

文章编号:1674-2869(2012)09-0005-04

# 不同基因缺失型酵母对全氟辛酸的灵敏性

金士威<sup>1</sup>,程巧红<sup>1</sup>,戴和平<sup>2</sup>

- (1. 武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程教育部重点实验室,湖北 武汉 430074;  
2. 中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,湖北 武汉 430072)

**摘要:**针对全氟化合物这类新型的有机污染物,在环境中具有持久性,生物累积性和毒性的问题,以全氟辛酸为模型化合物,以真核生物酵母以及4基因缺失型酵母突变体和5基因缺失型酵母突变体为模式生物,开发便捷、灵敏的毒理学评价方法,探究全氟辛酸对不同基因缺失型酵母的毒性效应,以期建立以酵母为平台的环境污染物快速筛选系统. 研究表明,5基因缺失型酵母突变体对全氟辛酸较为敏感,可以作为建立环境污染物快速筛选系统的细胞模型.

**关键词:**基因缺失型酵母突变体;基因缺失型酵母突变体;毒性机理

中图分类号:X835

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2012.09.002

## 0 引言

全氟辛酸(PFOA)是一种全氟有机酸,是聚四氟乙烯化工产品的关键原材料,以及许多全氟化合物的重要前体,也是一类重要的全氟表面活性剂. 其分子式为 $C_8F_{15}O_2H$ ,相对分子质量为414,熔点 $45\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,沸点 $189\sim 192\text{ }^{\circ}\text{C}/9.812\text{ kPa}$ ,水溶性为 $3.4\text{ g/L}$ <sup>[1]</sup>. 全氟化合物由于其疏水疏油和稳定的化学性质<sup>[2]</sup>被广泛使用,其中包括:石油化工、涂料、农药、纺织类、皮革品、家具、地毯、泡沫灭火剂等,还有与人们生活密切相关的纸张、食品包装、不粘锅涂层等<sup>[3]</sup>. 从20世纪80年代开始,由于全氟有机化合物在工业及民用领域的应用迅速增长,PFOA及其盐类产品大量使用,导致全球范围的各种环境介质如土壤、底泥、水体、大气中,通过食物链放大作用而存在于许多动物和人体中<sup>[4]</sup>. PFOA具有疏水疏油的特点,不易降解而容易在生物体内蓄积,在生物体内大部分与血浆蛋白结合存在于血液中,其余蓄积在动物的肝脏和肌肉组织中,引起其各个脏器不同程度的毒性损伤<sup>[5]</sup>. 毒理学研究证明PFOA是啮齿动物的致癌剂<sup>[6-10]</sup>,具有肝脏毒性、心血管毒性、生殖毒性和胚胎发育毒性、遗传毒性、免疫系统毒性、甲状腺毒性和致癌性<sup>[11]</sup>.

酵母是最简单的高等真核生物,是真核生物研究的模式生物. 酵母在三个不同水平上调节遗

传毒性化学物在细胞内的累积:细胞壁、细胞膜的通透性以及细胞的多药抗性机制(PDR途径)<sup>[12]</sup>. *CWP1*,*CWP2*基因编码细胞壁甘露糖蛋白,失活可明显提高酵母细胞壁通透性;*SNQ1*,*SNQ2*基因编码外排泵蛋白,失活可明显提高酵母内检测系统对不同分子量化学物的灵敏度;*YAP1*基因调控许多关键抗氧化基因的表达,失活可明显提高酵母检测系统检测DNA氧化损伤剂的能力<sup>[13]</sup>.

由于全氟化合物的广泛使用和全球的普遍污染,越来越多的学者开始研究其在环境中的污染现状、致毒机理和对人体的健康威胁. 采用基于细胞培养的离体生物方法评估环境污染物的毒理学效应,相比于鱼类、白鼠等活体动物实验,具有成本低、时间短、灵敏度高等优点,因此具有广阔的应用前景. 酵母细胞属于单细胞生物,除了缺乏哺乳动物细胞复杂的受体系统外<sup>[14]</sup>,还具有易培养、生长快、价格低等优点. 本研究旨在筛选基因缺失型酵母来检测环境中的有毒污染物,以PFOA为污染物模型,探究其对不同缺失型酵母的毒性机理.

## 1 实验部分

### 1.1 实验试剂

本实验PFOA为纯度大于97%的固体,购买自Merek公司,标准储备液为 $1.0\text{ mol/L}$ ,溶剂为二甲亚砜(DMSO)、SD-Ura培养液.

收稿日期:2012-07-05

基金项目:国家自然科学基金重点项目(21037004)

作者简介:金士威(1972-),男,浙江东阳人,教授,博士,硕士研究生导师. 研究方向:持久性有机污染监测与生态毒理学.

