

高通量筛选雌激素类化合物重组绿色荧光蛋白酵母细胞测评体系

李湘鸣¹, 罗方妮², 汪霄³, 贾平¹, 张娟¹, 祝娉婷¹, 张惟立¹

1 扬州大学医学院 预防医学教研室, 扬州 225001

2 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009

3 扬州市环境监测总站, 扬州 225009

摘要: 以载体双表达的方式构建重组酵母环境雌激素的评价体系, 用于快速筛选雌激素类化合物。在表达载体中, 用3-磷酸甘油醛脱氢酶(GPD)启动子驱动 α 人雌激素受体基因(hER α)的表达; 在报告载体中, 用雌激素效应元件(ERE)调控的绿色荧光蛋白(yEGFP)作为报告基因。将两者转化于酵母细胞(W303-1A)中, 构建成重组绿色荧光蛋白酵母细胞。该酵母细胞经不同浓度的雌激素类化合物作用后, 发现 GFP 的表达量与此类受试物具有明显的剂量效应关系。与其他环境雌激素酵母评价体系相比, 该重组酵母评价细胞, 在应用时不需要破坏细胞壁, 也不需要底物和相关试剂, 可直接在96孔板中操作完成, 具有快速、高通量、敏感性高、重现性好及廉价等特点。

关键词: 环境雌激素, 酵母细胞, 雌激素受体, 绿色荧光蛋白, 高通量测评

Bioassay of Recombinant Green Fluorescent Protein Gene Yeast Cell for a High Throughput to Screen Estrogenic Compounds

Xiangming Li¹, Fangni Luo², Xiao Wang³, Ping Jia¹, Juan Zhang¹, Pinting Zhu¹, and Weili Zhang¹

1 Preventive Medicine Department, Yangzhou Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

2 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

3 Environmental Surveillance Station of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: We developed the recombinant green fluorescent protein gene yeast cell to screen estrogenic compounds based on two episomal vectors. In the expression vector the expression of human estrogen receptor α (hER α) was driven by 3-glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GPD) promoter; in the reporter vector the expression of the yeast enhanced green fluorescent protein (yEGFP) gene was under the control of the estrogen response element (ERE). The vectors were transformed into yeast cell (W303-1A) to construct GFP recombinant yeast cell. Incubation of the yeast cell with various concentrations of the estrogenic compounds led to expression of the reporter gene product GFP in a dose dependent manner. Compared to other yeast bioassays, the yeast cell for environmental estrogen bioassay based on yEGFP reporter gene did not need cell wall disruption or the addition of a substrate or reagent. This yEGFP assay was performed completely in 96 well plates. So this test system can be used as a rapid and

Received: June 2, 2008; **Accepted:** September 17, 2008

Supported by: Fund of Environmental Surveillance Science Research of Jiangsu (No. 0714).

Corresponding author: Xiangming Li. Tel: +86-514-87978855; E-mail: lxm571009@yahoo.com.cn

江苏省环境监测科研基金项目(No. 0714)资助。

high throughput system for screening estrogenic chemical products, which has the characteristics of the sensitivity, reproducibility and cheapness.

Keywords: environmental estrogen, yeast, estrogen receptor, green fluorescent protein, high throughput assay

在雌激素类化合物体外检测方法中, 以用基因重组酵母细胞评价较为常见。常用的方法是将人 α 雌激素受体(hER)基因、雌激素效应元件(ERE)及编码 β -半乳糖苷酶的 *Lac Z* 报告基因重组于酵母细胞, 使 β -半乳糖苷酶的表达量在雌激素的调控之下。 β -半乳糖苷酶可催化底物 ONPG(邻-硝基苯- β -D-吡喃半乳糖)显黄色, 即可通过颜色的深浅甄别或检测环境雌激素。但这种方法主要缺点是需要破坏酵母细胞壁, 因为不同的破壁方法对实验结果的影响很大^[1]; 其次是酶活性受时间、温度、pH、菌液浓度的影响很大, 因而不同时间或地点实验(室)结果误差较大, 很难进行比较。

