

化学物质的 Ah 受体效应重组基因酵母检测法的优化

王伟, 胡建英*, 顾炜旻, 刘燕花

(北京大学环境学院, 北京 100871)

摘要: 接有芳香烃受体(AhR)基因和芳香烃受体核转位子蛋白(ARNT)基因的酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株是测定化学物质的 Ah 受体效应的方法之一. 本实验通过优化各个实验条件, 发现用 0.2% 葡萄糖作前培养液培养菌 24 h, 用 2% 半乳糖作化学物质暴露时的培养液, 暴露在玻璃管时, 暴露时间从原来的 18 h 缩短到 8 h. 并用已经优化的方法测定了六氯苯和五氯苯的 Ah 受体效应, 得出六氯苯和五氯苯相对于 TCDD 的毒性等当量值(TEF)分别为 0.018629 和 0.000294.

关键词: 重组基因酵母检测法; Ah 受体效应; 六氯苯; 五氯苯

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)04-0155-04

Modification and Application of Recombinant Yeast Bioassay for Measuring the AhR Ligand Activity

WANG Wei, HU Jian-ying, GU Wei-min, LIU Yan-hua

(College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: A recombinant yeast bioassay, a yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in which the human AhR and ARNT complex are coexpressed, is one of the methods to screen the active AhR agonist. In this study, the original agonist test was modified. The exposure time was reduced from 18 to 8 hours when experiment was under the following conditions: ① the yeast was cultured in 0.2% glucose medium for 24 hours; ② chemical exposure was carried in 2% galactose medium in glass tube. Finally, the AhR activity of hexachlorobenzene and pentachlorobenzene were assessed, and their toxicity equivalent factors were found to be 0.018629 and 0.000294, respectively.

Key words: recombinant yeast bioassay; AhR agonist; hexachlorobenzene; pentachlorobenzene

二恶英类物质是人类生产活动的副产品, 对其生成降解以及毒理学方面的研究是当今环境科学的前沿^[1,2]. 芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)介导基因表达是以 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p* dioxin(TCDD)为代表的二恶英类化学物质毒性作用的最基本的作用机制. AhR介导的目标基因表达的改变被认为是 TCDD 等物质引起生物影响的机理. 研究表明, 还有许多化学物质如多环芳烃类也能够和 AhR 受体结合, 显示出和二恶英类物质类似的生物效应^[3].

目前已经开发出几种监测环境样品的二恶英类物质的生物监测方法. 主要包括: ① EROD 酶诱导法^[4]; ② 重组受体/报告基因表达培养细胞法 CALUX/CAFLUX^[5]; ③ 重组受体/报告基因表达酵母法^[6]; ④ 细胞增殖法^[7]. 这些方法各有优缺点, 如 EROD 酶诱导法灵敏度较高, 但是耗时较长. 细胞培养需要 24 h, 再加上化学物质暴露时间需要 48 h, 整个实验周期较长. 由于 PCBs 等物质会抑制 EROD 的诱导^[8], 从而导致此方法信号不准确; 重组受体/报告基因表达培养细胞对荧光稳定性有一定要求, 细胞培养需要 24 h; 细胞增殖法操作简便, 但实验周

期长, 特异性差. Miller 等^[6]于 1997 年就开发了重组受体/报告基因表达酵母法. 这种测定方法是将人类 Ah 受体和 ARNT 基因克隆到酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株上, 通过配体诱导激活受体基因, 同时激活报告基因, 转录成 β -半乳糖苷酶, 通过测定 β -半乳糖苷酶来检测出化学物质的 Ah 受体效应. 此方法相对而言有快速简单, 较高的灵敏度等等优点, 开始应用于 Ah 受体效应物质的筛选中. 但是此方法存在着诸多缺点, 如响应值偏低, 背景值较高, 色氨酸类物质显示微弱的 Ah 受体效应等等. 为此, Miller^[9]在 1999 年将方法作了优化, 筛选出了较为理想的菌株 YCM3, 报告质粒 pTXRE5-Z, 使监测灵敏度有了很大的提高, 并降低了背景值. 同时, 作者还发现暴露容器材质对 TCDD 的活性有较大的影响. 尽管如此, 此方法还存在暴露时间较长(18 h)的问题, 而且暴露容器材质对于 TCDD

收稿日期: 2003-10-08; 修订日期: 2004-01-15

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(49925103); 国家 863 计划项目(2002 AA601140-6)

作者简介: 王伟(1979~), 女, 硕士生, 主要研究方向为环境毒理学.

