第1期,194-201	Asian Journal of Ecotoxicology	No.1, 194-201	
2016年 第11卷	生态毒理学报	Vol. 11, 2016	

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150206002

汤花梅, 魏婷, 张超, 等. 应用超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器筛选基因毒性化合物[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(1): 194-201 Tang H M, Wei T, Zhang C, et al. Utilization of super-sensitive yeast HUG1-yEGFP biosensor to screen genotoxic compounds [J]. Asian Journal of Eco-

toxicology, 2016, 11(1): 194-201 (in Chinese)

应用超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器筛选基因 毒性化合物

汤花梅1.2,魏婷1.2,张超1.2,刘玉倩1.2,汪艳1,张晓华1,袁丽1,戴和平1.*

1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态和生物技术国家重点实验室,武汉 430072

2. 中国科学院大学,北京 100049

收稿日期:2015-02-06 录用日期:2015-03-19

摘要:为了扩展本实验室构建的响应于 DNA 损伤信号的超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器的检测范围并积累参考数据, 为实际应用打下实验基础,本研究对 26 种与环境及人类生活息息相关的化合物的基因毒性进行了检测,筛选出 8 种具有基因 毒性的化合物,并将其结果与现有微生物检测系统的检测结果进行了对比。结果显示,超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器 的检测结果与以细菌为宿主细胞的 Ames 试验或 SOS 显色法的检测结果的吻合度高于 50%,与以酵母为宿主细胞的 GSA 检 测系统的检测结果的吻合度高于 85%。以真核生物酵母为宿主的检测系统与以原核生物细胞为宿主的检测系统的结果的差 异反映了它们抗胁迫机制的不同。本研究应用超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器特异性检测出 3 种化合物为基因毒性阳 性,这 3 种化合物是代森锰锌、孔雀石绿及丙烯酰胺,均被报道具有潜在致癌性。本研究结果表明,超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器可以有效地对环境污染有关的基因毒性化合物进行检测,可以作为其他现有检测系统的补充,应用于环境化学污 染的健康风险评价。

关键词:环境污染;酵母;生物传感器;基因毒性;健康风险评价 文章编号:1673-5897(2016)1-194-08 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

Utilization of Super-sensitive Yeast *HUG1-yEGFP* Biosensor to Screen Genotoxic Compounds

Tang Huamei^{1,2}, Wei Ting^{1,2}, Zhang Chao^{1,2}, Liu Yuqian^{1,2}, Wang Yan¹, Zhang Xiaohua¹, Yuan Li¹, Dai Heping^{1,*}

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China
University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 6 February 2015 accepted 19 March 2015

Abstract: In order to extend the detection range of super-sensitive DNA damage responded yeast *HUG1-yEGFP* biosensor which was constructed by our laboratory, and to accumulate more relevant data for practical application, 26 kinds of chemicals which were widely distributed in the environment and human lives were detected and 8 kinds of genotoxic compounds were screened out. Compared with three existed microbiological whole-cell sensing systems, the detection results in this study matched over 50% of the data from Ames test and SOS colorimetric test

基金项目:国家自然科学基金重点项目(21037004);淡水生态和生物技术国家重点实验项目(2012FBZ10)

作者简介:汤花梅(1989-),女,硕士,研究方向为酵母生物传感器监测基因毒性研究,E-mail:sjtangyuan@sina.cn

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

based on bacterial cell, and over 85% of the data from the GSA test based on yeast cell. The differences of the results between the test systems based on eukaryotic yeast cell and prokaryotic bacteria cells reflected the different mechanisms of stress resistance. In this study, three kinds of genotoxicity-positive compounds, mancozeb, malachite green and acrylamide which were reported as potential carcinogens, were specifically detected by super-sensitive yeast *HUG1-yEGFP* biosensor. The results of the study indicated that super-sensitive yeast *HUG1-yEGFP* biosensor can be used to effectively detect genotoxic compounds which were related to environmental pollution. Therefore, they are valuable in environmental health risk assessment for chemical pollutant as a complementary method for other existed detection systems.

