

以螢光共振能量轉移技術作為 戴奧辛生物檢測模式之研究

林紀佑¹、謝俊弘¹、李偉山³、張簡國平³
潘建源¹、李心予^{12*}

¹ 國立台灣大學動物學研究所

² 國立台灣大學生命科學系

³ 正修科技大學化工與材料工程研究所

【摘要】戴奧辛(dioxin)是一群含多氯聯苯化合物之總稱，由於具有高度脂溶性，多經由食物鏈積存於生物體內，影響賀爾蒙的調控，甚至造成細胞癌化，是目前所知毒性最強之污染物。目前檢測戴奧辛多使用質譜儀分析等化學方法，然而隨著戴奧辛在生物體內致毒機制了解與日俱增，生物檢測方法逐漸受到重視，因此本研究利用細胞反應來辨識戴奧辛等環境污染物，根據AHR(Aryl hydrocarbon receptor)-HSP90(Heat Shock protein 90) pathway，藉由螢光共振能量轉移技術(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)訊號偵測戴奧辛污染程度，在時間及成本上占有相對優勢，且較能真實反應環境汙染因子對生物體的毒害程度。本實驗設計上，分別建構AHR-CFP與HSP90-YFP的表達質體，同時送入大鼠肝癌H4IIEC3細胞中，結果發現FRET訊號與戴奧辛污染程度有依賴關係，未來可能作為輔助戴奧辛等環境污染物大量篩選的檢測工具。

【關鍵詞】戴奧辛、螢光共振能量轉移、生物檢測

前言

戴奧辛(dioxin)是約210種含多氯聯苯結構式的化合物的總稱，在此類化合物的苯環上，不同位置的氫原子被氯所取代時，可以產生不同類型的戴奧辛，包括75種多氯聯苯戴奧辛及135種多氯聯苯呋喃，其中最著名的2, 3, 7, 8 - tetrachlorodibenzo - p - dioxin (簡稱2, 3, 7, 8-TCDD)，即是人類合成的化合物中毒性最強，來自於合成氯類物質的污染物(Hu, et al., 1999)。

戴奧辛致癌已被國際癌症研究中心(IARC)於1997年將2, 3, 7, 8-TCDD歸類為「人類確定致癌物」，證實肝、肺、胃癌及淋巴瘤都和戴奧辛有關(Bock, et al., 1995)。而美國環保署(US-EPA)與世界衛生組織(WHO)亦將戴奧辛歸類為可能人類致癌物；日本通產省與環境廳亦將戴奧辛歸類為「環境荷爾蒙」之一。其來源包括廢物、垃圾與含鉛汽油的燃燒、造紙木漿的漂白等。九成以上的戴奧辛曝露於我們的日常飲食、乳製品、蛋還有魚等蛋白質類食物(Rideout, et al., 2004)。戴奧辛屬於親脂性的化學物質，每個人身上多少都有戴奧辛，這是因為戴奧辛不能迅速被環境分解，因此容易經由食物鏈而累積在生物體內產生毒性作用，超過九成的戴奧辛是經由食入方式進入人體(Bock, 1997)。持續少劑量的暴露亦可能引發癌症，進而造成對健康的影響(Wissing, 1998)。

* 通訊作者，臺北市羅斯福路四段一號 Tel:(02)3366-2499 Fax:(02)2363-6387
E-mail: hsinyu@ntu.edu.tw

戴奧辛對細胞的影響大多是經由AHR(Aryl hydrocarbon receptor)仲介反應(Rowlands, et al., 1997)，因此了解AHR在戴奧辛訊息傳遞路徑上的功能異常重要。AHR是一種固醇類賀爾蒙受器的轉錄因子，屬於bHLH-PAS轉錄因子蛋白家族，最主要的特色就是含有PAS domain，可促進配體鍵結及促進例如AHR與HSP90蛋白之間雙體化結合作用的進行(Levine, et al., 2001)，以扮演訊號傳遞蛋白的角色(Wilson, et al., 1998)。此外，TCDD所導致的生物風險亦被證實與AHR的活化與結合能力具有強烈的相關性。當細胞所處的環境中含有微量的戴奧辛時，脂溶性的戴奧辛能夠輕易的穿透細胞膜上的磷脂雙層疏水結構而進入細胞質與AHR結合。一旦AHR與戴奧辛結合，AHR與HSP90所形成的複合物經由配體(ligand)的結合後，造成AHR從HSP90的結合態解離，進而轉進細胞核內，與AHR的核內結合對象ARNT(AHR nuclear translocator)雙體化結合，進而活化代謝相關基因像CYP1A1及CYP1A2，並活化基因的轉錄作用(Nebert, et al., 1993)。然而根據目前研究所知，AHR-HSP90複合物並非就單純只有這兩種蛋白質組成(Carlson, et al., 2002; Lees, et al., 2002)，包括AIP、XAP2、Ara9等蛋白質也共同參與形成蛋白質複合物，其中AIP是免疫親和蛋白(Immunophilin)的一種，它扮演HSP90的co-chaperone的角色，它在形成AHR-HSP90複物物的時候存在於AHR與HSP90的中間，功能是穩定AHR-HSP90複合物。由於細胞對戴奧辛的高敏感度，戴奧辛於哺乳類動物細胞誘導AHR-HSP90複物物的解離作用十分適合用來當作戴奧辛的生物檢測模式。

