

二恶英反应增强子调控的虫荧光素酶报告基因质粒的构建

张志仁* 徐顺清 周宜开 任 恕 吕 斌

(华中科技大学同济医学院环境医学研究所,武汉市 430030)

摘 要 为加强二恶英类化学物质的快速筛选和半定量检测,我们构建了一在二恶英反应增强子调控下的虫荧光素酶报告基因质粒。二恶英反应增强子来源于 pHAV 质粒,MMTV 启动子来源于 pCatM 质粒,上述两者连接后与虫荧光素酶载体连接,转染人 HepG2 肝癌细胞,以 2,3,7,8-四氯代二苯并二恶英(TCDD)诱导报告基因表达后检测虫荧光素酶活性。结果表明该质粒中虫荧光素酶的表达受二恶英反应增强子的调控,且在一定浓度范围内虫荧光素酶的活性与 TCDD 的量呈线性关系。研究显示该质粒转染的细胞株有望用于快速筛选及半定量检测二恶英,可进一步加强研究作为二恶英类化学物质监测的常规方法。

关键词 二恶英类化学物质,虫荧光素酶,报告基因,二恶英反应增强子

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0170-05

二恶英类化学物质是一大类能与芳香烃受体结合,并产生二恶英类毒性损害的化学物质。它们结构相近,与机体作用产生毒性的机理也相近。这类物质主要包括多氯代二苯并二恶英,多氯代二苯并呋喃和多氯联苯中的某些种类。它们毒性作用广泛,且作用剂量低,在环境中广泛存在,并且可以通过生物链富集,对人类健康危害极大^[1~2]。

二恶英类化学物质对机体危害很大,急需加强对它们的日常监测。但目前检测二恶英的金标准—色谱学方法,由于需要高精密的仪器、专门的技术人员和严格的质量控制,全世界仅有少数实验室具备检测能力。并且检测一个样本通常需 1000~2000 美元,耗时数周至 1 个月,不能满足日常监测的需要^[3]。为此建立一种快速样本筛选及半定量检测的方法,满足一般分析的需要势在必行。

二恶英类化学物质毒性作用的机理为,二恶英类化学物质首先与机体细胞内芳香烃受体结合使之激活,转位于核内后与核中的芳香烃受体核转位子蛋白结合,然后结合于特异基因上游的二恶英反应增强子启动机体特异基因的表达如细胞色素 P4501A1 和 1A2 等,产生毒性作用^[4~5]。这也是经典的以 7-乙氧基-异吩恶唑酮-脱乙基酶(EROD)或芳烃羟化酶为标志物的生物学检测方法的原理^[6]。根据二恶英类化学物质的毒性作用机理,我们拟构

建一在二恶英反应增强子调控下的虫荧光素酶报告质粒,该质粒中虫荧光素酶的表达在二恶英反应增强子的调控之下。将该质粒转染含芳香烃受体的人 HepG2 肝癌细胞中,筛选出稳定转染的细胞株,则该细胞中虫荧光素酶的表达受芳香烃受体的调节。二恶英类物质与该细胞株作用,即可剂量依赖性地诱导虫荧光素酶的表达,因此可用该细胞株定性或半定量地检测作用于细胞的二恶英类化学物质。

1 实验方法

1.1 主要仪器

超净工作台(H51300);低温离心机(MIKR022K);恒温水浴摇床(江苏太仓市实验设备厂);二氧化碳培养箱(SHELLAB 2350MP);弱光仪(美国 EG 公司 LB9507 型)。

1.2 主要试剂

Hind III, *Bgl* II, *Bam* HI, *Eco* RV 限制酶(华美公司);*Bgl* II 接头(上海生物工程技术服务有限公司);pGL3-Promoter 载体(Promega 公司);TCDD 标准品(Accustands Inc.)