Keywords: environmental pollution; yeast; biosensor; genotoxicity; health risk assessment

癌症已成为世界范围的头号杀手,中国的癌症 发生情况也不容乐观。癌症的发生在不同地域、年 龄及性别之间的分布表明癌症的发生与生活方式及 环境因素具有密切的关系^[1-3]。作用于有机体,直接 或间接地造成 DNA 损伤,进而导致基因突变,促进 肿瘤的发展,并造成毒性作用的环境化学因子称为 基因毒性化合物^[4]。大部分基因毒性化合物都有可 能引起 DNA 损伤的发生,因此以 DNA 损伤响应为 生物标志物可以有效地检测和鉴定环境中的基因毒 性化合物,不仅能对环境中毒性化合物进行定性及 定量分析,更能反映出不同毒性化合物在分子水平 对生物造成的毒性效应^[5],对人类健康-环境风险评 估具有重要意义。

现有的基因毒性化合物微生物检测手段有鼠伤 寒沙门氏菌致突变型实验(Ames test)^[6],大肠杆菌 SOS 显色法^[7]及已商业化使用的酵母 *RAD54-GFP* 遗传毒性检测系统 GreenScreen Assay(GSA)^[8]。对比 细菌,以酵母为模式生物的检测系统更具有优势,因 为酵母作为一种简单的单细胞真核微生物,不仅易于 培养、生长迅速,操作简便,在基因水平上易于改造, 同时,作为第一种完成全基因组测序的真核生物,酿 酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中6 000 多个基因序 列信息中,约有 23%与人类基因具有同源性^[9]。

我们实验室将响应于 DNA 损伤信号的 HUG1yEGFP 生物传感器元件转入七基因缺失酵母突变 株内,并将该元件同源重组到酵母基因组上,建立了 稳定的超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器^[10],检 测原理如图 1。HUG1 基因由复制阻滞及 DNA 损 伤试剂诱导高表达^[11], Meurisse 等^[12]发现 HUG1 能 结合 Rnr2 亚基,并推测其参与负反馈调节核糖核苷 酸还原酶(RNR)活性。基因毒性化合物可以诱导 HUG1-yEGFP 元件中的报告基因绿色荧光蛋白的 表达,其剂量效应可通过荧光酶标仪或流式细胞仪



图 1 HUG1-yEGFP 生物传感器检测基因 毒性化合物原理示意图^[11]

注:在正常情况下,酵母中 HUG1 的表达水平较低,主要受结合 在 HUG1 基因启动子上的负调控因子 Crt1 的阻遏,当暴露于基 因毒性化合物时,Crt1 被磷酸化,然后被蛋白酶水解,HUG1 启 动子去阻遏,使与之融合的报告基因 yEGFP 得以表达。表达产 物的荧光信号可以用荧光定量酶标仪或流式细胞仪进行检测。

Fig. 1 The principle of HUG1-yEGFP Biosensor

for detecting genetic toxicity of compound^[11] Note: Under normal condition, the negative regulatory factor Crt1 bounds to the promoter of *HUG1* and leads to low-level expression of HUG1 in yeast. When exposed to genotoxic compounds, the Crt1 would be phosphorylated and then hydrolyzed by protease with the derepression of the HUG1 promoter and expression of the infused yEGFP. The fluorescence intensity of the expressed yEGFP will be detected by Multiscan spectrum or flow cytometer.

对酵母细胞的荧光强度进行测定。与现有的检测方法相比较,超敏感 HUG1-yEGFP 检测系统不仅能定性并定量检测基因毒性化合物,且对多种化合物,尤其是在对氧化试剂,如叔丁基过氧化氢(t-BHP)一类

的化合物的 DNA 损伤效应的检测更灵敏。在提高 灵敏度的同时,该检测系统的特异性更强,如在 GSA 试验中表现为假阳性的氯霉素,对超敏感酵母 *HUG1-yEGFP* 生物传感器并无诱导作用^[10]。

由于本实验室构建的超敏感酵母 HUG1-yEG-FP 生物传感器是一种新型检测系统,需要扩大其对 化合物的种类和范围的检测,也需要积累检测数据 作为进一步优化的参考,为其实际应用和推广建立 实验基础。因此,本研究利用超敏感酵母 HUG1yEGFP 生物传感器,在原来已检测的典型基因毒性 化合物的基础上,又检测了 26 种在生产生活中被人 类大量使用的化合物,包括4 种农药、5 种工业原料 杀菌剂、2 种实验室试剂、2 种涉及食品安全的试剂、 12 种重金属盐及1 种抗癌药物,其中 8 种化合物检 测为基因毒性阳性化合物。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 菌株

超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器菌株 WXY30095-genome-HUG1-yEGFP 由本实验室构 建^[10],是将 HUG1-yEGFP 报告元件整合到七基因缺 失酵母突变株:WXY30095 (snq2 \triangle ::KanMX, pdr5 \triangle ::LEU2, cwp1 \triangle ::hisG, cwp2 \triangle ::HIS3, yap1 \triangle :: hisG, rad1 \triangle ::hisG, mag1 \triangle ::hisG)。

