

分析用的鸭血清胆碱酯酶的 制备、性质及其应用

廖辉南 丁庆林

胆碱酯酶能被有机磷酸酯类与氨基甲酸酯类等化合物强烈抑制,这对于农业虫害、环境保护、医学检验等方面皆有广泛应用,此外,胆碱酯酶在神经生理与毒理的研究中颇有理论价值。

胆碱酯酶作为分析试剂,国外通常采用电鳗 (electric eel)、牛红血球以及马血清等组织作为酶源。我国已往常用马血清、电鳗 (electric ray) 等组织提取假性与真性胆碱酯酶。我们与中国科学院上海生物化学研究所共同研究过程中,筛选出一种灵敏、稳定的鸭血清胆碱酯酶 (简称鸭酶)。此酶源取材容易、来源广泛、易于制备。曾参照 Strelitz^[1] 提取马血清胆碱酯酶的方法,进行了大量制备。

为了探讨鸭酶的某些性质,我们还将该酶于 Sephadex G-200 层析柱进一步分离。现将实验过程与结果报告如下。

材料与 方法

1. 材料

(1) 鸭血清: 取新宰的北京填鸭血清,不溶血呈橙黄色为宜。

(2) Sephadex G-200 系瑞典 Pharmacia 公司产品。

(3) 抑制剂: DFP $\left[(\text{iC}_3\text{H}_7\text{O})_2 \text{P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \diagdown \\ \text{F} \end{array} \right]$, 纯度 97.95%; 1605 $\left[(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 \text{P} \begin{array}{c} \text{S} \\ \diagup \diagdown \\ \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2 \end{array} \right]$,

纯度 97.3%; DDVP $\left[(\text{CH}_3\text{O})_2 \text{P} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \diagdown \\ \text{O} - \text{CH} = \text{CCl}_2 \end{array} \right]$, 纯度 80%。

(4) 表面活性剂: SDS (十二烷基磺酸钠) 分析纯; JFC (脂肪醇环氧乙烷) 浸湿剂; OP₁₀ (烷基苯酚环氧乙烷) 乳化剂。

2. 方法

(1) 鸭酶的制备: 将鸭血清加入 0.35 饱和度硫酸铵,离心弃去沉淀,所得清液酸化,即用 5N H₂SO₄ 调节 pH 值在 2.8—2.9 为适,则分离出大量杂蛋白。然后,将酸化清液加入硫酸铵至 0.6 饱和度,放置冰箱内过夜,则盐析液分为两层: 上层为淡棕色絮状物,下层为棕色清液,将絮状物抽滤得滤饼,以适量蒸馏水溶解之,加入饱和硫酸铵溶液使之成 0.4 饱和度,放置过夜,虹吸出液体,于铺有一层滑石粉的布氏漏斗滤纸上,再加适量硅藻土过滤,则收集无色澄清滤液,加入硫酸铵使成 0.85 饱和度,放置过夜,上层为无色清液,下层为微黄色絮状沉淀,抽滤成滤饼,以少量水溶解之,倾入透析袋中对水透析,直至酶液中硫酸铵去尽。最后,稀释成一定活性单位,用 2 毫升安瓶装入 0.5 毫升酶液进行冰冻干燥成粉剂。

本文 1979 年 9 月 25 日收到。

(2) 鸭酶进一步纯化^[2]: 将 2 克鸭酶干粉溶于 40 毫升 0.1M、pH7.4 的磷酸钠缓冲液中(其中含有 0.04% JFC; 0.01% OP₁₀ 表面活性剂), 加至 80 × 4.5 厘米柱床的 Sephadex G-200 中, 于室温下(15℃), 用同一缓冲液进行洗脱, 流速为 0.5 毫升/分, 在洗脱液开始流出约 150 毫升之后, 先后收集到具有胆碱酯酶活性的二个峰组分, 大峰组分体积约为 100 毫升, 小峰组分体积约为 150 毫升。

(3) 测试方法: 1) 蛋白浓度系按 Folin-酚方法测定。2) 酶活性采用 Ellman 方法测定^[3]。3) 酶促底物的水解速率系采用 Radiometer 自动滴定仪进行恒 pH 测定^[4]。

