

文章编号: 1674 - 5566(2012)01 - 0060 - 07

凡纳滨对虾乙酰胆碱酯酶组织分布及对有机磷农药敏感性分析

王元^{1,2}, 周帅¹, 房文红¹, 周俊芳¹, 胡琳琳¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用改进的 ELLMAN 法测定凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 脑神经节乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 活性, 确定其适宜测定条件, 并在此基础上测定对虾不同组织 AChE 活性, 比较毒死蜱、敌敌畏、辛硫磷和乙酰甲胺磷 4 种有机磷农药对凡纳滨对虾脑神经节 AChE 活性的影响。结果表明, 温度 35 ℃, 磷酸缓冲液 pH 7.5 时, 凡纳滨对虾的 AChE 活性最高, 保温时间对酶活性影响很小; 对虾 AChE 活性存在着明显的组织分布差异性, 脑神经节 AChE 活性最高, 为 (49.73 ± 8.42) nmol/(min · mg), 分别是鳃、肌肉和肝胰腺的 3 倍、15 倍和 19 倍; 对虾 AChE 对敌敌畏最为敏感, IC₅₀ 为 0.19 μg/mL, 对毒死蜱和辛硫磷敏感性较强, IC₅₀ 分别为 7.20 μg/mL 和 9.39 μg/mL, AChE 对乙酰甲胺磷敏感性最弱, IC₅₀ 为 136.77 μg/mL。由此可见, 对虾养殖中应注意防范敌敌畏、毒死蜱和辛硫磷等有机磷农药的毒性危害。

研究亮点: 有机磷农药是常用杀虫剂, 其残留危害着水产养殖, 以前对水产动物毒性研究主要集中在鱼类, 很少关注对有机磷农药尤为敏感的对虾。本文优化建立了对虾 AChE 活性检测方法, 评价分析了 4 种有机磷农药对对虾 AChE 活性的抑制作用, 为今后开展对虾有机磷毒理学研究奠定了基础, 也为健康养殖提供了技术支持。

关键词: 凡纳滨对虾; 乙酰胆碱酯酶; 组织分布; 有机磷农药; IC₅₀

中图分类号: S 948

文献标志码: A

有机磷农药是农业生产中应用最普遍的杀虫剂种类之一, 虽然具有高效、广谱的特点, 但如果缺乏科学、合理的用药方法, 则会危害到生态环境甚至人类健康。农药残留不仅威胁着食品安全, 而且一旦进入养殖水体直接影响水生动物的健康生长, 特别是对虾、蟹等甲壳动物。有机磷农药会抑制昆虫体内胆碱酯酶等酶系的活性, 尤其是乙酰胆碱酯酶 (AChE)^[1]。具有强抑制性的有机磷农药与 AChE 结合, 致使乙酰胆碱 (ACh) 不能水解而大量蓄积, 从而增强和延长对受体的作用时间, 导致神经系统功能紊乱^[2]。目前国内外已有不少关于水生动物 AChE 的研究, 但绝大多数是围绕鱼类展开的^[3-4], 且多是以 AChE 作为环境污染的生物化学标记进行的研究, 有关虾类 AChE 的研究报道却十分少见^[5]。

本文以国内大规模养殖的凡纳滨对虾为试验材料, 在优化脑神经节 AChE 活性测定条件基础上, 测定了乙酰胆碱酯酶的组织分布, 并研究了 AChE 对 4 种有机磷农药的敏感性, 为有效监测水体中有机磷污染及对虾养殖中防止有机磷中毒危害提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 取自上海市奉贤区礼和渔业养殖专业合作社, 实验室暂养时采用人工海水盐调节, 盐度为 5 左右, 暂养水温为 26 ~ 27 ℃, 不间断循环和充氧, 投喂适量人工配制颗粒饲料, 暂养一周后挑选体表无损伤、健康的个体用于试验, 体长为 (10.4 ± 0.6) cm。

收稿日期: 2011-06-21 修回日期: 2011-10-12

基金项目: 上海市科学技术委员会科研项目重点专项 (08DZ1980802)