1.2 培养基和溶液

YPD 培养基:1% 酵母提取物,2% 蛋白胨,2% 葡萄糖;固体培养基另加2% 琼脂。

SD-Ura 培养基(每升含量):酵母胆碱(无氨基酸)1.7 g,硫酸铵 5 g,葡萄糖 20 g,腺嘌呤 20 mg,甲 硫氨酸 20 mg,色氨酸 20 mg,组氨酸 20 mg,亮氨酸 30 mg,赖氨酸 30 mg,缬氨酸 30 mg。

10×PBS 缓冲液:氯化钠 80 g,氯化钾 1 g,十 二水合磷酸氢二钠 36.8 g,磷酸二氢钾 2.4 g,溶于双 蒸水中,用 NaOH 调节 pH 值为 7.4,定容至 1 L,使 用时用双蒸水稀释成 1×PBS 且需高压灭菌。

1.3 化学试剂

代森锰锌、乐果、马来酰肼、2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、2-氨基-4-硝基苯酚、8-羟基喹啉、儿茶酚、DEHP (太酸二丁酯)、EB(溴化乙啶)均购自 Sigma-Aldrich 公司,均为优级纯。丙烯酰胺(acrylamide)购自生工生物 工程有限公司,NaAsO₃、Pb(CH₃COO)₂、Pb(NO₃)₂购自 国药集团化学试剂有限公司,亚硝酸钠购自湖北大学 化工厂,孔雀石绿购自上海标本模型厂,MnCl₂购自金 山县兴塔化工厂,ZnSO₄购自北京化工厂,BaCl₂购自

成都化学试剂厂,V₂O₅购自上海试剂总厂第三分厂, CuSO₄购自武汉市东方红化工厂,CdCl₂购自重庆东 方试剂厂,CoCl₂购自广东台山化工厂,K₂Cr₂O₇购自 上海浦江化工厂,NiCl₂购自北碚化学试剂厂,环磷酰 胺购自百特国际有限公司,以上试剂均为化学纯。蓬 灰购自甘肃力司食品科技有限公司。

1.4 酵母菌株复苏和培养

取-70 ℃保存的酵母菌株 WXY30095-genome-HUG1-yEGFP 接种在 YPD 固体培养基平皿上,于 30 ℃恒温培养箱中倒置培养2 d。

1.5 DNA 损伤试剂暴露实验

用新鲜的酵母培养基将过夜培养酵母细胞稀释 至 OD_{600 nm}为 0.1,将稀释后的酵母菌液转移至 24 孔 板中,每孔 1 mL 菌液。按设置的药物浓度梯度加药 后,置于恒温摇床中 30 ℃、200 r·min⁻¹暴露 8 h 或 12 h。然后吸取每孔中的 1 mL 菌液经 6 000 r·min⁻¹离 心 2 min 后去上清,加无菌的 PBS 磷酸缓冲液重悬菌 液,再经 6 000 r·min⁻¹离心去上清后重悬于 1 mL 无 菌的 PBS 磷酸缓冲液中。每孔 200 µL 分装菌液至 96 孔板透明底黑色孔板内。若用于流式细胞仪检 测,则加入 PI 染色 30 min,以区分活细胞与死细胞。 1.6 荧光酶标仪或流式细胞仪检测绿色荧光蛋白 GFP 的表达

按照刘玉倩等^[13]和 Wei 等^[10]的方法,用荧光酶标仪和流式细胞仪检测绿色荧光蛋白的表达量。荧光酶标仪用 SpectraMax M5 多功能酶标仪检测酵母细胞浓度 OD_{600nm}值和相对荧光强度值(激发光波长488 nm、发射波长 520 nm)。

Becton Dickinson FACS Aria TM Ⅲ高速分选型 流式细胞仪检测活细胞 yEGFP 绿色荧光蛋白相对 表达量。PI 信号由 PE-A(激发光波长 488 nm、发射 光波长 575 nm), yEGFP 信号由 FITC 通道收集(激 发光波长 488 nm、发射光波长 525 nm)。

1.7 数据统计与分析

1.7.1 酶标仪检测数据统计与分析

Microsoft Excel 2007 软件统计并计算荧光强度 平均值来定量 yEGFP 的表达,并取 3 次平行实验的 平均值和标准差。相对荧光强度 AU 为任意单位 (arbitrary unit), AU/OD_{600 nm} 为每单位酵母细胞的平 均相对荧光强度。

