

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.03.037

# 东亚飞蝗乙酰胆碱酯酶的分离纯化与 农药活性筛选初步研究

邓园杰, 张肖肖, 高甜甜, 陶 科, 金 洪, 侯太平  
(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

**摘 要:** 采用亲和层析法对东亚飞蝗(*Locusta migratoria*) 脑组织的乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)进行分离纯化, 纯化倍数为 474.81 倍, 产率为 28.93%, 此酶经过 SDS-PAGE 呈一条带, 达到电泳纯, 相对分子质量约为 67.22kDa. 同时测定了课题组前期合成的 24 种呋喃酮类似物对该乙酰胆碱酯酶的抑制活性和对 RP-HzVNC-AW1(AW1)细胞的毒力, 并分析其相关性. 结果表明: 在 24 种呋喃酮类似物中, 对 AChE 有抑制作用的化合物有 19 种, 对 AW1 细胞有增殖抑制作用的有 13 种. 结果还显示, 属于第 II 类化合物的细胞毒力与 AChE 抑制活性关联性好于其它两类, 其中 II<sub>3</sub> 化合物, 在 100mg/L 的浓度下, AChE 抑制率为 (80.94±3.09)%; 在 50mg/L 的浓度下, 对 AW1 的细胞毒力为 (95.01±2.24)%.

**关键词:** 乙酰胆碱酯酶; 亲和层析; 活性筛选; MTT 法

**中图分类号:** S482.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2018)03-0637-06

## Purification of acetylcholinesterase from *Locusta migratoria* and preliminary study on pesticide screening

DENG Yuan-Jie, ZHANG Xiao-Xiao, Gao Tian-Tian, TAO Ke, JIN Hong, HOU Tai-Ping  
(Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment of Ministry of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** AChE was purified by affinity chromatography from *Locusta migratoria* head. The purification factors and yields were 474.81-fold and 28.93%, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was 67.22kDa, measured by SDS-PAGE. The inhibitory activity of 24 furanone analogs against AChE and the toxic effect against RP-HzVNC-AW1(AW1) were measured, then the relevance of cytotoxicity and inhibitory effects was discussed. The results showed that 19 compounds had inhibitory effects on AChE and 13 compounds with cytotoxicity on AW1 cells. Compound II had shown better relevance to AChE activity with cytotoxicity. The AChE inhibition rate of II<sub>3</sub> was (80.94 + 3.09)% under the concentration of 100 mg/L and cytotoxicity activities was (95.01±2.24)% under the concentration of 50 mg/L.

**Keywords:** Acetylcholinesterase; Affinity chromatography; Activity screening; MTT

收稿日期: 2017-04-07

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目子课题(2016YFC0502004)

作者简介: 邓园杰(1993-), 女, 湖南衡阳人, 硕士. E-mail: 1536165921@qq.com

通讯作者: 侯太平. E-mail: houtplab@scu.edu.cn

## 1 引言

世界上蝗虫的种类多达一万种以上,在我国分布最广泛、危害最大的三个亚种分别是东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis* Meyen)、亚洲飞蝗(*Locusta migratoria migratoria* Linnaeus)和西藏飞蝗(*Locusta migratoria tibetensis* Chen)<sup>[1]</sup>,其中东亚飞蝗的成灾最为严重,发生最频繁.东亚飞蝗主要分布于我国华北和江淮等平原地区,华北湖库、环渤海湾和黄河滩区等主要蝗区的年均发生面积为 134.0 万  $\text{hm}^2$ <sup>[2]</sup>.东亚飞蝗的防治是蝗虫防治的重点.

神经系统是最主要的害虫控制靶标,约 90%左右的杀虫剂都具有较强的神经毒性<sup>[3]</sup>.乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)为昆虫神经系统的一种重要酶系,是有机磷农药和氨基甲酸酯农药的重要作用靶标.但是随着该类杀虫剂的大量使用,昆虫体内的 AChE 对杀虫剂的敏感性降低,从而导致昆虫对该类型杀虫剂产生了不同程度的抗性.同时由于部分杀虫剂具有高毒性,目前已经被限制使用.因此寻找新的对乙酰胆碱酯酶具有抑制活性的农药化合物有着重要的意义.

