附件12

病毒微生物农药草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂

（征求意见稿）

1. 范围

本部分规定了草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂的要求、试验方法以及标志、标签、包装、贮运、安全和保质期。

本部分适用于以病毒包涵体为主要成分的草地贪夜蛾核型多角体病毒母药添加适宜助剂加工而成的草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

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商品农药采样方法

GB 3796农药包装通则

GB 4789.2食品卫生微生物学检验菌落总数测定

GB/T 6682分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 14825 农药悬浮率测定方法

GB/T 16150农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

GB/T 20813农药产品标签通则

GB/T 28137 农药持久起泡性测定方法

GB/T 31737 农药倾倒性测定方法

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1　草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂Spodoptera frugiperdamultiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) suspension concentrate（SC）

以草地贪夜蛾核型多角体病毒母药与适宜的载体及分散剂混合均匀的液体制剂。

3.2　病毒包涵体occlusionbody（OB）

病毒水平传播的主要载体形式，其结构特征是病毒粒子包埋于蛋白质基质的多角体中。

3.3　生测效价比potency ratio

根据药物的药理和对生物体的作用设计试验，比较样品、标准品引起的生物反应，测定药物效价或其生物学活性。

3.4　菌落形成单位colony forming units（CFU）

由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落。指在琼脂平板上在一定温度下，经过一定时间培养后形成的每一个菌落，是计算细菌或霉菌数目的单位。

3.5　杂菌菌落总数number of microbial contaminants

将草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂样品稀释后涂布在琼脂营养培养基上，在一定温度下，经过一定时间培养所得到的微生物（真菌和细菌）菌落数之和。

４要求

4.1外观

应是可流动、易测量体积的悬浮液体；存放过程中可能出现沉淀，但经搅动能恢复为均匀的悬液，不应有结块。

4.2规范项目及指标

草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂还应符合表1要求。

**表1 草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂控制项目指标**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目** | **指标** |
| 病毒包涵体数量，OB/mL | ≥标示值a |
| 生测效价比（标准品LC50/待测样品LC50），%  | ≥80.0 |
| 杂菌菌落总数，CFU/g（mL） | ≤1.0×107 |
| pH范围 | 5.0-7.5 |
| 悬浮率，%  | ≥80.0 |
| 细度（通过75 µm标准筛)，% | ≥95.0 |
| 倾倒性 | 倾倒后残余物，%  | ≤3.0 |
| 洗涤后残余物，%  | ≤0.5 |
| 持久起泡量（1min后），mL  | ≤30.0 |
| 低温稳定性b | 合格 |
| a标示值可以为5亿OB/mL、10亿OB/mL、30亿OB/mL |
| b低温稳定性试验每3个月至少检验一次 |

5 试验方法

5.1 一般规定

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，试验用水为GB/T 6682中规定的三级水。

5.2抽样

按GB/T 1605中“液体制剂采样”方法进行。用随机数表法确定抽样的包装件，最终抽样量一般不少于600 mL。

5.3PCR扩增及DNA测序法对病毒毒种的鉴定

提取试样中病毒DNA作为模板，用杆状病毒核心基因*me53*基因*和lef-9*基因引物（连接*m13*通用引物序列）进行PCR扩增反应，琼脂糖凝胶电泳检测后，用*m13*通用引物对PCR产物进行测序，将测序结果与草地贪夜蛾核型多角体病毒KYc01株的*me53*基因（GenBank 序列号:MN833125）和*lef-9*基因的核苷酸序列进行比对分析，核苷酸一致性均大于98%，即认定试样中的病毒为草地贪夜蛾核型多角体病毒。

草地贪夜蛾核型多角体病毒有效成分描述参见附录A。

草地贪夜蛾核型多角体病毒毒种的鉴定的方法按照附录B的规定。

5.4 病毒包涵体含量的测定

5.4.1方法提要

草地贪夜蛾核型多角体病毒包涵体含量的测定采用血球计数板计数法。称取少量病毒试样，用定量的水稀释成水悬浮液，并稀释至适当倍数后，滴加在血球计数板上，在光学显微镜下计数。根据血球计数板上病毒包涵体的数量以及稀释倍数，计算出单位质量（体积）病毒包涵体的数量。

