

利用免疫分析法偵測環境中的殺草劑⁽¹⁾

徐慈鴻⁽²⁾、陳曉望⁽²⁾

一、前 言

環保意識與日劇增人們越發關心到工業污染物的消除以及暴露於農業、工業用化學物質所帶來的危險。使得一些環保機構，像是美國環境保護局(Environmental Protection Agency)、美國農業部門(United States Department of Agriculture)、加拿大農業部門(Agriculture Canada)和健康福利部門(Health & Welfare Canada)不得不審慎評估大量使用在農業和森林的農藥所帶來的風險和利益。

公眾對於使用農藥與否的爭議不斷增加，如何找尋更精準、快速的方法來偵測環境中農藥的殘留遂成為各個政府和工業界的當務之急。例如：在加拿大和美國，工業界需要關於登記農藥更詳盡的資料，而政府部門和學校研究機關則必需提供農藥在土壤、飲水和食品成份中的最低殘量值。目前主要偵測農藥的傳統技術包括有：氣體-液體層析，高效能液體層析，薄膜層析等方法。雖然這些技術相當敏感且再現性高，但是卻麻煩、耗時、昂貴。因此，尋找更簡單快速，和便宜的方法來偵測，計算各種土壤、水和植體中的農藥含量是需要的。利用已經被研究相當透徹的免疫學原理和技術則可符合上述的需要。免疫化學因其具有敏感、專一、分析快速、容易操作、花費少和適用性廣等優點而成爲一些研究學科，像是臨床化學和內分泌學的研究上經常使用的分析方法。

將免疫學的技術應用於土壤、水、植體、尿液和血液中農藥含量的偵測

深具研究潛力，而且也已經有相關研究報告提出，目前某些殺草劑的免疫學分析方法也已經商業化了，(見表一)可以輕易地利用免疫學的技術分析追蹤這些殺草劑。

(1) 譯 自：J. CHRISTOPHER HALL, RAYMOND J. A. DESCHAMPS, and MARK R. McDERMOTT. 1990. Immunoassays to Detect and Quantitate Herbicide in the Environment. Weed Technology 4(2) : 226-234

(2) 台灣省農業藥物毒物試驗所助理

表1. 現今偵測殺草劑使用之免疫法一覽表

Table 1. Review of published immunoassays for herbicides.

Herbicide ^a	Antibody Method ^b	Reference
Atrazine	Polyclonal ELISA	9
Chlorsulfuron	Polyclonal ELISA	12
2,4-D	Polyclonal RIA	18
	Polyclonal RIA	13
	Polyclonal ELISA	5
	Polyclonal RIA	6
	Polyclonal ELISA	6
	Polyclonal ELISA	20
Diclofop-methyl	Polyclonal ELISA	20
	Polyclonal Fluoroimmunoassay	20
Paraquat	Polyclonal RIA	14
	Polyclonal RIA	4
	Monoclonal ELISA	17
	Polyclonal ELISA	21
	Polyclonal ELISA	22
Picloram	Polyclonal RIA	6
Terbutryn	Polyclonal ELISA	10
2,4,5-T	Polyclonal RIA	18

^a Nomenclature (2,4-D and picloram listed in abstract): Atrazine, 6-chloro-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5,-triazine-2,4-diamine; chlorsulfuron, 2-chloro-N-[[[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl) amino] carbonyl] benzenesulfonamide; diclofop, (±)-2-[4-(2,4-dichlorophenoxy)phenoxy] propanoic acid; paraquat, 1, 1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion; terbutryn, N-(1,1-dimethylethyl)-N'-ethyl-6-(methylthio)-1,3,5-triazine-2,4-diamine; 2,4,5-T, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid.

^b ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; RIA, radioimmunoassay.

