

基因重组细胞在环境样品多氯联苯检测中的应用

徐挺¹, 孔繁翔^{1,2*}, 孙成¹, 谈健康¹, 韩小波¹, 阎荣¹

(1. 南京大学环境学院, 南京 210093; 2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008; E-mail: kongfx@jlonline.com)

摘要: 为发展快速、简便和廉价的检测环境和生物样品中的多氯联苯技术, 本研究利用重组有绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶(Luc)报告基因的 2 个细胞系, 检测从野外环境中所采集的水、底泥和生物样品中的多氯联苯的含量。研究结果表明, GFP 和 Luc 荧光强度与多氯联苯标样浓度的相关性很好, 相关系数分别达到 0.99188 和 0.98239; 具有很好的剂量-效应关系。与气相色谱-电子捕获器法(GC-ECD)的仪器分析比较, GFP 和 Luc 的荧光强度与环境样品中的多氯联苯化合物含量也具有很好的相关性。因此可用于受多氯联苯污染的环境样品筛选和半定量快速、简便、廉价检测。

关键词: 基因重组细胞; 多氯联苯; 环境样品

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)01-0045-04

The Application of the Gene recombinated Cell in the Detection of PCBs Compounds in Environmental Samples

XU Ting¹, KONG Fan-xiang^{1,2}, SUN Cheng¹, TAN Jian-kang¹, HAN Xiao-bo¹, YAN Rong¹

(1. School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; E-mail: kongfx@jlonline.com)

Abstract: To develop novel and rapid bioassay systems for detection of PCBs in environmental and biological samples, two lines of gene-recombinated cells containing reporter gene, green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc), were chosen to detect the PCBs in the water, sediment and biological samples from environment. The result showed that the correlation between RFU of GFP and Luc activity and PCBs standard sample concentration was fine, r was 0.99188 and 0.98239 respectively. Compared with the instrument analysis with GC-ECD, the correlation between RFU of GFP and Luc activity and PCBs concentration in environmental and biological extracts was also fine. The method offered a new way of screening and semi-quantitative bioassay for PCBs compounds in environmental and biological samples.

Key words: gene-recombinated cell; PCBs compounds; environmental sample

多氯联苯(polychlorinated biphenyl, PCBs)是二噁英类化合物的一大类,能与芳香烃受体(AhR)结合^[1,2]。在剂量极低时仍可对动物产生致畸、致癌、内分泌干扰等毒性^[1,3]。采用传统的化学分析方法,处理复杂,费用昂贵,纯化与分析过程费时,无法进行大量环境样品快速筛选和日常监测。基因重组可以将能发生易观察的生物学信号的报告基因与二噁英类化合物反应原件(DRE)基因片段共同整合到细胞中,构成稳定表达的重组细胞系。由于报告基因受性状基因控制,因此可以直接测定完整细胞的荧光强度,以确定环境样品中二噁英类化合物如多氯联苯的浓度,省去常规生物分析过程中的细胞破碎、提取和生化反应等繁琐程序,发展一套快速、灵敏、廉价、简便的检测技术。目前这方面的技术发展很快^[4,5],但大多仍处于实验室的研究过程,用于环境样品测试则少见报道^[2,6,7]。

本实验采集香港湾区的底泥样品和鱼,以及南京市乌龙潭公园的水样和金川河入江口的水样及

底泥样品,利用 2 种细胞系对这些环境样品中的多氯联苯含量进行测定,并与仪器分析结果比较,进行环境样品的初步筛选^[8],为是否必要进行化学分析提供参考,探讨生物测定方法在检测环境样品中的应用前景。本研究中以多氯联苯为模型化合物,因此所提出的方法原理可以用于测定二噁英类化合物。

1 材料与方法

1.1 样品采集

样品分别采自香港铜锣湾地区(Causeway Bay)的底泥(S1)和澳背塘地区(O Pui Tong)的翡翠贻贝(B),南京市乌龙潭公园的水样(W1);南京市金川河入江口处的水样(W2)和底泥样(S2)。泥样由彼得森式采泥器收集,经风干、研细、过筛后密封保存备用;水样用采样器收集,采回后立即放置冰箱-20℃

收稿日期:2003-03-06;修订日期:2003-05-28

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2001039)

