

甲胺磷对拟环纹豹蛛中肠蛋白消化酶活性影响的压电传感监测

王智¹, 宋大祥², 付秀芹³, 李云龙⁴

(1. 湖南文理学院生命科学系, 湖南常德 415000; 2. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002;

3. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081; 4. 湖南师范大学化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室, 长沙 410081)

摘要: 利用压电体声波阻抗分析法实时动态监测了拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 中肠蛋白消化酶对酪蛋白的酶促水解过程及不同浓度梯度(0.008%、0.016%、0.024%和0.032%)的甲胺磷农药对酶活性的影响,并用紫外分光光度法进行了验证。结果表明,合适低剂量(0.008%)的甲胺磷农药可显著地增强拟环纹豹蛛蛋白消化酶的活性,较高剂量(0.032%)的农药却显著抑制蛋白消化酶的活性,且水解过程稳态频移值可准确地反映酶活性与农药浓度的关系。本工作为研究低剂量农药增强蜘蛛控虫力的机理及酶活性的快速检测提供了一种可行的新方法。

关键词: 拟环纹豹蛛; 甲胺磷; 蛋白消化酶; 酶活性; 压电石英晶体阻抗分析法

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)04-0700-05

Effect of methamidophos on midgut proteinase activity in the wolf spider, *Pardosa pseudoannulata* (Araneae: Lycosidae) assayed with piezoelectric bulk acoustic wave impedance analysis method

WANG Zhi¹, SONG Da-Xiang², FU Xiu-Qin³, LI Yun-Long⁴ (1. Department of Life Sciences, Hunan University of Arts and Science, Changde, Hunan 415000, China; 2. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 3. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 4. Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The piezoelectric bulk acoustic wave (BAW) impedance analysis method was employed to monitor *in situ* the proteinase-catalyzed hydrolyzation of casein and the effect of methamidophos pesticide on the midgut proteinase activity of the wolf spider, *Pardosa pseudoannulata*, and its results were verified by ultraviolet spectroscopy. The results showed that hydrolyzation was significantly increased in the presence of low-dose methamidophos, whereas the hydrolyzation was significantly inhibited in the presence of high-dose methamidophos, and a correlation was found precisely between the enzyme activity reflected by the final frequency shift after the hydrolyzation and the concentration of methamidophos. The present work may have presented a novel method feasible for studying the mechanism of excitability of spiders under low-dose methamidophos pesticide and quick detection of proteinase activity.

Key words: *Pardosa pseudoannulata*; methamidophos; midgut proteinase; enzyme activity; ultraviolet spectroscopy; piezoelectric bulk acoustic wave impedance method

蜘蛛是农林害虫的重要捕食性天敌,在农林害虫的生态调控中起着重要的作用(王洪全,1981; Wang *et al.*, 2002, 2004)。王智等(2002)首次发现低剂量化学农药能增强蜘蛛对害虫的相对活力和控

虫力,并提出了低剂量农药增强蜘蛛控虫力的理论假设以来,至今仍没发现对该假设进行验证的报道。本实验所用的蛋白酶是一种存在于蜘蛛中肠细胞内,对底物蛋白质专一性很强的消化水解酶,其活性的强弱

直接决定蜘蛛对害虫的捕食作用大小(王智等, 2002)。因此, 深入研究低剂量的化学农药对蜘蛛中肠蛋白消化酶活性的影响是非常重要的。在生物学上有传统的研究方法, 如分光光度法、化学发光法等。但是, 这些方法存在许多缺点如检测灵敏度低、需要复杂的设备和繁琐的操作、有的还要使用有毒试剂、只提供单一信息和不能够进行在线监测等等。