绿色荧光蛋白(GFP)是来自水母的一种天然荧光蛋白, 它在细菌、真菌、植物和动物细胞中表达时都能发出荧光, 具有活体、原位、实时表达的特点^[2-4]。利用 GFP 作为报告基因, 将会克服酶作为报告基因的缺点, 使得环境雌激素酵母测评体系更加方便、快速、可比。

1 材料与方法

1.1 主要材料

反转录 RT-PCR 试剂盒、pGEM-T 载体购自 Promega 公司; 所用的各种限制性内切酶、PCR 聚合酶、PCR 产物回收试剂盒、DNA 切胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; Western blotting 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。质粒 pAW8-yEGFP 由英国苏塞克斯大学 Yari Fontebasso 博士惠赠; 双酚 A、甲体(α)、丙体(γ)和丁(ϵ)体六六六、O, P'-DDT、P,P'-DDT、P,P'-DDD、P,P'-DDE 雌二醇、雌酮和雌三醇购自 Sigma 公司; 马来酸二乙酯(DEM)购自 Fluka 公司; 邻苯二甲酸二丁酯(DPA)购自上海恒利试剂厂; SD/-trp、-ura 酵母选择性培养基购自 Clontech 公司。

1.2 反转录 PCR(RT-PCR)

1.2.1 引物设计

从乳腺癌细胞 MCF-7 提取总 RNA。引物由上海生工公司合成。根据全长人雌激受体基因(hER

cDNA)序列设计上下游引物, 经 DNA- star 软件验证, 引物内碱基不形成发夹结构, 上下游引物间不形成二聚体, 引物两端分别设计 *BamH I* 和 *Sal I* 酶切位点, 两端并加 2 个防护碱基。

上游引物:

5'-CGGGATCCGGACCATGACCATGACCC-3'
(*BamH I*)

下游引物:

5'-ATGTCGACTCAGACGTGGCAGGGAAA-3'
(*Sal I*)

1.2.2 RT-PCR 反应程序

反转录程序和操作步骤按 Promega 公司的 RT-PCR 试剂盒的说明书进行。PCR 反应程序: 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 2 min, 40 个循环, 最后 72°C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳分析, 切取回收 1.8 kb 左右的片段, 用胶回收试剂盒纯化。纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接后, 转化于感受态 DH5 α , 小量提取质粒, 用 *BamH I* 和 *Sal I* 酶切, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 以确定 hER cDNA 的插入。将该质粒测序, 并与 GenBank 中的 hER 序列进行同源性比较, 要求与所克隆质粒达 100% 同源。将该载体命名为 pGEM-T/hER。

1.3 hER 酵母表达载体的构建

用 *BamH I* 和 *Sal I* 对 pGEM-T/hER 双切, 将切下的 hER cDNA 插入到酵母表达载体(pGDP212)中, 构建成 pYG/hER 质粒, 由 GPD(3-磷酸甘油醛脱氢酶)启动子驱动 hER 表达, 选择性标志为 trp-(色氨酸基因缺陷)。阳性克隆载体 pYG/hER 经常规酶切鉴定, 测序, 以验证重组表达载体接头及阅读框的正确。

1.4 hER 在酵母中的表达

酵母细胞 W303-1A(MATa、ade2-1、his3-11、leu2-3、trp1-1、ura3-1)由江南大学王正祥教授惠赠。将质粒 pYG/hER 用醋酸锂(LiAC)方法转染于 W303-1A 酵母细胞, 涂布于 SD/trp-平板, 30°C 培养 4 d 后挑取 3 mm 左右菌落, 置于 SD/-trp 培养液中扩大培养。取 1.5 mL 酵母细胞培养液, 2500 r/min 离心收集细胞, 弃上清, 加入 50 μ L(pH 7.6) STES 缓冲液

