

钠、钾离子对 Bt 蛋白在蒙脱石和凹凸棒土表面吸附与解吸的影响

刘 宁^{1,2}, 周学永^{2*}, 董庆洁¹, 刘祥云¹, 姚奇才², 黄晓林²

(1.天津理工大学化学化工学院, 天津 300384; 2.天津农学院食品科学系, 天津 300384)

摘 要:采用静态吸附法研究了钠、钾离子对苏云金杆菌杀虫蛋白在蒙脱石和凹凸棒土表面吸附与解吸特性的影响。结果表明,添加钠、钾离子($0\sim 2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)均可提高 Bt 蛋白在两种矿物上的平衡吸附量,但等温吸附曲线的 Langmuir 方程拟合基本没受影响。添加钠离子或钾离子均能引起矿物粒子 Zeta 负电位升高,提示钠、钾离子通过减小矿物粒子与 Bt 蛋白之间斥力的方式促进了 Bt 蛋白吸附。在蒙脱石吸附 Bt 蛋白过程中添加钠、钾离子可使 Bt 蛋白的水解吸率升高,但解吸后的残留量变化不大;在凹凸棒土吸附 Bt 蛋白过程中添加钠、钾离子可使 Bt 蛋白的水解吸率减小,且解吸后的残留量增加。

关键词:Bt 蛋白;蒙脱石;凹凸棒土;钠、钾离子;吸附与解吸

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)04-0786-05

Effects of Sodium and Potassium Ion on the Adsorption and Desorption of Bt Protein by Montmorillonite and Attapulgite

LIU Ning^{1,2}, ZHOU Xue-yong^{2*}, DONG Qing-jie¹, LIU Xiang-yun¹, YAO Qi-cai², HUANG Xiao-lin²

(1.College of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China; 2.Department of Food Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: The effects of sodium and potassium ion on the adsorption and desorption characteristics of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* (Bt) by montmorillonite and attapulgite were studied by a batch method. The results showed that the adsorption amount of Bt protein by both minerals increased with the addition of sodium or potassium ion ($0\sim 2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The fitting of isotherms for Langmuir equation, however, was not influenced. The Zeta negative potential of mineral suspensions increased by the addition of sodium or potassium ion, suggesting that the adsorption of Bt protein on minerals was promoted by sodium or potassium ion through the reduction of repulsion between mineral particles and Bt protein. The addition of sodium or potassium ion during the adsorption of Bt protein by montmorillonite resulted in a increase of desorption of Bt protein, but the residual quantity of Bt protein had a slight change. The addition of sodium or potassium ion during the adsorption of Bt protein by attapulgite, however, resulted in a decrease of desorption of Bt protein, and the residual quantity of Bt protein increased.

Keywords: Bt protein; montmorillonite; attapulgite; sodium and potassium ion; adsorption and desorption

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种广泛存在于土壤中的革兰氏阳性菌,在其芽胞形成

过程中产生杀虫晶体蛋白^[1],其杀虫原理已被广泛应用于转基因抗虫育种实践中。随着转 Bt 基因抗虫作物的大面积推广种植,其环境安全性问题日益引起关注。转 Bt 基因作物向土壤中释放杀虫蛋白的途径主要有 3 种:根系分泌、花粉飘落和秸秆还田^[3-4]。研究表明,Bt 蛋白能够迅速被土壤矿物颗粒吸附,一般 1~3 h 就能达到吸附平衡^[5]。吸附后的 Bt 蛋白对土壤微生物或酶降解具有抗性,导致持效期显著延长^[6]。土壤组成及环境因素,如矿物类型、温度、pH、有机配基^[7-10]等

收稿日期:2011-10-12

基金项目:国家自然科学基金项目(31070478);天津市自然科学基金重点项目(08JCZDJC18800);天津农学院科技发展计划(2008D016)

