比,注射 PSP-淋巴液的小鼠致死时间延长了一倍以上,并认为其对麻痹性贝毒的耐受机理倾向于后者^[9]。这个信息为我们提供了一个重要启示,淋巴液的毒性中和作用是否可应用于麻痹性贝毒的降毒、分离纯化或检测技术的研究与开发?但是其 PSP 结合机理有待进一步研究。为了进一步深入探讨潮间蟹淋巴液中和麻痹性贝毒机理,需要大量提取蟹淋巴液。然而蟹淋巴液和其他动物血液一样暴露在空气中很快就凝固,需要添加抗凝剂。另外,蟹淋巴液的提取方法和贮藏条件对其毒性中和效果均可能有影响,因此有必要探讨淋巴液的不同技术处理对其毒性中和效果的影响。本文以钝齿短浆蟹淋巴液为研究对象,采用小鼠生物法比较不同抗凝剂、提取方法和冻存条件对蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响,为蟹淋巴液的制备提供可靠的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

钝齿短浆蟹(*Thalamita crenata*)于 2010 年 5 月至 2011 年 8 月采集于湛江海域,活体蟹采集后立即运回实验室用于淋巴液的提取。麻痹性贝毒来源于铜铸熟若蟹(*Zoymus aeneus*),经过部分纯化获得比毒性值为 118MU/mg 的麻痹性贝毒(主要含有 STXs 和 GTXs)^[10]。其他试剂均为分析纯。实验所用昆明系雄性小鼠(20 g ± 2 g)由广东双林生物制药有限公司提供,动物实验符合广东省实验动物管理条例。

1.2 蟹淋巴液的提取

采用组织破碎提取法和针头抽液法等两种方

法提取蟹淋巴液。组织破碎提取法就是将蟹体组织破碎后加入含有适量抗凝剂的 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0)浸提蟹淋巴组织液,经过离心得到蟹淋巴液。针头抽液法则采用注射针头直接从蟹甲足关节中抽取,抽取后立即加入含适量抗凝剂的 20 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 8.0)混合均匀,经过离心、过滤得到蟹淋巴液。在比较两种方法对淋巴液的毒性中和效果试验中,每个方法重复 3 批次,再分别进行小鼠的麻痹性贝毒毒性中和效果试验。

1.3 麻痹性贝毒毒性中和效果试验

麻痹性贝毒毒性中和效果试验采用小鼠腹腔注射毒素溶液方法,通过比较 PSP 阳性对照组和 PSP-淋巴液组的小鼠致死时间是否存在显著性差异来评价淋巴液的毒性中和效果^[9]。先配制标准 PSP 溶液,使其 3 倍稀释液能使小鼠的致死时间在 5 min 左右。在 PSP-淋巴液试验组中,按照标准 PSP 溶液 1 份,淋巴液 1 份,20 mmol/L 磷酸缓冲溶液(pH 8.0)1 份的比例将其充分混合得到 PSP-淋巴混合液,取 1mL 腹腔注射于小鼠腹部,记录从注射到小鼠致死的时间。PSP 阳性对照组则直接用磷酸缓冲溶液将标准 PSP 溶液进行 3 倍稀释后按照同样方法进行小鼠实验,并记录小鼠致死时间。每组实验重复 3 次,计算其标准偏差,小鼠致死时间以(平均值 ± 标准偏差)表示。PSP-淋巴液组的小鼠致死时间越长,说明其毒性中和效果越好。采用 *t*-检验法比较 PSP 阳性对照组和 PSP-淋巴混合液组的小鼠致死时间是否存在显著性差异,如 $P < 0.05$ 表示两组间存在显著性差异。

1.4 抗凝剂对蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果分析

分别以 EDTA、草酸钠、柠檬酸钠和肝素为抗凝剂,在相同条件下制备蟹淋巴液,并在相同条件下进行麻痹性贝毒毒性中和小鼠试验。每组实验重复 3 次,比较各组的小鼠致死时间,小鼠致死时间越长表示麻痹性贝毒毒性中和效果越好。

