

美洲蟑螂头部乙酰胆碱酯酶活性测定及对5种常用农药的敏感性

何绍志, 李 维, 王 雁, 杨 潇, 饶 瑜, 杨文字, 陈祥贵*

(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)

摘 要: 目的: 研究农药对美洲蟑螂头部乙酰胆碱酯酶活性的抑制作用, 为农药快速检测提供新的敏感酶源。方法: 选取美洲蟑螂为实验对象, 以Ellman法测定酶活, 并用正交试验确定最佳反应体系条件; 采用酶抑制法为检测方法, 考察其对有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的敏感性, 计算相关半抑制浓度(IC₅₀); 并同时测定电鳗乙酰胆碱酯酶(AChE)敏感性, 以保证2种AChE在同一实验条件下具有可比性。结果: 美洲蟑螂AChE对敌百虫、敌敌畏、甲萘威、克百威、速灭威的IC₅₀值分别为5.495、5.943、0.290、0.160、1.897 μmol/L, 对敌敌畏、甲萘威及速灭威的敏感性略高于电鳗AChE, 后者对这5种农药的IC₅₀值分别为3.990、7.656、1.002、0.007、7.568 μmol/L。结论: 美洲蟑螂AChE粗提物对5种农药表现较好的敏感性, 可以作为新型敏感酶源的系统研究。

关键词: 美洲蟑螂; 乙酰胆碱酯酶; 农药; 敏感性

Determination of AChE Activity in *Periplaneta americana* Head and Its Susceptibility to Five Common Pesticides

HE Shao-zhi, LI Wei, WANG Yan, YANG Xiao, RAO Yu, YANG Wen-yu, CHEN Xiang-gui*

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

Abstract: Objective: To explore the inhibitory effect of pesticides on the activity of acetyl cholinesterase (AChE) in the head of *Periplaneta americana*, and to provide a new susceptible enzyme source for the quick detection of pesticides. Methods: The activity of AChE was determined by Ellman's colorimetric method. An orthogonal array design was used to establish the optimum reaction conditions for determining AChE activity. The susceptibility of the AChE activity to organic phosphorus pesticides and carbamate pesticides was measured using enzymatic inhibition by calculating IC₅₀. Electric eel AChE was used as a control under the same experimental conditions. Results: The IC₅₀ values of trichlorfon, dichlorvos, carbaryl, carbofuran and metolcarb to *Periplaneta americana* head AChE were 5.495, 5.943, 0.290, 0.160, 1.897 μmol/L, respectively. The susceptibility of AChE from the head of *Periplaneta americana* to dichlorvos, carbaryl and metolcarb were slightly higher than that from electric eel. The IC₅₀ values of trichlorfon, dichlorvos, carbaryl, carbofuran, and metolcarb to electric eel AChE were 3.990, 7.656, 1.002, 0.007, 7.568 μmol/L, respectively. Conclusion: *Periplaneta americana* head AChE shows good susceptibility to five pesticides and thus can be used as a new susceptible enzyme.

Key words: *Periplaneta americana*; acetyl cholinesterase; pesticides; susceptibility

中图分类号: TS207.3; S482.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0184-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323039

随着经济的高速发展和人们生活水平的日益提高, 食品安全问题越来越受到高度重视。在诸多的食品安全问题中, 农药残留一直是各国食品安全体系建设重点关注的内容。我国是一个农业大国, 过量使用农药、超范围使用农药甚至使用禁用农药的情况还比较常见, 农产品农药残留超标的事件时有发生, 导致以农产品为原料加工的食品存在农药残留超标的隐患^[1-3]。因此, 简便、

经济的农药残留快速检测技术的研究和应用对于保障我国的食品安全具有重要意义。

对于有机磷和氨基甲酸酯类的农药残留快速检测, 酶抑制法是当前国内外研究最多的, 被普遍认为是最具前景的方法^[4-5]。其基本原理是: 在体外条件下, 胆碱酯酶的活性变化与有机磷和氨基甲酸酯类农药的浓度存在良好的相关性, 通过测定农产品的农药残留提取液对

收稿日期: 2013-07-18

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项目

作者简介: 何绍志(1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: heshaozhi1988@163.com

*通信作者: 陈祥贵(1967—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。E-mail: chenxianggui@tom.com

