

# 河豚毒素检测技术



1

河豚毒素简介

2

河豚毒素快速检测技术

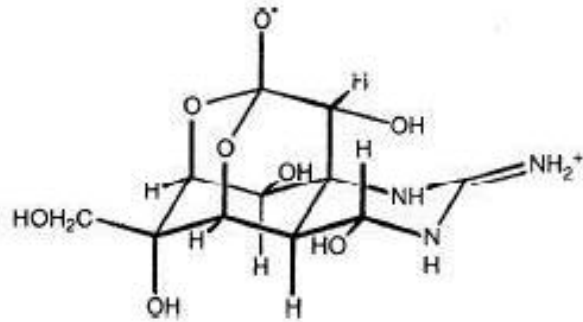
3

河豚毒素实验室检测技术

4

关于美正生物

## 河豚毒素的结构与性质



河鲀毒素 (TTX) 是鲀鱼类 (俗称河豚鱼) 及其它生物体内含有的一种生物碱。其分子式为 $C_{11}H_{17}O_8N_3$ ，分子量为319。

TTX是自然界中所发现的毒性最大的神经毒素之一，曾一度被认为是自然界中毒性最强的非蛋白类毒素。经腹腔注射对小鼠的 $LD_{50}$ 为 $8 \mu g/kg$ ，其毒性比氰化物还要高1250多倍，0.5mg即可致人于死命。毒素对肠道有局部刺激作用，吸收后迅速作用于神经末梢和神经中枢，可高选择性和高亲和性地阻断神经兴奋膜上钠离子通道，阻碍神经传导，从而引起神经麻痹而致死亡。

## 河豚毒素的结构与性质

TTX化学性质和热性质均很稳定，盐腌或日晒等一般烹调手段均不能将其破坏，只有在高温加热30min以上或在碱性条件下才能被分解。220℃加热20-60min可使毒素全部被破坏。中毒潜伏期很短，短至10-30min，长至3-6h发病，发病急，如果抢救不及时，中毒后最快的10min内死亡，最迟4-6h死亡。中毒后也缺乏有效的解救措施。毒素纯品在医药方面用途广泛，具有极高商业价值。



**拼死也要吃的河豚鱼！**

## 河豚毒素的起源与分布

毒素起源于生物体本身还是寄生物尚有争议，体内毒素的积累和分布因不同季节和部位而异。河鲀在生殖季节毒性大，且雌性大于雄性，而在不同部位中，卵巢>脾脏>肝脏>血液>眼睛>鳃耙>皮肤>精巢。一般肌肉中不含有河鲀毒素，但河鲀死后内脏中的毒素可渗入肌肉，此时鱼肉也含有少量毒素。提取毒素的主要部位为卵巢和肝脏



## 河豚毒素的起源与分布

鲀形目鱼类（河鲀）有毒，河鲀毒素之名，也因河鲀而起。而人们通常所指的河鲀（并非河豚）（puffer fish），为鲀科鱼类，泛指硬骨鱼纲、鲀形目、鲀科的各属鱼类，鲀科鱼类是最常见的含河鲀毒素的水产品。中国的鲀科鱼类共有**54**种，其中东方鲀属**22**种。



在河豚体内发现含河豚毒素的器官或组织有肝脏、卵巢、皮肤、肠、肌肉、精巢、血液、胆囊和肾等，其中肝脏含河豚毒素的河豚有**34**种，卵巢含河豚毒素的有**32**种，皮肤含河豚毒素的有**21**种，肠含河豚毒素的有**21**种，肌肉含河豚毒素的有**13**种，精巢含河豚毒素的有**8**种，血液含河豚毒素的有**4**种，胆囊含河豚毒素的有**4**种，肾含河豚毒素的有**1**种。有些种类的河豚，地理分布不同，其体内毒素分布的部位也会有所不同，如台湾海域的[纹腹叉鼻鲀](#)（*Arothron hispidus*），其肌肉就有毒性了，而在南海海域，肌肉中则没有河豚毒素分布；又如东海南部的横纹东方鲀（*Takifugu oblongus*），仅卵巢、肝脏和肠中含河豚毒素，而在台湾沿海的横纹东方鲀，体内河豚毒素分布较为广泛，在卵巢、肝脏、肠、胆囊、精巢、肌肉和皮肤中均有分布，器官或组织中的河豚毒素量也不同。



分布

## 其他含毒生物

河鲀毒素及类似物不仅存在于各种豚科鱼中，还广泛分布于各种高等、低等生物中，如云斑裸颊虾虎鱼 (*Yongeichthys criniger*)、织纹螺 (*Nassarius* spp.) 等。[14] Asakawa等首次报道牡蛎吊筏上的纽虫体内含大量的河鲀毒素、4-表河鲀毒素、脱水河鲀毒素及3种未知毒素，最高毒性为14734MU/g。这种纽虫体质量仅为0.2-1.0 g，就足以杀死13000只小鼠。纽虫的毒性变化很大，认为纽虫可能通过共生的微生物产生河鲀毒素或前体。而自1964年Mosher等首次在河鲀鱼外的动物蝶螈中发现河鲀毒素以来，人们对蝶螈体内的河鲀毒素及其大量衍生物 (1-Hydroxy-5, 11-dideoxytetrodotoxin、6-表河鲀毒素) 的研究兴趣越来越浓，主要集中在阐述这种低等动物的代谢途径。[15] 从粗皮渍螈 *Taricha granulosa* 体内分离出河鲀毒素的10, 7内酯型，该成分在河鲀毒素合成的第十五步环节中作为前体物质，故研究蝶螈的代谢途径将有助于更好地解释河鲀毒素的起源。从亚历山大藻培养液中检出一定量的河鲀毒素，表明亚历山大藻体内麻痹性毒素和河鲀毒素同时存在。Kodama等认为这种麻痹性贝毒



其他含有河豚毒素的生物有一个共同点，即其体内含有多种能分泌毒素及其类似物的细菌。已从海藻、花纹爱洁蟹（*Atergatis folioides*）、多棘槭海星（*Astropecten polyacanthus*）、圆尾鲎（*Carcinoscorpius rotundicauda*）、虫纹东方鲀（*Fugu vermicularis*）和星点东方鲀（*Takifugu niphobles*）、腹足动物（*Niotha clethrata*）、纽虫动物中陆续分离到产TTX的细菌，淡水沉积物中也有此类菌、海洋沉积物中分离的链霉菌（*Streptomyces* sp.）能产TTX及其衍生物、海胆（*Meoma ventricosa*）中分离的致病菌VL21也被证实有产毒能力。产TTX的微生物类群有弧菌属（*Vibrio*）的溶藻弧菌（*Vibrio alginolyticus*）和鳗弧菌（*Vibrio anguillarum*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、希瓦氏菌属的腐败希瓦菌（*Shewanella putrefaciens*）、交替单胞菌（*Alteromonas*）、芽孢杆菌（*Bacillus*）；放线菌属的链霉菌（*Streptomyces*）

