

細胞感測器於環境污染物 毒性檢測之研發與應用

撰文/袁秋英

前言

近年因工業與農業的持續發展，其中使用之農藥及化學肥料，或是重金屬及工業廢水等容易大量排入環境，除了造成環境污染問題，亦對農業生態系的平衡造成嚴重之衝擊。環境污染物測試的方法可分為理化法和生物法。前者主要是利用儀器定量分析污染物的含量，但無法得知污染物對生物造成毒害的綜合性影響。而生物法則可同步呈現多種污染物的總毒性，此特性為理化檢測闕如者。生物毒性測試方法包括急毒性、亞急毒性、慢毒性實驗，以及生物致畸、致癌、致突變等實驗，其中急毒性實驗是高劑量以1次或24小時之內多次處理哺乳類動物（如小鼠、大鼠、家兔），以半數致死量（LD₅₀）或半數致死濃度（LC₅₀）評估環境污染物對生物體的傷害，其具有方法複雜、反應時期長及成本高之缺點，無法於田間立即及連續監測。因此建立對環境污染物綜合毒性之快速檢測系統，將成為檢驗及監測毒物質含量及預防環境惡化的重要課題。

一般而言，由於微生物有體積小、數量多、繁殖快速、核酸易於修飾及重組等獨特的優點，同時微生物細胞的代謝作用易被毒化物抑制，不同之毒化物可造成酵素活性、耗氧量或螢光釋出量等改變，使得近年許多研究運用此等生理反應，開發為檢測毒化物的細胞感測器。由於細胞感測器具有靈敏、快速、成本低廉等特性，因此，國際標準化

組織於1998年頒布發光細菌檢驗的標準方法（ISO 11348-1~2-1998），美國 Oak Ridge 國家實驗室及田納西大學聯合研發，並應用此原理延伸出發光生物的毒性檢測晶片；以色列及韓國皆已將發光細胞固定於光纖探針，大幅增強檢驗之靈敏度，中國亦於1998年頒布發光細菌法檢測水質急毒性的標準（GB/T 15441-95），顯示細胞感測器運用於環境污染物檢測的潛力。本文綜合論述細胞感測器的類別及應用現況、細胞固定化技術及未來之發展重點。

細胞感測器之研發與類別

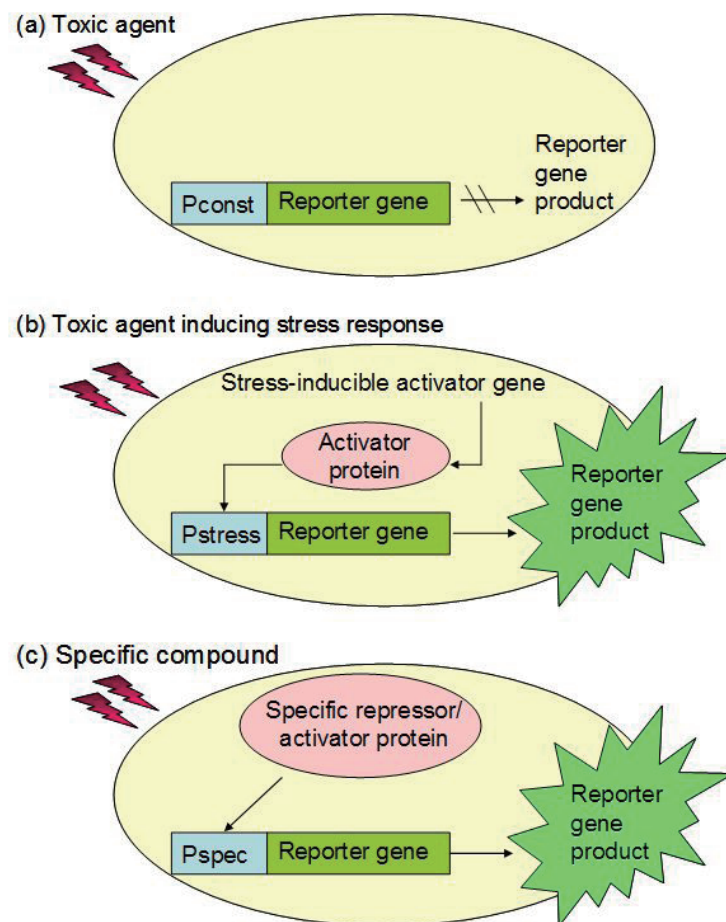
生物感測器為運用生物的反應及專一性辨識之特性，發展出來的整合型分析系統，包括生物性識別系統和信號傳輸轉換系統兩部分，主要的原理為當被檢測物質與生物識別系統發生作用，產生光、熱、質量或電化學等反應，再將此等變化轉換為可輸出信號，以達到分析及檢測的目的。生物感測器最早起始於以酶電極檢測血糖濃度（Clark and Lvons, 1962），經過多年的發展，各類生物感測器之技術已日趨多樣化。依據生物性識別元件的類別，可將生物感測器區分為酵素感測器、免疫感測器、DNA 感測器及細胞感測器等，而聯結於後的信號傳輸轉換元件則有電化學型、光學型、質量感測型和熱力學型等類別。

