

發光光桿菌 (*Photorhabdus luminescens*) 農藥有效成分檢驗方法草案

一、農藥性質：

普通名稱：發光光桿菌 0805-P2R (*Photorhabdus luminescens* 0805-P2R)

農藥性質及生物特性：發光光桿菌屬於革蘭氏陰性菌，發光光桿菌農藥之 Porin 是革蘭氏陰性菌外膜的主要蛋白質，典型 porin 單體分子量約 30–50 kDa。

二、劑型：水懸劑 (SC)。

三、作用：殺蟎劑。

四、分析方法：

1. 適用範圍：本方法適用於發光光桿菌 0805-P2R (*Photorhabdus luminescens* 0805-P2R) 農藥之 38 kDa Porin 定量分析。
2. 檢驗方法：酵素結合免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay，簡稱 ELISA)。

2.1 設備裝置：

2.1.1 ELISA 微盤分析儀，吸收波長可設定 405 nm。

2.1.2 恆溫箱 (溫度精確度可達 $\pm 2^{\circ}\text{C}$)。

2.1.3 桌上型離心機，可設離心轉速 $6000 \times g$ 。

2.1.4 試管振盪器。

2.2 器具材料：

2.2.1 10 μL 、200 μL 、1 mL 微量吸管 (Micropipette)、微量吸管尖 (pipette tips)。

2.2.2 200 μL 八爪微量吸管。

2.2.3 標準 96 孔 (8×12) ELISA 盤，透明平底(flat- bottom)，高結合(high binding polystyrene)。

2.2.4 無菌離心管 (1.5 mL，15 mL)。

2.2.5 保鮮膜。

2.2.6 500 mL 血清瓶。

2.2.7 500 mL 玻璃量筒。

2.3 溶劑試藥：

2.3.1 標準劑：38 kDa Porin 對照用標準品，零下 20°C 儲存。

2.3.2 一次抗體：38 kDa Porin 兔血清一次抗體 (Anti-38 kDa Porin Rabbit IgG)，零下 20°C 儲存。

2.3.3 二次抗體：鹼性磷酸酶結合抗兔二次抗體 (Alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-Rabbit IgG)， 4°C 儲存。

2.3.4 呈色基質：對硝基苯基磷酸鹽 (p-Nitrophenyl phosphate)，零下 20°C 儲存。

2.3.5 包被緩衝液 (Coating buffer, pH 9.6)(W/V)：

含有 0.159 % 碳酸鈉(sodium carbonate)、0.294 % 碳酸氫鈉(sodium bicarbonate)與 0.0195 % 疊氮化鈉(sodium azide)之緩衝液，或 GeneMark (廠牌) 1X Coating Buffer，型號：ECB-500， 4°C 儲存。

2.3.6 磷酸鹽緩衝液 (PBS) (W/V)：

含 0.80 % 氯化鈉 (Sodium Chloride)、0.11 % mM 磷酸氫二鈉 (Sodium hydrogen phosphate)、0.022 % 氯化鉀 (Potassium chloride)、0.0136 % 磷酸二氫鉀 (Potassium dihydrogen phosphate) 與 0.01 % 疊氮化鈉 (sodium azide)，或 GeneMark (廠牌) 10X PBS Buffer，型號：GB07-1，常溫保存。

2.3.7 PBS-Tween 緩衝液 (PBST)：

PBS 中加入 0.05 % (V/V) 聚山梨醇酯 20 (Tween-20)，常溫保存。

2.3.8 酵素結合緩衝液 (Enzyme-conjugate buffer)：

PBST 中加入 2 % (W/V) 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP-40) 與 0.2 % (W/V) 卵清蛋白 (Ovalbumin) 或 GeneMark (廠牌) Conjugate Buffer，型號：ECJ-500，4 °C 儲存。

2.3.9 呈色緩衝液 (Substrate buffer, pH 9.8) (W/V)：

含 9.7 % 二乙醇胺 (Diethanolamine) 與 0.0195 % 疊氮化鈉 (sodium azide) 或 GeneMark (廠牌) Substrate and Buffer，型號：ESB-500，4 °C 儲存。

2.4 貯存標準液 (Standard stock solution) 配製：

標準劑 (38 kDa Porin) 放置冰上回溫，以試管振盪器混合均勻，以微量吸管正確吸取定量之標準劑於 1.5 mL 離心管中，以包被緩衝液稀釋成 30.0~40.0 mg/mL 38 kDa Porin 之貯存標準液，並精確紀錄之，以試管振盪器混合均勻。

2.5 標準檢量線 (Standard calibration curve) 製作：

以微量吸管正確吸取定量之貯存標準液於 1.5 mL 離心管中，以包被緩衝液稀釋成 2 mg/L 之標準液，後續取 450 μ L 此標準液以包被緩衝液進行 2 倍系列稀釋，最終檢量線濃度 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/L 之標準液。

2.6 檢液之配製：

檢體充分混和後，以微量吸管正確吸取 4 重複 1 mL 成品農藥於 1.5 mL 離心管中，以大約 6000 $\times$ g 離心 10 分鐘，微量吸管正確吸取 100 μ L 上清液以包被緩衝液先進行 10 倍稀釋，再進行 1 次 10 倍稀釋 (共 100 倍)，後續再取 500 μ L 以包被緩衝液進行 2 倍系列稀釋至落入檢量線範圍。

2.7 空白對照組 (Blank)：以包被緩衝液當作空白對照組。

2.8 含量測定：

2.8.1 樣品固著：

2.8.1.1 在 96 孔 ELISA 盤上，先規劃此次實驗的空白對照組、檢液及標準液的位置，4 重複檢液用同一檢量線同時進行分析。

2.8.1.2 微量吸管正確分別取 200 μ L 之空白對照組、各濃度標準液與檢液加入 ELISA 盤中，每個空白對照組、標準液及檢液皆重複 2 個反應孔 (Well)。

