

# 用于农药残留检测的大豆酯酶的纯化分离

周艳利,李建科,温艳霞

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院,西安 710062)

**摘要** 以大豆种子为原料探索农药残留检测用酯酶的新酶原。采用差速离心、硫酸铵盐析、DEAE-32 离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析等方法对大豆酯酶进行了纯化分离,并研究了纯化酶对有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感性。最终得到 3 种电泳纯的大豆酯酶,记为  $E_1$ 、 $E_2$  和  $E_3$ 。但 3 种大豆酯酶对有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感性不同, $E_1$  对农药没有敏感性, $E_2$  的敏感性比  $E_3$  好。因此,大豆酯酶  $E_2$  可作为农药残留检测的新酶原。

**关键词** 农药残留;快速检测;大豆酯酶;纯化;分离

中图分类号 S565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2007)06-0935-04

## PURIFICATION AND SEPARATION OF SOYBEAN ESTERASE FOR PESTICIDE RESIDUE DETECTION

ZHOU Yan-li, LI Jian-ke, WEN Yan-xia

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

**Abstract** To search a new esterase for pesticide residue detection from soybean seeds, the soybean seed powder was dealt with crude extraction, differential centrifugation, ammonium sulfate salting-out to purify soybean esterase. The purified enzyme was then separated by DEAE-32 ion exchange column chromatography and Sephadex G-100 gel filtration column chromatography. Then, the inhibition to Organophosphate and Carbamate pesticides of the esterase was observed. Three soybean esterase of electrophoresis purity were obtained, marked with  $E_1$ ,  $E_2$  and  $E_3$ . Results indicated that  $E_1$  had no sensitivity (inhibition) to Organophosphate and Carbamate pesticide while  $E_2$  was better sensitive than  $E_3$ . Hence, a new esterase for pesticide residue detection from soybean seeds and a better purification method were obtained.

**Key words** Pesticide residues; Rapid detection; Soybean Esterase; Purification; Separation

目前,动物乙酰胆碱酯酶用于农残检测的研究报道很多,但动物酯酶取材不易,且保存条件苛刻。植物酯酶酶原丰富,取材方便,对农药的敏感性与动物酯酶相当<sup>[1]</sup>,因而近年来备受关注。国内关于植物酯酶用于农残检测的报道主要集中于小麦粗提酯

酶<sup>[2-4]</sup>,还未见有纯品制备出。

笔者在筛选大量植物酶原的基础上<sup>[5-6]</sup>,选定对农药敏感性最高的大豆酯酶作为农药快速检测用生物识别元件。根据文献报道,大豆中酯酶有很多种<sup>[7-9]</sup>,而同一生物体的不同酯酶对农药的敏感性

收稿日期:2007-05-14

基金项目:国家科技攻关项目(2001BA804A28);陕西省科技攻关项目(2004K01-G7);西安市科技攻关项目(GG05112)

作者简介:周艳利(1983-),女,硕士,研究方向为食品营养与卫生。E-mail:zhouyanli83@stu.snnu.edu.cn

通讯作者:李建科,教授。E-mail:jiankel@snnu.edu.cn

有所不同<sup>[10]</sup>,因而有必要分别对其进行研究。本研究目的就在于对大豆酯酶进行纯化分离,并研究各大豆酯酶对农药的敏感性,最终制备出纯化的酶制剂。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆:秦豆 8 号(陕西省农业厅提供)。

1.2 试剂及仪器

whatman DEAE-纤维素 32 (DE-32);pharmacia 葡聚糖凝胶 G-100;SDS-PAGE 分子量标准蛋白:西安莱博生物技术有限责任公司提供;考马斯亮蓝 R250;USB 进口分装;TEMED(四甲基乙二胺):Sigma 进口分装;过硫酸铵:Sigma 进口分装;SDS(十二烷基硫酸钠):Sigma 进口分装;甲叉双丙烯酰胺:GENVIEW 进口分装;丙烯酰胺:GENVIEW 进口分装;2-巯基乙醇:GENVIEW 进口分装。其它试剂均为分析纯。