細胞感測器是以活細胞為感應識別元件與光、電等信號傳輸系統組合而成的檢測系統。使用的細

胞以原核生物為主(細菌、真菌、藻類等)，少部份使用真核生物(酵母菌)，主要運用的原理為微生物或單一細胞富含多種酵素調控的反應，即環境污染物引起代謝異常的產物，或發光物質之改變，且此含量的變化與污染物毒性程度具線性關係。此外，由於基因工程技術的快速發展，現今已普遍利用基因重組建構的細胞感測器，例如將具專一性辨識污染毒物質的啟動子構築於可發光蛋白的報導基因(*gfp*、*luc*、*lux*等)，再轉殖於微生物中。目前已構建成功並用於毒化物分析的重組微生物有大腸桿菌(*Escherichia coli*)、沙門氏菌(*Salmonella strain*)、歐洲亞硝化單胞菌(*Nitrosomonas europaea*)、酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)及集胞藻(*Synechocystis sp.*)等。亦可延伸發展為單一菌株同時呈現二種以上不同的毒物質，或是各別專一性檢測的多數菌株，組合為重要污染物的檢測套組。重組微生物不僅可鑑別環境毒化物，以及增加檢測毒化物的種類，並且可涵蓋非特異性檢測(non-specific assay)、半特異性(semi-specific assay)及特異性檢測(specific assay)毒化物等技術(圖一)，以因應污染物日漸增多而趨於複雜化之檢測污染物需求。

(一) 非特異性細胞感測器

發光細菌是最早被應用於環境監測中的微生物細胞感測器，其中發光桿菌(*Photobacterium phosphorum*)為海洋細菌，應用於快速監測水質的總毒性反應(Bulich *et al.*, 1981)，其作用原理為利用還原型黃素單核苷酸(flavin mononucleotide, FMNH₂)、長鏈脂肪醛(lipathic aldehyde)為受質，經細菌螢光素酶(luciferase)催化後，可自然發光，當環境中存在有毒物質時，因為螢光素酶活性或細胞呼吸作用受抑制，發光能力受到影響，其光亮減弱程度與毒化物的濃度及毒性具相關性，因此檢測發光細菌的光強度變化，可評估污染物質之毒性。由於只要會抑制發光細菌螢光素酶活性或細胞呼吸作用者，皆會降低發光量，故此屬於非特



(a)非專一性感測器；(b)半專一性感測器；(c)專一性感測器 (Soren *et al.*, 2006)

圖一 三種細胞感測器類別

異性細胞感測器，不僅可檢測混合的毒化物，亦可呈現化合物之間非預期發生的加成作用；然而某些金屬離子元素如鈉、鈣、鎂離子等，因光散射的干擾，易造成偽陽性結果的判讀。現有弧菌科發光細菌(*photobacterium leiognathi*)於2002年即開始被用於水質毒性之監測，以及基因重組的奈瑟氏菌科(*Janthinobacterium lividum*)菌株用於對地下水的檢驗。

