

产河豚毒素菌株的筛选、鉴定及透析培养

张宏宇¹, 林 涛², 武 斌², 李增鹏¹, 郭文斌¹, 陈明谅^{1*}

(1. 自然资源部第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;
2. 河北施坦纳生物科技有限公司, 河北 石家庄 050011)

摘要:河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)在镇静、镇痛、麻醉、戒毒等神经性疾病治疗方面效果显著且无致瘾性,因此具有极好的应用前景,但由于其从河豚体内提取的成本过高,所以难以大量推广应用。越来越多的证据表明 TTX 来源于河豚体内共生的微生物。我们从野生横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*)肝脏中分离得到了一株产 TTX 较高的芽孢杆菌 3G2(*Bacillus* sp. 3G2),通过 ELISA 和胶体金的方法检测到其发酵液 TTX 含量为 35 ng/mL。将该菌株接种于专用透析培养器中,不断流加新鲜培养基实现连续培养,同时实现简化分离工艺,对发酵液进行小鼠生物活性检测、TTX 试纸条检测,并通过河豚毒素抗体免疫共沉淀纯化得到 TTX 粗品后进行高效液相色谱鉴定均表明发酵液中含有 TTX 且含量较高。本研究通过筛选产 TTX 的优质菌株进一步证实了河豚毒素外源性假说,并初步验证了透析法生产河豚毒素的优越性,为后续商业应用提供实践性基础。

关键词:海洋生物学;河豚毒素;芽孢杆菌;ELISA 检测;透析培养;HPLC

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.2023.02.004

中图分类号:P735 文献标识码:A 文章编号:2095-4972(2023)02-0210-08

河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)是一种海洋天然神经毒素,毒性是氰化钠(NaCN)的 1 250 多倍,1 mg 的微量摄入就能够毒死一个体重 50 kg 的成年人^[1]。不同于芋螺毒素、海葵毒素等多肽类毒素,TTX 是一种耐热,毒力很强的生物碱,相对分子质量为 319.27,通过特异性抑制神经纤维的电压门控钠离子通道(VGSGs)亚型发挥作用。VGSGs 介导人体的疼痛感觉,因此河豚毒素在止痛方面有很大的潜力^[2]。由于 TTX 具有抑制神经兴奋的功能,且无副作用无成瘾性,因而具有极高的生理药理研究价值,目前已经在镇静、镇痛、麻醉、戒毒等神经性疾病治疗方面具有良好的应用前景。早在 1986 年,加拿大国际公司已经利用 TTX 成功研制出名为 Terodin 的戒毒药物^[3]。

TTX 像其他海洋药物一样存在着含量极少的问题,导致分离纯化困难,造价过高等行业壁垒,因此目前获得 TTX 的方法主要有三种:从河豚体内分离纯化、海洋细菌发酵以及人工化学合成法。目前市场上 TTX 的主要生产来源还是通过捕捞野生河豚,

从中提取纯化,而从河豚体内直接提取、纯化、制备 TTX 的工艺复杂,产量极低,所以价格昂贵,限制了目前在临床药物的大规模应用。同时,经过人工养殖以后,河豚毒力减弱,因此从一定程度上证实了 TTX 的微生物起源假说。1988 年 Thuesen 等就从携带 TTX 的生物体中分离到产毒菌株^[4]。岳田芳等(2007)采用海藻希瓦氏菌(*Shewanella alga*)作为出发菌株,发酵生产得到了 TTX 粗品^[5]。但是一些研究表明,细菌在培养过程中 TTX 的产生在几次传代后丢失^[6]。而芽孢杆菌属的 *Bacillus* sp. 1839 经过长期持续培养后仍能分离到 TTX。目前也仅在芽孢杆菌属中发现产生的 TTX 是通过细胞死亡、毒素排出、芽孢形成、细菌孢子萌发等方式释放到环境中的^[7]。

TTX 的检测方法主要基于其理化性质、抗原特异性、神经毒性三方面展开。由于实验方法简单方便、实验结果清晰明确,小鼠的生物检测法仍然是现在国内外最常用的毒素检测方法,但其缺点是检出限高,不可区分 TTX 类似物,检测结果只能作为参

考,仍然需要后续定性定量实验。纪元等(2010)应用 ELISA 试剂盒对不同海域的河豚进行检测,结果发现该方法与小鼠生物检测法一致性较高^[8]。ELISA 检测法方法使用简单方便,可以实现 TTX 的快速检测。董雪等(2009)建立的单克隆抗体的直接竞争 ELISA,预先包被酶联抗原,与待测的 TTX 竞争抗 TTX 抗体,标记检出限为 1.1 ng/mL^[9]。但该方法仅能作为定性和定量的辅助手段,仍然无法避免 TTX 类似物的干扰。苏捷等(2013)研发了河豚毒素免疫层析快速检测试纸条用于检测 TTX 样品,使用方便快捷,肉眼可直接判读结果,但检出限较高,为 100 ng/mL^[10]。高效液相色谱法(HPLC)是目前分析领域最常用的方法之一,具有准确度高,精密度好的优点,在纯度鉴定方面无法被其他方法取代^[11]。王少蓉等(2010)利用 HPLC 分析菌株发酵液,发酵样品与 TTX 标准品出现一致波峰,初步证实菌株提取物得到的有毒成分为 TTX^[12]。