1.7.2 流式细胞仪检测数据统计与分析

流式细胞仪收集样品 10 000 个细胞荧光表达 量,FlowJo 软件计算样品中 PI 阴性细胞的平均荧光 强度。荧光诱导倍数(fold induction)=暴露组单位酵 母细胞相对荧光强度平均值/对照组相对荧光强度 平均值,酶标仪检测数据设定遗传毒性阈值为1.6 倍,流式细胞仪检测数据设定遗传毒性阈值为2倍 (细胞的平均荧光强度增加了60%或100%),即当检 测系统暴露于某一浓度的遗传毒性化合物中时,产 生的 yEGFP 单位酵母细胞平均荧光强度值与对照 组结果相比,荧光诱导倍数>1.6 或2则可认为是阳 性遗传毒性效应,利用 graphpad 软件作图。

结果(Results) 2

基因毒性化合物对超敏感酵母 HUG1-yEGFP 2.1 生物传感器细胞毒性的检测

应用超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器对 26 种化合物的基因毒性进行检测,经数据统计分 析,共有8种化合物具有基因毒性,即暴露后,酵母 细胞表达 yEGFP 荧光强度为酶标仪检测的阴性对 照组的1.6倍以上或流式细胞仪检测的阴性对照组 的2倍以上。这8种化合物分别为:代森锰锌、2-氨

基-4 硝基苯酚、8-羟基喹啉、儿茶酚、EB、丙烯酰胺、 孔雀石绿、NiCl₂。为了了解各种基因毒性化合物在 致酵母 DNA 损伤时,都会对含有超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器元件的酵母细胞产生不 同程度的细胞毒性,我们通过对酵母细胞生长速度 的检测,了解各种基因毒性化合物的细胞毒性。图 2是对酵母菌液生长情况的统计分析,结果显示各 化合物在不同暴露浓度时对酵母细胞生长的抑制, 反映了各种化合物浓度对酵母的细胞毒性效应。 基因毒性化合物诱导超敏感酵母 HUG1-yEG-2.2 FP生物传感器荧光蛋白表达的剂效关系检测

将这8种化合物诱导超敏感 HUG1-EGFP 生物传 感器的荧光蛋白表达的剂效关系进行了检测。结果如 图 3 所示,匀表现出良好的剂效关系。其中,儿茶酚暴 露剂量为400 μg·mL⁻¹时,荧光蛋白表达量诱导倍数最 高,为10.07倍。最大荧光诱导倍数最低的药品为EB, 诱导倍数为2倍。对比图2的相关细胞毒性的数据, 我们发现,致 DNA 损伤的有效诱导表达时的最低暴露 剂量所对应的细胞毒性均小于半致死量。



图 2 基因毒性化合物对超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器细胞毒性的剂效关系

注:不同填充图案的条柱代表不同的药物组处理。每一药物组处理浓度从左至右依次增加,各处理组药物浓度分别为:代森锰锌(0、1、2、4、 8、16 µg·mL⁻¹);2-氨基-4 硝基苯酚(0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg·mL⁻¹);8-羟基喹啉(0、20、40、80、160、320 µg·mL⁻¹);儿茶酚(0、0.1、0.2、0.4、0.8、 1.6 mg·mL⁻¹);溴化乙啶(EB) (0、1、2、4、8、16 µg·mL⁻¹);丙烯酰胺(0、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 mg·mL⁻¹);NiCl₂(0、0.03、0.06、0.12、0.24、0.48 mg·mL⁻¹); mL⁻¹);孔雀石绿(0、12.5、25、50、100、200 µg·mL⁻¹)。

Fig. 2 Dose-effect relationship between genotoxic compounds and cell growth rate of HUG1-yEGFP biosensor Note: Columns with different filling pattern represent different drug groups. The drug concentrations in each group increase from left to right in turn and the concentrations are as follows: mancozeb (0, 1, 2, 4, 8, 16 µg·mL⁻¹); 2-amino-4-nitrophenol (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg·mL⁻¹); 8hydroxyquinoline (0, 20, 40, 80, 160, 320 µg·mL⁻¹); catechol (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg·mL⁻¹); EB (0, 1, 2, 4, 8, 16 µg·mL⁻¹); acrylamide (0, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 mg·mL⁻¹); NiCl₂(0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 mg·mL⁻¹); malachite green(0, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg·mL⁻¹).

