

基于受体作用理论的类雌激素效应测试方法

赵建平¹, 赵洋甬², 胡建林^{1,3*}

1. 宁波市环境监测中心, 浙江 宁波 315012; 2. 浙江中通检测科技有限公司, 浙江 宁波 315012;
3. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 以 17 β 雌二醇为标准参考物质, 对基于受体作用理论的环境激素分析方法实验条件进行了重构和优化, 建立了环境类雌激素分析方法。结果表明: 用营养缺陷型培养基 30 $^{\circ}$ C 恒温振荡 66 h 培养时间进行重组基因酵母的复苏与增殖, 20 $^{\circ}$ C~35 $^{\circ}$ C 水浴样品与酵母混合液培养 3~6 h 暴露, 优先选用机溶剂处理法释放 β -半乳糖苷酶, 35 $^{\circ}$ C 恒温水浴进行酶活测试反应, 采用反应终止后 2.5 h 420 nm 波长进行分析测试, 同时实际样品的分析, 加测不少于一个的稀释水样效应值, 可使方法更加科学高效、准确度高, 应用于各类实际样品分析。

关键词: 环境雌激素效应; 重组基因酵母; 受体作用

中图分类号: X13 文献标识码: A 文章编号: 1004-8227(2015)11-1953-08

DOI: 10.11870/cjlyzyyhj201511020

国际上开展环境激素的研究已经 30 多年了, 然而, 由于环境激素对生物的危害具有蓄积性、潜在性和隐蔽性等特点, 一直未引起人们足够的重视。直至最近几年, 其危害效应逐渐体现, 才得到了广泛关注^[1]。环境雌激素是环境内分泌干扰物中最大的一类, 也是研究最多, 最受重视的一类。为了环境的可持续发展和人类的健康, 加强对环境激素的研究势在必行, 而环境激素的检测是环境激素各项研究的基础。目前, 检测环境雌激素的方法主要有化学法和生物法。化学法检测环境雌激素灵敏度高、特异性好, 定性和定量准确。但是用仪器检测环境雌激素, 只能对已知的环境雌激素进行检测, 而且, 在检测前一般还要对样品要进行提取、净化、浓缩等前期处理。由于这些化学方法使用的仪器昂贵、检测成本高、分析过程冗长、技术复杂、对检测人员专业化程度要求高, 不适合大量样本的环境雌激素常规检测。在我国, 环境激素的研究刚刚起步, 对其污染状况缺乏全面的调查和评价, 高效、灵敏的检测技术相当匮乏, 建立前处理更加优化、检测更加灵敏快速的检测方法, 显得尤为重要。本文尝试在专利方法^[2]基础上, 结合受体作用理论^[3], 建立一种利用重组基因酵母测试环境激素效应的方法, 修正了原有方法

中一个效应值所对应的环境雌激素浓度只有一个的错误认识, 提出了增加稀释水样的测试, 结合稀释后的结果对环境激素的浓度进行准确判断。同时文章对该方法使用中其他因素进行了较全面的试验分析, 确定了一个较为完善的环境雌激素效应测试方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

17 β -雌二醇(E2)作为雌激素标准物质使用, 重组基因酵母干粉(本文中的重组基因酵母采用中科院生态环境研究中心王子健等构建的双杂交酵母(保藏编号 CGMCC No. 2307)。该酵母含 pG-BKT7-hER 酵母表达质粒和 pGAD424-GRIP1 酵母表达质粒。其中 pGBKT7-hER 酵母表达质粒包含雌激素受体基因, pGAD424-GRIP1 酵母表达质粒包含具有如 SEQ ID NO. 2 所示序列的雌激素受体共激活因子基因片段。购自无锡中科)。

1.2 实验方法

环境雌激素物质与人雌激素受体的配体结合区结合后引起构象改变, 进一步结合共激活因子,

收稿日期: 2015-03-23; 修回日期: 2015-06-26

基金项目: 宁波市饮用水源及重要流域非急性生物学效应分析(NB201412C)

作者简介: 赵建平(1971~), 男, 高级工程师, 主要从事环境监测工作. E-mail: zjpmwq@126.com

* 通讯作者 E-mail: hujianlin@139.com

促进报告基因 Lac Z 的转录。通过测试 β 半乳糖苷酶活性,可以从基因层面定量表征环境中环境雌激素物质对人体健康的影响。主要由以下 4 个部分组成:

(1) 重组基因酵母的复苏与增殖

将酵母干粉倒入 SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型培养基中,200 r/min,30℃ 培养一段时间,使菌悬液达到一定浓度(用 600 nm 处光密度即 OD_{600} 表征)。

(2) 环境雌激素化合物与酵母混合培养(样品暴露)