二、甚麼是免疫分析

抗體(antibody)屬於一種蛋白質，又稱為免疫球蛋白，免疫分析係根據免疫學原理--動物體內會產生製造抗體，以辨識並且專一地結合到一些簡單或複雜分子(稱抗原)的表位(epitope)。而抗體和抗原間的專一性相當高，例如：針對鄰-硝酸酚(para-nitrophenol)產生的抗體，就無法和正-硝酸

酚(ortho-nitrophenol)結合，雖然這二者具相同的分子式，但它們的結構式卻不同。

那麼，若能將特殊的抗體結到合適當的指示系統，就能用來偵測特殊的化學物質，且可將其定量到近 ppb 之微量或者也可以從一些相似的化合物中測出特定的化合物而不受干擾。

傳統製造抗體的方法，是將化合物(即抗原)(MW \geq 10000 Dalton)注射到某些動物體內(例如：小白鼠，老鼠，兔子)於是在這些動物體內發生免疫反應，這代表針對這些外來的化合物已有特殊專一的抗體合成，以蛋白質為例，在其外表有不同樣式的化學結構能誘發與其結構契合的專一抗體，儘管分子量太小(< 1000 Dalton)的分子，無法獨自誘生抗體，但可以利用化學方法使其與某種蛋白質分子鍵結，以便進行免疫反應，如此，所誘發的抗體不但能辨識這蛋白質分子的表面結構，而且對與其結合的小分子(稱之為hapten)亦能加以辨識，利用這樣的原理，可以使我們分析追蹤農藥分子。

三、殺草劑專一性多株抗體(Herbicide-Specific Polyclonal Antibodies)的生產

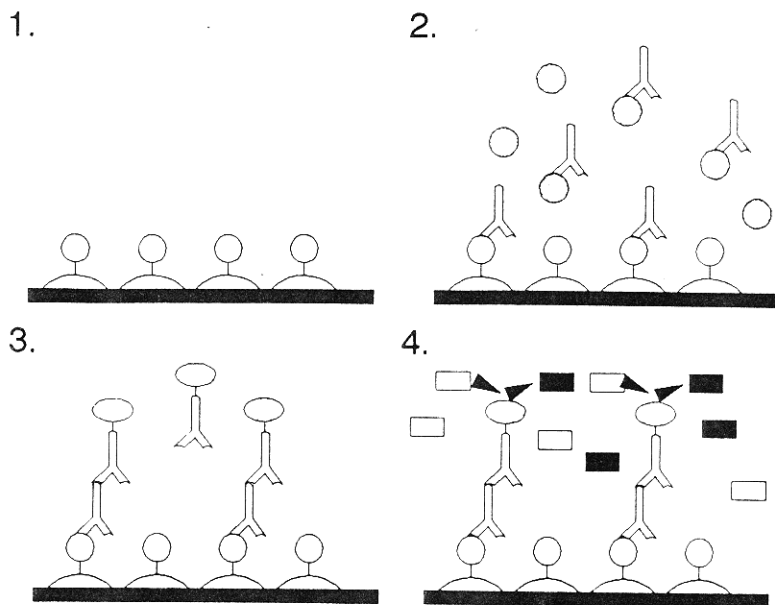
爲了產生對殺草劑(即所謂的hapten)有專一性的抗體，這些農藥或植物生長調節劑必需以化學方法結合到"小牛血清蛋白"(BSA, Bovine serum albumin)分子上，產生一種稱爲殺草劑-小牛血清蛋白的結合物，將含有結合物的緩衝液注射到動物體內(例如：紐西蘭白兔)，由於小牛血清蛋白是一大分子的非自身蛋白質，於是促使兔子體內的"免疫系統"針對小牛血清蛋白產生抗體，而這抗體亦能同時辨別結合在小牛血清蛋白上的殺草劑分子。這些實驗的兔子在接受首次的注射後，於7天、21天、42天、49天的分別接受越來越高的劑量注射，初次注射二日後沿兔子耳緣血管(marginal vein)抽取幾毫升的血液，而後每個月定期抽取。將這些血液的紅血球除去即是血清，而血清中的抗體可直接用來作免疫分析，或者，可以利用一些簡單的生化技術(例如蛋白質沉澱或是以蛋白質A管柱分離免疫球蛋白G)進一步自血清純化出抗體。

