

# 利用 SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳分析法測定蘇力菌產品中殺蟲結晶蛋白含量之研究

段淑人、高穗生、宣詩玲

台灣省農業藥物毒物試驗所生物藥劑系

(接受日期: 民國 82 年 11 月 30 日)

## 摘 要

段淑人、高穗生、宣詩玲 1993 利用 SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳分析法測定蘇力菌產品中殺蟲結晶蛋白含量之研究 植保會刊 35:139-148.

利用電泳分析法測定蘇力菌商品中毒蛋白之含量，試驗結果顯示，檢驗樣品經含微量 EDTA 之高鹽緩衝液懸浮處理後，再進行 10% 聚丙稀醯胺分離膠體電泳分析並以苦抹藍 CBR 染色後，利用穿透式電泳密度測定儀配合電腦套裝軟體之分析，可精確測得產品主成份之含量。並藉由標準劑之比對可估算商品之相對力價。此種生化分析法較傳統生物檢定法更為簡便、省時省力且精確性高、再現性良好，可確實反映出商品主成份之種類與其含量之多寡。經由電泳分析法檢測之商品其相對力價與標示力價符合率甚高 (91.5 ~ 98.9%) ；而與酵素聯結免疫吸附檢定法之結果符合率亦高 (98.2 ~ 106.1%)。唯少數商品測試發現，上述二法與生物檢定法之間有差距較大之高估現象，推測其原因可能係生化分析法所測得之結晶蛋白含量同時包括有殺蟲活性及無殺蟲活性蛋白質，導致估算含量偏高。此技術適用於蘇力菌製劑中，新產品主成份含量之常規監測及工廠品質管制之參考，而市售產品之抽驗則需配合生物檢定結果相互印證，才能更正確地判定產品之優劣。

(關鍵字：蘇力菌、殺蟲結晶蛋白質、電泳分析法、酵素聯結免疫吸附檢定法、生物檢定法、力價)

## 前 言

蘇力菌係目前本省使用最廣之微生物殺蟲劑，其殺蟲活性乃源於標的害蟲幼蟲攝入側孢晶體後經鹼性腸液及酵素之作用，使晶體分解成具毒性之毒素 (Toxin)，造成中腸穿孔，破壞細胞滲透壓及胸腔之酸

鹼值，進而導致麻痺死亡<sup>(8)</sup>。然而不同品系之菌株所含有之原生質體載附之毒蛋白基因不同，因此產生之毒蛋白種類與含量亦不相同<sup>(4,15,16)</sup>，而其所表現之殺蟲活性與寄主範圍也有很大之差異<sup>(3,11,14)</sup>。由於蘇力菌之殺蟲效果與其側孢晶體中毒蛋白之含量有直接正相關<sup>(11)</sup>，故該類產品殺

蟲活性之高低及品質之優劣，可藉由其特定毒蛋白之含量多寡來決定<sup>(5)</sup>，所以美國環境保護署主張除以生物檢定法訂出蘇力菌國際單位 IU/mg 外，尚可以含主成份殺蟲毒蛋白之重量百分比 (% a.i.) 來標示商品之成份，並以電泳分析法、免疫法或色層分析法來測定主成份含量<sup>(17)</sup>。Chak and Young<sup>(6)</sup> 利用 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 之蛋白質圖譜電泳分析法篩選台灣本土含殺蟲毒蛋白之蘇力菌菌株。Brussock 和 Currier<sup>(5)</sup> 亦於 1990 年利用 SDS-PAGE 之方法分析並定量不同蘇力菌商品中主成份毒蛋白之含量，以迅速監測醱酵及製劑過程中商品品質之好壞，其精確性及再現性均高，且主成份含量之多寡與生物檢定之結果可相互配合，而此法與利用酵素聯結免疫吸附檢定法 (ELISA) 監測蘇力菌製劑中毒蛋白之含量<sup>(10)</sup> 有異曲同工之妙。羅等<sup>(2)</sup> 亦表示在許多定量毒蛋白含量之方法中，ELISA 檢定技術之靈敏度高，專一性強且操作簡便，適用於蘇力菌製劑產品質量的常規檢測。由於 SDS-PAGE 和 ELISA 二法除了以上所述各項優點外，更可克服傳統生物檢定法費時費工之缺點，而可快速得到精確的結果。本所鑑於農藥管制工作之職責所在，乃進一步於本所建立此二生化法，期能利用 SDS-PAGE 分析法及 ELISA 檢定法，測定蘇力菌商品中主成份毒蛋白之種類及含量，以提供日後農業主管單位執行蘇力菌製劑申請登記及市售商品品質管制之參考。本文旨在報告 SDS-PAGE 分析法。

