

农药残留快速检测用酶 ——胆碱酯酶的筛选

刘畅¹, 陈福生², 王涛³, 石翠芳⁴

(1. 河北科技师范学院食品工程系, 河北秦皇岛 066600; 2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070;

3. 海口农工贸(罗牛山)股份有限公司, 海南海口 570125;

4. 福建师范大学闽南科技学院生化工程系, 福建泉州 362300)

摘要:在常见易得的前提下,以猪血、鸡血、鸭血、鲢鱼和鸡肝为实验材料提取胆碱酯酶,通过比较不同来源、不同动物组织胆碱酯酶的活性,并进行了胆碱酯酶对常见农药的敏感性实验,结果表明:鸭血清 BChE 酶含量丰富、对常见的有机磷农药及氨基甲酸酯类农药较敏感、且来源广泛、廉价易得。可作为果蔬农药残留的快速检测用酶。

关键词:胆碱酯酶, 筛选, 农药残留, 快速检测

Abstract:This paper reviewed the screening of cholinesterase on the detection of pesticide residues. Cholinesterase was separated from many tissues of different animals. The comparative study of enzyme specific activity and resistance to organophosphorus pesticides has been developed. The result suggested that butyrylcholinesterase from duck serum has high specific activity, cheap, easy to purified, and the inhibition of the sensitivity to two organophosphorus pesticides is significantly higher than cholinesterase of pig serum. So this cholinesterase can be used to detect pesticide residues in agricultural products.

Key words :cholinesterase; screening; pesticide residues; rapid detection

中图分类号: TS207.5*3 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)06-0213-03

胆碱酯酶抑制法具有快速、简便、灵敏及成本低等优点,是我国农产品农药残留快速检测的主流技术。其理论基础是:有机磷和氨基甲酸酯类农药能抑制动物体内胆碱酯酶(cholinesterase, ChE)的活性,在一定条件下,ChE的活性变化与有机磷农药的浓度存在良好的相关性,通过测定农产品的农药残留提取液对ChE酶活的影响即可判定农药残留的情况。ChE依其催化底物的特异性分为乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BChE)。AChE主要分布于

脑、脊髓、红细胞等组织中,BChE主要分布于血清及肝脏中。不同生物来源的ChE在结构上有一定的差异,表现在受有机磷农药抑制时具有不同的选择性和敏感程度^[1]。因此,筛选一种对常见的有机磷农药及氨基甲酸酯类农药较敏感的ChE一直是研究热点。目前对不同来源ChE的研究报道很多,如二化螟、大黄鱼等^[2-4],此外也有直接应用马血清和敏感系家蝇头部进行农药残留检测的报道^[5]。由于动物的肝脏和血液来源广泛、廉价,成为提取ChE的首选材料。本实验在常见易得的前提下,系统地比较了几种动物组织ChE的活性和对常见农药的敏感性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜动物血液(鸭血、鸡血、猪血)、鸡肝脏、新鲜鲢鱼购于菜市场;碘化硫代丁酰胆碱(BTChI),二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)均为Sigma公司产品;氯化乙酰胆碱 上海三爱思化学试剂有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS) 武汉化学试剂厂;聚乙二醇20000 上海华舜公司,进口分装;甲胺磷、敌敌畏、克百威等农药为市售产品;其余试剂均为分析纯或生化试剂规格。

1.2 实验方法

1.2.1 AChE活力的测定

1.2.1.1 AChE活力的测定方法 根据微量羟胺比色法并加以改进^[6]。于试管中加入0.5mL酶液,0.2mol/L pH7.8的磷酸钠缓冲溶液(PB)0.5mL,0.2mol/L氯化乙酰胆碱(AtCh·Cl)1mL,37℃水浴20min,加入4mL碱性羟胺(由2mol/L盐酸羟胺溶液与3.5mol/L的NaOH溶液等体积混合配成),振摇3min,然后加0.4mol/L的HCl溶液4mL,振摇2min后过滤,再加0.37mol/L的FeCl₃溶液2mL进行显色,于525nm比色测定。