[0.2 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.1%(M/V)SDS, 0.01 mol/L EDTA]悬浮细胞, 置于 -20°C 冷冻 30 min 后, 沸水中煮 5 min, 提取酵母 DNA, 用 PCR 方法鉴定人雌激素受体基因的存在, 上游引物为 5'-GGACCATGACCATGACCC-3', 下游为 5'-TCA GACTGTGGCAGGGAAA-3'。反应体系: H_2O 37.5 μL , $10\times$ PCR Buffer 5 μL , DNA 模板 1 μL , 上游和下游引物(25 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , *Taq* 酶 0.5 μL , dNTP 4 μL 。反应程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 55°C 退火 45 s, 72°C 延伸 2 min, 总计 30 个循环, 循环结束再延伸 7 min。

同时取对数生长期的酵母细胞, 提取蛋白质, 用 Western blotting 方法进行分析, 以确定 hER 特异性表达。将该酵母细胞命名为 W303-1A/hER。

1.5 雌激素效应元件(ERE)调控 EGFP 在酵母中的表达

用 PCR 方法从质粒 pAW8-yEGFP 扩增 yEGFP 基因, 上游引物为 5'-TGCACCGGTATGTCTAAAG GTGAAGAATTA-3', 下游为 5'-ATCGCGGCCGCT TATTTGTACAATTCATCC-3', 引物两端设计 *Age* I 和 *Not* I 酶切位点(下划线所示), 并增加 3 个保护碱基, 扩增产物经 PCR 纯化试剂盒回收, 用 *Age* I 和 *Not* I 双切, 将其插入到 pMP208 载体(本室构建)的 *CYC1* 启动子下游, 构建成 ERE 调控的 yEGFP 报告载体, 常规酶切鉴定、测序, 将该载体命名为 pLZ-yEGFP。

将 W303-1A/hER 用 SD/-trp 培养液扩增, 用醋酸锂(LiAc)方法将 pLZ-yEGFP 转化于重组酵母细胞 W303-1A/hER 中, 使 yEGFP 的表达置于雌激素受体的调控之下。转化子经 SD/-trp, -ura 培养平板筛选, 挑取阳性克隆, 置于 SD/-trp, -ura 培养液中, 30°C 振荡过夜, 取 1.5 mL 提取酵母 DNA, 进行 PCR 鉴定; 取 1 mL 酵母培养液于 4 mL SD/-trp-, ura 培养液中, 加入终浓度为 0、1 和 10 nmol/L 的 17β 雌二醇, 30°C 振荡培养 4 h, 置于荧光显微镜下观察, 拍照。将该酵母细胞命名为 W303-1A/hER-ERE-yEGFP。

1.6 实验评价

选用 24 孔细胞培养板, 加入 SD/-trp, -ura 培养液 1.8 mL、 30°C 振荡过夜的重组酵母细胞培养液 0.2 mL 及用二甲亚砜或乙醇配制的不同浓度的受试物 10 μL , 30°C 振荡培养 4 h, 取 1 mL 离心(13 000 r/min)

1 min, 用 PBS 洗涤 1 次, 重悬于 PBS 中, 分别取 100 μL 于 96 孔透明酶标板和黑色酶标板内, 用 GENios Plus 多功能酶标仪测 OD_{600} 值和荧光强度, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 509 nm, 以单位 OD_{600} 酵母细胞表示相对荧光强度。阳性受试物(阳性对照)选用雌二醇、雌酮、雌三醇, 操作方法同受试物。

1.7 统计分析

由于阳性对照受试物与重组 GFP 酵母细胞的发光强度间具有剂量效应关系, 呈“S”型曲线, 故用 Logistic 曲线模型进行拟合。

化学受试物雌激素效应阳性判断标准: 最高浓度组产生相对发光强度为空白对照的 1.5 倍或以上, 并有明显的剂量效应关系, 则判断为阳性。

2 结果

2.1 hER cDNA 在酵母细胞中的表达

由图 1 可见, 在重组酵母细胞 W303-1A/hER 的 PCR 产物中, 有一条 1.8 kb 的 hER cDNA 条带, 说明雌激素受体基因已重组于酵母细胞中。hER 的分子量为 66 kD。经 SDS-PAGE 电泳发现, 阳性克隆酵母细胞在 50~100 kD 处有一新生蛋白带, 而正常酵母细胞(阴性对照)未发现这一条带。利用抗 hER 的单克隆抗体与辣根过氧化物酶标记的二抗对重组蛋白进行 Western blotting 分析, 在约 66 kD 处发现一特异性条带, 提示重组 hER 蛋白在酵母细胞中稳定表达。

