

前 言

本标准是根据我国以往制定的苏云金杆菌企业标准等有关材料,结合我国实际情况而制定的。

本标准对苏云金杆菌原粉的要求、试验方法、抽样以及包装、运输等作了具体要求和规定,从而为苏云金杆菌生产提供了统一的技术依据。

本标准的附录 A 是提示的附录,附录 B 是标准的附录。

本标准由中华人民共和国原化学工业部技术监督司提出。

本标准由化学工业部沈阳化工研究院归口。

本标准主要起草单位:中国农业大学应用化学系。

本标准参加起草单位:湖北省生物农药工程研究开发中心、济南科贝尔生物工程有限公司。

本标准主要起草人:刘丰茂、王开梅、钱传范、钟连胜、赵欣昕、王绮文。

苏云金杆菌原粉

Bacillus thuringiensis technical

苏云金杆菌(Bacillus thuringiensis, B. t.)是目前应用最广泛的一种微生物杀虫剂,它的主要杀虫成分是伴孢晶体中的毒素蛋白,其中,对鳞翅目有毒力的蛋白相对分子质量为 130 000。

1 范围

本标准规定了苏云金杆菌原粉的要求、试验方法以及标志、标签、包装、贮运。

本标准适用于防治鳞翅目害虫的苏云金杆菌原粉。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB/T 1250—1989 极限数值的表示方法和判定方法

GB/T 1600—1979(1989) 农药水分测定方法

GB/T 1601—1993 农药 pH 值的测定方法

GB/T 1604—1995 商品农药验收规则

GB/T 1605—1979(1989) 商品农药采样方法

GB 3796—1983 农药包装通则

GB/T 16150—1995 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

3 要求

3.1 外观:灰白色至棕褐色粉末。

3.2 苏云金杆菌原粉应符合表 1 要求。

表 1 苏云金杆菌原粉控制项目指标

项 目	指 标	
	一等品	合格品
毒素蛋白, % \geq	7.0	6.0
毒力效价([Px IU/mg][Ha IU/mg]) \geq	50 000	40 000
pH 值	5.5~7.0	
水分, % \leq	6.0	
细度, 45 μm , % \geq	98	
注: Px 和 Ha 分别为小菜蛾(<i>Plutella xylostella</i>)和棉铃虫(<i>Heliothis armigera</i>)缩写。		

4 试验方法

除另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,所述溶液均为水溶液。

4.1 抽样

按照 GB/T 1605—1979(1989)中“原粉采样”进行,用随机数表法确定抽样的包装件,最终抽样量应不少于 100 g。

4.2 鉴别试验

当用生物测定法评价产品质量产生疑问时,可用以下方法进行鉴定。

用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)方法测定有效毒素蛋白的相对分子质量是否为 130 000,同时测定其含量是否符合 3.2 指标的规定。

4.3 毒素蛋白含量测定方法

毒素蛋白含量可以用 SDS-PAGE-扫描法和 SDS-PAGE-洗脱比色法两种方法进行测定,二者精密度、准确度接近,前者由于自动化程度更高,而定为仲裁法。

4.3.1 SDS-PAGE-扫描法(仲裁法)

4.3.1.1 方法提要

用碱性溶液处理苏云金杆菌原粉伴孢晶体,使其降解为毒素蛋白,然后通过 SDS-PAGE,依蛋白质相对分子质量的差异,使毒素蛋白与其他杂蛋白分离,之后用薄层扫描仪或电泳图像扫描仪扫描蛋白区带面积,进行定量。

4.3.1.2 仪器、设备

电泳仪。

夹芯式垂直电泳槽(1.5 mm 凹形带槽橡胶模框)、凝胶板面积 145 mm×100 mm(1.5 mm、12 孔样品槽模具)。

高速薄层层析扫描仪或电泳图像扫描仪。

离心机:10 000 r/min。

分析天平:精确至 0.000 1 g。

4.3.1.3 试剂和溶液

过硫酸铵(AP)。

十二烷基硫酸钠(SDS)。

四甲基乙二胺(TEMED)。

氢氧化钠。

30%丙烯酰胺:称取丙烯酰胺 30 g,亚甲基双丙烯酰胺(原称:甲叉双丙烯酰胺)0.8 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,过滤,于 4℃暗处贮存备用。