将 1 mL 酵母菌液加入 8 mL 样品中,混入 1 mL 浓缩培养基后,200 r/min,水浴暴露培养一段时间,测定 600 nm 处光密度。

(3) 半乳糖苷酶活性测定

离心后加入 2.4 mL Z 缓冲液,混匀后使用超声波(功率 500 W,间歇式工作,工作 6 s,间隔 3 s,破碎次数 20 次)或氯仿处理(加入 0.8 mL 氯仿,用涡旋仪 2 500 rpm 破碎细胞)。用涡旋仪 2 500 rpm 破碎细胞。加入 0.8 mL ONPG(邻硝基酚- α -D-吡喃半乳糖)(溶于 Z 缓冲液),200 rpm 水浴恒温振荡 60 min。加入 0.8 mL 10% 碳酸钠溶液终止反应,出现明显的黄色,放置一段时间,待颜色稳定后,6 000 rpm 离心 2 min,用分光光度计检测上层液体的光密度值 A(以双蒸水为空白,波长通过特征物质可见光扫描确定)。

半乳糖苷酶活性用以下公式计算半乳糖苷酶活性 U:

$$U = \frac{A - A'}{t \times V \times OD_{600}} \times D \quad (1)$$

式中:A 为采用 8 mL 样品暴露测得的酶底物反应光密度值;A' 为采用 8 mL 双蒸水暴露测得的酶底物反应光密度值;V 为测试用的菌液体积:0.4 mL;t 为反应时间:60 min;D 为稀释因子:12。

(4) 曲线拟合和分析

利用 ORIGIN 软件分析 17 β -雌二醇双蒸水溶液建立的浓度-酶活性关系,使用 Doseresp 曲线进行拟合。经适当稀释后,计算样品的 17 β -雌二醇当量浓度。Doseresp 曲线模型公式如下:

$$U = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\lg x_0 - x)p}} \quad (2)$$

式中:U 表示 β 半乳糖苷酶酶活;A₁ 表示曲线酶活 U 下限;A₂ 表示曲线酶活 U 上限; $\lg x_0$ 表示 17 β -雌二醇 EC₅₀ 浓度, mol/L;x 表示 17 β -雌二醇浓度, mol/L;p 表示系数。

2 结果分析

2.1 重组基因酵母的复苏与增殖对环境雌激素测试影响分析

以 1/10 共培养液的光密度 OD_{600} 表示酵母菌生物量,该重组基因酵母的生长曲线如图 1 所示。结果显示,3 组不同批次的重组基因酵母初始生物量(酵母干粉 1、2、3)基本相同,加入培养基后 600 nm 处光密度均在 0.4 左右,这说明此时酵母细胞总数无显著性差异(不考虑细胞活性);0~120 h 培养期间,酵母的生长呈 S 形生长曲线,3 组酵母的生长趋势基本一致,但其生长速率与最高生物量呈现一定的差异,这可能是由于各批次酵母的复苏率存在一定差异,复苏后酵母的活性或具有活性酵母数量不同引起;当培养 36~72 h 时,3 组酵母的生长速率均达到最大值,此时酵母处于对数生长期,生长代谢均较旺盛。这与冯军等^[4]利用电化学法分析得到的酵母生长代谢活性结果较为接近。考虑暴露环节需要酵母菌有较高的表达活性,则应将重组基因酵母复苏与增殖培养时间控制在 48~66 h。为提高分析灵敏度,可在培养 66 h 后进行样品暴露,此时扩培养后的酵母菌密度较大。

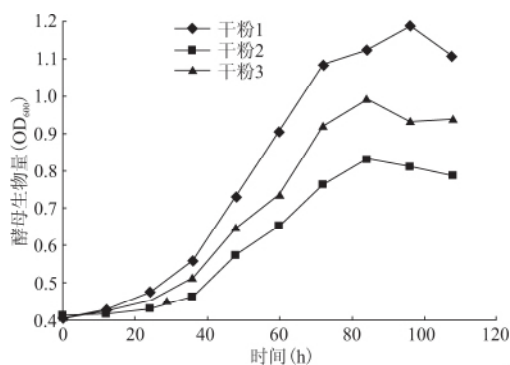
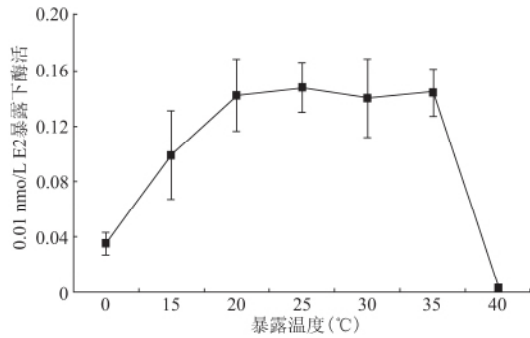


