###

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS XXXX

A 21

微生物源抗生素类次生代谢产物杀线虫活性测定 浸虫法

**Determination of nematicidal activity for microbial secondary metabolites——Immersion method**

（征求意见稿）



发布

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

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

**次生代谢产物杀线虫****活性测定**

1 范围

本标准规定了微生物源抗生素类次生代谢产物杀线虫活性测定的原理、仪器设备、试剂与材料、操作步骤、结果分析。

本标准适用于微生物源抗生素类次生代谢产物杀线虫活性的测定。

**2 术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

**2.1**

**致死中浓度 lethal concentration 50%，LC50**

LC50指的是使受试线虫半数死亡的次生代谢产物的浓度。

**3 原理**

将线虫浸入微生物源抗生素类次生代谢产物药剂中使线虫死亡，用中性红将线虫死细胞或组织染成在显微镜下可见的红色，通过染色情况判断次生代谢产物对线虫的致死情况，计算线虫的校正死亡率，根据校正死亡率的几率值和药剂浓度对数的线性回归关系得到回归曲线，计算得到LC50，从而测定次生代谢产物杀线虫的活性。

**4 仪器设备**

4.1 恒温培养箱：温度偏差在±1 ℃以内。

4.2 显微镜：最小放大倍数为10倍。

4.3 电子天平：称量精度0.1 g以上。

4.4 微量移液器。

4.5 离心机。

4.6 计数器。

**5 试剂与材料**

所有试剂除另有说明外，均为分析纯，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

**5.1 5 mg/mL胆固醇溶液**

称取适量胆固醇，溶于相应体积的无水乙醇中，配成5 mg/mL的胆固醇溶液，0.22 μm孔径的滤膜过滤除菌。

**5.2 1 mol/L氯化钙溶液**

称取适量胆固醇，溶于相应体积的去离子水中，配成1 mol/L的氯化钙溶液，0.22 μm孔径的滤膜过滤除菌。

**5.3 1 mol/L硫酸镁溶液**

称取适量七水硫酸镁，溶于相应体积的去离子水中，配成1 mol/L的氯化钙溶液，0.22 μm孔径的滤膜过滤除菌。

**5.4 1 mol/L磷酸缓冲液，pH 6.0**

称取118.1 g 磷酸二氢钾，23.0 g 磷酸氢二钾，溶解于900 mL的去离子水中，调节pH值至 6.0，再加去离子水定容到1 L，0.22 μm孔径的滤膜过滤除菌。

**5.5**  **线虫专用缓冲液（M9 缓冲液）**

取3.0 g磷酸二氢钾，6.0 g磷酸氢二钠，5.0 g氯化钠，1 mL 浓度为1 mol/L的七水硫酸镁，用去离子水溶解，并定容到1 L，0.22 μm孔径的滤膜过滤除菌。

**5.6 次氯酸钠裂解液**

取0.1 g氢氧化钠，溶于3.5 mL去离子水中，再加入1 mL含活氯10-15%的次氯酸钠溶液混合。

**5.7 琼脂培养基（LB培养基）**

称取10.0 g胰蛋白胨，5.0 g酵母粉，10.0 g 氯化钠，去离子水定容到1 L，121 ℃灭菌20 min。

**5.8 线虫生长固体培养基 （nematode growth media，NGM）**

称取2.5 g胰蛋白胨，3.0 g氯化钠，17.0 g琼脂粉，用去离子水溶解并定容到975 mL，121 ℃灭菌20 min，冷却到55 ℃左右时，加入1 mL浓度为5 mg/mL的胆固醇溶液，1 mL 浓度为1 mol/L的氯化钙溶液，1 mL浓度为1 mol/L的硫酸镁溶液，25 mL浓度为1mol/L pH 6.0的磷酸钾缓冲液。