农药标准溶液:久效磷、敌百虫、甲基对硫磷、马拉硫磷 4 种有机磷农药标品和克百威、抗蚜威、甲萘威、速灭威 4 种氨基甲酸酯类农药标品,含量均为 100 mg kg<sup>-1</sup>,纯度为 99.9%,北京陆桥科技有限责任公司提供,4℃避光保存。

D60-2F 型电动搅拌机:杭州仪表电机厂;TD30 高速冷冻离心机:德国 Sigma 公司;D25mm 透析袋:北京鼎国生物技术有限公司;Christ Alphas-4 冷冻干燥机:德国 Christ 公司;MB99-3 型自动液相色谱层析分离仪,MILLIPORE 超滤离心管:英骏生物技术有限公司;UNICO WFJ2000 型分光光度计:上海龙尼柯仪器有限公司;微型混合器:H-1 型,上海康禾光电仪器有限公司;U-3010 紫外可见分光光度计:日本 HITACHI 公司。

1.3 方法

1.3.1 总酯酶活力的测定方法 总酯酶活力的测定和计算参照文献[5]的方法。标准曲线制作方法略有改进,反应时间由 5 min 改为 10 min。

1.3.2 蛋白浓度测定方法 考马斯亮蓝法和紫外吸收法,具体方法参照余冰宾等<sup>[11]</sup>。

1.3.3 大豆酯酶的提取 大豆种子粉碎后,取大豆粉 2 g,按 1: 5 料液比加 0.3 mol L<sup>-1</sup>,pH 7.0 的磷酸盐缓冲液,搅拌处理 30 min 后置 4℃冰箱中浸提过夜,2~3 层纱布过滤后得粗提酶液。

1.3.4 大豆酯酶的纯化 将粗提酶液进行1 000、2 000、4 000、6 000 r min<sup>-1</sup>的差速离心,合并有酶活的部分。然后用 60% 硫酸铵盐析,收集沉淀并溶解,将溶解酶液透析 1~2 d,直至渗出液经 BaCl<sub>2</sub> 检验无 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,然后对透析保留酶液进行真空冷冻干燥制得酶粉。

1.3.5 大豆酯酶的分离

1.3.5.1 纤维素 DEAE-32 离子交换层析 取 20 mg mL<sup>-1</sup>酶粉溶解液 5 mL 过 DE-32 离子交换柱(2×40 cm),以 0.03 mol L<sup>-1</sup>,pH 为 7.0 的磷酸缓冲液平衡,梯度混合器左杯盛 200 mL 1.0 mol L<sup>-1</sup>的 NaCl 溶液,右杯盛 200 mL 0.03 mol L<sup>-1</sup>,pH 为 7.0 的磷酸缓冲液进行梯度洗脱,流速为 1.0 mL min<sup>-1</sup>,分管收集,每管 4 mL,经 280 nm 紫外检测,对各管进行蛋白浓度和酯酶活力的测定,合并有酶活力的各峰对应的各管,SDS-PAGE 鉴定纯度。对分离的各种酯酶进行透析脱盐,然后超滤浓缩。

1.3.5.2 葡聚糖 Sephadex G-100 凝胶过滤层析 取 5 mL 超滤浓缩液过葡聚糖 Sephadex G-100 凝胶层析柱(2×80 cm),以 0.03 mol L<sup>-1</sup>,pH 为 7.0 的磷酸缓冲液(内含 0.14 mol L<sup>-1</sup>NaCl)平衡并洗脱,流速为 0.5 mL min<sup>-1</sup>,分管收集,每管 4 mL,经 280 nm 紫外检测,对各管进行蛋白浓度和酯酶活力的测定,合并有酶活力的各峰对应的各管。对分离的各种酯酶进行透析脱盐,然后超滤浓缩。

