

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

李维¹, 何绍志¹, 张全², 杨潇¹, 饶瑜¹, 钱珊¹, 陈祥贵¹

(1. 西华大学生物工程学院, 食品生物技术四川省高校重点实验室, 四川成都 610039)

(2. 西华大学机械工程学院, 四川成都 610039)

摘要: 测定鸡血清丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase, BChE) 对农药的敏感性, 为农药残留快速检测提供新的敏感酶源。本文以马血清丁酰胆碱酯酶为对照, 以碘化硫代丁酰胆碱为底物, 采用 Ellman 法, 研究了鸡血清丁酰胆碱酯酶的酶学性质及其对有机磷和氨基甲酸酯类农药的敏感性, 计算相关半抑制浓度 (half-inhibitory concentration, IC_{50})。结果表明, 两种 BChE 在 35 °C、pH 8.0 时达到最佳的反应活性, 无底物抑制效应, 对毒扁豆碱敏感, 对盐酸多奈哌齐相对不敏感; 鸡血清 BChE 对敌百虫、克百威、灭多威、速灭威、敌敌畏的 IC_{50} 值分别为 0.77、31.99、1.14、5.49、0.95 $\mu\text{mol/L}$; 马血清 BChE 对这五种农药的 IC_{50} 值分别为 3.88、1.22、22.58、24.18、5.46 $\mu\text{mol/L}$ 。除克百威外, 鸡血清 BChE 对供试农药的敏感性均高于马血清 BChE。因此, 鸡血清 BChE 具有较好的农药敏感性, 可以作为农药残留快速检测的候选酶源。

关键词: 鸡血清; 丁酰胆碱酯酶; 农药; 敏感性

文章编号: 1673-9078(2014)5-69-74

Comparative Study of the Pesticide Sensitivity of Butyrylcholinesterases from Chicken Serum and Horse Serum

LI Wei¹, HE Shao-Zhi¹, ZHANG Quan², YANG Xiao¹, RAO Yu¹, QIAN Shan¹, CHEN Xiang-Gui¹

(School of Bioengineering, Xihua University, Key Laboratory of Food Biotechnology of Sichuan Provincial University, Chengdu 610039, China)

Abstract: The inhibition effect of butyrylcholinesterase (BChE) in the chicken serum to pesticide was investigated, and new sensitive enzyme source to the quick examination of pesticide were provided. Taking the horse serum BChE for comparison, enzymology properties of the chicken serum BChE and its sensitivity to pesticides were studied by the colorimetric method of Ellman's, and then the half inhibitory concentration value (IC_{50}) was calculated. The results showed that both BChE reached their best reactivity at 35 °C and pH 8.0, no substrate inhibition effect was observed, and both were sensitive to physostigmine but relatively insensitive to donepezil HCL. The IC_{50} value for trichlorfon, carbofuran, methomyl, metolcarb, dichlorvos to the chicken serum BChE were 0.77, 31.99, 1.14, 5.49, 0.95 $\mu\text{mol/L}$, respectively, while the IC_{50} value for those five pesticides to horse serum BChE were 3.88, 1.22, 22.58, 24.18, 5.46 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Thus, the chicken serum BChE has good sensitivity to pesticides and could be used as a candidate enzyme source for rapid detection of pesticide residues.

Key words: chicken serum; butyrylcholinesterase; pesticides; sensitivity

我国是一个农业大国, 农药使用十分广泛且管理困难, 农产品农药残留超标的情况时有发生, 迫切需要发展适合基层监测监管的农药残留快速检测手段^[1-2]。酶抑制法具有操作简便、快速、灵敏度高、无需昂贵的仪器设备等优点, 特别适合基层现场检测, 是

收稿日期: 2013-12-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271872); 四川省学术带头人培养基金; 教育部春晖计划项目 (12202524)

