

一种基于 SDS 溶液高效提取土壤残留 Bt 蛋白的方法

方志翔, 孟 军, 贺昭和, 刘 标^① (环境保护部南京环境科学研究所国家生物安全重点实验室, 江苏 南京 210042)

摘要: 通过对 SDS 浓度、孵育温度和孵育时间 3 种提取条件的研究, 建立了一种基于 SDS 溶液的提取土壤中残留 Bt 蛋白的方法 (简称 SDS 法)。在 $\rho(\text{SDS})$ 为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、孵育温度为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 、孵育时间 $\geq 4 \text{ h}$ 条件下, 采用 SDS 法可有效地从不同类型土壤样品中提取残留 Bt 蛋白, 提取效果明显好于碳酸盐法、人造蠕虫肠道蛋白提取液法和 PBST (phosphate buffer solution with Tween-20) 法。

关键词: SDS 溶液; Bt 蛋白; 提取; 土壤; 碳酸盐法; 人造蠕虫肠道蛋白提取液法; PBST 法

中图分类号: X53; Q-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-4831(2011)01-0088-05

A Novel SDS-Buffer-Based Method for Extracting Bt Protein Residues From Soil FANG Zhixiang, MENG Jun, HE Zhaohe, LIU Biao (National Key Laboratory of Biosafety, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China)

Abstract A novel SDS based method for extracting Bt protein residues from the soil was developed based on studies on extraction conditions including concentration of SDS in the solution and temperature and duration of incubation. Results show that when SDS was $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the solution at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ for more than 4 hours it might extract effectively Bt protein residues from various types of soils, demonstrating better effect than the so far known extraction methods, such as carbonate method, invertebrate gut fluid chemistry and PBST (phosphate buffer solution with Tween-20).

Key words SDS buffer; Bt protein; extraction; soil; carbonate method; invertebrate gut fluid chemistry; phosphate buffer solution with Tween-20

由于转 Bt 作物可以减少 40%~70% 的农药施用量, 经济和生态效益巨大, 因而得到大面积推广^[1]。2009 年全球转基因作物种植总面积已达 1.34 亿 hm^2 , 其中转 Bt 基因作物种植面积占转基因作物种植总面积的 18%^[2]。

转 Bt 棉花在我国进行商业化种植已达 10 余年, 据 2006 年统计, 转 Bt 棉花种植面积已占我国棉花种植总面积的 70% 以上^[3]。转 Bt 作物在种植以后, 会通过根系分泌物、花粉、残茬向土壤释放 Bt 蛋白^[4], 这些分泌的 Bt 蛋白会被土壤中的黏土矿物和腐殖质等表面活性颗粒吸附, 且结合态毒蛋白仍具有较强的杀虫活性, 在土壤环境中可长时间存留^[5]。这些残留的毒蛋白可能会对土壤中无脊椎动物、微生物产生潜在的毒性, 影响土壤生物种群多样性结构, 从而破坏土壤的物质循环和能量转换^[6]。因此, 研究 Bt 蛋白在土壤中的降解动态对于保护生态环境安全具有十分重要的意义。

目前, 对于土壤中残留 Bt 蛋白的检测方法, 主要有生物测定法和 ELISA 试剂盒检测法。生物测定法以目标害虫取食混有残留 Bt 蛋白土壤的植物组织后的死亡率、化蛹率、羽化率、体质量变化等作

为指标, 是确认土壤中残留 Bt 蛋白杀虫活性的一种直接、有效、简便易行的手段。但生物测定法需要统一虫源、虫龄和饲养条件, 且占用的空间大, 检测所需时间长, 环境因素干扰大, 因此难以对大规模的土壤样品进行检测^[7-8]。ELISA 检测法通过缓冲液提取土壤样品中的 Bt 蛋白, 然后采用 ELISA 检测方法对提取的蛋白进行定性或定量。相对生物测定法, ELISA 检测法操作较为简单, 检测所需时间短, 适用于大批量样品的检测, 因此成为目前检测土壤中残留 Bt 蛋白最常用的一种方法^[9]。在对土壤中残留 Bt 蛋白的检测过程中, 最为关键的就是能否高效地从土壤中提取残留 Bt 蛋白。目前, 提取土壤中残留 Bt 蛋白的方法主要有碳酸盐法、人造蠕虫肠道蛋白提取液法、PBST (phosphate buffer solution with Tween-20) 法, 但这些方法都存在一定缺陷。碳酸盐法和 PBST 法提取效率不高, 对于 Bt 蛋白残留含量