1 mol/L、pH8.8 三羟甲基氨基甲烷-HCl 缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 30.25 g 溶于蒸馏水中,用浓盐酸调至 pH8.8,用蒸馏水定容至 250 mL。

1 mol/L、pH6.8 三羟甲基氨基甲烷-HCl 缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 12.10 g 溶于蒸馏水中,用浓盐酸调至 pH6.8,用蒸馏水定容至 100 mL。

电极缓冲液:称取三羟甲基氨基甲烷 3.03 g,甘氨酸 14.42 g,十二烷基硫酸钠 1 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

3×样品稀释液:1 mol/L、pH6.8 三羟甲基氨基甲烷-HCl 18.75 mL,十二烷基硫酸钠 6 g,甘油 30 mL,巯基乙醇 15 mL,少许溴酚蓝,用蒸馏水定容至 100 mL。

染色液:称取考马斯亮蓝(CBB)R-250 1 g,加入甲醇 450 mL,冰乙酸 100 mL,蒸馏水 450 mL,溶解过滤后使用。

脱色液:量取甲醇 100 mL,冰乙酸 35 mL,用蒸馏水定容至 1 000 mL。

漂洗液：量取无水乙醇 30 mL，冰乙酸 10 mL，蒸馏水 60 mL，混合均匀后使用。

毒素蛋白标样：毒素蛋白(相对分子质量为 130 000)含量为 9.3% 的原粉。

4.3.1.4 试样处理

称取标样、试样各 20 mg(准确至 0.1 mg)，移至 5 mL 离心管中，加 2 mL 水充分悬浮。然后加入 0.55 mol/L 氢氧化钠溶液 0.45 mL(使氢氧化钠溶液的终浓度为 0.1 mol/L)，放置约 5 min，再加入 3×样品稀释液 1.30 mL，使最终体积为 3.75 mL，于 100℃沸水中煮 6 min，离心(2 000 r/min)10 min 后取上层清液，以备电泳上样。

4.3.1.5 SDS-PAGE 分离毒素蛋白

a) 制备 8%~10% 聚丙烯酰胺凝胶

采用不连续缓冲系统，制胶方法见附录 A(提示的附录)。

b) 上样

取上述标样溶解液上层清液，于聚丙烯酰胺凝胶的上样孔中分别上样 6、8、10、12、14 μL(毒素蛋白含量约为 3~7 μg)，作为标准曲线，再取一定体积的试样溶液上层清液(毒素蛋白含量约为 5 μg)；加入到上样孔中，注入电极缓冲液后，接通电源。

c) 电泳

电泳初期电压控制在 100 V 左右，待试样进入分离胶后，加大电压到 120 V，继续电泳，当指示剂前沿到达距底端 1 cm 左右时停止电泳，取出胶板，在 7.5%(体积百分数)乙酸中浸泡 30 min。

d) 染色

将分离胶部分取下，用考马斯亮蓝(CBB)R-250 染色液染色过夜。

e) 脱色

倒去染色液，先用漂洗液洗涤凝胶，然后加入脱色液，于 37℃下加热使其脱色，更换几次脱色液，直至背景清晰为止。

4.3.1.6 测定

胶板经脱色后，可清晰地看到 130 000 蛋白区带，用高速薄层层析扫描仪或电泳图像扫描仪扫描该区带，扫描波长为 600 nm。

样品中毒素蛋白的百分含量(X)按式(1)进行计算。

$$X = \frac{m_1 V_2}{m_2 V_1} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中： m_1 ——从标准曲线上查得的样品中毒素蛋白的量，μg；

m_2 ——2 mL 稀释液中样品的质量，mg；

V_1 ——样品最终定容体积，mL(3.75 mL)；

V_2 ——注入凝胶上样孔的样品体积，μL。

4.3.1.7 允许差

取其算术平均值为测定结果。两次平行测定结果相对偏差小于等于 8%。

4.3.2 SDS-PAGE-洗脱比色法

4.3.2.1 方法提要

用碱性溶液处理苏云金杆菌原粉伴孢晶体，使其降解为原毒素，然后通过 SDS-PAGE，依蛋白质相对分子质量的差异，使毒素蛋白与其他杂蛋白分离，再割胶，洗脱，测定吸光度。