作者简介: 李维 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养与安全

通信作者: 陈祥贵 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全

目前农药残留快速检测常用的方法^[3]。酶抑制法的基本原理是: 在体外条件下, 胆碱酯酶催化水解的功能被有机磷或氨基甲酸酯类农药抑制, 其抑制率与农药的浓度存在良好的相关性。利用这一性质, 在酶反应实验时加入底物和显色剂观察测定颜色的变化, 进而判断有机磷及氨基甲酸酯类农药是否残留以及残留量的多少^[4-5]。

酶抑制法是国内外农药残留快速检测的主要方法之一, 检测用酶是影响酶抑制法灵敏性和准确性的关键因素, 但目前国内外上市的酶抑制法检测产品如传

感器、试纸条、快速检测仪等常用酶源基本上是来源于家蝇、电鳗等物种的乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AChE), 而其他酶源研究利用较少^[6-8]。来自生态毒理学领域的研究表明, 在某些物种中丁酰胆碱酯酶对农药的敏感性优于乙酰胆碱酯酶^[9], 但体外农药敏感性的研究报道不多, 且大多以马血清丁酰胆碱酯酶为酶源进行研究开发^[10]。尽管有作者报道了其他物种的丁酰胆碱酯酶的农药敏感性, 但并未与最常用的马血清丁酰胆碱酯酶的农药敏感性作对比研究^[11]。不同来源的检测用酶分子结构存在一定差异, 对农药的选择性和敏感性有较大差别, 因此在农药快速检测的应用价值也不同。本研究在前期比较多种动物血清丁酰胆碱酯酶农药敏感性的基础上, 发现鸡血清丁酰胆碱酯酶农药敏感性优于其它已报道的丁酰胆碱酯酶。

因此, 本文采用鸡血清 BChE 作为实验酶源, 以马血清 BChE 作为对照酶源, 同时测定并比较两种 BChE 对同种农药的敏感性, 为鸡血清 BChE 进一步研究和应用提供实验支撑, 为评价其作为酶抑制法检测用酶的候选酶源提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡血清自制 (新鲜鸡血, 冷冻离心收集血清); 马血清 BChE (CAS 9001-08-5, 500U) 购自 Sigma 公司。

农药标准品: 敌百虫 (纯度 $\geq 99.1\%$)、克百威 (纯度 $\geq 98.3\%$)、灭多威 (纯度 $\geq 98.7\%$)、速灭威 (纯度 $\geq 99.4\%$)、敌敌畏 (纯度 $\geq 99.4\%$) 均购自北京勤诚亦信科技发展有限公司。

碘化硫代丁酰胆碱、5, 5'-二硫代-2, 2'-二硝基苯甲酸 (DTNB)、考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白均购自 Sigma 公司; 毒扁豆碱敏感、盐酸多奈哌齐购自成都曼斯特公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

高速冷冻离心机, centrifuge 5810R, 德国 Eppendorf 公司; 电子天平, TB-214, 北京赛多利斯仪器有限公司; 分光光度计, UV2600A, 上海龙尼柯仪器有限公司; 酶标仪, infinite F200, 瑞士 Tecan 公司; 超低温冰箱, Ultra Freeze 3410, 丹麦 Heto 公司。

1.3 方法

1.3.1 蛋白质含量的测定

参照 Bradford (1976) 的考马斯亮蓝 G-250 法^[12], 以牛血清白蛋白为标准样品。

1.3.2 丁酰胆碱酯酶活力的测定

酶活的测定方法参照 V.Gorun 改进的等 Ellman 法^[13-14], 作为底物的碘化硫代丁酰胆碱被 BChE 分解为丁酸和硫代胆碱, 硫代胆碱与 DTNB 作用, 生成一种黄色的络合物, 在 410 nm 波长有吸收。以酶促反应的初速度来确定酶活性。