1.5 冻存条件对蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果分析

以最佳抗凝剂制备蟹淋巴液,然后将其分为两组,一组加入蔗糖,使其最终浓度达 5%,另一组不加

蔗糖。两组溶液在相同冻存温度条件下(−20℃)贮存 2 周, 再比较其冻存前后的麻痹性贝毒毒性中和效果。

1.6 数据处理

每试验组分别进行 3 个平行, 采用 Excel 2010 软件对试验数据进行处理, 用(平均值 ± 标准偏差)表示试验结果。采用 *t*-检验法比较两试验组的差异性, 如 *P* < 0.05 表示两组间存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同抗凝剂对蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响

EDTA、草酸钠、柠檬酸钠和肝素 4 种抗凝剂对蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响见表 1。从表中可见, 上述 4 种抗凝剂与毒素混合液的小鼠致死时间都在 5 min 左右, 且没有明显差异, 表明抗凝剂对麻痹性贝毒的毒性无显著性影响。值得关注的是, 相对于 PSP 阳性对照组, PSP-抗凝剂-淋巴液组的小鼠致死时间均显著延长(*P* < 0.01), 但是不同抗凝剂其与 PSP-淋巴液的小鼠致死时间有明显差异。PSP-EDTA-淋巴液组的小鼠均存活。PSP-草酸钠-淋巴液组、PSP-柠檬酸钠-淋巴液组和 PSP-肝素-淋巴液组的小鼠致死时间分别为(27.86 ± 2.66) min, (28.89 ± 0.59) min 和(14.08 ± 0.6) min, 各组的小鼠致死时间分别为相应 PSP 阳性对照组的 5.4 倍, 5.3 倍和 2.6 倍。以上结果表明 PSP-EDTA-淋巴液组的毒性中和效果最好, 其次是 PSP-草酸钠-淋巴液组和 PSP-柠檬酸钠-淋巴液组 (两组间无明显差异), PSP-肝素-淋巴液组的毒性中和效果最差(与 PSP-草酸钠-淋巴液组和 PSP-柠檬酸钠-淋巴液组有显著性差异, *P* < 0.05)。因此本研究选择 EDTA 为蟹淋巴液抗凝剂进行后续的研究。

2.2 不同提取方法对蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响

提取蟹淋巴液主要有两种方法, 一种是用注射针头从活蟹甲足关节抽取淋巴液的针头抽液法, 另一种是直接将蟹组织破坏后浸提淋巴液的组织破碎提取法。本试验以 EDTA 为抗凝剂, 以提取液的麻痹性贝毒毒性中和效果为评价指标, 对两种提取方法的优劣进行了分析比较。另外, 为了

表 1 不同 PSP-抗凝剂对钝齿短浆蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响

Tab. 1 Effect of anticoagulants on PSP toxicity neutralization of hemolymph from *Thalamita crenata*

抗凝剂 anticoagulant	小鼠致死时间/min mouse's death time	
	PSP-抗凝剂 阳性对照组 control group	PSP-抗凝剂-淋巴液组 PSP-anticoagulants- hemolymph groups
乙二胺四乙酸钠 盐 EDTA	5.75±0.37	(-) ^a
草酸钠 sodium oxalate	5.19±0.13	27.86±2.66*
柠檬酸钠 sodium citrate	5.41±0.13	28.89±0.59*
肝素钠 heparin sodium	5.48±0.21	14.08±0.6*、§

注: “a”-小鼠存活; “*” -与相应 PSP 阳性对照组相比存在显著性差异(*P* < 0.01); “§” -与 PSP-草酸钠-淋巴液组和 PSP-柠檬酸钠-淋巴液组相比存在显著性差异(*P* < 0.05)。

Note: “a”-survival; “*” -significantly different from that of the control tests; “§” - significantly different from that of the PSP-sodium oxalate-hemolymph group and PSP-sodium citrate-hemolymph group.