HSP90被認為能夠與未鍵結配體的固醇類受器作用，調節這些固醇類受器重要的功能，包括抑制未鍵結配體的固醇類受器與DNA結合及進行轉錄動作，扮演一種伴隨蛋白(Chaperone)的角色。HSP90在細胞質內扮演兩個功能，第一：遮蔽固醇類賀爾蒙受器避免在無配體結合態的情況下進入細胞核內扮演轉錄活化因子的角色，第二：暴露且穩定固醇類賀爾蒙受器的配體結合位置構型，使得配體能夠與固醇類賀爾蒙受器結合(Housley, et al., 1990)。

目前檢測戴奧辛多使用化學方法，然而隨著戴奧辛在生物體內致毒機制了解與日俱增，生物檢測方法逐漸受到重視，本實驗欲利用螢光共振能量轉移(FRET)技術來偵測戴奧辛。FRET原理是當二螢光蛋白有相互作用時，因為能量共振轉移，會有FRET訊號之產生；當二螢光蛋白解離之後，因為距離太遠無法能量共振轉移，而失去FRET訊號。由於AHR與HSP90在無戴奧辛處理之下，穩定地在細胞質鍵結，本研究期望利用細胞經由AHR與HSP90訊號仲介之路徑反應，利用青色螢光蛋白(ECFP)與黃色螢光蛋白(EYFP)分別標定AHR與HSP90並且偵測FRET訊號產生；當處理戴奧辛之後，AHR與HSP90解離並且造成AHR轉進細胞核，標定的螢光分子之間因為距離太遠，而失去FRET訊號。

FRET的全名是Fluorescence Resonance Energy Transfer，螢光共振能量轉移(FRET)是一種螢光光譜技術，可以用來量測分子間的距離。FRET的原理是利用供體及受體兩個螢光分子，當供體的發射光譜與受體的激發光譜有重疊時，在兩分子距離極為接近的情況下，供體由激發態躍遷所釋放出的能量將轉而激發受體，這種能量轉換是一種雙原子偶極力作用(dipole-dipole interaction)。FRET的有效範圍約從20~100Å，也就是說，我們可以用光學的方法準確地量測光學解析度以下的尺度。此外，FRET也被有效的應用於生物分子現象的研究。然而使用FRET必須先滿足三個基本條件：第一、供體的放射光譜與受體的吸收光譜有明顯的重疊；第二、供體與受體之間有一定的距離限制，有效範圍在20~100Å；第三、供體與受體各別的螢光蛋白彼此容易配合(Day, et al.,

2001)。此外，實驗者亦可經由增加供體的放射光譜與受體的吸收光譜兩者的重疊來改善FRET的效率。

頻譜之間的漏光(spectral cross talk)是由二個部分組成的，第一：從受體頻道偵測到供體放射訊號，第二：激發供體的波長直接對受體螢光蛋白激發。然而，供體與受體頻譜之間有愈多的重疊，受體放射訊號中偵測出愈多的背景訊號。所以頻譜之間的漏光(spectral cross talk)對於要使用何種的螢光蛋白作研究成為重要的因素。CFP與YFP是當中較為適當的一對，也是為什麼它們普遍被使用於FRET的研究。表一是為了螢光蛋白頻譜之間的漏光(spectral cross talk)最小化與改善訊號雜訊比所選擇的濾鏡(filter)。

戴奧辛會經由AHR-ARNT路徑調控代謝機制，當環境中有戴奧辛時，誘導AHR從HSP90的結合態解離，進而轉進細胞核內，與AHR的核內結合對象ARNT(AHR nuclear translocator)雙體化結合，去活化特定的基因，調節細胞內許多的生理活性。本實驗設計將哺乳類動物細胞的AHR及HSP90 DNA序列分別分離出來，各自插入能夠表現出不同螢光色澤的哺乳類動物細胞螢光表現載體，轉殖入哺乳類動物細胞，使得AHR及HSP90基因序列能夠在哺乳類動物細胞內自體(Endogenous)表現出螢光AHR及螢光HSP90蛋白質，並且期望螢光AHR及螢光HSP90蛋白質能夠於細胞中自體生成AHR-HSP90多重螢光複合物，建立能夠表現AHR-HSP90多重螢光複合物細胞株。藉由於細胞培養環境中添加不同劑量之戴奧辛，於螢光顯微鏡下觀察AHR-HSP90多重螢光複合物的解離作用是否有程度上的差異。由於觀察AHR-HSP90多重螢光複合物能夠於分子內產生FRET，螢光共振能量傳遞的現象，因此細胞培養環境中若有戴奧辛的存在，可藉由戴奧辛訊息傳遞路徑造成AHR-HSP90複合物的解離，使得分子內的FRET現象消失，進而轉而變成AHR與HSP90相互獨立存在的螢光。並且依據環境中存在戴奧辛濃度的不同而造成AHR-HSP90複合物分子內的FRET現象消失程度上的差異，觀測戴奧辛對此轉殖後之哺乳類細胞有無梯度依賴的影響。