结果与讨论

1. 鸭酶二种组分的若干性质

该酶经凝胶层析分离, 得到二个峰组分。分别对此二组分进行了二种底物的酶促水解速率比较, 结果表明, 二者水解速率差异均一致, 即碘化

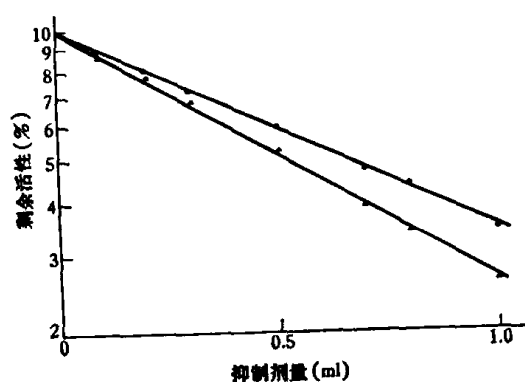


图 1 鸭酶二种组分对 DFP 抑制差异

抑制剂浓度: $6.96 \times 10^{-9} M$

—●—●—●— 小峰; —▲—▲—▲— 大峰

丁酰硫代胆碱被鸭酶二组分水解速率高于碘化乙酰硫代胆碱。然而, 这二种组分对 DFP 抑制敏感性却表现出有所差异(见图 1)。此外, 还将此二组分分别作了超离心分析, 由图 2 显示出两者均呈单一的峰, 其沉降系数(S 值)分别为 5.34 和 5.29, 两者颇相接近。

上述结果表明, 鸭酶所出现的二个组分及其表现的特性, 据 Holmes 等人所做的电泳分析^[5], 可能是由于二种同工酶, 因而表现出被 DFP 抑制的动力学行为差异。

2. 不同缓冲液及 pH 值对鸭酶活性的影响

鸭酶表现的活性随着缓冲剂种类不同而异, 如图 3 所示。在本测定条件下, 巴比妥缓冲液与 Tris-缓冲液较之磷酸钠缓冲液与柠檬酸钠缓冲液

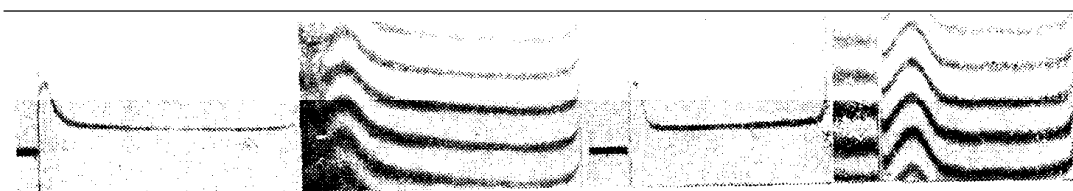


图 2 鸭酶二种组分超离心分析图谱

左二图为大峰组分; 右二图 of 小峰组分

表现酶活性为高。这四种缓冲液的最适 pH 值巴比妥为 8.0; Tris- 为 8.4; 磷酸钠为 7.2; 柠檬酸钠为 7.0。

3. 鸭酶对各种底物的水解速率比较

在同一酶活性下, 以恒 pH 滴定法比较了鸭酶对各种底物的水解速率, 由图 4 所示。四种胆碱酯类底物中, 以氯化丁酰胆碱被催化水解速率最高, 氯化乙酰胆碱次之, 而鸭酶对氯化 β -甲基胆碱与苯酰胆碱水解速率甚低, 同时, 观察到乙酰胆碱底物自发水解速率高于丁酰胆碱。

四种非胆碱酯类底物中, 鸭酶对 α -萘酚乙酸酯与 N-甲基吡咯乙酸酯催化水解速率最快, 而 α -萘酚丁酸酯与 3', 5'-二氯靛酚乙酸酯则次之, 相应地, 前两种底物自发水解速率亦稍高

