

Определяне степента на инхибиране на имобилизирана ацетилхолинестеразата от някои органофосфорни пестициди

Марина Янева, Катя Габровска, Цонка Годжевъргова

Determination of inhibition degree of immobilized acetylcholinesterase from some organophosphate pesticides: Pesticides are chemical substances that are widely used against plant pests and diseases. Organophosphorous pesticides are the most popular pesticides used in agriculture. As acetylcholinesterase inhibitors, organophosphorous pesticides are toxic organic chemicals. The control and detection of organophosphorous pesticide residue. The purpose of this study was comparison between of spectrophotometric and fluorescent methods for determination of pesticides dichlorovos and paraoxon.

Key words: paraoxon, dichlorovos, acetylcholinesterase, Ellman's reagen

ВЪВЕДЕНИЕ

Пестицидите са едни от основните замърсители на околната среда, които водят до сериозни проблеми относно безопасността на храните [5]. Един от основните класове пестициди, които се използват в селското стопанство са органофосфатните пестициди (OPs). Повечето органофосфатните инсектициди проявяват своята токсичност, действайки като необратими инхибитори на ензима ацетилхолинестераза, която катализира хидролизата на невротрансмитера ацетилхолина до холин и оцетна киселина [4]. Инхибирането на този ензим затруднява предаването на нервни импулси [6]. Съществуват различни техники за откриване и доказване на остатъци от пестициди - масспектроскопия, тънкослойна хроматография, газ хроматография, спектрофотометричен метод, където се използва реагента на Ellman и др.

Целта на настоящото изследване е да се сравнят резултатите от спектрофотометричен и флуоресцентен метод за определяне концентрацията на пестициди и подбор на по-чувствителния метод.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Материали

Като носител за провеждане на имобилизацията на ацетилхолинестеразата са използвани лабораторно приготвени магнитни наночастици със среден размер 100 nm [3]. Ацетилхолинестераза (AChE, изолирана от *Electrophorus electricus*, 401U/mg) е закупена от фирма Sigma-Aldrich, Germany. Специфичната активност на имобилизирана ацетилхолинестераза се определя чрез използването на следните реактиви: ацетилтиохолин хлорид (ATCh), реактив на Ellman (5,5'-дитио-бис(2-нитробензоена киселина) и 7- диетиламино-3-4 малеимидофенил-4-метилкумарин, закупени от Fluka, Switzerland. Инхибирането на ацетилхолинестеразата се извършва с етил-параоксон и дихлоровос, закупени от Sigma-Aldrich, USA.

Апарати

Измерванията се извършват чрез използването на UV/Vis спектрофотометър модел 6900 Jenway, оборудван с кварцови кювети с дължина 10 mm и флуоресцентен спектрофотометър модел Cary Eclipse, Varian.

Имобилизация на ацетилхолинестеразата върху магнитни наночастици

Магнитните наночастици се модифицират с цел въвеждане на amino групи на тяхната повърхност [3]. Към 11,7 mg магнитни наночастици се добавят 2 ml 50 mM фосфатен буфер с pH 8. След това магнитните наночастици се сепарират с магнитно поле и разтворът се изхвърля. Към наночастиците се добавя 2 ml 5% глутаров алдехид. Получената смес се поставя на клатчка при стайна температура и се инкубира в продължение на 1 час и 30 минути. След това разтворът на глутаровият алдехид се отстранява, а наночастиците се промиват 10 пъти с 10 mM фосфатен буфер pH 7,6. Към наночастиците се добавя 1 ml ензимен разтвор с

концентрация 0,05mg/ml и полученият разтвор се оставя за една нощ при температура 4°C. След това ензимният разтвор се отстранява, а магнитните наночастици с имобилизирания ензим се промиват 4 пъти с дейонизирана вода и 2 пъти с 10 mM фосфатен буфер pH 7,6.

Определяне степента на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестераза от пестицидите дихлоровос и параоксон

Първо се измерва началната активност на ензима (A_0). Приготвят се различни концентрации на двата инхибитора дихлоровос и параоксон, от 1.0E-02 до 1.0E-10 g/l. Варира се количеството на магнитните наночастици с имобилизирания ензим, като се правят проби от 10, 20, 40 μ l наночастици с концентрация 3,9 mg/ml. Към тях се добавят 100 μ l от инхибитора с определена концентрация и сместа се инкубира в продължение на 20 минути при стайна температура. След това разтворът на инхибитора се изхвърля, а наночастиците с имобилизиран ензим се промиват 4-5 пъти с 10 mM фосфатен буфер pH 7,6. Добавят се 100 μ l 2mM ATCh към имобилизирания ензим и пробата се инкубира в продължение на 10 минути при 37°C. Магнитните частички се сепарират, разтворът се взема и към него се добавя реактива на Елман или флуоресцентното багрило, за да се определи остатъчната активност на ензима (A_t).

