

土壤中類戴奧辛化合物篩檢方法－冷光酵素報導基因法

中華民國 99 年 6 月 10 日環署檢字第 0990052962 號公告

自中華民國 99 年 9 月 15 日起實施

NIEA S901.60B

一、方法概要

本方法使用特殊之重組細胞株，進行土壤中類戴奧辛化合物（Dioxin-like compounds）之毒性當量（Toxic Equivalents, TEQ）篩檢。此類細胞株已穩定轉殖具有戴奧辛反應元素（Dioxin Responsive Element, DRE）基因及冷光酵素（Luciferase）基因之質體，培養過程中若接觸戴奧辛/呔喃及其他類戴奧辛化合物，這些化合物會和細胞內的多環芳香烴受體（Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR）結合後形成複合物，接著進入到細胞核內與 DRE 基因結合，促使 DRE 下游的基因進行轉錄與轉譯，同時誘發冷光酵素之產生，且酵素產量呈現劑量效應關係。此種技術稱之為冷光酵素報導基因法（Luciferase reporter gene assay）。

檢測時，樣品經萃取、濃縮、淨化等程序後，添加至細胞中暴露 24 小時，溶解細胞釋出冷光酵素。接著添加冷光酵素受質溶液，其內含之冷光素會受冷光酵素催化發出冷光。因冷光與戴奧辛類化合物之間有劑量效應，藉由測定樣品之冷光強度與 2,3,7,8-TCDD 檢量線所產生之冷光強度進行比對，即可估算樣品中類戴奧辛化合物之毒性當量。如欲分別估算樣品中戴奧辛/呔喃及毒性多氯聯苯之毒性當量，可於淨化時利用活性碳管柱將二類化合物分開，再分別進行暴露實驗。

二、適用範圍

- （一）本方法適用於環境調查、污染場址調查、污染場址整治範圍規劃時，土壤、底泥及淤泥樣品中類戴奧辛化合物之毒性當量篩檢。若要準確定量出樣品中戴奧辛之毒性當量，則需使用進一步的分析技術〔請參考戴奧辛及呔喃檢測方法－同位素標幟稀釋氣相層析／高解析質譜法(NIEA M801)〕。
- （二）本方法之檢測人員應受過有機分析技術及細胞培養技術之訓練。每一實驗室在使用本方法時皆須遵行第九節所述品質管制規範，以證明其具有能力產生可接受之檢測報告。

三、 干擾

- (一) 測定時，若樣品中存在其他可活化多環芳香烴受體之物質（如多環芳香族化合物（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs）及其他結構類似之化合物，可能造成檢驗結果偏高之干擾。
- (二) 樣品萃液中若有具細胞毒性的雜質，可能會導致偽陰性之結果。

四、 設備及材料

- (一) 廣口玻璃瓶：褐色，容量 125 mL 或其他適當大小，附螺旋蓋鐵氟龍內墊。
- (二) 天平
 - 1. 精密天平：可精秤至 0.1 mg。
 - 2. 電子天平：可精秤至 10 mg。
- (三) 吹氮濃縮裝置（Termovap sample concentrator）。
- (四) 烘箱：溫度可達 200°C。
- (五) 洗瓶：鐵氟龍材質，500 mL。
- (六) 玻璃樣品瓶：1.8 mL、22 mL（6 dram）或其他適當大小，附螺旋蓋鐵氟龍內墊。
- (七) 丟棄式玻璃滴管：9 英吋長。
- (八) 矽膠帽：1 至 2 mL。
- (九) 玻璃棉：使用前依序以二氯甲烷及正己烷浸泡淋洗，以氮氣吹乾後置於褐色瓶內備用，亦可使用市售清洗過之玻璃棉。
- (十) 藥勺：不銹鋼材質，或同級品。
- (十一) 玻璃漏斗：125 mL、250 mL 或其他適當大小。
- (十二) 乾燥器（Desiccator）。
- (十三) 重組細胞株：已穩定轉殖具有戴奧辛反應元素基因及冷光酵素基因之質體。