## 材料與方法

### SDSPAGE 膠體電泳分析法

#### 1. 菌體之培養及結晶蛋白之純化：

利用 CHES medium<sup>(7)</sup> 於 30 °C 振盪培養蘇力菌 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) (HD-1-S-1980) 菌體，48 小時後，離心 15 分鐘 (Hitachi RPR12-2,

10krpm) 取沈澱菌塊，水洗三次後加無菌水懸浮並以超音波振盪器 (VIBRA CELL S&M, 20% output) 擊碎三次，每次一分半鐘，打破菌體細胞後，再以糖密度梯度 (67%, 72%, 79%) 離心 14 小時 (Hitachi, RPR28SA, 25 krpm, 4 °C) 取得晶體，經 SDS-PAGE (7.5%, 60V, 15 hrs, 4 °C) 分離出 Btk 亞種之原毒素 CryIA(131-133 kD)，經切割該條膠片後再以 ISCO electroelutor/concentrator 進行蛋白質溶離 (3W, 4 hrs, 4 °C)，溶出之蛋白質以 PBS buffer, pH7.2，透析三次後，蛋白質定性 (SDS-PAGE mini gel, 150V, 45 min) 及利用 BCA protein assay reagent 定量 (Spectrophotometer absorbance 562 nm)，以確定其為所要之蛋白質及濃度，並分裝冷凍備用。

#### 2. 蘇力菌產品毒蛋白之抽取：

蘇力菌產品分別採用四種不同前處理之方式進行主成份毒蛋白之抽取：

(1) 蘇力菌產品定量溶於含 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 之強鹼溶液 (pH12) 中，於攝氏 28 度振盪 (HOTTECH, 703R, 300 rpm) 16 小時，而後離心 (KUBOTA KM-15200, 8,000 rpm)，吸取上清液樣加入等量 2X sample buffer，煮沸 5 分鐘進行 SDS-PAGE 分析。

(2) 不經任何其他前處理，直接稱取蘇力菌商品，加入等量 2X sample buffer，煮沸 5 分鐘進行 SDS-PAGE 分析。

(3) 取蘇力菌產品溶於無菌水中，以超音波擊碎機 (VIBRA CELL S&M, 20% output) 處理三分鐘，再吸取懸浮液 100 μl，並加入等量 2X sample buffer，煮沸 5 分鐘即可進行 SDS-PAGE 分析。

(4) 取 50 毫克之蘇力菌商品溶於 1 毫升溶液 (2M NaCl, 10 mM EDTA) 中，以 15,000rpm (KUBOTA KM-15200)

離心二分鐘，取沈澱物以 10 mM EDTA 再懸浮，並以 15,000 rpm (KUBOTA KM-15200) 離心二分鐘後，取沈澱物溶於 50  $\mu$ l 10 mM EDTA，加入等量 2X sample buffer，煮沸 5 分鐘即可進行 SDS-PAGE 電泳分析。

