

荧光标记的酵母细胞用于环境镉的生物监测研究

林 岚*, 汪妍竹, 于文英

东南大学医学院生物工程系, 江苏 南京

收稿日期: 2022年11月10日; 录用日期: 2022年12月22日; 发布日期: 2022年12月30日

摘 要

目的: 前期研究已构建裂殖酵母 *SPBC776.03* 敲除株(*SPBC776.03Δ*), 而且 *SPBC776.03* 基因缺失可致细胞周期有丝分裂染色体分离异常。本研究目的是以 *SPBC776.03Δ* 为阳性对照, 针对环境镉离子的致突变性建立基于酵母的生物监测体系。方法: Rad22-GFP DNA 修复灶(DNA repair foci)检测、人工微型染色体丢失实验、以及实时定量 PCR (qPCR)。结果: 基于 PCR 以及酵母同源重组, 我们成功构建了 DNA 损伤相关基因 Rad22 携带荧光标记的酵母菌株 Rad22-GFP, 用于指示环境中遗传毒因子。镉暴露下的该指示菌株在细胞周期中出现多个(>2)荧光点, 而未受镉胁迫的对照组则无。阳性对照 *SPBC776.03Δ* 菌株即使未受镉胁迫, 其细胞周期中高频出现多个(>2)荧光点。进一步对镉胁迫是否影响 *SPBC776.03* 基因转录进行探讨, qPCR 测定发现, 与未经镉胁迫的野生型酵母相比, 镉胁迫导致 *SPBC776.03* 转录水平下调 3 倍, 提示 *SPBC776.03* 可能为酵母细胞受重金属离子镉胁迫的响应基因。结论: 根据本研究工作, 已建立了用于环境镉暴露的生物监测体系——Rad22-GFP 酵母株, 该生物监测周期短, 简便易行。

关键词

生物监测, 裂殖酵母, DNA损伤, 镉暴露

A Biomonitoring System of Environmental Cadmium Exposure Based on Fluorescence-Tagged Fission Yeast

Lan Lin*, Yanzhu Wang, Wenying Yu

Department of Bioengineering, Medical School, Southeast University, Nanjing Jiangsu

Received: Nov. 10th, 2022; accepted: Dec. 22nd, 2022; published: Dec. 30th, 2022

*通讯作者。

Abstract

Objectives: Our previous studies have constructed *SPBC776.03Δ* strain of *Schizosaccharomyces pombe*, and shown that deficiency of *SPBC776.03* gene may lead to mitotic chromosome missegregation during cell cycle. This work aims to establish a biomonitoring system based on fission yeast to assess the genotoxicity and mutagenicity of environmental cadmium ions. **Methods:** Rad22-GFP DNA repair foci examination, artificial mini-chromosome loss test, and real-time quantitative PCR. **Results:** Using PCR-based techniques and homologous recombination, a yeast strain called Rad22-GFP was constructed as an indicator of environmental genotoxic agents, in which the DNA damage associated gene Rad22 was tagged with GFP in its chromosomal locus. Under Cd exposure, this indicator strain displayed multiple (>2) DNA repair foci, whereas none was observed with untreated control. As for the positive control strain *SPBC776.03Δ*, multiple (>2) DNA repair foci were observed during cell cycle even in the absence of Cd stress. Real-time qPCR analyses have revealed that, *SPBC776.03* transcriptional levels were found to downregulate by three-fold when exposed to Cd²⁺, in contrast to untreated wild-type counterparts, suggesting that *SPBC776.03* would be a responsive gene of fission yeast to the Cd stress. **Conclusions:** Our studies have constructed a biomonitoring system of environmental cadmium exposure based on fluorescence-tagged Rad22 expression, Rad22-GFP, in fission yeast, which has advantages of speediness and convenience in the assessment of Cd toxicity.

