

## 小鼠生物法和酶联免疫法(ELISA)定量监测沿海5省 养殖河豚鱼中的河豚毒素(TTX)

纪元, 刘岩, 官庆礼\*

(中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

**摘要:**为进一步扩大国内养殖河豚鱼消费市场提供依据,应用小鼠生物法监测了我国辽宁、河北、山东、江苏和福建4种养殖河豚鱼(红鳍东方鲀,菊黄东方鲀,双斑东方鲀和暗纹东方鲀4种组织(皮、肉、肝脏和性腺)中河豚毒素(TTX)含量及周年变化,并用酶联免疫法(ELISA)同步检测了山东红鳍东方鲀的皮、肉和肝脏各组及个别卵巢样品。结果4种养殖河豚鱼的皮、肉和肝脏每组平均含毒量均属无毒(小鼠生物法检测结果小于0.5  $\mu\text{g/g}$ , ELISA检测结果小于0.8  $\mu\text{g/g}$ )。卵巢发现一强毒例,精巢则全部无毒。通过监测,发现养殖河豚鱼组织器官的毒力呈现一定的周年变化。ELISA法与小鼠生物试验测得的结果相符合。养殖河豚鱼皮、肉和精巢认为可以考虑科学安全的利用,肝脏须谨慎对待,由于养殖河豚鱼上市规格较小,卵巢一般无食用意义,加工过程应注意不要污染可食部分。

**关键词:**养殖河豚鱼;河豚毒素;小鼠法;酶联免疫检测法

**中图分类号:**X 835; S 965.225

**文献标识码:**A

河豚肉味腴美,营养丰富,被人们视为餐桌珍品,尤其在亚洲国家,自古就有喜食河豚的习惯,而在日本更是被视为国宴佳肴。但河豚鱼体内含有的剧毒神经毒素——河豚毒素(tetrodotoxin, TTX),严重妨碍了对河豚鱼的加工应用。长期以来,河豚一直是我国食品卫生部门禁止鲜食的鱼类之一。1990年颁布的《水产品卫生管理办法》中明文规定,河豚鱼有剧毒,不得流入市场,捕捞后应剔出妥善处理。该办法的有效实施对于保障人民的生命安全无疑发挥了积极的作用,但由于经营河豚鱼产生的巨大经济效益和人们的消费需求,实际的状况却是屡禁难止。日本放开河豚鱼市场至今已有两百多年的历史,但食用河豚鱼导致的中毒发生率和死亡率却持续下降。在我国,卫生部门特批的试食试点单位开办十年至今无一例中毒事件发生,以往的研究已经证实并不是所有种类的河豚鱼的所有组织都有毒,因此,河豚鱼市场完全禁止无异于因噎废食。

自20世纪90年代起于黄渤海沿岸地区进行

了大规模的红鳍东方鲀养殖,我国河鲀鱼养殖经过近二十年的发展,目前已初具生产规模。养殖地区主要集中在辽宁、河北、山东、江苏、广东等沿海的10个省份。养殖种类主要是红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、假睛东方鲀(*T. pseudommus*)、暗纹东方鲀(*T. fasciatus*)、菊黄东方鲀(*T. flavidus*)和双斑东方鲀(*T. bimaculatus*)。除了国内试点单位消费的极少一部分河鲀鱼外,70%~80%的产品出口到日本、韩国。随着野生河豚鱼资源的枯竭,养殖河豚鱼产量的不断增长,如何科学安全地利用养殖河豚鱼,开放河豚鱼市场具有经济社会环境多方面的意义。

对于养殖东方鲀的毒性水平和特点的研究在我国还很零散,养殖河豚鱼是否有毒也是众说纷纭。为此,本文用检测较灵敏的酶联免疫检测(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法对我国养殖河豚鱼体内河豚毒素的含量进行了周年监测,以期解答我国养殖河豚鱼是否含毒,毒素含量是多少,是否与野生河豚鱼一样存在组织分

布差异和季节变化等问题。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

2007 - 2008 年每两个月为一批,分别从辽宁、河北、山东、江苏及福建 5 省的养殖单位采集红鳍东方鲀,双斑东方鲀,菊黄东方鲀和暗纹东方鲀,冰鲜方式运往实验室。KM 昆明种小鼠购自青岛市药检所。基于已有的养殖河豚鱼毒力很低的研究结果<sup>[1-12]</sup>,对样品随机分组合并,分别取皮、肉和肝 3 种组织各 10 g,同一来源的 10 尾鱼为一组合并成 100 g 作为一个检测单位。性腺不合并,逐个检测。

### 1.2 仪器与试剂

全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),37 ℃ 恒温孵育箱(上海一恒科技有限公司),旋转蒸发仪(上海亚荣仪器有限公司),台式高速冷冻离心机(白洋离心厂),Delta 320 pH 计(上海梅特勒-托利多伊奇有限公司),河豚毒素标准品(河北省水产研究所),河豚毒素定量酶联免疫检测试剂盒(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所)。

### 1.3 样品处理

**小鼠生物法** 将 0.1% 乙酸加入到称量合并后的 100 g 样中搅碎,超声 10 min 后浸泡 40 ~ 48 h,7 000 r/min 离心 20 min,收集上清液(肝脏样品离心后过滤,分离最上脂肪层),把残渣收集重复以上步骤,合并上清液,100 ℃ 加热煮沸 5 min,冷却后,过滤。滤液减压浓缩 10 倍得到浓缩滤液 10 mL,性腺浓缩至所取克数的一半,此液体即为小鼠法检测原液。

