



酵母双杂交技术构建重组维甲酸 X 受体(RXR)基因酵母

李剑, 饶凯锋, 马梅*, 王子健

中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京 100085

* 联系人, E-mail: mamei@rcees.ac.cn

2008-01-02 收稿, 2008-07-15 接受

国家自然科学基金重点基金(批准号: 20337020)、中国科学院知识创新工程方向项目(批准号: KZCX3-SW-431)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2007AA06Z414)资助

摘要 应用酵母双杂交技术构建重组维甲酸 X 受体(RXR)基因酵母, 用以筛选具有类/抗维甲酸活性的化合物. 构建含有 RXR 基因的酵母表达质粒 pGBT9-RXR β , 称为诱饵质粒; 构建含有 RXR 协同激活因子 GRIP1 基因的酵母表达质粒, 形成靶质粒 pGAD424-GRIP1; 诱饵质粒和靶质粒同时转染酵母细胞 Y187, 于营养缺陷型培养基(SD/-Trp/-Leu)上筛选阳性菌落, 构建 RXR β -GRIP1 双杂交酵母. 考察 RXR β -GRIP1 酵母与典型的 RXR 配体化合物天然激素-9-顺维甲酸的结合情况. 结果表明, 9-顺维甲酸能够诱导 RXR β -GRIP1 酵母酶活性, 并存在显著的剂量-效应关系, EC_{50} 值为 $1.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 构建的 RXR β -GRIP1 酵母与报道的 RXR β -TIF2 酵母相比, 对 9-顺维甲酸的 EC_{50} 值接近, 但诱导活性较高. 进一步建立了检测环境污染物诱导/抑制 RXR β -GRIP1 酵母 β -半乳糖苷酶活性的实验方法, 用于检测三丁基锡乙酸盐化合物、Aroclor1254 以及水厂进水和出水样品. 证明三丁基锡乙酸盐能够较强地诱导 RXR β -GRIP1 酵母酶活性; 而 Aroclor1254 能够显著抑制 9-顺维甲酸诱导的 RXR 酶活性, 是 RXR 拮抗剂; 水厂进水样品能够抑制 9-顺维甲酸诱导的酶活性, 而现行工艺对 RXR 拮抗剂有很好的去除效果. 证实了该重组基因酵母用于环境污染物类/抗维甲酸干扰效应的筛选可行性.

关键词

酵母双杂交
维甲酸受体
重组基因酵母
类/抗维甲酸活性

维甲酸(retinoic acid, RA)也称为视黄酸, 是天然或人工合成的维生素 A 衍生物, 体内存在的维甲酸包括有全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid)和 9-顺维甲酸(9-cis-retinoic acid)等, 该类化合物具有重要生理活性, 特别是对动物的胚胎发育、器官形成、生殖等具有重要作用^[1]. 虽然很早就已经发现持久性有毒有机污染物(POPs)的暴露与生物体内维甲酸平衡的破坏相关, 但是具体影响这一系统的污染物种类及其作用机理并不清楚^[2]. 近年来的文献报道, 不少化合物通过模拟或抑制生物体内天然维甲酸, 从而对机体产生作用. 如 Nishikawa 等^[3]报道三苯基锡(TPT)和三丁基锡(TBT)通过模拟 9-顺维甲酸对雌性骨螺(*Thais clavigera*)产生性畸变作用. 因此, 维甲酸干扰化合物已成为继环境雌激素之后一类重要的内分泌干扰物, 已经有文献报道了相应的快速检测方法^[4].

维甲酸的生理学活性是通过细胞内相关的受体介导的, 人体内与维甲酸相关的受体有维甲酸受体(RAR)和维甲酸 X 受体(RXR). 全反式维甲酸专一性地与 RAR 受体结合, 9-顺维甲酸能与 RAR 以及 RXR 两种受体结合. 20 世纪 90 年代对 RXR 作用机理的研究发现了一系列 RXR 的协同激活因子^[4,5], 它们并不直接和 DNA 结合, 而是通过与受体的相互作用促进基因转录. 受体作用理论认为, 维甲酸与受体结合后形成复合物并发生构象的改变, 进一步结合协同激活因子, 从而促进转录. 为考察化合物或环境污染物对 RXR 的干扰效应, 采用酵母双杂交技术将 RXR 基因和受体协同激活因子基因共转化进入酵母细胞中, 构建双杂交 RXR 酵母. 当环境维甲酸干扰物存在时, 该类化合物首先与 RXR 结合形成复合物, 该复合物进而结合受体协同激活因子蛋白, 启动报告基因表

