

·研究简报·

利用固定化草酸氧化酶快速检测河豚毒素

李德昆, 林洪, 江洁, 曹立民, 官庆礼

(中国海洋大学水生生物制品安全性实验室, 山东青岛266003)

摘要:本研究旨在快速简便地检测河豚鱼体中河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)提供可操作手段。将河豚毒素用氢氧化钠处理,得到定量的草酸盐。利用戊二醛法将草酸氧化酶固定于聚丙烯膜上,通过比色法检测草酸含量,可以测算出河豚毒素的含量。结果显示,检测限量为 $0.80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,线性范围为 $1.44\sim 14.40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,加标平均回收率为88.54%,变异系数在11%以内。实验证实,该方法可抗河豚体内多种组分的干扰。利用该法测定3组暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)肝脏中河豚毒素含量,并将检测结果与小鼠生物试验进行对照,相关性良好。该方法检测时间短,对仪器设备要求低,便于推广应用。

关键词:河豚毒素;固定化草酸氧化酶;快速检测

中图分类号:S912 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)05-0638-05

河豚鱼肉质鲜美可口,但其体内通常含有河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX),对人的致死剂量为 $0.5 \text{ mg}/(70 \text{ kg})$,毒性比氰化钾强1000倍,是自然界中毒性最强的非蛋白类毒素^[1]。中国卫生部从安全角度考虑明文规定严禁加工经营鲜河豚鱼^[2]。但这难免造成中国有限的高值海洋鱼类的浪费。日本和韩国等国的实践证明,采用适当的加工方法,河豚鱼可以安全食用^[2]。

合理利用河豚鱼的关键是建立TTX的检测方法,尤其是快速检测方法以判定其毒性。TTX常规的检测方法是小鼠生物试验^[3]。该方法快捷,但需要大量的小鼠,且检测结果为总毒性。高效液相色谱法的研究报道较多,但其对样品预处理条件要求很高,费用昂贵,适合做研究^[4]。利用免疫学方法检测TTX的发展也很快,该方法费用低,灵敏度高,有望做成试剂盒用于TTX的快速检测。但这类方法需要较长时间来制备抗血清与单克隆抗体^[5-6]。此外,还可以将TTX衍生化后进行检测。本研究通过使用强碱将TTX处理后,得到与TTX成定量关系的C₉碱与草酸盐。通过检测草酸盐的生成量来定量TTX。本研究旨在克服前述方法中操作繁琐或耗时过长的缺陷,建立一种操作简便、成本低廉的快速检测TTX方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

河豚毒素标准品由河北省水产研究所提供,含量99.5%;牛血清白蛋白(中科院上海生化);草酸氧化酶(Oxalate Oxidase, 下简称OXO, Sigma公司);辣根过氧化物酶(Horse radish Peroxidase, 下简称HRP, 上海雪滴生物公司);4-氨基安替比林(Sigma公司);聚丙烯膜(青岛福林试剂公司);丁二酸、苯酚、草酸、戊二醛及其他化学试剂均为分析纯试剂;暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)取自中国海洋大学太平角实验基地;昆明种小鼠取自青岛药检所,雌性,体重 $(20 \pm 0.5) \text{ g}$ 。

1.2 方 法

1.2.1 戊二醛法固定草酸氧化酶 按华惠珍^[7]的方法略加改进。取 $50 \mu\text{L}$ 丁二酸缓冲液,滴加至聚丙烯膜中心,取 1.5 mg 草酸氧化酶与 1.5 mg 牛血清白蛋白加入膜上缓冲液,使之完全溶解。振荡滴加 $10 \mu\text{L}$ 2.5%的戊二醛溶液,使之铺成直径约 8 mm 的圆型薄膜。静置至表面水干,包上渗析膜,先用二次重蒸水洗1h,再用pH 3.80的甘氨酸洗涤1h,置二次重蒸水中 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 草酸氧化酶与辣根过氧化物酶抗干扰能力的检测 取丁二酸缓冲液 5 mL ,先加入草酸钠至浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,然后加入固定化草酸氧化酶反应 7 min 。取出酶膜,加入显色

收稿日期:2004-11-22; 修订日期:2005-04-02。

基金项目:山东省科技厅高新技术产品研究项目(200007)

