

· 专论与综述 ·

PCR 技术在水生毒理学研究中的应用

金少格 陆光华* 刘建超 赵海洲 孙丽莎 杨晓凡

(浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室 河海大学环境学院 江苏 南京 210098)

摘要:介绍了聚合酶链式反应(PCR)技术的基本原理,并在此基础上综述了PCR技术在水生毒理学研究中的应用及国内外最新研究进展,其中涉及的模式生物包括原生动物、浮游植物、浮游动物和鱼类等。PCR技术不仅为污染物对水生生物的毒性检测带来了便利,还有助于从分子水平上阐述污染物的毒性作用机制。最后指出了目前PCR技术应用的局限性及未来的发展前景。

关键词:聚合酶链式反应技术;生态毒理学;基因毒性;水生生物

中图分类号:X171.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-2009(2012)02-0001-05

Application of PCR Technology for Aquatic Toxicologic Research

JIN Shao-ge, LU Guang-hua*, LIU Jian-chao, ZHAO Hai-zhou, SUN Li-sha, YANG Xiao-fan

(Key Laboratory of Education Ministry of Comprehensive Management and Resources Development for Shallow Lakes, Environment College, Hehai University, Nanjing, Jiangsu 210098, China)

Abstract: Technologic principle of polymer chain reaction (PCR) was described. Research development of PCR technology for the application of aquatic toxicology was reviewed, which model organism included protozoa, zooplankton, phytoplankton and fishes at home and abroad. PCR technology not only brought convenient for toxic detection of pollutant by using aquatic organisms but also help for explanation of toxic pollutants mechanism at molecular level. Limitation and development of PCR in the future application were also discussed.

Key words: Polymer chain reaction technology; Ecological toxicology; Gene toxicity; Aquatic organisms

污染物在环境中的迁移、转化及降解过程经历着一系列复杂的物理、化学和生物变化,这些变化去除了一部分污染物,但另一部分污染物只是在形态和性质上发生变化,生成了新的污染物,这些新污染物可能会给环境带来更大的安全隐患^[1]。污染物从不同途径进入水体,降低水产品质量,威胁人体健康,从而引起了人们的关注。水生毒理学是研究污染物与水生生物和环境因素之间相互作用的科学^[2],传统方法是从剂量-反应关系中得出污染物对水生生物体的毒性,但只能从表观上研究污染物对生物体的毒害,难以揭示污染物对生物体的内在毒性作用机制,因而存在一定的缺陷。现代分子生物技术的高速发展为环境污染物的毒理机制研究提供了前所未有的机遇。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术产生于1985年,是特定DNA片段体外扩增的新技术。1998年

Savva等采用PCR技术研究了苯并[a]芘对小鼠的基因毒性^[3],标志着该技术在毒理学研究中的应用的开始,并逐渐显示出巨大的优越性。PCR技术在水生毒理学研究中同样发挥了巨大作用,不仅为污染物对水生生物的毒性检测带来了便利,还有助于人们从分子水平上阐述污染物对水生生物的毒性机制。PCR技术因特异性好、灵敏度高、快速简便、可重复性等优点,在水生毒理学研究中受到越来越多的关注。

1 PCR技术的基本原理和方法

PCR技术是体外酶促合成特异DNA片段的一

收稿日期:2011-05-30;修订日期:2012-02-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(50830304)

作者简介:金少格(1986—),男,安徽霍山人,在读研究生,主要研究方向为环境毒理学。

* 通讯作者:陆光华 E-mail: ghlu@hhu.edu.cn

种方法,利用 DNA 变性与复性的原理。该技术利用两段寡核苷酸(3'和5'引物)作为反应引物,以4种脱氧核苷三磷酸 dNTP、DNA 聚合酶作为反应物,将提取到的 DNA(即模板 DNA)片段精确扩增^[4]。

PCR 由变性—退火(复性)—延伸3个基本反应步骤构成^[5]。变性阶段主要是 DNA 解离,以便于单链 DNA 与引物结合,为复性阶段做准备;复性阶段是将引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;引物的延伸阶段是在 TaqDNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,从引物的 5'端→3'端延伸,合成与模板互补的 DNA 链。重复循环变性—退火—延伸过程,就可获得更多的“半保留复制链”,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2 min~4 min,2 h~3 h 就能将目的基因扩增放大几百万倍。

