

## 应用荧光分析法检测酶的研究进展

邢艳珑, 毛相朝, 王舒, 王华磊, 魏东芝

中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266101

**摘要:** 酶是细胞新陈代谢的基础, 酶的检测在生物技术、疾病诊断及药物开发等领域都具有十分重要的意义。在检测酶的诸多方法中, 荧光法因其灵敏度高、检测限低等优势发展迅速。以下简述了近年来荧光法在酶检测领域的研究, 根据检测方法的不同分为直接荧光检测法和间接荧光检测法, 其中直接检测法又根据不同的底物标记及检测机理进行分类。以下介绍了各种方法的应用, 并展望了此类方法的前景和发展趋势, 为酶工程及生命科学其他领域的相关研究提供信息。

**关键词:** 荧光探针, 酶, 检测

## Recent advances in enzyme assays using fluoremetry

Yanlong Xing, Xiangzhao Mao, Shu Wang, Hualei Wang, and Dongzhi Wei

*Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266101, China*

**Abstract:** Enzymes play such a pivotal role in cellular metabolism that enzyme assays are important for bio-engineering, disease diagnoses and drug discovery. Among the reported methods, fluoremetry has attracted more and more attention due to its high sensitivity and possibility of continuous dynamic monitoring. The recent progresses and applications in enzyme assays using fluorescent probes were reviewed. Different methods were classified into direct fluorescence detection and indirect fluorescence detection according to their labeled substrates and detection mechanisms. Our writing purpose is to provide the readers with a flavor of the kinds of tools and strategies available in enzyme assays with fluorescent probes. Also, the research situation and prospects were discussed.

**Keywords:** fluorescent probes, enzyme, detection

酶与生物体新陈代谢的各种化学反应紧密相关, 研究其性质及作用机理对于从分子水平研究生命现象具有重要意义。而且随着生物学与化学交叉学科的发展, 酶作为高效生物催化剂越来越受到关注, 酶工程已在生物技术领域占有重要地位<sup>[1]</sup>。酶活检测是对酶功能的检测, 可使酶催化化学转化的功能“可视化”, 是发现新酶和对酶进行表征不可或缺

的工具<sup>[2]</sup>。已报道的检测酶活的方法包括同位素标记法<sup>[3]</sup>、电化学法<sup>[4]</sup>、分光光度法<sup>[5-7]</sup>、荧光法<sup>[8-10]</sup>等, 其中分光光度法和荧光法是最大的一类检测方法。当在成分复杂的反应体系中, 酶活较低时, 就可以充分利用荧光法高度灵敏的优势<sup>[11]</sup>。而且由于荧光法操作简便需样量少, 在酶的高通量筛选方面也有重要应用。以下综述了不同荧光分析法用于检测

**Received:** October 8, 2009; **Accepted:** October 22, 2009

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724703).

**Corresponding author:** Dongzhi Wei. Tel: +86-532-80662681; Fax: +86-532-80662683; E-mail: weidz@qibebt.ac.cn

国家重点基础研究发展计划(973计划)(No. 2009CB724703)资助。

酶的研究。

## 1 直接荧光检测法

直接检测法是用修饰后的酶底物作为荧光探针,通过检测催化作用前后底物的荧光信号变化来进行。具体分为用荧光团标记的底物做探针、基于荧光共振能量转移(FRET)的荧光探针及无标记的底物探针等。

### 1.1 荧光团标记的底物作为探针

#### 1.1.1 以香豆素衍生物进行标记

目前在酶检测领域发展成熟的一种方法是以伞形酮作为底物的内置荧光团结合 $\beta$ -消除反应的检测方法<sup>[12]</sup>,伞形酮又称 7-羟基香豆素,是一种强荧光染料,以伞形酮标记底物作为探针,在酶催化作用下产物发生分子内 $\beta$ -消除反应而使底物上的伞形酮脱落,通过荧光强度的变化反映酶活。该方法被应用于检测多种酶,包括转羟乙醛酶<sup>[13]</sup>、 $\beta$ -内酰胺酶<sup>[14]</sup>等。但是在以上检测中,酶催化初级产物需要经过二次转化才可生成荧光产物,反应速度慢不利于某些酶的酶促反应动力学测定。Sicard 等<sup>[15]</sup>设计合成一系列脂肪族 2-香豆氧基酮,并以其做底物检测了重要的膜结合酶—Baeyer-Villiger 单加氧酶(BVMO)的活性。在 BVMO 作用下,2-香豆素基酮生成极不稳定的产物醚,醚可以迅速释放伞形酮。该反应无动力学延迟,而且不需辅助试剂。

