

文章编号: 1674-5566(2014)05-0675-05

云斑裸颊虾虎鱼体内各组织河鲀毒素的含量

马廷龙, 龚小玲, 管哲成, 鲍宝龙

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 我国曾发生多起食用虾虎鱼的中毒事件。从发生中毒事件的广东湛江徐闻县西连镇采集了有毒虾虎鱼, 经形态学鉴定为云斑裸颊虾虎鱼(*Yongeichthys criniger*), 其体内含河鲀毒素。采用酶联免疫法测定了云斑裸颊虾虎鱼各组织河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)的含量, 结果显示每千克组织的TTX含量由高到低依次为肝脏(69.954 mg)、卵巢(9.510 mg)、皮肤(8.937 mg)、肌肉(5.181 mg)、眼睛(3.321 mg)。比野生暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)相应组织TTX含量均要高, 毒性强烈。

研究亮点: 首次通过酶联免疫法对我国大陆发生食用中毒的云斑裸颊虾虎鱼各组织的河鲀毒素含量进行了定量测定。相比暗纹东方鲀, 云斑裸颊虾虎鱼毒性强烈, 累积河鲀毒素能力更强。

关键词: 云斑裸颊虾虎鱼; 河鲀毒素; 酶联免疫法; 暗纹东方鲀; 食物中毒

中图分类号: Q 959.4

文献标志码: A

云斑裸颊虾虎鱼(*Yongeichthys criniger*)为暖水性沿岸小型有毒鱼类, 生活于咸淡水水域底部, 游动较少, 以底栖动物、虾、有机碎屑等为食。体长80~120 mm, 大者可达180 mm^[1]。日本、新加坡、我国海南与台湾等地均有分布。由于与大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*, 俗称“跳跳鱼”)外形相似, 在我国广东多地常被误食, 已发生多起食用云斑裸颊虾虎鱼中毒致死的事件。如2007年3月, 湛江市徐闻县西连镇发生食用云斑裸颊虾虎鱼, 致16人中毒, 1人死亡^[2]。2013年3月14日至15日, 雷州市英利镇、东方红农场、幸福农场等地共22人因食用有毒虾虎鱼中毒^[3]。在20世纪70年代已有一些日本学者进行过虾虎鱼毒性的研究^[4-6]。在日本和中国台湾地区采集的云斑裸颊虾虎鱼体内均已检出含有河鲀毒素(tetrodotoxin, TTX)^[7], 但关于中国大陆云斑裸颊虾虎鱼体内河鲀毒素分布与含量尚无报道。2013年4月, 作者在发生食用云斑裸颊虾虎鱼中毒事件的广东省湛江市徐闻县西连镇, 采集了当地人指认误食的云斑裸颊虾虎鱼, 通过形

态学鉴定种类, 并利用酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测不同组织河鲀毒素含量。同时, 与野生暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)相应组织的毒性强弱进行了比较。

1 材料与方法

1.1 样本采集

虾虎鱼样品于2013年4月26日采集于广东湛江市徐闻县西连镇, 充氧活体运回上海海洋大学实验室, 随机选取7尾, 分离皮肤、眼睛、肌肉、肝脏、卵巢组织。野生暗纹东方鲀样品1尾于2013年4月29日采集于上海芦潮港。

1.2 种类的形态鉴定

根据虾虎鱼的斑纹、体色、鳍等形态特征, 参考《中国动物志——硬骨鱼纲鲈形目(五)虾虎鱼亚目》鉴定种类^[1]。

1.3 酶联免疫法(ELISA)定量检测不同组织中的TTX

河鲀毒素的提取参考文献[8]。不同组织称重(暗纹东方鲀由于性腺无法分辨雌雄, 故没有

收稿日期: 2014-03-25 修回日期: 2014-05-18

基金项目: 国家自然科学基金(41176108); 上海市教育委员会创新重点项目(14zz145)

作者简介: 马廷龙(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类生物学。E-mail: 444685096@qq.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

