

王君,袁亚明,江晶晶,等. 动物肝酯酶对西维因的抑制响应[J]. 轻工学报,2022,37(3):10-16.

WANG J, YUAN Y M, JIANG J J, et al. Inhibitory response to carbaryl of animal liver esterases[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(3):10-16. DOI:10.12187/2022.03.002



# 动物肝酯酶对西维因的抑制响应

王君<sup>1</sup>, 袁亚明<sup>1</sup>, 江晶晶<sup>1</sup>, 许慧卿<sup>1</sup>, 李松南<sup>2</sup>

1. 扬州大学 旅游烹饪学院, 江苏 扬州 225127;

2. 扬州大学 农业科技发展研究院/教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 江苏 扬州 225009

**摘要:** 采用硫酸铵分级盐析后透析的方法分别从鹅肝、鸡肝和猪肝中提取和纯化酯酶, 对其进行蛋白组分的定性和定量分析及结构表征, 并以西维因作为农药模型进行抑制响应研究。结果表明: 鹅肝酯酶得率最高(14.58%), 鸡肝酯酶得率最低(8.82%)但热稳定性最好, 猪肝酯酶的蛋白质量浓度最高(12.47 mg/mL); 3种动物肝酯酶的蛋白分子质量均为30~110 kDa, 主要蛋白组分的分子质量均为55 kDa, 且该蛋白组分在鸡肝酯酶中的相对含量最高(16.74%), 在猪肝酯酶中的相对含量最低(14.31%); 3种动物肝酯酶的蛋白颗粒大小不一, 均呈片状结构, 表面较光滑; 在西维因质量浓度为0.5~10.0 mg/L时, 鸡肝酯酶的线性范围(0.5~5.0 mg/L)、检测下限(0.29 mg/L)和 $IC_{50}$ (7.74 mg/L)均最低, 可作为西维因快速检测的潜在敏感酶源。

**关键词:** 西维因; 动物肝酯酶; 酶联免疫吸附技术; 农药残留检测

**中图分类号:** TS201.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2022)03-0010-07

## 0 引言

喷洒农药是控制病虫害、保证粮食高产的必要措施, 但也伴随农药残留等食品安全问题。含有农药残留的食品原料是否安全, 取决于农药的残留量、毒性和食用剂量<sup>[1]</sup>。因此, 制定农药最大残留限量标准是目前各国际组织和国家加强农药残留管控的通行做法, 而农药残留的高效、快速检测则是重要技术手段。

目前农药残留的检测技术主要包括色谱(气相色谱、高效液相色谱、薄层色谱、免疫亲和色谱等)技术、光谱(拉曼光谱、红外光谱、近红外光谱、荧光

光谱等)技术和生物(酶联免疫吸附(ELISA)、聚合酶链式反应、生物传感器、生物芯片等)技术<sup>[2]</sup>。其中, 建立在免疫学基础上的ELISA技术利用酶标记的抗原或抗体作为主要试剂, 通过复合物的酶催化底物呈色反应实现待测物质的定性或定量检测<sup>[3]</sup>, 已逐渐发展成为农药残留快速检测的主要技术之一。朱松明等<sup>[4]</sup>基于有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药对乙酰胆碱酯酶的抑制作用, 以吡啶酚乙酸酯为酶促水解反应的显色底物, 通过物理吸附法固定乙酰胆碱酯酶并将其制备成农药残留快速检测酶片, 实现了对农产品中有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药残留的快速定性筛检。陈子鹏等<sup>[5]</sup>同

收稿日期: 2021-08-29; 修回日期: 2022-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(82000791)

作者简介: 王君(1991—), 女, 安徽省亳州市人, 扬州大学讲师, 博士, 主要研究方向为食品营养与代谢。E-mail: 007232@yzu.edu.cn

通信作者: 李松南(1993—), 男, 安徽省阜阳市人, 扬州大学助理研究员, 博士, 主要研究方向为食品生物化学。E-mail: lsnyz2020@yzu.edu.cn

样以乙酰胆碱酯酶为酶源,基于 ELISA 技术原理建立了自助式农药残留检测平台,通过图像识别技术进行农药残留检测。但上述研究中使用的乙酰胆碱酯酶是一种酯酶标准品,提取和纯化工艺较为复杂,价格也较昂贵,这限制了其在农药残留检测中的大规模应用。