作者简介:刘 宁(1985—),女,山东东营人,硕士在读,研究方向为土壤矿物对 Bt 蛋白的吸附解吸特性。

E-mail: dylan_liu@163.com

*** 通讯作者:**周学永 E-mail: zhouxueyongts@163.com

条件均可影响 Bt 蛋白的吸附性能,但截至目前,有关离子强度对 Bt 蛋白在土壤中吸附与解吸的影响尚未引起重视。通常情况下,金属离子可以通过电荷吸引进入土壤胶体双电层,进而引起吸附性能的改变。本文研究钠、钾离子对 Bt 蛋白在矿物表面吸附/解吸性能的影响,并对其机制进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Bt 库斯塔克亚种原粉由华中农业大学微生物农药国家工程中心提供,蒙脱石和凹凸棒土分别由浙江丰虹粘土化工有限公司和江苏省盱眙县华丰油田钻井液用材料厂提供。

1.2 Bt 蛋白的提取

取 Bt 原粉约 10.0 g,用去离子水洗涤 3 次。将洗涤后的沉淀配成水悬液,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调至 pH12,35 °C 水浴溶解 Bt 伴胞晶体 1 h。离心 25 min 去沉淀,上清液用乙酸调至 pH4.4,离心得杀虫蛋白沉淀^[11]。Bt 蛋白沉淀用去离子水洗涤 5 次,冷冻干燥,低温保存。

1.3 钠、钾离子对 Bt 蛋白平衡吸附的影响

Bt 蛋白的平衡吸附试验在 25 °C 进行,吸附体系 pH8.0,吸附时间为 3 h。将矿物浓度固定,依次提高 Bt 蛋白浓度制作等温吸附曲线。钠离子或钾离子的添加浓度依次为 0、0.5、1.0、2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。吸附完成后离心,在 280 nm 处测定上清液浓度,利用吸附前后 Bt 蛋白浓度的差值及体系中的矿物浓度计算吸附量。

1.4 钠、钾离子对吸附态 Bt 蛋白解吸的影响

Bt 蛋白和矿物按固定比例混合,钠、钾离子浓度分别为 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,吸附 3 h 后离心,小心操作分离上清液。往吸附试管中加入 3 mL 去离子水,在 25 °C 条件下振摇解吸 3 h。离心,在 280 nm 处测定解吸液浓度,利用解吸量与吸附量的比值计算解吸率。

1.5 钠、钾离子对矿物电位的影响

将蒙脱石和凹凸棒土配制成水悬液,在磁力搅拌下连续滴加 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 或 KCl 溶液,用微电泳仪(JS94J 型,上海中晨数字技术设备有限公司)测定矿物悬液的 Zeta 电位。

2 结果与分析

2.1 钠、钾离子对 Bt 蛋白在矿物表面平衡吸附的影响

25 °C 条件下,添加钠、钾离子对 Bt 蛋白在蒙脱石

表面等温吸附曲线的影响如图 1 和图 2 所示。

在无离子添加时,Bt 蛋白在蒙脱石表面的吸附量随 Bt 蛋白浓度的增加而增加,等温吸附曲线符合 Langmuir 方程 ($R^2 > 0.96$)。随着钠离子的添加 ($0 \sim 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),Bt 蛋白的吸附量逐渐增加,但等温吸附曲线的形状没有改变(图 1),对 Langmuir 方程的符合程度也未受影响(表 1)。钾离子($0 \sim 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 Bt 蛋

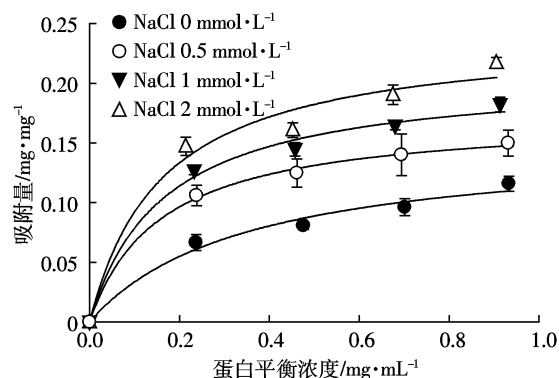


图 1 NaCl 对 Bt 蛋白在蒙脱石表面平衡吸附的影响

Figure 1 Effect of NaCl on the balance adsorption of Bt protein by montmorillonite

