



中华人民共和国国家标准

GB/T 26349—2010

蝇类抗药性检测方法 家蝇不敏感乙酰胆碱酯酶法

Test methods of fly resistance to insecticides—
Test methods of insensitive acetylcholinesterase for musca domestica

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 给出的起草规则起草。

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

本标准主要起草人：高希武、曾晓芃、梁沛、马彦、刘婷、佟颖、赵彤言。

蝇类抗药性检测方法

家蝇不敏感乙酰胆碱酯酶法

1 范围

本标准规定了家蝇(*Musca domestica*)不敏感乙酰胆碱酯酶(AChE)的检测方法。
本标准适用于家蝇对有机磷、氨基甲酸酯类药剂抗药性的生物化学检测。

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**
能够抑制敏感品系家蝇乙酰胆碱酯酶正常活性 90% 的杀虫药剂的浓度,单位为 mol/L 或 mmol/L。

2.2

F1代 **F1 generation**

从现场捕捉的家蝇,繁殖后得到的第一代。

3 试虫

现场采集家蝇,室内饲养,羽化后 3 d~5 d 的 F1 代雌性家蝇。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),化学纯。

4.2 磷酸二氢钾(KH_2PO_4),化学纯。

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:称取 12.4 mg DTNB,溶于 125 mL 95%乙醇中,加入 50 mL 磷酸缓冲液,最后用蒸馏水定容至 250 mL,4 °C 避光保存。

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。

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 玻璃组织匀浆器。

5.1.4 台式冷冻离心机(离心力 10 000 *g* 以上)。

5.1.5 加液器。

5.2 杀虫药剂的配制

用丙酮或其他的有机溶剂将杀虫药剂配制成母液,试验前用磷酸盐缓冲液(含 0.1% Triton X-100)稀释到区分浓度(常见杀虫药剂对敏感家蝇品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度见表 A.1)的 2 倍,溶剂在反应体系中的最终浓度应小于 1%。

5.3 操作步骤

5.3.1 取家蝇 1 只,用眼科剪刀或手术刀片将头部剪(切)下,放入 4 °C 预冷的玻璃组织匀浆器(1 mL)中,加入 0.5 mL 4 °C 预冷的磷酸盐缓冲液(含 0.1% Triton X-100),充分匀浆。

5.3.2 匀浆液在 4 °C, 10 000 *g* 离心 15 min, 取上清液即为酶液, 冰浴保存备用。

5.3.3 取 4 支试管, 分别加入上述酶液 0.1 mL, 在其中 3 支试管中分别加入一定量的杀虫药剂溶液 0.1 mL, 使其终浓度达到区分剂量, 第 4 支试管中加入 0.1 mL 磷酸盐缓冲液作为无药剂对照管; 另取 1 支试管加入 0.2 mL 磷酸盐缓冲液, 作为空白对照。

5.3.4 上述 5 支试管 30 °C 保温 5 min 后, 分别加入 0.1 mL ATCh, 在 30 °C 继续保温 15 min 后, 加入 1.6 mL DTNB-乙醇显色剂。

5.3.5 以空白对照调仪器 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(OD_{412})。

5.3.6 按上述方法每个种群检测 100 只家蝇。

5.4 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 OD_{412} ;

\overline{OD}_c —— 无药剂对照管平均光密度值 OD_{412} 。

5.5 判别标准

AChE 残存活性大于 20% 为不敏感的 AChE, 具有不敏感 AChE 的个体为对有机磷或氨基甲酸酯类药剂具有抗性的个体, 抗性个体在种群中的比例达到 20% 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 玻璃组织匀浆器。

6.1.4 台式冷冻离心机(离心力 10 000 *g* 以上)。

6.1.5 加液器。

6.2 杀虫药剂的配制

用丙酮或其他有机溶剂将杀虫药剂配制成母液,试验前用磷酸盐缓冲液(含 0.1% Triton X-100)稀释到区分浓度(常见杀虫药剂对敏感家蝇品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度见附录 A 表 A.2)的 2.5 倍,溶剂在反应体系中的最终浓度应小于 1%。

6.3 操作步骤

6.3.1 取家蝇 1 只,用眼科剪刀或手术刀片将头部剪下,放入 4 °C 预冷的玻璃组织匀浆器(1 mL)中,加入 0.5 mL 4 °C 预冷的磷酸盐缓冲液(含 0.1% Triton X-100),充分匀浆。

6.3.2 匀浆液在 4 °C, 10 000 *g* 离心 15 min,取上清液即为酶液,冰浴保存备用。

6.3.3 在酶标板孔中加入 0.1 mL 酶液,在每个孔中分别加入 0.05 mL DTNB 和 0.1 mL 含抑制剂的 ATCh 溶液,抑制剂终浓度为区分浓度,每只家蝇设无抑制剂对照一个,用缓冲液代替抑制剂量,在酶标仪中读数 5 min,曲线的斜率作为反应初速度(*v*)。计算平均值。

6.3.4 按上述方法每个种群检测 100 只家蝇。

6.4 结果表述

测定 AChE 残存活性的计算见公式(2):

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

式中:

E ——AChE 残存活性;

\bar{v}_i ——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。

6.5 判别标准

AChE 残存活性大于 20% 为不敏感的 AChE,具有不敏感 AChE 的个体为对有机磷或氨基甲酸酯类药剂具有抗性的个体,抗性个体在种群中的比例达到 20% 时为抗性种群。

附录 A
(资料性附录)

常见杀虫药剂对敏感家蝇品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度

A.1 表 A.1 给出了用分光光度法测出的 3 种杀虫药剂对敏感家蝇品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度。

表 A.1 3 种杀虫药剂对敏感家蝇品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度(分光光度法)

杀虫药剂	区分浓度 I_{90} mol/L
敌敌畏(DDVP)	2×10^{-5}
残杀威(propoxur)	4×10^{-4}
灭多威(methomyl)	6×10^{-5}

注：敏感品系来自中国农业大学选育的家蝇敏感品系，2004 年测定结果。

A.2 表 A.2 给出了用酶标仪法测出的 3 种杀虫剂对敏感家蝇品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度。

表 A.2 3 种杀虫药剂对敏感家蝇品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度(酶标仪法)

杀虫药剂	区分浓度 I_{90} mol/L
敌敌畏(DDVP)	3×10^{-3}
残杀威(propoxur)	5×10^{-4}
灭多威(methomyl)	4×10^{-2}

注：敏感品系来自中国农业大学选育的家蝇敏感品系，2004 年测定结果。



GB/T 26349-2010

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-42180

定价: 14.00 元