提取), 剪碎, 研磨, 加入 0.1% 乙酸搅拌, 在水浴上不断搅拌煮沸 10 min, 冷却后过滤, 用 0.1% 乙酸溶液洗残渣, 合并滤液定容至 10 mL。为使 ELISA 的测试值位于标准浓度范围内, 对粗毒素提取液进行稀释 5 倍处理。将稀释后的样品 pH 调至 6.5~7.4, 定容至 10 mL, 利用河鲀毒素定量酶联免疫检测试剂盒(北京中卫食品卫生科技公司)进行 ELISA 检测。检测步骤如下: 用洗液洗涤微孔板 3 min, 重复洗涤 1 次, 记录样品及标准品的位置。加入 50 μL 样品及 TTX 标准品(北京中卫食品卫生科技公司)至微孔, 然后加入 50 μL 抗河豚毒素单克隆抗体溶液至样品及标准品中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min。在吸水纸上拍打甩掉孔中液体, 洗液洗涤微孔板 3 min, 再重复洗涤 2 次, 在吸水纸上拍打以除尽孔中液体。每孔加入酶标物 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。洗液洗涤微孔板 3 min, 再重复洗涤 4 次, 在吸水纸上拍打完全除去孔中液体。每孔加入显色液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 min 后, 每孔加入终止液 50 μL , 立即用酶标仪在波长 450 nm 处测定吸光度值(OD 值)。

TTX 含量按下式进行计算:

$$T = (C \times K) / B \quad (1)$$

式中: T 为 TTX 含量($\mu\text{g}/\text{kg}$); C 为测定液中 TTX 浓度(ng/mL); K 为提取液的稀释倍数; B 为组织液浓度(g/mL)。

2 结果与分析

2.1 物种鉴定

经形态学鉴定, 样品体侧正中有黑色大斑纹, 背侧鞍状黑斑 2~3 个, 以第一背鳍基底后方的最大且明显, 体侧有 3 至 4 个, 最后一个黑斑在尾鳍基部(图版-1); 项部有 2 条暗褐色宽横条, 有一暗色长斑连接眼至上颌(图版-2); 头部无鳞, 项部延伸至背鳍前段亦无鳞(图版-3); 2 个背鳍, 第一背鳍为 6 鳍棘; 第二背鳍 1 鳍棘, 9 鳍条。臀鳍与第二背鳍位置相对, 为 1 鳍棘, 9 鳍条(图版-4); 胸部、胸鳍基部以及腹部被小圆鳞(图版-5); 上下颌等长, 唇略厚; 舌发达, 游离; 两颌齿多行, 排列稀疏, 并且外行齿扩大, 下颌中央结合处无犬齿。符合《中国动物志——硬骨鱼纲鲈形目(五) 虾虎鱼亚目》^[1] 裸颊虾虎鱼属特征, 并且本属产于中国仅 1 种, 即云斑裸颊虾虎鱼。

2.2 各组织的 TTX 含量比较

以各标准溶液 OD 值与标准 1(浓度 0 ng/mL TTX 标准溶液)的 OD 值的比值为纵坐标(即标准品 OD 比), 所对应标准溶液浓度(ng/mL)的对数值为横坐标, 制作如图 1 所示的标准曲线。根据样品 OD 值与标准 1 的 OD 的比值(即样品 OD 比), 通过标准曲线公式得到对应点的横坐标, 即为 TTX 浓度的对数值, 求得反对数即为测定液中 TTX 浓度 C (ng/mL)。

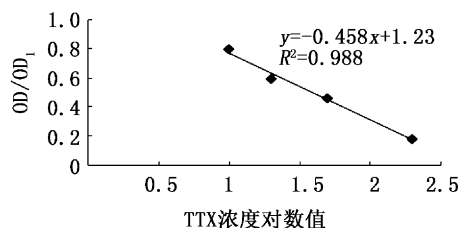


图 1 TTX 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of TTX amount

云斑裸颊虾虎鱼和暗纹东方鲀各组织的 TTX 含量见表 1, 云斑裸颊虾虎鱼每千克组织含 TTX 量从高到低依次为肝脏 69.954 mg、卵巢 9.510 mg、皮肤 8.937 mg、肌肉 5.181 mg、眼睛 3.321 mg, 而暗纹东方鲀相应组织的 TTX 含量均比云斑裸颊虾虎鱼低, 其每千克组织含 TTX 量从高到低依次为肝脏 7.86 mg、皮肤 0.72 mg、眼睛 0.23 mg、肌肉仅为 0.13 mg。

3 讨论

通过形态学的鉴定, 比对各部分特征, 此次采集的样品为裸颊虾虎鱼属云斑裸颊虾虎鱼, 其体侧大块黑色斑纹, 为其显著特征, 并且通过第一背鳍可迅速区分与云斑裸颊虾虎鱼容易混淆的无毒大弹涂鱼: 云斑裸颊虾虎鱼第一背鳍为 6 鳍棘, 第二背鳍为 1 鳍棘 9 鳍条; 大弹涂鱼第一背鳍只有 5 鳍棘, 鳍棘呈丝状延长且背鳍高, 第二背鳍低, 1 鳍棘 22~29 鳍条。

