

家蝇乙酰胆碱酯酶的纯化、生化性质及其对杀虫剂敏感性的研究

魏 辉^{1,2}, 沈晋良², 吴 玮¹, 赵建伟¹, 占志雄¹

(1.福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013; 2.南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095)

摘 要 采用 CEA 亲和层析法对家蝇 AChE 进行纯化, 测定了不同温度、pH 值、ATChI 浓度、DTNB 浓度对 AChE 活性的影响, 并测定了不同杀虫剂对纯酶和粗酶的抑制作用。结果表明, CEA 纯化倍数为 672.36, 产率为 34.68%; 当温度为 35 °C 时, 粗酶和纯酶的 AChE 活性最高; 当 pH=7.2 时, 纯化后 AChE 的活性最高, 随后随着 pH 的升高 AChE 的活性反呈下降趋势; 当 pH=7.8 时, 粗酶 AChE 活性最高; 当底物浓度为 2 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 纯化 AChE 活性达到最大值, 当底物浓度为 1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 粗酶活性达到最大值。粗酶和纯化的 AChE 活性的两个波峰出现在 DTNB 浓度为 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时; 仲丁威、乙酰甲胺磷、速灭威、甲胺磷、毒死蜱、克百威、抗蚜威、灭多威和辛硫磷等 9 种杀虫剂对粗酶和纯酶 AChE 的 IC_{50} 比值都大于 6, 甲萘威对纯酶和粗酶 AChE 的 IC_{50} 比值为 4.826, 二嗪磷的为 1.184, 三唑磷的为 0.099。

关键词 家蝇; 乙酰胆碱酯酶; 纯化; 生化性质; 药剂敏感性

中图分类号: X830.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)01-0156-05

Purification Biochemical Properties and Insecticides Susceptibility of Acetylcholinesterase from Housefly (*Musca domestica* L.)

WEI Hui^{1,2}, SHEN Jin-liang¹, WU Wei¹, ZHAO Jian-wei¹, ZHAN Zhi-xiong¹

(1. Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Acetylcholinesterase (AChE, EC3.1.1.7) is an important enzyme sources in enzyme-based methods for pesticide instant determination. In this study, 3-carboxyphenyl ethyldimethyl ammonium (CEA) method was adopted to purify AChE from housefly (*Musca domestica*). The effects of reaction temperature, pH, ATChI concentration and DTNB concentration on the purified and crude AChE activities were investigated. Also, the inhibitory effects of different insecticides on the purified and crude AChE activities were measured. The results showed that AChE purification fold can be reached to 672.36 when the yield was 34.68%. Significantly highest purified AChE activity was observed when the experiment conditions were 35 °C, pH7.2, 2 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATChI and 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTNB. In addition, significantly highest crude AChE enzyme activities were observed at 35 °C, pH7.8, 1 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATChI, 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTNB. The IC_{50} ratio of crude and purified AChE, caused by fenobucarb, acephate, metolcarb, methamidophos, chlorpyrifos, carbofuran, pirimicarb, methomyl, phoxim were more than 6. The IC_{50} ratio were 4.826, 1.184 and 0.099 caused by carbaryl, diazinon and triazophos, respectively. The results showed that purified AChE is more sensitive to tested insecticides than crude AChE, but the sensitivity may depend on chemical structure of insecticides and reaction conditions, which indicated the purified AChE-based methods for instant pesticides determination are more effective and useful at optimized conditions.

Keywords *Musca domestica*; acetylcholinesterase; purification; insecticides susceptibility

乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE, EC3.1.1.7) 是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的靶标

酶^[1-2]。因此, AChE 成为农药残留酶抑制分析法中酶的重要来源之一^[3], 而家蝇成虫是酶抑制法中 AChE 的重要来源^[4-5]。在昆虫的粗匀浆液中, 除 AChE 外还混有其他蛋白质, 尤其是水解酶类对生化反应的结果会有影响^[6]。在生化反应中, 这些蛋白质可能会降解 AChE 的抑制剂或作为结合蛋白使抑制剂有效浓度降低^[7], 这些都会影响到以 AChE 为酶源的农药残留快速检测的灵敏度。因此家蝇 AChE 分离和纯化对于

