

三种转基因酵母法筛选类雌激素活性物质方法的比较

王敬贤^{1,2} 徐 盈¹

(1 中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用转基因酵母菌株, 分别采用摇瓶法、96 孔板法和单板法筛选类雌激素活性化学品, 并对实验参数进行了优化。通过对工作光密度及 β -半乳糖苷酶反应时间的优化, 使改进后的转基因酵母筛选法筛选一批样品的时间从原来需要的几天缩短为半天。并且在时间缩短的同时, 仍保留原来检测的高灵敏度和准确性, 也节省了大量的试验耗材, 达到了能应用于环境样品中类雌激素活性物质的快速测定的目的。

关键词: 重组基因酵母; 生物测试; 类雌激素活性; 快速测定

中图分类号: X174 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)02-0155-06

越来越多的证据表明, 许多存在于环境中的人工化学品能够模拟雌激素干扰鸟类、爬行类以及哺乳类野生动物或实验动物正常的内分泌功能, 改变动物在发育和成年阶段胞内信号过程^[1], 从而造成动物的雌雄性别的改变以及畸形等病变。这类物质被称之为环境激素、内分泌干扰物或激素活性化学品等^[2-5]。20 世纪 90 年代以来, 环境化学品的内分泌干扰效应引起了学术界和公众的极大关注, 也引起了发达国家政府的高度重视, 对环境内分泌干扰物的筛选已成为当前各国政府以及研究机构致力解决的重要课题。

现有的用于评价环境化学物激素活性的检测方法大体可以分为整体水平、细胞水平、受体水平和分子水平等四类。目前报道环境激素鉴别方法虽然较多, 但各有优缺点。由于不同的方法其敏感性不同, 鉴别方法尚需标准化。方便、经济、灵敏的短期测试方法对环境化学物的鉴别是适用的, 这也是鉴别方法研究的主要方向。由于转基因重组酵母实验方法具有灵敏、快速、廉价的特点, 本研究对此方法进行了改进, 以便能达到快速检测环境中类雌激素污染物的目的。

转雌激素基因酵母菌株从结构上表达了人的雌激素受体基因。雌激素受体基因转入酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 能充当依赖于雌激素基因复

制的启动子。由 Glaxo wellcome 开发的转雌激素基因 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株 (Glaxo Wellcome, Mumbai, India), 通过测量 β -半乳糖苷酶活性而代表雌激素活性。由于世界各国不同实验室所用转基因酵母菌株略有不同, 因此实验步骤和方法均有一定的差异^[6-7]。本实验室所用酵母菌株是最初由 Glaxo 公司开发, 测定步骤主要参照 Rehmann 的实验方案^[8]。在实验过程中, 对该方法不断加以改进, 将摇瓶法改进为 96 孔板测定法, 进而进一步改进为单板快速测定法, 并且对这 3 种不同实验操作步骤进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 试剂与菌种 基本培养基为: 酵母含氮培养基 (YNB, DIFCO Laboratories) 1.7‰ (NH₄)₂SO₄ 5.0‰ 葡萄糖 20‰ 组氨酸 0.05‰ 亮氨酸 3.96‰ 补充氨基酸混合物 2.02‰ 缓冲液 (Z-buffer) 为: Na₂HPO₄·12H₂O 21.51‰ NaH₂PO₄·2H₂O 6.22‰ KCl 0.75‰ MgSO₄·7H₂O 0.25‰; 终止液: Na₂CO₃ 10.6‰; CuSO₄·5H₂O 1.25‰; β -半乳糖苷酶检测缓冲液: 270 μ L β -巯基乙醇加入到 100 mL Z-buffer, 再加 3.33 mL 0.1% SDS; β -半乳糖苷酶底物溶液: 将 0.4% (w/v) 的 *o*-nitrophenol- β -D-galactopyranoside (*o*NPG) 加入到不含 SDS 溶液的 β -半乳糖苷酶检测缓冲液中; β -半乳糖