作者简介:徐挺(1978~),男,安徽合肥人,硕士研究生,研究方向为环境生物学。

* 通讯联系人

保存。铜锣湾位于香港岛的正北部,与九龙的尖沙咀隔海相望,其间有来自港岛的生活污水,以及九龙、新界工业区排放的废水;澳背塘位于香港东北海域及大鹏湾附近,曾是香港海产养殖的重要场所,但由于毗邻深圳,可能会受到影响;乌龙潭公园位于南京市居民区内,周围有数家医疗机构对其直接排放;金川河是南京市中心地带一条重要的城市内河,汇入长江,流域内工厂企业 65 家,工业废水的排放量占其纳污总量的 25.8%^[9]。

1.2 样品中多氯联苯的提取

(1) 底泥及生物样品的提取^[10] 保存的底泥样品经风干、研碎,准确称取干燥的 20g 底泥样品或 5g 生物样品于 100 mL 离心管中,同时定量加入 4 mL 重蒸水,10 mL 甲醇及 20 mL 正己烷,密封后用 KS250D 型超声清洗仪(宁波科生仪器厂)超声萃取 1 h。离心,静置,移取上层萃取清液,再加入 20 mL 正己烷,再次超声萃取 1 次,移取上层萃取液,与前次萃取液合并于梨形瓶中。

(2) 水样的提取 准确称取 1.5g 硅胶和 0.5g Na₂SO₄ 至 6 mL 固相萃取柱,成 6 mL C18-SPE 固相吸附柱(美国 SUPELCO 公司)。萃取柱用 10 mL 正己烷清洗 2 次,加压过柱。然后将萃取浓缩的样品溶液加于萃取柱顶部,至样品渗入柱内时,用 10 mL 5% 异丙醇/正己烷溶液淋洗柱内被吸附的有机化合物,并将洗脱液收集入 25 mL 梨形瓶中。用 RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),蒸去其中的正己烷,以备生物测试;另将提取液转移入特制小样品管,用缓流高纯氮吹至 100 μL,加入内标,移至带内衬管的进样瓶中,以备仪器分析。

1.3 样品的分析

(1) 样品的仪器分析 仪器分析采用气相色谱-电子捕获器法(GC-ECD),HP6890 型气相色谱仪,配自动进样器和 ECD 检测器。GC-ECD 操作条件:初温 60°C,程序升温法 25°C/min 升高至 170°C;4°C/min 升高至 190°C;10°C/min 升高至 230°C;2°C/min 升高至 240°C;10°C/min 升高至 270°C;保持 5 min。载气:高纯氦气(纯度 99.99%);进样量为 1 μL。

(2) 样品的生物测试 本实验利用经电激转染法,分别含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)报告基因的细胞系(H1. Gl. 1c3)以及荧光素酶(luciferase, Luc)报告基因的细胞系(pGud-Luc1.1)。基因重组细胞从美国加州大学戴维斯分校 Michael 教授实验室获得(DNA 转染及筛选过程另

文发表)。H1. Gl. 1c3 细胞培养在 alpha-MEM 培养基,加入 10% 牛血清蛋白并含有抗菌素 G418 (968 mg/L);pGudLuc1.1 细胞培养于 alpha-MEM 培养基,加入 10% 牛血清蛋白培养基。培养条件为 37°C,CO₂ 浓度为 5%。

绿色荧光蛋白测定:细胞(H1. Gl. 1c3)经培养后,在 96 孔黑色微孔板中加入细胞悬浮液 100 μL/孔,每微孔中细胞数达到 7.5×10^4 。在培养箱中静置过夜,使细胞附着在微孔底部。第 2 天,移去上部培养基,加入 100 μL 培养基并含有不同浓度的作为多氯联苯标准溶液的 3,3',4,4',5-PCB 和待测环境样品的提取液。培养基与 PCB 浓度标准液和提取液体积比为 100:1,对照为二甲基亚砜。在 32°C 培养箱内处理 24 h 后,在荧光分光光度计(Perkin Elmer LS 50B)上,激发波长为 485 nm,发射波长为 515 nm,直接测定每个微孔板中细胞的荧光强度,并按照标准曲线计算环境样品的多氯联苯浓度,与仪器分析比较。每个处理有 3 个平行,并重复实验,取其平均值。

