

## 乙酰胆碱酯酶膜的酶学性质及其对有机磷农药的检测效果\*

### The Nature of Acetylcholinesterase Membrane and Its Detection Effects on Organophosphorus Pesticides

王 晔<sup>1,2</sup>, 彭 元<sup>2</sup>, 赵肃清<sup>3</sup>, 徐凤彩<sup>4</sup>

WANG Ye<sup>1,2</sup>, PENG Yuan<sup>2</sup>, ZHAO Su-qing<sup>3</sup>, XU Feng-cai<sup>4</sup>

(1. 百奥泰生物科技(广州)公司, 广东广州 510760; 2. 广西科学院, 广西南宁 530007; 3. 广西植物研究所, 广西桂林 541006; 4. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642)

(1. Sinoasis Pharmaceuticals Inc, Guangzhou, Guangdong, 510760, China; 2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006, China; 4. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China)

**摘要:**测定自行制备的乙酰胆碱酯酶(AChE)酶液和壳聚糖-AChE 酶膜的酶学性质,并以壳聚糖-AChE 酶膜分别检测乐果、甲胺磷、敌百虫、敌敌畏、甲基对硫磷5种有机磷农药,探讨采取酶膜进行快速检测有机磷农药残留的可行性。结果显示:壳聚糖-AChE 酶膜的  $K_M$  为  $2.8 \times 10^{-4}$  mol/L, 最适 pH 值为 8.0, 在 pH 值为 8.0~8.5 时活力稳定;最适反应温度为 45℃ 左右,在 15~60℃ 时较为稳定;半衰期达 12d, 固定化酶膜的实际应用性能较游离酶有较大改善。壳聚糖-AChE 酶膜对不同类型的有机磷农药的敏感性差异很大,对甲基对硫磷最为敏感,其  $pI_{50}$  为 5.57, 对其它 4 种农药  $pI_{50}$  为 4.0 左右;以酶活力抑制率 16% 为农药检出标准,甲基对硫磷的检出限为 0.4 mg/L, 其他 4 种检出限为 3~22 mg/L, 只有甲基对硫磷达到检测要求。

**关键词:**乙酰胆碱酯酶 壳聚糖 固定化酶 酶学性质 有机磷农药 检测

**中图分类号:** Q552.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2007)03-0160-03

**Abstract:** In this article, Chitosan AChE membrane of Acetylcholinesterase and the nature of the AChE membrane is determined, and by using this AChE membrane, five kinds of organophosphorous pesticides (methyl parathion, dimethoate, dichlorovos, trichlorfon and methamidophos) are detected. The result shows that the  $K_M$  of immobilized AChE is  $2.8 \times 10^{-4}$  mol/L. The optimum pH value is 8.0, while the pH value stability is 8.0~8.5. The thermal stability of the immobilized AChE is 15~60℃ and the operation half life of the immobilized AChE is 12 days. The practical performance of the immobilized AChE is greatly improved. Immobilized Acetylcholinesterase's sensitivity changes remarkably depending on the kinds of organophosphorous. It is most sensitive to methyl parathion whose  $pI_{50}$  is 5.57. Yet, it is less sensitive to the other four kinds of pesticides whose  $pI_{50}$  is about 4.0. The detection limit to methyl parathion is 0.4 mg/L, while detection limit to the others is between 3~22 mg/L.

**Key words:** Acetylcholinesterase, Chitosan, immobilized enzyme, zymological properties, organophosphorous pesticide, detection

收稿日期: 2007-03-07

修回日期: 2007-04-25

作者简介: 王 晔(1974-), 男, 工程师, 硕士, 主要从事酶工程研究。

\* 广西区科技厅攻关项目(桂科攻0537007-7-2)和南宁市科技攻关项目(200501065B)资助。

有机磷农药的生化机制是抑制乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, 3. 1. 1. 7, AChE)<sup>[1]</sup>, 近年来采用 AChE 快速检测有机磷农药残留的研究已较多<sup>[2]</sup>。本文以壳聚糖为载体, 吸附-交联法制备

AChE 酶膜<sup>[3]</sup>,测定其酶学性质,并利用 AChE 酶膜检测5种常见有机磷农药,拟通过其操作与检测来探讨采取酶膜进行快速检测有机磷农药残留的可行性,以及今后实际应用可能存在的问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

氯化乙酰胆碱(acetylcholine chloride, AChCl, Sigma 公司生产);5,5-二硫-2-[2-硝基苯甲酸](DTNB, Fluka 公司生产);乐果(dimethoate)、敌敌畏(dichlorvos)、敌百虫(trichlorfon)、甲胺磷(methamidophos)、甲基对硫磷(methyl parathion)原液为国产市售;其它试剂为市售生化试剂或分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 AChE 游离酶与固定化酶活力测定

