

菊黄东方鲀卵黄蛋白原肽段 vWD 的真核重组表达及功能研究

蒋彩云¹, 乔琨², 许旻², 陈贝², 刘智禹^{2,3}, 黄文树^{1,3}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013; 3. 福建省海洋生物资源开发利用协同创新中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 河鲀的卵黄蛋白原可能参与河豚毒素(TTX)的体内转运过程。为了探讨该机理,建立了毕赤酵母真核表达系统,成功地表达了菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*)卵黄蛋白原的vWD结构域肽段(rTF_vWD),并采用Biacore-表面等离子体共振(SPR)系统检测了rTF_vWD与TTX的亲和力,以及腹腔注射小鼠验证rTF_vWD对TTX毒力的中和作用。结果表明:rTF_vWD与TTX的平衡解离常数(K_D)为3.1 mmol/L;将TTX与rTF_vWD共孵后肌肉注射小鼠,2 h内小鼠的死亡率显著下降,表明TTX与rTF_vWD结合后,TTX的毒性降低了。

[关键词] 河豚毒素;菊黄东方鲀;卵黄蛋白原肽段vWD;毕赤酵母;表面等离子体共振;中和作用

[中图分类号] Q 786

Eukaryotic Recombination Expression and Functional Study on Vitellogenin Peptide vWD from *Takifugu flavidus*

JIANG Caiyun¹, QIAO Kun², XU Min², CHEN Bei², LIU Zhiyu^{2,3}, HUANG Wenshu^{1,3}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Cultivation and High-Value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China;

3. Fujian Collaborative Innovation Center for Exploitation and Utilization of Marine Biological Resources, Xiamen 361021, China)

Abstract: Vitellogenin of pufferfish may be involved in the *in vivo* transport of tetrodotoxin (TTX). In order to explore this mechanism, the eukaryotic expression system of the vitellogenin vWD domain peptides(rTF_vWD) of *Takifugu flavidus* in *pichia pastoris* was established and the target recombinant protein was successfully expressed in this study. The affinity between rTF_vWD and TTX was determined by using Biacore-surface plasma resonance(SPR) system. Intraperitoneal injection of mice was used to verify the neutralization of rTF_vWD and TTX *in vivo*. The results showed that the equilibrium dissociation constant (K_D) of rTF_vWD and TTX was 3.1 mmol/L; When TTX and rTF_vWD were co-incubated and then intraperitoneally injected into mice, the mortality of mice within 2 h was significantly reduced, indicating that the toxicity of TTX was reduced combined with protein *in vitro*.

[收稿日期] 2020-07-14

[基金项目] 福建省种业创新与产业化工程项目(2017FJSCZY03);福建省海洋渔业结构调整专项(2017HYJG07, 2017HYJG08);2019年度福建省海洋经济发展专项;省属公益类科研院所专项(2020R1013008)

[作者简介] 蒋彩云(1993—),女,硕士生,从事水产动物免疫学方向研究。通信作者:黄文树(1973—),男,教授,从事水产动物免疫学、水产动物疾病防控研究。E-mail:wshuang@jmu.edu.cn

Keywords: tetrodotoxin; *Takifugu flavidus*; vitellogenin peptide vWD; *Pichia pastoris*; SPR; Neutralization

0 引言

大多数的河鲀都含有河豚毒素 (tetraodotoxin, TTX), TTX 是一类毒性极强的非蛋白类神经毒素^[1], 它可以选择性地与肌肉和神经组织中的电压门控 Na^+ 通道结合, 从而封闭神经轴突传导能力, 导致进行性瘫痪, 甚至使生物因呼吸和心力衰竭而死亡^[2]。TTX 对小鼠的半数致死量 (LD50) 约为 $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ (按小鼠体重计), 对人的最小致死剂量只有 $0.5 \sim 1.0 \text{ mg}$ ^[3], 其毒性是氰化钠的 1 250 倍^[4], 但目前还没有对 TTX 中毒治疗的特效药。由于河鲀肉味鲜美、营养丰富, 日本、澳大利亚、孟加拉国、中国素有食用河鲀的习惯; 然而, TTX 的化学性质稳定, 一般烹调手段难以破坏^[5]; 因此, 人们因食用河鲀而导致 TTX 中毒的事件, 屡有发生, 严重威胁人们的生命安全^[6-8]。

