

基于固定化 AChE 的流动注射型酶传感器研究

朱小山^{1,2}, 孟范平^{2*}, 朱琳¹, 何东海²

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2. 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要:以固定化鲛鱼脑组织乙酰胆碱酯酶[acetylcholinesterase, AChE(EC 3. 1. 1. 7)]为识别元件, 以 pH 电极为换能器, 构建流动注射型 AChE 酶传感器. 该传感器在以磷酸盐缓冲液为载液条件下具有良好的重现性(RSD= 1. 427%, $n=10$)和敏感性, 可实现对有机磷化合物的在线监测; 对甲基对硫磷具有线性响应的浓度范围为 $4.29 \times 10^{-10} \sim 4.29 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最低检测限为 $1.3 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 在以清洁海水为载液条件下, 该传感器对海水中甲基对硫磷的敏感性较差, 但是采用 NaClO 溶液对海水中甲基对硫磷进行预氧化后, 传感器对其的最低检测限可达到 $2.16 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词:固定化; 乙酰胆碱酯酶; 生物传感器; 流动注射系统; 有机磷农药

中图分类号: X834 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)09-1829-06

Flow Injection Biosensor Based on the Immobilized AChE

ZHU Xiao-shan^{1,2}, MENG Fan-ping², ZHU Lin¹, HE Dong-hai²

(1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A biosensor based on the flow injection system was constructed with the immobilized AChE from *Scomberomorus niphonius* (Curier) as identification element and a pH electrode as transducer. When phosphate buffer was used as carrier liquid, a good reproducibility (RSD= 1. 427%, $n=10$) of the biosensor response was obtained after the substrate was injected repetitively. After an incubation time of 20min, the calibration graph to methylparathion is linear ($r=0.9986$) when its concentration ranges from $4.29 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $4.29 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the detection limit is $1.3 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. However, the sensitivity of this biosensor to methylparathion when using clean seawater as carrier liquid is not as good as that using phosphate buffer. But after preoxidation of methylparathion with NaClO as oxidant, the detection limit of the biosensor to methylparathion in seawater can be improve to $2.16 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: immobilization; acetylcholinesterase (AChE); biosensor; flow injection system; organophosphorus pesticides (OPs)

随着农林业上有机磷农药的广泛使用, 有机磷农药对环境的污染日益严重, 也对人类健康产生潜在的威胁. 因此, 有必要对环境中的有机磷农药进行快速灵敏的监测. 联合国安全与健康委员会和欧盟规定, 有机磷农药的分析方法为气相色谱法或者高效液相色谱法^[1]. 这 2 种方法虽然具有灵敏度高、准确性好等优点, 但是同时存在着仪器笨重、无法现场使用、监测速度慢、需要繁琐的样品前处理以及技术难度大等缺陷^[2]. 而生物传感器具有快速、简便、易于在线和现场检测的优点, 因而受到越来越多的关注.

近年来, AChE 传感器的研究已成为一个热门领域. 该类传感器可以灵敏检测环境中的有机磷农药, 主要是基于胆碱酯酶对有机磷农药的高度敏感性和特异性响应^[3,4]. 同其他传感器类似, 酶传感器的主要组成有识别元件(固定化酶)和换能器 2 部分. 目前, 使用最多的换能器是 H⁺ 敏感装置, 如 pH 电极^[5,6]、离子敏场效应晶体管^[7]和金属—金属氧化物电极^[8]等. 乙酰胆碱(或丁酰胆碱)的酶促水解

能产生乙酸(或丁酸), 后者引起体系中 pH 值(或电位)发生变化. 即使是较低的这种变化也会被上述换能器检测到^[9]. 有机磷农药正是通过抑制乙酰胆碱酯酶(AChE, EC 3. 1. 1. 7)的活性而影响体系的电位. 于是根据有机磷农药与酶活之间的剂量-效应关系^[10]即可计算出有机磷农药的浓度.

自 20 世纪 70 年代以来, 流动注射分析系统(FIA)和连续流分析系统已经应用于在线定量分析方面, 并显示出高效性和多功能性^[11]. 将流动注射分析系统和固定化酶偶联所制备的传感器已应用于胆碱^[12]、农药^[13]的测定, 但是目前还没有发现应用于海水中有机磷农药测定的报道. 本研究以固定化 AChE 为识别元件, 以 pH 电极为换能器, 引入流动注射系统中, 构建成乙酰胆碱酯酶传感器, 并尝试将其应用于海洋环境监测.

收稿日期: 2005-10-19; 修订日期: 2005-12-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2001AA635130)

作者简介: 朱小山(1977~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物与生态毒理学, E-mail: zxsxg1977@yahoo.com.cn

* 通讯联系人

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲱鱼[*Scomberomorus niphonius* (Curier)] 脑组织 AChE 由中国海洋大学生命学院环境与生态工程研究室分离纯化。

碘化硫代乙酰胆碱(ATCh)购自 Fluka 公司;普鲁卡因胺(procainamide)、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDAC) [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide] 均购自 Sigma 公司;甲基对硫磷(methy-parathion, 99%)标准品购自国家农药质检中心(沈阳);多孔琼脂珠购自 Pharmacia 公司. 其余试剂均为分析纯。

载液为 pH7.5 的 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS), 含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 . 底物 ATCh 用 PBS 溶液配成 $345.80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的贮备液, 使用前再用 PBS 溶液稀释到所需浓度. 甲基对硫磷用无水乙醇配成 $43.29 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的贮备液, 使用前用 PBS 溶液稀释到所需浓度. 纯水由去离子水经 2 次蒸馏制得。

HL-2 型恒流泵为上海沪西分析仪器厂产品; pH 电极为上海精密仪器公司产品. 微量移液器为法国 Gilson 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化酶的制备

以普鲁卡因胺为吸附剂、多孔琼脂珠为载体制备固定化酶. 首先将普鲁卡因胺、多孔琼脂珠在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDAC 溶液中按照一定比例(每 mg 多孔琼脂珠中加入 $100 \mu\text{mol}$ 普鲁卡因胺)在冷冻管内混合, 室温下偶联 2 h. 用 EDAC 液将多余的普鲁卡因胺洗掉. 再用磷酸盐缓冲液(pH 8.0, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 洗 1 次. 将经上述处理的多孔琼脂珠和一定量的 AChE 酶液混合, 冰箱内轻微搅拌过夜, 然后抽滤混合液, 所得到的固体即为固定化 AChE. 用磷酸盐缓冲液(pH 8.0, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 反复冲洗 3~5 次, 备用。

1.2.2 固定化酶柱的制备

准确称取一定量固定化酶(使酶活力在 1U 左右), 仔细装入 $20 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ (i. d.) 短玻璃管中, 两端用玻璃棉封住, 制得固定化酶柱。

1.2.3 传感器的组装及使用步骤

传感器的主要部件包括有蠕动泵、注射阀门、固定化酶柱、测定池、电极、A/D 转换装置以及微机等

(图 1). 最初在进行生物传感器操作条件优化时, 将阀门 V_2 关闭; 而进行农药浓度检测时, 按照如下步骤循环进行: 起始酶活性的测定 → 农药样品进样(农药抑制作用) → 剩余酶活性的测定 → 酶的复活 → 复活后酶活性的测定 → 另一个农药样品的进样。

具体操作步骤如下: ①稳定基线 将阀门 V_2 关闭, 打开阀门 V_1 , 让载液(PBS)持续流过传感器, 直到基线稳定. ②起始酶活测定 从注射阀门处注入 $60 \mu\text{L}$ 底物使用液($86.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $60 \mu\text{L}$, 用载液配制), 记录峰值, 作为起始酶活. ③农药抑制与剩余酶活测定 当峰高回复到底物注射前的基线状态时, 将 V_1 关闭, 打开 V_2 , 农药溶液由此进入流动系统, 控制进样时间为 20 min, 然后再次将 V_2 关闭, 打开 V_1 , 让载液(PBS)流过系统. 当信号值再次回到基线时, 从注射阀门处注入底物使用液, 记录峰值, 作为农药抑制后的剩余酶活性. ④酶的复能 当峰高回落, 再由注射阀加入高浓度底物溶液($345.80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $60 \mu\text{L}$, 用载液配制), 作为酶的复活液. 系统回到基线状态时, 再次注入底物使用液, 测定复活后的酶活性. 当酶活(信号值)恢复到起始酶活时, 可以进行另一个农药样品的测定. 含农药的样品对固定化酶的活性抑制百分率(I)按下式计算:

$$I = \frac{E_0 - E}{E} \times 100\%$$

式中: E_0 为表示起始(或复活)后的酶活(mV); E 为表示抑制后的酶活(mV)。

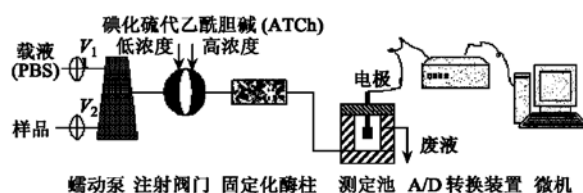


图 1 流动注射型乙酰胆碱酯酶传感器的构造

Fig. 1 Schematic diagram of flow injection biosensor based immobilized AChE

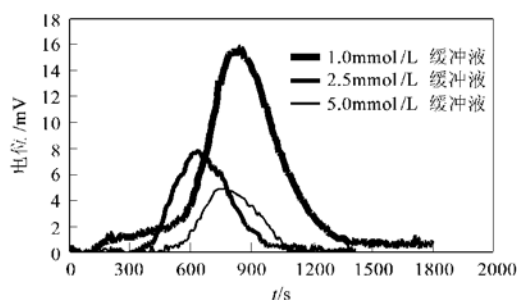
2 结果与讨论

2.1 传感器操作条件

2.1.1 缓冲液

在传感器中, 作为载液的缓冲液能够直接影响到固定化酶的稳定性、灵敏性和酶促反应速度. 本研究测定了不同浓度磷酸盐缓冲液对酶活性的影响(图 2), 发现随着浓度的增加, 酶活性下降. 这与 Xavier 等人观察到的实验现象一致^[14]. 这主要是因

为高浓度的缓冲液能够限制游离态 H^+ 的存在, 导致以 pH 电极为换能器的酶传感器的响应值降低^[14]. 另外, 极低浓度的农药对酶的抑制所引起的电极电位变化也是相当微弱的. 因此为了提高传感器的灵敏性, 应在保证获得稳定基线的前提下, 尽可能选择缓冲强度弱的溶液^[15]. 此外, 经过反复实验, 发现在缓冲液中加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 能起到稳定酶活的作用. 文献报道^[15], 中性盐能使缓冲强度弱的溶液保持稳定而不影响酶电极的响应特性. Leórr-González 等人发现^[16] 随操作时间延长酶活性逐渐降低, 但在缓冲液中加入 $45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 和 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 后, 酶活基本保持稳定. 本研究的结果表明, 浓度为 1 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.5, 含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2) 作为传感器工作载液比较理想.



流速为 $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 底物为 ATCh ($34.58 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $60 \mu\text{L}$), 温度为室温

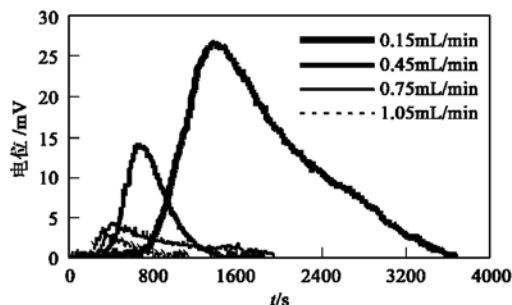
图 2 不同浓度磷酸缓冲液对传感器响应的影响

Fig. 2 Effect of the PBS concentration on the sensor response

2.1.2 流速

样品流速和通过量也是 2 个重要的影响因素. 流过酶柱的样品体积越大, 无疑会给酶和农药更多的接触时间, 固定化酶所受到的抑制越大. 而流速则决定底物或农药在酶柱中停留的时间, 流速越慢, 底物或农药在酶柱中的停留时间就越长, 酶促反应 (或抑制反应) 进行得越完全, 表现为酶活峰值越高 (或越低). 可见, 降低流速和延长进样时间的最终结果是一致的, 都能增加农药对酶活的抑制程度. 但是实验发现, 流速太小将会限制分析速度 (图 3), 有时甚至产生宽峰和拖尾现象, 从而影响传感器的精确性, 这与 Pogacnik 等^[17] 的实验结果一致. 另外由图 3 可见, 随着流速的增加, 酶活性降低, 表现为峰高下降. 因此综合上述 2 个方面的原因, 本研究选定流速为 0.45 mL/min , 同时控制进样时间为 20 min (即样品

量约为 9 mL) 进行实验. 在此条件下, 传感器对底物有良好的响应, 完成一个峰约需 $10 \sim 15 \text{ min}$, 同时抑制作用更加完全.



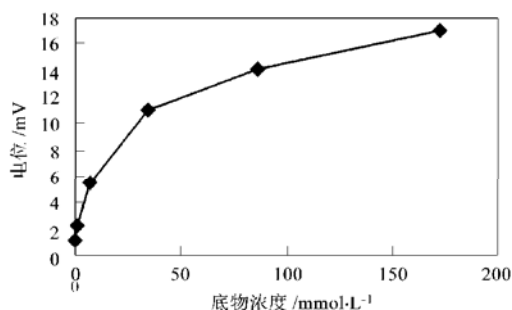
载液为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH7.5, 含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2), 底物为 ATCh ($34.58 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $60 \mu\text{L}$), 温度为室温

图 3 不同流速对传感器响应的影响

Fig. 3 Effect of flow rate on the sensor response to ATCh

2.1.3 底物浓度

底物浓度也是影响乙酰胆碱酯酶传感器性能的一个重要因素. 因为底物和有机磷化合物都是首先结合于酶的活性位点, 而后才能受到酶的催化水解或者抑制酶的活性^[18]. 底物浓度对固定化酶活性的影响见图 4. 可见, 酶活性随着底物浓度的增加而上升, 表现出浓度依赖性, 但当在底物浓度超过 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 酶活性变化趋于平缓. Shi 等认为^[19], 测定酶抑制作用的最佳底物浓度应是传感器响应最大时的浓度. Andres 等提出, 为了提高酶活性检测抑制剂的精确性, 所用底物浓度应处于固定化酶的饱和浓度范围之内^[9]. 因此, 本研究选取底物浓度为 $86.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$.



流速为 $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 载液为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH7.5, 含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2), 温度为室温

图 4 不同底物浓度对传感器响应的影响

Fig. 4 Effect of substrate concentration on the sensor response to ATCh

2.2 传感器的重现性

传感器对底物响应的重现性是衡量传感器能否应用于有机磷农药检测的重要指标. 因为整个检测过程都是源于固定化酶在农药抑制前、后的活性比较. 只有在良好稳定性的前提下, 传感器响应值的变化才能被认为是抑制剂自身对酶活抑制的结果. 本研究连续 10 次测定了酶传感器对底物的响应峰值 (图 5), 获得良好的重现性 ($RSD = 1.427\%$, $n = 10$). 实验同时发现, 随着时间的延长, 传感器的基线产生一定的漂移 (图 5、图 6), 可能与所用流动注射系统的管路尤其是测定池的形状、容积有关, 也可能与固定化酶在酶柱中分布不均、酶柱和测定池内存在气泡以及底物冲洗不完全有关.

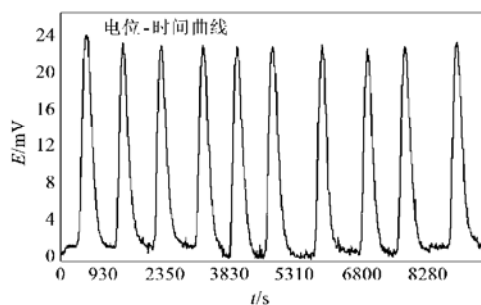


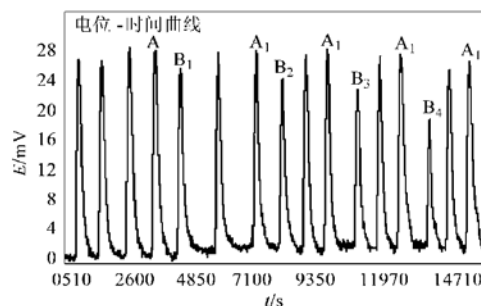
图 5 酶传感器对多次注射底物使用液的响应

Fig. 5 Responses of the biosensor to repeated injection of ATCh

2.3 酶传感器对有机磷农药的敏感性

AChE 之所以可以作为酶传感器的识别元件, 主要是因为它对有机磷农药具有良好的敏感性以及一定范围内的有机磷农药浓度和酶活的抑制程度之间呈良好的线性关系^[10]. 图 6 为本研究所设计的酶传感器对不同浓度甲基对硫磷所产生的响应曲线. 可见, 甲基对硫磷农药对固定化 AChE 具有剂量-效应关系, 随着浓度的增加抑制作用增强, 在浓度为 $4.29 \times 10^{-10} \sim 4.29 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间具有很好的线性关系 ($r = 0.9986$). 以抑制率为 5% 时的农药浓度为其最低检测限, 则该生物传感器对甲基对硫磷的检测限为 $1.3 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (或 $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 低于 Tran Minh 等人^[6]的实验结果 (检测限为 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 表明本研究所设计的酶传感器对甲基对硫磷具有良好的敏感性. 应该指出, 本研究所用的 AChE 是通过比较 10 种海水真骨鱼的脑组织 AChE 对甲基对硫磷的敏感性而筛选得到的, 因而具有较高的敏感性^[20]. 此外, 由图 6 还可见, 高浓度底物对受低浓度农药抑制的固定化酶具有复活作用, 然而, 随着农药浓度的增加, 这种复活

作用有所减弱.



A 为起始酶活; A₁ 为复活后酶活; B₁, B₂, B₃, B₄ 分别为 4.29×10^{-10} , 4.29×10^{-9} , 4.29×10^{-8} , $4.29 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基对硫磷抑制 20min 后的酶活

图 6 酶传感器对不同浓度甲基对硫磷的响应

Fig. 6 Response of the biosensor at different concentration of methyl parathion

2.4 传感器的可重复使用性

传感器的可重复使用性也是传感器性能的一个重要指标. 要实现传感器固定化酶的重复使用, 就必须尽可能恢复受有机磷农药抑制后的酶活. 在有关 AChE 传感器的报道中, 多采用 1 种肟类药物 (pyridine 2-aldoxime methiodide, 2-PAM)^[9,21,22] 作为复能剂. 一般认为, 2-PAM 主要是通过对磷酸化酶的亲电性 P 原子进行亲核攻击, 将酶置换出来, 从而使酶活得以恢复^[23]. 另外, 也有学者指出, 磷酸盐缓冲液和高浓度底物同样具有复活作用^[24]. 这已经在本研究中得到证实: 当用 PBS 溶液冲洗酶柱超过 30 min 时, 固定化酶能够完全复活; 而 60 μL 碘化硫代乙酰胆碱溶液 ($345.80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 在不足 15min 内即可获得良好的复活效果. 这表明, 在测定低浓度有机磷农药时, 肟类药物并非唯一可用的复能剂, 直接用 PBS 缓冲液冲洗流动系统或注入高浓度底物溶液也能收到良好的复能效果. 研究还发现, 随着有机磷农药浓度的增加, PBS 和高浓度底物溶液对酶的复能效果变差 (图 6). 因此, 固定化酶受到高浓度有机磷农药抑制后的复能技术尚有待进一步研究.

