



苏芸金杆菌晶体毒素稳定性和 发酵液保存方法的研究

顾真荣

(湖北省农业科学院植物保护研究所)

苏芸金杆菌制剂目前国内外已从粉剂向液剂过渡^[1],对其主要有毒成分晶体毒素在液相中的稳定性,迫切需要进行理论上的研究,本文报道的是初步工作,供参考。

材料和方法

1. 菌株: 青虫菌 (*Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*) 68-3 菌株,本所选育和保存。

2. 纯晶体的制备: 取摇瓶发酵液用液体双相法提取纯晶体^[2],晶体纯度可达 97% 以上。

3. 发酵液的保存: 发酵液系本院微生物实验工厂 1980 年 7 月 20 日产品,作以下 5 个处理: 添加① 0.4% 煤油; ② 0.8% 食盐; ③ 5% 氨水; ④ 弃去全部上清液(脱水 72% 左右); ⑤ 不作处理(对照)。每个处理取 5 立升发酵液,密闭室温保存两年。

4. 蛋白质浓度测定: 参照朱伦等方法^[3],用考马斯亮蓝 G-250 作染色测定。牛血清蛋白为标准蛋白。

5. 生物测定: 供试昆虫为家蚕,参照罗绍彬的方法^[4],测定样品致死中浓度 LC_{50} ,绘制毒力曲线,以抑制家蚕体重增长的百分值表示毒性,该百分值与死亡率是一致的^[5]。

结果与讨论

(一) 晶体在弱碱环境中的变化

取 15mg 纯晶体粉末于 5ml 0.0135N NaOH 中水解 4 天,柱体积: 2.6×55 cm, 流速: 20 ml/小时, 10 mM $NaHCO_3$ 洗脱,每管收集 4 ml。作晶体碱水解物的 Sephadex G-200 柱层析图(见图 1)。

图 1 中峰 I 处于 V_0 位置,是完全排阻的组分,包括一些没有消化彻底的碎片;峰 II 是完全

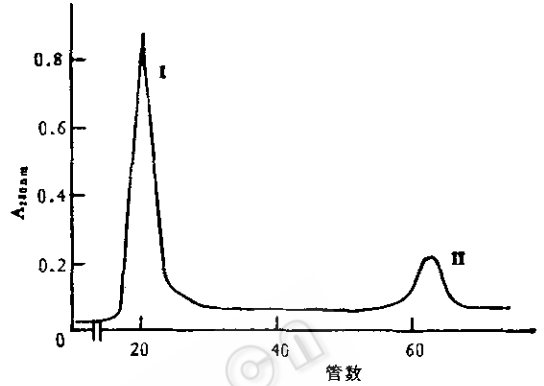


图 1 晶体碱水解物的 Sephadex G-200 柱层析图

表 1 晶体碱水解时间增加和峰 I、II 面积的变化

水解天数	2	4	6	8
峰 I 面积 (cm ²)	1.44	1.37	1.34	1.32
峰 II 面积 (cm ²)	0.27	0.43	0.70	1.03

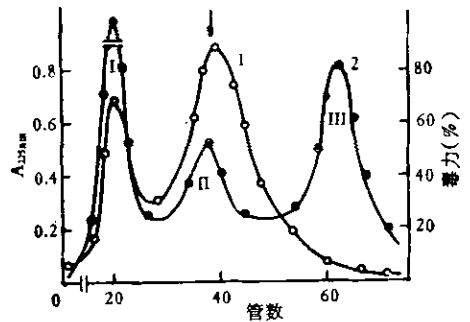


图 2 晶体碱水解液柱层析图及其毒力曲线
(1. 毒力 2. A_{220nm})

不排阻的组分,分子量很小。考马斯亮蓝染色证明该两部分都是蛋白质。随着水解天数增加,峰 I 面积略有减小,峰 II 面积显著增加(见表 1)。

本工作在彭中允副研究员指导下完成。

峰 I 组分向峰 II 组分的转化表明晶体蛋白经历着一个逐步降解的过程。上述碱水解物的紫外吸收 $A_{225\text{ nm}}$ 的柱层析图和各组分对家蚕的毒力曲线见图 2。层析条件同图 1，碱水解 5 天。

由图 1、2 可知， $A_{225\text{ nm}}$ 曲线比 $A_{280\text{ nm}}$ 曲线多一峰，该组分洗脱体积(箭头↓所示)与牛血清蛋白相同，即分子量在 6.8 万道尔顿，且对家蚕有很高的毒性。图 2 中的峰 III 和图 1 中的峰 II 为同一组分，没有毒性，表明晶体蛋白降解成小分子后，毒性丧失殆尽。

(二) 保存液中晶体毒素的变化

发酵液室温保存两年后离心，其上清液的 Sephadex G-200 柱层析图及各组分的毒性见图 3。(层析条件同前，加样量 5ml 离心。)