在建立微量筛选模型对农药化合物进行高通量筛选时,由于不同的昆虫体内的乙酰胆碱酯酶的结构存在一定的差异,一个物种的乙酰胆碱酯酶抑制测定的结果并不能完全代替另一个物种<sup>[4]</sup>,且目前并无以东亚飞蝗乙酰胆碱酯酶作为酶源的试剂盒.同时由于粗酶液中含有多种其他酶类,如可以水解农药的解毒酶和能够作为 AChE 替代靶标的脂酶<sup>[5]</sup>,这些会影响实验结果,出现漏筛.因此将东亚飞蝗的 AChE 进行分离纯化后用于化学药物筛选可以筛选出针对蝗虫靶向性更强的先导化合物.

本文运用亲和层析的方法对东亚飞蝗头部的乙酰胆碱酯酶进行分离纯化,并以其作为酶源对本实验室合成的 24 种咪喃酮类似物进行乙酰胆碱酯酶抑制活性测定,同时利用 MTT 法测定了化合物对神经细胞 AW1 的细胞活性,选取对 AChE 和 AW1 细胞均具有较高活性的化合物测定其对东亚飞蝗的活体活性,并探讨了这类化合物的 AChE 活性、AW1 细胞活性和活体活性的关联性,旨在建立酶-细胞-活体杀虫活性相互关联的农药活性筛选方法,以期为新的农药杀虫剂的筛选与创制研究提供参考.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

2.1.1 供试昆虫、细胞 东亚飞蝗(*Locusta migratoria*)由本实验室饲养,温度  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照 12L:12D、15%相对湿度,每天喂养新鲜的小麦叶和少量干麸.

昆虫细胞为美洲棉铃虫(*Helicoerpa zea*)腹神经索细胞 RP-HzVNC-AW1(AW1),获赠于美国农业部生物防治实验室,本实验室培养.

2.1.2 供试试剂、仪器 24 种咪喃酮类似物由本实验室前期合成;Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司;二硫代二硝基苯甲酸(DTNB),硫代乙酰胆碱(ATChI),四乙基碘化铵( $\text{Net}_4\text{I}$ ),盐酸普鲁卡因胺(procainamide)均购自 SIGMA 公司;BCA 蛋白含量测定试剂盒,购自康为世纪公司;SDS-PAGE 蛋白凝胶试剂盒,购自 Solarbio 公司;其他化学试剂均购自成都科龙化学试剂厂,均为分析纯等级.

仪器主要包括有:ELx800 酶标仪,美国 BioTek 有限公司;BT100-2J 蠕动泵,LongerPump 有限公司;BSZ-160 型自动部分收集器,HD-4 电脑紫外检测仪,上海沪西分析仪器.

### 2.2 方法

2.2.1 乙酰胆碱酯酶的纯化 取东亚飞蝗成虫的头部,称重,用液氮研磨成粉末后转移到匀浆器中,以 1g:10mL 的比例加入匀浆液(pH8.0,0.1M 的 PB 溶液内含 0.6M NaCl,0.5mM EDTA- $\text{Na}_2$ ,1% Triton X-100,1mM PMSF),冰浴匀浆,匀浆液于  $4^\circ\text{C}$ ,11000r/min 离心 30min,共离心两次,取上清用砂芯漏斗过滤去除脂肪.

制备 CNBr-Sepharose 4B 柱<sup>[7,8]</sup>,偶联配体盐酸普鲁卡因胺,脱气后,装柱.粗酶液样品上亲和柱(1.9cm $\times$ 6.0cm)后,用含 0.3M  $\text{Net}_4\text{I}$  的 PST 缓冲液(pH7.5,0.1M PB 溶液中含有 0.05M NaCl 和 0.05% Triton X-100)洗脱 AChE,流速 30mL/h(每 3min 收集一管).测定各管的 AChE 酶活性及蛋白含量,合并酶活性最高的 5 管,透析后备用.整个纯化过程均在  $4^\circ\text{C}$  下进行.