### 3. SDS 膠體電泳分析法：

參考 Laemmli<sup>(13)</sup> 之方法，配製 4% stacking gel 及 10% resolving gel，用 BIO-RAD Mini-PROTEAN II (0.75 mm spacers) 及 20 mA 之電流進行電泳分析，而後以 0.2% Coomassie Brilliant Blue R 染色，再以 25% 甲醇及 10% 醋酸褪染，以塑膠膜封片陰乾備用。

### 4. 密度測定儀定量法：

經染色褪色後之電泳膠片，利用電泳密度測定儀 (BIO-RAD Model 620 CCD Densitometer) 以 600 nm 波長之光源掃描膠片，所得之吸光值再以 1-D Analyst/Macintosh Data Analysis Software 套裝軟體分析積分數值，求出 CryIA 標準直線迴歸方程式，並將樣品標準劑與樣品之毒蛋白吸光值代入方程式，求出毒蛋白含量及樣品相對力價。

### 5. 樣品結晶蛋白含量百分比計算：

換算公式：

$$\% \text{ toxin protein} = \frac{\mu\text{g toxin from SD curve}}{\mu\text{l sample loaded}} \times \frac{\text{dilu. factor}}{\mu\text{g}/\mu\text{l of stock}} \times 100\%$$

### 6. 商品相對力價之計算：

樣品相對力價 (IU/mg) = (樣品毒蛋白含量  $\div$  標準劑毒蛋白含量)  $\times$  標準品力價  
**酵素聯結免疫吸附檢定法<sup>(1)</sup>**

由前所得之毒蛋白為抗原 (Antigen) 以皮下多處注射法免疫紐西蘭白兔 (0.5 ml 0.2 mg/ml CryIA + 0.5 ml Freund's Adjuvant)，製備特異性高的多源抗體。取蘇

力菌產品，懸浮於 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，0.02% Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub>，pH12 之鹼性緩衝溶液中，在 28  $^{\circ}$ C 振盪 4 小時 (HOTTECH 703R, 300 rpm) 後離心 13,000  $\times$  g 15 分鐘取上清液，並稀釋成不同濃度進行 ELISA 試驗。經由標準劑 HD-1-S-1980 之比對換算出樣品之相對力價。

### 生物檢定法<sup>(12)</sup>

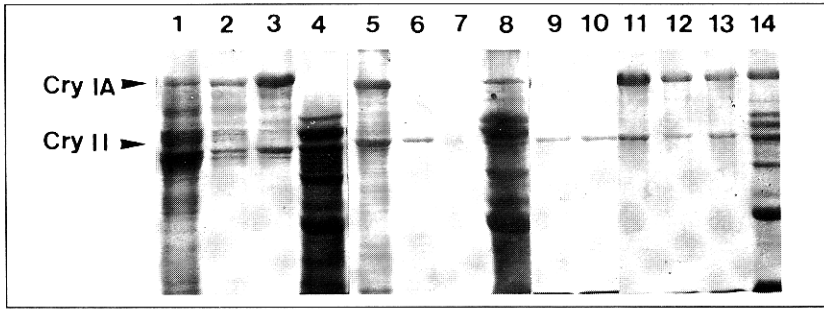
以小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 三齡初幼蟲為供試昆蟲，以噴藥塔 (Potter spray tower, Burkard<sup>®</sup>) 噴灑 (at 5psi) 定藥量之蘇力菌殺蟲劑稀釋液於新鮮無毒定面積之甘藍菜葉片，待風乾後，餵食予供試昆蟲，記錄幼蟲 72 小時內之死亡率，經 Abbott Formula 校正後，以 Probit Analysis<sup>(9)</sup> 計算其半致死濃度 (LC<sub>50</sub>)，並與標準劑比較，估算測試藥劑之力價。