自 20 世纪 80 年代初压电石英晶体(piezoelectric quartz crystal, PQC)在液相中稳定起振获得成功以来, 已广泛用于现场动态监测电极表面附近的化学/生物过程(Yang *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1995; 姚守拙, 1997; Xie *et al.*, 1999)。PQC 传感器主要利用其谐振/振荡体声波在液相中的微米级距离传播, 可敏感电极表面纳克级的质量变化, 故也称为石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)或压电体声波(bulk acoustic wave, BAW)传感器。BAW 阻抗分析法具有灵敏度高、操作方便、可现场动态提供反映研究体系物理或化学性质变化的多维信息等优点, 近来它已广泛用于蛋白质吸附与变性、细菌测定、抗体免疫分析、DNA 杂交、分子相互作用等生命科学和医学领域(Yang *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1995; 姚守拙, 1997)。在 AT 切压电体声波液相定量传感理论中, 有如下两个重要方程, 其中式(1)为 Sauerbrey 方程描述质量效应, 式(2)为 Martin 方程描述牛顿型液体负载导致的净粘密度效应。

$$\Delta f_0 = - \frac{2f_{0g}^2}{(\rho_Q \mu_Q)^2} \frac{\Delta m}{A}$$

$$= - 2.264 \times 10^{-6} f_{0g}^2 \frac{\Delta m}{A} \quad (1)$$

式中 f_{0g} 为晶体基频(Hz), A 为压电活性面积(cm^2), μ_Q 和 ρ_Q 分别为石英剪切模量($2.947 \times 10^{11} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$)和密度($2.648 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), Δm 为电极表面的质量

变化(ng)。

$$\Delta R_{1L} = - 4\pi L_Q \Delta f_{0L} \sqrt{f \mu_Q} / \sqrt{f_{0g} c_{66}}$$

$$\approx - 4\pi L_Q \Delta f_{0L} \quad (2)$$

式中 Δf_{0L} 和 ΔR_{1L} 分别为液相负载变化时晶体谐振频率(f_0)和动态电阻(R_1)的响应, f 为谐振区中心频率, c_{66} 为压电晶体的弹性常数($2.957 \times 10^{10} \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$), L_Q 为晶体在空气中的动态电感。

对 9 MHz 的石英晶体而言, 净粘密度效应的特征值为 $\Delta f_{0L} / \Delta R_{1L} \approx - 10 \text{ Hz} \cdot \Omega^{-1}$ 。对于某一实际体系, 若质量效应和粘密度效应同时存在, 判断体系质量效应和粘密度效应相对大小的有效判据是, $|\Delta f_0 / \Delta R_1|$ 越大, 则质量效应越大, 因净质量效应的动态电阻响应趋于零。

我们利用压电石英晶体阻抗分析法研究甲胺磷农药对拟环纹豹蛛 *Pardosa pseudoannulata* 中肠蛋白消化酶活性的影响, 旨在为杀虫剂的合理使用、充分发掘蜘蛛等天敌的控虫潜能及天敌兴奋剂的开发研制提供理论依据和新的研究方法。对农林害虫的有效防治、维护生态平衡及对 IPM 的发展和具有较大的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 仪器装置

PQCI 装置如图 1。监测分析部分由一台网络/频谱/阻抗分析仪(HP4395A)和一台与之相联的个人计算机(IBMPI66MMX)构成。HP4395A 可同步测量压电石英晶体(PQC)谐振的电导(G)与电纳(B)谱, 通过 HP82341C 高性能 HP-IB 接口卡(Windows3.11/NT/95), 用 Visual Basic(VB)5.0 编联机应用程序控制 HP4395A 获得导纳数据, 运用 Gauss-Newton 非线性

