

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3282.1—2018

---

## 真菌微生物农药 金龟子绿僵菌 第1部分：金龟子绿僵菌母药

Fungal pesticides—*Metarhizium anisopliae*—  
Part 1: *Metarhizium anisopliae* technical concentrate (TK)

2018-07-27 发布

2018-12-01 实施

---



中华人民共和国农业农村部 发布

## 前 言

NY/T 3282《真菌微生物农药 金龟子绿僵菌》分为3个部分：

- 第1部分：金龟子绿僵菌母药；
- 第2部分：金龟子绿僵菌油悬浮剂；
- 第3部分：金龟子绿僵菌可湿性粉剂。

本部分为NY/T 3282的第1部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本部分由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本部分起草单位：农业农村部农药检定所、重庆大学、重庆重大生物技术发展有限公司。

本部分主要起草人：王中康、王晓军、殷幼平、杨峻、李向英、郭明程、胡丽。

# 真菌微生物农药 金龟子绿僵菌

## 第1部分:金龟子绿僵菌母药

### 1 范围

本部分规定了金龟子绿僵菌母药的术语和定义、要求、试验方法、产品的检验和验收,以及标志、标签、包装、储运、安全和保质期。

本部分适用于以分生孢子为主要成分的粉状金龟子绿僵菌母药。

### 2 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 191 包装储运图示标志

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/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 16150 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**金龟子绿僵菌母药** *Metarhizium anisopliae* technical concentrate(TK)

金龟子绿僵菌纯菌种经生物发酵获得的高含量的单一或组合形态的活菌体母药,通常情况还会包含伴随发酵过程的相关生物组分。

#### 3.2

**分生孢子** conidia

真菌的一种无性繁殖细胞,由分生孢子梗上产孢细胞产生,是真菌农药中最常见的形态,简称孢子。

#### 3.3

**含孢量** spore content

每单位金龟子绿僵菌母药样品中所含金龟子绿僵菌孢子的数量。

#### 3.4

**活孢率** percentage of living spores

即孢子萌芽率,指在一定培养条件下,萌芽的金龟子绿僵菌孢子数占总孢子数的百分率。

#### 3.5

**菌落形成单位** colony forming units(CFU)

以涂布方法,使单个分生孢子分散生长在营养琼脂培养基上,每一活孢子形成一个菌落,即为菌落形成单位(CFU)。

3.6

**杂菌率 rate of microbial contaminants**

金龟子绿僵菌母药样品中除绿僵菌孢子外,其他菌(真菌和细菌等)量占总菌量的百分率。

3.7

**储存稳定性 storage stability**

金龟子绿僵菌母药在室温或低于室温下密闭储存一定时间后,产品的活孢数占其标明值的相对百分率。

4 要求

4.1 外观

外观通常为浅绿色至暗绿色粉末,由于发酵基质的不同颜色偶有差异;应为均匀疏松的粉末,不应有结块。

4.2 规范项目及指标

金龟子绿僵菌母药质量控制项目应符合表 1 的要求。

表 1 金龟子绿僵菌母药控制项目指标

项 目	指 标
含孢量,亿孢子/g	≥250
活孢率,%	≥85
杂菌率,%	≤5
干燥减量,%	≤8
细度(通过 175 μm 试验筛),%	≥90
pH	5.5~7.0
储存稳定性*,%	≥80
* 定期检测项目;每 6 个月检测一次。	

5 试验方法

5.1 一般规定

除非另有说明,试验方法所用试剂级别为化学纯及以上,所用溶液均为水溶液。

5.2 抽样

按照 GB/T 1605 的规定进行样品的采集,用随机数表法确定抽样的包装件,最终抽样量不少于 200 g。抽样时,从不同部位随机抽取至少 3 个样点的孢子粉,混合均匀。采样时,应特别注意样品的代表性和避免污染,采集容器和采样工具应经过消毒灭菌。样品采集后,应立即检验,若不能立即检验,可储存在 4℃ 冰箱中。

5.3 菌种鉴别

形态学特征观察:以划线或稀释涂布法将样品在萨氏培养基 1/4SDAY 上纯化培养,观察菌落形态颜色或色素等特征。用显微镜观察菌丝体、产孢梗和分生孢子并测量大小,对比近源绿僵菌的形态学特征描述进行鉴定。有效成分的特征描述参见附录 A。