2.2.2 酶活性测定 实验参考 Ellman<sup>[10]</sup>的方法并进行改进.以碘代硫化乙酰胆碱(ATChI)为底物,二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)为显色剂,4%的 SDS 为终止剂.首先,在反应体系中的待测孔内,每孔内加入 50 $\mu\text{L}$  的待测酶液,再加入 50 $\mu\text{L}$  0.1M pH7.5 的 PB 溶液,10 $\mu\text{L}$  5mM 的 ATChI,10 $\mu\text{L}$

5mM的DTNB,30℃水浴20min后,加入100 $\mu$ L 4%SDS溶液终止反应,静置5min,用酶标仪在405nm处测定其酶活.对照孔先加入4%SDS使酶失活后,再加入底物进行反应.

$$\text{AChE活力}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta\text{OD}}{t} \times \frac{V}{v \times L \times e}$$

$V$ 为反应体系总体积( $\mu$ L), $e$ 为摩尔消光系数, $v$ 为反应体系中加入样品量( $\mu$ L), $L$ 为光径(cm), $\Delta\text{OD}$ 为吸光度变化, $t$ 为反应时间(min).

2.2.3 蛋白质含量测定 采用BCA蛋白测定试剂盒微孔测定法测定蛋白含量.

2.2.4 SDS-PAGE电泳 采用SDS-PAGE电泳试剂盒灌制5%的浓缩胶和10%的分离胶,电泳在室温条件下进行.

2.2.5 24种咪喃酮类似物对AChE的抑制作用研究 用DMSO配置各农药化合物的母液,反应终浓度为100mg/L,按2.2.2方法测定酶活并按下列公式计算抑制率和校正抑制率,每处理重复3次,并计算平均值和标准偏差.阳性对照为灭多威,阴性对照用溶剂代替药物,空白组用PB代替药物.空白对照组和样品对照组均先加入4%SDS使酶失活后再加入底物进行反应.

$$\text{抑制率 } E(\%) = \frac{A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白}}} \times 100$$

$$\text{校正抑制率 } I(\%) = \frac{E - E_0}{1 - E_0} \times 100$$

注: $A_{\text{空白}}$ 为空白组与空白对照组的 $\text{OD}_{405}$ 差值, $A_{\text{样品}}$ 为样品组与样品对照组的 $\text{OD}_{405}$ 差值, $E$ 为药品抑制率, $E_0$ 为溶剂抑制率.

用上述方法进行活性初筛后,取校正抑制活性最高的化合物再将其稀释成八个浓度梯度(200mg/L-0.0064mg/L),按照上述方法测定其 $\text{IC}_{50}$ 值.

2.2.6 化合物对AW1细胞的MTT法毒力测定

取对数生长期的细胞,按照本实验室建立的MTT活性测定方法<sup>[11]</sup>,测定化合物对神经细胞AW1的细胞活性.药品终浓度为50mg/L.按照如下公式计算细胞抑制率,每处理重复3次,并计算平均值及标准偏差.阳性对照为灭多威.

$$\text{细胞抑制率}(\%) =$$

$$\frac{\text{空白对照组 } \text{OD}_{490} - \text{实验组 } \text{OD}_{490}}{\text{空白对照组 } \text{OD}_{490}}$$

2.2.7 化合物对东亚飞蝗生物活性测定法 选取健康且虫体大小一致的东亚飞蝗3龄幼虫作为实验材料,采用浸渍法<sup>[11,12]</sup>测定对AChE和AW1细胞均具有较高抑制活性的一类化合物对东亚飞蝗的触

杀活性.药品浓度为1000mg/L.东亚飞蝗每组20头,共设3次重复,处理120h后记录死亡情况,按如下公式计算各处理的校正死亡率,并计算平均值.用不加药的溶剂作为空白对照,阳性对照为灭多威.

$$\text{校正死亡率}(\%) =$$

$$\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100$$

### 3 结果与分析

#### 3.1 蝗虫头部AChE纯化与效果

东亚飞蝗头部AChE的亲的和层析结果见图1所示,纯化指数如表1所示.纯化倍数为474.81倍,纯化回收率为28.93%.SDS-PAGE电泳图谱如图2所示,呈一条带,初步表明经过亲和和层析后所得的酶液达到电泳纯,其相对分子量约为67.22kDa.

