

行政院及所屬各機關因公出國人員出國報告書

(出國類別：研習)

藻類及其毒素之分子生物檢驗技術研習

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局

出國人：職稱：科長、薦任技士

姓名：傅幼敏、林蘭珺

出國地點：紐西蘭

出國期間：92年11月23日～12月1日

報告日期：93年2月12日

Fc/09300561

系統識別號:C09300561

公 務 出 國 報 告 提 要

頁數: 46 含附件: 否

報告名稱:

赴紐西蘭研習[藻類及其毒素之分子生物檢驗技術]

主辦機關:

行政院衛生署藥物食品檢驗局

聯絡人/電話:

陳婉麗/02-26531300

出國人員:

傅幼敏 行政院衛生署藥物食品檢驗局 第五組 科長
林蘭珏 行政院衛生署藥物食品檢驗局 第五組 薦任技士

出國類別: 研究 實習

出國地區: 紐西蘭

出國期間: 民國 92 年 11 月 23 日 - 民國 92 年 12 月 01 日

報告日期: 民國 93 年 02 月 12 日

分類號/目: F0/綜合(農業類) F0/綜合(農業類)

關鍵詞: 藻類,藻類毒素,分子生物

內容摘要: 為能提昇食品中藻類毒素之檢驗技術及了解世界各國對有害藻華(harmful algal bloom, HAB)之管理及監控方式,藥物食品檢驗局(以下簡稱為本局)派員赴紐西蘭納爾遜(Nelson)參加由APEC舉辦之「藻類及其毒素之分子生物檢驗技術研習會」。與會之收穫包括(1)了解各國監測藻華之系統、管理現況及因應措施(2)研習各國對水中藻類生長情況及海洋毒素偵測之最新技術(3)實地參觀納爾遜當地之海洋毒素檢驗實驗室,了解各種分子生物技術(DNA probe、biochip、ELISA、PCR)及貴重儀器(LCMS、LC/MS/MS、NMR)於海洋毒素偵測上之應用(4)與藻毒領域之國際性專家請益,並建立溝通之管道等。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

藻類及其毒素之分子生物檢驗技術研習

摘 要

為能提昇食品中藻類毒素之檢驗技術及了解世界各國對有害藻華(harmful algal bloom, HAB)之管理及監控方式，藥物食品檢驗局(以下簡稱為本局)派員赴紐西蘭納爾遜(Nelson)參加由 APEC 舉辦之「藻類及其毒素之分子生物檢驗技術研習會」。與會之收穫包括(1)了解各國監測藻華之系統、管理現況及因應措施(2)研習各國對水中藻類生長情況及海洋毒素偵測之最新技術(3)實地參觀納爾遜當地之海洋毒素檢驗實驗室，了解各種分子生物技術(DNA probe、biochip、ELISA、PCR)及貴重儀器(LC/MS、LC/MS/MS、NMR)於海洋毒素偵測上之應用(4)與藻毒領域之國際性專家請益，並建立溝通之管道等。

目次

摘要.....	1
目次.....	2
前言.....	3
與會國及人員.....	4
內容.....	5
心得與建議.....	14
附件.....	18

前言

水產品藻源毒素所引起的食物中毒依症狀大約可分為五類：麻痺性貝類中毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)、失憶性貝類中毒(amic shellfish poisoning, ASP)、下痢性貝類中毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)、神經性貝類中毒(neurotoxic shellfish poisoning, NSP)、熱帶珊瑚礁魚類中毒(ciguatera fish poisoning, CFP)。這些藻毒成分藉著濾食性生物如雙殼貝等或草食性魚類攝入，再經食物鏈傳遞，蓄積在一些本不具毒性的水產品體內。台灣位處亞熱帶，一些類此之毒藻陸續地被分離與研究，甚至自養殖池中亦可分離出毒藻。近年來隨著台灣加入世界貿易組織(WTO)及兩岸貿易及走私頻繁，水產品衛生安全之檢驗已不限於化學及微生物之檢驗。藻源毒素之問題亦越發受到關注。

亞太經濟合作會議(Asia Pacific Economic Cooperation, APEC)係亞太地區以經濟體(economics)組成分正式諮商論壇，於 1989 年成立，我國以中華台北(Chinese Taipei)名稱於西元 1991 年加入。為避免藻毒問題造成各經濟體及與非 APEC 成員間之水產品往來貿易受阻，2001 年 APEC 中之海洋資源保護(Marine Resource Conservation)工作小組紅潮及有害藻華管理計劃(Red Tide/HAB Project)成立了一

個專戶(Trade and Investment Liberalisation and Facilitation Special Account, TILF), 希望以三年(2001~2004 年)的時間達成以下目的:(1)發展適當的分析方法來監測水產品是否受到污染;(2)發展經驗證之校正標準品(certified calibration standards)與經驗證之參考物質(certified reference materials), 提供進行毒素化學分析鑑定時所需;(3)將上述兩項成果結合, 並以研討會之方式介紹給 APEC 所有會員體中有關執行水產品檢測之單位。執行此三年計劃之主要單位為加拿大國家研究委員會(National Research Council)的海洋生物科學研究所(Institute for Marine Bioscience), 另有來自不同經濟體如紐西蘭、澳洲、中華台北(窗口為台灣大學漁業科學研究所周宏農教授實驗室)、新加坡、日本、美國、加拿大等其他實驗室參與共同研究(collaborative study)。因此, 此次研討會堪稱是一「藻類檢驗技術交流暨成果發表會」。

與會國及人員

參與本次研討會的國家經濟體, 包括下列 25 個 APEC 成員(經濟體)或非成員單位: 澳洲、巴西、加拿大、智利、中國大陸、斐濟、德國、香港、愛爾蘭、義大利、日本、南韓、馬來西亞、墨西哥、紐西蘭、挪威、秘魯、菲律賓、新加坡、蘇格蘭、南非、中華台北、英

國、美國、越南，共有 115 名人員與會。台灣共有三位人員參加，台灣大學漁科所周宏農教授、行政院衛生署藥物食品檢驗局傅幼敏科長及林蘭珏薦任技士。

內 容

此次研討會於 11 月 25 日下午報到，由 11 月 26 日~29 日止舉行四天的會議，11 月 30 日由大會安排至馬爾波羅(Marlborough)地區參觀貽貝養殖場(mussel farm)，了解養殖及採收方式(議程詳見附件一)。四天的會議安排如下：早上為專題報告(plenary session)，由大會邀請各國學者專家做專題演講，並開放討論，使與會者得以直接做意見交流；下午則移師至 Nelson College for Girls 或 Cawthron Institute，進行實地操作(practical session)，在此將由來自不同國家不同實驗室的工作人員展示日新月異的藻類鑑定及毒素分析方法。同時，在 Nelson College for Girls 穿堂亦展示 50 篇海報，內容包含了現今有關藻毒之熱門議題，將於下列文章中詳細討論。

專題報告之議題主要著眼於有害藻華之監測情形及分析方法之建立，又以後者為重。首先由加拿大 Dr. Michael Quilliam 介紹 APEC-TILF project 之由來及成立主旨，揭開了此次研討會序幕。接著，有來自菲律賓、南韓、愛爾蘭之學者介紹該國及歐盟目前有害藻

華之監測情況。在有害藻類鑑定技術方面，加拿大學者發表了原位(*in situ*)監測之技術，澳洲學者介紹以同步聚合酵素鏈反應(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)鑑定水樣中藍綠藻(Cyanobacterium)之成果，紐西蘭 Cawthron Institute 之專家則闡述以去氧核糖核酸探針(DNA probe)鑑定有毒藻類及無毒藻類之快速檢驗方法，並說明將此技術導入 Nelson-Marlborough 魚貝類水產品監測計劃之實施情形。足見為有效區分產毒與不產毒藻類，各國學者已採用分子生物技術來輔佐傳統顯微鏡鏡檢之不足。

在運用生物化學毒性來鑑定毒素方面之報告，更是百家爭鳴，精銳盡出。首先有加拿大及美國學者針對現有偵測方法做綜合性的評估，接著有澳洲學者針對 PSP 的毒性受體毒素分析(receptor assay)、智利學者針對 PSP 的毒性官能基分析(functional assay)、紐西蘭專家針對各種貝類的免疫分析(immunoassay)、日本教授針對 DSP 的蛋白質磷解酵素(protein phosphorylase 2a, PP2A)提出改進方法與期許；同時亦有紐西蘭環境科學研究所之專家提出利用 neuroblastoma assay 做為篩選神經毒素(neurotoxin)的定性方法，可初步判斷是否含有 PSP 或 NSP。

在使用化學儀器鑑定毒素種類及數量方面，各國學者不約而同皆使用高效液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)

搭配質譜儀(mass spectrum)，包括：澳洲學者提出以 LC/MS 監測藍綠藻產生之微囊藻毒，紐西蘭學者除說明以 LC/MS 監測 Eastern oyster 中 NSP 之情況，該國 Cawthron Institute 之專家並且向與會者介紹目前該研究所建立之以 LC/MS 分析 PSP、ASP、DSP、NSP 之方法，並說明導入 Nelson-Marlborough 魚貝類水產品監測計劃之實施情形。除了用於分析鑑定已知毒素，日本一位學者並以 LC/MS/MS 鑑定出 DSP 毒素如 okadaic acid 及 pectenotoxin 之 analogues，於大會中首次發表。