进行酶的筛选时,传统的高通量法采用微量滴定板或多通道加样法,在操作时酶和底物的移液和混合难以实现准确微量操作,而且溶剂挥发和底物沉淀都会对测定造成影响。因此,Babiak 等<sup>[16]</sup>开发了一种新型的高通量酶活检测法,先将荧光底物伞形酮羧甲基醚和 4-甲基伞形酮溶解在硅胶板上并挥干。用液相层析仪自动注射器在硅胶板上均匀滴加酶液,通过酶催化作用后显现的伞形酮的蓝色荧光可筛选有活性的脂肪酶或酯酶。该方法取样量少、成本低、精确度高,能用于底物不溶于水的酯酶、底物溶于水的糖苷酶及底物为全蛋白的蛋白酶的快速、高通量检测。

#### 1.1.2 其他荧光染料进行标记

除香豆素外,其他荧光染料如可见光区的荧光

素、罗丹明及其衍生物,近红外光区的花菁等标记的底物也用作检测酶的荧光探针。

微流体技术是一种新型的检测酶的实验技术,具有节省试剂用量、提高效率、改善分析有效性等优点。Miller 等<sup>[17]</sup>在研究微流体装置检测酶的可行性时,选择荧光素磷酸酯-碱性磷酸酯酶作模型。酯酶催化底物水解释放出荧光素,通过酶标仪测荧光信号检测酶活。选用同样的酶-底物模型,Huebner 等<sup>[18]</sup>将碱性磷酸酯酶在大肠杆菌中表达,实现了皮升级微液滴中的酶活检测。

近年来,随着对活体细胞酶功能的深入研究,越来越多的荧光染料标记的底物探针被用于成像领域。Chandran 等<sup>[19]</sup>以罗丹明 110 标记的底物作荧光探针,罗丹明的氨基被邻羟基肉桂酸基取代形成内酯结构导致荧光猝灭,在酯酶的作用下,内酯水解断裂,罗丹明荧光恢复。该探针成功用于人宫颈癌细胞中具有高酯酶活性的脂质体、胞液等亚细胞区的观测。蔡荧光素在修饰后被标记于蛋白质 N 端半胱氨酸上,用于检测胞内酯酶活性<sup>[20]</sup>。Messerli 等<sup>[21]</sup>在研究能引起细胞凋亡的关键酶白介素 1 $\beta$ 转换酶(Caspase1)时,设计合成 N 端为花菁 Cy5.5 修饰的肽底物荧光探针,利用 Caspase1 可以特异性打断探针中的天冬氨酸-谷氨酸酰胺键从而释放荧光基团的特性进行生物活体的 Caspase1 活性检测,进而进行细胞凋亡的预测。

有机小分子荧光染料具有量子产率高、光化学物理稳定性高等优点,被用于设计合成检测酶的荧光探针。而且由于其较好的细胞穿透性而用于在活体细胞酶功能成像的研究。

### 1.2 基于荧光共振能量转移(FRET)的荧光探针

FRET 探针带有一个电子供体和一个受体,二者之间由酶识别部位连接。供受体的空间距离达到一定的数量级(1~10 nm),且受体的吸收光谱与供体的发射光谱相重叠时,发生 FRET。此时供体发射光被受体猝灭,只发出受体发射光。在酶催化作用下供受体之间的连接桥断裂,FRET 消失,供体发射光被观察到,通过荧光强度或波长的变化反应酶活<sup>[22]</sup>。