1.3.6 大豆酯酶纯度鉴定 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶和聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳,考马斯亮蓝 R250 染色,具体方法参考文献[12]和[13]。

1.3.7 大豆酯酶农药抑制率的测定方法 1.45 mL 的磷酸缓冲液中依次加入 0.5 mL 酶液和 0.5 mL 的农药,混匀后在 30℃水浴中反应 10 min,取出试管,加入 50 μL α-乙酸萘酯丙酮溶液,混匀,在 30℃水浴中反应 15 min,再加入 0.5 mL 固兰 B 盐溶液,混匀放入 30℃水浴中反应 10 min,然后在 595 nm 波长处测定吸光度,用缓冲液代替酶和农药作空白,调零。农药的抑制率计算公式如下:

抑制率(I) = 
$$\frac{OD_{未抑制} - OD_{抑制}}{OD_{未抑制}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 大豆酯酶的纯化

由表 1 可见,粗提酶液进行差速离心后,酶活基

本没有损失,杂蛋白除去了一半多。因此,差速离心在酶的纯化过程中是一种有效的方法。最终将初步纯化的酶液冷冻干燥制成粉剂,不仅有利于下一步的柱层析分离,还能有效地保持酶的稳定性。

表1 大豆酯酶的纯化过程

纯化步骤 Purification step	Table1 Purification of soybean esterase				
	总蛋白 Total protein/mg	总酶活 Total activity/U	酶比活力 Specific activity /U mg <sup>-1</sup>	回收率 Yield/%	纯化倍数 Purification multiple
粗提液 Crude extract	1050	2400	2.286	100.0	1.0
差速离心 Differential centrifugation	400	2380	5.950	99.2	2.6
硫酸铵盐析 Ammonium sulfate salting-out	276	2271	8.228	94.6	3.6
冷冻干燥 Frozen-dried	215	1860	8.651	77.5	3.8

2.2 大豆酯酶的分离

2.2.1 纤维素 DEAE-32 离子交换层析 大豆酯酶经纤维素 DEAE-32 离子交换层析后,得到三个蛋白峰,各峰对应的各管蛋白浓度和酶活力(用 595nm 吸光度值表示)见图 1 和 2,由图可见,第二和第三个蛋白峰有酶活,第一个峰为杂蛋白,弃去。超滤浓缩后,总酶活回收率为 74.8%。可见,DEAE-32 柱层析可在保证酶活的基础上将大豆酯酶分离并除去杂蛋白。经 SDS-PAGE 鉴定,第二峰的蛋白已达到电泳纯见图 6,记为酯酶 E<sub>1</sub>,而第三峰还需进一步分离。

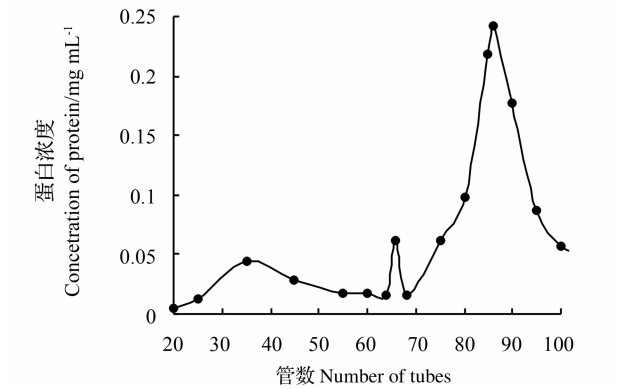


图1 纤维素 DEAE-32 柱层析各管蛋白浓度  
Fig.1 The protein concentration of every tube  
by cellulose DEAE-32

2.2.2 葡聚糖 Sephadex G-100 凝胶过滤层析 纤维素 DEAE-32 纯化后的第三峰再经葡聚糖 Sephadex G-100 凝胶过滤层析,得到三个蛋白峰,各峰对应的各管蛋白浓度和酶活力(用 595nm 吸光度值表示)见图 3 和 4,由图可见,第一和第二个蛋白峰有酶活,第三个峰为杂蛋白,弃去。得到的两种酯酶分别记为 E<sub>2</sub> 和 E<sub>3</sub>。