在蒐集水樣及魚貝類檢體方面，紐西蘭 Cawthron Institute 之專家以 ASP 為例，闡述採樣之重要性；同時，該研究所另一位學者提出一種新的採樣技術：Solid Phase adsorption Toxin Tracking (SPATT)，做為原位(*in situ*)監控的利器。此外，亦有紐西蘭相關研究單位之學者以毒理學觀點來探討小白鼠毒性生物分析法之適用性及存在性。其中有一篇報告非常有趣：加拿大 Dr. Joanne F. Jellett 將其實驗室心血結晶發展為市售檢驗 PSP 及 ASP 套組，無奈上市後因單價高、接受度不大之因素面臨公司轉手之命運，這慘痛經驗告訴與會者：「對科學家而言，研發一種新的檢驗方法的確是一項挑戰，但卻只是產品商品化及為大眾接受的一小步而已---困難的還在後面」。此次大會亦在下午實地操作部分展示上述套組。

此次研討會共有 50 張海報張貼，內容大概可分為：監測計劃、案例報告、藻類鑑定技術、毒素分析方法及其他。分述如下：

一、監測計劃：計有越南、科威特、墨西哥、智利、中國大陸、美國等六國發表其於特定地區(海岸、湖畔或水庫)之藻類監測計劃。

二、案例報告：計有挪威發表於棕蟹(brown crab)中引起之 DSP 症狀之報告及巴西藉由報告發生 PSP 中毒事件、引申出研發新的 functional assay 之迫切需求。另外，菲律賓報告在其國家的兩個省中發現會產生熱帶珊瑚礁魚毒 (CFP) 之 ciguatoxic dinoflagellates，並提出相關警訊。

三、藻類鑑定技術：與專題報告部分相呼應，藻類鑑定之技術已跳脫單獨使用顯微鏡，並進階到利用菌種的 DNA 或特定序列來定性及定量。美國諸多大學教授聯合發表以 RT-PCR 針對藻類之 18S SSU rRNA genome 做為 target sequence，目前已可成功鑑定多種會產毒之藻類。在另一篇報告中，澳洲學者與美國學者亦說明如何利用 RT-PCR 鑑定湖水及水庫中會產生肝毒素(alkaloid heptatoxin cylindrospermopsin) 之 *Cylindrospermopsis raciborskii*。由於水庫中蓄積之水流動性較差，若有害藻華一但發生，恐將危害人民用水之安全。因此，巴西聖保羅大學之教授於會中發表有關使用 RT-PCR 來檢測 15 個水庫中 *Microcystis*

spp. 之報告，使用 *mcyB* 序列，在 60 株篩選出菌株中可以成功鑑定 17 株。除了 RT-PCR，德國及加拿大專家亦聯合發表以 long subunit (ls) 或 small subunit (ss) rRNA 做為探針(probe)，鑑定亞歷山大藻 (*Alexandrium* species)，同時搭配 HPLC-FD 或 HPLC/MS 確認，證實此方法可應用於監測系統中。墨西哥學者亦使用 16s rDNA probe 來鑑定水庫中之藍綠藻，以監測水之品質。

四、毒素分析方法：

1. 麻痺性貝毒(PSP)：日本 Dr. Oshima 報告在使用傳統的小白鼠生物毒性分析法鑑定 PSP 時，加入由扇貝(scallop)中萃取的天然毒素做為 in-house reference material，當做品質控管(quality control)之條件。Dr. Oshima 同時發表以 HPLC 搭配管柱後衍生反應(post-column derivatization)及使用螢光偵測器(fluorescence detector)鑑定藻類中之 PSP，並應用到監測系統中。使用管柱後衍生反應者亦有加拿大 Dr. Quilliam 的報告。但 Dr. Quilliam 針對管柱後衍生反應需要花費較多時間之缺點，又提出搭配管柱前氧化反應(precolumn oxidation)之方法，並和其他 18 個實驗室做共同研究(collaborative study)，獲得不錯的成果。除了使用螢光偵測器，Dr. Quilliam 介紹另外一種偵測器

---chemiluminescent nitrogen detector (CLND), 此偵測器可針對含氮化合物(nitrogen containing compounds)反應, 因此舉凡含氮毒素如 PSP、河魴毒素(tetrodotoxin)、anatoxin、螺旋藻毒(spirolide)、ASP 毒素(domoic acid)等皆可使用 LC/CLND 定量。近幾年來 LC/MS 及 LC/MS/MS 技術發展日新月異, 研究藻毒之學者亦善加利用, 發表不少報告。首先, 紐西蘭 Cawthron Institute 專家提出以 LC/MS/MS 鑑定多種藻類毒素殘留分析之方法, 加拿大 Dr. Quilliam 也發表以 hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)/MS 鑑定 PSP 之技術; 新加坡學者向 Dr. Quilliam 取經後, 亦使用相同技術鑑定分離自 *Gymnodinium catenatum* 之 PSP。由於使用化學分析時需要使用經驗證參考標準品及經驗證參考物質, 在這方面執世界牛耳之加拿大國家研究委員會提出三篇報告, 介紹如何自藻類中純化 PSP、如何確認毒素之純度及穩定度及使用核磁共振(magnetic resonance spectroscopy, NMR)來定量。

2. 下痢性貝毒(DSP): 澳洲學者提出以 HPLC 定量自昆士蘭及新南威爾斯省採集之貽貝中之 DSP, 紐西蘭 Cawthron Institute 則使用離子阱(ion-trap) LC/MS 做為鑑定 DSP 相關毒素(yessotoxin 及 pectenotoxin-2)結構之工具。英國學者使用 LC/MS 來分析水

溶性魚貝毒素(lipophilic shellfish toxins)，包括 okadaic acid、pectenotoxin-2 及 azaspiracid-1 等。日本學者與紐西蘭 Cawthron institute 合作，亦以 LC/MS/MS 為分析方法，自貝類檢體中鑑定出 DSP 毒素如 brevetoxin B1 及 PbTx-3，找出在紐西蘭爆發下痢性貝毒之元兇。英國學者也報告在藍貽貝(blue mussel)萃出物中，以 LC/MS 鑑定發現 pectenotoxins、okadaic acid 及 dinophysistoxin-2 等三種 DSP 毒素，這是首次在 *Dinophysis acuta* 中發現有三種毒素同時存在。除了化學分析，紐西蘭 Cawthron Institute 之專家也使用 PP2A 之分析來鑑定 DSP 毒素。

3. 失憶性貝毒(ASP): 失憶性貝毒之高效液相層析分析法是目前 AOAC 建議方法之一(另一項是麻痺性貝毒的小白鼠生物毒性分析)，秘魯學者提出以 HPLC 鑑定採集自其國家之北海岸及南海岸之雙殼貝類中的 ASP 毒素(domoic acid, DA)，並探討氣候之影響。另外，挪威與紐西蘭學者亦共同發表以直接式酵素連結免疫分析反應(direct c-ELISA)鑑定海水中及貝類中之 DA，研究結果顯示可使用於監測系統中。紐西蘭專家以核糖體核糖核酸(ribosomal RNA)做為探針，先自水樣中分離 *Pseudo-nitzschia australis*，再以 LC/MS 鑑定該株菌所產生之 DA 毒素

---isodomoic acid C。

4. 微囊藻毒 (Microcystins)：Microcystins 為藍綠藻 (*Cyanobacterium*) 產生之細胞外代謝物，為肝毒素 (cyclic heptapeptide toxins)，常見於湖水及水庫中，和 anatoxins 統稱為 freshwater toxins，別稱「水庫殺手」。短時間內食用含大量 microcystins 之水會造成肝損傷，長時間飲用則會促進肝腫瘤之產生。近來最受注目之例子為巴西 60 名洗腎患者進行血液透析時使用含有 microcystins 之水而引起肝功能損傷，甚至死亡之案例。世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 因此而訂定飲水中之限量標準為 1 $\mu\text{g/L}$ 。此次研討會德國學者報告以 HPLC 搭配光二極體偵測 (photo-diode-array) 來鑑定水中 microcystins，前處理可使用固相萃取 (SPE-C18) 或免疫親和性管柱 (immunoaffinity column)。此方法並正被國際標準組織 (International Standardization Organization, ISO) 評估中，目前有 30 家實驗室參與共同研究。而澳洲學者有感於使用 HPLC 分析耗時費力，嘗試評估三種市售 ELISA 套組鑑定 microcystins 之可行性，發現僅有一種套組可真正應用於實務上。加拿大和澳洲學者聯手合作，先使用免疫親和性管柱萃取水樣，再使用多株抗體 (polyantibodies) 來篩選水樣中之 microcystins，模擬水樣