收稿日期: 2010-08-02

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2008ZX08012-004, 2008ZX08012-005, 2008ZX08011-002)

^①通信作者 E-mail: liubiao@nies.org

较低的土样容易造成检测结果假阴性; 虽然相对于上述 2 种方法, 人造蠕虫肠道蛋白提取液法提取量有一定提高, 但是由于该方法需在提取液中加入人造蠕虫蛋白成分, 对于大量的土壤样品检测而言成本相对较高。为克服以上提取方法的缺点, 笔者尝试一种基于 SDS 溶液的新的提取土壤残留 Bt 蛋白的方法, 以期为更有效地监测 Bt 蛋白在土壤中的残留提供参考。

1 材料与方法

1.1 土壤样品来源

供试土壤样品分别取自不同地区连续多年种植转 Bt 棉花和常规棉的棉田, 采样地点分别为江西九江、河南新乡、陕西杨凌、新疆乌鲁木齐。这 4 个采样点分布于我国的长江流域、黄河流域和西北内陆产棉区, 而这 3 个区域分别代表了我国不同生态环境和土壤类型的 3 大产棉区。连续种植转 Bt 棉花的时间为: 新乡棉田, 3 a; 九江棉田, 4 a; 乌鲁木齐棉田, 3 a; 杨凌棉田, 4 a。

1.2 土壤样品采集方法

于棉花开花期, 在选取的不同转 Bt 棉田随机采集土样, 同时每个采样点设置 1 个种植常规棉的田块作为对照。每块棉田设置 5 个采样点, 各样点相距 30~50 m, 在每个采样点随机选取 5 株棉花, 在每株棉花的根际周围 (距主根 5~10 cm, 距地表 5~20 cm) 取土样, 共取约 500 g 土壤, 装入 1 个密封袋, -20 °C 下冰箱保存。

1.3 土壤残留 Bt 蛋白提取方法

采用碳酸盐法提取 Bt 蛋白的具体步骤参见文献 [10], 采用人造蠕虫肠道蛋白提取液法提取 Bt 蛋白的具体步骤参见文献 [11], 采用 PBST 法提取 Bt 蛋白的具体步骤参见美国一龙公司 ELISA 蛋白提取试剂盒 (Envirologix USA) 上的说明。

由于该研究主要探讨 SDS 溶液浓度、孵育时间和孵育温度 3 种提取条件对土壤残留 Bt 蛋白提取效果的影响, 在最终的试验中, 采用了最优条件下的提取方法。以下为最终优化的 SDS 溶液配方和提取方法。

SDS 提取液的配制: NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, SDS 2 g, 甘油 50 mL, 溶于 800 mL 灭菌去离子水中, 调节 pH 值至 7.4 定容至 1 L, 4 °C 或常温下保存。

提取土壤残留 Bt 蛋白的主要步骤为: (1) 取 100 g 土壤样品, 采用孔径为 48 μm 的网筛过筛, 以去除植物根系残体等杂质, 称取 5 g 过筛后的土壤

样品置于研钵中, 研磨 1 min, 使土壤颗粒细小均匀; (2) 将 0.5 g 研磨后的土壤样品置于 2 mL 离心管中, 加入 1.5 mL SDS 提取液, 置于涡旋混合仪上振荡 1 min, 使其充分混合均匀; (3) 将上述土壤悬浮液置于可控温摇床中, 50 °C 下 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 4~16 h; (4) 将振荡后的离心管取出, 迅速置于离心机中, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1~2 min; (5) 离心结束后, 用微量移液器小心吸取离心管中上清液, 转入新的离心管中, 该上清液即为含有 Bt 蛋白的溶液; (6) 采用 ELISA 试剂盒对含有 Bt 蛋白的溶液进行定量。