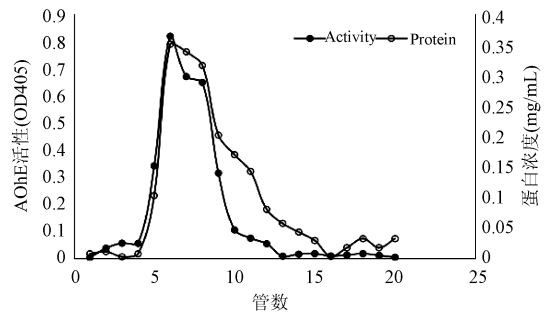


图1 亲和层析提纯东亚飞蝗AChE  
Fig.1 Affinity chromatography of AChE from *Locusta migratoria*

表1 东亚飞蝗头部AChE的纯化指数

Tab.1 Purification results of AChE from *Locusta migratoria*

过程	总蛋白(mg)	比活力( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	总活性( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	收率(%)	纯化指数
粗酶样品	1724.45	0.021	35.78	1	1
亲和层析	1.038	9.971	10.35	28.93%	474.81

#### 3.2 24种咪喃酮类似物的AChE抑制活性和细胞活性

24种咪喃酮类化合物的编号与化学结构及对AChE的抑制活性和对AW1细胞毒力结果如表2、表3所示.实验结果表明,在100mg/L的浓度下,24种活性小分子化合物中,共有19种化合物对AChE产生了抑制作用,其中1-咪喃基-3-取代苯基-2,3-二溴丙酮类化合物(II)中II<sub>3</sub>化合物对东亚飞蝗AChE的抑制活性高达(80.94 $\pm$ 3.09)%,与终浓度为100mg/L的氨基甲酸酯农药灭多威对AChE的抑制率(95.69 $\pm$ 0.82)%较为接近.

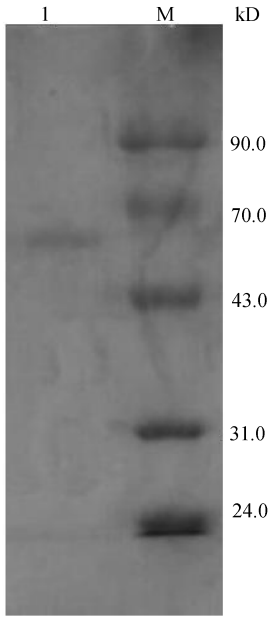


图 2 东亚飞蝗头部 AChE 的 SDS-PAGE 图谱  
I 为东亚飞蝗 AChE 的纯化条带, M 为 Maker 条带  
Fig. 2 SDS-PAGE of AChE from *Locusta migratoria*

测定 II<sub>3</sub> 化合物对 AChE 的 IC<sub>50</sub> 值及 95% 的置信区间, 所得结果为 6.756(5.531~8.252)mg/L,

相关系数 R<sup>2</sup> 为 0.948, 相比较灭多威对 AChE 的 IC<sub>50</sub> 为 1.569(1.060~2.321)mg/L, 相关系数 R<sup>2</sup> 为 0.9869, 较为接近, 表示 II<sub>3</sub> 化合物对东亚飞蝗 AChE 具有较高的抑制活性。