达,通过测定报道基因 $LacZ$ 表达产物 β -半乳糖苷酶活性,表征化合物对RXR诱导活性。 β -半乳糖苷酶活性同时受到酵母载体中 $LacZ$ 基因拷贝数的影响,本研究采用含有双拷贝数 $LacZ$ 基因的Y187 酵母菌株,区别于文献报道^[3]采用Y190 酵母菌株的方法,提高方法灵敏度,更有利于环境样品中低剂量内分泌干扰物的检测。本研究报道检测内分泌干扰物的RXR拮抗效应:同时添加一定浓度的RXR天然激素-9-顺维甲酸和干扰化合物,测定添加干扰物后 β -半乳糖苷酶活性的降低,表征化合物对维甲酸活性的抑制作用。因此,基于新的受体作用理论建立的双杂交酵母系统能够实现对于干扰化合物和环境污染物类/抗RXR活性的快速筛选。由于双杂交酵母体系考虑了协同激活因子与受体的相互作用而更加接近哺乳动物内分泌系统的真实作用情况。核受体协同激活因子GRIP1 是目前研究得比较多的协同激活因子,生物体内测试(*in vivo*)研究也表明GRIP1 能够参与RXR介导的基因表达^[6]。因此,本研究构建了RXR-GRIP1 双杂交酵母系统,采用该系统对三丁基锡化合物、多氯联苯(PCB)和水厂进水、出水样品的RXR干扰效应进行了测试,同时证实了该酵母用于化学品和环境污染物类/抗维甲酸干扰效应筛选的可行性。

1 实验

() 主要材料和试剂。pGBT9-RXR β 诱饵质粒,编码小鼠RXR β 蛋白,由日本大阪大学Nishikawa教授惠赠^[3]。RXR β -TIF2 酵母由北京大学胡建英教授惠赠。pGAD424-GRIP1 靶质粒,含有全长的GRIP1 序列,由美国加州大学Stallcup教授惠赠^[4]。感受态大肠杆菌DH5 α ,质粒小提试剂盒,X-gal溶液,1kb DNA marker, DNA marker , 氨苄青霉素均购自Tiangen生物试剂公司。Y187 酵母菌株(MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1- 901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met-, gal80 Δ , URA3:: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ)、pCL1 质粒、pGBKT7-53 质粒、pGADT7-T质粒、pGADT7-Lam质粒、pGBKT7-Lam标准质粒、酵母YPDA培养基、SD/-Trp/-Leu培养基、TE溶液、1 $\times$ TE/1 $\times$ LiAc溶液、PEG/LiAc溶液均购自ClonTech公司。二甲基亚砜(DMSO)、半硫酸腺苷购于Sigma公司。PCB 混标Aroclor1254 购于AccuStandard公司。三丁基锡乙酸盐购于Sigma-Aldrich公司。DNA序列测定由北京诺赛基因组研究中心完成。

() 诱饵质粒和靶质粒的提取纯化与鉴定。10 μ L 诱饵质粒或靶质粒转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆,同时进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆,提取质粒并纯化。0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定,同时进行序列测定,测序引物为pGBT9 或 pGAD424 通用引物。