胆碱酯酶活性的影响即可判定农药残留的超标情况。目前国内外酶抑制法检测农药残留的研究主要集中在各种类型酶传感器如电流型、光学型和压电型等的研制方面,而对检测用酶的研究报道相对较少^[6-8]。检测用酶是酶抑制法的核心和关键。国内外报道的用于农药残留检测的酶传感器所用的酶绝大多数是乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE),且主要来自家蝇、电鳗和牛红细胞,酶源非常单一^[9]。寻找易于获得的对农药敏感的替代酶源对于酶抑制的应用具有重要意义。国内外学者对一些动物包括昆虫的乙酰胆碱酯酶的农药敏感性进行了研究,如刘晓宇^[10]、丁运华^[11]及廖秀丽^[12]等分别对鲫鱼、罗非鱼、小峰熊蜂的AChE敏感性进行了研究报道,但多数研究并未对比候选酶源与家蝇或电鳗的乙酰胆碱酯酶的农药敏感性的差异。

有研究提示,美洲蟑螂对多种有机磷农药和氨基甲酸酯类农药敏感,LD₅₀在40μg/g以下^[13],但尚未有关于其乙酰胆碱酯酶体外农药敏感性的报道。本研究选用蜚蠊科中的美洲蟑螂(*Periplaneta americana*)作为实验酶源材料,通过对提取的头部粗酶液测定其AChE活性,并同时检测其与电鳗AChE对有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的敏感性,为评价美洲蟑螂头部AChE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

美洲蟑螂取自好医生攀西药业有限责任公司美洲蟑螂养殖基地;电鳗AChE(Type C3389-500U) 美国Sigma公司。

农药标准品:敌百虫(纯度≥99.1%)、敌敌畏(纯度≥99.4%)、甲萘威(纯度≥98.9%)、克百威(纯度≥98.3%)、速灭威(纯度≥99.4%) 北京勤诚亦信科技开发有限公司;碘化硫代乙酰胆碱、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(BSA)、Triton X-100 美国Sigma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 德国Eppendorf公司;TB-214电子天平 北京赛多利斯仪器有限公司;UV2600A分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司;酶标仪 瑞士Tecan公司;Ultra Freeze 3410超低温冰箱 丹麦Heto公司;FDU-1100真空冷冻干燥机 日本东京理化Eyela公司。

1.3 方法

1.3.1 粗酶的提取

取50只美洲蟑螂成虫,剪去头部,放入干净的表面皿中称量。然后用预冷的0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.5,含

0.1%的Triton X-100)冰浴条件下匀浆,匀浆比为1:4(m/V)制成匀浆液。匀浆液于4℃、10000r/min离心15min,取上清液即为粗酶提取液,经冷冻干燥后配制成0.2g/mL溶液,分装后于-50℃低温保存备用,用时稀释到适当质量浓度即可。

1.3.2 蛋白质含量的测定

参照Bradford^[14]的考马斯亮蓝G-250法,用牛血清白蛋白制作标准曲线,由标准曲线计算出反应酶液的蛋白质含量。

1.3.3 乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的测定

酶活性的测定参照改进的Ellman法^[15-16],作为底物的碘化硫代乙酰胆碱被AChE分解为乙酸和硫代胆碱,硫代胆碱与DTNB作用,生成一种黄色的络合物,在412nm波长处测其光密度(OD)。由酶促反应的初速率来确定酶活性。

分别取0.5mL的磷酸缓冲液(0.1mol/L)与0.5mL粗酶液(0.05g/mL)加入10mL试管中,充分混匀35℃水浴10min后加入1mL碘化硫代乙酰胆碱(1mmol/L),反应10min后加入DTNB-磷酸盐-乙醇溶液显色并终止反应,以不加底物的反应液作为空白对照,于412nm波长处比色,每个处理重复3次。以L-半胱氨酸的物质的量为横坐标,以OD_{412nm}为纵坐标,制作标准曲线,根据标准曲线计算酶活力。酶比活力以每克头部蛋白每分钟水解底物的物质的量计算。

1.3.4 单因素试验

分别选取pH值为6.5、7.0、7.5、8.0、8.5;反应温度为20、25、30、35、40℃;反应时间为5、10、15、20、25min各5个水平进行单因素试验。