菌种鉴别采用形态学特征观察和分子鉴定相结合的方式进行。常规检测主要根据代表菌株的形态学特征进行菌种鉴别。分子鉴定可采用核糖体 rRNA 基因序列或其他目标基因序列分析。菌种鉴别原则与方法见附录 B。

5.4 含孢量测定

5.4.1 方法提要

显微镜血球计数板计数法。将孢子样品加入吐温 80 溶液中,用高速匀浆器搅拌制成孢子悬浮液,

并稀释至适当倍数  $K_1$  后,在光学显微镜下用血球计数板直接计数孢子数,然后计算单位质量试样中的真菌含孢量。

#### 5.4.2 试剂和溶液

吐温 80。

0.1%吐温 80 溶液:(吐温 80 : 水)=1 : 1 000。

#### 5.4.3 仪器及设备

电子天平:精度为 0.001 g。

光学显微镜:目镜×物镜=400 倍。

高速匀浆器:转速 $\geq$ 1 000 r/min。

超净工作台。

恒温培养箱。

亮线血球计数板:25×16 规格。

微量移液器:0.2 mL~1.0 mL。

手动计数器:1~9 999。

容量瓶:100 mL。

三角瓶:250 mL。

#### 5.4.4 试验步骤

5.4.4.1 将试样混均匀后,称取约 1.0 g(精确至 0.001 g)试样 2 份作为 2 个重复。

5.4.4.2 将每份试样置于洁净三角瓶中,先用 5 mL 吐温 80 溶液润湿,再加入吐温 80 溶液 60 mL 制成孢子悬浮液并在高速匀浆器上搅拌 5 min(1 000 r/min),转移至 100 mL 容量瓶中定容、摇匀,配制成 A 悬浮液(稀释 100 倍)。

5.4.4.3 用移液器准确吸取 1.0 mL A 悬浮液至 100 mL 容量瓶中,用吐温 80 溶液稀释至 100 mL(再稀释 100 倍),并在高速匀浆器上混合均匀后备用。

5.4.4.4 在血球计数板上盖好盖玻片后,用微量移液器吸取 5.4.4.3 的孢子悬浮液,在盖玻片边缘滴入,使液体沿边缘渗入盖玻片下,使其刚好充满盖玻片与计数板技术区域之间。应无气泡且计数区域四周无液体,如有多余液体可用吸水纸吸去。

5.4.4.5 用显微镜观察,待孢子静止后进行计数。在规划格区内,采取对角线 5 点取样的计数方法计数。上下区域各 5 个中方格(16 个小方格/中方格),即双线范围内 160 小方格(计数时,对于中方格四周如有压线的孢子,计上双线不计下双线,计左双线不计右双线)的金龟子绿僵菌孢子数。

5.4.4.6 每份试样点样计数  $p$  次( $p=2$ )。

#### 5.4.5 测定结果

试样的含孢量  $W_1$  按式(1)计算。

$$W_1 = \frac{K_1 \times 400 \times N_1}{160 p m_1 \times 0.1 \times 10^{-3} \times 10^8} = \frac{5N_1}{4m_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$W_1$  ——试样的含孢量,单位为亿孢子每克(亿孢子/g);

$K_1$  ——稀释倍数(10 000 倍);

$N_1$  —— $p$  次计数的总孢子数(上下区域各 5 个中方格中计数的总孢子数);

400 ——血球计数板计数室小方格总数为  $25 \times 16 = 400$ ;

160 ——血球计数板上下区域各 5 个中方格的小方格的总数( $5 \times 16 \times 2 = 160$ );

0.1 ——血球计数板计数室体积,单位为立方厘米( $\text{mm}^3$ );

$10^{-3}$  ——立方毫米换算为立方厘米(mL)的倍数;

- $p$  ——计数次数(2次);
- $m_1$  ——试样质量,单位为克(g);
- $10^8$  ——代表  $10^8$  个孢子每克,即亿孢子每克。

5.4.6 允许差

2次平行测定结果相对差应不大于10%,取其算术平均值作为测定结果。

5.5 活孢率测定

5.5.1 玻璃纸片萌芽孢子显微计数法

5.5.1.1 方法提要

将孢子悬浮液均匀涂在放有玻璃纸的1/4SDAY培养基上,然后在(25±1)℃下培养24h,制片镜检。以孢子萌芽长度大于孢子长度的一半视为萌芽,计数萌芽与未萌芽的孢子总数,计算孢子萌芽百分率,即活孢率。