收稿日期: 2003-12-20; 修订日期: 2004-11-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向性项目 (编号: KZCX2-414) 资助

作者简介: 王敬贤 (1968-), 女, 湖北省仙桃市人; 博士生; 从事内分泌干扰物的研究

通讯作者: 徐盈, E-mail: xuying@ihb.ac.cn

苷酶复合检测液: 2mg/mL α -NPG 22mL, 0.1% SDS 110 μ L, 50mmol/L β -巯基乙醇 29.7 μ L, 200U/mL α -lyticase(Corvallis) 11 μ L, Z-buffer 10.9mL。

所用菌株是 *Saccharomyces cerevisiae* 菌种, 由美国北卡州毒理化学工业研究所游力博士提供。将保存于-70℃冰箱中的50—100 μ L新鲜冻融的酵母菌株接种到10mL培养基中, 加10 μ L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 置于转速为130r/min, 温度为30℃的空气浴摇床中, 培养过夜, 测定稀释10倍培养液在600nm的光度, 读数

必须处于0.15—0.5。

1.2 转基因酵母检测方法原理 用于该分析中的酵母菌种从结构上表达了人的雌激素受体基因, 在其独立的表达质粒上, 雌激素响应序列控制 *Lac-Z* 报道基因的表达, 当外源雌激素与雌激素受体缔合, 启动基因的转录, 产生和分泌 β -半乳糖苷酶。通过测量 β -半乳糖苷酶活性而代表雌激素活性。作用原理见图1所示。

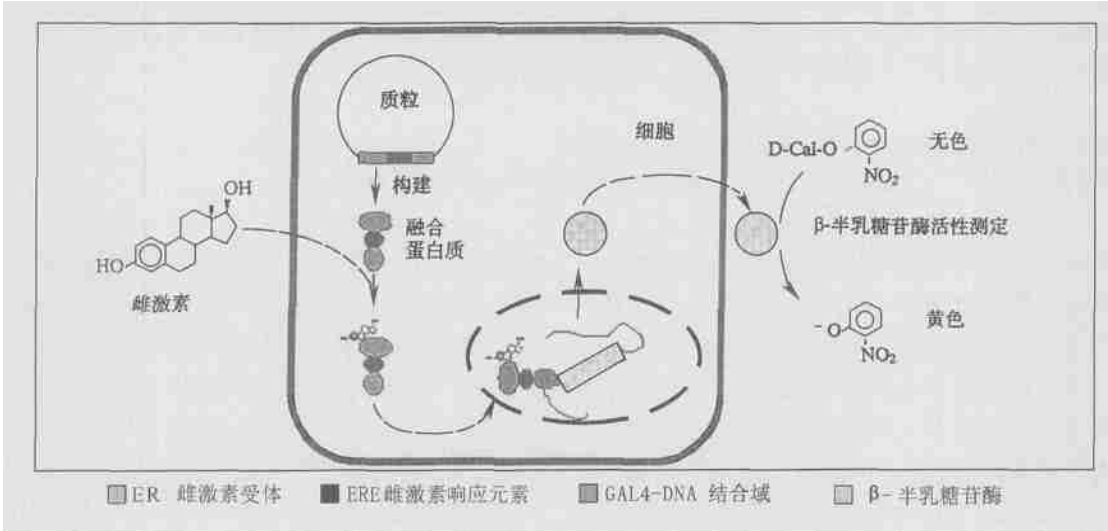


图1 类雌激素受体调节过程机理

Fig.1 The mechanism of modulating process by xenoestrogenic receptor

1.3 摇瓶法 用基本培养基将菌株培养液稀释至OD_{600nm}为0.75, 将之作为工作液。移取10mL完全混合稀释的培养液到100mL的三角锥瓶中, 分别加入100 μ L DMSO(空白), 100 μ L用DMSO溶解的17 β -雌二醇(17 β -E2, 阳性对照, 浓度范围为0.01—100nmol/L)和100 μ L用DMSO溶解的样品, 然后于130r/min, 30℃培养2h。培养结束后首先测定培养液的OD_{600nm}。