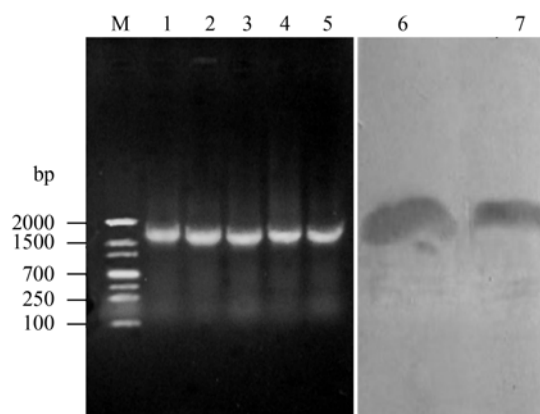


图 1 雌激素受体基因在酵母细胞中的表达

Fig. 1 Expression of hER cDNA in yeast cell

M: DNA standard electrophoresis ladder;
1-5: hER cDNA; 6,7: Western blotting

图 2 为重组酵母(W303-1A/hER-ERE-yEGFP)的 PCR 鉴定。在酵母细胞的 PCR 产物中, 见有 1.8 kb 的 hER cDNA 及 710 bp 的 yEGFP 条带, 说明受雌激素调控的以 yEGFP 为报告基因的酵母细胞重组成功。

在荧光显微镜下, 用蓝光激发酿酒酵母涂片, 发现许多粒粒耀眼的绿光, 分布均匀一致, 说明 yEGFP 基因在酵母细胞中已成功表达(图 3)。同时发现该重组酵母细胞经雌二醇诱导后, yEGFP 发光强度明显强于空白对照, 说明 yEGFP 的发光强度与雌激素的作用间具有某种量效关系。

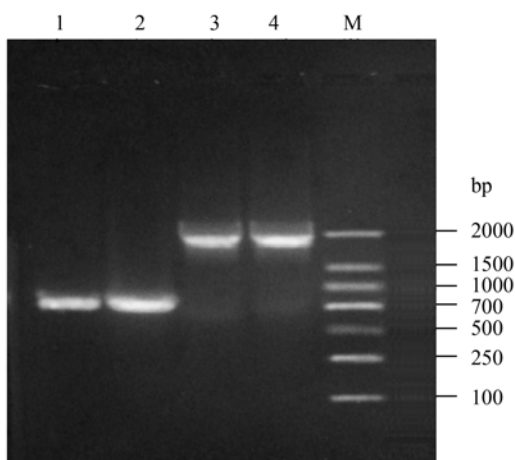


图 2 基因重组酵母细胞的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification for the gene recombinant yeast cell

M: DNA standard electrophoresis ladder; 1, 2: 710 bp, yEGFP gene; 3, 4: 1800 bp, hER cDNA

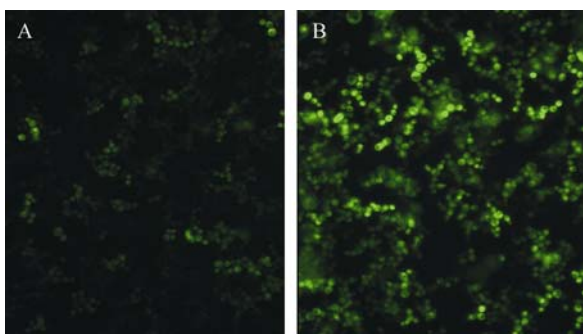


图 3 yEGFP 在酵母细胞中的表达

Fig. 3 Expression of GFP in yeast cell

A: yeast cells were induced without 17βestradiol; B: yeast cells were treated with 1nmol/L 17βestradiol

2.2 实验评价

图 4 为 3 种雌激素与重组酵母细胞相对发光度间的剂量效应关系。可见 17β-雌二醇雌激素效应最强, 其次是雌酮和雌三醇, 均呈“S”型剂量效应曲线。用 Logistic 方程拟合, 经计算 EC₅₀(17β-雌二醇)