5.4.2仪器、设备

分析天平：精确至0.0001g；

微量移液器：0.1 mL~1 mL；

容量瓶：10 mL；

光学显微镜；

血球计数板及专用盖玻片。

5.4.3测定步骤

a）将试样充分震荡摇匀后，准确吸取一定量的试样（精确到0.0001 g）置于10 mL容量瓶中，加水稀释至刻度，配制成母液。取母液稀释成适当浓度的悬浮液（最终稀释液使每小格有2～4个病毒包涵体）。计数时，将清洁干燥的血球计数板的计数室上加盖专用的盖玻片，用微量移液器吸取稀释后的病毒悬液，滴于盖玻片边缘，让悬液自行缓缓渗入，一次性充满计数室，防止产生气泡，充入悬液的量以不超过计数室台面与盖玻片之间的矩形边缘为宜。多余悬液可用滤纸吸去。

b）将载有试样悬液的计数板静置15 min，放在显微镜下分别观察两个计数室，每个计数室选取4角及正中央5个中方格（共80个小方格），计数病毒包涵体的总数。两个计数室各5个中方格中包涵体总数取平均值。

5.4.4 计算

试样中草地贪夜蛾核型多角体病毒包涵体含量*X1*（单位为OB/mL）按式（1）计算：

$X\_{1}=\frac{A×B}{80}×4×10^{6}$………………………………………………(1)

式中：*A* ——两个计数室各5个中方格中病毒包涵体总数的平均值，单位为OB；

*B* ——样品稀释倍数，单位为毫升/毫升（mL/mL）；

4×106——1毫升母液含有计数小方格的个数，单位为个每毫升（个/mL）；

80——计数小方格数，单位为个。

5.4.5 允许差

进行两次平行测定。两次平行测定结果之差应不大于20%，取其算术平均值作为测定结果。

5.5 生测效价比的测定

生测效价比（标准品LC50/待测样品LC50）的测定方法，按照附录C进行。

5.6杂菌菌落总数的测定

按GB 4789.2进行。

5.7 pH的测定

按GB/T 1601进行。

5.8悬浮率的测定

按照GB/T 14825进行。

5.9细度的测定

按GB/T 16150中2.2进行。

5.10 倾倒性的测定

按照GB/T 31737进行。

5.11持久气泡量的测定

按GB/T 28137进行。

5.12 低温稳定性试验

5.12.1 方法提要

试样在0℃保持1 h，观察外观有无变化，继续0℃贮存7 d，测试其物性指标是否符合标准要求。

5.12.2 仪器

制冷器：保持0℃±2℃。

5.12.3 试验步骤

取80 mL试样置于100 mL烧杯中，在制冷器中冷却至0℃±2℃，保持1 h，其间每隔15 min搅拌1次，每次15 s，观察外观有无变化。将烧杯放回制冷器，在0℃±2℃继续放置7 d。7 d后，将烧杯取出，恢复至室温，按5.8、5.9完成悬浮率和细度的测定。悬浮率和细度符合标准要求为合格。

6产品的检验与验收

应符合GB/T 1604的规定。极限数值处理采用GB/T 8170中的修约值比较法。

7 标志、标签、包装、贮运、安全和保质期

7.1标志、标签

应符合GB 3796和GB 20813的规定，注明“低毒”、“防暴晒”“防高温”等标志。

7.2包装

应符合GB 3796和GB 20813中的有关规定。

7.3贮运

贮运过程中应有遮避装置，防止日晒及潮湿。

7.4安全

在使用说明书或包装容器上，除有相应的毒性标志外，还应有毒性说明、中毒症状、解毒方法和急救措施。

7.5 保质期

在规定贮运条件下，草地贪夜蛾核型多角体病毒悬浮剂的质量保证期从生产日期算起为二年。二年保质期内，生测效价比和病毒包涵体数量不低于4.2所规定的控制指标。

1. （资料性附录）
草地贪夜蛾核型多角体病毒有效成分描述
2. 中文通用名称：草地贪夜蛾核型多角体病毒。
3. 拉丁文学名：Spodoptera frugiperdamultiple nucleopolyhedrovirus，简称SfMNPV。
4. 生物学分类：杆状病毒科、Alpha杆状病毒属。
5. 生物学特性：
	1. 形态结构：基本毒粒为杆状，毒粒有囊膜，囊膜内含有一个杆状的核衣壳，核衣壳中含有病毒基因组。病毒颗粒被包藏在蛋白晶体内形成包涵体（OB）。光学显微镜下观察，OB呈强折光性的颗粒；电子显微镜下观察，OB呈多面体形状，直径0.5～15 μm之间。
	2. 分子结构：杆状病毒基因组为双链、环状DNA分子。
	3. 包涵体生物学特征：包涵体可以保护病毒颗粒，包涵体非常稳定，对细菌、热和许多化学物质包括低pH有抵抗能力，使其在土壤中可以存活多年。
	4. 宿主范围及传播机理