4.3.2.2 仪器、设备

分光光度计。

其他同 4.3.1.2。

4.3.2.3 试剂和溶液

吡啶

其他同 4.3.1.3。

4.3.2.4 试样处理

同 4.3.1.4。

4.3.2.5 SDS-PAGE 分离毒素蛋白

a) 制备 8%~10% 聚丙烯酰胺凝胶

同 4.3.1.5a)。

b) 上样

取上述标样溶液上层清液,于上样孔中分别上样 15、20、30、40、50 μL (毒素蛋白含量约为 7.5~25 μg),作为标准曲线,再取一定体积的试样溶液上层清液(毒素蛋白含量约为 15 μg),加入到上样孔中,注入电极缓冲液后,接通电源。

c) 电泳

同 4.3.1.5c)。

d) 染色

同 4.3.1.5d)。

e) 脱色

同 4.3.1.5e)。

4.3.2.6 测定

用手术刀刮下待测区带,放入玻璃试管中,再加 25% 吡啶(体积分数)3.0 mL,于 37℃ 下振荡洗脱毒素蛋白所吸附的考克斯亮蓝(CBB)R-250,平衡后用分光光度计,以 25% 吡啶为参比,于 605 nm 下,测定溶液的吸光度,用式(1)计算毒素蛋白含量。

4.3.2.7 允许差

取其算术平均值为测定结果。两次平行测定结果相对偏差小于等于 8%。

4.4 毒力效价的测定

按附录 B(标准的附录)进行。

4.5 pH 值的测定

按 GB/T 1601 测定。

4.6 细度的测定

按 GB/T 16150—1995 中 2.2 进行测定。

4.7 水分的测定

按 GB/T 1600—1979(1989)中“共沸蒸馏法”进行测定。

5 检验规则

应符合 GB/T 1604 有关规定。极限数值按 GB/T 1250 处理。

6 标志、标签、包装、贮运

6.1 产品包装应符合 GB 3796 规定,同时注明所用标准编号。

6.2 原粉主要采用塑料袋包装,密封。

6.3 贮存时严防日晒,勿受压,置于阴凉干燥处。

6.4 运输时,注意轻放,防止损坏。

6.5 保证期:在正常贮运条件下,原粉质量保证期从生产日期算起为二年,产品出厂时毒力效价和毒素蛋白含量不低于 3.2 指标,两年内产品毒力效价和毒素蛋白含量均不低于 3.2 指标的 60%。

附 录 A
(提示的附录)
电泳胶的制备

A1 制板

本实验选用板状电泳。具体操作根据实验室条件而定。基本操作大体上是根据电泳槽高矮大小,选择两块大小一样的玻璃板,其中一块一端带有 2~3 cm 高的凹槽。两块玻璃板洗净干燥后,在无凹槽的玻璃板两边各放一条“间隙条”(塑料条、胶条都可以,其宽度、厚度根据需要而定)。然后放上带凹槽的玻璃板,用夹子将两块玻璃板固定,这样两块玻璃板之间就形成了一定的间隙。形成的间隙下端应该封闭,以防灌入的胶液漏出。一般用胶纸条封闭,待灌入的胶凝固后,再撕去胶纸;或用 1%~1.5% 浓度的琼脂封闭,方法是:在琼脂中加入电极缓冲液或蒸馏水,在沸水浴中加热溶解,将带有间隙的玻璃板装置,垂直放在一个高 3 cm、宽 3 cm、比玻璃板宽而长的一个小槽内(商品电泳槽有配套装置),趁热将溶解的琼脂胶灌入小槽内,待冷却后取出玻璃板装置,下端即封严,可进行灌注聚丙烯酰胺胶液。

A2 制备分离胶

从冰箱中取出制胶试剂,平衡至室温。按表 A1 先配制分离胶。本试验中分离胶浓度为 10%。

将胶液配好、混匀后,迅速注入两块玻璃板的间隙中,至胶液面离玻璃板凹槽 3.5 cm 左右。然后在胶面上轻轻铺 1 cm 高的蒸馏水,加蒸馏水时通常顺玻璃板慢慢加入,勿扰乱胶面。垂直放置胶板于室温约 20~30 min 左右使之凝聚。此时,在凝胶和蒸馏水之间可以看到很清晰的一条界面。然后吸出胶面上的蒸馏水。