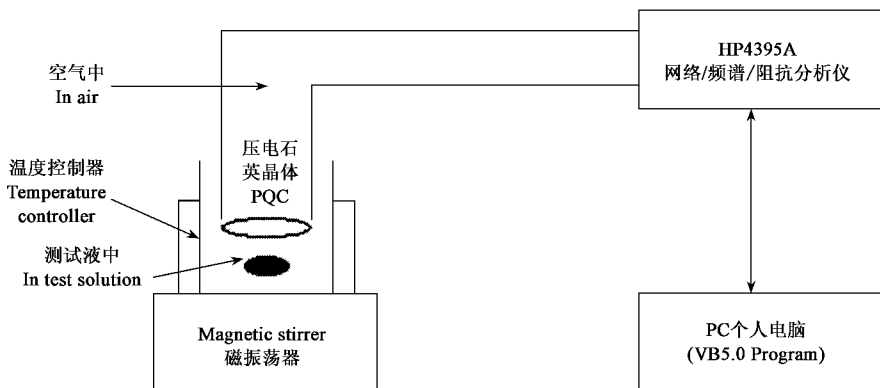


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the experimental setup

性最小二乘法实时拟合每组 G 与 B 数据并完成导纳数据和其他等效电路参数分析。实验中采用直径 12.5 mm、厚约 0.2 mm、AT—切 9 MHz 压电石英晶体 (JA-5B 型, 北京 707 厂), 单面触液型。晶体喷金一面电极直径 6.5 mm, 没入待测液, 接入阻抗测试架的地端作为工作电极; 另一面露于空气中的银电极直径 6 mm, 该电极接入阻抗测试架的非地端。实验中使用常规玻璃检测池 (5 mL), 电磁搅拌机恒速搅拌。温控装置为恒温水套与超级恒温槽以及 WM2K-1 型温度自动控制仪 (上海医疗仪器厂), 所有实验温度均控制在 $(28 \pm 0.5^\circ\text{C})$ 。

1.2 材料

拟环纹豹蛛雌成蛛从无农药污染的生物防治稻田中采集, 活体带回实验室饲养备用。

考马斯亮蓝 G250 为 Fluka 公司产品, 酪蛋白为 Sigma 公司产品, Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 均为国产分析纯试剂, 甲胺磷原药 (93%) 取自湖南农业大学食品安全科技学院。

低剂量农药的配制: 将 93% 的甲胺磷原药用蒸馏水配成 40% 的药液, 然后在农药作用下, 根据拟环纹豹蛛对主要稻虫褐飞虱的捕食功能反应大小选择 5 种有代表性的农药浓度进行该项实验, 即将 40% 的甲胺磷药液再与水按体积比配成 0.008%、0.016%、0.024% 和 0.032% 四个浓度。

1.3 实验方法

1.3.1 酶液提取: 取 7~8 头已饥饿 48 h 的拟环纹豹蛛雌成蛛, 在体视显微镜下于冰块上解剖, 取其中肠, 用 2 mL pH 8.0 的磷酸缓冲液 (1 mmol/L) 在冰浴中研磨匀浆, 匀浆在 4°C 下 $4\,000 \times g$ 离心 15 min, 取上清液作为酶源。

1.3.2 蛋白质含量测定: 采用考马斯亮蓝 G250 法测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白 (Bradford, 1976)。

1.3.3 蛋白消化酶的压电阻抗分析: 将 1 mmol/L pH 7.5 的 PBS 缓冲液 2.5 mL 和 0.1 mL 0.5% 的酪蛋白注入检测池中, 一段时间后得到稳定的信号值, 分别记为初始谐振频率 (f_{01})、动态电阻 (R_{11})、动态电感 (L_{11}) 和静态电容 (C_{01}) 作为参比值。接着, 同时注入 0.2 mL 的酶液和 0.1 μL 的各种低剂量农药到检测池引发反应, 记录时间 (t) 并同步采集各电路参数信号值 (即 f_0 、 R_1 、 L_1 和 C_0), 得到整个过程的相应信号变化 (即 $\Delta f_0 = f_0 - f_{01}$ 、 $\Delta R_1 = R_1 - R_{11}$ 、 $\Delta L_1 = L_1 - L_{11}$ 、 $\Delta C_0 = C_0 - C_{01}$) 随时间的关系曲线。反应完毕后, 这些参数又会维持一个相对稳定