## 結果與討論

### SDS-PAGE 分析法

#### 1. 蘇力菌商品主成份毒蛋白 CryIA 抽取方法之建立：

於本試驗中曾嘗試以不同方法來抽取蘇力菌商品中之主成份 (毒蛋白 CryIA)，最初以 0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH12 之鹼性溶液，於 28  $^{\circ}$ C 下猛烈震盪 16 小時，期能將商品中主成份毒蛋白鹼溶出來，結果部份商品之鹼溶效果很差，其 CryIA (131-133kD) 無法自膠體電泳中完全顯現，而消化成連續之小分子蛋白質，此與 Brussock and Currier<sup>(5)</sup> 所做鹼溶之效果迥異，後又以 sample buffer 直接煮沸樣品，期能減少商品中蛋白質水解酵素之分解作用，卻造成部分商品之主成分完全不顯現，繼又以超音波振盪打碎機企圖使毒蛋白自製劑中釋出，結果均無法獲得預期之效果，以上各種方法均會使得部分商品之 CryIA 蛋白質消失、表現不完全或分解成許多小分子蛋白質 (圖一)，造成檢測樣品主成份含



圖一、以不同方法處理蘇力菌商品其主成份毒蛋白之電泳圖譜。

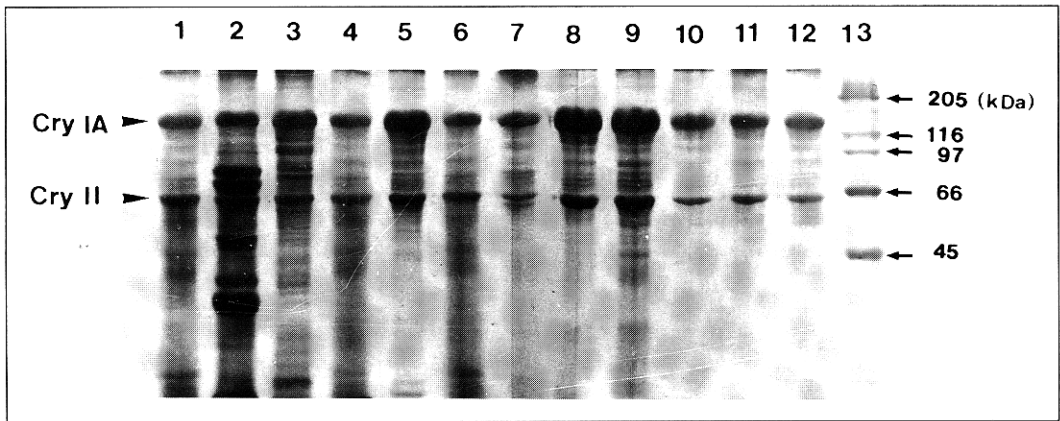
Fig. 1. SDS-PAGE of Btk preparations by different pre-treatments.

Lane 1-4: Bt prep. WP-C, E, D, A. treated with 0.2% Na CO<sub>3</sub>, pH12.

Lane 5-8: Bt prep. WP-C, E, D, A. boiled in sample buffer.

Lane 9,10: Bt prep. WP-B and its standard sonicated by sonicator.

Lane 11-14: Bt prep. WP-C, E, D, A. treated with 2M NaCl、10mM EDTA.



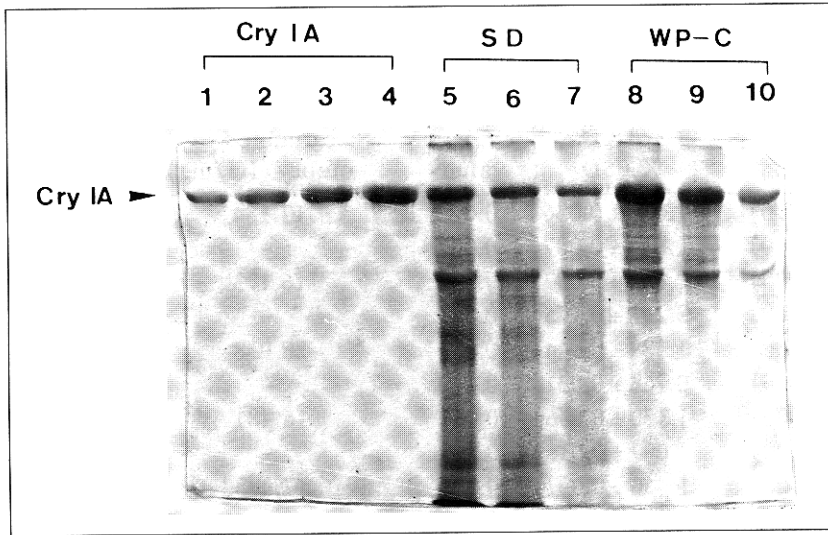
圖二、數種蘇力菌商品以2M NaCl、10mM EDTA處理後表現之毒蛋白電泳圖譜

