

苏云金芽孢杆菌培养条件及 晶体蛋白提纯方法初探

左雅慧* 丁之铨 张 杰

(中国农业科学院植物保护研究所 病虫害生物学国家重点实验室 北京 100094)

摘要 在苏云金芽孢杆菌常用培养基的基础上,设计了3种改进苏云金芽孢杆菌产生伴孢晶体的培养基,从中筛选出一种比1/2 LB、G-T培养基培养周期短(约需38 h)的ZM培养基。同时,改进了晶体蛋白的提纯方法—碱裂解法。改进后的方法与不连续蔗糖密度梯度离心法相比,简便易行,提取量大,在Bt的生化 and 生物活性研究上具有一定参考价值。

关键词 苏云金芽孢杆菌 培养基 晶体蛋白 提纯

中图分类号 S 476.11

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称Bt)以其对多种害虫的特异性毒杀、不污染环境和对人畜无害等特点成为目前研究应用最为广泛的生物杀虫剂。发酵获得提纯Bt晶体蛋白是有关Bt生物活性、作用特点及某些分子生物学研究的重要环节。作者通过多次试验,筛选出一种产品体量较大的ZM发酵培养基,它与一般常用的G-T、1/2LB培养基相比,具有发酵周期短,孢晶产量高等特点。同时在前期工作基础上,改进了晶体

蛋白的提纯方法—碱裂解法,该法比国外常用的不连续蔗糖密度梯度离心法简便,提取量大,成本低。

1 材料与方法

1.1 培养条件筛选

苏云金芽孢杆菌HD-73菌株由中国农科院植保所生物技术组提供。LB液体培养基^[1]用于活化菌株,1/2LB、G-T为常用的晶体蛋白发酵培养基。1/2LB培养基成份为:酵母膏0.25%,蛋白胨0.5%,NaCl 0.5%,pH7.0;G-

T培养基的成份为:CaCl₂ 0.08 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, 葡萄糖 2 g, 微量元素溶液(FeSO₄ 0.25 g, CuSO₄ 0.5 g, ZnSO₄ 0.5 g, MnSO₄ 5 g, MgSO₄ 20 g, 蒸馏水 1 000 ml) 10 ml, 1 mol Tris (pH 7.5) 5 ml, 酵母膏 1.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.4。参考有关文献阐述的 Bt 发酵培养基的主要成份^[2,3], 设计配制了 3 种产晶体蛋白发酵培养基, 成分分别为:

1号:葡萄糖 0.5%, 豆饼粉 1.5%, 可溶性淀粉 0.3%, 蛋白胨 0.05%, 玉米浆 0.2%, CaCO₃ 0.2%, MgSO₄ 0.075%, KH₂PO₄ 0.07%, (NH₄)₂SO₄ 0.15%, pH 7.0。

2号:酵母粉 1.0%, 可溶性淀粉 0.5%, 葡萄糖 1.0%, 玉米浆 0.2%, CaCO₃ 0.2%, MgSO₄ 0.075%, KH₂PO₄ 0.07%, (NH₄)₂SO₄ 0.15%, pH 7.0。

3号:蛋白胨 1%, 酵母粉 0.2%, 可溶性淀粉 0.3%, 葡萄糖 0.2%, K₂HPO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, CaCO₃ 0.2%, pH 7.0。

将活化的菌液以 1% (V/V) 的接种量分别接种于 1、2、3 号发酵培养基中 (500 ml 三

角瓶内装 100 ml 培养基), 30℃、23 r/min 培养 30 h 后每隔 2 h 取样, 用 16×100 倍光学显微镜观察晶体蛋白产生情况, 确定最适培养基, 将其与 1/2LB、G-T 培养基进行发酵周期对比试验。