PCR 技术可分为如下类型:①不对称 PCR 技术;②反向 PCR 技术;③多重 PCR 技术;④标记 PCR(LP-PCR)技术;⑤锚定 PCR 技术;⑥PCR 固定相分析法技术;⑦原位 PCR 技术;⑧实时 PCR(RT-PCR)技术;⑨荧光定量 PCR 技术;⑩随机扩增多态性 PCR(RAPD-PCR)技术。在水生毒理学研究中,较为常用的有多重 PCR 技术、RT-PCR 技术、荧光定量 PCR 技术和 RAPD-PCR 技术,在研究污染物对水生生物的毒理机制方面起到了非常重要的作用。

2 PCR 技术在水生毒理学中的应用

水生毒理学研究常用的模式生物包括藻类、水蚤、鱼类等,主要的研究方法可以简单地归纳为:在实验室条件下,将模式生物暴露于一定浓度的污染物中,再采用 PCR 技术检测模式生物在污染物暴露下的相关基因表达水平。直接从模式生物中分离特定 DNA 片段异常困难,难以满足实验要求。PCR 技术能在短时间内对极少量的特定 DNA 扩增,使得扩增数量达到实验目的,此优势使其在毒理研究中得到越来越多的应用。目前,在原生动物、浮游植物、浮游动物和鱼类毒理学研究中,利用 PCR 技术所取得的研究成果为环境污染物生态风险评估提供了科学依据。

2.1 PCR 技术在原生动物毒理学研究中的应用

上个世纪中期,人们已经清楚认识到水体中的

原生动物在净化水体和食物链中所起的作用,在水生毒理学研究中常用的受试原生动物是嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)。嗜热四膜虫是一种全球分布的单细胞真核生物,以自由游泳的方式生活在淡水湖泊和江河流域,具有个体生理、行为与所处环境中的污染物质紧密联系的特点,对水生污染物的胁迫作用响应非常敏感。与其他模式生物相比,嗜热四膜虫培养简单、快速、经济,因处于水生生态系统食物链的底层,更有利于污染物毒性的早期预报,所以被认为是水生毒理学研究中的良好模式生物^[5]。2006 年以来相继完成的嗜热四膜虫大核基因组测序计划,为分子水平上与毒性相关基因的嗜热四膜虫研究奠定了基础^[6]。

有机氯农药 DDT(dichloro-diphenyl-trichloro-ethane)是一种重要的持久性有机污染物,主要通过降雨和地表径流等方式进入水生生态系统^[7]。郭利娜等^[8]筛选出一个 DDT 暴露下的差异基因——酮戊二酸/苹果酸载体蛋白基因(*omc*),再用实时定量 PCR 技术测定了不同浓度 DDT 暴露下该基因的表达水平。结果表明,DDT 使 *omc* 基因的表达水平下降,DDT 对该基因的调控模式可能类似于雌激素对高等动物的调控途径,推测 DDT 可能通过调控 *omc* 等基因而影响线粒体正常功能,进而对细胞产生毒害作用。

在应用 PCR 技术的过程中,引物的选择特别重要,选择最优的引物,可以增大检测精度,提高灵敏度。愈婷等^[9-10]应用荧光定量 PCR 技术研究了铜和镉对嗜热四膜虫金属硫蛋白基因(*MTT₁*)的诱导表达,对不同浓度重金属对 *MTT₁* 基因的诱导进行了定量分析,解析了不同浓度重金属诱导 *MTT₁* 基因表达的变化规律。通过比较金属硫蛋白基因两个亚族(*MTT₁* 和 *MTT₂*)的特性,发现前者容易受到镉诱导,而后者容易受到铜诱导。在此基础上,Wang 等^[11]对这两种基因的功能性进行了对照研究,发现嗜热四膜虫的 *MTT₁* 基因起到了重金属解毒作用,而 *MTT₂* 则参与嗜热四膜虫体内铜离子平衡的生理调节作用。

在嗜热四膜虫的毒理效应研究中,不但可以应用 PCR 技术检测基因表达水平,而且可以将 PCR 技术与其他分子技术联合应用,以检测嗜热四膜虫在污染物暴露下相关基因的表达水平,这些研究为嗜热四膜虫作为淡水生物监测的指示生物提供了更有力的实验手段。三丁基锡(TBT)一直广泛应