Fig. 2. SDS-PAGE of Btk preparations pre-treated with 2M NaCl, 10mM EDTA.

Lane 1-12 contain twelve different wettable powders:

- Lane 1: WP-A standard,
- 2: WP-A,
- 3: WP-A technical conc.,
- 4: WP-C standard,
- 5: WP-C,
- 6: WP-F standard,
- 7: WP-F,
- 8: WP-B standard,
- 9: WP-B,
- 10: WP-E,
- 11: WP-D,
- 12: WP-D standard.

Lane 13: Protein markers.



圖三、以 SDS-PAGE 定量蘇力菌商品中主成份毒蛋白

Fig. 3. Quantification of Cry IA protein in Btk preparations by SDS-PAGE assay.

Lane 1-4: Cry IA 1 to 4  $\mu\text{g}$  loaded in each lane.

Lane 5-7: HD-1-S-1980 8, 6, and 4  $\mu\text{l}$  loaded respectively.

Lane 8-10: Bt product WP-C 6, 4, and 2  $\mu\text{l}$  loaded respectively.

表一、利用電泳密度測定儀定量蘇力菌商品主成份含量之標準換算模式

Table 1. Example of a typical densitometric scan report and the calculated % CryIA of Btk preparations <sup>a)</sup>

Lane	Sample	Input	Peak Area <sup>b)</sup>	Standare curve <sup>c)</sup> /CryIA <sup>c)</sup>	cal.%
1	CryIA	4 $\mu\text{g}$	3.094	y = 0.7716x - 0.0605 r = 0.996	
2	CryIA	3 $\mu\text{g}$	2.198		
3	CryIA	2 $\mu\text{g}$	1.391		
4	CryIA	1 $\mu\text{g}$	0.791		
					Cry IA mean Cry IA $\pm$ SD
5	HD-1-S-1980	8 $\mu\text{l}$	2.220	0.739	
6	HD-1-S-1980	6 $\mu\text{l}$	1.709	0.765	0.768 $\pm$ 0.031
7	HD-1-s-1980	4 $\mu\text{l}$	1.174	0.799	CV $\pm$ 0.040
8	WP-C <sup>d)</sup>	6 $\mu\text{l}$	3.147	1.386	
9	WP-C	4 $\mu\text{l}$	2.018	1.347	1.389 $\pm$ 0.044
10	WP-C	2 $\mu\text{l}$	1.046	1.434	CV = 0.031

<sup>a)</sup> The scan report detailed above is from a densitometer (Bio-Rad Model 620)

<sup>b)</sup> Peak Area : OD  $\times$  mm

<sup>c)</sup> Cry IA: Protoxin Cry IA(131-133 KD protein), purified from Btk strain HD-1

<sup>d)</sup> WP= wettable powder

表二、利用 SDS 電泳分析法測試數種蘇力菌商品主成份含量及相對力價之比較

Table 2. Comparison of potency estimated by SDS-PAGE assay with labeled potency for several Btk preparations