的状态, 此时被记为 f_{02} 、 R_{12} 和 L_{12} , 则相应的终点变化值分别为 $\Delta f_m (= f_{02} - f_{01})$ 、 $\Delta R_m (= R_{12} - R_{11})$ 、 $\Delta L_m (= L_{12} - L_{11})$ 和 $\Delta C_m (= C_{02} - C_{01})$ 。通过其中的频率变化就可实现对蛋白消化酶水解酪蛋白过程的实时监测, 即由 $\Delta f-t$ 曲线即可得到酶促反应的初速度 $v (\Delta f/t)$ 。

1.3.4 蛋白消化酶活性的紫外分光光度分析: 取待测酶液 0.2 mL 与 0.5 mL 底物 (酪蛋白, 0.5%) 及 0.015 μL 的低剂量农药混匀, 置于 37°C 的水浴中反应 15 min, 加入 1.3 mL 20% 三氯乙酸 (TCA) 终止反应, 静置 2 min 后于 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 下 $4\,000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液 0.8 mL 加 1.6 mL Na_2CO_3 和 0.2 mL Folin-酚混匀, 在 680 nm 处测 OD 值, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 酪蛋白酶促水解过程的压电体声波 (BAW) 阻抗分析

图 2 曲线显示了在无甲胺磷时酪蛋白酶促水解过程中 PQC 等效电路参数 (Δf_0 、 ΔR_1 、 ΔC_0 和 ΔL_1) 随时间的变化情况。可见, 酶的加入导致了 Δf_0 的急剧上升, 然后慢慢地继续上升, 最后达到一个相对稳定的值 (即 Δf_m); 与此同时, ΔR_1 与 ΔL_1 则呈现出相反的变化态势, ΔC_0 有一个较小的上升趋势。图 3 曲线显示在有合适低剂量甲胺磷 (0.008%) 情况下, Δf_0 和 ΔR_1 的响应趋势与前者类似, 但最终稳态响应的幅度显著增大, 表明酶活性已得到加强, 从而酪蛋白的水解过程更为完全, ΔC_0 的变化与前者类似, ΔL_1 的变化曲线变得较为平稳。为了解这里的压电体声波 (BAW) 阻抗响应机制, 我们计算了水解过程的 $\Delta f_0/\Delta R_1$ 值。在有无甲胺磷的条件下分别为 11.6 和 13.1 Hz/ Ω , 均接近净粘密度效应的特征值, 表明实验响应主要来自于水解反应导致的溶液粘密度改变。

2.2 甲胺磷浓度对酪蛋白水解过程的影响

从图 4 可见, 在 0.008% 的甲胺磷农药作用下, PQC 的 Δf_0-t 响应曲线都不同程度地左移, 曲线斜率与幅度增加最大, 其上升幅度明显大于没有甲胺磷时的情形, 酶被激活的程度也最大, 说明酪蛋白的水解过程最完全, 溶液的粘密度改变最大。在 0.024% 和 0.032% 的甲胺磷作用下, Δf_0-t 响应曲线明显右移, 曲线斜率和幅度明显减少, 频率上升速度减慢, 酶活性受到明显的抑制, 并且甲胺磷浓度越