Инхибирането I % се изчислява чрез уравнението:

$$I \% = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

където: I % - степен на инхибиране;

A_0 – начална активност на ензима;

A_t – активност на ензима след инкубирането му с пестицида;

Спектрофотометричен и флуоресцентен метод за определяне активността на имобилизираната ацетилхолинестеразата

- *Спектрофотометричен метод чрез реактива на Ellman* [2]. Приготвя се реакционна смес, където се варира количеството на имобилизирания ензим върху магнитните наночастици - 10, 20, 40 l (с концентрация 3,9 mg/ml). Към нея се добавят 100 μ l 2 mM ATCh и получената смес се инкубира при 37°C за 10 минути. След изтичане времето за инкубация разтворът се взема и към него се добавят 100 μ l 2 mM реактив на Ellman и 1,4 ml 10 mM фосфатен буфер pH 7,6. Ензимният реакционен продукт (тиохолин) реагира с реактива на Ellman и интензитета на полученият жълт разтвор се определя спектрофотометрично при 412 nm.

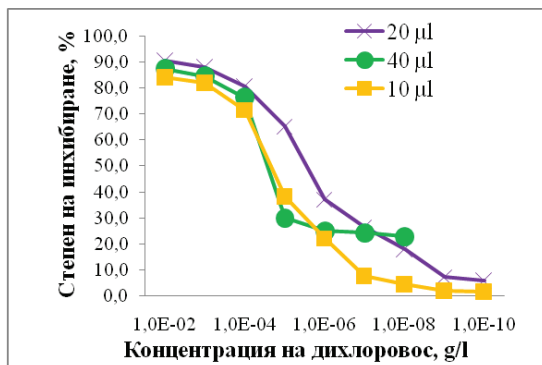
- *Флуоресцентен метод*. Реактивът на Ellman се заменя с флуоресцентно багрило 7-диетиламино-3-4 малеимидофенил-4-метилкумарин 0,16 μ g/1ml [1]. Флуоресцентното багрило реагира с тиохолина и образува комплекс, който се измерва при екстинция 384 nm. и емисия 487 nm.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Определяне степента на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестеразата от пестицидите дихлоровос и параоксон чрез спектрофотометричен метод

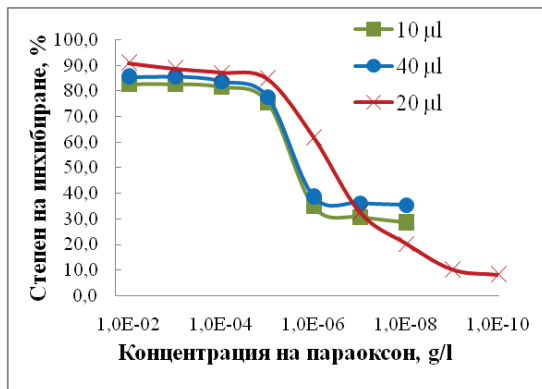
Изследвана е степента на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестераза от два пестицида дихлоровос и параоксон, с цел създаването на високо-чувствителен тест за анализ на тези два пестицида. За целта първо е имобилизиран ензима върху магнитни наночастици съдържащи аминокислоти чрез глутаров алдехид по методика описана по-горе. Определено е количеството на имобилизирания ензим по метода на Брадфорд [5], 0.025mg белтък на 1 mg носител. След това е изследвано инхибиращото действие на различни концентрации на пестицидите дихлоровос и параоксон върху имобилизирания ензим. На базата на получените данни са построени калибровъчни криви на тези пестициди и е определена линейната област на измерване и границата на откриване на пестицида. Остатъчната активност на ензима, след икубирането му с пестицида се измерва по

два метода – спектрофотометричен с реактива на Ellman и флуоресцентен метод с флуоресцентното багрило 7-диетиламино-3-4 малеимидофенил-4-метилкумарин. Целта е да се определи кой метод е по-чувствителен и ще осигури определянето на по-ниски концентрации от тези пестициди. Първо е използван спектрофотометричния метод. На фиг. 1 са представени резултатите, получени след инкубирането на ензима с различни концентрации на инхибитора дихлоровос (от $1.0E-02$ до $1.0E-10$ g/l). Варирано е и количеството на имобилизираната ацетилхолинестераза върху магнитните наночастици - 10, 20 и 40 μ l от разтвора на магнитните наночастици с имобилизирания ензим (концентрация 3,9 mg/ml). От фигурата се вижда, че най-висока степен на инхибиране на ензима се постига при използването на 20 μ l от разтвора на магнитните наночастици с имобилизирания ензим (концентрация 3,9 mg/ml).



Фиг. 1. Определяне степента на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестераза от пестицида дихлоровос чрез спектрофотометричен метод

В този случай линейния интервал на кривата е от $1.0E-04$ до $1.0E-09$ g/l. Освен това много ниски концентрации на дихлоровоса влияят върху активността на ензима – $0,8.0E-09$ g/l. При използване на 10 μ l от имобилизирания ензим върху магнитните наночастици линейната област е от $1.0E-04$ до $1.0E-07$ g/l, а при 40 μ l от $1.0E-04$ до $1.0E-05$ g/l.