收稿日期: 2006-09-27

作者简介: 刘畅(1979-),女,助教,研究方向: 食品安全。

基金项目: 湖北省科技厅项目(2002AA207B07)部分内容。

1.2.1.2 AChE 活力定义 在 37 ℃, pH7.2 0.2mol/L 的 PB 中, 每毫克酶蛋白每分钟催化水解底物 AtCh·Cl 的微摩尔数。

$$\text{AChE 酶活力 (U)} = (M - m) / 20\text{min}$$

式中 M: 非酶水解空白管中 AtCh·Cl 的微摩尔数;

m: 测定管中 AtCh·Cl 的微摩尔数。

1.2.2 BChE 活力的测定

1.2.2.1 BChE 活力的测定方法 根据 Ellman^[7]法并加以改进。在试管中加入 0.2mol/L pH8.0 的 PB 3mL, 置于 37 ℃ 水浴中, 加入底物 6.5mg/mL BTChI 溶液 50μL, 10.0mg/mL DTNB 溶液 50μL, 保温 3min, 加入 50μL 酶提取液, 准确计时 3min, 加入 3% SDS 溶液终止反应, 于 410nm 进行比色, 同时做空白对照。

1.2.2.2 BChE 活力定义 37 ℃, 0.2mol/L pH8.0 的 PB 中, 每毫克酶蛋白每分钟水解底物 BTChI 的微摩尔数^[8,9]。

$$\text{BChE 酶活力 (U)} = V \times A \times 10^6 / (v \times K \times L \times C)$$

式中 V: 反应体系的总体积;

A: 吸光度随时间变化率;

v: 酶活测定时所取酶提取液的体积 (μL);

K: 消光系数 [L/(mmol·mm)], K=1.36;

C: 酶蛋白的浓度 (mg/mL);

L: 比色皿光程 (mm)。

1.3 胆碱酯酶的提取

1.3.1 血清胆碱酯酶的提取 分别将加有 1%柠檬酸钠的抗凝鸭血、猪血和鸡血进行离心 (5000r/min, 15min), 除去红细胞, 加入等体积的 0.2mol/L pH7.2 的 PB, 分别加入 (NH₄)₂SO₄ 调至 0.25 个饱和度, 4 ℃ 静置 12h, 离心得上清液, 再分别以 (NH₄)₂SO₄ 将上清液调至 0.6 个饱和度 (鸭血清) 和 0.5 个饱和度 (猪血清和鸡血清), 4 ℃ 静置 12h, 抽滤得滤饼, 用 PB 溶解, 即为粗酶液^[10]。

1.3.2 猪血红细胞膜胆碱酯酶的提取 将新鲜猪血低速离心 (2000r/min, 20min), 取沉淀的红细胞 (勿溶血), 用 0.9% 的生理盐水洗 4 次, 然后按体积比 1:8 加入 0.1mol/L pH7.2 的 PB, 纱布过滤, 滤液于 4 ℃ 搅拌过夜。次日离心 (15000r/min, 30min), 沉淀用 pH7.2, 0.01mol/L 的 PB 洗涤至上清液呈浅粉色。于沉淀中加入含 0.5% Triton X-100 的 PB 洗涤, 37 ℃ 振荡 5h, 4 ℃ 15000r/min 离心 30min, 收集浅黄色上清液, 即为粗酶液。

1.3.3 鱼肌肉胆碱酯酶的提取 参考董之海方法^[4]并加以改进。将鱼肌肉打成肉糜, 每克肉糜约加 10mmol/L EDTA·2Na·20mmol/L pH8.0 的 PB 3mL, 于高速组织捣碎机中制备匀浆, 加入 Triton x-100 使之浓度达 0.5%, 调至 pH8.0, 4 ℃ 搅拌 4h, 4000r/min 离心 1h, 除去白色悬浮物, 收集上清液, 即为粗酶液。

1.3.4 鱼脑胆碱酯酶的提取 参考谢显传方法^[6]并加以改进。取鲢鱼头, 用剪刀将鱼头背面剪开, 剥去头顶骨, 用镊子剥离非脑缔结组织, 取出鱼脑组织, 按体积比为 1:3 加入 0.05mol/L 的 PB, 匀浆, 于 4 ℃ 离心 (5000r/min 15min), 取上清液, 即为粗酶液。