荧光素酶活性测定:将细胞(pGudLuc1.1)培养于 6 孔培养板,每孔加入 1 mL 细胞悬浮液,静置过夜,使细胞附着于培养板底部。第 2 天,移去上部培养基,加入 1 mL 培养基并含有不同浓度的上述标准溶液和待测环境样品的提取液。培养基与标准液和提取液体积比为 100:1。对照为二甲基亚砜。37°C 处理 4 h 后,移去上部处理液,用磷酸缓冲液洗涤细胞 2 次,加入 200 μL 裂解液,摇床 20 min。收集细胞裂解液于离心管,12,000 r/min 离心 1 min。在 96 孔微孔板中,每孔加入离心后的细胞裂解液 50 μL。在荧光分光光度计上加入反应底物,读数后,再加入荧光胺,测定蛋白质含量,计算单位蛋白质的荧光素酶荧光强度。

统计分析用 Excels 计算标准误差和回归系数。

2 结果与讨论

2.1 仪器分析结果

GC-ECD 仪器分析结果表明,S1、B、W1 样的多氯联苯含量的负对数值分别为 7.27、7.56 和 8.16。水样 W2 和底泥样 S2 分别为 7.88 和 7.35。

2.2 生物测定结果

(1) 绿色荧光蛋白 GFP 测定结果见图 1 和图 2。从这 2 个图中可见,GFP 荧光强度与多氯联苯标样的浓度的相关性很好,回归方程为 $y = 96054.9 - 7731.3x$,相关系数达到 0.99188,因此从理论上来

说利用该重组细胞的荧光蛋白可以很好地表征溶液中的多氯联苯含量.根据标准曲线,在底泥样品 S1 中,多氯联苯的含量的负对数值为 7.97, B 样值达到 9.42.水样 W1 中为 9.96(图 1).与仪器分析结果比较,底泥中的含量基本一致,为 7.27,但是在贻贝体内和水中的测定分别低一个或 2 个数量级.在底泥 S2 中,多氯联苯含量在生物和仪器测定分别为 7.34 和 7.35,十分吻合,而水样 W2 的生物测定和仪器测定相差一个数量级(图 2).

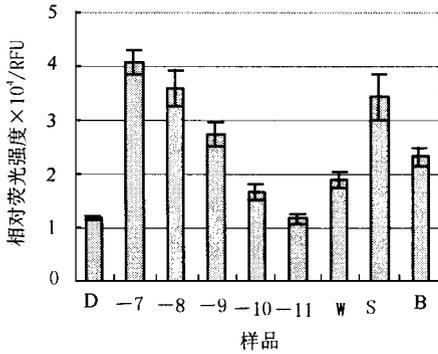


图 1 第一批样品绿色荧光蛋白发光值

Fig.1 RFU of the GFP in the 1st batch of samples

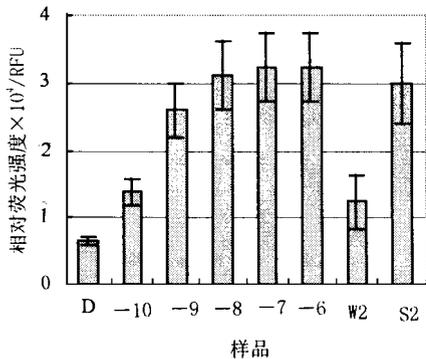


图 2 第二批样品绿色荧光蛋白发光值

Fig.2 RFU of the GFP in the 2nd batch of samples

在这 2 批样品测定的 GFP 荧光强度无论是标样还是环境样品均有一定的差异,这说明,不同批次的细胞在同样的化合物诱导下,会产生不同强度的荧光,因此,在测定环境样品时,标样的选择十分重要.从图中可以看到,当标样浓度在 $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 附近,荧光强度达到一个饱和值,这一现象在 Aarts 等人的研究中已有提及^[11].如果有样品的发光强度值落在这个饱和区域,需要稀释以获取较准确的结果.

(2) 荧光素酶 荧光素酶在环境样品中多氯联苯诱导下荧光强度的测定结果见图 3 和图 4.结果表明,荧光素酶活性与多氯联苯标样浓度同样具有很好剂量-效应关系.相关系数介于 0.95 ~ 0.98 间.