图 1 不同批次重组基因酵母生长曲线分析
Fig. 1 Growth Curve Analysis Analysis of Gene Recombined Yeast

2.2 环境雌激素化合物的暴露环节对环境雌激素测定的影响

2.2.1 暴露温度对测定的影响

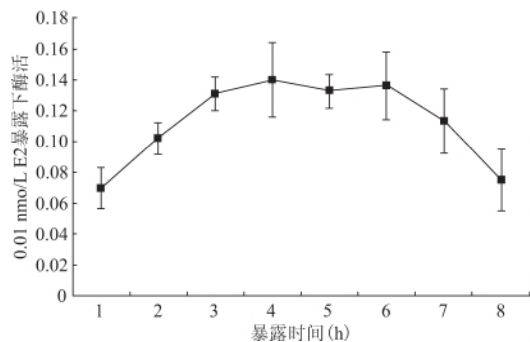
由图 2 可知,当温度 20℃~35℃ 时,暴露后测试的酶活处于较高水平;而当温度下降到 15℃ 以下时,酶活的测试值明显下降,0℃ 下暴露,酶活仅 0.035;当温度达到 40℃ 时,酶活接近 0,这可能由于过高的温度使酶失活。

图 2 暴露温度对 β -半乳糖苷酶活性的影响Fig. 2 Influence on Exposure Temperature to β -galactose Glucoside Enzyme Activity

综上所述,在为使测试方法具有较高的灵敏度,同时增加数据的可比性,建议将暴露温度控制在 $20^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 暴露时间对测定的影响

由图 3 可知,当暴露时间低于 3 h 时,暴露后的酶活随暴露时间的增加而增加;当暴露时间介于 3~6 h 之间时,酶活达到最大值,且趋于稳定;当暴露时间高于 6 h 时,酶活随暴露时间的增加呈下降趋势。这可能与 β -半乳糖苷酶的降解有关。因此,暴露时间设置在 3~6 h 为适,为增加仪器响应值 (OD_{420}),建议将暴露时间设置在 6 h。考虑整体分析时间的可行性,在酵母活性较高时(扩培后酵母菌浓度较高),也可以取 3 h 为暴露时间。

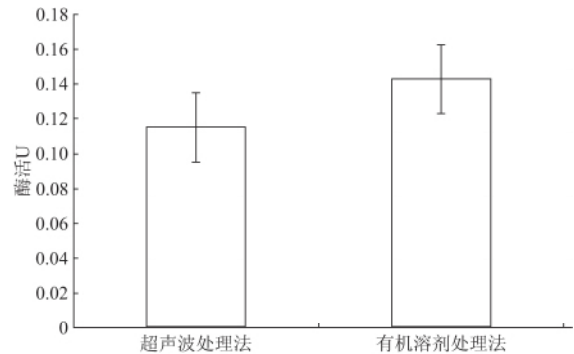
图 3 不同暴露时间下 β -半乳糖苷酶活性分析Fig. 3 Analysis on the Changes of β -galactose Glucoside Enzyme Activity in Different Exposure Time

2.3 β -半乳糖苷酶活性测定对环境雌激素测试影响分析

2.3.1 β -半乳糖苷酶释放方法比较

使用超声波处理法、有机溶剂处理法对 β -半乳糖苷酶的释放效果如图 4 所示。结果显示,超声波处理组的酶活均值略低于氯仿处理组 ($p < 0.05$),这可能是由于超声波在液体中传播时产生剧烈地扰

动作用,使颗粒产生很大的加速度,从而互相碰撞或与器壁互相碰撞而击碎,这种强大能量可能破坏 β -半乳糖苷酶的空间结构或产生局部高温,从而使部分酶失活。但由于采用间歇式处理,所以释放后的酶活相对于有机溶剂处理减少的不多。此外,两者的测试偏差均为 0.01 左右,说明该测试方法具有较高的精密性。所以为提高方法的灵敏度,建议选择有机溶剂处理法释放 β -半乳糖苷酶(如氯仿)。

图 4 不同释放方法对 β -半乳糖苷酶活性影响分析Fig. 4 Influence on Different Release Methods to β -galactose Glucoside Enzyme Activity

