

## 果蔬农药残留快速检测固定化酶片的制作研究

张登科<sup>1</sup>, 郝程列<sup>1</sup>, 钟凯<sup>2</sup>, 张爱琳<sup>1,3\*</sup> (1. 天津农学院食品科学与生物工程学院, 天津 300384; 2. 天津市康利缘生物技术有限公司, 天津 300345; 3. 天津市农副产品深加工技术工程中心, 天津 300384)

**摘要** [目的]对胆碱酯酶的保藏性进行研究分析,以期得到保障农药残留检测的最佳酶活力。[方法]试验选定高酶活力的大豆酯酶为酶原,通过筛选最适反应温度、反应时间、离子浓度和最适 pH,及最佳的反应显色体系来确定反应最适的条件,采用不同的显色体系酶抑制法,研究酶片的制作方法。[结果]酶片载体材料采用硝酸纤维素膜,制作每张酶片取 20  $\mu\text{L}$  大豆酶液,15  $\mu\text{L}$  0.5% 的 BSA 溶液,2  $\mu\text{L}$  0.05% 戊二醛于平底试管中。添加 0.03 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液至总体积 100  $\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  固定 10 h;制作每张显色片,需在 1 cm  $\times$  1 cm 大小的滤纸片上加入 50  $\mu\text{L}$  显色剂,30  $\mu\text{L}$  底物,4  $^{\circ}\text{C}$  冷风吹干,封膜真空保存。[结论]固兰 B 盐和  $\alpha$ -乙酸奈酯组合,适合作为酶抑制法检测有机磷农药残留的显色剂,且效果明显。

**关键词** 大豆;胆碱酯酶;农药残留;酶片

中图分类号 TS207.5<sup>+</sup>3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)28-0081-04

## Study on the Preparation of Immobilized Enzymes for Rapid Detection of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables

ZHANG Deng-ke<sup>1</sup>, HAO Cheng-lie<sup>2</sup>, ZHONG Kai<sup>2</sup>, ZHANG Ai-lin<sup>1,3\*</sup> (1. College of Food Science and Biotechnology, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 2. Tianjin Kangli edge Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300345; 3. Tianjin Engineering and Technology Center of Agricultural Products Processing, Tianjin 300384)

**Abstract** [Objective] The preservation of cholinesterase was studied in order to guarantee the best enzyme activity of pesticide residue detection. [Method] The soybean esterase with high enzyme activity was selected as zymogen, optimum reaction conditions by screening the optimal reaction temperature, reaction time, concentration and pH, reaction and the best color system were determine. The method of making enzyme tablets was studied by using different color system and enzyme inhibition method. [Result] Nitrocellulose membrane was used for enzyme piece of material, which made each enzyme take 20  $\mu\text{L}$  soybean enzyme liquid, 15  $\mu\text{L}$  0.5% BSA solution, 2  $\mu\text{L}$  0.05% glutaraldehyde to the bottom of the tube. Add 0.03 mol/L pH 7.0 phosphate buffer and the total volume was 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  fixed 10 h. Made each color piece, should add 50  $\mu\text{L}$  chromogenic agent in 1 cm  $\times$  1 cm filter size, 30  $\mu\text{L}$  substrates, 4  $^{\circ}\text{C}$  cold wind blow dry, sealing membrane vacuum preservation. [Conclusion] The combination of solid blue B salt and  $\alpha$ -naphthyl acetate is suitable for the detection of organophosphorus pesticide residue by enzyme inhibition method, and the effect is obvious.