本研究显示云斑裸颊虾虎鱼各组织毒性以肝脏最强, 其次为卵巢、皮肤、肌肉、眼睛。单位组织毒性含量, 云斑裸颊虾虎鱼肝脏毒性是暗纹东方鲀肝脏的 9 倍左右, 其皮肤毒性超过暗纹东方鲀 12 倍, 肌肉接近于 39 倍, 眼睛超过 14 倍, 比野生暗纹东方鲀相应组织的 TTX 含量均要高。通过与东方鲀属和腹刺鲀属的河鲀毒素 ELISA

的检测数据对比^[9-11],云斑裸颊虾虎鱼肝脏含毒量均高于月腹刺鲀(*Gastrophysus lunaris*)、横纹东方鲀(*Takifugu oblongus*)、黄鳍东方鲀(*Takifugu xanthopterus*)、紫色东方鲀(*Takifugu Porphyreus*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*);肌肉毒性高于横纹东方鲀、黄鳍东方鲀,低于月腹刺鲀;皮肤毒性高于横纹东方鲀、黄鳍东方鲀、棕斑腹刺鲀,低于月腹刺鲀。可能由于季节的变化,鱼体内所含毒

量也会发生改变,需要更为深入的研究,以更准确比较各种有毒鱼类之间、组织与组织之间的含毒量高低。但云斑裸颊虾虎鱼的 TTX 含量之高,应给予高度重视,尤其肌肉和皮肤均含有相当高含量的 TTX,一旦当作大弹涂鱼误食,极易造成严重的中毒事件,建议在云斑裸颊虾虎分布的海南、广东等地进行相关宣传,防止此类事件的再次发生。

表 1 云斑裸颊虾虎鱼与暗纹东方鲀单位不同组织 TTX 含量

Tab. 1 The TTX content of each tissues in *Y. criniger* and *T. fasciatus*

鱼名	组织	OD	OD/OD ₁	测定液中 TTX 浓度		每千克组织 TTX 含量
		(平均值 ± 标准差)		/(ng/mL)	/(g/mL)	
云斑裸颊 虾虎鱼	肝脏	0.238 ± 0.005	0.150	228.051	0.016 3	69.954
	皮肤	0.315 ± 0.068	0.198	178.734	0.100 0	8.937
	肌肉	0.329 ± 0.047	0.207	170.988	0.165 0	5.181
	眼睛	0.712 ± 0.052	0.448	50.938	0.076 7	3.321
	卵巢	0.077 ± 0.004	0.048	380.384	0.200 0	9.510
暗纹东方鲀	肝脏	0.077 ± 0.002	0.048	380.383	0.096 8	7.862
	皮肤	1.092 ± 0.027	0.688	15.287	0.042 3	0.723
	肌肉	1.636 ± 0.073	1.030	2.736	0.041 0	0.134
	眼睛	1.685 ± 0.099	1.060	2.346	0.020 4	0.230

目前对于云斑裸颊虾虎鱼体内河鲀毒素的来源尚不清楚,而河鲀体内的河鲀毒素被普遍认为是来自食物链或体内共生的细菌^[12]。云斑裸颊虾虎鱼体内河鲀毒素有猜测可能来自食物链中的塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*),塔玛亚历山大藻确实既能产生麻痹性贝类毒素,又能产生河鲀毒素^[13],但也不能排除其体内的河鲀毒素来自共生的细菌的可能。已有各种产河鲀毒素的细菌从有毒的河鲀体内被分离出来^[12,14-19]。云斑裸颊虾虎鱼毒素的来源,还需进一步的研究认证。

感谢广东省湛江市陈世硕、柯耿协助采集云斑裸颊虾虎鱼样品!感谢上海海洋大学伍汉霖研究员在鱼类鉴定方面的指导!

参考文献:

- [1] 伍汉霖,钟俊生. 中国动物志:硬骨鱼纲. 鲈形目. 虾虎鱼亚目[M]. 北京:科学出版社,2008.
- [2] 杨霞. 因进食有毒海鱼,湛江 16 人中毒 1 人死亡[EB/OL]. http://www.gd.xinhuanet.com/newscenter/2007-03/13/content_9490844.htm,2007-03-13.
- [3] 陈杨,粤食安. 毒倒 22 人,肇事的并非“跳跳鱼”经初步判断,祸起云斑裸颊虾虎鱼[N]. 新快报,2013-03-20

(A32).

