



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 19567.1—2004

---

## 苏云金芽胞杆菌原粉

*Bacillus thuringiensis* technical

2004-06-22 发布

2004-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

苏云金芽胞杆菌(*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胞晶体中的毒素蛋白,其中,本标准所检测的对鳞翅目害虫有毒力的毒素蛋白的相对分子量为 130 kDa。生物测定中甜菜夜蛾用于检测对鳞翅目害虫有毒力的苏云金芽胞杆菌原粉的毒力,小菜蛾和棉铃虫用于检测对苏云金芽胞杆菌鳞翅目害虫有活性的苏云金芽胞杆菌原粉的毒力。

本标准是根据我国以往制定的苏云金芽胞杆菌行业和企业标准等有关材料,结合我国的实际情况制定的。

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

本标准的附录 A 是资料性附录,附录 B 是规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位:农业部农药检定所、华中农业大学微生物农药国家工程研究中心、湖北省生物农药工程研究中心。

本标准主要起草人:姜辉、喻子牛、陈守文、王开梅、王晓军、吴新平、顾宝根。

本标准由农业部农药检定所负责解释。

# 苏云金芽胞杆菌原粉

## 1 范围

本标准规定了苏云金芽胞杆菌原粉的要求、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芽胞杆菌原粉。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

- GB/T 1250 极限数值的表示方法和判定方法
- GB/T 1600—2001 农药水分测定方法
- GB/T 1601 农药 pH 值的测定方法
- GB/T 1604 商品农药验收规则
- GB/T 1605—2001 商品农药采样方法
- GB 3796 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:灰白色或棕褐色粉末。
- 3.2 苏云金芽胞杆菌原粉应符合表 1 要求。

表 1 苏云金芽胞杆菌原粉控制项目指标

项 目	指 标				
	<i>B. t. a</i>		<i>B. t. k</i>		
	一等品	合格品	一等品	合格品	
毒素蛋白(130 kDa)/(%)	≥	8.0	7.0	7.0	6.0
毒力效价( <i>P. x.</i> , <i>H. a.</i> )/(IU/mg)	≥			50 000	40 000
毒力效价( <i>S. e.</i> )/(IU/mg)	≥	60 000	50 000		
pH 值		5.5~7.0			
水分/(%)	≤	6.0			
细度(75 μm)/(%)	≥	98			

注 1: *P. x.*、*H. a.* 和 *S. e.* 分别为小菜蛾(*Plutella xylostella*)、棉铃虫(*Heliothis armigera*)和甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)缩写。  
注 2: *B. t. a* 为苏云金芽胞杆菌鮎泽亚种;*B. t. k* 为苏云金芽胞杆菌库斯塔克亚种。

## 4 试验方法

除非另有说明,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—2001 中“商品原药采样”进行,用随机数表法确定抽样的包装件,最终抽样量不少于 100 g。

#### 4.2 毒素蛋白含量

用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶图像处理法进行测定。

##### 4.2.1 方法提要

用碱性溶液处理苏云金芽胞杆菌原粉中的伴胞晶体,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,使毒素蛋白与苏云金芽胞杆菌杂蛋白分离,之后用电泳图像扫描蛋白区带面积,进行定量。

##### 4.2.2 仪器、设备

- a) 电泳仪;
- b) 双垂直式电泳槽(1.5 mm 凹形带槽橡胶模框),凝胶板面积 170 mm×170 mm(1.5 mm、20 孔样品槽模具);
- c) 电泳凝胶成像系统;
- d) 离心机:10 000 r/min;
- e) 分析天平:精确至 0.000 1 g。

##### 4.2.3 试剂和溶液

4.2.3.1 过硫酸铵(APS)。

4.2.3.2 十二烷基硫酸钠(SDS)。

4.2.3.3 四甲基乙二胺(TEMED)。

4.2.3.4 氢氧化钠。

4.2.3.5 30%丙烯酰胺凝胶母液: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。

4.2.3.6 分离胶缓冲液:称取三羟基甲基氨基甲烷(Tris)18.17 g 和 SDS 0.4 g 溶于蒸馏水中,用浓盐酸调至 pH8.8,用蒸馏水定容至 100 mL。

4.2.3.7 浓缩胶缓冲液:称取 Tris 6.06 g 和 SDS 0.4 g 溶于蒸馏水中,用浓盐酸调至 pH6.8,用蒸馏水定容至 100 mL。

4.2.3.8 电极缓冲液:称取 Tris 3.036 g,甘氨酸 14.42 g,SDS 1 g,用水溶解并定容至 1 000 mL。

4.2.3.9 3×样品稀释液:1 mol/L、pH6.8 Tris-HCl 18.75 mL,SDS 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。