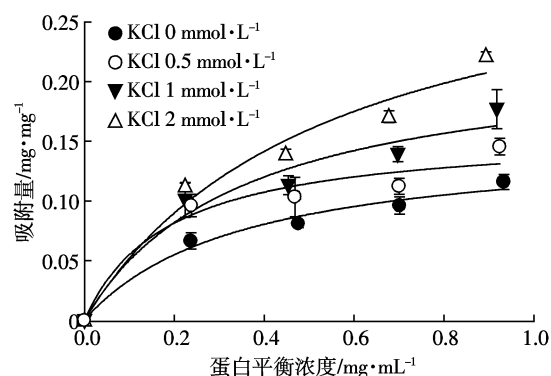


图 2 KCl 对 Bt 蛋白在蒙脱石表面平衡吸附的影响

Figure 2 Effect of KCl on the balance adsorption of Bt protein by montmorillonite

表 1 钠、钾离子添加下 Bt 蛋白在蒙脱石表面的吸附性能

Table 1 The adsorption characteristics of Bt protein on montmorillonite with adding of Na^+ or K^+

添加盐类型	添加盐浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	饱和吸附/ $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$	相关系数(R^2)
无离子	0	0.150 9	0.978 4
NaCl	0.5	0.172 7	0.997 7
	1.0	0.207 6	0.991 1
	2.0	0.241 6	0.973 9
KCl	0.5	0.157 7	0.973 5
	1.0	0.225 2	0.968 9
	2.0	0.332 7	0.962 4

白等温吸附曲线的影响与钠离子相似(图 2),但钾离子对 Bt 蛋白吸附的促进作用高于钠离子(表 1)。

添加钠、钾离子对 Bt 蛋白在凹凸棒土表面的等温吸附曲线的影响如图 3 和图 4 所示。

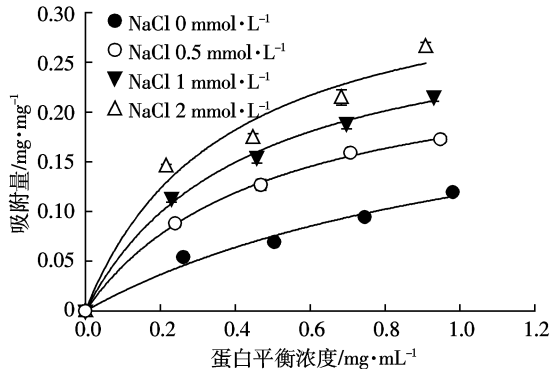


图 3 NaCl 对 Bt 蛋白在凹凸棒土表面平衡吸附的影响

Figure 3 Effect of NaCl on the balance adsorption of Bt protein by attapulgite

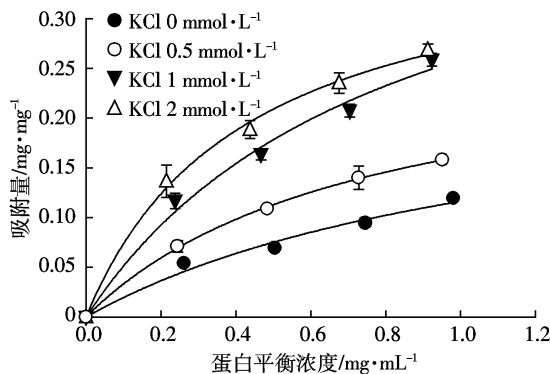


图 4 KCl 对 Bt 蛋白在凹凸棒土表面平衡吸附的影响

Figure 4 Effect of KCl on the balance adsorption of Bt protein by attapulgite

凹凸棒土对 Bt 蛋白的吸附与蒙脱石类似,在无离子添加时,Bt 蛋白的吸附量随 Bt 蛋白浓度的增加而增加,等温吸附曲线符合 Langmuir 方程($R^2>0.97$)。随着钠、钾离子的添加($0\sim 2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),Bt 蛋白的吸附量逐渐增加,等温吸附曲线的形状没有发生改变(图 3 和图 4)。在相同条件下,凹凸棒土对 Bt 蛋白的吸附能力高于蒙脱石(表 2)。

2.2 钠、钾离子对矿物表面电位的影响

在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,添加钠、钾离子对蒙脱石和凹凸棒土 Zeta 电位的影响见图 5 和图 6。