表 1 超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器各化合物基因毒性的检测及与其他 3 种检测系统结果的比较

Table 1 Genotoxicity of chemical compounds tested by HUG1-yEGFP biosensor and comparison with three other tests

		超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器		°Ames 试验	^d SOS 显色法	CG 4 [14]	
		Super-sensitive	e Yeast HUG	-yEGFP Biosensor	^c Ames test	SOS colorimetric test	USA ¹¹
化合物 Compounds		^a 细胞毒性 cytotoxicity	^a 基因毒性 genotoxicity	^b 最小剂量 minimum dose /(µg・mL ⁻¹)			
农药 Pesticide	代森锰锌 Mancozeb	+	+	1	/	/	/
	乐果 Dimethoate	-	-	/	TA100(+S9)	-	/
	马来酰肼 Maleic hydrazide	-	-	/	-	/	/
	4)2,4 - D	-	-	/	/	/	/
工业原料、 杀菌剂等 Industrial raw materials and fungicides	5)2-氨基-4 硝基苯酚 2-amino-4-nitrophenol	+	+	100	TA98,TA100(+S9)	/	+
	6)8-羟基喹啉 8-hydroxyquinoline	+	+	40	TA100,TA97(+S9)	-	-
	7) 儿茶酚 Catechol	+	+	40	TA100	-	+
	8)NaNO ₂	-	-	/	TA100	+	/
	9)孔雀石绿 Malachite green	+	+	12.5	-	/	/
实验室试剂 Lab reagents	10)溴化乙锭 EB	+	+	1	TA98(+S9)	+(+S9)	+
	11)丙烯酰胺 Acrylamide	+	+	6 400	-	/	/
食品安全	12)DEHP	-	-	/	-	/	/
Food additives	13)蓬灰 Ash	-	-	/	/	/	/
重金属 Heavy metal	14)MnCl ₂	+	-	/	TA102	-	/
	15)ZnSO ₄	+	-	/	/	-	/
	16)BaCl ₂	+	-	/	/	-	/
	17)V ₂ O ₅	+	-	/	-	/	/
	18)NaAsO ₃	+	-	/	/	-	/
	19)Pb(CH ₃ COO) ₂	+	-	/	-	-	/
	20)Pb(NO ₃) ₂	+	-	/	/	-	/
	21)CuSO ₄	+	-	/	-	-	/
	22)CdCl ₂	+	-	/	-	-	-
	23)CoCl ₂	+	-	/	TA98	-	/
	$24)K_2Cr_2O_7$	+	-	/	TA97,TA98,TA100	+	/
	25)NiCl ₂	+	+	120	-	-	+
抗癌药物 Anti-cancer drug	26)环磷酰胺 Cyclophosphamide	-	-	/	TA1535(+S9)	-	-

注:^a,+代表阳性,-代表阴性,/代表无相关数据;^b,致 DNA 损伤最小剂量。^c,Ames test 实验数据由 http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ui/和 http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmLgen? GENETOX 两个数据库获得。所列菌株为 Ames 试验检测药品呈阳性菌株。^d,SOS 实验数据由 http://www1. pasteur.fr/recherche/unites/pmtg/toxic/database.iphtmL 数据库获得。

Note: ^a, + denote positive, - denote negative, / denote none relevant data; ^b, minimum dose that induces DNA damage; ^c, the experimental data of Ames test obtained from http://tools.niehs.nih.gov/cebs3/ui/ and http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmLgen? GENETOX. The listed strains are drug-positive strains in Ames test. ^d, the experimental data of SOS colorimetric test obtained from http://www1.pasteur.fr/recherche/unites/pmtg/toxic/database.iphtmL.

第1期



图 3 基因毒性化合物诱导超敏感 HUG1-EGFP 生物传感器的荧光蛋白表达的剂效关系

注:不同填充图案的条柱代表不同的药物组处理。每一药物组处理浓度从左至右依次增加,各处理组药物浓度分别为:代森锰锌(0、1、2、4、 8、16 µg·mL⁻¹);2-氨基-4 硝基苯酚(0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg·mL⁻¹);8-羟基喹啉(0、20、40、80、160、320 µg·mL⁻¹);儿茶酚(0、0.1、0.2、0.4、0.8、 1.6 mg·mL⁻¹);EB(0、1、2、4、8、16 µg·mL⁻¹);丙烯酰胺(0、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8 mg·mL⁻¹);NiCl₂(0、0.03、0.06、0.12、0.24、0.48 mg·mL⁻¹);孔雀石 绿(0、12.5、25、50、100、200 µg·mL⁻¹)。