收稿日期: 2008-03-18

基金项目: 福建省自然科学基金 (B0320003), 福建省农业科学院科技创新团队建设基金 (STIF-Y07)

作者简介: 魏 辉 (1972—), 男, 福建平潭人, 博士, 副研究员, 主要从事植物源农药和农药毒理的研究。

E-mail: weihui318@vip.qq.com

联系人: 沈晋良 E-mail: shenjl@public1.ptt.js.cn, jlshen@njau.edu.cn

研究其AChE性质,保证各批次的酶稳定,提高家蝇AChE对有机磷及氨基甲酸酯类农药的灵敏度等都具有重要意义。本文采用3-羧基苯基-乙基二甲基铵(3-carboxyphenyl ethydimethyl ammonium,CEA)亲和层析法对家蝇AChE进行纯化,对其特性进行分析,并对家蝇不同纯度的AChE的药剂敏感性进行比较分析,为农药残留快速检测提供研究方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试试剂与主要仪器

葡聚糖凝胶(Sephadex G-200,Amersham公司产品);溴化氰活化的琼脂糖凝4B(CNBr-Sephadex 4B,Amersham公司产品);3-二甲基氨基苯甲酸(Aldrich公司产品);乙基碘(Fluka公司产品);四乙基碘化铵(上海试剂一厂产品);1,6-己二胺(上海试剂一厂产品);固蓝RR盐(Fluka公司产品);毒扁豆碱(Fluka公司产品);碘化硫代乙酰胆碱(ATChI,Fluka公司产品);二硫双对硝基苯甲酸(DTNB,上海化学试剂厂产品);丙烯酰胺(Acr,上海化学试剂公司产品);N,N'-亚甲双丙烯酰胺(Bis,上海化学试剂公司产品);四甲基乙烯二胺(TEMED,上海生物工程公司产品);其他试剂均为国产分析纯。

80.3%三唑磷(triazophos)原药(浙江新农化工股份有限公司);95%二嗪磷(diazinon)原药(浙江禾本农药化学有限公司);95%毒死蜱(chlorpyrifos)原药(美国陶氏益农公司);98%乙酰甲胺磷(acephate)原药(湖南益阳市农药厂);70.3%甲胺磷(methamidophos)原药(江苏东海农药厂);97%克百威(carbofuran)原药(湖北武穴市农药厂);87.3%辛硫磷(phoxim)原药(南京第一农药厂);96%速灭威(metolcarb)原药(上海东风农药厂);98%仲丁威(fenobucarb)原药(常州长益化工有限公司);90%抗蚜威(pirimicarb)原药(无锡农药厂);99%残杀威(propoxur)原药(湖南海利化工股份有限公司);98%甲萘威(carbaryl)原药(湖南海利化工股份有限公司);85%灭多威(methomyl)原药(江苏南通农药厂)。

Multiskan MK3型酶标仪(Thermo Electron Corporation);UV-1600型紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);高速冷冻离心机(RF-3200,Eppendoff公司);层析柱(1.5×55 cm,上海玻璃仪器厂);层析冷柜(LRH-300-GS,广东省医疗器械厂);自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂BSZ-160);衡流泵(上

海沪西分析仪器厂HL-2型);核酸蛋白检测仪(上海琪特分析仪器有限公司HD-21-88);记录仪(LM14A-Y(t),上海大华仪表厂)。

1.2 酶源制备

家蝇最初采自福州,为福建省农业科学院植物保护研究所室内长期饲养的种群。取羽化3 d的家蝇成虫(雌雄比1:1),置于-20℃冻箱中冰冻致死,取出称重后,加入等质量的PBS(0.01 mol·L⁻¹,pH7.2)缓冲液,研磨后加入适量的PBS,在4℃下搅拌24 h,8 000 g 4℃离心15 min,分离上清液,沉淀物用上述方法重复抽提一次。将两次所得的上清液混合后,在4℃下搅拌24 h,8 000 g 4℃离心15 min,收集上清液即为粗酶提取液。