Keywords

Biomonitoring, Fission Yeast (*Schizosaccharomyces pombe*), DNA Repair, Cadmium Exposure

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着工业化进程的加快,环境污染加剧,重金属暴露愈来愈多。重金属毒物在生物体内蓄积会影响细胞的正常生理功能,主要是通过引起DNA损伤及蛋白质构象的改变,进而触发细胞凋亡、细胞周期改变以及细胞的恶性转化。镉被世界卫生组织的国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)认定为I类致癌剂。环境中镉对生物体包括人类有毒,它污染大气、水体、或者土壤,经由呼吸、接触、以及食物进入体内,即使低水平的暴露也会造成较大的健康损害[1][2]。

多年来,研究人员研发出各种基于微生物、植物、昆虫与哺乳细胞培养的短期测试体系,用于筛选环境中致突变、致畸和致癌(统称为“三致”)的物质。Ames试验是基于沙门氏菌的回复突变测试系统,在检测化学物质的致突变性方面有敏感、便捷的优点。大量证据表明超过90%致突变剂具有已知的致癌性,而且Ames试验体系对已知的非致癌剂没有响应。然而Ames试验存在不足:首先,检测不同类型的突变原需要几种菌株;其次,许多作用于DNA、抑制DNA复制、致细胞死亡的物质对致突变性仅有微弱的直接影响,标准的Ames试验检测不出这些物质的致突变性;最后,Ames试验在细菌中进行,细菌基因组结构、遗传调控与代谢完全不同于真核细胞。因此,亟需建立起基于不同生物概念与生物体的遗传毒测试体系。

根据许多导致DNA损伤的物质都具有致突变性,在一定剂量范围能诱发真核细胞微核现象的发生,本研究选择了模式生物裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)作为研究对象,通过构建DNA损伤的标志

基因 Rad22 C 端带荧光标记的酵母细胞株 Rad22-GFP, 以对数期的酵母胞内 GFP 荧光点(DNA 修复灶)作为评价终点, 观察并比较镉暴露、以及未经暴露的酵母细胞中该荧光点的发生频率, 进而监测环境中镉导致的健康风险。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 培养基、菌种与质粒

裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)菌株 PT 286 为本实验室保藏的野生型(WT)单倍体, *SPBC776.03Δ* 是 *SPBC776.03* 基因敲除的单倍体细胞株, 为本实验室前期构建并保藏; 裂殖酵母日常培养采用 YE5S (Yeast extract with 5 supplements)培养基: 5 g/L 酵母提取物, 30 g/L 葡萄糖, 225 mg/L 亮氨酸, 225 mg/L 组氨酸, 225 mg/L 赖氨酸, 225 mg/L 腺嘌呤, 225 mg/L 尿嘧啶; 大肠杆菌感受态 DH5 α 菌株购自天根生化科技(北京)公司; 含人工微型染色体的裂殖酵母 CF824 菌株、质粒 pFA6a-GFP KanMX6 由宾夕法尼亚大学医学院 Phong Tran 教授惠赠。

2.1.2. 试剂

Taq DNA polymerase、dNTPs、T4 DNA 连接酶、PrimeScript™ first-strand cDNA synthesis kit、DNA marker DL2000 购自 TaKaRa 公司; pfu DNA polymerase、2 \times SYBR RealUniversal Premix、质粒小提试剂盒、酵母基因组提取试剂盒、DNA marker D15000 购自天根生化科技(北京)公司; KOD DNA polymerase 购自东洋纺(TOYOBO CO., 日本)公司; 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成; 抗生素 G418 (也称遗传霉素)、诺尔丝菌素分别购自生工生物工程(上海)有限公司、北京中成谨念科技有限公司, 溶壁酶 Lyticase 购自生工生物工程(上海)有限公司; 胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxiod 公司, CdSO₄ (481882)购自 Sigma-Aldrich 公司。

2.1.3. 仪器

SimpliAmp™ PCR 仪(ThermoFisherScientific Co., 美国), ABI 7500 real-time PCR 仪(ABI Life Technologies, 美国), 荧光显微镜(奥林巴斯 Olympus, 日本), 分光光度计(翱艺仪器上海有限公司), 全自动数码凝胶成像仪(上海培清科技有限公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 构建 Rad22 C 端带荧光标记的酵母株 Rad22-GFP