Fig. 3 Dose-effect relationship between genotoxic compounds and induced expression of green fluorensence

protein of HUG1-yEGFP biosensor

Note: Columns with different filling pattern represent different drug groups. The drug concentrations in each group increase from left to right in turn and the concentrations are as follows: mancozeb $(0,1,2,4,8,16 \ \mu g \cdot mL^{-1})$; 2-amino-4-nitrophenol $(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 \ m g \cdot mL^{-1})$; 8-hydroxyquino-line $(0, 20, 40, 80, 160, 320 \ \mu g \cdot mL^{-1})$; catechol $(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 \ m g \cdot mL^{-1})$; Be $(0, 1, 2, 4, 8, 16 \ \mu g \cdot mL^{-1})$; acrylamide $(0, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 \ m g \cdot mL^{-1})$; NiCl₂ $(0, 0.03, 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 \ m g \cdot mL^{-1})$; malachite green $(0, 12.5, 25, 50, 100, 200 \ \mu g \cdot mL^{-1})$.

2.3 超敏感酵母 *HUG1-yEGFP* 生物传感器筛选基因毒性化合物与其他微生物检测系统的比较

将本次研究结果与现有微生物检测系统的检测结果进行了对比,如表1所示,本次研究中共有 23种化合物在现有的检测系统中测试过,与Ames 试验测试化合物重叠的种类有19种,所得结果一 致的药品有10种,其中4种呈阳性的化合物分别 为2-氨基-4-硝基苯酚、8-羟基喹啉、儿茶酚、EB,6 种呈阴性的化合物分别为马来酰肼、DEHP、V₂O₅、 Pb(CH₃COO)₂、CuSO₄、CdCl₂;与SOS毒性试验相比 较,重叠的药物有17种,其中试验结果一致的有12 种,但只有EB为基因毒性阳性药物;与GSA试验 相比较,检测重叠的药物有7种,其中只有8-羟基喹 啉的检测结果不一致,检测同为基因毒性阳性的药 物分别为2-氨基-4硝基苯酚、儿茶酚、EB及镍离 子。与现有检测系统结果重叠但检测结果不一致的 化合物是 NaNO₂、孔雀石绿、 $K_2Cr_2O_7$ 。另有 3 种化 合物没有查到被其他 3 种检测系统检测的数据,这 些化合物是代森锰锌、2,4-D、蓬灰。

3 讨论(Discussion)

为了扩展本实验室构建的超敏感 HUG1-yEG-FP 生物传感器的检测范围并积累参考数据,为实际 应用打下实验基础,我们对 26 种与环境及人类生活 息息相关的化合物的基因毒性进行了检测,筛选出 8 种具有基因毒性的化合物,并将其结果与现有微 生物检测系统的检测结果进行了对比。

本研究结果对比于现有的 Ames 实验、SOS 显 色试验及 GSA 实验,其中与 Ames 试验测试药品重 叠的种类有 19 种,所得结果一致的药品有 10 种,结 果吻合度为 52.63%;与 SOS 显色试验相比较,重叠 的药物有 17 种,其中试验结果一致的有 12 种,吻合 度为 70.59%,但只有 EB 为基因毒性阳性;与 GSA 试验相比较,检测重叠的药物有 7 种,其中 6 种的检测结果一致,吻合度为 85.71%。综上,本研究结果 更接近于 GSA 试验,其原因可能与二者都是基于酿酒酵母响应于 DNA 损伤高表达基因所建立的报告 系统有关。同时 EB 在以上几种检测系统中均为阳性,但以细菌为模式生物的 Ames 试验及 SOS 试验 需 S9 处理,而酵母为模式生物的超敏感酵母 *HUG1-yEGFP* 生物传感器及 GSA 检测系统不需要 对受试化合物进行代谢活化,推测酿酒酵母中存在 可对 EB 进行代谢活化的酶。