于后两种底物。

由于各种底物结构上的差异,影响了胆碱酯酶活性中心与底物结合力,致使各种底物被催化的反应速率不同。

4. 鸭酶与其它来源的胆碱酯酶被 DFP 抑制的程度比较

DFP 能与胆碱酯酶活性区域起反应,形成稳定的磷酸化酶,从而引起胆碱酯酶不可逆抑制。以同一测定条件下,比较了鸭酶、鱼酶*、马酶**、电鳐酶***等胆碱酯酶被 DFP 抑制的程度。由表 1 表明 DFP 对鸭酶敏感性高于马酶与电鳐酶,而鱼酶又较之鸭酶灵敏些。

不同来源的胆碱酯酶被 DFP 抑制的程度差别甚大,这是由于各种酶固有的构型与 DFP 作用适合程度不同所致。

表 1 不同源胆碱酯酶对 DFP 敏感性差异

不同源 ChE	鸭 酶	鱼 酶	马 酶	电 鳐
$t_{1/2}[I]$ 值(分M)	7.43×10^{-9}	1.60×10^{-9}	7.24×10^{-8}	1.05×10^{-6}

5. 鸭酶对不同抑制剂的灵敏度比较

反复测定了鸭酶对 DFP、1605 及 DDVP 等杀虫剂的抑制灵敏度。由图 5 中得出这几种杀虫剂对鸭酶的 pI_{50} 值,即 DFP 为 8.35, DDVP 为 7.54, 1605 为 4.63。

同一种的胆碱酯酶对不同抑制剂敏感性是不相同的。在一定范围内,其抑制程度与抑制剂的浓度成正比关系,利用此酶可微量地测定各种抑制剂。

6. 鸭酶的稳定性能比较

我们对历年来所制备的鸭酶进行了性能测试,如表 2 所示。从 1972 年以来所制备的鸭酶

表 2 鸭酶长期贮存性能

年月、批号	冰 箱 贮 存		室 温 贮 存	
	酶比活 (u/mg)	抑制率(%)	酶比活 (u/mg)	抑制率(%)
1972 年 5 月	—	—	26.3	48.9
1974 年 7 月批号 I	288.5	54.7	179.5	51.6
1974 年 7 月批号 II	615.0	54.7	546.5	51.8
1975 年 8 月	104.0	52.9	—	—
1979 年 4 月	216.0	53.0	216.0	53.0