1.3 CEA的制备

参照Massoulie等^[8]方法,称5 g 3-二甲基氨基苯甲酸和50 mL丙酮于250 mL圆底烧瓶中,加入10 mL乙基碘溶解,混合物在60℃条件下搅拌24 h。

1.4 手臂的偶联

参照Massoulie等^[8]方法,取2 g CNBr-Sephadex 4B加入偶联缓冲液(10.9 g Na₂CO₃+8.4 g NaHCO₃+1 L水,pH 10)10 mL,再加过量已熔1,6-己二胺4 mL,用HCl(0.1 mol·L⁻¹)将pH调至10,在室温搅拌过夜(勿用磁力搅拌器),用乙醇胺5 mL(1 mol·L⁻¹,pH 8.0)温育以封闭残余的活性基团,搅匀后在室温静置12 h,用蒸馏水洗3~5遍。

1.5 配体与手臂偶联

参照Massoulie等^[8]方法,取0.2 g CEA溶解于NaOH,加到10 mL上述处理过的CNBr-Sephadex 4B中,悬于蒸馏水中,用HCl(0.1 mol·L⁻¹)将pH值调至4,偶联反应在室温中进行24 h,加1 mL乙酸酐进行乙酰化,降低自由氨基之间的离子交换作用,用8 mol NaOH溶液将pH保持在4~6之间,室温反应12 h,然后凝胶依次用过量的蒸馏水,1 mol NaCl和蒸馏水冲洗,即为亲和凝胶。

1.6 乙酰胆碱酯酶纯化

参照Massoulie等^[8]方法,将上述凝胶装柱(长×直径=7.5 cm×1.5 cm)后用3个柱体积PBS洗脱,加样后先用0.4 mol·L⁻¹ NaCl的PBS洗脱4~6个柱体积,再用含0.2%四乙基碘化铵的PBS洗下AChE,洗脱3个柱体积,最后用2 mol·L⁻¹ NaCl的PBS缓冲液洗脱,以除去残留的AChE和其他蛋白质。洗脱速度稳定为26 mL·h⁻¹,每6 min收集一管,每管收集2.6 mL。整个实验过程温度控制在4℃左右。

1.7 蛋白质含量的测定

参照 Bradford^[9]记述的考马斯亮蓝 G-250 染色法测定,以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.8 乙酰胆碱酯酶活性测定

参照 Ellman^[10]、Zhu 等^[11]的终点法测定 AChE 的活性。反应体系为 2.55 mL pH 7.0 的 PBS 缓冲液 酶液 200 μL , 75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATChI 50 μL 和 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTNB 100 μL , 在 27 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 15 min, 然后加 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 毒扁豆碱 100 μL 终止反应。用 UV-1600 型分光光度计在 412 nm 波长下测定 OD 值, 设置 3 次重复。

1.9 不同温度、pH 值、ATChI 和 DTNB 对 AChE 活性的影响

采用 Ellman^[10]、Zhu 等^[11]的终点法测定不同水浴温度对 AChE 酶活的影响。分别在 5 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、45 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$ 、85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下测定纯化前后 AChE 活性。

采用 Ellman^[10]、Zhu 等^[11]的终点法测定在不同 pH 值对 AChE 酶活的影响。分别在 pH 为 5.0、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0、9.0 PB 缓冲反应体系中测定纯化前后 AChE 活性。

采用 Ellman^[10]、Zhu 等^[11]的终点法测定 ATChI 不同浓度对纯化前后 AChE 酶活的影响。反应 ATChI 浓度分别为 750、830、940、1 070、1 250、1 500、1 870、2 500、3 750、7 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

采用 Ellman^[10]、Zhu 等^[11]的终点法测定不同 DTNB 浓度对纯化前后 AChE 酶活的影响。DTNB 反应浓度分别为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.10 杀虫剂抑制作用测定方法

反应体系为 300 μL , 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATChI 100 μL , 0.45 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTNB 100 μL , 酶量分别为 10、20、40、