1.3.5 正交试验法优化反应体系条件

单因素虽分析简便,但误差无法估量,故在单因素的基础上,采用正交试验L₉(3³)进行分析。每组处理重复3次。

1.3.6 两种乙酰胆碱酯酶对农药的半抑制浓度

用丙酮分别将5种农药配制成浓度为2×10⁻¹mol/L的母液,用磷酸缓冲液(pH7.5, 0.1mol/L)梯度稀释,取2×10⁻³、2×10⁻⁴、2×10⁻⁵、2×10⁻⁶、2×10⁻⁷、2×10⁻⁸mol/L作为反应浓度。每个浓度取0.5mL代替1.3.3节中酶活性测定反应体系的磷酸缓冲液(电鳗AChE浓度为0.0002U/μL)。将试管35℃保温10min后,加入1mL碘化硫代乙酰胆碱充分混匀反应10min,迅速加入DTNB-磷酸盐-乙醇溶液1mL显色并终止反应,以不加底物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,于412nm波长处测其OD值,每处理重复3次,计算剩余酶活力及抑制率。

$$\text{抑制率}(H)/\% = \frac{OD_1 - OD_2}{OD_1} \times 100$$

式中:OD₁为无农药抑制时反应体系的光密度值;OD₂为有农药抑制时反应体系的光密度值。

根据不同农药浓度(c , mol/L)对美洲蟑螂AChE及电鳗AChE抑制率(H , %), 参照冯艳萍等^[17]的计算方法, 作出一 $\lg c$ 与 $\lg(H/(1-H))$ 曲线方程, 分别计算出5种农药对2种AChE的 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 pH值对AChE酶比活力的影响

取0.5mL不同pH值的磷酸缓冲液(0.1mol/L)与0.5mL 0.05g/mL粗酶液加入10mL试管中, 充分混匀35℃水浴10min后加入1mL碘化硫代乙酰胆碱(1mmol/L), 反应15min后加入DTNB-磷酸盐-乙醇溶液显色并终止反应, 测定酶比活力, 结果如图1所示, 当pH值为7.5时酶比活力达到最大值。

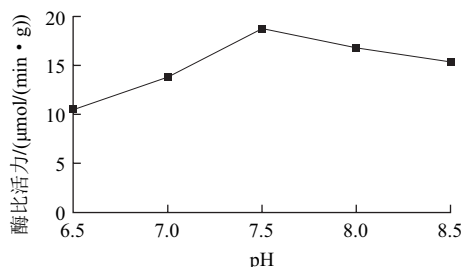


图1 pH值对AChE酶比活力的影响

Fig.1 Effect of pH on the specific activity of AChE

2.1.2 反应温度对AChE酶比活力的影响

取0.5mL磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH7.5)与0.5mL 0.05g/mL粗酶液加入10mL试管中, 置于不同的温度条件下水浴10min后加入1mL碘化硫代乙酰胆碱(1mmol/L), 反应15min后加入DTNB-磷酸盐-乙醇溶液显色并终止反应, 测定酶比活力, 结果如图2所示, 当反应温度为30℃时酶比活力达到最大值。

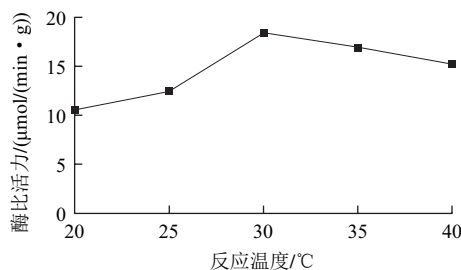


图2 反应温度对AChE酶比活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on the specific activity of AChE

2.1.3 反应时间对AChE酶比活力的影响

取0.5mL磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH7.5)与0.5mL 0.05g/mL粗酶液加入10mL试管中, 充分混匀30℃水浴10min后加入1mL碘化硫代乙酰胆碱(1mmol/L), 反应不