由图 5 和图 6 可知,矿物悬液的 Zeta 电位为负值,相比较而言,蒙脱石的 Zeta 电位低于凹凸棒土。随着钠、钾离子的滴加,矿物悬液的电位呈上升趋势

表 2 钠、钾离子添加下 Bt 蛋白在凹凸棒土表面的吸附性能
Table 2 The adsorption characteristics of Bt protein on attapulgite with adding of Na^+ or K^+

添加盐类型	添加盐浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	饱和吸附量/ $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$	相关系数/ R^2
无离子	0	0.256 4	0.976 8
NaCl	0.5	0.261 5	0.998 7
	1.0	0.307 3	0.996 4
	2.0	0.350 7	0.986 1
KCl	0.5	0.281 9	0.999 3
	1.0	0.372 8	0.987 5
	2.0	0.387 0	0.996 1

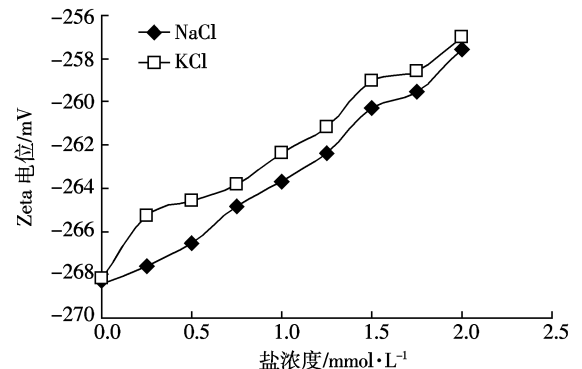


图 5 钠、钾离子对蒙脱石电位的影响

Figure 5 Effect of Na^+ and K^+ on the potential of montmorillonite

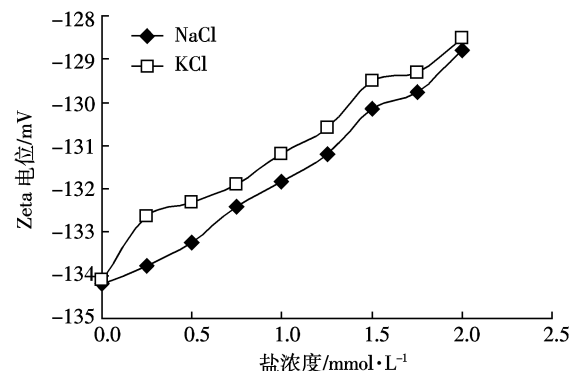


图 6 钠、钾离子对凹凸棒土电位的影响

Figure 6 Effect of Na^+ and K^+ on the potential of attapulgite

且绝对值变小。研究金属离子对矿物 Zeta 电位的影响,有助于从静电吸引角度探索钠、钾离子促进 Bt 蛋白吸附的机制。

2.3 钠、钾离子对吸附态 Bt 蛋白解吸的影响

采用去离子水作为解吸剂,分别对 3 种吸附条件下(不添加离子、添加钠离子、添加钾离子)制备的矿物-Bt 蛋白复合物进行解吸,结果见图 7 和图 8。

由图 7 可见,在蒙脱石吸附 Bt 蛋白过程中如果不添加钠离子和钾离子,则 Bt 蛋白的水解吸率为

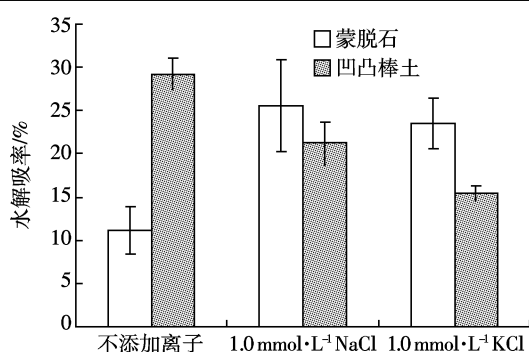


图 7 钠、钾离子对吸附态 Bt 蛋白解吸率的影响

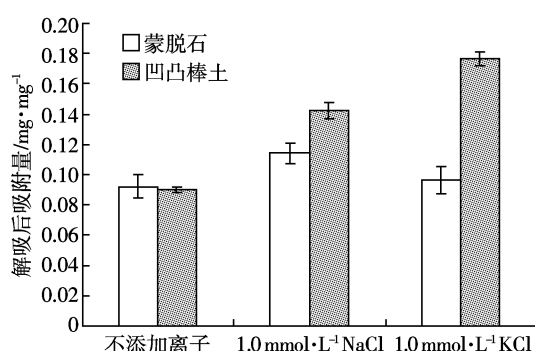
Figure 7 Effect of Na⁺ and K⁺ on the desorption percentage of adsorbed Bt protein