- (十四) Class II 生物安全櫃 (Class II biological safety hood)。
- (十五) 高壓滅菌釜 (Autoclave): 溫度能保持在 $121 \pm 1^\circ\text{C}$ (壓力約 15 lb/in^2 或 1.1 kg/cm^2) 滅菌 15 分鐘以上。
- (十六) 細胞培養箱 (Water jacketed cell culture incubator): 水匣加熱式, 可將溫度維持在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、二氧化碳濃度維持在 $5 \pm 0.2\%$ 。
- (十七) 循環式水浴槽: 溫度能保持在約 37°C 。
- (十八) 倒立式顯微鏡 (Inverted microscope): 具 40 倍及 100 倍放大倍率。
- (十九) 冷凍櫃 (溫度可維持在 -70°C 以下) 或液態氮樣品儲存桶 (Liquid nitrogen dewar)。
- (二十) 多孔盤震盪器: 轉速可維持在每分鐘約 300 至 450 轉。
- (二十一) 冷光儀 (Luminometer): 可用於 96 孔盤或 384 孔盤之冷光檢測, 至少須具有一個試劑分注器。
- (二十二) 試管震盪器 (Vortex)。
- (二十三) 吸管輔助器 (Pipetting aid)。
- (二十四) 無菌吸管 (Sterile pipettes): 玻璃或塑膠材質, 體積為 5、10、25 mL 或其他適當大小。
- (二十五) 可調式微量吸管 (Adjustable micropipette): 2 至 $20 \mu\text{L}$ 、20 至 $200 \mu\text{L}$ 、100 至 $1000 \mu\text{L}$ 或其他適當大小。
- (二十六) 可調式多爪微量吸管 (Adjustable multichannel micropipette): 5 至 $50 \mu\text{L}$ 或其他適當大小。
- (二十七) 可調式連續分注吸管 (Repeater pipette)。
- (二十八) 細胞培養瓶 (Tissue culture flask): 75 平方公分或其他適當大小。
- (二十九) 多孔細胞培養盤 (Cell culture microplates): 96 孔以上。
- (三十) 細胞冷凍小管 (Cryogenic vials): 2 mL, 塑膠材質, 無菌。

五、試劑

- (一) 正己烷：殘量級。
- (二) 正壬烷：殘量級。
- (三) 甲苯：殘量級。
- (四) 甲醇：殘量級。
- (五) 丙酮：殘量級。
- (六) 二氯甲烷：殘量級。
- (七) 試劑水：不含有機物質之去離子水。
- (八) 硫酸：試藥級。
- (九) 矽藻土 (Celite)：545-AW (Supelco 2-0199)，或同級品。
- (十) 活性碳 (Activated carbon)：Carbopak C，Supelco 1-0258，AX-21，或同級品。
- (十一) 矽膠 (Silica gel)：Fisher 100-200 mesh，或同級品。
- (十二) 無水硫酸鈉 (Sodium sulfate, anhydrous)：粒狀，試藥級。
- (十三) DMSO (Dimethyl sulfoxide)：Sigma-Aldrich 270431，或同級品。
- (十四) 磷酸緩衝鹽溶液 (Phosphate buffered saline; PBS)：VWR 45000-446，或同級品。
- (十五) 胰蛋白酵素 (Trypsin)：Sigma T4424，或同級品。
- (十六) 胎牛血清 (Fetal calf serum)：Gibco 26140-079，或同級品。
- (十七) 細胞培養液 (Cell culture media)：RPMI 1640 培養液， α -MEM 培養液，或其他可供細胞生長之培養液。
- (十八) 細胞溶解液 (Cell culture lysis reagent)：Promega E1531，或同級品。
- (十九) 冷光酵素受質溶液 (Luciferase substrate solution)：Promega

E1501，或同級品。

(二十) 酒精 (Ethanol)：濃度介於 70% 至 75%。

(二十一) 氫氧化鈉：試藥級。

(二十二) 氮氣：純度 99.99% 以上。

(二十三) 2,3,7,8-TCDD 標準溶液。

(二十四) 添加標準溶液：以正壬烷配製內含 PCDDs 及 PCDFs 之待測物標準液（待測物種類及濃度如表一）。亦可使用市售已製備好之標準溶液。

六、採樣與保存

(一) 土壤可參考本署公告「土壤採樣方法」及「底泥採樣方法」等相關採樣方法採樣（註 1）。採得之樣品裝入瓶蓋附鐵氟龍墊片之玻璃瓶內，避光保存在 10°C 以下運送至實驗室。

