

陈 剑,达剑森,盛雅惠,等. 重组雌激素受体基因酵母细胞检测牛尿液中  $\beta$ -雌二醇残留的方法[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):166-167.

# 重组雌激素受体基因酵母细胞检测 牛尿液中 $\beta$ -雌二醇残留的方法

陈 剑<sup>1</sup>, 达剑森<sup>2</sup>, 盛雅惠<sup>3</sup>, 康佳佩<sup>3</sup>, 李湘鸣<sup>4</sup>

(1. 江苏省淮安生物工程高等职业学校, 江苏淮安 223200; 2. 扬州市邗江区畜牧兽医站, 江苏扬州 225000;

3. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225000; 4. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225000)

**摘要:**为探索畜禽产品中雌激素残留的检验方法,加强对畜禽生产过程中激素添加的监控,本研究选择了在我国几种常见影响比较大的合成雌激素- $\beta$ -雌二醇(E2)为研究对象,建立用于测定动物尿液中雌激素的重组基因酵母检测法。结果表明本方法简单、有效,能够作为雌激素残留检测体系的有益补充。

**关键词:**畜禽产品;重组雌激素受体基因酵母细胞;牛尿液;雌激素; $\beta$ -雌二醇;残留检测

**中图分类号:** S852.23      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0166-02

生产中广泛应用的雌激素,可以通过食物链富集作用于人体,导致生殖障碍、出生缺陷、发育异常、代谢紊乱以及某些癌症的发生<sup>[1]</sup>。世界很多国家计划或已经制定了一些法律法规限制此外类物质的使用,譬如除己烯雌酚等人工合成类雌激素化合物于 1980 年华沙国际学术讨论会和同年的联合国粮农组织与世界卫生组织联席会议决定全面禁用<sup>[2]</sup>。就目前而言,对于环境雌激素的研究还处于起步阶段,很多问题有待进一步揭示。随着重组 DNA 技术、基因表达及酵母分子遗传学研究的进展,越来越多的外源基因在酵母细胞中获得高效表达,因此,酵母作为一个基因工程表达系统受到广泛应用<sup>[3]</sup>。通过本研究希望能够为我国建立快速检测牛牛生产中添加雌激素情况的监测提供新技术支持、构建我国畜禽安全生产的预警体系。

## 1 测定原理

将人类雌激素受体基因(hER cDNA)转化于酵母,使其高效表达,再将雌激素反应原件(ERE)与编码 $\beta$ -半乳糖苷酶的 LacZ 报告基因相串联,重组于酵母细胞。当牛尿中的雌激素活性物质与酵母中的 hER 结合后,会通过生物变构效应,经雌激素效应元件(ERE)顺式激活 Lac Z ( $\beta$ -半乳糖苷酶)基因表达,从而使 Lac Z 的表达量增加。通过测定 Lac Z 的活性就可以定量反映牛尿中雌激素的含量。

## 2 试验材料

### 2.1 试验样品采集

小牛尿液:从扬州大学实验农牧场采集出生 10 日龄的小牛尿液 12 份,依次编号分别为 112、113、116、117、119、120、

121、122、123、124、125、128。

### 2.2 试验材料

C<sub>18</sub>柱(美国 Welch 公司);甲醇(上海振兴化工一厂,分析纯);丙酮、无水乙醇、浓盐酸氢氧化钠、二氯甲烷(上海焱晨化工实业有限公司,均为分析纯);琼脂粉(中国医药集团上海化学试剂公司);酵母基本合成培养基(SD)及无色氨酸、尿嘧啶(-Trp、-Ura)营养补料原料(美国 Clontech 公司); $\beta$ -雌二醇(扬州大学医学院李湘鸣教授提供)。

## 3 试验过程

### 3.1 重组雌激素受体基因细胞酵母培养

3.1.1 培养板制作 按照配方配制选择性固体培养平板 SD/-trp、-ura(无色氨酸、尿嘧啶),经 121℃ 灭菌 20 min,取约 15 mL 倒入消毒培养皿中,冷凝后用保鲜膜密封,4℃ 保存备用。

3.1.2 重组雌激素受体基因酵母细胞(W303-1A/hER-ERE-LacZ)接种 在无菌操作台内将 W303-1A/hER-ERE-LacZ 划线接种于 SD/-trp、-ura 平板,置于 30℃ 培养箱内培养 3~4 d,使其长出 3~4 mm 的酵母克隆,保鲜膜密封,4℃ 冰箱保存。