1) 用于酵母同源重组的 GFP-kanMX6 DNA 片段的扩增与纯化

酵母中 DNA 损伤由其染色体上 C 端荧光标记的 Rad22 来指示[3]。本研究采用同源重组技术在其染色体 Rad22 基因(下游) 3'端带上 GFP 基因标签, 使得 Rad22-GFP 在基因组内源性启动子控制下融合表达。参照 Bähler *et al.*方法[4], 以质粒 pFA6a-GFP (S65T)-kanMX6 为模板 PCR 扩增得到 GFP-kanMX6 module (图 1)用于后续的同源重组, 该 PCR 所用的引物 5'端为靶基因 Rad22 特异性同源臂[Rad22-GFP5 KanMX-Fwd: 5' (AACAAATTCTGATCCTCAGTCGCAATGAGGTCGCGAGAAAACACTACGATGCTACG GTGGATAAGAAAGCCAAAAAAGGA)-CGGATCCCCGGGTTAATTAA3'; Rad22-GFP5KanMX-Rev: 5' (TAAACAAATCATTAGTCATAAAACAGAAAATACTTGGTAAAAAACAAGTTGCCAATCATCACATT TTGCCTCATTACTT)-GAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3', 圆括弧里序列表示与酵母染色体基因同源序列, 下划线处分别是质粒 pFA6a-GFP-kanMX6 骨架上限制性内切酶 *Bam*HI, *Pac*I 以及 *Eco*RI, *Pme*I 位点序列]; 0.85%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收 GFP-kanMX6 DNA 片段; 回收纯化的 GFP-kanMX6 DNA 每 3 管合并

成 1 管，溶于 10 μ l TE 缓冲液(pH 8.0)中，进行后续的转化实验。

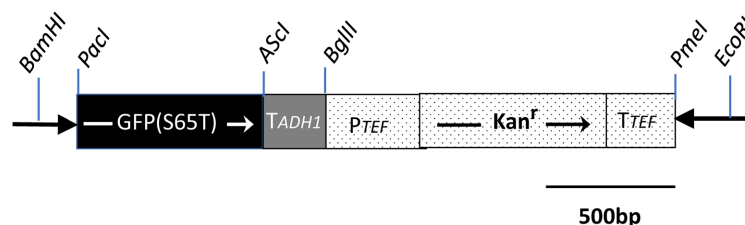


Figure 1. The GFP-KanMX6 module of plasmid pFA6a-GFP (S65T)-kanMX6
图 1. 质粒 pFA6a-GFP (S65T)-kanMX6 上的 GFP-kanMX6 组件

2) 基于乙酸锂化学法的酵母转化

采用乙酸锂化学法转化酵母感受态(野生型菌株 PT 286、以及 *SPBC776.03 Δ), 涂布 YE5S 琼脂平板, 30 $^{\circ}$ C, 18 h 培养长出菌苔之后, 影印转接到含 100 μ g/ml G418 的 YE5S 平板上, 30 $^{\circ}$ C 继续培养 2~3 天; 挑取 G418 抗性转化子, 于 YE5S/G418 液体培养基中 200 rpm 振荡培养约 12 h, 采用酵母基因组提取试剂盒, 按照操作说明提取转化子的基因组 DNA, 进行 colony PCR 鉴定。将鉴定成功的转化子分别-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存于 20%甘油(v/v)。*

2.2.2. 荧光显微镜观察 DNA 修复灶

分别接种 Rad22-GFP/PT286 (野生型)以及 Rad22-GFP/*SPBC776.03 Δ (敲除株)细胞于 5 mL YE5S 液体培养基中, 25 $^{\circ}$ C 培养直到对数生长期中期。收获细胞、离心、弃上清, 将离心管中细胞团(沉淀)以及少量 YES 培养基置于冰上, 取 2 μ L 细胞悬液于载玻片上, 盖上 22 mm \times 22 mm 盖玻片。荧光显微镜下观察 ~200 个细胞, 拍照。*

2.2.3. *SPBC776.03* 敲除株(*SPBC776.03 Δ)的微型染色体丢失测定*

微型染色体丢失检测根据 Niwa *et al.*方法[5]稍加改进: CF824 菌株是含有额外的人工微型染色体 (Ade⁺, G418 抗性)的酵母单倍体, 基于 CF824 菌株与染色体分离异常的菌株杂交后, 后代由于染色体分离异常, 微型染色体(mini-chromosome)无法平均分配到两个子细胞中, 导致一部分子细胞在缺乏腺嘌呤 (Ade⁻)的 YE4S 平板无法正常生长, 从而出现红色菌落。据此对有丝分裂染色体分离异常菌株进行快速筛查、鉴定。细胞计数采用 OD₆₀₀ 监测, 将含有人工微型染色体的细胞约 600 个, 涂布于 YE4S (Ade⁻)平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d。出现的粉红色菌落占总菌落的比率代表着有丝分裂中染色体分离异常事件的频率。