**Key words** Soybean; Cholinesterase; Pesticide residues; Enzyme slices

农药残留是农药使用后一个时期内未被分解而残留于生物体、收获物、土壤、水源、大气中的微量农药原体、有毒代谢物、降解物和杂质的总称<sup>[1-2]</sup>。农药残留检测酶抑制法,是基于农药的毒性机理来进行测定的,农药在生物体内能与乙酰胆碱酯酶结合,且不易分离<sup>[3-4]</sup>,乙酰胆碱酯酶的活性受有机磷和氨基酸甲酸酯类农药的特异性抑制,丧失了水解底物的活力<sup>[5]</sup>,致使神经传导中的乙酰胆碱不能水解而积累,影响神经的信号、递质的正常传递,神经持续兴奋,发生抽搐等,导致昆虫中毒甚至死亡<sup>[6]</sup>。根据有机磷农药对酶促反应具有抑制作用这一毒理学特性,建立了酶抑制法检测农产品中有机磷及氨基甲酸酯类农药残留<sup>[7-8]</sup>。其中由于植物酯酶的成本大大低于动物性的乙酰胆碱酯酶,且来源广泛易得,因此植物酯酶抑制法测定农药残留是一种很经济适用的方法<sup>[9-10]</sup>。该试验着重研究酶抑制法的关键工作酶——植物酯酶,从大豆中提取植物酯酶,将提取出来的植物胆碱酯酶固定到载体上,制作成快速检测酶片,提高酶活力,也探究提高植物酯酶的保藏期,解决胆碱酯酶难以保存的问题,用于农药残留的快速现场检测。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 原料与主要试剂。东北大豆,购自天津红旗农贸市

场; $\alpha$ -乙酸奈酯,天津伞科技有限责任公司;硝酸纤维素膜(NC),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;牛血清白蛋白(BSA),Ruibio 分装,合肥博美生物科技有限责任公司;十二烷基硫酸钠(SDS)、丙酮、戊二醛、苯,均为分析纯,购自天津市化学试剂三厂;氧乐果,天津津农药厂。

1.1.2 主要仪器设备。JJ-2 型组织捣碎匀浆机,江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;EX224 电子天平,奥豪仪器(上海)有限公司;国华 SHZ-82 恒温振荡器,常州国华电器有限公司;LD5-2B 低速离心机,北京雷勃尔离心机有限公司;722N 可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;LGJ-18S 冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 酶液制备。大豆用组织捣碎机粉碎成粉末,按料液比 1:5(g:mL)分别称取适量的大豆粉,加入 pH 7.0 浓度为 0.03 mol/L 的磷酸缓冲液,4  $^{\circ}\text{C}$  浸泡 12 h 后振荡 30 min,以 5 000 r/min 离心 10 min,上清液滤纸过滤得到粗酶液,冷藏备用,同时测定粗酶液酶活力。

1.2.2 大豆酯酶最适反应条件。

1.2.2.1 最适反应温度。分别在 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65  $^{\circ}\text{C}$  下测定酶活力,确定最适反应温度。

1.2.2.2 最适 pH 测定。分别在 pH 为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的缓冲液中测定酶活力,确定最适 pH。

1.2.2.3 确定缓冲液的最适离子浓度。设定缓冲液的离子浓度分别为 0.010、0.015、0.020、0.025、0.030、0.035、0.040、

基金项目 2016 年大学生国家创新项目(201610061156)。

作者简介 张登科(1995—),男,安徽合肥人,本科生,专业:食品质量与安全。\*通讯作者,副教授,博士(后),从事食品安全与检测研究。

收稿日期 2017-06-16

0.045 mol/L,分别测定其酶活力,绘制曲线图,确定其最适离子浓度。

### 1.2.3 酶活力的测定。

**1.2.3.1 原酶液吸光度值的测定及不同用量显色剂时溶液的显色效果。**在试管中加入 20  $\mu\text{L}$  酶液和 2.40 mL pH 7.0 的磷酸缓冲液(对照管加 2.45 mL),然后加入 50  $\mu\text{L}$  底物  $\alpha$ -乙酸奈酯溶液,将试管都置于 30  $^{\circ}\text{C}$  水浴中反应 15 min,向各试管中再加入 50  $\mu\text{L}$  固兰 B 液,放在 30  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中反应 10 min,立即在波长 595 nm 处测定吸光度<sup>[4]</sup>。