将200 μ L培养液转入Eppendorf 指管中, 分别加入620 μ L β -半乳糖苷酶检测缓冲液和50 μ L 氯仿, 小心将其混合均匀, 在28℃的水浴摇床上预培养5min。加入200 μ L β -半乳糖苷酶底物溶液将酶反应启动, 随着进一步的培养, 可以逐渐看到培养液呈现越来越强的黄色。对于17 β -E2, 这样的过程约需要30min, 对于被测定的样品, 一般最多也不超过120min, 加入500 μ L Na_2CO_3 (1mol/L)中止反应。将中止反应后的培养液离心(16400r/min, 15min), 然后取上清液在波长为420nm处测定其吸光强度。

雌激素活性可用 β -半乳糖苷酶活性来表示。

β -半乳糖苷酶依此底物由无色变为黄色, 通过测定420nm的吸光度可以测定 β -半乳糖苷酶活性。通过测定600nm的吸光度可计算出酵母的密度和死亡率。

β -半乳糖苷酶的活性计算方法:

$$u = C_N / t * V * D * OD_s$$

u β -半乳糖苷酶的活性($\mu\text{g/mL/min/mL}$), t 酶反应时间(min), V 测定时培养细胞的体积(0.2mL), D OD_s 样品的稀释因子, OD_s 测定培养液在600nm时的吸光度, C_N 酶活测定中420nm时 α -Nitrophenol 的浓度($\mu\text{g/mL}$)。其中,

$$C_N = 10^{-6} (A_S - A_B) / \epsilon / d$$

A_S 样品在420nm的吸光度, A_B 空白样品在420nm的吸光度, ϵ 酶测定缓冲溶液摩尔吸光系数($4.666 * 10^3 \text{cm}^2 * \text{mL/g}$), d 测定池的厚度(1cm)。

环境激素毒性剂量响应曲线是一个有四个参数的对数模型, 计算方法如下:

$$Y = \frac{[A - D]}{[1 + [C/X]^B]} + D$$

Y 响应值(β 半乳糖苷酶的活性), X 测定中“ 雌激素类物质” 浓度, A 最低检测限, B 剂量响应曲线线性部分的斜率, C 半剂量响应雌激素浓度, D 最大酶诱导活性。

EC50 值为达到 50% 最大响应值时“ 类雌激素” 的浓度。

1.4 96 孔板测定法 用基本培养基将菌株培养液稀释至 OD_{600nm} 为 0.75, 将之作为工作液。将 17 β -E2 标准化合物及样品溶于 DMSO, 以 DMSO 作为空白对照, 再将该标准系列及样品溶液和空白用测定工作液稀释 100 倍, 使 DMSO 的含量为 1%。移取 200 μ L 样品暴露液于 96 孔培养板(flat-bottom microtiter plate) 中, 然后于 130r/ min, 30 $^{\circ}$ C 培养 2h。培养结束后首先测定培养液的 OD_{600nm}。以下操作步骤与摇瓶法相同, 最后将终止反应后的培养液离心, 取上清液于 96 孔培养板中, 在波长为 420nm 处测定其吸光强度。

β 半乳糖苷酶的活性计算方法如下:

$$u = 100\% \times \left[\frac{A_{420}(x)}{A_{600}(x)} - \frac{A_{420}(blank)}{A_{600}(blank)} \right] \times \frac{30}{t}$$

其中: u β 半乳糖苷酶的活性, A_{420} 样品酶反应上清液 420nm 时的吸光度, A_{600} 样品酵母菌生长在 600nm 时的吸光度, t 酶反应时间(min)。