图 8 钠、钾离子对吸附态 Bt 蛋白解吸残留量的影响

Figure 8 Effect of Na⁺ and K⁺ on the residual amount of adsorbed Bt protein after desorption

11.11%;若在吸附过程中添加 1.0 mmol·L⁻¹ 氯化钠或氯化钾时,则解吸率分别升至 25.56%和 23.60%。在凹凸棒土吸附 Bt 蛋白过程中,钠、钾离子的添加对 Bt 蛋白解吸率的影响趋势与蒙脱石相反。当无钠、钾离子添加时,Bt 蛋白的解吸率为 29.25%,而当添加 1.0 mmol·L⁻¹ 氯化钠或氯化钾时,解吸率分别降至 21.21%和 15.40%。

解吸后 Bt 蛋白在矿物表面的残留情况如图 8 所示。在 3 种吸附条件下(不添加离子、添加钠离子、添加钾离子)制备的蒙脱石-Bt 蛋白复合物,水解吸后 Bt 蛋白的残留量分别为 0.092、0.114 mg·mg⁻¹ 和 0.096 mg·mg⁻¹,彼此之间差别不大;而凹凸棒土-Bt 蛋白复合物经水解吸后,Bt 蛋白的残留量分别为 0.090、0.142 mg·mg⁻¹ 和 0.177 mg·mg⁻¹。由此可见,钠、钾离子的添加不仅使 Bt 蛋白在凹凸棒土表面的吸附量增加,同时使解吸后的残留量增加。

3 讨论

吸附平衡体系 pH 值与土壤矿物的理化性质有

密切关系,当吸附体系的 pH 值大于矿物等电点时,矿物表面带负电荷,反之,矿物表面带正电荷。Sander 等^[12]从等电点变化的角度出发,推测静电吸引是氧化硅吸附 Bt 蛋白的驱动力。本实验所采用的 Bt 蛋白等电点约为 5.5^[13],吸附体系的 pH 值为 8.0,由于体系 pH>5.5,Bt 蛋白分子中的氨基基团脱去质子,从而使蛋白质分子带负电荷。Zeta 电位的测试结果表明,吸附体系中蒙脱石和凹凸棒土两种矿物表面均带负电荷,因此 Bt 蛋白分子与矿物粒子之间存在电荷斥力,且斥力越大,吸附量越小。随着钠、钾离子的加入,矿物表面负电荷密度逐渐减小,导致 Bt 蛋白分子与矿物粒子之间的斥力减弱,促进了 Bt 蛋白在矿物上的吸附。研究发现,钾离子对 Bt 蛋白吸附的促进作用强于钠离子,这可能与土壤胶体对钾离子的吸附能力大于钠离子有关^[14]。DNA 可以通过与 Na⁺或 K⁺形成盐桥的方式与土壤胶体吸附^[14],本研究中发现,Na⁺或 K⁺虽然可以促进 Bt 蛋白的吸附,但 Bt 蛋白的吸附强度与矿物类型有关,其中 Bt 蛋白与蒙脱石的吸附强度较弱,容易被水解吸,而 Bt 蛋白与凹凸棒土的吸附比较牢固,不易被水解吸下来。因此,有关 Bt 蛋白与矿物表面的结合机制,尚有待于进一步深入研究。