**1.2.3.2 2种显色剂对比试验。**该试验分别采用固兰 B 盐和 2,6-二氯酚靛酚钠作显色剂进行效果对比,添加相同量的农药稀释液,测定吸光度值,计算酶抑制率,比较显色剂的效果。

**1.2.3.3 抑制率计算方法。**计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = [(\Delta A_0 - \Delta A_t) / \Delta A_0] \times 100\%$$

式中,  $\Delta A_0$  为对照管吸光度值;  $\Delta A_t$  为抑制管吸光度值。

**1.2.4 农药氧乐果不同稀释浓度下对酶的抑制率。**该试验将农药氧乐果分别稀释成不同浓度,稀释倍数分别为 10、20、30、50、100、150、200、250、300、400、500、1 000,测定不同农药浓度下酶的吸光度变化,计算酶抑制率。

**1.2.5 大豆酯酶的固定及酶片和显色片的制作。**

**1.2.5.1 试验组①。**分别将硝酸纤维膜和滤纸剪成 1 cm  $\times$  1 cm 的小片,放进 0.03 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液中,4  $^{\circ}\text{C}$  浸泡 48 h。一次性取 40  $\mu\text{L}$  大豆酶液,30  $\mu\text{L}$  0.5% 的 BSA 溶液,4  $\mu\text{L}$  0.05% 戊二醛于平底试管中。添加 0.03 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液至总体积 200  $\mu\text{L}$ ,将上述液体在漩涡混合器上混匀,取活化好的硝酸纤维膜浸入液体中,4  $^{\circ}\text{C}$  下固定 10 h。取出酶片,用 pH 7.0 的 PBS 溶液冲洗数次。4  $^{\circ}\text{C}$  自然吹干或者用冷风吹干,封膜真空保存。

**1.2.5.2 试验组②。**如图 1,酶片制作流程:将滤纸剪成 1 cm  $\times$  1 cm 大小的卡片,每片上加入 20  $\mu\text{L}$  酶液,20  $\mu\text{L}$  底物  $\alpha$ -乙酸奈酯丙酮溶液。

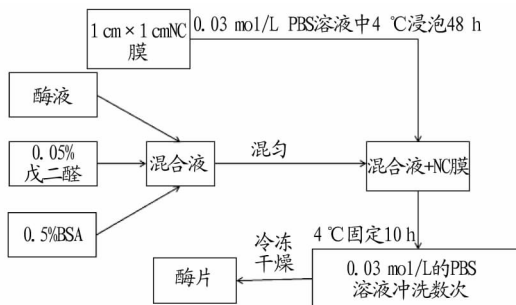


图1 酶片制作流程

Fig.1 Flow chart of enzyme production

显色片制作流程(图1):显色片有2种方案,一种采用0.8%的固兰 B 溶液制作,另一种采用0.5%的2,6-二氯酚靛酚钠制作。显色片的制作,在 1 cm  $\times$  1 cm 大小的滤纸上加入 50  $\mu\text{L}$  显色剂,30  $\mu\text{L}$  底物,4  $^{\circ}\text{C}$  冷风吹干,封膜真空保存。

## 2 结果与分析

**2.1 大豆酯酶原酶液活力测定** 由表 1 可知,通过浸泡提

取的原酶液活性较高,吸光度值达到 0.844,说明大豆可以作为植物胆碱酯酶提取的试验材料。

表1 大豆酯酶原酶液活力

Table 1 The enzyme activity of sobbean esterase

试验组 Test group	酶液 Enzyme volume $\mu\text{L}$	磷酸缓冲液 PBS volume mL	$\alpha$ -乙酸奈 酯溶液 Nye - acetate volume $\mu\text{L}$	固兰 B 液 Solid blue volume mL	OD 值 (595 nm) OD value
对照 Control group	0	2.450	50	0.5	0
①	20	2.430	50	0.5	0.831
②	20	2.430	50	0.5	0.856

