

苏云金芽孢杆菌发酵液中晶体蛋白定量测定方法的探讨

顾真荣

(上海市农业科学院植物保护研究所)

彭中允*

(湖北省农业科学院植物保护研究所)

摘要 探索了一种苏云金芽孢杆菌发酵液中晶体蛋白化学定量测定的方法。发酵液经离心技术处理后,其晶体蛋白由还原剂、变性剂组成的裂解液溶解,再用紫外光谱吸收法或考马斯亮蓝染色法定量。该方法测得的晶体蛋白量与经生物测定得到的毒力之间有良好的相关性,在苏云金芽孢杆菌的研究和生产上有一定的实用价值。

关键词 苏云金芽孢杆菌;晶体蛋白;定量测定

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* 简称 *B.t*) 的主要杀虫活性成分是伴孢晶体蛋白。伴孢晶体蛋白的定量测定对于 *B.t* 深入的理论研究和产品标准化都有着重大的意义。国内外有人采用火箭免疫电泳和酶联免疫吸附等方法定量测定晶体蛋白^[1-4]。由于上述方法需要制备高纯度的晶体抗原和高效价的抗血清,不易被国内厂家采用。我们摸索了一种简便的化学定量测定方法,可用于发酵液中晶体含量测定。该方法的原理是,将发酵液中的晶体和芽孢通过离心方法充分纯化,用还原剂和变性剂组成的裂解液将晶体溶解,溶解后的晶体蛋白再用紫外光谱吸收法或考马斯亮蓝染色法进行定量测定。通过配制一系列已知晶体浓度的样品得到不同的光密度值,制成标准工作曲线,待测样品在相同条件下测得的光密度值,对照标准曲线即可算出样品中晶体的含量。

材料和方法

(一) 菌种

苏云金芽孢杆菌蜡螟变种 *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* 68-3 和 *B.t* var. *tianmensis* 7216, 湖北省农科院植保所虫菌组保存。

(二) 纯晶体的制备

取摇瓶发酵液用液体双相法提纯晶体^[5], 晶体纯度 97% 以上。摇瓶发酵培养基为: 豆饼粉 2.0%, 蛋白胨 0.3%, 淀粉 0.4%, 磷酸二氢钾 0.02%, 硫酸镁 0.09%, 碳酸钙 0.1%。消毒后 pH7.2, 500ml 三角瓶装 40ml 培养液, 190r/min 旋转式摇床 32℃ 培养 3 天。

(三) 标准晶体液的配制

为避免晶体凝聚结块, 提纯后的湿晶体加 0.01mol/L pH7.2 磷酸缓冲液定容至适当体积制成晶体悬浮液, 取一半作标准晶体液, 冰箱保存备用。另一半离心沉淀后冷冻干燥, 完全失水后称重。重量除以体积即为标准晶体液的晶体浓度, 以 mg/ml 表示。一般调节浓度在 2—3 mg/ml 为好。

(四) 样品晶胞液的制备

发酵液中除晶体、芽孢外还有大量培养基残渣和部分营养体, 制备成样品液时需充分纯化。具体做法是: 发酵液经双层纱布过滤两次。取滤液 100ml, 加水 200ml, L × J-II 型离心机低速离心两次, 去除沉渣(转速达到 1000 r/min 即停)。沉渣中绝大部分是培养基

* 现在工作单位: 深圳市农科中心生物发酵室。

残渣和营养体,其中也夹杂少量的晶体和芽孢,加水充分振荡,让晶体游离出来后再次低速离心。合并两次上层悬浮液,3000 r/min 30 分钟离心洗涤两次。沉淀物为较纯的晶体和芽孢,加入 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液定容至原体积 100ml,冰箱保存备用。

(五) 晶体的溶解和样品液的处理

选择的蛋白质还原剂和变性剂能快速溶解晶体,不分解芽孢和不干扰随后的蛋白质测定。其配方为:1% SDS (Wt/Vol)、2% β -巯基乙醇 (Vol/Vol)、6 mol/L 尿素。晶体在该液中 15 分钟即溶解,镜检看不到完整的晶体。测定时,标准晶体液或样品晶孢液 1ml 加入 1—2ml 的上述由还原剂和变性剂组成的裂解液,并用 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液补充到总体积为 5ml,30℃ 保温反应 3 小时。晶孢液与裂解液的加入比例应由晶孢液中大致晶体量来确定,通过预备试验可以测定晶孢液中大致晶体量。反应结束后的样品液需 3000 r/min 离心 30 分钟,上清液是晶体溶解蛋白,可作进一步的蛋白质浓度测定。沉淀是芽孢。活芽孢计数表明,反应后的活芽孢数没有下降,即该裂解液对芽孢无明显作用。测定标准晶体液时,也需进行上述离心。