四齿鲀科的许多河鲀都可以贮积 TTX。野生河鲀可通过食物链的毒素富集作用, 大量贮积 TTX 于特定组织, 如肝脏、卵巢和皮肤等^[9]。养殖的无毒的红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 和星点东方鲀 (*Takifugu niphobles*), 若饲喂含 TTX 的饵料后, 其肝脏、卵巢和皮肤中也可累积 TTX^[10-11]。对野生斑点东方鲀 (*Takifugu poecilonotus*) 进行研究发现, 在性成熟期 (12 月至 3 月), 随着性腺指数 (gonadosomatic index, GSI) 的升高, 卵巢中的 TTX 毒性含量增加, 与此同时, 肝脏中的 TTX 含量显著降低^[12], 提示河鲀体内的 TTX 可通过组织间转运从肝脏转移到卵巢。为了探究 TTX 组织间转运机制, Yin 等^[13]提取和纯化了豹纹东方鲀 (*Takifugu pardalis*) 卵巢中的高分子量物质, 获得分子质量为 10 ku 左右的毒素结合蛋白 (TPOBP-10), 通过 Edman 法为其氨基酸测序, 并进行 cDNA 克隆, 结果显示该蛋白与红鳍东方鲀的卵黄蛋白原 vWD 结构域 (vitellogenin subdomain, vWF type D) 高度同源, 提示卵黄蛋白原肽段 vWD 可能具有结合 TTX 的功能, 进而参与 TTX 在河鲀卵巢中的富集作用^[13]。然而, 卵黄蛋白原肽段 vWD 是否可结合 TTX, 是否可中和 TTX 的毒性, 目前仍缺少相关的证据。

为此, 本研究采用真核表达系统体外重组表达菊黄东方鲀 (*Takifugu flavidus*) 中卵黄蛋白原 vWD 结构域肽段, 并采用 Biacore - 表面等离子体共振 (SPR) 检测重组蛋白结合 TTX 的能力, 并进一步研究重组蛋白对 TTX 毒性的中和作用, 为阐明 TTX 从肝脏转移到卵巢的机制积累重要基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

菌株: *E. coli* DH5 α 感受态细胞为本实验室保存, 毕赤酵母菌株 GS115 购自 Invitrogen 公司; 质粒: pMD19-T-TF_vWD 克隆质粒为本实验室保存, 表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; 实验动物: 19.0 ~ 21.0 g 的无特定病原体级 (SPF) ICR 品系雄性健康小鼠, 由厦门大学实验动物中心提供。

1.1.2 实验试剂

胰蛋白胨 (tryptone)、酵母粉 (yeast extract) 购自 OXOID 公司; 生物素购自上海生工生物公司; 无氨基酵母氮源 (YNB) 购自 Difco 公司; DL2000 DNA Maker (3427A)、Ex Taq 酶试剂盒、EcoR I 和 Not I 限制性内切酶、核酸共沉剂试剂盒、T4 DNA ligase 均购自 TaKaRa 公司; 预染蛋白质分子质量标准 Marker (DM131-01) 购自北京全式金生物公司; DL10 000 DNA Marker (SM0331) 购自赛默飞世尔科技有限公司; His-Tag 抗体 ($6 \times \text{His}$, His-Tag Antibody)、羊抗鼠二抗 (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)) 购自 Proteintech 公司; 河豚毒素粗品 (C11H17N3O8, 纯度 $\geq 98\%$) 购自泰州康特生物工程有限公司; HisTrapTM FF Crude 5mL 亲和层析柱、氨基偶联试剂盒 (氢氧化钠、乙醇胺、醋酸钠缓冲液 (pH=4.0, 4.5, 5.0, 5.5)、NHS (*N*-羟基马来酰亚胺)、EDC-HCl (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 等)、甘氨酸-盐酸 (pH=2.0), 以及传感生物芯片 CM5 均购自美国 GE Healthcare Life Sciences 公司; PBS 缓冲液 (pH=7.4) 由本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 pPIC9K – TF_vWD 载体的构建

根据菊黄东方鲀 TF_vWD 蛋白质编码基因 (GenBank 登录号: MT160192), 采用 Primer Premier 6.0 软件设计上下游引物。上游引物为 TF_vWD – F: 5' – GGGGAATTCACCACCTTCAACGACATCA – 3'; 下游引物为 TF_vWD – R: 5' – ATGCGGCCGCTCAATGCTGATGCTGATGATGCCCCGTTGGGCATACGGA – 3'。下划线部分为限制性内切酶 EcoR I 和 Not I 的酶切位点, 终止密码子前为 6 × His 标签 (如加粗部分)。引物合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