(二) 雖無數據證明最長之樣品保存期限，土壤樣品如經乾燥、研磨、過篩後存於室溫暗處，則保存期限至少一年。

七、步驟：本法之各項步驟，係屬以效能為基準（Performance-based）之步驟，檢驗室可適當變更相關程序，但須符合品質管制九、（三）之規定。

(一) 樣品預處理：請參考本署公告之 NIEA M801 方法規定。

(二) 樣品萃取：稱取 2 至 10 g 樣品進行萃取，可使用索氏萃取、高壓溶劑萃取、超音波萃取、震盪萃取等方式進行（註 2）。

(三) 樣品淨化及分離：可使用酸性矽膠管柱及活性碳管柱進行樣品淨化及分離。完成淨化之樣品，須將溶劑完全置換為 DMSO（建議體積為 50 μ L），即為樣品萃取液。

(四) 重組細胞株之培養與維持

1. 細胞培養：

(1) 一般將細胞置於含有胎牛血清之細胞培養液的培養瓶內進行培養，細胞培養箱之溫度為 37 \pm 0.5°C（二氧化碳 5 \pm 0.2%、

維持飽和溼度)。

- (2) 當細胞密度過高(註3)，須進行繼代培養。先將細胞培養液吸除，以磷酸緩衝鹽溶液沖洗，再使用胰蛋白酶於 37 ± 0.5 °C 作用使細胞脫落懸浮後，取適量細胞加入新鮮之細胞培養液，換一新培養瓶繼續培養。
2. 細胞儲存：須將細胞培養液置換為內含抗凍劑(如 DMSO)之冷凍用培養液，分裝至細胞冷凍小管，逐步降溫後再放入液態氮中長期儲存。
3. 細胞解凍：冷凍保存之細胞，解凍時須置於約 37°C 水浴槽儘速回溫，再將冷凍用培養液置換為含有胎牛血清之細胞培養液。

(五) 戴奧辛篩檢

1. 細胞植入多孔細胞培養盤：

- (1) 先評估檢測樣品所需之多孔細胞培養盤總數及所需之細胞總量。
- (2) 將所需之細胞以胰蛋白酶處理使其脫落懸浮後，以細胞培養液稀釋至適當濃度，再以多爪微量吸管或可調式連續分注吸管分裝至多孔細胞培養盤。
- (3) 將完成細胞植入程序的多孔細胞培養盤移入細胞培養箱，在 37 ± 0.5 °C (二氧化碳 $5 \pm 0.2\%$ 、維持飽和溼度) 培養約 24 小時後，如細胞生長良好，即可進行暴露實驗。

2. 細胞暴露：

- (1) 製備 2,3,7,8-TCDD 檢量線：以 DMSO 為溶劑製備檢量線，檢量線至少應有 7 個不同濃度，濃度之分布應趨近於等比數列。檢量線最低點應高於偵測極限(註4)，中間點應落於 50% 有效濃度 (the median effective concentration, EC_{50}) 附近，最高點所測得之冷光強度應接近該檢量線之反應極限值(註5)。
- (2) 製備暴露培養液(註6)：
 - A. 2,3,7,8-TCDD 檢量線：將檢量線樣品分別取定量加入細胞培養液中並均勻混合，DMSO 最終濃度須小於 1% (v/v)。

B. 待測樣品萃取液：以 DMSO 適度稀釋後（註 7），分別取定量加入細胞培養液中並均勻混合，DMSO 最終濃度須小於 1%（v/v）。

C. DMSO 試劑空白：取定量 DMSO 加入細胞培養液中並均勻混合，DMSO 最終濃度須小於 1%（v/v）。

(3) 進行多孔細胞培養盤暴露實驗：將培養約 24 小時之多孔細胞培養盤由細胞培養箱取出後，將暴露培養液沿孔壁加入，完成後再將多孔細胞培養盤放回細胞培養箱，暴露約 24 小時。