**5.9 0.1 %（w/v）中性红溶液**

称取适量中性红粉末溶于相应体积的生理盐水中，配成0.1 %的中性红溶液，0.22μm孔径的滤膜过滤。

**5.10** **N2野生型秀丽****隐杆线虫（****Caenorhabditis elegans，the Bristol strain N2）**

**5.11 尿嘧啶缺陷型大肠杆菌**（*Escherichia coli* OP50）

**6 操作步骤**

**6.1 大肠杆菌OP50的培养与接种**

挑取大肠杆菌OP50单菌落于LB培养基中，37 ℃振荡过夜培养，取0.1 mL菌液涂布于NGM固体培养基上，室温放置约30 min。

**6.2 N2野生型秀丽隐杆线虫的培养与同步化**

将N2野生型秀丽隐杆线虫接入含有大肠杆菌OP50的NGM固体培养基上，于20℃培养3天，用M9缓冲液冲洗NMG固体培养基上，收集处于产卵期的线虫。用移液器吸取1 mL含产卵期线虫的M9缓冲液至10 mL的离心管中，向管中加入4.5 mL次氯酸钠裂解液，上下颠倒混合约3-5分钟，约800 g的转速离心2分钟，弃上清收集虫卵，用M9缓冲液重复洗涤和离心3次后，用0.2 mL无菌M9缓冲液悬浮虫卵，将卵液转移到含大肠杆菌OP50的NMG固体培养基上，于20℃培养 48 h，线虫成长至四龄幼虫。

**6.3 药剂活性测定**

**6.3.1 药剂配制**

水溶性药剂直接用水溶解，非水溶性药剂用二甲基亚砜溶解。在0.001~10 mg/mL浓度范围内按照等比或等差的方法设置5以上个系列质量浓度，每个质量浓度药液量不少于10 mL。

**6.3.2 试虫准备**

用无菌M9缓冲液将6.2中的四龄线虫从NGM固体培养基上冲洗下来，800 g转录离心2分钟，弃上清液，弃上清收集虫体，用M9缓冲液重复洗涤和离心2次，最后用无菌M9缓冲液重悬线虫至浓度80-100头/mL，备用。

**6.3.3 药剂处理**

用移液器分别吸取6.3.1中不同浓度的药剂溶液和清水对照各2 mL，加入到不同的5 mL试管中，每个试管另加入大肠杆菌OP50的M9缓冲液悬液1mL，将6.3.2的线虫悬液1 mL加入到上述试管中，将试管置于20 ℃恒温培养箱中培养24 h。每个浓度的药剂和清水处理各设置3次重复。

**6.3.4 线虫染色与死亡线虫记录**

6.3.3药剂处理后，将试管置于离心机中，800 g离心5分钟，弃上清收集虫体，用M9缓冲液重复洗涤和离心2次。加入100 μL的0.1%中性红溶液进行染色，染色5 min后，800 g离心5 min，弃上清，加入M9缓冲液100 μL悬浮线虫，并转移至96孔板中。半身以上染为红色的线虫判定为死亡线虫。在显微镜下观察线虫死亡情况，记录每个浓度药剂处理后观察到的线虫总数和死亡线虫数。每个处理的重复试验，观察的线虫不少于30头。

**7 结果分析**

7.1 结果计算

死亡率和校正死亡率分别按公式（1）和（2）计算：

$P\_{1}=\frac{K}{N}×100$ ……………………………………………………………………(1)

式中：

*P*1——死亡率（%）；

*K*——死亡线虫数（头）；

*N*——观察总线虫数（头）。

$P\_{2}=\frac{P\_{1}-P\_{0}}{1-P\_{0}}×100$ ……………………………………………………………………(2)

式中：

*P*2——校正死亡率（%）

*P*1——处理线虫死亡率（%）

*P*0——对照线虫死亡率（%）

若对照死亡率小于5%，无需校正；若对照死亡率在5~15%之间，应按照公式（2）进行校正；对照死亡率大于15%，试验需要重做。

根据药剂浓度对数值与对应校正死亡率的几率值作回归分析，计算回归曲线的*R2*值。选择*R2*值在0.95以上且最高的5个以上连续梯度的药剂浓度来得到最终的回归曲线Y = a X + b，其中Y为校正死亡率的几率值，X为浓度对数值，a为回归曲线斜率，b为常数。根据回归曲线，计算药剂的LC50及其95%置信区间。

以平行样的平均值为最终的降解率值，计算结果保留到小数点后两位。

**7.2 重复性**

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

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