进一步分析 EDTA 浓度是否对淋巴液毒性中和效果有影响, 本试验同时比较不同 EDTA 浓度与淋巴液毒性中和效果的关系。表 2 列出了针头抽液法和组织破碎法在不同 EDTA 浓度(5 mmol/L, 8.3 mmol/L, 12.5 mmol/L 和 25 mmol/L)下, 提取得到的淋巴液与 PSP 混合液的小鼠致死时间分布情况。从表 2 可以看出, 不同 EDTA 浓度的试剂-PSP 阳性对照组的小鼠致死时间均在 5~7 min, 表明试剂对麻痹性贝毒的毒性无显著性影响。相对于 PSP 阳性对照组, 虽然针头抽液法和组织破碎法得到的淋巴液, 其与毒素混合液的小鼠致死时间均明显延长, 但从总体上看, 针头抽液法的 PSP-淋巴液试验组的小鼠致死时间明显长于组织破碎法。对于针头抽液法, 当 EDTA 浓度为 5 mmol/L 时, 67% 试验小鼠的致死时间 > 30 min, 随着 EDTA 浓度的升高, 小鼠致死时间逐渐缩短, 当 EDTA 浓度升高至 25 mmol/L 时, 小鼠致死时间均 < 16 min。对于组织破碎提取法, 虽然未有明显的规律, 但是绝大部分小鼠致死时间分布在 8~24 min。以上分析结果表明, 针头抽液法明显优于组织破碎提取法。因此本研究采用针头抽液法制备蟹淋巴液进行后续的研究。

表 2 不同提取方法对钝齿短浆蟹淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响
Tab.2 Effect of extraction methods on PSP toxicity neutralization of hemolymph from *Thalamita crenata*

		小鼠致死数量/只 mouse mortality in number			
致死时间段/min time range of death		EDTA/(mmol · L ⁻¹)			
		5	8.3	12.5	25
PSP 阳性对照组	PSP positive control group				
	5.0~7.0	3	3	3	3
针头抽液法	syringe needling extraction method				
	5.0~8.0	0	0	0	1
	8.1~16.0	0	0	0	8
	16.1~24.0	2	3	6	0
	24.1~30.0	1	2	1	0
	> 30	6	4	2	0
组织破碎提取法	homogenizing extraction method				
	5.0~8.0				
	8.1~16.0	3	2	4	2
	16.1~24.0	5	4	3	2
	24.1~30	1	0	0	2
	> 30.0	0	3	2	3

2.3 蔗糖对冻存淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响

蟹淋巴液制备后往往要冷冻存放备用,但是由于蟹淋巴液的主要成分为蛋白质(数据未显示),蛋白质在冻存过程中很容易发生冷冻变性,这些变化可能会影响淋巴液的毒性中和效果,因此本研究进一步分析比较了抗冻剂蔗糖对冻存淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响。表 3 列出了有或无蔗糖淋巴液组在冻存前后的麻痹性贝毒中和效果。从表 3 可以看出,在 PSP 阳性对照组中,PSP-蔗糖阳性对照组和 PSP-蔗糖-EDTA 阳性对照组的小鼠致死时间(两者无显著性差异)均略比 PSP-EDTA 阳性对照组长,且有显著性差异($P < 0.01$),表明蔗糖对麻痹性贝毒有一定的毒性中和效果。对于无蔗糖和有蔗糖淋巴液,在冻结前,各 PSP-淋巴液组的小鼠试验均存活,但是冻存 2 周后,PSP-无蔗糖淋巴液和 PSP-有蔗糖淋巴液的小鼠致死时间有明显差异。腹腔注射 PSP-无蔗糖淋巴液 28 min 后试验小鼠死亡,但是其致死时间仍明显长于所有 PSP 阳性对照组($P < 0.01$)。相比之下,腹腔注射 PSP-有糖淋巴液的试验小鼠和冻结前的小鼠试验没有明显差异。这个结

果表明蔗糖对淋巴液有明显的抗冷冻变性保护作用,可以使淋巴液在冻存过程中保持原来的分子形态,并保持其毒性中和效果。

表 3 蔗糖对冻存淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响
Tab. 3 Effect of sugar on PSP toxicity neutralization of hemolymph from *Thalamita crenata*

min (小鼠致死时间 mouse death time)		
试验组 test group	冻存前 before freezing	冻存 2 周后 after frozen for 2 weeks
PSP-蔗糖阳性对照 PSP-sugar control	9.51±0.82 [§]	n.d
PSP-EDTA 阳性对照 PSP-EDTA control	5.75±0.37	n.d
PSP-蔗糖-EDTA 阳性对照 PSP-sugar-EDTA control	9.45±0.56 [§]	n.d
PSP-无蔗糖淋巴液组 PSP-hemolymph without sugar	(-) ^a	28.6±0.68*
有蔗糖淋巴液组 PSP-hemolymph with sugar	(-) ^a	(-) ^a

注: n.d-未检出; “a”-表示小鼠存活; “*”-与 PSP 阳性对照组相比均有显著性差异($P < 0.01$); “§”-与 PSP-EDTA 阳性对照组相比存在显著性差异($P < 0.01$).