通过传统摇床发酵获得的发酵液,下游分离工艺复杂、回收成本高、回收率低,而透析培养可以通过连续培养的方式不断添加新鲜培养基,并且在下游分离纯化过程中,也减少了培养基中大分子杂质的干扰。透析培养的原理是利用半透膜调节两侧物质交换,把大分子蛋白质与菌体分隔开。传统的透析器分两个部分,即装着营养物质的培养基室和装着海水的细菌培养室,两室之间由半透膜进行营养物质与代谢产物的渗透交换^[13]。另外细菌在海水里生长繁殖更符合其原始的海洋自然环境,对菌株产 TTX 的稳定性也有一定的提升。本研究旨在筛选优质产 TTX 的菌株以进一步证实河豚毒素外源性假说,并初步验证透析法生产河豚毒素的优越性,为后续商业开发提供实践性基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 本研究野生河豚采集自福建省漳州市东山岛海域。在河豚体内,因为受卵巢发育情况影响,河豚体内的毒素受季节、年龄的影响较大。两次采样时间分别为 2020 年 9 月(10 只,均为雄性)和 2021 年 4 月(14 只,8 只雌性,6 只雄性)。

1.1.2 培养基 2216E 液体培养基及含 1.5%琼脂粉的 2216E 固体培养基,透析培养液为盐度 27 的灭菌海水。

1.1.3 透析培养器 由河北施坦纳生物科技有限公司提供透析器(专利号 CN201459137U),日本进口 10 kD 透析膜、充气泵、空气过滤器、细化器等共

同组成透析培养装置。

1.1.4 试剂盒及其他主要试剂 天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒、河豚毒素快速检测试剂盒、TTX 标准品、河豚毒素抗体均购自武汉优博生物科技有限公司,TTX 检测胶体金试纸条由福建省水产研究所苏捷博士馈赠,Protein A Resin 购自南京金斯瑞生物科技有限公司,GEN III 微孔板购自美国 Biolog 公司。

1.2 方法

1.2.1 河豚物种鉴定及产 TTX 菌株的分离 河豚鱼采集后用无菌水洗涤除去体表脏物,解剖取出卵巢、肝脏、脾脏、表皮组织称重。取 20 mg 肝脏组织使用天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,采用 16S rRNA 引物与 *Cytb* 引物分别扩增其基因序列。16S rRNA 正向引物序列为:5'-CGC-CTGTTTATCAAAAACAT-3';反向引物序列为:5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'。*Cytb* 正向引物为:5'-TACCATGAGGACAAATATCATTCTG-3';反向引物为:5'-CCTCCTAGTTTGTAGGGATTGATCG-3',反应条件:94 ℃ 3 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,循环数 30 个,最后进行 72 ℃ 延伸 10 min。称取每只河豚各组织样品剪碎,利用匀浆器匀浆,加入 5 mL 0.1%的乙酸,再煮沸搅拌 10 min。待样品冷却后,全部样品转入 15 mL 离心管,4 000 r/min 离心(肝脏吸去脂肪层)10 min,加入去离子水至 10 mL,取 1 mL 提取液用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至中性,立即用于河豚毒素 ELISA 快速检测试剂盒检测。选取试剂盒检测结果中毒素含量最高的两只河豚,在离心管中分别对其卵巢、肝脏、脾脏、表皮组织进行剪碎匀浆研磨,然后用灭菌海水稀释,采用系列稀释平板涂布法进行系列稀释,各取 100 μL 稀释后的样品,用涂布棒均匀涂在 2216E 海洋微生物固体培养基上,每个稀释度设置两个重复,置于 28~30 ℃ 培养箱,培养 24~48 h。分别挑取颜色不同形状大小各不相同的菌落用末端稀释划线法进行纯化,直至长出单菌落。

1.2.2 产 TTX 菌株基因组 DNA 的提取 采用煮沸法简易提取 DNA,首先挑取上述平板上的单菌落接种到已经加有 1 mL 2216E 液体培养基的灭菌 96 深孔板中,28 ℃ 摇床培养 12 h。离心收集菌体沉淀,再加入 100 μL 灭菌水重悬,12 000 r/min 继续离心 1 min,去上清,菌体沉淀加 100 μL 灭菌水重悬煮沸 10 min,冰上冷却 1 min,简短离心去除壁上水珠,获得的 DNA 在 4 ℃ 或 -20 ℃ 保存。

1.2.3 产 TTX 菌株的分子鉴定 采用细菌通用引

物扩增菌株 16S rRNA 序列。正向引物序列为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物序列为 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'。反应条件: 94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 循环数 30 个, 最后进行 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物序列由厦门铂瑞生物科技公司测序确定, 将 16S rRNA 序列提交到 GenBank 的数据库进行序列对比, 选取一致性较高的序列进行分析。