同时间后加入DTNB-磷酸盐-乙醇溶液显色并终止反应, 测定酶比活力, 结果如图3所示, 当反应时间为15min时酶比活力达到最大值。

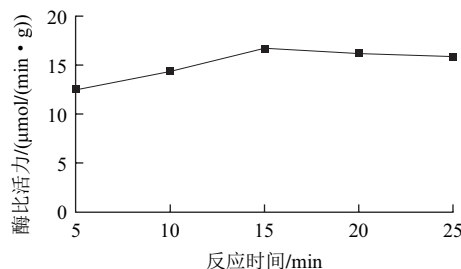


图3 反应时间对AChE酶比活力的影响

Fig.3 Effect of reaction time on the specific activity of AChE

2.2 正交试验确定反应体系最佳条件

表1 美洲蟑螂头部乙酰胆碱酯酶反应条件正交试验设计方案及结果

Table 1 Orthogonal array design and results for enzymatic reaction conditions of AChE

试验号	A pH	B 反应温度/℃	C 反应时间/min	AChE酶比活力/($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$)
1	1(7.0)	1(30)	1(5)	12.9653±0.1357
2	1	2(35)	2(10)	16.4568±0.2543
3	1	3(40)	3(15)	11.3246±0.0941
4	2(7.5)	1	2	14.1247±0.2580
5	2	2	3	18.7639±0.3815
6	2	3	1	10.1854±0.1156
7	3(8.0)	1	3	9.2185±0.2536
8	3	2	1	9.8445±0.0898
9	3	3	2	10.1023±0.2318
k_1	4.5274	4.0343	3.6661	
k_2	4.7860	5.0072	4.5204	
k_3	3.2406	3.5125	4.4656	
R	1.5454	1.4948	0.8543	

由表1可知, 美洲蟑螂头部AChE的最佳反应条件为 $A_2B_2C_2$, 通过验证实验, 最佳组合条件下美洲头部AChE酶比活力为 $(19.4385 \pm 0.3376) \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$, 大于正交试验中每组数据。因此, 确定美洲蟑螂头部AChE酶比活力测定最佳反应条件为: pH7.5、反应温度35℃、反应时间10min。影响因素的主次顺序为pH值>反应温度>反应时间。反应pH值的极差最大, 表明反应体系中该因素对AChE的酶比活力测定影响最大。

2.3 不同浓度的农药对电鳗AChE的抑制

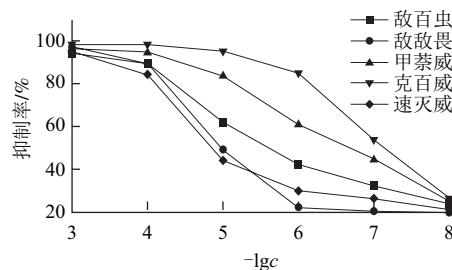


图4 不同浓度的农药对电鳗AChE的抑制

Fig.4 Inhibitory effects of five pesticides on AChE activity of electric eel

由图4可知,随着浓度的增大,5种农药对电鳗AChE酶活的抑制程度也随之增强,但这5种农药对酶活抑制程度并不相同。克百威和甲萘威在抑制电鳗AChE总体上表现出很高的抑制程度,而敌敌畏、敌百虫在浓度降至 10^{-7} mol/L时,对电鳗AChE的抑制能力逐渐减弱。

2.4 不同浓度的农药对蟑螂AChE的抑制

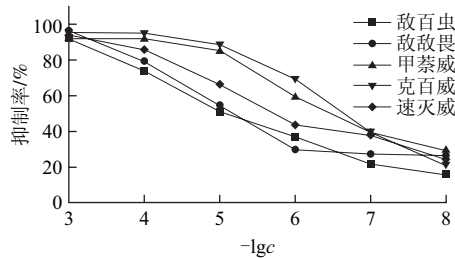


图5 不同浓度的农药对蟑螂AChE的抑制

Fig.5 Inhibitory effects of five pesticides on AChE activity of *Periplaneta americana* head

由图5可知,随着农药浓度的增加,5种农药对蟑螂AChE的抑制程度也逐渐增强。在农药浓度大于 10^{-6} mol/L时,5种农药对蟑螂AChE抑制能力同电鳗AChE基本相同,能力大小顺序为克百威>甲萘威>速灭威>敌敌畏>敌百虫。并且敌敌畏在其浓度降至 10^{-6} mol/L时,抑制能力逐渐减弱。

2.5 美洲蟑螂头部AChE与电鳗AChE对农药敏感性比较

表2 美洲蟑螂头部AChE与电鳗AChE对农药敏感性比较
Table 2 Comparison of AChE susceptibility between *Periplaneta americana* and electric eel to five pesticides