## “GB 5009.206-2016 食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定”

2016-12-23发布，2017-06-23实施。

本标准规定了水产品中河豚毒素的测定方法。

**第一法：**小鼠生物法，适用于河豚鱼肌肉、肝脏、皮肤和性腺组织中河豚毒素的测定；

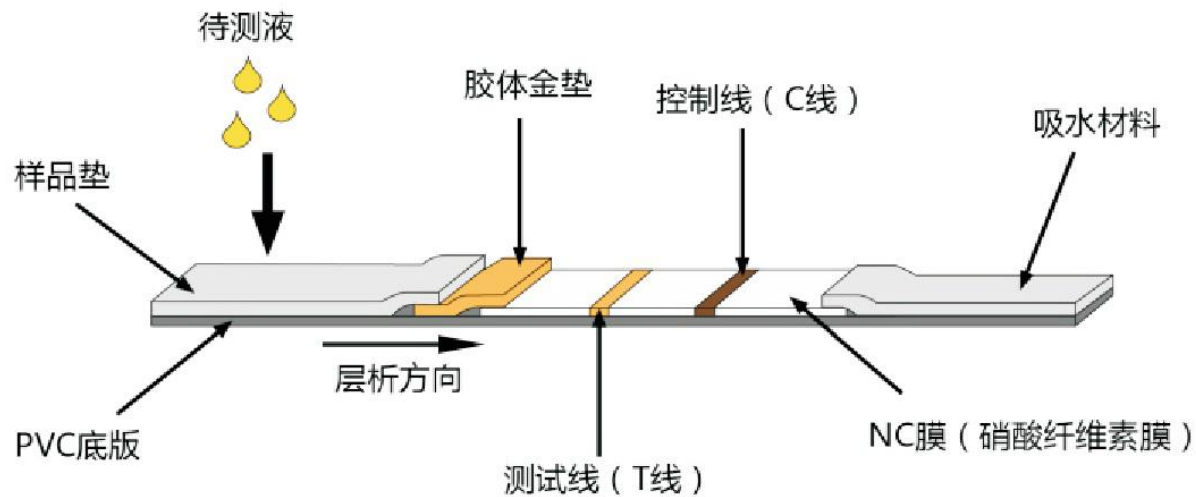
**第二法：**液相色谱串联质谱法，适用于河豚鱼肌肉、肝脏、皮肤和性腺组织中河豚毒素的测定；

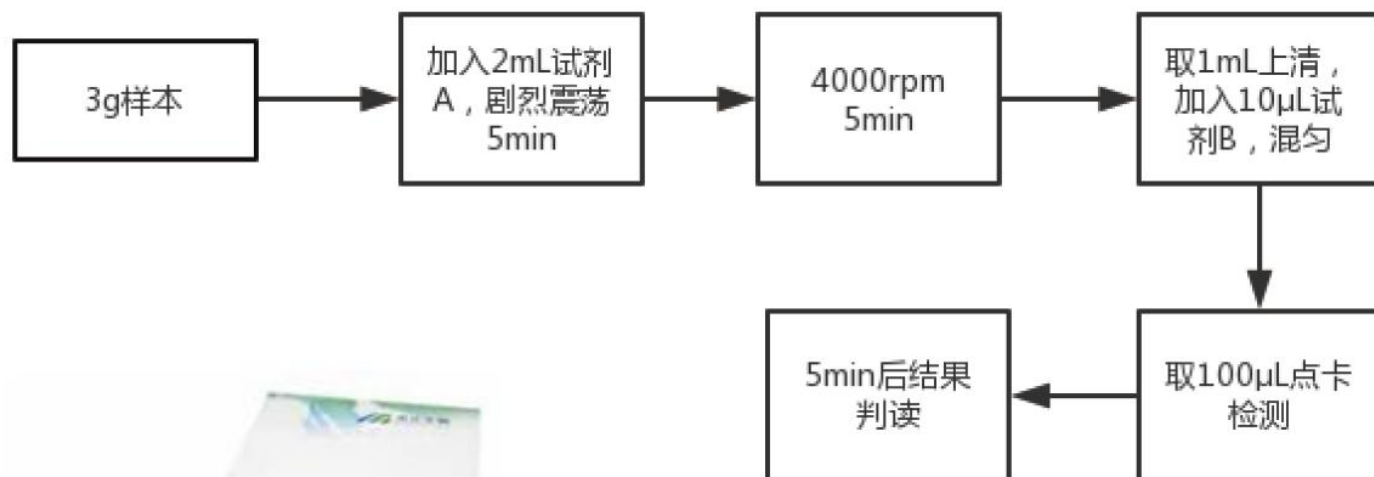
**第三法：**液相荧光法，适用于河豚鱼、织纹螺、虾、牡蛎、花蛤和鱿鱼中河豚毒素的测定；

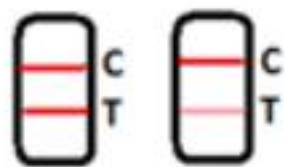
**第四法：**酶联免疫吸附法，适用于河豚鱼、肝脏、皮肤和性腺组织中河豚毒素的测定



## 胶体金快速检测卡：



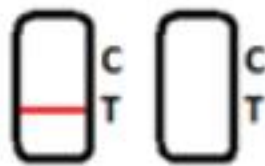




阴性

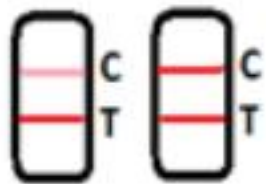


阳性

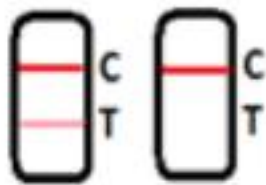


无效

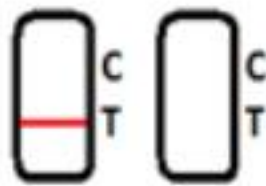
消线法, 检出限**200 $\mu$ g/kg**



阴性



阳性

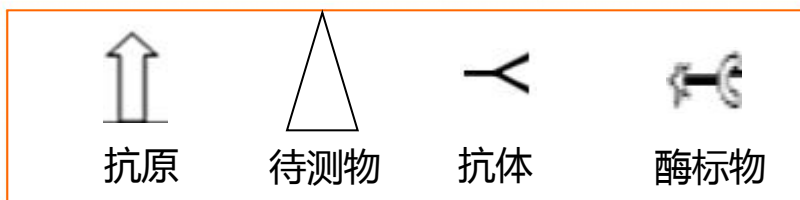
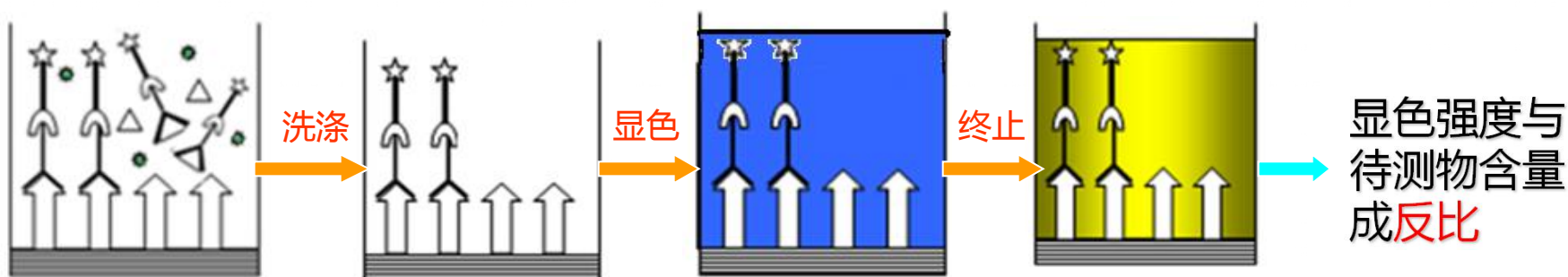