四、偵測殺草劑的免疫分析法

偵測殺草劑有三種基本的免疫分析法可以應用，分別是：(1)間接酵素-連接免疫吸附分析(indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 即indirect ELISA)(2)直接酵素-連接免疫吸附分析(Direct ELISA)。(3)放射免疫分析(Radioimmunoassay 即RIA)。間接ELISA的原理：將結合有殺草劑分子的

兔子血清蛋白吸附於聚苯乙烯微定量盤 (polystyrene microtiter plate) 含96個穴的穴壁上，此大分子蛋白質藉由靜電引力附著於孔壁上，而殺草劑分子則可進一步發生反應(選擇BSA當載體蛋白--carrier protein 是因兔子體內的殺草劑抗體會迅速增加，如此兔子血清中其他任何抗體和定量盤孔壁上BSA反應機會就小)，其反應作用(如圖1)為：

1. 在孔壁表面上塗抹殺草劑-BSA的結合體。
2. 這殺草劑-BSA結合體上之殺草劑分子，會和外來殺草劑分子競爭和抗體鍵結的機會。
3. 利用第二種結合有某酵素的抗體，來和第一種之抗體結合。
4. 這和第二種抗體結合的酵素，加入其受質後，其產物有顏色產生，利用光度計可偵測結果。



LEGEND:

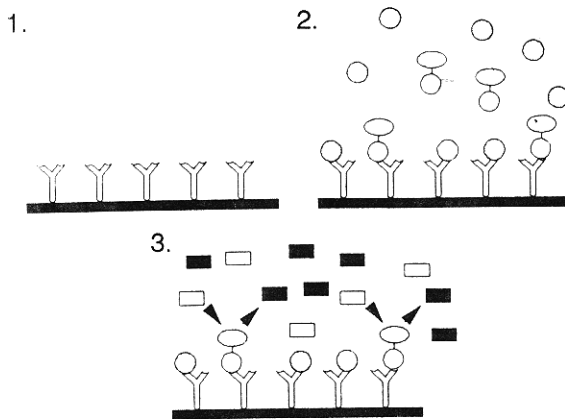
- - polystyrene surface
- - haptens
- - analyte
- - substrate
- ⋈ - antibody
- ⋈ - enzyme-labelled antibody
- - colored end product

圖1. 間接 ELISA 分析法

當殺草劑、血清蛋白之結合體塗抹於微定量盤的孔壁30分鐘後，利用緩衝液衝洗數次，將多餘的殺草劑血清蛋白洗掉，而後將稀釋過的含有殺草劑抗體的血清，加入定量盤的孔內，培養1小時，使抗體和孔壁上的殺草劑分子充分鍵結後，再以多量的緩衝液沖洗掉未作用的抗體，接著加入第二種連接有某酵素(例如：alkaline phosphatase)的抗體(一般用山羊抗-兔子抗體)，此第二種抗體會和第一種抗體(殺草劑抗體)產生結合作用，經1小時後，用緩衝液沖洗掉未作用的第二種抗體，加入酵素之受質，於是會產生顏色之改變，利用光度計偵測顏色之強弱可做定量分析。

一旦在水樣，標準溶液，或植體抽出液中含有自由的殺草劑分子，當加入含有殺草劑抗體的兔子血清時，抗體和樣品溶液中的殺草劑分子產生鍵結作用，所以此血清接著再置入定量盤之孔壁時，無法進一步和孔壁上之殺草劑-血清蛋白結合體發生鍵結，如此一來，第二種抗體-酵素結合體則無法(或只有少量的)連接上去，因此反應溶液的色度即減弱，此為一種競爭抑制作用，因此，當自由的殺草劑分子含量越多時，顏色的變化越微弱。

直接 ELISA 原理(見圖 2)：



LEGEND:

- ▬ - polystyrene surface
- Y - antibody
- - analyte
- - enzyme-linked hapten
- - substrate
- - colored end product

圖 2. 直接 ELISA 分析法

這方法較間接 ELISA 法更簡單，直接將殺草劑連接到經選擇的酵素上，不用再多使用第二種抗體。

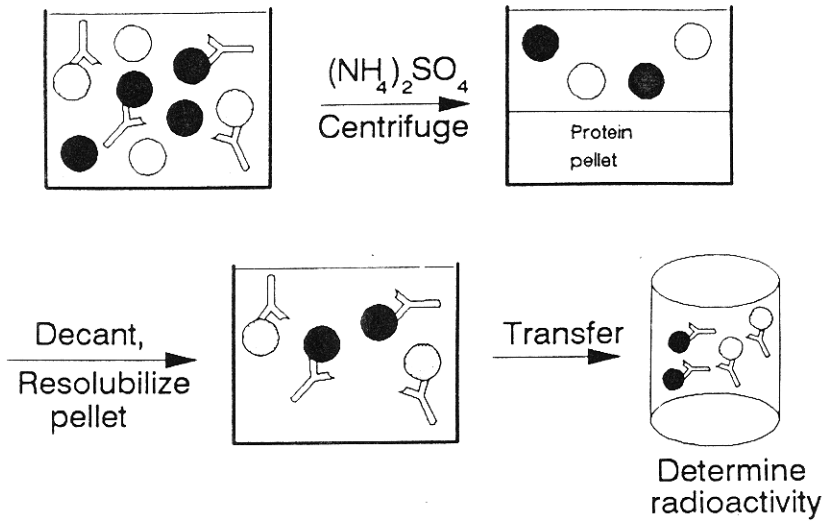
將殺草劑分子的抗體鍵結於微量盤的孔壁上，接著將含有殺草劑—酵素結合體的溶液和自由殺草劑分子一起加入微量盤中充分作用後加以沖洗，再加入酵素的受質，產生有色的產物以光電比色計測度，顏色反應的強弱和自由殺草劑分子的濃度成反比。

(一)放射性免疫分析

1. RIA 和 ELISA 的原理相似，但卻有比 ELISA 更簡便的好處(步驟更簡單)，不過實驗室必須領有放射性同位素使用之執照才可進行此項技術。
2. 將具有放射標定的殺草劑配成緩衝液並且定量，和含有殺草劑抗體的血清一起作用，待兩小時後，標定有放射性的殺草劑就會黏附到殺草劑抗體。藉由蛋白質的沈澱來收集被抗體抓住的殺草劑，其方法可以硫酸銨(ammonium sulfate)加入再離心把所有的蛋白質都沈澱下來，這樣就可以把抗體抓住的殺草劑一起沈澱，其他沒被抓住的殺草劑即隨懸浮液丟棄之。
3. 沈澱在管底含放射性的殺草劑可藉輻射計數器來定量。對於水中或植體中殺草劑含量之測定，即是將這些未標定的殺草劑及已標定定量之殺草劑一同和殺草劑抗體反應，此時未標定的殺草劑和已標定定量之殺草劑彼此競爭和抗體結和的位置，當未標定的殺草劑的量多於已標定定量之殺草劑的量，未標定的殺草劑搶到的結和位置就多，此時沈澱於管底的輻射反應就比較低，藉此測定殺草劑在水中或是植體中的含量。見圖3。分析物和標定分析物彼此競爭和抗體結和的位置、再以硫酸銨沈澱所有的抗體，(不論是攜帶標定者或未標定物)離心後將懸浮液丟棄，將沈澱物再溶解，以液體閃爍光譜儀(Liquid scintillation spectroscopy)測定溶液中的輻射量。