中存在着許多不同毒素之真實情形。德國教授發表使用 LC/MS 定量 saxitoxin、DA、OA、anatoxin-A 時，同時可檢測六種 microcystins，並可得知此六種毒素之結構。LC/MS 應用性之廣可見一斑。

5. 其他毒素：Spirolides 為螺旋藻所產生之一群毒素總稱，可在魚貝類親油性(lipophilic)萃出物中發現，注射至小鼠中會引起神經毒症狀(neurotoxic symptoms)，並在 3-20 分鐘內死亡。加拿大 Dr. Quilliam 以 LC/MS/MS 分析藻類及貝類檢體，可靈敏地鑑定不同結構之 spirolides，偵測極限可達 ng/mL。

五、其他：在藻毒的其他議題中，還包括了澳洲學者報告在澳洲海域中發現新的三種雙鞭毛藻(gymnogniniod dinoflagellates)，美國學者探討在兩種 *Pfiesteria shumwayae* 藻類中，造成 ichthyotoxicity 的主要毒素。紐西蘭 Cawthron Institute 是該國研究海洋毒素之學術重鎮，而研究海洋毒素須從培養有毒藻類開始，因此該研究所報告目前所有收集到之菌株及說明如何保存。該所另外呼應 plenary session 中有關 SPATT 之課題，以海報說明 SPATT 之單體構造、如何採樣及進行後續分析。

在實地操作部分，在大會精心安排下，與會者皆有機會實地瞭解最新技術之演進，依分析方法分為六大部分：Cells、probes、

functional assays、immuno assays、LC-MS 及 HPLC。細節詳述於附件二。在會議最後一天，討論小白鼠生物毒性分析法之未來及如何推動新的分析技術應用於監測系統上。各國學者熱烈討論，各抒己見，最後討論出一個共識：雖然以化學儀器如 LC、LC/MS 及 LC/MS/MS 可以鑑別個別毒素及定量，然而考量儀器成本及人員訓練，再加上標準品及參考物質已被列為化學武器，取得所費不貲及有所管制，要推廣成為 AOAC 建議之方法還有一段路要走。因此，小白鼠生物毒性分析法雖然有其缺點(個體差異性及無法辨別個別毒素劑量)，還是有其存在之必要。

心得與建議

此次研討會網羅了世界各國研究海洋毒素的精英，在短短四天時間中吸收各家精華，學習管理與處理有害藻華之技術、最新偵測方法，謹將會議心得與建議摘要如後。

、藻毒分析之跨國合作

此次研討會發表多篇由不同國家實驗室共同合作的結果，亦有多篇有關毒素分析方法的共同研究(collaborative study)報告，顯示開發新的分析方法已不再是單打獨鬥，跨國合作的時代已經來臨。要掌握分析方法的最新脈動，參加相關研討會實屬必要。再

者，由口頭報告或海報論文亦可看出：美國藥物食品管理署 (FDA)、加拿大國家研究委員會及紐西蘭 Cawthron Institute 為當今世界研究海洋毒素之學術重鎮，日本、新加坡等國家皆曾派員學習相關技術後，再返國建立分析系統。若能派員循此模式赴海外相關實驗室研習，相信對提昇國內相關檢驗技術大有助益。

二、藻毒分析之發展方向

雖然非選擇性之小白鼠生物毒性分析法仍有其存在之必要性，但不可否認，LC/MS 已漸成為分析不同種類海洋毒素之有效利器。目前本局有能力執行 PSP 的小白鼠生物毒性分析法及 LC-FD 化學分析法，但既然 LC/MS 有可能成為未來 AOAC 建議之方法，建立 LC/MS 之檢驗方法還是有必要。

三、中國大陸沿海漁獲安全堪憂

此次研討會重點著重於分析方法之建立，然而僅有的幾篇藻華監測報告背後所揭露的意義值得令人深思。有害藻華已普遍發生於全球各地區，雖然台灣由於地形及洋流關係，這方面的問題並不嚴重，但隨著水產品貿易往來頻繁，對於海洋毒素可能帶來之危害仍不可輕忽。中國大陸朱明遠教授於會中發表三年來於山東膠州灣監測 DSP 及 ASP 之報告，與其詳談，得知目前中國大陸對海岸藻華之監測尚未有全面性之通盤計劃，因此與台灣交易頻繁

的大陸東南沿海地區漁獲之安全性堪憂。

四、微囊藻毒素問題

除了魚貝類產品有海洋毒素，綠藻錠及水庫蓄積的水亦有藻類毒素污染之隱憂，值得關切注意。飼養綠藻時通常也會有螺旋藻生長，而螺旋藻會產生 spiroside，加拿大 Dr. Quilliam 曾在會中報告以 LC/MS/MS 分析藻類及貝類檢體，發現不同結構式之 spiroside。微囊藻毒在近年來越來越受重視，除了巴西 60 名洗腎患者死於此毒素引起之疾病，此毒素亦有可能導致水庫水質不堪飲用。2003 年 9 月中央研究院吳俊宗博士曾發出「翡翠水庫微囊藻有暴增傾向」之警訊；台大海洋研究所白書禎教授亦發表一篇「旱象解除、水庫水質無人問」之文章，即是針對水庫水質惡化時由於微囊藻大量增加，而產生微囊藻毒之現象提出嚴重警告。爰此，若能建立相關檢驗技術，將可為消費者健康安全做更嚴格之把關。

五、值得學習之敬業態度

大會安排於 11 月 30 日前往紐西蘭貽貝養殖重鎮---馬爾波羅參觀，行程包括搭乘遊艇前往位於峽灣間的貽貝養殖場，瞭解養殖及採收方式。美國 FDA Dr. Sherwood、韓國 Dr. Kim 等各國研究藻類生態之學者，到不同水域皆蒐集當地水樣，回到遊艇上立即

使用攜帶式光學顯微鏡觀察，瞭解水樣中有何種藻類存在。此種把握各種機會學習之敬業精神及寓工作於日常生活中之專業態度，令筆者折服之際也提出與各位同仁互勉之。

附件

附件一：大會議程

附件二：實地操作紀實

附件一：大會議程 **HABTech 2003 Programme**

Tuesday 25 November

Registration, Welcome and Reception	
1.00-6.00pm	Registration – Rutherford Hotel lobby
6.30-7.30pm	Powhiri – formal welcome from local Maori iwi – Ngati Koata Place: Reception area of Rutherford Hotel
7.30-9.00pm	Reception – Rutherford Hotel (drinks and light supper)

Wednesday 26 November

Plenary Sessions 1 and 2 – Matai Room, Rutherford Hotel	
9.00-10.35	Plenary Session 1 Chairman: Graeme Robertson
9.00-9.15	Welcome and Housekeeping – Graeme Robertson (CEO, Cawthron)
9.15-9.30	Official Opening
9.30-9.35	G. Roam – APEC Perspective
9.35-9.45	Mike Quilliam – Conference Goals
9.45-10.15	Mike Quilliam – APEC Toxins Project – achievements
10.15-10.35	T. Yasumoto - Development of methodology
10.35-11.00	Morning Break
11.00-12.35	Plenary Session 2 Chairman: Helen Smale
11.00-11.20	S. Hall – USFDA Perspective
11.20-11.40	Philipp Hess "Irish monitoring programme and LCMS - situation in EC"
11.40-12.00	P. Busby – NZ Perspective
12.00-12.20	<u>Kim, HakGyoon</u> , Kang, YoungShil, Kim, KuiYoung, Lee, ChangKyu, Lim, WolAe, Kim, SookYang, Lee, TaeSeek, Kim, JiHoe. "Korean HABs programs for the detection of harmful algae and the determination of biotoxins in seafood."
12.20-12.35	Panel Discussion Moderator: Helen Smale
12.35-2.00	Lunch Break
2.00-5.30	Practical sessions 1 & 2 – Laboratories, Nelson Girls College
5.30-6.30	Poster session 1 and refreshments

Thursday 27 November

Plenary Sessions 3 & 4 – Matai Room, Rutherford Hotel	
9.00-10.35	Plenary Session 3 Chairman: Alan Campbell
9.00-9.20	<u>John C. Wekell</u> , Sylvester G. Spenser, Vera L. Trainer, Dan Ayres and Doug Simons "Variability of domoic acid levels in razor clams - impact on strategies for sampling and management of ASP"
9.20-9.40	<u>Toshiyuki Suzuki</u> , Veronica Beuzenberg, Lincoln Mackenzie & Michael A. Quilliam "Novel okadaic acid and pectenotoxin analogues in <i>Dinophysis acuta</i> collected in New Zealand"
9.40-10.00	Rex Munday "Toxicological studies and risk assessment of shellfish toxins"
10.00-10.20	James F. Lawrence "Method development and validation for algal toxins: Canadian situation"
10.20-10.35	Panel Discussion – Moderator: Alan Campbell
10.35-11.00	Morning Break
11.00-12.35	Plenary Session 4 Chairman: Roger Belton
11.00-11.20	Rhodora V. Azanza "Paralytic shellfish poisoning (PSP's) in the Philippines and the Southeast Asian harmful algal bloom (HAB) situation"
11.20-11.40	Benjamin A. Suárez-Isla "Need for new functional assays for marine toxins. The case of recent PSP outbreaks in Chile"
11.40-12.00	<u>Lyndon E. Llewellyn</u> , Cedric Robillot, Daniel Kineavy, Jim Burnell, Julie Fletcher & Brett Kettle "Receptor assays for paralytic shellfish poisons and their utility on biochips"
12.00-12.20	<u>Penelope Truman</u> & Peter Northcote "Effect-based assays in biotoxin monitoring – the neuroblastoma assay for neurotoxic shellfish poisoning toxins"
12.20-12.40	<u>Robert W. Dickey</u> , Zhihong Wang, Steven M. Plakas, Kathleen R. El Said, Edward L.E. Jester & H. Ray Granade "Assessment of methods for determination of Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP) toxins in the Eastern oyster (<i>Crassostrea virginica</i>)"
12.40-1.00	Panel Discussion – Moderator: Roger Belton
1.00-2.30	Lunch Break
2.30-6.00	Practical sessions 3 & 4 – Laboratories, Nelson Girls College
6.00-7.00	Poster session 2 and refreshments