无效

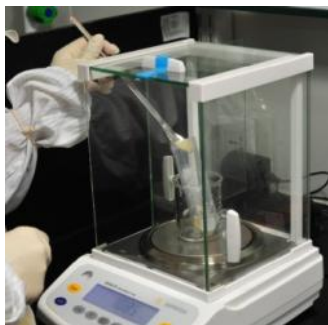
比色法, 检出限**35 $\mu$ g/kg**

## 酶联免疫试剂盒：

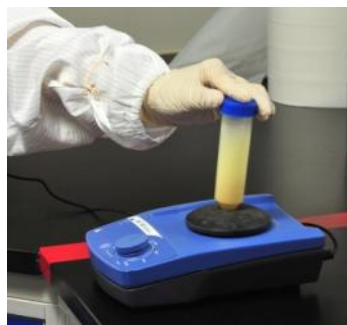
竞争法：样本中的抗原和一定量的固相抗原竞争结合一定量的抗体，而后与酶标二抗反应，待测样本中抗原越多，与固相抗原结合的抗体及酶标二抗越少，显色越浅；反之，待测样本中抗原越少，显色越深。



### 间接竞争法



2g 样本



+4mL 提取液, 震荡提取5min



4000rpm, 10min



取上清液



检测



结果分析



数据读取



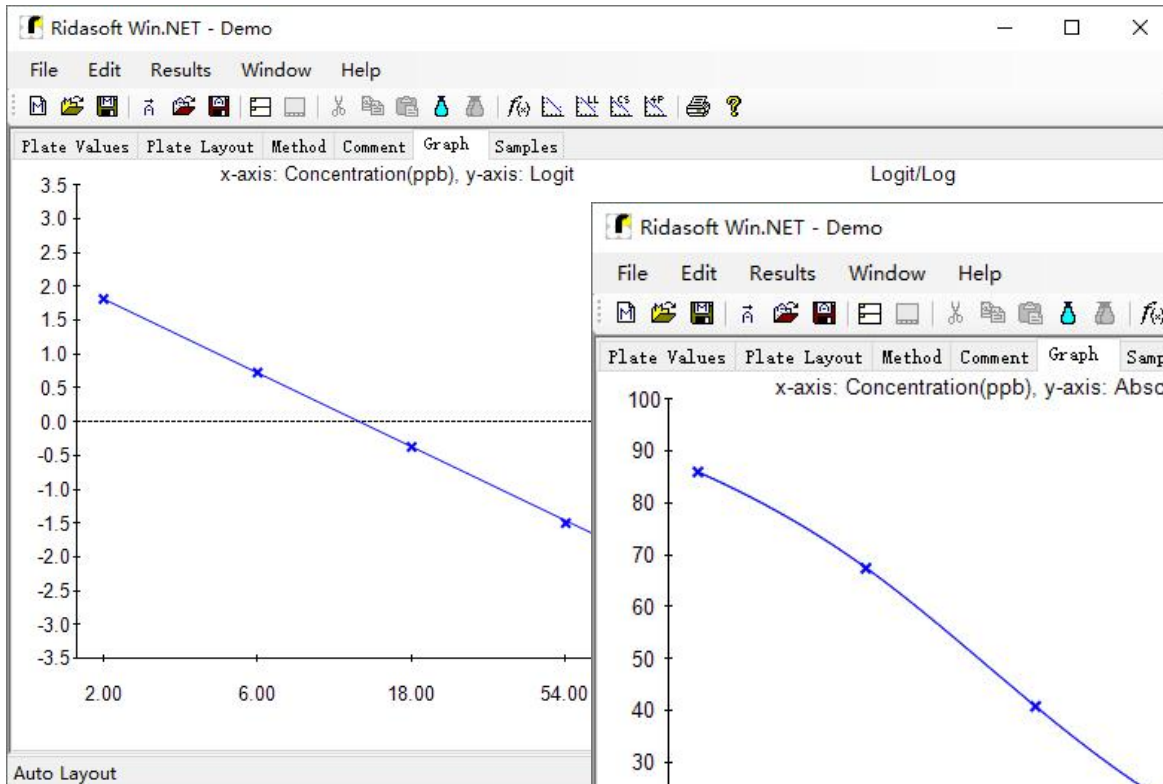
**加标准品/样本/酶标物/抗试剂：**加标准品/样本50 $\mu$ L/孔到对应的微孔中，再加入酶标物50 $\mu$ L/孔，然后再加入抗试剂50 $\mu$ L/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应30min。

**6、洗板：**小心揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液250 $\mu$ L/孔，充分洗涤4~5次，每次间隔10s，用吸水纸拍干（拍干后未被清除的气泡可用未使用过的枪头戳破）。

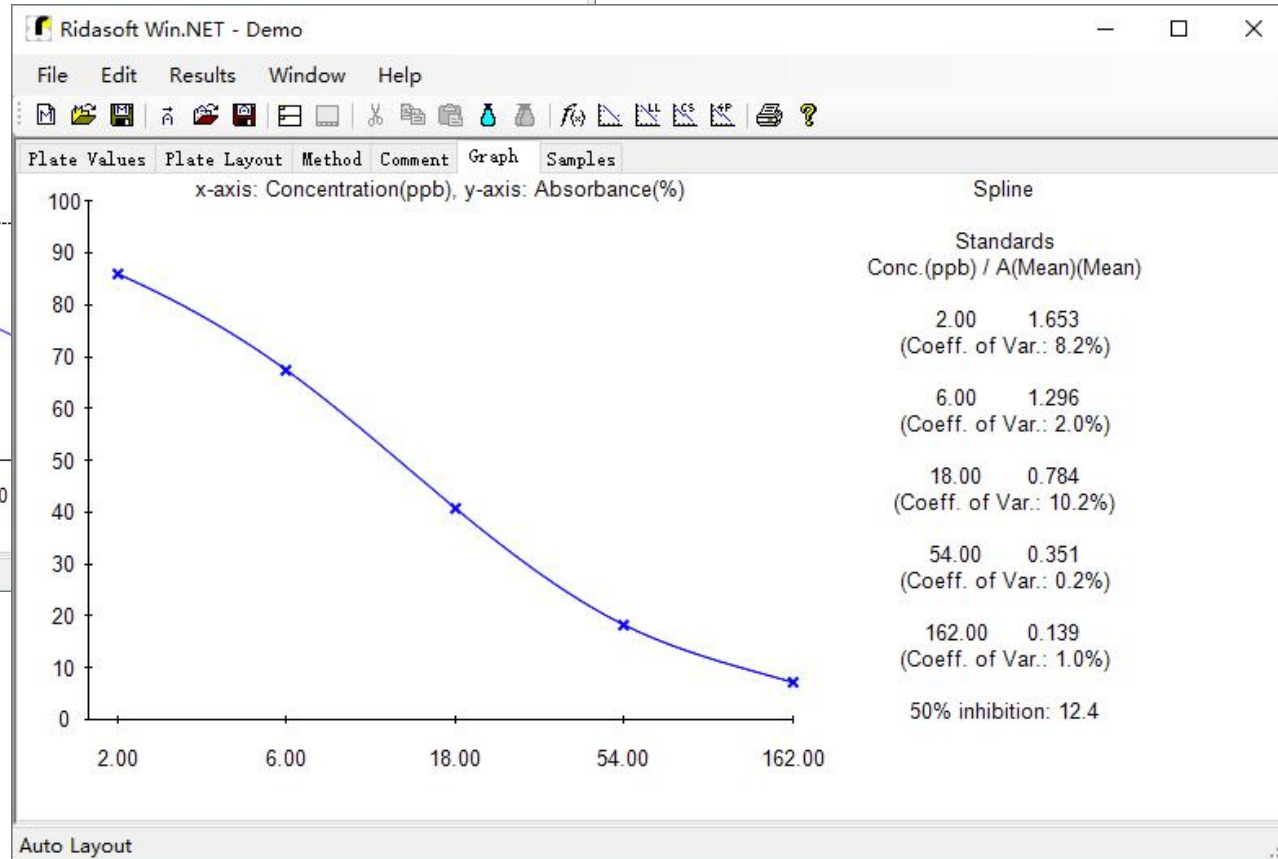
**7、显色：**加入底物液A液50 $\mu$ L/孔，再加底物液B液50 $\mu$ L/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应15min。