1.3 质粒构建

1.3.1 二恶英反应增强子的获得:质粒 PHAV(美国哈佛大学医学院 J. P. Whitlock 教授馈赠,结构见图 1)由 *Hind* III 酶切电泳分离,得 2647bp 含二恶英

反应增强子片段。再经 *Bam*HI 酶和 *Eco*RV 酶切, 得 3 个片段大小分别为 180bp, 1836bp 和 630bp, 其中 630bp 片段含二恶英反应增强子为所需。由于 *Bam*HI 酶和 *Bgl* II 酶为同裂酶, 而 *Eco*RV 酶切末端为平端。加入 *Bgl* II 接头, *Bgl* II 消化生成两端均为 *Bgl* II 粘端的 DNA 片段。

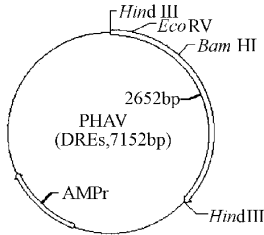


图 1 质粒 PHAV 结构

Fig. 1 Construction of plasmid PHAV

1.3.2 MMTV 启动子获得:质粒 pMcat(美国哈佛大学医学院 J P Whitlock 教授馈赠, 结构见图 2)经 *Hind*III 酶切得一 1306bp 含 MMTV 启动子片段, 再以 *Bgl* II 酶切电泳分离纯化得 390bp 片段为所需, 其 5'端为 *Bgl* II 粘端, 3'端为 *Hind*III 粘端。

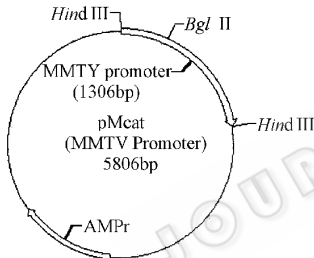


图 2 质粒 PMcat 结构

Fig. 2 Construction of plasmid PMcat

1.3.3 二恶英反应增强子与 MMTV 启动子的连接:在 T4DNA 连接酶作用下, 上述两片段连接成一约 1020bp 片段。从 5'端至 3'端其顺序依次为: 5'端 *Bgl* II 粘端、二恶英反应增强子、MMTV 启动子、3'端 *Hind*III 粘端。由于二恶英反应增强子作用与序列方向无关, 因此连接而成的片段 MMTV 启动子的作用已在二恶英反应增强子的调控之下。

1.3.4 含虫荧光素酶编码序列载体的处理:pGL3-Promoter 载体(结构见图 3)以 *Hind*III 和 *Bgl* II 双酶消化, 得 209bp(该片段含 SV40 启动子)和 4801bp(含虫荧光素酶基因)片段。电泳分离纯化 4801bp 片段。该片段 5'端为 *Hind*III 粘端, 3'端为 *Bgl* II 粘端。

1.3.5 处理载体与目的片段的连接:T4DNA 连接酶于适当条件下将目的片段与处理后的载体连接, 连接后的质粒结构见图 4。重组质粒转入 JM109 大

肠杆菌菌株, 于含氨苄青霉素的 LB 培养基中选择培养。重组质粒酶切鉴定。

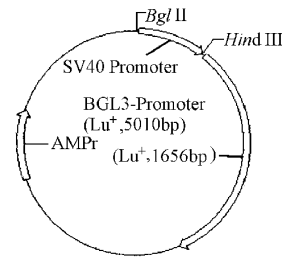


图 3 质粒 BGL3-Promoter 结构

Fig. 3 Construction of BGL3-Promoter

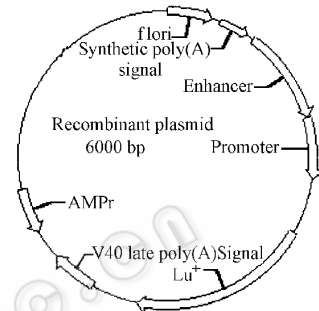


图 4 重组质粒结构

Fig. 4 Construction of recombinant plasmid

1.4 细胞培养及质粒转染

人类肝肿瘤细胞株 HepG2(中国武汉典型培养物保藏中心)于含 10% 热灭活胎牛血清的 1640 培养基(Gibco)中 37°C 5% 二氧化碳浓度下培养。

细胞的短暂转染采用磷酸钙共沉淀法, 以 15 μ g 重组质粒转染 HepG2 细胞。转染细胞于上述条件培养 48h 后, 分别加入二甲基亚砷和溶解于二甲基亚砷的 TCDD(1nmol/L), 继续培养 24h, 检测荧光素酶活性, 方法见下^[7]。

