

产河豚毒素(TTX)菌株 ZY-23 的分离与鉴定

池珍 郑莺 毛宁*

(福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350108)

摘要: 从河豚卵巢中分离得到 35 株细菌, 利用小鼠生物法检测获 11 株产河豚毒素(TTX)菌株, 其中有 6 株菌产 TTX 含量达 400 ng/mL 以上, 对其中 ZY-23 菌株进行传统分类学方法鉴定, 初步鉴定为液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)。16S rRNA 基因序列分析, ZY-23 菌株与 *Serratia* sp. Tp5 的亲缘关系最近, 相似度达 99%。用荧光检测分析其发酵液, 发现在 423 nm 处与标准品具有相同的发射峰, 初步证实发酵液含有 TTX。

关键词: 河豚毒素, 小鼠生物检测法, 生理生化试验, 16S rRNA, 液化沙雷氏菌, 荧光检测法

Isolation and Identification of Strain ZY-23 Producing Tetrodotoxin

CHI Zhen ZHENG Ying MAO Ning*

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: A total of 35 bacterial strains were isolated from the ovarian of Globefish. It was confirmed that 11 bacterial strains among them were capable of producing tetrodotoxin using mouse bioassay method and the toxin concentrations in the cultures of 6 bacterial strains were above 400 ng/mL. Based on the morphology, physiological and biochemical characteristics, the strain ZY-23, one of the bacterial strains, was identified preliminarily as *Serratia liquefaciens*. The phylogenetic analysis showed that 16S rRNA sequence of the bacterial strain ZY-23 had 99% homology to that of *Serratia* sp. Tp5. The result of fluorimetric spectrophotometry indicated that there was the same fluorescence peak of the fermentation broth as that of the standard substance, suggesting that the strain ZY-23 indeed produced tetrodotoxin.

Keywords: Tetrodotoxin, Mouse bioassay method, Physiological and biochemical research, 16S rRNA, *Serratia liquefaciens*, Fluorescent spectrometry

河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)是小分子生物碱, 它是一种毒性极强的非蛋白类神经毒素^[1]。现代研究表明 TTX 作为镇痛剂和戒毒剂, 具有独特疗效。其镇痛效果是吗啡的 3000 倍, 比普鲁卡因和可卡因强 10 万倍; 作为戒毒剂, 其戒毒有效率达 98%,

且不具毒副作用和成瘾性^[2-3]。传统 TTX 来源于河豚鱼组织, 长期从河豚鱼提取 TTX, 严重破坏了河豚鱼的野生资源数量。目前, 国内已见胡江春^[1,4]等人采用生物检测法与 HPLC 法结合从红鳍东方豚卵巢中分离得到产 TTX 微生物。虽然微生物源

基金项目: 福建省大学生创新性实验项目(No. Fjnu 2008-003)

*通讯作者: Tel: 86-591-22867293; 信箱: mao_n@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2009-08-25; 接受日期: 2009-11-26

TTX 量极低,但后续可用诱变育种方法来提高 TTX 产量。

TTX 的检测方法有生物检测法:小鼠生物检测法,小鼠神经细胞培养法。化学与仪器检测法:薄层层析法(TLC)、荧光分光光度计法、紫外分光光度计法、HPLC 法、气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)以及免疫学检测等多种方法,每种方法都有其优点和局限性。生物检测法的实验条件较难控制,缺乏特异性,精确度较差。仪器检测法除需要相应仪器设备外,尤其对检测样品要求高度纯化。由于 TTX 独特结构,对它的检测通常都要采取两种以上的方法即生物检测法与仪器检测法相结合,取长补短,相互验证。本研究采用生物检测法与荧光分光光度计检测相结合,从野生河豚体内分离筛选产 TTX 的海洋细菌,欲通过诱变育种提高产 TTX 量,通过微生物发酵获取微生物源 TTX,满足日益增长的市场需求。