1.2.4 发酵液的 ELISA 检测 根据 16S rRNA 测序结果以及产河豚毒素菌株类别的研究初步确定可能的生产菌种, 由河豚毒素快速检测试剂盒检验。取每个待检测菌株发酵液样品 900 μL, 加入 100 μL 1% 乙酸水溶液使其终浓度为 0.1%, 加热煮沸 10 min, 离心取上清, 用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 为中性用于检测。每个样品和标准品做 3 孔平行, 记录所在位置, 每孔加入标准品或发酵样品 50 μL, 加入酶标抗体工作液 50 μL 混匀, 用封板膜封板, 25 ℃ 反应 30 min。将孔内液体甩干, 用洗液 250 μL 每孔洗板 4~5 次, 每次间隔 15~30 s, 用吸水纸拍干, 每孔加入显色液 TMB 100 μL, 轻轻振荡混匀, 25 ℃ 避光显色 10 min。每孔加入终止液 50 μL, 轻轻振荡混匀, 利用酶标仪在 OD_{450} 进行检测, 5 min 内读完数据, 测定每孔 OD 值。

1.2.5 真空冷冻干燥机进行冻干处理 选取 ELISA 初筛得到的产量较高的菌株, 在 30 mL 2216E 培养基中 22 ℃ 180 r/min 摇床培养 12 h, 得到的发酵液提前放入 -80 ℃ 冰箱冷冻 2 h 以上, 然后放入真空冷冻干燥机进行冻干处理, 得到淡黄色冻干粉, 使用时用 5 mL 0.1% 乙酸加热溶解取上清, 调 pH 中性后继续用于 ELISA 复筛检测。

1.2.6 产 TTX 菌株的透析培养 本研究进行了透析法生产 TTX 的实验, 使用的透析培养器由河北施坦纳生物科技有限公司设计制造, 将上述 ELISA 复筛显示高产 TTX 的菌株进行透析培养, 将配置好的 8 L 2216E 培养基和 8 L 海水分装到透析器培养基室和培养液室中, 121 ℃ 高压灭菌 20 min, 将高压后的透析器冷却到室温后进行接种。出发菌株接种于 100 mL 培养基中 28 ℃, 180 r/min 摇瓶培养至 OD_{600} 值为 0.6, 接种量为 3%~5%。25 ℃ 充气静置培养 48 h 后, 收取培养液室的菌液, 冻干后加入 0.1% 乙酸溶解煮沸 10 min 离心取上清调 pH 中性用于后续验证。

1.2.7 小鼠毒性验证 选取体重 20 g 的 ICR 小白鼠 8 只, 雌雄不限, 每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 透析培养上清液, 观察记录染毒症状和时间。

1.2.8 试纸条验证 从包装袋中取出试纸条, 置于水平清洁桌面上。在检测卡上标记待检样本编号, 滴加 50 μL pH 已调中性的样品于加样孔中, 加样后开始计时, 10 min 后读取结果。两条红色条带带即质控区(C)和检测区(T)均出现红带为阴性, 只有质控区(C)出现一条红色条带为阳性。

1.2.9 高效液相色谱法检测 首先利用免疫沉淀初步纯化获取 TTX 粗品, 具体操作如下: 取 200 μL Protein A Resin 用 1 mL PBS 清洗 3 次后加入 100 μL 河豚毒素抗体, 4 ℃ 旋转混合 2 h, 加入上述冻干溶解煮沸后的上清液继续旋转混合 4 h, 6 000 r/min 离心 5 min, PBS 冲洗 beads 3~5 遍后, 沸水浴加热 10 min, 12 000 r/min 离心取上清得到 TTX 粗品。然后采用高效液相色谱仪分析上述 TTX 粗品与 TTX 标准品。HPLC 分析条件: 流动相: 0.05 mol/L Na_2HPO_4 , 0.05 mol/L NaH_2PO_4 , 2.5 mmol/L 庚烷磺酸钠, pH 6.8; TTX 标准品: 0.34 μg/mL; 检测波长: 210 nm; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 常温; 进样体积: 7.5 μL。

1.2.10 进化树构建及生理生化鉴定 利用 ClustalW 软件对菌株 16S rRNA 序列进行比对。通过 MEGA7 软件, 以邻接法(Neighbour-Joining)建立系统进化树, Bootstrap 置信值估算重复次数为 1 000 次。把上述检测产量最高的菌株进行平板划线直至出现单克隆菌落, 用棉签轻轻挑取单菌落到 GEN III 微孔板适配的接种液中混匀, 每孔 100 μL 加入 GEN III 96 孔微孔板中, 37 ℃ 培养箱孵育, 9 h 后观察颜色变化进行分析。

2 结果与讨论

2.1 产河豚毒素菌株的分离鉴定

提取的河豚基因组 DNA 经 16S rRNA 与 *Cytb* 两种引物进行 PCR 鉴定及测序, 测序结果与 NCBI 数据库 BLAST 分析, 发现均与横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*) 高度同源, 相似度均在 99% 以上, 因此本研究所采集的河豚鉴定为横纹东方鲀。TTX 含量 ELISA 结果显示编号 13 和编号 1 号河豚毒素含量较高, 每 1 g 肝脏组织分别含 9.674 μg 和 7.893 μg TTX。菌株筛选情况及活性鉴定: 13 号和 1 号河豚发现其均为雌性, 采用系列稀释涂布法涂布从河豚卵巢、肝脏、表皮、鳃部、脾脏中筛出共 112 株不同菌株, 其中包括不动杆菌属(*Acinetobacter*) 24 株不同菌株; 芽孢杆菌属(*Bacillus*) 14 株不同菌株; 假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*) 11 株不同菌株; 希瓦氏菌属(*Shewanella*) 8 株不同菌株[6 株海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*), 2 株未定种]; 假单胞菌属