SD-Ura 培养液: 酵母氮源无氨基无硫酸铵 0.17%、硫酸铵 0.5%、腺嘌呤 0.2%、色氨酸 1%、组氨酸 1%、亮氨酸 1%、赖氨酸 1% (以上百分数均为质量分数)。

固体培养基加质量分数 2% 的琼脂粉, 溶于蒸馏水中高压灭菌后, 加入质量分数 40% 的葡萄糖致最终质量分数为 2%。

### 1.2 实验器材

高压灭菌锅 (LDZX-30KBS), 上海申安医疗器械厂生产。摇床 (THZ-C), 江苏太仓实验设备厂生产。恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司生产。超净工作台 (Ai Tech), 苏州安泰空气技术有限公司生产。移液枪 (eppendorf)、Ø90 mm 培养皿、试管、三角瓶。

### 1.3 实验生物

本研究野生型酵母细胞 BY4741 和其 4 基因缺失型突变体 ( $cwp1 \Delta cwp2 \Delta snq1 \Delta snq2 \Delta$ )、5 基因缺失型突变体 ( $cwp1 \Delta cwp2 \Delta snq1 \Delta snq2 \Delta yap1 \Delta$ ) 菌株均来自于中科院水生生物研究所水生动物蛋白质工程学科组。

### 1.4 实验方法

实验前均将配制的 SD-Ura 培养液在高压灭菌锅中灭菌, 把三种酵母 (BY4741、4 基因缺失型突变体、5 基因缺失型突变体) 接种到 SD-Ura 液体培养基中, 30 °C, 200 r/min 摇床过夜培养 16 h。第二天用 SD-Ura 液体培养基将培养的酵母培养液稀释, 分光光度计检测其 OD 值为 0.11, 继续 30 °C, 200 r/min 摇床培养 2 h, 测其 OD 值为 0.14 时开始染毒。染毒后的酵母培养液继续 30 °C, 200 r/min 摇床培养 4 h。取出酵母细胞培养液在超净工作台用无菌水稀释  $10^5$  倍后, 取 100  $\mu$ L 涂 SD-Ura 固体培养基平板, 30 °C 培养箱中培养两天, 对长出的单克隆子进行统计计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 DMSO 溶剂对酵母生长的影响

生物实验常以 DMSO 为污染物的载体溶剂, 本实验探索了不同的 DMSO 浓度对酵母生长的影响。由实验结果得知, 当 DMSO 在培养液中的质量分数小于 0.5% 时, 对 3 类酵母细胞的生长没有明显影响; 而当 DMSO 质量分数为 5% 时, 则产生明显的影响, 特别是对 5 基因缺失型酵母突变体, 影响更为显著, 其存活率降为 70%。故以后的实验中, 培养液中 DMSO 的浓度不超过 0.5%, 以避免溶剂的影响。

### 2.2 染毒后酵母的培养时间与细胞生长量的关系

为了验证酵母细胞染毒后细胞生长量与培养时间的最佳关系, 酵母细胞培养液在染毒后分别在 30 °C, 200 r/min 摇床分别培养 0、2、4、6、8 h, 随后分别在超净工作台用无菌水稀释  $10^5$  倍, 分别取 100  $\mu$ L 涂 SD-ura 固体培养基平板后, 在 30 °C 培养箱中培养两天后, 对生长出的单克隆子计数, 其结果如图 1 所示。染毒超过 4 h 后, 酵母增殖上处于不增殖的状态, 所以本实验酵母细胞培养液染毒后继续培养的时间定为 4 h。