Friday 28 November

Plenary Sessions 5 & 6 – Matai Room, Rutherford Hotel	
9.00-10.35	Plenary Session 5 Chairman: Russell Mincher
9.00-9.20	<u>Patrick Holland</u> , Paul McNabb, Andy Selwood & Tracey Neil "LC-MS methods for marine biotoxins and their introduction into New Zealand shellfish regulatory programmes"
9.20-9.40	Geoffrey Eaglesham "Cyanobacterial Toxins - Applications of high performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS)"
9.40-10.00	<u>Allan Cembella</u> , Michael Quilliam, Nancy Lewis, Diego Ibarra, Cheryl Rafuse, Joanne Jellett, Richard Davis, Stephane Kirchoff & John Cullen "Strategies for <i>in situ</i> detection of harmful algal blooms and their toxins in coastal waters"
10.00-10.20	<u>Lincoln Mackenzie</u> , Veronica Beuzenberg, Patrick Holland, Paul McNabb, Andy Selwood, Tracey Neil & Sandy Vale "Solid-phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new and highly effective <i>in situ</i> bio-toxin monitoring tool"
10.20-10.35	Panel Discussion – Moderator: Russell Mincher
10.35-11.00	Morning Break
11.00-12.35	Plenary Session 6 Chairman:
11.00-11.20	Lyn R. Briggs "Immunoassay development for shellfish toxins"
11.20-11.40	Joanne F. Jellett "So you want to swim with the sharks? - Turning science into business with the Jellett Rapid test for PSP"
11.40-12.00	<u>Lesley Rhodes</u> , Janet Adamson and Melissa Gladstone "DNA probes: the molecular answer for rapid detection of toxic micro-algae"
12.00-12.20	<u>Christopher Saint</u> , Paul Monis, Steven Giglio, Rebecca Campbell & Kim Fergusson "Molecular detection of cylindrospermopsin-producing cyanobacteria"
12.20-12.35	Panel Discussion Moderator:
12.35-2.00	Lunch Break
2.00-5.30	Practical sessions 5 & 6 – Laboratories, Nelson Girls College
5.30-6.30	Poster session 3 and refreshments

Saturday 29 November

Plenary Session 7 – Matal Room, Rutherford Hotel	
10.30-12.30	Hot topics in HAB and MBTX testing, and issues arising from the workshop. 2 x 45min discussion sessions plus break. Details to be decided. Moderator:
12.30-1.00	Mike Quilliam APEC Project – final report
1.00-1.30	Closing Ceremony
7.00-11.00	Workshop Dinner "The Boathouse"

Sunday 30 November

Field Trip	
9.00am	Depart Rutherford Hotel
	Bus to Havelock Launch trip through scenic Marlborough Sounds. Inspect mussel growing areas.
12.00-1.00pm	Lunch at Portage
1.00pm	Return to Havelock by launch.
3.00pm	Inspect mussel harvester
3.30-4.00pm	Free time in Havelock township
4.00pm	Depart for Nelson Visit Pelorous scenic area
5.30pm	Arrive Rutherford Hotel

HABTECH 2003 WORKSHOP

POSTER PROGRAMME

Note 1: All posters are at Nelson Girls College and will be displayed Wednesday to Friday.

Note 2: "D" denotes poster in demonstration area.

POSTER SESSION 1	Authors present: 5.30-6.30pm on Wednesday
P1 Khuc Tuan Anh	Shellfish Monitoring Programme in Viet Nam
P2 Tore Aune	Brown crabs (<i>Cancer pagurus</i>) induced DSP-symptoms in several hundred persons in Norway in summer 2002
P3 Marcelo Barros	Relationships between eutrophication, the occurrence of algal blooms and antioxidant activity in microalgae
P4 Frank Benoit	Anti-MCYST antibodies possessing broad specificity against microcystins: ELISA and immunoaffinity columns application
P5 Carmelita Bigueras-Benitez	Occurrence of Ciguatoxic Dinoflagellates in Two Provinces in the Philippines
P6 Biosense Abstract	Interlaboratory validation study of the ASP Direct cELISA for the determination of Domoic acid in shellfish and seawater
P7 Holly Bowers (D)	Real-time PCR Assays for Harmful Algal Bloom Species
P8 Eri Carroll	Detection of toxins in shellfish from Queensland and Northern New South Wales, Australia
P9 Allan Cembella	Application of rRNA-targeted Molecular Probes and Chemical Analytical Methods to Discriminate among Toxicogenic <i>Alexandrium</i> Species
P10 Jens Dahlmann	An ISO Method-Protocol for Determinating Microcystins in Raw and Treated Waters
P11 Jens Dahlmann	An LC-MS based method for simultaneous determination of Harmful Algal Bloom (HAB) toxins coupled with structure elucidation of microcystins
P12 Miguel de Salas	Taxonomy, morphology, and genetic affinities of three new species of small marine Australian gymnodinoid dinoflagellates
P13 Julianne Dyble	Detecting the presence and activity of the cyanobacterial HAB species <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> using RT-PCR based approaches
P14 Andrew Gordon	Relative contribution of toxin and micropredation to ichthyotoxicity of two strains of <i>Pfiesteria shumwayae</i>
P15 Andrew Gordon	<i>Pfiesteria</i> – associated toxin affects salinity tolerance of Tilapia (<i>O. niloticus</i>)

POSTER SESSION 2**Authors present: 6.00-7.00pm on Thursday**

- P16 Michael Holmes Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-tandem mass spectrometry (MS) analysis of paralytic shellfish toxins (PST) from Singapore isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae)
- P17 Hitoshi Ishida Confirmation of brevetoxin B1 and PbTx-3 in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand by quantitative determination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry
- P18 M. Rufus Kitto HAB Dynamics in Kuwait – challenges and solutions for aquaculture
- P19 Chris Miles Ion-Trap LCMS as a tool for structural characterisation of marine algal toxins
- P20 Steven Morris The first report of the co-occurrence of pectenotoxins, okadaic acid and dinophysistoxin-2 in shellfish from England
- P21 Doug Mountfort (D) Removing the matrix effect in the protein phosphatase inhibition assay for DSP Toxin in Shellfish: a pre-requisite to acceptance of the assay
- P22 Y. Oshima Method for the determination of PSP in natural plankton samples and its application for the monitoring
- P23 Y. Oshima Quality control of PSP mouse bioassay using in-house reference material prepared from naturally contaminated scallops
- P24 Ruth Pérez Calderon Determination of domoic acid (ASP Toxin) in bivalve molluscs by high performance liquid chromatography (HPLC) in extraction areas (north and south coast of Peruvian ocean) by the influence of temperature variations
- P25 Jesús Pérez-Linares Characterization of the 16S ribosomal sequences (rDNA) in cyanobacterial isolates associated with toxicity events
- P26 Jesús Pérez-Linares Evaluation of dinoflagellate toxicity implicated in recent HAB events in the Gulf of California, Mexico
- P27 Ernani Pinto A method based on PCR analysis to detect *Microcystis* spp. in Brazilian reservoirs
- P28 Krystyna Ponikla (D) Cawthron Culture Collection of Micro-algae
- P29 Lesley Rhodes Cryopreservation of micro-algae
- P30 Lesley Rhodes (D) Production of isodomoic acid C by *Pseudo-nitzschia australis*, as determined by DNA probe and LC-MS technologies

