

Bti 的溶血特性及其在 Bti 制剂毒力检测中的应用

但汉斌 陈勇强

(天津农科院园艺所农业微生物研究室 天津 300192)

摘要 实验利用 Bti(苏云金杆菌以色列亚种)对兔红细胞(RBC)的溶血特性,以 A_{541} 特征光吸收对 Bti 毒蛋白溶液体积或其对数作回归分析。结果表明:二者具有良好的直线关系。相关系数 $r \geq 0.95$ 。方差分析表明:不同梯度的 Bti 毒蛋白溶液处理之间差异极显著,处理内各重复之间差异不显著,同一天内的重复检测没有显著差异。本文给出了 Bti 制剂毒力检测的参考程度,并就该程度应用于 Bti 毒力快速检测作了较为详尽的探讨。

关键词 苏云金杆菌以色列亚种, 溶血实验, 毒力检测

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)(简写 Bt)制剂是目前世界上产量最大的微生物杀虫剂^[1],它广泛应用于农、林、医等多领域的害虫

防治,并取得了显著的社会效益、经济效益和生

1996-12-30收稿

态效益。苏云金杆菌制剂存在生产过程中各批次毒力难以保证一致的问题,因此对其毒力测定比化学农药要频繁。寻求准确、快速、易操作的毒力测定方法一直是各厂家及科学工作者所关注的问题。

我国农业部于 1996 年颁布了苏云金杆菌制剂毒力测定的标准方法,该方法解决了国内生物农药测定的标准统一问题,但仅适于测定防治鳞翅目害虫的苏云金杆菌制剂(在我国一般是 Bt subsp. kurstaki HD-1 库斯塔克亚种)。Johnson^[2], Gringorten^[3] 用昆虫肠上皮细胞的培养物代替活体昆虫成功地作过库斯塔克亚种的离体生物测定; Dukeikovskaya^[4] 分别采用放射免疫法、火箭免疫法和酶联免疫法 (ELISA) 定量测定了 Bt 库斯塔克亚种制剂中 ICP 的含量以指示毒力; 罗绍彬等 (1990) 也用 ELISA 作过 Bt 库斯塔克亚种制剂毒力的评估工作; Egorov 等^[5] 通过藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 的融菌实验, 测定融菌圈以评估 Bt 库斯塔克亚种、苏云金亚种等制剂的毒力大小; Majumdar 等^[6] 通过兔红细胞 (RBC) 的溶血实验测定溶血后的光吸收以标定 Bt (以色列亚种, Bti) 制剂的毒力效价。本实验在 Majumdar 等人的实验基础上, 直接以 Bti 的摇瓶发酵液作供测样品, 通过实验结果分析检验该方法的可靠性; 同时通过条件摸索, 力求探索出一套精确的实验程序, 为国内建立有关 Bti 制剂的毒力检测标准提供参数依据。本实验在国内属首次报道。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌种: Bti 1897, 由南开大学任改新教授惠赠。

1.1.2 Bti 摇瓶培养基 (g/L): 蛋白胨 5, 牛肉膏 3, NaCl 5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.005, pH 7.0~7.2。

1.1.3 供血兔: 天津实验动物中心。

1.1.4 Elsevier 溶液 (g/L): 葡萄糖 20.5, NaCl 4.2, 柠檬酸钠 8, 柠檬酸 0.55, 灭菌后 4℃ 保存备用。

1.1.5 PBS 系列缓冲液 (g/L): PBSa: NaCl 8,

Na_2HPO_4 1.15, KCl 0.2, KH_2PO_4 0.2; PBSb: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20; PBS: 0.25 份 PBSa 加 50 份 PBSb; PBSG: 1 份 5.4% 葡萄糖加 4 份 PBS; PBS-GG: 1 份 5% 明胶加 100 份 PBS-G。

1.1.6 实验仪器: 国产 HYA 恒温摇床, SPA-10pH 计, TGL 高速台式离心机, LRA 生化培养箱, SIGMA 2K15 离心机, 岛津 UV-160A 紫外-可见分光光度仪。