**8、测定：**加入终止液50 $\mu$ L/孔，轻轻振荡混匀，设定酶标仪于450nm处（建议用双波长450/630nm检测，请在5min内读完数据），测定每孔OD值。





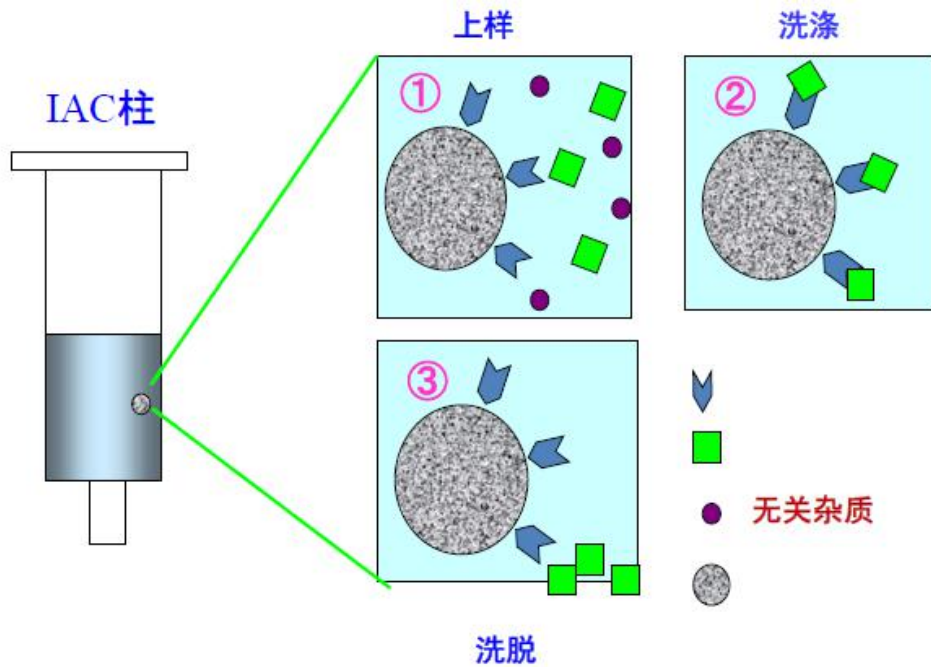
线性相关系数 $R^2 \geq 0.99$



样本编号	组织	含量 (µg/kg)
1#河豚鱼	肉	349.2
	肝	654
	皮	421.9
	卵巢	816.6
2#河豚鱼	肉	0
	肝	0
	皮	0
	卵巢	0
3#河豚鱼	肉	54.2
	肝	25.8
	皮	41.4
	卵巢	39.9
4#河豚鱼	肉	19.4
	肝	10.6
	皮	15.4
	卵巢	0

最低检出限: 4µg/kg

样本稀释液：如检测样本中河豚毒素的含量超出试剂盒可检测的最大值（**324ppb**），可用样本稀释液进行适当稀释后再进行检测，样本最终含量值需乘以对应的稀释倍数，稀释后的样本含量值应在标准曲线浓度（**0-162ppb**）范围内。