(*Pseudomonas*) 11 株不同菌株;弧菌属 (*Vibrio*) 34 株不同菌株[16 株为溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)];海单胞菌属 (*Marinomonas*) 4 株不同菌株;气单胞菌属 (*Aeromonas*) 6 株不同菌株。

2.2 发酵液的 ELISA 检测

根据 16S rRNA 测序结果以及产河豚毒素菌株类别的研究,初步确定可能的生产菌种,利用河豚毒素快速检测试剂盒进行初筛。将不同标准品浓度 OD 值(B_i)与空白对照 OD (B_0) 值的比值的 $\logit$ 函数与标准品浓度 (16、32、64、128 ng/mL) 对数做拟合曲线(图 1),初筛后的菌株经冷冻干燥处理后浓缩约 6 倍,0.1%乙酸溶解煮沸后的上清进行 ELISA 复筛实验,最终筛出产量最高一株为芽孢杆菌 3G2 (16S rRNA 的 GenBank 序列号为 OP563727),分离自 13 号河豚的肝脏组织,发酵液产量为 35 ng/mL,复筛浓缩 6 倍后 ELISA 显示结果为 227.24 ng/mL,显著差异性分析表明 3G2 浓缩后样品与未浓缩相比具有极显著差异 ($P<0.0001$,图 2)。

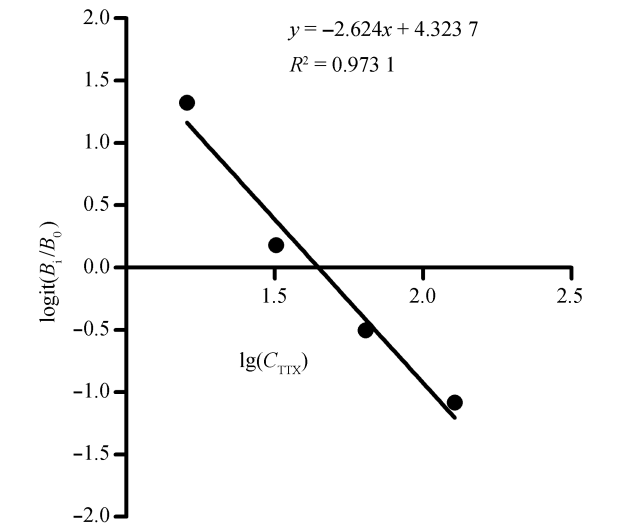


图 1 ELISA TTX 标准曲线

Fig. 1 ELISA TTX standard curve

2.3 河豚毒素生产菌的透析培养

细菌在海水中生长繁殖更符合其原始的海洋自然环境,对菌株产 TTX 的稳定性也有一定的提升。而透析培养后,在下游分离纯化过程中,减少了培养基中大分子杂质的干扰。岳田芳等通过传统摇床发酵法在相同的 2216E 培养基条件下获得的 TTX 生产菌干重为 1.38 g/L,且在装液量为 150 mL(1 L 三角瓶)时菌体干重最大,继续增加培养液菌体干重反而有所下降^[5]。本研究采用的透析培养法可以通过在透析膜间隔条件下,向培养基室不断流加新鲜培养基,使细菌培养室在通气良好时达到高密度

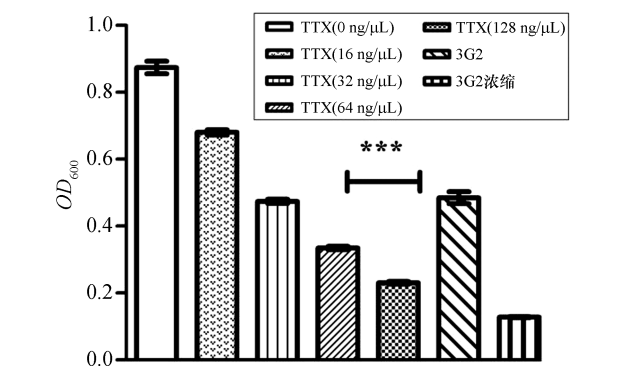


图 2 标准品及样品反竞争性 ELISA

Fig. 2 Anti-competitive ELISA of the standard and sample

增长。经透析培养收集的菌液粘稠浑浊度高,离心冻干后干菌重达到 15.3 g/L,产量比传统摇床发酵^[5]提高了近 10 倍。

2.4 小鼠生物毒性检测

小鼠腹腔注射 0.5 mL 上述透析培养液 1 min 后出现染毒症状。主要表现为进行性活动减弱,呼吸困难,蜂腰症状明显。随着时间延长,基本无主动活动能力,毛发竖立,最后抽搐衰竭而亡。雌雄小鼠染毒症状有差异,雄性比雌性先期 1 h 死亡。所有小鼠 10 h 内全部死亡。

2.5 试纸条检测

试纸条结果左侧为 ELISA 检测 TTX 含量低的两株菌发酵液,右侧为筛出的两株高产量菌发酵浓缩液(图 3),左侧两纸条显示两条杠为阴性,右侧两试纸条均显示一条杠为阳性。已知试纸条检出限为 100 ng/mL^[9],进一步验证其 ELISA 结果的正确性。

