

鸡血液中乙酰胆碱酯酶的提取研究

邱朝坤, 孙广东, 刘晓宇*, 吴谋成, 杨健, 徐盛 (1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 内陆渔业环境与资源重点开放实验室, 江苏无锡 214081; 3. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

摘要 [目的] 为了研究硫酸铵盐析法在乙酰胆碱酯酶分离纯化中的效果, 从而利用乙酰胆碱酯酶的活性变化反映农药的污染情况。[方法] 采用硫酸铵盐析和等电点区分的方法从鸡血中提取乙酰胆碱酯酶, 并探讨其适宜的pH值范围。[结果] 结果表明:pH值4.5左右大量的杂蛋白能被除去, 可获得较高乙酰胆碱酯酶得率; 采用饱和度为50%~60%的硫酸铵盐析效果较好, 据此得出较佳的提取工艺。[结论] 该研究结果为后续鸡血AChE的提取、分离、纯化等工作提供了相应的参考, 同时为利用乙酰胆碱酯酶指示环境受有机磷和氨基甲酸酯类农药污染的后续研究和应用提供了理论依据。

关键词 血液; 乙酰胆碱酯酶; 提取

中图分类号 Q956 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)19-05777-02

Study on the Extraction of Acetylcholinesterase from Chicken Blood

QIU Chao-kun et al (College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract Acetylcholinesterase (AChE) was extracted from chicken blood by means of salting-out effect using ammonium sulfate as the salting-out agent, so as to make use of changes of the activity of acetylcholinesterase to reflect insecticide pollution situation. The experiment has applied ammonium sulfate salting-out and the isoelectric point differentiation methods to extract acetylcholinesterase from chicken blood and explore the appropriated pH range. The results indicated that most impurities of the protein were removed at pH 4.5 and the good production rate of AChE was obtained. In addition, it was found that 50%~60% saturated ammonium sulfate could salt out most of impurities. The optimal extraction craft was found and discussed in this study. The result of this study has provided corresponding reference for follow up AChE extraction from chicken blood. Meanwhile, it has provided theoretical basis for the follow up studies and application of using AChE to indicate the insecticide environment pollution by organophosphorus and carbamates.

Key words Blood; Acetylcholinesterase; Extraction

目前, 中国常用的农药中甲胺磷、久效磷、对硫磷、氧乐果、甲基对硫磷、呋丹等高毒农药占总农药用量的70%以上^[1]。这些有机磷、氨基甲酸酯类农药都是乙酰胆碱酯酶的抑制剂, 对人体具有较高毒性。人畜长期食用有农药残留的食物, 会使农药残留在人体中, 并积累造成毒害, 该现象称为农药残毒^[2]。残毒对人类健康的影响很大, 必须引起高度重视。酶抑制法主要根据有机磷、氨基甲酸酯类杀虫剂对胆碱酯酶(AChE)的活性有不可逆的抑制作用, 从而可对这2类农药的残留污染情况进行检测。该法是一种简便、灵敏、经济、快速的检测方法。

乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)作为一种蛋白质分子构成的生物催化剂, 其主要功能是将传导神经兴奋化学物质的乙酰胆碱迅速水解为乙酸和胆碱, 以维持神经系统的正常生理功能。而AChE活性受有机磷和氨基甲酸酯类农药的特异性抑制^[3-5]。基于这一特点, 可以利用乙酰胆碱酯酶的活性变化反映农药的污染情况^[6-7]。笔者重点研究硫酸铵盐析法在乙酰胆碱酯酶分离纯化中的效果, 以期利用乙酰胆碱酯酶指示环境受有机磷和氨基甲酸酯类农药污染的后续研究和应用提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 新鲜鸡血取自华中农业大学农贸市场。硫酸铵、柠檬酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸二钠盐、乙醇均为国产分析纯; Tris-HCl, Amresco公司; 碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCh)、5,5-双(2-硝基苯基)甲酰胺(5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)、考马斯亮蓝