1 材料与方 法

1.1 野生河豚鱼与实验动物

河豚鱼捕自福州长乐附近海域。昆明种小鼠,雄性,体重 20 ± 1 g,购自福建医科大学动物实验中心。

1.2 产河豚毒素海洋细菌的分离方法

1.2.1 分离培养基:酵母膏 0.3 g,蛋白胨 0.3 g,牛肉膏 0.3 g,葡萄糖 1.0 g,蔗糖 1.0 g,河豚卵巢提取液 0.01 mL,海水 99 mL,琼脂 2.0 g, pH 7.0-7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2.2 液体发酵培养基:酵母膏 0.3 g,蛋白胨 0.3 g,蔗糖 2.0 g, NaCl 2.0 g,自来水 99 mL, pH 7.0-7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.2.3 分离方法:用无菌水清洗河豚鱼,无菌条件下取出河豚鱼卵巢,加无菌水研磨,取匀浆后的组织进行 10 倍系列稀释涂板法分离,置 26°C 恒温培养,待长出菌落后,挑取大小、颜色及形态不同的菌落,纯化后再传代 3 次,生长稳定后将其接种于斜面培养基备用。

1.2.4 产 TTX 菌株的筛选:挑取不同的菌株接种于液体发酵培养基中,180 r/min、 26°C 培养 18 h,作为种子液。吸取 2 mL 种子液接种到发酵培养基,在 180 r/min、 26°C 培养 48 h。发酵液经 8000 r/min、30 min 离心后得到发酵上清液。上清液在沸水浴加热 10 min,8000 r/min 离心 30 min,取上清液用孔径

0.22 μm 滤膜抽滤后得到滤液。滤液用旋转蒸发仪(200 r/min, 60°C)浓缩 10 倍,吸取浓缩液 1 mL 对小鼠进行腹腔注射(初筛时对小鼠腹腔注射每组 1 只,复筛时每组 5 只),记录小鼠致死时间和致死现象^[5](河豚毒素中毒的典型症状为腹腔注射后安静、急动、转圈、动作生硬、抽搐,直至停止呼吸死亡),根据小鼠生物检测法筛选产 TTX 菌株。

1.2.5 菌株 ZY-23 生理生化试验:根据《微生物学实验》^[6]中的方法进行。

1.2.6 16S rRNA 的 PCR 扩增及序列测定:CTAB 提取菌株 ZY-23 中的总 DNA,采用通用引物 DF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), DR (5'-AGAAA GGAGGTGATCCAGCC-3'),对其 16S rRNA 片段进行 PCR 扩增,DNA 序列由上海生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.7 系统发育树的构建:将获得的 16S rRNA 序列与 GenBank 中核酸数据进行 BLAST 分析,利用 ClustalX 1.83 软件进行序列比对。通过 Phylip 软件,以邻接法(Neighbour-joining)建立系统进化树 Bootstrap 置信值^[7]估算重复次数 1000 次。

1.3 小鼠生物检测法标准曲线制作

TTX 标准品(98%)购于河北水产开发有限公司。准确称取 TTX 标准品 1.00 mg 溶于 10 mL 容量瓶中,得到浓度为 0.1 mg/mL 的标准品母液。用超纯水将标准品母液稀释为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度梯度溶液。每一浓度梯度稀释液取 3 个平行分别对雄性小鼠(20 ± 1 g)进行腹腔注射 0.5 mL,记录死亡情况及时间,绘制标准曲线。

1.4 荧光分光光度计检测

发酵离心液经 D101 大孔吸附树脂处理后收集滤出液,将滤出液流经 D152 离子交换树脂,用醋酸水溶液洗脱,取收集到的洗脱液 0.5 mL,加入等体积的 4 mol/L NaOH 沸水浴 45 min,迅速冷却到室温,用荧光分光光度计检测(Hitachi 850,激发波长 370 nm,发射波长 495 nm,扫描范围为 400 nm-600 nm)。

2 结果

2.1 小鼠生物检测法标准曲线的绘制

以不同浓度的标准品溶液注射小鼠,以小鼠死

亡时间倒数为横坐标, 单位体重毒素剂量为纵坐标绘制标准曲线, 见图 1。根据标准曲线求得单位体重毒素剂量(以 20 g 小鼠重量为 1 个单位)。再根据单位体重毒素剂量与小鼠实际重量算出实际注射的毒素剂量。