#### 1.2.1 小分子荧光探针

此类荧光探针是以有机小分子荧光染料作能量

供受体对, Farber 等<sup>[23]</sup>在研究斑马鱼脂质代谢实验中合成了含氟硼染料(BODIPY)荧光供受体对的磷脂作为探针, 在鱼体内的磷脂酶催化作用前后探针会呈现不同颜色的荧光, 通过荧光显微成像技术研究了斑马鱼体内脂质代谢途径, 对研究脊椎动物消化系统疾病遗传基因也有非常重要的意义。基于同样的机理, Takakusa 等<sup>[24-26]</sup>研究开发出一系列 FRET 荧光探针 CPF1-4 用于检测磷酸二酯酶, 其探针用香豆素-荧光素作为荧光能量供受体对, 并用二苯基磷酸酯键连接供受体。通过在水溶液中检测比率荧光变化测定了磷酸二酯酶的活性。该研究中基于 FRET 机理, 通过酶断裂荧光传感器检测酶活的方法也为其他水解酶的检测提供了研究基础。

### 1.2.2 荧光蛋白探针

荧光蛋白也被设计成 FRET 探针, Kohl 等<sup>[27]</sup>研究蛋白质-蛋白质相互作用时, 用绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(DsRed)作为荧光供受体对, 以一段烟草蚀刻病毒(TEV)靶向识别蛋白连接肽连接构成 FRET 探针, TEV 蛋白酶催化作用后, 通过双光子技术定量监测蛋白荧光, 从而实现了单分子水平上纳摩尔级酶浓度的动态监测。

### 1.2.3 量子点荧光探针

量子点(Quantum Dots, QDs)是能接受激发光产生荧光的半导体纳米粒子, 因其独特的光学特性而应用于新型生物化学传感器的设计<sup>[28-29]</sup>。用于检测酶活的量子点荧光探针一般选择酶特异性识别的肽链或 DNA 链为识别部位, 其一端连量子点, 另一端连猝灭剂(如金纳米粒子 AuNPs)或有机小分子荧光染料及荧光蛋白。

Chang 等<sup>[30]</sup>设计合成蛋白酶活化的量子点探针 QDs-肽链-AuNPs, 核壳结构 CdSe/CdS 量子点为供体, AuNPs 为猝灭剂, 中间肽链为胶原酶特异性识别肽。QDs 的荧光由于 FRET 作用被 AuNPs 猝灭, 加入胶原酶后肽链打断, QDs 荧光恢复。该方法的缺陷是由于量子点-金纳米晶体簇的聚集, 探针对酶的反应时间较长。为改善量子点探针的性质, Rosenzweig<sup>[31-32]</sup>研究小组在合成用染料标记的肽包覆量子点方面的研究取得了一定进展。他们用三辛基氧化磷(TOPO)修饰的 CdSe/ZnS 与标记了罗丹明红-X 的四肽进行

配体交换, 成功合成了肽包覆 CdSe/ZnS 量子点作为 FRET 探针, 并通过荧光显微成像将其用于实时监测正常及癌变乳腺细胞的胞外基质金属蛋白酶活性。该法可用于快速鉴别两种细胞, 并可为开发酶活化剂和抑制剂提供研究基础<sup>[31]</sup>。基于同样的机理, 他们还测定了胰岛素的活性和胰岛素抑制剂的抑制效率<sup>[32]</sup>。Mattoussi 研究小组<sup>[33]</sup>研制了新型的量子点-小肽自组装纳米传感器, 一段特异性小肽一端连有染料或猝灭剂, 另一端带有组氨酸标签, 通过组氨酸与量子点配位自组装得到 FRET 探针, 实验中高效检测了一系列蛋白水解酶, 包括组织半胱氨酸蛋白酶、凝血酶、胶原酶、胰凝乳蛋白酶等。

在以上研究基础上, QDs 的功能得到了进一步开发: 在 Rao 小组的工作中, 为避免 QDs 作为多个受体的能量供体时会发生荧光自猝灭或受体荧光发射强度低的现象<sup>[34]</sup>, 他们研制了以 QDs 作能量受体, 发光蛋白荧光素酶作供体的自组装纳米探针, 并成功检测了蛋白水解酶的活性<sup>[35]</sup>。此外, QDs 还被用于进行二元检测, 即在单一激发波长下同时检测两种酶<sup>[36]</sup>。