细胞的稳定转染采用重组质粒(15 μ g)和选择性质粒 PTK-Hyg(Clontech 公司)(15 μ g)磷酸钙共沉淀法共转染 HepG2 细胞。转染细胞于上述条件培养 24h, 再转入含 500 μ g/mL 潮霉素选择培养基中培养。每 2 天换一次培养基, 共培育 4 周^[8]。选择生长良好的细胞, 分别加入二甲基亚砷和溶解于二甲基亚砷的 TCDD(1mmol/L), 继续培养 24h, 检测荧光素酶活性(方法见下), 于其中挑选有诱导活性且强发光细胞做进一步的培养及研究。稳定转染细胞株保存于含 10% 二甲基亚砷无抗生素的 1640 培养基中, 置于液氮罐中。

1.5 TCDD 与虫荧光素酶诱导的剂量反应关系^[9~10]

第一天, 接种稳定转染细胞于 6 孔板中, 每孔加

细胞悬液 3mL,细胞悬液密度为 2×10^5 个细胞/mL。

第二天 转染细胞株荧光素酶活性诱导。于含转染细胞孔中加入溶解于 DMSO 的 TCDD 标准系列,并且每孔 DMSO 浓度低于 0.5%。每个浓度制 3 个平行样。对照组加入 DMSO 浓度为 0.5%。

第三天 荧光素酶活性的检测。重组质粒转染细胞组去除培养基后,用 3mL 冷却的磷酸盐缓冲液洗涤细胞 3 次。用清洁橡皮铲收集细胞于 1mL 磷酸盐缓冲液中,保存于 -80°C 。离心去除磷酸盐缓冲液,加入 $500\mu\text{L}$ 荧光素酶裂解缓冲液(Promega 公司)裂解细胞, $13\ 000\text{g}$ 离心 3min,去除细胞残骸,上清于 -80°C 保存或直接用于检测虫萤光素酶活性。虫萤光素酶活性的检测取 $100\mu\text{L}$ 的荧光素酶分析试剂(Promega 公司),加入 $20\mu\text{L}$ 的细胞裂解液,于弱光仪计算 3s 发光值,结果由打印机自动打印。酶活性表示用每 μg 蛋白多少个相对发光单位(RLU)表示,即 $\text{RLU}/\mu\text{g}$ 。蛋白检测用 Bio-Rad 法。同时做荧光素酶发光标准曲线,将荧光素酶溶解于裂解缓冲液中,配成浓度梯度,检测时取 $500\mu\text{L}$ 加入 $100\mu\text{L}$ 的荧光素酶分析试剂,于弱光仪检测发光强度。

1.6 数据的统计分析

每个标准浓度做 3 个平行样,取其平均值。TCDD 与酶活性间的关系采用 Excel 进行回归分析,计算检测下限。检测下限定义为实验空白平均值加上 3 倍标准差。

2 结 果

2.1 重组质粒的鉴定

重组质粒和 pGL3-Promoter 载体共同电泳和 DNA 分子量标准进行比较,结果见图 5。一方面比较重组质粒与 pGL3-Promoter 载体的相对分子量,另一方面鉴定重组质粒的分子量大小。由图 5 可见重组质粒分子量大于 pGL3-Promoter 载体,与 DNA 分子量标准比较大小约为 6000bp。重组质粒以 *Bgl* II 和 *Hind* III 酶切,pGL3-Promoter 载体也以上述两个相同的酶切,共同电泳与 DNA 分子量标准比较,结果见图 6。由图 6 可见两质粒酶切后均分为两条泳带,且其中分子量较大的一条位置相近,分子量小的一条则重组质粒的大于 pGL3-Promoter 载体的,分子量大小分别约为 1400bp 和 200bp。由上述电泳结果可在原处理后载体上连接上了一大小约为 1400bp 的片段,该片段与目的序列大小相近。