在药物浓度为 50mg/L 时, 24 种呋喃酮类似物中, 有 13 种化合物对 AW1 细胞具有细胞活性。其中 II 类化合物的细胞增殖抑制率总体比 I 类、III 类比偏高, 其中 6 种化合物的细胞毒力超过 85%, 分别为 II<sub>1</sub> (98.36 ± 0.34)%, II<sub>3</sub> (95.01 ± 2.24)%, II<sub>4</sub> (96.43 ± 2.66)%, II<sub>5</sub> (99.07 ± 0.32)%, II<sub>6</sub> (85.36 ± 3.52)%, III<sub>2</sub> (94.19 ± 2.61)%. II<sub>1</sub>、II<sub>3</sub>、II<sub>4</sub>、II<sub>5</sub> 与阳性对照灭多威相比较, 细胞增殖抑制率相近。

同时由表 3 可以得出: 对于农药活性小分子化合物的毒力测定结果显示, AChE 筛选法和昆虫离体细胞筛选具有一定的关联性。II 类化合物的 AChE 酶活性与细胞活性的关联性好于 I 类和 III 类化合物。尤其是化合物 II<sub>3</sub>, 其对 AChE 的抑制率为 (80.94 ± 3.09)%, 对 AW1 细胞的毒力为 (95.07 ± 2.24)%, AChE 抑制率和细胞毒力关联性尤为突出。

表 2 24 种呋喃酮类化合物结构式

Tab. 2 The structures of 24 furanone analogs

编号	化学结构式	编号	化学结构式	编号	化学结构式
I <sub>1</sub>		II <sub>4</sub>		III <sub>5</sub>	
I <sub>2</sub>		II <sub>5</sub>		III <sub>6</sub>	
I <sub>3</sub>		II <sub>6</sub>		III <sub>7</sub>	
I <sub>4</sub>		II <sub>7</sub>		III <sub>8</sub>	
I <sub>5</sub>		III <sub>1</sub>		III <sub>9</sub>	
II <sub>1</sub>		III <sub>2</sub>		III <sub>10</sub>	
II <sub>2</sub>		III <sub>3</sub>		III <sub>11</sub>	
II <sub>3</sub>		III <sub>4</sub>		III <sub>12</sub>	

表3 化合物对东亚飞蝗 AChE 的抑制活性(%)和对 AW1 细胞毒力(%)

Tab.3 The inhibition rates of compounds against AChE and AW1 cells

编号	AChE 抑制率	AW1 细胞	编号	AChE 抑制率	AW1 细胞	编号	AChE 抑制率	AW1 细胞
I <sub>1</sub>	21.66±0.93	0	II <sub>4</sub>	30.78±4.94	96.43±2.66	III <sub>5</sub>	0	1.59±1.43
I <sub>2</sub>	13.64±4.06	0	II <sub>5</sub>	18.24±8.04	99.07±0.32	III <sub>6</sub>	2.38±1.78	0
I <sub>3</sub>	9.85±1.36	0	II <sub>6</sub>	19.24±3.99	85.36±3.52	III <sub>7</sub>	8.26±2.00	2.95±2.41
I <sub>4</sub>	18.40±0.96	0	II <sub>7</sub>	3.17±4.81	3.92±3.19	III <sub>8</sub>	5.71±2.03	0
I <sub>5</sub>	21.95±0.54	0	III <sub>1</sub>	0	18.20±2.52	III <sub>9</sub>	12.01±2.26	36.03±1.39
II <sub>1</sub>	36.48±4.65	98.36±0.34	III <sub>2</sub>	0	94.19±2.61	III <sub>10</sub>	4.60±4.21	0
II <sub>2</sub>	42.18±1.85	84.84±3.08	III <sub>3</sub>	0	3.69±3.69	III <sub>11</sub>	9.21±2.09	0
II <sub>3</sub>	80.94±3.09	95.01±2.24	III <sub>4</sub>	0	0	III <sub>12</sub>	5.47±3.48	0