### 1.2.4 时间分辨-荧光共振能量转移(TR-FRET)探针

时间分辨荧光探针是一种新型的基于长寿命发光的稀土元素的探针, 以稀土螯合物为电子供体。该探针灵敏度高、选择性好、发光稳定。Karvinen 等<sup>[37]</sup>报道了用 TR-FRET 探针检测蛋白酶的方法。肽链底物的一端连接螯合物作发光基团, 另一端连接合适的荧光染料作猝灭剂, 螯合物与染料之间发生 FRET 而荧光猝灭, 在半胱氨酸蛋白酶、蜗牛酶、磷脂酶等的水解作用下, 螯合物或荧光染料一端断裂, 从而使螯合物发光。但该方法存在探针合成复杂、探针浓度大时对 FRET 有影响等缺点, 因此 Mizukami 等<sup>[38]</sup>开发了用乙酰苯胺与铽螯合物相连的新型探针, 该类探针克服以上缺点, 且检测蛋白酶时样品溶液中其他荧光物质不干扰, 成功用于测定钙调蛋白和亮氨酸胺酶的活性。

### 1.3 非标记的荧光探针

此类荧光探针, 底物自身无荧光团, 但在酶催化作用下产物分子由于共轭结构的变化可产生荧光信号, 此法常用于进行某些醇脱氢酶及醛缩酶催化

抗体的活性测定。

## 2 间接荧光检测法

当底物分子在酶催化作用下无荧光变化时, 可以用外加荧光探针检测产物的方法来间接检测酶活。Bornscheuer 等<sup>[39]</sup>发展了一种高通量筛选酯酶或脂肪酶的方法, 在有机溶剂中酯酶可催化乙烯酯和醇发生酯交换反应生成酯和乙醛。用无荧光的胍试剂 NBD-H 与醛反应生成强荧光的脎, 由此实现了酯酶活性的高通量实时检测。Khersonsky 等<sup>[40]</sup>在检测内酯酶活性时, 用硫代烷基取代的五元环内酯作底物, 水溶液中在血清对氧磷酶的催化下内酯键断裂, 生成的醇自发断裂生成醛同时脱落一个含巯基的小分子。巯基可以用荧光探针 Ellman 试剂检测, 由此间接测得内酯酶的活性。

## 3 荧光探针检测酶活的应用

### 3.1 生物技术领域

该领域的酶活检测用于发展酶的高通量筛选, 进行遗传选择和指纹分析。从微生物资源和突变酶构成的巨大样品库中获得新酶需要采用先进的技术手段, 荧光探针法是其中一种。借助荧光活化细胞分选法等先进的技术手段, 酶活检测在微生物筛选和定向进化实验中扮演着重要的角色<sup>[41]</sup>。而且酶的功能也可以通过活性图谱或称指纹来直观表象。

### 3.2 疾病诊断及药物开发领域

借助荧光显微镜等先进仪器, 可以实现用荧光探针在活细胞或生物体内定位有活性的酶。认识细胞内酶的作用及功能可揭示生理和病理条件下细胞内酶作用变化机制, 阐明生命作用机理, 在疾病诊断和药物筛选领域有重要的意义。

## 4 结论与展望

酶活检测的主要目的为发现新酶和对酶进行表征, 在多种检测方法中, 荧光法以其高灵敏的独到优势在酶活检测中发挥了重要作用。借助于微孔板荧光仪、荧光显微镜、激光共聚焦显微镜等高科技先进仪器, 用荧光探针检测酶活在高通量筛选、细胞及活体生命分析、新药开发及实时监测等方面的