农药种类	酶种类	抑制率曲线方程	相关系数	IC ₅₀ /(10^{-6} mol/L)
敌百虫	蟑螂AChE	$Y = -0.749X + 3.940$	0.9880	5.495
	电鳗AChE	$Y = -1.443X + 7.791$	0.9945	3.990
敌敌畏	蟑螂AChE	$Y = -0.574X + 3.000$	0.9789	5.943
	电鳗AChE	$Y = -0.722X + 3.694$	0.9893	7.656
甲萘威	蟑螂AChE	$Y = -0.989X + 6.466$	0.9833	0.290
	电鳗AChE	$Y = -1.460X + 8.758$	0.9923	1.002
克百威	蟑螂AChE	$Y = -1.061X + 7.210$	0.9920	0.160
	电鳗AChE	$Y = -1.284X + 9.214$	0.9931	0.007
速灭威	蟑螂AChE	$Y = -1.002X + 5.733$	0.9989	1.897
	电鳗AChE	$Y = -1.344X + 6.882$	0.9687	7.568

注: Y 为 $\lg(H/(1-H))$, X 为 $-\lg c$ 。

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,可知 $H=1-H$,即抑制率 $H=50\%$,可求出不同农药对两种AChE的半抑制浓度(IC₅₀),由表2可知,农药浓度与抑制率的相关性均达到了0.96以上,表明线性关系良好。并且两种AChE对农药的敏感性可由抑制曲线方程的斜率进行初步判断,蟑螂AChE对5种农药的敏感性从大到小排列依次为:克百威、速灭威、甲萘威、敌百虫、敌敌畏;电鳗对5种农药的敏感性从大到排列依次为:甲萘

威、敌百虫、速灭威、克百威、敌敌畏;蟑螂AChE对5种农药的敏感性与电鳗AChE差异不明显。

生态毒理学中,常用抑制中浓度IC₅₀来评价对农药的敏感性。IC₅₀值越小,表明农药对AChE的抑制能力越强,即AChE对农药越敏感。由表2可知,两种AChE对同种农药的敏感性均在一个数量级(10^{-6} mol/L)上,两种AChE对氨基甲酸酯类农药敏感性要高于有机磷农药。蟑螂AChE和电鳗AChE均对克百威最敏感,IC₅₀值分别为 0.160×10^{-6} mol/L和 0.007×10^{-6} mol/L;而对敌敌畏均不敏感,IC₅₀值分别为 5.943×10^{-6} mol/L和 7.656×10^{-6} mol/L;蟑螂AChE对敌敌畏、甲萘威、速灭威的敏感性略高于电鳗AChE。

3 讨论

美洲蟑螂是蟑螂族群里最大也是最常见的种类,具有繁殖快、生命力强等特点。近年来,鉴于其在药用方面的价值^[18-19],部分地区大规模养殖,故避免了蟑螂因接触农药而产生抗药性。美洲蟑螂具有AChE活性高、价格便宜、取材方便等特点,可作为寻找新敏感酶源的实验材料。

AChE的活性测定条件主要包括:底物浓度、酶浓度、反应温度、反应时间、pH值,不同生物体及同种生物不同器官中AChE活性测定所需条件不同^[20-22]。本研究通过单因素及正交试验对反应体系条件进行优化,最终确定底物浓度1.0mmol/L、酶冻干粉质量浓度0.05g/mL、温度35℃、时间10min、pH7.5为后续实验测定条件。根据孙黔云^[23]、李妙鱼^[24]等报道可知,电鳗AChE最优反应条件与本实验中所确定测定条件基本相同。

基于实验环境、实验操作等因素的影响,相同的酶源在不同的测定条件下得出的结果可能不同^[25]。目前世界上公认的敏感酶源来自家蝇、电鳗等,本实验中测定敌百虫、敌敌畏、甲萘威、克百威、速灭威5种农药对美洲蟑螂头部AChE的IC₅₀分别为5.495、5.943、0.290、0.160、1.897μmol/L,同时也测定了电鳗AChE在同一条件下对同一农药的IC₅₀值。结果表明,美洲蟑螂头部AChE与电鳗AChE对5种农药的敏感性非常接近,但由于家蝇饲养存在一定难度,电鳗来源稀少,故美洲蟑螂可作为酶抑制法检测用酶的候选酶源。