以菊黄东方鲀 pMD19 – T – TF_vWD 阳性质粒 (本实验室保存) 为模板, 分别以 TF_vWD – F 和 TF_vWD – R 为上、下游引物, 采用 Ex Taq © 酶扩增目的基因片段, 获得含有酶切位点的 TF_vWD 目的基因片段。使用 EcoR I 和 Not I 限制性内切酶进行双酶切, 同时对 pPIC9K 载体质粒进行 EcoR I 和 Not I 双酶切, 用核酸共沉剂试剂盒按照说明书回收酶切后的目的基因片段及载体。采用 T4 DNA ligase 于 16 °C 下将具有 EcoR I 和 Not I 黏性末端的 pPIC9K 载体与具有相同黏性末端的 TF_vWD 基因片段连接, 转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 涂布于含有卡那霉素的 LB 琼脂平板上进行抗性筛选, 用 PCR 法鉴定阳性克隆菌, 交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成测序。根据测序结果, 将已构建成功的阳性菌株 –80 °C 保存于终体积分数为 20% 的甘油中备用。

真核表达载体的构建过程如图 1 所示, 分泌型表达载体 pPIC9K 的 N 端含有 AOX 1 启动子, 利用酵母信号肽 α-factor 因子引导 TF_vWD 分泌表达, 其 C 端加入 6 × His 标签, 可以通过 Ni⁺ 亲和层析纯化目的蛋白。

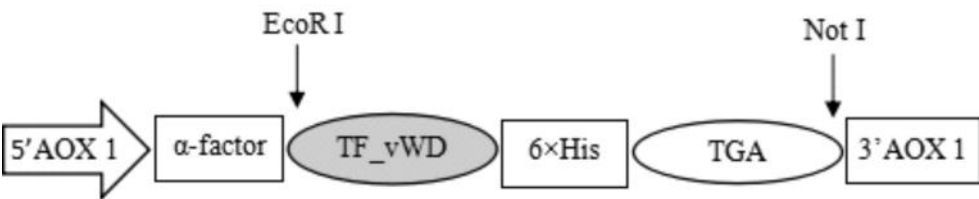


图 1 pPIC9K–TF_vWD 重组质粒载体的示意图
Fig.1 Schematic diagram of the recombinant plasmid vector of pPIC9K–TF_vWD

1.2.2 pPIC9K – TF_vWD 载体的转化

将测序正确的 pPIC9K – TF_vWD 菌株进行培养并提取质粒, 通过 Sac I 限制性内切酶对其线性化。用核酸共沉剂对酶切产物进行纯化, 通过电击法将线性化的质粒转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 并立即将转化液涂布于 MD 平板上, 放入培养箱 (28 °C) 中培养 2 ~ 3 d, 随机挑取 MD 平板上的单克隆菌落接种于 YPD 平板培养。

1.2.3 TF_vWD 重组蛋白的表达与纯化

挑取 YPD 平板上 GS115 单菌落接种于 20 mL BMGY 培养基中, 然后放入培养箱 (28 °C)。以 230 r/min 摇菌至 600 nm 波长下 OD 值为 4 ~ 6 时, 2000g 离心 10 min 收集细胞, 再加入 20 mL BMMY 培养基。比较在 pH = 7.0、诱导甲醇体积分数为 0.5%、不同诱导时间 (0, 12, 24, 48, 72, 96 h) 下重组蛋白的表达量 (每隔 24 h, 补加 0.5% 的甲醇)。利用 SDS-PAGE 对 TF_vWD 重组蛋白 (rTF_vWD) 的表达量进行分析, 其余表达菌液的上清, 经 PBS 透析缓冲液透析 3 次, 每次 24 h, 经 0.45 μmol/L 膜抽滤收集上清液并用 Ni⁺ 亲和层析柱纯化。