注:结果表示为平均值±标准差(n=5),灭多威对 AChE 的抑制率为(95.69±0.82)%,对 AW1 细胞增殖抑制率为(99.18±0.62)%。

### 3.3 II类化合物对东亚飞蝗活体活性研究

由于II类化合物对东亚飞蝗 AChE 的抑制活性和对 AW1 细胞毒力均好于其它两类,故本实验对II类化合物对东亚飞蝗的活体活性进行了研究.在II类化合物终浓度为 1000mg/L 时,处理 120h 后,其校正死亡率分别为 II<sub>1</sub>18.75%、II<sub>2</sub>40.63%、II<sub>3</sub>37.5%、II<sub>4</sub>43.75%、II<sub>5</sub>18.75%、II<sub>6</sub>15.63%、II<sub>7</sub>18.75%。II类化合物对东亚飞蝗均具有一定的杀虫活性,其中 II<sub>4</sub> 化合物的校正死亡率最高为 43.75%。与表 3 的实验数据相比较可以得出,该类化合物的活体活性与 AChE 抑制活性、细胞活性具有一定的相关性。

## 4 讨论

东亚飞蝗头部的粗酶液中除 AChE 外还含有许多其他的蛋白,这些蛋白在实验中可能会降解 AChE 的抑制剂或者作为结合蛋白使抑制剂的有效浓度降低,从而对 AChE 的抑制剂研究产生一定的干扰<sup>[5]</sup>,从而导致药物对 AChE 的敏感性降低,在药物的高通量筛选中出现漏筛.因此在研究化合物对 AChE 的作用需要将 AChE 进行分离提纯.在乙酰胆碱酯酶的筛选模型中,由于生物化学和遗传的多样性,不同来源的乙酰胆碱酯酶差异性较大,一种来源的酶的抑制测定结果很难代表另一类,因此在研究农药对乙酰胆碱酯酶的抑制作用时,最好用研究对象来制备酶源<sup>[4]</sup>.因此本实验用东亚飞蝗作为实验对象,用经分离纯化后的乙酰胆碱酯酶做酶源来研究化合物对东亚飞蝗乙酰胆碱酯酶的活性抑制作用,以筛选对东亚蝗虫的 AChE 具有强靶向性的化合物。

AChE 纯化方法与蛋白纯化方法相同,常用的方法有凝胶过滤,离子交换层析法和亲和层析法。

高希武<sup>[13]</sup>分别用 Sepharose 4B 和 Sepharose G-200 凝胶过滤层析法对棉铃虫 AChE 进行分离纯化,纯化效果分别为 3.66 和 17.74 倍;朱小山用 Procainamide 亲和层析法分别对鲑鱼<sup>[14]</sup>、黄鱼<sup>[15]</sup> AChE 纯化效果可达 415 和 252 倍;魏辉<sup>[16]</sup>运用 CEA 亲和层析法对家蝇的 AChE 纯化效果为 672.36 倍;何绍志<sup>[17]</sup>,王晓娜<sup>[18]</sup>用 Procainamide 亲和层析法纯化美洲蟑、桔小实蝇 AChE 纯化效果为 172.04 倍和 561 倍.本实验采用 Procainamide 亲和层析法纯化东亚飞蝗的 AChE,纯化倍数可达 474.81,回收率达到了 28.93%,纯化效果较为理想,为下一步研究化合物对东亚飞蝗乙酰胆碱酯酶的抑制活性提供了筛选工具。

Ellman 法、MTT 法和活体测定法是三种常用于筛选农药活性物质的方法.本文旨在通过测定 24 种咪喃酮类似物对东亚飞蝗 AChE、AW1 神经细胞及东亚飞蝗活体活性的影响,来检测这三种筛选方法的关联性.经研究发现,II类农药小分子化合物具有一定的相关性.但同时部分化合物在 AChE 酶活性、AW1 细胞毒力及活体活性上存在差异,其原因可能有以下几点:第一,MTT 法是基于细胞水平的筛选,活体筛选是基于生物活体的筛选,均为多靶标位点筛选法,MTT 法筛选出的化合物的主要是呼吸、核酸和蛋白质合成抑制剂等<sup>[11]</sup>,活体筛选中药物的作用靶标包括有神经、呼吸、消化等作用靶标,同时药物既可以作用于单一靶标也可以作用于多个靶标,但 AChE 离体抑制活性筛选筛选出的为以 AChE 为作用靶标的专一性抑制剂.第二,由于蝗虫的细胞系较难获得,因此本实验选来自于美洲棉铃虫(鳞翅目)的 AW1 细胞进行毒力筛选,而 AChE 来源于东亚飞蝗(直翅目),不同种属昆虫细胞、酶存在着一定的差异