2.3.2 酶活测试最适温度分析

不同反应温度下酶活的变化如图 5 所示。结果显示当培养温度为 $15^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 之间时,时间和反应温度呈正相关, 35°C 时酶活最高。当反应温度达到 37°C 时,酶活值与 35°C 时较为接近,仅相差 2.2%;当设置温度高于 37°C ,达到 40°C 时,酶活 U 显著下降,且测试偏差较大,这可能是由振荡培养器的温度波动引起的,即酶可能处于短期高温胁迫状态,使得部分酶的空间结构遭到破坏,活性降低;当设置温度达到 45°C 时,酶活 U 接近 0,此时酶的活性基本丧失,无法催化反应进行。综上所述,酶活测试最适温度为 35°C 。

2.3.3 酶活测试最适比色时间分析

不同放置时间下吸光度的变化测试结果如图 6 所示。结果显示,放置 0.5 h 后 420 nm 处吸光度达到最高,此后 2.5 h 内,基本维持在最高吸光度状态。所以加终止剂后放置 0.5 h 进行分析,即可达到最大的测试灵敏度。这个结论专利中的描述^[2]“在室下放置 2 h 后比色”有所不同。这可能是由于该专利考虑了较低室温下加入终止剂后显色反应较慢,需要一定的稳定时间;而本实验中,由于将此反应放置在一个较为恒定的环境中 (37°C),从而排除了环境温度对该步骤测试的影响,节省了试验时间。

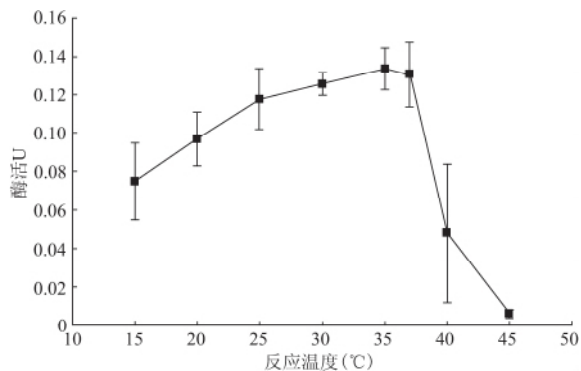


图 5 酶活测试最适温度分析

Fig. 5 Analysis on the Most Suitable Temperature to Enzyme Activity Test

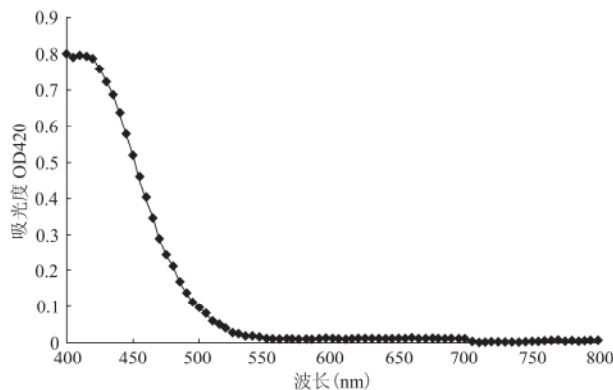


图 7 酶活测试最适比色波长分析

Fig. 7 Analysis on the Most Suitable Wave Length to Enzyme Activity Test

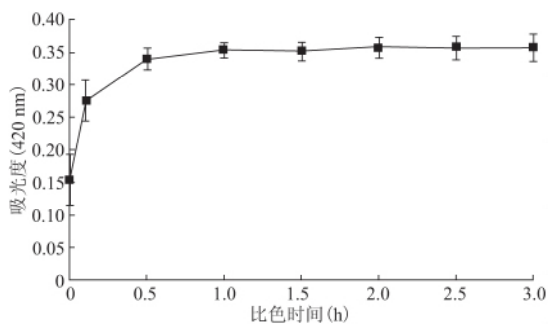


图 6 酶活测试最适比色时间分析

Fig. 6 Analysis on the Most Suitable Colorimetric Time to Enzyme Activity Test

2.3.4 酶活测试最适比色波长分析

将显色后的酶反应产物至于 10 mm 比色皿中。使用瓦里安 Cary50 紫外光度计进行 400~800 nm 可见光段全波长扫描,如图 7 所示。结果显示,可见光区域的波长-吸光度曲线呈“倒 S 型”。当波长 400~420 nm 时,化合物吸光度最高;大于 420 nm 时,吸光度随波长增加而减少;当波长达到 550 nm 时,酶反应产物吸光度与空白无显著性差异。所以可将 400~420 nm 中任意一个波长为最佳比色波长,在此波长下的测定结果具有最高的灵敏度。为扩大方法的适用性,使用滤光片的光度计也能用于测试,可将方法的比色波长定为 420 nm。在实际测试中,若最后使用离心方法获得比色溶液,而未采用 0.22 μm 抽滤,此时还应考虑酵母细胞碎片产生的浊度。从图 7 可知,空白对照在 420 nm 处的吸光度与 600 nm 处的差异不大。若样品在 600 nm 处光密度(OD_{600 样品})与空白(OD_{600 空白})有显著性差异,可以使用样品在 600 nm 处的吸光度 OD_{600 样品} 代替 OD_{600 空白} 进行后续的计算分析。