5.5.1.2 试剂和溶液

萨氏培养基(1/4SDAY):称取蔗糖10g、酵母浸膏5g、蛋白胨2.5g、琼脂粉18g溶于1000mL去离子水中。用精密pH试纸将pH调至6.5,然后在高压灭菌锅中于121℃、0.15MPa高压灭菌20min。锥蓝(曲利苯蓝)染色液:锥蓝:水=1:1000。

5.5.1.3 仪器及设备

- 电子天平:精度为0.001g。
- 光学显微镜:目镜×物镜=400倍。
- 旋涡振荡器:转速≥100r/min。
- 亮线血球计数板,25×16。
- 微量移液器:0.2mL~1.0mL。
- 手动计数器:1~9999。
- 高压灭菌锅、超净工作台、恒温培养箱、玻璃纸片和玻璃器皿等。

5.5.1.4 测定步骤

5.5.1.4.1 将高压灭菌后的萨氏培养基(1/4SDAY)降压后取出,在无菌条件下倒入直径为9cm的培养皿中(每皿约15mL)。待其凝固后,在超净工作台无菌条件下放入大小为1cm×1cm的玻璃纸片(高温灭菌)。

5.5.1.4.2 将试样混合均匀后,称取约0.01g(精确至0.001g)试样2份,分别进行以下操作:

- a) 在含有0.05%吐温80水溶液中配成约 $1.0 \times 10^7$ 个孢子/mL孢子悬浮液后,在涡旋振荡器中混合均匀;
- b) 再用接种环蘸取配制好的孢子悬浮液均匀涂于3片玻璃纸片上,然后放入(25±1)℃恒温箱内恒温培养24h;
- c) 用尖镊子分别取下3片玻璃纸片放于载玻片上,吸取一滴锥蓝染色液滴于玻璃纸上,约3min后盖上盖玻片(尽量避免气泡存在);
- d) 在光学显微镜下观察并计数萌芽的孢子数与未萌芽的孢子数,计算其孢子萌芽百分率。每次计数至少300个孢子。3次测定结果的平均值作为1份试样的测定结果。

5.5.1.5 测定结果

试样的活孢率  $W_2$  按式(2)计算。

$$W_2 = \frac{N_1}{N_2} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$W_2$ ——试样的活孢率,单位为百分率(%);

- $N_1$ ——萌芽孢子数,单位为个;  
 $N_2$ ——检查孢子总数,单位为个。

#### 5.5.1.6 允许差

2次平行测定结果之差应不大于10%,取算术平均值作为测定结果。通过肉眼观察菌落的数量来推算单位微生物农药样品中的活孢子含量。

#### 5.5.2 稀释平板菌落计数法

金龟子绿僵菌母药活孢率测定见附录C。

#### 5.6 杂菌率测定

按照本部分5.4显微镜血球计数板计数法进行测定,检测样品中的金龟子绿僵菌和其他真菌和细菌的数量,杂菌率 $W_3$ 按式(3)计算。

$$W_3 = \frac{N_2 + N_3}{N_1 + N_2 + N_3} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $W_3$ ——杂菌率,单位为百分率(%);  
 $N_1$ ——试样中金龟子绿僵菌的总数,单位为个每克(个/g);  
 $N_2$ ——试样中非目标真菌的数量,单位为个每克(个/g);  
 $N_3$ ——试样中细菌杂菌的数量,单位为个每克(个/g);

#### 5.7 干燥减量测定

##### 5.7.1 方法提要

按加热减量法测定,即试样经加热后,计算失去的水分占称取试样质量的百分率。

##### 5.7.2 仪器及设备

- 电子天平:精度为0.001 g。  
 电热恒温干燥箱:控温误差 $\pm 2^\circ\text{C}$ 。  
 称量皿:直径70 mm $\times$ 35 mm。

##### 5.7.3 试验步骤

先将称量皿在 $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ 电热恒温干燥箱内烘至恒重称重(精确至0.001 g)。称取试样约5.0 g(精确至0.001 g)置于预先称重的称量皿内,放入 $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ 电热恒温干燥箱内干燥,1 h后取出,在干燥器中冷却至室温,称重。