2.3 大豆酯酶纯度鉴定

大豆酯酶纯化各步骤的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 5,蛋白条带随着纯化过程而变得更加

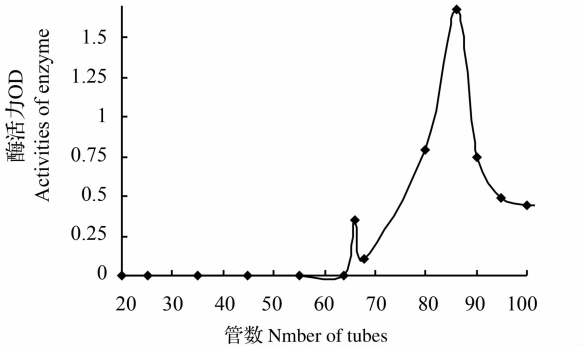


图2 纤维素 DEAE-32 柱层析各管酯酶活力  
Fig.2 The esterase activity of every tube  
by cellulose DEAE-32

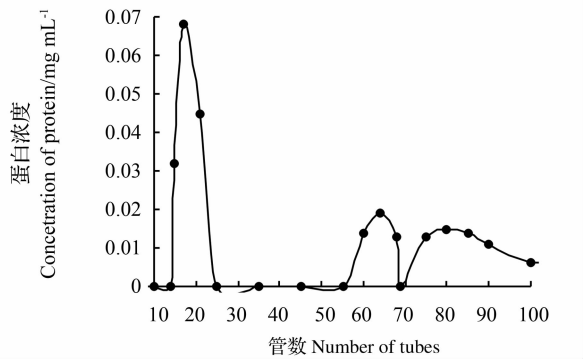


图3 Sephadex G-100 凝胶层析各管蛋白浓度  
Fig.3 The protein concentration of every tube  
by Sephadex G-100

清晰,证明纯化过程达到了很好的效果,去除了大部分的杂蛋白。

大豆酯酶经过纤维素 DEAE-32 柱层析后,得到的两部分有酶活力的蛋白峰的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 6,可见酯酶 E<sub>1</sub> 已经达到了电泳纯,第三峰的大豆酯酶还需要进一步纯化。

DEAE-32 柱层析第三峰大豆酯酶再经过 Sephadex G-100 柱层析后,得到的两部分有酶活力的蛋白峰的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 7,可见两

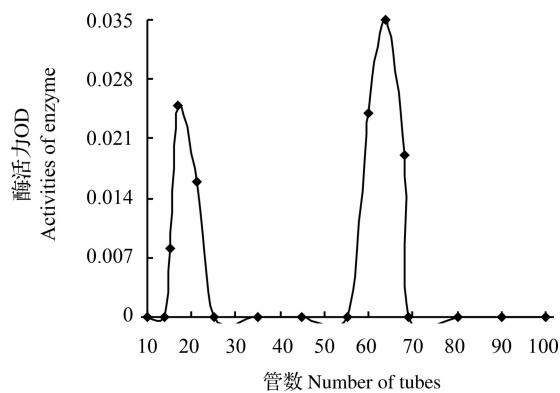
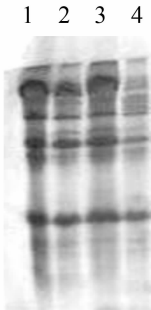


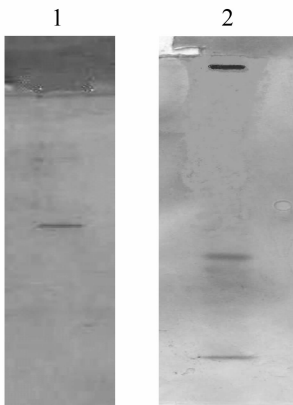
图4 Sephadex G-100 凝胶层析各管酶活  
Fig. 4 The esterase activity of every tube  
by Sephadex G-100