用生物测定环境样品的结果也与仪器分析比较吻合.如在仪器分析中, W1 水样,底泥样 S1 和鱼体样品的多氯联苯含量负对数值分别为 8.16, 7.27 和 7.56,而生物测定结果分别为 8.27, 6.91 和 7.47;在对 W2 的测定中,底泥样品中生物测定的结果与仪器分析基本一致,分别为 7.47 和 7.56.但水样的测定结果却与仪器分析相差 2 个数量级,分别为 7.88 和 9.99,其原因还有待分析.

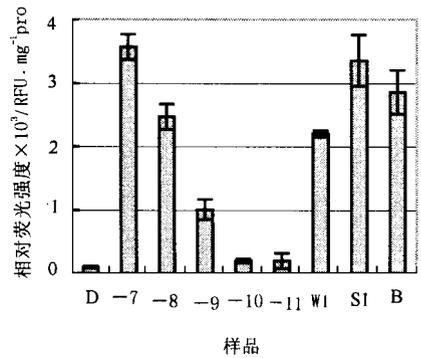


图 3 第一批样品荧光素酶活性

Fig.3 RFU of Luc in the 1st batch of samples

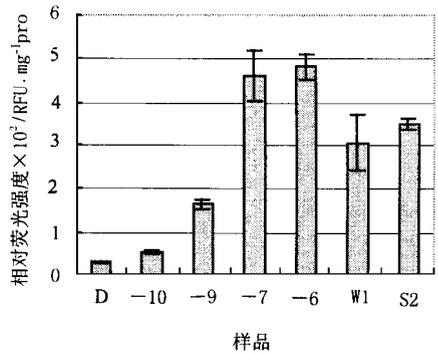


图 4 第二批样品荧光素酶活性

Fig.4 RFU of Luc in the 2nd batch of samples

(3) 生物测试与化学分析的比较 图 5 和图 6 中取测定浓度的负对数为纵坐标做图(因为是取负对数,所以绝对值越大,其表示的实际浓度越低).从图中可以看出,以 GFP 为报告基因时,生物测定的结果往往低于传统气相色谱法的结果(图 5),个别样品误差可达一个数量级.

而采用荧光素酶为报告基因的测定结果,相对来说要与气相色谱的结果吻合得多,但是在测定金川河河水样时,出现了误差(图 6).

生物测定和仪器测定差异也有可能来自于仪器的分析误差.因为本实验所采用的多氯联苯提取及 GC-ECD 检测方法有研究者认为其分离、净化步骤不是专门针对样品中的 PCBs 的,因此在进入 GC-ECD 的样品的响应不能准确代表 PCBs 的响应,计算 PCBs 的浓度也会产生偏差.