G250, Sigma公司; 牛血清白蛋白(BSA), Roche公司分装。

UV-9100型紫外可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器厂; LGR-16-W冷冻离心机, 北京医用离心机厂。

1.2 方 法

1.2.1 鸡血盐析的分级沉淀^[8]。原料的选取。为保证鸡血液中酶的活性, 选取健康的活鸡直接取血。取血前用75%的酒精将鸡的颈部消毒, 清理部分羽毛, 从颈部取血。乙酰胆碱酯酶的分离。将新取的鸡血分别盛放于3个表面皿中, 然后将表面皿倾斜置于冷冻室中凝固, 以使血清析出。分别于6、12、24 h 3个时间段用吸管吸取其上层血清。若提取液颜色不清亮或带有部分血细胞, 则用离心机进行差速离心, 再将上清液移于另一试管中, 加盖冷藏备用。

1.2.2 硫酸铵盐析浓度的确定^[9]。分别取500 ml处理好的鸡血清于1 000 ml烧杯中, 共3组, 在280 nm处测其OD值; 缓慢加入硫酸铵粉末, 至浓度达一定值, 用0.5 ml/L的硫酸调pH值为5.0, 于4℃环境中过夜; 冷冻离心分离沉降物, 取上清液, 在280 nm处测其OD值。继续往上清液中加入硫酸铵粉末, 使其浓度达45%, 分离上清液和沉淀, 按照“1.2.4”的方法检测上清液中蛋白质的含量。改变硫酸铵的浓度, 重复上述试验。

1.2.3 最佳pH值的确定。分别取500 ml处理好的鸡血清于1 000 ml的烧杯中, 共6组, 每组平行做3份, 在280 nm处测其OD值; 缓慢加入硫酸铵粉末, 使其浓度达40%, 放置过夜, 再用0.5 ml/L的硫酸调pH值至4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5, 在4℃环境中过夜; 冷冻离心分离沉降物, 取上清液, 在280 nm处测其OD值。继续在上清液中加入硫酸铵粉末, 使其浓度达50%~60%, 分离上清液和沉淀, 按照“1.2.4”的方法检测上清液中蛋白质的含量, 并按“1.2.5”所述方法分别检测上清液和沉淀中的酶活力。

基金项目 湖北省自然科学基金资助(2006ABA165); 农业部专项基金(04-11-04B)。

作者简介 邱朝坤(1984-), 男, 湖北武汉人, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全。* 通讯作者。

收稿日期 2007-04-20

1.2.4 蛋白质的含量测定。参照 Bradford^[10] 考马斯亮蓝 G 250 法。用牛血清白蛋白(BSA)测定蛋白质含量标准曲线。取 1 ml 待测酶液(调整蛋白质含量 20 ~100 µg),加 5 ml 考马斯亮蓝 G 250 染色液,混合均匀,30 min 后测 OD 值。由标准曲线计算酶液中蛋白质的含量。

1.2.5 酶活力的测定。参照 Ellman 等^[11] 的方法,并稍作修改。在 3.00 ml 磷酸盐缓冲溶液(pH 值 8.0,0.1 mol/L)中加入 20 µl 酶液混匀,于 30 的水浴中保温 20 min 后,依次加入 100 µl DTNB 溶液和 20 µl ATCh 溶液,充分混匀,反应体积为 3.14 ml。然后在 412 nm 处用 1 cm 比色杯比色,每隔 0.5 min 读数 1 次,连续测定 3 min。

2 结果与分析

2.1 硫酸铵浓度的确定 硫酸铵一般不会使蛋白质变性,是盐析中最常用的盐。在 pH 值为 7.0 条件下,不同饱和度的硫酸铵对蛋白质沉淀量的影响结果见表 1。

表1 不同饱和度硫酸铵盐析结果

硫酸铵的饱和度 %	沉淀总蛋白 OD 值	相对百分数 %
0 ~30	0.47	2.1
30 ~40	1.24	5.6
40 ~50	6.63	29.7
50 ~60	7.72	34.6
60 ~70	2.63	11.8
70 ~80	3.65	16.3