1.4 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析及多重比较 (Duncan 检验, $\alpha = 0.05$), 数据以平均值 \pm 标准差表示。采用 Excel 2003 软件制图。

2 结果与分析

2.1 不同 SDS 浓度对土壤残留 Bt 蛋白提取效果的影响

由图 1 可知, 土样中 Bt 蛋白提取量随着提取液中 $\rho(\text{SDS})$ 升高而升高, 但是当 $\rho(\text{SDS}) > 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之后基本不变, 由于过高浓度的 SDS 容易使提取液出现结晶析出而影响缓冲液的使用, 因此将 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 确定为最佳 SDS 浓度。

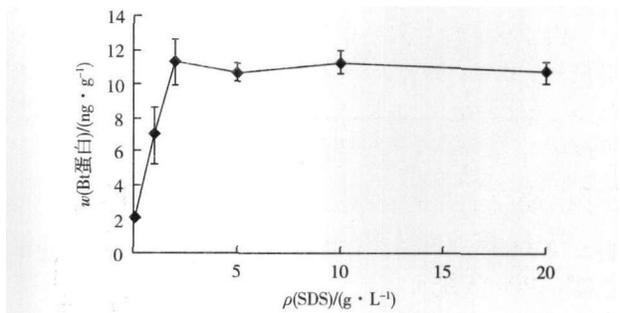


图 1 50 °C 条件下不同 $\rho(\text{SDS})$ 对土样中 Bt 蛋白提取效果的影响

Fig 1 Effects of SDS concentration on Bt protein extraction at 50 °C

2.2 不同孵育温度对土壤残留 Bt 蛋白提取效果的影响

由图 2 可知, Bt 蛋白提取量随着孵育温度的上升而升高, 当温度高于 50 °C 后进入平台期, 因此将 50 °C 确定为最佳孵育温度。

2.3 不同孵育时间对土壤残留 Bt 蛋白提取效果的影响

由图 3 可知, Bt 蛋白提取量随着孵育时间的延

长而升高,但是 4 h 以后的变化已趋于平缓。因此,采用 ≥ 4 h 的孵育时间。若延长孵育时间至过夜则可以取得更好的提取效果。

综合以上试验结果,将土样中 Bt 蛋白的提取条件优化为: ρ (SDS), $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 孵育温度, $50 \text{ }^\circ\text{C}$; 孵育时间, $\geq 4 \text{ h}$ 延长孵育时间可获得更好的提取效果。

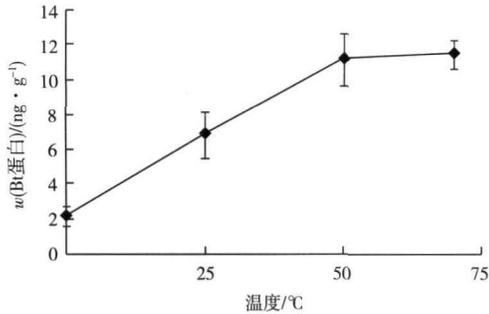


图 2 ρ (SDS)为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下不同孵育温度对土样中 Bt 蛋白提取效果的影响

Fig 2 Effect of incubation temperature on Bt protein extraction with SDS being $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in concentration

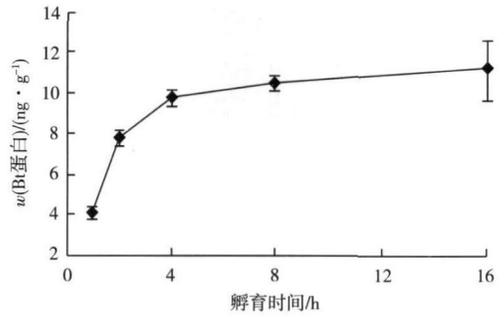


图 3 ρ (SDS)为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下不同孵育时间对土样中 Bt 蛋白提取效果的影响

Fig 3 Effect of incubation duration on Bt protein extraction with SDS being $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in concentration

2.4 SDS法与其他 3 种提取法对土壤残留 Bt 蛋白提取效果的比较

4 种提取方法对转 Bt 棉田和常规棉田土样中残留 Bt 蛋白的提取结果见表 1~ 2。由表 1~ 2 可知,采用 SDS 法对不同棉田土壤样品中残留 Bt 蛋白的提取效果均明显优于其他 3 种方法。