2.2.4. 实时荧光定量 PCR (qPCR)

采用 SYBR green 实时荧光定量 PCR 方法测定酵母在 Cd 暴露下的 *SPBC776.03* 基因转录水平, 实验组的酵母液体培养中 Cd²⁺终浓度 100 μ M, 未经 Cd 处理的酵母野生株 PT 286 作为对照。收获对数生长期的酵母细胞, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA; 总 RNA (3 μ g)通过 PrimeScriptTM 第一链 cDNA 合成试剂盒、按照试剂盒说明书进行反转录得到相应 cDNA; 荧光定量 PCR 检测 *SPBC776.03* 的 qPCR 引物如下: Primer-Fwd-*SPBC776.03*: 5'-ACTGCCTCTGAAGCAATCGCT-3', Primer-Rev-*SPBC776.03*: 5'-TTTAC GAGCGACATCCATGCC-3'; 以看家基因 β -actin 作为内参, 其用于 qPCR 的引物如下: Primer-Fwd-actin: 5'-GGATTCTACGTTGGTGAAGCTC-3'; Primer-Rev-actin: 5'-GGGTTCAAAGGAGCCTCAAAC-3'; 每次 qPCR 取 1 μ L cDNA 作为模板, 用 2 \times SYBR RealUniversal Premix 建立 20 μ L 反应体系: 2 \times SYBR RealUniversal Premix 10 μ L, 一对引物(10 μ M)各 0.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase-free dd H₂O 7.8 μ L。在 ABI 7500 real-time PCR 仪上按照以下反应参数运行: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min, 40 循环的 95 $^{\circ}$ C 10 sec, 55 $^{\circ}$ C 20

sec, 72°C 32 sec。实验组与对照组各 4 个生物学样品重复, 每轮 qPCR 反应每个样品至少 3 个复孔。采用 Nature Protocols (2008)报道的相对 Ct 法(6)对基因转录水平进行相对定量, 即通过计算 Cd 暴露组(实验组)与未经 Cd 处理组(对照组)的 $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{Target}} - Ct_{\beta\text{-actin}})}$ 的比值, 来探讨 Cd 胁迫对酵母 *SPBC776.03* 转录水平的效应。

3. 结果与分析

3.1. Rad22 C 端携带 GFP 标签的酵母株(Rad22-GFP)构建

1) 用于同源重组的 GFP-kanMX6 片段的扩增

以质粒 pFA6a-GFP (S65T)-kanMX6 为模板进行 PCR 扩增, 得到 GFP-kanMX6 module DNA 片段; 引入 KanMX 抗生素抗性标记是为了方便后续的转化子筛选; 更为重要的是, 设计基因特异性的长引物以便 PCR 产物能与酵母 Rad22 基因 3'-末端序列通过同源重组而实现交换, 即 GFP-kanMX6 标签镶嵌到 Rad22 蛋白 C 端。这一对 PCR 引物 5'端为靶基因 Rad22 特异性的同源臂(~80 bp 长, 详见实验方法 1.2.1); 根据文献[4], PCR 扩增产物应为两端带有同源臂序列(酵母基因组上紧挨靶基因 Rad22 终止密码子的上下游对应序列)、中间为源于 pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 质粒的 GFP-kanMX6 组件 DNA, 长度约 2.6 kb。

通过以上设计的 PCR 引物, 采用高保真的 KOD DNA 聚合酶进行扩增, PCR 热循环参数为: 94°C 预变性 4 min, 30 循环的 98°C 15 sec, 66°C 5 sec, 72°C 40 sec, 最后 72°C 延伸 10 min, PCR 产物经 0.85% 琼脂糖凝胶电泳得到条带符合预期(图 2, ~2.6 kb), 说明用于同源重组的 GFP-kanMX6 组件 DNA 扩增成功。3 管样品目标条带经割胶回收后合并成 1 管, 用于后续的转化实验。