作者简介: 王元 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物药理学。E-mail: wy9501@yeah.net

通讯作者: 房文红, E-mail: whfang06@yahoo.com.cn

1.2 药品及仪器

碘化硫代乙酰胆碱(简称 ATCh)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸,简称 DTNB)和 Triton X-100 购自美国 Alfa 公司,其余试剂购自国药集团化学试剂公司。

80% 敌敌畏乳油、40% 辛硫磷溶液、48% 毒死蜱乳油和 30% 乙酰甲胺磷乳油分别购自南通江山农药化工股份有限公司、泰州市春达动物药业饲料有限公司、通州正大农药化工有限公司和江苏蓝丰生物化工股份有限公司,试验时无水乙醇将上述农药稀释成系列浓度的使用液。

高速冷冻离心机(CF-16R × II)由日本 HITACHI 公司生产;紫外可见分光光度计(UV-2802S)由尤尼柯(上海)仪器有限公司生产;精密 pH 计(pHS-3C 型)由上海雷磁仪器厂生产;数显恒温水浴锅由上海梅香仪器有限公司生产。

1.3 凡纳滨对虾 AChE 粗酶液制备

取对虾 25 尾,剪开头胸甲,小心剥去其下层肌肉组织直至看到乳白色的脑神经节,用镊子取出虾脑神经节组织,滤纸吸干并放入表面皿中称重。然后,用预冷的含 1% Triton X-100 的磷酸缓冲液(pH 8.0, 0.1 mol/mL)冰浴条件下匀浆,对虾脑神经节组织质量(g)/磷酸缓冲液体积(mL)为 1:4,再用磷酸缓冲液稀释成 50 mg/mL 的匀浆液。在 4 °C、10 000 g/min 条件下离心 20 min,取上清液,即为粗酶提取液,记录体积并在 4 °C 下保存、备用。对虾鳃、肌肉和肝胰腺组织的 AChE 粗酶液制备参照上述方法。

1.4 AChE 活性测定

参照 ELLMAN 等^[6]方法作适当改进:取粗酶液 10 μL 加入到 3.00 mL 磷酸缓冲液中,混匀,置一定温度的水浴中保温一段时间,取出后加入 100 μL ATCh 溶液(75 mmol/L)和 100 μL DTNB 溶液(20 mmol/L),立即混匀,迅速将混合液倒入 1 cm 比色皿内,在 412 nm 处测定吸光度。测定时间为 190 s,时间间隔为 10 s,延时设为 0。

酶活性定义为每毫克组织样品每分钟水解底物的纳摩尔数,单位为 nmol/(min · mg),计算公式为:

$$U = V \times A \times 10^6 / (V_0 \times K \times L \times C) \quad (1)$$

式中:U 表示定义的酶活性。A 表示吸光度随时间的变化率(min^{-1}); V_0 表示粗酶液的体积(μL),此处为 10 μL;K 表示消光系数 [$\text{L}/(\text{mmol} \cdot$

mm)] ,此处为 1.36 $\text{L}/(\text{mmol} \cdot \text{mm})$;C 表示匀浆液中组织样品的质量浓度(mg/mL),此处为 50 mg/mL;L 表示测定酶活性时溶液的光径长度(mm),此处为 10 mm;V 表示反应体系的总体积(mL),此处为 3.21 mL。

1.5 不同测定条件对酶活性的影响

1.5.1 温度对酶活性的影响

取 3.00 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 8.0)和 10 μL 粗酶液加入玻璃试管内,混合均匀后分别在 20、25、30、35、40 °C 下保温 25 min,然后依次加入 100 μL 碘化硫代乙酰胆碱和 100 μL DTNB 溶液,混匀后,测定 AChE 活性,每个保温温度重复 3 次。