**ELISA 法** 将山东红鳍东方鲀皮、肝、肉及个别性腺检测原液根据小鼠生物法检测结果适当稀释,使毒素含量在 ELISA 法检测线性范围内。用 NaOH 调 pH 至 6.5 ~ 7,立即用于检测。

### 1.4 试验方法

**小鼠生物法** 准确称取河豚毒素 1.01 mg 溶于 10 mL 容量瓶中(浓度:0.1 mg/mL),分别吸取 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10 mL 配成 10 mL 梯度溶液,浓度分别为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 μg/mL。对每一浓度分别取 3 只重量在 18.5 ~ 21 g KM 品系雄性小鼠注射(注射剂量

0.5 mL),记录死亡情况及死亡时间,对小鼠称重。以平均死亡时间的倒数为横坐标(X),小鼠单位体重河豚毒素注入量(以 20.0 g 为小鼠单位体重)为纵坐标(Y),其线形回归方程为  $y = 2247.7x + 86.485, R^2 = 0.9791$ 。

取样品检测原液,用玻璃棒充分搅匀,每次注射小鼠 0.5 mL,每个样重复 3 次,以注射器中样液全部注入小鼠体内开始计时,以出现河豚毒素中毒的典型症状为标准判断小鼠是否为 TTX 中毒致死;以小鼠停止呼吸为判断时间终点的标准。通过标准曲线回归,得原液毒素含量。根据下式计算原液包含的 10 尾鱼组织中的平均毒素含量。

$$\text{TTX 含量}(\text{ng/g}) = A \cdot F \cdot / (W \cdot X)$$

式中,A 为通过回归方程算出的原液含量;F 为体重校正系数;X 为样品提取液浓缩倍数;W 为每毫升浓缩液相当于河豚组织的克数。

如果原液毒力很大,小鼠死亡时间 < 3 min,可以采用稀释原液的方法,直至小鼠死亡时间介于 3 ~ 30 min 之间,记录未经稀释的原液体积以及稀释倍数,按上式计算。

**酶联免疫分析程序** 分析程序和 TTX 含量计算方法均按试剂盒说明书上的方法进行。

## 2 结果

### 2.1 小鼠生物法检测结果

2007 - 2008 年从辽宁大连,河北唐山,山东乳山,江苏南通和扬州及福建连江共采集养殖河豚鱼 565 尾,其采集地,采集时间,采集数量及采集河豚鱼的生物学特征见表 1 和表 2。除山东菊黄东方鲀和山东双斑东方鲀因采集数量较少未分组外,均进行了组织分组合并和浓缩。

按日本谷氏对河豚毒性强弱的分类标准,每克组织中含有小于 10 个鼠单位(MU)的可认为无毒,在 10 ~ 100 MU 的为弱毒,在 100 ~ 1 000 MU 的为强毒,在 1 000 MU 以上的为剧毒<sup>[13]</sup>。对人而言,河豚毒素最小致死量约 2.2 mg,按 1 MU = 0.22 μg TTX 的标准,即食用 22 μg TTX/g 的鱼组织 100 g 后可致死,但人一般一次食用不会超过 1 kg,所以凡含毒在 10 个鼠单位以内,即 2.2 μg TTX/g 鱼组织,不能致人死亡。这也是一般认为的可食用的河豚鱼的安全标准<sup>[14]</sup>。小鼠标准曲线回归算出的所有样品组织毒素含量若小于 2.2 μg/g 可认为无毒。结果所有供检测的分

组合并后的皮,肌肉和肝脏组织平均毒素含量均属无毒。小鼠生物法检测每批各组织各组织间组织平均含量的周年变化结果见图1~图3。由图可知,我国养殖河豚鱼体内并不是不含河豚毒素,而是含量极低,大部分在300 ng以下,与野生河豚鱼一样存在组织分布差异和季节变化,但与野生河豚鱼一般肝脏毒力强于肌肉和皮的情况不同的

是养殖河豚鱼除暗纹东方鲀外,其他3种河豚鱼是肌肉毒力强于肝脏和皮,而暗纹东方鲀是皮的毒力强于肌肉和肝脏。野生红鳍东方鲀一般3~5月繁殖季节毒力最强,而养殖的山东和河北两地红鳍东方鲀3种组织毒力峰值除河北的肌肉出现在5月,均出现在7月。另外江苏菊黄东方鲀7月采集的样品毒力也高于11月的。

表1 养殖河豚鱼采集地、种类、时间及数量统计信息

Tab.1 The statistical information of location, species, time and quantity of the collected specimens

	山东红鳍 <i>T. rub</i> *S	河北红鳍 <i>T. rub</i> *H	辽宁红鳍 <i>T. rub</i> *L	山东菊黄 <i>T. fla</i> *S	江苏菊黄 <i>T. fla</i> *J	山东双斑 <i>T. bim</i> *S	江苏双斑 <i>T. bim</i> *J	福建双斑 <i>T. bim</i> *F	江苏暗纹 <i>T. obs</i> *J
2007-11	30	30	-	8	-	3	-	-	-
2008-01	30	10	14	10	-	-	-	30	-
2008-03	30	20	20	-	-	-	-	30	-
2008-05	30	20	-	-	-	-	-	-	-
2008-07	30	20	-	-	30	-	-	-	-
2008-09	30	20	-	-	-	-	-	-	-
2008-11	30	20	-	-	30	-	20	-	20
合计 total	210	140	34	18	60	3	20	60	20
同种合计 total of same species	384			78		83			20
总计 sum	565								

注: -代表未采集到。S. 山东, H. 河北, L. 辽宁, J. 江苏, F. 福建。

Notes: - means no specimen. S. Shangdong, H. Hebei, L. Liaoning, J. Jiangsu, F. Fujian.

