

## 特异性 Tetrodotoxin 亲和吸附微珠 的制备及其提取性能

陈树桥<sup>1</sup>, 赵清良<sup>1</sup>, 唐梓进<sup>2</sup>

( 1. 南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京 )

( 2. 江苏吴中大自然生物工程公司, 210097, 江苏, 南京 )

[ 摘要 ] 将横纹东方豚卵巢与醋酸乙醇溶液混合匀浆, 经离心、加热、沉淀、脱脂等处理, 制得粗提液, 活性炭吸附粗提液得到粗毒液, 以壳聚糖为载体合成亲和微珠分别来分离纯化粗提液和粗毒液, 用传统的小鼠生物法检测 TTX 毒素量。潮湿活性炭对 TTX 的吸附量约为 2  $\mu\text{g/g}$ , 潮湿亲和微珠吸附量约为 10  $\mu\text{g/g}$ , 亲和微珠吸附提取粗毒液, 回收率达 51%, 直接吸附粗提液, 回收率达到 80%, 同时蛋白也得到有效的去除。

[ 关键词 ] 河豚毒素, 壳聚糖微珠, 亲和吸附, 小鼠生物检测

[ 中图分类号 ] R318, [ 文献标识码 ] A, [ 文章编号 ] 1001-4616( 2005 )02-0092-04

## Studies on the Preparation and Characteristics of the Tetrodotoxin-Specific Adsorption Microspheres

Chen Shuqiao<sup>1</sup>, Zhao Qingliang<sup>1</sup>, Tang Zijin<sup>2</sup>

( 1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China )

( 2. Jiangsu Wuzhong Natural C. LTD, 210097, Nanjing, China )

**Abstract** The crude extraction of TTX by aceticacid-ethanol is obtained from the ovary of *Fugu oblongus*, then de-fatted with chloroform. The crude extraction of TTX is absorbed by activated charcoal and further purified by new kind of the affinity adsorption chitosan microspheres. The adsorption of tetrodotoxin is measured with the mouse bioassay. The adsorptive capacity of affinity adsorption chitosan microspheres reaches about 10  $\mu\text{g TTX/g}$  ( wet ), the recovery rate is about 51% and 80%, and the protein concentration is lowered about 3 and 4 times. The efficiency of purification and the recovery by affinity adsorption chitosan microspheres are higher than by the activated charcoal. The chitosan microspheres can be reused after regeneration.

**Key words** tetrodotoxin, affinity adsorption, chitosan microspheres, mouse bioassay

## 0 引言

横纹东方豚体内的河豚毒素( tetrodotoxin, TTX )是寄生的产毒菌在生长过程中所分泌并积累的一种非蛋白的神经毒素<sup>[1]</sup>, 具有极高的经济价值和医疗价值, 常用于镇痛、局麻、松弛肌肉痉挛, 国内外目前的临床应用有将毒素用于晚期癌症止痛, 效果良好, 且未见成瘾, 河豚毒素针剂可代替吗啡和杜冷丁用于治疗神经痛, 起效比吗啡、杜冷丁慢, 但镇痛持续时间可长达 12 ~ 24 h, 用于冬季皮肤痒症、痒疹、癣疥、皮炎等, 可以止痒而促进其痊愈, 对胃痉挛及其它肌肉痉挛有效, 对破伤风痉挛被认为是特效药, 可治疗气喘、百日咳、遗尿症、阳痿等; TTX 能特异性的阻断钠离子通道, 而对其它离子如钙和钾离子基本上无影响, 在生理研究上, 已成为机制研究的工具药, 为神经细胞膜研究必不可少的参照药物<sup>[2-4]</sup>。初期国内外学者多采用  $\text{Al}_2\text{O}_3$  柱层析、马铃薯及硅藻土混合的分配层析、硅藻土和活性炭混合的吸附层析、圆形滤纸层析、弱酸性阳离子交换树脂法提取和纯化

收稿日期: 2004-09-25.

基金项目: 江苏吴中大自然生物工程有限公司资助项目.

作者简介: 陈树桥, 1976—, 硕士研究生, 主要从事生物化学的学习与研究. E-mail: csq19760108@163.com

通讯联系人: 唐梓进, 1934—, 教授, 江苏吴中大自然生物工程有限公司总工程师, 主要从事生物化学的研究. E-mail: njtjz@jlonline.com

TTX 现在采用 HPLC 与离子交换树脂相结合、微滤、超滤、纳滤和反渗透等多种前沿膜分离技术、微生物发酵与超滤的技术相结合等提取高纯度的河豚毒素<sup>[5-8]</sup>,以上操作较为复杂,回收率较低.我们以壳聚糖为材料,制备了机械强度较好的壳聚糖微珠,并以壳聚糖微珠为载体、物质 A 为配基,合成了直径为 100 ~ 200  $\mu\text{m}$  的 TTX 亲和吸附微珠,进行 TTX 的分离纯化,迄今未见有关此类研究报道.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

(1) 试验试剂:壳聚糖(B.R),小牛标准血清白蛋白(BSA),TTX 标准品(购自河北省水产研究所),其它所用试剂均为分析纯或生化试剂.

