

# 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

段淑人、宣詩玲、高穗生

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6月30日)

## 摘 要

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 植保會刊 35：70-78.

蘇力菌庫斯塔基亞種微生物製劑殺蟲效力之高低，主要反映在製劑中結晶蛋白質含量之多寡。利用酵素聯結免疫吸附檢定法可快速且精確地測定出商品中側孢晶體蛋白質含量，經由標準劑之校正可估算商品力價。本研究採用專一性良好之多源抗體及間接酵素聯結免疫吸附檢定法建立標準曲線，所測商品之相對力價與其標示力價符合率均高(93.6~99.4%)，且與生物檢定結果亦多半相符合(89.6~98.8%)。得知酵素聯結免疫吸附檢定法操作簡便、專一性强、靈敏度高且再現性强，偵測效率較傳統式生物檢定法省時省工，並可避免生物檢定時因供試昆蟲品種對病原菌感受性差異，而導致藥劑力價估算不確實之虞。本法適用於蘇力菌產品製劑過程中之常規檢測工作，並可作為上市前蘇力菌商品品質管制之參考。

(關鍵字：蘇力菌、酵素聯結免疫吸附檢定法、抗原、多源抗體、殺蟲結晶蛋白質、力價)

## 緒 言

蘇力菌庫斯塔基亞種 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Btk) 是本省目前使用最廣泛之微生物殺蟲劑之一，係以側孢晶體之殺蟲結晶蛋白及內生孢子為主，加入保護劑、防腐劑、填充劑及界面活性劑等添加物所組成。在以往農業主管單位及國際間均係以生物檢定法測定其殺蟲效果與商品力價，而近年來美國環境保護署尚主張以含主成份之重量百分比(% a. i.) 來標示商品之成

份，並以免疫法、電泳分析法或色層分析法來測定主成份含量<sup>(12)</sup>。因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，故該類產品質量好壞，主要反映在製劑中毒蛋白的含量<sup>(1,11)</sup>。Andrews *et al.*<sup>(3)</sup> 即利用火箭式免疫電泳法 (Rocket immuno-electrophoresis) 偵測蘇力菌製劑中結晶蛋白之含量，而 Wie *et al.*<sup>(13)</sup> 首先以酵素聯結免疫吸附檢定法 (ELISA) 來偵測並定量分析 Btk 及 *B. t. israelensis* 亞種 (Bti) 菌液中所含之側孢晶體毒蛋白濃度。Smith & Ulrich<sup>(10)</sup> 指出

以ELISA方法來分析蘇力菌庫斯塔基亞種之醱酵產物中毒蛋白含量，其可靠性相當高。Wie *et al.*<sup>(14)</sup> 研究以pH12之鹼性緩衝液將蘇力菌商品中之毒蛋白溶解出來，並利用簡易直接之ELISA法快速、精確地定量商品中毒蛋白含量。美國Ecogen公司也利用ELISA做蘇力菌製劑過程中品質鑑定之快速檢定法<sup>(6)</sup>。羅等<sup>(2)</sup>亦表示在許多定量毒蛋白含量之方法中，尤以ELISA檢定技術，靈敏度高，專一性強且操作簡便，可用於蘇力菌製劑產品質量的常規檢測。同時沈等<sup>(1)</sup>也證明了利用ELISA方法測定樣品晶體蛋白含量的高低，可反映該樣品殺蟲毒效之大小。由於ELISA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<sup>(10)</sup>。故本研究擬於本省建立庫斯塔基亞種殺蟲結晶蛋白之ELISA檢定方法，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。

## 材料與方法

### 1. 蘇力菌側孢晶體之純化：

利用CHES medium<sup>(4)</sup>於30°C振盪(300 rpm)培養Btk之菌體，48小時後鏡檢菌體中是否有側孢晶體之形成，再以10 krpm之轉速離心菌液15分鐘(Hitachi RPR12-2)取沈澱菌塊，並以無菌水水洗三次，之後以少許緩衝液(10 mM Tris. Cl + 10 mM EDTA, pH 8.0)懸浮之，並利用超音波擊碎機(VIBRA CELL S & M, 20% output)擊碎三次，每次一分半鐘以打破菌體細胞使側孢晶體能釋出，又以不連續之蔗糖梯度(67%, 72%, 79%)經超高速離心25 krpm 14小時，4°C(Hitachi, RPR28SA)吸取72%與79%間之白色濁液，即為側孢晶體，再以無菌水水洗三次，最後以緩衝液(10 mM Tris. Cl + 10 mM EDTA, pH 8.0)懸浮保存於-20°C備用。