HSP90哺乳類動物細胞螢光表現載體的設計必須考慮下列兩點：第一、必須設計能夠與AHR哺乳類動物細胞螢光表現載體表現不同的色澤，第二、由於表現出的螢光AHR蛋白與螢光HSP90蛋白必須共同表現出有螢光共振能量傳遞(FRET)效應，以區分結合態的AHR-HSP90複合物及解離後單獨存在的螢光AHR蛋白及螢光HSP90蛋白。因此HSP90哺乳類動物細胞螢光表現載體的設計必須配合AHR哺乳類動物細胞螢光表現載體，作一個理想的搭配，因此我們採用CFP與YFP螢光蛋白(Day, et al., 2001)。由於pECFP表現的螢光蛋白是呈現青色，利用458nm波長的光能夠激發青色螢光，另一方面，pEYFP表現的螢光蛋白是呈現黃色，採用545/25nm濾鏡接收放射波長。於無戴奧辛時，AHR與HSP90在細胞質中穩定的鍵合，由於距離接近，458nm雷射激發青色螢光，並造成螢光能量共振轉移的現象發生，應可偵測到黃色螢光，扣掉漏光後以此計算FRET訊號；當環境中有戴奧辛，AHR與HSP90解離，AHR轉進細胞核內，無法產生螢光能量共振轉移，除了漏光外沒有辦法偵測到黃色螢光。

材料與方法

Cell culture

H4IIEC3大鼠肝癌細胞(Rat hepatoma, 購自食品工業研究所)使用含有20% 馬血清(horse serum, 購自BioWest)及5% 胎牛血清(Fetal Bovine serum, 購自Hyclone Inc.)的Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, 購自GibcoBRL)培養於37°C含5% 二氧化碳之恆溫培養箱中, 每3天繼代一次。

質體建構

AHR-CFP質體建構: 從Hepa1c1c細胞中純化出genomic DNA, 利用PCR的方法, 分別以引子AHR-5': GCTAG CATGA GCAGC GGCGC CAACA T; AHR-3': CTCGA GCAGG AATCC ACCAG GTGTG A夾出AHR基因, 將此段PCR產物先和yT&A Cloning Vector (購自Yeastern Inc.)進行接合反應, 經transformation送入competent cell中進行增殖, 挑選出來的質體經PCR及限制酶切割確定含有AHR後, 利用限制酶切割AHR的DNA片段, 再以T4 DNA ligase接合至含有青色螢光基因的pECFP-C1 vector (購自Clontech)上, 最後得之質體再以定序確認, 命名為AHR-CFP(圖一)。HSP90-YFP質體建構: 從J774A.1細胞中純化出genomic DNA, 利用PCR的方法, 分別以引子HSP90-5': CTCGA GTGGT GG AGA CCTTT GCGTT TC; HSP90-3': TCTAG AGGCT TCTTC CAGGA GGCTT T, 夾出HSP90基因, 將此段PCR產物先和yT&A Cloning Vector (購自Yeastern Inc.)進行接合反應, 以前述方法Subclone進pEYFP-C1 vector (購自Clontech), 最後得之質體再以定序確認, 命名為HSP90-YFP(圖二)。

轉殖試驗(Transfection)

準備 2×10^7 cells/ml的細胞於預先放置100 mm之蓋玻片至6-well plates中, 換上1 ml未含血清的DMEM, 將4 μ g質體DNA加入250 μ l DMEM, 以及10 μ l Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (購自Invitrogen Inc.)加入250 μ l DMEM的混合液感染細胞, 4小時後加入200 μ l FBS。再經20小時後, 即完成轉殖試驗。

戴奧辛配製與感染

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- ρ -dioxin Solution, (購自BOEHRINGER MANNEHEIM Inc.)原始濃度為10 μ g/ml, 稀釋溶於DMSO中(購自Sigma)。將配製好之戴奧辛容易分別依指定的劑量與時間加入細胞液中進行處理。

玻片製備

將6-well內細胞液吸除, 經PBS清洗後加入1ml之4% 甲醛固定30分鐘。完成後用PBS清洗三次及二次蒸餾水清洗一次後, 將玻片取出並將細胞浮貼面朝預先加入Fluoromont封片膠之蓋玻片上放置即完成。

FRET螢光顯微鏡偵測

使用Con-focal LSM 510 Meta顯微鏡於暗室進行操作。首先分別設定CFP激發光源為458nm、YFP激發光源為514nm, 以LSM 510 Meta電腦軟體扣除cross-talk數值, 以利作正確FRET訊號量化計算。條件設定以後, 放入檢體, 先於CFP視野找尋預檢測之細胞, 再切換至YFP視野, 確定細胞內同時含有CFP、YFP訊號。以Fc(Youvan, 1997)與FRETN(Gordon, 1998)兩種方式進行FRET量化計算。

結果

戴奧辛誘導FRET訊號強度下降

H4IIEC3細胞經共同轉殖AHR-CFP與HSP90-YFP建構質體之後，感染不同濃度戴奧辛兩小時。結果很明顯的發現到在未處理戴奧辛所誘導細胞產生FRET訊號為最強，同時也發現了最弱的CFP訊號與最強的YFP訊號(圖三)。另一方面，經感染10 pM或100 pM濃度的戴奧辛後則誘導FRET訊號產生有明顯的下降，並且發現CFP訊號的增強與YFP訊號強度的下降(圖三)。將訊號的強度量化之後，我們很明顯的可以發現到經過戴奧辛感染10 pM與100 pM濃度的戴奧辛造成了FRET訊號強度分別下降了2.85與3.21倍(圖四)。