1.5.2 磷酸缓冲液 pH 对酶活性的影响

分别取 3.00 mL 不同 pH(6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0)0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液和 10 μL 粗酶液加入试管内,于 35 °C 下保温 25 min,然后依次加入 100 μL 碘化硫代乙酰胆碱和 100 μL DTNB 溶液,混匀后,测定 AChE 活性,每个 pH 组重复 3 次。

1.5.3 保温时间对酶活的影响

取 3.00 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.5)和 10 μL 粗酶液加入玻璃试管内,混合均匀后在 35 °C 下分别保温 10、15、20、25、30 min,然后依次加入 100 μL 碘化硫代乙酰胆碱和 100 μL DTNB 溶液,混匀后,测定 AChE 活性,每个保温时间重复 3 次。

1.6 对虾不同组织 AChE 活性分析

首先,提取凡纳滨对虾的脑神经节、鳃、肌肉和肝胰腺等组织的 AChE 粗酶液,然后根据最适酶促反应条件对各组织的 AChE 活性进行测定。

1.7 虾脑神经节 AChE 对有机磷农药的敏感性

以对虾脑神经节 AChE 作为酶源,测定不同浓度的敌敌畏、辛硫磷、乙酰甲胺磷和毒死蜱对 AChE 活性的抑制效果,计算半抑制浓度(IC_{50})。首先用无水乙醇将敌敌畏、辛硫磷、乙酰甲胺磷、毒死蜱按下述条件配成系列浓度的农药药液,分别取 100 μL 药液和 10 μL 对虾脑神经节 AChE 粗酶液,加入到 3.00 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 7.5),混匀后于 35 °C 水浴 15 min,加入 100 μL 碘化硫代乙酰胆碱和 100 μL DTNB 溶液后测定吸光度。混合液中农药的终浓度分别为敌敌畏 0.062 5、0.125、0.25、0.5、1 μg/mL,毒死

蜱 1、2、4、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 辛硫磷 2、4、8、16、32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 乙酰甲胺磷 32、64、128、256、512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对照组以无水乙醇代替农药液。测定酶活性, 并计算抑制率及半抑制浓度(IC_{50})。

$$I(\%) = (E_1 - E_2) / E_1 \times 100 \quad (2)$$

式中: I 为抑制率(%); E_1 为对照组酶液活性; E_2 为农药存在时酶液活性。

1.8 数据处理

实验数据用 SPSS 13.0 软件进行处理, 采用单因素方差分析, 数据进行 LSD 两两比较, $P < 0.05$ 表示统计学差异显著。进行回归分析, 求出半抑制浓度。

2 结果

2.1 不同测定条件对对虾脑神经节 AChE 活性的影响

2.1.1 保温温度对酶活性的影响

在磷酸盐缓冲液 pH 8.0、保温时间为 25 min 时, 保温温度对对虾脑神经节 AChE 活性的影响见图 1。对虾脑神经节 AChE 活性随温度的升高, 呈现出先升高后降低的现象, 在 30 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活显著高于其他试验组, 并于 35 $^{\circ}\text{C}$ 时达到峰值。

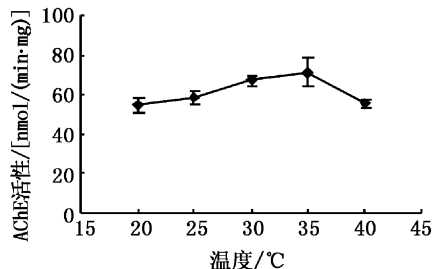


图 1 保温温度对凡纳滨对虾脑神经节 AChE 活性的影响 ($n=3$)

Fig. 1 Effect of holding temperature on the AChE activities of cerebral ganglion from white shrimp

2.1.2 pH 对酶活性的影响

在保温温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、保温时间 25 min 条件下, 磷酸缓冲液 pH 对对虾脑神经节 AChE 活性的影响见图 2。对虾脑神经节 AChE 活性随 pH 的升高, 呈现出先升高后降低的现象, 以 pH 7.5 时酶活最高。经统计分析, pH 7.5 时的酶活显著高于 pH 6.0 ~ 7.0 时的 4 个试验组, 略高于 pH 8.0 的试验组, 但酶活与之并无显著差异 ($P > 0.05$); 当 pH 为 8.0 时, 对虾脑神经节 AChE 活性与 pH