4.2.3.10 固定液:量取 95%乙醇 500 mL,冰乙酸 160 mL,用蒸馏水定容至 1 000 mL。

4.2.3.11 染色液:称取考马斯亮蓝(CBB)R-250 1 g,加入 95%乙醇 250 mL,冰乙酸 80 mL,蒸馏水定容至 1 000 mL,溶解过滤后使用。

4.2.3.12 脱色液:量取 95%乙醇 250 mL,冰乙酸 80 mL,用蒸馏水定容至 1 000 mL。

4.2.3.13 毒素蛋白标样:毒素蛋白(相对分子量为 130 kDa)含量为 8.0%的原粉。

##### 4.2.4 样品处理

称取标样、试样各 20.0 mg(精确到 0.1 mg),移至 1.5 mL 离心管中,加 1 mL 水充分悬浮。取 100 μL 加入另一 1.5 mL 离心管,加入 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液 25 μL(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 75 μL,使最终体积为 200 μL,于 100℃沸水中煮沸 6 min,离心(2 000 r/min)10 min 后取上层清液,以备电泳上样。

##### 4.2.5 SDS-PAGE 分离毒素蛋白

###### 4.2.5.1 制备 8%~10%聚丙烯酰胺凝胶

采用不连续缓冲系统,制胶方法参见附录 A(资料性附录)。

#### 4.2.5.2 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  $\mu\text{L}$ (毒素蛋白含量约为 3  $\mu\text{g}$ ~7  $\mu\text{g}$ ),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  $\mu\text{g}$ ),加入到上样孔中,注入电极缓冲液后,接通电源。

#### 4.2.5.3 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 170 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%(体积分数)乙酸中浸泡 30 min。

#### 4.2.5.4 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。

#### 4.2.5.5 脱色

倒去染色液,先用漂洗液洗涤凝胶,然后加入脱色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 保温脱色,更换几次脱色液,至背景清晰为止。

#### 4.2.6 测定

胶板经脱色后,可清晰地看到分子量为 130 kDa 蛋白区带,用凝胶成像系统对凝胶进行分析。

样品中毒素蛋白的百分含量(X)按式(1)进行计算。

$$X = \frac{M}{c \times V} \times n \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

M——由标准蛋白回归曲线计算得到的蛋白量;

c——样品的浓度;

V——样品的加样体积;

n——样品的稀释倍数。

#### 4.2.7 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 5%。

#### 4.3 毒力效价的测定

按附录 B(规范性附录)进行。

#### 4.4 pH 值的测定

按 GB/T 1601 测定

#### 4.5 细度的测定

按 GB/T 16150—1995 中 2.2 进行测定。

#### 4.6 水分的测定

按 GB/T 1600—2001 中“共沸蒸馏法”进行测定。

### 5 检验规则

需符合 GB/T 1604 有关规定。极限值按 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及检测所用试虫。

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两年,产品出厂时毒力效价和毒素蛋白的含量不低于 3.2 指标,两年内产品毒力效价和毒素蛋白的含量不低于 3.2 指标的 70%。

**附录 A**  
**(资料性附录)**  
**电泳凝胶的制备**

**A.1 制板**

本实验选用双垂直电泳槽,具体操作根据实验室条件而定。基本操作是根据电泳槽高矮大小,选择两块大小一样的玻璃板,其中一块端部带有 2 cm~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。

**A.2 制备分离胶**

从冰箱中取出制胶试剂,平衡至室温。按表 A.1 配方配制分离胶。本试验中分离胶浓度为 7.5%。

按表 A.1 配方将胶液配好、混匀后,迅速注入两块玻璃的间隙中,至胶液面离玻璃板凹槽 3 cm 左右。然后在胶面上轻轻铺 1 cm 高的蒸馏水,加蒸馏水时通常沿玻璃板慢慢加入,勿扰乱胶面。垂直放置胶板于室温,1 h 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。然后倒掉胶面上的蒸馏水。

**A.3 制备浓缩胶**

用量根据实际情况而定,制备方法按表 A.1 配方配制。

按表 A.1 配方将胶液混合,取少量灌入玻璃板间隙中,冲洗分离凝胶面,而后倒出。将余下的胶液注入玻璃板间隙间,使胶液液面与玻璃板凹槽处平齐,而后插入“梳子”(样品槽模板),在室温放置 20 min~30 min,浓缩胶即可凝聚。凝固后,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。

