

生物荧光传感器检测环境水样中氨基甲酸酯类农药残留

张 昊 刘传志 徐 影 郭 元 宋 禹 于源华*

(长春理工大学, 长春 130022)

摘 要 建立了简便、灵敏的氨基甲酸酯类农药生物荧光传感器及其检测方法。通过构建氨基甲酸酯类农药降解菌 H5 基因组文库, 筛选出氨基甲酸酯类农药特异性响应功能基因的调控序列, 将其与增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP) 连接, 构建了非细胞体系生物荧光传感器 H12-E, 非细胞体系蛋白浓度为 1.0 g/L。在室温条件下, 对不同浓度呋喃丹标准液进行检测, 30 min 即可检测出 fg 级氨基甲酸酯类农药总量, 灵敏度高于国家标准, 线性范围 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4}$ g/L。采集吉林省松花江流域等水样, 检测氨基甲酸酯类农药残留, 并向伊通河水样中添加高中低 3 个水平呋喃丹标准液, 方法回收率 95%~110%, 相对标准偏差(RSD) 2.4%~4.9%。本方法可望用于环境水体中氨基甲酸酯类农药残留的快速检测。

关键词 氨基甲酸酯类农药; 基因组文库; 生物荧光传感器; 非细胞体系

1 引 言

氨基甲酸酯类农药是农作物防治虫害的常用农药^[1], 常用的如呋喃丹(2, 3-二氢-2, 2-二甲基-7-苯并呋喃基-甲基氨基甲酸酯)、西维因((1-萘基)-N-甲基氨基甲酸酯) , 它们是主要的氨基甲酸酯类杀虫剂, 能被植物的根、茎、叶吸收, 并在作物内传导; 可经消化道、呼吸道和皮肤被人吸收, 吸收后主要分布于肝、肾、脂肪和肌肉中。氨基甲酸酯类农药是一种抑制体内胆碱酯酶的神经毒素, 具有潜在致癌、致畸、致突变作用^[2~4]。近年来, 农药残留和食品安全的问题备受关注。

目前, 氨基甲酸酯类农药残留的检测方法主要用于蔬菜和水果等样品, 环境水体中氨基甲酸酯类农药残留的快速检测鲜有报道。我国现行氨基甲酸酯类农药国家标准检测方法有色谱法^[5, 6]、胆碱酯酶抑制法^[7]等。色谱法定量准确, 但仪器体积大, 对检测人员的技术要求高; 胆碱酯酶抑制法快速、便捷, 但灵敏度低, 检出限仅为 mg/kg 级。因此建立灵敏、简便、低成本的环境水体中氨基甲酸酯类农药残留快速检测方法对环境监测领域意义重大。

近年来, 非细胞体系生物荧光传感器以快速、灵敏、高通量的优点, 在快速检测领域受到广泛关注。非细胞体系是在细胞抽提物的酶系中合成蛋白质的体外系统, 具有稳定、快速、高效等特点^[8]。Xiong 等^[9]将绿色荧光蛋白基因同源重组到睾丸酮从毛单胞菌中甾体激素特异性响应功能基因下游, 构建了定量检测甾体激素的非细胞体系生物荧光传感器, 灵敏度达到 1.0 ng/L。本研究组在质粒 pK18 的顺式 β -半乳糖苷酶启动子基因下游, 依次插入了甾体激素及多环芳烃的特异性响应功能基因、绿色荧光蛋白基因, 并将质粒转入大肠杆菌 BL21 中, 构建了定量检测甾体激素及多环芳烃的非细胞体系高效生物荧光传感器, 灵敏度达到 0.1 ng/L^[10]。

本研究通过构建氨基甲酸酯类农药降解菌 H5 基因组文库, 筛选出氨基甲酸酯类农药特异性响应功能基因的调控序列, 与增强型绿色荧光蛋白(EGFP) 基因连接, 构建了检测氨基甲酸酯类农药残留的非细胞体系生物荧光传感器, 用于环境水体中的农残检测。当样本中含有氨基甲酸酯类农药时, EGFP 表达并发光, 荧光值在一定范围内与农药含量呈正相关。