7.0、pH 7.5 不存在显著性差异。

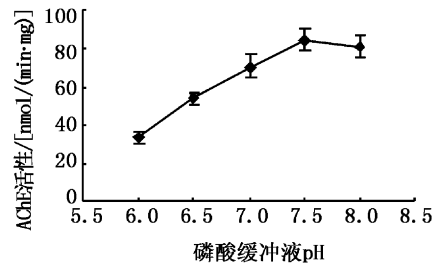


图 2 磷酸缓冲液 pH 对凡纳滨对虾脑神经节 AChE 活性影响

Fig. 2 Effect of pH of PBS buffer on the AChE activities of cerebral ganglion from white shrimp

2.1.3 保温时间对酶活性的影响

在保温温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 、磷酸盐缓冲液 pH 7.5 的反应体系中, 对虾脑神经节 AChE 活性随保温时间的变化情况见图 3。在保温时间为 10 ~ 25 min 时检测 AChE 活性, 酶活基本保持不变, 直至 30 min AChE 活性略有下降, 不过各试验组间的酶活差异并不显著 ($P > 0.05$)。为此, 本试验选择 15 min 作为适宜保温时间。

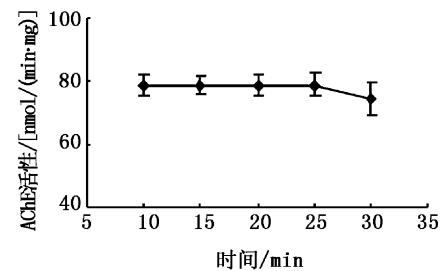


图 3 保温时间对凡纳滨对虾脑神经节 AChE 活性的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effect of holding time on the AChE activity of cerebral ganglion from white shrimp

2.2 凡纳滨对虾主要组织的 AChE 活性

根据结果 2.1 得出的 AChE 酶促反应最适条件, 即在保温温度 35 $^{\circ}\text{C}$ 、磷酸缓冲液 pH 7.5、保温时间 15 min 的条件下, 凡纳滨对虾不同组织中 AChE 活性差异见图 4。在脑神经节、鳃、肌肉和肝胰腺均可检测到 AChE 活性, 其中以脑神经节中 AChE 酶活最高 [(49.73 \pm 8.42) nmol/(min \cdot mg)], 极显著高于其它组织 ($P < 0.01$); 鳃组织次之, 为 (16.16 \pm 4.27) nmol/(min \cdot mg), 显著高于肌肉 [(3.31 \pm 0.39) nmol/(min \cdot mg)] 和肝胰腺 [(2.59 \pm 0.10) nmol/(min \cdot mg)] ($P <$

0.05),但肌肉和肝胰腺中的 AChE 活性并无显著性差异($P>0.05$)。

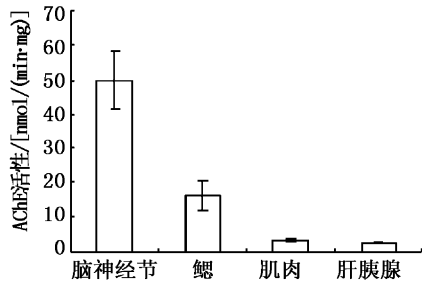


图4 凡纳滨对虾不同组织中 AChE 活性(n=5)

Fig.4 The activities of AChE of different tissues from white shrimp

2.3 凡纳滨对虾脑神经节 AChE 对有机磷农药的敏感性

以农药浓度的对数为横坐标、凡纳滨对虾脑神经节 AChE 抑制百分率为纵坐标作图,得到农药抑制 AChE 的量效曲线,见图 5。敌敌畏、辛硫磷、毒死蜱和乙酰甲胺磷对 AChE 活性均具有明显的抑制作用,且随着药物浓度增加,对 AChE 活性的抑制率逐渐升高,即对 AChE 活性的抑制作