POSTER SESSION 3**Authors present: 5.30-6.30pm on Friday**

P31 Gian Paolo Rossini	A functional assay for the measurement of yessotoxins in contaminated biological samples
P32 Pat Holland	A multiresidue LC-MS method for algal toxins in shellfish: validation and interlaboratory studies
P33 Miriam Seguel	Harmful algal blooms associated to mussels culture in southern Chile
P34 Glen Shaw	Toxicological effects of pectenotoxin-2-seco acids: implications for public health
P35 Elizabeth Smith	Consumer safety and environmental science: The requirement for rapid tests for marine biotoxins and phytoplankton identification
P36 Lesley Stobo	Combating matrix effects in the LC-MS analysis of lipophilic shellfish toxins
P37 John Wekell	Increased magnitude, frequency and geographical spread of harmful algal blooms in Puget Sound, Washington State, USA
P38 Wasa Wickramasinghe	Evaluation of several commercial ELISA kits for the detection of microcystins in drinking water
P39 Mingyuan Zhu	Monitoring of PSP and DSP toxins and toxic algae in Jiaozhou Bay over the last 3 years
P40 Mike Quilliam	Quantitation of phycotoxins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹ H-NMR) for the production of certified standards
P41 Mike Quilliam	Analysis of phycotoxins in hand-picked plankton cells by micro-column liquid chromatography-tandem mass spectrometry
P42 Krista Thomas (D)	Analysis of PSP toxins by liquid chromatography with post-column oxidation and fluorescence detection
P43 Krista Thomas (D)	Preparation of a mussel tissue reference material for PSP toxins
P44 Krista Thomas (D)	Certified reference materials for shellfish toxins
P45 Mike Quilliam	Analysis of natural toxins by liquid chromatography and chemiluminescent nitrogen detection
P46 Mike Quilliam	Analysis of spirolide toxins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry
P47 Mike Quilliam	Analysis of PSP toxins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

附件二：實地操作紀實

主題：The brain slice assay- a novel tissue recording system for neurophysiology and neuropharmacology research applications

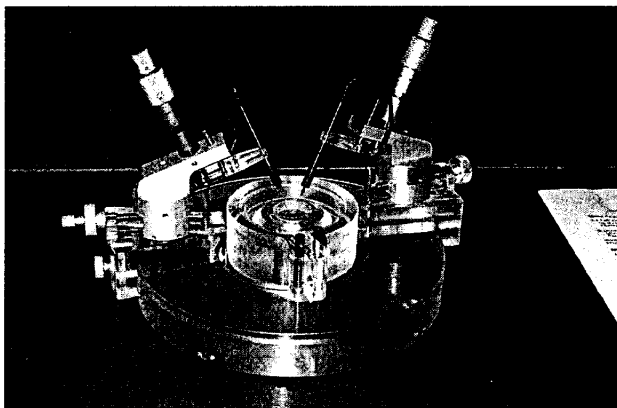
說明者：Steve Kerr

單位：Department of Pharmacology & Toxicology, University of Otago School of Medical Science, Dunedin, New Zealand

一、目的及原理：

腦細胞具有許多 ion channels 及不同 receptor，因此使用大鼠(rat)腦細胞切片來快速判定樣品是否含有可以阻斷 ion channel 的毒素(如：麻痺性貝毒及神經性貝毒)。腦細胞切片置於凹層中，將檢液滴入腦細胞切片，左右電極同時通電並以訊號放大器連接於電腦監測，藉由電波之變化可得知檢液中是否含有毒素。

二、儀器設備：



主題：Probes and DNA chip technology-macro and micro views

說明者：Linda Medlin

單位：AWI, Am Handelshafen, Bremerhaven, Germany

一、目的及原理：

1. Biochip：利用 DNA 微點陣技術(DNA microarray)，將不同產毒藻類的 DNA 或 RNA 鑲嵌在載玻片或尼龍薄膜上，再與從樣品萃得之 DNA 或 RNA fragment 進行雜交(hybridization)，可同時檢測出九種產毒藻類。
2. FISH：利用螢光原位雜交(fluorescence in situ hybridization，簡稱 FISH)，不必破壞細胞(省略萃取步驟)，可以在 30 秒內同時鑑定樣品中是否含有產毒藻類。

二、實驗操作：

1. Biochip：

sample→extraction→DNA(RNA) fragments obtained→incubate 5 min→buffer, probe added→hybridization added→incubate 1 hr→put in the biochip→capture probe added→45°C, 1 hr→washing with buffer→dry→antibody added→incubate→dry→read with reader

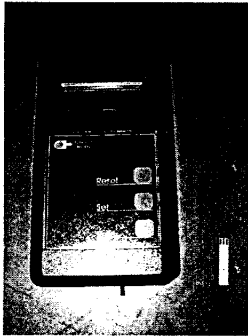


Fig2 . Hand-held DNA microchip reader

2. 螢光原位雜交(fluorescence in situ hybridization, FISH)

Algae sample→put the probe in appendorf, then algae sample→incubate in 50°C to hybridize→put the hybridization product in the membrane→dry→put it in the reader→read the result through monitor or microscope

主題：The micro-algae world

說明者：Melissa Gladstone

單位：Cawthron Institute, Nelson, New Zealand

一、目的及原理：

利用輕便的光學顯微鏡及外接數位相機，可以隨時隨地於水邊以特殊取樣管取得水樣，再對照毒藻之圖譜，可立即監測水中是否有產毒藻類生長。

二、儀器圖示：



所需儀器設備清單：

Flat capillary tubes：用以沾取水樣，可直接置於顯微鏡下觀察。(0.3 mm×3 mm×10 cm)

Field Microscope：攜帶式光學顯微鏡，放大倍率為 4×，10×及 40×。(Swift FM-31 WD Field Microscope)

Viewcam：具有 4 吋螢幕之數位相機。(Sharp Hi-8 Viewcam)

主題：An automated DNA probe-based assay for the detection of fish-killing microalgae

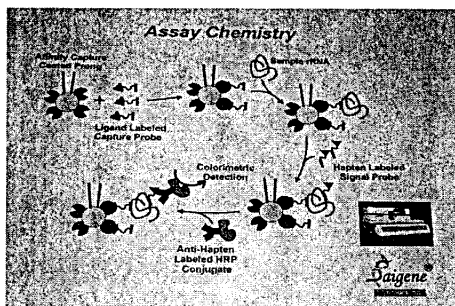
說明者：Melissa Gladstone

單位：Cawthron Institute, Nelson, New Zealand

一、目的及原理：

以顯微鏡觀察水中藻類型態，是最原始、簡單可得知水樣中是否有產毒藻類生長的方法。然而，有時產毒藻類與不產毒藻類型態相近，或數量太多難以計算，易造成判斷上之困難。利用 DNA 探針(DNA probe)來捕捉海水中產毒藻類之核糖體 RNA(ribosomal RNA)，再以分光光度計偵測吸光值(optical density)，可在 1 小時內同時偵測三種型態相近的藻類並計算其數量，彌補上述單純用顯微鏡觀察時之缺點。

原理示意圖：

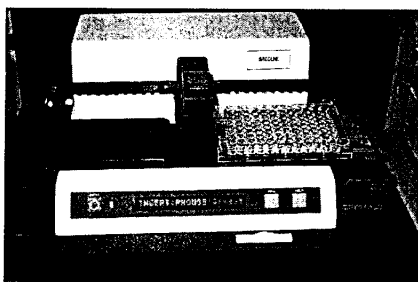


二、實驗操作

此次使用之商業化 96-well plate 可偵測 *Heterosigma akashiwo* 及 *Fifrocapsa japonica* 兩種 fish-killing fragile raphidophytes。

Sea water samples → add buffer solution → extraction → put the extract into the plate → incubate to hybridized with capture probe → add hapten labeled signal probe → incubate → wash → add anti-hapten labeled HRP conjugate → colorimetric detection

偵測吸光值儀器圖示：



主題：DNA probes for monitoring toxic micro-algae: a risk management tool for marine biotoxins

說明者：Lesley Rhodes

單位：Cawthron Institute, Nelson, New Zealand

一、目的及原理：

以顯微鏡觀察藻類型態所帶來的缺點為：有毒藻類及無毒藻類型態相近及計數上之困難，而 whole cell format DNA probe 的問世，可以不用經過萃取步驟，直接捕捉海水中目標藻類之核糖體 RNA(ribosomal RNA)，再以顯微鏡(inverted microscope)觀察，將可減少誤判情形發生。

二、實驗操作：

Cut the centrifuge tube→connect to the cartridge→rinse with buffer→add sample(whole cell)→add probe→inspect with inverted microscope

主題：Real-time PCR assays for harmful algal bloom species

說明者 Holly Bowers

單位：University of Maryland, Institute of Human Virology, Baltimore MD, USA

一、目的及原理：

利用同步聚合酶鏈反應(real-time PCR)，可以針對藻類的特定序列加以增值，偵測海水中型態相近的產毒藻類及不產毒藻類，避免誤判；並且可同時定量。

此次示範的菌種為 *Microcystis spp.*，為常見於水庫之藻類。選用之特定序列為 *mcyB*(codes for microcystin synthetase)。

二、實驗操作

增值反應(amplification)

2 μ L of DNA extract, 5 p mol of each primer(FAA 5'-CTATGTTATTTATACAT CAGG-3') and RAA 5'-CTCAGCTTAACTTGATTATC-3'. 2.5 U of Taq polymerase with buffer(1.5 M MgCl₂) and 200 μ M of each dNTP.

Parameters:

94°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 10 s., 40°C for 20s. 72°C for 1 min, followed by the final extension at 72°C for 5 min.