1.2 实验方法

1.2.1 Bti 毒蛋白溶解液的制备: Bti 经 30℃, 200r/min 摇瓶发酵 48h 后镜检, 绝大多数晶体脱落后停止发酵; 取 15ml 发酵液加入 15ml 无菌水摇匀, 加入 NaOH (终浓度 50mM) 及 EDTA (终浓度 10mM), 调 pH 至 11.7, 放摇床 37℃、200r/min 培养 2h, 溶晶体毒蛋白; 取该毒蛋白溶液 10ml, 调 pH 至 8.8, 加入 PBS-G 至总体积为 30ml; $13000 \times g$, 5℃ 离心 15min; 收集上清液, 测蛋白含量 (测定方法参阅文献 [9]); 4℃ 冰箱保存, 72h 内使用。

1.2.2 RBC 储藏液的制备: 用灭菌后的医用注射器直接从兔心脏取血 (10ml/kg), 加入到 2 倍体积的 Elsevier 溶液中摇匀防凝; 用 PBS-G 洗 2 次, $1000 \times g$, 室温 15min 离心收集 RBC 储存于盛有适量 PBS-GG 的试管中, 用封口胶封口后 4℃ 冰箱保存; 24h 以后使用, 使用期不超过 72h。

1.2.3 RBC 工作液的制备: 将储存 24h 以上的 RBC 储藏液用 PBS-GG 稀释至一定浓度, 取 0.2ml 加入 5ml 蒸馏水混匀后测定光吸收值, $A_{541} = 1.5 \pm 0.1$ 时原液即为 RBC 工作液。

1.2.4 溶血测定: 将毒蛋白溶液用 PBS-G 稀释至蛋白含量为 $1.4 \pm 0.2\text{mg/ml}$; 分别取 0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml, 加入 1*、2*、3*、4*、5* 试管中, (每号管作 5~6 个重复); 各序号管依次加入 PBS-GG 0.8ml、0.6ml、0.4ml、0.2ml、0.0ml; 各试管分别加入 RBC 工作液 0.2ml, 0.9% NaCl 溶液 3.8ml; 36℃ 培养 2h; 室温下 $1000 \times g$ 离心 5min; 取上清液测定 A_{541} 。

1.2.5 实验结果统计分析: 利用方差分析检验

A_{541} 检测值的可重复性, 以及在毒蛋白溶液梯度稀释下 A_{541} 值的差异显著性, 同时以 A_{541} 值 (x) 对毒蛋白溶液体积或其对数 (y) 作回归分析, 检验二者的直线相关性。

2 结果及讨论

2.1 兔 RBC 的光吸收特性

Majumdar 等^[6]报道了兔 RBC A_{542} 吸收峰的应用, 本实验多次重复发现, 兔 RBC 在可见光谱内有 2 个恒定的吸收峰 $A_{540-542}$ 及 A_{576} (图 1), 其中第一峰的平均出现位置在 541nm 处, 该

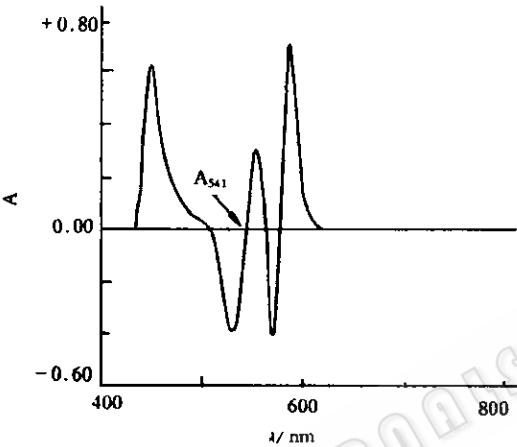


图1 兔RBC的一阶导数光谱

峰的峰值随 RBC 的破裂而增加, 而 A_{576} 保持恒定。说明 A_{541} 是细胞内物质的吸收特性, 而 A_{576} 则是胞壁物质的吸收特性。另外, 兔 RBC 在紫外及近紫外光谱 (200~400nm) 内还有 4 个不规则的吸收峰出现, 这些峰值是否也随 RBC 的破裂而出现规律性的变化尚有待试验。

2.2 溶血实验结果及分析

2.2.1 实验一结果及分析: 实验数据 (表 1) 统计表明, A_{541} 与毒蛋白溶液体积数成正比, 与毒蛋白溶液体积数的对数亦成正比, 相关系数 (r) 分别为 0.99 和 0.95。根据回归方程, 取 $x = 0$, 可以发现光吸收测定的最低样品量为毒蛋白溶液 5.74 μ l; 实验测得毒蛋白 (非纯化) 溶液的蛋白浓度为 $4.856 \times 10^{-2} \mu\text{g} / \mu\text{l}$, 故可检测的毒蛋白最低量为 0.29 μg 。本实验的另一附属实验 (数据略) 显示, 如果将 $4.856 \times 10^{-2} \mu\text{g} / \mu\text{l}$ 的 Bti 毒蛋白溶液再稀释 200 倍, 在相同的实验程序下, 所测得各处理之间的 A_{541} 值没有显著差异, 处理间 F 值 (0.43) 明显地小于 F0.05 (5.19) 及 F0.01 (11.39); 处理内各重复之间 F 值 (0.82) 也明显地小于 F0.05 (6.26) 及 F0.01 (15.52), 检测液已达到极度稀释。