造成本研究检测系统对某些化合物检测的结果 与现有检测系统不一致的原因,可能与各种检测系 统所基于的检测原理及不同检测系统宿主细胞的差 异相关联。Ames 实验和 SOS 试验的宿主细胞都是 原核生物细菌, Ames 实验检测的是细胞回复突变 率,是以细胞整体形态为检测指标,而 SOS 显色试 验基于大肠杆菌损伤快速应答机制,将报告基因 LacZ 与 SOS 基因(如 SfiA)启动子融合,检测大肠杆 菌与底物 X-gal 显色反应,是以单个分子的响应表 达水平来定性及定量基因毒性化合物[15],所以它们 之间的检测结果的差异主要是因为检测原理的差 异。而 GSA 实验是基于 DNA 损伤响应基因 RAD54 和绿色荧光蛋白融合,和超敏感酵母 HUG1vEGFP 生物传感器的宿主细胞都是真核生物酵母, 都是基于单分子的 DNA 损伤响应表达水平的检测 原理,因此它们的检测结果高度相似,它们与 Ames 检测和 SOS 反应的检测结果的差异可能更多地表 现在原核生物和真核生物之间在损伤修复,代谢解 毒和抗胁迫机理的差异。这种差异比检测原理的差 异更关键,可能是很多化合物的基因毒性检测不到 的主要原因。比如亚硝酸钠在 Ames 实验和 SOS 试 验中都被检测为基因毒性阳性,但在超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器检测中却为基因毒性阴 性。这暗示着,在真核生物酵母中可能存在与原核 生物不同的某种解毒机制。同样的情况也可能发生 在对重金属的检测中。有大量文献报道,酵母中存 在多种金属硫蛋白,因此酵母表现出对重金属具有 较强的抗性,这也可以解释为什么用超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器只检测到 NiCl,为基因毒 性阳性,其他的都为阴性。另一方面,由于酵母也缺 乏高等真核生物的代谢活化酶系统,所以我们开始 以为用大鼠肝微粒体抽提液 S9 对一些化合物进行 处理后,也可以用超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传 感器进行检测,但结果却出乎预料。环磷酰胺是一 种大量使用的抗癌药物,需要经过代谢活化后才能 表现出基因毒性,但用 S9 处理后的检测结果却为 阴性。本实验室前期也尝试过对其他一些有机化合 物进行代谢活化,如苯并芘,虽然活化了的化合物可 以使 Ames 实验检测为阳性,但仍然不能使酵母生 物传感器检测为阳性。所以猜测,对于酵母生物传 感器而言,这些化合物所涉及的不仅仅是代谢活化, 可能还与酵母的细胞屏蔽和抗胁迫机制有关。鉴于 上述所出现的问题,我们还需要对酵母细胞的抗胁迫 机制进行深入的了解,找到关键的基因进行改造,进 一步改善和扩展酵母生物传感器的检测和应用范围。

本研究中被超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传 感器特异性检测为基因毒性阳性的 3 种化合物为代 森锰锌、孔雀石绿及丙烯酰胺。这个检测结果与文 献报道的这3种化合物均具有潜在致癌性的结果相 一致。代森锰锌为一种广谱的乙撑二硫代氨基甲酸 酯类保护性杀菌剂^[16],能增加大鼠癌症的发生率及 与性别相关的特异癌症[17],且代森锰锌受试人类淋 巴能导致胞内染色体断裂并促进细胞的凋亡[18]。孔 雀石绿是一种有毒的三苯甲烷类化合物,作为染色 剂用于服饰、瓷器、报纸等行业的染色剂,同时因其 具有抗真菌、细菌、寄生虫且及急性毒性低等特性, 曾被用于渔业。Fernandes 等^[19]及 Rao^[20]等的研究 表明孔雀石绿能增加啮齿动物癌症发生率,同时能 引起兔子和鱼类的生殖异常。1993年美国明令禁 止其使用于水产养殖业[21],在我国,孔雀石绿于 2002 年被列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清 单》,但仍有不少的水产养殖户因其价格低廉,杀菌 范围广,而违规使用。Ames test 在鼠肝微粒体 S9 存在的情况下,检测孔雀石绿为阳性[22],而在本研究 中,孔雀石绿在无外源代谢系统的情况下诱导报告 系统,检测为基因毒性阳性,意味着酵母细胞中可能 存在催化孔雀石绿代谢活化的酶。同时,真菌雅致 小克银汉霉菌催化孔雀石绿脱甲基生成隐色孔雀石 绿的研究结果也支持本研究的猜测[23]。丙烯酰胺为 生产聚丙烯酰胺的原料,聚丙烯酰胺主要用于水的 净化处理及管道涂层、凝胶电泳等。长时间高温烹 任尤其是油炸使得食物特别是淀粉类食物中丙烯酰 胺含量升高,甚至能达到 150~4 000 μg·mL^{-1[24]},在 本研究中有效诱导 HUG1-yEGFP 生物传感器的最 低剂量为6400 µg·mL⁻¹。对以上几种化合物的基 因毒性阳性检测表明,超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器可以有效地对环境污染有关的基因毒性化 合物进行检测,可以作为其他现有检测系统的补充, 应用于环境化学污染的健康风险评价。