* 通讯联系人: huji@urban.pku.edu.cn

以外的物质是否也存在影响还没有一个定论.

基于以上背景,本文通过研究碳源,实验器材的种类和暴露时间对 β -naphthoflavone 诱导 Ah 受体效应的影响,优化上述方法,并将其应用到我国污染较严重的六氯苯、五氯苯的 Ah 受体效应的测试.

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

β -naphthoflavone(以下简称 NF,99%+,Acros organics)用作阳性对照;二甲基亚砜(ACS级,美国 AMRESCO);显色剂(σ -nitrophenol- β -D-galactopyranoside, ONPG, 东京化成);溶菌酶 Zymolyase(20T;生化学工业,日本);实验用培养基为去除了 tryptophan 的 SD 培养基,对象物质等标准物质均购买于日本东京化成和林纯药公司;BIORAD 550 酶标仪, Nunc 96 孔 2 条可拆酶标板;Jouan MR18 22 冷冻离心机.

1.2 Ah 受体效应酵母测试方法

用接种针挑取 2~3 环酵母菌株 YCM3^[9]于放有葡萄糖培养液的培养瓶中,在 30℃ 的条件下过夜培养(对数生长期).取上述培养液 50 μ L 加入有 200 μ L 培养液的小管中,再添加 2.5 μ L 的样品溶液(DMSO 溶解液),震荡摇匀.置于摇床(转速为 200 r/min)上培养(30℃).移取 150 μ L 上述培养液于酶标板(96 孔)中,于 595 nm 波长下测定菌液的吸光度值(以加入 DMSO 的培养液为参照空白).余下的溶液离心 5 min(15000 r/min),弃去上清液后,加入 200 μ L 含 1 mg·mL⁻¹ Zymolyase 的 Z buffer (0.1 mol/L)的碳酸钠缓冲溶液(pH=7.0,10 mmol/L 的 KCl,1 mmol/L 的 MgSO₄)溶液,震荡混匀后,静置反应 20 min(30℃)去细胞壁.加入含 4 mg·mL⁻¹ ONPG 的缓冲溶液(0.1 mol/L 的 Na₂HPO₄ 和 KH₂PO₄)40 μ L 于上述溶液中,震荡混匀,再于 30℃ 条件下静置反应至产生黄色,记录反应时间,加入 100 μ L 的 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液使反应停止.离心 5 min(15000 r/min),吸取上清液 150 μ L 于 96 孔酶标板中,分别于 415 nm 和 570 nm 波长下测定吸光度值(以加入菌液的培养液为参照空白).

最后用下式计算 β -半乳糖苷酶诱导活性:

$$\beta\text{-Galactosidase Activity (Unit)} = 1000 \times (A_{415} - 1.75 \times A_{570}) / (t \times V \times A_{595})$$

其中, t 为加入 ONPG 到出现黄色的反应时间; V 为菌液体积(0.05 mL); A_{595} A_{415} A_{570} 为吸光度值.

1.3 数据统计

本实验中数据统计使用 Microsoft Excel 软件.六氯苯和五氯苯 EC 值的计算使用 GraphPad Prism 软件.六氯苯和五氯苯 TEF 值的计算为 TCDDEC10 值除以氯苯 EC_{TCDD10%}, EC_{TCDD10%} 值是当氯苯的 β -半乳糖苷酶诱导活性为 TCDD 的诱导活性的最大值的 10% 时的浓度值.实验次数为 2 次.