2.4 数据分析方式对环境雌激素测试结果影响分析

2.4.1 测试结果的精度与数据分析

根据实验目的对测试精度的要求,可以将实验分为定性测试和定量测试两大类。对于环境雌激素初筛样品,只需了解环境水体中的环境雌激素是否达到一定含量,此时一般只需要进行定性分析;而对于本底调查或污染普查性质的样品,则需对水体中环境雌激素的总体含量(或效应)有个较为精确的了解,此时,需要进行定量分析。

2.4.2 两种曲线拟合方式对定量测试数据的影响

在原方法的专利中,环境雌激素效应曲线以 Doseresp 曲线拟合,对 0.025~0.25 nmol/L 的浓度点进行加密分析,如表 1 所示,其卡方系数值(Chi²/DoF)为 0.000 04~0.000 66,接近 0,这说明使用 Doseresp 拟合效果较好。

从图 8 中可以发现,当 E2 浓度处于 0.025~0.25 nmol/L 之间时,E2 剂量浓度与酶活 U 呈显著正相关,近似线性相关。对 0.025~0.25 nmol/L 的 E2 酶活进行线性分析,结果如表 1 所示。其决定系数(R²)在 0.970~0.992 之间,均高于 0.95,这说明在此浓度范围内,环境雌激素浓度与酶活 U 呈显著线性正相关。

此外,以最大酶活为基准,对两种曲线拟合方式计算得到的 20%,50%,80%效应浓度(EC₂₀,EC₅₀,EC₈₀)进行比较分析,两者相对偏差在 -14.9%~5.9%之间。

综上所述,Doseresp 曲线拟合与一定浓度范围内的线性拟合均能很好地模拟酶活随环境雌激素的变化,且两种方法对于 EC₂₀~EC₈₀ 之间的测试结果相对偏差较小。

表 1 两种曲线拟合方式的比较

Tab.1 Comparison of Two Different Curve Fitting Methods

序号	Doseresp 曲线拟合				线性拟合			
	Chi ² /DoF	EC20	EC50	EC80	R ²	EC20	EC50	EC80
1	0.000 15	0.048	0.095	0.168	0.970	0.045	0.102	0.159
2	0.000 27	0.051	0.091	0.168	0.990	0.044	0.102	0.161
3	0.000 09	0.060	0.104	0.192	0.992	0.045	0.106	0.168
4	0.000 09	0.054	0.099	0.181	0.984	0.040	0.105	0.170
5	0.000 40	0.063	0.110	0.196	0.972	0.054	0.117	0.181
6	0.000 04	0.068	0.121	0.202	0.984	0.056	0.129	0.202
7	0.000 66	0.062	0.115	0.216	0.990	0.050	0.124	0.197

2.4.3 样品的稀释与数据定量分析

对于定量分析的剂量-效应曲线一般使用 Doseresp 曲线对暴露后各浓度梯度中半乳糖苷酶活性 U 进行拟合^[2]。如图 8 为某次环境雌激素测定的一条拟合曲线。图中,曲线的最后一点只取到 1.0 nmol/L,因为当 E2 浓度超过 1.0×10^{-9} mol/L 时,相对偏差迅速升高。这可能由于过高的 E2 浓度可能会对酵母菌的生长或半乳糖苷酶活性产生抑制,而这种抑制随个体差异有一定的不确定性。从这个意义上说,Doseresp 曲线虽然理论上能反应剂量效应的总体关系,但受到实际高浓度样品可能产生抑制效应影响,所以环境雌激素剂量-效应实际曲线形状类似钟形生长曲线。如图 9,一个效应值所对应的环境雌激素浓度至少有两个(非唯一解)。因此在实际分析中,按照专利中的方法(即仅测定一个效应值)无法得到确定的环境雌激素浓度。而当环境雌激素浓度过高时,由于对酵母细胞有一定毒害作用,此时酶活值会有所下降,如图 9 所示。为确定唯一解,可以加测不少于一个的稀释水样,最大稀