部分达到了很好的分离,并且初步判断酯酶 E<sub>2</sub> 含有两个亚基,E<sub>3</sub> 含有一个亚基。



1. 粗提样品;2. 差素离心样品;3. 盐析后样品;4. 冷冻干燥样品  
1. Crude extraction fraction;2. Differential centrifugation fraction;3. Salting-out fraction;4. Frozen-dried fraction

图5 大豆酯酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱  
Fig. 5 SDS-PAGE of soybean Esterase



1. 第二峰样品(E<sub>1</sub>);2. 第三峰样品  
1. The second peek fraction(E<sub>1</sub>);2. The third peek fraction

图6 纤维素 DEAE-32 柱层析样品电泳图谱  
Fig. 6 SDS-PAGE of cellulose DEAE-32



1. 第一峰样品(E<sub>2</sub>);2. 第二峰样品(E<sub>3</sub>)  
1. The first peek fraction(E<sub>2</sub>);2. The second peek fraction(E<sub>3</sub>)

图7 Sephadex G-100 柱层析样品电泳图谱  
Fig. 7 SDS-PAGE of Sephadex G-100

### 2.4 大豆酯酶农药的敏感性测定

三种酯酶经过初步的农药抑制试验,结果表明,酯酶 E<sub>1</sub> 对 8 种农药几乎没有抑制作用,抑制管的吸光度值反而增加,可能原因是酯酶 E<sub>1</sub> 对有机磷和氨基甲酸酯类农药的酯键有水解作用,推测该酶可能与大豆的解毒功能有关。所有农药对酯酶 E<sub>2</sub> 的抑制率均在 50% 以上,酯酶 E<sub>3</sub> 虽然也可以被农药所抑制,但抑制率比酯酶 E<sub>2</sub> 要低(50% 以下)。因此,酯酶 E<sub>2</sub> 比酯酶 E<sub>3</sub> 对农药的敏感性高,更适于农药残留检测。

## 3 讨论

酯酶存在于植物各部位和不同发育时期的细胞中,是催化酯类化合物水解的酶系,它们的生理功能还不十分清楚,在代谢中可能起到转酯作用,由于它们能水解大量非生理存在的酯类化合物,因此认为可能对植物有去毒作用。近年来研究表明,农药可以对植物酯酶产生抑制作用,因此,利用植物酯酶可以测定农产品中的农药残留。

大豆酯酶是大豆体内的一大类酶,它在大豆分类和进化学研究工作中的应用价值已经普遍受到学者们的关注。董登峰<sup>[14]</sup> 等从大豆叶片中分离出能水解磷酸烯醇式丙酮酸的酸性磷酸酯酶,揭示了大豆酯酶在代谢过程中的作用。而本文通过一系列的提取纯化工艺,得到了三种大豆 α-乙酸奈酯酶,并且三种酯酶对 α-乙酸奈酯酶催化活性不同,亚基数和分子量也不同,初步判断它们属于大豆酯酶同

(下转 942 页)

表 2 未知样品转基因定量检测结果

Table 2 Result of quantitative detection of transgenic component of unknown samples

样品名称 Sample name	检测基因 Target gene	Ct 值( Ct value)			Ct Mean of Ct	ΔCt DetalCt	转基因含量 GMO/%
		1	2	3			
S2	<i>lectin</i>	22.75	22.89	22.96	22.87	3.38	1.4
	<i>CaMV35S</i>	26.30	26.15	26.29	26.25		
S3	<i>lectin</i>	22.98	22.56	22.68	22.74	5.33	0.4
	<i>CaMV35S</i>	27.96	28.09	28.17	28.07		
S1	<i>lectin</i>	21.98	22.06	21.84	21.96	—	—
	<i>CaMV35S</i>	>40	>40	>40	>40		

参 考 文 献

[1] 农业部农业转基因生物标识管理办法[M]. 北京:农业部,2002.

