

# 家蝇(*Musca domestica* Vicina L.)头部 乙酰胆碱酯酶检测农药残留最佳条件研究

董杰, 王开运\*, 姜兴印, 仪美芹

(山东农业大学 植物保护学院 农药系, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 系统研究了敏感家蝇 *Musca domestica* Vicina L. 羽化后不同天数其头部乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的比活力、敏感度以及酶源蛋白质含量的变化; 缓冲液 pH 值对家蝇头部 AChE 比活力的影响。结果表明: 家蝇初羽化至羽化后第 15 d, 其头部 AChE 的比活力逐渐升高 [ $0.4483 \pm 0.0104 \sim 0.7769 \pm 0.0189 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ ], 而酶源蛋白质的含量逐渐下降 ( $187.0222 \pm 9.0213 \sim 83.0222 \pm 7.1111 \mu\text{g}/\text{头}$ )。羽化后 2~4 d, 其头部 AChE 的敏感度最高; 初羽化和羽化后第 15 d, 敌敌畏的  $\text{I}_{50}$  分别是羽化后第 3 d 的 1.4 倍和 2.1 倍。在一定的 pH 值范围内 (6.6~8.0), 家蝇头部 AChE 的比活力随缓冲液 pH 值的升高而增大。本研究为利用家蝇头部 AChE 检测有机磷残留量探索了最佳条件。

**关键词:** 家蝇; 乙酰胆碱酯酶; 比活力; 敌敌畏; 敏感度

**中图分类号:** Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2003)01-0093-04

我国是农药生产和使用大国, 化学防治在农业害虫防治中具有效果好、见效快、使用方便、经济等优点。但随着害虫抗药性的产生, 农药的用量也不断增大, 尤其在蔬菜和果品生产中农药残留已成为突出问题, 因食用被农药污染的瓜果、蔬菜引起的中毒事故屡见不鲜<sup>[1]</sup>。为控制农药的使用, 实现农产品的安全生产, 针对有机磷和氨基甲酸酯类农药残留测定的酶抑制技术近年来越来越受到重视。该技术具有方法简便、反应迅速、结果稳定、成本低廉等特点<sup>[2]</sup>。20世纪90年代以来, 我国农药残留工作者对此进行了大量的研究<sup>[2~5]</sup>。酶抑制法常用的酶源有: 植物酶、牛、猪等家畜的肝脏酯酶、人血浆或血清、马血清、蝇或蜜蜂头部的脑酯酶、兔或鼠的羧酸酯酶等<sup>[5,6]</sup>。但不同种类、不同来源的酶源, 对检测灵敏度具有较大的影响<sup>[7]</sup>。据文献报道, 酶抑制法测定农药残留量以敏感家蝇 *Musca domestica* Vicina L. 效果较佳<sup>[8]</sup>。余孝颖等进一步研究发现, 家蝇头部乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 对有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感度要优于其他来源的胆碱酯酶<sup>[9]</sup>。但该酶源直接用于农药残留检测的条件尚未优化。为此, 本研究以敏感家蝇为材料, 系统研究了敏感家蝇羽化后不同天数其头部 AChE 的比活力、敏感度、酶源蛋白质含量的变化, 以及缓冲液 pH 值对其头部 AChE 比活力的影响等, 以期酶抑制法测定农药残留选择最佳条件提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 敏感家蝇

虫源引自中国科学院动物研究所, 并在室内无药剂接触条件下长期饲养。

### 1.2 供试药品、试剂

97.86% 敌敌畏 (dichlorvos) 原油 (山东农药工业股份有限公司产品); 碘化硫代乙酰胆碱

作者简介: 王开运 (1954-), 男, 山东滕州人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药毒理方面的研究

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (2002BA516A12)。

(A TChI) (上海试剂一厂); 双(4-硝基-3-羧基苯)二硫化物(DTNB) (上海试剂三厂); 还原型谷胱甘肽(GSH) (上海酵母厂); 毒扁豆碱、考马斯亮蓝 G-250 (均为上海化学试剂公司进口包装); 牛血清白蛋白(江苏常熟福山生化试剂厂)。