戴奧辛誘導FRET訊號強度下降有著劑量依賴的關係

為了更進一步探討是否隨著戴奧辛感染的劑量增加而導致FRET訊號強度有所改變。成功轉殖AHR-CFP與HSP90-YFP建構質體的H4IIEC3細胞，經過感染0 pM, 1 pM, 5 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM各種不同濃度的戴奧辛兩小時之後，偵測其FRET訊號的強度。結果顯示，在0 pM的戴奧辛濃度刺激之下H4IIEC3能夠產生最強的FRET訊號強度，然而隨著1 pM, 5 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM的戴奧辛濃度刺激之下，FRET訊號強度的下降量各為1.02, 2.45, 2.86, 2.89, 3.21倍。結果顯示了戴奧辛誘導FRET訊號強度下降有著劑量依賴的關係，而且在5 pM就有了非常明顯的下降量(圖四)。

戴奧辛誘導FRET訊號強度下降有著時間依賴的關係

為了更進一步探討是否隨著戴奧辛感染的時間增加而導致FRET訊號強度有所改變，成功轉殖AHR-CFP與HSP90-YFP建構質體的H4IIEC3細胞經過感染10 pM的戴奧辛濃度0小時, 1小時, 2小時, 4小時, 8小時, 16小時各種不同時間，偵測其FRET訊號的強度。結果顯示，在0小時的戴奧辛濃度刺激之下H4IIEC3能夠產生最強的FRET訊號強度，然而隨著0小時, 1小時, 2小時, 4小時, 8小時, 16小時的10 pM的戴奧辛刺激之下，FRET訊號強度的下降量各為2.55, 3.22, 3.24, 3.11, 0.23倍。結果顯示了戴奧辛誘導FRET訊號強度下降有著時間依賴的關係，而且在1小時就有了非常明顯的下降量(圖五)。然而，在16小時卻產生FRET訊號強度上升的情況。

討論

在實驗設計上，我們預期經由轉殖AHR-CFP與HSP90-YFP質體能夠表達青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白的細胞，在處理戴奧辛後，藉由戴奧辛促使青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白從原本的結合態解離，利用偵測FRET訊號下降量的變化來得知青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白解離程度，進而推估戴奧辛的濃度。經由處理一系列不同濃度的戴奧辛，與所偵測到這些不同濃度戴奧辛誘導之細胞產生之FRET訊號強度製作成一個標準曲線圖，即可以利用此標準曲線圖當作偵測戴奧辛濃度的生物檢測工具。本研究所使用的H4IIEC3細胞為大鼠肝癌細胞，因為肝臟被認為是動物體內對戴奧辛及類似的毒物最為敏感的器官之一(Barbieri, et al., 1988)，因此使用肝癌細胞來進行實驗不僅可以利用其對於戴奧辛的靈敏度，更可以利用癌細胞易於培養的特性使實驗易於進行。本研究所使用的AHR與HSP90基因均取自小鼠的基因，其目的在於希望表現出的青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白不會與H4IIEC3大鼠細胞本身的AHR與HSP90交互作用而導致實驗結果失準。

由實驗結果發現，於無戴奧辛時，H4IIEC3細胞能夠表達最強的FRET訊號強度，並且由共軛焦顯微鏡掃描的影像也顯示FRET訊號都表現在細胞質的部分，而細胞核的部分則沒有偵測到任何FRET訊號，這顯示青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白在細胞質的部分緊密的結合成一個異單元體(Heterodimer)(Heid, et al., 2000)，因而產生FRET的訊號。然而，不論處理10 pM或100 pM濃度的戴奧辛之後，FRET訊號明顯變弱，這是因為青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白解離而導致細胞質內FRET訊號的降低。另外實驗結果發現，處理戴奧辛之後，青色螢光AHR蛋白轉進細胞核內，也因此導致CFP訊號於細胞核內的增強。另一方面，隨著AHR與HSP90的解離，也導致YFP與FRET訊號的下降。研究結果證實了AHR與HSP90所產生的異單元體會因為戴奧辛的存在而解離，並且AHR會接著進入到細胞核內，這些結果也與前人的研究相吻合(Sogawa, et al., 1997)。

由於CFP與YFP的激發波長十分接近，因此利用此兩種螢光蛋白為組合來偵測FRET訊號較其他螢光蛋白質的組合更加適當(Majoul, et al., 2002)。但是由於激發波長的過於接近，因此發生漏光的現象在所難免。然而，從各種濃度戴奧辛感染所攝影CFP, YFP與FRET影像變化趨勢依然證實戴奧辛對AHR與HSP90蛋白質交互作用的影響。隨著10 pM與100 pM的戴奧辛感染細胞，CFP的強度較0 pM的戴奧辛刺激來的強，然而YFP與FRET的訊號則是10 pM與100 pM較0 pM感染細胞來的弱，此一趨勢證實即使有漏光的現象也不影響利用FRET訊號偵測戴奧辛影響細胞的實用性。