3.1.3 扩增酵母克隆 取消毒玻璃瓶 1 只,加入 3 mL SD/-trp、-ura 培养液,用接种环从 SD/-trp、-ura 培养板挑取酵母克隆置于 3 mL SD/-trp、-ura 培养液中,在 30℃ 恒温振荡器中培养过夜(约 14 h)。

### 3.2 样品预处理

用定性滤纸和漏斗将原尿过滤至干净消毒玻璃瓶中。为减少误差,用具塞试管分装过滤牛尿至消毒玻璃瓶中,每样 2 份,一份取 5 mL 做加样试验,另一份取 5 mL 做空白对照。

### 3.3 试剂配制

(1) 8 mol/L NaOH(分子量 40):称取 NaOH 32 g,用 100 mL 双蒸水充分溶解。(2) 0.1 mg/mL 溶菌酶的 ONPG:取 40 mg ONPG 粉末,加入 10 mL 的 Z Buffer,再加入溶菌酶使其终浓度为 0.1 mg/mL,避光充分混匀,分装为 2 mL/管,冷冻保存。

收稿日期:2013-05-27

基金项目:江苏省高校自然科学基金(编号:03KJB610168);江苏省扬州市科技攻关——社会发展科技攻关计划(编号:YZ2011092)。  
作者简介:陈 剑(1980—),男,江苏淮安人,讲师,主要从事畜牧兽医的教学与研究工作。E-mail:110741171@qq.com。

通信作者:李湘鸣,博士,教授,主要从事有害化学物的生监测研究工作。E-mail:847264344@qq.com。

3.4 尿样加标

小牛尿液分别加入试验选择的雌激素物质:乙炔雌二醇。 $\beta$ -雌二醇做加标后在小牛尿液中的终浓度达到 0.050 mol/L。空白对照(即尿样空白)加入等量的乙醇;试剂空白用 2 mL 蒸馏水代替小牛尿液。

3.5 C<sub>18</sub> 吸附柱活化

用移液器吸取 2.5 mL 甲醇淋洗 C<sub>18</sub> 吸附柱,每次 15 min,共 3 次,再用双蒸水清洗 3 次,每次 15 min,将活化后的吸附柱放入 4 ℃ 冰箱保存备用。

3.6 水解

目的是将内源性的结合性雌激素类化合物水解为游离型。分别取加标尿液 2 mL 置于具塞试管中,依次加入 2 mL HCl、2 mL 甲醇;空白对照和试剂空白与尿样完全相同。

将试管于 100 ℃ 水浴作用 1 h,然后吸取 2 mL 用 8 mol/L NaOH 调节溶液 pH 值至 3.0。

3.7 吸附

将上述 pH 值为 3.0 水解液分别通过活化 C<sub>18</sub> 吸附柱,弃去流出液。在无液体流出后(吸附约 20 min),用循环水式真空泵抽气 5 min,尽量除去 C<sub>18</sub> 吸附柱中残留的水分。然后用 4 mL 二氯甲烷洗脱 C<sub>18</sub> 吸附柱 2 次,每次约 30 min。将洗脱液洗置于消毒玻璃瓶中,封口编号。

4 雌激素类化学物测定

4.1 作用于酵母细胞

在无菌操作台内,将每份试验尿样用二氯甲烷洗脱液吸取 0.1 mL 至消毒玻璃瓶中,置于 37 ℃ 烘箱内,挥发 5 min。加入 1.5 mL SD/- trp、- ura 培养液,再加入 0.5 mL 过夜酵母培养液,使其在培养液中浓度分别为 100、0 mg/mL(对照),30 ℃ 继续振荡培养 6 h。

4.2 显色

取透明酶标板,每 3 孔分为 1 组。加入 20  $\mu$ L 受试物作用的酵母细胞培养液,然后加入 40  $\mu$ L 含 0.1 mg/mL 溶菌酶的 ONPG,最后加入 160  $\mu$ L 含 1% SDS Z Buffer,在 37 ℃ 振荡箱内显色,记录受试样品的显色时间,最后用 50  $\mu$ L 1 mol/L 的 NaCO<sub>3</sub> 中止其反应。同时以同样的方法取透明酶标板,加入 0.1 mL 于 30 ℃ 作用 6 h 的酵母培养液,用于测波长为 630 nm 处的细胞密度。

4.3 测光密度

用酶标仪测光密度,于波长为 405 nm 处测显色尿样,波长为 630 nm 处测经受试物作用的酵母细胞培养液的细胞密度,求  $D_{405\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$  之比值。

5 结果与分析

5.1 重组基因酵母细胞对  $\beta$ -雌二醇的反应

表 1 为重组基因酵母细胞对加入  $\beta$ -雌二醇和小牛原尿的反应变化,以  $D_{405\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$  之比值表示。由表 1 可以看出,重组基因酵母细胞对 100 ng/mL 浓度的  $\beta$ -雌二醇可以产生明显的响应,12 份加入  $\beta$ -雌二醇小牛尿的  $D_{405\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$  最高值达 1.624,最低值为 0.679;而小牛原尿  $D_{405\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$  普遍较低,最高值为 1.394,最低值为 0.393,经配对  $t$  检验表明 2 组差异极显著( $t=3.722, P=0.0033$ )。空白试剂中雌激素

表 1 重组基因酵母细胞对  $\beta$ -雌二醇的筛选  
(以  $D_{405\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$  之比值表示)

牛尿编号	含 $\beta$ -雌二醇	不含 $\beta$ -雌二醇	空白试剂
112	1.624 $\pm$ 0.499 0	0.687 $\pm$ 0.115 1	0.787
113	1.243 $\pm$ 0.266 3	0.496 $\pm$ 0.206 4	0.881
116	0.815 $\pm$ 0.306 0	0.623 $\pm$ 0.105 8	0.669
117	1.466 $\pm$ 0.418 4	0.519 $\pm$ 0.046 7	0.368
119	0.886 $\pm$ 0.113 0	0.435 $\pm$ 0.105 8	0.293
120	1.082 $\pm$ 0.088 7	0.757 $\pm$ 0.482 9	0.316
121	0.992 $\pm$ 0.131 0	0.607 $\pm$ 0.038 2	0.510
122	1.069 $\pm$ 0.799 3	0.393 $\pm$ 0.036 1	0.240
123	0.922 $\pm$ 0.288 0	1.394 $\pm$ 0.085 8	0.326
124	1.165 $\pm$ 0.229 8	0.708 $\pm$ 0.137 6	0.298
125	0.679 $\pm$ 0.102 3	0.446 $\pm$ 0.046 7	0.244
128	0.842 $\pm$ 0.228 1	0.678 $\pm$ 0.196 2	0.194
平均值	1.065 $\pm$ 0.275 4	0.645 $\pm$ 0.264 2	0.427 $\pm$ 0.230 5

活性更低,说明小牛原尿中仅含极微量的雌激素。

5.2 重组基因酵母细胞对  $\beta$ -雌二醇的反应分析

根据试验所得数据和研究分析,重组基因酵母细胞对加入  $\beta$ -雌二醇的小牛原尿的反应明显,所有加标尿样中的雌激素水平很高,均高于不加标样,说明刚出生的小牛性器官还处于原始状态,雌激素分泌极少。小牛原尿和空白试剂(蒸馏水)反应差别不大,但稍高于空白试剂,说明小牛原尿中含极微量的雌激素,可能是小牛摄入母乳所致。因为小牛毕竟是生物活体,所产生的体液中还具有其他的生物活性物质,因此与空白试剂相比,所测结果也可能是其他生物活性物质的干扰性反应。通过比较分析,小牛原尿组成的雌激素类化合物和蒸馏水无明显差别。

这次检测的尿液样本的过程相对简单,利用酵母检测雌激素生物活性方法灵敏、快速、方便。不过该验证方法只是定性筛选方法,所以如果筛选出可疑样品需要做进一步证实。选择 10 日龄小牛尿作为试验对象是真实物质载体,可以更好地说明酵母细胞检测方法准确方便的优异性。

5.3 问题与展望

雌激素的种类繁多,广泛存在于生活和生产环境中,对人体可产生多方面的作用。随着工业的发展,雌激素的污染进一步加重,威胁着人类的健康、生存与繁衍。而随着污染的日益严重,将会有越来越多的物质被怀疑具有雌激素效应。但是就目前而言,对于环境雌激素的研究还处于起步阶段,其种类还在增加,很多问题有待进一步揭示。因此,建立快速经济、简单有效的生物检测方法就显得尤为重要。发展出快速、简便的方法是国内外许多专家、学者致力研究的目标,并且已经取得了一些进步,但有效监控雌激素还需广大科技工作者做出更多的努力。

参考文献:

[1] 王一梅,王 洋,唐 非. 环境雌激素的研究现状(二)——环境雌激素的测定[J]. 公共卫生与预防医学,2009(2):47-49.  
[2] 郁 倩. 动物性食品和水雌激素残留污染检测的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.  
[3] 李湘鸣,罗方妮,刘桂霞,等. 基因重组酵母细胞检测养殖场污水中环境雌激素[J]. 农业环境科学学报,2007,26(6):2200-2205.