表2 养殖河豚鱼生物学特征

Tab.2 Biological characteristics of the cultured puffer fish

种类 species	样本数量 quantity	体长(cm) body length	总重(g) body weight	性腺重/总重 gonad weight/body weight
红鳍东方鲀 <i>T. rubripes</i>	384	26.6 ± 22.9	632.5 ± 208.09	0.110 ± 0.11
暗纹东方鲀 <i>T. bimaculatus</i>	20	20.4 ± 0.7	374.8 ± 27.5	0.005 ± 0.011
菊黄东方鲀 <i>T. flavidus</i>	78	17.5 ± 1.2	229.5 ± 48	0.020 ± 0.02
双斑东方鲀 <i>T. fasciatus</i>	83	17.6 ± 0.8	272.0 ± 37.0	0.070 ± 0.04

在2008年3月山东红鳍东方鲀的30尾鱼中发现一强毒例卵巢,毒力达27.596 μg/g。另外还有一些用小鼠生物法能够检测出河豚毒素但达

不到2.2 μg/g的卵巢样本。而所有精巢样品未发现有毒致死小鼠的。

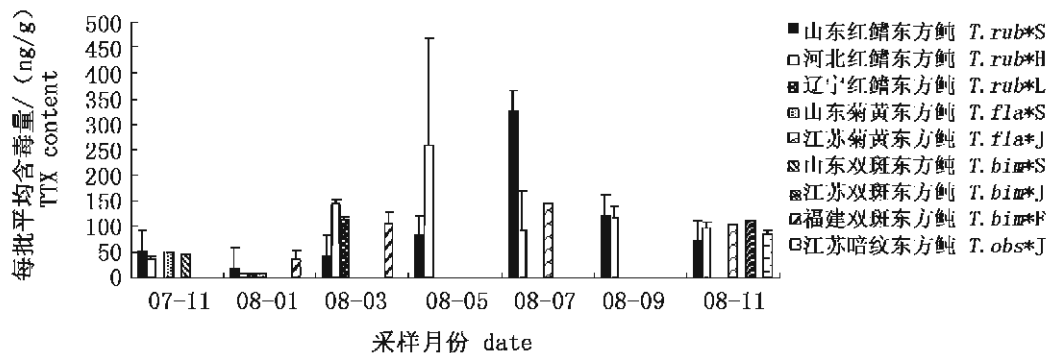


图1 中国养殖河豚鱼肌肉含毒量周年变化

Fig.1 The annual variation of TTX content in muscle of cultured pufferfish in China

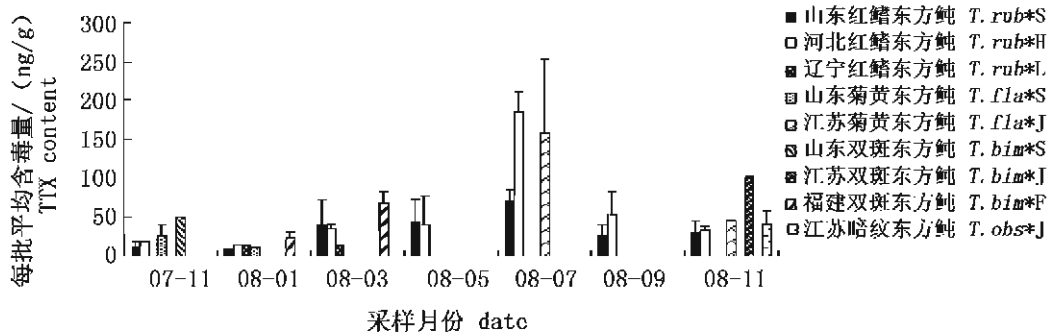


图2 中国养殖东方鲀肝脏含毒量周年变化

Fig. 2 The annual variation of TTX content in liver of cultured pufferfish in China

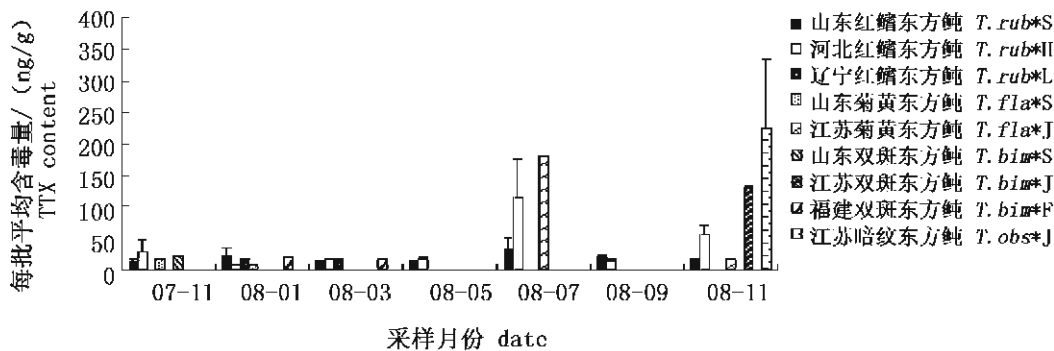


图3 中国养殖东方鲀皮含毒量周年变化

Fig. 3 The annual variation of TTX content in skin of cultured pufferfish in China