Aliquots of PCR reaction products were electrophoresed in 0.7% agarose gels containing 10 μ g/mL ethidium bromide.

主題：Introduction to electrospray LC-MS using domoic acid as an example

說明者：Andy Selwood

單位：Cawthron institute, Nelson, New Zealand

一、目的及原理

以高效液相層析儀(HPLC)搭配紫外光檢出器(UV detector)及質譜儀(mass spectrum)，定性及定量失憶性貝毒(amneic shellfish poisoning)的 domoic acid 及 iso-domoic acid C。實驗中將使用來自加拿大 NRC(National Research Council)實驗室的 CRM(certified reference material)-DA(domoic acid)、將 CRM 加入 mussel 後的萃出物及未知樣品等三種。

二、實驗操作：

Homogenize shellfish and weigh a 4 g sub sample into 50 mL tube→add 16 mL 50% methanol and extract with high speed blender→centrifuge and remove supernatant→dilute 1:10 with 10% acetonitrile and run trough C18 cartridge → qualified and quantified with LC/MS

Conditions of LC/MS:

Column: RP-18, 5 μm , 4.6 mm \times 150 mm

Mobile phase: A: 33% methanol

B: 500 mM formic acid / 40 mM ammonium hydroxide

Mix 90% A and 10% B

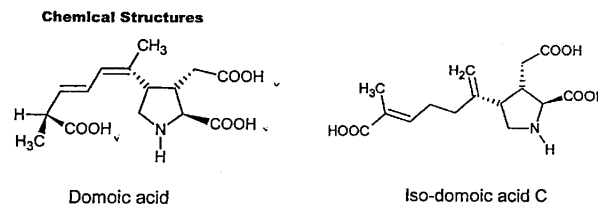
Flow rate: 0.2 mL/min

M+H⁺: 312.2 for SIR(selected ion recording)

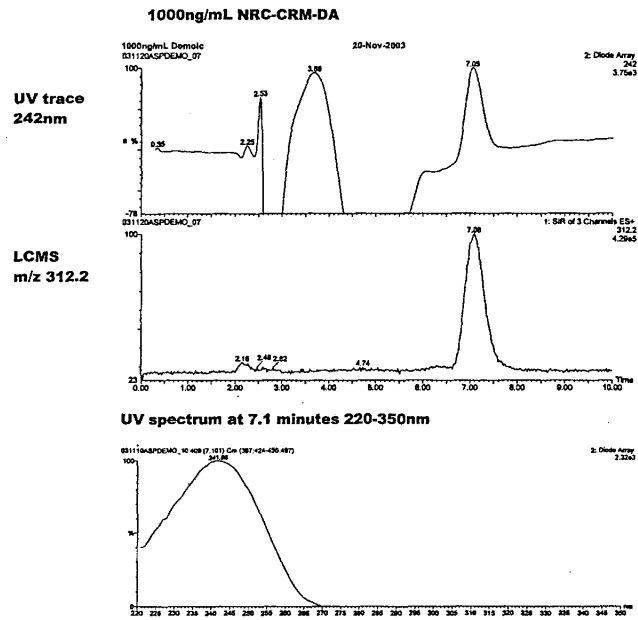
Detector: UV at 242 nm

MRM channels: 312.2 > 266.2 and 312.2 > 161.2

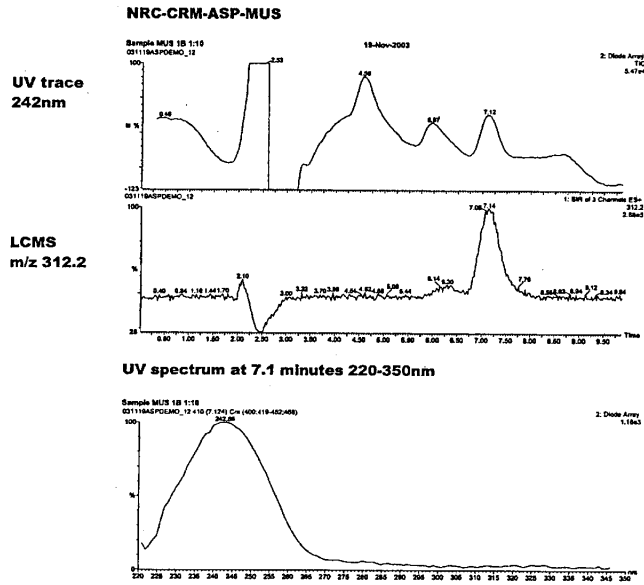
三、附圖



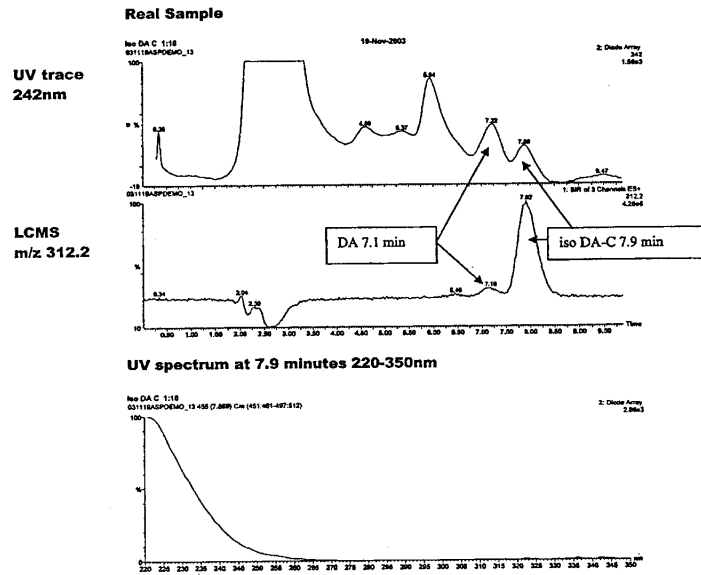
圖一、Domoic acid 及 Iso-domoic acid C 結構式



圖二、上圖：以 DAD 242 nm 偵測 NRC-CRM-DA(1000 ng/mL)之圖譜；
 中圖：以 LC/MS ES+ 偵測 NRC-CRM-DA 之圖譜(m/z 312.2)；
 下圖：以 UV 220-350 nm 波長掃描滯留時間(retention time)為 7.1 min 時
 之波峰



圖三、上圖：以 DAD 242 nm 偵測加入 NRC-CRM-DA(1000 ng/mL)標準品的貽貝(mussel)檢體圖譜；
 中圖：以 LC/MS ES+ 偵測加入 NRC-CRM-DA 標準品的貽貝檢體圖譜(m/z 312.2)；
 下圖：以 UV 220-350 nm 波長掃描滯留時間(retention time)為 7.1 min 時之波峰



圖四、上圖：以 DAD 242 nm 偵測貽貝(mussel)檢體圖譜；
 中圖：以 LC/MS ES+ 偵測貽貝檢體圖譜(m/z 312.2)；
 下圖：以 UV 220-350 nm 波長掃描滯留時間(retention time)為 7.1 min 時
 之波峰

主題：Introduction to electrospray LC-MS/MS using okadaic acid as an example

說明者：Paul McNabb

單位：Cawthron institute, Nelson, New Zealand

一、目的及原理

以高效液相層析儀(HPLC)搭配紫外光檢出器(UV detector)及 triple quadrupole MS/MS，定性及定量下痢性貝毒(diarrhetic shellfish poisoning)的 okadaic acid。HPLC 可以分離出單一毒素，第一個 MS 可以決定最大的離子片段(parent ion)，針對此離子再撞擊、分裂可得第二個離子片段(daughter ion)。實驗中將使用來自加拿大 NRC(National Research Council)實驗室的 CRM(certified reference material)-OA(okadaic acid)作為標準品，建立標準圖譜後，將樣品所得質譜與其比較，可求得樣品中毒素含量。

二、實驗操作：

Homogenize shellfish and weigh a 2 g sub sample into 50 mL tube→add 18 mL 90% methanol and extract with high speed blender→centrifuge and remove supernatant→hexane wash and centrifuge → qualified and quantified with LC/MS/MS

Conditions of LC/MS/MS:

Column: RP-18, 5 μ m, 4.6 mm×150 mm

Mobile phase: 60% acetonitrile 50 mM formic acid/ 4 mM ammonium hydroxide

Flow rate: 0.2 mL/min

M+H⁺: 803.5 (m/z)