2013-02-16 收稿; 2013-11-03 接受

本文系吉林省科技厅重大攻关项目(No. 102DGG005) 和质检公益性行业科研专项经费(No. 201110018-02) 资助

* E-mail yuyuanhua8888@126.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Synergy2 荧光酶标仪(美国 BioTek 公司); 96 孔微孔黑板(美国 Corning 公司); LC-20A 高效液相色谱仪、UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 5810R 冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司); HZQ-F160 全温振荡培养箱(哈东联公司)。

H5 菌株(本实验室保存)、质粒 pKEGFP-2(本实验室构建); 大肠杆菌 HB101(北京鼎国生物公司)。

呋喃丹标准品(中国药品生物制品检定所); LB 培养基、无机盐培养基、Kanamycin(北京鼎国公司); 限制性内切酶、碱性磷酸酶(NEB 公司); 其它试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水。

呋喃丹标准液配制: 呋喃丹标准品 0.01 g, 加入 10 mL 丙酮溶解, 再用含有 10% 丙酮的磷酸盐缓冲液(PBS) 将其稀释成所需浓度的呋喃丹标准液。

2.2 H5 菌株对氨基甲酸酯类农药降解功能的鉴定

配制 50 mg/L 呋喃丹, 作为唯一碳源的无机盐培养基, 分别加入 HB101 菌液和 H5 菌液, HB101 菌液在 37 °C, H5 菌液在 27 °C, 2000 r/min, 培养 14 h, 高效液相(HPLC) 法检测培养基中呋喃丹含量。HPLC 条件: ODS-C18 反向柱(150 mm×4.6 mm 5 μm); 流动相: 甲醇-水(70:30, V/V); 流速 1 mL/min; 柱温 30 °C; 紫外检测器 检测波长 210 nm。

2.3 H5 菌株基因组文库的构建及功能基因调控序列的筛选

参照基因组文库构建方法^[11], 用限制性内切酶 BamHI 酶切 H5 染色体及载体 pKEGFP-2, 将其连接, 转化 HB101 感受态细胞, Kanamycin 抗性 LB 固体培养基筛选单克隆。将筛选出的单克隆菌液与 10, 100 和 1000 ng/L 呋喃丹标准液在 96 孔微孔黑板中诱导培养 1 h, 荧光酶标仪检测荧光强度, 激发波长 475 nm, 发射波长 509 nm, 选取荧光强度与呋喃丹浓度正相关且荧光增强率(FE) 最大的克隆子。

$$FE(\%) = 100 \times (F_{cf} - F_0) / F_0 \quad (1)$$

其中 F_{cf} 为与呋喃丹反应的荧光强度, F_0 为空白对照荧光强度。对筛选出的阳性克隆子的 H5 DNA 片段进行分析、测序及序列比对。

2.4 生物荧光传感器的构建及制备

对含有功能基因的质粒做 PCR, 获得调控序列, 插入 pKEGFP-2 载体中 EGFP 基因上游, 构建荧光重组菌。用溶菌酶冻融破碎技术, 制备荧光重组菌非细胞体系^[10], 考马斯亮蓝法测定非细胞体系蛋白含量, 将其浓度调整为 1.0 g/L, 即为制备的氨基甲酸酯类农药生物荧光传感器。

2.5 检测方法的建立、应用及方法回收率

在 96 孔微孔黑板中加入 100 μL 传感器和 2 μL 系列浓度呋喃丹标准液, 反应后, 荧光酶标仪检测荧光强度, 以含有氨基甲酸酯类农药的样品荧光强度与空白对照荧光强度之差为传感器响应值(荧光值)。

将采集吉林省松花江流域及长春市等 5 个水样各 10 mL, 10000 r/min 离心 1 min, 取上清液测荧光强度, 对照标准曲线, 计算样品中氨基甲酸酯类农药总量。