酯酶是催化酯类化合物水解的一大类酶的总称,广泛分布于动物、植物和微生物中<sup>[6]</sup>。动物肝脏、血液和组织中存在多种可以水解有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药的酯酶,且获取和提取成本较低,可作为酯酶标准品的替代品以满足市场需求<sup>[7]</sup>。徐斐等<sup>[8]</sup>研究发现,分级盐析后透析得到的鸡肝酯酶回收率较高,且均对有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药响应较敏感,适用于大规模动物酯酶的制备。杨莉等<sup>[9]</sup>研究发现,猪肝酯酶对双(对硝基苯基)磷酸酯敏感性最高;与胆碱酯酶相比,猪肝酯酶对供试的多数有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药的半抑制浓度( $IC_{50}$ )更低,敏感性更好。

尽管部分文献已报道了动物肝酯酶作为 ELISA 技术农药残留快速检测敏感酶源的潜在价值,但针对其提取、纯化、结构表征及对农药的敏感性响应尚缺乏系统研究。基于此,本文拟采用硫酸铵分级盐析后透析的方法分别从鹅肝、鸡肝和猪肝中提取和纯化酯酶,对 3 种动物肝酯酶的蛋白组分进行定性和定量分析,并对其结构进行表征。西维因,又名甲萘威、胺甲萘,是目前常见的氨基甲酸酯类农药,本文将其作为农药残留敏感性响应的农药模型,研究 3 种动物肝酯酶在不同西维因质量浓度下的酶活抑制率、敏感程度、检出下限和  $IC_{50}$ ,以期为 ELISA 技术农药残留快速检测的候选酶源开发与利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜鹅肝、鸡肝和猪肝,购于扬州市当地农贸市场;西维因、三羟甲基氨基甲烷,上海阿拉丁科技股份有限公司产;2,6-二叔丁基对苯酚、乙二胺四乙酸(EDTA)、苯甲基磺酰氟、KCl、硫酸铵、十二烷基

硫酸钠(SDS),国药集团化学试剂有限公司产;溴酚蓝,江苏强盛功能化学股份有限公司产;Marker 蛋白,美国 Bio-Rad 中国有限公司产;固蓝 B 盐、 $\alpha$ -萘酚、 $\alpha$ -乙酸萘酯,生工生物工程(上海)股份有限公司产;聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)试剂盒,赛默飞世尔科技公司产。本实验所用试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器与设备

HR-6 型组织匀浆机,上海沪析实业有限公司产;BenchTop Pro 型台式冻干机,美国 Virtis 公司产;1510 型酶标仪,美国 Thermo 公司产;DYY-11 型电泳仪,北京市六一生物技术有限公司产;1658000 型垂直电泳槽,伯乐生命医学产品(上海)有限公司产;H1650-W 型离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产;S-4800 II 型场发射扫描电镜(SEM),日本 Hitachi 公司产;DSC204F1 型差示扫描量热仪(DSC),德国 Netzsch 公司产。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 动物肝酯酶的提取和纯化** 参照徐斐等<sup>[8]</sup>的方法,并稍作改进。分别准确称取 30.0 g 新鲜鸡肝、鹅肝和猪肝,依次加入 100 mL Tris-乙酸缓冲液(0.1 mol/L 的 Tris 溶液,含 0.1 mol/L 的 KCl 和 0.001 mol/L 的 EDTA,用乙酸调节 pH 值至 7.4)、100 mL 苯甲基磺酰氟(115  $\mu$ mol/L)和 100 mL 2,6-二叔丁基对甲酚(45  $\mu$ mol/L)后,在冰水浴中用组织匀浆机进行匀浆处理,于 8000 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液,即为动物肝酯酶粗提物,于 -18  $^{\circ}$ C 冰箱中冻藏,备用。

取 30 mL 动物肝酯酶粗提物置于冰水浴中,添加一定质量的硫酸铵至整个体系中硫酸铵饱和度为 30%,于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中静置 2 h,低温(4  $^{\circ}$ C)、8000 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液;将得到的上清液在冰水浴中继续添加一定质量的硫酸铵至整个体系中硫酸铵饱和度为 70%,于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中静置 2 h,重复上述离心步骤,收集并冻干沉淀,于 -18  $^{\circ}$ C 冰箱中冻藏,备用。准确称取 1.5 g 冻干粉,与 10 mL PBS 缓冲液(0.1 mol/L 的磷酸缓冲盐溶液)混匀后装入透析袋(截留分子量 8000~14 000 kDa)中,磁力搅拌透析 6 h,于 8000 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液,即得纯化后的动物肝酯酶溶液。