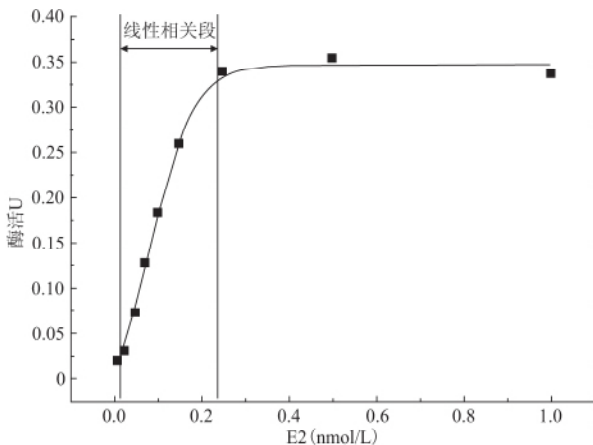


图 8 环境雌激素的理论剂量效应曲线(Doseresp 曲线)
Fig.8 Dose-effect Curve of Environmental Estrogen on Ideal Condition (Doseresp Curve)

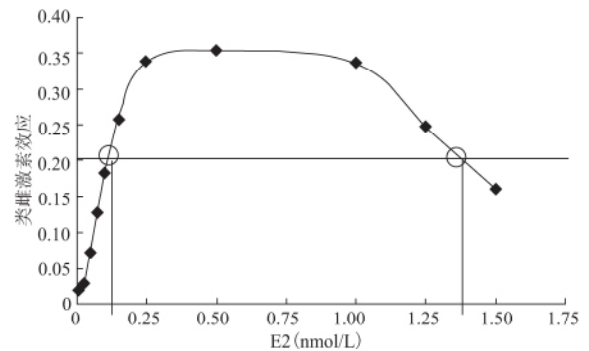


图 9 环境雌激素测试实际剂量效应与剂量关系
Fig.9 Dose-effect Curve of Environmental Estrogen on Ideal Condition in Reality

释倍数可以是线性段长度(约 10 倍,超过此倍数,就可能无法判定最终结果),此时可以将测试结果控制在曲线的线性相关段内,从而解决方程解不唯一的问题。

计稀释前水样为 A 样(酶活 U_A ,线性段内对应 E2 浓度为 C_A),稀释后水样为 B 样(酶活 U_B ,线性段内对应 E2 浓度为 C_B)。以线性段长度为最大稀释倍数。当 U_B 与空白一致时,水样的环境雌激素效应浓度为 C_A (以 E2 计);当 $U_A > U_B > U_{\text{空白}}$ 时,水样的环境雌激素效应浓度为 $C_B \times$ 稀释倍数(以 E2 计);当 $U_B > U_A > U_{\text{空白}}$ 时,需要加做一个稀释度后再按以上方法对其浓度加以判断。

为得到更为精确的值,可以将稀释倍数缩小,如将最大稀释倍数定为 60%的线性段长度(约 6 倍),就能将 U_A 或 U_B 控制在 20%~80% U_{max} 之间。

由于在样品分析前对水样的急性毒性进行了分析,故而一般不存在 U_A 与 U_B 均与空白一致的情况。

2.4.4 定性样品结果分析

在固定酶底物反应时间后, β 半乳糖苷酶酶活只与酶产生率有关,即:

$$U \propto (OD_{420}/OD_{600})$$

其中: OD_{420} 为采用 8 mL 样品暴露测得的 420 nm 光密度值(光程 10 mm); OD_{600} 为暴露后酵母菌液 600 nm 光密度值,用以表征暴露后酵母菌浓度(光程 10 mm)

由于同一批样在加测细胞急性毒性分析后,毒性较小的水样中毒性物质对于酵母的生长影响较小,所以表征酵母菌浓度的 OD_{600} 无显著性差异(不同批次样品受酵母初始活性等因素影响, OD_{600} 可能存在差异),此时 $U \propto OD_{420}$,即环境雌激素测试效应表征指标酶活在同批样品中只与其颜色有关。

由于 ONPG 试验的显色反应较为灵敏,对于定性分析样品,在样品暴露完成后,在酶活测试环节,可用目视比色法对结果进行定性分析,同时使用标准色列进行结果分析,比色时可能由于吸入酵母细胞碎片而使 OD_{420} 吸光值偏高,采用目视比色可以避免浊度带来的误差。

3 讨论

3.1 重组基因酵母的复苏与增殖对环境雌激素测试影响分析

酵母的复苏与增殖是为了制备有足够的具有活性的酵母细胞。当增殖过程完成后,酵母将被扩培到一定浓度,该酵母菌液浓度的高低,活性强弱直接影响到暴露的灵敏度和检测偏差。

除培养时间外,培养基组成和培养温度也是影响扩培结果的重要因素。普通的啤酒酵母的扩培一般采用液体麦芽汁培养基培养,其生理生长温度范围为 $27^{\circ}\text{C} \sim 33^{\circ}\text{C}$,最佳培养温度 30°C ^[5]。环境雌激素测定中使用的重组基因酵母为防止细胞的回复突变,减轻传代过程中质粒丢失情况,其复苏与增殖使用 SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型培养基^[2]。由于重组基因酵母本质仍为啤酒酵母,所以在 30°C 下振荡培养,其生长较快。