(二) 半特異性細胞感測器

半特異性細胞感測器技術主要檢測某類特定之毒化物，Quillardet於1982年首次發表利用大腸桿

菌於核酸受損後修復之 SOS 反應 (SOS response) 原理，建構基因重組的大腸桿菌，開發為環境中毒化物之檢測系統。半特異性的生物感測器其報告基因被融合於對逆境感應的啟動子下游，當菌株處於含毒物環境及逆境壓力時，相關基因之啟動子經活化，並誘導構築於其後之報告基因表達，所以這類生物感測器可對環境中毒化物產生監測作用。與非特異性的生物感測器相比，半特異性的生物感測器並非監測整個環境中總毒物反應，而是可以監測某類毒化物或逆境壓力，如引起核酸、蛋白質、細胞膜損傷，或是氧化性逆境、環境荷爾蒙等毒化物之檢測。

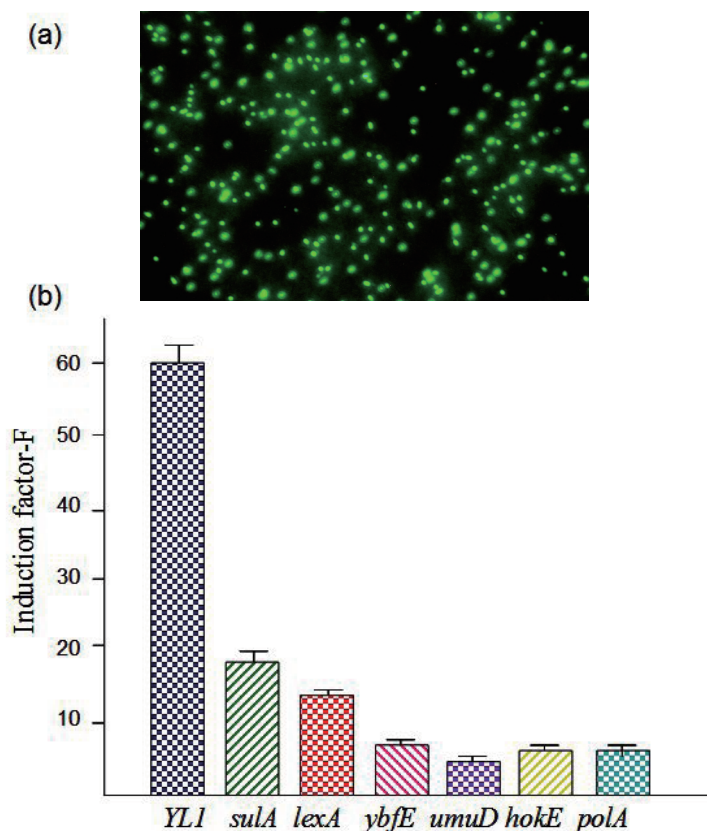
天然的或人工合成的內分泌干擾物 (endocrine disrupting compounds, EDCs) 已可於環境水體中檢出至 ng L^{-1} 的含量，其中包括二氫基女性素 (estradiol) 及雌酮 (estrone) 等。利用雌激素反應元件 (estrogen response element, ERE) 的核酸序列連接半乳糖苷酶 (galactosidase) 的 *LacZ* 報告基因，轉殖於酵母細胞，經由雌激素受體 (estrogen receptor, ER) 調控的反應，可檢測環境荷爾蒙，而 *LacZ* 基因的表達量與環境雌激素的污染程度呈現劑量關係，得以評估環境荷爾蒙的污染程度。另有將含 *lac::luxCDABE* 報導基因的重組大腸桿菌，包埋於瓊脂培養基，並固定在玻璃珠上，可有效監測土壤中污染的多環芳香烴類化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)。

近年農業藥物毒物試驗所依據 SOS 原理，篩選出高靈敏度之感測核酸 (YLI)，與 GFP 融合建構為致核酸損傷之細胞感測器，經由對第二類毒化物之初步測試，結果顯示此 YLI-GFP 感測器之偵測極限為目前已發表感測系統的 3-10 倍 (圖二)，且與 Ames test 檢測結果相近，由於此感應器檢測時僅需 $10\mu\text{l}$ 的污染檢體，且於 2 小時反應後即可完成檢測，較 Ames test 省時，適用於大量檢體的快速篩檢。