(六) 蛋白质浓度测定

紫外吸收法用 751G 分光光度计测定 $O.D_{280}$ 值,同浓度的裂解液作对照。考马斯亮蓝染色法参照朱俭等方法进行^[6]。选用考马斯亮蓝 G-250 为染色剂,直接用离心后的样品液点样,点样量 20 μ l,同浓度的裂解液为对照,每个样品设 3 个重复,取其平均值。在 751G 或 721 分光光度计上测定 $O.D_{595}$ 值。

(七) 生物测定

供试昆虫为家蚕,参照罗绍彬的方法测定样品致死中浓度 LC_{50} ^[7]。

试验结果

(一) 晶体量与光密度值的关系

将标准晶体液配制成 2.0 mg/ml 浓度,分别吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5ml 放

至 7 个小试管中,各加入 1ml 裂解液,再补充 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液至每管总体积为 5ml。保温反应 3 小时后离心上清液用紫外吸收法测定其光密度值,结果见图 1。

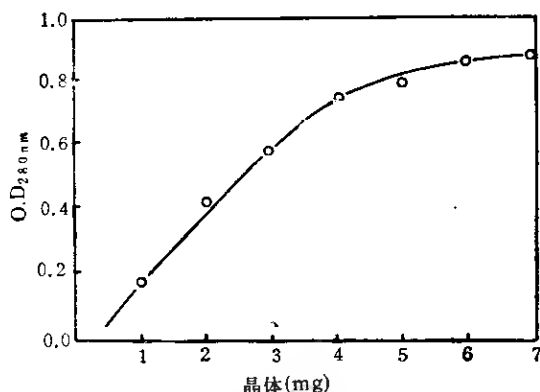


图1 晶体量与 $O.D_{280}$ 值的关系

图 1 为一对数曲线。说明在裂解液限量的时候(5ml 反应液中加 1ml 裂解液),晶体量在 1—4mg 左右时,光密度值与晶体量成正比关系;晶体量较高时,光密度值虽随晶体量增加,但增加的程度不如低浓度时明显,即不成正比关系;当晶体量达 6mg 之后,光密度值趋于恒定。这类似于酶反应中底物浓度与酶反应速

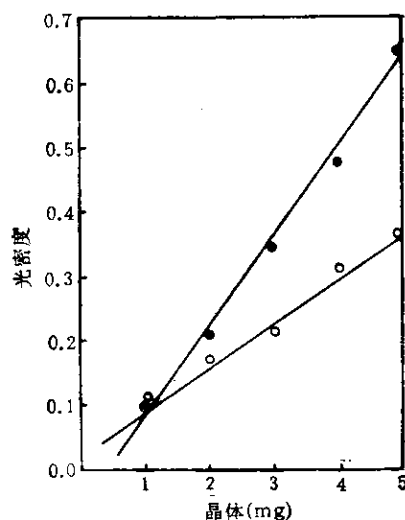


图2 两种方法测定的标准曲线

●—● $O.D_{280}$ $y = -0.055 + 0.138x$ $r = 0.996$
 ○—○ $O.D_{595}$ $y = 0.039 + 0.065x$ $r = 0.993$

度之间的关系。其原因可能是晶体过量后，裂解液不能将全部晶体溶解成可溶性蛋白。因此，在测定时若用 1ml 裂解液，被测样品以晶体量应调节在 4mg 之内。采用 1.5 ml 裂解液后，用两种方法测得的晶体量与光密度值的标准曲线见图 2。

在实际测定中，我们用标准晶体液配制成 5 个系列浓度，作出晶体浓度与光密度值的工作曲线(回归方程)，然后在相同条件下测定出样品光密度值，用带有线性回归计算功能的计算器十分方便地计算出样品中的晶体量或晶体浓度。

(二) 方法的精密度和准确度

用该方法对同一摇瓶发酵液的六次测定结果是：2.30、2.54、2.48、2.38、2.70 和 2.48mg/ml，其平均值为 2.48mg/ml。变异系数 CV 为 5.5%。在 B.t 的生物测定中，CV 小于 20% 均为有效测定，可见该方法测定有效成分晶体量时具有很高的精密度的。

表 2 五批培养物中活芽孢数、晶体浓度及对家蚕毒力的测定结果

培养物 编号	培养基组成				活芽孢数 ($\times 10^8$ /ml)	晶体浓度 (mg/ml)	毒效 LC_{50} (稀释倍数)
	豆饼粉 (%)	淀粉 (%)	酵母粉 (%)	蛋白胨 (%)			
1	3	0.8	0.4	0.1	19.4	3.06	488
2	2	0.6	0.2	0.1	12.1	2.30	269
3	1.5	0.4	0.2	0.1	10.4	1.78	225
4	1.0	0.2	0.1	0.1	7.4	1.72	153
5	0.5	0.1	0.1	0.1	6.4	1.24	137

注：菌株为 7216；培养基无机盐成分同为：碳酸钙 0.1%、硫酸镁 0.03% 和磷酸二氢钾 0.01%，同批摇床培养 3 天；晶体浓度、芽孢数和生物测定均用初步纯化的晶胞混合液

