

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 864 号—17—2024

转基因植物环境安全检测 外源杀虫蛋白对非靶标生物影响 青翅蚁形隐翅甲

The detection of environmental safety of genetically modified plants—
Effects of exogenous insecticidal protein on non-target organisms—
Paederus fuscipes Curtis

2024-12-30 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：农业农村部科技发展中心、中国农业科学院植物保护研究所、华中农业大学。

本文件主要起草人：李云河、王亚南、马伟华、华红霞、蔡万伦、梁晋刚、彭于发。



转基因植物环境安全检测

外源杀虫蛋白对非靶标生物影响 青翅蚁形隐翅甲

1 范围

本文件描述了转基因植物外源基因表达的杀虫蛋白对青翅蚁形隐翅甲(*Paederus fuscipes* Curtis)影响的检测方法。

本文件适用于转基因植物外源基因表达的杀虫蛋白对青翅蚁形隐翅甲潜在经口毒性的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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。

农业农村部公告第 111 号—13—2018 转基因植物环境安全检测 外源杀虫蛋白对非靶标生物影响 第 1 部分:日本通草蛉幼虫

农业部 1485 号公告—17—2010 转基因生物及其产品食用安全检测 外源基因异源表达蛋白质等同性分析导则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外源杀虫蛋白 exogenous insecticidal protein

转入植物的外源抗虫基因所表达的杀虫蛋白。

[来源:农业农村部公告第 111 号—13—2018,3.1]

3.2

经口毒性 oral toxicity

通过将受试杀虫蛋白均匀混入饲料,经口给予受试生物,对受试生物的生存和生长发育产生的有害影响。

[来源:农业农村部公告第 111 号—13—2018,3.2]

3.3

剂量 dose

受试杀虫蛋白的使用量。用每克人工饲料(鲜重)中混入受试杀虫蛋白的质量(μg)来表述。

[来源:农业农村部公告第 111 号—13—2018,3.3]

3.4

死亡率 mortality

死亡的受试生物个体数占总受试生物个体数的比率(%)。

[来源:农业农村部公告第 111 号—13—2018,3.4,有修改]

3.5

半数致死剂量 median lethal dose, LD_{50}

经口给予受试杀虫蛋白后,通过统计获得的预期能够引起受试生物死亡率为 50%的受试杀虫蛋白剂量(基于第 7 d 青翅蚁形隐翅甲死亡率进行计算)。

[来源:农业农村部公告第 111 号—13—2018,3.8,有修改]

3.6

最大耐受剂量 maximum tolerated dose, MTD

在试验周期内,受试杀虫蛋白不引起受试生物出现死亡的最大试验剂量。当受试杀虫蛋白对受试生物无毒或极低毒性的情况下,无法或不需要计算出半数致死剂量时,以试验中所设立的最大剂量确定受试生物可耐受的最大剂量。

4 原理

以青翅蚁形隐翅甲幼虫为受试生物,将一定剂量(浓度)转基因植物外源杀虫蛋白均匀混入人工饲料,直接饲喂受试生物。以纯人工饲料(或混入受试杀虫蛋白溶剂/介质的饲料)作为阴性对照,以混入已知对青翅蚁形隐翅甲幼虫有经口毒性的有机或无机化合物的人工饲料为阳性对照,观察计算青翅蚁形隐翅甲的死亡率,比较分析处理组间青翅蚁形隐翅甲死亡率的差异。受试杀虫蛋白处理组青翅蚁形隐翅甲死亡率显著高于阴性对照组时,求得半数致死剂量(LD₅₀),明确外源杀虫蛋白对青翅蚁形隐翅甲的潜在经口毒性。

5 试剂和材料

5.1 溶剂

蒸馏水、磷酸盐缓冲液(PBS)或其他适宜溶剂。

5.2 受试杀虫蛋白

受试外源杀虫蛋白可直接从转基因植物提取纯化获得,也可经微生物表达、提取和纯化获得,但需要保证所获得的杀虫蛋白与转基因植物组织中表达的外源杀虫蛋白具有实质等同性,符合农业部 1485 号公告—17—2010 的规定和要求。