1.2 晶体蛋白的提纯

(1)碱裂解法 将 3 L 发酵液离心收取菌体, 用无菌预冷的 1 mol NaCl 溶液和无离子水洗涤, 溶于 150 ml 的裂解液中 (50 mmol EDTA、50 mmol Na₂CO₃、3% 巯基乙醇) pH 10, 4℃ 下裂解 5~6 h, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 用 4 mol 乙酸钠—乙酸溶液 (pH 4.5) 中和达 pH 5.0 左右, 4℃ 沉淀 4 h。12 000 r/min 离心 10 min 收取沉淀物, 用无菌预冷的无离子水洗涤数次, 最后溶于 30 ml 的溶解液 (50 mmol Na₂CO₃ 1 mmol EDTA) 中, pH 10。

(2)不连续蔗糖密度梯度离心法 蔗糖浓度为: 67%、72%、82%, 27 000 r/min 离心 14 h, 具体过程详见参考文献[4]。晶体蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 法, 具体内容详见参考文献[5]。

表 1 不同培养基上苏云金芽孢杆菌产生晶体情况

培养基 种类	发酵时间			
	24 h	36 h	38 h	50 h
1号	大多数为营养体细胞, 出现少量芽孢、晶体。	大量芽孢、晶体产生, 有个别营养体细胞。	大量芽孢、晶体释放出来。	部分晶体已溶解。
2号	营养体细胞粗壮未见晶体。	有个别芽孢、晶体出现, 多数为营养体细胞。	有少量芽孢、晶体产生。	部分晶体产生。
3号	大多数为营养体细胞, 个别芽孢、晶体出现。	大量芽孢、晶体产生, 有少量营养体存在。	大量芽孢、晶体出现, 有个别营养体细胞。	部分晶体已溶解。

2 结果与讨论

从表 1 看出, 苏云金芽孢杆菌在 2 号培养基发酵周期最长, 培养 50 h 只有部分晶体产生; 1、3 号培养基发酵产品体的最适时间分别为 36 h 和 38 h, 但因 1 号培养基中豆饼粉杂质较多, 不利于蛋白提纯; 3 号培养基较为合适, 命名为 ZM 培养基, 同时, 试验表明 ZM 培养基比国内外常用的 1/2LB、G-T 培养基的发酵周期短。通过镜检, 苏云金芽孢杆菌在 ZM 培养基上培养 38 h, 90% 营养体释放出芽孢和晶体,

且晶体产量大, 而 1/2LB、G-T 培养基则需要 68 h 和 48 h。在实验室条件下使用 ZM 培养基可以节省大量时间, 同时, 降低了提取晶体蛋白的试验成本, 具有一定的参考价值。

应用不连续蔗糖密度梯度离心法提取晶体蛋白量少, 每升发酵液中提取的晶体蛋白量为 30 mg, 仅为碱裂解法的 1/2 左右 (碱裂解法提取量为 70 mg/L)。试验发现, 最适的蔗糖浓度梯度不易控制, 孢晶混合物不能完全分离, 而且超离心时间很长, 约需 14 h, 一般实验室无此条

件,成本高,不易于大量提取。而本文所采用的碱裂解法改进了溶解条件,晶体蛋白溶解于 50 mmol $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-HCl}$ (pH 10.5) 的碱性溶液中, 37°C 、1 h。操作简便,时间短,提取量大。在此条件下,细胞所产生的碱性蛋白水解酶极易使晶体蛋白降解。所以,无论是溶解还是裂解均应在低温条件下进行,而且在提取过程中也应尽量保持低温状态,以免蛋白降解。该方法在对 Bt 生物活性研究上具有一定的应用价值。

主要参考文献

- 1 萨姆布鲁克 J. 等著. 分子克隆实验指南(第 2 版). 金冬雁等译. 北京:科学出版社,1992.
- 2 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京:科学出版社,1990.
- 3 吴继星,陈在佺. 生物防治通报,1994,10(3):110-113.
- 4 Thomas W E, Ellar D J. J Cell Sci, 1983, 60: 181-197.
- 5 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.