3. 細胞溶解及冷光測定：

(1) 完成暴露程序後，將多孔細胞培養盤由細胞培養箱取出進行鏡檢，確認細胞是否狀態良好，沒有遭受毒害或細菌污染之狀況（註 8）。

(2) 將多孔細胞培養盤內之暴露培養液吸除，再以磷酸緩衝鹽溶液潤洗。

(3) 每孔注入適量之細胞溶解液，震盪使細胞溶解後再進行冷光測定。

(4) 以冷光儀自動注入冷光酵素受質溶液，與冷光酵素作用後測定冷光強度（以 Relative Light Units (RLU) 表示）。

八、結果處理

每一多孔細胞培養盤之冷光強度測定結果，均須先扣除該盤之冷光背景值（DMSO 試劑空白之冷光平均值）後，再進行下列資料分析：

（一）2,3,7,8-TCDD 檢量線計算（註 5）

1. 將檢量線以冷光強度對標準品濃度之對數值作圖，結果曲線應呈現 S 形（Sigmoid shape，如圖一）。

2. 冷光強度與標準品濃度之關係，應符合下列之希爾方程式（Hill equation）：

$$y = \frac{a_0}{1 + \left(\frac{x}{a_1}\right)^{a_2}}$$

y = 經背景校正之冷光強度值 (RLU)
 x = 2,3,7,8-TCDD 之濃度值
 a_0 = 反應極限值
 a_1 = 50%有效濃度
 a_2 = 曲線的形狀參數

依據最小平方最適迴歸法則 (Least-squares best-fit)，利用統計軟體 (註 9) 找出最符合標準品測定值之曲線，即可得到 a_0 、 a_1 、 a_2 。

- (二) 暴露培養液中類戴奧辛物質之毒性當量濃度估算：求出與樣品同一多孔盤上之檢量線的 a_0 、 a_1 、 a_2 後，再將樣品之冷光強度值 (y) 代入上述公式計算出 x 值，即為暴露培養液中類戴奧辛物質之毒性當量濃度。
- (三) 樣品之毒性當量濃度估算：若計算出之 x 值單位為 pM，代入下列公式即可求得樣品之毒性當量濃度，單位為 ng TEQ/kg：

$$\text{樣品之總毒性當量濃度} = \frac{x}{c} \times d \times \frac{v}{10^6} \times 322 \div w$$

x : 暴露培養液中類戴奧辛物質之 TEQ 濃度 (pM)

c : 暴露培養液中 DMSO 之最終百分濃度

d : 樣品萃取液之稀釋倍數

v : 樣品萃取液之體積 (μL)

w : 樣品萃取克數 (g)

九、品質管制

- (一) 依本方法執行戴奧辛檢測之實驗室，須建立最初分析之起始精密度與回收率資料。依步驟七之程序 (包含前處理、萃取、淨化等樣品分析程序)，執行四重複之品管查核樣品分析，其回收率須介於 30 ~ 130%，相對標準偏差須小於 30%。
- (二) 依本方法執行戴奧辛檢測時，須進行之品管分析包括方法空白樣品分析、重複樣品分析、品管查核樣品分析。
1. 每 10 個樣品應執行上述之品管分析各 1 個；若每批次樣品數少於 10 個，則每批次仍應執行上述之品管樣品分析各 1 個。
 2. 品管查核樣品應以添加標準溶液 (如表一) 配製，其濃度須小於

1000 ng/kg (註 10)。分析結果之回收率須介於 30 ~ 130%。

(三) 為克服樣品基質干擾及有效率執行本方法之檢測，檢驗人員可適當變更第七節之步驟程序，惟檢測結果之數據品質不能低於本方法之品管規範。變更之檢測方法，實驗室必須保留相關之檢測品保品管數據資料，編頁碼裝訂成冊，包括：

(1) 執行方法變更之原因說明。

(2) 執行方法變更後之檢測品管數據資料，含：

A. 起始精密度與回收率資料。

B. 空白分析。

C. 準確度評估。

(四) 進行七、(五) (2)細胞暴露時，每一多孔細胞培養盤均須伴隨進行下列檢測，並符合下列品管要求：

1. 2,3,7,8-TCDD 檢量線：暴露時每一濃度至少進行二重複。結果處理時以重複分析之冷光強度平均值進行檢量線計算，檢量線之 r^2 應大於或等於 0.98。

2. DMSO 試劑空白：暴露時至少進行三重複。結果處理時以重複分析之冷光強度平均值作為該盤之冷光背景值。

3. 檢量線查核樣品：暴露時應進行三重複。未扣除冷光背景值前，重複分析之冷光強度相對標準偏差應小於 15%。檢量線查核樣品其分析結果之相對誤差值宜在 $\pm 15\%$ 以內。