## 2.2 ELISA 检测结果与小鼠生物法检测结果的比较

将山东红鳍东方鲀所有皮、筋肉和肝脏原液及个别用小鼠生物法能够检测出来的性腺原液经适当稀释用 ELISA 试剂盒检测(表 3)。

两种方法检测结果符合良好, 配对  $t$  检验  $t = 1.03$ ,  $t_{0.05, 29} = 2.045$ ,  $t < t_{0.05, 29}$ , 说明两两之间在统计上无显著差异性。回归方程为  $y = 1.3977x + 0.0022$  相关系数 ( $R^2$ ) 为 0.9739。说明用小鼠生物试验和 ELISA 法测得的河豚鱼组织中 TTX 含量间呈极显著相关。

## 3 讨论

### 3.1 养殖河豚鱼是否含毒

Matsui 等<sup>[1]</sup>和 Saito 等<sup>[2]</sup>报道养殖河豚鱼体内检测不到 TTX, 从那以后, 人们普遍认为养殖河豚鱼无毒<sup>[3]</sup>。Noguchi 等<sup>[4]</sup>采用小鼠和液相—质谱联用技术调查了日本 1999—2004 年间各主要养殖区海上网箱及陆地池养的 5 000 尾红鳍东方鲀的毒性情况, 在检测的肝脏、皮、肉和性腺中

均没有检测到 TTX (检测灵敏度  $< 0.1 \text{ MU/g}$ )。然而 1996 年 Matsumura<sup>[5]</sup>用酶联免疫的方法检测了 10 条 3 月龄的养殖红鳍东方鲀, 发现养殖的红鳍东方鲀体内含有少量的 TTX。最近 Sasaki 等<sup>[6]</sup>用电生理学的方法检测了 10 条养殖的红鳍东方鲀, 指出养殖河豚鱼体内含有 TTX, 但含量很低。

在国内, 1994 年, 南京师范大学生命科学学院通过 6 年的养殖, 于 2001 年春季, 对野生、人工未控毒养殖和家化控毒养殖的雌性亲本随机取样, 检测结果表明: 培育的暗纹东方鲀亲本, 各组织器官 TTX 平均含量低于  $2 \mu\text{g/g}$ <sup>[7]</sup>。在此期间, 李世平等<sup>[8]</sup>于 1998 年采用小鼠生物检测法测定了人工养殖的一龄和两龄的暗纹东方鲀不同组织(肌肉, 肝脏, 胃肠, 肾脏)中 TTX 的含量。结果表明: 人工养殖暗纹东方鲀不同组织中 TTX 含量都极低, 几乎无毒, 说明用人工养殖方法可以培育出低毒或无毒河豚。1999—2000 年, 殷宁等<sup>[9]</sup>, 赵清良等<sup>[10]</sup>又对养殖的 3 龄暗纹东方鲀的毒性进行了研究, 与前不同的是研究了其性腺发

育及毒性。证实了在淡水养殖条件下,投以配合饵料,辅以一定的技术措施,即便是已达到性成熟的养殖的3龄暗纹东方鲀卵巢和肝脏也是无毒的。江苏宜兴人工养殖的暗纹东方鲀所有受检的器官组织均无毒<sup>[11]</sup>。2004年,张理等<sup>[12]</sup>用昆明

小鼠对养殖的红鳍东方鲀和假睛东方鲀样品进行测定,均显示无毒,而自1998年第一家河豚馆试点单位在青岛开办十年以来,还未有一例养殖河豚鱼中毒事件发生。

表3 小鼠生物法与酶联免疫法检测结果  
Tab.3 The result of mouse assay and ELISA method

样品 sample	皮 skin		肌肉 muscle		肝脏 liver	
	小鼠法(μg/g) mouse assay	酶联免疫法 (μg/g) ELISA	小鼠法(μg/g) mouse assay	酶联免疫法 (μg/g) ELISA	小鼠法(μg/g) mouse assay	酶联免疫法 (μg/g) ELISA
山东红鳍07-11组1	ND	0.024 ± 0.001	0.052 ± 0.002	0.064 ± 0.008	ND	0.020 ± 0.001
山东红鳍07-11组2	ND	0.011 ± 0.001	-	-	ND	0.067 ± 0.001
山东红鳍07-11组3	ND	0.008 ± 0.001	-	-	ND	0.005 ± 0.001
山东红鳍08-1组1	ND	0.033 ± 0.003	ND	0.355 ± 0.069	ND	0.015 ± 0.001
山东红鳍08-1组2	ND	0.020 ± 0.002	0.041 ± 0.002	0.041 ± 0.003	ND	0.058 ± 0.005
山东红鳍08-1组3	ND	0.009 ± 0.001	ND	0.030 ± 0.004	ND	0.018 ± 0.002
山东红鳍08-3组1	ND	0.007 ± 0.003	ND	0.030 ± 0.001	ND	0.029 ± 0.002
山东红鳍08-3组2	ND	0.017 ± 0.002	0.092 ± 0.012	0.088 ± 0.01	ND	0.143 ± 0.013
山东红鳍08-3组3	ND	0.020 ± 0.003	ND	0.022 ± 0.004	0.028 ± 0.021	0.023 ± 0.001
山东红鳍08-5组1	ND	0.022 ± 0.003	0.135 ± 0.026	0.101 ± 0.007	0.078 ± 0.035	0.050 ± 0.007
山东红鳍08-5组2	ND	0.018 ± 0.001	ND	0.024 ± 0.008	ND	0.033 ± 0.001
山东红鳍08-5组3	ND	0.018 ± 0.002	0.096 ± 0.009	0.090 ± 0.014	0.037 ± 0.022	0.078 ± 0.01
山东红鳍08-7组1	0.027 ± 0.003	0.033 ± 0.03	0.193 ± 0.026	0.352 ± 0.081	0.060 ± 0.003	0.137 ± 0.013
山东红鳍08-7组2	ND	0.027 ± 0.002	0.338 ± 0.154	0.228 ± 0.166	0.063 ± 0.016	0.139 ± 0.026
山东红鳍08-7组3	0.054 ± 0.005	0.082 ± 0.029	0.497 ± 0.42	0.753 ± 0.245	0.089 ± 0.095	0.094 ± 0.006
山东红鳍08-9组1	0.024 ± 0.01	0.013 ± 0.002	0.127 ± 0.015	0.195 ± 0.041	0.043 ± 0.041	0.040 ± 0.004
山东红鳍08-9组2	ND	0.020 ± 0.001	0.072 ± 0.035	0.081 ± 0.01	ND	0.035 ± 0.006
山东红鳍08-9组3	ND	0.019 ± 0.001	0.191 ± 0.074	0.365 ± 0.066	0.022 ± 0.004	0.079 ± 0.005
山东红鳍08-11组1	ND	0.020 ± 0.001	0.095 ± 0	0.203 ± 0.1	ND	0.033 ± 0.007
山东红鳍08-11组2	ND	0.022 ± 0.002	ND	0.032 ± 0.003	0.049 ± 0.03	0.054 ± 0.003
山东红鳍08-11组3	ND	0.020 ± 0.001	0.102 ± 0.014	0.161 ± 0.029	0.027 ± 0.012	0.047 ± 0.008
山东07-11红鳍卵巢	0.113	0.15				
山东08-3红鳍卵巢	27.596	61.24				
山东08-7红鳍卵巢	0.714	1.21				
山东08-9红鳍卵巢	0.412	0.723				