- [4] NOGUCHI T, HASHIMOTO Y. Isolation of tetrodotoxin from a goby *Gobius criniger* [J]. *Toxicon*, 1973, 11(3): 305-307.
- [5] HASHIMOTO Y, NOGUCHI T. Occurrence of a tetrodotoxin-like substance in a goby *Gobius criniger* [J]. *Toxicon*, 1971, 9(1): 79-84.
- [6] HASHIMOTO Y, SHIOMI K. Occurrence of a skin toxin in coral-gobies *Gobiodon* spp [J]. *Toxicon*, 1974, 12(5): 523-524.
- [7] LIN S J, HWANG D F, SHAO K T, et al. Toxicity of Taiwanese gobies [J]. *Fisheries Science*, 2000, 66(3): 547-552.
- [8] 段发森,谢心磊,朱宝平. 用小鼠单位法检测河豚毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2000, 8(4): 463-464.
- [9] 计融,王健伟,罗雪云,等. 鲀毒鱼类中河鲀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.
- [10] 赖少阳,张风雷,岳亚军,等. 广东省 4 种民间食用河豚鱼毒素检测[J]. *中国公共卫生*, 2010(7): 927-927.
- [11] 官慧芝,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(12): 1423-1424.
- [12] 吴韶菊,崔建洲,官庆礼. 河豚毒素的微生物起源[J]. *海洋科学*, 2005, 29(10): 81-85.
- [13] KODAMA M, SATO S, SAKAMOTO S, et al. Occurrence of tetrodotoxin in *Alexandrium tamarense*, a causative

- dinoflagellate of paralytic shellfish poisoning[J]. *Toxicon*, 1996, 34(10): 1101-1105.
- [14] YANG G, XU J, LIANG S, et al. A novel TTX-producing *Aeromonas* isolated from the ovary of *Takifugu obscurus*[J]. *Toxicon*, 2010, 56(3): 324-329.
- [15] 李秋芬, 徐怀恕. 河豚毒素及其微生物起源[J]. 海洋通报, 1994, 13(4): 86-91.
- [16] 池珍, 郑莺, 毛宁. 产河豚毒素(TTX)菌株ZY-23的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 217-221.
- [17] 范延辉, 胡江春, 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[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 361-364.
- [18] 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, 2009, 17(6): 734-739.
- [19] 刘静, 杨桂梅, 鲍宝龙. 产河鲀毒素细菌水平转移相关基因的鉴定[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 509-515.



图版 所采集的云斑裸颊虾虎鱼的外形图

Plate The appearance of *Y. criniger*

1. 侧面观; 2. 背面观; 3. 头部与项部; 4. 背鳍与腹鳍; 5. 胸鳍基部; sp. 鞍状黑斑; wbs. 暗褐色宽横条; hn. 项部无鳞区; df. 背鳍; af. 臀鳍; pfb. 胸鳍基部小圆鳞。

Analysis of the tetrodotoxin content of tissues in *Yongeichthys criniger*

MA Ting-long, GONG Xiao-ling, GUAN Zhe-cheng, BAO Bao-long

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Food poisoning incidents have occurred in China because of eating goby, which is a species of fish living with a common edible mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostris*). In order to investigate the goby species and its toxicity in this study, the goby samples were collected from Xuwen (Zhanjiang, Guangdong province) where the poisoning accident occurred in 2007. Based on the morphological features, the fish was identified as *Yongeichthys criniger*, which was reported as a tetrodotoxin (TTX)-accumulated fish species in Japan, and Taiwan province of China. The amount of TTX in each tissue of *Y. criniger* and *Takifugu fasciatus* was measured using enzyme linked immunosorbent assay. The tissue with TTX content in per kilogram tissue in *Y. criniger* from high to low is liver (69.954 mg), ovary (9.510 mg), skin (8.937 mg), muscle (5.181 mg), and eye (3.321 mg). The amount of TTX in each tissue of *Y. criniger* is higher than that in same tissue of *Takifugu fasciatus*. This is the first report about the amount of TTX in *Y. criniger* from mainland in China, and the investigation is helpful to prevent people eating toxic *Y. criniger*.

Key words: *Yongeichthys criniger*; tetrodotoxin; enzyme linked immunosorbent assay; *Takifugu fasciatus*; food poisoning