浓度，得到了 5 种晶体和芽孢含量不同的培养物，分别测定了活芽孢数、晶体浓度和对家蚕的毒力，结果见表 2。

由表 2 结果看，晶体浓度和 LC_{50} 的回归方程为 $y = -142 + 196x$ ，相关系数 $r = 0.96$ ，为高度相关；芽孢数和 LC_{50} 的回归方程为 $y = -50.0 + 273x$ ，相关系数 $r = 0.99$ ，亦为高度相关。这说明，在上述条件下，测得的晶体量与活芽孢数和毒力均呈正相关，三种方法测定的结果均趋一致，都是可靠的。但是，若采用不同

表 1 回收率试验的测定结果

测定样品	O.D. ₂₈₀	晶体量 (mg)
发酵液 1 ml	0.869	2.91
发酵液 1 ml + 标准晶体液 2 ml	1.290	4.57
标准晶体液 2 ml	0.620	1.93

为了验证该方法的可靠性，我们做了常规化学测定方法的回收率试验(表 1)。

本次测定的标准晶体液浓度为 0.92 mg/ml，2ml 晶体量为 1.84mg。该试验的外标回收率 = $(4.57 - 2.91) \div 1.84 = 90.2\%$ ；内标回收率 = $1.93 \div 1.84 = 105\%$ 。因此，该方法作为一种定量测定的方法具有较高的准确度。

(三) 本法与活芽孢计数法和生物测定法的比较

活芽孢计数法一直是国内厂家沿用的产品质量检测法。生物测定则是国际上通用的产品质量检测法。本文方法与前两种方法的比较，是在摇瓶发酵培养基的基础上设计了 5 个系列

表 3 六批浓缩液活芽孢数和晶体浓度及对家蚕毒力测定的结果

批号	活芽孢数 ($\times 10^8$ /ml)	晶体浓度 (mg/ml)	毒效 LC_{50} (稀释倍数)
1	77.0	11.04	5500
2	83.3	9.57	4760
3	105.8	15.2	9140
4	93.8	7.05	2470
5	86.9	8.94	2040
6	80.8	12.1	5160

注：菌株为 68-3；培养基配方不同但含固量相同，浓缩倍数亦基本相同。晶体测定用考马斯亮蓝染色法测定。

培养基配方和不同的培养条件,则晶体量仍与毒力呈正相关,而活芽孢数不与毒力相关(表3)。

由表3计算得出,晶体浓度与 LC_{50} 的回归方程为 $y = -4120 + 842x$, 相关系数 $r = 0.934 > r_{0.01} = 0.917$; 活芽孢数与 LC_{50} 的回归方程 $y = -4270 + 104x$, 相关系数 $r = 0.425 < r_{0.05} = 0.811$ 。这说明在不同的培养基和培养条件下,活芽孢数不能反映出发酵液的毒力,而晶体量仍可以可靠地反映出其毒力。晶体量的测定比活芽孢数的测定更有实用价值。

讨 论

1. 该方法测定一批样品需要 6—8 小时。如采用合适的离心机机型和改进离心方法,时间还可缩短。晶体蛋白的水解亦可改用 0.1 mol/L 的 NaOH 液。

2. 本方法除了测定摇瓶发酵液外,也可测大罐发酵液和液剂产品。以黄豆饼粉和花生饼粉为主要原料的发酵液,可用紫外吸收光谱法测水解晶体蛋白,用棉籽饼为主要原料的发酵液则需要用考马斯亮蓝染色法。

3. 罗绍彬等报道^[9], 用酶联免疫吸附测定法测量国内 *B.t* 乳剂产品 (100—120 亿/ml 芽孢数) 的碱性蛋白浓度为 10—13 mg/ml, 其中晶体蛋白浓度在 5—6 mg/ml 之间。而用本方法测定, 4% 含固量的摇瓶发酵液 (20—30 亿/ml 芽孢数) 中晶体蛋白浓度在 2—3 mg/ml 之间; 7% 含固量的大罐发酵液 (50—60 亿/ml 芽孢数) 中晶体浓度为 5—6 mg/ml; 大罐发酵液浓缩一倍而成的乳剂产品 (100—120 亿/ml 芽孢数) 中的晶体浓度在 10—15 mg/ml。两种方法测定的结果虽处在同一个数量级上, 但差距接近一倍, 还需要作进一步的研究和探讨。

参 考 文 献

1. Andrews R E et al.: *Appl Environ Microbiol.* **40**: 897—900, 1980.
2. Wie S I et al.: *Appl Environ Microbiol.* **43**: 891—894, 1982.
3. Smith R A and Ulrich J T: *Appl Environ Microbiol.* **45**: 586—590, 1983.
4. 罗绍彬等: 生物防治通报, **3**(4): 145—148, 1987.
5. 王瑛等: 微生物学报, **20**(3): 285—288, 1980.
6. 朱检等: 生物化学实验, 上海科学技术出版社, 104—109 页, 1980.
7. 罗绍彬: 微生物学通报, **7**(2): 54—56, 1980.