

鲫鱼肝脏 AChE 的提取及有机磷农药对 AChE 的抑制效应研究

刘晓宇¹, 王 斌¹, 吴谋成¹, 杨 健², 徐 盈³

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 内陆渔业环境与资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘 要: 本研究利用淡水鲫鱼肝脏为主要原材料提取乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE), 并设计正交试验确定了鲫鱼肝脏中乙酰胆碱酯酶的最佳提取条件; 通过酶抑制法衡量敌敌畏、辛硫磷、三唑磷、乐果等四种不同种类有机磷农药对粗酶液的抑制作用; 将鱼肝和鱼脑中乙酰胆碱酯酶活性及蛋白含量的进行对比研究。研究结果表明: 提取液 pH 值、提取液种类以及原料与提取液的质量体积比对酶液的活性影响显著; 被测四种有机磷农药中, 敌敌畏对 AChE 活性抑制作用最强。鱼脑的 AChE 比酶活是肝脏的 AChE 比酶活的 3~7 倍。

关键词: 鲫鱼肝脏; 乙酰胆碱酯酶; 有机磷农药; 抑制; 提取

Study on Crucian Liver Extraction and Restraining Effects to AChE by Organophosphorus Pesticides

LIU Xiao-yu¹, WANG Bin¹, WU Mou-cheng¹, YANG Jian², XU Ying³

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Key Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: In this paper, Crucian was used as the raw material. A three factors three levels orthogonal test was used to confirm the optimum extracting conditions of acetyl cholinesterase (AChE) from the Crucian liver so as to analyze the protein content and enzyme activity in the AChE coarse enzyme solution and compare the AChE activity and protein content in the liver and brain. As the enzyme restrain method was used to evaluate the restraining effects of dichlorvos, phoxim, triazophos, dimethoate in the coarse enzyme solution. The results of this study showed the pH, the type of the extraction solution and the quality volume ratio of the raw material to the extraction solution affect the activity of the enzyme significantly. Among the four organic phosphorus pesticides, dichlorvos shows the greatest restrain effect.

收稿日期: 2006-10-30

基金项目: 农业部专项基金项目(04-11-04B); 湖北省自然科学基金项目(2006ABA165)

作者简介: 刘晓宇(1969-), 女, 副教授, 研究方向为食品安全及农业资源综合利用。

- fermentation[J]. International J Food Microbiology, 2003, 84: 225-235.
- [13] LEUSCHNER R G K, ARENDT E K, HAMMES W P, et al. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 617-621.
- [14] FOSCHINO R, PERRONE F, GALLI A, et al. Characterization of two virulent *Lactobacillus fermentum* bacteriophage isolated from sour dough[J]. J Appl Bacteriol, 1995, 79: 677-683.
- [15] 余茂効, 贾盘兴, 徐星, 等. 多粘芽孢杆菌噬菌体的分离及其特性的研究[J]. 微生物学报, 1997, 14(2): 216-223.
- [16] REGENMORTEL M H V, FAUQUET C M, BISHOP D H L, et al. Virus taxonomy, seventh report of the international committee on taxonomy of viruses[C]. Academic Press, San Diego, 2000: 63-136; 267-284; 389-393; 645-650.
- [17] 黄建军, 胡晓梅, 饶贤才, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP2 生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1133-1136.
- [18] 李明, 申晓东, 周莹冰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 860-862.

Key words Crucian liver; acetylcholinesterase; organophosphorus pesticides; inhibition; extraction

中图分类号: Q965.9 S482.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)04-0191-04