我們的研究結果指出戴奧辛刺激同時表現青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白的H4IIEC3細胞FRET訊號的下降，並且有著劑量依賴的關係(圖四)，並且在5 pM的戴奧辛下有明顯的下降量。然而在高於5 pM濃度以上的戴奧辛感染則誘導FRET訊號的下降量有趨於飽和的現象。這些結果指出了利用FRET訊號來偵測戴奧辛的濃度其靈敏度可以達到5 pM的程度，與我們之前利用CALUX Assay偵測戴奧辛的濃度其靈敏度也約為5 pM的程度相吻合(Barbieri, et al., 1988)。另一方面，我們同時發現了戴奧辛刺激同時表現青色螢光AHR蛋白與黃色螢光HSP90蛋白的H4IIEC3細胞FRET訊號的下降有著時間依賴的關係，並且在戴奧辛一個小時後就刺激了最大的FRET訊號下降量。隨著處理的時間變長，戴奧辛誘導FRET訊號的下降量有趨於飽和的現象。然而，在刺激戴奧辛十六小時的時間點上偵測到的FRET訊號強度反而增加，並且為未感染戴奧辛樣本的五倍以上。從共軛焦顯微鏡攝影的影像中發現到，H4IIEC3的型態有圓化(rounding)的現象，並且有大量死亡的情形發生。因此，我們推測H4IIEC3細胞經16小時刺激戴奧辛之後，會造成細胞型態的改變，而這種細胞型態的改變很有可能就是導致螢光訊號增強的主因，最後導致無法確實的偵測到FRET訊號受到戴奧辛的影響。因此利用FRET訊號來偵測戴奧辛的濃度其最適當的時間點約在感染一小時之後，並且其最長時間最好不超過8小時。另一方面，先前我們的研究利用CALUX Assay偵測戴奧辛的濃度最適當的時間點是10至15個小時之間(Huang, et al., 2004)。然而這裡我們利用FRET訊號來偵測戴奧辛的濃度其時間點約在一至八小時之間。這結果指出AHR與HSP90的解離作用是在細胞質內發生，並且在接觸戴奧辛之後就會立即發生，但是戴奧辛影響CYP1A1基因promoter的表現卻是在細胞核才進行(Vrzal, et al., 2005)，並且中間必須經歷許多分子的交互作用才會被引發，因此利用偵測FRET訊號可以在短的時間點就得到結果而利用CALUX Assay需要較長時間是有其相關性。這結果更證實了利用偵測FRET訊號的方法來做為戴奧辛的生物檢測工具相較於CALUX Assay有更為省時的優勢性。

目前已有許多的報導利用FRET技術來研究環境毒物，如戴奧辛、多氯聯苯對細胞生理的途徑研究，如Khan S. 在2007年的報告提到，處理戴奧辛後，AhR轉進細胞核內的現象，在MSF-7、COS-1兩細胞株都可以明顯看見結果，與本實驗結果相符(圖三)，另外，Khan S. 藉由FRET來研究AhR與ER α 蛋白質之間的相互關係，處理戴奧辛後，FRET訊號增強，顯示利用FRET技術來做為毒物的偵測具有可行性(Khan, et al, 2006)；另一篇研究指出，轉染CFP-ER α 與YFP-ER α 質體於MSF-7、COS-1兩細胞株內，處理PCB後，因為ER α 本身會雙體化，FRET訊號增強，與本實驗利用AhR與HSP90蛋白來偵測戴奧辛(圖四)不謀而合(Abdelrahim, et al., 2006)。然而為何使用MSF-7、COS-1細胞株作實驗，是因為戴奧辛已經被證實與癌化有關，並且會干擾雌激素，影響乳癌的產生，MSF-7與COS-1是研究乳癌公認重要的細胞株，但本實驗研究的目的是在於偵測低濃度的戴奧辛，H4IIEC3是大鼠的肝癌細胞，除了易於培養外，由於肝臟是代謝毒物的中心，因此肝細胞對於毒物的偵測上，有其不可取代性。綜合以上結果，利用極為靈敏的FRET技術來研究毒物造成細胞生理的影響，勢必成為一種生物檢測的趨勢。

本篇研究主要的優勢在於提高靈敏度，實驗中所處理戴奧辛的濃度在pM等級，Khan S. 等報告使用的濃度為nM，相對來講我們能提高一千倍的偵測靈敏度，也代表本系統可以偵測到更微量的毒性物質。再者，本實驗的可用性極高，因為我們一方面可以提供影像資訊，用於判斷 AhR 是否有轉進核內的現象(圖三)，另一方面亦可以用於定量(圖四)，製作濃度標準曲線，未知濃度的毒物即可依照標準曲線推知其濃度。

以目前世界各國的戴奧辛食品安全含量標準來看，美國乳製品的含量標準為1 ppt (以脂肪計)，歐盟為5 ppt (以脂肪計)，而我國目前公告的乳製品暫行安全規範是5 pg-TEQ/g(以脂肪計)(經濟部標準檢驗局發布)；以飲用水安全含量標準來看，聯邦飲用水標準為0.00003 g/l，州立飲用水規則中緬因州是0.0000022 g/l；再以焚化爐來看，台灣空氣污染防治所規定的廢棄物焚化爐戴奧辛管制及排放標準值為0.1ng-TEQ/Nm³。換算此生物檢測系統的偵測極限，偵測FRET訊號變化於H4IIEC3細胞中最靈敏可偵測到3.22ppt，低於法規的安全標準。一般認為生物檢測方法並無法達到像化學分析方法那樣微量偵測的程度，但以實驗結果來看，生物檢測系統所能達到的最低偵測極限，確實足以作為戴奧辛日常檢測的工具。

目前國內從事戴奧辛偵測之研究仍然是以質譜儀偵測法為大宗，雖然精準但個別樣品之處理成本十分昂貴，距離大幅之樣品檢測仍有相當之困難度存在。由於戴奧辛於環境中存在最主要是造成對生物細胞的毒害，過去使用化學分析方法評估戴奧辛的生物危害是一種間接的方法，然而戴奧辛生物檢測的貢獻是能夠提出細胞受戴奧辛影響的直接反應，對戴奧辛生物毒害的評估更增添直接的有力證據。除了具有毒理上專一性之外，也較化學方法更為省時且成本低廉，適合於大量樣品的篩選，滿足衛生監督的需求。