(2) 实验仪器:TU-1800 紫外可见分光光度计,扫描电子显微镜 JSM-5610LV(SEM),Consd24 型真空冷冻干燥机.试验动物:体重  $20 \pm 1\text{g}$  左右的雌雄健康昆明种小鼠(购自南京医科大学动物实验中心),横纹东方豚卵巢(购自江苏扬中市).

### 1.2 方法

(1) 蛋白质含量测定根据考马斯亮蓝 G250 法<sup>[9]</sup>测定.

(2) 小鼠生物曲线的制作和毒素含量的计算表示.

按文献[10]和[11]的方法,稍作修改,绘制如图1的小鼠生物曲线,预实验确定试验浓度.用5只体重20g左右小鼠,分别腹腔注射0.4mL TTX 液,观察并记录死亡时间,求取死亡时间平均值,由平均死亡时间结合小鼠生物曲线求出毒素含量,并计算毒素总量.

(3) TTX 亲和微珠的制备.

将一定量的干壳聚糖粉溶于适量的2%乙酸中搅拌混匀,静置1d后离心取其上清液,将上清液抽真空脱去其中的空气泡,用10%的NaOH溶液调节上清液pH值至出现大量灰白色沉淀.离心弃上清,收集沉淀,取少量沉淀进行常规水分测定.将液体石蜡等四种液体以一定比例均匀混合作为有机相,取120mL有机相放入圆底烧瓶中,再取一定量的表面活性剂tween-60加入有机相中,在40℃水浴中1000r/min搅拌20min,然后加入15mL的含致孔剂和羧甲基壳聚糖的壳聚糖乙酸溶液,1500r/min搅拌60min,使其充分分散为均匀的小液滴.将水浴温度升至55℃,1500r/min搅拌0.5min,加入20mL5%的NaOH溶液调节体系的pH至微碱性.5min后500r/min搅拌,溶液颜色由浅黄变为乳白,最后变为深褐色时,停止搅拌.将溶液通过250目的尼龙膜过滤,用四氯化碳洗涤有机杂质,再用乙醚除去四氯化碳,最后用蒸馏水冲洗多次,得到棕褐色壳聚糖微珠.壳聚糖微珠加适量蒸馏水,在25%戊二醛存在下,加入配基A,常温搅拌24h,获得的产物再与 $\text{KBH}_4$ 在碱性条件下搅拌反应,将残存的醛基还原为羟基,水洗后放入0.1mol/L的盐酸中,浸泡40min左右,除去致孔剂,然后水洗至中性制得TTX亲和微珠.取部分湿的亲亲和微珠,室温干燥后备用.扫描电镜观察鉴定(图2、3).

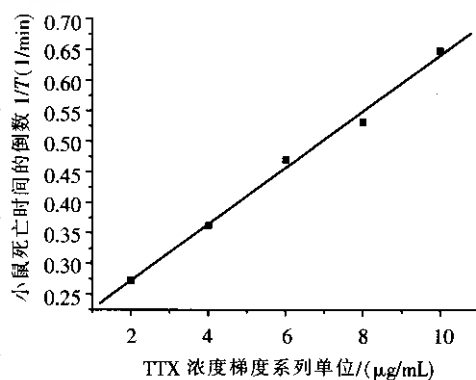


图1 小鼠生物曲线

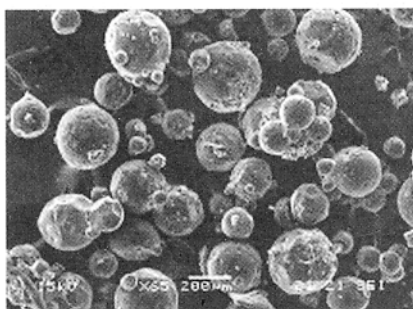


图2 局部微珠扫描电镜照片

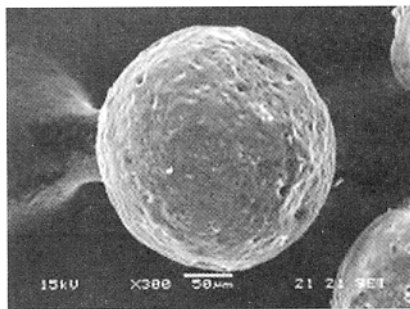


图3 单个微珠扫描电镜照片

(4) TTX 亲和微珠机械强度的测定<sup>[12]</sup>.

