

生物感測器檢測環境 污染物之研發與應用

■ 農業藥物毒物試驗所

袁秋英 · 林志鍵 · 蔣慕琰

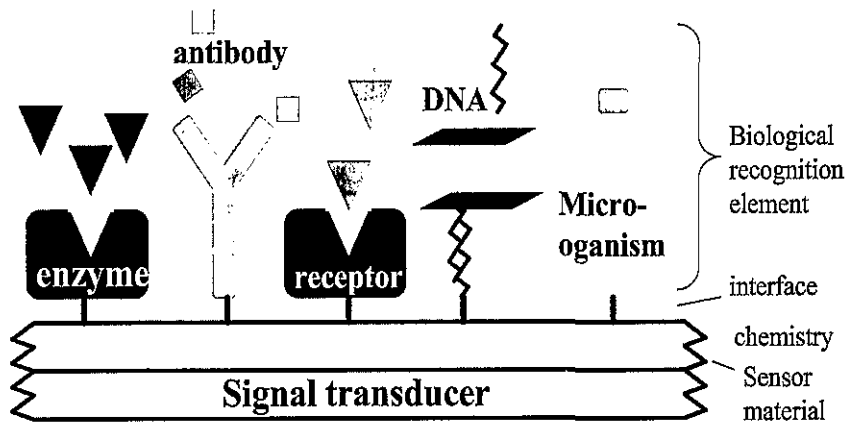
一. 前言

現今工商業快速發展，全球正面臨日益嚴重的環境污染問題，污染物的種類及數量逐年增加，爲了確保人畜環境的健康與安全，對於各種污染物的毒性鑑定成爲目前急需探討的議題。毒性化學物質 (toxic chemical substance) 乃指人爲產製過程中衍生的具生物毒性之物質，這些毒化物可能以農藥、重金屬廢棄物及環境荷爾蒙等形式散佈於水域或土壤環境中，亦可能經由生物蓄積於食物鏈間的轉換，造成生物體內核酸的損傷、斷裂，甚至導致畸變或癌症的發生。

中央主管機關已針對250種以上的毒化物分別建立22種檢測方法，例如液相層析(LC)、氣相層析(GC)、超臨界流體層析(SFC)、原子吸收光譜(AAS)、感應耦合電漿原子發射光譜(ICP-AES)等技

術。雖然這些分析方法具有靈敏度高、選擇性好、準確度高等優點，但設備昂貴、預純化較費時、無法取得生物毒性訊息，且不適於現場即時或連續性的監測。

一般生物毒性評估以哺乳類、魚類、藻類及微生物等爲測試生物，其中以安姆氏試驗(Ames test)的致變異性檢測應用最廣，但由於反應時間長，且僅適合於實驗室分析的局限性，因此生物感測器(biosensor)的研發應運而生，由於此等檢測技術具有速度快、靈敏度高、選擇性佳、成本低、操作簡單等特性，目前被視爲是環境污染毒化質現場監測的最適方法。農業藥物毒物試驗所已初步建立了檢測毒物質的細胞感測器及免疫感測器，本文將針對生物感測器的類別、於環境污染物檢測的應用，以及未來發展方向，綜合論述於下。



附圖 生物感測器之生物性識別元件類別 (Rogers 2006)

二. 生物感測器之原理及類別

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及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。

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(附圖)，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。由於生物性識別元件和信號傳輸轉換元件運用的原理互異，在生物性識別元件之後常聯結不同的信號傳輸轉換元件，可產生效率不同的檢測系統，因此現階段的生物感測器類別極為多樣化，亦各有其優缺點。其中生物性識別元件的適用與否，為此感測器的特異性辨識及結果正確性之關鍵因子；信號傳輸轉換元件的

適用與否，則為檢測時間及靈敏度之關鍵因子。

三. 生物感測器於環境污染物檢測之應用

目前在環境污染物中檢測的主要項目包括有農藥、重金屬、酚類化合物、多氯有機物、內分泌物、有害微生物、生化需氧量、硝酸鹽、二氧化硫等(附表)，以下針對各污染源研發的感測器分別說明之。

(一)農藥殘留之檢測

歐盟的 Directive 98/83/EC 訂定環境飲用水中農藥含量，單一藥劑不得超過 $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ 。自 80 年起即有學者以乙醯膽鹼酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE) 運用於有機磷及氨基甲酸鹽類化合物的檢測。此外，丁醯膽鹼酯酶 (butyrylcholinesterase, BChE) 及膽鹼氧化酶 (choline oxidase, ChOD) 亦有相似作用。之後發展為雙酵素-電流型感測系統，以 BChE 及 ChOD