A3 制备浓缩胶

其用量根据实际情况而定,制备方法按表 A1。

表 A1 SDS-PAGE 凝胶的配方

贮 备 液	分离胶	浓缩胶
30% 丙烯酰胺	10 mL	3.4 mL
1 mol/L、pH8.8 三羟甲基氨基甲烷-HCl	13 mL	
1 mol/L、pH6.8 三羟甲基氨基甲烷-HCl		2.5 mL
蒸馏水	11.6 mL	14.0 mL
10% 十二烷基硫酸钠	0.35 mL	0.20 mL
10% 过硫酸铵	0.23 mL	0.20 mL
四甲基乙二胺	23 μ L	20 μ L

混合上述溶液,用少量灌入玻璃板间隙中,冲洗分离胶胶面,而后倒出。然后把余下的胶液注入玻璃板间隙,使胶液面与玻璃板凹槽处平齐,而后插入“梳子”,在室温放置 20~30 min,浓缩胶即可凝聚。凝聚后,慢慢取出梳子,取时应防止把胶孔弄破。取出梳子后,在形成的胶孔中加入蒸馏水,冲洗未凝聚的丙烯酰胺等,倒出孔中蒸馏水,再加入电极缓冲液。

将灌好胶的玻璃板垂直固定在电泳槽上,带凹槽的玻璃板与电泳槽紧贴在一起,形成一个贮液槽,向其中加入电极缓冲液,使其与胶孔中的缓冲液相接触。在电泳槽下端的贮液槽中也加入电极缓冲液。

附录 B
(标准的附录)
毒力效价的测定

B1 毒力效价测定方法之一——用小菜蛾(*Plutella xylostella*)作试虫的测定方法(仲裁法)

B1.1 试剂或材料

标准品:CS-95, H_{3ab} , 效价 20 000 IU/mg。

小菜蛾幼虫:*Plutella xylostella*。

食用菜籽油。

酵母粉:工业用。

维生素 C:医用,分析纯。

琼脂粉:凝胶强度大于 300 g/cm²。

磷酸氢二钾:分析纯。

磷酸二氢钾:分析纯。

聚山梨酯-80:粘度 $3.5 \times 10^{-4} \sim 5.5 \times 10^{-4}$ m²/s。

菜叶粉:甘蓝型油菜叶,80℃烘干,磨碎,过 80 目筛。

蔗糖:分析纯。

纤维素粉 CF-11。

氢氧化钾:分析纯。

氯化钠:分析纯。

15%尼泊金:对羟基苯甲酸甲酯(化学纯)溶于 95%乙醇。

10%甲醛溶液:甲醛(分析纯)溶于蒸馏水。

干酪素溶液:干酪素(BR 生物试剂)2 g 加 0.001 mol/L 氢氧化钾 2 mL,8 mL 蒸馏水,灭菌。

磷酸缓冲液:氯化钠 8.5 g;磷酸氢二钾 6.0 g,磷酸二氢钾 3.0 g;聚山梨酯-80 溶液 0.1 mL;蒸馏水 1 000 mL。

B1.2 仪器、设备

磨口三角瓶:250 mL。

分析天平:精确到 0.1 mg。

电动搅拌器:无级调速,100~6 000 r/min。

医用手术刀。

振荡器。

水浴锅。

养虫管:9 cm×2.5 cm。

烧杯:50 mL。

试管:18 mm×180 mm。

玻璃珠:φ5 mm。

移液管:10 mL。

B1.3 测定步骤

B1.3.1 感染液的配制

a) 标准品

用分析天平准确称取标准品 100.0~150.0 mg(精确到 0.1 mg),装入 250 mL 装有 10 粒玻璃珠的

磨口三角瓶中。加入 100 mL 磷酸缓冲液,浸泡 10 min,在振荡器上振荡 30 min。得到浓度约为 1 mg/mL 的标准品母液(该母液在 4℃ 冰箱中可存放 10 天)。然后将标准品母液稀释成浓度为 1.000、0.500、0.250、0.125、0.062 5、0.031 3 mg/mL 六个稀释感染液。