为 8.82×10^{-13} mol/L; EC₅₀(雌酮)为 1.80×10^{-8} mol/L; EC₅₀(雌三醇)为 2.31×10^{-7} mol/L。

表 1 为 W303-1A/hER-ERE-yEGFP 对所选化学受试物的筛选结果, 可见双酚 A 和 O,P'-DDT 雌激素效应最强, 其次 P,P'-DDT 和 P,P'-DDD。

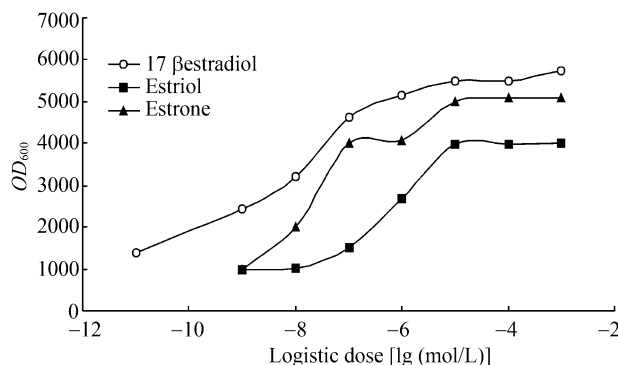


图 4 阳性受试物 Logistic 剂量效关系

Fig. 4 Logistic dose effect relationship for various estrogenically active substances

表 1 重组 yEGFP 酵母细胞对受试化合物的类雌激素活性筛选

Table 1 Screening of Estrogenic activity for the test compounds based on the yEGFP recombinant yeast cell

Test compounds	Concentration (mol/L)	Fold induction	Results
Bisphenol A	10^{-5}	8.80	+
DEM	10^{-3}	0.95	-
DPA	10^{-3}	0.55	-
O,P'-DDT	10^{-6}	2.48	+
P,P'-DDT	10^{-5}	1.82	+
P,P'-DDD	10^{-5}	1.72	+
P,P'-DDE	10^{-3}	1.15	-
αBenhexachlor	10^{-3}	1.48	-
γBenhexachlor	10^{-3}	1.09	-
εBenhexachlor	10^{-3}	0.82	-

3 讨论

双酚 A、O, P'-DDT、P, P'-DDT 和 P, P'-DDD 可与 ER 结合, 发挥雌激素效应, 这与许多文献报道一致^[5-7]。虽然整体动物(体内)实验发现 DPA、P, P'-DDE 和六六六类农药具有雌激素效应, 但这种雌激素效应可能是通过与其他类固醇受体(如孕激素受体、糖皮质激素受体)结合或通过抗雄性激素来实现的^[8,9]。

虽然, 在环境雌激素鉴别方法中, 体内实验如子宫增重法具有权威性, 但是, 体内实验方法难以阐明

环境雌激素的作用机理。在体外实验方法中, 乳腺癌细胞增殖筛选法亦较方便, 但无法说明细胞的增殖结果是由何种受体介导的, 因在乳腺癌细胞中有许多受体存在, 如雄激素受体、孕激素受体、视黄醇受体及糖皮质激素受体; 雌激素受体竞争法虽然可以证明配体与受体的结合, 但无法说明该配体是激活还是拮抗雌激素受体的功能。酵母细胞属于单细胞生物, 除了缺乏哺乳细胞复杂的受体系统外, 还具有易培养、生长快、价格低等优点, 故选用重组基因酵母细胞测评环境雌激素是较为理想的方法^[10]。

目前, 国内外主要采用酿酒酵母细胞作为宿主细胞, 用“hER-ERE-报告基因”这一调控序列构建重组细胞测评环境雌激素。通常选用的报告基因有 LacZ、CAT(氯霉素乙酰转移酶基因)和 LUC(萤光素酶基因)^[11-13]。由于后两者试剂及设备条件等要求较高, 所以多用 β -半乳糖苷酶来评价环境雌激素的污染程度。当雌激素类化合物作用于重组酵母细胞时, 就会使 hER 发生变构效应, 进而通过与 ERE 结合, 使 Lac Z 表达, 通过测定 β -半乳糖苷酶的活性, 来评价环境雌激素的污染程度。但这些测评方法有以下缺点: 1)稳定性、可比性差; 2)操作繁琐、耗时; 3)成本较高。GFP 能发绿色荧光, 可直接测其荧光强度, 不需要底物及辅助因子。采用 GFP 作为报告基因, 会克服用酶作为报告基因的许多缺点, 能方便、快速、定性、定量、高通量地评价、筛选环境雌激素。