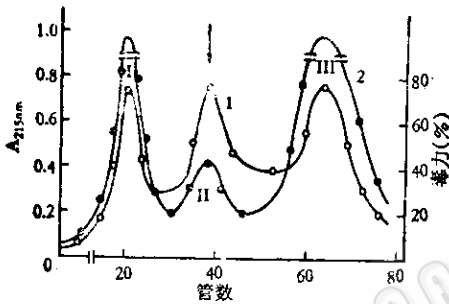


图 3 保存液的柱层析图和对家蚕的毒力曲线

由图 3 可知， $A_{215\text{ nm}}$ 曲线与图 2 中的 $A_{225\text{ nm}}$ 曲线有相似之处，三个峰的洗脱位置一样，但由于上柱的量不同，各组分的含量也不同，毒力亦有差异，尤其是图 2 中的峰 III 是小分子量的多肽，而图 3 中的峰 III 主要是保存液中的色素成分(考马斯亮蓝染色测定测不出蛋白质成分)。蜡螟变种是产生外毒素的，色素峰有毒，很可能是外毒素所致，但需证实。由此可见，发酵液长期保存时，晶体自发降解的变化与晶体在弱碱环境中的变化是相似的。

(三) 五种保存液的情况及其对家蚕的毒力

保存两年后的五种发酵液情况和生物测定结果见表 2。

由表 2 可知，五种保存液的毒力顺序为：食盐保存液 > 对照保存液 > 煤油保存液 > 浓缩保存液 > 氨水保存液。其原因有三点。

1. 保存液的有毒成分主要在沉淀层：发酵液长期保存可分为上下两层(清液层和沉淀层)两层分别作生物测定，证实有毒成分绝大部分在沉淀层。煤油、食盐和对照保存液上下层的体积比分别为 2.33、2.91 和 1.86，而上层对家蚕的毒力分别为下层的 $\frac{1}{150}$ 、 $\frac{1}{155}$ 和 $\frac{1}{30}$ 。

表 2 五种保存液的情况和对家蚕的生物测定结果

保存液	结果	项目							
		镜 检	原菌数 (亿/ml)	两年后 菌数	pH ¹⁾	比重 (g/cm ³)	LC ₅₀ ²⁾ (稀释 倍数)	95% 置信限	回归斜率
0.4% 煤油		大量芽孢, 少量晶体	42.6	42.0	6.45	1.01	301	292—310	-1.65
0.8% 食盐		同 上	45.5	44.3	6.62	1.02	488	452—524	-1.37
5% 氨水 ¹⁾		—	40.0	—	>12.0	—	—	—	—
浓 缩		大量芽孢,极 少晶体有杂菌	140.0	143.5	8.30	0.99	15	13—17	-2.25
对 照		大量芽孢, 极少晶体	43.1	44.4	8.00	1.01	431	399—463	-1.69

1) 氨水保存液一年后作毒力测定，毒性已完全丧失，故未作进一步测定。

2) 原发酵液 pH 为 6。保存期间 pH 会自发上升。

3) 生物测定系 27℃ 感染 17 小时的结果。非同批的新鲜发酵液在此条件下的 LC₅₀ 为 600—900 倍，可作为毒性下降的参考指标。

表 3 四个保存液中干物质的量和生测结果

项目 结果 保存液	LC ₅₀ (mg/ml)	95% 置信限	回归斜率	300ml 中干物质质量 (g)
0.4% 煤油	0.250	0.288—0.221	1.87	2.28
0.8% 食盐	0.254	0.285—0.230	1.93	5.20
浓 缩	测不出	—	—	12.80
对 照	0.255	0.272—0.240	2.05	4.60

各取 300ml 保存液,以 3000rpm 离心 30 分钟,60℃ 缓慢烘干,称重,磨碎,0.0625—2.0 mg/ml 6 个稀释度作生物测定,设 3 个重复,23℃ 感染 24 小时。

2. 除浓缩液的干物质无毒性外,煤油、食盐和对照 3 种保存液的干物质毒性相同,保存液毒力的高低主要看干物质的量(见表 3)。

3. 煤油促进晶体降解为可溶性的毒素: 4 种保存液以 3000rpm 离心 30 分钟,取上清液作生物测定,同时用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度(见表 4)。

表 4 4 种保存液离心上清液的生物测定和蛋白质浓度测定*

项目 结果 保存液	LC ₅₀ (稀释倍数)	蛋白质浓度 (mg/ml)
0.4% 煤油	189	0.52
0.8% 食盐	25	0.43
对照	30	0.46
浓缩	0	3.57

* 此处测得的蛋白质浓度是晶体和培养基残渣两者降解而成的可溶性蛋白。而新鲜发酵液离心的上清液所测蛋白质浓度为 0。

表 4 说明,煤油保存液的干物质损失最多,其上清液的蛋白质浓度最高(毒性也最高),这表明损失的干物质(一部分是晶体)首先是以可溶性物质存在,然后进一步降解,最后以气体形式放出。Bulla 认为晶体在碱性环境下首先降解为 1.34×10^5 道尔顿的亚单位(或前毒素),进一步转化为 6.8×10^4 道尔顿的毒素,该毒素在室温下几个月仍具有杀虫活性,若再降解成小分子量的多肽,毒性随之丧失^[6,7]。本实验结果与上述观点相同。

参 考 文 献

- [1] 严绍良等: 微生物学通报, 9(4): 197—198, 1982。
- [2] 王瑛等: 微生物学报, 20(3): 285—288, 1980。
- [3] 朱俭等: 《生物化学实验》, 上海科学技术出版社, 上海, 66—68, 1981。
- [4] 罗绍彬: 微生物学通报, 7(2): 54—56, 1980。
- [5] Schesser, J. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 878—880, 1977。
- [6] Bulla, L. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1123—1130, 1979。
- [7] Bulla, L. A. et al.: *J. Biol. Chem.* **256**: 3000—