表 1 4 种提取方法对转 Bt 棉田土样中残留 Bt 蛋白的提取结果

Table 1 Extraction of Bt protein residues from soil samples collected in Bt transgenic cotton fields with four different extraction methods

采样地点	$w(\text{Bt 蛋白})/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$			
	SDS 法	碳酸盐法	AGF 法 ¹⁾	PBST 法
河南	4.39 ± 0.08^a	1.44 ± 0.04^b	0.76 ± 0.05^c	0.61 ± 0.04^c
江西	11.25 ± 1.37^{ab}	3.28 ± 0.03^a	1.36 ± 0.03^d	1.05 ± 0.02^c
新疆	2.66 ± 0.11^d	1.15 ± 0.03^e	0.67 ± 0.05^c	0.74 ± 0.01^c
陕西	3.47 ± 0.10^d	1.64 ± 0.04^c	1.22 ± 0.07^{ad}	1.03 ± 0.03^{ac}

同列或同行之间英文小写字母相同表示不同类型土壤间或不同提取方法间差异不显著,英文小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。1) 人造蠕虫肠道蛋白提取液法。

表 2 4 种提取方法对常规棉田土样中残留 Bt 蛋白的提取结果

Table 2 Extraction of Bt protein residues from soil samples collected in conventional cotton fields with four different extraction methods

采样地点	$w(\text{Bt 蛋白})/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$			
	SDS 法	碳酸盐法	AGF 法 ¹⁾	PBST 法
河南	1.37 ± 0.04^a	0.32 ± 0.11^b	未检出	未检出
江西	1.79 ± 0.05^a	0.39 ± 0.03^b	未检出	未检出
新疆	0.61 ± 0.14^b	0.11 ± 0.02^a	未检出	未检出
陕西	0.33 ± 0.08^b	0.28 ± 0.08^b	未检出	未检出

同列或同行之间英文小写字母相同表示不同类型土壤间或不同提取方法间差异不显著,英文小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

1) 人造蠕虫肠道蛋白提取液法。

3 讨论

有研究表明释放到土壤中的游离态 Bt 蛋白极

易与土壤活性颗粒结合且不易分离,因此难以有效分离和纯化^[6],一直以来这都是转 Bt 基因作物对土壤生态系统影响研究的难点之一。由于土壤组成成分复杂,因此会对提取结果造成严重干扰,导致提取效率偏低,甚至无法从土壤中提取残留蛋白。为了能深入研究外来蛋白对土壤生态系统可能造成的影响,亟需一种高效的土壤蛋白提取方法。

SAXENA 等^[4]发现,即使转 Bt 基因玉米根际周围土壤中毒蛋白含量高达 $95 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,实际操作中可分离的毒蛋白含量甚至低于检测限。尽管目前可以用生物毒理试验来验证有毒 Bt 蛋白的存在,但是要想进一步深入开展研究,则需要高效的土壤 Bt 蛋白提取方法的协助。基于此目的,笔者研究了基于 SDS 溶液的土壤残留 Bt 蛋白的提取方法,它可以从多种类型土壤中较高效、低成本地提取 Bt 蛋白,提

取效率高于现有的常用提取方法。SDS 是一种阴离子型表面活性剂, 它可以通过吸附的方式使蛋白质分子带上负电荷。尽管目前没有直接的试验证据证明 SDS 分子可以导致蛋白质分子从其吸附的土壤成分微粒上解吸下来, 但是从该研究不同梯度 $\rho(\text{SDS})$ 的试验结果来看, SDS 分子确实是决定能否从土壤中提取残留 Bt 蛋白的关键因子。该研究中温度对 Bt 蛋白提取效率的影响结果表明, 土壤 Bt 蛋白的提取量随着温度的升高而增加。以往的土壤残留 Bt 蛋白提取方法通常是在 $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或者常温下孵育, 而笔者尝试在较高温度下进行孵育, 结果表明, 在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下能够取得较好的提取效果。初步推断其原因可能是由于随着温度的升高, 反应体系中的各种分子运动加剧, 从而导致蛋白质分子更容易从其吸附的颗粒上解吸下来。此外, 为验证试验所用提取液中 SDS 是否会对后续检测过程造成影响, 笔者在 ELISA 试剂盒自带的 Bt 蛋白标样中加入 SDS 提取液后进行检测, 并与未加 SDS 的提取液进行比较, 两者检测结果一致, 证明 SDS 不会对后续检测过程造成影响。