2.8.1.3 將 ELISA 盤以保鮮膜密封並靜置於 37 °C 恆溫箱 60 分鐘。

2.8.2 清洗程序：

倒除 ELISA 盤內液體，加入約 200 μ L 之 PBS-Tween 緩衝液，靜置 3 分鐘，此清洗程序重複 3 次，在第 3 次清洗後拍乾 ELISA 盤進行下一步驟。

2.8.3 一次抗體反應：

2.8.3.1 一次抗體反應液配製：

微量吸管吸取 10 mL 酵素結合緩衝液至 15 mL 離心管中並加入 5 μ L 一次抗體，進行 2000 倍稀釋，以試管振盪器混合均勻。

2.8.3.2 以八爪微量吸管吸取 200 μ L 之一次抗體反應液加入已清洗 ELISA 盤中。

2.8.3.3 將 ELISA 盤以保鮮膜密封並靜置於 37 °C 恆溫箱 60 分鐘。

2.8.3.4 重複 2.8.2 清洗程序 3 次。

2.8.4 二次抗體反應：

2.8.4.1 二次抗體反應液：微量吸管吸取 10 mL 酵素結合緩衝液至 15 mL 離心管中並加入 2 μ L 二次抗體，進行 5000 倍稀釋，以試管振盪器混合均勻。

2.8.4.2 以八爪微量吸管吸取 200 μ L 之二次抗體反應液加入已清洗 ELISA 盤中。

2.8.4.3 將 ELISA 盤以保鮮膜密封並靜置於 37 °C 恆溫箱 60 分鐘。

2.8.4.4 重複 2.8.2 清洗程序 3 次。

2.8.5 呈色反應：

2.8.5.1 呈色液配製：呈色基質室溫下回溫，秤取約 10±2 mg 呈色基質於 15 mL 離心管中，以微量吸管正確加入 10 mL 之呈色緩衝液配製成 1 mg/mL 呈色液，以試管振盪器混合均勻。

2.8.5.2 以八爪微量吸管吸取 180 µL 之呈色液加入已清洗 ELISA 盤中，在室溫下靜置且避光反應。

2.8.6 吸光值測定：

呈色反應約 20±5 分鐘，以 ELISA 微盤分析儀偵測吸光值 A_{405nm} ，呈色時間可依每次反應速率做調整。

2.8.7 含量計算：

將 2 重複吸光值計算其平均值，將平均吸光值扣除空白對照組後，以標準劑濃度為 x 軸、吸光值為 y 軸，經回歸分析求得標準檢量線： $y = ax + b$ ，由

標準檢量線計算檢液濃度： $x = \frac{y-b}{a}$ (mg/L)

每公升檢體中 38 kDa Porin 含量計算(g/L)：

檢液濃度($\frac{mg}{L}$)×稀釋倍數× $\frac{1g}{10^3mg}$

五、參考資料：

1. 黃金興、林詩舜、葉錫東 (2001) 由苦瓜硬化病果上所分離之矮南瓜嵌紋病毒鞘蛋白基因之分析。植物病理學會刊 10:11-18, 2001。
2. 謝奉家、謝再添、張敬宜 (2023) 發光光桿菌 *Photorhabdus luminescens* 防治木瓜葉蟎。植物保護科技在韌性農業之應用：111-126。
3. Suleyman Aydin. (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides 72 4-15.
4. Andreasson, U., Perret-Liaudet, A., van Waalwijk van Doorn, L. J. C., Blennow, K., Chiasserini, D., Engelborghs, S., ... & Teunissen, C. E. (2015). A practical guide to immunoassay method validation. Frontiers in Neurology, 6, 179.
5. Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Pepa Della, M. E., et al. 2012. Microbe-host interactions: structure and role of gram-negative bacterial porins. Curr. Protein Pept. Sci. 13:843-854.

六、品質管制：

1. 一次抗體反應液、二次抗體反應液及呈色液需在使用前配製，不可放置隔天使用。
2. ELISA 反應孔不能有氣泡，以免干擾吸光值，影響數據正確性。
3. 呈色反應時間可根據每次反應速率不同做調整，可在加入呈色液時避光反應約 3 分鐘時進行初步判斷，若已有明顯呈色(黃色)表示反應速率快，可在反應 15 分鐘後即進行吸光值測定。反之，則須拉長呈色時間，最終讓吸光值 A_{405nm} 扣除空白對照組小於 2，以避免過度反應。
4. 檢量線至少包含 5 個不同濃度(含)以上標準液。其線性相關係數平方值 r^2 需達 0.99 以上。
5. 每個樣品應取樣 4 重複用同一檢量線同時進行分析，結果計量採平均值，其相對標準偏差應小於 20 %。
6. 檢驗方法的回收率採用添加實驗，每濃度至少 3 重複，用同一檢量線同時進行分析，結果計量採平均值，其回收率標準為 80 ~ 120 %之間。
7. 所有品質管制數據，均須詳實清晰紀錄不可任意塗改，並經由品質主管審核後妥善保存，以做為試驗結果之參考佐證。
8. 一次抗體依 ELISA 進行品質管制：(1) A_{405nm} 反應值：一次抗體以 1:2000 稀釋倍數進行反應時，其 $A_{405nm} \geq 0.5$ ，(2) A_{405nm} 背景值：無抗原或無一次抗體之對照孔，其 $A_{405nm} \leq 0.1$ ，(3) 專一性：對非目標抗原合成 peptide 無反應，其 $A_{405nm} \leq 0.1$ 。