通讯作者简介:戴和平(1955-),女,博士,研究员,主要研究兴 趣是将高通量生物标志物的检测方法应用于环境科学中。

参考文献(References):

- [1] McCann J, Choi E, Yamasaki E, et al. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1975, 72(12): 5135–5139
- [2] Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens [J]. Environmental Research, 2007,105(3): 414–429
- [3] Chen W Q, Zheng R S, Zhang S W, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2014,26(1):48–58
- [4] Phillips D H, Arlt V M. Genotoxicity: Damage to DNA and its consequences[J]. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Springer, 2009: 87–110
- [5] 余建新, 吴采樱. 生物标志物用于污染物的快速检测 及毒性评价[J]. 分析化学, 2002, 30(1): 107-113
- [6] Ames B N, Durston W E, Yamasaki E, et al. Carcinogens are mutagens - Simple test system[J]. Mutation Research, 1973, 21(4): 209-210
- [7] Cailletfauquet P, Michelmaenhaut G, Radman M. Interference between SOS induction, mismatch repair and other repair processes in the determination of spontaneous and radiation-induced mutation-rates [J]. Mutation Research, 1982, 96(1): 124
- [8] Cahill P A, Knight A W, Billinton N, et al. The Green-Screen((R)) genotoxicity assay: A screening validation programme[J]. Mutagenesis, 2004, 19(2): 105–119
- [9] Mewes H, Albermann K, Bähr M, et al. Overview of the yeast genome[J]. Nature, 1997, 387(6632): 7–8
- [10] Wei T, Zhang C, Xu X, et al. Construction and evaluation of two biosensors based on yeast transcriptional response to genotoxic chemicals[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 44: 138–145
- [11] Basrai M A, Velculescu V E, Kinzler K W, et al. NORF5/ HUG1 is a component of the MEC1-mediated checkpoint response to DNA damage and replication arrest in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular Cell Biology, 1999, 19(10): 7041-7049
- [12] Meurisse J, Bacquin A, Richet N, et al. Hug1 is an intrinsically disordered protein that inhibits ribonucleotide re-

ductase activity by directly binding Rnr2 subunit[J]. Nucleic Acids Research,2014, 42(21): 13174-13185

- [13] 刘玉倩,魏婷,张超,等. 超敏感酵母 HUG1-yEGFP 生物传感器遗传毒性化合物检测方法优化[J]. 应用与环境生物学报,20(5):919-924
- [14] Knight A W, Billinton N, Cahill P A, et al. An analysis of results from 305 compounds tested with the yeast RAD54-GFP genotoxicity assay (GreenScreen GC) - including relative predictivity of regulatory tests and rodent carcinogenesis and performance with autofluorescent and coloured compounds[J]. Mutagenesis, 2007, 22(6): 409– 416
- [15] Quillardet P, Huisman O, D' ari R, et al. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(19): 5971–5975
- [16] Lone S, Shah R, Lone A. Mancozeb influence on biochemical profile of adult mice (*Mus musculus*)[J]. American Research Journal, 2014, 1(1): 1–5
- [17] Belpoggi F, Soffritti M, Guarino M, et al. Results of longterm experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, 982(1): 123– 136
- [18] Srivastava A K, Ali W, Singh R, et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes[J]. Life Sciences, 2012, 90(21): 815–824
- [19] Fernandes C, Lalitha V, Rao K. Enhancing effect of malachite green on the development of hepatic pre-neoplastic lesions induced by N-nitrosodiethylamine in rats[J]. Carcinogenesis, 1991, 12(5): 839–845
- [20] Rao K. Inhibition of DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures by malachite green: A new liver tumor promoter[J]. Toxicology Letters, 1995, 81(2): 107–113
- [21] Culp S J, Beland F A. Malachite green: A toxicological review[J]. Journal American College of Toxicology, 1996, 15(3): 219–238
- [22] Cleinmensen S, Jensen J C, Jensen N J, et al. Toxicological studies on malachite green: A triphenylmethane dye [J]. Archives of Toxicology, 1984, 56(1): 43–45
- [23] Cha C-J, Doerge D R, Cerniglia C E. Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans* [J]. Applied Environmental Microbiology, 2001, 67(9): 4358–4360
- [24] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(17): 4998-5006 ◆