b) 可湿性粉剂样品

称取相当于标准品毒力效价的样品适量(精确到 0.2 mg),加 100 mL 磷酸缓冲液,然后参照标准品的配制方法配制样品感染液。

c) 悬浮剂样品

将样品振荡 20 min,充分摇匀。用移液管吸取样品 10.00 mL,加入装有 90 mL 无菌蒸馏水的磨口三角瓶中,吸洗三次,充分摇匀得到含 100 μ L/mL 的母液。将母液稀释成含量分别为 5.000、2.500、1.250、0.625、0.313 和 0.156 μ L/mL 六个稀释液。

对有些效价过高或过低的样品,在测定前需先以 3 个距离相差较大的浓度做预备试验,估计 LC_{50} 值(半致死中浓度)的范围,据此设计稀释浓度。

B1.3.2 感染饲料的配制

饲料配方:维生素 C 0.5 g、干酪素溶液 1.0 mL、菜叶粉 3.0 g、酵母粉 1.5 g、维生素粉 1.0 g、琼脂粉 2.0 g、蔗糖 6.0 g、菜籽油 0.2 mL、10% 甲醛溶液 0.5 mL、15% 尼泊金 1.0 mL、蒸馏水 100 mL。

将蔗糖、酵母粉、干酪素溶液、琼脂粉加入 90 mL 的蒸馏水中调匀。搅拌煮沸,使琼脂完全熔化,加入尼泊金,搅匀。将其他成分用剩余的 10 mL 蒸馏水调成糊状。当琼脂冷却至 75℃ 左右时与之充分混合,搅匀,置 55℃ 水浴锅中保温备用。取 50 mL 烧杯 7 只,写好标签,置 55℃ 水浴中预热;分别向每个烧杯中加入 1 mL 对应浓度的感染液,缓冲液作空白对照。向每个烧杯中加入 9 mL 熔化的感染饲料;用电动搅拌器搅拌 20 s,使每个烧杯中的感染液与饲料充分混匀。

将烧杯静置,待冷却凝固后,用医用手术刀将感染饲料切成 1 cm×1 cm 的饲料块,每个浓度取 4 个饲料块分别放入 4 支养虫管中,每管放入一块,写好标签。

B1.3.3 接虫感染

随机取已放置饲料的养虫管,每管投入 10 头小菜蛾三龄初幼虫,每浓度 4 管,塞上棉塞,写好标签,在相同饲养条件下饲养。

B1.4 结果检查及计算

感染 48 h 后检查试虫的死亡情况。判断死虫的标准是以细签轻轻触动虫体,无任何反应者判为死亡。

计算标准品和样品各浓度的供测昆虫死亡率,查 Abbott 表或用式(B1)计算校正死亡率(X_1)。对照死亡率 10% 以下需要校正,大于 10% 则试验结果无效。

$$X_1 = \frac{T - C}{1 - C} \times 100 \quad \dots\dots\dots (B1)$$

式中: T ——处理死亡率;

C ——对照死亡率。

将感染液各浓度换算成对数值,校正死亡率转换成死亡机率值,用最小二乘法分别求出标准品 LC_{50} 值和待测样品 LC_{50} 值,然后按式(B2)计算待测样品的毒力效价(X_2)[Px IU/mg(μ L)或 Ha IU/mg(μ L)]:

$$X_2 = \frac{SP}{Y} \quad \dots\dots\dots (B2)$$

式中: S ——标准品 LC_{50} 值;

P ——标准品效价;

Y ——样品 LC_{50} 值。

B1.5 允许差

毒力测定法允许相对偏差,但每个样品 3 次重复测定结果最大相对偏差不得超过 20%。毒力测定制剂各浓度所引起的死亡率应在 10%~90%之间,在 50%死亡率上下至少要各有两个浓度。