可增強靈敏度，對巴拉松 (parathion) 及馬拉松 (malathion) 的檢測極限分別為 2 及 6 ppb。另有以 AChE 電極研發成掌上型的單片機檢測，僅需 3 分鐘，二氯松 (dichlorvos) 及巴拉松的可檢出濃度分別為 0.5~43.1 及 0.1~15.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ，適於現場監測。除草劑部分以免疫感測器配合表面電漿共振 (surface plasmon resonance,

SPR)，於地下水可檢出 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 草滅淨 (simazine)。由小球藻葉綠素的螢光釋放量，可估算達有龍 (diuron) 的含量，檢測極限為 0.025 $\mu\text{g L}^{-1}$ 。以免疫感測器的檢出 0.6 ng L^{-1} 除草寧 (propanil)。

(二) 重金屬之測定

現今已有多種生物感測器運用於重

附表 生物感測器於環境污染物檢測之應用

污染物類別	生物辨識元件	信號輸出元件	檢出量
殺蟲劑 (巴拉松)	酵素 (AChE)	電化學 (電流式)	LOD: 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$
殺蟲劑 (巴拉松, 得滅克)	雙酵素 (BChE, ChOD)	電化學 (電流式)	10-100 ppb
殺蟲劑 (二氯松, 巴拉松)	酵素 (AChE)	電化學 (掌上型)	0.5、0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$
除草劑 (達有龍)	小球藻	螢光	0.025 $\mu\text{g L}^{-1}$
除草劑 (草滅淨)	抗體	螢光, SPR	0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$
除草劑 (除草寧)	抗體	螢光	0.6 ng L^{-1}
重金屬 (鎘, 鉛, 銻)	重組大腸桿菌	螢光	0.1, 10, 0.1 nmol L^{-1}
重金屬 (鎘, 鉛, 汞, 鋅)	重組大腸桿菌	螢光	1.8, 33, 0.03, 1626 mg L^{-1}
重金屬 (汞)	重組大腸桿菌	冷光	1~50 ng L^{-1}
酚類化合物	酵素 (Tyrosinase)	電化學 (電流式)	0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$
五氯苯酚	酵素 (CDH, GDH)	電化學 (電流式)	0.8 $\mu\text{g L}^{-1}$
酚甲烷	抗體	螢光, SPR, 免疫	0.03~0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$
多氯聯苯	核酸	電化學 (電位式)	0.2 mg L^{-1}
多氯聯苯	抗體	螢光	1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
戴奧辛	重組 hepatone 細胞	冷光	10 pM
內分泌干擾物	重組酵母菌	螢光	LOD: sub-ng L^{-1}
內分泌干擾物	雌激素接受者	免疫	0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$
微生物 (腸炎桿菌)	抗體	SPR	10^6 cells mL^{-1}
微生物 (大腸桿菌)	酵素 (tyrosinase)	電化學 (電位式)	$10^3 \sim 10^4$ cells mL^{-1} 生化
需氧量	毛孢子菌、醃酸菌	電化學 (電流式)	0.088 g L^{-1}
生化需氧量 (低量)	螢光假單胞菌	光纖	0.5 mg L^{-1}
硝酸鹽	假單胞菌	電化學 (電流式)	5 $\mu\text{mol L}^{-1}$
二氧化硫	酵素 (sulfite oxidase)	電化學	0.6×10^{-4} mol L^{-1}

AChE : acetylcholinesterase, BChE : butyrylcholinesterase, ChOD : choline oxidase
 CDH : cellobiose dehydrogenase, GDH : glucose dehydrogenase, LOD : limit of detection
 SPR : surface plasmon resonance

金屬的測定，例如酵素抑制法、蛋白質鍵結法及細胞感測器等。其中蛋白質鍵結法利用金屬鍵結蛋白質為生物性識別元件的感測器，將蛋白質 GST-SmtA 和 MerR 分別固定在金電極上，可專一性辨識汞離子；亦可以重組大腸桿菌含有汞的抗阻基因 *mer* 啟動子及 *lac* 基因，檢出汞離子於土壤中 1-50 ng L⁻¹。細胞感測器於重金屬的檢測，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* 基因檢測銅離子。以 *cad* 及 *cadC* 基因啟動子融合綠色螢光蛋白 (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。