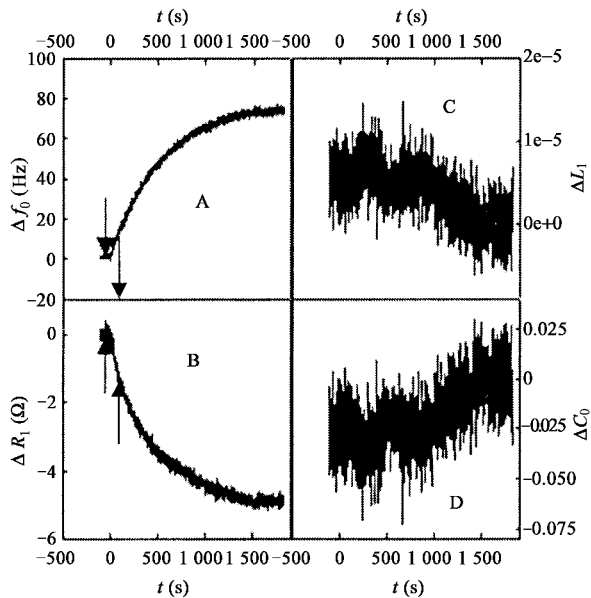


图 2 向 2.5 mL 磷酸缓冲液 (PBS) 及 0.1 mL (0.5%) 酪蛋白中加入 0.2 mL 酶液后的压电体声波 (BAW) 传感器的 Δf_0 (曲线 A) ΔR_1 (曲线 B) ΔL_1 (曲线 C) 和 ΔC_0 (曲线 D) 的同步响应

Fig. 2 Simultaneous responses of Δf_0 , ΔR_1 , ΔL_1 and ΔC_0 of the BAW sensor following the addition of proteinase (0.2 mL) in buffer solution containing 0.1 mL (0.5%) casein (0.2 mL) into the 5 mL detection cell. The same below. The arrow shows the addition of proteinase

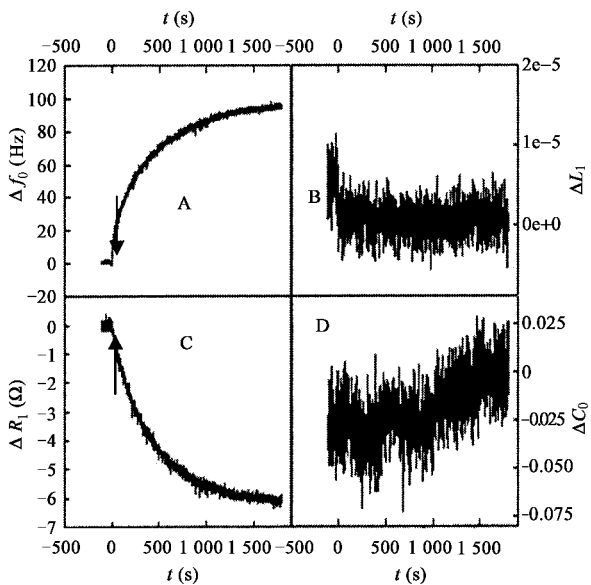


图 3 向 2.5 mL 磷酸缓冲液 (PBS) 及 0.1 mL (0.5%) 酪蛋白中加入 0.2 mL 酶液和 0.1 μ L 甲胺磷 (0.008%) 后的压电体声波 (BAW) 传感器的 Δf_0 (曲线 A) ΔR_1 (曲线 B) ΔL_1 (曲线 C) 和 ΔC_0 (曲线 D) 的同步响应

Fig. 3 Simultaneous responses of Δf_0 , ΔR_1 , ΔL_1 and ΔC_0 of the BAW sensor following the addition of proteinase (0.2 mL) in buffer solution containing 0.1 mL (0.5%) casein plus 0.1 μ L methamidophos (0.008%)

大,其曲线斜率和频率幅度下降也就越大。但是在甲胺磷浓度为 0.016% 时 Δf_0-t 响应曲线的斜率和频率幅度的变化比较特殊,在 0 ~ 8 min 内,曲线左移,曲线斜率增大,频率上升,反应速度较快,反应 8 min 以后,曲线明显右移,酶促反应速度明显减慢,其机理有待进一步研究。最终稳态频移响应与甲胺磷浓度的关系见图 5。