1.3.5 鸡肝中胆碱酯酶的提取 取新鲜鸡肝, 去掉膜和脂肪, 切碎按 1:9 (w/v) 比例加蒸馏水, 匀浆 5min, 4000r/min 离心 15min, 将上清液过滤, 即为粗酶液。

1.4 胆碱酯酶对农药的敏感性分析

调整各种粗酶液至相等的酶活力, 分别以 2mg/kg 的甲胺磷, 0.1mg/kg 的敌敌畏和克百威对酶进行抑制, 37 ℃ 水浴保温 30min, 测其残余酶活力, 根据公式求得抑制率。

计算公式如下:

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{U_0 - U_i}{U_0} \times 100\%$$

式中 U₀: 未受抑制 ChE 的活力;

U_i: 受农药抑制 ChE 的活力。

2 结果与分析

2.1 不同动物组织胆碱酯酶活力的比较

根据 ChE 在不同生物中的分布规律, 并依照酶含量丰富、廉价易得的指导原则, 研究了几种不同动物组织 ChE 粗酶液的比酶活力, 结果见表 1。

表 1 不同动物组织 ChE 比酶活力的比较

ChE	AChE 比酶活力 (U/mg)	BChE 比酶活力 (U/mg)
猪红细胞 AChE	903	-
鱼脑 AChE	1275	-
鱼肌肉 AChE	1157	-
猪血清 BChE	-	96
鸭血清 BChE	-	150
鸡血清 BChE	-	54
鸡肝 BChE	-	68

注: “-”表示没有测到酶活力。

由表 1 可知, AChE 比酶活力以鱼脑最高, 达 1275U/mg BChE 比酶活力以鸭血清最高, 达 150U/mg, 鱼脑 AChE 提取较困难, 而鸭血清 BChE 廉价、来源广泛, 且提纯时鸭血清 BChE 比鱼脑 AChE 得率高。此外, 猪血清 BChE 的比酶活力虽然较鸭血清 BChE 低, 但其来源更加广泛, 因此, 以鸭血清和猪血清 BChE 作为实验材料, 进行农药敏感性实验。

2.2 胆碱酯酶对农药敏感性的比较

有机磷及氨基甲酸酯类农药均可和 ChE 酯解部位的丝氨酸羟基共价结合, 分别形成磷酸化胆碱酯酶和氨基甲酰化胆碱酯酶, 从而降低 ChE 酶促水解底物的能力。由于不同来源的胆碱酯酶对农药的敏感性不同, 本实验以鸭血清和猪血清 BChE 作为实验材料, 对几种常见农药 (甲胺磷、敌敌畏、克百威) 进行敏感性研究, 比较结果见表 2。

表2 ChE对几种有机磷及氨基甲酸酯类农药敏感性的比较

ChE 种类	农药对 ChE 的抑制率(%)		
	甲胺磷	敌敌畏	克百威
猪血清 BChE	67.1	81.0	68.2
鸭血清 BChE	78.4	99.6	81.7

由表2可知,三种农药对鸭血清 BChE 的抑制率均高于猪血清 BChE,说明鸭血清 BChE 对这三种农药的敏感性高于猪血清 BChE,且鸭血清 BChE 较廉价,来源较广泛,故选用鸭血清 BChE 作为酶抑制法检测农药残留的检测用酶。

3 小结与讨论

对不同动物组织 ChE 的比酶活力大小、酶含量是否丰富、是否廉价易得、以及对常见农药敏感性等几个因素进行了研究,研究结果表明,虽然鱼脑 AChE 的比活力高,但提取较困难,且得率较低;猪血清 BChE 虽然来源广泛,但其对常见农药的敏感性较差;鸭血清 BChE 对常见的有机磷农药及氨基甲酸酯类农药较敏感、酶含量丰富、且来源广泛、廉价易得。所以,最终确定鸭血清 BChE 作为农药残留的检测用酶。

参考文献:

- [1] 余孝颖.有机磷农药对不同生物来源的胆碱酯酶选择性抑制的研究[J].环境科学,1996,17(4):41-43.
- [2] Devonshire A L, Moores G D. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide resistant house flies (*Musca domestica*) [J]. Pestic, Biochem, Physiol, 1984, 21: 336-340.
- [3] 彭宇,王荫长,韩召军,陈长琨,李国清.二化螟体内乙酰胆碱酯酶的分布及纯化方法[J].昆虫学报,2002,45(2):209-214.
- [4] 董之海.大黄色肌肉胆碱酯酶的纯化[J].生物化学杂志,1995,11(4):487-489.
- [5] 赵丽丽,陈宁,张克旭.果菜中有机磷农药快速检测方法的研究[J].食品科学,2001,22(6):54-57.
- [6] 魏婉丽,李凤珍,孙曼霁.以氯化丁酰胺碱为底物测定假性胆碱酯酶活性的微量羟胺比色法[J].军事医学科学院院刊,1999,23(2):140-142.
- [7] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochem Pharmacol, 1961(7):88-95.
- [8] 谢显传,李少南,朱国念,谭亚军.麦穗鱼脑乙酰胆碱酯酶的纯化及其比较性质研究[J].农药学报,2003(5):45-50.
- [9] 朱小山,孟范平,杨正先.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,2003,22:521-525.
- [10] 刘畅,陈福生,路磊,李书谦,邢淑婕.鸭血浆胆碱酯酶的分离纯化和性质的研究[J].食品科学,2005,26(4):91-94.

(上接第175页)

表5 调味汤配比正交实验结果 $L_9(3^4)$

实验号	A	B	C	D	感官评分
1	1	1	1	1	62.8
2	1	2	2	2	70.2
3	1	3	3	3	73.5
4	2	1	2	3	76.7
5	2	2	3	1	79.5
6	2	3	1	2	76.6
7	3	1	3	2	76.3
8	3	2	1	3	84.8
9	3	3	2	1	82.7
K_1	206.5	215.8	224.2	225	T=683.1
K_2	232.8	234.5	229.6	223.1	
K_3	243.8	232.8	229.3	235	
k_1	68.83	71.93	74.73	75.00	
k_2	77.6	78.17	76.53	74.37	
k_3	81.27	77.60	76.44	78.33	
R	12.44	6.24	1.8	3.96	
优水平	A_3	B_2	C_2	D_3	

制过程中,对杀菌温度 121、118、116 进行不同时间的比较,其中 15-20-15min/121、15-40-15min/118 及 15-60-15min/116 均能达到商业无菌,不同杀菌条件对产品感官的影响见表6。从实验结果看,拟选用 15-40-15min/118 杀菌条件。

3 结论

3.1 牛腩萝卜罐头主要原料的优化配比为:牛腩与萝卜的质量比为 1:1;固形物(指牛腩与萝卜的沥汁

表6 杀菌温度和时间对牛腩萝卜罐头感官质量的影响

杀菌条件 (时间/温度)	15-20-15min/ 121	15-40-15min/ 118	15-60-15min/ 116
感官质量	中等	较好	中等

1min 的重量)与调味汤的质量比为 3:1;香料水按如下质量比及方法煮制而成:八角 1.0、花椒 0.5、陈皮 1.5、香叶 0.2、桂皮 0.5、茴香 0.8、甘草 0.8、姜 1.0,加水 100,煮沸 30min,过滤弃渣,再用沸水定容为 100,即得所需香料水;调味汤由香料水、柱侯酱、白砂糖、食盐经搅拌煮沸溶解而成,其质量比为:香料水 柱侯酱 白砂糖 盐=120 10 9 3。

3.2 杀菌条件确定为:15-40-15min/118,即升温 15min、恒温 40min、降温 15min。

参考文献:

- [1] 赵晋府主编.食品工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1999.208-228.
- [2] 杨邦英主编.罐头工业手册(新版)[M].北京:中国轻工业出版社,2002.556-557.
- [3] 中华人民共和国国家标准.肉类罐头卫生标准[S].GB13100-2005.
- [4] 曾庆孝主编.食品加工与保藏原理[M].化学工业出版社,2002.55-72.