20 世纪 80 年代以来, 有机磷农药成为农林生产中使用最广的农药种类, 也成为对环境和人类造成危害的物质之一^[1-2]。有机磷农药对人体具有较高毒性。农药残留已成为近年来威胁百姓安全的一大突出问题, 农药残留不仅越来越成为威胁餐桌安全的“隐形杀手”, 而且祸及农产品出口, 且有愈演愈烈之势, 因而研究有机磷农药的快速检测方法成为热点问题。有机磷农药是乙酰胆碱酯酶的抑制剂, 利用这一特点, 可以用酶抑制法^[3]这一简便、灵敏、经济的快速检测方法检测有机磷农药残留量。酶抑制法中酶最为关键, 酶的种类决定着检测的灵敏度。酶抑制法测定农药残留所用的酶包括乙酰胆碱酯酶、丁酰胆碱酯酶、动物与植物酯酶, 其中乙酰胆碱酯酶(AChE)对有机磷农药较敏感, 测定的灵敏度高, 选择性强。因而乙酰胆碱酯酶应用较多。故而研究各种来源 AChE 的性质选择敏感的 AChE 酶源对于食品及环境安全评价具有重要的意义。

本文首次运用正交试验法对鲫鱼肝脏 AChE 的提取工艺作了优化, 研究了其活性并与鱼脑中 AChE 活性做了比较, 并以农业生产中广为使用的四种有机磷农药为抑制剂, 研究了鲫鱼肝脏 AChE 对供试有机磷农药的敏感性。这项工作对于筛选灵敏酶源从而评价环境及食品安全具有积极意义, 同时亦为鱼类 AChE 的进一步性质研究提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鲜活鲫鱼购于华中农业大学集贸市场。

高速冷冻离心机(CR-21G) 日本HITACHI公司; 752紫外光栅分光光度计 上海分析仪器厂; 722可见分光光度计 上海欣茂仪器有限公司; pHs-3C型数字pH计 上海雷磁仪器厂; 电子分析天平(AB204-E) METTLER TOLEDO。

考马斯亮蓝试剂盒 南京建成生物工程研究所; 5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)、碘化硫代乙酰胆碱 Sigma 公司; 牛血清白蛋白冻干粉 Roche 公司进口分装; Tris-HCl Amresco 公司; DEAE-Sephadex A-50 葡聚糖凝胶 Pharmacia公司; 80%敌敌畏乳油 湖北沙隆达股份有限公司; 40%辛硫磷乳油 安徽美科达农化有限公司; 40%乐果乳油 江苏腾龙生物药业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鲫鱼肝脏中乙酰胆碱酯酶(AChE)的提取

实验用鲜活鲫鱼购于华中农业大学集贸市场, 驯养

2~3d。驯养用水必须经过充分曝气和自然光照, 水温保持室温。

将鱼肝切碎, 去掉筋和筋膜, 为了防止过快地凝结, 适量加入抗凝剂柠檬酸钠或肝素。为了保证酶活性, 整个过程应在冰浴条件下进行。

在匀浆器中匀浆(冰浴条件下), 在冷冻离心机中4℃以10000r/min 离心30min, 取上清液(粗酶液)保存于冷藏室中备用^[4]。

以提取液 pH 值、提取液种类、原材料与提取液的质量体积比(W/V)为三因素, 设计三水平的正交试验, 采用的正交表为 L₉(3³) (见表 1)。

表 1 正交试验中的影响因素及水平
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	提取液 pH 值	提取液种类	提取液质量体积比(W/V)
1	7.0	磷酸缓冲溶液	1:3
2	7.5	Tris-HCl缓冲溶液	1:4
3	8.0	水	1:5

实验结果利用统计软件 SAS 进行分析, 得出最佳提取条件。

1.2.2 蛋白质含量的测定

考马斯亮蓝法^[5]测定。

1.2.3 AChE 粗酶液酶活性

以改进的 Ellman 法^[6]测定酶活。

具体操作^[7-8]: 在 3.00ml 磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH8.0)中加入 20μl 酶液, 混匀。30℃保温 20min 后, 依次加入 100μl DTNB 溶液(终浓度 1.0mmol/L)和 20μl ATCh 溶液(终浓度 1.0mmol/L), 充分混合, 反应体积为 3.14ml。在 412nm 处用 1cm 比色皿比色, 每隔 0.5min 读数, 连续测定 3min。酶活力定义为每克脑蛋白每分钟水解底物的 μmol 数。