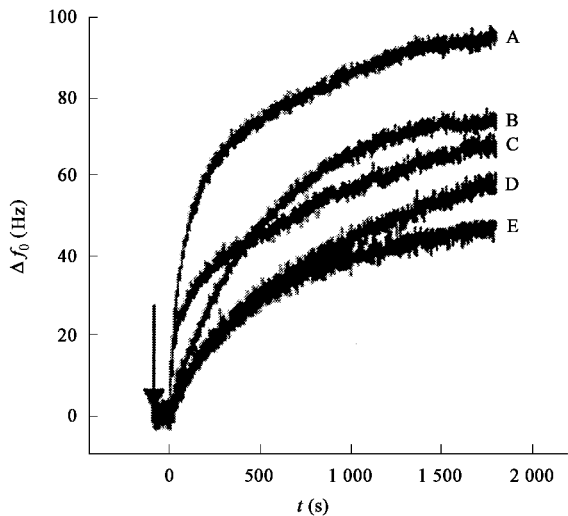


图 4 往 2.5 mL 磷酸缓冲液 (PBS) + 0.1 mL (0.5%) 酪蛋白 + 不同浓度的甲胺磷农药中加入 0.2 mL 酶液后的压电体声波 (BAW) 传感器的 Δf_0 的同步响应

Fig. 4 Simultaneous responses of Δf_0 of the BAW sensor following the addition of proteinase (0.2 mL) in buffer solution containing 0.1 mL (0.5%) casein plus methamidophos of different concentrations A ~ E 分别代表甲胺磷的浓度为 0.008%, 0, 0.016%, 0.024% 和 0.032%。A ~ E stand successively for concentrations of methamidophos, 0.008%, 0, 0.016%, 0.024%, and 0.032%, respectively.

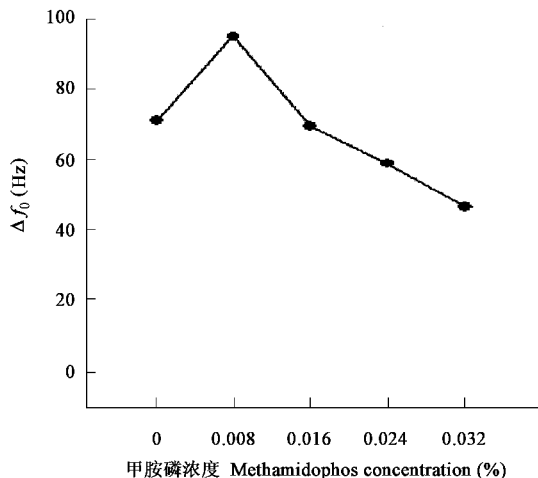


图 5 最终稳态频移响应与甲胺磷浓度的关系
Fig. 5 Relationship of final frequency shift and concentration of methamidophos

2.3 紫外分光光度分析

不同低剂量浓度的甲胺磷对拟环纹豹蛛中肠蛋白消化酶活力影响的紫外分光光度分析结果见表 1。从表 1 可知,在甲胺磷浓度梯度分别为 0.008%、0.016%、0.024% 和 0.032% 作用下,蛋白酶的比活力分别是未施农药时的 1.30 倍、0.88 倍、0.75 倍和 0.57 倍,经 *t* 检验均具显著或极显著差异,说明合适的低剂量浓度的甲胺磷能激活拟环纹豹蛛离体蛋白消化酶的比活力,较大剂量的甲胺磷抑制离体蛋白消化酶的比活力。其机理可能是低剂量的有毒物质刺激酶的构象发生轻度变化,酶的活性中心更易于与底物结合形成酶-底物复合物,同时也有利于酶对底物的降解。随着甲胺磷浓度的递增,蛋白消化酶的比活力逐渐下降,这与前面的压电传感监测的结果相同。说明压电体声波阻抗分析法能准确、快速地检测酶对专一性底物的酶促水解过程及有毒物质(如农药)对酶活性的影响。