(三) 特異性細胞感測器

1990 年 King 等人首次報導可檢測荼的發光菌株，此等特異性細胞感測器是將調控基因之啟動子連接報告基因，只有特定的目標物質才能活化啟動子，並誘導下游報告基因之表達，因此該類感測器可檢測特定的污染物質。目前將重組發光微生物應用於重金屬、農藥等有毒物質，進行專一性檢測的研究日益增多。

利用達有龍 (diuron) 對小球藻光合作用電子傳遞的影響，由小球藻葉綠素的螢光釋出量，估算達有龍的含量，檢測極限為 $0.025 \mu\text{g L}^{-1}$ 。若將攜帶磷酸水解酶基因的大腸桿菌固定於含瓊脂的尼龍膜上，連接於雙臂光纖束的共同端，表達含磷酸水解



(a) YLI-GFP重組大腸桿菌；

(b) Induction factor-F (感測之螢光量/對照組之螢光量)

圖二 比較七種SOS基因啟動子融合GFP螢光蛋白之重組大腸桿菌感測nalidixic acid的螢光釋出量

酶的大腸桿菌細胞催化有機磷殺蟲劑的水解，形成吸收特定波長的呈色產物，再將此水解產物以光纖檢測，約 10 分鐘即可檢出有機磷及胺基甲酸鹽類殺蟲劑，偵測極限介於 3-5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 。亦可將攜帶有機磷水解酶基因的大腸桿菌和 pH 值電極結合形成新型之感測器，可經由測定有機磷農藥水解過程產生的氫離子濃度，間接測定有機磷農藥的濃度。

細胞感測器於重金屬的檢測，主要利用重金屬特定抗阻基因的啟動子為生物性識別元件，銜接不同信號傳輸轉換元件，建構成對金屬離子具選擇性的感測器。例如利用酒釀酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 重組銅離子誘導的 *CUP1* 基因啟動子及 *lacZ* 基因，於銅離子 (Cu^{2+}) 存在時，酒釀酵母細胞需氧量發生改變，即可以電流型生物感測器檢測。另利用 *cad* 及 *cadC* 基因啟動子為感測元件，融合綠色螢光蛋白 (GFP) 構築的重組大腸桿菌，可檢出土壤中鎘、鉛及銻的含量分別為 0.1、10 及 0.1 nmol L^{-1} 。

細胞感測器之固定化

一般而言，細胞感測器對於單純化學物質的測定，大部份皆可獲得非常理想的檢測結果，然而環境中污染物種類及性質極複雜，於田間實際檢測時，產生許多干擾因素，而影響檢測的結果，以致產生誤差變大、再現性不佳等問題，因此細胞感測器需再利用適當介質，將細胞固定於特定的材料上，方可維持細胞的活性，且後續可將感測訊號轉換放大，增加檢出之靈敏度。例如弧菌科發光細菌 *Vibrio fischeri* 及 *photobacterium leiognathi* 皆適用於環境毒性的檢測，若配合細胞固定化技術，與矽光二極體組合，即可構建為高靈敏度的流通式毒性檢測儀。

(一) 細胞固定化的方法

細胞固定化是一種將動植物或微生物細胞，固定於不溶性載體上之技術。可使游離的細胞侷限於特定空間，使其保持活性且可反覆使用。目前細胞

固定化的方法有吸附法、共價結合法、交聯法、包埋法、絮凝法、多孔物質包絡法、超過濾法及多種固定方法組合等，其中以吸附法及包埋法使用較普遍。吸附法為利用物理性吸附或離子鍵結原理將細胞固定於載體上，如活性碳、石英砂、多孔玻璃、纖維素、DEAE-纖維素等。此方法操作簡單、載體可重覆使用，但結合不緊密，細胞較易脫落。包埋法為利用物理方式將細胞包埋於載體中，有凝膠包埋及半透膜包埋兩種，包埋法操作簡單，對細胞活性影響小，為目前研究最廣泛的方法。交聯法與共價鍵結法為細胞表面的官能基與固相載體以共價鍵連接，結合緊密不易脫落，但反應條件較難控制，且易造成細胞死亡。由於各種固定法都有其特點及適用範圍，故可多種固定方法組合使用，吸附法配合交聯法可提高細胞活性及適用性，例如以矽藻土將菌株固定於光纖末端、利用瓊脂將細胞固定於微孔板或將菌株包埋於矽凝膠。Premkumar 等人 (2002) 將大腸桿菌以矽凝膠包埋，貯存於 4°C 可維持細胞活性達 3 個月以上。

