

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可湿性粉剂的要求、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。

苏云金杆菌可湿性粉剂

Bacillus thuringiensis wettable powder

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可湿性粉剂的要求、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等制成的苏云金杆菌可湿性粉剂,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 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 5451—1984 农药可湿性粉剂湿润性测定方法
 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 3616—1999 苏云金杆菌原粉

3 要求

3.1 外观:灰白色至棕褐色疏松粉末,不应有团块。

3.2 苏云金杆菌可湿性粉剂应符合表 1 要求。

表 1 苏云金杆菌可湿性粉剂控制项目指标

项 目	指 标		
	32 000 IU/mg	16 000 IU/mg	8 000 IU/mg
毒素蛋白, % \geq	4.0	2.0	1.0
毒力效价([Px IU/mg][Ha IU/mg]) \geq	32 000	16 000	8 000
pH 值	6.0~7.5		
细度(75 μ m), % \geq	98		

表 1 (完)

项 目	指 标		
	32 000 IU/mg	16 000 IU/mg	8 000 IU/mg
悬浮率(有效成分), %	≥	70	
湿润时间, min	≤	3	
水分, %	≤	4.0	

注: Px 和 Ha 分别为小菜蛾(*Plutella xylostella*)和棉铃虫(*Heliothis armigera*)的缩写。

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)中第五章“粉剂和可湿性粉剂的采样”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、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可湿性粉剂伴孢晶体,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

取上述标样溶解上层清液,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可湿性粉剂伴孢晶体,使其降解为毒素蛋白后,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,放于玻璃试管中,再加 25%吡啶(体积百分数)3.0 mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 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 细度的测定

按 GB/T 16150—1995 中 2.2 进行测定。

4.7 悬浮率测定

4.7.1 操作步骤

称取样品 200.0 mg(精确到 0.1 mg),放入盛有玻璃珠的三角瓶中,加入标准硬水 100 mL,用左右振荡 60 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—93 中 3.1 进行。

4.7.2 计算

悬浮率(Y)按式(2)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。

4.7.3 允许差

二次重复测定结果之差应不超过 10%。

4.8 湿润时间的测定

按 GB/T 5451 进行。

4.9 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，并注明所用标准编号。

6.2 可湿性粉剂产品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，可湿性粉剂的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 70%。