选取上述某样本, 分别添加高中低呋喃丹标准液, 以本法分别对每个浓度试液测定 3 次, 计算方法加标回收率。

3 结果与讨论

3.1 HS 降解功能鉴定

经 HPLC 检测, 14 h 内 H5 对氨基甲酸酯类农药降解率为 39.3%, HB101(阴性对照) 对氨基甲酸酯类农药降解率为 0.6%, 具有显著差异, 并且 H5 在 48 h 内能够完全降解浓度为 50 g/L 呋喃丹标准液, 说明 H5 对氨基甲酸酯类农药具有较强降解功能。

3.2 H5 基因组文库的构建及调控序列的筛选结果

H5 基因组文库共 4836 个克隆子, 12 号克隆子经呋喃丹诱导后, 荧光增强率最大为 14.1%。对该质粒的 H5 DNA 片段测序, 全长 1094 bp, 经 BLAST 在 GeneBank 数据库比对, 与 Paenibacillus sp. JDR-2 羧

酸酯酶基因同源性 89% ,羧酸酯酶能有效水解氨基甲酸酯类农药^[12] ,因此 H5 DNA 片段是降解氨基甲酸酯类农药的功能基因 ,通过比对 ,该功能基因的 654~1061 bp 为其调控序列 ,能够与氨基甲酸酯类农药产生特异性响应。

3.3 传感器的构建结果

由图 1 可见 407 bp 启动子等调控序列和 EGFP 基因与质粒 pK18 上的 LacZ 启动子基因反向 ,因此 EGFP 的表达只受上游 407 bp 启动子等调控序列影响 ,与 LacZ 基因无关。氨基甲酸酯类农药能够与 407 bp 启动子等调控序列产生特异性响应 ,启动下游 EGFP 基因转录和翻译 ,表达 EGFP 蛋白 ,当给予 475 nm 激发光时 ,在 509 nm 处发射绿色荧光。由此推测 407 bp 启动子等调控序列上可能结合某种抑制子蛋白 ,当样本中含有氨基甲酸酯类农药时 ,抑制子蛋白与氨基甲酸酯类农药特异性结合 ,蛋白构象改变 ,从调控序列上脱落 ,解除对启动子等调控序列功能的抑制 ,启动子启动下游 EGFP 基因的表达 ,该原理与熊光明等研究的羧丸酮从毛单胞菌中 3 α -羟基类固醇脱氢酶/羧基还原酶基因的调控及与甾体类激素相互作用的原理相似^[13]。由此构建的非细胞体系生物荧光传感器 H12-E ,在 20℃ 可保存数月。

3.4 H12-E 检测呋喃丹标准荧光曲线

选取不同反应时间及不同浓度呋喃丹进行检测 ,结果如表 1 所示 ,10 min 内即可检测到荧光信号 ;反应时间延长 ,EGFP 不断表达 ,荧光值升高 ;随着代谢产物不断增加 ,改变了传感器内环境 ,影响了 EGFP 表达以及代谢 ,导致荧光值降低。诱导反应时间为 30 min 时结果最稳定。因此 ,本荧光生物传感器的诱导反应时间确定为 30 min。

表 1 H12-E 经不同诱导反应时间的传感器响应荧光值

Table 1 Time dependence of fluorescence value with fluorescence biosensor H12-E

呋喃丹浓度 Concentration of carbofuran ($\mu\text{g/L}$)	不同诱导反应时间的荧光值 Fluorescence values with different incubation time			
	10 min	20 min	30 min	40 min
1	1441	1841	2394	2235
5	1563	2184	2959	2561
10	1598	2246	3372	2576