取 50 μL pH 8.0 磷酸缓冲液与 50 μL 酶液加入 96 孔板中混匀, 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温保持 15 min, 加入 100 μL 碘化硫代丁酰胆碱 (1 mmol/L)、100 μL DTNB (1 mmol/L), 以不加底物的反应液作为空白对照, 于 410 nm 处测定其吸光度值, 记录 10 min 内吸光度变化值, 每处理重复 3 次。以 L-半胱氨酸为标准样品与 DTNB 反应, 制作标准曲线, 根据标准曲线计算酶活。酶活以每 g 鸡血清蛋白每 min 水解底物的 μmol 数计算。

1.3.3 pH 对酶活性的影响

分别在 pH 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 条件下, 35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应, 按照 1.3.2 方法测定酶活力, 并以最适反应 pH 下的酶活力作为 100% 计算。每处理重复 3 次。

1.3.4 温度对酶活性的影响

分别在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$, pH 8.0 条件下, 按照 1.3.2 方法测定酶活力, 并以最适反应温度下的酶活力作为 100% 计算。每处理重复 3 次。

1.3.5 底物浓度对酶活性的影响

配制不同浓度的底物溶液 (1~250 mM), 与酶液反应, 以不加酶液的反应液作为空白对照, 按照 1.3.2 方法测定酶活力, 以底物溶液为 1 mmol/L 下的酶活力作为 100% 计算。每处理重复 3 次。

1.3.6 抑制剂对酶活性的影响

在酶促反应体系中, 分别加入 50 μL 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} 、 2×10^{-6} mol/L 毒扁豆碱、盐酸多奈哌齐溶液, 按照 1.3.2 方法测定酶活力, 以不加抑制剂的酶活力作为 100% 计算。每处理重复 3 次。

1.3.7 农药抑制时间对酶活性的影响

用丙酮分别将五种农药配制成浓度为 2×10^{-1} mol/L 的母液, 用磷酸缓冲液 (pH 8.0, 0.1 mol/L) 梯度稀释, 配制成 2×10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} 、 2×10^{-6} 、 2×10^{-7} 、 2×10^{-8} mol/L 的反应浓度, -4°C 储藏待用。

分别取 50 μL 1×10^{-6} mol/L 敌百虫、 2×10^{-6} mol/L 克百威、 1×10^{-5} mol/L 灭多威、 2×10^{-5} mol/L 速灭威、 1×10^{-6} mol/L 敌敌畏农药稀释液取代上述 1.3.2 酶活性测定反应体系中的磷酸缓冲液, 35 $^{\circ}\text{C}$ 保温抑制 3、5、10、15、20、25、30 min 后, 再加入 100 μL 碘化硫代

丁酰胆碱、100 μL DTNB 混匀反应 10 min, 以不加底物和农药的反应液作为空白对照, 以磷酸缓冲液代替农药稀释液作为无农药抑制酶活对照 (经多次实验, 丙酮小于 1%对胆碱酯酶活性无影响), 于 410 nm 处测定其吸光度值。每处理重复 3 次。计算酶的抑制率, 抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率 } H / \% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

注: A_0 : 无农药抑制时反应体系的吸光度; A_1 : 有农药抑制时反应体系的吸光度。

1.3.8 农药对酶活性的抑制

农药取 2×10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} 、 2×10^{-6} 、 2×10^{-7} 、 2×10^{-8} mol/L 作为反应浓度, 每个浓度取 50 μL 代替上述 1.3.2 酶活性测定反应体系中的磷酸缓冲液。按 1.3.7 方法计算酶的抑制率。

根据不同农药浓度对鸡血清 BChE 及马血清 BChE 抑制率 H, 参照冯艳萍等^[15]的计算方法, 作出 -lgC 与 lg (H/1-H) 曲线方程, 分别计算出五种农药对两种 BChE 的半抑制浓度 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 pH 对酶活性的影响

pH 是影响酶活的主要参数之一, 在 pH 6.5~9.0 的缓冲液中测定鸡血清 BChE 和马血清 BChE 的酶活力, 结果见图 1。由图 1 可知, 在 pH 6.5~8.0 范围内, 随 pH 的升高, 两种酶的酶活力均逐渐增加; pH 为 8.0 时, 鸡血清和马血清 BChE 均达到最高酶活性; pH 超过 8.0 之后, 两种 BChE 酶活性随着 pH 值的升高而降低。