本实验中仅将美洲蟑螂头部AChE粗酶作为实验酶源,也只测定了5种代表性的农药。为了进一步揭示美洲蟑螂头部AChE的农药敏感性,本实验室正在进行酶的分离纯化,然后进一步检测其对更多的有机磷农药和氨基甲酸酯类农药的敏感性,为科学评价美洲蟑螂作为敏感酶源提供实验依据。

参考文献:

- [1] 伍小红, 李建科, 惠伟. 农药残留对食品安全的影响及对策[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(6): 80-84.
- [2] 柴丽月, 常卫民, 陈树兵, 等. 食品中农药残留分析技术研究[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 260-264.
- [3] 李太平. 食品中农药最大残留限量标准的安全漏洞分析[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 266-271.
- [4] 林春绵, 胡晓燕, 张安平. 酶抑制法快速检测有机磷农药残留的研究进展[J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(4): 386-391.
- [5] MIROSLAV P, KAMIL M, KAMIL K. Progress of biosensors based on cholinesterase inhibition[J]. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16(14): 1790-1798.
- [6] ZAMFIR L G, ROTARIU L, BALA C. A novel, sensitive, reusable and low potential acetylcholinesterase biosensor for chlorpyrifos based on 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate/multiwalled carbon nanotubes gel[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(8): 3692-3695.
- [7] de ALBUQUERQUE Y D, FERREIRA L F. Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 596(2): 210-221.
- [8] 孟范平, 唐学玺, 李桂芳, 等. 利用乙酰胆碱酯酶传感器监测海水长效磷[J]. 海洋环境科学, 2003, 22(4): 63-67.
- [9] SUN Xia, WANG Xiangyou. Acetylcholinesterase biosensor based on prussian blue-modified electrode for detecting organophosphorous pesticides[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(12): 2611-2614.
- [10] 刘晓宇, 赫强, 吴谋成, 等. 鲫鱼脑乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性测定及对有机磷农药的敏感性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 71-74.
- [11] 丁运华, 吴晓敏, 方俊彬. 罗非鱼肌肉乙酰胆碱酯酶的纯化、性质及农药敏感性研究[J]. 水生态学杂志, 2012, 33(1): 120-125.
- [12] 廖秀丽, 罗术东, 伍翔, 等. 峰熊蜂头部乙酰胆碱酯酶测定条件的优化及其对六种常用杀虫剂的敏感性[J]. 昆虫学报, 2011, 54(12): 1361-1367.
- [13] HARDSTONE M C, SCOTT J G. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects?[J]. Pest Manag Sci, 2011, 66(11): 1171-1180.
- [14] 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.
- [15] GORUN V, PROINOV I, BĂLTESCU V, et al. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations[J]. Analytical Biochemistry, 1978, 86(1): 324-326.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 胡艳芬, 吕小满, 王玉梅, 等. 美洲大蠊药用价值研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(18): 2822-2824.
- [19] ZHANG Hongwei, WEI Liyou, ZHANG Zhengyu, et al. Protective effect of periplaneta americana extract on intestinal mucosal barrier function in patients with sepsis[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(1): 70-73.
- [20] 仪美芹, 于彩虹, 杨明, 等. 鲫鱼(*Carassius auratus*)体内胆碱酯酶的组织分布及其对氨基甲酸酯类杀虫剂的敏感度[J]. 环境与安全学报, 2006, 6(3): 57-60.
- [21] 汤方, 杨海江, 高希武, 等. 黑翅土白蚁乙酰胆碱酯酶最佳反应体系的建立及药剂敏感度比较[J]. 昆虫学报, 2008, 51(7): 714-719.
- [22] 刘洪霞, 史雪岩, 高希武. 摇蚊乙酰胆碱酯酶最佳反应体系的建立及有机磷类药剂敏感性比较[J]. 安全与环境学报, 2005, 5(5): 67-70.
- [23] 孙黔云, 杨付梅. 乙酰胆碱酯酶抑制剂微量筛选模型的比较研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(10): 1387-1392.
- [24] 李妙鱼. 乙酰胆碱酯酶抑制剂的合成、表征及其对电鳗AChE抑制活性的研究[D]. 太原: 山西大学, 2004.
- [25] 杜美红, 孙永军, 汪雨, 等. 酶抑制法-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.