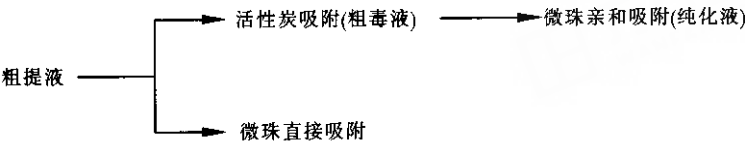
将一定粒数的壳聚糖微珠放入烧杯,加入适量蒸馏水,搅拌8h,转速为2000r/min,根据微珠破碎的数目万方数据

多少计算完好率,测其搅拌稳定性,取另一一定粒数的微珠放入离心管中4 000 r/min离心30 min,计算完好率,方法同上,测其离心稳定性。

完好率(%) = 未破碎微珠数目 / 总微珠数目 × 100%

(5) TTX 分离纯化的步骤。

取横纹东方豚卵巢500 g,捣碎后,加入3倍体积的0.1%醋酸70%乙醇液一起匀浆抽提毒素,匀浆液经3 000~4 000 r/min离心20 min,沉淀物再用以上方法重复抽提2次。合并2次抽提液,将抽提液置于80℃水浴锅中不断搅拌,30 min后室温冷却,4 000 r/min冷冻离心20 min,取上清液,将适量无水乙醇加入到上清液中搅拌沉淀蛋白,再次离心取上清,减压浓缩去除乙醇。用少量氯仿进行多次脱脂,除去氯仿后制得80 mL液体,称此为TTX粗提液。小鼠试验检测毒素含量,考马斯亮蓝法测残存蛋白,4℃储存备用,然后分离纯化。



活性炭处理毒素制取粗毒液<sup>[10]</sup>,真空减压浓缩到20 mL,用考马斯亮蓝法测残存蛋白,小鼠试验检测毒素含量。

TTX亲和微珠进行湿法装柱,用pH 8.6的氨水充分平衡亲和吸附柱,再用蒸馏水大量冲洗亲和吸附柱。将TTX粗毒液20 mL稀释5倍后,每次上样20 mL,流速为1 mL/min,用2倍柱体积蒸馏水冲洗未被吸附的TTX并收集流出液,检测流出液中毒素含量,计算毒素通过亲和吸附存在于微珠上的量。然后改用pH 4.0的醋酸溶液洗脱,流速为1 mL/min,结合小鼠试验检测,收集有毒性的部分,测定毒素含量。将吸附后的微珠用75%乙醇冲洗后,再用蒸馏水水洗多次至中性,按上述吸附试验的方法多次做吸附试验,确定吸附量及回收率的差异。收集合并洗脱收集的毒素,减压浓缩到20 mL,检测毒素含量。将粗提液5 mL稀释后进行亲和吸附,方法同上,比较活性炭和TTX亲和微珠吸附能力的差异。

(6) 纯化液的处理<sup>[5-8]</sup>。

用5%的氨水调节纯化液至pH9.0以上,放置于低温冰箱中,静置1周后出现白色沉淀,将沉淀物真空冷冻干燥得TTX冻干粉,取TTX冻干粉溶于少量5%醋酸中溶解,滤除不溶物,重复以上操作多次,可以得到较纯的TTX。

2 结果

2.1 小鼠生物曲线：

$Y = 0.1803 + 0.04605x$   $R = 0.99677$

X轴为TTX浓度,Y轴为平均死亡时间倒数,R为相关系数。

2.2 TTX亲和微珠的部分理化性质

TTX亲和微珠直径为大约100~200 μm左右,形状多为球形及椭球形,粒度分布较均匀,有少量拖尾和碎片,在微珠表面存在许多空隙、凹槽、沟道及微孔,这种表面结构十分有利于吸附。在转速为2 000 r/min的情况下,搅拌TTX亲和微珠8 h,完好率达到90%,说明微珠有较好的机械强度,离心干燥微珠几乎无破碎,进一步说明其较好的稳定性。

2.3 TTX分离纯化结果

将活性炭吸附粗提液得到的粗毒液再经TTX亲和微珠的吸附,进一步分离纯化,或用TTX亲和微珠直接吸附粗提液,其结果比较见表1、2。

表1 活性炭处理粗提液与TTX亲和微珠分离提纯粗毒液的比较

测试液	体积/mL	毒素量/mg	回收率/%	残存蛋白/mg
粗提液	20	1.5	1	0.104
粗毒液	20	0.9	60%	0.053
纯化液	20	0.765	51%	0.016