(二) 固定細胞之載體類別

細胞固定化使用之載體可區分為有機高分子載體、合成有機高分子載體及複合性載體。大部份天然高分子載體對微生物無毒，但固定的機械強度較弱、化學穩定性較差、易被微生物分解，且使用壽命較短。常用者包括瓊脂、明膠、海綿、甲殼素、海藻酸鈉及殼聚糖等，其中海藻酸鈉的應用最廣泛，由於其具有化學穩定性佳、無毒及包埋效率高等優點，適合固定活細胞，唯不耐高濃度的磷酸鹽、不耐熱、易破碎且不可重覆使用。合成有機高分子載體具有機械強度佳、化學穩定性高、抗微生物分解之特性，但易造成細胞毒害為其缺點，其中普遍應用的載體為聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)，其凝膠強度佳、化學穩定性高、抗微生物分解，較聚丙烯醯胺 (ACAM) 之毒性低。複合性載體是以有機及無機載體材料配合使用者，以達成增強結合性及

降低細胞毒性的目的。例如可發螢光的大腸桿菌 (*E. coli*) 和酵母菌 (*S. cerevisiae*) 細胞，分別隨機固定於高密度微孔矩陣中，該微孔矩陣的光纖末端經過蝕刻處理，便可將菌體連接及固定於微孔中，並將每個細胞的螢光信號定位及定量。

細胞感測器與光電、晶片檢測技術整合之趨勢

細胞感測技術研發的最終目標是希望將生物感應的訊號，經由轉換、放大和正確輸出為可量化數據，以發揮速度快、靈敏度高、選擇性佳、成本低、操作簡單等特性。近年隨著奈米科技、光纖材質、晶片製成及半導體微細加工技術的發展，能在更小尺寸上加工微型元器件，不僅可將光元件、微機電集成，同時具微小化功效，進而發展為性能更穩定的生物微電子機械系統 (biological micro electro-mechanical systems, BioMEMS)，可改善細胞感測器的功能，包括減少樣本量、進樣自動化、減少細胞數目、提高靈敏度、提高時間和空間解析度等特點。例如奈米光纖探針及生物晶片於細胞感測的整合運用技術已有初步進展，然而現階段仍存在許多待探討的技術細節。

目前已可利用發光細菌先固定於海藻酸鈉凝膠，再以光纖探頭接收訊號，通過光導纖維之光傳輸裝置輸送光訊號，之後採用高靈敏度的光電轉換器，將訊號轉換、收集處理及數據化，反應時間約 15 分鐘，待發光強度降為 50% 時，由抑制率估算 EC_{50} 值，即可呈現污染物的急毒性。

Lux 發光基因微陣列 (LuxArray) 的研發，開拓了細胞晶片應用的先鋒，此微陣列為利用固態 LB 培養基，將 689 株感測菌株固定於微孔板，經過污染物誘導後產生高度表達的信號。Bolton 等人 (2002) 進而利用互補性金屬氧化半導體，構建感測菌株的生物光信號整合回路系統 (bioluminescent bioreporter integrated circuit, BIBIC)，具有檢出萘或水楊酸之功效。

已商品化的細胞感測器

大量而多樣化的生物感測器已於實驗室中研發了近 40 年，真正商品化運用者仍占少數，大部份已商品化的生物感測器應用於醫藥及食品發酵產業，少部份用於環境污染物的分析。具有商品價值的生物感測器，除了市場需求的考量以外，主要需具備操作容易、靈敏度和準確性佳、價格便宜、易批量生產、生產中可進行質量監測、以及至少有 6 個月以上的櫥架壽命等條件，大多數的生物感測器不易如此完備。