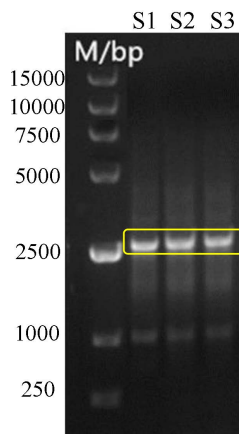


Figure 2. Electrophoresis of GFP-KanMX6 DNA fragment that was PCR-amplified using pFA6a-GFP (S65T)-kanMX6 as the template. The resulting PCR products were loaded on the 0.85% agarose gel. The left lane was DNA marker D15000 (M/bp) and S1~S3 represented sample No.1~3; the GFP-KanMX6 DNA fragment was obtained by PCR amplification as expected, which was marked by the yellow rectangle in the gel

图 2. 以质粒 pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 为模板扩增 GFP-kanMX6 片段的电泳图, PCR 产物上样 0.85% 琼脂糖凝胶, 最左边为 DNA marker D15000 (M/bp), S1~S3 为 1~3 号样品; 黄色框内表示约 2.6 kb 大小的电泳条带, 符合预期, 即为 GFP-kanMX6 片段, 可用于后续转化

2) 阳性转化子 Colony PCR 鉴定

转化实验中在 YE5S/G418 影印平板上出现的抗性转化子, 接种于 2 mL YE5S/G418 液体培养基中培养 11 h~12 h 至其 $OD_{600} \approx 0.5$, 用酵母基因组提取试剂盒, 提取其基因组 DNA, 然后进行 Colony PCR 鉴定及琼脂糖凝胶电泳; Colony PCR 所用的正向引物 GFP-F: 5'-GGTCCTTCTTGAGTTTGTAAC-3'、与 GFP-kanMX6 组件上 GFP 相匹配的序列(图 3(a)), 反向引物 Rad22-R-GFP-C-tag: 5'-CATCGTAGTTTTCTC

GCGACC-3'、与 Rad22 基因末端距终止密码子 50 bp~30 bp 处对应。Colony PCR 鉴定结果如图 3(b)，构建成功的转化子电泳条带预期为 740 (= 731 - 41 + 50) bp。

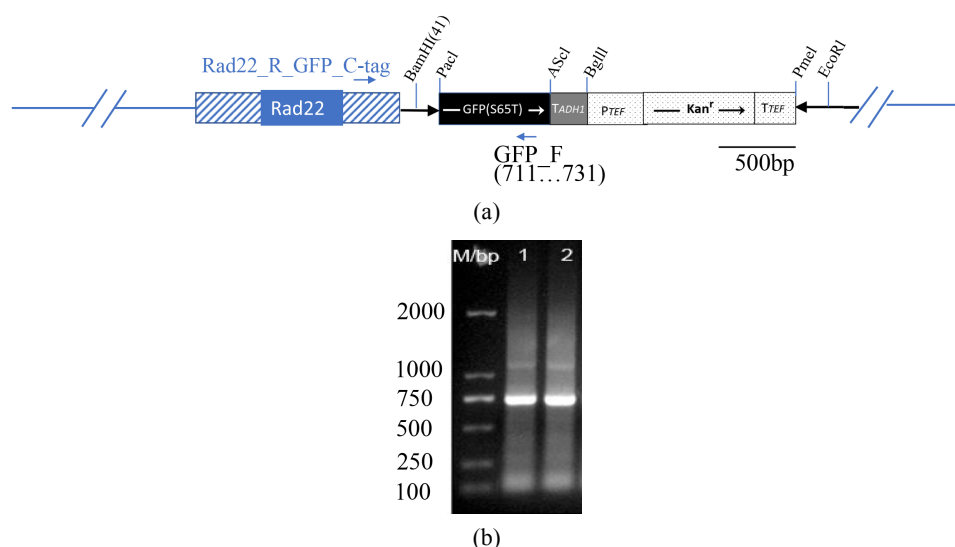


Figure 3. Colony PCR verification of positive transformants (a) Schematic diagram of the genomic DNA (partial) from Rad22-GFPKanMX transformants illustrating the 3'-terminal tagging of Rad22 coding sequences (CDS) with GFP-KanMXcassette, achieved by homologous integration and PCR-based gene targeting. The primers used in colony PCR verification, namely GFP-F, and Rad22-R-GFP-C-tag, matched their respective chromosomal locus nucleotides, as indicated by the arrows. The numbers in the brackets following the *BamHI* and GFP-F, respectively, represented their nucleotide locus on the GFP-KanMXmodule; (b) Electrophoretic graph of colony PCR products. The left lane was DNA marker DL2000 (M/bp), and 1~2 being the transformants 1~2. The expected band was 740 bp