性.第三,昆虫活体中存在着血脑屏障和脂肪体细胞,可以阻止药物的进入,因此对细胞或酶有抑制作用的物质不一定能够直接接触到靶标,从而导致活性出现差异<sup>[19]</sup>.但如何更准确的进行活性筛选,则尚需进一步进行深入研究和探索.

本研究为下一步进行Ⅱ类化合物的结构优化和活性筛选起到了一定的指导作用,也为以东亚飞蝗乙酰胆碱酯酶为靶标的农药抑制剂的快速筛选提供了方法和数据支持.

### 参考文献:

- [1] 冯晓东,吕国强.中国蝗虫预测预报与综合防治[M].北京:中国农业出版社,2011.
- [2] 黄冲,刘万才.近10年我国飞蝗发生特点分析与防控建议[J].中国植保导刊,2016,36:49.
- [3] 巨修练,刘安昌,祝宏,等.作用于昆虫神经系统杀虫剂的选择性与安全性[J].世界农药,2010,32:28.
- [4] 黄晓,滕云,陶科,等.天然产物对家蚕乙酰胆碱酯酶抑制作用研究[J].四川动物,2008,27:327.
- [5] 彭霞,陶科,滕云,等.农药靶标乙酰胆碱酯酶的分离纯化及性质研究[J].四川大学学报:自然科学版,2008,45:189.
- [6] 何利钦,任远航,邓园杰,等.26种咪唑啉类似物对 Sf9 细胞毒力测定与活体生物活性比较研究[J].四川大学学报:自然科学版,2015,52:403.
- [7] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000.
- [8] Dudai Y, Silman I, Shinitzky M, *et al.* Purification by affinity chromatography of the molecular forms of acetylcholinesterase present in fresh electric-organ tissue of electric eel[J]. Proc Natl Acad Sci USA 1972, 69: 2400.
- [9] Ma En Bo, He Yan-Ping, Zhu K Y. Comparative studies of acetylcholinesterases purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implications of insecticide resistance[J]. Pestic Biochem Phys, 2004, 78: 67.
- [10] Ellman G L, Courtney K D, Andre V Jr, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7: 88.
- [11] 任远航,邓园杰,金洪,等.15种吡啶啉类似物对 AW1 神经细胞毒力测定与活体生物活性比较研究[J].四川大学学报:自然科学版,2016,53:909.
- [12] 纪明山,刘周成,李修伟,等.防治草原蝗虫有效药剂的室内筛选[J].农药,2012,51:148.
- [13] 高希武,周序国,王荣京,等.棉铃虫乙酰胆碱酯酶(AChE)的体躯分布及部分纯化[J].昆虫学报,1998,41:S21.
- [14] 朱小山,孟范平,何东海.鲑鱼脑组织 AChE 的分离纯化及某些生化性质[J].青岛大学学报工程技术版,2006,21:35.
- [15] 朱小山,孟范平,何东海.黄鱼(*Hexagrammos otakii*)脑组织 AChE 的亲和层析[J].中国海洋大学学报自然科学版,2004,34:231.
- [16] 魏辉,沈晋良,吴玮,等.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[J].农业环境科学学报,2009,28:156.
- [17] 何绍志,李维,王雁,等.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[J].食品科学,2013,34:184.
- [18] 王晓娜.桔小实蝇 AChE 的分离纯化及生化毒理学特性研究[D].重庆:西南大学,2011.
- [19] 彩万志,庞雄飞,花保祯,等.普通昆虫学[M].2版.北京:中国农业大学出版社,2011.