**表 A.1 SDS-PAGE 凝胶的配方**

贮存液	分离胶	浓缩胶
30% 丙烯酰胺母液	18 mL	2 mL
分离胶缓冲液	18 mL	
浓缩胶缓冲液		4.5 mL
双蒸水	35 mL	11.5 mL
10% 过硫酸胺(APS)	0.5 mL	0.1 mL
四甲基乙二胺(TEMED)	0.1 mL	0.02 mL

**附录 B**  
(规范性附录)  
**毒力效价的测定**

**B.1 毒力效价的测定方法——用小菜蛾(*Plutella xylostella*)作试虫的测定方法**

**B.1.1 试剂或材料**

标准品:CS-1995, H<sub>3ab</sub>, 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:凝胶强度大于 300 g/cm<sup>2</sup>。

磷酸氢二钾:分析纯。

磷酸二氢钾:分析纯。

聚山梨酯-80:粘度  $3.5 \times 10^{-4}$  m<sup>2</sup>/s~ $5.5 \times 10^{-4}$  m<sup>2</sup>/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%酒精。

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。

**B.1.2 仪器、设备**

磨口三角瓶:250 mL,具塞。

分析天平:精确到 0.1 mg。

电动搅拌器:无级调速,100 r/min~6 000 r/min。

医用手术刀。

微波炉或电炉。

振荡器。

水浴锅。

养虫管:9 cm×2.5 cm。

小烧杯:50 mL。

大烧杯:500 mL。

试管:18 mm×180 mm。

玻璃珠:直径 5 mm。

移液管:10 mL,5 mL,2 mL,1 mL。

**B.1.3 测定步骤**

**B.1.3.1 感染液的配制**

**B. 1. 3. 1. 1 标准品**

用分析天平准确称取标准品 100.0 mg~150.0 mg(精确到 0.1 mg),放入 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 3 min,得到浓度为 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. 1. 3. 1. 2 原粉样品**

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。

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,估计致死中浓度(LC<sub>50</sub>值)的范围,据此设计稀释浓度。

**B. 1. 3. 2 感染饲料的配制**

饲料配方:维生素 C0.5 g,干酪素溶液 10 mL,菜叶粉 3.0 g,酵母粉 1.5 g,纤维素粉 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,使琼脂完全溶化,加入尼泊金搅匀。将苏云金芽胞杆菌成分用剩余的 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,以缓冲液作空白对照。向每个烧杯中加入 9 mL 溶化的感染饲料,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。

**B. 1. 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。

**B. 1. 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试昆虫死亡率,查 Abbott 表或计算校正死亡率( $X_1$ )。空白对照死亡率 10%以下需要校正,大于 10%则试验结果无效。

校正死亡率按式(B. 1)计算:

$$X_1 = \frac{T-C}{1-C} \times 100\% \dots\dots\dots(B. 1)$$

式中:

T——药剂处理死亡率;

C——空白对照死亡率。

将感染液各浓度换算成对数值,校正死亡率转换成死亡几率值,用最小二乘法分别求出标准品 LC<sub>50</sub>值和待测样品 LC<sub>50</sub>值,计算待测样品的毒力效价( $X_2$ )。

毒力效价按式(B. 2)计算:

$$X_2 = \frac{S \times P}{Y} \dots\dots\dots(B. 2)$$

式中:

S——标准品 LC<sub>50</sub>值;

P——标准品效价;

Y——样品 LC<sub>50</sub>值。



### B.1.5 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%死亡率上下至少各有两个浓度。

## B.2 毒力效价测定方法——以棉铃虫(*Heliothis armigera*)作试虫的测定方法

### B.2.1 试剂和材料

标准品:CS-1995,  $H_{3ab}$ , 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/cm<sup>2</sup>。

磷酸缓冲液:同B.1.1。

### B.2.2 仪器、设备

分析天平:精确到0.1 mg。

电动搅拌器:无级调速,100 r/min~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:直径5 mm。

注射器:50 mL。

标本缸。

恒温培养箱。

### B.2.3 测定步骤

#### B.2.3.1 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蒸馏水湿润备用。将余下200 mL蒸馏水加入琼脂粉内,在微波炉上加热至沸腾,使琼脂完全溶化,取出冷却至70℃,与苏云金芽胞杆菌成分混合,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。

#### B.2.3.2 感染液的配制

称100.0 mg~150.0 mg(精确到0.1 mg)原粉样品,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。于分析天平上称取150.0 mg~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。

#### B.2.3.3 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。

#### B.2.3.4 接虫感染

于 26℃~30℃ 室温下,将未经取食的初孵幼虫(孵化后 12h 内)抖入直径 20cm 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。

#### B.2.4 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(B.1)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% 则试验无效。将浓度换算成对数值,死亡率或校正死亡率换算成几率值,用最小二乘法分别求出标准品和样品的  $LC_{50}$  值,按式(B.2)计算毒力效价。