注:反应体系中 DFP 抑制剂浓度为 $1.84 \times 10^{-9}M$ 。

* 黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 肌肉胆碱酯酶。

** 马血清假性胆碱酯酶。

*** 电鳐电器官组织真性胆碱酯酶。

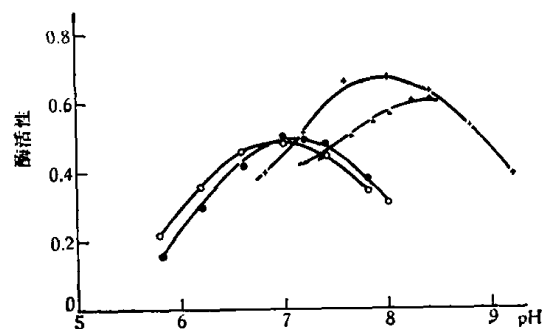


图 3 几种缓冲剂的不同 pH 值对鸭酶活性的影响

—○—○—○— 柠檬酸缓冲液; —●—●—●— 磷酸缓冲液;
—◆—◆—◆— 巴比妥缓冲液; —▲—▲—▲— Tris-缓冲液

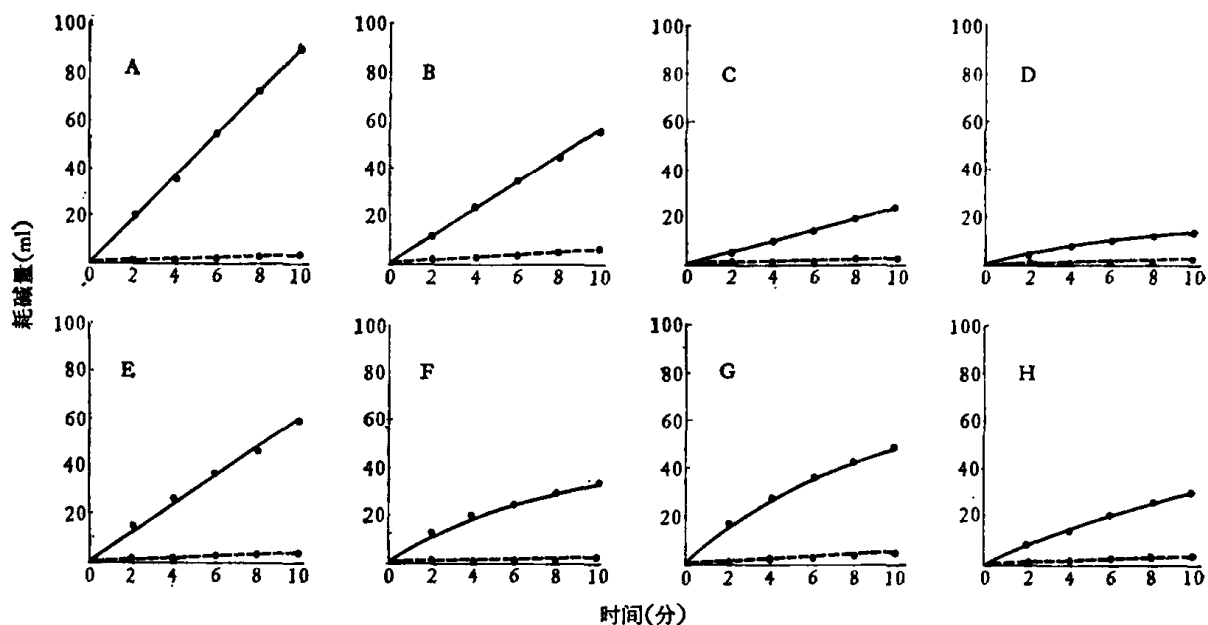


图4 鸭酶对各种底物的水解速率比较

反应温度 37℃, 0.023N NaOH, 胆碱酯类底物 0.004M, 非胆碱酯类 0.0016M (含 0.04M MgCl₂, 0.10M NaCl)。

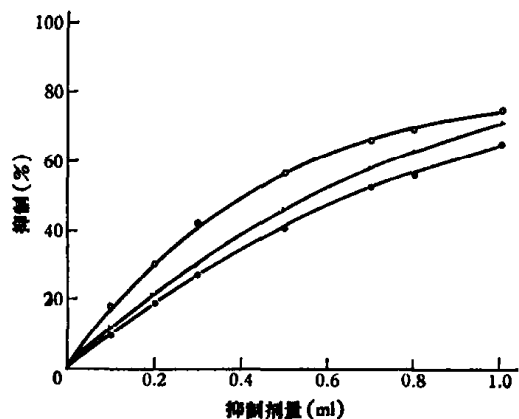
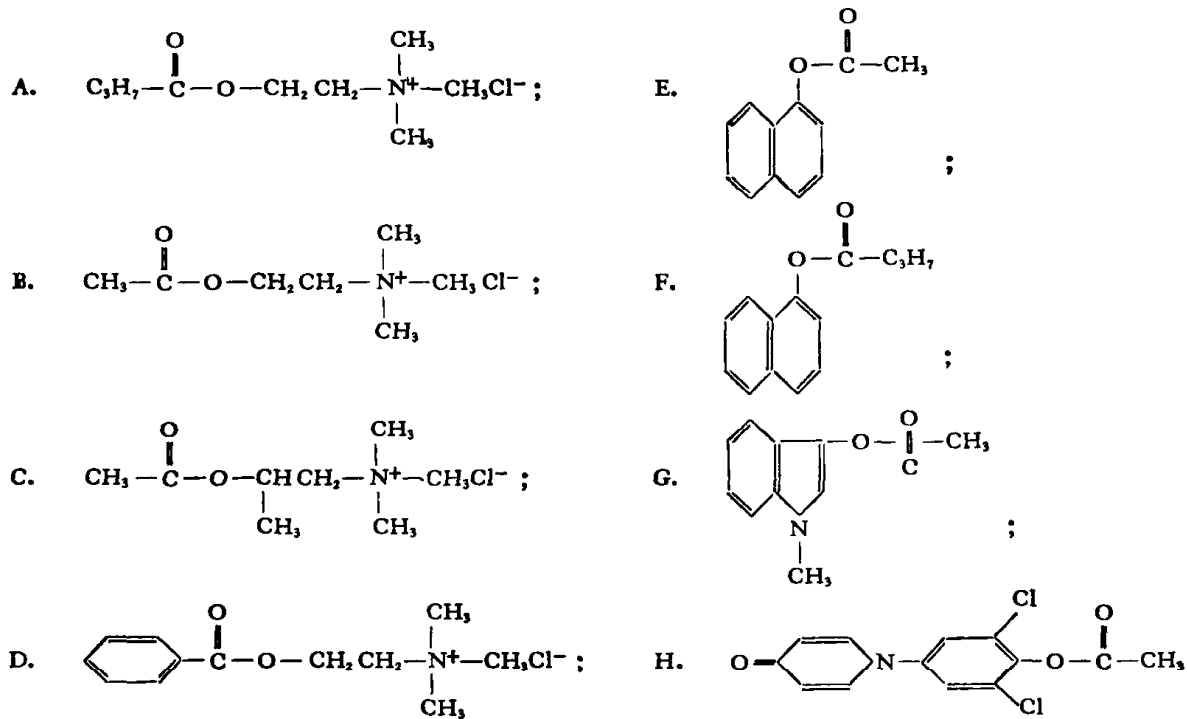