### 2. Cry IA蛋白抗原之製備：

取純化之側孢晶體與同體積二倍濃度之Sample buffer 混合煮沸三分鐘後，參考Laemmli (1970)<sup>(7)</sup>之方法，進行SDS-PAGE (

7.5%, 60 V, 15 hrs, 4°C)，並以0.2M KCl於4°C染20分鐘，切下分子量約為130~140 kD之白色凝膠帶，即為Cry IA毒蛋白，經切割該條膠片後再以Isco electroelutor/concentrator<sup>-</sup>進行蛋白質溶離(3W, 4 hrs, 4°C; electro-elution buffer: 1. Outer buffer: 40 mM Tris-acetate, pH 8.6; 2. Inner buffer: 10 mM Tris-acetate, pH8.6 + 1 mM EDTA + 0.1% SDS)，溶出之蛋白質以PBS緩衝液，pH 7.2透析三次，並做蛋白質定性(SDS-PAGE mini gel, 150V, 45 mins)及定量(Pierce BSA protein assay, Spectrophotometer absorbance 562 nm)，以確定其為所要之蛋白質及配製濃度，再分裝冷凍備用。

### 3. 特異性多源抗血清之製備：

由前所得之毒蛋白為抗原與乳化劑Freund's Adjuvant Complete (0.5 ml 0.2 mg/ml Cry IA + 0.5 ml 乳化劑)做完全乳化作用後，以皮下多處注射法免疫紐西蘭白兔，每隔二週一次(第二次起乳化劑採用Freund's Adjuvant Incomplete)，連續三次，於第三劑追加後第六天大量採血，其間於每次注射前均自兔子耳朵中央動脈抽取血液，裝於血清分離管中靜置30分鐘後，離心3,000轉，15分鐘。參考Ma *et al.*(1984)<sup>(8)</sup>及Ma & Ballerino (1988)<sup>(9)</sup>之方法以Indirect ELISA方法追蹤抗體力價產生曲線。以採取力價最高之抗Cry IA毒蛋白陽性血清冷凍備用。

### 4. 抗血清力價測試步驟：

①以Coating buffer (15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 35 mM NaHCO<sub>3</sub> + 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 9.6)稀釋Cry IA毒蛋白抗原，使濃度為2 μg/ml，培養於96孔聚苯乙烯凹孔板內(100 μl/well)，於4°C隔夜培養。

②棄卻①之抗原液、甩乾，並以溶於PBS之0.5%安佳脫脂奶粉懸浮液做Blocking，於室溫作用1小時(150 μl/well)。

③棄卻②甩乾並以0.05% PBS-Tween 20為洗滌液，利用自動洗盤機(SKATRON A/S MICROWASH II)清洗三次。

④加入各階段所採之抗Cry IA血清，係將血清以PBS做二倍連續稀釋(100倍至51200倍)，且以未免疫前所採陰性血清為對照組，於室溫培養1小時(100  $\mu$ l/well)。

⑤棄卻④用乾並以 PBS-Tween 為洗滌液，利用自動洗盤機清洗三次。

⑥加入5,000倍稀釋濃度之 Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 於室溫培養 1 小時(100  $\mu$ l/well)。

⑦棄卻⑥用乾並以 PBS-Tween 利用自動洗盤機清洗五次。

⑧加入0.1% PNPP/Substrate buffer (9.7% Diethanolamine + 0.01%  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  + 0.02%  $NaN_3$ , pH=9.8)(100  $\mu$ l/well)，於室溫呈色一小時後利用 Molecular Devices kinetic microplate reader Vmax 讀出波長405 nm時之吸光值，以比較兔子抗體力價產生情形，當抗體力價已上升至高峰時即可大量採血分離血清備用，否則仍需追加一劑。

#### 5. 抗血清專一性測試：

##### ①西方轉漬法(Western Blot)：

將Btk (HD-1)及Bti (IPS-82)鹼溶之菌液於SDS-PAGE電泳畢之膠體依順序和海綿、濾紙、硝化纖維紙組合好後，置入裝滿轉印緩衝液之轉印槽(BIO-RAD MINI PROTEAN II Cell)中，以100 V轉印2小時；取出硝化纖維紙以PBS緩衝液浸洗一次後再進行免疫染色。