目前已上市的細胞感測器試劑如 Microtox® 及 Mutatox® 為偵測基因毒性物質的檢測試劑，主要的應用原理為利用自發性螢光細菌 (*Photobacterium leiograthi*) 於毒物質存在時，會降低其螢光釋出量，且毒物質的含量與螢光量具負相關性，現已應用於加拿大 Yameska 河流與美國大湖地區水質及沉積物的基因毒性檢測之用。然而只要環境中可造成發光細菌生理代謝功能異常的因素，亦會降低其發光量，檢測結果易產生偽陽性問題。另一細胞感測器產品為 REMEDIOS，主要利用毒物質對微生物代謝活性的抑制，可檢測多種毒物質。

未來發展之方向

至今欲開發新穎性細胞感測器，無論於生物性感測系統或是信號傳輸轉換元件皆有相當大的發展空間。例如新穎辨識元件、連續性監測、複合式 (多樣性) 分析、奈米技術、微小化等各方面的改進。

1. 新穎感應元件的開發

生物感測器的適用性主要決定於分子辨識元件的親和性、專一性及感測物的產生量。為因應日漸增多而複雜化的污染物質，宜著重更具特異性的感測元件的篩選，並增強核酸調控表達的效率。

2. 細胞固定條件最佳化技術

尋找性能穩定、壽命長、鍵結强度高及無毒的固定載體，建立細胞活性的保存技術，以維持檢測

之穩定性及再現性。

3. 連續性監測

水體中污染物的濃度為一種動態的變化型式，若僅定時取樣檢測無法得知污染物真正釋出時間的最大濃度。因此發展可連續監測的感測器方可即時檢出及採取早期防範。

4. 複合式分析(multi-analyte)

發展單一感測器可同時檢測多種污染物，以縮短檢測時間、減少檢體使用量及試劑用量。例如平面晶片 - 免疫感測器以 CCD 為檢測器，可同時檢出重金屬、農藥等毒化物。另可針對光電、晶片及抗體等訊號處理系統整合的開發，提升檢出效率。

5. 微小化

可經由微機電及微流體技術使分析系統微小化，微小化的優點為可減少檢體及試劑用量、減少廢棄物、易於操作、縮短檢測時間、降低能量的消

耗、經濟及增加檢測靈敏度等。進而可發展為可攜式的感測器，適於田間篩檢用，可高密度的貯存檢測的資料。微小化檢測系統亦利於後續發展為取樣、過濾、檢測等一貫作業系統的建立。

結論

隨著全球各國對環境污染物的毒性問題日漸重視，因此開發檢驗及監測污染物的理想細胞感測器仍有寬廣的前景。現階段已商品化而運用於環境污染物檢測的細胞感測器為數不多，不論於生物識別元件或是信號傳輸轉換元件皆可依循快速、即時連續監測及具商品化潛力等方向研發，將可使得細胞感測器趨於微小化、多元化、可攜化與自動化的適用性。

AgBIO

袁秋英 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所 公害防治組
副研究員

參考文獻

1. Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A. (2006) *Microbial biosensors*. *Analy. Chimica Acta*. 568:200-210.
2. Kostrzynska, M., Leung, K. T., Lee, H. and Trevors, J. T. (2002) *Green fluorescent protein-based biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic compounds*. *J. Microbiol Methods* 48: 43-51.
3. Malandain, C., Fayolle, F. and Bedouelle, H. (2005) *Biosensors for the environment*. *Oil & Gas Sci. and Technol. Rev. IFP*, 60:887-897.
4. Mitchell, R. J. and Gu, M. B. (2004) *An Escherichia coli biosensor capable of detecting both genotoxic and oxidative damage*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 46-52.
5. Rogers, K. R. (2006) *Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring*. *Analy. Chimica Acta* 568: 222-231.
6. Soren, J. S., Mette, B. and Hansen, L. H. (2006) *Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17:11-16.
7. Yagi, K. (2007) *Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 73: 1251-1258.
8. 袁秋英、林志鍵、蔣慕琰 (2009) 生物感測器檢測環境污物之研發與應用。農政與農情，No.205，頁83-87。