作者简介:李德昆(1979-),男,博士,专业方向:水生生物制品安全性。

通讯作者:林洪, Tel: 0532-2032272, E-mail: linhong@ouc.edu.cn

剂 2 mL, 室温下成色 15 min, 于 520 nm 下检测反应液的吸光值。另取等量丁二酸缓冲液, 加入草酸钠后再加入 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 SO_4^{2-} 、 HPO_4^{2-} 、 CH_3COOH 、 CH_3OH 等分别至终浓度为 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 之后处理同上。3 次检测均做平行实验 3 次, 将后述两次检测结果均值与前述结果均值进行比较, 以确定各干扰物质对两种酶活力的影响。

1.2.3 显色剂的配制 取 1.0 mg 辣根过氧化物酶、50 mg 4-氨基安替比林与 2 mL 5% 的苯酚, 溶于 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.00 磷酸缓冲液, 定容至 100 mL 备用。

1.2.4 固定化酶法检测 TTX

(1) 检测原理 TTX 用强碱 NaOH 处理后转变为等摩尔的 C_9 碱与草酸盐。草酸氧化酶可以将草酸盐氧化成 CO_2 与 H_2O_2 , 利用辣根过氧化物酶可以将 H_2O_2 与苯酚、4-氨基安替比林反应生成靛亚胺, 该物质在 520 nm 有最大光吸收值, 测定吸光值可以定量草酸^[4], 从而可以计算出 TTX 含量。

(2) TTX 的提取 取 5.0 g 鱼肉, 加入 25 mL 的乙酸-甲醇混合液进行匀浆, 所得匀浆液 70 °C 加热 10 min 后过滤取滤液; 将残渣用乙酸-甲醇混合液仔细冲洗后再次过滤, 重复该操作 3 次, 合并滤液。减压浓缩, 用乙醚脱脂 2 次, 然后用蒸馏水将浓缩液稀释定容到 5 mL, 此稀释液 1 mL 相当于 1.0 g 样品。

(3) 标准曲线的制备 取 1 mg TTX 标准品, 用二次蒸馏水配制成 10 mL 的母液, 分别取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL 加至 10 mL 带塞试管中, 加乙酸溶液至 2.0 mL, 以 2.0 mL 乙酸溶液为空白。各管准确加入 $3.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 2.0 mL, 加塞摇匀, 在 $(85 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴中加热 45 min, 中间振荡 1~2 次。加热结束后立即用自来水冷却至室温。用硫酸溶液调节 pH 值至 3.80, 避光, 放入 38 °C 的水浴中预热 5 min, 再放入固定化草酸氧化酶反应 7 min。取出酶膜, 加入显色剂 2 mL, 室温下成色 15 min, 于 520 nm 下检测吸光值, 制备标准曲线。

另取不同浓度 TTX 标准溶液加入到空白河豚鱼肝脏中, 用方法(2)提取, 其他操作步骤同上, 以检测该方法的回收率 R。

(4) 样品中 TTX 的检测 以不进行碱处理的提取液为空白, 取 1.0 mL 提取液代替 TTX 标准溶液, 其余操作同上, 检测吸光值, 根据标准曲线计算 TTX 的含量。

1.2.5 比较实验

(1) 固定化酶法 取暗纹东方鲀肝脏为样品, 方法同 1.2.4。

(2) 小鼠生物试验检测 TTX 样品与(1)相同, 具体方法参见李世平^[3]等。

1.3 数据处理

TTX 浓度均采用平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 草酸氧化酶的固定化及其保存

酶的固定化方法较多, 常用的是戊二醛法^[9]。本实验采用将草酸氧化酶固定在聚丙烯膜上, 牛血清白蛋白帮助形成网络结构, 还有助于增强草酸氧化酶的稳定性^[9]。

固定化草酸氧化酶, 4 °C 存放于二次蒸馏水中, 期间不连续检测使用 300 次, 存放 100 d, 每隔 15 天测定一次固定化草酸氧化酶的相对酶活力, 图 1 显示草酸氧化酶的酶活力变化小于 6%, 表明草酸氧化酶是一种较为稳定的酶类, 采用戊二醛法固定草酸氧化酶可以满足检测要求。