##### 5.7.4 测定结果

干燥减量 $W_4$ 按式(4)计算。

$$W_4 = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- $W_4$ ——干燥减量,单位为百分率(%);  
 $m_1$ ——称量皿的质量,单位为克(g);  
 $m_2$ ——烘前试样与称量皿的质量,单位为克(g);  
 $m_3$ ——烘后试样与称量皿的质量,单位为克(g)。

##### 5.7.5 允许误差

2次平行测定结果之差应不大于0.5%,取算术平均值作为测定结果。

#### 5.8 细度测定

按GB/T 16150中“干筛法”的规定执行。

#### 5.9 pH测定

按 GB/T 1601 的规定执行。

## 5.10 储存稳定性

### 5.10.1 方法提要

将试样密闭放置于 5℃ 低温储存 12 个月或 15℃~25℃ 常温储存 6 个月后,按照 5.5.1 的方法测定活孢率。储存后不低于活孢率初始值的 80%。

### 5.10.2 仪器及设备

冰箱:5℃。

样品柜:室内控温范围 15℃~25℃。

棕色磨口玻璃瓶:带有磨口瓶塞,确保样品密闭。

### 5.10.3 试验步骤

将 20 g 试样放在玻璃瓶中,使其铺成平滑均匀层。密封后,置于 5℃ 冰箱中放置 12 个月或 15℃~25℃ 下放置 6 个月后,按照 5.5.1 的方法测定活孢率。

## 6 产品的检验和验收

应符合 GB/T 1604 的规定。极限数值处理应按照 GB/T 8170—2008 中 4.3.3 的要求进行。

## 7 标志、标签、包装、储运、安全和保质期

### 7.1 标志、标签

应符合 GB 3796 的规定,同时注明储运条件。

### 7.2 包装

应符合 GB 3796 和 GB/T 191 的规定。

### 7.3 储运

储运时,应严防日晒及 35℃ 以上高温,置于阴凉干燥处。运输时,注意轻放,防止破损。不得与有毒有害物质混装、混运。

### 7.4 安全

在使用说明书或包装标签上应注明产品为微毒、防护措施等。

### 7.5 保质期

在本部分的储存条件下,质量保证期从生产日期算起,12 个月内产品活孢率不低于标示值。



附 录 A  
(资料性附录)  
金龟子绿僵菌有效成分描述

A.1 中文通用名称

金龟子绿僵菌。

A.2 拉丁文学名

*Metarhizium anisopliae*

A.3 生物学分类地位

菌物界、子囊菌门 Ascomycota、盘菌亚门 Pezizomycotina、粪壳菌纲 Sordariomycetes、肉座菌亚纲 Hypocreomycetidae、肉座菌目 Hypocreales、麦角菌科 Clavicipitaceae、绿僵菌属 *Metarhizium*、金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*。

A.4 生物学特性

A.4.1 菌落特征

在 1/4SDAY 培养基上菌落初期白色,背面可见淡黄色色素,后期产孢后呈暗绿色,分生孢子聚集成堆。菌株可以在 SDAY 上 28℃ 生长 1 周,直径可达 3.5 cm。

A.4.2 形态特征

菌丝具分枝分隔,粗 1.4 μm~2.1 μm。瓶梗型产孢细胞,大小幅度为(2.1~2.9) μm×(7.1~7.5) μm;从瓶梗顶端产生分生孢子链;孢子链连接点倾斜度小;分生孢子单细胞,长椭圆形至近柱状,两端钝圆形。分生孢子有时单生于菌丝分枝末端;分生孢子长度大于 15 μm。

A.4.3 核糖体基因分子鉴定结果

通过菌株总 DNA 扩增、克隆转化,测定绿僵菌菌株的 ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 的特征序列(见图 A.1)。金龟子绿僵菌菌株的 ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 目的基因序列全长为 552 bp,其中 5'端包含部分 18S rRNA 基因序列:1~49 为部分 18S rRNA 基因序列。3'端包含部分 28S rRNA 基因序列:520~552 为部分 28S rRNA 基因序列。其余的则为 ITS 区:50~195 为 ITS1 区域全序列,196~342 为 5.8S rRNA 基因全序列,343~519 为 ITS2 区域的全序列。综合培养性状及形态特征以及 ITS1 - 5.8 - ITS2 rDNA 分子克隆测序比对结果,鉴定该菌株为金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)。

```
TTTTATGCTTTAATTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTCGAGGTCAACTATAAAAAGTTGGGGGTTTT
TACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCCTGTTGCGAGTGTTTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACG
GCGAGACCGCCAATCAATTTAAGGGACGGCTGTGCTGGAAAACCAGCCTCGCCGATCCCCAACAC
CAAGTCCACAGGGGACTTGAGGGGCGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGAC
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTTT
```

```
TAACCACTCAGAAGATACTTATTAATAAAAAATTCAGAAGGTTTGGGTCCCCGGCGGGCGCGAAGTCC  
CGCCGAAGCAACAATGAAAGGTATAATTCACAGGGGTTGGGAGTTGGATAACTCGGTAATGATCCC  
TCCGCAGGTTCACTAAACGGAAACA
```