(三) 酚類化合物之檢測

環境中的酚類化合物 (phenols) 中以氯酚 (chlorophenols)、硝基酚 (nitrophenols) 的毒性最強。早期的生物感測器用酪氨酸酶 (tyrosinase)、漆氧化酶 (laccases) 及辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP) 檢測土壤及水中酚類化合物，偵測極限達 0.1 μg L⁻¹。另有以纖維二糖脫氫酶 (cellobiose dehydrogenase, CDH) 和葡萄糖脫氫酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 於廢水中即時監測五氯苯酚 (pentachlorophenol, PCP)，檢測極限為 0.8 μg L⁻¹。利用免疫感測器、表面電漿共振及螢光檢測法，可有效檢測酚甲烷 (bisphenol A, BPA)、壬基苯酚 (nonylphenol) 及己烯雌酚 (diethylstilbestrol)，檢測極限界於 0.03~0.4 μg L⁻¹ 之間。

(四) 多氯有機物之檢測

多氯聯苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 是工業中廣泛使用的化合物。當 2,4,5-三氯苯氧丁酸 (2,4,5-trichlorophenoxy butyrate, TCPB)-螢光素 (FL) 耦合物與多氯聯苯抗體結合即可釋出螢光，偵測極限為 1.0 μg L⁻¹。戴奧辛 (dioxins) 已被世界衛生組織列為被監測的環境污染物之一，是目前倍受全球關注的重要多氯有機物。已商品化的 CALUX® 系統為細胞感測器，可檢測及量化戴奧辛及其相似化合物含量。

(五) 內分泌干擾物之檢測

近年利用免疫檢測器可檢出低於 ng L⁻¹ 含量的雌酮、黃體素 (progesterone) 及睪丸酮 (testosterone) 等內分泌干擾物 (endocrine disrupting compounds, EDCs)。亦有細胞感測器利用雌激素反應元件 (estrogen response element, ERE)，配合半乳糖苷酶 (galactosidase) 及 *LacZ* 報告基因於酵母細胞，經雌激素受體 (estrogen response, ER) 調控檢測環境荷爾蒙。

(六) 有害微生物含量之測定

利用有致病性核酸探針的 DNA 感測器，可測定環境中有害之微生物，可其專一性較免疫感測器者高，且可同時測定微生物的毒蛋白。如以抗體的免疫系統配合表面電漿共振，即時檢測水體中腸炎桿菌 (*Salmonella enteritidis*)，檢測時間僅需 2 分鐘可檢出量約為 10⁶ cells mL⁻¹。利用大腸桿菌的酪氨酸酶 (tyrosinase) 可估算水體中

大腸桿菌的含量，偵測極限為 $10^3\sim 10^4$ cells mL⁻¹。

(七)其他

生物感測器亦可應用於生化需氧量(Biochemical oxygen demand, BOD)之檢測，生化需氧量常為監測水體有機物污染程度的綜合性指標，以螢光假單胞菌(*Pseudomonas putida*)僅需15分鐘，可檢出之靈敏度達 0.5 mg L^{-1} ；另以假單胞菌(*Pseudomonas* sp.)硝酸鹽還原酶，只需10~15秒，可檢出 $5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ 硝酸鹽；或以亞硫酸鹽氧化酶(sulfite oxidase)與氧電極建構的生物感測器，於10分鐘之內，檢出大氣中 $0.6 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ SO₂含量。

四. 未來發展之方向

至今欲開發新穎性生物感測器，無論於生物性識別元件或是信號傳輸轉換元件皆有相當大的發展空間。

(一) 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。因此感應元件宜易於合成，且具有廣幅的選擇性。如多肽核酸及分子印跡聚合物(molecular-imprinted polymers, MIPs)。

(二) 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。宜發展可連續監測的感測器，即時檢出及採取早期防範。

(三) 複合式分析(multi-analyte)：發展可同時檢測多種污染物的感測器，縮短

檢測時間、減少檢體使用量及試劑用量。如晶片-免疫感測器同時檢出病毒、毒物質及細菌孢子等。另有多路徑微流系統，整合晶片、編碼微珠及抗體之運用。

(四) 奈米技術：運用奈米材質於生物感測器的元件，如以短片段DNA連接於金膠奈米粒子，可產生顏色的變化；矽膠奈米線圈(silicon nanowires, SiNWS)具有高度敏感度，可即時檢測生物性及化學性物質。如微懸臂樑(micro-cantilever)或奈米懸臂樑(nano-cantilever)生物感測器可大幅提高解析度。

(五) 微小化：經由微機電及微流體技術使分析系統微小化，其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，高密度的貯存檢測資料，適於田間篩檢之用。後續亦利於研發為取樣、過濾、檢測等一貫作業系統。

五. 結論

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生物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生物感測器為數不多，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，包括多肽核酸、分子印跡聚合物等類感應元件的開發，核酸晶片以及奈米技術的應用，將可使得生物感測器趨於微小化、多元化、可攜化與自動化的適用性。 