MRM channels: ES - 803.5 > 255 and ES + 822.5 > 751.5

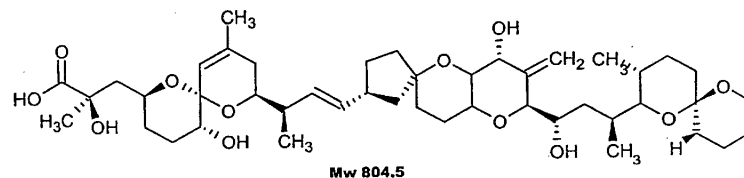
Detector: UV at 242 nm

注意事項：

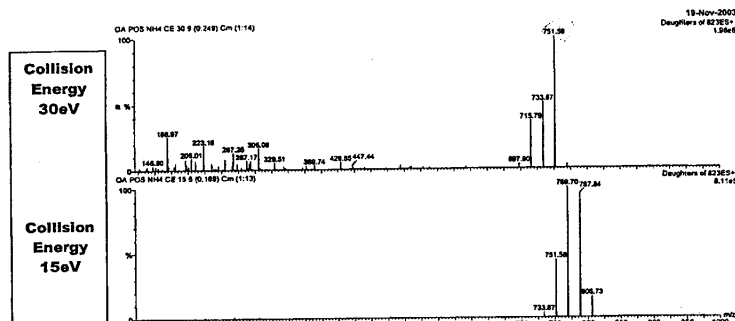
- 1.偵測 DTX-2 時使用相同 m/z 值，測 DTX-1 時 m/z 值須加上 14。
- 2.同時偵測多種海洋毒素(如 DSP, PTX, YTX)時，移動相溶液須使用梯度。
3. DSP-ester 在上機前須先經過水解步驟：

1 mL extract 加入 125 μ L 2.5 N NaOH →76 °C，40 min →冷卻，調整 pH 到中性→過濾→濾液。

三、附圖



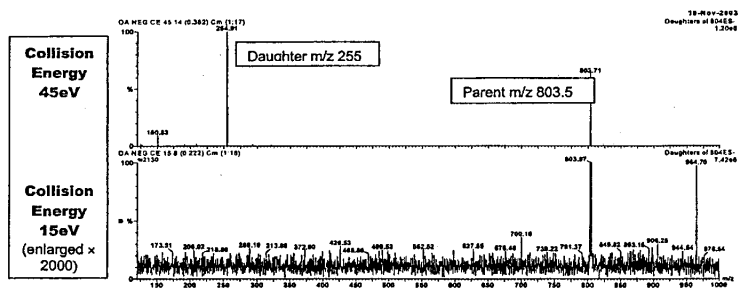
圖一：Okadaic acid 結構式



圖二、將 OA 以 positive ionization 處理，可得質量為 822.5 之 $[M+NH_4]^+$ 物質 (parent ion)。此物質再經第二次離子化(positive ionization)，施以不同能量(不同電壓)，可得不同離子片段(fragment)。

上圖：電壓為 30 eV 時所產生之離子片段，主要片段為 751.56。

下圖：電壓為 15 eV 時所產生之離子片段，主要片段為 769.7。



圖三、將 OA 以 negative ionization 處理，可得質量為 803.5 之 $[M+H]^-$ 物質 (parent ion)。此物質再經第二次離子化(negative ionization)，施以不同能量(不同電壓)，可得不同離子片段(fragment)。

上圖：電壓為 45 eV 時所產生之離子片段，主要片段為 255。

下圖：電壓為 15 eV 時所產生之離子片段，主要片段為 804。

實際分析樣品時，係採用此條件。比對樣品與標準品圖譜上的面積，可以

求得樣品中 OA 之濃度。

主題：Analysis of PSP toxins by liquid chromatography with pre- or post- column oxidation and fluorescence detection

說明者：Krista Thomas

單位：Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canada

一、目的及原理：

以 HPLC 分離，配合管柱後氧化(post-column oxidation)，再以螢光偵測器(fluorescence detector)偵測，可以檢測所有的麻痺性貝毒(saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxins)，但需要較多時間。若將移動相溶液由 isocratic 改變為 gradient，可節省三分之二的時間。

二、實驗操作：

1. 現有文獻之方法

檢液之製備：

homogenize shellfish and weigh a 100 g sub sample into 500 mL container→add 100 mL 0.1 N HCl and extract with blender→heat to the boiling point for 5 min→cool to room temp. →adjust pH to 2.0~4.0 →centrifuge and remove supernatant→qualified and quantified with HPLC

高效液相層析條件(Y. Oshima, *JAOAC Int* 78, 528)

Column: RP-C8, 5 μ m

Mobile phase:

For GTX-1~6, dcGTX-2, dcGTX-3: 2 mM NaHSA in 10 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ buffer(pH 7.3)

For C-1~C-4: 2 mM $\text{N}(\text{Bu})_4\text{H}_2\text{PO}_4$ buffer(pH 5.8)

For STX, neoSTX, dcSTX: 2 mM NaHSA in 30 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 7.1): CH_3CN = 93:7

Flow rate: 0.8 mL/min

Oxidant: 7 mM HIO_4 in 50 mM K_2HPO_4 (pH 9), 0.25 mL/min

Reaction coil: 10 m teflon coil(i.d. 0.3 mm), 85°C

Acid: 0.5 M CH_3COOH , 0.25 mL/min

Detector: fluorescence detector, Ex: 330 nm, Em: 390 nm

需要進行三次層析，才可分析所有的 PSP 毒素。

2. 改良之方法

檢液之製備

homogenize shellfish and weigh a 100 g sub sample into 500 mL container→add 100 mL 1 % acetic acid and extract with blender→cleanup with SPE-C18→cleanup with SPE-WCX →oxidation→qualified and quantified with HPLC

高效液相層析條件

Column: Zorbax Bonus-RP, 3.5 μ M, 2 \times 100 mm

Mobile phase:

A: 20 mM heptane sulphate, 10 mM ammonium phosphate, pH7.1

B: 30 mM ammonium phosphate, 23% acetonitrile

C: water

Gradient: 55% A 45% C until 22 min, step to 55%A, 35%B, 10 %C at 22.1 min, hold to 43 min.

Oxidant: 100 mM ammonium phosphate with 5 mM periodate, pH 7.8, 0.1 mL/min

Reaction coil: 10 m teflon coil(i.d. 0.3 mm), 85°C

Acid: 0.75M HNO₃, 0.1 mL/min

Detector: fluorescence detector, Ex: 330 nm, Em: 390 nm

可以同時分析 GTXs, NEO, dcSTX 及 STX。

WCX cleanup :

Fraction #	Elution solution	Toxins
1	Effluent+ wash	C1-C4
2	0.05 M NaCl	GTX1-4, B1, B2
3	0.3 M NaCl	STX, dcSTX, NEO

主題：A simple and rapid microplate assay method for okadaic acid using protein phosphatase 2a

說明者：Sei Sato

單位：Japan Food Research Laboratories

一、目的及原理

下痢性貝毒(diarrhetic shellfish poisoning, DSP)之主要毒素為 okadaic acid(OA)，毒性主要作用於對蛋白質磷脂酵素(protein phosphatase 2a, PP2A)之抑制。利用自日本貝類(*Neptunea arthritic*)中萃取之 PP2A 及已商品化之 *p*-nitrophenyl phosphate 做為基質，再加入水樣及貝類樣品，利用產物在分光光度計下之讀值，可測定樣品中 OA 含量。

二、實驗操作

檢液之製備

Take 2g whole tissue homogenate→homogenize, 1 min→centrifuge for 10 min→extract supernatant→50 μL of the extract supernatant with 950 μL of sample buffer

水解反應

To 500 μL of the extract supernatant add 100 μL of 1.25 N NaOH→vortex mixer→heat the tube for 20 min, 100°C→cool the tube to room temp. →neutrlize with 100 μL 1.25 N HCl→take 50 μL and add 950 μL of sample buffer→vortex mixer

基質反應溶液之製備(substrate working solution)

Take the substrate tablet in 15 mL polyethylene tube→wrapped with aluminium foil→12 mL of the substrate buffer

PP2A 反應溶液之製備(PP2A working solution)

Mixing the whole contents of PP2A buffer A and B→Take 1.0 mL PP2A stock solution in 15 mL polyethylen tube→add 9.0 mL PP2A buffer→vortex mixer→keep at 4-6°C

呈色反應

Add to each well 100 μL of substrate working solution→add to each well 100 μL of PP2A working solution→gently mix for 1 min→place a lid→incubate(30 min, 36°C) →measure the color at 405 nm(reference at 492 nm)

主題：A fluorometric protein phosphatase assay for DSP toxins

說明者：Douglas Mountfort

單位：Cawthron Institute, Nelson, New Zealand

一、目的及原理

原理同前一個實驗。利用 4-methylumbelliferyl phosphate 及 fluorescein diphosphate 在 PP2A 作用下會產生螢光物質的特性，將水樣及貝類樣品萃出物加入上述基質中，偵測其於螢光光度計下之讀值，可測定樣品中 OA 含量。靈敏度較以分光光度計偵測者佳。

二、實驗操作

分析用溶液之製備

Stock CaCl_2 soln.: 0.1 M in distilled water.