1.2.4 不同种类有机磷农药对 AChE 粗酶液的抑制效应酶活性测定方法同 1.2.3。

检测结果按公式计算^[9]:

$$I(\%) = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 100$$

式中, I 为抑制率(%); E₁ 为无农药抑制时的酶液活性(U); E₂ 为某一浓度农药抑制时酶液的活性(U)。

1.2.5 鱼脑中 AChE 活性与肝脏中 AChE 活性的比较

取同一批样品的鱼脑, 用剪刀从鱼嘴向上延背部剪开, 掰开头骨, 用重蒸水冲洗去除鱼血, 再用镊子将整个脑组织取出, 放到滤纸上吸去血丝, 并用镊子除

去非脑组织,放入表面皿中称重。然后用磷酸缓冲溶液(pH7.4, 50mmol/L)冰浴条件下匀浆,匀浆比(质量体积比)为1:3制成匀浆液。在4℃冷冻离心(10000r/min)30min,得上清液,即为粗酶液提取液,记录体积并在4℃下保存。

用Ellman法测定上述粗酶液的酶活性以及利用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,同鱼肝脏中提取的粗酶液作对比。

2 结果与分析

2.1 鲫鱼肝脏中乙酰胆碱酯酶的提取条件

正交试验结果分析如表2。

表2 鲫鱼肝脏乙酰胆碱酯酶不同处理组合的比活力值
Table 2 Application of $L_9(3^3)$ orthogonal test assaying the acetylcholinesterase activity from crucian liver

编号	处理组合	乙酰胆碱酯酶比活力($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)
1	1, 1, 1	23.8931 $\pm$ 0.1197
2	1, 2, 2	13.5019 $\pm$ 0.089
3	1, 3, 3	11.7295 $\pm$ 0.0923
4	2, 1, 2	29.1908 $\pm$ 0.141
5	2, 2, 3	16.0304 $\pm$ 0.08
6	2, 3, 1	20.2528 $\pm$ 0.4563
7	3, 1, 3	18.1124 $\pm$ 0.193
8	3, 2, 1	18.7928 $\pm$ 0.0837
9	3, 3, 2	12.3012 $\pm$ 0.2123

注:按 $L_9(3^3)$ 正交表安排的9个处理组合进行试验,下角标代表各因素的不同水平。每个处理重复3次,每个重复测定3次。表中数据为平均值 $\pm$ 标准差。

表3是对表2的数据进行极差分析的结果,从中得出各因素对鲫鱼肝脏中AChE比活力测定影响的大小顺序为:提取液的种类>提取液pH值>原料与提取液质量体积比。其中提取液种类的极差最大,表明该因素对测定鲫鱼肝脏中AChE比酶活的影响最大。

表3 $L_9(3^3)$ 正交试验极差分析表
Table 3 Analysis of the results from orthogonal test with the method of range analysis

	乙酰胆碱酯酶比活力($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$)		
	提取液 pH 值	提取液种类	提取液质量体积比(W/V)
均值1	16.3771	23.9591	20.9817
均值2	22.0878	16.1508	18.5591
均值3	16.3940	14.7489	15.3181
级差	5.7107	9.2102	5.6636

方差分析的结果见表4。从表4可以看出,三个因素对鲫鱼肝脏中AChE比活力的测定都有显著的影响。提取液pH值、提取液种类、质量体积比均对测定有极显著影响。其影响大小顺序为:提取液的种类>提取液pH值>原料与提取液质量体积比。由方差分析得出的影响大小顺序与用极差之间相同。综合极差分析及方差

表4 $L_9(3^3)$ 正交试验方差分析表

Table 4 Analysis of the results from orthogonal test with ANOVA

来源	自由度	平方和	均方	F 值
提取液 pH 值	2	183.0020294	91.5010147	43.75**
提取液种类	2	428.7421394	214.371069	102.50**
提取液质量体积比(W/V)	2	145.9158295	72.9579147	34.88**