() 酵母双杂交实验。挑取新鲜培养的酵母Y187 菌株单菌落,在500 mL 的YPDA 培养基中30 振荡培养到对数生长期后(600 nm 处的吸光度值为0.4~0.6),1000 $\times g$ 离心5 min 沉淀细胞,悬浮于无菌的TE 溶液中,重复离心操作,将酵母细胞沉淀溶于2.5 mL 新鲜配制的无菌的1 $\times$ TE/1 $\times$ LiAc 溶液中。将pGBT9-RXR β 质粒和 pGAD424-GRIP1 质粒同时转染至酵母细胞 Y187,构建 RXR-GRIP1 双杂交酵母,反应体系为:0.1 mg 载体 DNA,0.1 μ g pGBT9-RXR β 质粒,0.1 μ g pGAD424- GRIP1 质粒,0.1 mL 的酵母细胞悬液,0.6 mL 无菌的 PEG/LiAc 溶液。200 r $\cdot$ min⁻¹,30 下孵育30 min,加入70 μ L DMSO,42 水浴热激15 min,冰浴静置1~2 min,14000 r $\cdot$ min⁻¹室温下细胞离心5 s,0.5 mL 无菌 TE 缓冲液重悬细胞。涂布在SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型的选择性固体培养基上30 培养2~4 d。

() 菌落转移滤膜分析。能够在选择性培养基上生长的克隆,采用菌落转移滤膜分析的方法进一步剔除假阳性结果。具体操作如下:灭菌的干燥滤膜1#(Whatman, 美国)覆盖生长有双杂交酵母菌落(直径大于2 mm)的平板上,将菌落转移到滤膜,液氮反复冻融;另取滤膜2#浸没到含X-gal 和9-顺维甲酸(浓度为5 $\times 10^{-6}$ mol $\cdot$ L⁻¹)的缓冲溶液中润湿,将含有菌落的滤膜1#覆盖到润湿的滤膜2#上,30 孵育直到克隆出现明显的蓝色,并对显色的克隆计数,计算转化率。选择具有蓝色的阳性克隆到SD/-Trp/-Leu 选择性培养基上继续培养至菌落直径大于2 mm,挑取菌落接种于SD/-Trp/-Leu 液体培养基中,30 ,200 r $\cdot$ min⁻¹振荡培养过夜。第2天部分细胞添加15%的无菌甘油后-80 冷冻保存,另一部分与配体结合后检测 β -半乳糖苷酶的活性。

$$\text{转化率(菌落数} \cdot \mu\text{g}^{-1}) = \frac{\text{克隆数(菌落数)} \times \text{总重悬体积}(\mu\text{L})}{\text{涂布体积}(\mu\text{L}) \times \text{稀释因子} \times \text{质粒DNA使用量}(\mu\text{g})}$$

() 构建双杂交酵母质量控制。为了对双质粒

同时转染酵母细胞的流程进行控制,并对合成的质粒进行鉴定,实验设计考察了质粒转染酵母细胞的效率并进行了平行的质控实验.阳性对照实验设置两组:第一组,采用 pCL1 标准质粒(编码野生型的 GAL4蛋白,能够诱导 β -半乳糖苷酶活性)转染酵母细胞,并计算转化效率.第二组采用同时转染 pGBKT7-53 标准质粒(编码 GAL4DNA-BD 蛋白)和 pGADT7-T 标准质粒(编码 GAL4DNA-AD 蛋白),计算转化效率;阴性对照采用 pGADT7-Lam 标准质粒(编码 GAL4DNA-AD 和人体 lamin C 杂合蛋白)和 pGBT9-hRXR β 质粒同时转染酵母细胞,计算转化率; pGBKT7-Lam 标准质粒(编码 GAL4DNA-BD 和人体 lamin C 杂合蛋白)和 pGAD424-GRIP1 质粒同时转染酵母细胞,计算转化率.

() 水样的采集及前处理. 于2007年1月对北京某水厂进水和出水进行采集.所采集的40 L水样运回实验室后参照本实验室已报道的方法^[7]对样品进行前处理、HLB柱富集、有机溶剂洗脱,总提取物经高纯氮气吹干后加入0.5 mL DMSO溶解形成粗体物的原液,将原液样品按1:1添加DMSO稀释,形成1/2原液样品;将1/2原液样品按1:1添加DMSO稀释,形成1/4原液样品;-20℃保存用于生物测试.

() β -半乳糖苷酶活性的检测. β -半乳糖苷酶活性的检测方法参照本实验室已经报道的方法^[8]. β -半乳糖苷酶相对酶活性的计算公式如下:

$$Y = (A_{420} - A_B) / t \cdot V \cdot D \cdot A_{595},$$

式中, Y 为 β -半乳糖苷酶活性(U); t 为反应时间(min); V 为测试体积(mL); D 为稀释因子; A_B 为空白对照在420 nm 处的光吸收值.