60、80 μL , 在 96 孔酶标板中依次加样后, 用酶标仪 (Multiskan MK3, Thermo Electron Corporation) 测定并记录在 405 nm 波长下的光密度值, 以酶量 (mL) 为自变量, 以 OD 值为纵坐标, 求酶活力曲线, 计算乙酰胆碱酯酶的比活力 $\text{OD}_{405} \cdot (\text{mgPr} \cdot 15 \text{ min})^{-1}$ 。酶活力单位 (U) 定义为单位时间内每毫克蛋白催化 1 毫摩尔底物 (ATChI) 的酶量, 表示为每毫克蛋白单位时间内 OD 值的变化。杀虫剂抑制试验中以不同浓度溶液代替缓冲液, 在室温下抑制 3 min 后, 加入底物、显色剂后测定 OD 值, 每个药剂至少设置 8 个浓度, 根据下式计算抑制率, 按 Finney 机率值分析法^[13]求得斜率 (b 值)、抑制中浓度 (IC_{50}) 和 95% 置信区间 (95% CI), 统计分析用 Polo 软件^[13],

抑制率 (%) = $[(\text{对照酶活力值} - \text{处理组酶活力值}) / \text{对照酶活力值}] \times 100$

2 结果与分析

2.1 AChE 的 CEA 亲和层析纯化

从 AChE 的洗脱曲线 (图 1) 可见, CEA 亲和层析有 2 个洗脱峰, 用 0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的 PBS 洗脱下来洗脱次峰为没有被配体结合的 AChE, 出现在第 19 组分; 用含 0.2% 四乙基碘化铵的 PBS 洗下主峰为结合到亲和柱上的 AChE, 出现在第 37 组分, CEA 纯化倍数 672.36, 产率为 34.68% (表 1)。

2.2 不同温度对 AChE 活性的影响

从图 2 可以看出, 当温度低于 35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 粗酶和纯酶状态的 AChE 活性均随着温度的升高而增加, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 反应条件下, AChE 的活性达到最高, 随后 AChE 的活性随着温度的升高反而呈下降趋势, 说明高温对 AChE 有抑制作用, 可能是由于高温使蛋白产生变性。

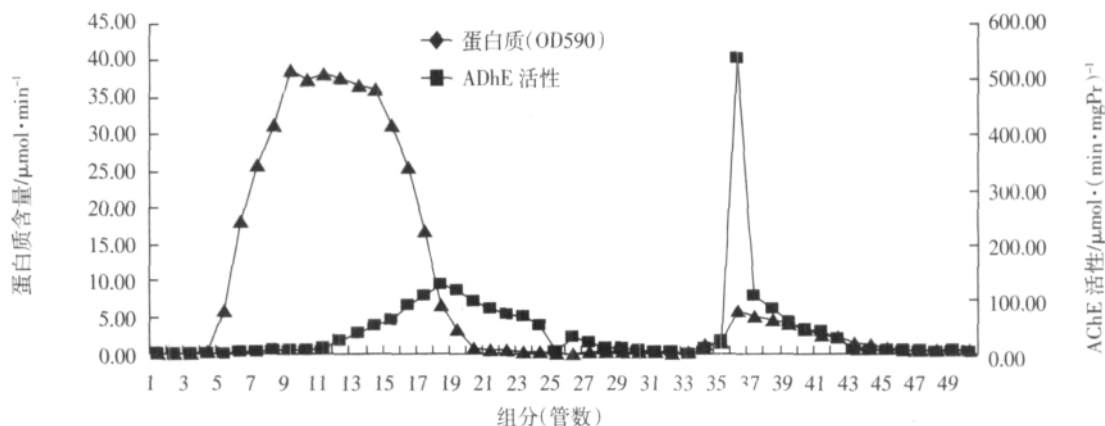


图 1 CEA 亲和层析纯化家蝇 AChE

Figure 1 CEA affinity chromatography of AChE from housefly *Musca domestica*

表 1 CEA 亲和层析纯化家蝇 AChE
Table 1 CEA affinity chromatography of AChE from housefly *Musca domestica*

酶	体积/mL	蛋白浓度/mg·mL ⁻¹	总蛋白/mg	总活力/ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$	比活力/ $\mu\text{mol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mgPr})^{-1}$	产率/%	纯化倍数
粗酶	100	1.66	166	138.37	0.83	100.00	1.00
纯酶	20	0.43	8.6	4 799.31	558.06	34.68	672.36