草酸氧化酶价格昂贵, 通过戊二醛法将草酸氧化酶固定化, 可以增加酶的重复使用次数, 降低检测的消耗。由于检测过程中使用草酸氧化酶与辣根过氧化物酶两种酶类, 而该两种酶的反应条件差别较大, 将草酸氧化酶进行固定化后也便于草酸氧化酶与辣根过氧化物酶的分离, 从而降低两种酶之间的相互干扰。辣根过氧化物酶的催化反应为显色步骤, 不需要进行酶的分离, 将辣根过氧化物酶溶解于显色剂中使用。

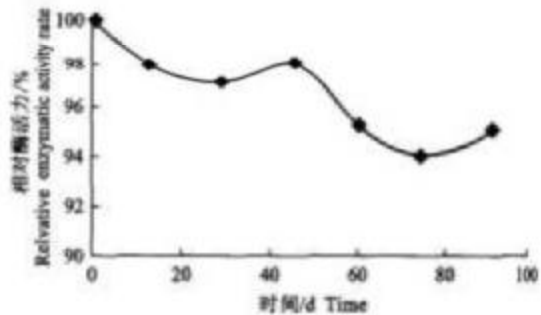


图 1 存放条件对固定化草酸氧化酶酶活力的影响
Fig. 1 Effects of holding conditions on immobilized OXO activity

2.2 固定化草酸氧化酶与辣根过氧化物酶抗干扰能力

检测过程中使用了草酸氧化酶与辣根过氧化物酶, 因此凡是干扰这两种酶的物质, 都会干扰 TTX 的检测。河豚鱼体内富含 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等元素^[10], 而提取检测过程中又引入了 SO_4^{2-} 、 CH_3COOH 及 CH_3OH 等, 这些物质对 HPLC 法及小鼠生物试验等传统方法会产生较大的干扰。将以上物质分别以 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度加入到表 1 所示的检测体系中, 检测发现除 Cl^- 外, 其他物质在 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下均不会干扰固定化酶检测体系, 在浓度增大到 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 部分离子如 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等会产生微弱的干扰作用, 导致酶活力下降 5%~10%, 但不会影响检测结果。 Cl^- 对草酸氧化酶有较弱的干扰作用^[8], 故调节 pH 值时应避免使用盐酸溶液。

CH_3COOH 与 $(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ 为草酸氧化酶底物草酸的结构类似物,检测发现,即使在 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高浓度,这两种物质也不影响草酸氧化酶的酶活力,表明草酸氧化酶的特异性强,性质稳定。

表1 部分离子及有机物对固定化草酸氧化酶与辣根过氧化物酶相对酶活力的影响

Tab.1 Effects of some ions and organic matters on relative activities of immobilized OXO and HRP %

干扰物 Disruptors	干扰物终浓度/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Final concentration of disruptors	
	0.01	0.1
Ca^{2+}	100	100
Na^+	100	100
K^+	100	95
Mg^{2+}	100	95
Fe^{2+}	100	100
Mn^{2+}	100	90
Al^{3+}	100	95
SO_4^{2-}	100	100
HPO_4^{2-}	100	90
CH_3COOH	100	100
$(\text{CH}_2\text{COOH})_2$	100	95
CH_3OH	100	95
Cl^-	60	50

注:以原酶活力为100%计。

Note: On the basis of 100% original enzyme activity.

2.3 标准曲线

将所得数据进行线性回归,得到如图2所示的标准曲线 $y=0.005x$, $R^2=0.9795$,其中 x 为 TTX 的质量分数, y 为吸光值。检测限量为 $0.80 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,线性范围为 $1.44\text{--}14.40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

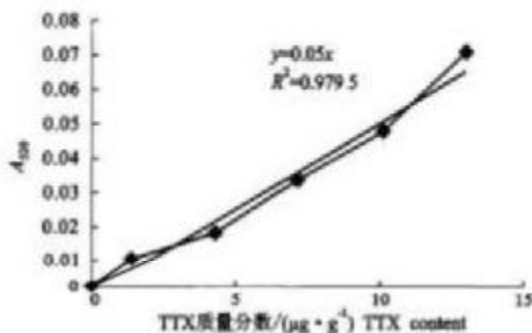


图2 固定化酶法检测 TTX 标准曲线

Fig.2 Standard curve between A_{520} vs. TTX content in *T. obscurus* using immobilized OXO