##### ②免疫染色法：

硝化纖維紙以含1%脫脂奶粉之PBS於室溫作用30分鐘，PBST洗二次；將硝化纖維紙切成條狀分別與不同濃度的抗血清(anti-Btk Cry IA毒蛋白血清)於室溫反應60分鐘，以PBST洗四次；再與過氧化氫酶標示之山羊抗兔免疫球蛋白(GAR-Peroxidase)作用60分鐘，以PBST洗五次；加上過氧化氫酶受質呈色液(0.06% DAB, 0.03%  $H_2O_2$ , 50 mM Tris. Cl pH 7.6)，於室溫下反應至硝化纖維紙呈淡棕色，以水沖洗晾乾並觀察結果。

#### 6. 測試樣品前處理：

參考Wie *et al*, 1984年<sup>(14)</sup>樣品鹼溶處理方法，取100 mg蘇力菌產品使懸浮於10 ml之0.2%  $Na_2CO_3$  + 0.02%  $NaN_3$ ，pH 12之鹼性緩衝溶液中，在28°C振盪(300 rpm)4小時後，將樣品懸浮液以13,000g離心15分鐘，取上清液，並將其以Coating buffer作二倍連續稀釋以進行ELISA試驗。Indirect ELISA進行步驟：

①Coating不同濃度之純化結晶蛋白4°C隔夜培養(100  $\mu$ l/well)。

②棄卻①並以0.5%安佳脫脂奶粉做Blocking，室溫1小時(150  $\mu$ l/well)。

③棄卻②並以 PBS-Tween 利用自動洗盤機清洗三次。

④加入以 PBS 稀釋 200 倍之自製陽性血清溶液，於室溫培養 1 小時 (100  $\mu$ l/well)。

⑤棄卻④並以 PBS-Tween 利用自動洗盤機清洗三次。

⑥加入 Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 2,500 倍稀釋濃度，於室溫 1 小時 (100  $\mu$ l/well)。

⑦棄卻⑥並以 PBS-Tween 利用自動洗盤機清洗五次。

⑧加入0.1% PNPP/Substrate buffer，呈色一小時後以 Molecular Devices kinetic microplate reader Vmax判讀於波長405nm時之吸光值，以計算出OD值(y)與毒蛋白濃度(Log, x)之相關式 $y = a + bx$ 。

#### 7. 樣品晶體毒蛋白含量計算：

將標準劑HD-1-S-1980 (16,000 IU/mg) 及待測商品鹼溶蛋白不同稀釋濃度的ELISA試驗OD值，分別代入純化蛋白質標準相關式，換算出樣品中晶體蛋白之含量。

商品相對力價之計算：

$$\begin{aligned} & \text{樣品相對力價(IU/mg)} \\ & = (\text{樣品毒蛋白含量} \div \text{標準劑毒蛋白含量}) \\ & \quad \times \text{標準品力價} \end{aligned}$$

#### 8. 生物檢定：

以小菜蛾 (DBM, *Plutella xylostella*) 三齡初幼蟲為供試昆蟲，以噴藥塔 Potter

spray tower, Burkard)噴灑(5 psi)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>(5)</sup>計算其半致死濃度(LC50)，並與標準劑比較，估算測試藥劑之力價。

## 結果與討論

### 1. 間接ELISA法測定Cry IA毒蛋白含量

以 Btk(HD-1 品系, 3a3b 血清型)之純化 Cry IA 毒蛋白(131-133 kD)為抗原，以 Coating buffer 作二倍連續稀釋，經由 ELISA 方法測定吸光值與毒蛋白含量之關係(圖一)乃為二次曲線。其反應終點(endpoint)抗原之濃度為 15.6 ng/ml (0.0156 ppm)，靈敏度相當高，故此法實屬一精確之檢定法<sup>(13)</sup>。以其中五點經雙變數分析，得知蛋白質濃度(Log x)與吸光值(y)之直線迴歸方程式為： $y = 1.875 \text{Log} x - 2.129$ ,  $r = 0.996$ (表一)。在多次試驗中所有之直線迴歸相關係數均介於 0.992 至 0.999，可見此法之線性關係及再現性均良好。又以西方墨點法(Western blot)測得抗 Cry IA 之血清與 Cry II 蛋白質抗原無交互反應(cross reaction)，且 Btk Cry IA 之血清與 Bti 之 Cry IVA (134 kD)毒蛋白間亦無任何