图 A.1 金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)核糖体基因扩增序列

A.5 有效成分主要存在形态

分生孢子。

A.6 生物活性

杀虫。

A.7 适宜生长条件

最适培养基为萨氏培养基(1/4SDAY);最适生长温度为 28℃。分生孢子及菌落形态见图 A.2。

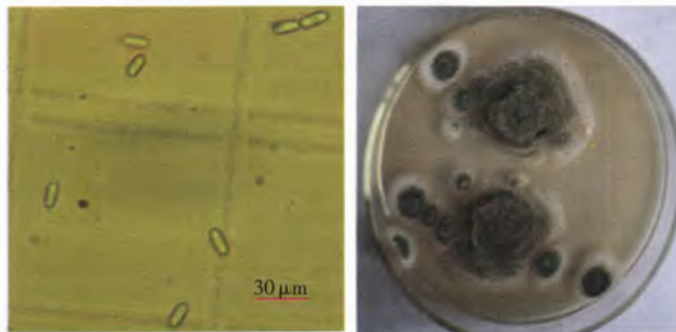


图 A.2 金龟子绿僵菌分生孢子及菌落形态

**附录 B**  
(规范性附录)  
**金龟子绿僵菌菌种鉴别方法**

**B.1 主要仪器设备和材料**

除常规微生物试验操作所需要的设备和培养条件外,其他还包括:PCR 扩增仪、水平电泳仪、超净工作台、高速冷冻离心机、琼脂糖凝胶电泳仪、电子天平(感量 0.000 1 g)、高压灭菌锅、恒温培养箱、菌落计数仪(可选)、培养皿( $\Phi$ 9 cm)、生物显微镜(10×100 倍)等。

**B.2 主要培养基和试剂**

试剂:蔗糖、蛋白胨、酵母浸提物、琼脂粉等。10×PCR 反应缓冲液、500 mmol/L KCl、100 mmol/L Tris·Cl 和 1.0% Triton X-100;25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>;4 种 dNTP 混合物;每种 2.5 mmol/L;Taq DNA 聚合酶 5 U/ $\mu$ L;1% 琼脂糖;5×TBE 电泳缓冲液。

培养基:1/4SDAY;蔗糖 10 g/L、酵母浸提物 5 g/L、蛋白胨 2.5 g/L、琼脂 20 g/L(pH 6.5)。

**B.3 形态学特征鉴别****B.3.1 菌落形态观察**

在 1/4SDAY 培养基或 PDA 培养基上生长,26℃~28℃ 培养 7 d,观察菌落培养性态特征,并测量菌落直径。在 1/4SDAY 培养基上菌落初期白色,背面可见淡黄色色素,后期产孢后呈暗绿色,产孢时灰绿色至暗绿色,自菌落中心由里向外长出成丛的绿色分生孢子堆。分生孢子梗单生或聚集或紧密排列,帚状分枝或轮生体。后期培养物菌落呈壳状。

**B.3.2 菌体观察**

用生物显微镜观察菌体形态、产孢梗和分生孢子形态等。菌体显微形态观察方法如下:先将绿僵菌接种到 1/4SDAY 固体培养基上,在菌落边缘嵌入 5 mm×5 mm 的灭菌盖玻片,26℃~28℃ 培养 1 周。取下盖玻片制片后,显微镜检查,观察待测菌株的菌丝体、产孢梗和分生孢子的形态,并测定其大小。

菌株形态特征:菌丝体分枝分隔;瓶梗型产孢细胞;分生孢子单细胞,长椭圆形至圆柱状,两端钝圆形,(4.3~5.2) $\mu$ m×(10.9~12.6) $\mu$ m。分生孢子有时亦单生于菌丝分枝孢梗末端。