利用偵測FRET訊號作為戴奧辛的生物檢測工具無疑的更加改善了先前CALUX Assay的許多限制性，包括感染戴奧辛一小時之後即能得到結果，大大節省了時間。另一方面，螢光物質的穩定性較冷光佳，因此也降低了先前利用冷光為基礎的CALUX Assay所會產生的誤差。簡而言之，利用偵測FRET訊號作為戴奧辛的生物檢測工具更將能發揮優勢，未來可能作為輔助戴奧辛等環境污染物大量篩選的檢測工具，使得利用生物方法檢測戴奧辛更為實用。

表一、FRET濾鏡組合

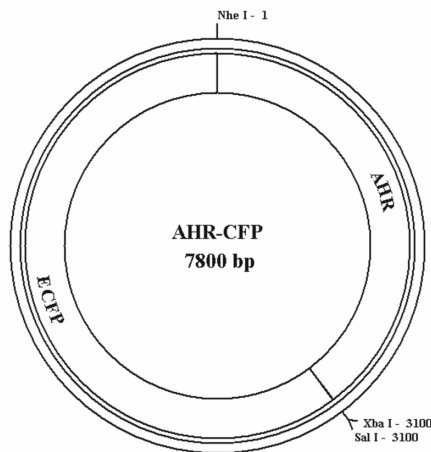
螢光蛋白	激發濾鏡(nm)	雙色鏡	放射濾鏡(nm)
BFP/H33342	365/15	390	460/50
GFP	488/20	505	535/50
YFP	500/15	525	545/25
RFP	535/20	570	590

(引自Day, et al., 2001)

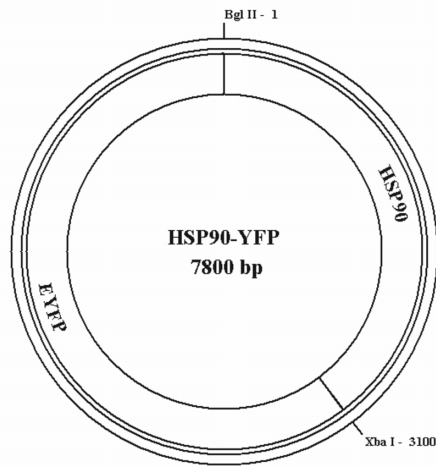
表二、螢光蛋白質的特性

螢光蛋白種類	BFP (Y66H)	CFP (Y66W)	CFP (S65T)	YFP (S65G)	RFP (D.striata)
最大激發波長	382nm	433 nm	488 nm	514 nm	558 nm
最大放射波長	446 nm	477 nm	509 nm	527 nm	583 nm

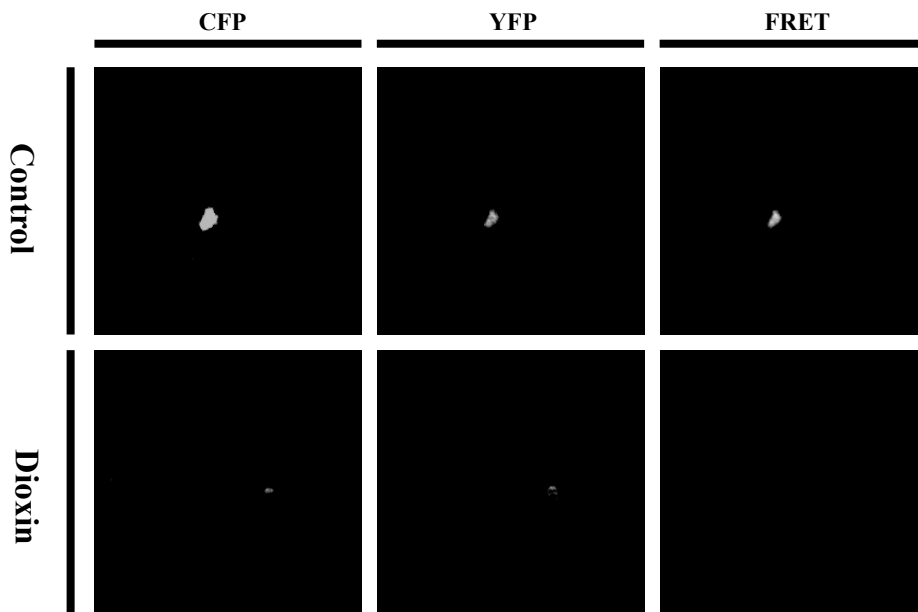
(引自Day, et al., 2001)



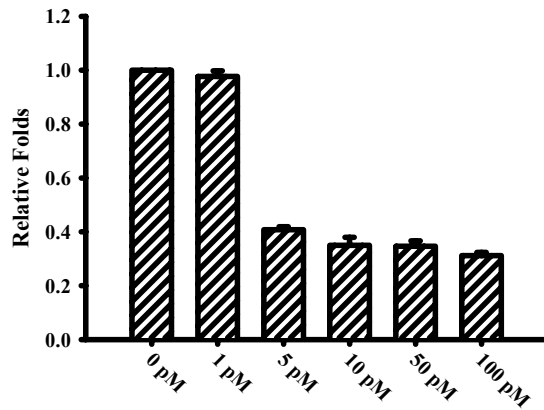
圖一、質體AHR-CFP的構造：質體AHR-CFP裡面包括了小鼠的AHR基因共2418 bp以及完整的PECFP-N1載體序列。經由Nhe I 與Xba I 的限制酵素切割於TA質體內AHR的PCR產物，與經過Nhe I 與Xba I 的限制酵素切割PECFP-C1進行接合。