**2.2 最适反应温度** 如图 2 可知,20 ~ 65  $^{\circ}\text{C}$  下测定酶活力,大豆酯酶的最适反应温度在 25 ~ 40  $^{\circ}\text{C}$ ,在 30  $^{\circ}\text{C}$  酶的活力最高。

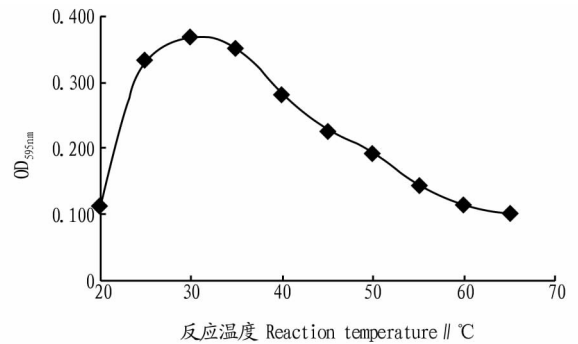


图2 大豆酯酶最适反应温度

Fig.2 The optimal temperature of soybean esterase

**2.3 最适 pH 测定** 图 3 所示是在 30  $^{\circ}\text{C}$  温度下,在 pH 4.5 ~ 8.5 范围缓冲溶液中测定酶活力大小,大豆酯酶在 pH 7.0 ~ 8.0 范围内活性最高,其活力在 pH 7.5 时最高。

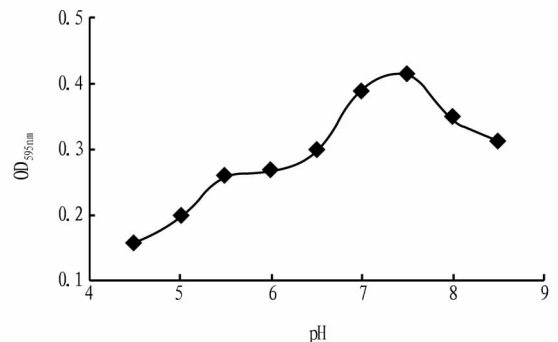


图3 大豆酯酶最适 pH

Fig.3 The optimal pH of soybean esterase

**2.4 确定缓冲液的最适离子浓度** 如图 4 所示,在 0.010 ~ 0.045 mol/L 不同离子浓度的缓冲溶液中测定酶活力,离子浓度在 0.020 ~ 0.040 mol/L 体系中大豆酯酶活力最大,其最大酶活力值在离子浓度为 0.030 mol/L。

**2.5 不同用量显色剂对酶活力的影响** 由图 5 可知,当显色剂固兰 B 的用量不同时,溶液的吸光度值不一样,用量和吸光度值呈正相关,当将显色剂固定到白色滤纸载体上时,应使用较高用量,或者使用较高浓度,避免白色滤纸片对颜色的掩盖作用,使颜色分明,方便观察。

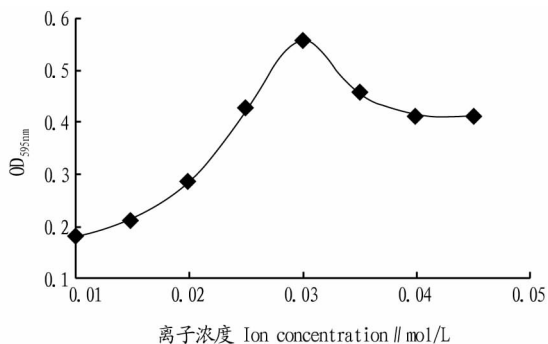


图4 大豆酯酶的缓冲液离子浓度

Fig.4 Buffer ion concentration of soybean esterase

由表2可知,仅从酶的抑制率效果来看,使用2,6-二氯酚靛酚钠作显色剂,酶抑制率效果非常明显,平均抑制率326.07%,但试验发现,在不加酶的情况下,2,6-二氯酚靛酚钠依然褪色,从而得出结论,2,6-二氯酚靛酚钠不适合作

