

水中微囊藻毒及節球藻毒篩檢方法

—盤式或條式直接競爭型酵素免疫分析法

中華民國100年3月11日環署檢字第1000019659號公告

自即日生效

NIEA E510.50B

一、方法概要

本方法採用已商品化的盤式直接競爭型酵素免疫試劑套組（direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit, ELISA kit）。檢測時，水樣經過濾後以試劑套組測試，水中藻毒與套組內酵素結合試劑（enzyme conjugate reagent）共同競爭限量之藻毒抗體。當無色酵素結合試劑與抗體結合後，酵素催化後續加入之受質液（substrate），轉化成有色產物，反之藻毒與抗體結合物仍維持無色。水樣中藻毒含量越高，相對減少藻毒結合試劑與抗體的鍵結量，反應後呈現較淺顏色。因此，水中藻毒濃度與反應顏色呈負相關性，將樣品所呈之顏色以與檢量線比較可得篩檢濃度。

二、適用範圍

本方法適用於篩檢飲用水、淨水廠淨化後出水或清水等水樣，篩檢水中微囊藻毒及節球藻毒等含有Adda結構之藻毒含量（註 1），可在短時間內篩檢大量樣品作為監測或預警。方法之測試濃度範圍約0.05~5 µg/L或依商品說明書建議。若需準確定量出樣品中微囊藻毒LR量，則需使用進一步的分析技術〔請參考飲用水中微囊藻毒素化學檢測方法—固相萃取與高效液相層析/串聯式質譜儀法(NIEA W539.50B)〕。

三、干擾

- （一）水體中除藻毒外存在會影響或競爭與試劑或抗體結合之物質。
- （二）進行檢測的環境溫度超出試劑適用範圍（低於10℃或高於30℃）。

四、設備

（一）儀器

- 1、迴轉式振盪器：可達200 rpm或配合試劑套組測試要求規格。
- 2、微量盤分析儀：配合試劑套組測試要求規格，一般試劑套組檢測波長使用450 nm。
- 3、計時器：可計時至30分鐘。

（二）材料

- 1、過濾套組：孔隙0.45 μm ，不需無菌，使用後拋棄。
- 2、小體積樣瓶：1至5 mL，盛裝過濾後之水樣用。
- 3、盤式直接競爭型酵素免疫試劑套組：使用市售藻毒試劑套組，並依篩檢目的不同而選擇適當套組（註 2）。試劑套組一般含有測試微孔盤、系列標準溶液、酵素結合試劑、受質液、反應終止液（stop solution）等（註 3）。須保存於2-8 $^{\circ}\text{C}$ 或依試劑套組說明。
- 4、注射器：1~10 mL。
- 5、微量吸管：單爪或多爪。
- 6、封口膜。

五、試劑

試劑水：電阻值須大於1 M Ω -cm，25 $^{\circ}\text{C}$ 。

六、採樣與保存

樣品採集後，立即以過濾套組過濾後進行篩檢測試。未能即時進行測試時，可將過濾後之水樣（約1 mL）以-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷凍保存，保存期限最長30天。

七、步驟

（一）套組與樣品之準備：

- 1、回溫：將待測樣品、試劑套組內之試劑與所需之微孔盤測試條孔，置於室溫下回溫30分鐘以上（如樣品原保存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下，需較長的回溫時間）。未使用之測試條孔以封口袋封好並放回冷藏保存。
- 2、配製清洗液（依試劑套組之需求，如清洗液為試劑水則不需配製）：如試劑套組提供濃縮清洗液，則須依其說明比例稀釋之，充份混合使底部之結晶完全溶解並回溫。

（二）試劑套組之操作：

- 1、樣品、酵素結合試劑的添加：添加樣品及酵素結合試劑之加入量、程序及混合時間，須依試劑套組說明操作。每批次檢測時須同時進行套組所附檢量線標準液及空白樣品（亦稱控制標準液）之測試，添加之程序須與樣品相同。每件樣品及標準品均須進行至少二重複測試。
- 2、競爭反應：將加好樣品與酵素結合試劑之測試盤，覆上封口膜，依試劑套組說明充分混合（搖動或振盪）後反應。

- 3、去除液體：反應後，將微孔測試盤內的液體倒掉棄置，並儘可能將水份除去。
- 4、清洗：用清洗液清洗數次（依試劑套組說明）。
- 5、呈色：加入試劑套組之酵素受質液（亦稱呈色劑）後，再加入反應終止液（亦稱停止劑），依試劑套組說明之時間處理，以微量盤分析儀測定其吸光值（亦稱OD值），取重複測試之平均值計算。

八、結果處理

- （一）以試劑套組之系列標準溶液濃度及其測試吸光值（OD值），製作半對數檢量線（semi-log）。標準溶液濃度取對數值，與該標準溶液對應的B/B₀（%）值，作線性回歸圖(如附圖)。B/B₀（%）值計算方式如下：

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{標準溶液(或樣品)的平均吸光值}}{\text{空白樣品(或控制標準液)的平均吸光值}} \times 100$$

- （二）計算樣品平均吸光值之B/B₀（%）值，由檢量線依內插法求得其濃度，一般以 μg/L（ppb）表示。

九、品質管制

每一樣品重複測試之吸光值分別為X₁、X₂，其相對差異百分比應(RPD；Relative Percent Difference) ≤ 15%。

$$RPD(\%) = \frac{|X_1 - X_2|}{1/2(X_1 + X_2)} \times 100$$

十、精密度與準確度

單一實驗室以市售微囊藻毒（Microcystin-LR及-RR）配製為5、1、0.5及0.05 μg/L，以免疫分析試劑進行測試結果如附表。

十一、參考資料

- （一）Chu, F. S., Huang, X., Wei, R. D., Carmichael, W. W. Production and Characterization of Antibodies against Microcystins. Applied and Environmental Microbiology. 1989, 55:1928-1933.
- （二）Yu, F. Y., Liu, B. H., Chou, H. N., Chu, F. S. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystin in Algae. J.