用 BCA 试剂盒测定动物肝酯酶溶液中蛋白的质量浓度;将上述纯化后的动物肝酯酶溶液冻干后得到固体动物肝酯酶,称量其质量,记为  $W/g$ ,按照如下公式计算动物肝酯酶得率。

$$\text{得率} = \frac{W}{1.5} \times 100\%$$

**1.3.2 动物肝酯酶蛋白组成测定** 通过 SDS-PAGE 测定 3 种动物肝酯酶的蛋白组成<sup>[10]</sup>,其堆积凝胶和分离凝胶的质量分数分别为 5% 和 8%,电泳电压分别为 80 V 和 120 V。将 3 种固体动物肝酯酶分别配制质量浓度为 8 mg/L 的酶液,然后准确量取 200  $\mu\text{L}$  酶液和 50  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 缓冲液(1.5 mol/L, pH 值为 8.8),置于离心管中并混合均匀,沸水浴处理 8 min,于 12 000 r/min 条件下离心 5 min 后,量取 8  $\mu\text{L}$  上清液加入凝胶孔。根据 Marker 蛋白中各蛋白分子质量的对数  $\lg M/(k\text{Da})$  与各蛋白的迁移距离  $L/\text{cm}$  绘制的线性标准曲线为  $L = -34.13\lg M + 182.7, R^2 = 0.9901$ 。通过 Image J 软件计算动物肝酯酶对应每个泳道中蛋白条带的分子质量及其相对含量。

**1.3.3 动物肝酯酶的微观形态观察** 分别称取一定质量的固体动物肝酯酶,用导电胶将其固定在金属载物台上,真空喷金 90 s 后,于 SEM 下观察其微观形态。采集条件为:加速电压 10 kV,放大倍数 5000 倍。

**1.3.4 动物肝酯酶的热力学特性测定** 准确称取 5 mg 固体动物肝酯酶,置于 DSC 坩埚中,按照质量比 1:3 添加 15 mg 蒸馏水,混合均匀后静置 2 h。DSC 的扫描温度范围为 40~120  $^{\circ}\text{C}$ ,扫描速度为 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ <sup>[11]</sup>。

**1.3.5 动物肝酯酶的酶活力测定** 准确称取 5 mg 固体动物肝酯酶,用 1 mL PBS 缓冲液溶解后,加入 1 mL 含不同质量浓度西维因(0.5~10.0 mg/L)的 PBS 缓冲液和 25  $\mu\text{L}$  底物(100 mmol/L  $\alpha$ -乙酸萘酯丙酮溶液),混合均匀后于 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡水浴中孵育 5 min,再加入 0.25 mL 显色剂溶液(质量分数为 3.6%的 SDS 溶液,其中添加质量分数为 0.8%的固兰 B 盐),继续于 30  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡水浴中孵育 5 min。以不加底物的样品溶液作为空白对照,在 595 nm 处

测定上述溶液的吸光度,比较不同质量浓度的西维因对样品酶活抑制率的影响<sup>[12]</sup>。动物肝酯酶的酶活力和酶活抑制率计算公式如下:

$$E = \frac{D \times (K \times A)}{T} \times 10^{-3}$$

$$I = \frac{E_2 - E_1}{E_1} \times 100\%$$

式中, $E$  为样品的酶活力/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$ , $D$  为样品的稀释倍数, $K$  为  $\alpha$ -萘酚在 pH 值为 6.4 条件下的标准曲线斜率/ $(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ , $T$  为反应时间/ $\text{min}$ , $A$  为溶液的吸光度, $I$  为酶活抑制率/%, $E_2$  为无农药抑制时样品的酶活力/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$ , $E_1$  为一定质量浓度西维因抑制时样品的酶活力/ $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$ 。

西维因检测下限定义为与 3 倍抑制率标准差平均值相对应的农药质量浓度<sup>[8,12]</sup>。参考杨莉等<sup>[9]</sup>的方程拟合方法,通过酶活抑制率方程可计算当  $I = 50\%$  时的农药质量浓度,即该动物肝酯酶对此农药的  $IC_{50}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 。

## 1.4 数据处理与分析

上述实验均重复进行 3 次,结果以(平均值 $\pm$ 标准差)表示,并使用 SPSS 和 Origin8.5 软件进行数据分析和作图,单因素方差分析通过 Duncan 多重比较法进行显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 动物肝酯酶得率及蛋白质质量浓度分析