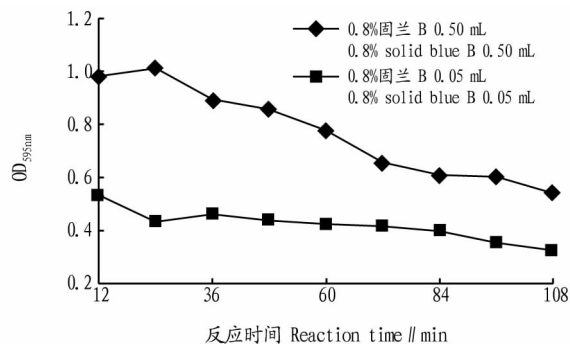


图5 不同浓度固兰B的吸光度值

Fig.5 Absorbance values of solid blue B at different concentrations

有机磷农药残留快速检测的显色剂。使用固兰B作显色剂,检测酶抑制率效果相对较差,但是比较稳定。综合考虑,固兰B盐更适合作有机磷农药快速检测的显色剂。

表2 2种显色剂对农药抑制率的影响

Table 2 Effect of two chromogenic agents on pesticide inhibition rate

反应液 Reaction liquid	显色剂种类 Types of chromogenic agent	酶液 Enzyme liquid μL	磷酸盐缓冲液 PBS mL	底物 Substrate agent μL	显色剂用量 Chromogenic agent // mL	农药 Pesticides volume μL	吸光度值 OD Absorbance value	酶抑制率 Enzyme inhibition rate // %
对照管 1	固兰 B	0	2.450	50	0.5	0	0	0
对照管 2	DPNP	0	2.450	50	0.5	0	0	0
试验管 A <sub>1</sub>	固兰 B	20	2.430	50	0.5	0	1.465	0
试验管 A <sub>2</sub>	固兰 B	20	2.430	50	0.5	0	1.528	0
试验管 A <sub>3</sub>	固兰 B	20	2.430	50	0.5	30	0.634	56.72
试验管 A <sub>4</sub>	固兰 B	20	2.430	50	0.5	30	0.592	61.25
试验管 B <sub>1</sub>	DPNP	20	2.430	50	0.5	0	0.148	0
试验管 B <sub>2</sub>	DPNP	20	2.430	50	0.5	0	0.121	0
试验管 B <sub>3</sub>	DPNP	20	2.430	50	0.5	30	-0.301	303.38
试验管 B <sub>4</sub>	DPNP	20	2.430	50	0.5	30	-0.301	348.76

2.6 氧乐果不同稀释浓度下对酶的抑制率 由表3可知,酶抑制率与农药浓度呈正相关,农药稀释浓度越大,酶抑制

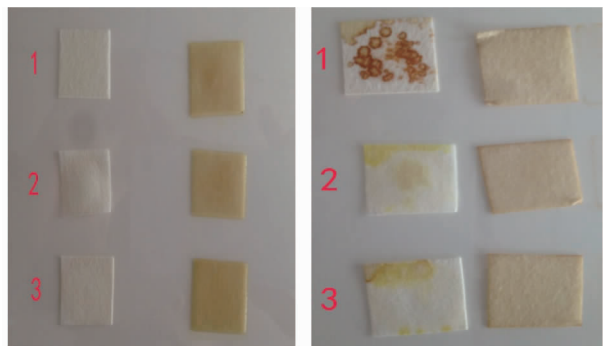
率越低,当稀释1 000倍时,酶抑制率还能达到10%左右。由此可见,氧乐果的药效较强。