该研究中, 采用 SDS 提取液及相应的提取方法对几种不同类型的土壤残留 Bt 蛋白的提取效果显著好于其他 3 种方法。对于不同的土壤类型, 属于黏土类型的江西土壤样品中 Bt 蛋白残留量较高, 而属于典型砂土类型的新疆土壤样品中 Bt 蛋白残留量较低, 这与其他研究者的研究结果是一致的^[9, 12-14]。

综上所述, 基于 SDS 提取液的土壤残留 Bt 蛋白提取方法步骤简单, 成本低廉, 并能较高效地从不同类型土壤样品中提取残留 Bt 蛋白。采用该方法提取到的 Bt 蛋白可以直接用于后续的 ELISA 定量检测, 这为进一步深入研究转 Bt 作物产生的土壤残留 Bt 蛋白对土壤生态系统影响打下了重要的技术基础。

参考文献:

- [1] 徐征. 农业转基因生物对土壤生态系统功能影响的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2004, 20(4): 47-50.
- [2] 刘文娟, 刘勇. 转 Bt 基因作物毒蛋白对土壤生态系统的影响 [J]. 中国测试, 2009, 35(6): 91-96.
- [3] 吴孔明. 我国 Bt 棉花商业化的环境影响与风险管理策略 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 1-4.
- [4] SAXENA D, FLORES S, STOTZKY G. Insecticidal Toxin in Root Exudates From *Bt* Com [J]. Nature, 1999, 402(2): 480-481.
- [5] SAXENA D, STEWART C N, AHOSAR I *et al*. Larvicidal cry Proteins From *Bacillus thuringiensis* Are Released in Root Exudates of Transgenic *B. thuringiensis* Com Potato and Rice but not of *B. thuringiensis* Canola Cotton, and Tobacco [J]. Physiology and Biochemistry, 2004, 42(5): 383-387.
- [6] SMS S R, HOLDEN L R. Insect Bioassay or Determining Soil Degradation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* cryIA (b) Protein in Com Tissue [J]. Environmental Entomology, 1996, 25(3): 659-664.
- [7] 李云河, 王桂荣, 吴孔明, 等. Bt 作物杀虫蛋白在农田土壤中残留动态的研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(4): 504-508.
- [8] TAPP H, STOTZKY G. Monitoring the Insecticidal Toxins From *Bacillus thuringiensis* in Soil With Flow Cytometry [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(11): 1074-1078.
- [9] TAPP H, CALAMITA L, STOTZKY G. Adsorption and Binding of the Insecticidal Proteins From *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on Clay Minerals [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1994, 26(6): 663-679.
- [10] 徐海根, 薛达元, 刘标, 等. 中国转基因生物安全性研究与风险管理 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2008: 493-495.
- [11] SHAN G, EM BRESKY K, HERMAN R A, *et al*. Biomimetic Extraction of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins From Soil Based on Invertebrate Gut Fluid Chemistry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(17): 6630-6634.
- [12] CRECCHIO C, STOTZKY G. Biodegradation and Insecticidal Activity of the Toxin From *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bound on Complexes of Montmorillonite-Humic Acids-Allyl Hydroxy polymers [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(4/5): 573-581.
- [13] TAPP H, STOTZKY G. Dot Blot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Monitoring the Fate of Insecticidal Toxins From *Bacillus thuringiensis* in Soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 602-609.
- [14] TAPP H, STOTZKY G. Insecticidal Activity of the Toxins From *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* Adsorbed and Bound on Pure and Soil Clays [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 1786-1790.

作者简介: 方志翔 (1982-), 男, 江苏南京人, 研究实习员, 硕士, 主要从事转基因生物安全风险评估方面的研究。
E-mail: zxfang23@126.com