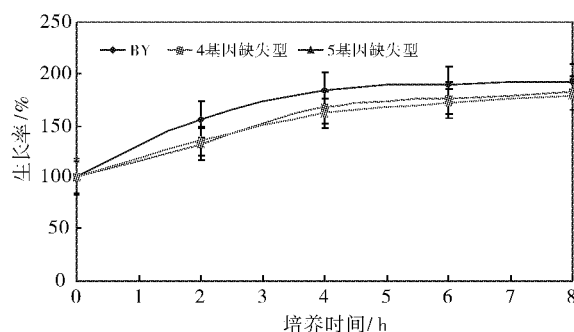


图 1 酵母培养时间与酵母生长量的关系

Fig. 1 Effect of culture time on the growth of yeast

### 2.3 PFOA 浓度对酵母生长的影响

酵母细胞培养液加 PFOA 后, 30 °C, 200 r/min 摇床继续培养 4 h, 在超净工作台用无菌水稀释  $10^5$  倍后涂 SD-Ura 固体培养基平板, 30 °C 培养箱培养 2 d 后, 对生长出的单克隆子计数, 其结果如图 2。由图 2 知, 当 PFOA 浓度为 0.6 mmol/L 时, 野生型酵母、4 基因缺失型酵母突变体和 5 基因缺失型酵母突变体存活率分别为 77.4%、69.7% 和 50.5%; 当 PFOA 浓度为 1.2 mmol/L 时, 野生型酵母、4 基因缺失型酵母突变体和 5 基因缺失型酵母突变体存活率分别为 35.4%、15.2%、8.0%, 4 基因缺失型酵母突变体和 5 基因缺失型酵母突变体的存活率下降比较快; 而当 PFOA 浓度大于 1.2 mmol/L 时, 野生型、4 基因缺失型酵母突变体和 5 基因缺失型酵母突变体存活率都为零 (图中未显示)。与野生型酵母相比, PFOA 对 4 基因缺失型酵母突变体和 5 基因缺失型酵母突变体生长影响比较明显, 而对 5 基因缺失型酵母突变体生长影响尤其明显。

由以上实验结果可知, PFOA 对 4 基因缺失型酵母突变体和 5 基因缺失型酵母突变体的影响比野生型酵母细胞灵敏, 可能因为 4 基因缺失型酵母突变体和 5 基因缺失型酵母突变体都缺失了编码细胞壁甘露糖和细胞外排泵蛋白的基因, 从而对外界毒物抗性的抵御机制减少很多, 能很灵敏

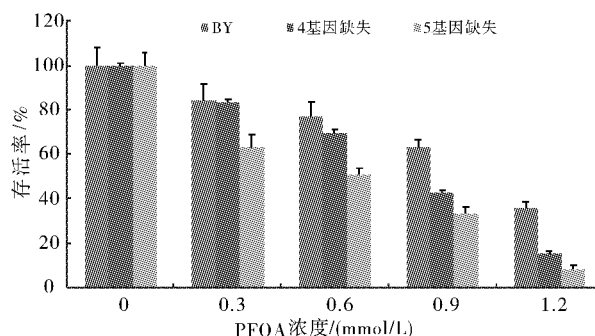


图2 PFOA对酵母毒性实验 (n=4)

Fig.2 Effect of the concentration of PFOA on the growth of yeast

的感受到外界环境的压力;而5基因缺失型酵母突变体比4基因缺失型酵母突变体又少了能调控许多关键抗氧化基因的表达的YAP1基因<sup>[12]</sup>,缺失了YAP1基因的5基因缺失型酵母突变体比4基因缺失型突变体对PFOA的灵敏性更强,说明5基因缺失型酵母突变体受到外界环境压力的时候不能有效的防御细胞的氧化损伤。

综上,当缺失了编码细胞壁甘露糖和细胞外排泵蛋白的基因的酵母受到外界环境的压力或者毒物的胁迫时,毒物可能以分子的形式从细胞壁进入细胞<sup>[15]</sup>,损害细胞的正常生理功能,进而致使酵母产生氧化损伤<sup>[13]</sup>。

由于PFOA等全氟化合物具有持久性和生物累积性且又被广泛使用,其在全球范围无处不在,造成了较为严重的污染<sup>[16-17]</sup>。Nobuyoshi<sup>[18]</sup>等研究表明全球各个大洋海域、日本、韩国、中国大陆沿海海域中均有有机氟化合物的存在,其中PFOA的含量均处于较高的水平。Kannan等<sup>[19]</sup>检测到地中海、波罗的海海豚肝脏中的PFOA高达878 ng/g。人群调查结果显示,一般人群体内有一定水平的PFOA暴露,有的可以达到很高的水平。Ehresman<sup>[20]</sup>等测量了美国3M公司18位职业工人血清中PFOA浓度为1 046 ug/L,日本居室灰尘中被检测出PFOA质量浓度范围为11~2 500 ng/g<sup>[21]</sup>。我国是有机氟化合物生产和消费大国,但对全氟化合物对人类健康和环境的威胁的研究还处于初级阶段,极有必要开展进一步的研究。酵母作为真核生物的模式生物,可以替代活体动物模型,利用其不同基因缺失型酵母突变体研究环境污染物的毒理学效应,如氧化损伤及氧化损伤修复机理、以及后续要研究的核苷酸切除修复和碱基切除修复等,在此筛选的基础上,可以选择对外界污染物较敏感的5基因缺失型酵母突变体为暴露模型,以建立酵母菌株检测和评估环境污染物毒性效应的平台。