2 结果和讨论

2.1 培养基碳源对诱导活性的影响

根据文献报道,在 GAL1.10 启动子表达 AhR、ARNT 基因受培养基中碳源影响较大,也即可以受半乳糖激活被葡萄糖抑制^[10].为了优化碳源对酵母 β -半乳糖苷酶活性诱导的影响,分别对不同试验阶段的所用培养液中碳源的种类和浓度对 Ah 受体效应的影响进行了研究.图 1 表示了化学物质暴露阶段的碳源种类对 NF 诱导 Ah 受体活性的影响,隔夜培养的培养液中的碳源为 2% 的葡萄糖.从图 1 可知,当化学物质在暴露阶段的培养基碳源为 2% 葡萄糖时, NF 不能诱导 Ah 受体活性,而添加同样浓度的半乳糖后,得到了非常好的 NF 的剂量-反应曲线.

另外发现隔夜培养液碳源种类对酵母 β -半乳糖苷酶诱导活性几乎没有影响,但受其浓度的影响较大.图 2 表示了葡萄糖浓度对于 NF 诱导 Ah 受体效应的影响.当葡萄糖浓度分别为 0.2% 和 2%,隔夜培养时间为 14 h 时,2% 葡萄糖的条件下, NF 能更好地诱导 AhR 受体效应;延长隔夜培养时间到 24 h,发现含有 0.2% 的葡萄糖的培养基下, NF 对 Ah 受体的诱导活性有很大的改进,而 2% 的葡萄糖的

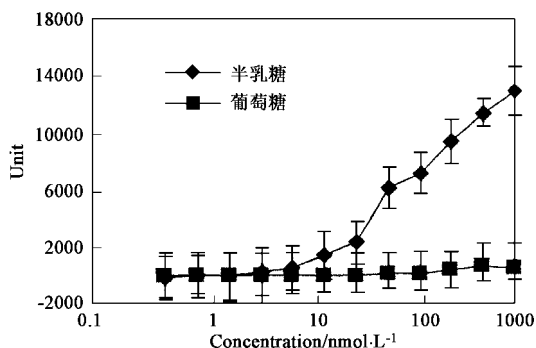


图 1 暴露反应培养基对酵母诱导活性影响(隔夜培养基:2%葡萄糖;隔夜培养时间:14 h;暴露时间:10 h)

Fig.1 Effects of culture medium for exposure on β -galactosidase activity

(overnight culture:2% glucose,14 h,exposure time:10 h)

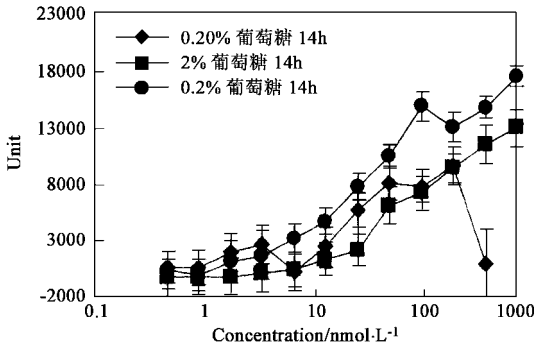
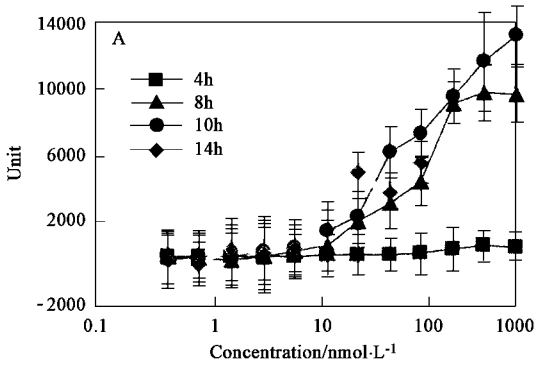


图 2 隔夜培养培养基中葡萄糖浓度对酵母诱导活性的影响
(暴露时间:8 h;暴露培养基:2 %半乳糖溶液)

Fig.2 Effects of glucose concentration in overnight
cultre medium on β -galactosidase activity
(exposure time :8 h;exposur culture :2 % galactose)



条件下,即使延长培养时间,其诱导活性没有改善.