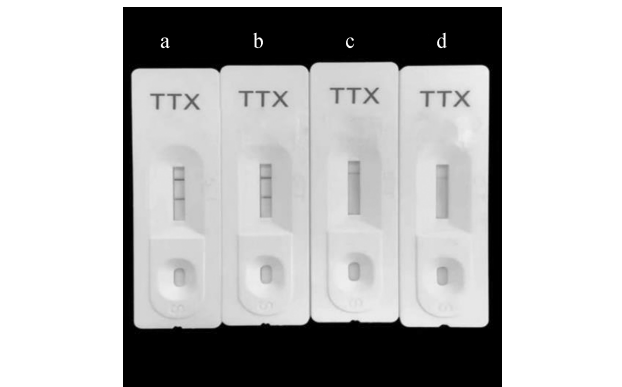


图 3 发酵液试纸条检测结果

Fig. 3 Test strip of fermentation liquid

a,b: TTX 含量低的两株菌发酵液;c,d: 3G2 菌株发酵液。

2.6 高效液相色谱鉴定

对于复筛毒性最强的菌株 3G2 发酵提取液经

过免疫共沉淀,使其得到初步纯化后,进行 HPLC 分析,结果表明菌株样品与标准品出现一致的波峰(检测波长 210 nm,图 4),其保留时间与 TTX 标准品一致,初步证实菌株 3G2 发酵液提取物得到的毒性成分为 TTX。

2.7 菌株 3G2 生理生化特征及进化树构建

菌株 3G2 菌落呈白色,不透明,直径 2~5 mm,表面湿润光滑,边缘整齐,为革兰氏阳性菌;菌体细胞为杆状,产芽孢,芽孢圆形或柱形,生理生化指标鉴定结果如下(表 1)。对 16S rRNA 测序结果进行 BLAST 分析,菌株 3G2 与 *Bacillus* sp.strain 70054 相似度为 99.86%。下载与目的序列相似度较高的序列以及筛选出的其他菌株 16S rRNA 序列构建系统进化树,通过进化树分析可以看出菌株 3G2 在进化

关系上与 *Bacillus anthracis*、*Bacillus cereus* 接近(图 5)。

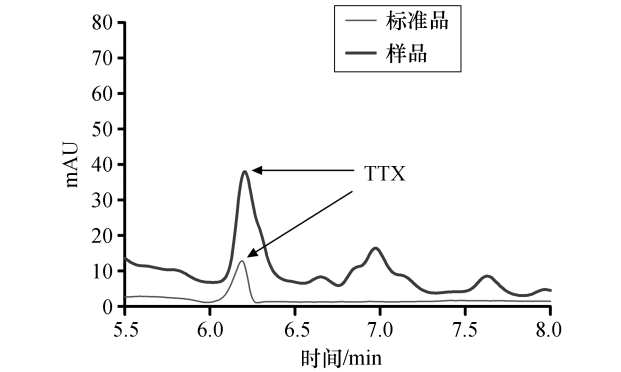


图 4 菌株 3G2 发酵样品及 TTX 标准品色谱图
Fig. 4 Chromatogram of strain 3G2 fermentation sample and TTX standard

表 1 菌株 3G2 的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of strain 3G2

生理生化指标	反应型	生理生化指标	反应型	生理生化指标	反应型	生理生化指标	反应型	生理生化指标	反应型
糊精	++	D-麦芽糖	+	D-海藻糖	++	D-纤维二糖	+	龙胆二糖	++
蔗糖	++	松二糖	++	水苏(四)糖	++	阳性对照 (芽孢杆菌类)	++	pH 6	++
pH 5	-	D-棉子糖	++	α-D-乳糖	+	D-蜜二糖	+	β-甲基-D-葡萄糖苷	++
D-水杨苷	++	N-乙酰-D-氨基葡萄糖	++	N-乙酰基-β-D-甘露糖胺	++	N-乙酰基-D-半乳糖胺	++	N-乙酰神经胺酸	++
1% NaCl	++	4% NaCl	++	8% NaCl	++	α-D-葡萄糖	+	D-甘露糖	+
D-果糖	++	D-半乳糖	++	3-甲基-葡萄糖	+	D-岩藻糖	++	L-岩藻糖	++
L-鼠李糖	+	肌苷	++	1%乳酸钠	++	夫地西酸	-	D-丝氨酸	++
D-山梨糖醇	++	D-甘露醇	++	D-阿拉伯糖醇	++	肌醇	++	甘油	++
D-葡萄糖-6-磷酸	++	D-果糖-6-磷酸	++	D-天冬氨酸	+	D-丝氨酸	++	醋竹桃霉素	++
利福霉素	++	二甲胺四环素	-	明胶	++	甘氨酸-L-脯氨酸	++	L-丙氨酸	++
L-精氨酸	++	L-天冬氨酸	++	L-谷氨酸	++	L-组氨酸	++	L-焦谷氨酸	++
L-丝氨酸	++	林肯霉素	++	盐酸胍	++	硫酸四癸钠	-	果胶	++
D-半乳糖醛酸	++	L-半乳糖胺内酯	+	D-葡萄糖酸	++	D-葡萄糖醛酸	++	葡萄糖醛酰胺	++
粘酸	++	奎宁酸	++	D-糖酸	++	万古霉素	++	四唑紫	++
四唑蓝	++	对羟基苯乙酸	++	丙酮酸甲酯	++	D-乳糖甲酯	++	L-乳酸	++
柠檬酸	++	α-酮戊二酸	++	D-苹果酸	++	L-苹果酸	++	溴琥珀酸	+
茶啉酸	-	氯化锂	++	亚碲酸钾	++	吐温 40	++	γ-氨基丁酸	++
α-羟基丁酸	++	β-羟基-D,L-丁酸	++	α-酮丁酸	++	乙酰乙酸	++	丙酸	++
乙酸	++	蚁酸	++	氨曲南	++	丁酸钠	++	溴酸钠	-