图 2 为 H12-E 检测呋喃丹标准荧光曲线 (a) 及线性曲线 (b)。线性方程为 $y = 290.11 \ln x + 470.59$ ($R^2 = 0.98$) ,其中 y 为荧光值 , x 为呋喃丹浓度 ,线性范围 1 ng/L~100 $\mu\text{g/L}$ 。当呋喃丹浓度为 1 ng/L 时 ,即可产生荧光信号 ,但信号较弱 ;当其含量高于 100 $\mu\text{g/L}$ 时 ,浓度过大影响 EGFP 正常表达 ,荧光值呈非线性变化。

3.5 应用及加标回收实验结果

采用本方法测定吉林省松花江流域的伊通河、饮马河、辉发河以及长春市南湖、自来水水样中氨基甲酸酯类农残分别为: 62.6, 148, 204, 12.4 和 1.54 $\mu\text{g/L}$ 。其中自来水及南湖水中农残量低 ,符合国家标准。伊通河、饮马河、辉发河等松花江支流污染严重 ,可能源于松花江流域的农业污染 ,氨基甲酸酯类农药施用总量大 ,有效利用率低 ,导致大量残留农药进入河流中。水样加标回收结果如表 2 所示 ,回收率 95%~110% ,相对标准偏差 (RSD) 2.4%~4.9% ,表明本方法具有可行性。

本研究建立的方法 ,以呋喃丹为标准 ,定量检测样本中氨基甲酸酯类农药残留总量。检测时间 30 min ,检测通量 96 个样品/次 ,检测下限达到 ng/L 级水平。有望用于环境水体及地下水等氨基甲酸酯类农药残留的快速筛查及环境评价。

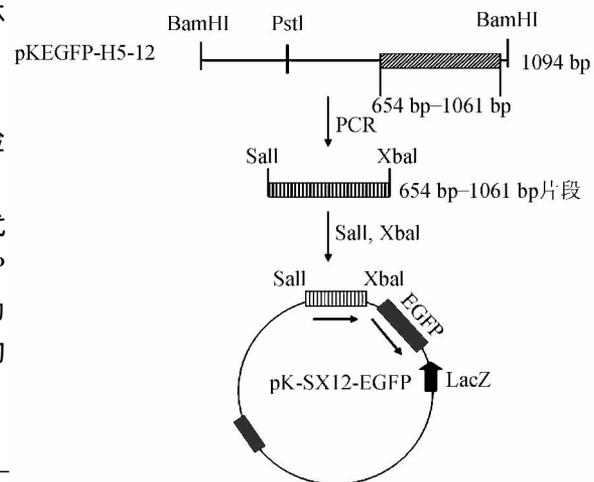


图 1 氨基甲酸酯类农药生物荧光传感器中核心功能质粒的构建

Fig.1 Construction core functional plasmid of carbamate pesticides biological fluorescence sensor

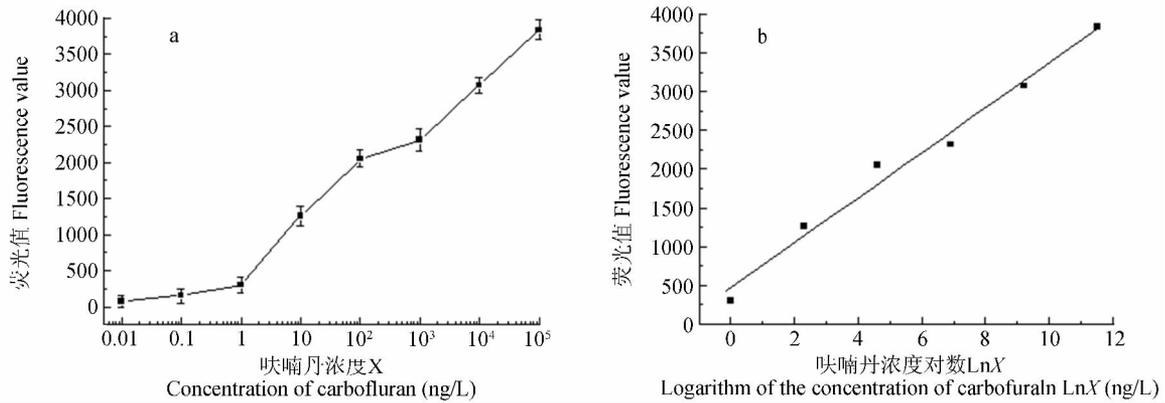


图 2 H12-E 检测呋喃丹的标准荧光曲线(a) 及线性曲线(b)