注:-未分组;ND:未检测出毒素。

Notes:- means no grouping; ND means no toxicity.

本实验的研究结果基本上与以上的研究结果相符,除了红鳍东方鲀和暗纹东方鲀,菊黄东方鲀和双斑东方鲀也进行了较大规模的检测,且采样随机,覆盖面广,所检测的所有皮,肉,肝脏和精巢均未发现大于2 μg/g的样本(图1~图3),但通过合并浓缩样品除精巢外仍然可以检测到TTX(图1~图3)。说明养殖河豚鱼体内并不是不含TTX,而是含量极低,远远达不到有毒的标准。

此次检测于2008年3月发现了一强毒的卵巢例(表3),TTX含量小鼠法检测为27.596 μg/g,ELISA法检测为61.24 μg/g。Yang等<sup>[15]</sup>发现

自然海区捕捞的暗纹东方鲀和人工繁殖的暗纹东方鲀经过半年的室内海水工厂化养殖,除了野生的暗纹东方鲀投喂小杂鱼虾和人工繁殖的暗纹东方鲀投喂人工配合饲料不同外,其它的饲养条件都一样,结果两者体内的能产TTX细菌的组成没有较大差别,间接表明虽然利用人工配合饲料喂养,通过海水养殖的暗纹东方鲀,体内仍含TTX。虽然人们可以通过控制养殖条件,在一定程度上能降低河豚毒性,但在食用这种人工海水养殖的河豚时,仍要注意河豚毒性的风险。Hwang等<sup>[16]</sup>发现,不同水质对人工养殖的红鳍东方鲀的毒性

有影响,在台北宜兰县两个养殖基地养殖的红鳍东方鲀是无毒的,而在毗邻的台北县养殖基地养殖的红鳍东方鲀的卵巢在1-3月是有毒的,肝脏在1-3月是有弱毒的。

由此可见,对于所检测的4种养殖河豚鱼,通过控制养殖条件,肉、皮和精巢中的毒素含量可以达到无毒级别,科学安全地利用是可行的,而肝脏仍然存在风险,需要做大量的研究工作。对于一例强毒卵巢的发现,由于养殖河豚鱼上市规格较小,卵巢一般无食用意义,若加工利用,应规范操作过程确保不污染无毒部分。考虑到国内市场的混乱现实情况,对原料接受、运输、贮存、去毒加工、制作过程中的危害进行分析并加以控制如何落实,对无毒和有毒种类,养殖和野生河豚鱼如何鉴别区分等等问题若得不到很好的解决,安全利用养殖河豚鱼仍然任重道远。

### 3.2 养殖河豚鱼含毒量

Matsumura<sup>[5]</sup>用酶联免疫的方法检测结果养殖的红鳍东方鲀皮、肉、肝脏和性腺 TTX 含量分别为 48.9, 11.6, 2.6 和 6.4 ng/g 组织, Sasaki 等<sup>[6]</sup>指出红鳍东方鲀肉、肾、肝和卵巢 TTX 含量在 20~200 ng/g 组织范围内。本研究用检测较灵敏的 ELISA 法检测结果与 Matsumura<sup>[5]</sup> 和 Sasaki 等<sup>[6]</sup> 研究结果相符,检测的 29 个样本是从小鼠生物法检测毒素含量较高的样本中挑出的,除了卵巢,其他 3 种组织毒素含量在 0.8 μg/g 以下,小鼠生物法检测毒素含量在 0.5 μg/g 以下(表 3)。而其他未用 ELISA 法检测而用小鼠生物法检测的样品包括性腺均在 250 ng/g 以下(图 1~图 3,性腺未显示)。仅有一例卵巢有毒,小鼠生物法检测毒素含量达 27.596 μg/g, ELISA 法检测 61.24 μg/g。Noguchi 等<sup>[4]</sup>采用小鼠和液相一质谱联用技术调查结果肝脏、皮肤、肌肉、性腺没有检测到 TTX (检测灵敏度 < 0.1 MU/g) 推测主要是因为采用的小鼠生物法检测限太高,而液相法前处理损失较大,对皮、肉和性腺并未全部检测造成的。

