



中华人民共和国国家标准

GB/T 26351—2010

蜚蠊抗药性检测方法 德国小蠊不敏感乙酰胆碱酯酶法

Test methods of cockroach resistance to insecticides—
Test methods of insensitive acetylcholinesterase for *Blattella germanica*

2011-01-14 发布

2011-05-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

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：北京市疾病预防控制中心、中国农业大学、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：曾晓芃、高希武、马彦、钱坤、佟颖、梁沛、赵彤言。

蜚蠊抗药性检测方法

德国小蠊不敏感乙酰胆碱酯酶法

1 范围

本标准规定了德国小蠊(*Blattella germanica*)体内不敏感乙酰胆碱酯酶(AChE)的检测方法。本标准适用于德国小蠊对有机磷、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**

能够抑制敏感品系德国小蠊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**

从现场捕捉的德国小蠊,繁殖后得到的第一代。

3 试虫

现场采集德国小蠊,室内饲养,F1代羽化后 7 d~15 d 的雄性德国小蠊。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。

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 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

用丙酮或其他有机溶剂将杀虫药剂配制成母液,实验前用磷酸盐缓冲液稀释到区分浓度(常见杀虫药剂对敏感德国小蠨品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度参见附录 A)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 将单头德国小蠨雄性成虫,放入 4 °C 预冷的玻璃组织匀浆器中,加入 1 mL 4 °C 预冷的磷酸盐缓冲液(pH7.5,0.1 mol/L,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,弃沉淀,取上清即为酶液,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 支试管中分别加入杀虫药剂水溶液 0.1 mL,使其终浓度达到区分浓度,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 将上述 5 支试管于 30 °C 保温 5 min,再分别加入 0.1 mL 乙酰硫代胆碱(ATCh),30 °C 继续保温 15 min 后,加入 1.6 mL DTNB-乙醇显色剂。
- 5.3.5 以空白对照调分光光度计 0 点,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)。
- 5.3.6 按上述方法检测 100 头德国小蠨。

5.4 结果表述

测定 AChE 残存活性的计算见公式(1)。

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

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。

5.5 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 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 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,实验前用磷酸盐缓冲液稀释到区分浓度(常见杀虫药剂对敏感德国小蠊乙酰胆碱酯酶的区分浓度参见附录 A)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 将单头德国小蠊雄成虫,放入 4 °C 预冷的玻璃组织匀浆器中,加入 1 mL 4 °C 预冷的磷酸盐缓冲液(pH7.5, 0.1 mol/L, 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,弃沉淀,取上清即为酶液,冰浴保存备用。
 6.3.3 在酶标板中的 4 个孔中分别加入上述酶液 0.1 mL,在其中 3 个孔中分别加入一定浓度的杀虫药剂溶液 0.05 mL,使其终浓度达到区分浓度,第 4 个孔中加入 0.05 mL 磷酸盐缓冲液作为无药剂对照管,在 30 °C 保温 5 min 后,分别加入 0.1 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。

6.4 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:

- \bar{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。

6.5 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 10% 时为抗性种群。

附录 A
(资料性附录)

常用杀虫药剂对敏感德国小蠊品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度

表 A.1 给出了敌敌畏和残杀威对敏感德国小蠊品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度。

表 A.1 常用杀虫药剂对敏感德国小蠊品系乙酰胆碱酯酶的区分浓度

杀虫药剂	区分浓度 LC ₉₀ mol/L
敌敌畏(DDVP)	0.056×10^{-4}
残杀威(propoxur)	4.69×10^{-4}

注：敏感品系来自北京市疾病预防控制中心医学昆虫饲养室，测定时间为 2005 年 3 月。



GB/T 26351-2010

版权专有 侵权必究

*

书号：155066·1-42182

定价：14.00 元