用于防垢油漆、农业杀菌剂和塑料稳定剂^[12-13] 是一种重要的水环境污染物质。Feng 等^[14] 采用抑制性差减杂交技术 (SSH 技术) 与实时定量 PCR 技术相结合的方法, 鉴定 TBT 对嗜热四膜虫基因表达的差异性影响, 构建了 TBT 胁迫下嗜热四膜虫 SSH 文库, 并筛选出 3 个与 TBT 暴露呈正向调节或反向调节的基因。TBT 胁迫下嗜热四膜虫相关基因的差异性表达, 为嗜热四膜虫作为灵敏、快速、方便的 TBT 监测指示生物奠定了基础。

采用 PCR 技术与其他分子技术相结合的方法, 筛选与污染物暴露相关的差异性表达基因, 并定量其表达水平, 在嗜热四膜虫的毒理研究中发挥了主要作用。嗜热四膜虫在载体和转基因构建方面比其他水生生物体容易而且简单, 所以一旦构建了转基因细胞系, 嗜热四膜虫将会展现其优越性。

2.2 PCR 技术在浮游植物毒理学研究中的应用

浮游植物的毒理研究是水生毒理学中一个重要的研究分支。藻类作为初级生产者, 对于水生系统的平衡和稳定起着极其重要的作用, 生物测试中的藻类测试是水生毒理学研究中必不可少的方法之一。对大量生物测试结果分析发现, 藻类对许多污染物敏感, 而且具有生长周期短、繁殖快、易于分离培养等优点, 是非常理想的毒性试验材料^[15]。很多研究都使用藻类来评估金属元素、农药除草剂和其他外源污染物对水生环境的生态风险^[16-19]。目前大多数研究主要集中于污染物对藻类的急性毒性, 从基因转录水平上描述污染物对藻类毒性作用机制的研究很少。

Qian 等^[20] 研究了铜和镉对普通小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 生长的联合毒性, 并采用 PCR 技术检测了重金属暴露下普通小球藻光合作用相关基因的转录水平。结果表明, 铜和镉降低了基因 *psbA* 和 *rbcL* 的转录水平, 二者联合没有表现出协同效应; 而两种金属联合暴露增加了基因 *psaB* 的转录水平, 并表现出协同效应。当前水环境中存在一种新型污染物, 即人用、兽用药物及个人护理用品 (PPCPs), 大部分污水处理厂是针对传统意义上的污染物而设计, 导致低浓度的药物活性物质持续不断地排入水环境^[21-22]。抗生素是一种典型的新型污染物, 有研究发现抗生素会影响叶绿体基因的复制、转录和翻译, 以及一些代谢途径如叶酸合成和脂肪酸合成^[23]。Qian 等^[24] 利用实时 PCR 技术研究了链霉素对普通小球藻和铜绿微囊藻 (*Microcys-*

tis aeruginosa) 的影响, 结果表明, 链霉素抑制了藻的光合作用相关基因的转录, 阻碍了光合作用中电子的传输, 并且导致藻类产生过多的反应氧。农药莠去津是一种毒性很强的除草剂。Qian 等^[25] 采用 PCR 技术定量了普通小球藻 3 个光合体系基因 (*psaB*、*psbC* 和 *rbcL*) 在莠去津暴露下的转录水平, 发现莠去津降低了 3 个靶基因的转录水平, 而且呈现剂量依赖性。壬基酚是一种重要的精细化工原料和中间体, 同时也是重要的环境雌激素^[26]。Qian 等^[27] 研究发现, 壬基酚不仅能够影响普通小球藻光合作用相关基因的转录水平, 而且会导致小球藻产生过多的活性氧, 从而破坏细胞结构。

应用 PCR 技术对藻类的毒性研究可以从分子水平上揭示污染物的毒性作用机理: 一方面是水中污染物可能抑制光合作用相关基因的转录水平; 另一方面污染物会刺激小球藻产生过多的活性氧来破坏细胞结构。