### 3.3 养殖河豚鱼毒素分布特点

TTX 在野生河豚鱼体内的分布随种类不同而不同,在海水种类中,卵巢和肝脏毒性最强,其次是肠和皮<sup>[17-21]</sup>,而淡水河豚鱼的皮毒性最高<sup>[22-25]</sup>。养殖河豚鱼体内 TTX 的分布依海水种类与淡水种类不同而不同,红鳍东方鲀,菊黄东方

鲀和双斑东方鲀是海水养殖品种,3种河豚鱼 TTX 体内分布较一致,大致是肉和卵巢最强,其次是肝脏和皮,暗纹东方鲀是淡水养殖品种,皮的含量最高(图 3)。与预想不大一致的是,养殖的河豚鱼肉中 TTX 的含量相对较高,而肝脏却相对较低(图 1~图 3,表 3),这在 Matsumura<sup>[5]</sup> 和 Sasaki 等<sup>[6]</sup> 的研究中也能看到类似的情况。而且几种组织的 TTX 含量差别不大,3种海水品种分布特点趋于一致。

通常雌鱼毒力大于雄鱼,产卵期的毒素含量高于非产卵期<sup>[17]</sup>,养殖河豚鱼虽然毒力很低,雌雄差别与季节变化仍然有所表现(图 1~图 3,表 3),在检测的所有卵巢中有极个别可以检测到 TTX,绝大部分未检测出 TTX,而精巢包括菊黄东方鲀全部检测不到 TTX(根据日本厚生省 1995 年更新的可食河豚鱼纲要,菊黄东方鲀的精巢不可食)。所采集的养殖东方鲀样本性腺绝大部分未成熟(表 2),但在 3 月份的样品中却发现一例强毒卵巢。

由此联想,河豚毒素在河豚鱼体内的积累是内外因共同作用的结果,不同种类的河豚鱼其体内积累 TTX 的机制存在差别,TTX 在各种不同门的动物中均被检测到说明了 TTX 很可能是来源于水环境<sup>[25-26]</sup>。养殖河豚鱼的水环境中 TTX 源远远少于野生环境,造成养殖河豚鱼体内毒素含量远远低于野生河豚鱼。海水品种与淡水品种的水环境也不相同,所以暗纹东方鲀与其他海水品种体内毒素分布不一样。而 3 种养殖的海水品种虽然体内 TTX 积累机制可能不同,但养殖环境中 TTX 源不论南北各省都无较大差别,故各组织含量差别不大。从含毒动物体内分离到产毒的细菌让人们认为细菌是 TTX 的终极来源<sup>[27-31]</sup>。但考虑细菌的产毒量都很小,无毒养殖的河豚鱼用有毒的饲料投喂或用毒液注射会带毒<sup>[32-34]</sup>, Noguchi 等<sup>[35]</sup>认为发端于细菌的生物富集作用是河豚鱼积累 TTX 的主要因素。杨桂梅等<sup>[36]</sup>推断河豚体内的 TTX 极有可能是河豚与其体内共生细菌共同的产物,体内共生细菌产生河豚毒素的衍生物,河豚把此衍生物转化为河豚自身的 TTX。总之,TTX 的外源性起源已普遍得到认可。

TTX 在河豚体内的积累,转化机制仍在研究中。河豚鱼对 TTX 具有较高的耐受性<sup>[37]</sup>,是基

于在动物中发现抗 TTX 的钠通道<sup>[38-41]</sup>,另一方面,河豚通过 TTX 结合蛋白(TTX binding protein, PSTBP)避免了 TTX 对自身的伤害<sup>[42]</sup>。作者猜测很可能不同种的河豚鱼各组织积累 TTX 存在不同的阈值,当积累量少时,如养殖河豚各组织器官均有分布,当达到一定阈值后,都向肝脏转移如野生河豚,造成肝脏中积累较高的量。而体内的这一系列过程又受到各种外界环境因子的调控从而有一定的季节分布差异。

### 3.4 小鼠生物法与 ELISA 法比较

本实验采用的试剂盒利用固相酶联免疫吸附原理,采用直接竞争 ELISA 法进行测定。用抗原包被微孔板,加入 TTX 标准品或样品、抗 TTX 酶标单克隆抗体进行免疫反应后,加入底物显色,终止液终止后,用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值。最低检出浓度为 0.1 ng/mL(每检测孔 0.01 ng),线性范围为 5 ~ 200 ng/mL,方法的加标回收率为 73.0% ~ 118.0%。灵敏、快速、简便、特异性好、取样量小、不破坏鱼体结构,并可同时检测大量样品等优点<sup>[43]</sup>。本次实验应用河豚毒素 ELISA 试剂盒对养殖河豚的毒性进行了较大规模的监测,结果显示与小鼠生物法的检测结果呈极显著相关。有较强的应用前景。ELISA 试剂盒检测结果大部分较小鼠生物法检测结果高,这与文献报道的结果一致<sup>[44-45]</sup>。其原因可从以下 4 个方面考虑:(1) 样品提取液中存在着某些使检测结果偏高的干扰物质;(2) 样液中可能存在一定量的 TTX 衍生物或类似物,这些物质可能与抗体发生反应,而其毒力却低于 TTX<sup>[46]</sup>;(3) 小鼠生物试验本身的误差;(4) 与 TTX 共存的无机盐和疏水氨基酸在进行小鼠检测时使得 TTX 的相对毒力有所降低<sup>[47]</sup>。

### 参考文献:

[1] Matsui T, Sato H, Hamada S, *et al.* Comparison of toxicity of the cultured and wild puffer fish *Fugu niphobles* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1982, 48: 253.