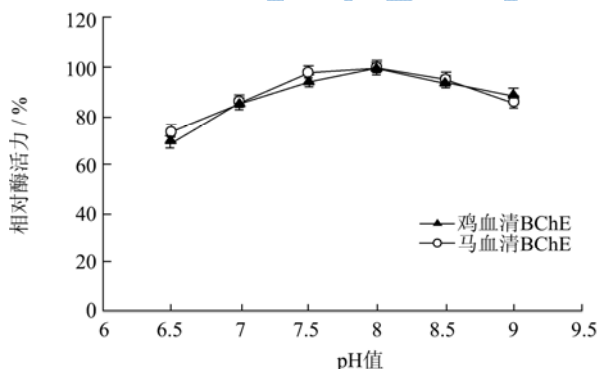


图 1 pH 值对 BChE 酶活力的影响
Fig.1 Effect of pH on BChE activity

2.2 温度对酶活性的影响

由图 2 可知, 鸡血清 BChE 和马血清 BChE 在 30~40 °C 时均表现出较高的酶活力, 35 °C 时, 酶活力最高; 高温和低温均抑制酶活力。

2.3 底物浓度对酶活性的影响

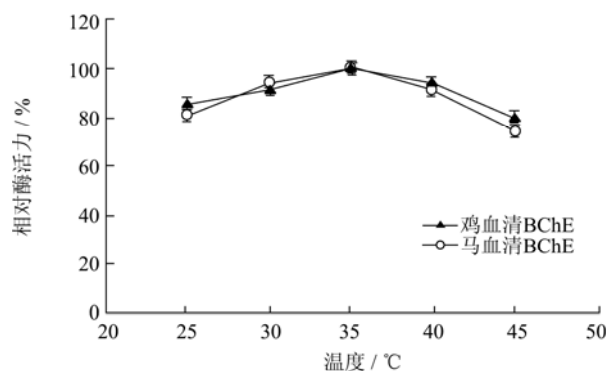


图 2 温度对 BChE 酶活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on BChE activity

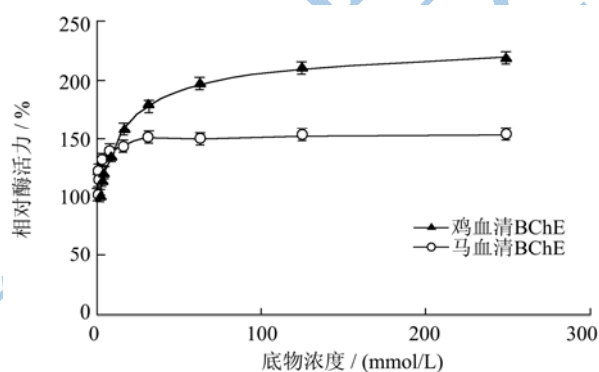


图 3 底物浓度对 BChE 酶活力的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on BChE activity

在底物浓度范围为 1~8 mmol/L 时, 随着底物浓度升高, BChE 酶活力线性升高, 其后酶活力缓慢增加; 马血清和鸡血清 BChE 酶活力分别在底物浓度超过 32 mmol/L 和 125 mmol/L 后不再增加, 但未出现过底物抑制效应 (图 3)。过量底物抑制效应是区分 AChE 和 BChE 的特性之一。AChE 具有过量底物抑制效应, BChE 无这一特性。