由表1 可看出,硫酸铵饱和度在 50 % ~60 % 范围内沉淀蛋白量最多,盐析效果最佳,故硫酸铵的饱和度选择为 55 %。

2.2 最佳 pH 值的确定 选用饱和度为 55 % 的硫酸铵进行盐析试验,考察不同 pH 值对蛋白质沉淀量及酶活性的影响,结果见表 2。

由表 2 可看出,鸡血液通过 pH 值 4.5、饱和度为 55 % 的硫酸铵盐析后,沉淀中比酶活力明显增大。经过该条件盐析后,上清液中的比酶活力和蛋白质含量降至最低,而沉淀中的比酶活力最高,说明鸡血液中的 AChE 被充分沉淀。因此可以确定提取时的最佳 pH 值为 4.5。

表2 不同 pH 值对鸡血液蛋白沉淀量及其酶活力的影响

pH 值	总蛋白 ng		比酶活力 µmol/(min·ng)		
	原液	55 % 硫酸铵盐析后的上清液	原液	55 % 硫酸铵盐析后的上清液	55 % 硫酸铵盐析后的沉淀
4.0	2.84	1.57	163	57	274
4.5	2.82	1.92	163	79	300
5.0	2.85	2.13	160	108	253
5.5	2.85	2.40	160	145	205
6.0	2.83	2.33	160	137	190
6.5	2.82	2.37	160	85	213

3 小结与讨论

考察鸡血液中 AChE 的提取及硫酸铵盐析纯化 AChE 的影响因素,确定了较佳的盐析条件,包括硫酸铵的饱和度、pH 值等重要因素。试验表明,硫酸铵的适宜饱和度为 55 %,最佳 pH 值为 4.5。经过该条件盐析后的鸡血液 AChE 比酶活力得到较大提高。结果表明,硫酸铵盐析为初步纯化鸡血液 AChE 的较有效方法,该研究为后续鸡血 AChE 的提取、分离、纯化等工作提供了相应的理论参考。

参考文献

- [1] 赵建庄,梁桂枝,柴丽娜,等.乙酰胆碱酯酶分离纯化的方法[J].北京农学院院报,2003,18(4):249-251.
- [2] SEGFRIED B D,SCOTT J G.Properties and inhibition of acetylcholinesterase in testis and susceptible German cockroaches (*Blattella germanica* L.) [J]. *Res-tic Biochem & Physiol*,1990,13:156.
- [3] 张明,李盾,陈仪本,等.乙酰胆碱酯酶分子生物学研究进展[J].农药,2006,45(1):8-10.
- [4] 张英鸽,姜爽.乙酰胆碱酯酶的构效关系研究进展[J].生物技术通讯,2005,5(5):63-64.
- [5] 盛一珉,杭汉翔.乙酰胆碱酯酶抑制剂的研究进展[J].海峡药学,2005,4(17):10-12.
- [6] 潘同霞,王恒亮,张保民.酶活性抑制测定农药残毒技术研究[J].河南农业科学,1997(1):25-26.
- [7] 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药剂[J].四川师范大学学报:自然科学版,2001,24(5):4-6.
- [8] 罗磊,朱雅东,丁霄霖.聚丙烯酰胺凝胶电泳研究猪血清蛋白硫酸铵分级盐析[J].食品科学,2006,34(11):218-222.
- [9] 蔡春尔,何培民.硫酸铵三步盐析对藻胆蛋白纯化的影响[J].生物技术通报,2006(4):121-125.
- [10] BRADFORD M M.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*,1976,72(1/2):248-254.
- [11] ELLMAN G L,COURTNEY D,ANDRES V,et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. *Bochem Pharmacol*,1961,7(2):88-95.