2.3 PCR 技术在浮游动物毒理学研究中的应用

大型蚤 (*Daphnia magna*) 是一种典型的浮游动物, 具有繁殖快、方便易得、对毒物敏感等特点, 因而成为毒理学研究中常用的指示生物。Ha 等^[28] 利用半定量 RT-PCR 技术研究了壬基酚、双酚 A 和百草枯等污染物对大型蚤血红蛋白基因表达的影响, 测定了大型蚤血红蛋白基因的表达水平和繁殖率, 结果表明, 大型蚤血红蛋白基因可以作为评价污染物毒理效应的指标。

PCR 技术还可以和其他分子技术联合应用, 检测污染物暴露条件下大型蚤相关基因表达水平, 其中 PCR 技术主要起校核作用, 确保研究结果的正确性。Soetaert 等^[29] 研究了镉诱导下大型蚤不同基因的表达状况, 先用 DNA 微阵列分析了相关基因在镉暴露下的表达水平, 再利用 RT-PCR 技术检测相应基因的转录水平。结果表明, DNA 微阵列和 RT-PCR 技术的检测结果具有一致性, 二者联用揭示了镉影响大型蚤消化、氧运输、表皮代谢和胚胎发育相关的分子途径。Soetaert 等^[30] 利用与生殖相关的 DNA 微阵列, 研究杀虫剂丙环唑对大型蚤基因表达的影响, 主要采用 PCR 技术与抑制性差减杂交技术 (SSH 技术), 构建生态毒理标准生物体的特异双链 DNA 库, 将已获得的成年蚤和幼蚤的相关基因用于 DNA 微阵列, 监测暴露于有毒物质中大型蚤的基因表达水平变化, 鉴定出差异性表达基因, 揭示丙环唑对大型蚤的毒性作用

机理。Schamphelaere 等^[31]利用微阵列技术和 RT-PCR 技术研究发现,大型蚤牧食含锌量高的绿藻会导致控制蜕皮过程基因的差异性表达。

PCR 技术和 DNA 微阵列法相结合在大型蚤的毒理研究中发挥了重要作用。在实验中一般先用微阵列法分析受试动物相关基因的表达信息,再采用 PCR 技术确认分析结果,从而大大提高了水生毒理学研究的准确性和科学性。

2.4 PCR 技术在鱼类毒理学研究中的应用

鱼类对水质变化十分敏感,只要水体中含有极微量的有毒物质,就会引起很强的反应,所以在水生毒理学研究中常用鱼类作为受试生物。实验必须选择合格而且具有代表性的鱼类^[32],常用受试鱼类包括斑马鱼(*Danio rerio*)、日本青鳉(*Oryzias latipes*)、南亚野鲮(*Labeo rohita*)等小型鱼类。水中微量或痕量有毒污染物一般不会导致鱼类死亡,却能改变其生理生化指标,特别对鱼类的生长、发育甚至繁殖产生不利影响。PCR 技术的运用为在分子水平上开展亚致死毒性研究提供了可能。

Mohanty 等^[33]利用 RAPD-PCR 技术研究了呋喃丹对南亚野鲮的基因毒性,实验结果表明,呋喃丹暴露时间对肝组织 DNA 稳定性的影响很大。Lapointe 等^[34]用定量 RT-PCR 技术研究了温度和铜暴露对黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)的单一及联合影响。实验结果表明,温度不但影响黑头呆鱼的蛋白质代谢,而且会影响其抗氧化能力;铜暴露会影响一些功能性蛋白基因的转录水平,这些功能性蛋白包括能量代谢蛋白、重金属解毒蛋白和保护蛋白;而二者的联合作用则表现出协同效应。

双酚 A 不仅会导致机体雌激素内分泌干扰,而且会引起多种疾病,甚至诱发肿瘤^[35]。端正花等^[36]采用实时定量 PCR 技术和斑马鱼基因芯片技术相结合的方法,从分子水平上研究了双酚 A 对斑马鱼的毒理机制,发现双酚 A 具有遗传毒性。斑马鱼芯片检测双酚 A 对 RNA 的损伤存在一定的误差,实时定量 PCR 技术在研究中起到了校核作用。PCR 技术不但可以和基因芯片技术联用,还可以和彗星实验及扩散法联用,以确保研究结果的科学性。Rocco 等^[37]利用彗星实验、扩散法和 RAPD-PCR 技术,研究了意大利污水厂处理水中所含药物对斑马鱼的细胞毒性和基因毒理效应,三者检测结果一致,表明水环境中的药品对斑马鱼产生了严重的基因毒性。随着技术水平的提高,PCR