图 3. 转化子的 colony PCR 鉴定(a) Rad22-GFPKanMX 转化子基因组 Rad22 编码序列 3'端通过同源重组而实现 GFPKanMX 融合共表达的示意图, Colony PCR 所用的正向引物 GFP-F、反向引物 Rad22-R-GFP-C-tag 各自与模板(基因组 DNA)结合位置见图中箭头所示, GFP-KanMXmodule 的 *BamHI* (41)以及引物 GFP-F (711.....731)的括弧中数字代表它们在 GFPKanMXmodule 上的核苷酸位置;(b) colony PCR 产物的电泳图,最左边为 DNA marker DL2000 (M/bp), 1~2 分别为转化子 1~2 号, 预期条带为 740 bp

3.2. 显微镜检荧光点标记的 DNA 修复灶

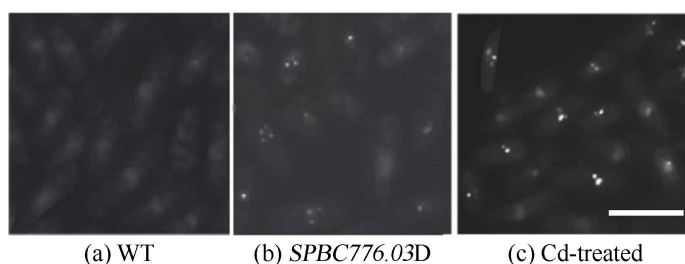


Figure 4. Microscopic examination of Rad22-GFP DNA repair foci: (a) wild type (WT); (b) *SPBC776.03Δ* (*SPBC776.03 D*) strain; (a)~(b) are in unstressed conditions; (c) Cd-treated WT cells, Scale bar: 10 μm

图 4. Rad22-GFP DNA 修复灶(荧光点)的显微镜检图: (a) 野生菌株(WT)细胞; (b) *SPBC776.03Δ* (*SPBC776.03D*)菌株; (a)~(b)均未受 Cd 暴露; (c) Cd 处理的 WT 细胞, 比例尺 10 μm

为了直观观察活细胞中的 DNA 损伤, 我们采用在其染色体内源启动子控制下表达 Rad22-GFP 融合蛋白的酵母细胞[3]。DNA 损伤相关蛋白 Rad22 是单链 DNA 结合蛋白, 在同源重组过程靶向到双链断裂点以及其它有单链 DNA 裸露的位点, 在 S 期于 DNA 损伤位置形成 Rad22-GFP DNA 修复灶(荧光点)。

我们通过荧光显微镜观察(图 4), 发现与未受 Cd 胁迫的野生菌株(WT)相比, 镉暴露的酵母菌株在细

胞周期 S 期出现多个(>2 个)荧光点, 表明镉具有致 DNA 损伤的效应, 即遗传毒性。与此同时, 阳性对照 *SPBC776.03Δ* 菌株即使未受镉胁迫, 其细胞周期 S 期仍然高频出现多个(>2)荧光点, 提示 *SPBC776.03* 基因为酵母的遗传稳定性所必不可少。

3.3. 染色体丢失检测

通过人工微型染色体丢失检测, 敲除株 *SPBC776.03Δ* 体现出显著的染色体丢失比率, 迥异于野生型酵母株, 结果如图 5 所示, 红色菌落占菌落总数的比率表示染色体丢失率。

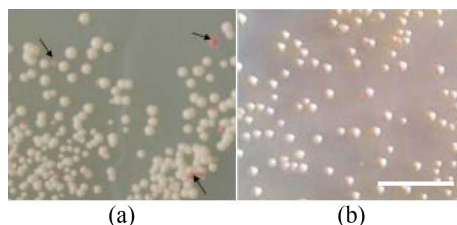


Figure 5. Artificial mini-chromosome loss assays for *SPBC776.03Δ* (a) versus WT (b) cells. *SPBC776.03Δ* cells displayed some frequency of mini-chromosome losses as evidenced by red colonies (marked by black arrows), Scale bar: 1 cm.