通过实验数据的方差分析 (表 2), 实验一

表1 实验一 A_{541} 值及回归分析

	处 理					回归方程	相关系数(r)
	1	2	3	4	5		
重复I	0.034	0.129	0.602	0.920	1.171		
重复II	0.029	0.180	0.618	0.949	1.124		
重复III	0.037	0.144	0.592	0.928	1.183		
重复IV	0.036	0.155	0.518	0.869	1.134		
重复V	0.022	0.193	0.564	0.896	1.210		
A_{541} 平均值(x)	0.032	0.160	0.579	0.912	1.164		
毒蛋白溶液体积(μ l) (y)	5	10	15	20	25	$y=16.26x+5.74$	0.99
毒蛋白溶液体积数(μ l)的对数(y)	0.699	1.000	1.176	1.301	1.398	$y=0.54x+0.8$	0.95

表2 实验一 A_{541} 值方差分析

变异来源	自由度DF	平方和SS	均方MS	F	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
处 理	4	4.6422	1.1605	1419.56	6.26	15.52
重 复	4	0.0048	0.0012	1.46	5.19	11.39
误 差	16	0.0131	0.0008			
总变异	24	4.6600				

*本文的所有方差分析表中, F值注*表示达到5%及1%差异显著, 没有*表示没有显著差异。

表3 实验二、三A₅₄₁值数据分析

	处理组数	重复数	处理间F值	重复间F值	回归方程	相关系数r
实验二	5	6	636.79*	2.25	A ₅₄₁ (x), 毒蛋白溶液体积数(y)	0.98
					y=16.78x+3.27	
					A ₅₄₁ (x), 毒蛋白溶液体积数对数(y)	0.98
实验三	5	6	421.40*	0.43	A ₅₄₁ (x), 毒蛋白溶液体积数(y)	0.98
					y=17.16x+2.85	
					A ₅₄₁ (x), 毒蛋白溶液体积数对数(y)	0.99
					y=0.61x+0.68	

各处理的5次重复测验数据之间没有显著差异,而各处理之间差异极显著。新复极差分析亦能得到相似的实验结果(表略)。

2.2.2 实验二、三结果及分析:实验二、三是实验一的重复实验,分别于翌日的上下午进行。Bti 毒蛋白溶液及 RBC 悬液仍采用实验一材料。方差分析结果(表3)与实验一相同:各处理之间差异达到极显著,而各重复之间差异不显著;回归分析 A₅₄₁ 与毒蛋白溶液体积数或其对数之间成明显的直线相关(r≥0.98)。

根据回归方程,毒蛋白最低检出量实验二为 0.16μg,实验三为 0.14μg。对照实验一可发现,随着毒蛋白溶液及 RBC 储存时间的延长,回归直线的斜率增大,在 y 轴的截距(最低检出量)减小(图2)。前者说明储存时间越大,检测灵敏度越低,生化机制与毒蛋白在储存过程中的降解有关;后一现象是否与 RBC 在储存过程中自溶有关尚有待进一步证实。

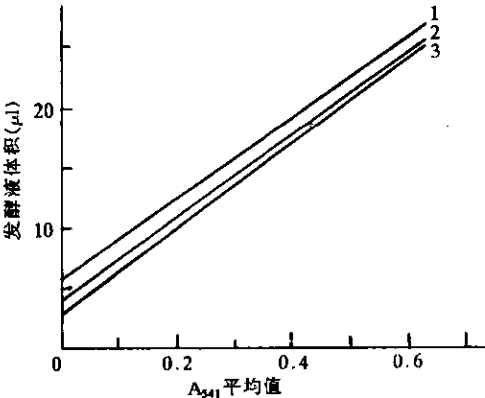


图2 三次重复实验的回归直线图

2.2.3 重复实验的新复极差分析:三次重复实验中,不同天操作的实验一与实验二、三之间差异显著;而同一天操作的实验二与实验三之间没有明显差异(表4),实验数据可以相互平均。进一步的方差分析(表略)显示,各实验的重复内 F 测验差异均不显著,表明重复数还可以减少,有 3 个左右的重复值即可。