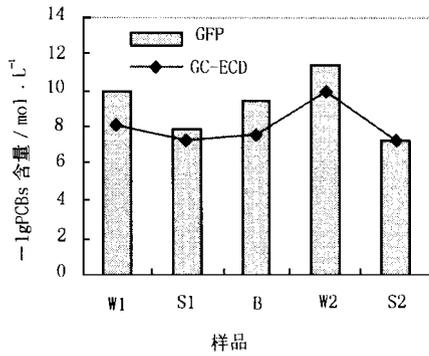


图 5 绿色荧光蛋白和气相色谱法的数据比较

Fig. 5 Comparison on the data from GFP and GC-ECD

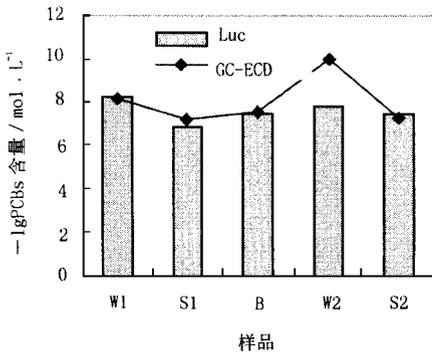


图 6 荧光素酶和气相色谱法的数据比较

Fig. 6 Comparison on the data from Luc and GC-ECD

从对标样的测定可以看到,生物测定与溶液中的多氯联苯浓度存在很好的剂量-效应关系,对环境样品的测定与仪器测定结果也基本吻合.本实验表明,采用转基因的重组细胞可以检测出环境样品中低至 10^{-8} 的多氯联苯.这一方法为实验室内进行环境样品的半定量筛选提供可能,也为野外污染物含量的测定提供参考.因此从理论上讲,这种快速、简便、廉价的生物测定方法作为一种筛选和半定量测定的手段在不断完善后,在某些对精度要求不高,不要求使用复杂、昂贵的仪器分析场合,是比较理想的替代方法.但是,从本实验中个别水样的测定,生物测定和仪器测定方法仍有一定差异,从生物学角度考虑,这可能是由于环境样品提取液中含有对生物遗传及蛋白质表达过程产生影响的物质^[12,13],使得生物测定产生一定的波动,因此给生物测定方法的发展提出了新的课题.

3 结论

(1) 从试验过程来看,利用报告基因重组细胞检测多氯联苯的方法相对于传统处理方法具有快速、简便、廉价等优点;本研究是以多氯联苯为模型化合物,因此所提出方法原理可以用于测定二噁英

类化合物.

(2) 从试验结果来看,用报告基因,尤其是采用荧光素酶作为报告基因时的测定结果令人满意,初步确定该方法在检测和筛选环境样品中的多氯联苯的含量在完善后可成立.

(3) 生物方法在对环境样品测定中,可能对样品的提取过程有一定的要求,以减少对生物遗传及表达过程的影响,还需进一步改善,以减小误差.

参考文献:

- [1] Hahn M E. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment [J]. *The Science of the Total Environment*, 2002, **289**: 49 ~ 69.
- [2] Murk A J, Leonards P E G, *et al.* Application of biomarkers for exposure and effect of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in naturally exposed European otters (*Lutra lutra*) [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1998, **6**: 91 ~ 102.
- [3] 张志仁,徐顺清等.二噁英类化合物毒性的分子机制 [J]. *环境与健康杂志*, 2000, **17**(5): 316 ~ 319.
- [4] 张菊梅,吴清平,周小燕,郭伟鹏,吴慧清,王元平.荧光素酶研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2001, **28**(5): 98 ~ 101.
- [5] 周盛梅,孟凡国,黄大年,黄纯农.绿色荧光蛋白及其应用 [J]. *生物工程进展*, 1999, **19**(2): 56 ~ 59.
- [6] Roberto F F, Barnes J M, Bruhn D F. Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection [J]. *Talanta*, 2002, **58**: 181 ~ 188.
- [7] Behnisch P A, Hosoe K, Sakai S. Combinatorial bio/chemical analysis of dioxin and dioxin-like compounds in waste recycling, feed/food, humans/wildlife and the environment [J]. *Environment International*, 2001, **27**: 495 ~ 519.
- [8] Behnisch P A, Hosoe K, Sakai S. Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds—a review of bioassay/biomarker technology [J]. *Environment International*, 2001, **27**: 413 ~ 439.
- [9] 冯效毅,丁光远,王金生.南京市金川河环境综合整治初步方案 [J]. *江苏环境科技*, 1997, **2**: 38 ~ 41.
- [10] 许士奋,蒋新,冯建,董玉瑛,孙成,王连生.气相色谱法测定长江水体悬浮物和沉积物中有机氯农药的残留量 [J]. *环境科学学报*, 2000, **20**(4): 494 ~ 498.
- [11] Aarts J M M J G, Denison M S, Cox M A, *et al.* Species-specific antagonism of Ah receptor action by 2,2',5,5'-tetrachloro- and 2',3,4,4'-hexachlorobiphenyl [J]. *European Journal of Pharmacology Environmental Toxicology and Pharmacology Section*, 1995, **293**: 463 ~ 474.
- [12] Smith C B, Anderson J E, Fischer R L, Webb S R. Stability of green fluorescent protein using luminescence spectroscopy: is GFP applicable to field analysis of contaminants [J]? *Environmental Pollution*, 2002, **120**: 517 ~ 520.
- [13] Ziccardi M H, Gardner I A, Mazet J A K, Denison M S. Application of the luciferase cell culture bioassay for the detection of refined petroleum products [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, **44**: 983 ~ 991.