按照 GE 公司的 HisTrapTMFF crude 亲和层析柱操作说明书进行纯化: 用 5 ~ 10 倍体积超纯水清洗层析柱, 用 5 ~ 10 倍柱体积的平衡缓冲液平衡 HisTrap 层析柱; 将过滤后的蛋白液上柱, 用 3 ~ 5 倍柱体积的平衡缓冲液平衡过柱, 洗去未结合的杂蛋白; 用洗脱缓冲液过柱, 5 ~ 10 倍柱体积, 洗脱目标蛋白; 收集洗脱峰, 取少量洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳鉴定 rTF_vWD 的纯度, 并以 Mouse Anti – 6His Tag 为一抗, 进行 Western Blot 鉴定。

1.2.4 rTF_vWD 与 TTX 的亲合力检测

1) pH 筛选 使用 Biacore T200 系统中的控制软件 (Biacore T200 Control Software) 进行表面等离子体共振 (SPR) 分析 TTX 与 rTF_vWD 的相互作用。在将 rTF_vWD 固定在传感器芯片 CM5 上之前, 筛选合适的结合缓冲液的 pH 值, 以 PBS 缓冲液为工作缓冲液, 用 10 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 值分别为 5.0、4.5 和 4.0) 稀释 rTF_vWD 至终质量浓度为 30 μg/mL。进样完成后选取偶联量最大的 pH 值进行后续实验, 每次进样后用 50 mmol/L NaOH 再生表面。

2) rTF_vWD 在 CM5 传感片表面的偶联 系统设置将 EDC 和 NHS 以 1:1 比例进行混合, 活化传感器芯片 CM5 表面, 再进样 30 μg/mL rTF_vWD 重组蛋白溶液 (用 pH = 4.0 的醋酸钠缓冲液配制, pH 条件根据上述实验筛选所得), 最后以 1 mol/L 乙醇胺盐酸封闭液封闭活化的芯片表面。

3) rTF_vWD 与 TTX 的动力学分析 用 PBS 缓冲液分别稀释 TTX 粗品浓度至 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 μmol/L, 依次通入到传感芯片上进行测量, 在每次测量后以 pH = 2.0 的甘氨酸进行洗脱。本实验在 25 ℃ 下进行, 利用 Biacore Evaluation Software 评估软件从结合和解离曲线计算出 rTF_vWD 与 TTX 的平衡解离常数 (K_D)。

1.2.5 利用腹腔注射验证 rTF_vWD 对 TTX 的中和作用

选取 19.0 ~ 21.0 g 的无特定病原体级 (SPF) ICR 系雄性健康小鼠 50 只, 称量并记录体重。实验操作方法参照食品安全国家标准“水产品中河豚毒素的测定”^[14]。

1) 对照组: 准备 10 只小鼠, 每只小鼠腹腔注射 0.15 μg TTX, 等待小鼠死亡, 记录在 2 h 内的生存时间及死亡数量。

2) 实验组: 提前将 TTX 与 rTF_vWD 按摩尔比为 1:1 和 1:50 分别混匀, 在 15 ℃ 条件下分别孵育 15 h。准备 20 只小鼠, 随机分为 2 组, 每组小鼠分别腹腔注射 0.15 μg TTX 与对应摩尔比的 rTF_vWD 混合液, 等待死亡, 记录在 2 h 内的生存时间及死亡数量。

2 实验结果

2.1 pPIC9K-TF_vWD 真核载体的构建与鉴定

经 PCR 扩增获得 TF_vWD ORF 框的编码序列, 大小为 435 bp, 编码 145 个氨基酸, 分子质量为 16.49 ku, pI 值为 5.58。分别使用 EcoR I 和 Not I 对目的基因及 pPIC9K 载体进行酶切, 将酶切后的载体与目的基因连接, 获得 475 bp + 9.2 Kbp 的 pPIC9K-TF_vWD 重组质粒 (见图 2a), 并转化至大肠杆菌 DH5α 中。挑取若干单克隆, 进行 PCR 鉴定, 得到阳性重组子克隆片段约 500 bp, 与预期片段大小相符 (见图 2b)。分别取阳性菌液测序, 结果证明连接正确, 核苷酸的开放阅读框编码连续, 最终获得正确构建的 pPIC9K-TF_vWD 融合表达载体。

2.2 TF_vWD 在毕赤酵母中表达及纯化

实验在培养基 pH 为 7.0, 诱导表达的甲醇体积分数为 0.5% 的条件下, 比较了不同时间点 (0, 12, 24, 48, 72, 96 h) rTF_vWD 的表达量。结果表明: 在各诱导表达条件下, 在约 16 ku 位置均出现目的条带, 且 72 h 后, 表达量最高