不同动物肝酯酶得率及蛋白质质量浓度见表 1。由表 1 可知,鹅肝酯酶得率最高(14.58%),鸡肝酯酶得率最低(8.82%),这可能与动物肝来源、肝成分组成等有关<sup>[12]</sup>。鹅肝、鸡肝和猪肝酯酶的蛋白质质量浓度分别为 11.58 mg/mL、9.96 mg/mL 和 12.47 mg/mL,均高于经 EDAC-Procaïnamide-CH-Sepharose 4B 和 Procaïnamide-ECH-Sepharose 4B 亲和层析柱纯化的鲑鱼脑组织胆碱酯酶(0.003 2 mg/mL)<sup>[13]</sup>和葱蝇乙酰胆碱酯酶(0.11 mg/mL)<sup>[14]</sup>,表明硫酸铵分级盐析后透析的方法适合动物肝酯酶的提取和纯化,但动物肝酯酶得率较低的问题还需进一步优化和探索。从动物肝酯酶得率和蛋白质质量浓度综合考虑,鹅肝和猪肝更适合作为动物肝酯酶提取的原料。

表1 不同动物肝酯酶得率及蛋白质量浓度

Table 1 Yield and protein mass concentration of esterases obtained from different animal liver esterases

酯酶种类	得率/%	蛋白质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )
鹅肝酯酶	14.58±0.46 <sup>a</sup>	11.58±0.53 <sup>b</sup>
鸡肝酯酶	8.82±0.23 <sup>c</sup>	9.96±0.18 <sup>c</sup>
猪肝酯酶	10.67±0.88 <sup>b</sup>	12.47±0.13 <sup>a</sup>

注:同一列不同字母表示具有显著性差异( $P<0.05$ )。

## 2.2 动物肝酯酶的蛋白组成分析

不同动物肝酯酶的 SDS-PAGE 图谱如图 1 所示,其中, M 为 Marker 蛋白, A 为鹅肝酯酶, B 为鸡肝酯酶, C 为猪肝酯酶。不同动物肝酯酶的蛋白组成及相对含量见表 2。由图 1 和表 2 可知,鹅肝、鸡肝和猪肝酯酶蛋白的分子质量均为 30~110 kDa。鹅肝酯酶中分子质量为 55 kDa 的蛋白相对含量最高(14.31%),其次是分子质量为 43 kDa 和 37 kDa 的蛋白(11.36% 和 11.15%),而分子质量为 101 kDa 和 110 kDa 的蛋白相对含量较低(<5%)。鸡肝酯酶中分子质量为 55 kDa 的蛋白相对含量也最高(16.74%),其次是分子质量为 43 kDa 和 37 kDa 的蛋白(13.10%和 12.93%),而分子质量为 101 kDa 和 110 kDa 的蛋白相对含量较低(<2%)。于晓航等<sup>[12]</sup>研究发现,通过分级盐析和排阻色谱法得到的鸡肝酯酶蛋白的分子质量主要分布在 49~90 kDa,且农药敏感性较好。猪肝酯酶中分子质量为 55 kDa 的蛋白相对含量也最高(14.67%),其次是分子质量为 34~43 kDa 的蛋白(10.21%~10.97%),而分子质量为 101 kDa 和 110 kDa 的蛋白相对含量较低(<4%),该结果与 D. Böttcher 等<sup>[15]</sup>的研究结果一致。综上所述,分子质量为 55 kDa 的蛋白是 3 种动物肝酯酶中最主要的蛋白成分,且在鸡肝酯酶中的相对含量最高,在猪肝酯酶中的相对含量最低。

## 2.3 动物肝酯酶的微观结构分析

不同动物肝酯酶的 SEM 图谱如图 2 所示。由图 2 可知,鹅肝、鸡肝和猪肝酯酶蛋白颗粒大小不一,以片状结构为主,表面较光滑,存在少量球形蛋白,这可能与蛋白种类和干燥工艺有关。这与陈珂等<sup>[16-17]</sup>的研究结果一致。陈珂等<sup>[16]</sup>研究发现,喷雾干燥的乳清蛋白颗粒呈现表面皱缩的不规则球