### 1.3 酶源制备

取羽化后第 3 d 的家蝇成虫, 用液氮快速冷冻, 取头部, 用冰水预冷的  $0.1 \text{ mol/L}$  的磷酸缓冲液( $\text{pH} 7.4$ )作为提取液, 在冰水浴中充分匀浆, 匀浆液于  $0 \sim 3000 \text{ r/min}$  离心  $15 \text{ min}$ , 取上清液作酶源。

### 1.4 AChE 比活力的测定<sup>[10]</sup>

以 A TChI 作底物, 反应条件为  $27^\circ\text{C}$ , 保温  $15 \text{ min}$ 。反应终止后, 用 UV-2201 紫外分光光度计测定  $412 \text{ nm}$  的 OD 值, 将所得数据经 DPS 系统软件处理, 求出酶活力。

### 1.5 敌敌畏对 AChE 的抑制中浓度( $I_{50}$ )的测定<sup>[11]</sup>

于反应管中加入不同浓度的敌敌畏和酶液及底物 A TChI,  $28^\circ\text{C}$  条件下保温  $15 \text{ min}$  后终止反应, 加入显色剂 DTNB 和磷酸缓冲液( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH} 7.4$ ), 用 UV-2201 紫外分光光度计测定  $412 \text{ nm}$  的 OD 值, 将所得数据经 DPS 系统软件处理, 求出  $I_{50}$  值。

### 1.6 酶源蛋白质含量的测定<sup>[12]</sup>

以牛血清白蛋白为标准蛋白, 反应条件为  $25^\circ\text{C}$ , 保温  $2 \text{ min}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 家蝇羽化后不同天数其头部 AChE 的比活力及酶源蛋白质含量的变化

家蝇羽化后, 其头部 AChE 的比活力和酶源蛋白质含量随时间的变化而有较大的差异(图 1)。从成虫初羽化至羽化后第 15 d, AChE 的活性逐渐增强, 其比活力由初羽化时的  $0.4483 \pm 0.0104 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$  上升到了羽化后第 15 d 时的  $0.7769 \pm 0.0189 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ , 提高了 0.73 倍, 而酶源蛋白质的含量逐渐下降, 与初羽化时( $187.0222 \pm 9.0213 \mu\text{g}/\text{头}$ )相比, 羽化后第 15 d 酶源蛋白质的含量( $83.0222 \pm 7.1111 \mu\text{g}/\text{头}$ )下降了 55.6%。其中, AChE 比活力的升高与酶源蛋白质含量的下降密切相关。

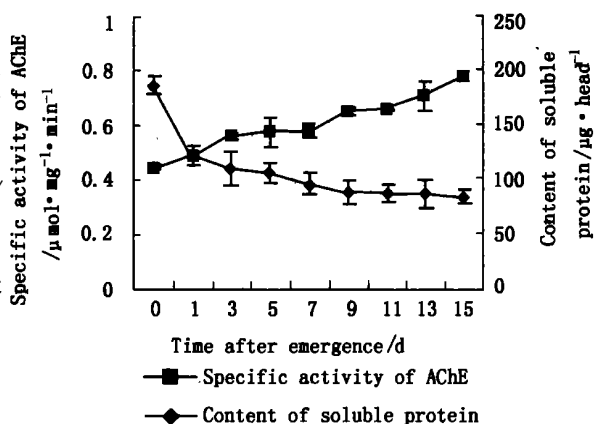


Fig 1 Determinations of specific activity of AChE and the content of soluble protein in housefly head in different days after emergence

### 2.2 家蝇羽化后不同天数其头部 AChE 对

家蝇羽化后, 其头部 AChE 对敌敌畏的敏感度随羽化后天数的不同差异明显(图 2)。家蝇初羽化时, AChE 的敏感度较低, 敌敌畏对其的抑制中浓度( $I_{50}$ )为  $3.5702 \pm 0.1018 \text{ mg/L}$ ; 之后逐渐升高, 至羽化后第 3 d, 达  $2.6237 \pm 0.2745 \text{ mg/L}$ ; 然后又逐渐降低, 至羽化后第 15 d, 降至  $5.4700 \pm 0.2340 \text{ mg/L}$ 。