交互反應(圖二)，故其專一性頗佳<sup>(14)</sup>。而利用此法進行毒蛋白之定量，其可信度極高，操作簡便又省時。除抗原於 4°C Coating 隔夜外，其餘操作步驟僅需 4 至 5 小時即可完成呈色定量反應，又可同時處理大量檢測樣品，較傳統生物檢定法需費時 4 至 7 天，又需較多之人力及空間，來得經濟有效<sup>(10)</sup>。由於 ELISA 反應主要是經由抗體與抗原之結合，再加上酵素之呈色反應後透過吸光值判讀換算蛋白質含量，故試驗進行時室溫高低波動之範圍及各步驟反應之時間等條件影響甚大，因此試驗條件之嚴格控制對試驗結果之再現性極為重要<sup>(1)</sup>。

### 2. 樣品結晶蛋白含量及相對力價之計算：

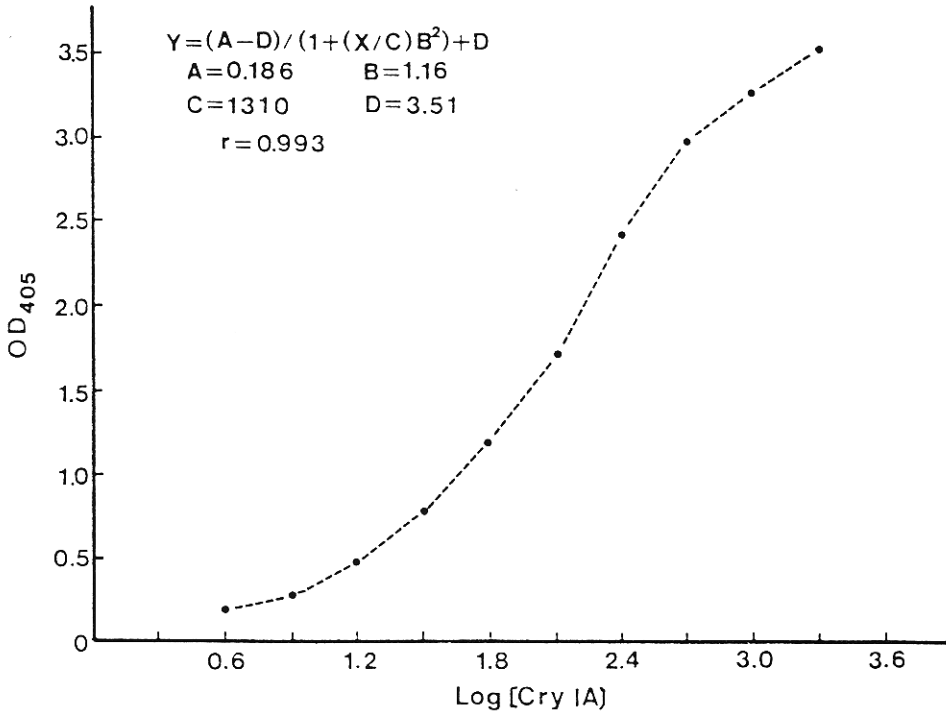
將標準劑 HD-1-S-1980 及六種蘇力菌商品可濕性粉劑：A劑(32,000 IU/mg)、B劑(28,000 IU/mg)、C劑(16,000 IU/mg)、D劑(16,000 IU/mg)、E劑(16,000 IU/mg)、F劑(16,000 IU/mg)，經鹼性溶液振盪處理 4 小時後離心取上清液，以二倍連續稀釋，做 ELISA 檢定。結果顯示標準劑中含 Cry IA 毒蛋白之量平均為 1.546%，而三個稀釋點之 CV 值為 0.068；經由公式換算得知六種不同製造商廠之蘇力菌商品中，除貯存較久之 E 劑外其餘商品之標示力價與 ELISA 檢測力價之符合率均頗高(93.6~99.4%)(表二、表三)。