EC50 的计算方法同 1.2.2。

1.5 单板测定法 用基本培养基将菌株培养液稀释至 OD_{600nm} 为 0.50 (吸光度的选择见 1.3.1), 将之

作为工作液。将 17 β -E2 标准化合物及样品溶于 DMSO, 以 DMSO 作为空白对照, 再将该标准系列及样品溶液和空白用测定工作液稀释 100 倍, 使 DMSO 的含量为 1%。

移取以上暴露液 100 μ L 于 96 孔培养板中, 于 130r/ min 30 $^{\circ}$ C 条件下培养 2h。培养结束, 首先测定 OD_{600nm}。然后加 100 μ L β 半乳糖苷酶复合检测液, 培养至空白对照样微微显色(约 1h, 培养时间的确定见 1.3.2), 加终止液 100 μ L, 测定 OD_{420nm}。

β 半乳糖苷酶活性的确定为, 该溶液在 420nm 的吸光度除以 600nm 处酵母的生长密度乘以二者的体积比, 即为 β 半乳糖苷酶活性。背景干扰通过减去空白对照样(DMSO) 420nm 处吸光度与 600nm 光密度的比值乘以二者体积比而扣除。其余计算方法基本与 1.2.2 相同。

1.6 单板测定法测定条件的优化 以摇瓶法为基础, 将之改进为 96 孔板法, 大大节约了测定时间和培养基, 但二者的操作步骤基本相同, 使用的检测液没有改变。再将 96 孔板法进一步改进为单板测定法的过程中, 由于改变了检测液, 操作步骤与前二种方法有明显的不同, 因此对该法进行了优化, 以确定最佳操作程序。

1.7 测定工作液光密度的优化 用生长培养基将酵母生长液稀释至 OD_{600nm} 分别为 0.25、0.50、0.75, 并测定三种不同光密度下 17 β -E2 标准曲线, 结果见表 1。

表 1 600nm 处不同光密度时工作测定液中 17 β -E2 标准曲线参数
Tab.1 Standard dose-response curve parameters of 17 β -E2 in different optical dense detection solution at 600nm

光密度 Optical dense	EC50 值范围 Ranges of EC50 value	曲线线性部分斜率 B 的范围值 Ranges of slope B in linearity of curve	E2 为 3nmol/ L 时 OD _{420nm} 的均值 Average values of OD _{420nm} at concentration of E2 by 3nmol/ L
0.25	0.4752—3.5849	1.0340—3.8789	0.1971
0.50	0.8516—1.3884	1.2208—2.4127	0.2800
0.75	0.5216—3.2588	0.5216—1.6567	0.2400

比较表 1 中不同 OD_{600nm} 时 17 β -E2 标准曲线发现, 光密度为 0.50 时 EC50 和 B 值均较稳定, 波动范围小, 而且 OD_{420nm} 最高, 即反应最灵敏。因此选择 600nm 处光密度为 0.50 的工作测定液较为合适。

1.8 β 半乳糖苷酶反应时间的优化 以 OD_{600nm} 为 0.50 的酵母生长液作为工作测定液, 每隔 10min 测定一次酶的活性, 不同反应时间 17 β -E2 标准曲线见表 2。

从表 2 可发现, 随着 β 半乳糖苷酶反应时间的延长, 空白的酶活和 3nmol/ L 17 β -E2 酶活均有所增长, 当然实验结果是希望空白越低, 样品的酶活越高, 反应越灵敏。当反应 1h 以后, 空白的酶活增长较多, 约一倍, 而 3nmol/ L 17 β -E2 酶活增长却不多。而且反应 1h 时标准曲线的 B、C、D 均较适中, 因此 β 半乳糖苷酶反应时间确定为 1h 左右较为合适。

表 2 不同反应时间 17β-E2 标准曲线参数
Tab 2 Standard dose-response curve of 17β-E2 at different reaction times