部分纯化的鸡红细胞乙酰胆碱酯酶液(以下简称酶液)、壳聚糖-乙酰胆碱酯酶膜(以下简称酶膜)按文献<sup>[3]</sup>方法自行制备,酶活力测定按照文献<sup>[3]</sup>方法进行,其中底物溶液:50mg 氯化乙酰胆碱(AChCl)、10mg DTNB 溶于 pH 值 8.0、0.1mol/L 的 100ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH 缓冲液。

#### 1.2.2 固定化酶与游离酶的酶学性质测定

$K_M$  测定:取5组酶液和酶膜分别测定活力,其中各组底物溶液中 AChCl 的量分别为20、40、60、80、100mg。用 Lineweaver-Burk 法求出酶液中游离酶的米氏常数  $K_M$  和酶膜中固定化酶的表现米氏常数  $K_M^{app}$ 。

最适 pH 值测定:分别配制 pH 值为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 0.1mol/L 的 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH 的缓冲液,再之以之分别配制底物溶液。取已制备好的酶膜和对照酶液各6组,分别加入上述不同 pH 值的底物溶液测定其活力。

pH 值稳定性测定:取酶液和酶膜,用 pH 值为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的缓冲液将酶液稀释至一定程度,酶膜用相应的缓冲液 37℃ 保温 1 h。测定活力。

最适反应温度测定:取酶液和酶膜,分别在 10、25、30、37、40、45℃ 下测定游离酶和固定化酶的活力。

热稳定性测定:取酶液和酶膜,分别在 10、25、30、37、40、45℃ 下水浴 30 min,按酶活力测定方法测定酶活力。

半衰期测定:将新制备的酶液和酶膜贮于 4℃

下,每隔 1d 测其活力变化。并按下式计算半衰期<sup>[4]</sup>

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{\frac{2.303}{t} \cdot \lg\left(\frac{E_0}{[E]}\right)},$$

式中  $t_{1/2}$  为半衰期(单位 d),  $E_0$  为原始酶活力,  $t$  为时间(d),  $[E]$  为  $t$  时的酶活力。

#### 1.2.3 壳聚糖-AChE 酶膜检测5种有机磷农药

取有机磷农药溶液 3ml,加入 0.4ml 的 3% 溴水,静置 10min,再加入酶膜,37℃ 抑制 1h,取出用 pH 值为 8.0、浓度为 0.1mol/L 的磷酸缓冲液洗净,按固定化酶活力测定方法测得活力为  $I_1$ 。对照用磷酸缓冲液代替有机磷农药溶液,测得活力为  $I_0$ 。按下式计算抑制百分数:

$$\text{抑制百分数}(I\%) = \frac{I_0 - I_1}{I_1} \times 100\%。$$

分别配制 200mg/L 的乐果、敌敌畏、敌百虫、甲胺磷、甲基对硫磷的应用液,按 2:15(体积比)的比例加入 3% 的溴水。然后用蒸馏水分别稀释至 100、10、1 和 0.1mg/L,以有机磷农药浓度的负对数对酶膜活力的抑制百分数作图,通过计算求出 pI50 与检出限(以酶抑制率 16% 作为检出标准)检验壳聚糖-AChE 酶膜对不同浓度的有机磷农药的测定效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶学性质

固定化酶  $K_M^{app}$  与游离酶的  $K_M$ : 固定化酶的  $K_M^{app}$  为 0.028 mol/L,游离酶的  $K_M$  为 0.070 mol/L,固定化酶的  $K_M^{app}$  比游离酶的  $K_M$  降低了 60%,说明固定化酶对底物 AChCl 的亲合力增加。

最适 pH 值:游离酶的最适 pH 值为 7.5,固定化酶的最适 pH 值有所上升,为 8.0 左右。

pH 值稳定性:游离酶与固定化酶在 pH 值为 6.5~9.0 之间活力都较为稳定,其中,游离酶在 pH 值为 7.0~7.5 之间最为稳定,固定化酶在 pH 值为 8.0~8.5 之间最为稳定。固定化酶膜在偏碱条件下稳定性有所提高。

最适反应温度:实验显示,游离酶的最适反应温度为 37℃,固定化酶的最适反应温度有所上升,为 45℃ 左右。

热稳定性:游离酶在 15~37℃ 之间较为稳定,固定化酶的稳定性有所提高,在 15~60℃ 之间都较为稳定。

活力半衰期:计算得游离酶的半衰期为 3d,固定化酶为 12d。

### 2.2 酶膜对5种有机磷农药的检测效果

如表 1 所示,在经溴水处理后,甲基对硫磷对酶

膜的抑制效果最好,其  $pI_{50}$  为 5.57,其它四种农药的  $pI_{50}$  相差不大,为 4.0 左右,说明 AChE 对于不同的有机磷农药的敏感度相差甚大。而在本实验中采用的 5 种有机磷农药中,鸡红细胞 AChE 对于甲基对硫磷最为敏感。以酶抑制率 16% 为检出标准,甲基对硫磷最低,为 0.4mg/L,敌百虫最高,为 22mg/L。