注：“++”、“+”表示阳性结果；“-”表示阴性结果。

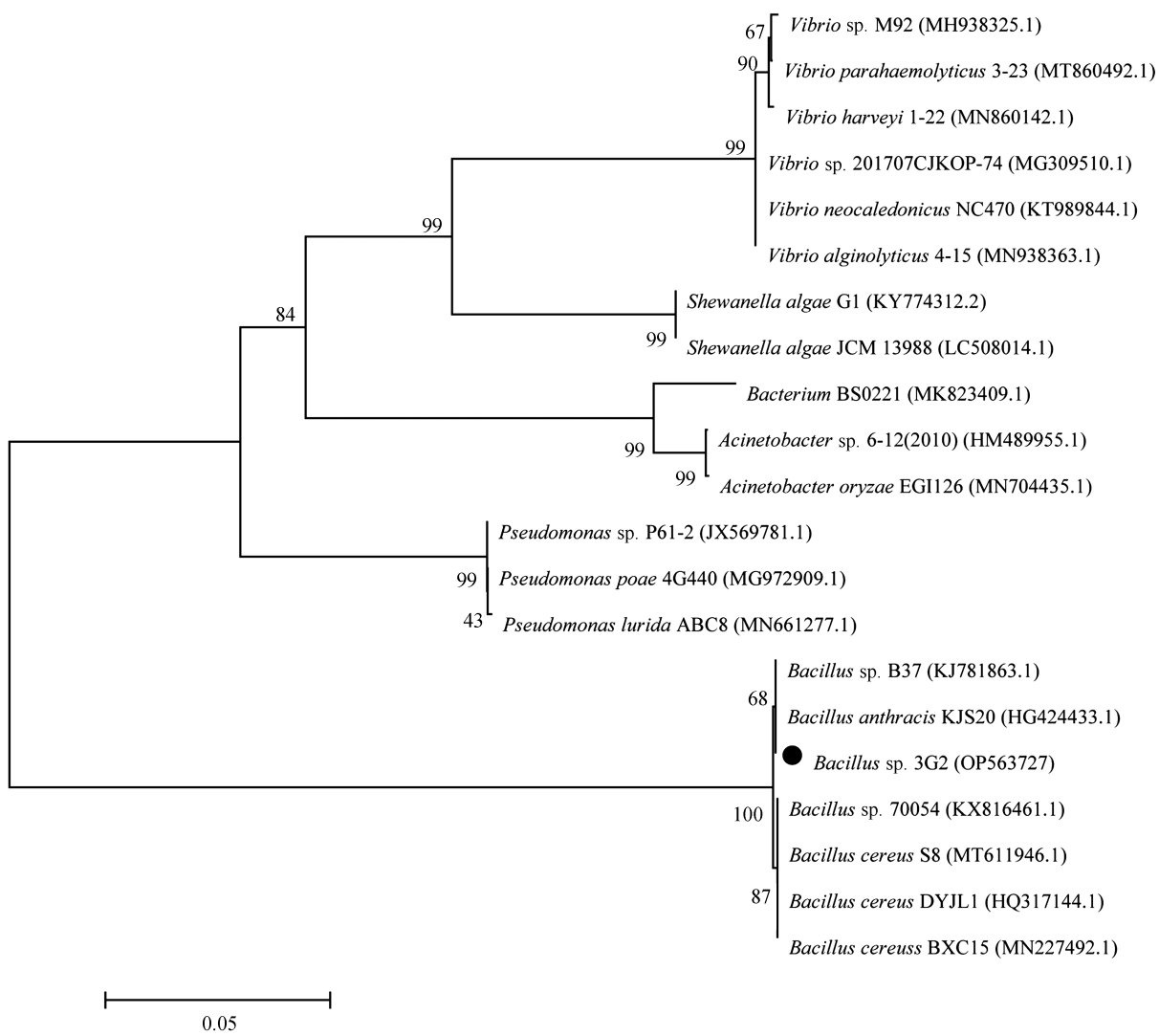


图5 菌株 3G2 的系统进化树分析
Fig. 5 Phylogenetic analysis of strain 3G2

2.8 讨论

从各种携带 TTX 的生物体及海洋、淡水中发现了 150 多株 TTX 产生菌,其中 31 个为细菌^[14]。最常见的 TTX 产生菌有芽孢杆菌属、假单胞菌属、气单胞菌属、弧菌属、希瓦氏菌属^[15]。如 Wu 等(2005)从渤海河豚中分离出 36 株细菌,其中 32 株芽孢杆菌为优势菌^[16]。然而分离鉴定出的细菌所产 TTX 含量大多很低,很难满足工业化需求,比 Yang 等(2010)从暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)中分离出一株气单胞菌,TTX 产量为 1.88 ng/mL^[17]。Wang 等(2010)从暗色东方鲀(*Fugu obscurus*)中分离出一株梭状芽孢杆菌,200 mL 发酵培养物中用小鼠生物检测法测定 TTX 含量为 23.9 MU^[18]。Yu 等(2011)从星点东方鲀(*Takifugu niphobles*)肠道中分离出一株拉乌尔菌(*Raoultella terrigena*),培养 24 h 后,培养基通过 ELISA 法测定产生 TTX 含量为 4.3

ng/mL^[19]。近些年国内外对产 TTX 菌株的研究主要集中在 TTX 的中和、免疫抗体研发、高通量测序、宏基因组学研究等,如 Biessy 等(2020)利用高通量测序评估了新西兰蛤蜊中 TTX 和非 TTX 细菌群落,结果表明弧菌和芽孢杆菌菌群可能是其 TTX 的来源^[20]。目前对筛选 TTX 生产菌进行发酵实验较少,陆燕等(2010)通过杂合设计对发酵条件进行优化,TTX 产量从 666.65 ng/L 提高到 1 900.60 ng/L^[21]。虽然有一定的作用,但是提高 TTX 产量的效果仍不理想,需要开发新的研究方法以提高 TTX 产量。

