

Mus hjælper til med pesticidanalyser

Med en nyudviklet pesticidbiochip kan man analysere for både BAM og atrazin i samme arbejdsgang uden øget tidsforbrug. Chippen kræver kun et lille prøvevolumen og kan måle pesticider i koncentrationer på omkring 1 ng/l

Af Jens Aamand, Geokemisk afdeling, Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse (GEUS), Leif Bruun, Autoimmunafdelingen, Statens Serum Institut (SSI) og Claus Bo Vøge Christensen, BIO-array gruppen, Mikroelektronik Centret, DTU

Der bruges i dag mange forskellige pesticider i de danske landbrug, parker og private haver, og der ses et stigende antal forureninger af grundvandet med disse stoffer. Da stort set alt vores drikkevand indvindes fra grundvandet, udgør pesticider en stor trussel for drikkevandets kvalitet. Ikke kun pesticiderne, men i lige så høj grad deres nedbrydningsprodukter forurener grundvandet.

Et af de mere alvorlige eksempler er pesticidet dichlobenil, der i jorden hurtigt omdannes til 2,6-dichlorbenzamid (BAM). BAM er et meget mobilt stof, der hurtigt bevæger sig mod grundvandet. Selv om dichlobenil ikke længere bruges i Danmark, observeres der alligevel nye fund af BAM i grund-

vandet, og mange drikkevandsboringer lukkes pga. overskridelse af grænseværdien.

Også triazin-herbicidernes nedbrydningsprodukter finder lige så ofte som moderstofferne vej til grundvandet [1].

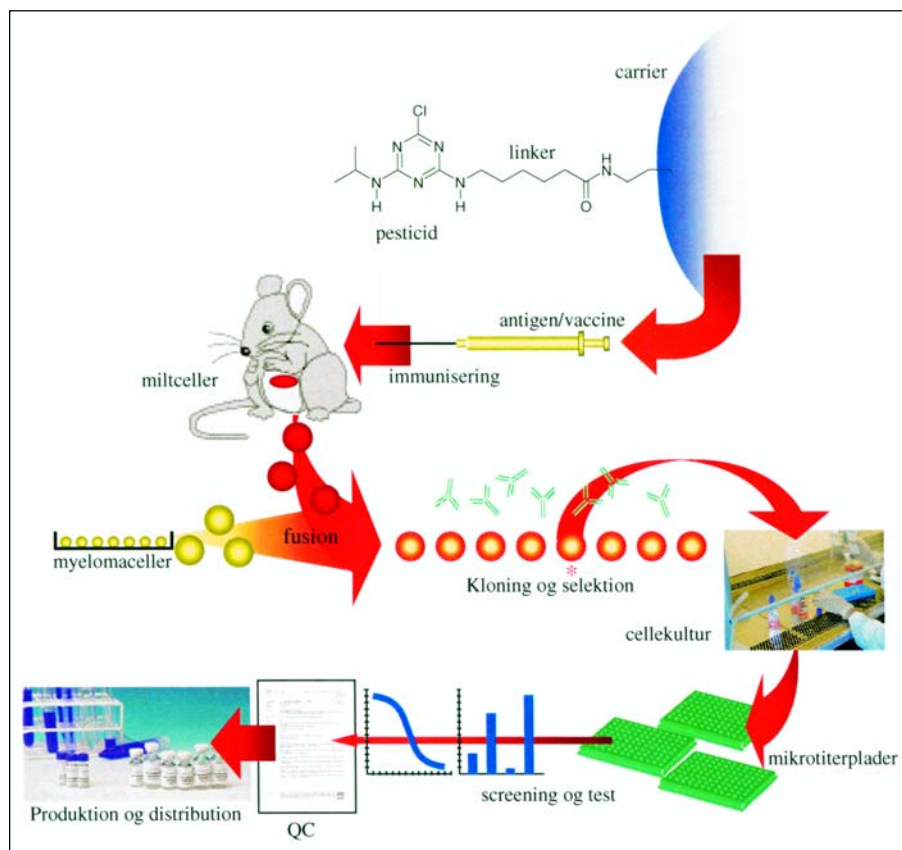
Pesticidanalyser

Der bruges i dag mange ressourcer på at analysere drikkevand for pesticider. Almindeligvis udføres disse analyser på avancerede laboratorier ved brug af f.eks. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) og massespektrometri (MS). Grænseværdien, dvs. den højest tilladte mængde af pesticider i drikkevand er i EU sat til 0,1 µg/l, men for at en analyse kan godkendes, skal der kunne måles helt ned til 0,01 µg/l (10 ng/l). For at kunne analysere så lave koncentrationer er det nødvendigt at koncentrere prøverne, og det sker ofte ved brug af organiske opløsningsmidler, der også belaster miljøet. De nuværende analyser er desuden relativt dyre og teknisk set tidskrævende. Der er derfor et behov for at udvikle nye, billigere og mere miljøvenlige analysemetoder. Immunkemiske analyser har længe været kendt inden for den medicinske verden, hvor de bl.a. bruges til diagnosticering af halsbetændelse (streptokokker) og andre sygdomme, men det er først inden for de seneste år, at man har brugt immunkemiske analyser til miljøanalyser. Af fordele kan nævnes, at mange prøver kan analyseres i en arbejdsgang, og at prøverne ikke behøver at koncentreres.

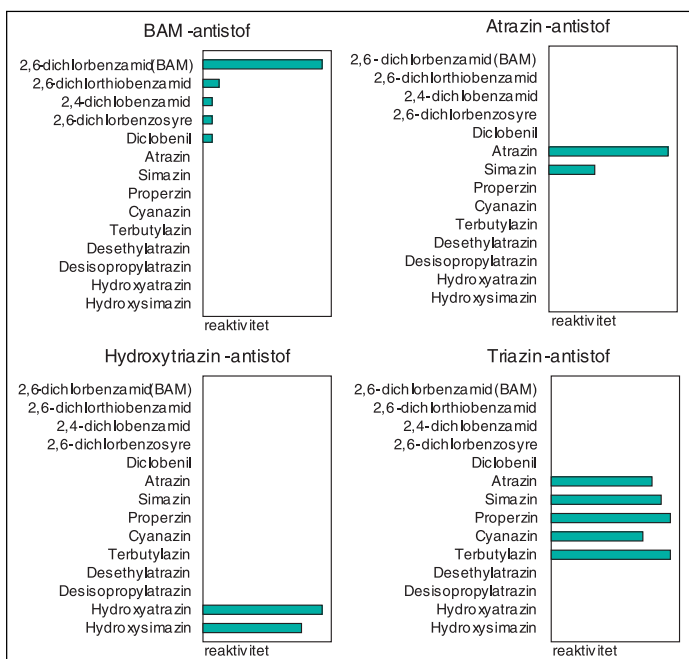
Immunkemisk analyse for pesticider

En forudsætning for at kunne udvikle en immunkemisk analyse er, at man har antistoffer, der genkender de pågældende pesticider.

Antistoffer er en del af menneskers og dyrs forsvarssystem over for patogene vira og bakterier, men også over for andre fremmedstoffer. Når vi udsættes for en infektion, produceres der antistoffer, der genkender specifikke molekyllære strukturer på overfladen af den indtrængende organisme. Antistofferne binder til overfladestrukturerne og hjælper herved med til at bekæmpe infektionen. Pesticidmolekyler er i sig selv for små til, at de kan fremkalde et sådant immunologisk respons, men hvis de kobles til et større molekyle, en carrier, kan man snyde immunsystemet til at producere antistoffer mod pesticidet (figur 1).



Figur 1. Udvikling af monoklonale pesticidantistoffer indledes med at pesticidet, vha. en kemisk linker, kobles til et carrierprotein. Dette pesticid-carrierkompleks injiceres i en mus, og efter ca. en måned har musen produceret antistoffer mod pesticidet, hvorefter den aflives og milten udtages. Milten indeholder mange antistofproducerende celler, men for at kunne dyrke dem i kultur må man fusionere dem med særlige kræftceller, såkaldte myelomaceller. Herved fås en række antistofproducerende cellekulturer (kloner), der hver især er opdyrket ud fra en enkelt miltceller. Man taler om, at de er monoklonale, og hver klon vil producere antistoffer med de samme egenskaber. Efterfølgende udvælges de kloner, der opfylder krav til f.eks. bindingsevne og specificitet over for pesticidet. Sidste trin er udvikling af en egentlig analyse, og her anvendes ofte mikrotiterplader, der er formstøbte plastplader med 96 små adskilte brønde. Koncentrationen aflæses ud fra en standardkurve.



Figur 2. Eksempler på pesticidantistoffers specificitet. BAM-antistoffet reagerer specifikt med BAM og fremviser kun ringe aktivitet over for kemisk nært beslægtede stoffer. Det har ikke været muligt at producere et antistof, der reagerer specifikt med atrazin, idet dette antistof også reagerer med pesticidet simazin. Triazin og hydroxytriazinantistofferne er eksempler på antistoffer, der genkender en hel gruppe. Sidstnævnte genkender nedbrydningsprodukter fra hhv. atrazin og simazin, mens triazinantistofferne genkender forskellige triazinpesticider.

Pesticid-carrierkomplekset kan altså starte en immunologisk reaktion, hvorved der dannes antistoffer, som specifikt genkender pesticidet, hvilket man kan benytte sig af ved at injicere komplekset i dyr (immunisering). Der vil som regel blive aktiveret flere antistof-producerende celler, og hver celle genkender specifikt en bestemt struktur. Når antistofferne oprenses fra en sådan immunisering fås et polyklonalt antistof, dvs. antistoffer fra forskellige cellekloner, med hver deres specificitet over for pesticidstrukturen.

Det vil imidlertid ofte være mere hensigtsmæssigt at producere et monoklonalt antistof, dvs. et antistof, der er produceret ud fra en enkelt celle, en såkaldt klon.

Fremstilling af monoklonale antistoffer

Ved fremstilling af monoklonale antistoffer immuniserer man ofte mus. Når musene er begyndt at producere antistoffer, aflives de, og milten udtages (figur 1). Miltcellerne fusioneres derefter med særlige kræftceller (myelomaceller), hvorved det er muligt at opformere en enkelt miltcelle.

En opformeret celle udgør en klon med den egenskab, at den kun producerer en bestemt type antistof. Antistoffet fra hver klon testes efterfølgende, og de kloner, hvis antistoffer opfylder kravene mht. bindingsevne og specificitet over for pesticiderne, udvælges. Det er f.eks. muligt at udvælge antistoffer, der genkender en ganske bestemt struktur på pesticidet, som er specifikt for netop dette stof. Man kan også udvælge antistoffer som genkender en struktur, der er fælles for en hel gruppe af pesticider (figur 2).

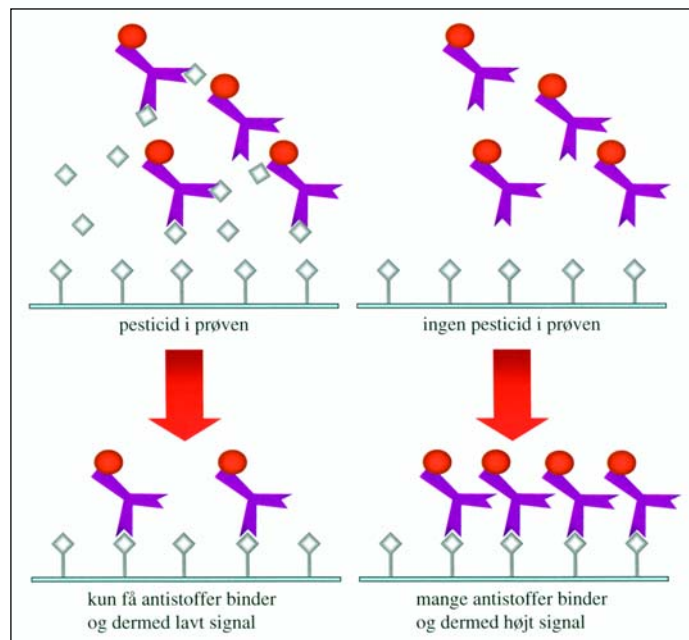
Endelig har monoklonale antistoffer den fordel, at klonen til enhver tid kan opformeres, så der kan produceres mere af nøjagtigt det samme antistof uden at skulle ofre flere mus.

Udvikling af analysemetode

Når man først har et velegnet antistof, kan man påbegynde den egentlige udvikling af en immunkemisk analysemetode. Ofte

bruges mikrotiterplader (formstøbte plastplader med 96 små brønde, figur 1). Inden pladerne tages i brug, kobles der en kendt mængde pesticid til bunden af brøndene. De prøver, der skal analyseres for pesticider, sættes nu til de enkelte brønde (typisk 100 µl), og derefter tilsættes antistofferne. Antistofferne kan nu enten binde til det pesticid, der er i prøven, eller det pesticid der findes immobiliseret til bunden af brønden. Er der kun lidt eller intet pesticid i prøven, vil meget antistof binde til det pesticid, der findes koblet til bunden af brønden. Når der er meget pesticid i prøven, vil antistoffet kun i ringe grad binde til det immobiliserede pesticid (figur 3). Man taler om, at der er en konkurrence mellem bundet og frit pesticid.

Brøndene tømmes og vaskes, så kun det antistof, der har reageret med det bundne pesticid, er tilbage. Der er koblet et bestemt enzym til antistofferne, og nu tilsættes et stof (substrat), der reagerer med dette enzym. Dvs. når substratet spaltes af enzymet, dannes et farvet spaltningsprodukt (signal), og absorbansen kan måles. Som følge af konkurrencen mellem immobiliseret pesticid i brønden og ubundet pesticid i prøven, vil lave pesticidkoncentrationer i prøven medføre, at flere enzymmærkede antistoffer binder til brønden, hvorved der fås en større substratomdannelse og dermed et større signal (absorbans).



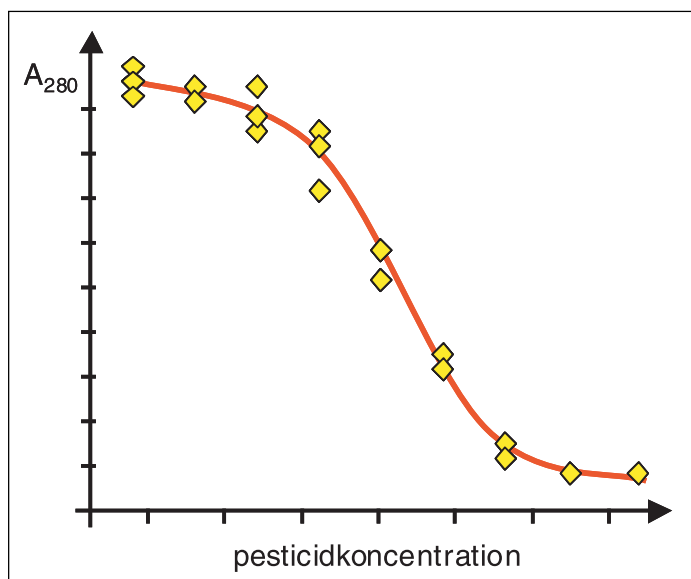
Figur 3. Konkurrenceassay. Er der pesticid i den tilsatte prøve, vil færre antistoffer binde til det pesticid, der på forhånd er koblet til overfladen (f.eks. bunden af en mikrotiterplade), og man får derfor et lille signal. Omvendt, hvis der ikke er pesticid i prøven, vil mere antistof binde til overfladen og signalet bliver højt.

Immunkemiske analyser på GEUS

På GEUS er der udviklet immunkemiske analyser for en række pesticider, heriblandt triazinherbicer og disses nedbrydningsprodukter [2] samt for BAM [3]. Analyserne bliver som standard altid udført som fire-dobbelte bestemmelser. Desuden skal der være en standardkurve og forskellige kontroller, hvorved der er plads til 13 prøver på hver mikrotiterplade. Den samlede analysetid er ca. 3-4 timer, og da man kan analysere flere plader på en gang, kan op til 50 prøver analyseres inden for dette tidsrum. En typisk standardkurve er vist i figur 4.

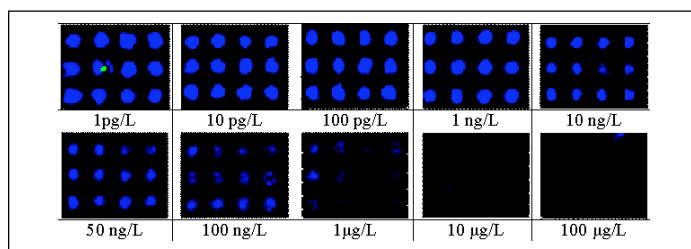
Fra mikrotiterplade til biochip

Med det formål at kunne screene for flere pesticider i en arbejdsgang har vi forsøgt at overføre mikrotiterpladeformatet til en biochip.



Figur 4. Eksempel på en standardkurve. Bemærk at en lav pesticidkoncentration giver et højt signal.

Begrebet biochip er i dag en generel betegnelse for et analyseformat, der ikke anvender brønde til separering af de enkelte reaktioner, men som i stedet udføres på en plan overflade, f.eks. et præparatglas. Princippet i en pesticidbiochip er det samme som ved mikrotiteranalysen. Det pesticid, man ønsker at analysere for, bindes som adskilte mikrosots til glasoverfladen, og efterfølgende tilsættes antistofferne og vandprøven. Også her vil antistofferne konkurrere om det bundne pesticid og pesticidet i prøven, så det højeste signal opnås ved lave pesticidkoncentrationer. Fordelen ved biochips er, at man kan analysere for mange pesticider i samme arbejdsang. Ved at benytte en robot udstyret med såkaldte printpinde kan man opnå en analysetæthed i størrelsesordenen 2000 analyser pr. cm² eller mere, og stadig holde de enkelte analyser adskilte. Det forhold at hele analysen foregår i mikroskala betyder, at koncentrationen kan bestemmes i et prøvevolumen på nogle få mikroliter. Samtidig bliver reaktionstiderne væsentligt kortere, når analysen foregår i et så lille volumen. Mens mikrotiterpladeanalysen indtil videre har anvendt enzymatisk detektion, har vi under udviklingen af pesticidbiochippet anvendt fluorescensmærkede antistoffer, der kan aflæses vha. en laserscanner (figur 5). Det har betydet, at arbejdsanggen er



Figur 5. Laserscan af pesticidbiochip designet til analyse af BAM og atrazin. Hver spot repræsenterer en enkelt analyse af en standard med kendt koncentration. De seks spots til venstre inden for hver koncentration er BAM-prøver og de seks spots til højre er atrazinprøver.

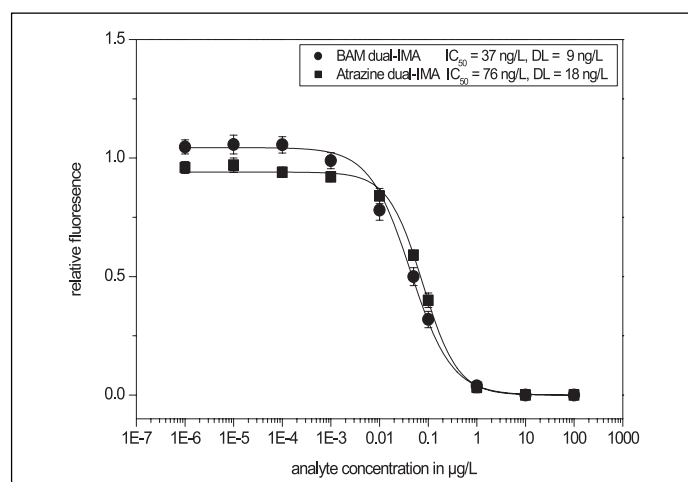
blevet forenklet, så den samlede analysetid for en pesticidchip er på mindre end 1½ time. Det, at analysen udføres med en mindre prøvemængde, har ikke betydet, at følsomheden er blevet mindre, tværtimod. Vi har udviklet en pesticidbiochip med en følsomhed helt nede i området 1 ng/l, hvor der i samme analysegang kan måles for både BAM og atrazin (figur 6). Det er muligt at indbygge flere pesticider i analysen, efterhånden som nye antistoffer mod andre pesticider bliver tilgængelige.

Muligheder og begrænsninger

Fordelene ved de immunkemiske analyser er,

- 1) at de kun kræver et lille prøvevolumen, dvs. et stort antal prøver kan nemt transporteres til laboratoriet, evt. med ordinær post
- 2) der bruges ikke opløsningsmidler eller andre stoffer, der kan skade miljøet og
- 3) de er væsentligt billigere at udføre.

En af de nuværende begrænsninger ved de immunkemiske metoder er dog, at de kun måler koncentrationen af et enkelt eller i bedste fald nogle få pesticider ad gangen. I modsætning til dette måler de chromatografiske metoder (LC/MS eller HPLC) en række stoffer, hvilket gør dem mere velegnede, hvor der ønskes en screening. En anden begrænsning er, at kemisk nært beslægtede pesticider kan krydsreagere med det pesticid, man ønsker at analysere for. Det er ikke noget problem ved analyse for BAM, men f.eks. vil den immunkemiske analyse for atrazin også give et signal, hvis der er andre triazinherbicider i prøven. Det kan dog ikke udelukkes, at man med tiden kan udvikle mere specifikke antistoffer.



Figur 6. Eksempler på pesticidbiochipstandardkurver for BAM og atrazin.

Med udviklingen af pesticidbiochippet er det blevet muligt at analysere for flere pesticider i den samme arbejdsang, uden at analysen af den grund tager længere tid. De udviklede biochips måler både BAM og atrazin, og følsomheden er samtidig øget, således at der nu i en enkelt dråbe vand kan måles pesticider i koncentrationer på omkring 1 ng/l. I princippet kan en enkelt biochip indeholde et meget stort antal forskellige analyser, og det kan meget vel vise sig, at det er tilgængeligheden af specifikke antistoffer, der udgør den største begrænsning for udviklingen af en egentlig multikomponent immunologisk pesticidanalyse.

Fremtiden vil vise, om pesticidbiochippet, efterhånden som der udvikles nye pesticidantistoffer, bliver de klassiske analysemetoder overlegen.

E-mail-adresse:
Jens Aamand: jeaa@geus.dk

Referencer

1. GRUMO (2002): Grundvandsovervågning 2002. Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse, Miljøministeriet.
2. Bruun, L., C. Koch, M. H. Jakobsen, B. Pedersen, M. Christiansen, and J. Aamand (2001). Characterisation of monoclonal antibodies raised against different structures belonging to the s-triazine-group of herbicides. Anal. Chim. Acta. 436:87-101.
3. Bruun, L., C. Koch, B. Pedersen, M. H. Jakobsen, and J. Aamand (2000). A quantitative enzyme linked immunoassay for the detection of 2,6-dichlorobenzamide (BAM), a degradation product of the herbicide dichlobenil. J. Immunol. Meth. 240:133-142