研究进展迅速, 并将在生物技术领域高通量筛选新酶、开发高效生物催化剂、利用酶功能活体成像技术开发酶源抑制剂等方面得到更广泛的应用。

## REFERENCES

- [1] Luo GM, Cao SG, Zhang J. Enzyme Engineering. 2nd ed. Beijing: Chemical Industrial Press, 2002: 1-5.  
罗贵敏, 曹淑桂, 张今. 酶工程. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2002: 1-5.
- [2] Reymond JL, Wahler D. Substrate arrays as enzyme fingerprinting tools. *ChemBioChem*, 2002, **3**: 701-708.
- [3] Tielmann P, Boese M, Luft M, et al. A practical high-throughput screening system for enantioselectivity by using FT-IR spectroscopy. *Chem Eur J*, 2003, **9**: 3882-3887.
- [4] Leegsma-Vogt G, Rhemrev-Boom MM, Tiessen RG, et al. The potential of biosensor technology in clinical monitoring and experimental research. *Biomed Mater Eng*, 2004, **14**: 455-464.
- [5] Zhang XY, Zhang YJ, Li ZM, et al. Study on the metabolism of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and its acetate-tolerant mutant DA19 based on key enzyme activity analysis. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(5): 896-901.  
张晓云, 张艳军, 李志敏, 等. 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 及其耐乙酸突变株 DA19 在氮源限制下的代谢和关键酶特性研究. *生物工程学报*, 2007, **23**(5): 896-901.
- [6] Lai QA, Liu ST, Lu WH, et al. Expression in *Escherichia coli*, purification and enzymatic properties of chicken aminopeptidase H. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(3): 381-386.  
赖庆安, 刘树滔, 卢苑华, 等. 鸡氨肽酶 H 在大肠杆菌中的表达、纯化与部分酶学性质分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(3): 381-386.
- [7] Fu Y, Chen C, Xie Q, et al. Immobilization of enzymes through one-pot chemical preoxidation and electropolymerization of dithiols in enzyme-containing aqueous suspensions to develop biosensors with improved performance. *Anal Chem*, 2008, **80**(15): 5829-5838.
- [8] Tsalkova TN, Davydova NY, Halpert JR, et al. Mechanism of interactions of  $\alpha$ -naphthoflavone with cytochrome P450 3A4 explored with an engineered enzyme bearing a fluorescent probe. *Biochemistry*, 2007, **46**(1): 106-119.
- [9] Richard JA, Meyer Y, Jolivel V, et al. Latent fluorophores based on a self-immolative linker strategy and suitable for protease sensing. *Bioconj Chem*, 2008, **19**: 1707-1718.
- [10] Simeonov A, Jadhav A, Thomas CJ, et al. Fluorescence spectroscopic profiling of compound libraries. *J Med Chem*, 2008, **51** (8): 2363-2371.
- [11] Goddard JP, Reymond JL. Recent advances in enzyme assays. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(7): 363-370.