用逐步增强。4 种农药在适宜浓度范围内抑制率与农药浓度对数均存在良好线性关系,其中乙酰甲胺磷线性相关系数达 0.994 9,具体见表 1。这 4 种有机磷农药对对虾脑神经节 AChE 活性抑制作用由强到弱为:敌敌畏>毒死蜱>辛硫磷>乙酰甲胺磷。敌敌畏抑制作用最强,半抑制浓度 IC_{50} 为 0.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$;其次为毒死蜱和辛硫磷, IC_{50} 分别为 7.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 9.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$;乙酰甲胺磷的 IC_{50} 显著高于敌敌畏和毒死蜱,为 136.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$,表明其对 AChE 抑制作用大大弱于前两者。

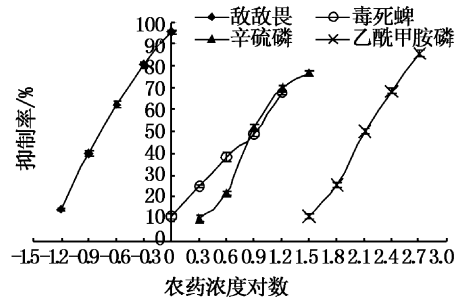


图5 有机磷农药对对虾脑神经 AChE 活性的抑制

Fig.5 Inhibition of organophosphorus on AChE activity of cerebral ganglion from white shrimp

表 1 有机磷农药对对虾 AChE 活性抑制作用的线性关系表

Tab.1 Inhibition relationship curve of organophosphorus pesticides on AChE activity from white shrimp

药品	范围/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	线性回归方程	线性相关系数	$IC_{50}/(\mu\text{g}/\text{mL})$
敌敌畏	0.062 5~1	$y = 66.79x + 98.53$	0.984 7	0.19
毒死蜱	1~16	$y = 45.88x + 10.66$	0.991 2	7.20
辛硫磷	2~32	$y = 60.18x - 8.529$	0.963 8	9.39
乙酰甲胺磷	32~512	$y = 64.17x - 87.06$	0.994 9	136.77

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾 AChE 活性测定条件优化

对 AChE 活性测定条件的优化是开展水生生物 AChE 研究的基础。尽管目前已有不少关于 AChE 活性测定方法的报道,但研究对象涉及甲壳动物的却十分少见。酶促反应是由酶作为催化剂的化学反应,其反应速度受底物浓度、温度和 pH 等因素的影响,本研究还考虑了保温时间对酶促反应的影响。本试验结果显示,酶促反应温度、pH 是影响对虾 AChE 活性高低的关键因素,而酶促反应时间长短对酶活高低影响不显著。

温度对酶促反应速度具有双重影响,在一定

范围内酶促反应随温度的升高而加快,当反应温度低于最适温度时,温度每升高 10 $^{\circ}\text{C}$,反应速度可提高 1~2 倍;如温度降低,反应速度会随温度变化有所下降,但低温不会使酶受到破坏,当温度回升时,酶活性又可恢复。不过如果温度过高超出酶的耐受范围,则会使酶逐渐变性,从而导致酶促反应速度下降^[7]。本研究结果显示,凡纳滨对虾脑神经节 AChE 活性适宜温度范围为 30~35 $^{\circ}\text{C}$,以 35 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳,该范围与鱼类的 AChE 研究结果相似^[8-9]。

pH 对酶活的影响主要体现在,可影响酶、酶-底复合物的解离状态和构型及各种辅助因子,对酶促反应的稳定性具有重要作用^[10]。选择合适的 pH 检测酶活,不仅因为酶促反应快、灵敏度

高,还因为在最适 pH 时酶活变化斜率最小,若反应体系中 pH 出现变化,对测定结果影响最小。本研究表明,对虾脑神经节 AChE 最适 pH 范围为 pH 7.5 ~ 8.0,这与鲫^[11-13]和鲮^[14]的研究结果基本相同。在 pH 7.5 时,凡纳滨对虾脑神经节 AChE 活性最高,是 pH 6.0 时的 2.5 倍,大于 pH 对鲫^[11-12]和鲮^[14]的脑 AChE 活性影响。