表1 壳聚糖-AChE 酶膜检测5种有机磷农药的性能

农药	实验测得的 $pI_{50}$	检测限(酶抑制率16%,mg/L)
甲基对硫磷	5.57	0.4
乐果	4.43	11
甲胺磷	4.30	3
敌敌畏	4.04	7
敌百虫	3.98	22

### 3 讨论

壳聚糖为疏水性,而 AChE 的底物  $ACh^+Cl^-$  为典型的电荷底物,因分散效应与扩散效应,导致底物、产物或其它效应物在微环境和宏观体系间发生不等分配,改变了酶反应体系的组成平衡,从而影响了反应速度<sup>[5]</sup>,最终表现为固定化酶的  $K_{app}$  较游离酶的  $K_M$  降低,以及最适 pH 值的升高。AChE 在固定化后稳定性得到了较大的提高,这是由于固定化增加了酶构象的牢固程度、挡住了不利因素对酶的侵袭或限制了酶分子间的相互作用,使得酶的稳定性有了显著的提高,酶膜的实际应用性能较游离酶有了较大的改善<sup>[5]</sup>。固定化 AChE 的这些性质,对其实际应用是有利的。

大多数有机磷农药的纯品对 AChE 的抑制能力很弱,它们必须在生理条件下激活才具有强的抑制能力,其生物激活作用主要是由于氧化作用,微粒体氧化酶起着这一作用<sup>[1]</sup>。在体外的模拟氧化,一般采用溴水、溴蒸气等<sup>[6]</sup>。有机磷农药对 AChE 的抑制具有选择性,主要是酶分子和抑制剂分子结构的影响。衡量抑制剂能力的指标有两个: $pI_{50}$ 和  $k_i$ 。 $pI_{50}$ 原则上与  $k_i$  具有相同的信息,但  $pI_{50}$  更实用。大多数好的 AChE 抑制剂,  $10^{-6}$ mol/L 下抑制 5~50min,

就能抑制酶的大部分活性<sup>[7]</sup>。影响抑制效果的化学因素包括有机磷农药上取代基的亲电性质、大基团效应、胆碱式结构、不对称效应。取代基不同而导致的抑制能力的改变,其比较只能在同系物间进行<sup>[1]</sup>。对于不同类型的农药,如本实验中的 5 种,因为它们分属有机磷农药下基团性质不同的类别,所以对它们之间的比较并无严格意义。根据 FAO/WHO 农药残留最高限量(MRL)标准,各种农药在蔬菜水果中的一般为 0~110mg/L(相当于 0~110ppm),其具体指标依据农药的种类和蔬菜水果种类而异。我国的安全标准一般是采用 HPLC 方法,有机磷农药含量低于 1mg/L 或无法检出<sup>[6]</sup>。在本实验中,甲基对硫磷的检测限为 0.4mg/L,已达检测要求,但是其它的 4 种有机磷农药的检出限在 3~22mg/L 之间,与标准限还有一定差距,原因除了与酶和有机磷农药本身的性质有关外,与酶源、纯化和固定方法、检测系统也有很大关系,这有待于在今后的具体应用和开发中作进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] 江藤守绘. 有机磷农药的化学与生物化学[M]. 杨石先,张立言,译. 北京:化学出版社,1974.
- [2] MORELIS R M, COULET P R. Sensitive biosensor for choline and acetylcholine involving fast immobilization of a bienzyme system on a disposable membrane[J]. Analytic Chemical Acta, 1990, 231: 27-32.
- [3] 王晔. 壳聚糖固定 AChE 及其检测有机磷农药的研究[D]. 广州:华南农业大学,2002.
- [4] 徐凤彩. 酶工程[M]. 北京:中国农业出版社,2000:69.
- [5] 陈石根,周润琦. 酶学[M]. 上海:复旦大学出版社,2001:39.
- [6] 何丽英,刘洁生,高炜峰,等. 固相化乙酰胆碱酯酶酶片的制备有应用研究[J]. 环境与健康杂志,1998,15(5): 125-127.
- [7] O'BRIEN R D. 杀虫药剂的生物化学与生理学[M]. 张宗炳,译. 北京:科学出版社,1985.

(责任编辑:韦廷宗)