- [12] Davie EAC, Mennen SM, Xu Y, *et al.* Asymmetric catalysis mediated by synthetic peptides. *Chem Rev*, 2007, **107**(12): 5759–5812.
- [13] Sevestre A, He' laine V, Guyot G, *et al.* A fluorogenic assay for transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Tetrahedron Lett*, 2003, **44**: 827–830.
- [14] Gao WZ, Xing B, Tsien RY, *et al.* Novel fluorogenic substrates for imaging  $\beta$ -lactamase gene expression. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**: 11146–11147.
- [15] Sicard R, Chen LS, Marsaioli AJ, *et al.* A fluorescence-based assay for Baeyer-Villiger monooxygenases, hydroxylases and lactonases. *Adv Synth Catal*, 2005, **347**: 1041–1050.
- [16] Babiak P, Reymond JL. A high-throughput, low-volume enzyme assay on solid support. *Anal Chem*, 2005, **77**: 373–377.
- [17] Miller EM, Wheeler AR. A digital microfluidic approach to homogeneous enzyme assays. *Anal Chem*, 2008, **80**: 1614–1619.
- [18] Huebner A, Olguin LF, Bratton D, *et al.* Development of quantitative cell-based enzyme assays in microdroplets. *Anal Chem*, 2008, **80**: 3890–3896.
- [19] Chandran SS, Dickson KA, Raines RT, Latent fluorophore based on the trimethyl lock. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(6): 1652–1653.
- [20] Yeo DSY, Srinivasan R, Uttamchandani M, *et al.* Cell-permeable small molecule probes for site-specific labeling of proteins. *Chem Commun*, 2003, **23**: 2870–2871.
- [21] Messerli SM, Prabhakar S, Tang Y, *et al.* A novel method for imaging apoptosis using a caspase-1 near-infrared fluorescent probe. *Neoplasia*, 2004, **6**(2): 95–105.
- [22] Komatsu T, Kikuchi K, Takakusa H, *et al.* Design and synthesis of an enzyme activity-based labeling molecule with fluorescence spectral change. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**: 15946–15947.
- [23] Farber SA, Pack M, Ho SY, *et al.* Genetic analysis of digestive physiology using fluorescent phospholipid reporters. *Science*, 2001, **292**: 1385–1388.
- [24] Takakusa H, Kikuchi K, Urano Y, *et al.* Intramolecular fluorescence resonance energy transfer system with coumarin donor included in  $\beta$ -cyclodextrin. *Anal Chem*, 2001, **73**: 939–942.
- [25] Takakusa H, Kikuchi K, Urano Y, *et al.* Design and synthesis of an enzyme-cleavable sensor molecule for phosphodiesterase activity based on fluorescence resonance energy transfer. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 1653–1657.
- [26] Takakusa H, Kikuchi K, Urano Y, *et al.* A novel design method of ratiometric fluorescent probes based on fluorescence resonance energy transfer switching by spectral overlap integral. *Chem Eur J*, 2003, **9**: 1479–1485.
- [27] Kohl T, Heinze KG, Kuhlemann R, *et al.* A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 12161–12166.
- [28] Gao X, Yang L, Petros JA, *et al.* *In vivo* molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, **16**(1): 63–72.
- [29] Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, *et al.* Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater*, 2005, **4**: 435–446.
- [30] Chang E, Miller JS, Sun J, *et al.* Protease-activated quantum dot probes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **334** (4): 1317–1321.
- [31] Shi L, Paoli VD, Rosenzweig N, *et al.* Synthesis and application of quantum dots FRET-based protease sensors. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**: 10378–10379.
- [32] Shi L, Rosenzweig N, Rosenzweig Z. Luminescent quantum dots fluorescence resonance energy transfer-based probes for enzymatic activity and enzyme inhibitors. *Anal Chem*, 2007, **79**: 208–214.
- [33] Medintz IL, Clapp AR, Brunel FM, *et al.* Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates. *Nat Mater*, 2006, **5**(7): 581–589.
- [34] Xu C, Xing B, Rao J, A self-assembled quantum dot probe for detecting B-lactamase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **344**: 931–935.
- [35] Yao H, Zhang Y, Xiao F, *et al.* Quantum dot/bioluminescence resonance energy transfer based highly sensitive detection of proteases. *Angew Chem Int Ed*, 2007, **46**: 4346–4349.
- [36] Suzuki MH, Husimi Y, Komatsu H, *et al.* Quantum dot FRET biosensors that respond to pH, to proteolytic or nucleolytic cleavage, to DNA synthesis, or to a multiplexing combination. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**: 5720–5725.
- [37] Karvinen J, Laitala V, Mäkinen ML, *et al.* Fluorescence quenching-based assays for hydrolyzing enzymes. application of time-resolved fluorometry in assays for caspase, helicase, and phosphatase. *Anal Chem*, 2004, **76**: 1429–1436.
- [38] Mizukami S, Tonai K, Kaneko M. Lanthanide-based protease activity sensors for time-resolved fluorescence measurements. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(44): 14376–14377.
- [39] Konarzycka-Bessler M, Bornscheuer UT. A high-throughput-screening method for determining the synthetic activity of hydrolases. *Angew Chem Int Ed*, 2003, **42**(12): 1418–1420.
- [40] Khersonsky O, Tawfik DS. Chromogenic and fluorogenic assays for the lactonase activity of serum paraoxonases. *ChemBioChem*, 2006, **7**: 49–53.
- [41] Reymond JL, ed. Lin ZL, Cai Z, trans. *Enzyme Assays: High-throughput Screening, Genetic Selection and Fingerprinting*. 1st ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 1–11.
- Jean-Louis Reymond 编著. 林章凜, 蔡真, 译. 酶活检测-高通量筛选、遗传选择以及指纹分析. 1版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 1–11.