**B.4 分子生物学特征鉴别**

选择虫生真菌核糖体目标基因,通过 PCR 体外扩增技术,采用 SDS 法提取绿僵菌基因组 DNA,通用引物扩增绿僵菌的 ITS 目标基因序列,目标基因经克隆测序后联机与数据库已知菌种进行同源性序列比对分析。鉴别到特定属种。

**B.4.1 PCR 扩增****B.4.1.1 DNA 制备**

采用改良的 SDS 法提取绿僵菌基因组 DNA。具体方法如下:

- a) 取 20 mL 1/4SDY 培养液于 100 mL 三角瓶,打取一培养 3 d 的绿僵菌菌饼(直径 6 mm)接到三角瓶于 28℃ 水平摇床,200 r/min 摇菌 48 h,取适量菌丝于 1.5 mL 离心管;
- b) 加入提取液(10%SDS+氯化苄)600  $\mu$ L 和适量石英砂于离心管,研磨至石英砂成粉末状后置于 65℃ 水浴 60 min,13 000 r/min 离心 3 min;

- c) 取上清液于 1.5 mL 离心管并加入等体积的苯酚：氯仿：异戊醇(25：24：1)后,13 000 r/min 离心 3 min;取上清液并加入氯仿：异戊醇(24：1)后 13 000 r/min 离心 3 min;
- d) 取上清液加入等体积异丙醇沉淀 DNA(-20℃放置 1 h),13 000 r/min 离心 3 min;70%乙醇洗涤 2 次,干燥,13 000 r/min 离心 3 min。

**B.4.1.2 扩增引物与反应体系**

分别以绿僵菌基因组 DNA 为模板,选择通用引物扩增 ITS-5.8S-ITS2 区序列 ITS-rDNA,宜采用:ITS-rDNA 上游引物:5'-GTTTCCGTAAGCTGAACCTGC-3';

ITS-rDNA 下游引物:5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'。

绿僵菌序列特异性扩增 PCR 反应体系见表 B.1。

**表 B.1 绿僵菌序列特异性扩增 PCR 反应体系**

PCR 试剂原始浓度	反应试剂终浓度,25 μL/管	反应体系加样体积,μL/管
10×缓冲液	1×缓冲液	2.5
50 mmol MgCl <sub>2</sub>	1.5 mmol/L	0.75
10 mmol dNTPs	200 μmol/L	2.0
10 μmol 上游引物	0.4 μmol/L	1.0
10 μmol 下游引物	0.4 μmol/L	1.0
2.5 U/μL Taq DNA 聚合酶	1 U	0.25
25 ng/μL DNA 模板	25 ng	1.0
灭菌脱离子水	补足 25 μL/管	16.5

ITS-rDNA PCR 反应扩增程序如下:94℃预变性 1 min,94℃变性 1 min,55℃退火 50 s,72℃延伸 1 min共 30 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 扩增模板重复测试 3 次。

**B.4.1.3 扩增产物检测**

PCR 扩增产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测,以 DNA Marker 指示 DNA 条带的大小及相对位置,稳压 125 V 电泳 35 min 检测。凝胶成像系统观察,检测结果在图像处理系统中处理并保存。

**B.4.1.4 目的基因序列克隆与测序分析**

**B.4.1.4.1 PCR 产物连接 T 载体**

所需试剂来自宝生物公司 Takara T 载体试剂盒(可根据实际需要适当调整)。

连接 T 载体反应体系:Solution I 5 μL;pMD19-T 0.5 μL;PCR 产物 4.5 μL。

**B.4.1.4.2 转化大肠杆菌**

加 10 μL 连接产物于 100 μL 感受态细胞中,冰浴 30 min;42℃热激 90 s;冰浴 5 min;加 500 μL LA 液体培养基,37℃ 150 r/min 摇床 30 min;100 mL LB 固体培养基加 1%青霉素 0.1 mL 后倒平板,取 50 μL 菌液涂平板培养过夜(24 h)。

**B.4.1.4.3 菌落 PCR**

每板挑取转化后涂板的单克隆菌落 5 个,转接至装有 500 μL LB 液体培养基的 1.5 mL 离心管中,200 r/min 37℃摇床 3 h~4 h;参照 ITS 扩增条件,取 1 μL 菌液作为 DNA 模板进行 PCR 反应;琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物;选择阳性菌落测序。