Note: n.d-not detected; “a”-survival; “*”-significantly different from all of the control tests; “§”-significantly different from that of the PSP-EDTA control ($P < 0.01$).

3 讨论

3.1 不同抗凝剂对淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响

EDTA、草酸钠和柠檬酸钠是常用的金属螯合剂,肝素钠是常用的血抗凝剂,这 4 种物质对蟹淋巴液均能起到良好的抗凝作用。但是从小鼠毒性中和效果试验结果可以看出,不同抗凝剂对淋巴液的毒性中和效果有不同程度的影响。PSP-肝素-淋巴液组的小鼠致死时间明显短于其他金属螯合剂,在金属螯合剂中尤其以 EDTA-淋巴液组的毒性中和效果最佳。肝素钠是一种由葡萄糖胺, L-艾杜糖醛苷、N-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸交替组成的黏多糖硫酸钠盐,分子量在 1 000 D 左右,而 EDTA、草酸钠和柠檬酸钠等金属螯合剂均为分子量小于 400 D 的多元羧酸盐。由此可以推测,肝素钠可能会较大程度地改变淋巴液的分子形态,从而导致其毒性中和作用明显下降。相比之下,小分子多元羧酸盐,尤其是 EDTA 对淋巴液分子形态的影响相对较小,使其保持最大的毒性中和效果。

3.2 不同提取方法对淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响

活蟹的健康状态以及淋巴液提取过程的快慢直接影响淋巴液的凝集速度和毒性中和效果,要获得高质量的淋巴液不仅要求活蟹机体健康旺盛还要求提取过程越快越好。针头抽取法直接抽取淋巴液虽然具有杂质少的优点,但是抽取效率非常低。相比之下,组织破碎法虽然杂质多,但是可以大批量提取。为了比较两种方法的优劣,本研究以 EDTA 为抗凝剂,以提取液的毒性中和效果为指标对两种提取方法进行分析比较。分析结果显示,低浓度的 EDTA (5 mmol/L)即可起到抗凝作用并保持较好的毒性中和效果,当 EDTA 浓度过高时,反而对淋巴液的毒性中和效果产生抑制作用。在低浓度 EDTA 条件下,针头抽取的淋巴液其毒性中和效果明显优于组织破碎法。从这个结果可以推测,起到麻痹性贝毒毒性中和效果的成分可能主要存在于淋巴液中,组织破碎浸提法

不仅带进淋巴液以外的杂质,同时在一定程度上稀释了起到毒性中和作用的活性成分,从而导致其毒性中和效果下降。综合考虑杂质对后续分离纯化造成的困难,本研究选择针头抽取法作为淋巴液的提取方法。

3.3 蔗糖对冻存淋巴液中和麻痹性贝毒毒性效果的影响

淋巴液的主要成分分析结果显示,淋巴液中的主要成分为蛋白质,因此淋巴液在冻存过程中很容易发生分子形态变化,这些变化可能会影响淋巴液的毒性中和效果。本研究以蔗糖作为抗冻剂,分析比较了蔗糖对冻存淋巴液毒性中和效果的影响。分析结果显示,蔗糖不仅对麻痹性贝毒有一定的毒性中和作用,还对淋巴液的毒性中和作用有明显的保护效果。蔗糖-淋巴液组在冻存 2 周后的毒性中和效果与冻存前无明显差异,而无蔗糖的淋巴液在冻存 2 周后,其毒性中和效果有明显下降趋势,表明蔗糖对淋巴液有明显的抗冷冻变性作用,同时使淋巴液中起到毒性中和效果的活性成分保持原有分子形态,并保持其毒性中和效果。

4 结论

以上分析结果表明,抗凝剂、提取方法和冻存条件对淋巴液的毒性中和效果均有较大影响,因此淋巴液制备技术是否科学直接影响淋巴液的毒性中和效果。根据以上分析结果,以 5~8 mmol/L EDTA 为抗凝剂,采用针头抽液方法制备淋巴液,并在有蔗糖的条件下冻存可以最大限度地保护淋巴液的理化性质,并保持淋巴液的毒性中和效果。

参考文献:

- [1] Pearson L, Mihali T, Moffitt M, et al. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin [J]. *Mar Drugs*, 2010(8): 1650–1680.
- [2] Wang S F, Tang D L, He F L, et al. Occurrences of harmful algal blooms (HABs) associated with ocean environments in the South China Sea [J]. *Hydrobiologia*, 2008, 596: 79–93.