4 结论

Bt 蛋白在蒙脱石和凹凸棒土表面的等温吸附曲线符合 Langmuir 方程($R^2>0.96$)。随着钠离子和钾离子的添加 (0~2 mmol·L⁻¹),Bt 蛋白的吸附量逐渐增加,但等温吸附曲线的形状未发生改变。吸附体系中矿物的 Zeta 电位呈现负值,随钠、钾离子的添加 Zeta 电位值升高,推测钠、钾离子对 Bt 蛋白吸附的促进作用是通过减小电荷斥力来实现的。在蒙脱石吸附 Bt 蛋白过程中添加钠、钾离子可使 Bt 蛋白的水解吸率升高,但解吸后的残留量变化不大;在凹凸棒土吸附 Bt 蛋白过程中添加钠、钾离子可使 Bt 蛋白的水解吸率减小,且解吸后的残留量增加。

参考文献:

- [1] Brar S K, Verma M, Tyagi R D, et al. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 323-342.
- [2] Saxena D, Flares S, Stotzky G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34: 133-137.
- [3] Miethling-Graff R, Dockhorn S, Tebbe C C. Release of the recombinant Cry3Bb1 protein of Bt maize MON88017 into field soil and detection of

- effects on the diversity of rhizosphere bacteria[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2010, 46(1):41–48.
- [4] 周学永, 刘 宁, 赵 曼, 等. 转 Bt 基因作物释放杀虫晶体蛋白对土壤生态安全的影响[J]. *遗传*, 2011, 33(5):443–448.
- ZHOU Xue-yong, LIU Ning, ZHAO Man, et al. Advances in effects of insecticidal crystal proteins released from transgenic Bt crops on soil ecology[J]. *Hereditas*, 2011, 33(5):443–448.
- [5] Zhou X, Huang Q, Chen S, et al. Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and red soil[J]. *Applied Clay Science*, 2005, 30(2):87–93.
- [6] Fiorito T M, Icoz I, Stotzky G. Adsorption and binding of the transgenic plant proteins, human serum albumin, β -glucuronidase, and Cry3Bb1, on montmorillonite and kaolinite; microbial utilization and enzymatic activity of free and clay-bound proteins[J]. *Applied Clay Science*, 2008, 39(3–4):142–150.
- [7] 周学永, 陈守文, 吴新世, 等. 苏云金芽孢杆菌原毒素在蒙脱石上的吸附特性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(4):992–996.
- ZHOU Xue-yong, CHEN Shou-wen, WU Xin-shi, et al. Adsorption characteristics of the protoxin of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite particles[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(4):992–996.
- [8] ZHOU Xue-yong, LIU Ning, GAO Jian-bao, et al. Adsorption thermodynamics of toxin (65 kDa) and protoxin (130 kDa) from *Bacillus thuringiensis* by several minerals[J]. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 2011, 9:A5.
- [9] Madliger M, Gasser C A, Schwarzenbach R P, et al. Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to silica particles: Effects on transport and bioactivity[J]. *Environmental Science Technology*, 2011, 45(10):4377–4384.
- [10] Fu Q, Hu H, Chen S, et al. Adsorption of insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by some Chinese soils: Effects of organic acid ligands addition[J]. *Plant Soil*, 2007, 296:35–41.
- [11] 周学永, 陈守文, 孙 宇, 等. 由苏云金芽孢杆菌胞晶混合物直接提取原毒素的方法[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(2):535–536.
- ZHOU Xue-yong, CHEN Shou-wen, SUN Yu, et al. Extraction of protoxin of *Bacillus thuringiensis* directly from the mixtures of spores and parasporal crystals[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(2):535–536.
- [12] Sander M, Madliger M, Schwarzenbach R. Adsorption of transgenic insecticidal Cry1Ab protein to SiO₂. 1: Forces driving adsorption [J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44:8870–8876.
- [13] Keeton T P, Bulla L A J. Ligand specificity and affinity of BTR1, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63:3419–3425.
- [14] 王代长, 王慎阳, 蒋 新, 等. 可变电荷与恒电荷土壤胶体对 DNA 吸附与解吸特征[J]. *环境科学*, 2009, 30(9):2761–2766.
- WANG Dai-zhang, WANG Shen-yang, JIANG Xin, et al. Characteristics of DNA adsorption and desorption in variable and constant charge soil colloids[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(9):2761–2766.