表4 三次重复实验A₅₄₁值的新复级差分析

	平均数	差异显著性	
		5%	1%
实验三	0.71	a	A
实验二	0.70	a	A
实验一	0.57	b	B

2.3 Bti 溶血特性在 Bt 毒力测定中的应用探讨

Bti 对动物 RBC 具有溶解作用的特性早在 1979 年就有报道^[7],Cheung 等^[8]报道了纯化的 Bti 晶体溶液对人 RBC 的溶解实验,Majumdar 等^[6]第一次用 Bti 制剂的非纯化毒蛋白溶液作兔 RBC 的溶血实验,并就该方法在 Bti 制剂毒力测定中的应用问题作过探讨,但对实验结果未作详细的数据分析,也未给出标准的实验程序。本实验在此基础上,通过反复摸索,得出可行而经济的实验程序,可作为 Bti 制剂毒力检测的参考程序。

报道实验经过多次重复检测及分析,证明 Bti 对兔 RBC 溶血实验可以得出 A₅₄₁ 与毒蛋白溶液体积或其对数之间非常良好的直线关系;同一处理内检测数据可重复性良好,重复数据差异不显著,各处理之间差异极显著;同一天检测的回归直线(图2)具有较好的重复性;如果

给定已知毒力的标准品作平行实验,则可准确地求出待测样品的毒力(数学模拟将另文发表)。可以看出,利用溶血实验作 Bti 毒力检测,可基本上克服目前生物测定中可重复性差的缺陷,并就目前的生物测定要求的最少重复数(30头虫的重复数以上)而言,溶血实验检测只需测定2~3个重复值。如果已有现成的 Bt 样品,整个实验过程耗时不超过48h,没有常规生物测定中的饲虫手续,基本上算是一个快速、经济、精确的方法,值得推荐。

致谢 承蒙南开大学任改新教授审阅并提供宝贵意见;本室朱珠、张宝莹及魏雪生同志参与部分工作;本所吴晓蕾副研究员在数据分析中提供不少咨询,谨此一并致谢。

参 考 文 献

[1] 喻子牛主编. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用. 北

京:农业出版社,1993.

- [2] Johnson D E. Invertebrate cell system applications, VII, 85~88, Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, Inc. 1989.
- [3] Gringorten J L. J Invertebr Patholo, 1990, 50: 237~242.
- [4] Duberkovskaya Z A Societ Biotechnology, No. 5, 124~128, Translation of Biotikhnoiyya, 1990, No. 5, 89~92
- [5] Egorov N S Microbiology, New York, 1990, 59: 3, 300~303.
- [6] Majumdar M K D Sikdar P. Journal of Applied Bacteriology, 1990, 69: 241~246.
- [7] Nishiitsutsuji-Uwo J, Endo Y, Himeno M. J Invertebr Pathol, 1979, 34: 267~275
- [8] Peter Y K. Cheung, Bruce D. Hammock, Current Microbiology, 1985, 12: 121~126
- [9] 李建武,肖能奎,余瑞元等编. 生物化学实验原理方法, 北京:北京大学出版社,1994.

RESEARCH ON THE HAEMOLYTIC METHOD OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENIS*(BTI) AND ITS APPLIANCE FOR TOXICITY DETECTION OF BTI PREPARATIONS

Dan Hanbin Chen Yongqiang

(Department of Agricultural Microbiology, Tianjin Institute of Horticultural Engineering, Tianjin 300192)

Abstract Impure crystal protein of Bti ferment is dissolved to thaw out the rabbit red blood cell(RBC) and solution of which is detected on the spectrophotometer for A_{541} data. Following regression analysis, A_{541} is found to be in good linear correlation with the volume(or its log scale) of Bti ICP solution, coefficient of correlation(r) ≥ 0.95 . Variance analysis results that, different concentration of Bti ICP solution gives clearly different A_{541} data, but the same concentration gives the similar A_{541} data(F test shows no clearly variance) even with 6 times repeats. Repeat exam of the same day gives no clearly variance from F tests. Reference procedure of Bti preparation toxicity detection is also given out in this paper.

Key words *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Haemolytic method, Toxicity detection