B2 毒力效价测定方法之二——以棉铃虫(*Heliothis armigera*)作试虫的测定方法

B2.1 试剂或材料

标准品:CS-95, H_{50} , 效价 20 000 IU/mg。

棉铃虫幼虫: *Heliothis armigera*。

黄豆粉:黄豆炒熟后磨碎过 60 目筛。

大麦粉:过 60 目筛。

酵母粉:工业用。

36%乙酸溶液:乙酸(化学纯),溶于蒸馏水。

苯甲酸钠:分析纯。

甲醛:分析纯。

维生素 C:医用,分析纯。

琼脂粉:凝胶强度大于 300 g/cm²。

磷酸缓冲液:同 B1.1。

B2.2 仪器、设备

分析天平:精确到 0.1 mg。

电动搅拌器:无级调速,100~6 000 r/min。

微波炉或电炉。

振荡器。

水浴锅。

组织培养盘:24 孔。

搪瓷盘:30 cm×20 cm。

磨口三角瓶:250 mL,具塞。

大烧杯:1 000 mL。

小烧杯:50 mL。

试管:18 mm×180 mm。

玻璃珠:φ5 mm。

注射器:50 mL。

标本缸。

恒温培养箱。

B2.3 测定步骤

B2.3.1 饲料准备

饲料配方:酵母粉 12 g、黄豆粉 24 g、维生素 C 1.5 g、苯甲酸钠 0.42 g、36%乙酸 3.9 mL、蒸馏水 300 mL。

将黄豆粉、酵母粉、维生素 C、苯甲酸钠和 36%乙酸放入大烧杯内,加 100 mL 蒸馏水湿润,另将余下 200 mL 蒸馏水加入琼脂粉内,在微波炉上加热至沸腾,使琼脂完全熔化,取出冷却至 70℃,即与其他成分混合,在电动搅拌器内高速搅拌 1 min,迅速移至 60℃水浴锅中加盖保温。

B2.3.2 感染液的配制

称 100.0~150.0 mg 可湿性粉剂样品,至盛有玻璃珠的磨口具塞三角瓶中,加磷酸缓冲液 100 mL,浸泡 10 min,在振荡器上振荡 1 min 即成母液。或将悬浮剂样品充分振荡均匀后,吸取 1.00 mL,至盛有玻璃珠的磨口具塞三角瓶中,加磷酸缓冲液 99 mL,浸泡 10 min,在振荡器上振荡 1 min 即成母液,于分

析天平上称取 150.0~300.0 mg 标准品(精确到 0.1 mg),如上法制成母液。将样品和标准品母液用磷酸缓冲液以一定的倍数等比稀释,每个样品和标准品至少各稀释 5 个浓度,并设一缓冲溶液作对照,每一浓度感染液吸取 3 mL 至 50 mL 小烧杯内待用,对照吸取 3 mL 磷酸缓冲液。

B2.3.3 饲料和感染液的混合及分装

用注射器吸取 27 mL 饲料,注入上述已有样品或标准品感染液的烧杯内,以电动搅拌器高速搅拌 0.5 min,迅速倒入组织培养盘上各小孔中(倒入量不要求一致,以铺满孔底为准),凝固待用。

B2.3.4 接虫感染

于 26~30℃ 室温下,将未经取食的初孵幼虫(孵化后 12 h 内)抖入直径 20 cm 的标本缸中,静待数分钟选取爬上缸口的健康幼虫作供试虫,用毛笔轻轻地将它们移入已有感染饲料的组织盘的小孔内,每孔一头虫。每个浓度和空白对照皆放 48 头虫,用塑料薄片盖住,然后将组织培养盘逐个叠起,用橡皮筋捆紧,竖立放于 30℃ 恒温培养箱内培养 72 h。

B2.4 结果检查和统计分析

用肉眼或放大镜检查死、活虫数。以细签触动虫体,完全无反应的为死虫,计算死亡率。如对照有死亡,可查 Abbott 校正值表或按式(B1)计算校正死亡率。对照死亡率在 6% 以下不用校正,6%~15% 之间需校正,大于 15% 则测定无效。将浓度换算成对数值,死亡率或校正死亡率换算成机率值,用最小二乘法分别求出标准品和样品的 LC_{50} ,按式(B2)计算毒力效价。

B2.5 允许差

毒力测定方法的允许相对偏差要求与 B1.5 相同。