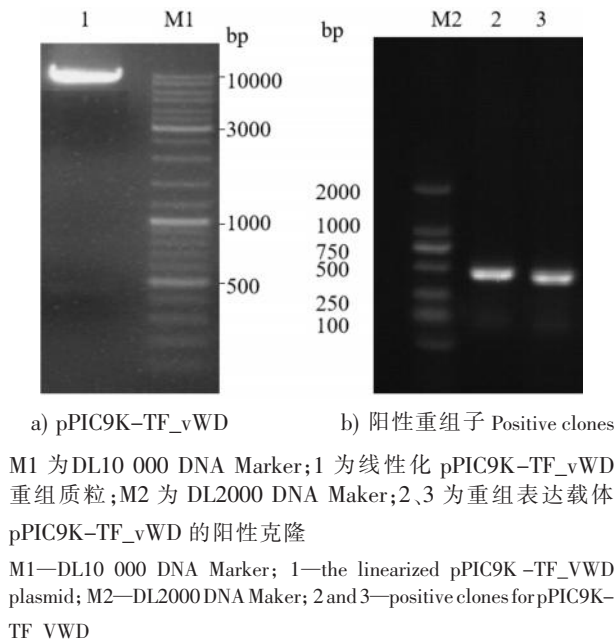
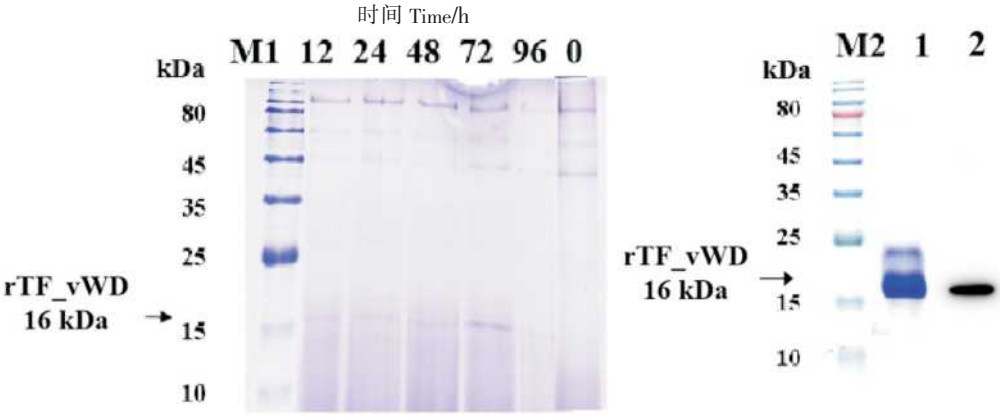


图 2 重组表达载体 pPIC9K-TF_vWD 的构建与 PCR 鉴定结果图

Fig.2 The electrophoretogram of pPIC9K-TF_vWD recombinant plasmid and PCR identification results

(见图 3a)。

重组毕赤酵母诱导表达后, 离心后收集上清, 经透析和过滤后, 利用镍离子螯合亲和层析柱纯化 rTF_vWD 真核表达产物。用低浓度咪唑 (20 mmol/L) 洗脱杂蛋白, 高浓度咪唑 (500 mmol/L) 洗脱整合的融合蛋白, 280 nm 检测紫外吸收曲线, 可见到明显的洗脱蛋白峰。收集洗脱组分进行 SDS-PAGE 电泳, 经 Quanlity One 软件分析, 得到了纯度为 90% 的 rTF_vWD。对纯化后的 rTF_vWD 进行 Western Blot 鉴定, 结果在分子质量约为 16 ku 的位置发现单一目的条带 (见图 3b)。



a) 不同诱导时间对 rTF_vWD 表达的影响
The influence of different induction time on the expression of rTF_vWD
M1 为预染蛋白 Maker;M2 为低分子量蛋白 Marker;1 为 TF_vWD 毕赤酵母真核表达产物纯化蛋白重组蛋白;
2 为 Western Blot 鉴定 rTF_vWD

M1—prestained protein Maker;M2—protein Marker;1—TF_vWD purified by eukaryotic expression product of pichia pastoris;2—rTF_vWD for Western Blot identification

图 3 rTF_vWD 在毕赤酵母中真核表达及其纯化

Fig.3 SDS-PAGE analysis of rTF_vWD expression in *P. pastoris* and the purification of TF_vWD production