**B.4.1.4.4 DNA 序列分析**

测序结果经 BioEdit 等软件分析和手工校正后,联机登陆 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行 BLAST 序列比对,程序将测序基因序列分别与 GenBank 中已知菌种的 ITS 序列进行同源性比对。

**附录 C**  
(规范性附录)  
**稀释平板菌落计数法**

**C.1 方法提要**

采用稀释平板菌落计数法,先将母药孢子用吐温 80 溶液润湿,制备 10 倍梯度稀释液;再涂布在 1/4 SDAY 培养基上,28℃ 培养 48 h,统计适度稀释培养基平板菌落总数(CFU),以检测样品中(g)的活菌数再除以绿僵菌单位质量的(g)含孢量,计算样品金龟子绿僵菌的活孢率(%)。

**C.2 试剂和溶液**

培养基:1/4SDAY、蔗糖 10 g/L、酵母浸提物 5 g/L、蛋白胨 2.5 g/L、琼脂 20 g/L(pH 6.5)。

**C.3 仪器及设备**

恒温培养箱、培养皿(Φ9 cm)、生物显微镜(10×100 倍)和菌落计数器(可选)等。

**C.4 测定步骤**

将高压灭菌后的萨氏培养基 1/4SDAY 降压后取出,在无菌条件下倒入直径为 9 cm 培养皿中(每皿 10 mL),制成 3 mm 厚的平板备用。将试样混合均匀后,称取 2 g 试样 2 份,分别进行以下操作:

将试样置于洁净三角瓶中,加入 0.1%吐温 80 溶液 98 mL 制成孢子悬浮液(约  $6 \times 10^{10}$  个孢子/mL),充分湿润后在高速匀浆器中混匀 5 min,标记为 0 号。然后,参照表 C.1(以稀释 6 次为例)进行梯度稀释。

表 C.1 绿僵菌母药样品 10 倍梯度稀释示例

编号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释液体积, mL	100	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
加入上一稀释浓度溶液的体积, mL	—	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
累计稀释倍数	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$
每稀释度期望孢子数量, mL	$3 \times 10^9$	$3 \times 10^8$	$3 \times 10^7$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$3 \times 10^1$

在超净工作台中,将上述各梯度稀释液分别用微量移液器吸取 100 μL 到培养基平板上,用曲玻棒涂布均匀。每一个稀释度做 3 次重复,在(25±1)℃下培养 24~48 h。选择适宜的稀释度,取菌落数在 20 个~100 个之间的平板进行计数。

**C.5 测定结果**

若只有 1 个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,则计算该稀释度 3 个重复平板金龟子绿僵菌菌落数的平均值,再将平均值乘以相应的稀释倍数,作为每克金龟子绿僵菌母药中的活孢量。如第 8 号稀释度 3 个平板的菌落数(CFU)分别为 28、26、30,则该母药的活孢数  $W_5$  按式(C.1)计算为:

$$W_5 = [(14 + 13 + 15)/3] \times 10^8 \times 10 = 2.80 \times 10^{10} \text{ CFU/g} \quad \dots\dots\dots \text{(C.1)}$$

式中:

$W_5$ ——活孢数,单位为 CFU/g。

若有 2 个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时,C.2 试样中的活孢数  $W_5$  按式(C.2)计算。

$$W_5 = \sum N_4 / [(1 \times n_1 + 0.1 \times n_2) \times 0.1 \times K] \dots\dots\dots (C.2)$$

式中:

$N_4$  —— 试样中 2 个连续稀释度稀释的平板菌落数在适宜计数范围内的金龟子绿僵菌总菌落数,单位为 CFU;

$n_1$  —— 第 1 个适宜稀释度的调查平板数(3);

$n_2$  —— 第 2 个适宜稀释度的调查平板数(3);

$K$  —— 第 1 个适宜稀释度的稀释倍数;

0.1 —— 涂布平板使用的稀释液体积,单位为毫升(mL);

示例:

如果第一稀释度( $10^{-8}$ )的菌落数(CFU)为 15、11、12,第二稀释度( $10^{-7}$ )的菌落数(CFU)分别为 15、15、17,则活菌量为:

$$W_5 = (15 + 11 + 12 + 15 + 15 + 17) / [(1 \times 3 + 0.1 \times 3) \times 0.1 \times 10^{-8}] = 2.57 \times 10^{10} \text{ CFU/g}$$

### C.6 允许差

2 次平行测定结果相对差应不大于 20%,取其算术平均值作为测定结果。