- [3] 林华娟, 陈晓, 路垚. 广东省由天然毒素导致的水产安全问题分析[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(3): 475–480.
- [4] Daigo K, Noguchi T, Miwa A, et al. Resistance of nerves from certain toxic crabs to paralytic shellfish poisons and tetrodotoxin [J]. Toxicon, 1988, 26: 485–490.
- [5] Koyama K, Noguchi T, Uzu A, et al. Resistibility of toxic and nontoxic crabs against paralytic shellfish poison and tetrodotoxin [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1983, 49: 485–489.
- [6] Yamamori K, Yamaguchi S, Maehara E, et al. Tolerance of shore crabs to tetrodotoxin and saxitoxin and antagonistic effect of their body fluid against the toxins [J]. Nipp Suis Gakk, 1992, 58 (6): 1157.
- [7] Nagashima Y, Ohgoe H, Yamamoto K, et al. Resistance of non-toxic crabs to paralytic shellfish poisoning toxins. Reguera B, Blanco J, Fernández M L, et al. (Eds), Harmful Algae [M]. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, 1998: 604–606.
- [8] Nagashima Y, Yamamoto K, Shimakura K, et al. A tetrodotoxin-binding protein in the hemolymph of shore crab *Hemigrapsus sanguineus*: purification and properties [J]. Toxicon, 2002, 40: 753–760.
- [9] Lin H, Nagashima Y, Jiang P, et al. Screening for toxicity and resistibility to paralytic shellfish toxin of shore crabs inhabiting at Leizhou peninsula, China [J]. Mar Envir Res, 2012, 78: 48–52.
- [10] 林华娟, 长岛裕二, 章超桦, 等. 铜铸熟若蟹(*Zosimus aeneus*)中麻痹性毒素成分的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2011, 35 (10): 1540–1546.

Effect of treatment methods of hemolymph from shore crab *Thalamita crenata* on its paralytic shellfish poisoning toxicity neutralization

CHEN Xiao, JIANG Peihong, LIN Huajuan

Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: Hemolymph from shore crab, *Thalamita crenata*, is able to neutralize the toxicity of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. This information offers a groundwork on investigating the detoxification of the PSP. Unfortunately, whether or not the treatment methods of the hemolymph will affect the PSP toxicity neutralization is still unclear. In this study, the effects of anticoagulants (EDTA, sodium oxalate, sodium citrate and heparin sodium), extracting methods (syringe needling extraction and tissue homogenizing extraction) and freezing storage condition (with or without sucrose) on PSP toxicity neutralization of the hemolymph were investigated through the mouse assay. The results showed that the mice intraperitoneal injection with the PSP mixed with EDTA-hemolymph were survival, while the mice's death times of hemolymph groups mixed with sodium oxalate, sodium citrate and heparin sodium were (27.86 ± 2.66) min, (28.89 ± 0.59) min and (14.08 ± 0.6) min, which to be 5.4, 5.3 and 2.6 times to that of corresponding control, respectively. Low EDTA concentration was efficacious in anticoagulation of the hemolymph and preserving a good PSP neutralization, which seemed to be repressed with in presence of excessive EDTA. Hemolymph extracted by syringe needle showed higher PSP neutralization than that of extracted by tissue homogenization. While the EDTA concentration was at 5 mmol/L in 20 mmol/L phosphate buffer (pH 8.0), 67% of the mice for the hemolymph group extracted by syringe needle died at more than 30 minutes. By comparison, the mice's death time for hemolymph group extracted by tissue homogenization ranged at 8.1–24.0 min. Moreover, sucrose could protect the hemolymph against from freeze denaturation. After freezing for 2 weeks, the PSP neutralization of the hemolymph with sucrose remained unchanged, while that of the hemolymph without sucrose decreased. These results indicate that the PSP neutralization of hemolymph was remarkably effected by anticoagulants, extraction methods and freezing storage condition.

Key words: *Thalamita crenata*; paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins; hemolymph; PSP toxicity neutralization

Corresponding author: LIN Huajuan. E-mail: huajuanlin@vip.163.com