图5 几种杀虫剂对鸭酶的抑制

—○—○—○— 1605 ($5.81 \times 10^{-3}M$);
 —▲—▲—▲— DDVP ($5.19 \times 10^{-3}M$);
 —●—●—●— DFP ($6.95 \times 10^{-3}M$)

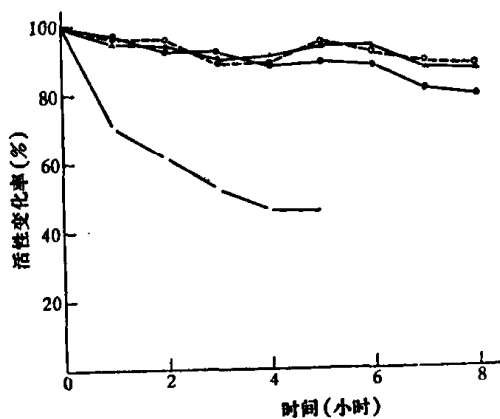


图6 鸭酶稳定性比较

—▲—▲—▲— 鸭酶; —●—●—●— 鱼酶;
 —○—○—○— 马酶; —◆—◆—◆— 电鳐酶

分别保存在冰箱与室温条件下,其比活性虽有不同程度的下降,但对 DFP 抑制性能却无明显变化。

此外,还比较了鸭酶、鱼酶、马酶及电鳗酶等胆碱酯酶的使用稳定性,如图 6。在 37℃ 下,经保温 8 小时,鸭酶与马酶活性无明显下降,鱼酶较鸭酶的稳定性稍为逊色,然而电鳗真性胆碱酯酶活性丧失甚快,仅保温 3 个多小时,活性变化率达 50% 之多。

结 语

鸭酶系一种典型的假性胆碱酯酶,其水解丁酰胆碱底物速率最快,亦能水解某些非胆碱酯类底物。鸭酶能被 DFP 之类有机磷化合物强烈抑制,较之马酶灵敏度高一个数量级左右。应用鸭酶作为分析试剂,可灵敏、特效地测定各种有机磷酸酯与氨基甲酸酯类杀虫剂。经多年实践证明,鸭酶在不同贮存条件下长期保存,其抑制性能无明显变化,在常温下使用,其稳定性甚佳。

致谢:中国科学院上海生物化学研究所的同志曾参加各种酶源筛选工作,特此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Strelitz, F., *Biochem. J.*, **38**(1944), 87.
- [2] Main, A. R. et al., *Journ of Biol. Chem.*, **247**(1972), 566.
- [3] Ellman, G. L. et al., *Biochem. Pharmacol.*, **1**(1961), 88.
- [4] Goodson, L. H. et al., *ADA042841*, 1977.
- [5] Holmes, R. S. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **159**(1968), 81.