Assay soln. A: 3.1 g tris(hydroxymethyl) methylamine in 300 mL of water(5 mL of CaCl_2)

Assay soln. B: NiCl_2 (9.51 mg/mL)in distilled water

Assay soln. C: bovine serum albumin (fraction V) at 10 mg/mL in assay soln. A

Assay soln. D: sodium cholate(2.9 mg/mL) in assay soln. A

Assay soln. E: 4-methylumbelliferyl phosphate at 1.7 mM(5 mg/mL) in assay soln. A

Assay soln. F: PP2A at 10 U/mL

檢液之製備

5 g whole shellfish tissue→add 5 parts of 90%methanol(v/v)→homogenize, 1 min below 10°C→filtration by Whatman No 541→take 1.0 mL of filtrate and add 125 μL of 2.5 N NaOH→heat at 76°C for 40 min→cool and neutralise by addition of 125 mL of 2.5 N HCl→transfer to a 5 mL capacity container and make volume to 4 mL using assay soln. A→adjust pH to 7.0→take to the final volume to 5.0 mL with assay soln. A, this is the hydrolysed sample→take another 1.0 mL sample adjust pH to 7.0→take to the final volume to 5.0 mL with assay soln. A, this is the non-hydrolysed sample

基質之製備

warm 8 mL of assay soln. A→add 2 mL of assay soln. E→store at 37°C for 15 min

呈色反應

add 0.4 mL of assay soln. A to PP2A vial→add 1 part of enzyme to 6 part of the mixture which mix assay soln. A,B,C and D in the ratio 2:1:7:2 →add 70 μL of enzyme assay mix to all sample→add the pre-warmed substrate soln. (120 μL) →measure by real time kinetics(Ex: 360nm;Em:460 nm)in the microplate reader for 1 hr at 37°C→determine activity by linear regression of the reaction curves

to give slope/min

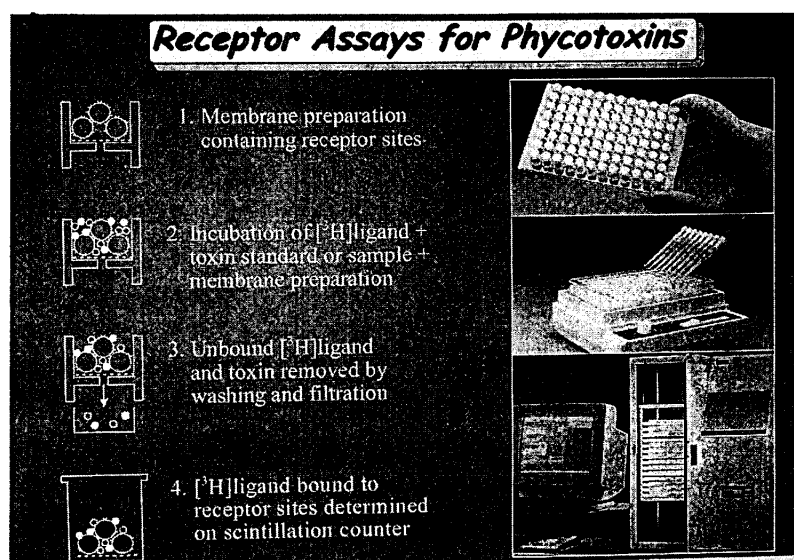
主題：Receptor binding assay(RBA) for domoic acid using a cloned glutamate receptor and microplate format

說明者：Patric T. Holland

單位：Cawthron Institute, Nelson, New Zealand

一、目的及原理

失憶性貝毒(Amnesic shellfish poisoning, ASP)之主要毒素為 domoic acid (DA)，其毒性為在腦與中央神經系統上干擾谷氨酸(glutamate)的正常傳導機制。利用放射性 ^3H -kainic acid 在 SF9 昆蟲細胞上之谷氨酸接受器上被 DA 取代之特性，可用以檢測樣品中是否含有 OA(原理如圖示)。再配合 96-well microplate 及閃爍計數器(multiwell scintillation counter)，可應付大量樣品分析之需求。



二、實驗操作

檢液之製備

shellfish was extracted with 50% methanol→incubated with glutamate decarboxylase(GAD) to remove glutamate

GLUR6 接受器之製備

SF9 cell was grown at 27°C in Grace's medium→infected with baculovirus and harvested at 72 hr postinfection by centrifugation→cell pellet was homogenized by polytron in 5 mM Tris-HCl, 0.1 M PMSF and 1 mM EGTA→centrifuged at 50000 g for 30 min→pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM PMSF and centrifuged at 50000 g for 30 min→repeat twice→resuspended in 50 mM Tris-HCl and 0.1 mM PMSF→determine the protein concentration

³H-kainic acid 飽和預備試驗

GLUR6 membranes(0.1 mg protein/mL) were incubated with 35 mL of increasing concentration of ³H-kainic acid(15.2 Ci/mM) in 50 mM Tris-HCl for 1hr at 4°C →nonspecific binding was determined in the presence of 200 μM DA →binding affinity and capacity were determined

DA 競爭性結合試驗

35 μL diluted sample, 140 μL GLUR6 membranes, 35 μL ³H-kainic acid was added to wells of a 96-well microplate →incubated 1 hr at 4°C →filtered onto a 96-place glass fiber filter mat →using a 96-place filter manifold →the filter mat was dried on a slide warmer for 15 min and then saturated with solid scintillant by melting 1 for min at 60°C →the cooled mat was sealed in plastic and counted in a microplate scintillation counter →competitive binding curve

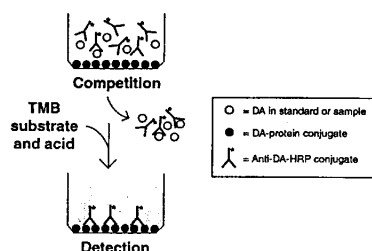
主題：ASP direct cELISA kit-demonstration of a novel rapid assay for the determination of domoic acid in shellfish and seawater

說明者：Hans Kleivdal

單位：Biosense Laboratories AS, Bergen, Norway

一、目的及原理

利用直接競爭式酵素連結免疫分析(direct cELISA)，可快速分析樣品中是否含有失憶性貝毒毒素-domoic acid(DA)。先將 DA-protein conjugate 固著在 96-well microplate 上，再加入 DA 標準品、樣品及 anti-DA HRP conjugate，進行競爭反應(如圖)，可由吸光值判讀毒素之含量。



二、實驗操作

檢液之製備

take 4 g of shellfish→add 16 mL 50% methanol→homogenize→centrifuge for 10 min at 3000g→retain the supernatant

直接競爭式酵素連結免疫反應

add 300 μ L washing buffer to well→remove the washing buffer→add 50 μ L standard/sample buffer to each A_{max} and blank wells→ add 50 μ L antibody-HRP buffer to blank wells→add 50 μ L of DA standard to wells→ add 50 μ L of sample to wells→ add 50 μ L of Anti-DA-HRP conjugate to wells→seal the plate and incubate at room temp. for 1 hr→wash the wells 4 times with 300 μ L washing buffer per well→add 100 μ L of TMB peroxidase substrate to all wells→incubate at room temp. for 15 min→stop the reaction by adding 100mL 0.3 M H₂SO₄ to all wells→after 2-5 min, read the absorbance in a microplate reader using a 450 nm filter

主題：Jellett rapid test kits for ASP and PSP toxins

說明者：Maurice Laycock

單位：Jellett Rapid Testing, Chester Basin, Nova Scotia, Canada

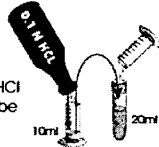
一、目的及原理

利用 lateral flow (又稱 immunochromatographic strip) 快速檢驗技術，目前已有檢驗套組可檢測麻痺性貝毒(PSP)及失憶性貝毒(ASP)。檢液經由毛細現象通過 T(test) zone 時，若檢液中含有毒素，會和 T zone 的特殊抗原結合，使得 signal reagent 無法與 T zone 之抗原結合，固無法呈色；但仍然可與 C(control) zone 的特殊抗原結合，呈現紅色。此快速檢驗除可定性，亦可做半定量試驗。

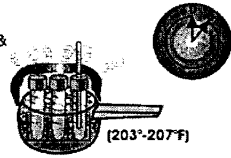
二、實驗操作

檢液之製備


1. Add 10ml of 0.1 N HCl to shellfish puree tube


2. Place temperature tube & sample tubes in the rackin BOILING WATER


After the temperature reaches 95° Celsus leave the sample(s) in boiling water for 5 minutes


3. Filter each boiled sample through a separate fluid filter

Pour filtered extract into a clean labeled tube/


4. Check the pH of the extract with a narrow range pH strip (example: pH 1-6)

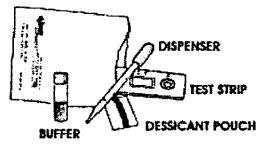
WARNING:
This page is amplified.
Always work with the instruction sheet that comes with the test.



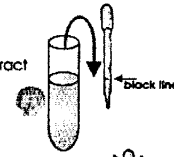
Extract is ready to use
with Jellett Rapid Test for ASP & PSP

試驗步驟

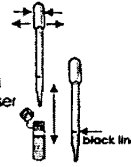
JELLETT RAPID TESTS for Marine Biotoxin Testing--



1. Add 100 μ L shellfish extract (up to the black line) and add to buffer.



2. Mix shellfish extract and buffer by inserting dispenser into bottle and squeezing top of dispenser at least 3 times. Then fill pipette to black line.



3. Empty dispenser contents into the sample hole. Wait 10-20 minutes for results...



結果判讀