2.3 rTF_vWD 蛋白与 TTX 的动力学分析

用 pH 值分别为 5.0、4.5 和 4.0 的醋酸钠缓冲液稀释 rTF_vWD, 进样完成后选取偶联量最大的 pH 值进行后续实验。实验结果表明, 最佳偶联 pH 值为 4.0 (见图 4), rTF_vWD 在 CM5 芯片表面最终偶联量为 4946 RU (见图 5)。以 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 $\mu\text{mol/L}$ 的 TTX 粗品流过固定有 rTF_vWD 的芯片, 测定并分析配体与受体的相互作用。结果显示, rTF_vWD 与 TTX 结合的响应值 (R_{max}) 为 100 RU, 通过稳态拟合 (Affinity) 计算出 rTF_vWD 与 TTX 的平衡解离常数 K_D 为 3.15 mmol/L (见图 6)。结果表明 rTF_vWD 能够与 TTX 结合, 且亲和力较弱。

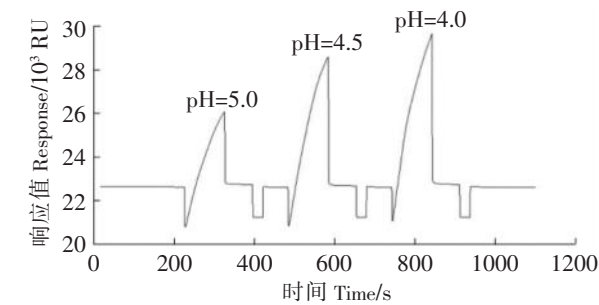


图 4 筛选 rTF_vWD 在 CM5 芯片表面最佳偶联 pH
Fig.4 Screening the best pH coupling of rTF_vWD on CM5 chip surface

2.4 rTF_vWD 蛋白对 TTX 的中和作用

对照组中, 对小鼠按每千克体重腹腔注射 7.5 μg TTX (或按 0.15 μg /鼠的量注射 TTX), 2 h 内

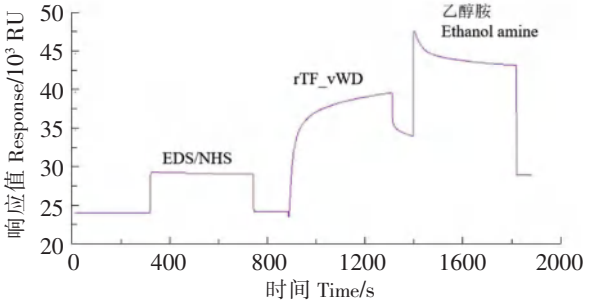


图 5 CM5 芯片表面绑定 rTF_vWD 的响应图
Fig.5 Response diagram of CM5 chip surface binding rTF_vWD

10 只小鼠死亡 7 只, 致死速度较快, 因此选择在 10 min 后进行肌肉注射 rTF_vWD。实验组中, 腹腔注射 TTX 与 rTF_vWD 孵育后的混合液, 小鼠存活率显著上升 ($P < 0.05$) (见图 7), 这表明 TTX 与蛋白体外孵育后, TTX 毒性显著降低了, 即 rTF_vWD 对 TTX 的毒性有中和作用。

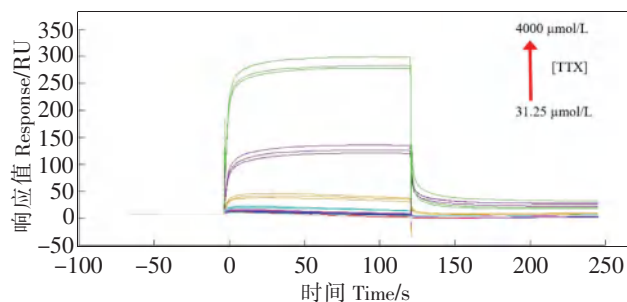


图 6 rTF_vWD 与 TTX 动力学分析

Fig.6 rTF_vWD and TTX dynamics analysis

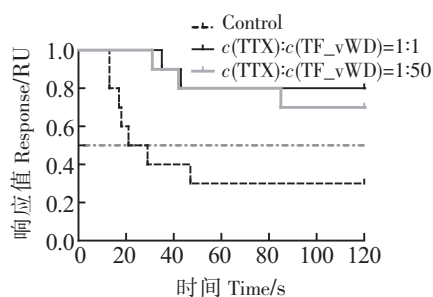


图 7 TTX 与 rTF_vWD 体外孵育后腹腔注射小鼠后的生存曲线

Fig.7 The survivorship curve of mice after intraperitoneal injection with TTX and rTF_vWD mixture

