



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102492027 A

(43) 申请公布日 2012.06.13

(21) 申请号 201110408518.5

(22) 申请日 2011.12.09

(71) 申请人 福建省农业科学院农业生物资源研
究所

地址 350003 福建省福州市五四路 247 号

(72) 发明人 刘波 阮传清 朱育菁 刘芸
唐建阳

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限
公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

C07K 14/325 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 2 页

(54) 发明名称

一种提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种成本低、安全、操作简单的提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法。该方法包括发酵原液的前处理和提取蛋白质晶体。本发明的 Bt 杀虫蛋白晶体的提取量大,操作简单,成本低、安全,适合工业化生产。

1. 一种提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法,其特征在于:所述方法的具体步骤如下:

(1) 发酵原液的前处理:

苏云金芽孢杆菌发酵完毕后,将发酵液 1500-3000 r/min 离心 1 min;滤液经 1000 r/min、4℃离心 1.5-2min, 除去沉淀;上清液通过 10000 r/min、4℃离心 15min,将收集到的沉淀溶于含有 0.1% (v/v)TritonX-100 的生理盐水中,然后继续在 10000r/min、4℃下离心 15min,沉淀用生理盐水洗涤,甩去多余水份后收集沉淀备用;

(2) 提取蛋白质晶体

将步骤(1)收集的沉淀与 PEG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾混合,加水溶解形成混合液,使最终浓度分别为:沉淀 24g/L、PEG 120 g/L、磷酸氢二钾 90 g/L,磷酸二氢钾 30g/L,边搅拌边调节混合液 pH 至 8.5,在 1440r/min, 15℃下离心 2min,除去上清液,加水补足至与上述混合液等体积,然后再次加入占混合液总体积 9% (w/v) 的磷酸氢二钾和 3% (w/v) 的磷酸二氢钾进行二次萃取,在 4500r/min, 4℃下离心 15-20 min,收集沉淀部分,加入生理盐水洗涤,收集 Bt 晶体蛋白质,将其溶于生理盐水中,于 -20℃下冻存。

2. 根据权利要求 1 所述的提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法,其特征在于:步骤(2)所述 PEG 为 PEG4000。

一种提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法,属生物农药技术领域。

背景技术

[0002] 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是重要的生物农药。1957 年苏云金杆菌制剂首次上市销售,目前商品制剂已达 100 多种,是世界上产量最大,应用最广的微生物杀虫剂。Bt 制剂产量占有所有活体微生物杀虫剂的比例达 90% 以上。

[0003] 苏云金芽孢杆菌制剂以杀虫蛋白晶体为主要成份,一般认为其杀虫机制为:杀虫蛋白晶体被敏感昆虫取食后,在昆虫中肠内溶解为前毒素,再经中肠蛋白酶水解形成具有杀虫活性的毒性肽,毒性肽穿过围食膜,与中肠上皮细胞刷状缘膜的结合,并进一步插入膜内,形成孔洞或离子通道,引起离子渗漏,破坏肠壁上皮细胞,使肠道内溶物渗入血腔,引起败血症,从而造成昆虫全身麻痹而死。

[0004] 在 Bt 的基因工程、毒理学研究、杀虫机理以及对人类的安全性等科学研究方面都对 Bt 杀虫蛋白晶体提出了极大的需求。目前有一些分离纯化杀虫蛋白晶体的方法:如孢子悬浮法,密度梯度离心法、萃取法、等电点沉淀法、碱裂解法等。虽然这些方法最终也能提取到杀虫蛋白晶体,但孢子悬浮法需要重复很多次,费时费力;密度梯度法提取的蛋白量少,所费时间长,成本高,操作复杂;萃取法需要使用了高毒性的有机溶剂 CCl_4 ,不利于环境保护,生产过程也容易发生危险,而碱裂解法容易出现杀虫蛋白晶体被自身产生的碱性蛋白水解酶降解的现象。

发明内容

[0005] 为了克服上述缺陷,本发明提供了一种成本低、安全、操作简单的提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法。

[0006] 本发明的技术方案如下:

一种提取 Bt 杀虫蛋白晶体的方法,具体步骤如下:

(1) 发酵原液的前处理:

苏云金芽孢杆菌发酵完毕后,将发酵液 1500-3000 r/min 离心 1 min;滤液经 1000 r/min、4℃ 离心 1.5-2min, 除去沉淀;上清液通过 10000 r/min、4℃ 离心 15min, 将收集到的沉淀溶于含有 0.1% (v/v) TritonX-100 的生理盐水中,然后继续在 10000r/min、4℃ 下离心 15min, 沉淀用生理盐水洗涤,甩去多余水份后收集沉淀备用;

(2) 提取蛋白质晶体

将步骤(1)收集的沉淀与 PEG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾混合,加水溶解形成混合液,使最终浓度分别为:沉淀 24g/L、PEG 120 g/L、磷酸氢二钾 90 g/L,磷酸二氢钾 30g/L,边搅拌边调节混合液 pH 至 8.5,在 1440r/min, 15℃ 下离心 2min, 除去上清液,加水补足至与上述混合液等体积,然后再次加入占混合液总体积 9% (w/v) 的磷酸氢二钾和 3% (w/v) 的磷酸二氢钾进行二次萃取,在 4500r/min, 4℃ 下离心 15-20 min, 收集沉淀部分,加入生理盐水洗

涤,收集 Bt 晶体蛋白质,将其溶于生理盐水中,于 -20°C 下冻存。

[0007] 步骤(2)所述 PEG 为 PEG4000。

[0008] 本发明的有益效果:

本发明的 Bt 杀虫蛋白晶体的提取量大,操作简单,成本低、安全,适合工业化生产。

具体实施方式

[0009] 实施例 1

(1) 发酵原液的前处理:

离心过滤:目的是通过离心过滤除去豆饼粉等大颗粒杂质。苏云金芽孢杆菌发酵完毕后,将发酵液 $1500\text{--}3000\text{ r/min}$ 离心 1 min ;

洗涤除杂:将离心过滤后的过滤液通过 1000r/min 、 4°C 、 2min 离心,除去沉淀,然后通过 10000r/min 、 4°C 、 15min 过滤,将收集到的沉淀溶于 4 倍量含有 0.1% TritonX-100 的生理盐水中,然后继续在 10000r/min 、 4°C 、 15min 下离心,将沉淀采用生理盐水洗涤三次,最后一次将离心管倒置 3min 使水流干,收集沉淀。

[0010] (2) 提取蛋白质晶体

按如下体系:称取沉淀、PEG、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾混合,以水溶解,使最终浓度分别为:沉淀 24g/L 、PEG4000 120 g/L 、磷酸氢二钾 90 g/L 、磷酸二氢钾 30g/L ,混合后调 PH 到 8.5 。在 1440r/min 、 15°C 、 2min 条件下离心分层,除去最上层,以水补足体积,然后再次加入占总体积 9% 的磷酸氢二钾和 3% 的磷酸二氢钾(即每 100ml 体积分别加 9g 磷酸氢二钾、 3g 的磷酸二氢钾)混合进行二次萃取。在 4500r/min 、 4°C 、 15min 下离心收集沉淀部分,加入 4 倍量的生理盐水洗涤,收集蛋白质晶体。溶解于生理盐水中 -20°C 冻存。