[2] Saito T, Maruyama J, Kanoh S, *et al.* Toxicity of the cultured pufferfish *Fugu rubripes rubripes* along with their resistibility against tetrodotoxin [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1984, 50: 1573 - 1575.

[3] Yasumoto T, Yasumura D, Yotsu M, *et al.* Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin

[J]. Agric Biol Chem, 1986, 50(3): 793 - 795.

[4] Noguchi T, Arakawa O, Takatani T. Toxicity of pufferfish *Takifugu rubripes* cultured in netcages at sea or aquaria on land [J]. Comp Biochem Physiol, Part D, 2006, 1: 153 - 157.

[5] Matsumura K. Tetrodotoxin concentrations in cultured puffer fish, *Fugu rubripes* [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(1): 1 - 2.

[6] Sasaki K, Takayama Y, Tahara T, *et al.* Quantitative analysis of toxin extracts from various tissues of wild and cultured puffer fish by an electrophysiological method [J]. Toxicon, 2008, 51: 606 - 614.

[7] 华元渝, 顾志峰, 周昕, 等. 暗纹东方鲀控毒养殖技术的研究 [J]. 淡水渔业, 2002, 32(5): 20 - 23.

[8] 李世平, 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]. 南京师大学报(自然科学版), 1998, 21(3): 91 - 94.

[9] 殷宁, 赵清良, 顾曙余. 养殖的 3 龄暗纹东方鲀毒性检测 [J]. 水利渔业, 2000, 20(2): 12 - 13.

[10] 赵清良, 赵强, 殷宁, 等. 养殖三龄暗纹东方鲀性腺发育及其毒性 [J]. 南京师大学报(自然科学版), 1999, 22(4): 89 - 91.

[11] 金传荫, 刘永定, 宋立荣, 等. 野生和人工养殖的暗纹东方鲀毒性的比较 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(2): 192 - 193.

[12] 张理, 谢克勤, 赵金山, 等. 用昆明小鼠定量测试河豚毒素的研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16: 497 - 500.

[13] Tani I. Studies on Japanese pufferfish in association with poisoning due to ingestion of them [M]. Tokyo: eikoku Tosho, 1945: 103.

[14] Kawabata T. Assay method for tetrodotoxin [M] // Food hygiene examination manual, vol. 2. Tokyo: Japan Food Hygienic Association, 1978: 232 - 244.

[15] Yang G, Bao B, Eric P, *et al.* Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish, *Takifugu obscurus* [J]. Aquaculture, 2007, 262: 183 - 191.

[16] Hwang D, Jeng S. Bioassay of tetrodotoxin using ICR mouse strain [J]. Journal of the Chinese Biochemical Society, 1997, 20: 80 - 88.

[17] Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare. Pufferfishes available in Japan - an illustrated guide to their identification [M]. Tokyo: Chuo-hokishuppan, 1984: 79.