本研究中,保温时间对对虾脑神经节的 AChE 活性影响不大,前 10 ~ 25 min AChE 活性几乎没有变化,至 25 min 后略有下降,但效果并不显著,这与鲮脑 AChE 的检测结果相似^[14]。而鲫脑 AChE 活性受保温时间影响较为明显,它随时间推移呈现一个先升高再降低的变化过程^[12],这些差异可能与 AChE 来源有关,一是鱼与虾存在着种属间的差异,二是它们生活的环境不同,如海水和淡水、环境温度等。

3.2 凡纳滨对虾脑神经节 AChE 活性高,是开展 AChE 研究的靶组织

乙酰胆碱酯酶是脊椎动物和无脊椎动物正常的神经传导活动必不可少的一种丝氨酸水解酶,其在动物脑组织中的含量最为丰富^[15]。目前已有不少关于水生动物不同组织中 AChE 活性的研究^[16]。在水生甲壳动物中,多是将动物整体匀浆进行酶活检测^[17],也有检测眼、鳃、血液、肌肉和性腺等组织 AChE 的活性。GARCIA-DE LA PARRA 等^[5]检测了驯养于盐度 32、温度 25 °C 的凡纳滨对虾幼虾[(3.2 ± 0.9) g]肌肉和眼的 AChE 活性,分别为 6.4 nmol/(min · mg)和 23.3 nmol/(min · mg),眼 AChE 活性约是肌肉中的 3.6 倍。在本研究中对虾脑神经节 AChE 活性是肌肉中的 15 倍,分别是鳃和肝胰腺的 3 倍和 19 倍。因此,我们认为对虾脑神经节更适合作为 AChE 研究的靶组织。

3.3 对虾 AChE 对 4 种有机磷农药敏感性差异分析

IC₅₀可以反映乙酰胆碱酯酶对抑制剂的敏感性。IC₅₀越小,表示 AChE 对酶抑制剂越敏感,即受抑制程度越强。本研究以对虾 AChE 活性最高的脑神经节作为靶组织指标酶源,测定了 4 种有机磷农药对脑神经节 AChE 的半抑制浓度(IC₅₀)。实验结果表明,乙酰甲胺磷的 IC₅₀是敌敌畏的 700 多倍,是毒死蜱和辛硫磷的 15 ~ 19 倍,说明乙酰甲胺磷对 AChE 活性的抑制作用相

对较弱,而敌敌畏的抑制作用很强。由此可见,同一来源的 AChE 对不同种类有机磷农药的敏感性不同^[18]。这主要是因为不同农药的分子构型存在差异,因而影响了它与酶分子活性部位的亲和性、磷酸化程度。本研究所使用的 4 种农药中,敌敌畏属于磷酸酯型,乙酰甲胺磷则属于硫代磷酸酯型,毒死蜱和辛硫磷虽都是硫逐磷酸酯型,但分子结构方面存在差别,因此,它们与 AChE 分子亲和程度也存在着一些差异。故不同种类有机磷农药对 AChE 抑制强弱不同。

已有研究^[12]发现鲫脑 AChE 对敌敌畏十分敏感,且程度强于乙酰甲胺磷。本试验结果与其一致,但其以鲫脑 AChE 活性抑制率 16% 为检出标准,测得敌敌畏和乙酰甲胺磷 IC₁₆分别为 1.75 μg/mL 和 81 μg/mL,而敌敌畏和乙酰甲胺磷对对虾脑神经节 AChE 的 IC₁₆分别为 0.06 μg/mL 和 40.36 μg/mL。由此可见,不同生物来源的 AChE 对同种有机磷农药的敏感程度不同^[19],凡纳滨对虾脑神经节 AChE 对敌敌畏和乙酰甲胺磷更为敏感,适合作为水体有机磷农药污染的指示指标。