表 1 不同低剂量浓度的甲胺磷对拟环纹豹蛛中肠蛋白消化酶活力的影响

Table 1 Effect of different low-dose D-allethrin on midgut proteinase activity of *Pardosa pseudoannulata*

甲胺磷浓度(%)	蛋白消化酶活力	比值
Methamidophos concentration	Midgut proteinase activity	Ratio
0	0.0312 ± 0.0012	1.0
0.008	0.0405 ± 0.0017**	1.30
0.016	0.0274 ± 0.0008*	0.88
0.024	0.0234 ± 0.0005*	0.75
0.032	0.0178 ± 0.0003**	0.57

* 和**分别表示经 *t* 检验差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。
* and ** stand for significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ by *t*-test, respectively.

3 讨论

本实验采用压电体声波阻抗法实时动态监测了拟环纹豹蛛中肠蛋白水解酶对酪蛋白的酶促水解过程及甲胺磷对酶活性的影响,并用传统的紫外分光光度分析法对结果进行了对比分析。结果表明,合适的低剂量甲胺磷能激活拟环纹豹蛛中肠蛋白水解酶的活性,稍大剂量的甲胺磷则对其有抑制效应,并发现压电体声波阻抗分析法比传统的紫外分光光度

分析法优势明显。本实验结果验证了作者曾提出的部分假设(王智等 2002),同时也进一步证实和发展了 Hueppe 和 Smyth 提出的“每一个物质在一定浓度中能杀死或破坏原生质,在较低浓度中抑制其发育,但在中性点之下更低的浓度时能刺激和增加生命潜力”的小剂量有益效应学说(冯致英,1980)。这对探讨低剂量杀虫剂增强蜘蛛控虫力的生物化学机制及对合理使用杀虫剂,减少其副作用及协调生防和化防的关系,都具有积极的意义。

参考文献(References)

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Feng ZY, 1980. Toxicology of Pesticides. Beijing: Chemical Industry Press. 57–134. [冯致英, 1980. 农药毒理学. 北京: 化学工业出版社. 57–134]
- Su HB, Williams P, Thompson M, 1995. Platinum anticancer drug binding to DNA detected by thickness-shear-mode acoustic wave sensor. *Anal. Chem.*, 67: 1 010–1 013.
- Wang HQ, 1981. Study on Utilization of Paddyfield Spiders. Beijing: Science and Technology Literature Press. 1–50. [王洪全, 1981. 稻田蜘蛛的利用研究. 北京: 科学技术文献出版社. 1–50]
- Wang Z, Yan HM, Jim JP, 2002. Study on interaction of the diversity of paddy field spider community and its objective pests occurring degree. *Korean Arachnol.*, 18(1): 39–45.
- Wang Z, Yan HM, Wang HQ, 2002. The influence of low-dose pesticides on the insect-control power of paddyfield spiders. *Acta Ecologica Sinica*, 22(3): 346–351. [王智, 颜亨梅, 王洪全, 2002. 低剂量农药对稻田蜘蛛控虫力的影响. 生态学报, 22(3): 346–351]
- Wang Z, Yuan ZM, Song DX, Zhu MS, 2004. Analysis on the dynamics of spatial distribution pattern of mixed spider population in rice field. *Entomologia Sinica*, 11(4): 257–265.
- Xie Q, Wang J, Zhou A, 1999. A study of depletion layer effects on equivalent circuit parameters using an electrochemical quartz crystal impedance system. *Anal. Chem.*, 71: 4 649–4 656.
- Yang M, Chung FL, Thompson M, 1993. Acoustic network analysis as a novel technique for studying protein adsorption and denaturation at surfaces. *Anal. Chem.*, 65: 3 713–3 716.
- Yao SZ, 1997. Piezoelectric Chemistry and Bio-Sensor. Changsha: Hunan Normal University Press. 1–297. [姚守拙, 1997. 压电化学与生物传感. 长沙: 湖南师范大学出版社. 1–297]

(责任编辑: 黄玲巧)