2.2 暴露时间对诱导活性的影响

暴露时间是生物监测方法的一个关键参数之一.图 3(A)为当隔夜培养基中的葡萄糖浓度为 2 % 时,暴露时间对诱导活性的影响.从图中可以知道,在暴露时间为 4 h 时,NF 对 Ah 受体的诱导活性非常低,当暴露时间增加到 8 h,诱导活性有很大的增加,10 h 时,NF 诱导 Ah 受体的最高活性为 13 000 unit.另外方面,当隔夜培养基中的葡萄糖浓度降为 0.2 %时,暴露时间对诱导活性的影响表示在图 3 (B)中.从图中可以看出,即使在暴露时间为 4 h 时,NF 就显示出较高的 Ah 受体活性.当暴露时间增加到 8 h,其诱导活性有了非常高的增加.但是暴露时间过长,导致诱导过甚使吸光度值超过酶标仪量程,

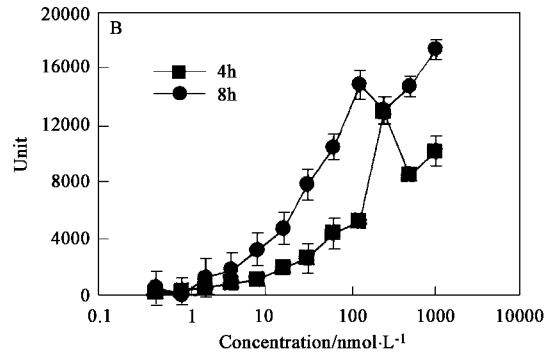


图 3 暴露时间对酵母诱导活性的影响(暴露反应培养基:2 %半乳糖;隔夜培养培养基:(A)2 %葡萄糖,14 h:(B)0.2 %葡萄糖,24 h)

Fig.3 Effects of exposure time on β -galactosidase activity(exposure culture :2 % galactose .Overnight culture :
(A) 2 % glucose ,14 h ;(B) 0.2 % glucose ,24 h)

在以后的实验中,暴露时间设定为 8 h .

2.3 暴露器材质对 NF 诱导 AhR 活性的影响

由于显示 Ah 受体效应的物质往往是低极性的化学物质,因此这些化学物质有可能会吸附在暴露

实验管的管壁上.图 4 中,隔夜培养培养液碳源为 0.2 %葡萄糖,暴露反应培养基碳源为 2 %半乳糖,暴露时间为 8 h 时暴露实验器材质对 NF 诱导 Ah 受体活性的影响.在相同的实验条件下,用聚苯乙烯管作为暴露实验管时,NF 的 Ah 受体诱导效应低于用硼硅玻璃管作为暴露实验管时的活性,这一实验结果和 Miller^[9]的结果非常相似,在他们的实验中,发现管材对 TCDD 的 Ah 受体效应有很大的影响.在以后的实验中,都采用玻璃管作为暴露实验管.

2.4 重组基因酵母检测几种化学物质的 Ah 受体效应

优化了实验方法后,本研究测试了六氯苯 (HCB),五氯苯(Penta- CB) 的剂量-效应关系(如图 5 所示).发现六氯苯有比较强的 Ah 受体效应,在 100 nmol/ L 浓度时就表现出活性,而且在 2000nmol/ L 时的活性值甚至和 NF 的最大活性值相当.六氯苯

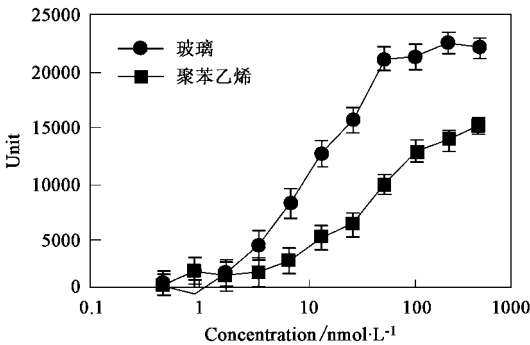


图 4 容器材质对酵母诱导活性的影响

Fig.4 Effects of exposure-tube materials on
 β -galactosidase activity

的相对于 TCDD 的毒性当量值为 0.018629.五氯苯的 Ah 受体效应相对较小,可是从 1000 nmol/L 开始也表现出了一定的活性,并且随着浓度的增加活性值有明显的上升趋势.五氯苯的相对于 TCDD 的毒性当量值为 0.000294.