(二)繪製標準曲線圖來求取殺草劑的含量

藉標準曲線的製作，求取殺草劑濃度，就 ELISA 而言，其標準曲線做法，以相對吸收值為縱軸，殺草劑濃度(ng/ml)之對數值為橫軸。相對吸收值即為已知濃度殺草劑之吸光度相對於不含殺草劑時溶劑的吸光度。RIA 的標準曲線製作方法和 ELISA 相同，只是其吸光值改為相對連結值(B/Bo)。B 就是已知量殺草劑中標定殺草劑之結和量，Bo 為標定殺草劑和抗體結合的最大值(在不含未標定殺草劑時)。舉例說明，如圖4上，必克爛(picloram)的定量，其 A/Ao 值為 0.6，由迴歸線推算出相對橫座標為 80ng/ml (此即為必克爛之濃度)。



LEGEND:

- - analyte
- - radiolabelled analyte
- Y - antibody

圖3. 放射性免疫分析法：分析物和放射性標定分析物彼此競爭和抗體結和的機會。硫酸銨將抗體和與其結和之放射性物一併沉澱。此溶液離心後取得沉澱，將懸浮液丟棄。將沉澱物再溶解即用液體閃爍閃計數光譜儀 - Liquid Scintillation Spectroscopy (LSS)，測其放射量。