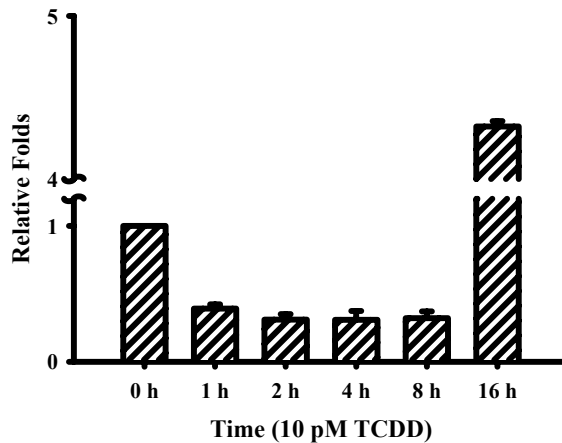
圖二、質體HSP90-YFP的構造：質體HSP90-YFP裡面包括了小鼠的HSP90基因共2507 bp以及完整的PEYFP-C1載體序列。經由Bgl II與Xba I的限制酵素切割於TA質體內HSP90的PCR產物，與經過Bgl II與Xba I的限制酵素切割作用後的PEYFP-C1片段進行接合。



圖三、戴奧辛造成AHR轉進核內現象：比較無處理戴奧辛與處理戴奧辛1小時之CFP channel、YFP channel、FRET channel。處理戴奧辛後，FRET訊號強度明顯降低，並且在處理戴奧辛的CFP channel清楚看見AHR-CFP轉進核內現象。



圖四、戴奧辛誘導FRET訊號強度下降有著劑量依賴的關係：經過轉殖AHR-CFP與HSP90-YFP質體的H4IIEC3細胞，分別處理0 pM, 1 pM, 5 pM, 10 pM, 50 pM, 100 pM不同戴奧辛濃度2小時，製備成玻片後，使用共軛焦顯微鏡拍攝影像，並且搭配適合CFP, YFP, FRET適當激發波長的濾鏡拍攝並記錄影像。使用之目鏡倍率為40倍。Relative Folds的計算方式為實驗組(經戴奧辛感染之樣本)數值與控制組(未經戴奧辛感染之樣本)相除之後所得之結果。



圖五、戴奧辛誘導FRET訊號強度下降有著時間依賴的關係：經過轉殖AHR-CFP與HSP90-YFP質體的H4IIEC3細胞，分別處理0 小時, 1 小時, 2 小時, 4 小時, 8 小時, 16 小時10 pM的戴奧辛，製備成玻片後，使用共軛焦顯微鏡拍攝影像，並且搭配適合CFP, YFP, FRET適當激發波長的濾鏡拍攝並記錄影像。使用之目鏡倍率為40倍。Relative Folds的計算方式為實驗組(經戴奧辛感染之樣本)數值與控制組(未經戴奧辛感染之樣本)相除之後所得之結果。

謝辭

本實驗需要感謝許多曾協助完成者，在此謹謝中研院顯微鏡影像核心實驗室提供儀器以及國科會計劃補助(計畫編號：NSC 93-2621-Z-002-022)，亦感謝中研院分生所簡正鼎老師實驗室，及吳君泰先生提供實驗支援。

參考文獻

- Abdelrahim, M., Ariazi, E., Kim, K., Khan, S., Barhoumi, R., Burghardt, R., Liu, S., Hill, D., Finnell, R., Wlodarczyk, B., Jordan, V. C. and Safe, S. 2006. 3-Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha. *Cancer Res.* 66(4):2459-67.
- Backlund, M., Johansson, I., Mkrtchian, S. and Ingelman-Sundberg M. 1997. Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *J. Biol. Chem.* 272(50): 31755-63.
- Barbieri, S., Pirovano, C., Scarlato, G., Tarchini, P., Zappa, A. and Maranzana, M. 1988. Long-term effects of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo- p-dioxin on the peripheral nervous system. Clinical and neurophysiological controlled study on subjects with chloracne from the Seveso area. *Neuroepidemiology.* 7(1): 29-37.
- Bock, K. W. 1994. Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 125: 1-42.
- Bock, K. W. and Kohle, C. 2005. Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 69(10): 1403-8.
- Brinker, A., Scheufler, C., Von Der Mulbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I. and Hartl, F. U. 2002. Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J. Biol. Chem.* 277(22): 19265-75.
- Brumbaugh, J., Schleifenbaum, A., Gasch, A., Sattler, M. and Schultz, C. 2006. A dual parameter FRET probe for measuring PKC and PKA activity in living cells. *J Am Chem Soc.* 128(1):24-5
- Carlson, D. B. and Perdew, G. H. 2002. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16(6): 317-25.
- Cheung-Flynn, J., Roberts, P. J., Riggs, D. L. and Smith, D. F. 2003. C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90. *J. Biol. Chem.* 278(19): 17388-94.
- Crews, S. T. and Fan, C. M. 1999. Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9(5): 580-7.
- Day, R. N., Periasamy, A. and Schaufele, F. 2001. Fluorescence resonance energy transfer microscopy of localized protein interactions in the living cell nucleus. *Methods.* 25(1): 4-18.