## 参考文献:

- [1] 范英武,郎朗,季宇彬. 全氟辛酸毒性的研究现状[J]. 食品与药品, 2008, 10(7): 66-69.
- [2] 贺志丽,贺志霞,陈瑞琴. 改性活性炭对水溶液中氟离子的吸附性能[J]. 武汉工程大学学报, 2012, 34(1): 43-47.
- [3] 韩建,方展强. 水环境PFOS和PFOA的污染现状及毒理效应进展[J]. 水生态学杂志, 2010, 3(2): 99-105.
- [4] 刘健,王海雁,赵淑江. 全氟辛烷磺酰基化合物(PFOS)类物质水环境污染研究进展[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(3): 451-456.
- [5] Han X, Ermpert K A, Jepson G W. Subcellular distribution and protein binding of perfluorooctanoic acid in rat liver and kidney [J]. Drug Chem Toxicol, 2005, 28(2): 197-209.
- [6] 范铁欧,金一和,麻懿馨,等. 全氟辛烷磺酸对雄性大鼠生精功能的影响[J]. 卫生研究, 2005, 34(1): 37-39.
- [7] 胡存丽,仲来福. 全氟辛烷磺酸和全氟辛酸毒理学研究进展[J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19(6): 354-358.
- [8] 姚晓峰,仲来福. 全氟辛酸对HepG2细胞的遗传毒性及氧化性DNA损伤[J]. 毒性学杂志, 2005, 19(3): 216-217.
- [9] Lau C, Thibodeaux J R, Hanson R G, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II. Postnatal evaluation [J]. Toxicological Sciences, 2003, 74: 382-392.
- [10] Fenton S E, Reiner J L, Nakayama S E, et al. Analysis of PFOA in dosed CD-1 mice. Part 2. Disposition of PFOA in tissues and fluids from pregnant and lactating mice and their pups [J]. Report Toxicol, 2009, 27(3-4): 365-372.
- [11] Shix, Du Y, Lam P. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebra fish embryos exposed to PFOS [J]. Toxicological Sciences, 2008, 230(1): 23-32.
- [12] Nguyen D T, Alarco A M, Raymond M. Multiple Yap 1 binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants and alkylating agents [J]. J Biol Chem. 2009, 276: 1138-1145.
- [13] Min Zhang, Chao Zhang, Jia Li. Inactivation of YAP1 Enhances Sensitivity of the Yeast RNR3-lacZ Genotoxicity Testing System to a Broad Range of DNA-Damaging Agents [J]. Toxicological Sciences, 2011, 120(2): 310-321.
- [14] Jork J A B, Butenhoff J L, Wallace K B. Multiplicity

- of nuclear receptor activation by PFOA and PFOS in primary human and rodent hepatocytes [J]. *Toxicology*, 2011, 288: 8-17.
- [15] 汪琨, 徐峥, 汪倩雯, 等. 肉桂醛特异性抑制酵母细胞壁合成的作用机理 [J]. *食品与发酵工业*, 2012, 38(3): 68-72.
- [16] 孙学志, 金军, 王英. 全氟辛烷磺化物及其环境问题 [J]. *环境污染与防治*, 2007, 3(29): 216-220.
- [17] Yamada H, Taylor P H, Buck R C, et al. Thermal degradation of fluorotelomer treated articles and related materials [J]. *Chemosphere*, 2005, 61(7): 974-984.
- [18] Nobuyoshi Y, Kurunthachalan K, Sachi T, et al. A global survey of perfluorinated acids in oceans [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 50: 658-668.
- [19] Kannan K, Corsolini S, Falandysz J, et al. Perfluorooctane sulfonate and Related Fluorinated Hydrocarbons in Marine Mammals, Fishes and Birds from Coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(3): 210-216.
- [20] Ehresman D J, Froehlich J W, Olsen G W, et al. Comparison of human whole blood, plasma and serum matrices for the determination of perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA) [J]. *Environ Res*, 2007, 103(2): 176-184.
- [21] Moriwaki H, Takatah Y, Arakawa R. Concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in vacuum cleaner dust collected in Japanese homes [J]. *Environ Monit*, 2003, 5: 753-757.

## Sensitivity of different gene deletion yeast to perfluorooctanoic acid

JIN Shi-wei<sup>1</sup>, CHENG Qiao-hong<sup>1</sup>, DAI He-ping<sup>2</sup>

(1. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan 430074, China;

2. Institute of hydrobiology, Chinese academy of sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Perfluorinated compounds (PFCs) are a class of emerging organic contaminants with persistent stability, strong bioaccumulation and high toxicity. To develop a convenient, sensitive toxicological evaluation method, perfluorooctanoic acid (PFOA) was used as a model compound and eukaryotic yeast and its 4 genes deletion yeast mutant and 5 genes deletion yeast mutant were used as model organisms. The toxic effects of PFOA on different gene deletion yeast were studied. The results show that 5 genes deletion yeast mutant is more sensitive to PFOA, which can be used as a cell model to establish rapid screening system of environmental pollutants.

**Key words:** genes deletion yeast mutant; genes deletion yeast mutant; mechanism of toxicity

本文编辑:张 瑞