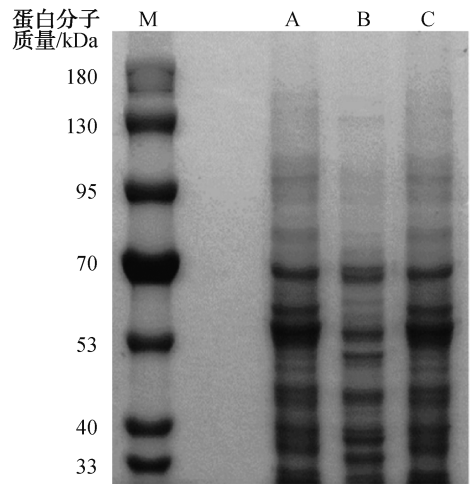


图1 不同动物肝酯酶的 SDS-PAGE 图谱  
Fig. 1 SDS-PAGE image of esterases obtained from different animal liver esterases

表2 不同动物肝酯酶的蛋白组成及相对含量  
Table 2 Protein composition and relative content of esterases obtained from different animal liver esterases

蛋白分子质量/kDa	鹅肝酯酶中的蛋白相对含量/%	鸡肝酯酶中的蛋白相对含量/%	猪肝酯酶中的蛋白相对含量/%
110	4.89	1.47	3.88
101	4.04	1.47	3.24
85	5.85	3.50	4.89
72	10.70	12.36	9.38
62	9.58	7.11	9.27
55	14.31	16.74	14.67
50	9.15	12.11	8.37
43	11.36	13.10	10.21
37	11.15	12.93	10.25
34	10.49	10.24	10.97
30	9.63	8.97	9.49

形,而真空冷冻干燥的乳清蛋白颗粒呈现表面光滑的片状结构。李向红等<sup>[17]</sup>研究发现,冷藏冻干后的草鱼肌原纤维蛋白呈现表面光滑的片层结构。

## 2.4 动物肝酯酶的热力学性质分析

在 DSC 升温过程中,蛋白结构的无序化或聚集态结构的解开会导致吸热现象,而超过一定温度后,蛋白变性则会导致放热现象,这些都与蛋白的种类和性质有关<sup>[18]</sup>。不同动物肝酯酶的 DSC 图谱如图 3 所示。由图 3 可知,鹅肝和猪肝酯酶分别在 54℃ 左右出现 1 个放热峰、在 100℃ 左右出现 1 个吸热峰;而鸡肝酯酶在 59℃ 和 78℃ 左右出现 2 个放热峰,这与鲑鱼球蛋白的热力学分析结果一致<sup>[19]</sup>。对

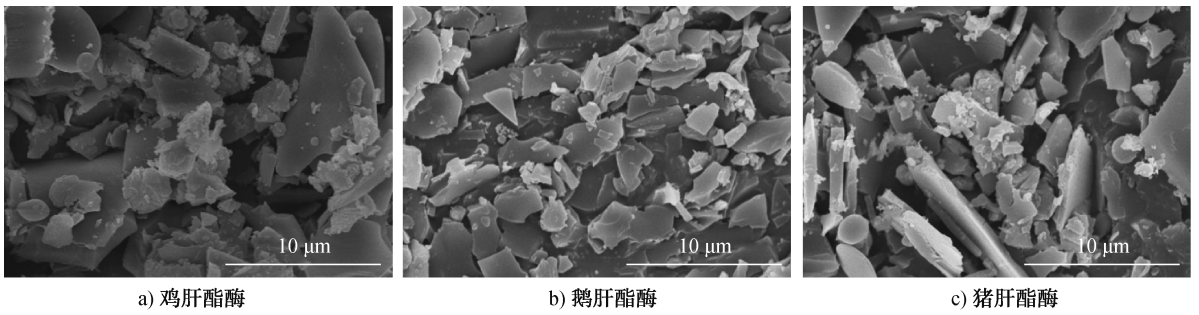


图2 不同动物肝酯酶的SEM图谱

Fig. 2 SEM images of esterases obtained from different animal liver esterases

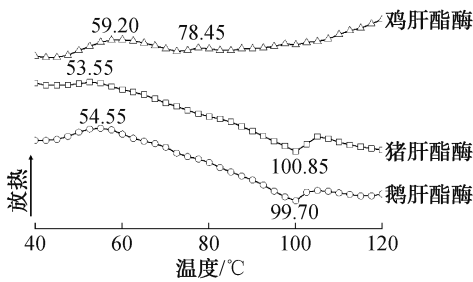


图3 不同动物肝酯酶的DSC图谱

Fig. 3 DSC curves of esterases obtained from different animal liver esterases

3种动物肝酯酶的DSC图谱进一步分析,可以得到起始温度( $T_o$ )、峰值温度( $T_p$ )、终止温度( $T_c$ )和热焓值( $\Delta H$ )4个热力学特征参数(见表3)。由表3可知,在第1个放热峰(Peak I)中,3种动物肝酯酶的 $T_o$ 无显著差异,但 $\Delta H$ 存在显著差异,且鸡肝酯酶的 $\Delta H$ 最大,表明鸡肝酯酶的热稳定性最好;在第2个吸/放热峰(Peak II)中,猪肝酯酶和鹅肝酯酶的 $T_o$ 显著大于鸡肝酯酶,且 $\Delta H$ 均存在显著差异。上述3种动物肝酯酶在热力学性质上的差异,主要与其蛋白组成及相对含量紧密相关,且与SDS-PAGE数据一致。