3 讨论

卵黄蛋白原是卵黄蛋白 (vitellin, Vn) 的前体, 主要是在肝脏中合成的, 通过体循环将其分布至全身, 并携带到卵巢。卵黄蛋白原被储存在早期卵母细胞体内, 然后裂解为卵黄脂磷蛋白 (I 和 II)、卵黄高磷蛋白和 vWD 结构域^[15]。除了作为卵黄蛋白前体的作用外, 卵黄蛋白原还能作为金属、无机磷酸盐、脂类和碳水化合物的载体蛋白^[16], 其中 vWD 结构域具有与病毒或细菌互作的性质, 对微生物进行识别并介导微生物的清除^[17]。最近有研究发现从豹纹东方鲀卵巢中分离纯化的卵黄蛋白原肽段 vWD 可能参与 TTX 的结合^[13]。为了验证卵黄蛋白原肽段 vWD 与 TTX 的结合能力, 本研究利用毕赤酵母表达系统, 经诱导表达条件的优化, 在 0.5% (体积分数) 甲醇、pH = 7.0 的条件下, 诱导表达 72 h 时, rTF_vWD 蛋白表达量最高, 通过 Ni + 亲和层析柱纯化得到 rTF_vWD 蛋白纯度为 90%。

Biacore - 表面等离子体共振 (SPR) 是一种高度敏感的技术, 常用来验证包括蛋白质和核酸在内的生物系统的相互作用^[18]。SPR 的主要优势是它能够实时测量亲和力和动力学, 并且是一种无标签, 使用材料相对少的技术^[19]。近年来, 应用 SPR 分析不同蛋白质和小分子相互作用的研究进展表明, SPR 在分析生物大分子和潜在候选药物的亲和力方面具有广泛的应用价值^[20-22]。本文利用 Biacore T200 生物分子相互作用分析系统, 将 rTF_vWD 作为受体, 以 TTX 作为配体进行相互作用的亲和力和动力学分析。结果表明 rTF_vWD 能够与 TTX 结合, 平衡解离常数为 3.15 mmol/L, 且亲和力较弱。本研究提供了 rTF_vWD 可结合 TTX 的直接证据, 为卵黄蛋白原肽段 vWD 可作为不同组织器官间 TTX 的传递^[23-24]介质提供重要的证据。本研究还提供了 rTF_vWD 可中和 TTX 毒性的重要佐证: 预先将 TTX 与 rTF_vWD 孵育后, 再腹腔注射小鼠, 则小鼠死亡率显著下降, 结果表明 rTF_vWD 可中和 TTX 毒性作用。本研究为河鲀对 TTX 耐受和 TTX 在河鲀体内转移和富集等机理的研究提供重要资料。

[参考文献]

- [1] JAL S, KHORA S S. An overview on the origin and production of tetrodotoxin, a potent neurotoxin [J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(4): 907-916. DOI:10.1111/jam.12896.
- [2] BANE V, LEHANE M, DIKSHIT M, et al. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection [J]. Toxins, 2014, 6(2): 693-755.
- [3] 李爱峰, 于仁成, 周名江, 等. 河豚毒素及其衍生物在织纹螺体内的解剖分布初探 [J]. 卫生研究, 2008, 37(4): 448-451.
- [4] CARDALL B L, BRODIE E D, BRODIE E D, et al. Secretion and regeneration of tetrodotoxin in the rough-skin newt (*Taricha granulosa*) [J]. Toxicon, 2004, 44: 933-938.