技术不仅能够用于阐明污染物的基因毒性,还可以用于揭示污染物的内分泌干扰机理。Zhang 等^[38]采用 RT-PCR 技术研究了雌激素 17 α 乙炔雌二醇(EE₂)和雄性激素 17 β 群勃龙(TRB)对日本青鳉下丘脑-垂体-性腺(HPG)的作用效应,日本青鳉的 HPG-PCR 阵列不但能够作为内分泌干扰物质的筛选工具,而且可以阐述污染物对鱼类内分泌干扰效应的作用机制。

3 研究展望

(1) PCR 技术的不断完善与发展,为水生毒理学研究提供了新的方法和思路,但目前该领域的研究成果非常有限。一方面 PCR 技术相对传统毒理学方法应用范围很小,尚需拓展;另一方面,目前多数相关研究局限于定性研究或者半定量研究,缺少对特殊基因表达的定量研究。特别是利用 PCR 技术研究高等水生生物毒理机制方面的成果甚少,如污染物的内分泌干扰机理研究等,此类内容应该成为今后重点发展的研究方向。

(2) 目前该领域研究采用的模式生物比较有限,主要是上述 4 类模式生物。采用其他模式生物如贝类及毛蚶类等底栖生物的研究需要加强,这将有助于积累相关研究成果,丰富毒理学数据库,为 PCR 技术在水污染环境生物监测中的实际应用提供科学依据。

(3) 进一步推动 PCR 技术与其他分子生物技术结合,以定量痕量及极微量的基因表达,提高毒理研究的准确度和精确度,为水生毒理学研究提供更广阔的前景。

(4) 目前 PCR 技术在水生毒理学研究中的应用还处于探索阶段,在方法学方面需要进一步标准化和规范化,以利于不同实验室间数据的比较及研究成果的应用。

[参考文献]

- [1] LARSEN J, SCHULTZ T W, RASMUSSEN L, et al. Progress in an ecotoxicological standard protocol with protozoa: Results from a pilot ringtest with *Tetrahymena pyriformis* [J]. *Chemosphere*, 1997, 35(5): 1023-1041.
- [2] RAND G M, PETROCELLI S R. Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications [M]. New York: Hemisphere Publishing, 1985.
- [3] SAVVA D. The use of PCR DNA fingerprints to detect the genotoxic effects of environmental chemicals [J]. *Ecotoxicology and*