## 2.5 动物肝酯酶对西维因的抑制响应分析

按抑制剂与酶的结合方式,可逆抑制分为同位抑制作用和别位抑制作用。前者指抑制剂与酶活性中心结合阻断酶分子的结合基团或催化基团,或与酶-底物复合物结合,阻止底物形成产物;后者指

抑制剂与酶活性中心以外的部位结合,通过酶分子构象的改变影响底物与酶的结合,进而影响催化效率。西维因可与胆碱酯酶活性中心丝氨酸的羟基结合,阻止乙酰胆碱与胆碱酯酶的结合,进而使体内的乙酰胆碱积聚而产生毒性<sup>[20]</sup>。因此,动物肝酯酶与西维因的结合属于同位抑制作用。

不同质量浓度西维因对不同动物肝酯酶的抑制率如图4所示。由图4可知,3种动物肝酯酶的抑制率均随西维因质量浓度的增加而升高,其中鸡肝酯酶最敏感,鹅肝酯酶次之,猪肝酯酶最弱。通过函数拟合可进一步计算西维因质量浓度对数值与不同动物肝酯酶抑制率的拟合曲线 $Y=a+b\lg X$ ,其参数见表4。由表4可知,在西维因质量浓度为0.5~10.0 mg/L时,3种动物肝酯酶的抑制率与西维因质量浓度的对数值均存在较好的线性关系( $R^2 > 0.90$ ),这与徐斐等<sup>[8]</sup>选择游离鸡肝酯酶和固定化鸡肝酯酶检测有机磷类农药和氨基甲酸酯类农药得到的拟合结果一致。与鹅肝酯酶和猪肝酯酶的线性范围相比,鸡肝酯酶的线性范围更低,且其检测下限远远低于鹅肝酯酶和猪肝酯酶,这表明鸡肝酯酶中富含对西维因敏感的蛋白组分。本研究提取的鸡肝酯酶的检测下限为0.29 mg/L,低于徐斐等<sup>[8]</sup>研究报道的游离鸡肝酯酶检测下限(2.52 mg/L)和离子交换色谱固定化的鸡肝酯酶检测下限(0.78 mg/L)。

表3 不同动物肝酯酶的热力学特征参数

Table 3 Thermodynamic characteristic parameters of esterases obtained from different animal liver esterases

种类	Peak I				Peak II			
	$T_o/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$	$T_o/^\circ\text{C}$	$T_p/^\circ\text{C}$	$T_c/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$
鹅肝酯酶	46.00±0.00 <sup>a</sup>	54.55±0.55 <sup>b</sup>	60.85±1.75 <sup>b</sup>	1.79±0.04 <sup>b</sup>	93.95±0.85 <sup>a</sup>	99.70±0.20 <sup>a</sup>	101.95±0.35 <sup>a</sup>	-0.69±0.01 <sup>c</sup>
鸡肝酯酶	47.55±1.15 <sup>a</sup>	59.20±0.40 <sup>a</sup>	71.50±1.60 <sup>a</sup>	2.50±0.06 <sup>a</sup>	74.85±0.25 <sup>b</sup>	78.45±1.05 <sup>b</sup>	83.25±0.85 <sup>b</sup>	0.16±0.03 <sup>a</sup>
猪肝酯酶	45.20±0.50 <sup>a</sup>	53.55±0.45 <sup>b</sup>	59.55±0.25 <sup>b</sup>	0.66±0.06 <sup>c</sup>	97.40±1.40 <sup>a</sup>	100.85±0.05 <sup>a</sup>	103.10±0.20 <sup>a</sup>	-0.40±0.01 <sup>b</sup>