#### B.2.5 允许差

毒力测定方法的允许相对偏差要求与 B.1.5 相同。

### B.3 毒力效价测定方法——以甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)作试虫的测定方法

#### B.3.1 材料和试剂

标准品:CS-2002,  $H_{7ab}$ , 20 000 IU/mg。

甜菜夜蛾幼虫:*Spodoptera exigua*。

黄豆粉:黄豆炒熟后磨碎过 60 目筛。

酵母粉(200 目):工业用。

维生素 C:医用,分析纯。

15% 尼泊金:对羟基苯甲酸甲酯(化学纯)溶于 95% 酒精。

10% 甲醛:甲醛(分析纯)溶于蒸馏水。

琼脂:凝胶强度大于 300 g/cm<sup>2</sup>。

蒸馏水。

#### B.3.2 仪器

分析天平:精确度 0.1 mg。

电动搅拌器:无级调速,100 r/min~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:直径 5 mm。

注射器:50 mL。

标本缸。

恒温培养箱。

### B.3.3 测定步骤

#### B.3.3.1 饲料配方

黄豆粉 32 g(60 目),酵母粉 16 g(200 目),琼脂 6 g,维生素 C 2 g,15%尼泊金 6.7 mL,10%甲醛 4 mL,水 400 mL。

将黄豆粉、酵母粉、维生素 C、尼泊金和 10%甲醛放入大烧杯中,加入 150 mL 水,混匀备用。将余下的 250 mL 水加入琼脂,在微波炉上加热至沸腾,使琼脂完全溶化,取出冷却至 70℃。与苏云金芽孢杆菌成分混合,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。

#### B.3.3.2 感染液的配制

称取 CS<sub>7ab</sub>-2002 标准品 150.0 mg~300.0 mg(精确至 0.1 mg),置于 250 mL 带有玻璃珠的三角瓶中,加入 100 mL 磷酸缓冲液,浸泡 10 min,在漩涡振荡器上振荡 1 min 后即为标准品感染母液。称取 100.0 mg~150.0 mg 原粉样品,置于 250 mL 带有玻璃珠的三角瓶中,加入 100 mL 磷酸缓冲液,浸泡 10 min,在漩涡振荡器上振荡 1 min 配制成样品感染母液。以两倍稀释法将标准品和样品母液稀释成一定浓度梯度,每个样品至少各稀释 5 个浓度梯度,每一浓度感染液吸取 3 mL 至 50 mL 小烧杯中待用。对照吸取 3 mL 磷酸缓冲液。

#### B.3.3.3 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。

#### B.3.3.4 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 30 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,竖放于 25℃培养箱内培养 72 h。

### B.3.4 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(B.1)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%则试验无效。将浓度换算成对数值,死亡率或校正死亡率换算成几率值,用最小二乘法或有统计功能的计算器,分别求出标准品和样品的 LC<sub>50</sub>,按式(B.2)计算毒力效价。

#### B.3.5 允许差

毒力测定方法的允许相对偏差要求与 B.1.5 相同。

### B.4 对掺入其他有效成分的可疑样品的检测

对于某些符合正文 3.2 分析指标的可疑样品,可通过测定原粉样品中胞晶混合物的毒力贡献率,判定样品中是否掺入其他有效成分。

#### B.4.1 原粉中不同成分的分离

用丙酮将原粉稀释成 10 mg/mL 的溶液,4℃下 5 000 r/min 离心 10 min,保留沉淀组分,用等体积的丙酮悬浮,再进行离心,共离心洗涤 3 次,保留沉淀组分;用等体积的蒸馏水悬浮沉淀组分,离心并保留沉淀组分,共进行 3 次离心洗涤,保留沉淀组分,该沉淀组分即为原粉中的胞晶混合物。

#### B.4.2 毒力效价的测定

按 B.1、B.2 或 B.3 的方法,对单位质量原粉及原粉的沉淀组分(胞晶混合物)分别进行毒力效价测定。

**B.4.3 样品中是否掺入其他有效成分的判断**

依据原粉中胞晶混合物的毒力贡献率( $X_3$ )来判断原粉样品中是否掺入其他有效成分:

毒力贡献率按式(B.3)计算:

$$X_3 = \frac{I}{T} \times 100\% \dots\dots\dots(B.3)$$

式中:

$I$ ——单位质量原粉中胞晶混合物的毒力效价;

$T$ ——单位质量原粉的毒力效价。

若原粉中胞晶混合物的毒力贡献率小于70%,则判定此原粉样品不符合标准。

---