### 2.3 缓冲液 pH 值对 AChE 比活力的影响

在缓冲液  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  不同 pH 值条件下, 家蝇头部 AChE 的比活力差异较大 (图 3)。缓冲液 pH 值为 6.6 时, AChE 的比活力较低, 为  $0.3656 \pm 0.0067 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ ; 之后, 随缓冲液 pH 值的升高, AChE 的比活力逐渐增大, pH 值为 8.0 时达到最大 [ $0.6209 \pm 0.0254 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ ]。由此说明, 随着磷酸缓冲液 pH 值的升高, AChE 对底物的水解能力增强。

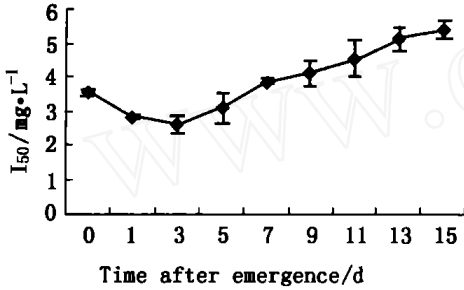


Fig 2 I<sub>50</sub> of dichlorvos to the AChE in housefly head in different days after emergence

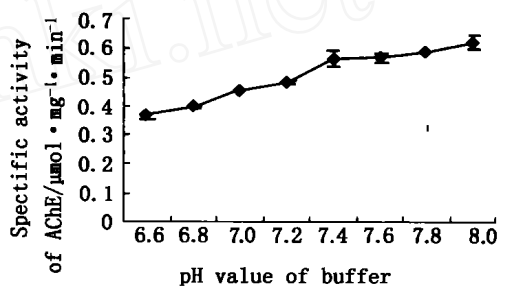


Fig 3 Comparison of specific activity of AChE in housefly head under different pH values

### 3 讨论

AChE 是昆虫神经系统中最重要酶系之一, 同时又是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标<sup>[13]</sup>。如果 AChE 受到抑制, 就会造成神经传导介质乙酰胆碱的积累, 从而影响神经冲动的正常传导, 使昆虫中毒致死。利用这一毒理学原理建立起来的酶抑制技术, 可以快速检测蔬菜和果品中的有机磷和氨基甲酸酯类农药残留<sup>[4]</sup>。但酶源的选择一直是困扰这一技术的难题, 农药残留工作者采用不同的酶源对农药残留进行了测定<sup>[2, 3, 14]</sup>。据文献报道, 家蝇头部 AChE 对有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感度要优于其他来源的胆碱酯酶<sup>[9, 15]</sup>。本研究进一步发现, 家蝇羽化后 2~4 d (3~5 日龄) 其头部 AChE 的敏感度最高, 但此时其头部 AChE 的比活力较低, 同时, 为了防止杂酶对酶抑制过程的干扰, 需进行纯化。Tripathi 等<sup>[16]</sup>用亲和层析法将家蝇头部的 AChE 进行纯化, 使其比活力提高了 1 223 倍, 值得借鉴。

DTNB 二硫键的断裂要求 pH 值在 6.5~8.5 之间, 因此 AChE 比活力的测定 (Ellman 法) 被限制在一定的 pH 值范围内<sup>[17]</sup>。本研究进一步发现, 在 6.6~8.0 范围内, 随缓冲液 pH 值的升高, AChE 对底物的水解能力增强, 其比活力逐渐增大, 与 Hellenbrand 等<sup>[18]</sup>的研究结果一致。因大多数有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂在碱性条件下易分解, 所以在测定中所使用的缓冲液的 pH 值不宜过高, 以 7.0~7.6 为宜。

