



中华人民共和国国家标准

GB/T 26348—2010

蚊虫抗药性检测方法 不敏感乙酰胆碱酯酶法

Test methods of mosquito resistance to insecticides—
Test methods of insensitive acetylcholinesterase for the mosquito

2011-01-14 发布

2011-05-01 实施



中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所、中国农业大学、北京市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：赵彤言、汪中明、李春晓、董言德、高希武、曾晓芃、佟颖。

蚊虫抗药性检测方法 不敏感乙酰胆碱酯酶法

1 范围

本标准规定了蚊虫体内不敏感的乙酰胆碱酯酶(AChE)的检测方法。

本标准适用于淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)、致倦库蚊(*Cx. pipiens quinquefasciatus*)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)、中华按蚊(*Anopheles sinensis*)等对有机磷类、氨基甲酸酯类杀虫剂抗性的生物化学检测。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

乙酰胆碱酯酶区分浓度 **discriminating concentration of acetylcholinesterase**
能够抑制敏感蚊虫乙酰胆碱酯酶生理活性 90% 的杀虫药剂的浓度。

3 试虫

现场多点采集幼虫,室内饲养,采用羽化后 3 d~5 d 未吸血雌蚊进行检测,冰浴条件下储存不超过 1 d, -20 °C 条件下储存不超过 1 周或 -80 °C 条件下储存 6 个月以内。

4 试剂

4.1 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),分析纯。

4.2 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),分析纯。

4.3 曲拉通 X-100(Triton X-100)。

4.4 乙酰硫代胆碱(ATCh),分析纯。

4.5 5,5'-二硫双硝基苯甲酸(DTNB),分析纯。

4.6 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.5 PBS):称取 30.18 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 2.16 g KH_2PO_4 ,蒸馏水定容至 1 000 mL。

4.7 DTNB-乙醇显色剂:12.4 mg DTNB,加 120 mL 95%乙醇,80 mL 蒸馏水,50 mL 磷酸盐缓冲液(pH7.5,0.1 mol/L,含 0.1% Triton X-100)。

4.8 ATCh 溶液:称取 28.9 mg ATCh 溶于 10 mL 蒸馏水中,-20 °C 避光保存。

4.9 ATCh-DTNB 混合溶液:称取 75 mg ATCh 和 13 mg DTNB,用 100 mL 磷酸盐缓冲液溶解。

5 分光光度法

5.1 仪器设备

5.1.1 分光光度计。

- 5.1.2 恒温水浴箱。
- 5.1.3 1 mL 玻璃组织匀浆器。
- 5.1.4 离心机(离心力 10 000g 以上)。
- 5.1.5 加液器。

5.2 操作步骤

- 5.2.1 酶源的制备 取成蚊 5 只做为 1 组,放入 4 °C 预冷的玻璃组织匀浆器中,加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液(pH7.5,0.1 mol/L,含 0.1% Triton X-100),充分匀浆。匀浆液在 4 °C,5 000g 离心 5 min,取上清液作为待测酶液,冰浴保存备用。
- 5.2.2 取 6 支试管,分别加入 6.1.1 中制备酶液 0.1 mL,在其中 3 支试管中分别加入 0.1 mL 的杀虫剂溶液,充分混匀,使其终浓度达到区分浓度(常用杀虫剂对淡色库蚊乙酰胆碱酯酶的区分浓度参见附录 A 表 A.1),且丙酮终浓度小于 1%。另 3 支试管中加入 0.1 mL 磷酸盐缓冲液作为无药剂对照管;再取 1 支试管加入 0.2 mL 磷酸盐缓冲液,作为空白对照。
- 5.2.3 上述 7 支试管 30 °C 保温 5 min 后,分别加入 0.1 mL 0.01 mol/L 乙酰硫代胆碱(ATCh),在 30 °C 继续保温 15 min 后,加入 3.6 mL DTNB-乙醇显色剂。
- 5.2.4 将空白对照调至仪器显示为 0 点,在分光光度计中于 412 nm 波长下测定无药剂对照管和药剂处理管的光密度值(OD₄₁₂),计算平均值。
- 5.2.5 按上述方法每个种群检测 100 组蚊虫。

5.3 结果表述

测定 AChE 残存活性的计算见公式(1):

$$E = \frac{\overline{OD}_t}{\overline{OD}_c} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- E —— AChE 残存活性;
- \overline{OD}_t —— 药剂处理管平均光密度值 OD₄₁₂;
- \overline{OD}_c —— 无药剂对照管平均光密度值 OD₄₁₂。

5.4 判别标准

AChE 残存活性大于 20% 为不敏感的 AChE,具有不敏感 AChE 的蚊虫组为对有机磷或氨基甲酸酯类药剂抗性组,抗性组在检测种群中的比例达到 10% 时为抗性种群。

6 酶标仪法

6.1 仪器设备

- 6.1.1 酶标仪。
- 6.1.2 恒温水浴箱。
- 6.1.3 1 mL 玻璃组织匀浆器。
- 6.1.4 离心机(离心力 10 000g 以上)。
- 6.1.5 加液器。

6.2 操作步骤

6.2.1 酶源的制备 取成蚊1只,放入4℃预冷的玻璃组织匀浆器中,加入0.5 mL 4℃预冷的磷酸盐缓冲液充分匀浆。匀浆液在4℃,5 000g离心5 min,取上清液作为待测酶液,冰浴保存备用。

6.2.2 分取0.1 mL 6.2.1中制备酶液到酶标板的3个孔中,再在各孔中加入0.1 mL杀虫剂溶液,杀虫剂用磷酸缓冲液稀释,使其终浓度达到区分浓度(常用杀虫剂对淡色库蚊乙酰胆碱酯酶的区分浓度参见表A.1),且丙酮的终浓度不超过1%。以0.1 mL磷酸盐缓冲液作为无药剂对照,加入另外3个孔中。在30℃保温5 min后,分别加入0.2 mL ATCh-DTNB混合溶液,在412 nm测定5 min时间动力学曲线,曲线的斜率作为反应初速度(v)。计算平均值。

6.2.3 按上述方法每个种群检测100只蚊虫。

6.3 结果表述

测定AChE残存活性的计算见公式(2):

$$E = \frac{\bar{v}_t}{\bar{v}_c} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

E ——AChE残存活性;

\bar{v}_t ——药剂处理组平均反应初速度;

\bar{v}_c ——无药剂对照组平均反应初速度。

6.4 判别标准

AChE残存活性大于20%为不敏感的AChE,具有不敏感AChE的蚊虫为对有机磷或氨基甲酸酯类药剂抗性个体,抗性个体在检测种群中的比例达到10%时为抗性种群。

附录 A
(资料性附录)

常用杀虫剂对淡色库蚊乙酰胆碱酯酶的区分浓度

表 A.1 给出了残杀威和敌敌畏对淡色库蚊乙酰胆碱酯酶的区分浓度。

表 A.1 常用杀虫剂对淡色库蚊乙酰胆碱酯酶的区分浓度

杀虫剂	区分浓度 g/L
残杀威(propoxur)	0.011 5
敌敌畏(DDVP)	0.081 3

注：敏感品系来自军事医学科学院微生物流行病学研究所蚊虫养殖室淡色库蚊北京株。



GB/T 26348-2010

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-42179

定价: 14.00 元