3.4 有机磷对凡纳滨对虾的影响

有机磷类农药是 AChE 的特异性抑制剂,环境中存在的有机磷可抑制生物体内 AChE 活性,导致生物过度兴奋并引发一系列的异常表现(取食降低、行动缓慢、躲避天敌能力减弱等)^[20]。在凡纳滨对虾幼虾生长期,若养殖水体被少量有机磷污染则对虾蜕皮、生长将被抑制。简慧敏等^[21]研究了敌敌畏、甲胺磷对凡纳滨对虾亚急性毒性作用,试验发现,当敌敌畏、甲胺磷浓度大于 1.0 × 10⁻⁶ μg/mL 时,受试虾体长、体重、蜕皮次数均随溶液中农药浓度的增加而逐渐减少。在凡纳滨对虾养殖的 7 - 8 月份,也是水稻等农作物虫害期,池塘附近农田大量使用有机磷杀虫剂,含有高浓度有机磷的农田废水进入养殖水体,对虾蟹类将造成严重危害。毒死蜱在农业中常用来防治水稻稻飞虱、卷叶螟等害虫,但它对水生生物的危害极大。马继华等^[22]发现毒死蜱对凡纳滨对虾具有强烈的急性毒性作用,在试验液中对虾行为异常,表现为狂游冲撞、旋转、上下直窜和痉挛等,高浓度组中对虾短时间内即中毒死亡。这些现象说明毒死蜱抑制对虾乙酰胆碱酯酶活性,破坏虾体神经系统,导致行为异常直至死亡。

从目前情况看,在对虾养殖中有机磷主要起负面作用,但它并非无有利的一面。农药辛硫磷在水产养殖中已被开发为一种渔药,主要用于杀灭水体害虫和鱼类寄生虫,如锚头蚤、中华蚤、鱼虱,指环虫等。辛硫磷通过作用于虫体乙酰胆碱酯酶,抑制其活性,破坏其神经组织而达到杀虫目的。由于对虾类具有高毒性,辛硫磷在对虾等甲壳动物疾病防治上属于禁用药物,在不久的将来,如果能利用有机磷对 AChE 的特异性抑制这一特点,研制出一种既能杀灭对虾寄生虫(如纤毛虫等)又对虾类无危害的甲壳类专用“辛硫磷”,那么有机磷将对虾类养殖产生积极作用,意义深远。

参考文献:

- [1] 彭霞,陶科,滕云,等. 农药靶标乙酰胆碱酯酶的分离纯化及性质研究[J]. 四川大学学报,2008,45(1):189-193.
- [2] 和大坡. 胆碱酯酶与有机磷农药中毒[J]. 衡水学院学报,2007,9(1):18-19.
- [3] 朱小山,孟范平,朱琳,等. 对有机磷农药敏感的海鱼脑 AChE 筛选研究[J]. 环境科学,2006,27(3):567-571.
- [4] CHUIKO G M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology,2000,127(3):233-242.
- [5] GARCIA-DE LA PARRA L M, BAUTISTA-COVARRUBIAS J C, RIVERA-DE LA ROSA N, et al. Effects of methamidophos on acetylcholine sterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety,2006,65(3):372-380.
- [6] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. Biochemical Pharmacology, 1961,7(2):88-95.
- [7] 魏福祥,韩菊,刘庆洲,等. 乙酰胆碱酯酶活性的计时电位法测定[J]. 分析测试学报,2004,23(2):9-11.
- [8] 朱小山,孟范平,何东海. 鲮鱼脑组织 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.
- [9] 刘晓宇,郝强,吴谋成,等. 鲫鱼脑乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性测定及对有机磷农药的敏感性研究[J]. 食品科学,2006,27(12):71-74.
- [10] 陈石根,周润琦. 酶学[M]. 上海:复旦大学出版社,2001:22-37.
- [11] 邱朝坤,刘晓宇,林晓娜,等. 鲫鱼乙酰胆碱酯酶活测定条件的优化研究[J]. 食品科学,2008,29(8):425-430.
- [12] 贾玉玲,彭惠民,彭方毅,等. 鲫鱼脑 AChE 制备及对几种有机磷农药敏感性研究[J]. 环境科学与技术,2010,33(6):23-27.
- [13] 刘晓宇,王斌,吴谋成,等. 鲫鱼肝脏 AChE 的提取及有机磷农药对 AChE 的抑制效应研究[J]. 食品科学,2007,28(4):191-194.
- [14] 亢小丹,孟范平,张爱静. 鲮鱼乙酰胆碱酯酶对海水甲基对硫磷的响应条件研究[J]. 环境污染与防治,2008,30(11):40-44.
- [15] 何东海,孟范平,朱小山. 有机磷农药对海洋动物乙酰胆碱酯酶(AChE)的毒性效应研究进展[J]. 海洋通报,2003,22(6):71-78.
- [16] 仪美芹,于彩虹,杨明,等. 鲫鱼(*Carassius auratus*)体内胆碱酯酶的组织分布及其对氨基甲酸酯类杀虫药剂的敏感度[J]. 安全与环境学报,2006,6(3):57-60.
- [17] XUERE B, NOURY P, FELTEN V, et al. Cholinesterase activity in Gammarus pulex (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos [J]. Toxicology, 2007,236(3):178-189.
- [18] 颜冬云,蒋新,余贵芬,等. 有机磷农药对乙酰胆碱酯酶的抑制作用及 QSAR 研究[J]. 中国环境科学,2006,26(3):364-367.
- [19] 朱小山,孟范平,杨正先. 5种海鱼脑 AChE 对2种有机磷农药的敏感性比较[J]. 上海环境科学,2003,22(8):521-525.
- [20] DETRA R L, COLLINS W J. The relationship of parathion concentration, exposure time, cholinesterase inhibition and symptoms of toxicity in midge larvae(Chironomidae:Diptera) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry,1991,10(8):1089-1095.
- [21] 简慧敏,姚庆祯,臧维玲,等. 铜、镉、敌敌畏和甲胺磷对南美白对虾的亚急性毒性作用[J]. 生态毒理学报,2007,2(2):237-242.
- [22] 马继华,蒋耀培,刘泉,等. “毒死蜱”对南美白对虾的急性毒性影响[J]. 水产科技情报,2009,36(4):192-194.

The tissue distribution of acetylcholinesterase from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and sensitivity analysis of organophosphorus pesticides

WANG Yuan^{1,2}, ZHOU Shuai¹, FANG Wen-hong¹, ZHOU Jun-fang¹, HU Lin-lin¹

(1. East China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The acetylcholinesterase (AChE) activity of cerebral ganglion from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was determined by the improved method of ELLMAN. On the basis of suitable conditions for determination, the AChE activities of other tissues were determined. This study also compared the effects of chlorpyrifos, dichlorvos, phoxim and acephate on AChE activity in cerebral ganglion. The results showed that the highest activity of AChE was obtained at temperature of 35 °C and pH value of phosphate buffer solution of 7.5, while holding time had little effect on the AChE activity. The difference of AChE activity in different tissues from white shrimp was obvious. The AChE activity of cerebral ganglion was 49.73 ± 8.42 nmol/(min · mg) protein, which was 3 times, 15 times and 19 times higher than that of gills, muscle and hepatopancreas, respectively. AChE was most sensitive to dichlorvos ($IC_{50} = 0.19$ μg/mL) and sensitive to chlorpyrifos ($IC_{50} = 7.20$ μg/mL) and phoxim ($IC_{50} = 9.39$ μg/mL), but was less sensitive to acephate ($IC_{50} = 136.77$ μg/mL). This shows that the shrimp culture should prevent the toxicity of organophosphorus pesticides, such as dichlorvos, chlorpyrifos and phoxim.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; AChE; tissue distribution; organophosphorus pesticides; IC_{50}