- Heid, S. E., Pollenz, R. S. and Swanson, H. I. 2000. Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 57(1): 82-92.
- Housley, P. R., Sanchez, E. R., Danielsen, M., Ringold, G. M. and Pratt, W. B. 1990. Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain. *J. Biol. Chem.* 265(22): 12778-81.
- Hu, K. and Bunce, N. J. 1999. Metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and related dioxin-like compounds. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13(6): 307-315.
- Iain, R. M. and Ralph, C. S. 1994. Laser spectroscopy. University of Newcastle upon Tyne, UK. Print publication: Issue 3. 29: 164-169.
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. and Buchner, J. 1995. Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.* 270(13): 7288-94.
- Kang, K. I., Devin, J., Cadepond, F., Jibard, N., Guiochon-Mantel, A., Baulieu, E. E. and Catelli M. G. 1994. In vivo functional protein-protein interaction: nuclear targeted hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(1): 340-4.
- Khan, S., Barhoumi, R., Burghardt, R., Liu, S., Kim, K. and Safe, S. 2006. Molecular mechanism of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor/Sp1 cross talk in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 20(9):2199-214.
- Larsen, J. C., Farland, W. and Winters, D. 2000. Current risk assessment approaches in different countries. *Food Addit. Contam.* 17(4): 359-69.
- Lees, M. J. and Whitelaw, M. L. 2002. Effect of ARA9 on dioxin receptor mediated transcription. *Toxicology.* 181-182: 143-6.
- Levine, S. L. and Perdew, G. H. 2001. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)/AhR nuclear translocator (ARNT) activity is unaltered by phosphorylation of a periodicity/ARNT/single-minded (PAS)-region serine residue. *Mol. Pharmacol.* 59(3): 557-66.
- Majoul, I., Straub, M., Duden, R., Hell, S. W. and Soling, H. D. 2002. Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein-protein interactions in single living cells by multifocal multiphoton microscopy. *J. Biotechnol.* 82(3): 267-277.
- Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K. and Yahara, I. 1991. Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *J. Biol. Chem.* 266(16): 10099-103.
- Nadeau, K., Das, A. and Walsh, C. T. 1993. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J Biol Chem.* 268(2): 1479-87.
- Nebert, D. W., Puga, A. and Vasilou, V. 1993. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 685: 624-40.
- Perdew, G. H., Hord, N., Hollenback, C. E. and Welsh, M. J. 1993. Localization and characterization of the 86- and 84-kDa heat shock proteins in Hepa 1c1c7 cells. *Exp. Cell Res.* 209(2): 350-6.

- Pratt, W. B. and Toft, D. O. 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 228(2): 111-33.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M. R., Fukunaga, B. N. and Hankinson, O. 1994. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol. Cell Biol.* 14(9): 6075-86.
- Rideout, K. and Teschke, K. 2004. Potential for increased human foodborne exposure to PCDD/F when recycling sewage sludge on agricultural land. *Environ. Health Perspect.* 112(9): 959-69.
- Rowlands, J. C. and Gustafsson, J. A. 1997. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit. Rev. Toxicol.* (2): 109-34.
- Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. 1997. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J. Biochem.* 122(6): 1075-9.
- Wilson, C. L. and Safe, S. 1998. Mechanisms of ligand-induced aryl hydrocarbon receptor-mediated biochemical and toxic responses. *Toxicol. Pathol.* 26(5): 657-71.
- Wissing, M. 1998. dioxins: current knowledge about health effects. *Rev. Med. Brux.* 19(4): A367-71.
- Wouters, F. S., Verveer, P. J. and Bastiaens, P. I. 2001. Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol.* 11(5): 203-11.
- Yahara, I., Minami, Y. and Miyata, Y. 1998. The 90-kDa stress protein, Hsp90, is a novel molecular chaperone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 851: 54-60.

Establish of a FRET detection system for dioxin-like compounds

Chi-Iou Lin¹, Chun-Hung Hsieh¹, Wei-Shan Lee³,
Gou-Ping Chang-Chien³, Chien-Yuan Pan¹ Hsinyu Lee^{12*}

1 Institute of Zoology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

2 Department of Life Science, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

3 Department of Chemical and Materials Engineering, Cheng Shiu University, Kaohsiung 833, Taiwan, R.O.C.

Abstract

Dioxins are group of compounds contain double aromatic ring-like structure. They are among the most prevalent and toxic environmental pollutants. Accumulation of dioxins in human tissue poses a potential threat to human health. Currently, analytical chemical procedures dominate the dioxin detection protocols. In this study, we established a fluorescence resonance energy transfer (FRET) based dioxin-detection bioassay. We generated plasmids encoding fusion proteins of AHR and HSP90 with CFP and YFP. The interactions between these two proteins are suitable for FRET experiments. In rat hepatoma cell line, H4IIEC3 cells, transiently co-expressing AHR-CFP and HSP90-YFP showed a significant FRET signal. Dioxin treatments down-regulated FRET signals in these transfected cells in a dose- and time- dependent manner. These results suggest that using FRET as a dioxin-detection bioassay is successful and suitable for initial screening for dioxin-like compounds.

Key Words: Dioxin, Biological detection, Fluorescence resonance energy transfer

* Correspondence author. Tel: (02)3366-2499 Fax: (02)2363-6837

E-mail address: hsinyu@ntu.edu.tw