图 5. 染色体丢失检测实验: 相比于野生型酵母株(b), *SPBC776.03Δ* 敲除株(a)表现出一定比率的微型染色体丢失(图中箭头所指的红色菌落), 比例尺 1 cm

基于以上 DNA 修复荧光点检测以及人工微型染色体丢失测定结果, 与酵母野生株相比, *SPBC776.03Δ* 敲除株体现 S 期 DNA 修复的明显异常, 说明 *SPBC776.03* 基因在裂殖酵母 DNA 受损之后的修复过程中起作用。已有文献报道, 镉暴露导致酵母的高突变率[6], 机制研究认为, Cd 的致突变性与 Cd 造成酵母复制后错配修复(mismatch repair, MMR)能力下降密切相关, 然而具体的 MMR 靶点尚未明了。敲除株 *SPBC776.03Δ* 的染色体丢失测定, 表明其有丝分裂(M 期)染色体分离行为存在异常, 这佐证了 *SPBC776.03* 基因敲除所致的 S 期 DNA 修复失常是酵母 M 期染色体不能准确分离的重要原因。

3.4. Cd 暴露下酵母 *SPBC776.03* 转录水平的检测(qPCR)

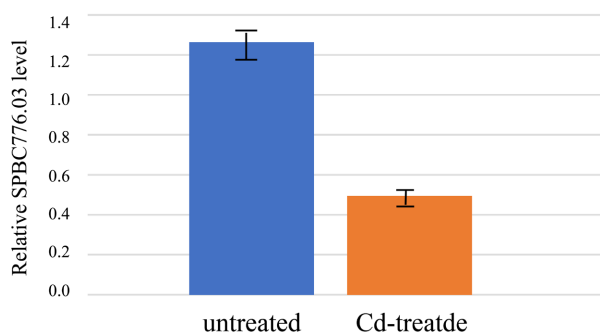


Figure 6. Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) analysis of transcriptional levels of fission yeast *SPBC776.03* under cadmium exposure. The untreated WT yeast cells were set as the control. The housekeeping gene β -actin served as the internal control

图 6. 实时荧光定量 PCR (qPCR)测定 Cd 暴露下酵母细胞的 *SPBC776.03* 基因转录水平, 未经 Cd 处理的野生型酵母作为对照; qPCR 中采用 β -actin 作为内参基因

为了进一步探讨 Cd 暴露是否会影响酵母细胞周期有丝分裂相关基因 *SPBC776.03* 转录, 我们进行实时荧光定量 PCR (qPCR)测定其 mRNA; 基于 Nature Protocols (2008)文献中相对 Ct 法(comparative Ct method) [7]进行目标基因转录的相对定量, 即: 通过分别计算 Cd 暴露组(实验组)与未经 Cd 处理组(对照

组)的 $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{Target} - Ct_{\beta-actin})}$, 并将 $\text{transcriptional fold change} = 2^{-(Ct_{Target} - Ct_{\beta-actin})_{Cd-treated}} / 2^{-(Ct_{Target} - Ct_{\beta-actin})_{untreated}}$ 用于评价 Cd 胁迫对酵母 *SPBC776.03* 转录水平的影响。实验结果表明, 经 $100 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 处理的酵母细胞中, *SPBC776.03* 基因转录下调 3 倍(图 6), 说明细胞通过调低一些信号通路以应激镉胁迫。这提示我们, *SPBC776.03* 基因可能是酵母细胞受重金属镉离子胁迫的响应基因。

4. 讨论

重金属镉对人体有毒, 多个国家禁止其在某些产品里使用, 比如儿童玩具、文具; 世界卫生组织 WHO 对于人体的镉摄取每周限量设为 $7 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重[8]; 研究证据表明, 镉暴露诱导基因组不稳定性; 基因组不稳定性源于细胞周期中基因组变化的累积, 被公认为癌症发生的主要驱动因素[9]。寻找并建立镉的遗传毒性的快速监测方法和技术, 非常必要。