相对百分诱导活性的计算公式为: 相对百分诱导活性(%) = $Y/Y_{\max} \times 100\%$, 其中 Y 为测试化合物诱导的 β -半乳糖苷酶活性; $Y_{\max}$ 为9-顺维甲酸在最大诱导浓度($5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导的 β -半乳糖苷酶活性.

() 数据处理. 每组实验均设计3组平行实验,实验数据表示为平均值 $\pm$ 标准差,处理采用 Origin 5.0 统计分析软件,并进行 t 检验和绘图.

2 讨论和结论

2.1 诱饵质粒和靶质粒的提取纯化与鉴定

10 μL 诱饵质粒或靶质粒的 DNA 纯化产物, 分别进行0.8%琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, pGBT9-RXR β

质粒和 pGAD424-GRIP1 质粒的电泳图谱均出现单一条带(图1). 对质粒的测序结果通过 GenBank BLAST 相似性分析证实上述质粒插入基因片段, 插入方向及阅读框正确(数据未列出).

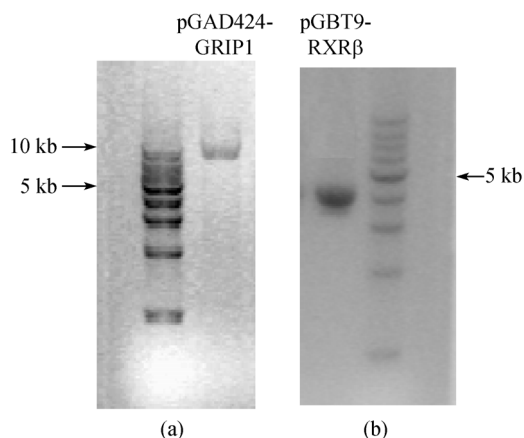


图1 靶质粒 pGAD424-GRIP1(a)和诱饵质粒 pGBT9-RXR β (b)的电泳鉴定

2.2 酵母双杂交实验

pGBT9-RXR β 质粒分别和 pGAD424-GRIP1 质粒同时转化感受态酵母细胞 Y187, 重悬细胞, 将转化后的酵母细胞分别涂布到5块含有 SD/-Trp/-Leu 固体培养基的平板上, 计算质粒的平均转化率如表1所示. 结果表明, 双杂交酵母 RXR β -GRIP1 以及阳性对照样品的转化率较高, 均大于 $4.5 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \mu\text{g}^{-1}$; 阴性对照样品转化率为0, 即选择性培养基上无克隆生长; 阳性对照和阴性对照样品间存在显著性差异($P < 0.01$)表明整个转化过程得到较好的控制.

2.3 双杂交酵母 RXR β -GRIP1 检测9-顺维甲酸的剂量-效应曲线

9-顺维甲酸是作用于RXR的天然激素, 为了检测9-顺维甲酸与双杂交酵母之间的相互作用, 并建立9-顺维甲酸诱导双杂交酵母的剂量-效应关系, 将RXR β -GRIP1 双杂交酵母细胞暴露到不同浓度的9-顺维甲酸溶液中, 检测诱导产生的酶活性. 同时为了比较本实验室合成的RXR β -GRIP1 酵母与文献报道的RXR β -TIF2酵母灵敏度的差异, 将RXR β -TIF2暴露到相同浓度梯度的9-顺维甲酸溶液中, 检测诱导产生的酶活性. 结果如图2所示, 表明9-顺维甲酸对RXR β -GRIP1 双杂交酵母酶活性存在显著的诱导, 并且在检测浓度范围内存在明显的剂量-效应关系. 剂

表 1 质粒转化酵母细胞 Y187 的转化率

双杂交酵母	维甲酸 X 受体(RXR)	阳性对照		阴性对照	
	酵母 RXR β +GRIP1	pCL1	pGBKT7-53+pGADT7-T	pGADT7-Lam+ pGBT9-RXR β	pGBKT7-Lam+ pGAD424-GRIP1
转化率/ 10^4 菌落数 $\cdot\mu\text{g}^{-1}$	4.8 $\pm$ 0.3	5.0 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

量-效应曲线表明, 9-顺维甲酸诱导的最大效应浓度为 $5\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; EC_{50} 值为 $1.5\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 对于 RXR β -TIF2 酵母 9-顺维甲酸的最大效应浓度为: $5\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; EC_{50} 值约为 $1.0\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 比较 RXR β -GRIP1 酵母的 EC_{50} 值与实验测得以及文献报道^[3]的 9-顺维甲酸在重组酵母系统 RXR β -TIF2 中 EC_{50} 相当, 但是高浓度下($>1.0\times 10^{-7}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) RXR β -GRIP1 酵母诱导的酶活性值明显高于RXR β -TIF2 酵母($P<0.05$). 图 2 表明, RXR β -GRIP1 酵母诱导的最大酶活性值约是RXR β -TIF2 酵母诱导的最大酶活性值的 3.4 倍, 证明本实验合成的双杂交酵母对于 9-顺维甲酸具有较高的诱导活性, 高于文献报道的值^[3], 表明采用全长的GRIP1 序列替代TIF2 序列, 同时采用含有双拷贝数LacZ基因的Y187 酵母菌株能够有效地提高方法的响应酶活性值.

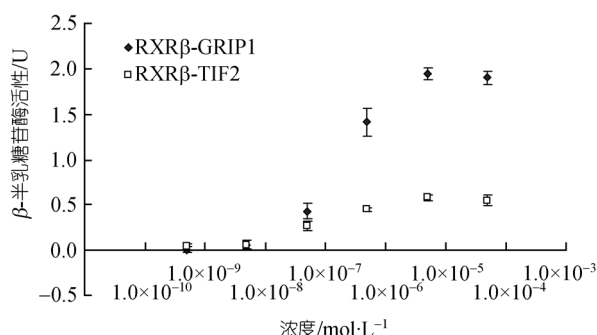


图 2 9-顺维甲酸对双杂交酵母 RXR β -GRIP1 和 RXR β -TIF2 酶活性诱导的剂量-效应关系曲线

2.4 三丁基锡乙酸盐对双杂交酵母 RXR β -GRIP1 诱导酶活性的检测

2004 年Nishikawa等^[3]报道了三苯基锡和三丁基锡对骨螺RXR的干扰作用. 三丁基锡乙酸盐作为三丁基锡的衍生物, 也很可能通过作用于RXR而对生物体的内分泌系统产生干扰. 因此, 本实验考察了三丁基锡乙酸盐对双杂交酵母酶活性的诱导作用. 将酵母细胞暴露到 $1\times 10^{-9}\sim 1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围的

三丁基锡乙酸盐中, 暴露完成后添加酶反应的底物, 检测 β -半乳糖苷酶活性, 用以表征三丁基锡乙酸盐对RXR的作用. 结果如图 3 所示, 在测定浓度范围内, 三丁基锡乙酸盐对酶活性存在明显诱导, 浓度大于 $1\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的三丁基锡乙酸盐与空白(DMSO)相比存在显著性差异($P<0.01$).

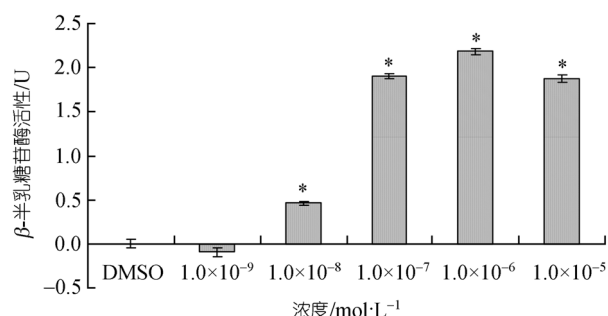


图 3 三丁基锡乙酸盐对双杂交酵母 RXR β -GRIP1 酶活性诱导检测

DMSO 为空白对照; *, 与空白相比存在显著性差异($P<0.01$)

如图 3 所示, 三丁基锡乙酸盐诱导双杂交酵母产生的最大酶活性值与天然激素 9-顺维甲酸诱导产生的最大酶活性值相当, 最大效应浓度约为 $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; EC_{50} 值约为 $2.6\times 10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与 9-顺维甲酸的结果相比, 可以得出三丁基锡乙酸盐对于RXR具有比 9-顺维甲酸更强的诱导活性. Nishikawa等^[3]检验三丁基锡对RXR的诱导活性时也报道了类似的实验结果. 江桂斌等^[9]对我国部分内陆水域TBT的水污染进行了研究, 结果表明上海黄浦江水样中三丁基锡浓度达 $425.3\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. 鉴于TBT具有较强的生物富集作用, 结合本测试的研究结果, 表明三丁基锡类化合物可能对生态系统产生不良影响, 需要对其进行快速的生物监测. 综上所述, 三丁基锡的衍生物三丁基锡乙酸盐对RXR具有较强的诱导活性; 双杂交酵母RXR β -GRIP1 能够作为一种快速的生物测试方法, 筛选出具有RXR诱导活性的化合物.

2.5 多氯联苯混合物(Aroclor1254)对双杂交酵母RXR β -GRIP1 诱导/抑制酶活性的检测

Ellen研究组^[10]报道了PCB118 具有与维甲酸竞争性结合RXR的活性. 因此, 本试验假设PCB类化合物能够干扰RXR介导的基因转录途径, 设计考察PCB混合物-Aroclor 1254 对RXR的干扰作用, 包括检测Aroclor1254 暴露后对双杂交酵母RXR β -GRIP1 酶活性的诱导作用, 以及同时暴露Aroclor1254 和 9-顺维甲酸($5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)后对RXR β -GRIP1 酵母诱导酶活性的抑制作用. Aroclor1254 选择的暴露浓度范围设定为 $5 \times 10^{-9} \sim 5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 测试结果表明为样品诱导酶活性与 9-顺维甲酸($5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)诱导酶活性的比值, 即相对诱导活性.

实验结果显示(如图 4), 在测试浓度范围内 Aroclor1254 对RXR β -GRIP1 酵母酶活性不存在明显的诱导, 与空白对照(DMSO)相比不存在显著性差异($P > 0.05$); 表明在测试浓度范围内 Aroclor1254 不易激活RXR信号途径, 诱导下游基因表达. $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 9-顺维甲酸的最大诱导浓度, 因此与待测化合物混合暴露, 检测Aroclor1254 对 9-顺维甲酸诱导的酶活性的抑制作用. 如图 4, 结果显示 Aroclor1254 大于 $5 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时能够显著抑制 9-顺维甲酸诱导的酶活性, $5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下 Aroclor1254 的抑制活性达到最大, 相对诱导活性下降了 42.5%, 由于在测试浓度范围内 Aroclor1254 的抑制率均低于 50%, 所以 IC_{50} 值(半数抑制浓度)未能计算得出. 为了排除化合物细胞毒性的影响, 同时考察了Aroclor1254 对酵母细胞生长的影响, 结果表明, 即使在最高浓度($5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)下, Aroclor1254 对RXR β -GRIP1 酵母的生长均不存在影响(数据未列出), 表明在实验测试浓度下, Aroclor1254 对酵母细胞不存在急性毒效应. 综合 Aroclor1254 对RXR的作用表明, Aroclor1254 表现出对RXR介导基因表达的抑制作用, 同时, 在测试浓度范围内不存在诱导作用, 因此, RXR信号途径为解释PCB类化合物干扰生物体维甲酸系统提供了一种可能的毒理学作用机制. PCB类化合物由于其亲脂性的特征, 易于在沉积物中蓄积, 对全球近海沉积物中PCB总量的调查发现为 $0.2 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[11], 可见 PCB类化合物可能干扰底栖生物的RXR信号途径.

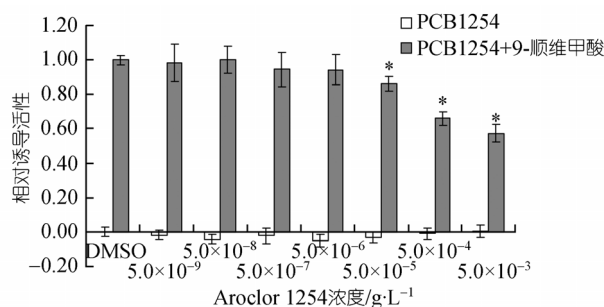


图4 多氯联苯混合物(Aroclor1254)对双杂交酵母RXR β -GRIP1 诱导/抑制酶活性的检测

9-顺维甲酸添加的浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; DMSO 为空白对照; *, 与空白相比存在显著性差异($P < 0.01$)

2.6 水厂出水对双杂交酵母RXR β -GRIP1 诱导/抑制酶活性的检测

本实验对我国水厂现行处理工艺去除RXR激动剂/抑制剂的效率进行了研究, 图 5 列出了进水和出水样品对双杂交酵母RXR β -GRIP1 诱导/抑制活性的测试结果. 从图中可以看出, 进水和出水样品均未检测出诱导活性; 进水原液样品+9-顺维甲酸与 9-顺维甲酸单独诱导相比, 相对诱导活性被抑制了 19.3%, 该抑制活性随着样品的稀释而降低, 具有一定的剂量-效应关系, 表明该水厂的进水样品含有RXR拮抗剂; 出水样品未表现出对 9-顺维甲酸诱导酶活性的抑制效应, 证明该水厂现行处理工艺对RXR拮抗剂有较好的去除; 通过酵母细胞生长实验, 排除了样品对酵母细胞生长的影响(数据未列出); 从目前的测试结果来看, 供水安全得到了较好的保障. 因此, 结合适当的样品前处理过程, 双杂交酵母RXR β -GRIP1 能用于环境样品RXR诱导/抑制活性的检测.

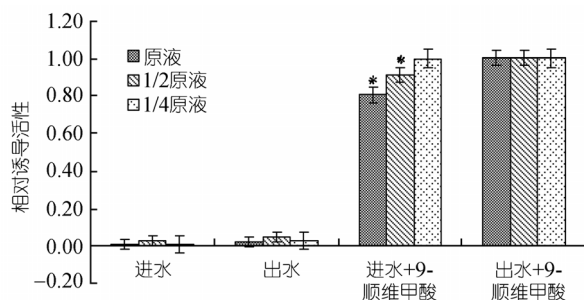


图5 北方某水厂进水、出水样品对双杂交酵母RXR β -GRIP1 诱导/抑制酶活性的检测

9-顺维甲酸添加的浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; *表示存在显著性差异($P < 0.01$)

参考文献

- 1 Ross S A, McCaffery P J, Drager U C, et al. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev*, 2000, 80: 1021—1054
- 2 Spear P A, Bilodeau A, Branchaud A. Retinoids: From metabolism to environmental monitoring. *Chemosphere*, 1992, 25: 1733—1738[DOI]
- 3 Nishikawa J I, Mamiya S, Kanayama T, et al. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 6271—6276[DOI]
- 4 Hong H, Kohlit K, Trivedit A, et al. GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 4948—4952[DOI]
- 5 Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 1995, 83: 835—839[DOI]
- 6 Walfish P G, Yoganathan T, Yang Y F, et al. Yeast hormone response element assays detect and characterize GRIP1 coactivator-dependent activation of transcription by thyroid and retinoid nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 3697—3702[DOI]
- 7 崔青, 李剑, 饶凯锋, 等. 用生物测试评价臭氧-活性炭净水工艺. *高技术通讯*, 2006, 16(10): 1073—1076
- 8 李剑, 崔青, 马梅, 等. 应用重组孕激素受体基因酵母测定饮用水中内分泌干扰物的方法. *环境科学*, 2006, 27(12): 2463—2466
- 9 江桂斌, 刘稷, 周群芳, 等. 我国部分内陆水域有机锡污染现状初探. *环境科学学报*, 2000, 20(5): 636—638
- 10 Fritsche E, Cline J E, Nguyen N H, et al. Polychlorinated biphenyls disturb differentiation of normal human neural progenitor cells: Clue for involvement of thyroid hormone receptors. *Environ Health Perspect*, 2005, 113: 871—876
- 11 Fowler S W. Critical review of selected heavy metal and chlorinated hydrocarbon concentrations in the marine environment. *Mar Environ Res*, 1990, 29(1): 1—64[DOI]