表2 活性炭与 TTX 亲和微珠吸附粗提液的比较

分离介质	吸附量/ $\mu\text{g/g}$	毒素量/mg	回收率/%	残存蛋白/mg
湿活性炭	2	0.9	60%	0.053
湿珠	10	1.2	80%	0.024

从表1和表2的数据可以看出,活性炭吸附量低于 TTX 亲和微珠吸附量,TTX 亲和微珠提纯粗毒液,回收率达51%,残存蛋白少,与活性炭可吸附蛋白有关;TTX 亲和微珠直接处理粗提液,回收率达80%,残存蛋白相对于处理粗毒液稍高。

2.4 壳聚糖微珠非特异性吸附

同1.2.3法制得无配基A的壳聚糖微珠,进行吸附TTX试验。结果表明,没有A配基存在的壳聚糖微珠,对TTX几乎无特异性吸附。另外TTX亲和微珠分离提纯TTX具有操作稳定性,在相同试验条件下,经7~8次重复使用(1次/2d),吸附力没有下降,符合亲和吸附剂的要求。

3 讨论

横纹东方豚卵巢经0.1%醋酸70%乙醇抽提,离心,80℃水浴加热,无水乙醇沉淀蛋白质等操作除去可绝大部分的蛋白,再经过活性炭吸附和微珠亲和吸附后,残存蛋白被进一步除去,但同时毒素损失较多,如果用微珠直接处理粗提液,回收率显著提高。微珠对TTX的吸附量达到10 $\mu\text{g/g}$ (湿壳聚糖亲和吸附微珠),且步骤简单,避免了提取过程中毒素的损失,为河豚毒素的大规模提取及药用价值的开发提供了实践支持。在整个操作过程中不使用常用的抽提试剂(如甲醇等),使用乙醇,相对比较安全和经济。粗提液中若残存蛋白太多可用无水乙醇多次沉淀,对于毒素回收率几乎无影响。纯化液中的残存蛋白是否可通过再一次上柱分离纯化或者结晶而减少,能否联合其它分离方法而提高TTX的纯度和回收率,亲和吸附的吸附和洗脱条件有没有更佳的等问题有待今后进一步研究。

根据TTX的分子结构中含有一个碳环,一个胍基,六个羟基,具有较强的极性,pKa值为8.76,呈弱碱性<sup>[13]</sup>等特点,选择配基A合成了亲和微珠,目前针对于TTX而合成亲和吸附微珠未见报道。本法具有制备简单、原料成本低、机械强度较高,有很好的应用前景。在纯化TTX过程中,对TTX的特异性吸附较强,可较大幅度地提高河豚毒素的回收率,同时也能有效地除去一些蛋白质,可重复使用多次。实验也表明,不含配基A的微珠对TTX不具有吸附性。

[参考文献]

[1] 李秋芬,徐怀恕.河豚毒素(TTX)及其微生物起源[J].海洋通报,1994,13(4):86—91.  
[2] 于丽华,周和.河豚毒素对小鼠镇痛作用的实验研究[J].山东医科大学学报,1999,37(2):120—121.  
[3] 高凌云.河豚毒素的局麻作用[J].中国海洋药物,1991,39(3):20—21.  
[4] Syoshida. Tetrodotoxin-resistant sodium channels[J]. Cell Mol Neurobiol,1994,14(3):227—44.  
[5] 潘心富.从河豚卵巢分离提取河豚毒素[J].海洋药物,1982,(4):56—60.  
[6] 郭慧清,李锦文,黎玉政,等.联合采用吸附树脂与离子交换树脂提取河豚毒素[J].广州师范学院学报(自然科学版),1997(2):60—63.  
[7] Hsieh Y W, Shiu Y C, Cheng C A *et al.* Identification of toxin and fish species in cooked fish liver implicated in food poisoning[J]. Food Chemistry and Toxicology, 2002, 67(8):948—952.  
[8] Noguchi T, Hashimoto Y. Isolation of Tetrodotoxin from a goby *Gobius criniger*[J]. Toxin, 1973, 11(3):305—307.  
[9] 张龙翔.生化试验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1997.138—140.  
[10] 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):90—94.  
[11] 陈玉仁.河豚毒素含量测定的三种不同方法及比较[J].海洋药物,1986(3):33—37.  
[12] 李艳利,史永昶,姜涌明,等.壳聚糖多孔珠的制备及其作为亲和吸附剂载体的研究[J].药物生物技术,1998,5(4):241—244.  
[13] Woodward R B. The structure of tetrodotoxin[J]. Pure Appl Chem, 1964(9):49—74.

[责任编辑:孙德泉]