5.3 阳性对照化合物

采用重铬酸钾(potassium dichromate;K₂Cr₂O₇)(分析纯)作为阳性对照化合物。

5.4 试验昆虫

采用实验室多代饲养(2 代以上)、遗传背景相对一致的青翅蚁形隐翅甲种群。随机选择青翅蚁形隐翅甲初孵幼虫(孵化 24 h 内)用于生物测定试验。

5.5 青翅蚁形隐翅甲幼虫人工饲料

将全机能肝粉与蜂蜜以质量比 5:1 的比例混合均匀,制备成青翅蚁形隐翅甲幼虫人工饲料,保存于 4℃冰箱待用(不超过 3 d);所述全机能肝粉营养成分含量为:猪肝 50%、鸡肝 20%、鹅肝 15%、红枣 10%、低聚半乳糖 5%。全机能肝粉的制备按照附录 A 的规定执行。

5.6 青翅蚁形隐翅甲幼虫饲喂方法

青翅蚁形隐翅甲幼虫采用 5.5 所规定的人工饲料饲喂,并辅以褐飞虱作为营养补充。即在取食人工饲料的第 6 d、7 d、8 d,为每头幼虫每天补充 10 头 1~3 龄褐飞虱若虫活体供取食。

注:褐飞虱采用实验室多代饲养(2 代以上)、遗传背景相对一致的褐飞虱种群。

6 主要仪器

6.1 分析天平:感量 0.1 g 和 0.01 mg。

6.2 解剖镜。

6.3 真空冷冻干燥仪。

6.4 光照培养箱或人工气候室。

6.5 烘箱。

7 试验步骤

7.1 试验处理

7.1.1 阴性对照组:在青翅蚁形隐翅甲幼虫人工饲料中均匀混入等质量受试杀虫蛋白的溶剂。

7.1.2 阳性对照组:将重铬酸钾均匀混入青翅蚁形隐翅甲幼虫人工饲料,含量为 1 500 μg/g(按鲜重计)。

7.1.3 受试杀虫蛋白处理组:在青翅蚁形隐翅甲幼虫饲料中均匀混入受试杀虫蛋白,剂量为青翅蚁形隐翅甲幼虫在自然条件下可摄取到的受试杀虫蛋白最高剂量的 10 倍以上(可将植物组织中外源杀虫蛋白的最高浓度作为受试昆虫可摄取到的受试蛋白最高剂量)。如果发现受试杀虫蛋白对青翅蚁形隐翅甲存活有显著不利影响,则需要进一步试验计算 LD_{50} ,试验剂量组的设置应满足在 95% 置信限下确定 LD_{50} 的统计需要(通常通过预实验确定正式试验的剂量,在含有 LD_{50} 的剂量范围内,至少设置 5 个按几何级数排列的剂量);如果无法或不需要计算 LD_{50} ,则只需设 1 个符合一般要求的剂量。

7.2 处理组饲料制备

7.2.1 受试杀虫蛋白应先溶解或悬浮于蒸馏水、PBS 或其他适宜溶剂中。

7.2.2 如果需要助溶剂,必须保证含该助溶剂的溶液对青翅蚁形隐翅甲幼虫没有显著影响,且要在对照组饲料中加入等量该溶剂。

7.2.3 将预先制备好的受试蛋白或对照化合物溶液加入适量的去离子水,再与全机能肝粉混合,充分搅拌均匀,液氮冷冻后进行真空冷冻干燥,所得干粉分装后置于 -20°C 冰箱保存待用(不超过 1 个月)。试验开始前将干粉与蜂蜜按 5.5 规定比例混合均匀使用,现用现配。

7.3 试验操作与记录

7.3.1 试验在光照培养箱或人工气候室中进行,温度为 $(28 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 65%~80%,光周期为 12 h : 12 h(L : D)。

7.3.2 将初孵青翅蚁形隐翅甲幼虫单头置于塑料指型管(直径约 3 cm,高约 6 cm)饲养。指型管事先在底部中心打 1 个吸水孔(孔径约为 0.5 mm),铺垫约 1.5 cm 的脱脂棉,上部垫上滤纸,滤纸上铺约 0.3 cm 的腐殖土。腐殖土事先经高压蒸汽灭菌(121°C , 30 min),冷却后使用。用洁净的载玻片盛放人工饲料,饲料面朝上放置于腐殖土上。接入试虫后,指型管用 100 目的纱网封口,防止逃逸。适时通过吸水孔给基质土补水保证基质土湿润。每天更换新鲜饲料,直至试验结束。每处理组设至少 3 个重复,每重复不少于 20 头幼虫。