Labeled* potency (IU/mg)	Cry IA (%) X ± SD	CV value	estimated otency (IU/mg)	correspondence % labeled/estimated
WP-A (16,000)	1.626 ± 0.036	0.022	17,184	93.1
A-SD (16,000)	1.514 ± 0.087	0.057	—	—
WP-B (16,000)	2.801 ± 0.087	0.031	16,173	98.9
B-SD (18,700)	3.241 ± 0.175	0.054	—	—
WP-C (28,000)	1.389 ± 0.044	0.031	28,938	96.8
C-SD (16,000)	0.768 ± 0.031	0.040	—	—
WP-D (16,000)	1.130 ± 0.046	0.041	16,481	97.1
D-SD (16,000)	1.097 ± 0.015	0.014	—	—
WP-E (16,000)	1.450 ± 0.037	0.026	17,483	91.5
E-SD (16,000)	1.327 ± 0.070	0.053	—	—
WP-F (16,000)	1.212 ± 0.038	0.031	16,790	95.3
F-SD (16,000)	1.155 ± 0.090	0.078	—	—

\*: A-SD, B-SD, C-SD, D-SD, E-SD, F-SD stand for standards of different Btk preparations respectively.

表三、利用 SDS 膠體電泳分析法及酵素聯結免疫吸附檢定法測定蘇力菌商品相對力價與生物檢定法估算力價之比較

Table 3. Comparison of potency as determined by SDS-PAGE, ELISA, and bioassay for four Btk preparations

Labeled potency (IU/mg)	Bioassay IU/mg <sup>1)</sup> X ± SD (CV)	Correspondence % SDSPAGE/bioassay	Correspondence % <sup>1)</sup> ELISA/bioassay
WP-C (28,000)	23,429 ± 3,030 (0.129)	123.52	125.77
WP-D (16,000)	15,180 ± 1,283 (0.085)	108.57	110.4
WP-E (16,000)	15,453 ± 779 (0.050)	113.13	106.61
WP-F (16,000)	15,307 ± 950 (0.062)	109.69	111.64

<sup>1)</sup> Referred to Tuan *et al.* 1993. Plant Prot. Bull. 35:70-78.

Abbott Laboratories 之方法，以 2 M NaCl、10 mM EDTA 溶液懸浮離心之處理，可使得目前所檢測之 Btk(HD-1) 商品中主成分 CryIA 表現良好，如圖二。其主要蛋白質能清晰表現出來之原因，可能是由於高濃度之鹽溶液可抑制蘇力菌產品中多種蛋白分解酵素之分解作用，使得

CryIA 蛋白不被分解而完全表現出來，加上 EDTA 可去除小蛋白質之雜訊干擾，而避免影響主要毒蛋白之判讀，故選定此懸浮液做為蘇力菌商品進行 SDS-PAGE 分析之前處理。

2. 利用 SDS-PAGE 分析蘇力菌商品主成份之標準法之建立

以 Btk HD-1 之純化結晶蛋白 CryIA 1  $\mu\text{g}$ 、2  $\mu\text{g}$ 、3  $\mu\text{g}$  及 4  $\mu\text{g}$  進行 SDS-PAGE 分析 (圖三), 再以 densitometer 測得吸光值 (OD), 經電腦軟體換算 CryIA 蛋白質含量 ( $\mu\text{g}$ ) 與吸光值之 peak area 值間之直線迴歸方程式  $y = 0.7716x - 0.0605$ ,  $r = 0.996$  (表一)。並將 HD-1-S-1980 及商品不同 loading volume 所得之 Peak Area 值代入方程式, 求得其 CryIA 蛋白質含量百分比, 大致而言, 經與各藥劑之標準劑比對後, 商品所測得之相對力價與其標示力價相當吻合, 其符合率高達 91.5 ~ 98.9% 之間 (表二)。