注: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ 。

分析的结果,三个因素对测定鲫鱼肝脏中AChE的比活力均有影响,因此在测定时都要加以控制。选择各因素的最优水平,可以得到提取鲫鱼肝脏的最佳条件组合:提取液pH值为7.5、提取液选择磷酸缓冲溶液、质量体积比为1:3。这时测定鲫鱼肝脏中AChE的比活力灵敏度最高,比酶活最大。

2.2 不同种类有机磷农药对AChE粗酶液的抑制效应

利用酶抑制法(分光光度法)测定四种不同种类有机磷农药对AChE粗酶液的抑制效应,分别将反应体系放在分光光度计中在412nm处比色,记录3min内吸光度的变化值,并且根据公式:

$$I(\%) = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 100$$

测得抑制率,其与农药浓度关系见图1。

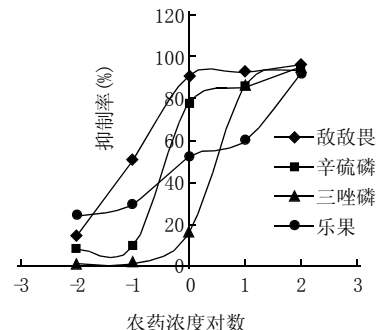


图1 抑制率与浓度对数关系曲线

Fig.1 Relationship curve of inhibition ratio and concentration of pesticides

分别测定4种有机磷农药不同浓度对鲫鱼肝脏乙酰胆碱酯酶的抑制作用,以抑制率为因变量,以浓度对数为自变量作回归分析,求出抑制中浓度 I_{50} ,比较4种农药对鲫鱼肝脏乙酰胆碱酯酶的抑制活性,结果见表5。

生态毒理学研究中,常采用抑制中浓度 I_{50} 来评价AChE对有机磷农药的敏感性。 I_{50} 值越小,表示农药的抑制作用越强,即酶的敏感性越强^[7-8]。

分析4种有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制中浓度可以得知,敌敌畏对AChE抑制作用最强,而三唑磷的抑制作用最弱,抑制作用为敌敌畏>辛硫磷>乐果>三唑磷。抑制作用最强的敌敌畏与抑制作用最弱的三唑磷

表 6 鲫鱼脑部与鲫鱼肝脏中 AChE 酶活性比较表
Table 6 Comparison of AChE activity between crucian brain and crucian liver

	吸光度							比酶活 ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$)
	0min	0.5min	1.0min	1.5min	2.0min	2.5min	3.0min	
鱼脑 1	0.325	0.335	0.345	0.355	0.365	0.375	0.384	4.421
鱼肝 1	0.455	0.468	0.476	0.482	0.488	0.493	0.497	1.282
鱼脑 2	0.203	0.223	0.241	0.258	0.274	0.289	0.306	31.702
鱼肝 2	0.420	0.428	0.435	0.439	0.445	0.448	0.453	9.7824
鱼脑 3	0.175	0.185	0.195	0.204	0.212	0.220	0.228	14.574
鱼肝 3	0.492	0.505	0.515	0.520	0.528	0.534	0.539	1.974

表 5 不同种类有机磷农药对鱼肝脏中 AChE 抑制作用线性关系表
Table 5 Inhibition relationship curve of organophosphorus pesticides on AChE from crucian liver

农药品种	回归方程	线性相关系数	抑制中浓度 I_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
敌敌畏	$y=20.465x+69.008$	0.8289	0.1178
辛硫磷	$y=24.765x+55.224$	0.8532	0.6153
三唑磷	$y=26.954x+39.999$	0.8512	2.3498
乐果	$y=16.556x+51.786$	0.9383	0.7801