本产品系通过自然界中分离草地贪夜蛾核型多角体病毒毒株，使其在活体宿主昆虫中扩增、分离纯化而成。该产品对草地贪夜蛾有特效，对其它生物安全，特别对人类和家畜等脊椎动物及鸟类无害。本品低毒。

病毒包涵体经害虫取食叶片进入目标害虫体内，在虫体内大量复制增殖扩散，急剧吞噬消耗虫体组织，导致害虫染病后组织细胞液化而亡，并通过死亡虫体的体液、粪便在害虫之间继续传播，形成流行性昆虫病毒病，药效持久。

1. 有效成分主要存在形态：草地贪夜蛾核型多角体病毒包涵体。
2. 生物活性：杀虫。
3. 溶解性：不溶于水。
4. 稳定性：在4°C以下可以长期保存，加工过程中处理温度不得高于60°C，在弱碱溶液、100°C以上高温条件下极快丧失生物活性。见光易丧失生物活性。
5. （规范性附录）
草地贪夜蛾核型多角体病毒毒种的鉴定

B.1 方法提要

通过提取试样病毒DNA作为模板，用杆状病毒核心基因*me53*基因和*lef-9*基因的引物（连接*m13*通用引物序列）进行PCR扩增反应，琼脂糖凝胶电泳检测后，用*m13*通用引物对PCR产物进行测序，将测序结果与草地贪夜蛾核型多角体病毒KYc01株的*me53*基因序列（GenBank 序列号:MN833125）和*lef-9*基因序列进行比对分析，确定试样的病毒是否为草地贪夜蛾核型多角体病毒。

B.2 试剂和溶液

碱裂解液：Na2CO3 31.8 g，NaCl 29.25 g，Na2EDTA‧2H2O 10.09 g，溶于800 mL蒸馏水，最后加蒸馏水定容至1 L。

乙二胺四乙酸（EDTA）。

冰醋酸。

十二烷基硫酸钠溶液（10%SDS）：100 g/L。在90 mL水中溶解10.0 g SDS，加热至68℃助溶，加入几滴浓盐酸调节溶液的pH值至7.2，加水定容至100 mL，分装备用。

蛋白酶K（20 mg/mL）：将200 mg的蛋白酶K加入到9.5 mL水中，轻轻摇动，直至蛋白酶K完全溶解。不要涡旋混合。加水定容到10 mL，然后分装成小份贮存于-20°C。