2.2 产河豚毒素细菌的初筛与复筛

从河豚卵巢分离纯化获 35 株细菌, 经连续传代 3 代后, 有 15 株性状稳定。采用小鼠生物法对这 15 株细菌发酵产物进行检测筛选。初筛发现 15 株细菌中, 有 11 株细菌发酵产物会导致小鼠出现典型中毒症状, 初期兴奋, 随后后肢麻痹、抽搐、呕吐、继而呼吸衰竭而死, 与标准品注射出现的症状相似, 故将这 11 株菌株作进一步复筛。复筛结果有 6 株细菌的发酵产物 6–7 min 就能致小鼠出现典型症状后死亡

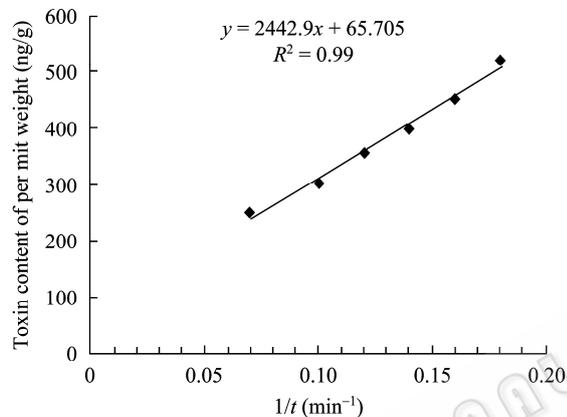


图1 小鼠死亡时间倒数-单位体重毒素剂量关系
Fig. 1 Relation between the reciprocal of the mouse's death time and toxic dose per unit weight

表 1 小鼠生物检测法复筛结果

Table 1 Results of production by mouse bioassay

菌株编号 No. strains	小鼠平均重量 (g) Mouse average weight (g)	平均死亡时间 (min) Average time of death (min)	平均毒素含量 (ng/mL) Average toxin content (ng/mL)
B-301	20.05	6	474.04
B-304	20.30	7	420.91
B-307	20.50	7	425.06
B-320	20.40	6	482.31
B-333	20.70	6	489.40
B-335	20.50	7	425.06
阳性对照	19.90	6	940.98
阴性对照	20.05	存活	0

注: 阳性对照: 标准品(1 μg/mL); 阴性对照: 未接菌的培养基。
Note: Positive control: Authentic TTX (1 μg/mL); Negative control: The culture medium without strains.

(表 1), 其余 5 株细菌致小鼠死亡时间均在 25 min 以上。根据小鼠死亡时间倒数-单位体重毒素剂量关系, 计算出菌株这 6 株细菌的发酵产物中的 TTX 含量均在 400 ng/mL 以上。其中, B-333 菌株的 TTX 含量最高为 489.40 ng/mL, 故选择菌株 B-333 进行进一步理化试验与鉴定, 并将该菌株命名为 ZY-23。

2.3 荧光分光光度计检测

利用荧光分光光度计检测, 得到荧光光谱图见图 2。从图中看到, 在荧光检测中, TTX 标准品与菌株 ZY-23 提取物在 423 nm 都出现一明显的发射峰, 初步证实发酵产物中含有河豚毒素。

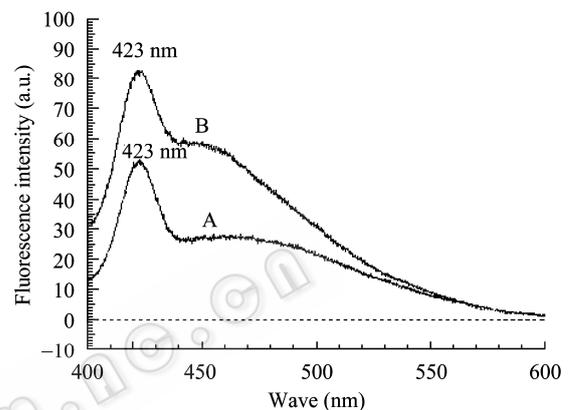


图2 TTX 标准品(A)及 ZY-23 发酵产物(B)的荧光分光光度计检测
Fig. 2 Fluorescence emission spectra of authentic TTX (A) and production (B)

2.4 菌株 ZY-23 形态特征与生理生化鉴定

菌株 ZY-23, 短杆状, (1.5–2.0) μm × (0.5–0.8) μm, 革兰氏阴性, 无芽孢, 无荚膜, 极生鞭毛。在分离培养基上菌落直径 0.5 mm–1 mm; 灰白色, 表面湿润光滑; 突起不明显, 边缘光滑。菌株 ZY-23 生理生化试验结果见表 2。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[8]第 8 版, 初步鉴定为液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)。

