

Immunkemi

- mus brugt til analyse for pesticider

Der bruges i dag store summer på pesticidanalyser som følge af, at der registreres et stigende antal forureninger med pesticider af vores grundvand. Der er derfor mange penge at spare, hvis der kan udvikles billigere analysemetoder.



Foto: Jørgen Dehliggaard

Grundvandet er truet af nedsvivende pesticider og nedbrydningsprodukter.

Af Leif Bruun og Jens Aamand

■ Vores brug af ukrudtsmidler, pesticider, er ikke uden problemer. Disse kemikalier kan trænge ned i grundvandet, og i flere tilfælde har EU's grænseværdi for indhold af pesticider på 0,1 µg/l været overskredet. Som følge heraf er der i perioden 1987-1998 lukket mere end 200 drikkevandsboringer. Det er især stoffet 2,6-dichlorbenzamid, også kaldet BAM, der har været årsag til lukninger, men der er også fundet andre pesticider i grundvandet. BAM er ikke et pesticid i sig selv, men et nedbrydningsprodukt fra ukrudtsmidlet dichlobenil. Mange af de pesticider, der er fundet i grundvandet, er i dag blevet forbudt at anvende. Dichlobenil blev således forbudt i 1997, men BAM må alligevel forventes at forurene vores grundvand langt ud i fremtiden. Den tid, der går, fra regn

falder på jordoverfladen, og til det når grundvandet, er nemlig meget lang. Transporttider på 20 år eller mere er ikke ualmindelige. Dette betyder, at mange af de pesticider, der måske i dag er blevet forbudt, alligevel også i fremtiden vil forurene vores grundvand. Stofferne er simpelt hen ikke nået derned endnu.

For at sikre rent drikkevand, der overholder EU's grænseværdier for pesticider, bruges der mange penge på rutinemæssige pesticidanalyser. Analyser udføres som oftest på kommercielle laboratorier ved brug af avanceret analyseudstyr som f.eks. væske- og gaskromatografi. Der stilles i dag krav om, at de anvendte analyser har en følsomhed der er 10 gange lavere end EU's grænseværdi, dvs. at følsomheden skal være helt nede omkring 0,01 µg/l. Prisen for en pesticid-analyse er meget høj. En enkelt

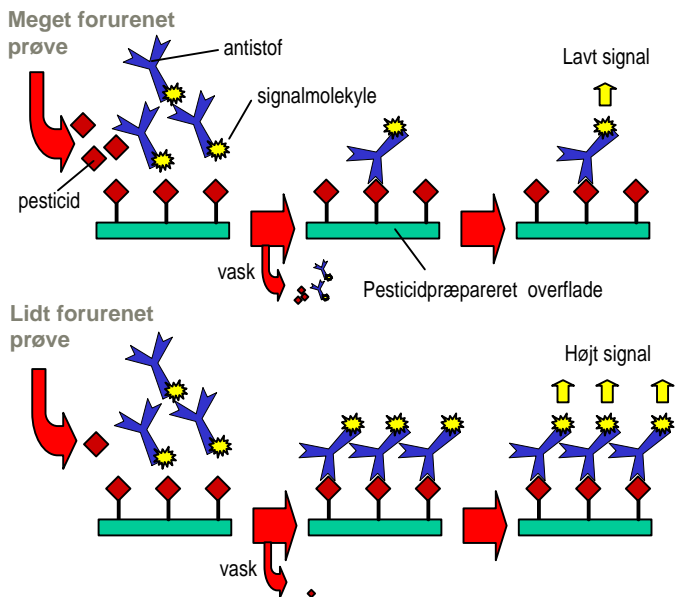
screeningsanalyse, der inkluderer f.eks. 8 pesticider, koster typisk 1600 kr. Visse pesticidanalyser er dog særligt vanskelige at udføre, og i sådanne tilfælde er analyseprisen væsentligt højere. F.eks. koster en analyse for stoffet glyphosat, der er aktivstoffet i ukrudtsmidlet Round Up typisk 3000 kr. Da der samtidig er et ønske om at udføre stadigt flere pesticidanalyser, er der stor interesse for at udvikle nye og billigere analysemetoder.

Inden for de seneste år er forskere begyndt at udvikle nye såkaldt *immunkemiske pesticidanalyser*. Her udnyttes det, at en mus ved injektion af små mængder pesticid producerer antistoffer mod pesticidet på nøjagtig samme måde, som når vi mennesker producerer antistoffer mod en influenzavirus. Antistofferne genkender specifikke kemiske strukturer på

pesticidmolekylet, og kan anvendes til udvikling af højfølsomme analysemetoder. Immunkemiske analysemetoder har i lang tid været kendt inden for den medicinske verden, hvor de bl.a. bruges til diagnosticering af halsbetændelse, og princippet anvendes også i flere af de graviditetstests, der findes i dag.

Antistoffer mod pesticider

For at udvikle antistoffer mod pesticider benytter man i dag de grundlæggende principper for en vaccination mod f.eks. influenza. I tilfældet med pesticider, benytter man mus, som får gentagne injektioner med en vaccine, som består af et protein med pesticider på overfladen (se boks B). Grunden til, at pesticiderne skal kobles til overfladen af et større protein, er, at pesticiderne ikke i sig selv er store nok til at kunne frem- →



Boks A. Princippet ved en immunkemisk pesticid-analyse: Den pesticidpræparerede overflade symboliserer indersiden af en brønd på en såkaldt mikrotiter-plade. Til en sådan brønd til-sættes prøven (typisk 150 µl) samt noget antistof. Antistofferne reagerer både med pesticiderne fra prøven og pesticiderne der sidder fast på den præparerede overflade.

Herefter vaskes overskydende prøve og antistof ud af brønden, og ved hjælp af signalmolekylerne kan man bestemme, hvor meget antistof, der sidder tilbage. Mængden af tilbagebleven antistof giver et mål for, hvor meget pesticid der var i prøven.

provokere produktion af antistoffer. Immunsystemet er indrettet til at bekæmpe større organismer som f.eks. virus eller bakterier, men ved at koble pesticiderne til større molekyler er det muligt at "snyde" systemet.

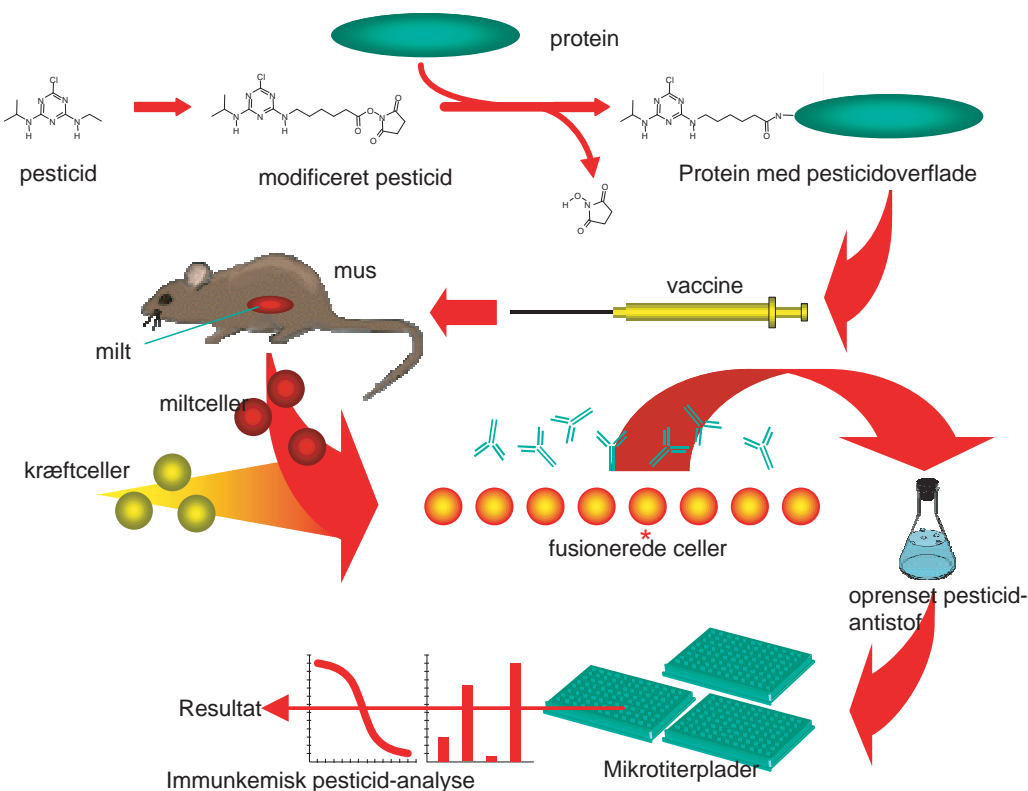
Blodprøver fra musen viser efterfølgende, om musens immunforsvar har reageret mod pesticiderne, og i så fald aflives musen. Milten indeholder mange antistof-producerende celler, og dette organ udtages derfor fra musen, så disse celler kan isoleres. Da det er meget vanskeligt at få disse celler til at vokse i laboratoriet, foretages der en såkaldt "fusion" mellem miltcellerne og kræftceller. Denne fusion resulterer i dannelsen af nye celler (hybridomer), der har arvet evnen til at producere antistoffer fra miltcellerne og evnen til at vokse uhæmmet fra kræftcellerne. Hybridomerne kan nu dyrkes i laboratoriet, og ved hjælp af forskellige teknikker kan man identificere, hvilke hybridomer der producerer antistoffer mod det pågældende pe-

sticid. De udvalgte hybridomer gennemgår herefter en såkaldt "kloning", hvor man sikrer sig, at den cellekultur, man arbejder videre med, kun består af én slags celler. Den endelige cellekultur kan opbevares i fryser i mange år, og kan til enhver tid tages op for at producere antistoffer mod pesticidet, der derefter kan danne udgangspunkt for immunkemiske analyser.

Immunkemisk analyse for pesticider

En immunkemisk pesticid-analyse kan opsættes på flere forskellige måder. Ofte anvendes såkaldte mikrotiter-plader (se boks B), der er små formstøbte plastikplader med 96 brønde. Til bunden af brøndene bindes (immobiliseres) det pesticid, som antistoffet kan genkende (boks A). Antistofferne vil herefter reagere med både det pesticid, der findes immobiliseret til bunden af brønden, og til det pesticid, der findes frit i vandprøven. Mængden af antistof der bindes til bunden af brønden vil dog afhænge af, hvad

Udvikling af antistoffer mod pesticider - boks B



Boks B.

Det pesticid, man ønsker at udvikle en immunkemisk analyse for, syntetiseres med en kemisk modifikation, der gør, at pesticidet kan sættes fast på et protein. Dette protein injiceres herefter i mus.

Efter nogle ugers behandling aflives musen, og celler fra milten tvinges til at vokse sammen med kræftceller, hvilket resulterer i fusionerede celler.

De fusionerede celler undersøges for, om de producerer antistoffer mod det rigtige pesticid, og at antistoffernes bindingsevne til pesticidet er tilstrækkelig.

Udvalgte celler klones og danner grundlag for en egentlig produktion af antistoffer. Antistofferne oprenses og benyttes til immunkemiske pesticid-analyser på mikrotiterplader.

der oprindeligt var i prøven. Man taler om, at der er en konkurrence mellem antistoffernes reaktion med det bundne pesticid og pesticidet i prøven.

Hvis der er meget pesticid i prøven, vil antistoffet hovedsageligt binde til det "frie" pesticid fra prøven. Hvis der derimod kun er lidt pesticid i prøven, vil antistoffet hovedsageligt binde til den præparerede overflade på mikrotiter-pladen. Man får derfor en omvendt proportionalitet mellem mængden af pesticid i prøven og det signal, analysen afgiver til laboratoriet. Jo mere antistof, der har bundet til mikrotiter-pladen, des mere signal genereres der. Signalmolekylerne kan være alt fra enzymer til fluorescerende molekyler.

Ulemper

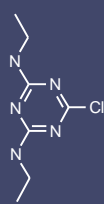
Problemet med at anvende antistoffer til pesticidanalyser er, at mange af de pesticider, vi analyserer for, ligner hinanden i strukturen. Som et glimrende eksempel på dette kan nævnes triazinerne, hvor udvalgte eksempler er vist i boks C. Det betyder, at har man anvendt et pesticid som atrazin som vaccine, så risikerer man, at de udviklede antistoffer også kan reagere med simazin, som strukturelt er nært beslægtet med atrazin. Dette kaldes i fagkrede "krydsreaktion". Antistoffer kan have bindingslommer, der populært kan sammenlignes med en handske til en hånd. Udseendet og egenskaberne af den bindingslomme, som et givent antistof er udstyret med, er afhængig af, hvordan vaccinen blev fremstillet. F.eks. er det meget vigtigt, hvordan pesticidet var orienteret på vaccinen. Ved at anvende bestemte orienteringer af f.eks. atrazin kan man nogenlunde styre, hvilke antistoffer der kommer ud i sidste ende. Boks D viser en simplificeret skitse af, hvordan antistoffer med forskellige bindingslommer kunne tænkes at reagere med diverse triaziner.

Hvor står vi i dag?

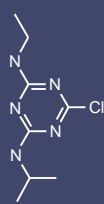
GEUS – Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse har i et samarbejde med Sta- →

Kemiske strukturer

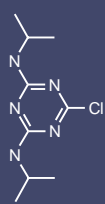
Boks C. De kemiske strukturer for udvalgte pesticider: De første 5 pesticider hører til gruppen triaziner. De næste tre stoffer er vigtige nedbrydningsprodukter fra simazin, atrazin og propazin. Det sidste stof er nedbrydningsproduktet, BAM som stammer fra pesticidet dichlobenil. Der arbejdes i øjeblikket på at udvikle immunkemiske analyser for de pesticider, som er vist nederst.



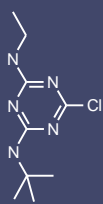
simazin



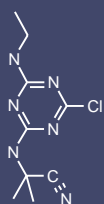
atrazin



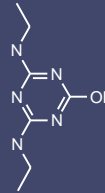
propazin



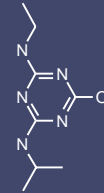
terbutylazin



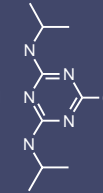
cyanazin



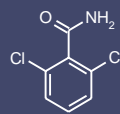
hydroxy-simazin



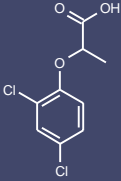
hydroxy-atrazin



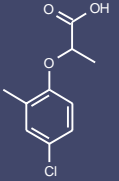
hydroxy-propazin



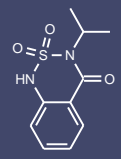
BAM



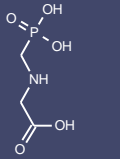
dichlorprop



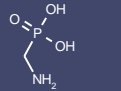
mehchlorprop



bentazon

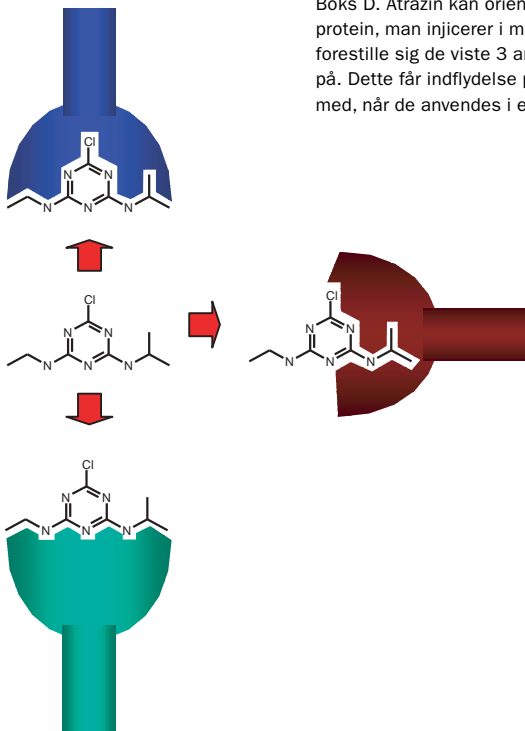


glyphosat






AMPA

Antistoffers krydsreaktion mellem forskellige pesticider - boks D



Boks D. Atrazin kan orienteres på flere måder, når det sættes fast på det protein, man injicerer i musen. Afhængig af denne orientering, kan man forestille sig de viste 3 antistoffer med hver deres måde at binde atrazin på. Dette får indflydelse på, hvilke pesticider hvert antistof vil reagere med, når de anvendes i en immunkemisk analyse.

Pesticider	Antistoffer		
			
Atrazin	✓	✓	✓
Hydroxy atrazin	✗	✓	✓
Simazin	✗	✗	✓
Cyanazin	✗	✗	✓
Terbutylazin	✗	✗	✓
Propazin	✗	✓	✓



Rent drikkevand direkte fra hanen er et gode.

Foto: GEUS

tens Serum Institut og biotekvirksomheden Exiqon A/S forsket de sidste 3 år i udviklingen af nye antistoffer mod pesticider. Denne forskning har i dag resulteret i en række antistoffer, der reagerer på forskellig måde med diverse triaziner (Tabellen: antistof 1-10) og det kendte pesticid-nedbrydningsprodukt: BAM (11). Markeringerne med "*" angiver, hvilke analyser GEUS benytter i dag. Denne forskning har de seneste 10 år også været foretaget af mange internationale forskergrupper. Dette har bevirket, at der i dag eksisterer antistoffer mod triaziner og mange andre pesticider verden

Table: Antistoffer

Anti-stof	Pesticid	Evt. analyses detektionsgrænse
1	atrazin, simazin	0,02 µg/l *
2	cyanazin, terbutylazin	0,03 µg/l
3	simazin, cyanazin, atrazin, terbutylazin	0,03 µg/l
4	atrazin, terbutylazin	0,06 µg/l
5	simazin, atrazin	0,05 µg/l
6	atrazin	0,05 µg/l
7	simazin	0,05 µg/l
8	cyanazin, propazin, terbutylazin	0,01 µg/l *
9	cyanazin	0,07 µg/l
10	hydroxypropazin, hydroxyatrazin, hydroxysimazin	0,01 µg/l *
11	BAM	0,02 µg/l *

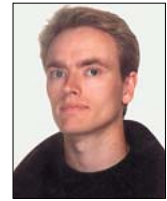
over. Grunden til, at der i tabellen er angivet flere triaziner ud for nogle af antistofferne er, at disse antistoffer krydsreagerer mellem de angivne triaziner. Dvs. benytter man f.eks. antistof 5 til en pesticidanalyse, vil man ikke kunne vide, om resultatet stammer fra simazin eller atrazin. En pesticidanalyse, der benytter antistof 11, vil således kun give svar for eventuelle mængder af BAM og ingen andre pesticider. Derfor har de immunkemiske analyser et problem, hvis man ønsker en pålidelig analyse for flere forskellige pesticider i samme vandprøve. Det er blandt andet derfor, at man i dag hovedsageligt benytter dyrere kromatografiske metoder til kontrol af drikkevandet.

Hvad vil fremtiden bringe ?

For at kunne hamle op med de kromatografiske metoder har GEUS indledt et samarbejde

med Statens Serum Institut, Exiqon A/S samt de to DTU institutter: MIC og IMT. Dette samarbejde har til formål at udvikle en pesticid-chip som gerne skulle kunne måle for flere pesticider på én gang. I den forbindelse skal der også udvikles nye antistoffer mod bl.a. glyphosat (boks C).

Pesticid-chippen (boks E) skal konstrueres på en sådan måde, at de forskellige antistoffer hver for sig reagerer med vandprøven. Dette kan styres vha. af mikroflow-systemer og kapillære kræfter, som fører prøven gennem chippen og ud i samtlige antistofkamre (boks E 9: 1-11). Det er ikke urealistisk, at en sådan analyse kun vil tage omkring 30 minutter at udføre og til en brøkdel af den pris, det koster at få foretaget pesticidanalyser i dag. ☺



Leif Bruun er projektforsker
e-post: lbr@geus.dk
Tlf.: 38 14 23 17



Jens Aamand er seniorforsker,
e-post: jeaa@geus.dk
Tlf.: 38 14 23 26

Geokemisk afdeling
GEUS - Danmarks og Grønlands Geologiske Undersøgelse
Thoravej 8
2400 København NV
Tlf.: 38 14 20 00

<http://www.geus.dk>

Råskitse for opsætningen af en pesticid-chip - boks E

Boks E.

En vandprøve tænkes påsat i et applikationsfelt på chippen. Herefter vil kapillære kræfter føre prøven gennem chippen og fordele den i forskellige reaktionskamre. Hvert kammer indeholder antistoffer mod enten én eller flere pesticider og det er målet at man efter en kort analyse-tid har et kvantitativt estimat for hvilke pesticider eller grupper af pesticider der er tilstede i prøven. Sådanne chips vil også kunne indbygges i rutineprægede apparaturer.