注 (1) 产率为纯化后酶的总活性与粗酶样品总活性的比值 (2) 纯化倍数等于纯化后酶的比活力与粗酶样品比活力的比值。

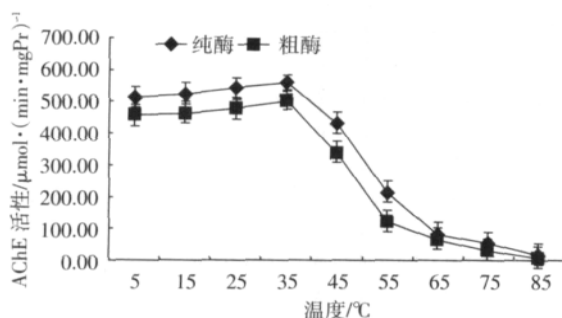


图 2 温度对纯化前后 AChE 活性的影响

Figure 2 Effect of temperature on the activities of crude extract and purified AChEs from housefly *Musca domestica*

2.3 不同 pH 值对 AChE 活性的影响

从图 3 可见, AChE 粗酶(当 $\text{pH} \leq 7.8$ 时)和纯化酶(当 $\text{pH} \leq 7.2$ 时)的活性随着 pH 升高而增加, 当 $\text{pH}=7.2$ 时, 纯化 AChE 的活性最高, 随后随着 pH 的升高 AChE 的活性反呈下降趋势; 当 $\text{pH}=7.8$ 时, 粗酶 AChE 活性最高, 当 $\text{pH}>7.8$ 时, 活性呈下降趋势。

2.4 不同 ATChI 浓度对 AChE 活性的影响

从图 4 可见, 随着底物浓度的增大, 粗酶和纯化的 AChE 活性明显增加。当底物浓度 $2\,500\,\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 纯化 AChE 活性达到最大值; 而当底物浓度为 $1\,500\,\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 粗酶反应速度达到最大值, 随后酶活性基本保持不变。

2.5 不同 DTNB 对 AChE 活性的影响

从图 5 可见, 当 DTNB 浓度为 $0.005\sim 0.2\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 粗酶和纯化的 AChE 活性随着 DTNB 浓度的增加

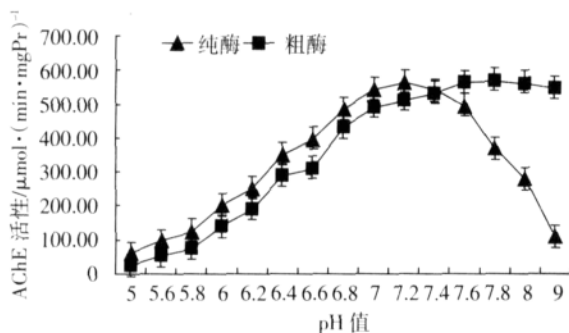


图 3 pH 对纯化前后家蝇 AChE 活性的影响

Figure 3 Effect of pH on the activities of crude extract and purified AChE from housefly *Musca domestica*

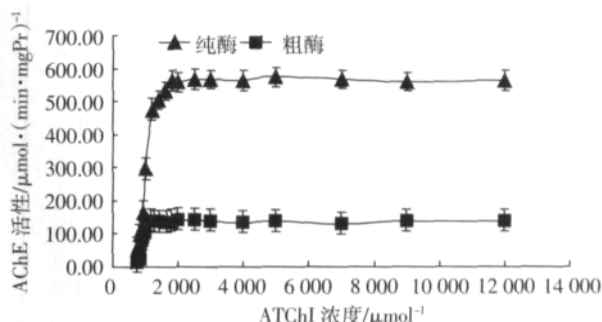


图 4 不同 ATChI 浓度对纯化前后家蝇 AChE 活性的影响

Figure 4 Effect of ATChI on the activities of crude extract and purified AChEs from housefly *Musca domestica*