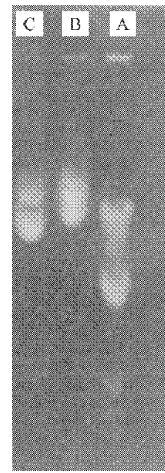


图 5 重组质粒与未重组质粒电泳图谱

Fig. 5 The electrophoresis of recombinant plasmid and vector

- A DNA marker
- B Recombinant plasmid
- C Vector plasmid

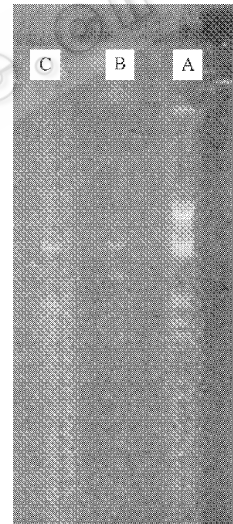


图 6 重组质粒 *Hind* III 和 *Bgl* II 酶切鉴定

Fig. 6 Identification of recombinant plasmid by digestion

- A DNA marker
- B Digestion of recombinant plasmid by *Hind* III and *Bgl* II
- C Digestion of vector plasmid by *Hind* III and *Bgl* II

2.2 短暂转染细胞荧光素酶诱导

短暂转染细胞分别为 DMSO 和 TCDD 诱导荧光素酶活性,验证重组质粒是否受二恶英反应增强子的调控,结果 TCDD 诱导荧光素酶活性为 DMSO 诱导的 80 倍。表明重组质粒荧光素酶的表达受 TCDD 的调控,重组质粒构建成功。

2.3 TCDD 与稳定转染细胞虫萤光素酶活性的剂量反应关系

以 2,3,7,8-TCDD 的标准浓度系列来诱导稳定转染细胞虫萤光素酶活性,以此来确定该细胞株

检测二恶英类化学物质的检测限及线性范围。其结果见图 7。同时做荧光素酶标准反应曲线,以明确发光强度与荧光素酶间的关系,结果见图 8。

由图 7 可见该细胞株具有较宽的线性范围,可从数个 1pmol/L 到 100pmol/L;在该范围内线性关系较好,其 r 值为 0.95;检测下限在本实验中为 1.1pmol/L。由图 8 可见在固定 ATP 及荧光素浓度的条件下,荧光素酶浓度与发光强度间有良好的对数线性关系,因此可通过检测发光强度来反应 TCDD 的浓度。由以上结果可知,虫荧光素酶报告质粒稳定转染的细胞株,可用于二恶英类化学物质的检测,在线性范围内可定量,超过线性浓度则可用于定性。

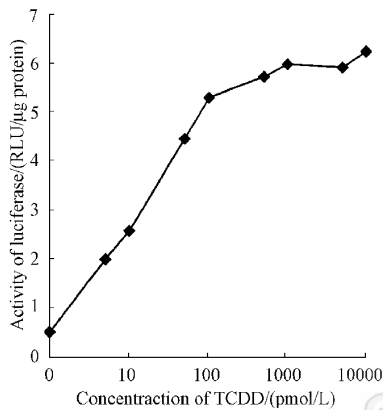


图 7 TCDD 诱导稳定转染细胞荧光素酶活性的剂量-效应图

Fig. 7 Dose-response curve for TCDD-induction luciferase activity in stable transfectional cell

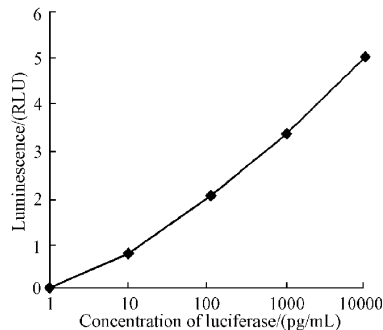


图 8 荧光素酶浓度与发光强度关系

Fig. 8 The relationship between the concentration of luciferase and luminescence

3 结 论

通过本实验我们成功构建了可用于二恶英类化学物质检测的虫荧光素酶报告质粒,该质粒的表达受二恶英增强子的调控。以该质粒稳定转染的细胞株用于检测,检测下限可达 1.1pM,线性范围宽可