综上所述,为使复苏增殖后的酵母细胞具有较高的活性与生物量,且兼顾后续实验需要,建议使用 SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型培养基,在 30°C 水浴条件下振荡培养 48 h 后进行分析。

3.2 暴露环节对环境雌激素测定的影响

环境雌激素化合物的暴露环节是指将活化扩培后的重组基因酵母至于样品中,根据环境雌激素化合物种类和浓度的不同,其与上游结合区(Binding domain, BD)的重组基因酵母上人雌激素受体结合率也有所差异(这可能与受试样品中具环境雌激素

效应化合物的空间结构有关),从而影响到下游 β -半乳糖苷酶基因的表达。

定量测定环境雌激素化合物效应时,对半乳糖苷酶总产量精度要求更高。当外源环境雌激素物质种类及数量确定,该环节的主要影响集中于暴露温度和暴露时间的影响。

温度对生物的生长与表达有着重要的影响。首先温度影响外源环境雌激素物质在介质中的热运动,从而决定了它们的扩散速度和与目标受体碰撞、结合的几率。根据分子热力学运动定律,随着温度的增加,其运动速率变快,与目标受体碰撞、结合几率也变高;其次,温度对于细胞膜的流动性以及通透性会产生影响,较高的温度有利于外源物质进入胞内;第三,温度对酵母细胞代谢所需的酶,包括目标产物 β -半乳糖苷酶活性都有影响,当超过临界温度时,会使部分酶失活,从而影响测试。

由于在一定范围内,温度对 β -半乳糖苷酶的产率有影响,此时延长暴露时间,就能得到足够检测需要的半乳糖苷酶量,理论上半乳糖苷酶量与暴露时间呈正相关。暴露时间过短则 β -半乳糖苷酶表达量很低,不过实际上,暴露时间过长也对测试结果产生影响,其原因可能是已产生的 β -半乳糖苷酶的降解引起的。

除暴露温度与暴露时间外,不同的碳源可能酵母基因表达产生影响^[6],当水体中含高浓度碳源时,需要加以关注;水体中的某些可能影响 pGBKT7-ER 和 pGAD424-GRIP1 酵母表达质粒中启动子的调控的物质也会对暴露后半乳糖苷酶产量产生较大影响^[7];环境压力对细胞膜通透性会有影响,从而影响大分子传输速率,进而可能对暴露后半乳糖苷酶的产率产生一定影响,在实际环境中,由于压力变化不大,所以该影响基本可以忽略,若需要减少暴露时间,可从增加环境压力角度加以研究。

3.3 β -半乳糖苷酶活性测定对环境雌激素测试的影响

β -半乳糖苷酶基因由于其表型易于检测且易于与内源性蛋白相区别,是基因工程中最常用、最成熟的一种报告基因。其酶学性质也已经有了较为深入的研究。目前, β -半乳糖苷酶活测试方法主要有基于 X-gal 蓝白筛选的试纸法^[8]和基于 ONPG(邻硝基酚- β -D-半乳糖苷)试验的比色法^[9]。当需要定量检测环境雌激素效应浓度时,一般使用 ONPG 试验来进行间接测试。

若仅进行初筛分析,也可以使用 X-gal 蓝白筛

选的试纸法进行定性检测,以提高分析效率。

3.4 浊度对测试的影响

本实验酶活测试采用 ONPG 试验,以单位时间、单位细胞量的 OD_{420} 的增加量来表示。

比色时可能由于吸入酵母细胞碎片可以使 OD_{420} 吸光值偏高,这种由引入浊度带来的比色误差也是影响酶活测试的重要因素。

通过高速离心虽可以将多数的酵母细胞碎片粘附在管壁上,但仍可能有少部分悬浮于水相内,干扰检测。因此在若使用直接比色法,建议使用透明度较高的离心管,在吸取上层水相有色溶液时要将移液枪头置于远离酵母碎片的位置,且移液时需要时刻关注是否有肉眼可见的碎片被吸入;此外还可以用抽滤法排除酵母碎片浊度的干扰,用孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜抽滤以去除悬浮物得到澄清溶液,但不能用滤纸过滤,因为滤纸可吸附部分溶解于水的颜色,使结果降低。

3.5 结论

基于受体作用理论的环境激素效应测试方法的关键环节主要有重组基因酵母的复苏与增殖、环境雌激素化合物与酵母混合培养(样品暴露)、半乳糖苷酶活性测定、曲线拟合和分析(结果分析)等 4 个环节。