2.4 抑制剂对酶活性的影响

毒扁豆碱是总胆碱酯酶抑制剂, 盐酸多奈哌齐是 AChE 特异性抑制剂, 两者对鸡血清 BChE 和马血清 BChE 的抑制作用见图 4。在供试浓度范围 (10^{-6} mol/L~ 10^{-4} mol/L), 毒扁豆碱对酶活抑制率达到 95% 以上; 盐酸多奈哌齐在最大浓度 (10^{-4} mol/L) 时对鸡血清 BChE 的抑制率仅 12%, 但对马血清 BChE 抑制率达到 80% 左右, 而 10^{-6} mol/L 盐酸多奈哌齐对两种血清 BChE 抑制率均在 10% 以下。采用家蝇和电鳗的 AChE 进行实验, 10^{-6} mol/L 盐酸多奈哌齐对酶活的抑制率均在 80% 以上 (本实验室未发表结果)。此结果进一步证明实验所测鸡血清酯酶为 BChE, 且鸡血清 BChE 较马血清 BChE 对抑制剂盐酸多奈哌齐的敏感性更低。

2.5 农药抑制时间的选择

由图 5 可知, 在 3~15 min 范围内, 随着农药抑制时

间的延长,五种农药对鸡血清BChE和马血清BChE抑制率均显著增加,15 min以后,农药对两种BChE抑制率增长不显著,趋于平稳。因此选择15 min作为农药抑制时间。

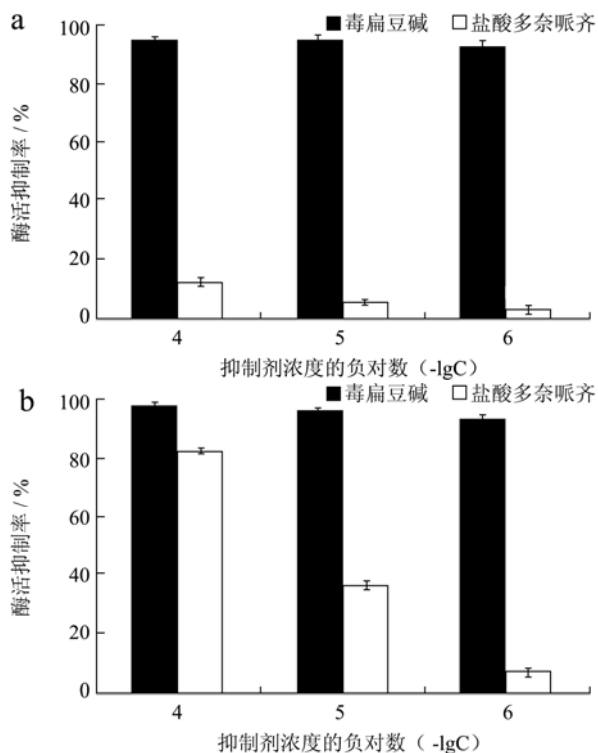


图4 胆碱酯酶抑制剂对BChE酶活力的影响

Fig.4 Effect of inhibitors on BChE activity of Chicken Serum and Equine Serum

注: a: 鸡血清BChE, b: 马血清BChE。

2.6 不同浓度的农药对鸡血清 BChE 的抑制

五种农药对鸡血清 BChE 抑制情况如图 6 所示。在浓度为 10^{-3} mol/L, 五种农药对两种 BChE 酶活均表现出较强的抑制。而在浓度为 10^{-7} mol/L 和 10^{-8} mol/L 时, 五种农药对两种 BChE 酶活抑制率在 20% 以下。在浓度为 10^{-4} mol/L~ 10^{-7} mol/L 范围内, 随着农药浓度的降低, 对酶活性抑制下降, 但不同农药对不同 BChE 的抑制表现出显著的差异。敌百虫、敌敌畏的抑制作用较强, 当浓度降低至 10^{-5} mol/L 时仍然对两种 BChE 具有 80% 左右抑制。克百威和灭多威两种氨基甲酸酯类农药对两种 BChE 的抑制呈现显著的差异, 鸡血清 BChE 对灭多威比较敏感, 而马血清 BChE 对克百威较敏感。

为了定量比较两种 BChE 对五种农药的敏感性差异, 我们选取抑制率范围为 90~20% 作线性回归分析, 得出 $-\lg C$ 与 $\lg(H/1-H)$ 曲线方程。当所得曲线方程 $Y=0$ 时, $H=1-H$, 即抑制率 $H=50\%$, 可求出不同农药对两种 BChE 的半抑制浓度 IC_{50} , 如表 1 所示。