抑制中浓度差异高达 20 倍。

通过本研究测定的四种有机磷农药对鱼肝脏中乙酰胆碱酯酶的抑制活性以及两种不同生物来源的乙酰胆碱酯酶对辛硫磷的检测灵敏度,可以看出不同农药对同一酶原的抑制作用差异很大,部分农药只有在浓度很高的情况下,才表现出明显的对酶抑制活性。同时也可以看出同种农药对不同生物来源的酶原有着不同的抑制作用。导致生物来源胆碱酯酶对不同农药产生选择性的主要原因是由于不同生物在生理生化特性及代谢上的差异,并致使不同酶源对农药的检测灵敏度出现很大的差异。

2.3 鱼脑中 AChE 活性与肝脏中 AChE 的比较结果

取三批鲫鱼样品,对比分析肝脏、脑中乙酰胆碱酯酶粗酶液中蛋白质含量以及酶活性。

通过测定三批样品中两种 AChE 粗酶液中蛋白质含量,可发现鲫鱼肝脏提取液中蛋白质含量明显高于鲫鱼脑提取液中。鱼肝脏中含有多种乙酰胆碱酯酶以外的酶,如:丁酰胆碱酯酶、SOD、转氨酶等等,相对鱼脑来说影响因素多、提纯难度大。

酶活性比较见表 6。

从以上三组对照实验可以看出,同一样本的肝脏和脑中乙酰胆碱酯酶活性有很大的差别,鱼脑中的 AChE 比酶活要比肝脏中高 3~7 倍。

纵向比较可以分析得知,不同鲫鱼个体内乙酰胆碱酯酶活性也有很大的区别,样品 1 组织中的 AChE 酶活性要明显低于样品 2 和样品 3。

3 结 论

3.1 鲫鱼肝脏 AChE 的最佳提取条件组合

分析正交试验结果可得出,最佳提取条件为:提取液 pH 值为 7.5、提取液选择磷酸缓冲溶液、质量体积比为 1:3。此条件组合下测定鲫鱼脑中 AChE 的比酶活灵敏度最高,比活力值最大。

3.2 四种有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制效应比较

敌敌畏对 AChE 抑制作用最强,其抑制中浓度仅为 $0.1178\mu\text{g}/\text{ml}$,而三唑磷的抑制作用最弱,其抑制中浓度为 $2.3498\mu\text{g}/\text{ml}$ 。而抑制作用从强到弱排序为敌敌畏>辛硫磷>乐果>三唑磷。抑制作用最强的敌敌畏与抑制作用最弱的三唑磷抑制中浓度差异高达 20 倍。

3.3 两种 AChE 粗酶液中蛋白质含量对比结果

鲫鱼肝脏提取液中蛋白质含量明显高于鲫鱼脑提取液中。而本研究过程中三组对照实验可以看出,同一样本的肝脏和脑中乙酰胆碱酯酶比酶活有很大的差别,鱼脑中的 AChE 比酶活要比肝脏中高 3~7 倍。

参考文献:

- [1] United Nations Environment Programme. Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organophosphorus compounds [R]. MAP Technical Reports Series, 1991, 58: 125.
- [2] 张一宾,孙晶.国外有机磷农药的概况及对我国有机磷农药发展的看法[J].农药,1999,38:1-3.
- [3] 宋国林,王宁华.乙酰胆碱酯酶法检测果蔬农药残留的研究[J].生物防护防疫装备,2005,26:31-32.
- [4] 李少南,谢显传,朱国念.淡水鱼脑 AChE 的动力学特性及抗抑制性[J].中国环境科学,2003,23(3):285-289.
- [5] BRADFORD M. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [6] ELLMAN G L, COURTNEY K O, ANDRES V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol, 1961(7): 88-95.
- [7] 朱小山,孟范平.黄鱼脑组织 AChE 的亲亲和层析[J].中国海洋大学学报,2004(3):231-237.
- [8] 朱小山,孟范平.5种海鱼脑 AChE 对 2 种有机磷农药的敏感性比较[J].上海环境科学,2003,22(8):521-525.
- [9] 康天放,何颖.蔬菜中有机磷农药残留的生物传感器法检测[J].环境科学与技术,2005,28(5):37-39.