实验分析结果表明:

(1)重组基因酵母的复苏与增殖可采用 SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型培养基, 30°C 振荡培养,可在培养 66 h 后进行样品暴露。此时,酵母处于对数生长期,生长代谢均较旺盛。

(2)暴露环节的主要影响集中于暴露温度和暴露时间的影响。在 $20^\circ\text{C}\sim 35^\circ\text{C}$ 水浴条件下暴露 3~6 h,测试结果的灵敏度较高。

(3)方法以 β -半乳糖苷酶酶活来表征水样中具环境雌激素效应物质的浓度。使用有机溶剂处理法释放 β -半乳糖苷酶(如氯仿), 35°C 水浴条件下,反应 60 min,加入终止剂后放置 0.5 h,之后在 420 nm 处

比色分析。此时,测试结果的灵敏度较高。

(4)环境雌激素剂量-效应实际曲线形状类似钟形生长曲线,在 $0.025\sim 0.25\ \text{nmol/L}$ 浓度范围内(以 E2 计)使用线性拟合也可以取得较好的拟合效果;对于实际样品,仅测定一个效应值无法得到确定的环境雌激素浓度,需要加测不少于一个的稀释水样。

参考文献:

- [1] JIANG W W, YAN Y, MA M, et al. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(2): 320-328.
- [2] 王子健,李 剑,马 梅,等.用于检测环境中类环境雌激素化合物的双杂交酵母及生物测试方法:中国,200710308509.2 [P/OL]. 2009-12-29[2011-03-30]. <http://www.docin.com/p526484819.html>.
- [3] HONG H, KOHLI K, TRIVEDI A, et al. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(10): 4948-4952.
- [4] 冯 军,慈云祥,牛喜平,等.发酵过程中啤酒酵母生长代谢活性的电化学分析[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(2): 22-25.
- [5] 王 玲,蒲万霞,常惠芸,等.影响啤酒酵母传代培养的关键因素初探[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(11): 96-98.
- [6] MARIE-AGNÈS S, BOOKER S, JAOUAN M, et al. Expression in yeast and purification of functional macrophage nitric oxide synthase. evidence for cysteine-194 as iron proximal ligand[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(22): 7204-7213.
- [7] 刘巍峰,高 东,鲍晓明,等.酿酒酵母可诱导启动子功能特性的研究[J]. *山东大学学报(自然科学版)*, 1998, 33(3): 345-350.
- [8] 袁素莉,付 立,张其玖.一种快速检测 β -半乳糖苷酶活性的试纸方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1994, 21(3): 271-273.
- [9] MAJID H M, 谭树华,高向东,等.药用乳糖酶酵母菌发酵条件研究[J]. *中国药科大学学报*, 1999, 30(5): 392-395.

TESTING METHOD OF ESTROGENIC EFFECT BASED ON THE RECEPTOR EFFECTS THEORY

ZHAO Jian-ping¹, ZHAO Yang-yong², HU Jian-lin¹

(1. Environmental Monitoring Center of Ningbo, Ningbo 315012, China; 2. Zhejiang Zhongtong Testing Technology Co., LTD, Ningbo 315012, China; 3. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The environmental hormones with accumulation and potential risk were concerned recently because of the inherent toxicity. The testing methods of the environmental hormones were studied by several research. Chemical methods were the major testing methods to determine the known environmental hormones during the past few years. In this paper we established and optimized a biological testing method based on the receptor effects theory. The experimental parameters of environmental hormone effects testing based on the receptor effects theory were optimized, including recovery and proliferation of recombinant gene yeast, exposure time and temperature of estrogenic compounds, the testing method of β -galactosidase, the optimum testing temperature, colorimetric time and colorimetric wavelength, statistical method by ORIGIN, and quantitative method, to analyze the estrogenic effect, in which 17β -estradiol was used as the standard reference materials. The results indicated that the method was more efficiently and accurately to determine the actual samples when recovery and proliferation of recombinant gene yeast was cultured in SD/-Trp/-Leu auxotrophic medium and shaken in 30°C after 66 h when the yeast initiated the logarithmic growth. We could mix sample and yeast mixture in $20^{\circ}\text{C} - 35^{\circ}\text{C}$ water bath for 3-6 hours to improve the sensitivity. The β -Galactosidase should be released by organic solvent treatment in 35°C water bath for 60 min, then 420 nm colorimetric analysis after 2.5 hours. The dose-effect curves of the environmental hormones fitted by ORIGIN were best when the concentration were between $0.025 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $0.25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. In addition, we suggested that the dilution sample should be added in actual tests to increase the accuracy of the methods.

Key words: Estrogenic effect; gene recombined yeast; receptor effects