4. 待測樣品：各稀釋度樣品暴露時皆應進行三重複。最後用於毒性當量估算之稀釋度，檢測結果應符合下列要求：

(1) 未扣除冷光背景值前，三重複之冷光強度相對標準偏差應小於 15%。

(2) 冷光讀值應落於檢量線 EC_{50} 附近之線性部分 (註 5)。

十、精密度與準確度

- (一) 冷光酵素報導基因法與氣相層析／高解析質譜法比較測試：單一實驗室針對 61 件土壤及底泥樣品，進行本方法與氣相層析／高解析質譜法 (NIEA M801) 的比對檢測，測值比介於 1.0—8.9 倍，平均為 3.8 倍，且二者間之相關係數極佳， R^2 為 0.940 (圖二)。
- (二) 上述測試結果，以 1000 ng-TEQ / kg 之法規管制標準值進行區分，冷光酵素報導基因法出現 0/61 (0%) 偽陰性反應，6 / 61 (9.8%) 偽陽性反應。

十一、參考文獻

- (一) US EPA, Method for Toxic Equivalents (TEQs) Determinations for Dioxin-Like Chemical Activity with the CALUX[®] Bioassay, SW-846 Method 4435, 2008.
- (二) US EPA, Screening Extracts of Environmental Samples for Planar Organic Compounds (PAHs, PCBs, PCDDs/PCDFs) by a Reporter Gene on a Human Cell Line, SW-846 Method 4425, 2007.
- (三) BioDetection Systems BV, Standard Operation Protocols for DR CALUX[®] Bioassay.

註：廢液分類處理原則—本方法所產生之有機廢液依含氯有機溶劑處理。直接接觸標準品或樣品之盛裝容器、吸管及培養盤等，均屬有害事業廢棄物，檢驗室應依相關規定妥善儲存、處理。

註 1：本文引用之公告方法名稱，以行政院環境保護署最新公告者為準。

註 2：須注意使用之溶劑是否會對細胞產生毒性或是造成偽陽性反應。

註 3：細胞培養時，其緻密度 (Confluence) 不宜超過 90%。

註 4：每一多孔盤偵測極限之計算方式為該盤 DMSO 試劑空白三重複之標準偏差的 2.5 倍，單位為 RLU。再代入檢量線方程式，即可算出暴露培養液中 TEQ 濃度之偵測極限。

單一實驗室 98 年度進行 12 盤檢測，暴露培養液中 TEQ 濃度之平均偵測極限為 0.17 pM (分布範圍為 0.04 至 0.31 pM)。

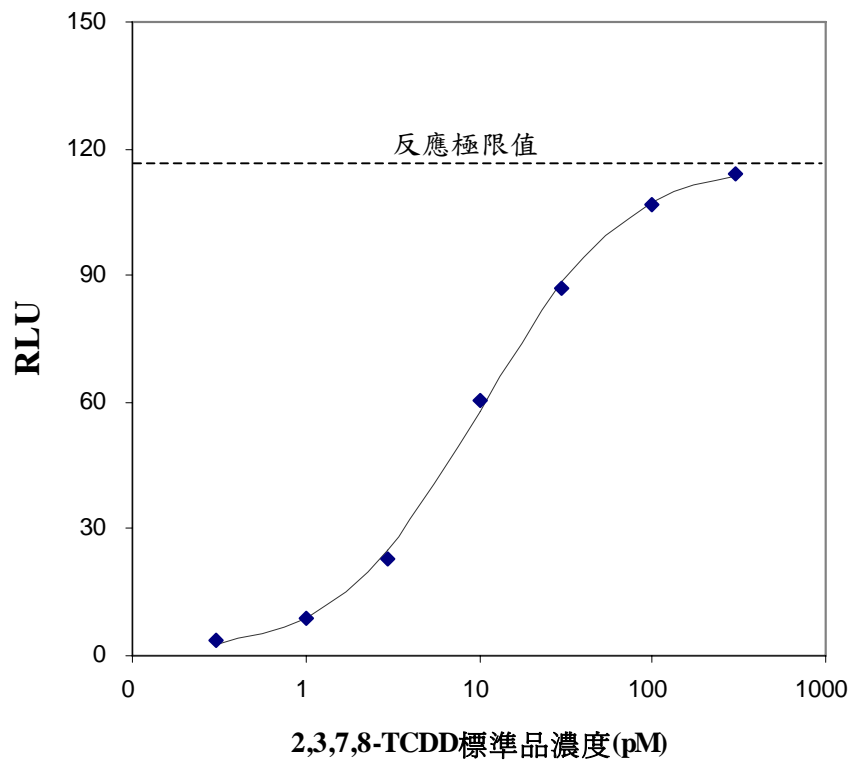
註 5：若因細胞株特性，檢量線無法呈現 S 形並符合希爾方程式，實驗室應提出適用之檢量線計算方式，並符合第九節所述品質管制規