酶反应时间(min) Reaction time of enzyme	40	50	60	70	80	90
空白酶活 Enzyme activity of blank	0.1019	0.1257	0.1366	0.2456	0.2449	0.4222
空白 OD _{420nm} OD _{420nm} of blank	0.0450	0.0591	0.0760	0.1116	0.1367	0.1782
3nmol/L E2 酶活 Enzyme activity of 3nmol/L E2	0.2852	0.4447	0.9282	1.0907	1.2962	1.5521
3nmol/L E2 OD _{420nm}	0.1400	0.2329	0.4010	0.5076	0.6605	0.7646
曲线中的 A Values of A in curve	0.1430	0.1180	0.1350	0.2187	0.2467	0.4071
曲线中的 B Values of B in curve	2.1923	1.1894	1.2208	0.9578	1.1251	1.2709
曲线中的 C Values of C in curve	1.1175	0.9420	1.1258	1.4405	1.0024	1.8880
曲线中的 D Values of D in curve	0.2996	0.5376	1.1740	1.3804	1.8227	2.9936

2 结果与讨论

在用转基因酵母法筛选类雌激素物质的初期, 实验操作参照 Rehmann 的实验设计^[8] 使用摇瓶法^[9]。从一批被筛选样品(约 30 个)的暴露测定到实验结束, 往往需要 2—3d, 而且需要连续测定, 工作量很大, 步骤繁琐, 实验结束以后还有大量的清洗工作。

由于摇瓶法存在的弊端, 本实验室将之改进为 96 孔板测定方法, 将筛选一批样品的测定时间缩短为 1d, 使快速测定成为可能。但本方法中使用氯仿破碎酵母细胞壁, 酶反应时需将暴露 2h 以后的反应液转移到 EP 指管中, 加入细胞破碎液和酶反应底物, 最后测定 OD_{420nm} 时, 再将反应液转入 96 孔培养板中, 整个实验的完成仍是费时费力的, 往往需要 10h 以上^[10]。

现在改进的快速测定法是用 oxylaticase 代替氯仿破碎酵母细胞壁, 从样品的暴露到酶活性的测定均在一块 96 孔培养板中完成, 测定时间缩短为 4—6h 左右, 真正达到了快速测定的目的。

三种转基因酵母筛选类雌激素活性检测方法得到的 17β-E2 标准剂量响应曲线分别如图 2—4 所示。图 5 为 96 孔板测定法测定的六种化合物 17β 雌二醇(17β-estradiol), 二乙基己烯雌酚(DES), 乙炔基雌二醇(EE2), 双酚 A(BPA), 滴滴伊(p, p'-DDE), 壬基酚(p-nonyphenol) 雌激素活性的测定结果。单

板测定法的测定结果与 96 孔板测定法类似(结果未列出)。结果表明, 实验结果(以 EC50 值为主要评价依据)与有关文献报道的结果基本一致^[11—12]。

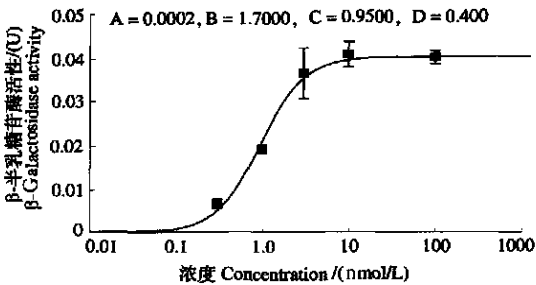


图 2 摇瓶法中 17β-E2 的标准剂量-效应关系曲线
Fig 2 Standard dose response curve of 17β-E2 detected by shaking bottle method