表3 不同农药浓度对酶活性的抑制率

Table 3 Inhibition rate of enzyme activity by different pesticide concentration

试管编号 Number	农药(40%) 稀释倍数 Pesticide diluted multiples	有效成分 Active ingredients mg/kg	磷酸盐缓冲液 PBS mL	酶液 Enzyme liquid μL	底物 Substrate agent μL	农药体积 Pesticides Volume μL	固兰 B Solid blue B mL	吸光度值(OD) Absorbance value	酶抑制率 Enzyme inhibition rate // %
0(CK)	—	—	2.430	20	50	20	0.5	0	0
1	10	0.040 0	2.430	20	50	20	0.5	0.403	40.3
2	20	0.020 0	2.430	20	50	20	0.5	0.400	40.0
3	30	0.013 0	2.430	20	50	20	0.5	0.259	25.9
4	50	0.008 0	2.430	20	50	20	0.5	0.289	28.9
5	100	0.004 0	2.430	20	50	20	0.5	0.245	24.5
6	150	0.002 7	2.430	20	50	20	0.5	0.219	21.9
7	200	0.002 0	2.430	20	50	20	0.5	0.184	18.4
8	250	0.001 6	2.430	20	50	20	0.5	0.123	12.3
9	300	0.001 3	2.430	20	50	20	0.5	0.145	14.5
10	400	0.001 0	2.430	20	50	20	0.5	0.136	13.6
11	500	0.000 8	2.430	20	50	20	0.5	0.148	14.8
12	1 000	0.000 4	2.430	20	50	20	0.5	0.103	10.3

**2.7 比较2种显色片的效果** 组合一见图6,固兰B、 $\alpha$ -乙酸奈酯组合,将稀释一定浓度后的农药滴加到酶片上(图6中编号2,3),对照组滴加相同量蒸馏水(图6中编号1),保持酶片湿润,将显色片覆盖在酶片上,稍等片刻,编号1的酶片上没有农药,胆碱酯酶未受抑制,遇到显色剂,产生紫红色(由于色差,颜色更接近褐色)变化;编号2,3的酶片由于滴加了农药,胆碱酯酶受到抑制,显色片不变色。根据颜色变化和颜色深浅即可初步判断农药含量,农药含量越高,颜色越深,农药含量越低,颜色越浅。



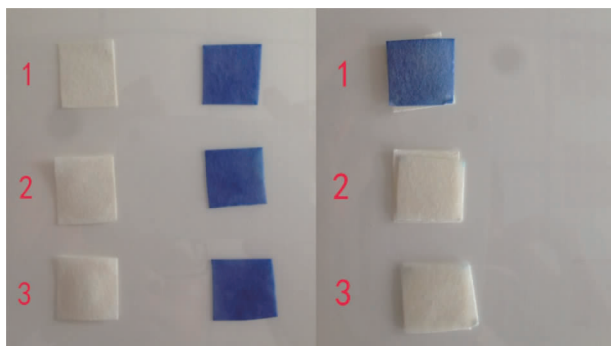
注:1.滴加蒸馏水;2,3.滴加农药

Note:1. drops with distilled water;2,3. drops of pesticide

图6 采用固兰B做显色剂时酶片的显色效果

Fig. 6 The enzyme piece color effect at the time of using solid blue B as chromogenic agent

组合二见图7,2,6-二氯酚酞酚钠做显色剂,将稀释一定浓度后的农药滴加到酶片上(图7中编号2,3),对照组滴加相同量蒸馏水(图7中编号1),保持酶片湿润,将显色片覆盖在酶片上,显色片立即产生变化,编号1的酶片上没有农药,胆碱酯酶未受抑制,遇到显色剂,蓝色显色片不发生变化;编号2,3的酶片由于滴加了农药,显色片的蓝色立即褪色,数秒后蓝色全部褪去。