7.3.3 试验持续 14 d 后结束,并记录第 7 d 和第 14 d 每个处理组试虫的存活情况。

8 结果分析与表述

8.1 对照处理结果分析

阴性对照组青翅蚁形隐翅甲的死亡率低于 30%,阳性对照组青翅蚁形隐翅甲死亡率高于 80%,且显著高于阴性对照组,表明试验体系工作正常,可用于检测外源杀虫蛋白对青翅蚁形隐翅甲的潜在毒性;否则需要查找原因,重新进行试验。

8.2 数据处理

根据试验记录,计算青翅蚁形隐翅甲死亡率,死亡率用百分数(%)描述,数据以表格形式表述,给出每个处理组和对照组的数据。死亡率按公式(1)计算,计算时保留小数点后两位小数。可用 Dunnett's test 或 Mann-Whitney U 检验等方法分析受试杀虫蛋白处理组或阳性对照组与阴性对照组间的差异显著性。如果受试杀虫蛋白处理组与阴性对照组青翅蚁形隐翅甲死亡率具有显著性差异,并可求得受试杀虫蛋白的 LD_{50} ,则通过概率值分析法(Probit analysis)、寇氏(Korbor)或其他计算方法求得 LD_{50} 值;如果无法求得 LD_{50} ,仅给出实际的统计分析数据。

$$K = \frac{n}{N} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

K ——青翅蚁形隐翅甲死亡率,单位为百分号(%);

n ——死亡的青翅蚁形隐翅甲个体数;

N ——总受试青翅蚁形隐翅甲个体数。

8.3 结果表述

根据统计分析结果,评估转基因植物外源杀虫蛋白对青翅蚁形隐翅甲的潜在经口毒性,结果表述为

“与阴性对照组相比,受试杀虫蛋白处理组的青翅蚁形隐翅甲死亡率高于(等于/低于)阴性对照组,差异达(未达)显著(极显著)水平”。

如果受试杀虫蛋白处理组与阴性对照组死亡率有显著(极显著)性差异,并可求得 LD_{50} 值,结果表述为“受试杀虫蛋白对青翅蚁形隐翅甲的半数致死剂量为 $\times\times$ ”;如果受试杀虫蛋白处理组与阴性对照组死亡率有显著性差异,但无法求得 LD_{50} 值,或受试杀虫蛋白处理组与阴性对照组死亡率没有显著性差异,结果表述为“青翅蚁形隐翅甲对该受试杀虫蛋白的经口毒性最大耐受剂量(MTD) $> \times\times$ (最大试验剂量)”。

附 录 A
(规范性)
全机能肝粉

A.1 肝粉制备

猪肝粉、鸡肝粉和鹅肝粉均按照以下步骤制备获得。

- A.1.1 将新鲜肝脏洗净,剔除外在的筋膜、血管、淋巴管等高密度组织。
- A.1.2 切成约 2 mm 厚的薄片。
- A.1.3 平铺于不锈钢烤架上,置于烘箱中,升温至 70 °C 并保持,烘干 24 h。
- A.1.4 自烘箱取出后使用研磨器研磨成粉末状。
- A.1.5 所得粉末过 100 目网筛,分装于 50 mL 离心管,保存于-20 °C 冰箱备用(不超过 1 个月)。

A.2 红枣粉制备

- A.2.1 挑选无虫蛀霉变的红枣,洗净去核,沥干水分。
- A.2.2 单层放置于不锈钢烤架上,置于烘箱中,升温至 70 °C 并保持,烘干 24 h。
- A.2.3 自烘箱取出后使用研磨器研磨成粉末状。
- A.2.4 所得粉末过 100 目网筛,分装于 50 mL 离心管,保存于-20 °C 冰箱备用(不超过 1 个月)。

A.3 全机能肝粉制备

将 A.1 获得的猪肝粉、鸡肝粉、鹅肝粉,A.2 获得的红枣粉,与低聚半乳糖按照 10 : 4 : 3 : 2 : 1 的重量比混合均匀,即得全机能肝粉。所得全机能肝粉直接使用,或分装于 50 mL 离心管,保存于-20 °C 冰箱备用(不超过 1 个月)。