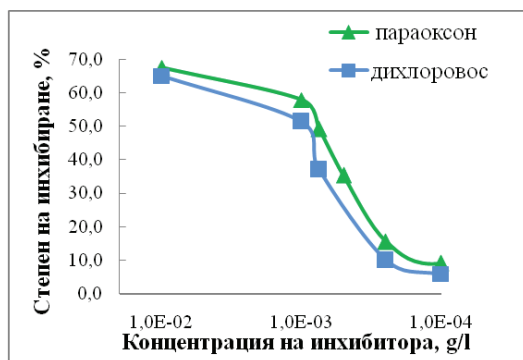
Фиг.2. Определяне степента на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестераза от пестицида параоксон чрез спектрофотометричен метод

На фиг.2 са представени резултатите получени при инкубирането на ензима с различни концентрации на инхибитора параоксон от $1.0E-02$ до $1.0E-10$ g/l. И тук е варирано количеството на магнитните наночастици с имобилизирания ензим - 10, 20 и 40 μ l (с концентрация 3,9 mg/ml).

От фигура 2 се вижда, че отново най-добра степен на инхибиране се постига при използването на 20 μ l от разтвора на имобилизирания ензим върху магнитните наночастици (концентрация 3,9 mg/ml). Линейната област, която се получава в този случай е от $1.0E-05$ до $1.0E-09$ g/l параоксон, а границата на откриване е $0,8.0E-09$ g/l. При използването на 10 и 40 μ l линейната област е много малка от $1.0E-05$ до $1.0E-06$ g/l.

Определяне степента на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестеразата от пестицидите дихлоровос и параоксон чрез флуоресцентен метод

На фиг. 3 са представени резултати получени при измерване на остатъчната активност на ензима с използването на флуоресцентно багрило 7-диетиламино-3-4 малеимидофенил-4-метилкумарин. Методиката е идентична на методиката за спектрофотометричния метод. Флуоресцентното багрило взаимодейства с установеното подходящо количество от имобилизираната ацетилхолинестераза върху магнитните наночастици, а именно 20 μ l (концентрация 3,9 mg/ml). Опитите са проведени както с инхибитор параоксон, така и с дихлоровос. Установено е, че при използването на флуоресцентното багрило, за разлика от реактива на Ellman, не може да се достигне до много ниски концентрации на инхибитора. На фиг. 3 се вижда, че линейната област, която се постига с използването на флуоресцентното багрило при двата инхибитора (параоксон и дихлоровос) е много малка от $1.0E-03$ до $2.5E-04$ g/l.



Фиг. 3. Определяне степента на инхибиране на имобилизираната ацетилхолинестераза при инхибитор параоксон и дихлоровос чрез флуоресцентен метод

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установено е, че спектрофотометричният метод с реактива на Ellman, открива по-ниски концентрации на дихлоровос и параоксон в сравнение с флуоресцентния метод използващ флуоресцентно багрило (7-диетиламино-3-4 малеимидофенил-4-метилкумарин).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Capacio, B.R., J.R Smith, R.K. Gordon, R.K. Haigh, J.R. Barr, B.J. Lukey, Clinical detection of exposure to chemical warfare agents, In: Chemical Warfare Agents: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, Romano, J.A., Lukey, B.J. & Salem, H., 2008, 501-548, Taylor & Francis Group
- [2] Ellman, G.L., K.D. Courtney Jr., V. Andres, B.C. Featherstone, Biochem. Pharmacol, 1961, 7, 88-94.
- [3] Gabrovska, K.I., S.I. Ivanova, Y.L. Ivanov, and T.I. Godjevargova, Immunofluorescent Analysis with Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Determination of Antibiotic Residues in Milk. Analytical Letters, 2013, 46, 1537–1552.
- [4] Pedrosa, V., J. Caetano, S. Machado, M. Bertotti, Determination of Parathion and Carbaryl Pesticides in Water and Food Samples Using a Self Assembled Monolayer /Acetylcholinesterase Electrochemical Biosensor. Sensors, 2008, 8, 4600-4610.
- [5] Shengye, J., X. Zhaochao, C. Jiping, L. Xinmiao, W. Yongning, Q. Xuhong Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH-sensitive fluorescence probe. Analitica Chimica Acta, 2004, 523, 117-123.
- [6] Simonian, A.L., E.I. Rainina, J.R. Wild, A New Approach For Discriminative Detection of Organophosphate Neurotoxins in the Presence of Other Cholinesterase Inhibitors Analytical Letters, 1997, 30, 2453- 2468.

За контакти:

Марина Янева-докторант, Университет „Проф. Д-р Асен Златаров“, Бургас;
marinaianeva@abv.bg;

Цонка Годжевъргова, Университет „Проф. Д-р Асен Златаров“, Бургас;
godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран