

# 分离纯化提高鸡肝酯酶对农药抑制响应的研究

于晓航, 朱念辛, 徐斐, 曹慧, 于劲松, 袁敏

(上海理工大学食品质量与安全研究所, 上海 200093)

**摘要:** 本文对鸡肝酯酶粗酶液分别进行了硫酸铵分级盐析、硫酸铵分级盐析+透析和硫酸铵分级盐析+排阻色谱三种分离纯化操作, 并采用四种结构不同的有机磷、氨基甲酸酯类农药, 考察了不同的分离纯化操作对鸡肝酯酶对农药抑制响应的影响。发现经过这三种分离操作后, 酯酶对农药抑制的响应程度显著提高, 其被四种农药抑制的程度分别提高了 6.49~11.30%、14.30~26.26% 和 10.95~39.87%, 而敏感酯酶回收率分别为 86.07~89.96%、66.60~73.57% 和 33.01~41.62%。由于分级盐析+排阻色谱的回收率过低, 分级盐析+透析操作对于大规模的检测用酶制备更为实用。此外, 研究还发现对这四种农药较敏感的酯酶均集中地分布在相同的分离部分, 因此推测鸡肝酯酶粗酶液中对农药抑制敏感的酯酶可能是一种酶或几种溶解性质及分子量都比较接近的酶的混合。

**关键词:** 鸡肝酯酶; 硫酸铵分级盐析; 透析; 排阻色谱; 农药抑制响应

文章编号: 1673-9078(2015)6-230-235

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.036

## Improving Pesticide Inhibition of Chicken Liver Esterase via Enzyme Purification

YU Xiao-hang, ZHU Nian-xin, XU Fei, CAO Hui, YU Jin-song, YUAN Min

(Food Quality and Safety Institute of University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** Chicken liver esterase was purified using three different methods: including fractional ammonium sulfate precipitation, fractional ammonium sulfate precipitation + dialysis, and fractional ammonium sulfate precipitation + exclusion chromatography. Four types of organophosphate with different structures and carbamate pesticides were used to detect the effects of these purification methods on the sensitivity of purified chicken liver esterase to pesticide inhibition. The results showed that the sensitivity of the esterase to pesticide increased significantly after purification. Compared with crude esterase, pesticide inhibition rates of purified esterase increased by 6.49%~11.30% with fractional ammonium sulfate precipitation, 14.30%~26.26% with fractional ammonium sulfate precipitation + dialysis, and 10.95%~39.87% with fractional ammonium sulfate precipitation + exclusion chromatography. The recovery rates of sensitive esterase were 86.07%~89.96%, 66.60%~73.57%, and 33.01%~41.62%, respectively. Due to the low recovery of sensitive esterase obtained by fractional ammonium sulfate precipitation + exclusion chromatography, fractional ammonium sulfate precipitation + dialysis is preferable for the large-scale preparation of enzymes. In addition, the esterase sensitive to the four different types of pesticides was always in the same fraction, regardless of the purification method. Thus, the sensitive esterase might be one or several kinds of esterases with similar solubility and molecular weight.

**Key words:** chicken liver esterase; fractional ammonium sulfate precipitation; dialysis; exclusion chromatography; sensitivity to pesticides inhibition

目前, 有机磷及氨基甲酸酯类农药的快速检测方法大多通过酶抑制法来实现, 所使用的检测酶主要为商品胆碱酯酶制剂, 如 sigma 公司的乙酰胆碱酯酶等, 其纯度可达 98%, 在检测时结果较为准确, 检测限也相对更低<sup>[1-2]</sup>。可是这些酶价格昂贵, 考虑到大规模检测用酶的成本, 有文献从动植物体内提取粗酶液, 采

收稿日期: 2014-09-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101283)

作者简介: 于晓航 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与检测  
通讯作者: 徐斐 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向为食品安全快速检测技术

用总酯酶活力测定方法或胆碱酯酶活力测定方法来探索其对农药抑制的响应<sup>[3-6]</sup>。但研究中发现, 粗酶液可能含有对农药抑制响应敏感的多种酶, 如乙酰胆碱酯酶、丁酰胆碱酯酶及一些非胆碱酯酶的 B 酯酶等, 这些非胆碱酯酶的 B 酯酶有可能成为胆碱酯酶的替代靶标, 起到保护胆碱酯酶的作用<sup>[7]</sup>。此时宜采用总酯酶活力测定方法, 因为胆碱酯酶活力测定方法不能真实地反映出所有敏感酯酶被抑制的情况。但当粗酶液中含有不能被农药抑制的酯酶时, 前者会使检测敏感性降低。除此之外, 粗酶液中可能还含有解毒酶, 能够催化农药水解<sup>[8]</sup>, 此时不论采用哪种酯酶活力测定方

法来衡量农药的浓度,都会严重低估其残留水平。因此,有必要对粗酶液进行一定的分离纯化以提高其对农药抑制的响应。

基于以上原因,许多学者对动植物中提取的粗酶液进行了纯化研究。谢显传等人采用 PEG2000 双水相萃取、DEAE-Sephadex A-50 和 Sephadex G-200 分离纯化麦穗鱼脑中的乙酰胆碱酯酶, S J Mousavy 等人用亲和层析色谱法从马血浆中分离出丁酰胆碱酯酶<sup>[3,9]</sup>,均发现随着纯化倍数近百倍提高,酶制剂对氧化三唑磷、氧化马拉硫磷等农药的抑制敏感性也提高了几十至几百倍。但繁琐的步骤造成目标酯酶过多损失,回收率往往只能达到 10%~20%。同时,亲和色谱的高成本也不能满足大批量检测用酶的需求。本课题组在长期研究中发现,从来源较为广泛的鸡肝中提取的粗酶液,对某些农药抑制的敏感性与乙酰胆碱酯酶商品酶制剂相近<sup>[10]</sup>。因此本文拟以鸡肝酯酶粗酶液为研究对象,应用较简单的硫酸铵分级盐析、透析及排阻色谱等方法对其进行分离,采用四种结构不同的有机磷、氨基甲酸酯类农药,考察分离纯化操作对鸡肝酯酶对农药抑制响应的影响,试图在提高其对农药抑制敏感性的同时获得较高的回收率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

鸡肝,购自上海大江食品公司;三唑磷、敌百虫、克百威、灭多威均为  $1000 \times 10^{-6}$  mg/L,购自上海农药研究所;预染蛋白分子量标准 P0066,聚丙烯酰胺,TEMED 等电泳所用试剂购自碧云天生物技术研究;Sephadex G-75 凝胶,购自 GE 公司;透析袋(分子量 8000~14000)、0.45  $\mu$ m 滤膜及乙酸-1-萘酯、SDS 等其它检测试剂均为国产分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司。

JYL-C012 料理机,九阳公司;LD85 冻干机, MILLROCK TECHNOLOGY 公司;层析系统装置(含紫外检测仪),上海沪西分析仪器厂有限公司;Avanti J-20XP 离心机, BECKMAN COULTER 公司;往复水浴恒温振荡器,金坛市科技仪器有限公司;722S 可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;伯乐小垂直电泳槽, Bio-Rad 公司。

### 1.2 鸡肝酯酶的分离纯化

#### 1.2.1 硫酸铵分级盐析

将鸡肝用中性缓冲液打浆,低温离心后取上清液为粗酶液。取一定量粗酶液,冰水浴中加硫酸铵至一

定饱和度(30%、40%、50%、60%、70%、80%),静置,低温离心得到上清及沉淀。分别测试农药对上清和沉淀的抑制率以表征酯酶对农药抑制的响应程度,同时测量敏感酶的回收率。综合以上两项指标,选择一个较低饱和度和一个较高饱和度进行分级盐析,最终收集沉淀以备进一步分离。

#### 1.2.2 透析

将分级盐析后沉淀溶解在 4  $^{\circ}$ C 缓冲液中透析 6 h,全程磁力搅拌,若出现沉淀,则将其低温离心,取上清酶液以备进一步分析。

#### 1.2.3 排阻色谱

将 Sephadex G-75 装填入 D 15 mm $\times$ 100 cm 的玻璃柱中,用缓冲液平衡两个柱体积。将分级盐析沉淀冻干后,取冻干粉 45 mg 溶解在 1.5 mL 缓冲液后透过 0.45  $\mu$ m 滤膜。取 1 mL 滤液上样,洗脱速度为 0.4 mL/min,每 10 min 收集一管。每管检测其蛋白浓度及农药抑制率,将对农药抑制敏感的蛋白峰收集以备进一步分析。

#### 1.2.4 SDS-PAGE 电泳

浓缩胶和分离胶的浓度分别为 10% 和 5%。将分级盐析沉淀、透析后上清及排阻色谱收集的农药抑制敏感样分别与上样缓冲液混合后沸水浴 5 min,冷却后点样。浓缩胶电压 80 V,分离胶电压 120 V,取下胶后进行考马斯亮蓝 R250 染色及脱色。

#### 1.2.5 总酯酶活力的测定方法

根据 K Van Asperen 所述方法改进<sup>[11]</sup>,在试管中依次加入 2 mL 测试缓冲,0.5 mL 适当稀释的酶液及 50  $\mu$ L 底物(100 mmol/L 的乙酸-1-萘酯丙酮溶液),30  $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min,加入 0.5 mL 显色剂(0.8% 固兰 B 的 3.6% SDS)仍于 30  $^{\circ}$ C 水浴反应 5 min,于 595 nm 处读取吸光度。以加入显色液之后补加 0.5 mL 酶液的样液为空白。1U 定义为每分钟能水解  $10^{-6}$  mol 底物的酶量,根据式(1-1)计算初始总酯酶活力

$$E_L = D \times \frac{K \times A}{5 \times 0.5} \quad (1-1)$$

注:  $E_L$  为总酯酶活力(U/mL),D 为酶液的稀释倍数,K 为对应 pH 条件下  $\alpha$ -萘酚标准曲线的斜率( $10^{-6}$ mol/OD),A 为反应液在 595 nm 处的吸光度(已扣去空白的 OD)。

#### 1.2.6 敏感酶活力及抑制率的测定方法

将农药用缓冲液稀释至一定浓度,用 2 mL 农药稀释液( $5 \times 10^{-6}$  mg/L 三唑磷或敌百虫、 $2 \times 10^{-6}$  mg/L 克百威或灭多威)代替 1.2.5 中 2 mL 的测试缓冲,后面步骤与 1.2.5 中相同,测试后 OD 代入公式(1-1)得出农药抑制后酶液残存的总酯酶活力  $E_L'$ 。根据式(1-2)计算对农药敏感的酯酶活力  $E_S$ ,并根据式(1-3)

计算农药对酶的抑制率 I。

$$E_s = E_L - E'_{L(1-2)} \quad (1-2)$$

$$I = \frac{E_s}{E_L} \times 100\% \quad (1-3)$$

### 1.2.7 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度及纯化倍数与敏感酶回收率的计算

采用考马斯亮蓝法对不同分离操作后的样品进行蛋白浓度测定<sup>[12]</sup>，以牛血清白蛋白为标准绘制不同浓度蛋白标准曲线如图 1。将不同分离操作后样品采用考马斯亮蓝法测定得到的 OD 值带入标准曲线算得蛋白浓度 C (mg/mL)。

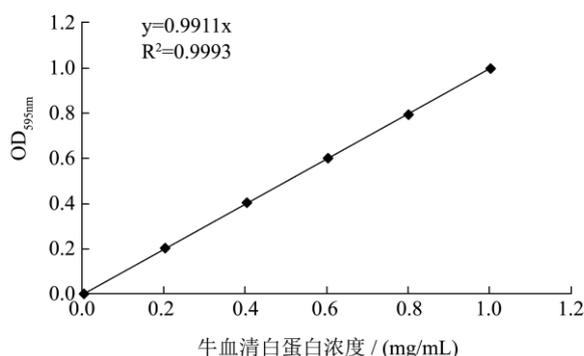


图 1 牛血清白蛋白标准曲线

Fig.1 The calibration curve of bovine albumin

同时采用 1.2.6 中方法获得纯化前后的敏感酶活力  $E_{Sx}$  和  $E_{Sy}$ ，采用 1.2.7 中方法获得纯化前后蛋白浓度  $C_x$  和  $C_y$ 。根据公式 (1-4) 和 (1-5) 分别计算不同步骤的纯化倍数 N 和敏感酶回收率 R。

$$N = \frac{E_{Sx}/C_x}{E_{Sy}/C_y} \times 100\% \quad (1-4)$$

$$R = \frac{E_{Sx}}{E_{Sy}} \times 100\% \quad (1-5)$$

### 1.2.8 数据分析

文中所有数据均为三组平行的测定结果，由（平均值±标准偏差）表示。同时采用软件 SPSS 进行 Duncan 检验，以确定不同分离操作引起抑制响应差异的显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 硫酸铵分级盐析饱和度的选择

根据酯酶对有机磷化合物的行为可将其分为三大类：A 酯酶可以水解有机磷酸酯，B 酯酶可以被有机磷酸酯所抑制，而 C 酯酶既不被磷酸酯所抑制，也不会降解磷酸酯<sup>[13]</sup>。因此若在分离过程中去除 A 酯酶及 C 酯酶，即可以提高总酯酶对农药抑制响应的敏感

程度。

对鸡肝酯酶粗酶液进行硫酸铵盐析，采用总酯酶活力测定方法测定了四种农药对粗酶液及不同饱和度上清和沉淀中酯酶的抑制率，得到图 2。可以看出，随着硫酸铵饱和度的升高，上清中酯酶对农药抑制响应的敏感性整体上逐渐减弱，与粗酶液相比，只有饱和度 30% 的上清对农药抑制响应略有升高，这表明在该饱和度下可能已有少量 A 酯酶或 C 酯酶沉淀下来；而沉淀中酯酶对农药的抑制响应随饱和度升高变化不大，只是在波动中略有提高，其中饱和度 30% 的沉淀抑制响应最低，饱和度 50% 的沉淀抑制响应最高，饱和度 70% 的沉淀抑制响应其次，这表明 50% 饱和度时，敏感酯酶和非敏感酯酶的分离效果最佳，70% 饱和度其次。图 3 为不同饱和度硫酸铵盐析后，对四种农药抑制敏感的酯酶在各自上清和沉淀中的回收率。可以看出，随着饱和度的升高，敏感酶回收率在上清中逐渐降低，在沉淀中逐渐升高，其中 30% 饱和度上清及 70% 饱和度沉淀中敏感酯酶的回收率最高，而饱和度 50% 的沉淀中敏感酯酶回收率不高。因此对粗酶液选择饱和度 30% 和 70% 进行分级盐析，期望抑制率可以进一步提高。

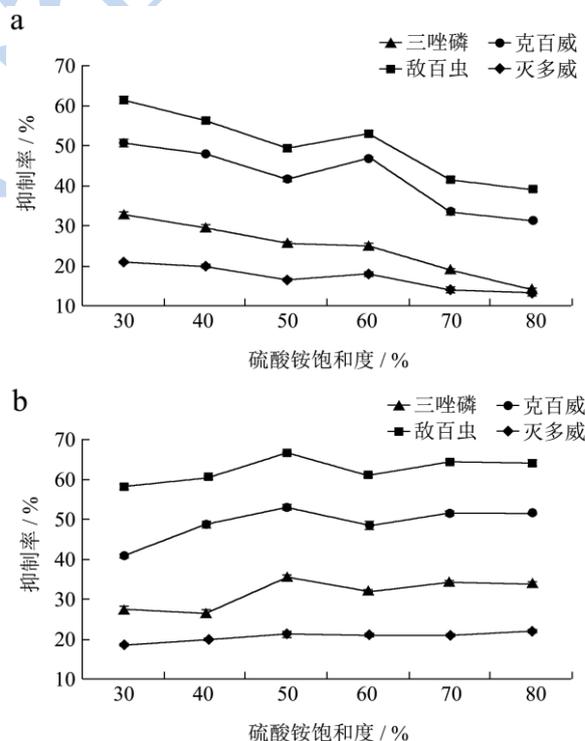


图 2 上清和沉淀中的酯酶对农药抑制的响应

Fig.2 Pesticide inhibition of esterase in the supernatant and precipitate

注：农药对粗酶液的抑制率分别为，三唑磷  $31.49 \pm 0.49\%$ ，敌百虫  $60.50 \pm 0.71\%$ ，克百威  $49.26 \pm 0.74\%$  和 灭多威  $20.17 \pm 0.71\%$ 。

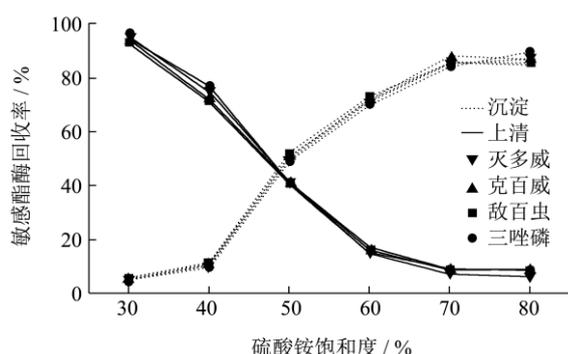


图3 不同硫酸铵饱和度盐析中四种农药抑制敏感酶活的回收率

Fig.3 Recovery of sensitive esterase activity in the supernatant and precipitate at different saturation levels of ammonium sulfate precipitation

## 2.2 鸡肝酯酶粗酶液经不同分离操作后的分离效果

对鸡肝酯酶粗酶液进行饱和度 30%和 70%的分级盐析, 获得沉淀分别进行透析及排阻色谱分离。发现复溶后的盐析沉淀会在透析过程中再次出现沉淀, 此现象可能是透析过程中某些等电点非常接近透析液 pH 的蛋白析出造成的。透析结束后将袋内样品低温离心, 分别检测上清与沉淀中的酯酶活力时发现沉淀中几乎没有酯酶活力, 因此保留上清做进一步分析。

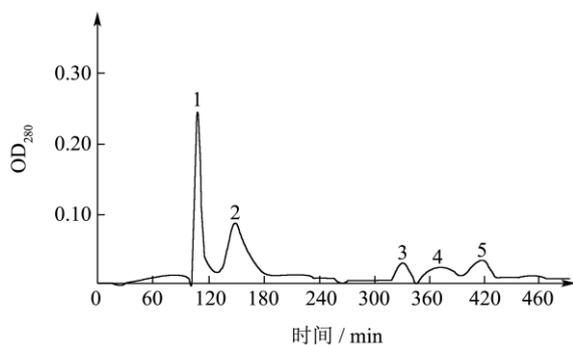


图4 Sephadex G-75 层析洗脱曲线

Fig.4 Elution profile of Sephadex G-75 exclusion chromatography

图4为复溶后分级盐析沉淀经过凝胶排阻色谱的洗脱曲线, 可以发现洗脱过程中依次出现了五个蛋白峰。通过测定发现只有 1、2 峰中具有酯酶活力, 分别为 45.85 U 和 144.02 U, 说明第 3、4、5 峰为非酯酶的蛋白峰。通过对农药抑制响应测试, 发现敏感酯酶几乎都集中在第 2 个峰中, 说明第 1 个峰含 A 酯酶或 C 酯酶。因此收集第 2 个峰做进一步分析。

将这三种分离纯化操作后的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 比较不同分离操作后蛋白质分子量分布情况,

得到图 5, 可以看出, 透析后弃掉沉淀的确去除了一些杂蛋白, 其电泳图较分级盐析更清晰, 而在排阻色谱后获得的蛋白质分子量主要在 49 ku~90 ku, 与 D Bütcher 对猪肝酯酶的研究结果类似, 其对猪肝酯酶进行分离后的样品也采用总酯酶的测定方法来进行检测, 发现猪肝中对农药抑制敏感的酯酶分子量为 63 ku 及 58 ku 两种, 与图 5 第 4 泳道中颜色较深条带分子量接近<sup>[14]</sup>。

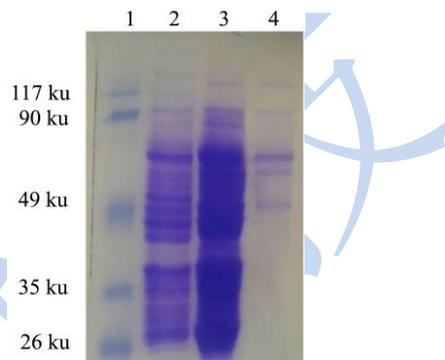


图5 不同纯化操作后鸡肝酯酶电泳图

Fig.5 Electrophoresis of chicken liver esterase by different purification methods

注: 1: 蛋白分子量标准 2: 分级盐析+透析 3: 分级盐析 4: 分级盐析+排阻色谱。

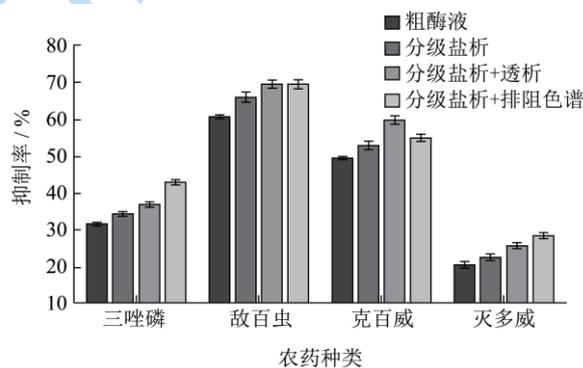


图6 不同分离操作后酶液的抑制率

Fig.6 Inhibition rates of chicken liver esterase by different purification methods

同时, 对三种分离操作的样品进行了抑制率分析, 如图 6 所示。可以看出, 不同操作后获得的样品对其抑制响应的高低排序整体呈现为粗酶液<分级盐析<分级盐析+透析<分级盐析+排阻色谱的趋势。其中, 与粗酶液相比, 分级盐析将农药的抑制率提高了 6.49~11.30%, 分级盐析+透析提高了 14.30~26.26%, 而分级盐析+排阻色谱提高了 10.95~39.87%。通过显著性分析, 发现除了分级盐析+透析操作和分级盐析+排阻色谱操作之间对敌百虫的抑制响应结果差异不显著以外, 其余两两操作之间抑制响应差异都是显著的。在分级盐析后, 由于去除了部分对农药抑制不敏感的

酯酶, 其对农药抑制的敏感性得到提高。在排阻色谱中, 第 1 峰中有少量对农药抑制响应不敏感的 A 或 C 酯酶进一步被去除, 而透析操作去除的沉淀中几乎没有酯酶的, 因此排阻色谱后保留的酯酶对农药抑制响应最高。同时, 在这两种操作中被除掉的杂蛋白都存在非酯酶, 可以推测去除的非酯酶对敏感酯酶可能具有一定的保护作用, 造成较为裸露的敏感酯酶对农药抑制的响应更加敏感。

此外, 本文还将粗酶液经过这三种纯化操作后的结果进行了比较, 如表 1 所示。敏感酶纯化倍数的高低排序为: 分级盐析+排阻色谱>分级盐析+透析>分级盐析, 而敏感酶的回收率排序恰好相反。可以看出, 对四种农药敏感的酯酶在透析操作及排阻色谱操作后的纯化倍数都较单纯的分级盐析有显著提高, 但回收率却有所下降, 尤其是排阻色谱。这可能不仅有分离损失的原因, 还可能与酶纯度升高使得酶稳定性变差以及操作时间延长造成酯酶失活等相关。综合来看, 除了分级盐析, 其他分离纯化操作后的酯酶对农药抑制响应的提高程度均明显低于敏感酯酶纯化倍数的提高, 说明纯化过程中去除的大部分为非酯酶。但相对来说, 分级盐析+透析的方法仍在保留了较高回收率的同时, 使农药对其的抑制敏感性有较大提高, 因此在大规模检测用酶制备上选择此方法最为实用。

从本文选择的四类结构不同的农药抑制情况来看, 虽然三唑磷和敌百虫分别属于硫(酮)代磷酸酯和磷酸酯两大类, 克百威与灭多威分别代表 N-甲基甲酸芳基酯和 N-甲基甲酸酯两大类, 然而在三种分离操作中, 对这四种不同结构农药抑制敏感的酯酶存在的分离分部都相同, 也可以推测出在鸡肝粗酶液中对有机磷及氨基甲酸酯类农药敏感的酯酶可能是一种酶或几种溶解性及分子量都很相近的酶的混合。

表 1 鸡肝酯酶中对农药抑制敏感酶的分离纯化结果比较

Table 1 Results of purified sensitive esterase by different separation

		methods			
		粗酶液	分步盐析	分级盐析+透析	分级盐析+排阻色谱
三唑磷	回收率/%	100	88.06	67.85	40.36
	纯化倍数	1	1.46	4.79	23.95
敌百虫	回收率/%	100	87.36	66.6	34.05
	纯化倍数	1	1.45	4.7	20.21
克百威	回收率/%	100	86.07	70.39	33.01
	纯化倍数	1	1.43	4.96	19.59
灭多威	回收率/%	100	89.96	73.57	41.62
	纯化倍数	1	1.49	5.19	24.7

### 3 结论

粗酶液经过分级盐析, 分级盐析+透析及分级盐析+排阻色谱三种分离操作后, 对农药的抑制响应敏感性都显著提高, 且敏感酯酶均分布在相同的分离部分。通过数据分析, 得出以下三种推测: 一、鸡肝酯酶中对有机磷及氨基甲酸酯类农药抑制较敏感的酯酶可能是一种酯酶或溶解度及分子量都比较接近的几类酯酶, 其分子量范围大概在 49 kDa~90 kDa 之间; 二、鸡肝酯酶中影响总酯酶对农药抑制响应的 A 酯酶或 C 酯酶含量较少, 大概在硫酸铵饱和度 30% 附近发生盐析; 三、由于 A 酯酶与 C 酯酶含量可能较少, 即使全部被去除, 也很难大幅提高鸡肝酯酶对农药抑制的响应程度。本文对鸡肝酯酶粗酶液进行纯化的目的是将纯化后的样品用于大规模的农药检测, 过低的回收率并不可取, 因此分级盐析后透析的办法更加实用且简便。

### 参考文献

- [1] SUN Xia, WANG Xiang-you. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(12): 2611-2614
- [2] 张淑平, 经媛元, 单联刚. 氨基甲酸酯类农药的快速检测[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 229-232  
ZHANG Shu-ping, JING Yuan-yuan, SHAN Lian-gang. The rapid analysis of carbamate residual [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(2): 229-232
- [3] S Mousavy, A Miremadi, F Ebrahimi et al. Extraction, purification and kinetics study of butyrylcholinesterase from equine plasma [C]. In: 1st Tabriz International Life Science Conference and 12th Iran Biophysical Chemistry Conference [C]. Iran: Tabriz University of Medical Sciences, 2013
- [4] 张爱琳, 樊秀花, 郑敏. 鸡血清胆碱酯酶的提取纯化工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(5): 30-33  
ZHANG Ai-lin, FAN Xiu-hua, ZHENG Min. Study on the extraction and purification of cholinesterase from chicken-serum [J]. Food Research and Development, 2011, 32(5): 30-33
- [5] 朱鸿, 李想韵, 邓玉, 等. 鸭肝丁酰胆碱酯酶的纯化与酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2011, 1: 95-99  
ZHU Hong, LI Xiang-yun, DENG Yu, et al. Purification and characterization of the butyrylcholinesterase from duck liver [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 1: 95-99

- [6] 李维,何绍志,张全,等.鸡血清丁酰胆碱酯酶与马血清丁酰胆碱酯酶对农药的敏感性的对比研究[J].现代食品科技,2014,30(5):69-74  
LI Wei, HE Shao-zhi, ZHANG Quan, et al. Comparative study of the pesticide sensitivity of butyrylcholinesterases from chicken serum and horse serum [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 69-74
- [7] G Chuiko. 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. comparative biochemistry and physiology part c: pharmacology [J]. Toxicology and Endocrinology, 2000, 127(3): 233-242
- [8] C M Conyers, A D MacNicoll, N R Price. Purification and characterisation of an esterase involved in resistance to organophosphorus insecticides in the saw-toothed grain beetle [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28(7): 435-448
- [9] 谢显传,李少南.麦穗鱼脑乙酰胆碱酯酶(AChE)的纯化及其比较性研究[J].农药学报,2003,5(1):45-50  
XIE Xian-chuan, LI Shao-nan. Purification and comparative studies [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2003, 5(1): 45-50
- [10] 张慧君,许学勤,徐斐,等.用于农药残留快速检测的两种酶的比较[J].分析化学,2004,11(32):1421-1425  
ZHANG Hui-jun, XU Xue-qin, XU Fei et al. Compare for rapid detection of pesticide residues in the two enzymes [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2004, 11(32): 1421-1425
- [11] K Van Asperen. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method [J]. Journal of Insect Physiology, 1962, 8(4): 401-416
- [12] Han Xiaoxia, Xie Yunfei, Zhao Bing, et al. Highly sensitive protein concentration assay over a wide range via surface-enhanced Raman scattering of coomassie brilliant blue [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(11): 4325-4328
- [13] 唐除痴,李煜昶,陈彬,等.农药化学[M].天津:肖占鹏,1998,12  
TANG Chu-chi, LI Yu-chang, CHEN Bin, et al. Pesticide Chemistry [M]. Tianjin: XIAO Zhan-peng, 1998, 12
- [14] D Böttcher, E Brisehaber, K Doderer, U T Bornscheuer. Functional expression of the  $\gamma$ -isozyme of pig liver carboxyl esterase in *Escherichia coli* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6): 1282-1289