注:同一行不同字母表示具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

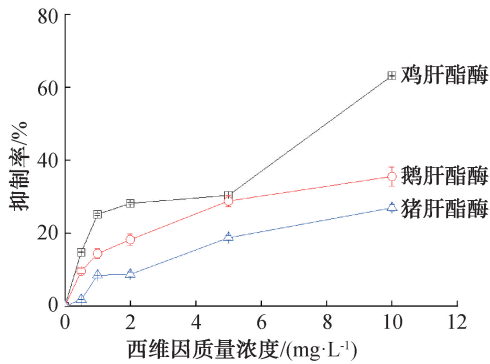


图4 不同质量浓度西维因对不同动物肝酯酶的抑制率

Fig. 4 Inhibition rate of esterases obtained from different animal liver esterases with various concentration of carbaryl

表4 西维因质量浓度对数值与不同动物肝酯酶抑制率的拟合曲线参数

Table 4 The parameters from each fitting curve between the logarithm value of carbaryl mass concentration and the inhibition rate of different animal liver esterases

种类	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	线性范围/ (mg·L <sup>-1</sup> )	检测下限/ (mg·L <sup>-1</sup> )	<i>IC</i> <sub>50</sub> / (mg·L <sup>-1</sup> )
鹅肝酯酶	34.35	0.99	2.0~10.0	2.07	28.40
鸡肝酯酶	11.53	0.97	0.5~5.0	0.29	7.74
猪肝酯酶	36.29	1.00	2.0~10.0	2.47	33.79

在食品毒理学中,酯酶的  $IC_{50}$  与农药敏感性紧密相关, $IC_{50}$  越小,表明其对该农药越敏感<sup>[21]</sup>。3种动物肝酯酶中,鸡肝酯酶的  $IC_{50}$  为 7.74 mg/L,远低于鹅肝酯酶(28.40 mg/L)和猪肝酯酶(33.79 mg/L),表明鸡肝酯酶中对西维因敏感的蛋白组分及其相对含量更多,且与抑制速率和检测下限的趋势一致。但与美洲蟑螂头部乙酰胆碱酯酶对西维因的  $IC_{50}$  (0.29 μmol/L)<sup>[22]</sup> 相比,本研究中鸡肝酯酶的  $IC_{50}$  (约 38.47 μmol/L) 明显偏高,这可能与不同来源酯酶在分子结构和蛋白组分上具有显著差异有关。

### 3 结论

本文通过硫酸铵分级盐析后透析的方法分别从鹅肝、鸡肝和猪肝中提取和纯化酯酶,定性和定量分析了3种动物肝酯酶的蛋白组分,并对其结构进行表征,进而研究了其对西维因的抑制响应。3种动物肝酯酶的得率和蛋白质量浓度均呈现显著差异,其中鹅肝酯酶得率最高(14.58%),猪肝酯酶的蛋白

质量浓度最高(12.47 mg/mL),即鹅肝和猪肝更适合作为动物肝酯酶提取的原料;3种动物肝酯酶的蛋白分子质量均为30~110 kDa,且主要蛋白成分的分子质量均为55 kDa;3种动物肝酯酶蛋白的颗粒形态均一旦以片状结构为主,表面较光滑;鸡肝酯酶的热稳定性最好,且当西维因质量浓度为0.5~10.0 mg/L时,其线性范围(0.5~5.0 mg/L)、检测下限(0.29 mg/L)和  $IC_{50}$  (7.74 mg/L) 均最低,可作为西维因快速检测的潜在敏感酶源。酯酶纯化工艺优化、最佳酶活反应条件和固定化酯酶应用将是下一步值得探索的研究方向。

### 参考文献:

- [1] 陈斌,吴芳芳,周翔,等. 果蔬食品安全问题研究及对策分析[J]. 食品安全导刊,2020,294(35):71-73.
- [2] 陈周秀,罗影,罗杨丽. 农产品中农药残留检测技术研究进展[J]. 农产品加工,2020,497(3):70-73.
- [3] 周邦萌,李其美. 酶联免疫吸附分析技术在食品农药残留检测中的应用探究[J]. 食品安全导刊,2020,277(18):87-88.
- [4] 朱松明,周晨楠,和劲松,等. 基于酶抑制法的农药残留快速比色检测[J]. 农业工程学报,2014,30(6):242-248.
- [5] 陈子鹏,马建博,杜建华. 基于酶抑制法的自助式农药残留检测平台建立[J]. 农业工程学报,2019,35(21):289-294.
- [6] 张佳佳. 乙酰胆碱酯酶酶源的筛选、提取及其特性研究[D]. 广州:华南理工大学,2016.
- [7] 王琳琳,高兴明,韦海涛,等. 固定化酶在食品工业中的应用研究进展[J]. 轻工学报,2021,36(2):25-33.
- [8] 徐斐,许学勤,张慧君,等. 鸡肝酯酶在有机磷和氨基甲酸酯类农药检测中的应用研究[J]. 食品科学,2007,330(5):237-240.
- [9] 杨莉,王羚佳,开拓,等. 猪肝酯酶农药敏感性及其与胆碱酯酶的对比研究[J]. 西南农业学报,2018,31(7):1536-1542.