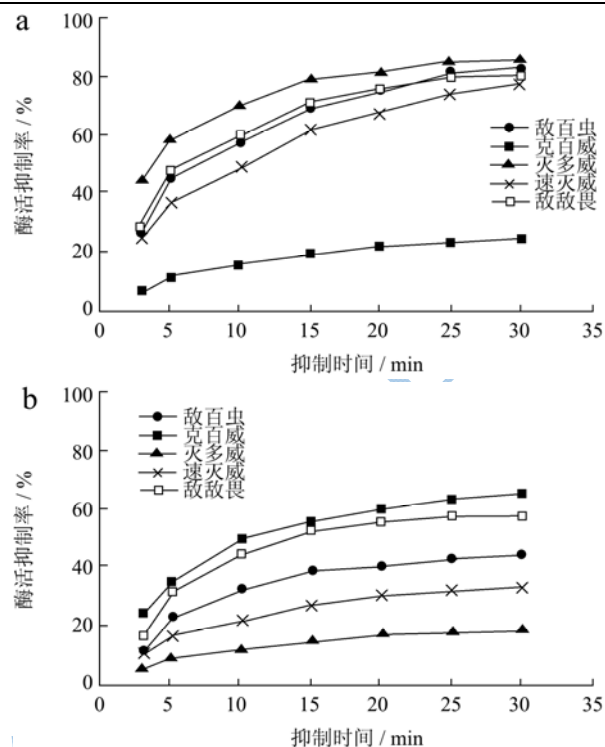


图5 农药抑制时间对BChE酶活力的影响

Fig.5 Inhibitory effect of time on BChE activity

注: a: 鸡血清 BChE, b: 马血清 BChE。

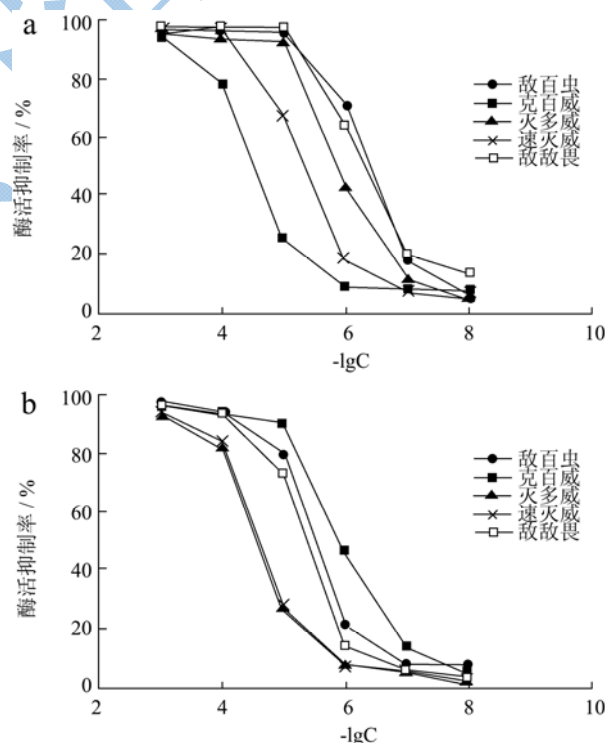


图6 不同浓度的农药 BChE 的抑制

Fig.6 Inhibitory effect of different pesticides on BChE activity

注: a: 鸡血清 BChE, b: 马血清 BChE。

从表 1 可知, 农药浓度与抑制率的相关性均达到了 0.98 以上, 表明线性关系良好。生态毒理学中, 常用抑制中浓度 IC_{50} 来评价对农药的敏感性。 IC_{50} 值越