Tris‧HCl储存液（1 mol/L）：称取121.1 g Tris碱，加入700 mL双蒸水，用浓盐酸调节至pH值至7.0，定容至1 L。

Tris‧HCl缓冲液（0.01 mol/L）：取Tris‧HCl储存液稀释100倍。

TE缓冲液：0.01 mmol/L Tris·HCl，1 mmol/L EDTA，pH= 8.0。

TAE缓冲液：50×贮存液，pH约8.5：242 g Tris碱、57.1 mL冰醋酸、37.2 g Na2EDTA‧2H2O、加水至1 L。

Tris饱和苯酚（含0.1%β-巯基乙醇）。

氯仿。

异戊醇。

Taq酶。

Taq酶缓冲液。

dNTP。

10×DNA上样缓冲液：10 mmol/L EDTA，50%丙三醇，0.25%溴酚蓝。

琼脂糖凝胶：8 g/L。

溴化乙锭溶液：1 g/L。

1 kb DNA Marker。

*m13*通用引物+杆状病毒PCR引物：

*me53*上游引物: TGTAAAACGACGGCCAGTAAACGCCAAGTGTCAGGGAGAATG；

*me53*下游引物: CAGGAAACAGCTATGACCACGCACTTGAAAGGAAAATACACT；

*lef-9*上游引物:AGGGTTTTCCCAGTCACGAARAAYGGYTAYGCBG；

*lef-9*下游引物:GAGCGGATAACAATTTCACACTTGTCDCCRTCRCARTC。

其中：B = C, G或者T; D = A, G或者T; R = A或者G; Y = C或者T；下划线部分指*m13*通用引物序列

B.3仪器设备

分析天平：精确到0.0001 g；

微量移液器；

高速离心机：最高转速10000 r/min；

振荡器；

恒温水浴；

紫外分光光度计；

PCR仪；

电泳仪；

水平电泳槽；

凝胶成像系统；

DNAMAN或者其它序列比对软件；

离心管；

量筒；

容量瓶。

B.4 病毒DNA提取

取试样1.0 g或者1.0 mL，置于100 mL离心管中，蒸馏水99.0 mL，在振荡器上振荡1 min。取振荡后的混悬液300 μL于离心管中，再加入100 μL碱裂解液，置入37°C水浴中保持30 min。取出再加入200 μLTris·HCl缓冲液，10000×g离心8 min，取出上清，加入5 μL蛋白酶K和60 μL SDS，然后置入65°C水浴中保持2 h，取出冷却至室温后，加入650 μLTris饱和苯酚混合均匀，10000×g离心5 min，取出上清到一个新离心管中，再加入650 μL苯酚：氯仿（1:1）混合均匀，10000×g离心5 min，取出上清到一个新离心管中，再加入650 μL氯仿：异戊醇（24:1）混合均匀，10000×g离心5 min，取出上清到一个新离心管中，用紫外分光光度计测定DNA浓度，置4°C备用。

B.5 PCR扩增实验及琼脂糖凝胶电泳

取提取的病毒DNA 10-50 ng，加入Taq酶1 µL、对应的10×Taq酶缓冲液3 µL、dNTP 2 µL、*me53*基因和*lef-9*基因上下游引物各2 µL（10 mM），添加灭菌纯水至30 µL，置于PCR仪进行PCR扩增。PCR扩增条件：95°C，5 min热变性后，进行30个下述循环：95°C 30 s，55°C 30 s，72°C 1 min，最后再72°C延伸5 min。取PCR扩增产物3 µL或者1 kb DNA Marker与DNA上样缓冲液混匀，依次点样于琼脂糖凝胶中，80 V电泳至溴酚蓝带达到凝胶的另一端。电泳结束后于溴化乙锭溶液中进行DNA染色5 min，在凝胶成像系统中观察PCR产物。PCR产物的大小分别为654 bp和296bp。

B.6 PCR产物测序及凝胶电泳

凝胶成像系统中观察到分子量大小正确的PCR产物，用M13引物对PCR产物进行DNA测序。用DNAMAN软件对所测到的*me53*基因和*lef-9*基因序列与SfMNPV（KYc01株）的*me53*基因（GenBank 序列号:MN833125）和*lef-9*基因的DNA序列进行比对。

SfMNPV-KYc01株*me53*基因部分序列（654bp）：

AAACGCCAAGTGTCAGGGAGAATGCGGTAAAATTTTTAACAATGGTAAATTTTTGTTCTGTGTCTACGACACTTCGGCTGCTGCTGCAACAGCTTCATCTAGCGGCGAAGCCAAGTTTAAACTAGTTTGTAATCTCTGTTCTAACGATTATTCTTACAACAACAGGTACGAAGTTTTACAACTGTTTCCTACCGTTTCTCAGCAAGTGGTAGAACGTTTATGTGAGATTGGTTTTTTGACTAAATACATCTTTCCCATTAAACTAAACTATACCGAGACACAAACTAAAACCGAAGTCATTAACTATCATGATTTTTACAAGATGGTTAAATCTATCATCAAAGAAAAAAAAAGCAACGAACAAATCACAGAAATTAAACTCAGCACCTATGGTCGAGACTTGTTCGTCGAGACTGATGATTTTTGCGTTATGAGAAAAGACAGTAACGAGTTTAACGAAACCGTCTACGAGTTGGACTTCTTTCCTAAACAAAGTTCCATGTTAGAGTTTTTGAAAATTTACAAAGACAACAAACCTCTCACATACTTTTATACAGTTAAAAAACGAGTCTACTTGAGCATCTTTGATTATGCAGTGTATTTTCCTTTCAAGTGCGT。

SfMNPV-KYc01株*lef-9*基因部分序列（296bp）：

TTGTCGCCGTCGCAGTCGGTGTTGGCGCCGGTGAAAATGCCTAGGCCTACTTTGACGCTCCAGTCGGTGTTGTTTTTCGGCTGGAGCACGTCGGAAACTTGGGTGCTCAACTGCGAAATGTTGGGATGACGAGTCGTCCAAGCGCGAACGTTGTCCACGTCGCGGCCGTAGTATCGTTGAATGCTGCTTTTCGGCGGCACTACGACGTTGGGCGCGTTCAGACATTGCACGTTTGCGTAAAACGATGCCGTGTTCAAGAACGTAGAGTATAAAAATTGTCCAGCGTATCCATTTTT。

B.7结果分析

试样与草地贪夜蛾核型多角体病毒KYc01株的*me53*基因（GenBank序列号：MN833125）和*lef-9*基因的一致性均应该大于98%，确定试样病毒种是草地贪夜蛾核型多角体病毒。