注:1.滴加蒸馏水;2,3.滴加农药

Note:1. drops with distilled water;2,3. drops of pesticide

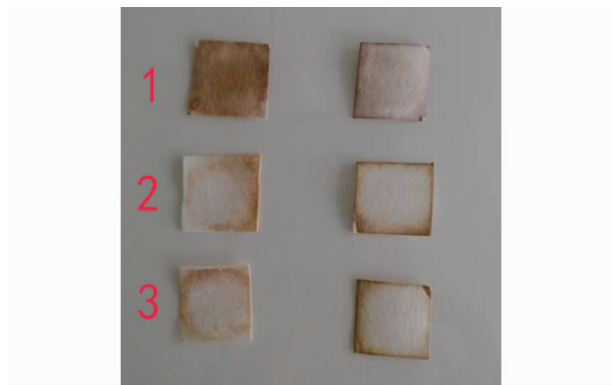
图7 采用2,6-二氯酚酞酚钠做显色剂时酶片的显色效果

Fig. 7 The enzyme piece color effect at the time of using 2,6-2-chlorophenol indophenol sodium as chromogenic agent

试验发现,在不添加酶的情况下滴加农药蓝色依然褪去,由此说明2,6-二氯酚酞酚钠不适合做有机磷农药残留快速检测的显色剂。

**2.8 酶片测试结果** 如图8所示,分别用稀释30倍(有效

成分0.013 mg/kg)的氧乐果对固兰B酶片进行试验,观察显色效果,可看出依然能有效抑制酶活性,酶片不发生变化。试管抑制试验中,农药稀释1 000倍,抑制率依然达到10.3%。



注:1.滴加蒸馏水;2,3.滴加农药

Note:1. drops with distilled water;2,3. drops of pesticide

图8 酶抑制结果

Fig. 8 The results of enzyme inhibition

### 3 结论

大豆酯酶作为一种廉价易得的植物酯酶,其最适反应温度为30℃,pH 7.5时酶的活性最高,缓冲液离子浓度在0.02~0.04 mol/L体系中大豆酯酶活力最大,其最大酶活力吸光度值为0.844。粗酶液在4℃和-20℃2个保藏温度下随着保藏天数的延长,酶活力均呈下降趋势,4℃保藏条件下的酶活力下降速度快于-20℃保藏条件,至保藏36 d时酶活力几乎完全丧失。

酶片采用硝酸纤维膜,制作每张酶片取20 μL大豆酶液,15 μL 0.5%的BSA溶液,2 μL 0.05%戊二醛于平底试管中,添加0.03 mol/L pH 7.0的磷酸缓冲液至总体积100 μL,4℃固定10 h;制作每张显色片,需在1 cm×1 cm大小的滤纸片上加入50 μL显色剂,30 μL底物,4℃冷风吹干,封膜真空保存。固兰B盐和 $\alpha$ -乙酸奈酯组合,适合作为酶抑制法检测有机磷农药残留的显色剂,且效果明显。

### 参考文献

- [1] 赵建庄,梁桂芝,柴丽娜,等.乙酰胆碱酯酶分离纯化的方法[J].北京农学院学报,2003,18(4):249-251.
- [2] 王松.蔬菜中有机磷农药残留测定方法的研究[D].南京:南京农业大学,2009.
- [3] 涂忆江.我国农药残留快速检测技术的研究与应用现状[J].农药科学与管理,2003,24(4):14-16.
- [4] 魏福祥,王振川,王金梅.乙酰胆碱酯酶生物传感器法测定蔬菜水果中有机磷农药残留[J].食品科学,2007,28(2):229-231.
- [5] 黄捷,马双成.中药农药残留检测中前处理方法的应用现状及展望[J].中国药师,2011,14(7):1036-1039.
- [6] 雷明,张檀,文建雷,等.农药残留检测用植物酯酶的筛选[J].西北植物学报,2008,28(1):183-187.
- [7] 刘春红,冯志彪.以 $\alpha$ -乙酸奈酯为底物植物酯酶活力测定条件的优化[J].食品工业科技,2008,29(6):145-147,151.
- [8] 董超,史延茂,张丽萍,等.采用植物酯酶测定农药残留量的研究[J].农药,2001,40(9):19-20.
- [9] 许娟,李建科,牛乐.农药残留快速检测固定化酶片的研究[J].食品科学,2008,29(6):268-272.
- [10] 田子华.酶抑制法农药残留快速检测技术研究[D].南京:南京农业大学,2005.