- Environmental Safety, 1998, 41(1): 103–106.
- [4] MASTRANGELO D, SQUITIERI N, BRUNI S, et al. The polymerase chain reaction (PCR) in the routine genetic characterization of retinoblastoma: A tool for the clinical laboratory [J]. Survey of Ophthalmology, 1997, 41(4): 331–340.
- [5] GOCHHAIT S, BUKHARI S I, BAMEZAI R N K. mRNA quantitation using real time PCR [J]. Soil Biology, 2007, 11: 53–72.
- [6] STOVER N A, KRIEGER C J, BINKLEY G, et al. *Tetrahymena* genome database (TGD): a new genomic resource for *Tetrahymena thermophila* research [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(1): 500–503.
- [7] ROGAN W J, CHEN A. Health risks and benefits of bis (4-chlorophenyl) -1,1,1-trichloroethane (DDT) [J]. The Lancet, 2005, 366(9487): 763–773.
- [8] 郭利娜, 愈婷, 冯立芳, 等. 四膜虫 *omc* 基因的克隆及在滴滴涕 (DDT) 暴露下的表达分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(2): 216–221.
- [9] 愈婷, 缪炜, 万明亮, 等. 镉和铜对嗜热四膜虫金属硫蛋白基因的诱导表达 [J]. 动物学报, 2005, 51(6): 1115–1121.
- [10] GUO L N, FU C J, MIAO W. Cloning, characterization, and gene expression analysis of a novel cadmium metallothionein gene in *Tetrahymena pigmentosa* [J]. Gene, 2008, 423(1): 29–35.
- [11] WANG Q L, XU J, CHAI B F, et al. Functional comparison of metallothioneins MTT₁ and MTT₂ from *Tetrahymena thermophila* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 509(2): 170–176.
- [12] HOCH M. Organotin compounds in the environment—an overview [J]. Applied Geochemistry, 2000, 16(7–8): 719–743.
- [13] EVANS S M, LEKSONO T, MCKINNELL P H. Tributyltin pollution: A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints [J]. Marine Pollution Bulletin, 1995, 30(1): 14–21.
- [14] FENG L F, MIAO W, WU Y X. Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR [J]. Aquatic Toxicology, 2006, 81(1): 99–105.
- [15] ZABLOTOWICZ R M, SCHRADER K K, LOCKE M A. Algal transformation of fluometuron and atrazine by *N*-dealkylation [J]. Journal of Environmental Science and Health (Part B), 1998, 33(5): 511–528.
- [16] LEVY J L, STAUBER J L, JOLLEY D F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity [J]. Science of the Total Environment, 2007, 387(1–3): 141–154.
- [17] STAUBER J L, DAVIES C M. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment [J]. Environmental Reviews, 2000, 8(4): 255–301.
- [18] QIAN H F, CHEN W, SHENG G D, et al. Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure, and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris* [J]. Aquatic Toxicology, 2008, 88(4): 301–307.
- [19] QIAN H F, XU X Y, CHEN W, et al. Allelochemical stress causes oxidative damage and inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* [J]. Chemosphere, 2009, 75(3): 368–375.
- [20] QIAN H F, LI J J, CHEN W, et al. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription [J]. Aquatic Toxicology, 2009, 94(1): 56–61.
- [21] RICHARDSON B J, LAM P, MARTIN M. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China [J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 50(9): 910–913.
- [22] 邹艳敏, 吴向阳, 仰榴青. 水环境中药品和个人护理用品污染现状及研究进展 [J]. 环境监测管理和技术, 2010, 22(6): 14–19.
- [23] BRAIN R A, HANSON M L, SOLOMON K R, et al. Aquatic plants exposed to pharmaceuticals: Effects and risks [J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 192: 67–115.
- [24] QIAN H F, LI J J, PAN X J, et al. Effects of streptomycin on growth of algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa* [J]. Environmental Toxicology, 2010, online, DOI: 10.1002/tox.20636.
- [25] QIAN H F, SHENG G D, LIU W P, et al. Inhibitory effects of atrazine on *Chlorella vulgaris* as assessed by real-time polymerase chain reaction [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(1): 182–187.
- [26] 赵铨铨, 王欣泽, 鲁佳铭, 等. 固相微萃取-气相色谱法测定生活污水中壬基酚 [J]. 环境监测管理和技术, 2009, 21(5): 39–41.
- [27] QIAN H F, PAN X G, SHI S T, et al. Effect of nonylphenol on response of physiology and photosynthesis-related gene transcription of *Chlorella vulgaris* [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2011, online, DOI: 10.1007/s10661-010-1858-9.
- [28] HA M H, CHOI J. Effects of environmental contaminants on hemoglobin gene expression in *Daphnia magna*: A potential biomarker for freshwater quality monitoring [J]. Archives of Environmental Contamination Toxicology, 2009, 57(1): 330–337.
- [29] SOETAERT A, VANDENBROUCK T, VEN K V, et al. Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 83(3): 212–222.
- [30] SOETAERT A, MOENS L N, VANDER V K, et al. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part C), 2005, 142(1–2): 66–76.

(下转第11页)