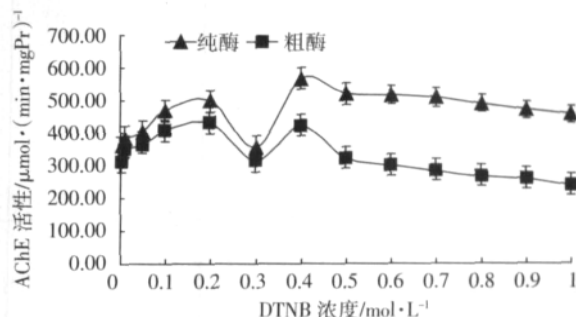


图 5 不同 DTNB 浓度对纯化前后家蝇 AChE 活性的影响

Figure 5 Effect of DTNB on the activities of crude extract and purified AChEs from housefly *Musca domestica*

而增加, DTNB 为 $0.2\sim 0.4\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, AChE 活性变化比较大, 其中两个波峰出现在 DTNB 浓度为 $0.2\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.4\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 以后随着 DTNB 浓度的升高, 酶活性逐渐下降。

2.6 乙酰胆碱酯酶粗酶与纯酶对杀虫剂的敏感性

从表 2 可见, 12 种杀虫剂对纯酶和粗酶的 AChE 抑制程度不一致, 其中仲丁威、乙酰甲胺磷、速灭威、甲胺磷、毒死蜱、克百威、抗蚜威、灭多威和辛硫磷 9 种杀虫剂对纯酶和粗酶 AChE 的 IC_{50} 比值都大于 6, 甲萘威对纯酶和粗酶 AChE 的 IC_{50} 比值为 4.826, 二嗪磷的为 1.184, 三唑磷的为 0.099。

3 讨论

在酶抑制许多实验中, IC_{50} 常用来表示酶对农药的敏感性。李少南等^[14]报道, 纯酶对农药的敏感性要显著高于粗酶状态的 BChE, 纯酶更易受抑制, Li 与

表 2 杀虫剂对 FAAS 种群家蝇头部不同纯度 AChE 的抑制作用
Table 2 Inhibition of insecticides to crude extract and purified AChE activities of housefly head

药剂名称	纯酶	粗酶	IC ₅₀ 比值 粗酶/纯酶
	IC ₅₀ (95%CI)/ mg·L ⁻¹	IC ₅₀ (95%CI)/ mg·L ⁻¹	
仲丁威	0.035 (0.032~0.038)	0.270 (0.235~0.310)	7.714
乙酰甲胺磷	0.200 (0.165~0.242)	1.480 (1.218~1.797)	7.400
速灭威	0.590 (0.514~0.677)	3.659 (3.058~4.377)	6.202
甲胺磷	0.039 (0.034~0.044)	0.231 (0.201~0.265)	5.923
毒死蜱	0.054 (0.051~0.057)	0.301 (0.277~0.326)	5.574
克百威	0.026 (0.025~0.026)	0.135 (0.128~0.143)	5.192
抗蚜威	0.417 (0.398~0.436)	2.156 (2.032~2.289)	5.170
灭多威	0.018 (0.016~0.021)	0.090 (0.074~0.110)	5.000
辛硫磷	0.004 (0.004~0.005)	0.020 (0.017~0.023)	5.000
甲萘威	0.023 (0.020~0.026)	0.111 (0.102~0.121)	4.826
三唑磷	0.031 (0.029~0.034)	0.058 (0.053~0.064)	1.871
二嗪磷	0.038 (0.035~0.042)	0.045 (0.042~0.049)	1.184

Hang^[15]研究表明,甲胺磷对抗性棉蚜 AChE 纯酶和粗酶的 IC₅₀ 比值为 6.43,而抗蚜威对它们 IC₅₀ 的比值为 11.73,说明 AChE 的纯酶更为敏感。从本文研究结果可看出,家蝇纯酶对不同杀虫剂敏感性都高于粗酶,而且对不同杀虫剂的 IC₅₀ 比值不一样,这可能与家蝇活体的药剂敏感性有关^[5]。