小,表明农药对 BChE 的抑制能力越强。我们根据曲线方程求出 5 种农药对两种 BChE 的 IC₅₀。由表 1 中数据可知,鸡血清 BChE 对五种农药的敏感性从大到小排列依次为:敌百虫>敌敌畏>灭多威>速灭威>克百威;马血清 BChE 对五种农药的敏感性从大到小排列依次为:克百威>敌百虫>敌敌畏>灭多威>速灭威。

本次实验中测定敌百虫、克百威、灭多威、速灭威、敌敌畏五种农药对鸡血清 BChE 的 IC₅₀ 分别为 0.77、31.99、1.14、5.49、0.95 μmol/L,同时也测定了在同一条件下酶活力相当的马血清 BChE 对同种农药的 IC₅₀。结果表明,除克百威外,鸡血清 BChE 对其余四种农药的敏感性均高于马血清 BChE 的敏感性。

表 1 鸡血清 BChE 与商品 BChE 对农药敏感性比较

Table 1 The Comparison of BChE sensitivity between Chicken Serum and commercialization to five pesticides

农药种类	酶种类	抑制率曲线方程	相关系数	IC ₅₀ /(μmol/L)
敌百虫	鸡血清 BChE	Y=-2.9771X+18.207	0.9964	0.77
	马血清 BChE	Y=-2.4586X+13.304	0.9930	3.88
克百威	鸡血清 BChE	Y=-1.9483X+8.7576	0.9816	31.99
	马血清 BChE	Y=-2.2107X+13.074	0.9896	1.22
灭多威	鸡血清 BChE	Y=-2.6051X+15.486	0.9980	1.14
	马血清 BChE	Y=-2.2444X+10.428	0.9864	22.58
速灭威	鸡血清 BChE	Y=-2.5567X+13.449	0.9915	5.49
	马血清 BChE	Y=-2.3833X+11.002	0.9836	24.18
敌敌畏	鸡血清 BChE	Y=-2.8821X+17.359	0.9824	0.95
	马血清 BChE	Y=-2.6707X+14.056	0.9948	5.46

3 结论

3.1 鸡血清 BChE 和马血清 BChE 具有相似的酶学性质:两种 BChE 在 35 °C、pH 8.0 时达到最佳的反应活性;无过量底物抑制效应;对毒扁豆碱敏感。鸡血清 BChE 对盐酸多奈哌齐敏感,而马血清 BChE 相对不敏感。通过敌百虫、克百威、灭多威、速灭威、敌敌畏五种农药对两种 BChE 的酶活抑制率进行比较,发现除克百威外,鸡血清 BChE 对其余四种农药的敏感性均高于马血清 BChE 的敏感性。

3.2 我国是农业大国,家禽饲养广泛、规模广大,鸡血清成本低廉、来源丰富、便于收集,是提取 BChE 的可靠来源。鸡血清中丁酰胆碱酯酶含量丰富,农药敏感性高,可作为酶抑制法检测用酶的候选酶源。

参考文献

[1] 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

且本次试验中测定的敌百虫、敌敌畏对鸡血清 BChE 的 IC₅₀ 远低于李颖畅等^[16]测定的敌百虫、敌敌畏对驴血清 BChE 的 IC₅₀(0.179、0.124 mg/mL,即 695.28、558.84 μmol/L)。因此,本研究结果为鸡血清 BChE 作为农药残留快速检测用酶的候选酶源提供了实验依据。

本实验以未纯化的鸡血清作为实验酶源,其中混有乙酰胆碱酯酶活性,但其催化乙酰胆碱底物的速率很小^[17],不影响本研究结果。为进一步揭示鸡血清 BChE 的农药敏感性,我们将通过酶分离纯化,然后进一步检测其对更多的有机磷农药及氨基甲酸酯类农药的敏感性,促进鸡血清 BChE 在酶抑制法中应用。