表一、蘇力菌純化結晶蛋白間接酵素聯結免疫吸附檢定法檢測結果

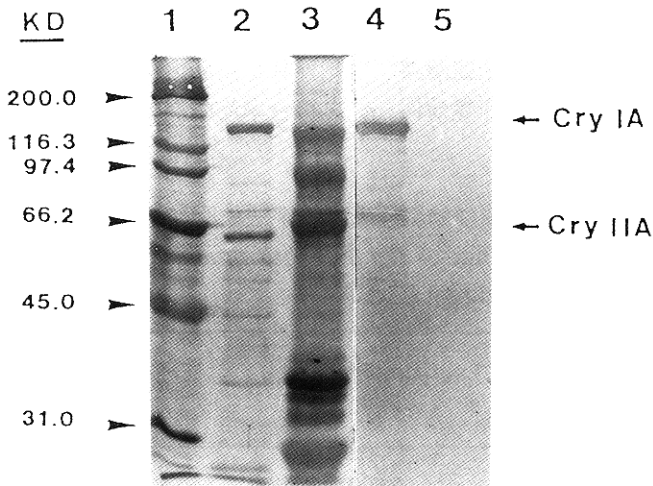
Table 1. The standard regression line of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry IA protein determined by indirect ELISA

Cry IA conc. (ng/ml)	Log [Cry IA conc.]	O.D. at 405 nm
500.00	2.699	2.970
250.00	2.398	2.405
125.00	2.097	1.720
62.50	1.796	1.176
31.25	1.495	0.772

Equation of regression line  $y = 1.875 \text{Log} x - 2.129$ ,  $r = 0.996$



圖一、利用間接酵素聯結免疫吸附檢定法測試結晶蛋白量與吸光之值之關係。  
 Fig. 1. Indirect ELISA standard curve using the rabbit antiserum to CryIA protein of Btk HD-1. (Data were fitted by analysis with computer software-Molecular Devices Vmax kinetic microplate reader).



圖二、利用西方轉漬法檢測抗CryIA血清之特異性。  
 Fig. 2. 10% SDS-PAGE (lane 1-3) and immunoblotting (lane 4,5) of cell extracts from Btk and Bti with antiserum raised against CryIA protein from Btk HD-1.  
 lane 1: Protein marker (Bio-Rad).  
 lane 2,4: Bt. subsp. *kurstaki* (HD-1).  
 lane 3,5: Bt. subsp. *israelensis* (IPS 82).

在不同次之ELISA檢定中所得各藥劑含毒蛋白之量均有不同程度之差異，若操作之室溫穩定且相同者，則試驗所得毒蛋白含量相仿，CV值亦小，再現性高，若兩次檢定操作溫度差距大時，則毒蛋白含量數值差異亦大，故每次檢定均需有標準劑做為校正值，比對後所得之相對力價則為穩定且具代表性之數值。

### 3. 生物檢定試驗與ELISA測試結果之相關性

六種蘇力菌商品同時進行ELISA檢定及生物檢定試驗，得知毒蛋白含量高者其殺蟲效力亦高。經由ELISA測得之商品相對力價與生物檢定法所測之小菜蛾力價間符合率頗高(表四)。且此二檢定法間存在一平行之相關性，其結果與沈等<sup>(1)</sup>證明利用ELISA檢定法測得之樣品晶體蛋白含量的高低，可反映樣品毒力大小之結論相吻合。Winkler *et al.*<sup>(15)</sup>即利用免疫化學技術測定結晶蛋白含量，並與生物檢定所測之殺蟲活性相比較，得知其間符合率高達97~107%。Smith and Ulrich<sup>(10)</sup>開發非競爭性ELISA (Non-competitive ELISA) 檢定法，測定醱酵過程中菌液內含結晶蛋白之多寡與生物檢定結果有良好之相關性。而本試驗中唯B劑符合率偏低，探究其原因可能由於ELISA檢測出之毒蛋白同時包括有生物活性及無生物活性者，因為

ELISA 檢定法雖為一靈敏精確的定量法，但卻無法辨別毒蛋白品質之好壞及是否仍有殺蟲效力，羅等<sup>(2)</sup>提出未加防腐劑而貯存1~3個月之樣品，其側孢晶體有自溶現象，部份晶體毒素失去活性，導致利用ELISA指示之力價偏高，與實際殺蟲效力不符，證明了貯存期間受污染或變質的樣品，用ELISA檢測無實際意義。又對於大部份之商品而言，不同生產批次之藥劑，其醱酵及製劑過程之條件都有所差異，有些情況可能造成結晶蛋白之受損而使其失去活性，此現象乃為化學檢定法無法測知的<sup>(11)</sup>。因此對於已失去生物活性，無法表現出良好的殺蟲效果，但仍可在ELISA反應中顯現出頗高吸光值之商品，則需輔以生物檢定測試之結果參考判斷，方有實質意義。另外不同種類或不同品系之供試昆蟲對各蘇力菌品系及製劑均有不同之感受性，故此試驗中之B劑亦可能由於生物檢定供試昆蟲之差異而造成估算力價之偏低，此點尚需更進一步之證實。