### 参考文献:

[1] 赵建庄, 柴丽娜, 李元珍. 农药残留速测研究的现状及展望 [J]. 北京农学院学报, 2001, 16 (2): 76-80  
 [2] 张雪燕, 邓吉生, 翟留香. 蔬菜中农药残留量的生物化学检测 [J]. 西南农业学报, 1996, 9 (2): 62-66  
 [3] 纪淑娟, 赵丽丽, 冯辉. 一种快速检测农产品有机磷农药残留的方法 [J]. 农药, 2000, 39(10): 17-18  
 [4] 高晓辉, 朱光艳. 蔬菜上农药残毒快速检测技术-酶抑制法检测有机磷和氨基甲酸酯类农药 [J]. 农药科学与管理, 2000, 21 (4): 29-31.  
 [5] 赵建庄, 范志金, 安健, 等. 薄层层析-酶抑制法检测有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂 [J]. 四川师范大学学

- 报(自然科学版), 2001, 24 (5): 496-498
- [6] 杨大进 农药残留生物快速检验方法 [J]. 中国食品卫生杂志, 1998, 10(2): 38-40
- [7] 陆贻通, 周培, 李振红 生物酶技术在农药残留快速检测中的应用进展 [J]. 上海环境科学, 2001, 20 (10): 467-470
- [8] 黄文凤, 蔡琪, 林而立, 等 酶催化动力学光度法快速测定蔬菜中的农药残留毒性 [J]. 现代科学仪器, 2000, (2): 29-32
- [9] 余孝颖 有机磷农药对不同生物来源的胆碱酯酶选择性的研究 [J]. 环境科学, 1996, 17 (4): 41-43
- [10] Ellman G L, Kiane Courtney K, Andres V, *et al* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Biochem Pharmacology*, 1961, 7: 88-95
- [11] 慕立义 植物化学保护研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1994, 150-151.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254
- [13] Fournier D, Mutero A. Mini review: modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1994, 108c(1): 19-31.
- [14] 李治祥, 翟延路 测定蔬菜水果中农药残留量的薄层-植物酶抑制法 [J]. 农业环境保护, 1988, 7 (3): 33-34
- [15] 郭敦成 农药毒理及其应用 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1987, 79-81.
- [16] Tripathi R K, O'Brien R D. Purification of acetylcholinesterase from house fly brain by affinity chromatography [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1977, 480: 382-389
- [17] 高希武 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍 [J]. 昆虫知识, 1987, (4): 245-246
- [18] Hellenbrand K, Krupka R M. The pH dependence of an insect (*Musca domestica*) acetylcholinesterase [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1974, 47B: 271-278

## Studies on the Optimum Conditions of Detecting Pesticides Residue by Using Acetylcholinesterase in Housefly (*Musca domestica* Vicina L.) Head

DONG Jie, WANG Kaiyun\*, JIANG Xing-yin, YIM ei-qin

(Department of pesticide, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

**Abstract:** The changes of the activity and susceptibility of acetylcholinesterase (AChE) and the changes of the content of protein of susceptible housefly (*Musca domestica* Vicina L.) after emergence were investigated systematically, and the effects of different pH values on the activity of AChE were also studied. The results showed that, the specific activity of AChE in the head increased gradually [ $0.4483 \pm 0.0104 \sim 0.7769 \pm 0.0189 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ ] from the first day to the fifteenth day after emergence, while the content of protein decreased gradually ( $187.0222 \pm 9.0213 \sim 83.0222 \pm 7.1111 \mu\text{g}/\text{head}$ ). The susceptibility of AChE in the head increased to highest level from the second day to the fourth day after emergence, and the  $I_{50}$  of dichlorvos of the first day and the fifteenth day after emergence was 1.4 times and 2.1 times compared to that of the third day, respectively. The specific activity of AChE in the head increased with the increasing of the pH value within some scope. These results offered an optimum conditions for detecting phosphorus pesticide residue using AChE from housefly head.

**Key words:** housefly; acetylcholinesterase; specific activity; dichlorvos; susceptibility