範。

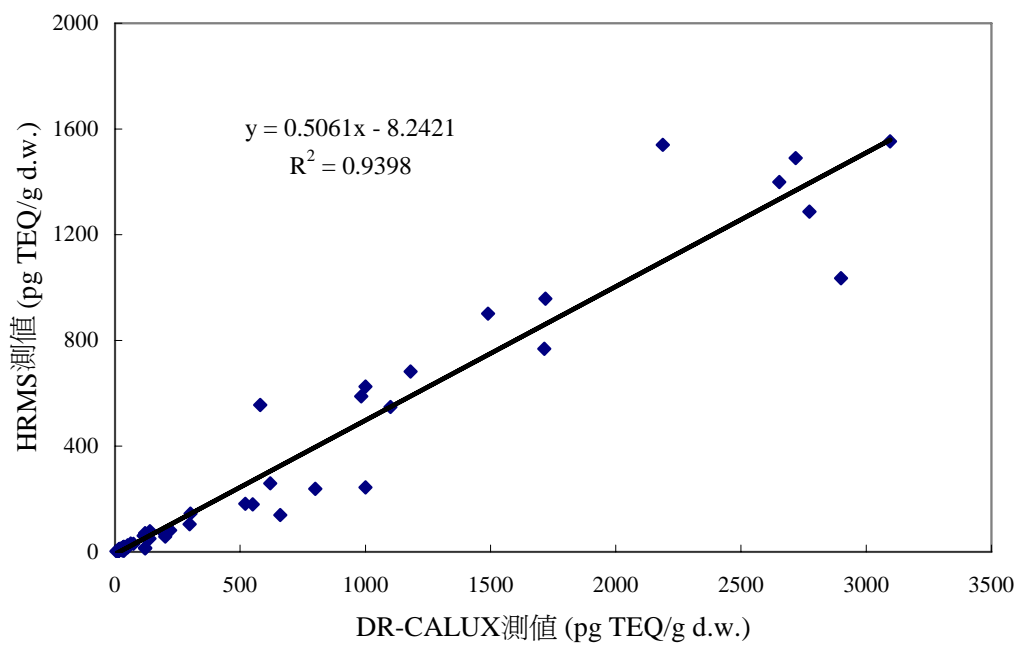
- 註 6：進行細胞暴露實驗時，同一多孔盤之暴露培養液，須有相同之 DMSO 最終濃度。一般進行暴露實驗之 DMSO 最終濃度不超過 1%，濃度過高會造成細胞毒性。
- 註 7：為避免可能之干擾物質造成偽陽性結果，樣品萃取液至少應進行 1:10 及 1:100 等 2 個稀釋度的暴露實驗。
- 註 8：若遭受毒害或細菌污染，會造成偽陰性之結果。因此檢測時於暴露程序完成後，應於顯微鏡下觀察細胞狀態是否良好。若細胞有遭到毒害之現象（細胞貼附狀況不佳或者細胞型態有顯著變化），應將樣品稀釋或重新淨化，去除具細胞毒性的雜質後再行檢測。
- 註 9：如 Excel 之規劃求解功能。
- 註 10：可將添加標準溶液以正壬烷適度稀釋後，再進行品管查核樣品配製。

表一、待測物標準品溶液

化合物名稱	濃度 (pg/ μ L)
2,3,7,8-TeCDD	5
2,3,7,8-TeCDF	5
1,2,3,7,8-PeCDD	25
1,2,3,7,8-PeCDF	25
2,3,4,7,8-PeCDF	25
1,2,3,4,7,8-HxCDD	25
1,2,3,6,7,8-HxCDD	25
1,2,3,7,8,9-HxCDD	25
1,2,3,4,7,8-HxCDF	25
1,2,3,6,7,8-HxCDF	25
1,2,3,7,8,9-HxCDF	25
2,3,4,6,7,8-HxCDF	25
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	25
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	25
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	25
OCDD	50
OCDF	50



圖一、2,3,7,8-TCDD 標準曲線圖



圖二、土壤及底泥之 HRMS 測值及冷光酵素報導基因法測值相關性圖