由本試驗結果可知，利用本所自製之純化Cry IA毒蛋白及抗血清，經由間接ELISA檢定法可精確測試出毒蛋白含量，再以標準劑 HD-1-S-1980 為力價換算之依據標準，即可得知同亞種蘇力菌商品之相對力價。檢討此法之優點為：1. 敏感度高，專一性强，可確認蘇力菌商品品系及主成份種類。2. 省時

表二、標準劑 HD-1-S-1980間接酵素聯結免疫吸附檢定法檢測結果

Table 2. Determination of Cry IA protein content of standard preparation HD-1-S-1980 using indirect ELISA

Rate of dilution	O.D. at 405 nm	Cry IA protein conc. (ng/ml) <sup>1</sup>	Original <sup>2</sup> protein (mg/g)	Average <sup>3</sup> protein (mg/g)
80000	2.219	208.4	16.67	15.46±1.05
160000	1.561	92.9	14.86	(CV= 0.068)
320000	0.995	46.4	14.85	(ai=1.546%)

1: Cry IA protein conc. as estimated by  $y = -2.219 + 1.875 \text{ Log } x$

2: Original protein (mg/g) = Cry IA protein conc. (ng/ml) × rate of dilution/10

3: Average protein (mg/g) = mean of original protein (mg/g) ± SD

表三、六種蘇力菌庫斯塔基亞種商品酵素聯結免疫吸附檢定法檢測結果

Table 3. Correlation of Btk product potency between labeled and immunoassayed with ELISA<sup>1</sup>

Formulations (labeled IU/mg)	Average IU/mg X ± SD (CV)	Labeled/ELISA % correspondence	Strain of commercial formulations
A (32000)	32,206 ± 2,231 (0.069)	99.4	HD-1
B (28000)	29,466 ± 2,657 (0.090)	95.0	EG2371
C (16000)	16,475 ± 550 (0.033)	97.1	HD-1
D (16000)	16,765 ± 1,075 (0.064)	95.4	HD-1
E (16000)	12,634 ± 508 (0.040)	126.6	INT-15-313
F (16000)	17,089 ± 1,456 (0.085)	93.6	HD-1

1: as estimated by HD-1-S-1980 standard

表四、蘇力菌商品以酵素聯結免疫吸附檢定法與小菜蛾生物檢定偵測力價結果之相關性

Table 4. Comparison of ELISA and bioassays of 6 Btk commercial formulations

Formulations (labeled IU/mg)	Bioassay <sup>1</sup> IU/mg X ± SD (CV)	ELISA IU/mg X ± SD (CV)	Bioassay/ELISA % Correspondence
A (32000)	31,457 ± 3,717 (0.118)	32,206 ± 2,231 (0.069)	97.67
B (28000)	23,429 ± 3,030 (0.129)	29,466 ± 2,657 (0.090)	79.51
C (16000)	15,453 ± 779 (0.050)	16,475 ± 550 (0.033)	93.80
D (16000)	15,180 ± 1,283 (0.085)	16,765 ± 1,075 (0.064)	90.55
E (16000)	12,480 ± 668 (0.053)	12,634 ± 508 (0.040)	98.78
F (16000)	15,307 ± 950 (0.062)	17,089 ± 1,456 (0.085)	89.57

1: Third-instar larvae of *Plutella xylostella* were used for measuring the potency

省工省空間，操作簡便，可同時迅速處理大量檢驗樣品。3. ELISA測定法之CV值較生物檢定法之CV值為低(表四)。只要試驗時溫度及其他操作條件控制一致，均可獲得良好之再現性。可避免如生物檢定時變異性往往過高之困擾。而唯一之缺點為無法區分有活性及無活性之結晶蛋白，故可能會高估力價。較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。且檢測之商品必須與標準品屬於同源菌株，因而需要求送檢藥劑之廠商提供該藥劑之標準劑，作為估算力價之對照標準，以儘量避免商品力價判讀時之困擾及誤差。而日後之工作將著重於製造多種蘇力菌亞種之毒蛋白抗原及抗血清，以備各種蘇力菌商品之檢測工作。並可應用此技術作為本土蘇力菌菌株之篩選及醱酵製劑過程中方法改進之參考。