2.4 回收率与变异系数

在检测方法的线性范围内,选择了5种 TTX 水平进行回收率的检测。如表2所示,在较低加入水平时回收率在80%左右,随着检测值的提高,该种方法的回收率也随之增加,在 TTX 的质量分数达到 $12.96 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,回收率达到97.5%。该方法的平均回收率为88.54%,准确度满足快速定量检测的要求。

表2 固定化酶法检测 TTX 的加标回收率($n=5$)

Tab.2 Analytical recovery of added TTX in puffer liver determined using immobilized OXO ($n=5$)

加入 TTX 水平/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Added TTX content	TTX 检测值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Determined TTX content $\bar{X} \pm \text{SD}$	回收率/% Recovery
1.44	1.15 ± 0.11	80.0
4.32	3.49 ± 0.37	80.7
7.20	6.43 ± 0.47	89.3
10.08	9.60 ± 0.14	95.2
12.96	12.64 ± 0.08	97.5

由表3可以看出,随着检测值的增加,变异系数呈减小趋势。在 $4.32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的加入水平时,批内批间的变异系数均小于11%。在 $7.20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的加入水平时,检测方法的变异系数接近于5%。检测表明该种方法的精确度可以满足快速定量检测的要求。

2.5 固定化酶法与小鼠生物试验的检测结果比较

将固定化酶法检测结果的均值与小鼠生物法检测结果的均值进行比较(如表4所示),相关系数 r 为0.9672,表明该种方法与小鼠生物法的检测结果具有良好的相关性。

3 讨论

草酸氧化酶的最适作用温度为 38°C ,最适 pH 3.80,因此将 TTX 用碱处理后,需要用酸溶液调节其 pH 值至酸性范围。 H_2O_2 在光照等条件下不稳定,高温也能促进其分解^[8],故反应过程采用铝箔包裹具塞试管。控制草酸氧化酶的作用时间为7 min,既可使草酸盐完全氧化,又可控制 H_2O_2 的分解程度,以保证检测结果的准确性。

利用固定化草酸氧化酶检测 TTX,提取、碱处理、草酸氧化酶催化、显色剂显色等检测步骤共需要时间3~4 h,而高效液相色谱法、气相色谱法及免疫学方法等均需要8~10 h,因此,本方法对提取液的处理程序简单,不需要复杂的前处理如柱层析、固相萃取等^[3-4],对仪器要求简单,便于操作人员掌握。

表3 固定化酶法检测的批内批间变异系数(n=5)

Tab.3 Within and between assay CV for determination of immobilized OXO method (n=5)

TTX加入水平/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Added TTX content	批内检测值/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Within-assay value $\bar{X}\pm\text{SD}$	批间检测值/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) Between-assay value $\bar{X}\pm\text{SD}$	批内变异系数/% Within-assay CV	批间变异系数/% Between-assay CV
4.32	3.51 \pm 0.32	3.49 \pm 0.37	9.16	10.63
37.20	6.52 \pm 0.32	6.43 \pm 0.47	4.88	7.34

表4 固定化酶法与小鼠生物试验的检测结果比较(n=5)

Tab.4 Comparison of determination results between immobilized OXO method and Mouse Bioassay (n=5)

样品分组 Sample group	固定化酶法检测值 Value by immobilized OXO method $\bar{X}\pm\text{SD}$	小鼠生物试验检测值 Value by Mouse Bioassay $\bar{X}\pm\text{SD}$
I	1.60 \pm 0.10	1.44 \pm 0.20
II	1.82 \pm 0.08	1.63 \pm 0.31
III	4.16 \pm 0.09	4.48 \pm 1.24

注:样品为河豚肝脏。

Note: The liver of *T. obscurus* was used as the sample.

如果直接用分光光度计检测草酸盐来定量 TTX,则干扰较大,检测限高,因此仅适用于 TTX 标准品的检测。利用辣根过氧化物酶与固定化的草酸氧化酶检测 TTX,由于酶的专一性,可充分保证方法的特异性。本方法可作为河豚鱼 TTX 含量的快速筛选方法,便于推广普及。

参考文献:

- [1] 陈素青,任雷鸣.河豚毒素的药理作用及临床应用[J].中国海洋药物,2001,6:50-55.
- [2] 李晓川,林美娇.河豚鱼及其加工利用[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [3] 李贵平,赵清良,赵强.野生和人工养殖暗纹东方鲀不同组织中河豚毒素(TTX)含量的初步研究[J].1998,21(3):90-94.
- [4] Garthwaite L. Keeping shellfish safe to eat: a brief review of shellfish toxins, and methods for their detection [J]. Trends Food Sci Technol, 2001,11:235-244.
- [5] Matsumura K. A monoclonal antibody against tetrodotoxin that reacts to the active group for the toxicity [J]. Environ Toxicol Pharmacol Sect, 1995,293:41-45.
- [6] 李德昆,林洪,曹立民,等.河豚毒素抗血清的制备与纯化[J].中国食品学报,2003;270-274.
- [7] 华惠珍,房云峰,熊慧敏.草酸氧化酶的研制及流动法测定草酸[J].北京大学学报(自然科学版),1990,26(2):141-146.
- [8] Thekur M, Goyal L, Pundir C S. Discrete analysis of plasma oxalate with alkylamine glass bound scorpion oxalate oxidase and horseradish peroxidase [J]. Biochem Biophys Meth, 2000,44:77-88.
- [9] Kanahito N, Osamu A, Shigeto T, et al. Occurrence of saxitoxin as a major toxin in the ovary of a marine puffer *Arothron firmamentum* [J]. Toxicon, 2004, 43: 207-212.
- [10] Saito T, Kawashima K, Lin K H, et al. Influence of aldehyde groups on the thermostability of an immobilized enzyme on an inorganic support [J]. Mater Sci Engin, 1997, 5(2):149-152.

Fast determination of tetrodotoxin by immobilized oxalate oxidase

LI De-kun, LIN Hong, JIANG Jie, CAO Li-min, GONG Qing-li
(Seafood Safety Laboratory, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A new determination method for tetrodotoxin (TTX) test was established in this study for the purpose of fast and simple conduction. After reacted with sodium hydroxide, tetrodotoxin was transferred into C₉ base and oxalate quantitatively. Oxalate oxidase could be immobilized onto the polypropylene membranes by the method of glutaraldehyde. The oxalate could be determined by the immobilized oxalate oxidase through colorimetry and the content of tetrodotoxin could be calculated. The minimum detection and linear range were 0.80 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 1.44–14.40 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. The average recovery of added tetrodotoxin was 88.54% and assay coefficients of variation were within 11%. This method is safe from the interference of compounds in puffers. The contents of tetrodotoxin in *Takifugu obscurus* livers were determined by this method and compared with that calculated from Mouse Bioassay. There was high relativity between the two methods. This method is suitable for fast determination of tetrodotoxin in fishery field with simple requirements for instruments and operation techniques.

Key words: tetrodotoxin; immobilized enzyme; oxalate oxidase; fast determination

Corresponding author: LIN Hong. E-mail: linhong@ouc.edu.cn

海洋出版社水产养殖图书名录

序号	书 名	单价(元)	序号	书 名	单价(元)
1	养殖环境中的生态因子	5	13	海水鱼类的集约化养殖技术	45
2	怎样养好热带鱼	5	14	海水设施养殖	50
3	南美白对虾健康养殖	18	15	海参、海胆生物学研究与养殖	30
4	科技兴海丛书(一)海水养殖技术	43	16	辽东湾近岸养殖区环境研究	20
5	科技兴海丛书(五)海洋化工与海水养殖技术	41	17	海参健康养殖技术	35
6	斑节对虾养殖	16	18	牙鲆健康养殖技术	25
7	对虾养殖病毒病害综合防治系统工程	12	19	石花菜育苗与养殖	29
8	对虾健康养殖问答	14	20	乐清湾、三门湾养殖生态和养殖容量研究与评价	80
9	海水健康养殖的理论与实践	60	21	海水养殖鱼类生物学及养殖	45
10	世界水产养殖科技大趋势	28	22	深水网箱养殖技术	25
11	南美白对虾生物学研究与养殖	18	23	中国主要海产贝类健康养殖技术	28
12	日本对虾健康养殖	22	24	美国红鱼养殖实用新技术	18

以上图书零售及邮购需另加 15% 邮费。购买 50 册以上免收邮费, 批销 100 册以上折扣优惠。

联系人: 刘禹明 电话: 010-62147016 地址: 北京市海淀区大慧寺路 8 号海洋出版社发行部 邮政编码: 100081