- [10] 孙克江,张甜,曲梅丽,等.聚丙烯酰胺凝胶电泳法快速检测植物源性食品中的蛋白成分[J].食品安全质量检测学报,2017,8(3):895-899.
- [11] 许可,邱国栋,李星科,等.冻藏时间对面团水分物态变化及品质特性的影响[J].轻工学报,2021,36(1):9-16.
- [12] 于晓航,朱念辛,徐斐,等.分离纯化提高鸡肝酯酶对农药抑制响应的研究[J].现代食品科技,2015,31(6):230-235.
- [13] 朱小山,孟范平,何东海.鲛鱼脑组织 AChE 的分离纯化及某些生化性质[J].青岛大学学报(工程技术版),2006,21(2):35-41.
- [14] 叶东平.葱蝇乙酰胆碱酯酶的纯化及其生化毒理学特性研究[D].重庆:重庆师范大学,2011.
- [15] BÖTTCHER D, BRUSEHABER E, DODERER K, et al. Functional expression of the  $\gamma$ -isoenzyme of pig liver carboxyl esterase in *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6):1282-1289.
- [16] 陈珂,刘丽莉,孟圆圆,等.鸡蛋清蛋白喷雾干燥工艺优化及特性变化[J].食品与机械,2019,35(1):197-203,231.
- [17] 李向红,王发祥,张付兰,等.冷藏过程中草鱼肌原纤维蛋白结构的变化[J].食品与发酵工业,2015,41(10):177-181.
- [18] GHANGHAS N, PRABHAKAR P K, SHARMA S, et al. Microfluidization of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein concentrate: Effects on functional, rheological, thermal and microstructural properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 149:111830.
- [19] REED Z H, PARK J W. Rheological and biochemical characterization of salmon myosin as affected by constant heating rate[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(2):343-349.
- [20] 金盛焯.酶抑制荧光探针法检测有机磷和氨基甲酸酯类农药的研究[D].大连:中国科学院研究生院(大连化学物理研究所),2004.
- [21] 杨莉,王羚佳,开拓,等.猪肝酯酶农药敏感性及其与胆碱酯酶的对比研究[J].西南农业学报,2018,31(7):1536-1542.
- [22] 何绍志,李维,王雁,等.美洲蟑螂头部乙酰胆碱酯酶活性测定及对5种常用农药的敏感性[J].食品科学,2013,34(23):184-188.

## Inhibitory response to carbaryl of animal liver esterase

WANG Jun<sup>1</sup>, YUAN Yaming<sup>1</sup>, JIANG Jingjing<sup>1</sup>, XU Huiqing<sup>1</sup>, LI Songnan<sup>2</sup>

1. School of Tourism and Cuisine, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;

2. Institutes of Agricultural Science and Technology Development/Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety of the Ministry of Education of China, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract:** Through graded salting out with ammonium sulfate and dialysis, esterases were extracted and purified from goose liver, chicken liver and pig liver respectively, then their structures were characterized, and their inhibition responses to carbaryl as a pesticide model were further investigated. Results showed that the yield of goose liver esterase was the highest (14.58%), and that of chicken liver esterase was the lowest (8.82%) with the best thermal stability, while the protein mass concentration of pig liver esterase was the highest (12.47 mg/mL); the protein molecular weights of all three kinds of animal liver esterases were 30~110 kDa with the leading one of 55 kDa, and that in chicken liver esterase was the highest (16.74%) while the lowest was in that of pig liver esterase (14.31%); these three kinds of animal liver esterases showed different sizes of protein particles with flake structures and smooth surfaces; in the carbaryl concentration range of 0.5~10.0 mg/L, the linear range (0.5~5.0 mg/L), the detection limit (0.29 mg/L) and  $IC_{50}$  (7.74 mg/L) of chicken liver esterase were the lowest, which could be used as a potential sensitive enzyme source for rapid detection of carbaryl.

**Key words:** carbaryl; animal liver esterase; enzyme-linked immunosorbent assay; detection of agricultural residues

(责任编辑:杨晓娟)