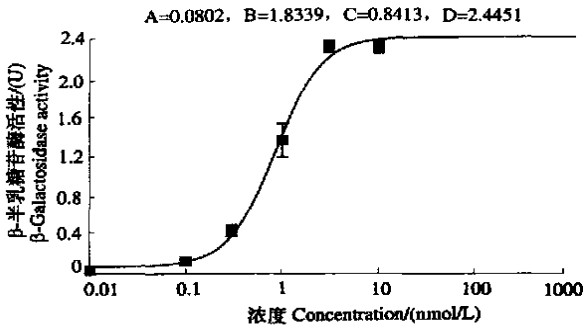


图 3 96 孔板快速测定法中 17β-E2 的标准剂量-效应关系曲线
Fig 3 Standard dose response curve of 17β-E2 detected by 96-well microtiter plate method

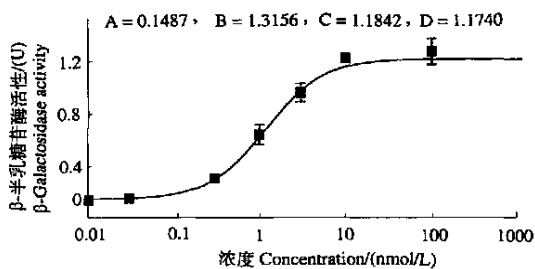


图 4 单板快速测定法中 17β-E2 标准剂量-效应关系曲线
Fig 4 Standard dose-response curve of 17β-E2 detected by single plate method

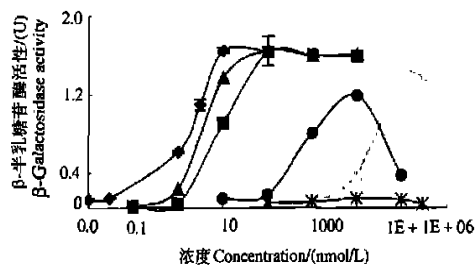


图 5 96 孔板测定法测定六种化合物类雌激素活性的结果
Fig.5 The estrogenic activities of six chemicals detected by 96-well microtiter plate method
E2 DES EE2 BPA DDE NP

表 3 为三种不同实验操作 17β 雌二醇的 EC50 值。从表 3 可见,三种实验操作所得结果是一致的。但从标准曲线的其他指标来综合评价,96 孔板快速测定法和摇瓶法的空白均较低,反应活性较高,96 孔板快速测定法的测定结果比摇瓶法稳定而且快速。单板快速测定法速度很快,半天能完成一批样品的测定,而且节约培养基、指管、96 孔板等耗材,节省人力,能够达到快速监测的目的。但该改进的方法尚存在不足之处,即空白值相对较高,反应活性较低。该方法还需进一步完善。

表 3 摇瓶法、96 孔板测定法和快速测定法 17β 雌二醇的 EC50 值
Tab.3 EC50 values of E2 obtained by shaking bottle method, 96-well microtiter plate method and single plate method

实验操作	摇瓶法	96 孔板测定法	单板测定法
Method of experiment operation	Shaking bottle method	96-well microtiter plate method	Single plate method
EC50 范围值	0.60—1.33	0.6025—1.2233	0.8516—1.3884
Ranges of EC50 values			

参考文献:

[1] Tyler C R, Jolbing S, Sumpter T P. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1998, **28**: 319—361

[2] Kavlock R J, Daston G P, Derosa C, *et al.* Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disrupters: a report of the US EPA-sponsored workshop [J]. *Environ Health Persp*, 1996, **104**(Suppl 4): 715—740

[3] Barton H A, Andersen M E. Endocrine active compounds: from biology to dose response assessment. [J] *Crit Rev Toxicol*, 1998, **28**: 363—423

[4] Golden R J, Noller K L, Titus-Ernstoff L, *et al.* Environmental endocrine modulators and human health: An assessment of the biological evidence [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1998, **28**: 109—227

[5] Forum. Estrogen in the environment [J]. *Environ Health Persp*, 1997, **105**: 910

[6] Routledge E J, Sumpter J P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast assay [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1996, **15**: 241—248

[7] Arnold S F, Robinson M K, Notides A C, *et al.* A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens [J]. *Environ Health Persp*, 1996, **104**: 544—548