[2] 金红. 转基因农产品标识管理和检测技术研究进展[J]. 天津农业科学,2002,8(4):48-53.

[3] 王林山,杨振刚,李应华. 转基因食品的安全性评价与管理[J]. 粮油加工与食品机械,2004,(5):37-41.

[4] 宋林,杨昌举,胡品洁. 转基因食品标识与管理[J]. 中国食物与营养,2005,6:9-12.

[5] 转基因植物及其产品检测大豆定性 PCR 方法[S]. 中华人民共和国农业行业. NY/T675-2003.

[6] 陈颖,徐宝梁,苏宁,等. 实时荧光定量 PCR 技术在转基因玉米检测中的应用研究[J]. 作物学报,2004,30(6):602-607.

[7] 潘良文,陈家华,罗达,等. 玉米粉中转基因 Bt176 玉米的定量检测[J]. 植物生理与分子生物学学报,2002,28(6):463-467.

[8] 金芜军,贾士荣,彭于发. 不同国家和地区转基因产品标识管理政策的比较[J]. 农业生物技术学报,2004,(12):7-12.

[9] 石英,吴广枫,余庆辉. 转基因产品的标识管理[J]. 新疆农业科学,2005,42(增):167-170.

[10] European Commission. Regulation (EC) No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Official Journal of the European Union,2003/10/18:L268/24-L268/28.

(上接 938 页)

工酶。农药抑制试验结果表明,三种大豆酯酶同工酶对农药的敏感性不同,酯酶 E<sub>2</sub> 的敏感性最好,可作为农残检测用植物酯酶新酶原。

在此基础上,进一步详细的研究大豆酯酶的特性、结构及有机磷和氨基甲酸酯类农药对各酯酶的抑制机理,可以为大豆酯酶在农残检测中的应用提供更多的理论依据。

参 考 文 献

[1] 张宁. 两种酶快速检测有机磷农药残留条件优化研究[J]. 江苏农业科学,2006,1:135-136.

[2] 韩承辉,谷巍,王乃岩,等. 快速测定水中有机磷农药方法的研究[J]. 环境化学,2000,19(2):187.

[3] 张叔平,经媛元,单联刚. 氨基甲酸酯类农药的快速检测[J]. 粮油食品科技,2006,14(3):48-50.

[4] 阮长青,杨娟,贾伟. 有机磷农药与小麦酯酶作用关系研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2006,18(1):61-62.

[5] 温艳霞,李建科. 有机磷农残检测用植物酯酶的研究[J]. 食品科学,2006,27(4):123-125.

[6] 温艳霞,李建科,张晓敏,等. 植物酯酶法检测有机磷农药的

敏感性和检测限的研究[J]. 食品科学,2006,27(9):186-187.

[7] 虞京藏,夏文胜,黄伟英,等. 大豆酯酶同工酶的初步研究[J]. 大豆科学,1983,2(1):104-107.

[8] 刘丽君,尹田夫,苗永山,等. 大豆不同品种(系)及 F<sub>2</sub> 代各生育期酯酶过氧化物酶同工酶分析[J]. 中国油料,1988,3:21-24.

[9] 卢翠华,雷勃钧,李希臣,等. 外源 DNA 导入大豆其后代的同工酶酶谱分析[J]. 大豆科学,1994,13(2):167-170.

[10] Bocquene G, Roig A, Fournier D. Cholinesterases from the common Oyster(*Crassostrea gigas*): Evidence for the presence of a soluble acetyl-cholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors[J]. Federation of European Biochemical Societies,1997,407:261-266.

[11] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2004:136-140.

[12] 杨建雄. 生物化学和分子生物学实验技术教程[M]. 北京:科学出版社,2002:153-155.

[13] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2004:151-156.

[14] 董登峰,杨杰,江立庚,等. 大豆磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶研究 III、非专一性酸性磷酸酯酶的纯化与特性[J]. 广西植物,2005,25(5):472-476.