一些学者认为,由于 IC₅₀ 值的大小除了与抑制剂的种类、酶对抑制剂的敏感性,还与参加反应的酶量以及环境因素等有关;在农药与酶的试验中,不同实验所得的 IC₅₀ 值,可能由于在反应中加入酶的数量不同而不具可比性,即使在同一实验中加入相同量的蛋白质,其结果也是没有可比性的,所以用 IC₅₀ 值大小比较不同实验或同一实验不同纯度样品中的 AChE 对抑制剂敏感性的方法是不合理的^[16]。在总体上,家蝇成虫活体对不同供试药剂的敏感程度与家蝇成虫头部的 AChE 的敏感性相似^[5],而利用纯化 AChE 进行测定使得 IC₅₀ 作为评价指标更加合理。

参考文献:

[1] Kardos S A, Sultatos L G. Interactions of the organophosphates paraoxon

and methyl paraoxon with mouse brain acetylcholinesterase[J]. *Toxico Sci*, 2000, 58 :118-126.

[2] Rosenfeld C, Kousba A, Sultatos L G. Interactions of rat brain acetylcholinesterase with the detergent Triton X-100 and the organophosphate paraoxon[J]. *Toxicol Sci*, 2001, 63 :208-213.

[3] Shi M A, Yuan J Z, Wu J, et al. Studies on the kinetics of acetylcholinesterase in the resistant and susceptible strains of housefly(*Musca domestica*)[J]. *Entomol Sinica*, 2001, 8(1) :30-38.

[4] 余孝颖. 有机磷农药对不同生物来源的胆碱酯酶选择性抑制的研究[J]. *环境科学*, 1996, 17(4) :41-43.

YU Xiao-ying. The selective inhibition of organophosphorus pesticides to acetylcholinesterase from different biological sources[J]. *Environmental Science*, 1996, 17(4) :41-43.

[5] 魏 辉, 沈晋良, 吴 玮, 等. 三个家蝇种群及其乙酰胆碱酯酶对杀虫剂的敏感性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(3) :1054-1058.

WEI Hui, SHEN Jin-liang, WU Wei, et al. Susceptibility of three housefly(*Musca domestica* L.) populations and their AChE to insecticides[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(3) :1054-1058.

[6] Gao J R, Zhu K Y. An acetylcholinesterase purified from the greenbug (*Schizaphis Graminum*) with some unique enzymological and pharmacological characteristics[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 31 :1095-1104.

[7] Devonshire A L, Moores G D. A Carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate and pyrethroid resistance in Peach Potato Aphids (*Myxus persicae*) [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1982, 18 :235-246.

[8] Massoulié J, Bon S. Affinity chromatography of acetylcholinesterase: the importance of hydrophobic interactions[J]. *Eur J Biochem*, 1976, 68 :531-539.

[9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72 :248-254.

[10] Ellman G L, Courtney K D, Andres V, et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 1961, 7 :88-95.

[11] Zhu K Y, Clark J M. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the colorado potato beetle, *Leptinota decemlineata* (Say)[J]. *Insect Biochem MolBio*, 1994, 24(5) :453-461.

[12] Finney D J. Probit analysis, third ed[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

[13] LeOra Software. POLO-PC: Probit and Logit Analysis [CP]. LeOra Software Berkeley, CA. 1997.

[14] 谢显传, 李少南, 朱国念, 等. 淡水鱼脑 ACHE 的动力学特性及抑制性[J]. *中国环境科学*, 2003, 23(3) :285-289.

XIE Xian-chuan, LI Shao-nan, ZHU Guo-nian, et al. Kinetic characters and inhibition resistibility of brain ACHE of freshwater fish[J]. *China Environmental Science*, 2003, 23(3) :285-289.

[15] Li F, Han Z J. Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid, *aphis gossypii* glover[J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2002, 51(1) :37-45.

[16] 谢显传, 李少南, 朱国念, 等. 麦穗鱼脑乙酰胆碱酯酶(AChE)的纯化及其比较性质研究[J]. *农药学报*, 2003, 5 :45-50.

XIE Xian-chuan, LI Shao-nan, ZHU Guo-nian, et al. Purification of brain acetylcholinesterase(AChE) from *Topmouth gudgeon* and comparative study between crude and purified AChE[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2003, 5 :45-50.