Fig.2 Standard curve (a) and linear regression curve (b) of H12-E detection for carbofuran

表 2 氨基甲酸酯类农药的 H12-E 检测方法的加标回收率和相对标准偏差(RSD)

Table 2 Recoveries and RSD for carbamate pesticides by H12-E

水样 Water sample	氨基甲酸酯类农药浓度 Concentration of carbamate pesticide ($\mu\text{g/L}$)	加标浓度 Spiked concentration ($\mu\text{g/L}$)	测定浓度 Measured concentration ($\mu\text{g/L}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (% , $n = 3$)
伊通河 River water	62.6	1	63.8	110	4.4
		10	73.4	107	2.4
		20	81.6	95	4.9

References

- LIANG Gui-Mei. *Plant Protection Technology and Extension* , **2000** , 20(3) : 32-33
梁桂梅. 植保技术与推广, **2000** , 20(3) : 32-33
- YANG Hua , MA Guang , FENG Quan. *Northern Fruits* , **2006** , (2) : 34-35
杨华, 马光, 冯泉. 北方果树, **2006** , (2) : 34-35
- Foumier D , Mutem A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology , Toxicology and Endocrinology* , **1994** , 108(1) : 19-31
- GU Xiao-Jun , TIAN Su-Fen. *Journal of Fujian Agricultural University(Natural Science)* , **2001** , 30(1) : 80-83
顾晓军, 田素芬. 福建农业大学学报, **2001** , 30(1) : 80-83
- GB/T 5009.104-2003. *Determination of Carbamate Pesticide Residues in Vegetable Foods*. National Standards of the People's Republic of China
植物性食品中氨基甲酸酯类农药残留量的测定. 中华人民共和国国家标准. GB/T 5009. 104-2003
- GB/T 5009.163-2003. *Determination of Carbamate Pesticides Multiresidues in Animal Foods(HPLC)* . National Standards of the People's Republic of China
动物性食品中氨基甲酸酯类农药多组分残留高效液相色谱测定. 中华人民共和国国家标准. GB/T 5009.163-2003
- GB/T5009.199-2003. *Rapid Determination for Organophosphate and Carbamate Pesticide Residues in Vegetables*. National Standards of the People's Republic of China
蔬菜中有机磷和氨基甲酸酯类农药残留量快速检测. 中华人民共和国国家标准. GB/T 5009.199-2003
- Ohashi H , Kanamori T , Shimizu Y. *Current Pharmaceutical Biotechnology* , **2010** , 11(3) : 267-271
- Xiong G , Luo Y , Jin S , Maser E. *Chemico-Biological Interactions* , **2009** , 178(1-3) : 215-220
- YU Yuan-Hua , SONG Yu , YU Hua-Dong , HE Xiu-Xia , ZHANG Shu-Hua , GE Shu-Min , MA Shu-Lin , HOU Wei. *National Invention Patent of the People's Republic of China: CN 102128938 B*. **2013** , 06 , 19
于源华, 宋禹, 于化东, 何秀霞, 张淑华, 葛淑敏, 马书林, 侯巍. 中华人民共和国发明专利: CN 102128938 B. 2013, 06, 19
- Handelsman J. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , **2004** , 68(4) : 669-685
- Singh B , Kaur J , Singh K. *Critical Reviews in Microbiology* , **2013** , (0) : 1-9
- Xiong G , Martin H J , Blum A , Schäfers C , Maser E. *Chemico-Biological Interactions* , **2001** , 130-132: 723-736