[8] Rehmann K, Schramm K-W, Kettner A. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples [J]. *Chemosphere*, 1999, **38**: 3303—3312

[9] Zhang Q, Xu Y, Schramm K-W, *et al.* Antiestrogenic and antiprogesteronic activity of tire extracts with yeast-based steroid hormone receptor genes transcription assay [J]. *Bull Environ Contain Toxicol*, 2002, **69**: 863—868

[10] Wang J, Wu W, Henkelmann B, *et al.* Presence of estrogenic activity from emission of fossil fuel combustion as detected by a recombinant yeast bioassay [J]. *Atmos. Environ*, 2003, **37**: 3225—3235

[11] Gaido K W, Leonard L S, Lovell S, *et al.* Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1997, **143**: 205—212

[12] Routledge E J, Parker J, Odum J, *et al.* Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1998, **153**: 12—19

[13] Coldham N G, Dave M, Sivapathasundaram S, *et al.* Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay [J]. *Environ Health Persp*, 1997, **105**: 734—742

[14] Miller D, Wheals B B, Beresford D, *et al.* Estrogenic activity of phenolic additives determined by an *in Vitro* yeast bioassay [J]. *Environ Health Persp*, 2001, **109**: 133—138

[15] Boever P D, Denare W, Vanderperen E, *et al.* Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soybean powder [J]. *Environ Health Persp*, 2001, **109**: 691—697

COMPARISON OF THREE RECOMBINANT GENE YEAST BIOASSAY FOR SCREENING XENOESTROGENIC COMPOUNDS

WANG Jing-Xian^{1,2} and XU Ying¹

(1. *State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology; Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, PR China*; 2. *Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039*)

Abstract: There has been increased concern regarding the study of endocrine disrupters. The study about the screening method of endocrine disrupters has become an important issue for governments and institutes in many countries. This study focused on improving method of recombinant gene yeast bioassay. The estrogen bioassay employed in this study involves the use of a genetically modified yeast strain to determine the ability of a test agent to trans-activate the estrogen receptor. This yeast strain contains a human estrogen receptor gene (ER alpha) and a reporter gene coding for the β -galactosidase. Test agents with estrogenic activity activate the receptor gene in yeast strain and subsequently result in the production β -galactosidase. The estrogenic activity of chemicals is quantified by determining the activity of the β -galactosidase. In this study, three recombinant gene yeast bioassay including shaking bottle method, 96-well microtiter plate method and single plate method for screening estrogenic activities were compared each other by detecting estrogenic activity of 17 β -estradiol. In the beginning of applying recombinant yeast bioassay in our laboratory, the operation procedure was shaking bottle method referred to the designs of Dr. Rehmann. From the beginning of screening a batch of samples (about 30) to the end of the experiment, it generally lasted 2—3 days. Because of the disadvantages of the method, it was improved in our laboratory to use 96-well microtiter plate method. It was shortened to 1 d to screen a batch of samples and made it possible to realize fast monitoring. But this method still needs more than 10h to finish one measurement. Now the method was further improved to be single plate method. In this method, oxylaticase was used as cellular wall cracker substitute for chloroform. Then one measurement could be finished in 4—6h. Comparison of the improved methods was made with different yeast construct in other laboratories by detecting estrogenic activities of six chemicals. Results (evaluated by EC₅₀) are consistent with reference reports. Since the single plate method changed great in experimental operation, its experimental parameters were optimized. 0.50 was selected as optical density of detection solution at 600nm and 1h was selected as reaction time of enzyme. By the improved method of optimized detecting optical dense and β -galactosidase reacting time, the detection time was shortened from several days to only a half day in screening a batch of samples. Meanwhile, the culture solution and consumed materials were also saved, whereas the sensitivity and accuracy of the method still remain the same as those before improvement. This makes it possible to realize the purpose of fast environmental monitoring for xenoestrogenic compounds.

Key words: Recombinant yeast; Bioassay; Estrogenic activity; Fast screening