2.5 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建

将菌株 ZY-23 获得的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 进行 BLAST 同源性检索, 对序列进行排序剪裁比对, 然后将完整序列提交 GenBank 注册, 获得登录号为 EU880537.1。结果表明: 菌株 ZY-23 与 *Serratia* sp. Tp5 的 16S rRNA 序列相似性达到 99%。利用相关软件构建进化树, 结果见图 3。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表 2 菌株 ZY-23 的生理生化试验结果
Table 2 The result of physio-biochemical tests of strain ZY-23

处理 Treatment	结果 Results	处理 Treatment	结果 Results
Utilization of glucose	+	H ₂ O ₂ produce	+
Utilization of saccharose	+	Oxidizing enzyme	-
Utilization of lactose	-	Utilization of citrate	+
Utilization of xylose	+	Urea hydrolysis	+
Utilization of arabinose	+	Gelatin liquefaction	+
Utilization of mannitol	+	Starch hydrolysis	-
Utilization of inositol	+	Deoxidize nitrate	+
Utilization of D-Sorbitol	+	Produce indol	-
Voges-Proskauer test	+	Milk peptonization	+
Methyl red test	-	Producesulfureted hydrogen	-
Movement	+	Utilization of nitrate	+

3 讨论

在多种TTX的检测方法中,日本官方采用的小鼠生物检测法^[9-11]是最常用,它建立在小鼠致死剂量与样品中TTX的含量之间良好相关性的基础之上。此法直观、快速、症状典型易于判断,而且价格低廉,被广泛采用。本试验从野生河豚卵巢筛选得到ZY-23菌株,用小鼠检测其TTX的相对量为489.40 ng/mL。由于小鼠生物法的重复性和精确度低,必须结合化学仪器分析法进一步证实。

化学与仪器检测的基本原理是根据 TTX 在碱性条件下加热时降解为可激发出荧光 C₉ 碱来进行。由 Nunez^[12]提出的荧光分光光度计检测 TTX,具有需样量少、许多试剂对反应均无影响。经小鼠检测后菌株 ZY-23 发酵液采用荧光分光光度计进一步检