迄今, 一系列采用微生物、植物和哺乳动物培养细胞的体外测试系统以及体内测试体系比如微核实验、染色体畸变等, 已建立并普遍应用在筛选环境中潜在的遗传毒物质。Ames 试验是应用最为广泛的遗传毒性测试方法, 然而受制于其所用的细菌(沙门氏杆菌)细胞迥异于真核生物细胞——基因组结构、基因调控以及细胞代谢, Ames 试验存在着明显的不足。某些哺乳动物培养细胞, 比如来源于肿瘤细胞系的细胞可能对 DNA 损伤更敏感或者更具抵抗性, 不合适作为遗传毒性测试体系[10]。酵母是真核生物, 在单倍体、二倍体状态均能生长, 并在实验室条件下相互转换, 具有遗传可操纵性、生长快等特点; Jia 等在出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 构建了基于 DNA 损伤诱导基因 RNR3 表达的报道菌株来测试遗传毒性物质[11]。裂殖酵母与出芽酵母都是基因组全测序的模式生物; 与出芽酵母相比, 裂殖酵母在细胞周期调控、rRNA 合成以及基因表达调控等方面与哺乳动物细胞具有更高相似性。

研究公认, DNA 修复是镉毒害的重要靶点, 镉暴露导致细胞的内源和外源 DNA 损伤不能及时修复, 从而大大提高了基因组改变的频率[8]。本研究工作聚焦于酵母 DNA 损伤相关基因 Rad22, 已建立起用于镉暴露的生物监测体系——Rad22-GFP 酵母株, 该生物监测周期短, 简便(只需酵母培养、荧光显微镜)、易行, 可作为环境中镉的遗传毒性的初筛监测系统。

5. 结论

本研究基于酵母 DNA 损伤相关基因 Rad22, 已成功建立生物监测体系——Rad22-GFP 酵母株, 可作为环境镉暴露及其镉遗传毒性的初筛系统。

基金项目

国家自然科学基金项目(42176211)资助。

参考文献

- [1] Koedrith, P., Kim, H., Weon, J. and Seo, Y.R. (2013) Toxicogenomic Approaches for Understanding Molecular Mechanisms of Heavy Metal Mutagenicity and Carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **216**, 587-598. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.02.010>
- [2] Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., et al. (2021) Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, Article No. 643972. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>
- [3] Chen, J.-S., Beckley, J.R., Ren, L., et al. (2016) Discovery of Genes Involved in Mitosis, Cell Division, Cell Wall Integrity and Chromosome Segregation through Construction of *Schizosaccharomyces pombe* Deletion Strains. *Yeast*, **33**, 507-517. <https://doi.org/10.1002/yea.3172>
- [4] Bähler, J., Wu, J.-Q., Longtine, M.S., et al. (1998) Heterologous Modules for Efficient and Versatile PCR-Based Gene Targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**, 943-951.

-
- [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<943::AID-YEA292>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<943::AID-YEA292>3.0.CO;2-Y)
- [5] Niwa, O., Matsumoto, T., Chikashige, Y. and Yanagida, M. (1989) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Minichromosome Deletion Derivatives and a Functional Allocation of Their Centromere. *The EMBO Journal*, **8**, 3045-3052. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08455.x>
- [6] Jin, Y.H, Clark, A.B., Slebos, R.J.C., *et al.* (2003) Cadmium is a Mutagen that Acts by Inhibiting Mismatch Repair. *Nature Genetics*, **34**, 326-329. <https://doi.org/10.1038/ng1172>
- [7] Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. *Nature Protocols*, **3**, 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- [8] Filipič, M. (2012) Mechanisms of Cadmium Induced Genomic Instability. *Mutation Research*, **733**, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.09.002>
- [9] Shen, Z. (2011) Genomic Instability and Cancer: An Introduction. *Journal of Molecular Cell Biology*, **3**, 1-3. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq057>
- [10] Manshian, B.B., Soenen, S.J., Brown, A., *et al.* (2016) Genotoxic Capacity of Cd/Se Semiconductor Quantum Dots with Differing Surface Chemistries. *Mutagenesis*, **31**, 97-106. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev061>
- [11] Jia, X., Zhu, Y. and Xiao, W. (2002) A Stable and Sensitive Genotoxic Testing System Based on DNA Damage Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, **519**, 83-92. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00129-8)