#### SDS-PAGE 分析法、酵素聯結免疫吸附檢定法與生物檢定法之相關性

取蘇力菌四種藥劑, 同時進行 SDS-PAGE、ELISA 檢定法, 並與生物檢定所測之力價相互比較, 得知以電泳分析或酵素檢定法所得之相對力價均較實際生物檢定所得之力價為高, 高出 6.6 ~ 25.8% 之多 (表三)。探究其原因, 可能由於 SDS-PAGE 檢測法只能辨識樣品主成份中毒蛋白分子量之大小; 而 ELISA 法也只能辨識檢測樣品中蛋白質之抗原性, 二者均無法區分蛋白質之活性, 因此檢測之毒蛋白通常包括有殺蟲活性及無活性者, 造成高估

檢測樣品力價之結果。但此法再現性極高, 且操作簡便、省時, 故應為製劑過程中品質管制之好方法, 或可利用於一般蘇力菌菌株生化篩選步驟。當然在利用此法進行一般蘇力菌商品抽測時, 最好能配合生物檢定藥效力價之數值斟酌判斷, 方為肯定之檢驗結果。

#### SDS-PAGE 分析法與酵素聯結免疫吸附檢定法之相關性

SDS-PAGE 與 ELISA 均為精確且簡便之定性定量生化法, 其間樣品處理方式雖不相同, 但大部份檢測之商品經此二法分別測試後, 其間結果符合率相當高, 約為 98.2-106.1% 之間 (表四)。此部份之結果與美國 Ecogen 公司 Brussock and Currier<sup>(5)</sup> 及 Groat 等人<sup>(10)</sup> 所做相似。SDS-PAGE 分析法係一經濟又簡便之蛋白質測定法, 可快速而精確地測定出樣品中所含蛋白質多胜鏈之種類, 利用密度測定儀可估計特定蛋白質之含量, 而 ELISA 檢定法具高靈敏度且專一性強, 可確認蘇力菌商品品系及主成份種類。綜合此二種生化分析法之優點如下: 1. 可迅速精確地測得主成份含量百分比。2. 檢驗過程中只需少許人工且節省實驗空間, 操作簡便, 可同時處理大量檢驗樣品。3. 可避免生物檢定時

表四、SDS 膠體電泳分析法與酵素聯結免疫吸附檢定法之符合率

Table 4. Correspondence between SDS-PAGE and ELISA assay for four Btk preparations<sup>1)</sup>

Labeled potency (IU/mg)	SDSPAGE potency X $\pm$ SD (CV)	ELISA potency <sup>2)</sup> X $\pm$ SD (CV)	Correspondence (%) SDSPAGE/ELISA
WP-C (28,000)	28,938 $\pm$ 917 (0.031)	29,466 $\pm$ 2,657 (0.090)	98.21
WP-D (16,000)	16,481 $\pm$ 671 (0.041)	16,765 $\pm$ 1,075 (0.064)	98.31
WP-E (16,000)	17,483 $\pm$ 446 (0.026)	16,475 $\pm$ 550 (0.033)	106.12
WP-F (16,000)	16,790 $\pm$ 526 (0.031)	17,089 $\pm$ 1,456 (0.085)	98.25

1) Estimated based on HD-1-S-1980 standard

2) Referred to Tuan *et al.* 1993. Plant Prot. Bull. 35:70-78.

因供試蟲種品系之不同而導致對藥劑之感受性有明顯差異。且生物檢定之變異性較大，以致於檢測之力價無法與原廠商所提供者做一比較，而生化分析法之穩定性及再現性均較生物檢定法為高，故可比較於不同時間地點及操作人員所做之結果。而唯一之缺點乃為生化法無法區分有殺蟲活性及無殺蟲活性之蛋白質，故所測得之數值乃為生化數據，並不能完全代表蘇力菌商品生物活性之高低，一般而言，會高估相對力價。故適用於蘇力菌商品製劑過程中品質管制及常規檢測工作，然若能與生物檢定法所測出之結果相對應，更能確實指示出商品力價之高低。且進行檢測時必須以該商品之標準劑，作為估算力價之對照標準，方能正確得知檢測商品之力價。同時，市售蘇力菌產品之抽驗則需配合生物檢定結果相互印證，才能正確判定產品之優劣。