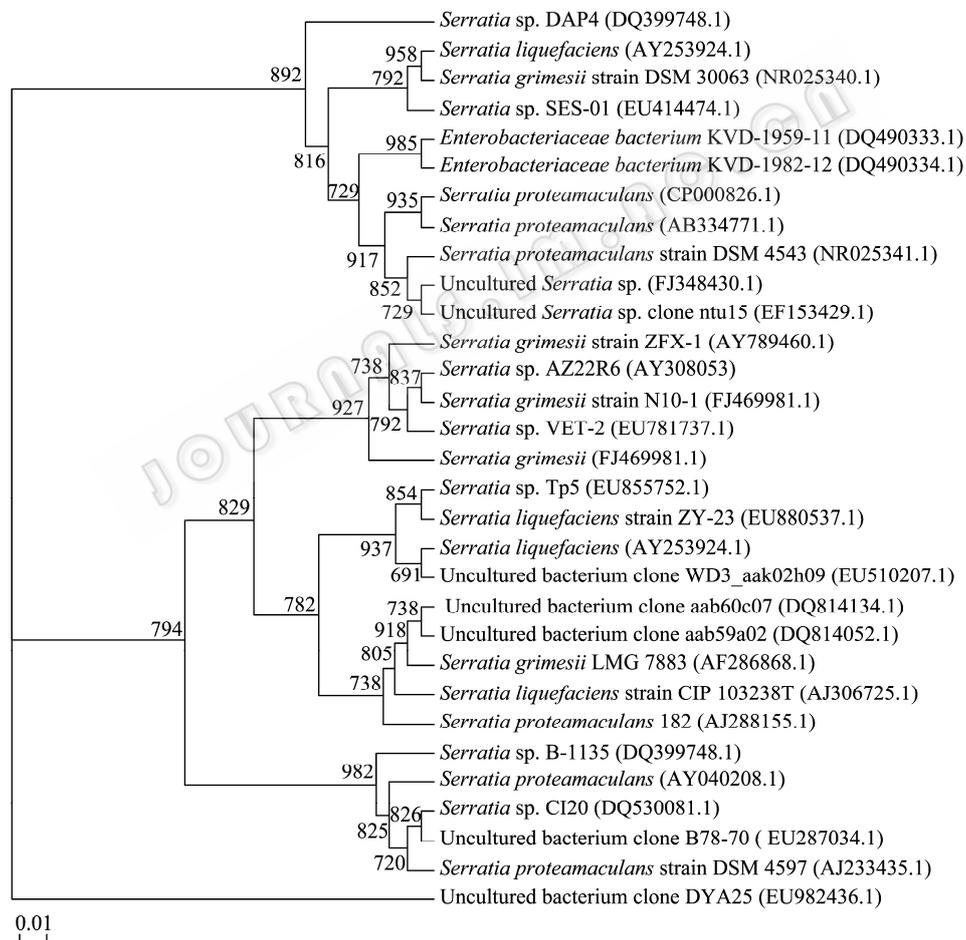


图 3 菌株 ZY-23 亲缘关系相近菌株 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain ZY-23 based on 16S rRNA genes

Note: Numbers at the nodes indicate the confidence level from 1000 replicate bootstrap sampling. The scale bar indicates the 0.01 evolutionary distance unit numbers in bracket refer to GenBank accession number.

测确认,结果显示在 423 nm 出现与标准品相一致明显的发射波峰,初步证实发酵液中含有河豚毒素类似物,小鼠中毒的典型症状与发酵液中的 TTX 类似物有密切关系。

分析型 HPLC 检测 TTX 精确度高于荧光分光光度计,但要求样品纯度更高。我们采用离子交换层析等方法对发酵液进行分离纯化,纯化后样品用 HPLC 检测,图谱显示样品的杂峰较多,与标准品对照,毒素峰面积较小,说明样品中 TTX 的含量较低,纯化过程 TTX 又有较大损失。今后可考虑进一步探讨纯化的方法,如亲和层析等,既提高样品纯度,又减少 TTX 的损失,进而再采用 GC-MS 或 LC-GC 等仪器进行检测。

本次筛选得到 ZY-23 野生菌株,产毒素量不高,还有待进一步通过诱变育种方法来提高,再通过发酵工艺优化达到生产目的。微生物发酵液中 TTX 含量低,且发酵液中成分复杂,既有蛋白、核酸等大分子,又有多种培养基成分和多种次生代谢产物,因此,寻找相对快速简便检测 TTX 的方法,是进一步诱变育种和工艺优化的前提与关键。

参 考 文 献

[1] 胡江春, 邓杰, 范延辉, 等. 梭形芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*)N141 发酵产河豚毒素的研究. 天然产物研究与

开发, 2008, 20(1): 74-75.

- [2] 陈素青, 任雷鸣. 河豚毒素的药理作用及临床应用. 中国海洋药物, 2001, 84(6): 50-55.
- [3] 于丽华, 周和. 河豚毒素对小鼠镇痛作用的实验研究. 山东医科大学学报, 1999, 37(2): 120-121.
- [4] 胡江春, 范延辉, 王书锦. 海洋细菌 B3B 产河豚毒素特性的鉴定及其发酵培养基优化. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 361-364.
- [5] 吴韶菊, 梁红星, 宫庆礼, 等. 小鼠生物量定性检测细菌发酵产生的河豚毒素. 安徽农业科学, 2007, 35(2): 315-316.
- [6] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1996: 26-35.
- [7] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985(39): 783-791.
- [8] RE. 布坎南, NE 吉布斯. 伯杰细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1989: 388.
- [9] Huang DF, Jeng SS. The detection of tetrodotoxin by HPLC. *China Biochemi Soc*, 1991(20): 80-86.
- [10] DengFuluHwang. YungHSiangTsai. Toxins in toxic Taiwanese crabs. *Food Reviews International*, 1999, 15(2): 145-162.
- [11] 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. 中国食品卫生杂志, 2004, 6(16): 497-500.
- [12] Nunez MT, Fischer S, Jaimovich E. A fluorimetric method to determine tetrodotoxin. *Anal Biochem*, 1976(72): 320-325.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在实践中具有重要意义学科专题进行论述。围绕专题所涉及各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>