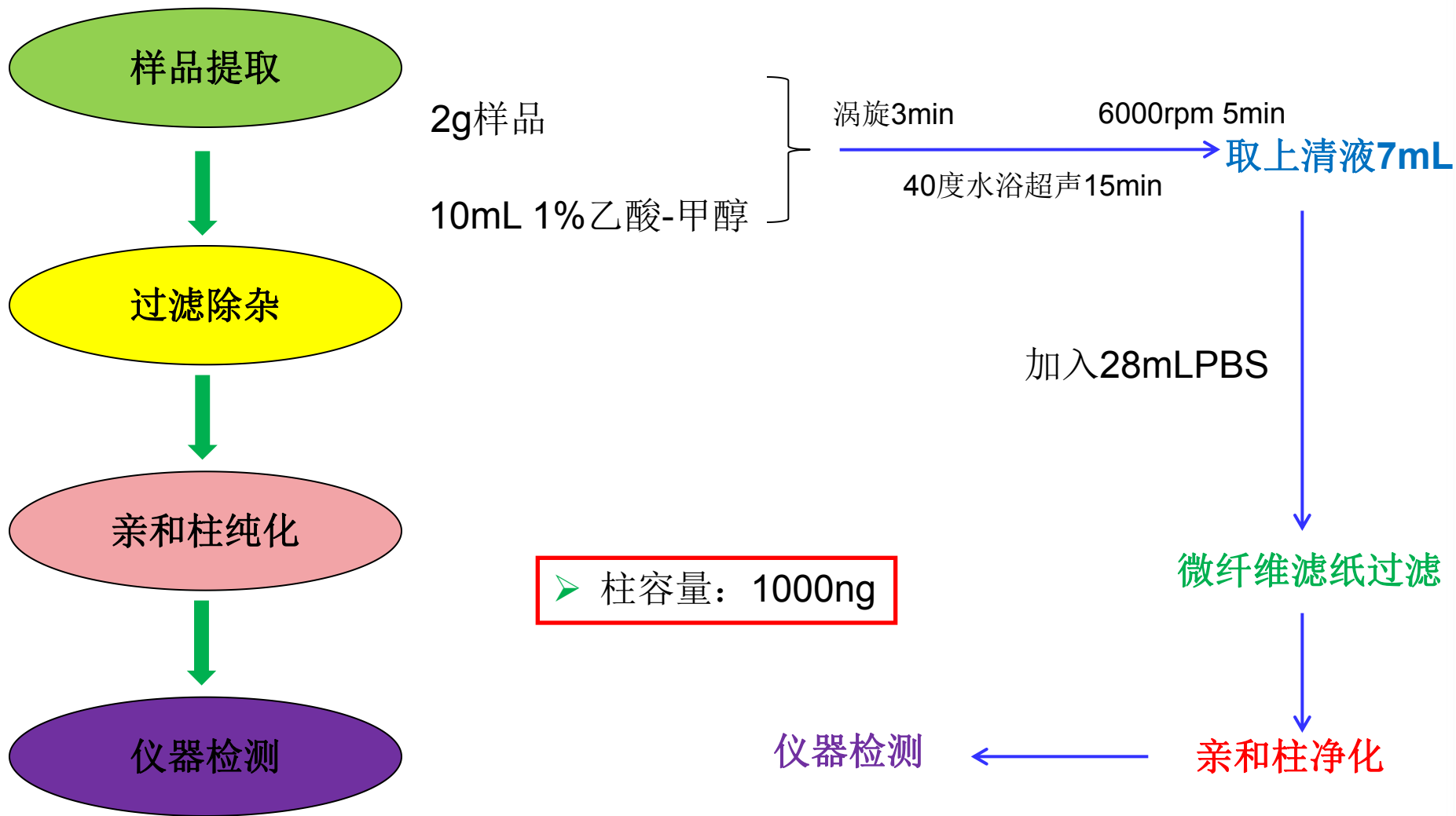


免疫亲和层析柱净化原理



- 称取2g样品，加入10mL 1%乙酸-甲醇溶液，涡旋振荡3min；
- 于40°C水浴超声提取15min；
- 冷却至室温后，于6000r/min离心5min；
- 取上清，7mL上清液加入28mL PBS溶液进行稀释 **【用适量的1N 氢氧化钠溶液调整pH值至7左右】**；
- 用玻璃微纤维滤纸过滤；
- 移取10mL滤液作为上样液检测。



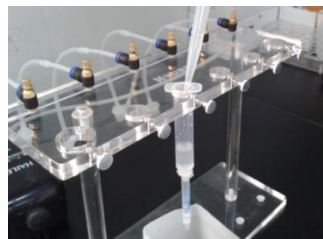




1. 安装针筒



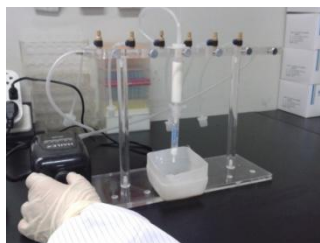
2. 连接



3. 上样



4. 去掉下方堵头



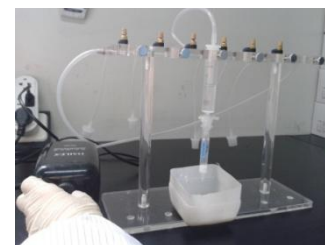
5. 流速1-2d/s



6. 排干



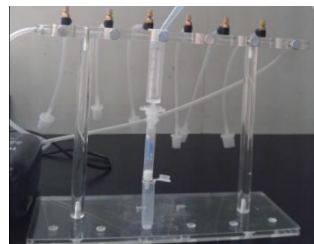
7. 水洗



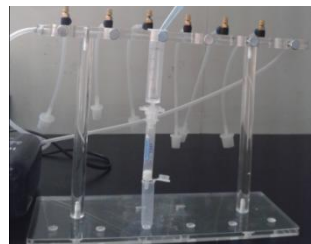
8. 流速(2-3) d/s



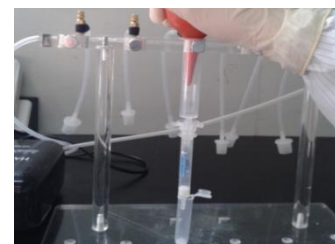
9. 排干



10. 2ml12%乙酸甲醇浸泡2min后洗脱



11. 2ml12%乙酸甲醇洗脱



12. 排干

## 色谱条件

- 色谱柱: **Amide柱, 2.1 mm×50 mm, 1.7 μm**
- 流动相: 流动相**A**为含有体积分数**0.1%**甲酸的**5 mmol/L**乙酸铵溶液

流动相**B**为乙腈, 梯度洗脱

- 流速: **0.3mL/min**
- 进样体积: **10uL**
- 柱温**40 °C**
- 样品室温度**10 °C**

表1. 梯度洗脱条件

序号	时间	流动相	
	/min	A/%	B/%
1	0.00	5	95
2	1.50	80	20
3	3.00	80	20
4	3.50	5	95





## 质谱条件

- 质谱条件：电喷雾离子源，正离子扫描（ESI+）
- 检测方式：多反应监测（MRM）
- 毛细管电压：3.0 kV
- 离子源温度：120 °C
- 脱溶剂气温度：380 °C
- 锥孔气流量：50 L/h
- 脱溶剂气流量：600 L/h

表2. 河豚毒素的质谱多反应监测实验条件

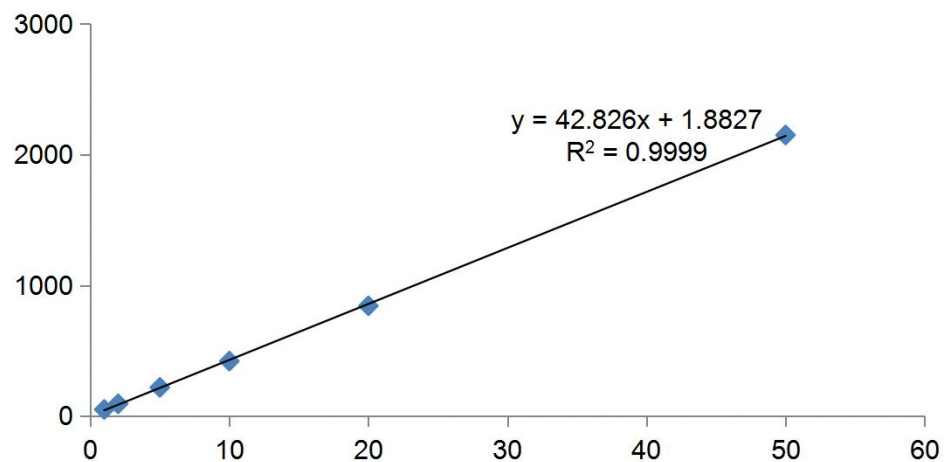
分析物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
河豚毒素	1.77	320	302*	45	25
			161.8		35