## 謝 辭

本試驗之進行期間承蒙中興大學昆蟲所侯豐男教授及陽明醫學院生化所翟建富教授多方協助及指導，謹此申謝。

## 引用文獻

1. 段淑人、宣詩玲、高穗生 1993 利用酵素聯結免疫吸附檢定法測定蘇力菌商品力價之研究。植物保護會刊 35: 70-78.
2. 羅紹彬、閻建平、戴順英、張用梅、劉娥英、胡名瑞 1990 測定蘇云金杆菌制劑伴孢晶体蛋白指示毒力效价的方法。生物防治通報 6(2):85-87.
3. Aronson, A. I., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50:1-24.
4. Bulla, L. A., L. J. Kramer, D. J. Cox, B. L. Davison and G. L. Lookhard. 1981. Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 256:3000-3004.
5. Brussock, S. M., and T. C. Currier. 1990. Use of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to quantify *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. pp. 78-87. In Hickley, L. A. and W. L. Fitch. (eds.), Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*. ACS symposium series No. 432. 148pp.
6. Chak, K. F., and Y. M. Young. 1990. Characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Taiwan. Pro. Natl. Sci. Council. B. ROC. 14:175-182.
7. Chestukhina, G. G., I. A. Zalunin, L. I. Kostina, T. S. Kotova, S. P. Kattrukha and V. M. Stepanov. 1980. Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. J. 187:457-465.
8. Endo, Y., and J. Nishiitsutsuji. 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol. 36:90-103.
9. Finey, D. J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University.
10. Groat, R. G., J. W. Mattison and E. J. French. 1990. Quantitative immunoassay of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* products. pp. 88-97. In Hickley, L. A., and W. L. Fitch. eds. Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*. ACS symposium series No. 432. 148pp.

11. Hofte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242-255.
12. Kao, S. S., and S. J. Tuan. 1992. *Bacillus thuringiensis* potency bioassay against *Plutella xylostella* larvae. p.276. Proceedings XIX International congress of Entomology. Beijing, China. June 28 - July 4, 1992.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685.
14. Lecadet, M. M., and D. Martouret. 1987. Host specificity of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin toward Lepidopteran species: *Spodoptera littoralis* Bdv. and *Pieris brassicae* L. J. Invertebr. Pathol. 49:37-48.
15. Pang, A. S. D., and B. Mathieson. 1991. Peptide mapping of different *Bacillus thuringiensis* toxin gene products by CNBr cleavage in SDS-PAGE gels. J. Invertebr. Pathol. 57:82-93.
16. Tyrell, D. J., L. A. Bulla, Jr., R. E. Andrews, Jr., K. J. Kramer, L. I. Davidson and P. Nordin. 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. J. Bacteriol. 145:1052-1062.
17. United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington D. C. 1988. Registration standard for the reregistration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient, Case No. 0247. 48pp.

### ABSTRACT

**Tuan, S. J., Kao, S. S., and Hsuan, S. L. 1993. Use of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis to Quantify CryIA Protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cell Extracts. 35:139-148. (Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 41301, R.O.C.)**

The Cry IA protein content of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* preparations was quantified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Results show that this assay, which is relatively simple and quick to perform, can accurately and reproducibly estimate the ingredient and content of Btk preparations. In most instances, the estimated potency was in agreement with labeled potency (91.5-98.9%). There was also a high degree of agreement between SDS-PAGE and ELISA results (98.2-106.1%). However in comparison with bioassay the SDS-PAGE and ELISA

tended to overestimate the content of active ingredient in the test samples. It is suspected that both biochemical and immunochemical assays were failed to distinguish between active and inactive proteins in samples tested. However, these methods can be adopted to detect the active ingredient of Btk in the course of fermentation process. As for monitoring the shelf-life of Btk preparations, we suggest both chemical assays and bioassay are needed for correct interpretation of the results.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal crystalline protein, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assay, bioassay, international unit)