2.5 传感器的稳定性

对本研究所设计的酶传感器的稳定性进行考察. 定期对传感器固定化酶进行测试, 不用时将固定化酶柱在常温下浸泡于 PBS 溶液中保存. 在 1 个月后, 固定化酶的酶活性约有 12% 的损失, 但仍能满足样品分析精度的要求. 表明该传感器具有良好的稳定性, 使用寿命在 1 个月以上.

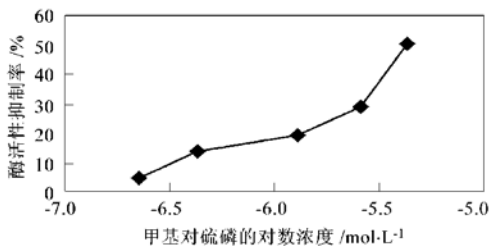
2.6 传感器对含有机磷农药的海水样品的响应

为将该种传感器应用于海洋环境检测,因此直接以清洁海水(取自青岛市鲁迅公园附近海域, pH 7.5~ 8.0, 盐度 31.2, 用一定量活性炭吸附 8 h 以去除海水中有机磷农药和其它污染物, 并经孔径为 0.22μm 的硝酸纤维素膜过滤)为载液, 2-PAM 溶液(2-PAM, 购自 Sigma 公司, 用清洁海水配成 2-PAM 溶液)为复活剂, 进一步研究了酶传感器在海水条件下的各种工作参数, 结果见表 1. 然后将本研究所设计的酶传感器实际应用于含有机磷农药的海水样品的测定. 结果发现酶传感器对海水中 $4.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下浓度的甲基对硫磷没有响应(与对照海水无差异), $4.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基对硫磷对

固定化酶的抑制率仅为 8.2%. 表明该传感器离直接测定海水中甲基对硫磷尚有一段距离. 采用氧化剂(NaClO 溶液)对海水样品中的有机磷农药进行预氧化后, 再用该传感器对海水样品进行测定, 结果见图 7. 可见, 随着海水中甲基对硫磷浓度的增加, 固定化酶受到的抑制作用增强, 表现出明显的剂量-效应关系. 如果以抑制率为 5% 时的农药浓度作为检测限, 则该传感器对预氧化后海水中甲基对硫磷的检测限可达到 $2.16 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 表明对海水进行预氧化可增强酶传感器对海水中有机磷农药的响应. 但是, 这一数值与该传感器在磷酸盐缓冲液条件下测得的检测限仍相差较大, 其原因有待深入研究, 推测和其不同的分析体系有关.

表 1 酶传感器在海水条件下的工作参数
Table 1 Working parameters of the biosensor in seawater

工作载液	pH	盐度	温度/℃	流速/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	底物浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	注射剂量/ μL
清洁海水	7~ 9	24.9~ 33.2	30	0.39	41.6	40



载液为清洁海水; 流速为 0.39 mL/min; 底物为 ATCh: $41.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 40 μL ; 温度 30℃; 复活剂为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2-PAM 溶液, 6mL

图 7 酶传感器对预氧化后海水中不同浓度甲基对硫磷的响应

Fig. 7 Response of the biosensor after exposure to pre-oxidized methyl parathion in seawater

3 结论

研究了基于流动注射系统的 AChE 传感器在检测水体有机磷农药方面的可行性, 该传感器在以磷酸盐缓冲液为载液条件下具有良好的重现性(RSD = 1.427%, $n = 10$) 和敏感性, 对甲基对硫磷的线性响应浓度范围为 $4.29 \times 10^{-10} \sim 4.29 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最低检测限为 $1.3 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 同时该传感器还具有良好的稳定性, 使用寿命长达 1 个月以上. 在以清洁海水为载液条件下, 该传感器对海水中甲基对硫磷的敏感性较差, $4.33 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基对硫磷对固定化酶的抑制率仅为 8.2%. 对海水中甲基对硫磷进行预氧化后, 传感器对甲基对硫磷的最低检测限可达到 2.16×10^{-7}

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 表明预氧化可增强酶传感器对海水中有机磷农药的响应.