从 1pM 到 100pM。并且该法较之于色谱法操作简单、费时少,不需精密的仪器,检测样品花费少。因此如用于大量样本的快速筛选,可节省人力、物力及财力。

与经典的以 7-乙氧基-异吩恶唑酮-脱乙酰基酶 (EROD) 或芳烃羟化酶为标志物的生物学检测方法比较,由于虫荧光素酶基因为原核基因,在真核细胞中没有背景表达,检测限可更底,并且虫荧光素酶不受表达后的调控,线性关系更好,因此虫荧光素酶报告质粒更适合于检测二恶英类物质。另外由于该质粒为人工构建,可进一步通过基因工程的方法,改良质粒,提高其发光效率,提高该方法的灵敏度。进一步的实验,可从使用该法检测实际样本,标准化操作程序,改善质粒的发光特性着手,使该法成为检测二恶英类物质的常规方法。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Tanabe S, Iwata H, Tatsukawa R. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on mammals. *Sci Total Environ*. 1994, **154**: 163-177
- [2] Poland A, Knutson. J C 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1982, **22**: 517-554
- [3] Karasek F W, Onuska F I. Trace analysis of the dioxins. *Analytical Chemistry*. 1982 **54** (2) 309-324
- [4] Donald E Tlitt, John P Glesy. Characterization of the H4IIE cell bioassay as a tool for assessing toxoc potency of planar halogenated hydrocarbons in environmental samples. *Environ. Sci. Technol.* 1991 **25** (1) 87-92
- [5] Denison M S, Whitlock J P Jr. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes (minireview). *J Biol Chem*, 1995, **270**: 18175-18178
- [6] Whitlock J P Jr. Genetical and molecular aspects of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, **30**: 251-277
- [7] Helfrich W G, Denison M S. Photooxidized products of tryptophan can act as dioxin agonists. *Mol Pharmacol*. 1991 **40**: 674-678
- [8] Kawai S, Nishizawa M. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol Cel Biol*. 1984 **4**: 1172-1174
- [9] Bradford M D. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 **72**: 248-254
- [10] Arts J M M J G, Denison M S, De Haan *et al.* Ah receptor-mediated luciferase expression: a tool for monitoring dioxin-like toxicity. Dioxin '93 12th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds. Vienna, September. Organohalogen

Construction of Luciferase Reporter Plasmid Which is Under the Control of Dioxin-responsive Enhancers

ZHANG Zhi-Ren XU Shun-Qing ZHOU Yi-Kai REN Shu LÜ Bin

(*Institute of Environmental Monitoring ,Department of Environmental Medicine ,Tongji Medical University ,Wuhan 430030 ,China*)

Abstract To improve the bio-detection of dioxin-type chemicals ,we constructed a plasmid containing reporter under the control of dioxin-responsive enhancer. After connected the enhancer from the plasmid pHAV with the MMTV promoter of the plasmid pCatM ,the connected segment was linked with the luciferase vector. Then the recombinant plasmid was transfected to the HepG2 human hepatoma cell line ,and the luciferase activity was induced by 2 ,3 ,7 ,8-TCDD. The result suggested that expression of the recombinant luciferase was controlled by the dioxin-responsive enhancer ,and there were a linear relationship between the activity of luciferase and certain range of 2 ,3 ,7 ,8-TCDD concentration. It is promising that the transfected cell line could be used for rapid screen and semi quantitation of dioxin-type chemicals ,and a standard and routine method for the detection of dioxin-type chemicals by this recombinant plasmid is being under way.

Key words dioxin-type chemicals , luciferase , reporter gene , dioxin-responsive enhancer

Received October 8 2000

This work was supported by the grant from National Natural Science Foundation of China(29877020).

* Corresponding author. Tel 86-27-83692726 ; Fax 86-27-83692708 ; E-mail zhangzhi-ren@yahoo.com

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>