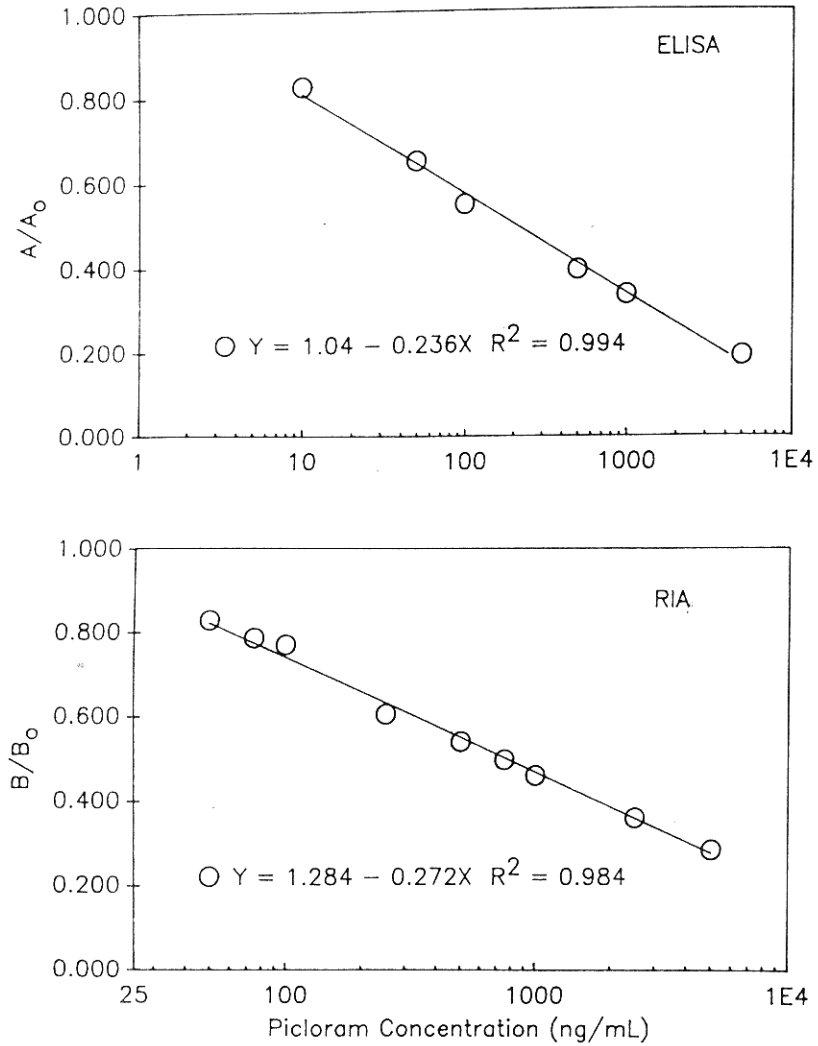


圖4. ELISA 和 RIA 法所製出之標準線: 用來測定必克爛。每一點至少為4重覆的平均值。

五、免疫分析成果之實例

圖4上由ELISA，所製出的標準曲線可求出必克爛的濃度範圍由10~5000ng/ml，用RIA方法製出的標準曲線如圖4下，可測定必克爛的濃度範圍為50~5000ng/ml。利用免疫分析法可回收人類尿液中或含殺草劑的水中的2,4-D及必克爛，其回收率可達82%~110%。利用可棄式逆相製備色層分析管進行濃度分析，此法可應用到微量之測定。

藉RIA的方法，以MCPA，mecoprop，2,4-D，dichlorprop，2,4,5-T及dicamba做為阻擋因子，來測定2,4-D抗血清和其結構相似分子的交叉反應。

必克爛抗血清和2,4-D或者相關殺草劑(如：pyridine herbicides clopyralid，fluroxypyr，及triclopyr)做交叉反應時亦可如法炮製。

在交叉反應之實驗，MCPA，2,4,5-T及dichlorprop三者和2,4-D抗血清有反應但是dicamba及mecoprop兩者則無。2,4-D、MCPA兩者和2,4-D抗血清反應時，2,4-D反應比MCPA大6倍，也就是說，要達到抑制半數放射性2,4-D的結合量須使用3600ng/ml未標定的MCPA，若用未標定之2,4-D只須要560ng/ml。其他如2,4,5-T、dichlorprop則要用到5000、1000ng/ml。必克爛的抗血清對2,4-D沒有專一性，而一般商品將必克爛的抗血清和2,4-D混在一起，即使用必克爛抗血清來定量必克爛亦不會受到2,4-D的影響。

表2. 用ELISA和RIA兩法探測河流及人類尿液中的2,4-D和必克爛

Method	Herbicide	Amount of herbicide added (ug/ml)	Recovery	
			River water [g/ml ± standard error]	Human urine (number determinations)
RIA	2,4-D	0.25	0.21 ± 0.04(4)	0.25 ± 0.01(8)
		2.50	2.35 ± 0.04(4)	2.65 ± 0.15(7)
ELISA	2,4-D	0.25	0.29 ± 0.06(2)	0.25 ± 0.03(9)
		0.75	ND ^a	0.90 ± 0.13(7)
		2.50	2.44 ± 0.92(2)	ND ^a
RIA	Picloram	0.25	0.25 ± 0.03(6)	0.19 ± 0.04(6)
		2.50	2.60 ± 0.19(6)	2.22 ± 0.35(6)

aND = not determined.

RIA 偵測技術比 ELISA 更可信。實際操作的步驟亦比較簡便。抗原、抗體結合的原理即是靠氫鍵、靜電力、凡德瓦力、親水鍵這些弱的非共價鍵的結合，形成抗原-抗體之複合物。將抗原附著在聚苯乙烯微定量盤 (microtiter plate well) 的孔上就是靠以上所述的非共價鍵的結合。

使用間接法 ELISA 成功的因素就在這些非共價鍵結合，其結合的位置有三(1)微定量盤的孔壁和附著的抗原之間(2)抗原-抗體之間(3)抗體和山羊抗-兔子連結酵素 (goat anti-rabbit-enzyme complex) 的複和體之間。相較之下，RIA 只須要一步：抗原-抗體複合物的形成即可完成。就農藥而言，以直接 ELISA 的方法；使用單株抗體，針對特殊的殺草劑有專一性即可提供更為簡便的分析方法。此項免疫分析法可和實驗室一般實驗器材配合使用，並分別提供兩項功用(1)快速、省錢的方法來定量殺草劑，而不需要清理。(2)氣相層析的前處理即樣品予先以顏色由淺而深的排列。不論提供上述何項功能，都能達到省時、省工、省事的目的。