Agric. Food Chem. 2002, 50:4176-4182.

- (三) ABRAXIS Microcystins-DM ELISA (Microtiter Plate)Guide.
- (四) ALGAL Microcystins Plate kit Guide. Taiwan Algal Science Inc.
- (五) Beacon Microcystin Plate Kit Instructional Booket. Beacon Analytical Systems Inc.
- (六) EnviroGard[®] Microcystins Plate Kit Guide , Strategic Diagnostics Inc.
- (七) EnviroLogix[™] Quantiplate kit for Microcystins Guide. EnviroLogix Inc.

註 1：微囊藻及節球藻均屬於藍藻，常見於優養化淡水水域，早期在微囊藻體內發現含有Adda結構之環狀胜肽肝臟毒素，命之為微囊藻毒（microcystins），因陸續發現其環狀胜肽之氨基酸有所不同分別以microcystin-LR、-RR、-YR等區隔。後來節球藻中亦發現也有含此類似之毒素，惟異於微囊藻毒，節球藻為環狀5個肽而非7個肽，毒性也較低，學者另命名為節球藻毒(nodularin)。本方法無法區隔同樣具有Adda之微囊藻毒-LR、-RR、-YR及節球藻毒等，故檢測結果僅以藻毒總量表示。

註 2：商品化藻毒試劑套組之抗體對各類藻毒之親合力不同，通常在產品說明書中以50% B/B₀（對測試特定藻毒標準液其平均吸光值為控制標準液平均吸光值半數時之濃度）表示，值越低表示親合力越高測試更靈敏，選用時應依檢測目標微囊藻毒類別選擇。例如：檢測微囊藻毒-LR時，應選擇微囊藻毒-LR 50% B/B₀低者。

註 3：反應終止液通常含酸，如不慎濺到皮膚、眼睛或衣服時，應立即以大量清水沖洗。

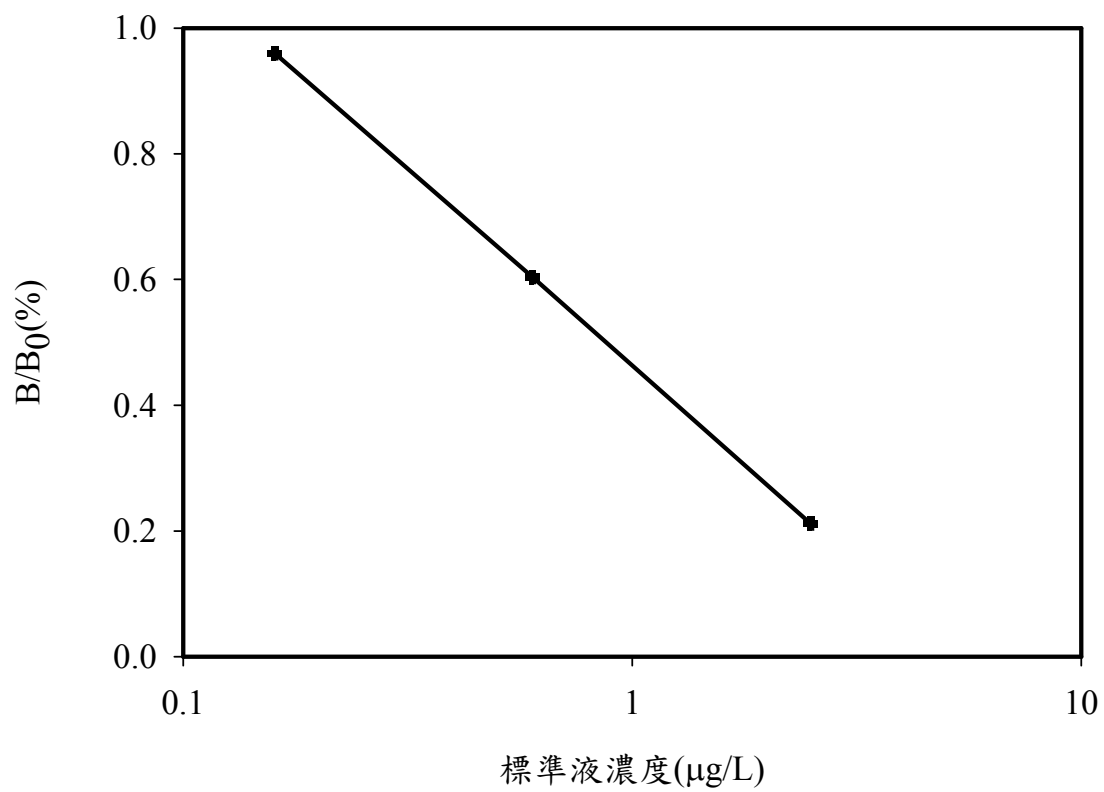
附表 配製之標準品以酵素免疫分析結果(同一廠牌 7重覆)

微囊藻毒類別	5 µg/L	1 µg/L	0.5 µg/L	0.05 µg/L
Microcystin-LR	*	0.97±0.16	0.43±0.12	0.05±0.02**
Microcystin-RR	*	0.89±0.26	0.48±0.10	0.04±0.02**

* 表示超過分析試劑之檢量線最高值。

** 表示內插法所得測值。

資料來源：環境檢驗所水源水質中藻類及其毒性之調查研究報告，97年3月。



附圖 套組所附之標準溶液濃度對應 B/B_0 之半對數檢量線圖