## 謝 辭

本文承農委會補助經費〔80農建-71-糧-71(11)，81農建-12.2-糧-35(6)〕，試驗之進行期間復蒙國立中興大學昆蟲學系侯豐男教授及陽明醫學院生化所翟建富教授之多方協助，美國馬里蘭大學馬可博士之技術指導，以及本所廖俊旺先生、郭雪小姐、林秀昭小姐等人之協助，使試驗得以順利完成，謹此申謝。

## 引用文獻

1. 沈鞠群、楊團員、喻子牛 1990 聯結免疫吸附測定法測定四種蘇云金桿菌菌株的晶體蛋白含量 生物防治通報增刊:47-50。
2. 羅紹彬、閻建平、戴順英、張用梅、劉娥英、胡名瑞 1990 測定蘇云金桿菌制劑伴孢晶體蛋白指示毒力效價的方法 生物防治通報 6(2): 85-87。
3. Andrews, R. E. Jr., J. J. Iandolo, B. S. Campbell, L. I. Davidson and L. A. Bulla Jr. 1980. Rocket immunoelectrophoresis of the entomocidal paras-
4. 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.
5. Finey, D. J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University.
6. Groat, R. G., J. W. Mattison and E. J. French. 1990. Quantitative immunoassay of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* products. In "Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis*." Hickie, L. A., and W. L. Fitch. eds. ACS symposium series No. 432, pp. 88-97.
7. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.
8. Ma, M., J. K. Burkholder, R. E. Webb and H. T. Hsu. 1984. Plastic-bead ELISA: an inexpensive epidemiological tool for detecting gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. 77 : 537-540.
9. Ma, M., and J. Ballerino. 1988. Course in hybridoma technology. Summer Session II, July 11th-August 19th, 1988 Department of Entomology, UMCP 61 pp.
10. Smith, R. A., and J. T. Ulrich. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative detection of *Bacillus thuringiensis* crystal protein. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 586-590.
11. Tyski, S. 1989. Radioimmunoassay of delta-endotoxin from *B thuringiensis* Correlation with bioassay. Toxicon 27 : 947-949.

12. 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.
13. Wie, S. I., R. E. Andrews, B. D. Hammock, R. M. Faust and L. A. Bulla Jr. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 43 : 891-894.
14. Wie, S. I., B. D. Hammock, S. S. Gill, Elizabeth Grate, R. E. Andrews Jr., R. M. Faust, L. A. Bulla Jr., and C. H. Schaefer. 1984. An improved enzyme-linked immunoassay for the detection and quantification of the entomocidal parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis* Appl. Bacteriol. 57 : 447-454.
15. Winkler, V. W., G. D. Hansen, and J. Yoder. 1971. Immunochemical analysis of parasporal crystal digests of *Bacillus thuringiensis* as an index of insecticidal activity. J. Bacteriol. 171 : 965-974.

### ABSTRACT

Tuan, S. J., Hsuan, S. L., and Kao, S. S. 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of *Bacillus thuringiensis* products. Plant Prot. Bull. 35: 70-78. (Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 41301, R.O.C.)

Commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) are the most predominant bacterial insecticides in the global market. Insecticidal activity of a formulation is dependent upon both the quality and quantity of crystal protein present. ELISA, a rapid procedure for detecting and quantifying the Btk-Cry IA protein was developed in our laboratory. We employed the specific polyclonal antibody and indirect ELISA to establish the standard curve of Cry IA protein concentration. A direct correlation between immunoassay and DBM bioassay of the Btk formulations was also determined under laboratory conditions. This technique took only 4-5 hrs to complete, and it had a 93.6-99.4% agreement with labeled potency and a 89.6-98.8% agreement with DBM bioassay. Its high sensitivity, speed of analysis, specificity, and reproducibility, make ELISA a reliable measuring device for the amount of crystal protein in Btk production samples, and also for routine check on active ingredient of commercial Btk products for registration.

(Key words: *Bacillus thuringiensis*, Enzyme-linked immunosorbent assay, Antigen, Polyclonal antibody, Insecticidal crystal protein, International unit)