雖然 ELISA 系統有實用價值，但是和兔子的血清抗體配合使用時，在執行上有不可必免的缺點，以 2,4-D 為例，來說明有那些缺失存在：

- (1) 在免疫反應過程，兔子的免疫系統產生的抗體，針對 2,4-D 和 BSA (小牛血清蛋白) 的三主要部份有專一性：(a). BSA 構造。(b). 2,4-D (可能混成有 1 種或多種) (c). 2,4-D 和 BSA 結構的連合。所以，兔子最後所產生的針對 2,4-D 有專一性抗體的量極為有限。
- (2) 血清的抗體對 2,4-D 的親和力由低到高不等，如此呈現中等親和力的結合，由於利用免疫分析法主要是靠抗體-抗原的親和力，實驗者多會選擇高親和力抗體來進行分析。
- (3) 有些對 BSA、2,4-D/BSA、2,4-D 有專一性的血清，尤其是一些只有弱的親和力，(不純的血清) 亦可和其餘在分子結構上相似於上述三種化學物結合。此外白蛋白 (albumins) 或 MCPA 兩者類似於 2,4-D 的構造，都是造成專一性降低的因素。
- (4) 由兔子血清得來的抗體在質、量上都會隨兔子的年齡個體而有差異。

基於上述的原因以現今的技術，尚未能發展出針對兔子抗 2,4-D 之高專一性抗體。即使使用一些複雜的免疫化學技術可以克服上述的困難，但是就 ELISA 或 RIA 而言，仍無法得到 2,4-D 所要求的高專一性之兔子抗-2,4-D 血清。不過，最近融合瘤的技術，將可克服所有的問題。

本篇主要探討多株抗體系統，以多株抗體系統和單株抗體系統的比較，單株抗體系統的發展更可觀，表 3 列出兩者之優缺點，可作一比較。

Russo 解釋所謂的多株抗體即為動物受外來抗原刺激後，產生許多種的抗體均對應此抗原有反應。其原理在抗原表面有許多不同的位置能夠活化細胞，此項活化就造成抗原刺激細胞的能力，如此產生了多株抗體。一般而言，多株抗體雖然很容易做出，但是有某些缺點：(1). 同種動物不同

表3. 單株抗體和多株抗體的比較

比較項目	多株抗體	單株抗體
計畫內容：		
試劑發展價錢	小於美金1,000元	小於美金10,000元
試劑發展時間	至少3個月	至少6個月
計術要求	注射及採血	注射及採血 細胞培養
儀器	無	細胞培養箱 無菌操作檯 二氧化碳培養箱
試劑特性：		
化學結構	異質的	同質的
限制條件	受動物壽命限制	無限制培養
親合性	一般性親合力： 由於異質族群，其 抗體對抗元之親和 性各有不同。	親合力：隨所使 用的試劑而不同
專一性	通常很高，但是由於多 元性質，可能會和結構 相似的抗原結合。	同上
敏感度	最低濃度0.1到1ppb	最低偵測濃度和多 株抗體類似或更低

個體做出的多株抗體，在量上有程度的差異。(2). 血清含專一性的抗體量太少(3). 動物的壽命趕不及抗血清的產生。

單株抗體指的即是由抗原的一個表位所刺激產生的專一性抗體，製作方法可將免疫的老鼠骨髓瘤細胞(myeloma cell)(由B淋巴細胞分裂的腫瘤細胞)和其脾細胞(spleen cell)融合形成雜交細胞，此即融合瘤細胞(Hybrid cell)可大量產生抗體。此融合瘤細胞和骨髓瘤細胞的基因自然是一樣的，也因為骨髓瘤細胞不斷的分裂特性可大量連續的培養。分裂後融合瘤細胞又形成許多不同株(clones)而且都對抗原有專一性，但是由於不同株，

