

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悬浮剂的要求、试验方法、抽样以及包装、运输等作了具体要求和规定,从而为苏云金杆菌的生产提供了统一的技术依据。

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。

苏云金杆菌悬浮剂

Bacillus thuringiensis suspension concentrate

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悬浮剂的要求、试验方法以及标志、标签、包装、贮运。

本标准适用于由苏云金杆菌原药和助剂制成的苏云金杆菌悬浮剂,主要用于防治鳞翅目害虫。

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,所有版本均为有效。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 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 14825—1993 农药可湿性粉剂悬浮率测定方法

GB/T 16150—1995 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

HG 3617—1999 苏云金杆菌原粉

3 要求

3.1 外观:棕黄色至褐色悬浮液体。

3.2 苏云金杆菌悬浮剂还应符合表 1 要求。

表 1 苏云金杆菌悬浮剂控制项目指标

项 目	指 标		
	8 000 IU/ μ L	4 000 IU/ μ L	2 000 IU/ μ L
毒素蛋白,% <div>\geq</div>	0.8	0.4	0.2
毒力效价([Px IU/ μ L][Ha IU/ μ L]) <div>\geq</div>	8 000	4 000	2 000
pH 值范围	4.5~6.5		
细度(150 μ m),% <div>\geq</div>	98		
悬浮率(有效成分),% <div>\geq</div>	80		
注: Px 和 Ha 分别为小菜蛾(<i>Plutella xylostella</i>)和棉铃虫(<i>Heliothis armigera</i>)的缩写。			

国家石油和化学工业局 1999-06-16 批准

2000-06-01 实施

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)中第四章“乳剂和液体状态的采样”进行,用随机数表法确定抽样的包装件数,最终抽样量应不少于 250 mL。

4.2 鉴别试验

当用生物测定法检测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,并同时测定毒素蛋白含量是否符合 3.2 指标的规定。

4.3 毒素蛋白含量的测定

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悬浮剂伴孢晶体,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 三羟基甲基氨基甲烷-HCl 缓冲液:称取三羟基甲基氨基甲烷 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 三羟基甲基氨基甲烷-HCl 缓冲液:称取三羟基甲基氨基甲烷 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:称取三羟基甲基氨基甲烷 3.03 g,甘氨酸 14.42 g,十二烷基硫酸钠 1 g,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。

3×样品稀释液:1 mol/L、pH6.8 三羟基甲基氨基甲烷-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 20 mg（准确至 0.1 mg），移至 5 mL 离心管中，加 2 mL 水充分悬浮。

量取待测试样 10 mL，准确称量后，用蒸馏水定容至 100 mL，充分摇匀后取 2 mL 稀释液，移至 5 mL 离心管中。

在上述 2 mL 试样溶液中加入 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℃ 沸蒸馏水中煮 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 HG 3616—1999 附录 A（提示的附录）。

b) 上样

取上述标样溶液上层清液，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）的乙酸中浸泡 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悬浮剂伴孢晶体，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，再割胶，洗脱，测定吸光度。

4.3.2.2 仪器

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,放于玻璃试管中,再加 25% 吡啶(体积百分数)3.0 mL,于 37℃ 下振荡洗脱毒素蛋白所吸附的考马斯亮蓝(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 HG 3616—1999 附录 B(标准的附录)进行。

4.5 pH 值的测定

按 GB/T 1601 进行。

4.6 悬浮率测定

4.6.1 测定步骤

样品摇匀后取 5.00 mL(精确到 0.01 mL),于 100 mL 三角玻璃瓶中,加入标准硬水 100 mL,用手左右振荡 50 次。制得的悬浮液全部转移到 250 mL 具塞量筒中,用标准硬水稀释到 250 mL。按 GB/T 14825—1993 中 3.1 进行。

4.6.2 计算

悬浮率(Y)按式(2)进行计算:

$$Y = \frac{111.1(C - Q)}{C} \dots\dots\dots(2)$$

式中: C——配置悬浮液所取试样的毒力效价, IU;

Q——留在量筒底部的 25 mL 悬浮液的毒力效价, IU。

4.6.3 允许差

二次重复测定结果之差不得超过 10%。

4.7 细度的测定

吸 20.00 mL 试样(准确至 0.01 mL),按 GB/T 16150—1995 中 2.2 进行。

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,并应注明所用标准编号。

6.2 悬浮剂产品主要采用 1 L 塑料壶包装,壶有内外盖,不泄漏。

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,悬浮剂的质量保证期从生产日期算起为一年半,本产品出厂时毒力效价且蛋白含量不低于 3.2 指标,一年半内毒力效价与蛋白含量均不低于 3.2 指标的 60%。