“\*” 为定量离子。

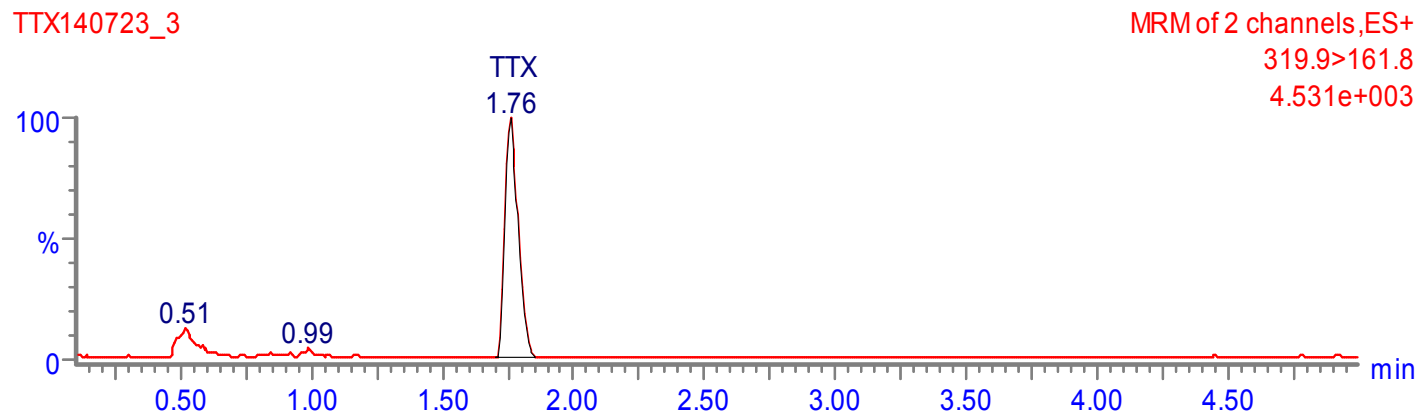
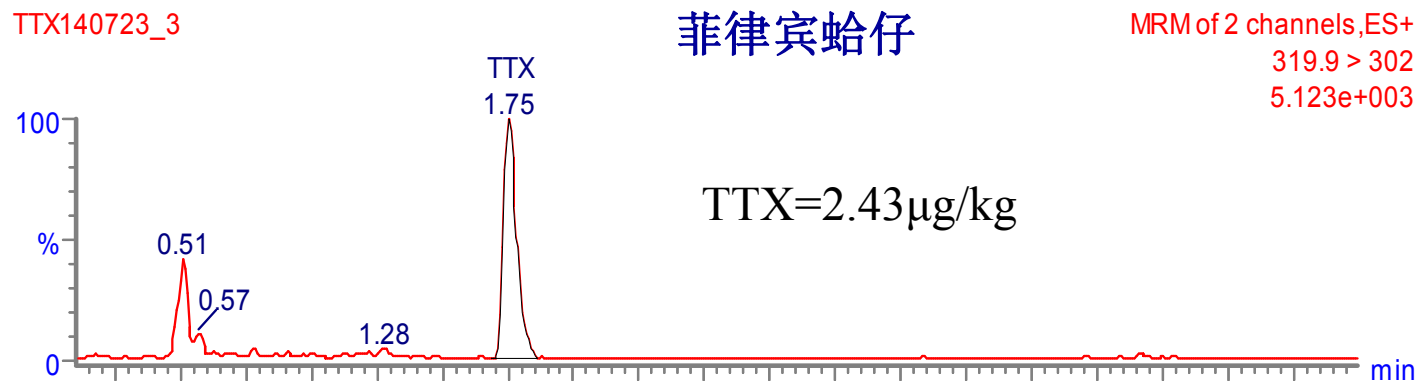
- 锥孔电压、碰撞能量、分析物母离子及子离子等质谱多反应监测实验条件如表2所示。

TTX浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	出峰时间	峰面积
1	1.75	51
2	1.75	94
5	1.76	220
10	1.75	421
20	1.75	844
50	1.76	2150

峰面积



## TTX检测应用实例

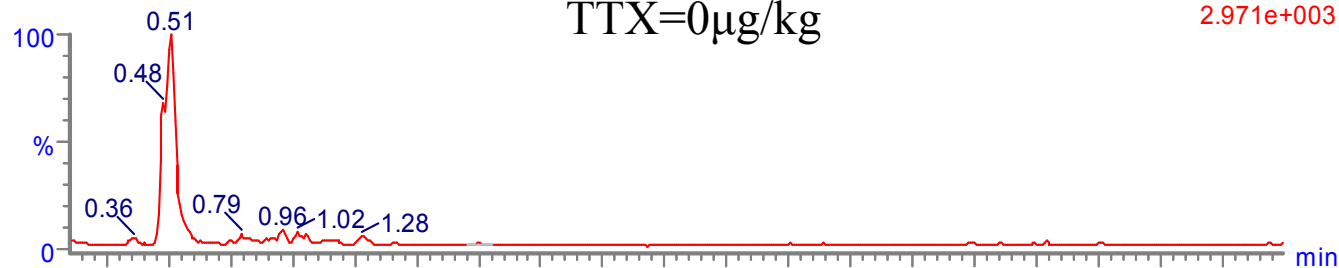


## 贻贝

TTX140723\_10

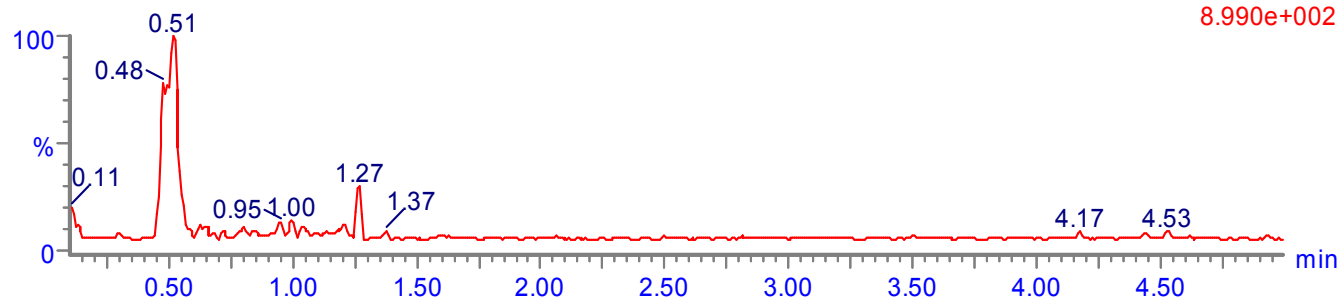
MRM of 2 channels, ES+  
319.9 > 302  
2.971e+003