本研究为首次利用 ELISA 与胶体金联合的方法进行简便有效的大规模初筛验证,确认得到的高产菌株,而经过放大发酵培养后 TTX 含量仍然有 35 ng/mL。由于 TTX 产生菌在细菌培养物中往往 TTX 水平太低以及培养基杂质干扰无法达到检出限,通

常只能采用色谱柱分离浓缩或者更加精密的检测仪器^[14],而本研究提出一种利用免疫共沉淀即可从发酵产物中快速分离浓缩 TTX 的方法。后期我们准备继续由该菌株作为出发菌,进行杂合正交实验以优化透析培养条件,进一步提高产量、实现工业生产规模,为之后利用其生产的 TTX 开发止痛贴、戒毒针剂、医疗美容产品等提供支持。

3 结论

通过河豚毒素 ELISA 检测手段初筛毒性较强的河豚并从其组织中分离菌株,在分离到的 112 株菌株中选择毒素含量最高的一株芽孢杆菌 3G2 进行透析培养,得到的透析培养液经 ELISA 检测 TTX

含量为 35 ng/mL。通过小鼠毒性试验和胶体金的方法再次验证,并与 TTX 标准品一同对比进行 HPLC 检测,证实发酵液所分离得到的毒性成分确定为 TTX,验证了所筛菌株的药理学特性、产毒性,更反映了透析培养法的高效产能,后续还可以通过继续优化发酵条件提高毒素产量。此外生长在透析器海水室中的生产菌株因为其环境更接近原始海洋生长环境,因此具有更高的 TTX 遗传稳定性,同时透析膜使得大分子杂质得以初步去除,通过不断更换新鲜培养基实现的连续培养更有利于后续大规模工业化应用。本研究进一步证实了河豚毒素外源性假说,并初步验证透析培养法对后续工业生产河豚毒素的优越性,为后续商业应用提供实践性基础。

参考文献:

- [1] NOGUCHI T, EBESU J S M. Puffer poisoning: epidemiology and treatment[J]. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 2001, 20(1): 1-10.
- [2] ABAL P, LOUZAO M C, ANTELO A, et al. Acute oral toxicity of tetrodotoxin in mice: determination of lethal dose 50 (LD50) and no observed adverse effect level (NOAEL)[J]. Toxins, 2017, 9(3): 75.
- [3] 张一, 傅军, 施益民, 等. 脑室内注射河豚毒素对老年大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2005(10): 783-784. ZHANG Y, FU J, SHI Y M, et al. Effect of intraventricular injection of tetrodotoxin on cerebral ischemia-reperfusion injury in aged rats[J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2005(10): 783-784.
- [4] THUESEN E V, KOGURE K, HASHIMOTO K, et al. Poison arrowworms: a tetrodotoxin venom in the marine phylum Chaetognatha[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1988, 116(3): 249-256.
- [5] 岳田芳, 刘岩, 邓志科, 等. 海藻希瓦氏菌(*Shewanella alga*)发酵培养基条件优化的研究[J]. 生物技术, 2007, 17(6): 63-66. YUE T F, LIU Y, DENG Z K, et al. Choice of optimal culture medium on *Shewanella alga*[J]. Biotechnology, 2007, 17(6): 63-66.
- [6] WANG X J, YU R C, LUO X, et al. Toxin-screening and identification of bacteria isolated from highly toxic marine gastropod *Nassarius semiplicatus*[J]. Toxicon, 2008, 52(1): 55-61.
- [7] MELNIKOVA D I, VLASENKO A E, MAGARLAMOV T Y. Stable tetrodotoxin production by *Bacillus* sp. strain 1839[J]. Marine Drugs, 2019, 17(12): 704.
- [8] 纪元, 刘岩, 宫庆礼. 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)[J]. 水产学报, 2010, 34(4): 589-597. JI Y, LIU Y, GONG Q L. Tetrodotoxin quantitative monitoring of cultured pufferfish collected from five coastal provinces in China by mouse method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 589-597.
- [9] 董雪, 钟青萍, 黄安诚, 等. 河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 977-981. DONG X, ZHONG Q P, HUANG A C, et al. Development of a direct competitive ELISA method for tetrodotoxin detection[J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(8): 977-981.
- [10] 苏捷, 姜琳琳, 吴靖娜, 等. 河豚毒素胶体金免疫层析快速检测试剂盒的应用研究[J]. 福建水产, 2013, 35(4): 323-327. SU J, JIANG L L, WU J N, et al. Application of immunochromatography test strip for rapid detection of tetrodotoxin[J]. Journal of Fujian Fisheries, 2013, 35(4): 323-327.
- [11] 李来好, 孙博伦, 赵东豪. 河豚毒素的检测与制备方法研究进展[J]. 南方水产科学, 2018, 14(3): 126-132. LI L H, SUN B L, ZHAO D H. Research progress in detection and preparation methods for tetrodotoxin[J]. South China Fisheries Science, 2018, 14(3): 126-132.
- [12] 王少蓉, 郁昂. 产河豚毒素菌株的分离鉴定[J]. 生物技术通报, 2010(6): 231-233. WANG S R, YU A. Isolation and identification of an efficient TTX-producing bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(6): 231-233.
- [13] 林涛, 朱明温, 林雅静, 等. 微生物透析培养器: CN201459137U[P]. 2010-05-12. LIN T, ZHU M W, LIN Y J, et al. Microbial dialysis incubator: CN201459137U[P]. 2010-05-12.
- [14] MAGARLAMOV T Y, MELNIKOVA D I, CHERNYSHEV A V. Tetrodotoxin-producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems[J]. Toxins, 2017, 9(5): 166.
- [15] PRATHEEPA V, VASCONCELOS V. Microbial diversity associated with tetrodotoxin production in marine organisms[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, 36(3): 1 046-1 054.
- [16] 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.
- [17] YANG G M, XU J L, LIANG S H, et al. A novel TTX-producing *Aeromonas* isolated from the ovary of *Takifugu obscurus*[J]. Toxicon, 2010, 56

(3): 324-329.

- [18] WANG J, FAN Y H, YAO Z G. Isolation of a *Lysinibacillus fusiformis* strain with tetrodotoxin-producing ability from puffer fish *Fugu obscurus* and the characterization of this strain[J]. *Toxicon*, 2010, 56(4): 640-643.
- [19] YU V C H, YU P H F, HO K C, et al. Isolation and identification of a new tetrodotoxin-producing bacterial species, *Raoultella terrigena*, from Hong Kong marine puffer fish *Takifugu niphobles*[J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(11): 2 384-2 396.
- [20] BIESSY L, PEARMAN J K, SMITH K F, et al. Seasonal and spatial variations in bacterial communities from tetrodotoxin-bearing and non-tetrodotoxin-bearing clams[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1860.
- [21] 陆燕, 易瑞灶, 陈伟珠. 堀越氏芽孢杆菌 S184 产河豚毒素的发酵条件优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(2): 307-311.
- LU Y, YI R Z, CHEN W Z. Enhancement tetrodotoxin production from *Bacillus horikoshii* S184 by optimizing nutrient and environmental conditions[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(2): 307-311.

Screening, identification and dialysis culture of a tetrodotoxin-producing strain

ZHANG Hongyu¹, LIN Tao², WU Bin², LI Zengpeng¹, GUO Wenbin¹, CHEN Mingliang^{1*}

(1. Third Institute of Oceanography, MNR, Xiamen 361005, China;

2. Hebei Steiner Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Tetrodotoxin (TTX) has an excellent application prospect in the treatment of neuropathic diseases such as sedation, analgesia, anesthesia and detoxification without causing addiction. However, due to its high cost of extraction from puffer fish, it is difficult to be widely applied. There is increasingly evidence that TTX originates from its symbiotic microbes. A strain of TTX-producing *Bacillus* sp. 3G2 was isolated from the liver of wild puffer fish (*Takifugu oblongus*), and 35 ng/mL TTX in fermentation broth was detected by ELISA and colloidal gold assay. Then, *Bacillus* sp. 3G2 was inoculated in a special dialysis incubator, and continuous culture was achieved by continuous flow and fresh culture medium. The mice biological activity and tetrodotoxin test strips were used to detect TTX in the fermentation broth. The crude TTX was purified by TTX antibody immunoprecipitation and further identified by high performance liquid chromatography (HPLC). Our study further corroborated the exogenous hypothesis of tetrodotoxin by means of screening high-quality strains from puffer fish, and preliminarily verify the superiority of dialysis production of tetrodotoxin. Therefor it provided a practical basis for subsequent commercial application.

Key words: marine biology; tetrodotoxin; *Bacillus*; ELISA detection; dialysis culture; HPLC

DOI: 10.3969/J.ISSN.2095-4972.2023.02.004

(责任编辑:肖 静)