1. （规范性附录）
生测效价比（标准品LC50/待测样品LC50）的测定

C.1 试剂或材料

草地贪夜蛾核型多角体病毒标准品：2×1010OB/g。

草地贪夜蛾（*Spodopterafrugiperda*）二龄幼虫。

酵母粉：工业用。

大豆粉，黄豆烤熟后磨碎过60目筛。

大麦粉：过60目筛。

玉米叶粉：玉米叶晒干磨碎过60目筛。

10%甲醛溶液。

山梨酸。

维生素C。

琼脂粉：凝胶强度大于300g/cm2。

磷酸缓冲液：磷酸缓冲液（pH =7.0）：称取NaCl8.0 g、Na2HPO4 1.44 g、KH2PO40.24 g、KCl0.2 g溶于800 mL蒸馏水，用1 mmol/L盐酸调节溶液的pH值至7.0，最后加蒸馏水定容至1 L，于冰箱中4°C下保存。

C.2 仪器和设备

微波炉。

分析天平：精确到0.1 mg。

电动搅拌器。

振荡器。

水浴锅。

细胞培养板：24孔。

搪瓷盘：30 cm×20 cm。

塑料离心管：10 mL。

量筒：5 mL，10 mL，100 mL，250 mL，500 mL。

容量瓶：50 mL，100 mL。

注射器（无针头）：50 mL。

微量移液器及吸头：10 μL，1 mL。

标本缸：1 L。

恒温培养箱（28°C±2°C）。

烧杯：1L。

C.3 测定步骤

C.3.1 饲料配制

取酵母粉24.0 g、黄豆粉48.0 g、大麦粉48.0 g、维生素C 3.0 g、苯甲酸钠0.84 g、36％乙酸7.8 mL放入1 L烧杯内，加200 mL蒸馏水湿润备用。

取40.0 g琼脂粉于1 L烧杯中，加入400 mL蒸馏水，在微波炉内加热至沸腾，使琼脂完全溶化，取出冷却至70°C，倒入预先配制的混合液中，用电动搅拌器高速搅拌1 min，迅速移至60 °C水浴锅中加盖保温备用。

C.3.2 感染液的配制

将待测样品摇匀后根据标识含量取适量置于10 mL塑料离心管中，加磷酸缓冲液9.0 mL，在振荡器上振荡1 min，取该悬浮液1.0 mL于100 mL容量瓶中，加磷酸缓冲液定容，制成待测样品母液（草地贪夜蛾核型多角体病毒KYc01包涵体浓度约为2.0×106OB/mL）。

称取标准品10.0 mg（精确至0.2 mg）置于10 mL塑料离心管中，加磷酸缓冲液10.0 mL，在振荡器上振荡1 min，取该悬浮液1.0 mL于100 mL容量瓶中，加磷酸缓冲液定容，制成标准品母液（草地贪夜蛾核型多角体病毒包涵体浓度为2.0×106OB/mL）。将样品和标准品母液用水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，并设清水作对照。

C.3.3 饲料和感染液的混合

将配好的饲料用注射器分装至24孔细胞培养板上，每孔约1mL，待饲料完全冷却后，每孔滴加病毒感染液10 μL，每个浓度用两块细胞培养板，轻轻转动细胞培养板，使病毒感染液在饲料表面分布均匀。

C.3.4接虫感染

于26°C～30°C室温下，将二龄初幼虫用毛笔轻轻移入已添加感染液和饲料的细胞培养板小孔内，每孔一头虫，每个浓度48头幼虫。接虫感染的细胞培养板覆盖3层吸水纸，加盖逐个叠起，用橡皮筋捆紧，置于26°C±1°C、湿度为60%、光周期为L:D（16:8）h条件下恒温培养箱内培养，第8d检查并记录死亡虫数。

C.3.5 检查和统计分析

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。记录各浓度的死亡虫数，计算死亡率及校正死亡率（*W*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*W*1（%）按公式(2)计算：

$W\_{1}=\frac{T-C}{1-C}×100$………………………………………………(1)

式中：*T*——感染液处理死亡率，%；

*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，用概率单位回归法分别求出标准品LC50值和待测样品LC50值（可以使用DPS或者SPSS等统计软件）。

C.3.6计算

待测样品的生测效价比（标准品LC50/待测样品LC50）*W*2根据公式（2）计算：

……………………………………………………………(2)

式中：*Y*——待测样品LC50值；

*Z*——标准品LC50值。

C.3.7 允许差

两次平行测定结果之差，不得超过20%。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_