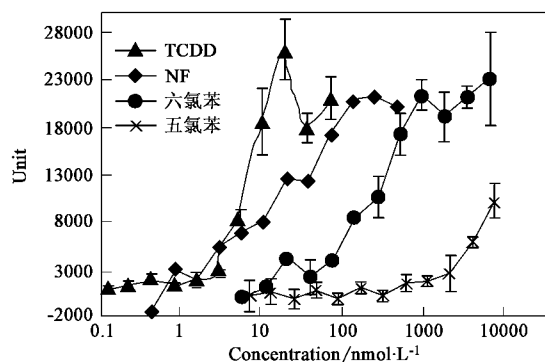


图 5 六氯苯 五氯苯的剂量-反应活性关系

Fig.5 Dose-response of HCB and Pentachlorobenzene

3 结论

本实验优化了 Ah 受体效应酵母测试方法的各个实验条件,发现用 0.2 %葡萄糖做前培养液培养菌 24 h,用 2 %半乳糖做化学物质暴露时的培养液,暴露在玻璃管时,暴露时间从原来的 18 h 缩短到 8 h.并用已经优化的方法测定了六氯苯和五氯苯的 Ah 受体效应,得出六氯苯和五氯苯相对于 TCDD 的毒性等当量值 (TEF) 分别为 0.018629 和 0.000294.重组受体基因/报告基因表达酵母法是一种比较快速有效地筛选和定量分析环境样品中二恶英类污染物质的方法.

参考文献:

[1] Kimbrough RD. Halogenated Biphenyls, Terphenyls,

Naphthalenes [M]. Dibenzo-dioxins and Related Products New York: North-Holland Biomedical Press, 1980. 406.

- [2] Nie M, Blankenship A, L Giesy J P. Interaction between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways: a potential mechanism for TCDD toxicity [J]. Environ. Toxicol. Pharmacol., 2001, **10**: 17 ~ 27.
- [3] Hilscherova K, Machala M, Kannan K, Blankenship AL. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples [J]. Environ. Sci. Pollut. Res., 2000, **7**: 159 ~ 171.
- [4] Brunstrom B, Engwall M, Hjelm K, Lindqvist L, Zebuhr Y. EROD induction in cultured chick embryo liver: a sensitive bioassay for dioxin-like environmental pollutants [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999, **14**: 837 ~ 842.
- [5] Clemons J H, Allan L M, Marvin C H, Wu Z, McCarry B E, Bryant D W, Zacharewski T R. Evidence of estrogen and TCDD-like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using in vitro gene express assay [J]. Environ. Sci. Technol., 1998, **32**: 1853 ~ 1860.
- [6] Charles A. Miller III. Expression of the Human Aryl Hydrocarbon Receptor complex in Yeast [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, **272**: 32824 ~ 32829.
- [7] Van Pelt FN, Hassing IG, Stelling MA, Seinen W. Induction of terminal differentiation in cultured human keratinocytes by polychlorinated aromatic hydrocarbons as measured by cell size analysis [J]. Toxicol Appl Pharmacol., 1992, **113**: 240 ~ 245.
- [8] Petrusis J R, Bunce N J. Competitive inhibition by inducer as a confounding factor in the use of the ethoxyresorufin O-deethylase assay to estimate exposure to dioxin-like compounds [J]. Toxicol. Lett., 1999, **105**: 251 ~ 260.
- [9] Charles A. Miller III. A human aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Pathway Constructed in Yeast Displays Additive Responses to Ligand Mixtures [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1999, **160**: 297 ~ 303.
- [10] Johnston M, Davis R. Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in Saccharomyces cerevisiae [J]. Mol. Cell. Biol., 1984, **4**: 1440 ~ 1448.