chicken-serum [J]. Food Research and Development, 2011, 32(5): 30-33
[2] 余以刚,卢志洪,朱珍,等.广州市售蔬菜有机磷农药残留情况调查分析[J].现代食品科技,2010,26(7):742-745
YU Yi-gang, LU Zhi-hong, ZHU Zhen, et al. Investigation and analysis of organophosphorus pesticide residues in vegetables collected from guangzhou [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(7): 742-745
[3] 陈威,钟国才,王亚军,等.基于酶抑制的有机磷农药残留快速检测方法进展[J].广东农业科学,2011,23:153-154
CHEN Wei, ZHONG Guo-cai, WANG Ya-jun, et al. Advances in the application of enzyme inhibition assay to the rapid detection of organophosphorus pesticides [J]. Guangdong Agricultural Science, 2011, 23: 153-154
[4] 杜美红,孙永军,汪雨,等.酶抑制-比色法在农药残留快速检测中的研究进展[J].食品科学,2010,31(17):462-466
DU Mei-hong, SUN Yong-jun, WANG Yu, et al. Advances in the application of enzyme inhibition/colorimetric assay to the rapid detection of pesticide residues [J]. Food Science, 2010, 31(17): 462-466

- [5] 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, JIN Yuan-yan, SHAN Lian-gang. Rapid detection of carbamate pesticides [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(2): 229-232
- [6] Vioque-Fernández A, de Almeida EA, López-Barea J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation [J]. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 2007, 145(3): 404-412
- [7] Laguerre C, Sanchez-Hernandez JC, Köhler HR, et al. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure [J]. Environ. Pollut., 2009, 157(1):199-207
- [8] Stefanidou M, Athanaselis S, Spiliopoulou H. Butyrylcholinesterase: biomarker for exposure to organophosphorus insecticides [J]. Intern. Med. J., 2009, 39(1):57-60
- [9] Wheelock C E, Phillips B M, Anderson B S, et al. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs) [J]. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 2008, 195: 117-178
- [10] Brandy J White, J Andrew Legako, H James Harmon. Rapid reagent-less detection of competitive inhibitors of butyrylcholinesterase [J]. Sensors and Actuators B, 2003, 91: 138-142
- [11] 刘畅,陈福生,高海生,等.鸭血清胆碱酯酶抑制法检测果蔬农药残留的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(1):157-160
LIU Chang, CHEN Fu-sheng, GAO Hai-sheng, et al. Study on the enzyme inhibition method of pesticide residues with cholinesterase from duck serum [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(1): 157-160
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254
- [13] V Gorun, I Proinov, V Băltescu, et al. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations [J]. Analytical Biochemistry, 1978, 86(1): 324-326
- [14] 高希武. Gorun 等改进的 Ellman 胆碱酯酶活性测定方法介绍[J].昆虫知识,1987,24(4):245-246
GAO Xi-wu. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases by Gorun and someone else [J]. Entomological Knowledge, 1987, 24(4): 245-246
- [15] 冯艳萍,张全,王萃.马拉氧磷和异马拉硫磷对乙酰胆碱酯酶联合抑制作用[J].浙江工业大学学报,2011,39(2):131-135
FENG Yan-ping, ZHANG Quan, WANG Cui. The joint inhibition of the Enantiomers of Malaoxon and Isomalathion on Acetylcholinesterase [J]. Journal of Zhe Jiang University of Technology, 2011, 39(2): 131-135
- [16] 李颖畅,李作伟,吕艳芳,等.驴血清胆碱酯酶抑制法快速检测蔬菜中农药残留[J].食品工业科技,2013,34(3):293-301
LI Ying-chang, LI Zuo-wei, LV Yan-fang, et al. Rapid determination of pesticide residues in vegetables by enzyme inhibition method with cholinesterase from donkey serum [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(3): 293-301
- [17] 丁运华,陈勇智.用于检测农药残留的胆碱酯酶酶源的研究进展[J].热带农业科学,2007,7(5):73-77
DING Yun-hua, CHEN Yong-zhi. Advances on sources of cholinesterase for pesticides residue determination [J]. Chinese Journal Tropical Agriculture, 2007, 7(5): 73-77