参考文献:

[1] Neufeld T, Eshkenazi I, Cohen E, *et al.* A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides[J]. *Biosensor & Bioelectronics*, 2000, **15**: 323~ 329.

[2] Lacorte S, Barcelo D. Rapid degradation of fenitrothion in estuarine water[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**: 1159~ 1163.

[3] Kang J J, Fang H W. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel[J]. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1997, **238**: 367~ 369.

[4] Stein M, Bilitewski U. Electrochemical detection of affcan swine fever virus in pig serum with a competitive separation analysisimmunoassay[J]. *Analyst.*, 1997, **122**: 155~ 159.

[5] Satish K, Masatoshi M. Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extraction from soil[J]. *Talanta.*, 1995, **42**(4): 649~ 655.

[6] Trarr Minh C, Pandey P C, Satish K. Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1990, **5**: 461~ 471.

[7] 余孝颖, 雷晟, 陈贵春. 胆碱酯酶场效应管传感器[J]. *分析化学*, 1996, **24**(5): 521~ 524.

[8] Kumaran S, Trarr Minh C. Insecticide determination with enzyme electrodes using different enzyme immobilization techniques[J]. *Electroanalysis*, 1992, **4**: 949.

[9] Andres R T, Narayanaswamy R. Fibre optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue[J]. *Talanta.*, 1997, **44**: 1335~ 1352.

- [10] Morgan M J, Fancey L L, Kiceniuk J W. Response and Recovery of Brain Acetylcholinesterase Activity in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Exposed to Fenitrothion[J]. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 1990, **47**: 1652~ 1654.
- [11] Gorton L, Csörgéi E, Dominguez E, *et al.* Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes[J]. *Anal. Chim. Acta.*, 1991, **250**: 203~ 248.
- [12] 宋正华, 章竹君, 范文哲. 乙酰胆碱和胆碱化学发光生物传感器的研究[J]. *化学学报*, 1998, **56**: 1207~ 1213.
- [13] TrairMinh C. Biosensor for the analysis of pesticide residues [J]. *Analytical Proceedings*, 1993, **30**: 73~ 74.
- [14] Xavier M P, Vallejo B, Marazuela M D, *et al.* Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, **14**: 895~ 905.
- [15] Mulchandani P, Mulchandani A, Kaneva I, *et al.* Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, **14**: 77~ 85.
- [16] LeónGonzález M E, Townshend A. Determination of organophosphorus and carbamate pesticide standards by liquid chromatography with detection by inhibition of immobilized acetylcholinesterase[J]. *J. Chromatogr.*, 1991, **539**: 47~ 54.
- [17] Pogacnik L, Franko M. Optimisation of FIA system for detection of organophosphorus and carbamate pesticides based on cholinesterase inhibition[J]. *Talanta.*, 2001, **54**: 631~ 641.
- [18] Wilkinson C F. *Insecticide Biochemistry and Physiology*[M]. London: Heyden, 1976.
- [19] Shi R, Stein K. Flow injection analysis of paraoxon with the use of an immobilized acetylcholinesterase reactor[J]. *Anal. Chim. Acta.*, 1996, **324**: 21~ 27.
- [20] 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.
- [21] Eto M. *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*[M]. Ohio: CRC press, Cleveland, 1974.
- [22] Eanty G, Marty J L. Detection of paraoxon by continuous flow system based enzyme sensor[J]. *Biosensor & Bioelectronics*, 1998, **13**(2): 213~ 218.
- [23] 罗春元. 胆碱酯酶结构与功能及磷酸化酶重活化机理[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, **23**(4): 329~ 333.
- [24] Ghous T, Townshend A. Flow injection determination of metrifonate by immobilized acetylcholinesterase inhibition[J]. *Analytica. Chimica. Acta.*, 1996, **332**: 179~ 185.