附加体型载体含有 2 μ m 酵母质粒复制子 DNA, 能够自主复制, 通常达 30~100 拷贝。表达质粒选用 GDP 启动子, 是一种较强的启动子, 可大大增强 hER 在酵母中的表达。Western blotting 实验发现, hER 印迹下有许多细条带, 这是当外源性蛋白表达量较高时, 受到内源性蛋白酶水解酶所致。pMP208 酵母报告载体^[14]是以 EGFP 为报告基因, 发光较弱, 与雌激类化合物的剂量效应关系不明显, 因为其含有许多酵母不嗜好的遗传密码子。pLZ-yEGFP 是经过人工改造的 EGFP 基因, 含有许多酵母所偏好的遗传密码子, 可大大增加 GFP 的荧光强度。可见这些技术手段, 采用附加体型载体(Yep type), 通过质粒双表达的方式, 建立重组 GFP 酵母细胞环境雌激素测评系统, 可大大提高重组细胞的敏感性。

REFERENCES

- [1] Li XM, Luo FN, Cheng CB. Development of a rapid screening system of environmental estrogen based on recombinant yeast cell. *J Environ Health*, 2006, **20**(2): 39-41. 李湘鸣, 罗方妮, 陈春波. 重组酵母细胞快速筛选环境雌激素系统的建立. *环境与健康杂志*, 2006, **20**(2): 39-41.
- [2] Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998, **67**: 509-44.
- [3] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(26): 12501-1254.
- [4] Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*, 2002, **102**(3): 759-781.
- [5] Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, et al. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, **143**(1): 205-212.
- [6] Klotz DM, Ladlie BL, Vonier PM, et al. o, p'-DDT and its metabolites inhibit progesterone-dependent responses in yeast and human cells. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, **129**(1): 63-71.
- [7] Chen XY, Chen CP, Wu YJ, et al. Study on the estrogenic activities of DDT pesticides based on the gene recombinant yeast cell. *J Toxicol*, 2006, **20**(6): 377-379. 陈秀云, 陈春波, 吴玉娟, 等. 重组基因酵母细胞对 DDT 类农药的雌激素活性研究. *毒理学杂志*, 2006, **20**(6): 377-379.
- [8] Koifman S, Koifman RJ, Meyer A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad Saude Publica*, 2002, **18**(2): 435-445.
- [9] Pudungtod C, Savitz DA, Overstreet JW, et al. Occupational pesticide exposure and semen quality among Chinese workers. *J Occup Environ Med*, 2000, **42**(10): 982-992.
- [10] Jungbauer A, Beck V. Yeast reporter system for rapid determination of estrogenic activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, **777**(25): 167-178.
- [11] Yoo EJ, Jang YK, Kimm HS, et al. Development of a new xenoestrogen screening system using fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cells*, 2002, **13**(1): 148-153.
- [12] Diel P, Schmidt S, Vollmer G. *In vivo* test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, **777**(1-2): 191-202.
- [13] Witters HE, Vangenechten C, Berckmans P. Detection of estrogenic activity in Flemish surface waters using an *in vitro* recombinant assay with yeast cells. *Water Sci Technol*, 2001, **43**(2): 117-123.
- [14] Li XM, Luo FN, Chen CB, et al. The expression of green fluorescent protein regulated by estrogen hormone in yeast cell. *J Yangzhou University (Agri & Life Sci Edition)*, 2006, **27**(2): 63-67. 李湘鸣, 罗方妮, 陈春波, 等. 雌激素调控的绿色荧光蛋白在酵母细胞中的表达. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2006, **27**(2): 63-67.