- [18] Kanoh S. Distribution of tetrodotoxin in vertebrates [J]//Hshimoto K ed. Recent Advances in Tetrodotoxin Research. Tokyo: Koseisha-Koseikaku, 1988, 32 - 44.
- [19] Fuchi Y, Narimatsu H, Nakama S, *et al.* Tissue distribution of toxicity in a pufferfish, *Arothron firmamentum* ("hoshifugu") [J]. J Food Hyg Soc Jap, 1991, 32: 520 - 524.
- [20] Khora S S, Isa J, Yasumoto T. Toxicity of puffers from Okinawa, Japan [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1991, 57: 163 - 167.
- [21] Kungsuwan A, Arakawa O, Promdet M, *et al.* Occurrence of paralytic shellfish poisons in Thai freshwater puffers [J]. Toxicon, 1997, 35: 1341 - 1346.
- [22] Mahmud Y, Yamamori K, Noguchi T. Occurrence of TTX in a brackish water puffer "midorifugu" *Tetraodon nigroviridis*, collected from Thailand [J]. J Food Hyg Soc Jap, 1999, 40: 363 - 367.
- [23] Mahmud Y, Yamamori K, Noguchi T. Toxicity and tetrodotoxin as the toxic principle of a brackish water puffer *Tetraodon steindachneri*, collected from Thailand [J]. J Food Hyg Soc Jap, 1999, 40: 391 - 395.
- [24] Zaman L, Arakawa O, Shimosu A, *et al.* Occurrence of paralytic shellfish poison in Bangladeshi freshwater puffers [J]. Toxicon, 1997, 35: 423 - 431.
- [25] Mosher H S, Fuhrman F A, Buchwald H D, *et al.* Tarichatoxin-Tetrodotoxin; a potent neurotoxin [J]. J Science, 1964, 4: 1100 - 1110.
- [26] Narita H, Noguchi T, Maruyama J, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin on a trumpet shellfish "boshubora" *Charonia sauliae* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1981, 47: 934 - 941.
- [27] Noguchi T, Arakawa O, Daigo K, *et al.* Local differences in toxin composition of a xanthid crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa [J]. Toxicon, 1986, 24: 705 - 711.
- [28] Noguchi T, Jeon J K, Arakawa O, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio sp.* isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus* [J]. J Biochem, 1986, 99: 311 - 314.
- [29] Simidu U, Noguchi T, Hwang D F, *et al.* Marine bacteria which produce tetrodotoxin [J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 53: 1714 - 1715.
- [30] Yu C F, Yu P H, Chan P L, *et al.* Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes [J]. Toxicon, 2004, 44: 641 - 647.
- [31] Wu Z L, Yang Y, Xie L P, *et al.* Toxicity and distribution of tetrodotoxin-producing bacteria in puffer fish *Fugu rubripes* collected from the Bohai Sea of China [J]. Toxicon, 2005, 46(4): 471 - 476.
- [32] Matsui T, Hamada S, Konosu S. Difference in accumulation of puffer fish toxin and crystalline tetrodotoxin in the puffer fish, *Fugu rubripes* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1981, 47: 535 - 537.
- [33] Yamamori K, Kono M, Furukawa K, *et al.* The toxification of juvenile cultured kusahugu *Takifugu niphobles* by oral administration of crystalline tetrodotoxin [J]. J Food Hyg Soc Jap, 2004, 45: 73 - 75.
- [34] Honda S, Arakawa O, Takatani T, *et al.* Toxification of cultured puffer fish *Takifugu rubripes* by feeding on tetrodotoxin-containing diet [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 2005, 71: 815 - 820.
- [35] Noguchi T, Arakawa O. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication [J]. Marine Drugs, 2008, 6: 220 - 242.
- [36] 杨桂梅, 鲍宝龙. 河鲀和河鲀毒素之间关系的研究进展 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(6): 734 - 739.
- [37] Saito T, Noguchi T, Harada T, *et al.* Resistibility of toxic and nontoxic pufferfish against tetrodotoxin [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1985, 51: 1371.
- [38] Yotsu-Yamashita M, Nishimori K, Nitanai Y, *et al.* Binding properties of 3H-PbTx-3 and 3H-saxitoxin to brain membranes and to skeletal muscle membranes of puffer fish *Fugu pardalis* and the primary structure of a voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit (fMNa1) from skeletal muscle of *F. pardalis* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267: 403 - 412.
- [39] Venkatesh B, Lu S Q, Dandona N, *et al.* Genetic basis of tetrodotoxin resistance in pufferfishes [J]. Current Biol, 2005, 15: 2069 - 2072.
- [40] Soong T W, Venkatesh B. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animals [J]. Trends in Genetics, 2006, 22(11): 621 - 626.
- [41] Maruta S, Yamaoka K, Yotsu-Yamashita M. Two critical residues in p-loop regions of puffer fish Na<sup>+</sup> channels on TTX-sensitivity [J]. Toxicon, 2008, 51: 381 - 387.



- [42] Matsumura K. Production of tetrodotoxin in puffer fish embryos [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 1998, 6: 217 - 219.
- [43] 宫慧芝,计融,江涛,等.河豚毒素单抗 ELISA 检测试剂盒的研制[J].中国公共卫生,2005,21(15): 1423 - 1424.
- [44] 计融,王健伟,罗雪云,等.鲉毒鱼类中河豚毒素直接竞争抑制性酶联免疫吸附试验测定方法的研究[J].中国食品卫生杂志,2002,14(5):7 - 10.
- [45] 李世平,焦新安,黄金林,等.河豚毒素两种定量检测方法比较研究[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2004,25(2):58 - 60.
- [46] Kao C Y. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitat in phenomena[J]. Pharmacol Rev, 1966, 18: 997.
- [47] Shimada K, Ohtsuru M, Nigota K. Effects of coexisting materials on the mouse bioassay method for determination of tetrodotoxin[J]. J Food Hyg Soc Jap, 1985, 26: 507 - 510.

## Tetrodotoxin quantitative monitoring of cultured pufferfish collected from five coastal provinces in China by mouse method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ji Yuan, LIU Yan, GONG Qing-li\*

(Aquaculture Department, Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** In order to provide first-hand scientific data and to utilize domestic cultured puffer fish safely, four tissues (skin, muscle, liver and gonad) of four cultured pufferfish species (*Takifugu rubripes*, *Takifugu fasciatus*, *Takifugu flavidus*, *Takifugu bimaculatus*) collected from five coastal provinces (Liaoning, Hebei, Shandong, Jiangsu and Fujian) in China were monitored quantitatively by mouse method after grouping and concentration. The skin, muscle and liver groups of *T. rubripes* from Shandong Province and several ovaries were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at same time. The results indicated that the average TTX content in each group of skin, muscle and liver of the four species specimens were 'non-toxic' in both of the mouse assay (less than 0.5  $\mu\text{g/g}$ ) and ELISA (less than 0.8  $\mu\text{g/g}$ ), and all the testes have no detectable TTX. However, a moderately toxic ovary sample was still detected. The annual variation of the average TTX content in groups of the muscle, liver and skin of cultured pufferfish can be observed. The results of the mouse method and ELISA method have no significant difference. It is confirmed that the skin, muscle and testis of the collected cultured pufferfish can be used with safety. The livers of the four species of puffer fish could be safely consumed as a delicious and nutritive food. The market size of cultured pufferfish was small, but still toxic. It is necessary to prevent the edible parts contamination.

**Key words:** cultured puffer fish; tetrodotoxin; mouse assay; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

**Corresponding author:** GONG Qing-li. E-mail: qingli@vip.sina.com