TTX=0 $\mu$ g/kg

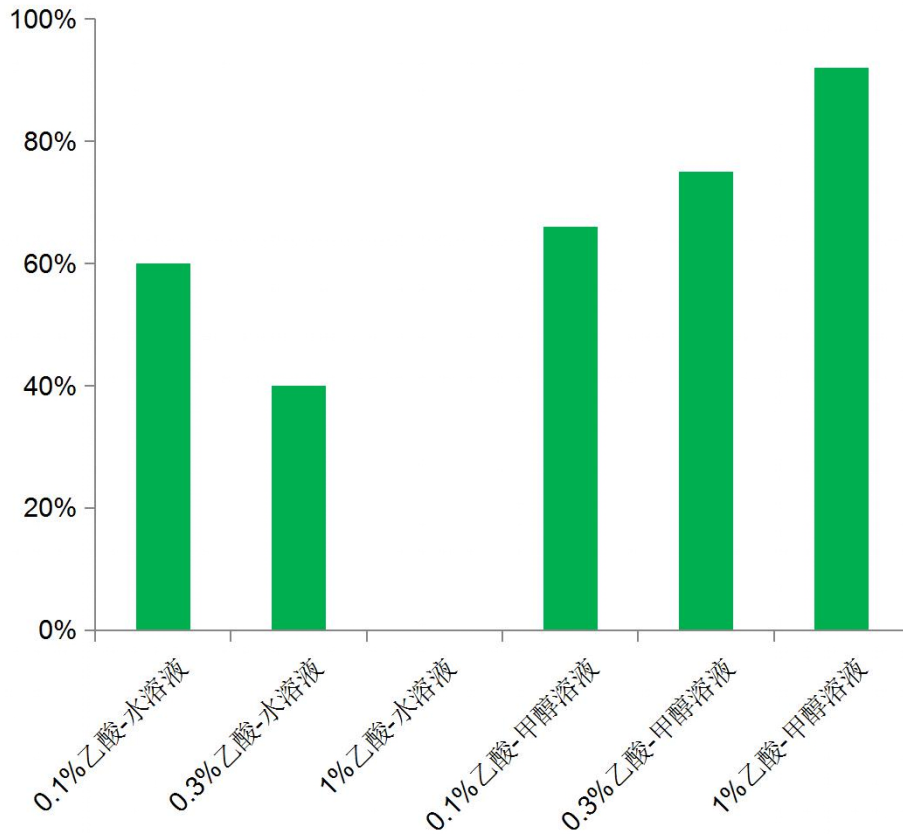


TTX140723\_10

MRM of 2 channels, ES+  
319.9 > 161.8  
8.990e+002



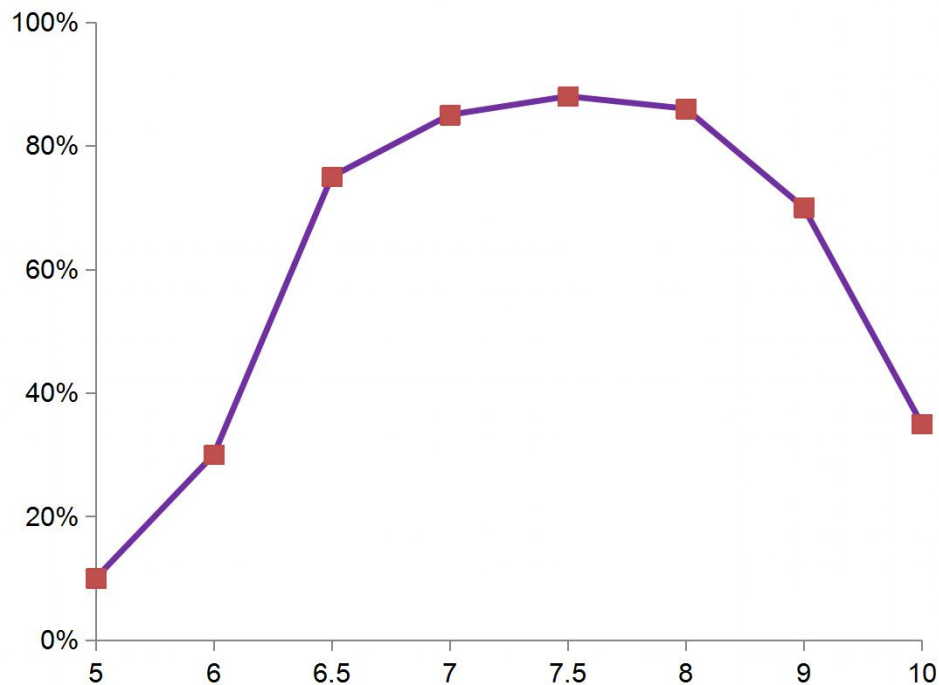
回收率



考察0.1%、0.3%、1%乙酸水溶液及0.1%、0.3%、1%乙酸甲醇溶液作为提取剂对回收的影响。

考察0.1%、0.3%、1%、2%、3%、5%的乙酸甲醇溶液作为提取液，当乙酸浓度 $\geq 1\%$ 后，回收率方面无显著性变化。

## 回收率



考察了上样液PH (5、6、6.5、7、7.5、8、9、10) 对回收率的影响

## 免疫亲和柱使用注意事项：

- 上样液PH为中性环境（7-8）
- 上样液流速控制：1-2滴/秒；洗脱液流速控制：1滴/秒
- 洗脱时建议加入2mL洗脱液静置浸泡2min后再开始洗脱
- 超过柱容量时，待测物质将不能被有效捕获，检测数据偏低；可加大稀释倍数后过免疫亲和柱富集

## 免疫亲和柱配套设备及耗材：



免疫亲和柱



标准品



气控操作架



玻璃纤维滤纸



- ◆ 坐落于江苏省无锡市高新开发区
- ◆ 专注于食品安全快速检测产品研发、生产、销售和服务。



- ◆ 始终坚持用最专业的产品、最优秀的团队和最完善的服务，服务于用户。
- ◆ 始终坚持“试剂领先”的核心战略，坚持设备为实际检测服务的理念，全方位提供政府和企业食品安全检测技术和整体解决方案。







**ELISA试剂盒**



**胶体金卡/条**



**免疫亲和柱**

## 中国水产科学研究院

水科质标函〔2016〕377号

### 快检产品现场验证结果（专家组）

#### 关于 2016 快速检测产

江苏美正生物科技有限公司  
 按照《农业部办公厅  
 快速检测产品推荐筛选  
 号）要求，我院于 10 月  
 组织开展水产品药物残留  
 验证，验证指标包括产品  
 性样品检出率和检测时间  
 见附件。