故又形成多株抗體。

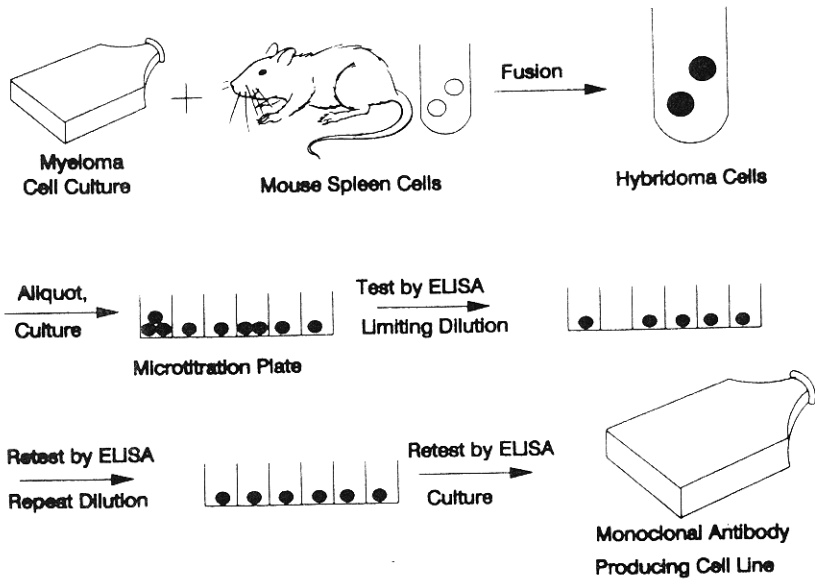


圖5. 單株抗體的製備，老鼠脾臟細胞和骨髓瘤細胞融合產生雜交細胞即所謂融合瘤細胞。大量培養後的融合瘤細胞用ELISA偵測所需要的抗體。稀釋法進行單細胞培養，再以ELISA篩選出一系列永久性產生抗體細胞。

解決上述的問題，可以定量稀釋來達到單株抗體的效果，即是將溶液中融合瘤細胞稀釋到單位溶液只含有一株細胞，如此可確定為產生遺傳基因完全相同的單株培養，而根據不同的表位(epitope)，當然就有不同的專一性，篩選的結果即可產生多種類型的單株抗體，或者是產生對同一表位具有各種不同程度的親和力。

將骨髓瘤細胞基因事先改變為無救援途徑的細胞，(所謂救援途徑即細胞更新合成途徑不能進行時產生能量之途徑)，而融合瘤細胞因為含有未經突變的脾細胞，所以仍有正常的基因進行更新合成途徑產生生存所必須的能量，一旦更新合成途徑受阻，則有救援途徑來取代。利用此項改變基因的技術，將製備的細胞培養於HAT培養基，其中含有aminopterin，阻擋更新合成途徑，在此情況下，只有具備援救途徑的融合瘤細胞能存活，突變的骨髓瘤細胞則死亡，如此即達到將融合瘤細胞篩選出的目的。

單株抗體可提高ELISA(不論直接或間接)的敏感性和專一性，唯一的問題就在此項技術及儀器的花費非常昂貴。

六、對農業界的潛在價值

工業上，政府及大學每年耗資好幾百萬元在偵測飲用水、土壤、食物上殺草劑殘留量，以確保殺草劑是否被安全正確的使用，但是這些偵測工作正受到財力以及時間上的困難。免疫分析提供了解決之道，節省樣品處理清除的時間，提供快速、高專一性的偵測，並可在層析定量分析前預測殺草劑的存在與否。即使免疫分析對環境中殺草劑含量無法準確定量，但仍可偵測是否有殺草劑的存在。將出現正反應的樣品篩選出來，再進行層析，如此減輕工作量，以及金錢的花費。地方政府可以提供農民一些簡便的殺草劑偵測指標，指示農民定期測試井水，下水道的的水是否含有殺草劑，為政府機構及農民節省時間與花費。美國現在已經有某些偵測指標(Kit)註冊可以使用，讓農民事先知道田間殘留何種殺草劑，避免種植敏感的作物品種。