- [5] HOW C K, CHERN C H, HUANG Y C, et al. Tetrodotoxin poisoning [J]. The American Journal of Emergency Medicine, 2003, 21(1): 51-54. DOI:10.1053/ajem.2003.50008.
- [6] HOMAIRA N, RAHMAN M, LUBY S P, et al. Multiple outbreaks of puffer fish intoxication in Bangladesh, 2008 [J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2010, 83(2): 440-444. DOI:10.4269/ajtmh.2010.10-0168.
- [7] ISLAM Q T, RAZZAK M A, ISLAM M A, et al. Puffer fish poisoning in Bangladesh: clinical and toxicological results from large outbreaks in 2008 [J]. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2011, 105(2): 74-80. DOI:10.1016/j.trstmh.2010.10.002.
- [8] YONG Y S, QUEK L S, LIM E K, et al. A case report of puffer fish poisoning in Singapore [J]. Case Reports in Medicine, 2013, 2013: 1-4. DOI:10.1155/2013/206971.
- [9] NOGUCHI T, ARAKAWA O. Tetrodotoxin-distribution and accumulation in aquatic organisms and cases of human intoxication [J]. Marine Drugs, 2008, 6: 220-242.
- [10] KONO M, MATSUI T, FURUKAWA K, et al. Accumulation of tetrodotoxin and 4, 9-anhydrotetrodotoxin in cultured juvenile kusahugu *Fugu niphobles* by dietary administration of natural toxic komonfugu *Fugu poecilonotus* liver [J]. Toxicon, 2008, 51(7): 1269-1273.
- [11] HONDA S, ARAKAWA O, TAKATANI T, et al. Toxicification of cultured puffer fish *Takifugu rubripes* by feeding on tetrodotoxin-containing diet [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 2005, 71: 815-820.
- [12] IKEDA K, EMOTO Y, TATSUNO R, et al. Maturation-associated changes in toxicity of the pufferfish *Takifugu poecilonotus* [J]. Toxicon, 2010, 55(2/3): 289-297. DOI:10.1016/j.toxicon.2009.08.001.
- [13] YIN X, KIRIAKE A, OHTA A, et al. A novel function of vitellogenin subdomain, vWF type D, as a toxin-binding protein in the pufferfish, *Takifugu pardalis*, ovary [J]. Toxicon, 2017, 136: 56-66. DOI:10.1016/j.toxicon.2017.06.006.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准水产品中河豚毒素的测定: GB 5009.206—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [15] FINN R N. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins [J]. Biology of Reproduction, 2007, 76(6): 926-935. DOI:10.1095/biolreprod.106.059766.
- [16] SMOLENAARS M M W, MADSEN O, RODENBURG K W, et al. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily [J]. Journal of Lipid Research, 2007, 48(3): 489-502. DOI:10.1194/jlr.R600028-JLR200.
- [17] HUO Y, LIU W, ZHANG F, et al. Transovarial transmission of a plant virus is mediated by vitellogenin of its insect vector [J]. Plos Pathogens, 2014, 10(3): e1003949.
- [18] VO T, PAUL A, KUMAR A, et al. Biosensor-surface plasmon resonance: a strategy to help establish a new generation RNA-specific small molecules [J]. Methods, 2019, 167: 15-27. DOI:10.1016/j.ymeth.2019.05.005.
- [19] 温建艳, 朱焕亮, 黄春芬. 2型糖尿病患者血浆同型半胱氨酸与颈动脉粥样硬化的关系 [J]. 浙江实用医学, 2009, 14(4): 285-286.
- [20] 马春梅, 黄晓星, 曹忠莲, 等. 基于 Biacore T200 分析系统研究阿达木单抗生物学活性 [J]. 世界临床药物, 2016(5): 308-313.
- [21] 代云见, 张勇侠, 何勇智, 等. Anti-IgE 单链抗体纯化工艺研究及活性鉴定 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(12): 57-63.
- [22] AYYAR B V, ATASSI M Z. Development of humanized scFv antibody fragment (s) that targets and blocks specific HLA alleles linked to myasthenia gravis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(22): 8165-8179. DOI: 10.1007/s00253-017-8557-1.
- [23] MATSUMOTO T, TANUMA D, TSUTSUMI K, et al. Plasma protein binding of tetrodotoxin in the marine puffer fish *Takifugu rubripes* [J]. Toxicon, 2010, 55(2/3): 415-420. DOI:10.1016/j.toxicon.2009.09.006.
- [24] YOTSU-YAMASHITA M, OKOSHI N, WATANABE K, et al. Localization of pufferfish saxitoxin and tetrodotoxin binding protein (PSTBP) in the tissues of the pufferfish, *Takifugu pardalis*, analyzed by immunohistochemical staining [J]. Toxicon, 2013, 72(12): 23-28. DOI:10.1016/j.toxicon.2013.06.002.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)