联系人及联系方式：

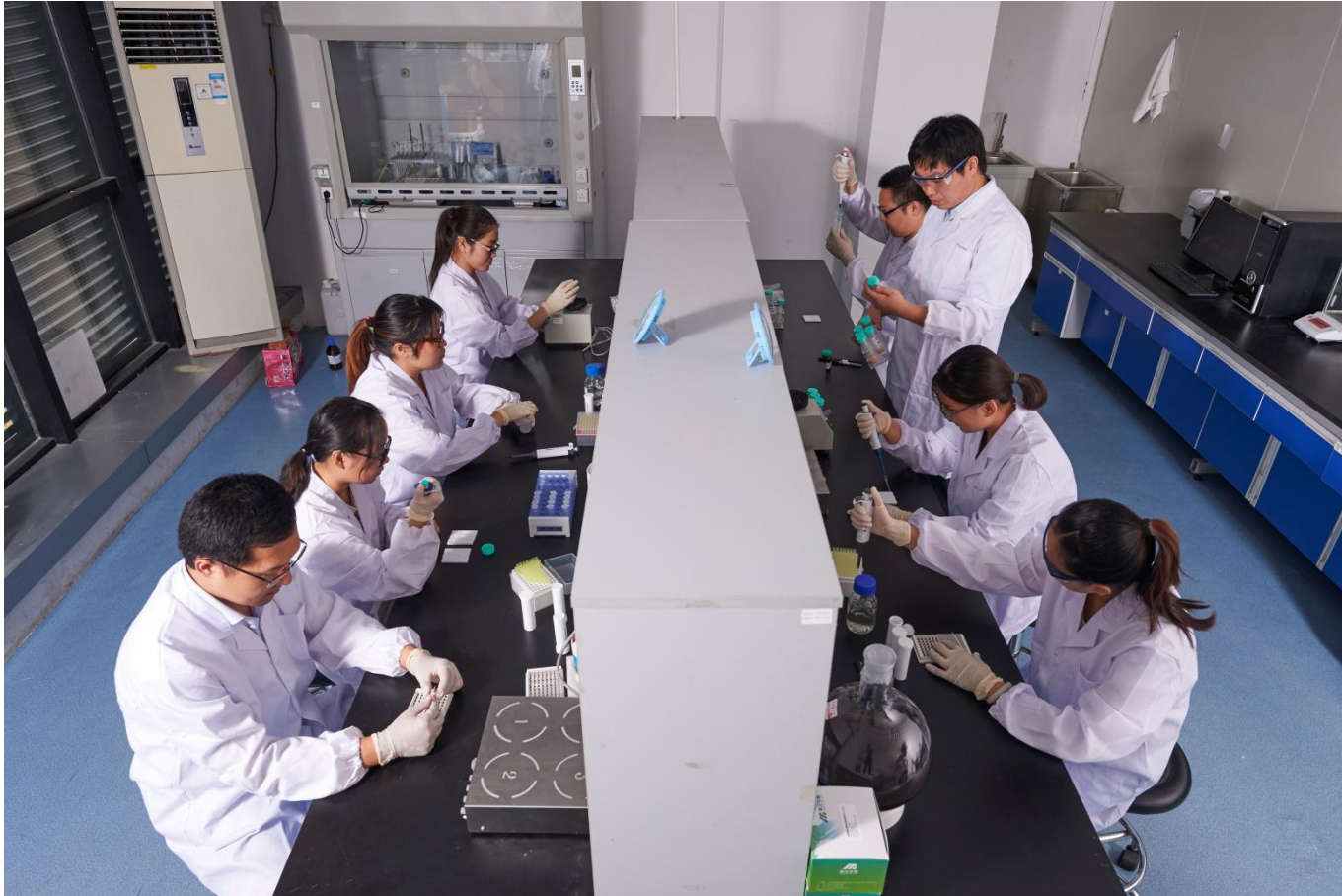
中国水产科学研究院

电 话：(010) 61

电子信箱：skyzbzx@126.com

序号	产品名称	产品标识 最低检出 限 $\mu\text{g}/\text{kg}$	现场验证 加标浓度 $\mu\text{g}/\text{kg}$	空白样品假 阳性率%		加标样品假 阴性率%		实际阳性样 品检出率%		检测用时 (min)		判定 结论
				批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	小批量样 品 (6 个)	总检测时 间(84 个)	
1	孔雀石绿快速检测试纸条	0.5	0.5	0	0	0	0	100	100	56	172	符合 要求
2	呋喃代谢物四合一快速检测试纸条 (AOZ)	0.5	0.5	0	0	0	0	100	100	102	333	符合 要求
3	呋喃代谢物四合一快速检测试纸条 (SEM)	0.5	0.5	0	0	0	0	100	100	102	333	符合 要求
4	呋喃代谢物四合一快速检测试纸条 (AMOZ)	0.5	0.5	0	0	0	0	100	100	102	333	符合 要求
5	呋喃代谢物四合一快速检测试纸条 (AMOZ)	0.5	0.5	0	0	0	0	100	100	102	333	符合 要求

## 博士领衔的科研团队



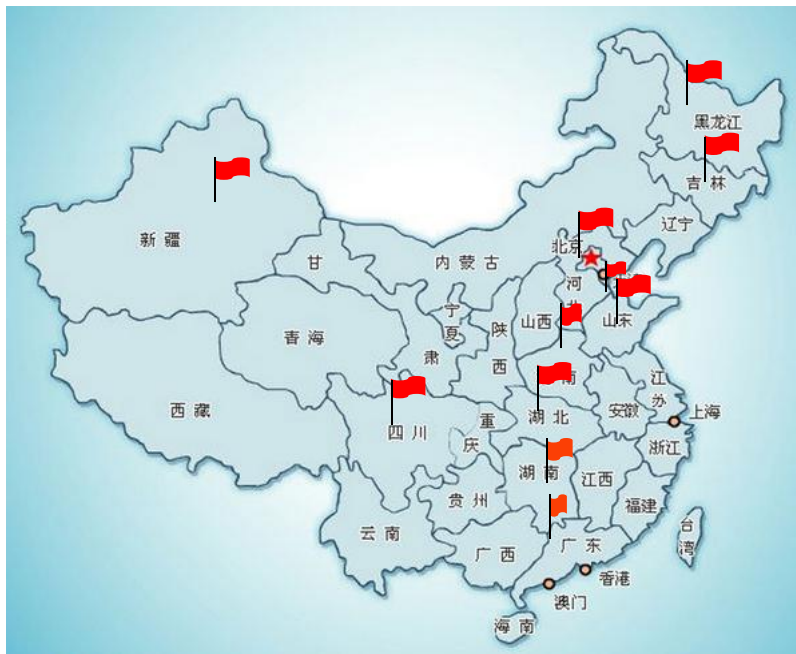
## 先进的研发实验室



符合GMP标准的生产车间







□一级实验室：无锡、长沙、北京

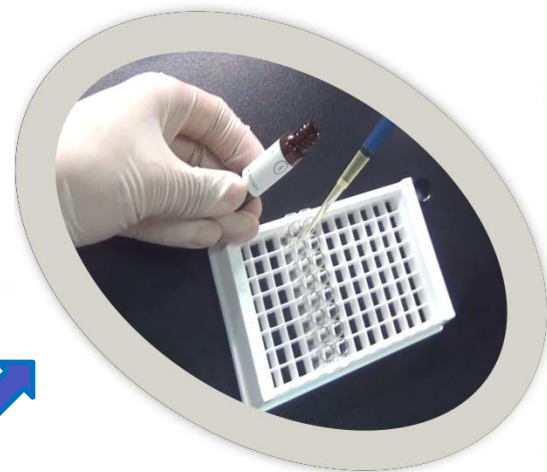
□二级实验室：济南、乌鲁木齐、哈尔滨、郑州、西安、深圳、成都、武汉、长春等

## □一级实验室：

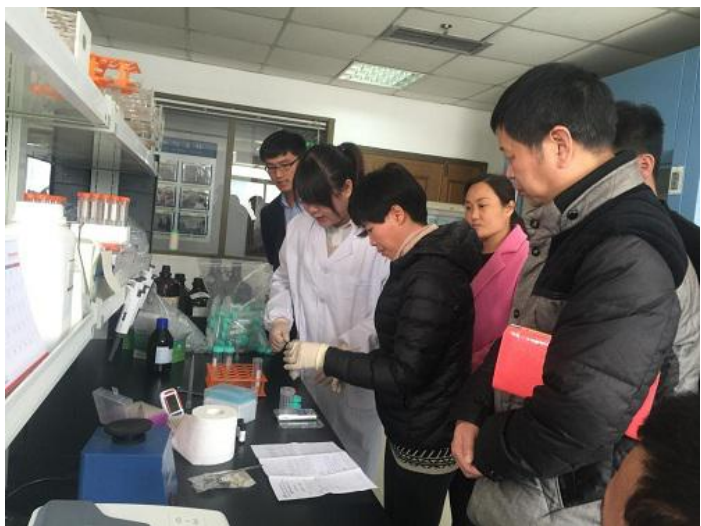
配备液相色谱等仪器，可进行样本的仪器法检测；配备各种快检仪器设备，可进行ELISA试剂盒、胶体金、理化试剂等检测。

## □二级实验室：

配备各种快检仪器设备，可进行ELISA试剂盒、胶体金、理化试剂等检测。



- 视频1：氯霉素快速检测卡操作视频
- 视频2：孔雀石绿快速检测卡操作视频
- 视频3：呋喃代谢物快速检测卡操作视频
- 视频4：盐酸克伦特罗ELISA试剂盒操作视频
- 视频5：





**感谢您的聆听！**

伦丽丽 18112376369 [lunlili@meizheng.net.cn](mailto:lunlili@meizheng.net.cn)