— 5 —

- 2008, 27(1): 206–212.
- [24] WANG Y, ZHUANG G S, SUN Y L, et al. The variation of characteristics and formation mechanisms of aerosols in dust, haze, and clear days in Beijing [J]. *Atmospheric Environment*, 2006, 40: 6579–6591.
- [25] QURESHI S, DUTKIEWICZ V A, KHAN A R. Elemental composition of PM_{2.5} aerosols in Queens, New York: Solubility and temporal trends [J]. *Atmospheric Environment*, 2006, 40(2): 238–251.
- [26] TAN J H, DUAN J C, HE K B, et al. Chemical characteristics of PM_{2.5} during a typical haze episode in Guangzhou [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21: 774–781.
- [27] LEE K H, KIM Y J, KIM M J. Characteristics of aerosol observed during two severe haze events over Korea in June and October 2004 [J]. *Atmospheric Environment*, 2006, 40: 5146–5155.
- [28] 王玮, 陈宗良. 大气气溶胶中无机碳和有机碳 [J]. *环境科学丛刊*, 1991, 12(12): 27–34.
- [29] 唐小玲, 毕新惠, 陈颖军. 不同粒径气溶胶中有机碳(OC)和元素碳(EC)的分布 [J]. *环境科学研究*, 2006, 19(1): 104–108.
- [30] DOYLE M, DORLING S. Visibility trends in the UK 1950–1997 [J]. *Atmospheric Environment*, 2002, 36: 3161–3172.
- [31] HUSAR R B, HUSAR J D, MARTIN L. Distribution of continental surface aerosol extinction based on visual range data [J]. *Atmospheric Environment*, 2000, 34: 5067–5078.
- [32] CHAN Y C, SIMPSON R W, MCTAINSH G H, et al. Source apportionment of visibility degradation problems in Brisbane (Australia) using the multiple linear regression techniques [J]. *Atmospheric Environment*, 1999, 33(19): 3237–3250.
- [33] WILLIAM C M. Introduction to visibility [R]. USA: Colorado State University, 1999: 1–2, 8–14, 19–21.
- [34] SCHWARTZ J, DOCKERY D W, NEAS L M. Is daily mortality associated specifically with fine particles? [J]. *Journal of Air and Waste Management Association*, 1996, 46: 927–939.
- [35] HODKINSON J R. Calculations of color and visibility in urban atmospheres polluted by gaseous NO₂ [J]. *Int J Air Water Pollut*, 1966, 10: 137–144.
- [36] KYUNG W, KIM Y J, KIM S Y B. Summer time haze characteristics of the urban atmosphere of Gwangju and the rural atmosphere of Anmyon, Korea [J]. *Environ Monit Assess*, 2008, 141: 189–199.
- [37] LATHA K M, BADARINATH K V S. Black carbon aerosols over tropical urban environment—a case study [J]. *Atmos Res*, 2003, 69: 125–133.
- [38] LIOUSSE C, CACHIER H, JENNIGS S G. Optical and thermal measurements of black carbon aerosol content in different environments: Variation of the specific attenuation cross-section, Sigma [J]. *Atmos Environ*, 1993, 27(8): 1203–1211.
- [39] OZAKAYNAK H A, SCHATZ D, THURSTON G D, et al. Relationships between aerosol extinction coefficients derived from airport visual range observations and alternative measure of airborne particle mass [J]. *Journal of Air Pollution Control Association*, 1985, 35: 1176–1185.
- [40] MALM W C, SISLER J F, HUFFMAN D, et al. Spatial and seasonal trends in particle concentrations and optical extinction in the United States [J]. *Geophys Res*, 1994(99): 1347–1370.
- [41] 张新玲, 张利民, 李子华. 南京市可吸入颗粒物数浓度变化及尺度分布 [J]. *江苏环境科技*, 2003, 16(4): 33–34.
- [42] 韩毓, 白志鹏, 孙韧. 颗粒物质量浓度对大气能见度水平影响分析 [J]. *环境监测管理与技术*, 2008, 20(4): 60–61, 65.
- [43] 韩毓. 灰霾天气条件下天津市环境空气中颗粒物污染特征分析 [J]. *环境监测管理与技术*, 2009, 21(4): 32–35.

本栏目责任编辑 姚朝英

(上接第5页)

- [31] SCHAMPELAERE K A C D, VANDENBROUCK T, MUYSSEN B T A, et al. Integration of molecular with higher-level effects of dietary zinc exposure in *Daphnia magna* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part D)*, 2008, 3(4): 307–314.
- [32] CASEBOLT D B, SPEARE D J, HORNEY B S. Care and use of fish as laboratory animals: current state of knowledge [J]. *Laboratory Animal Science*, 1998, 48(2): 124–136.
- [33] MOHANTY G, MOHANTY J, GARNAYAK S K, et al. PCR based detection of furadan genotoxicity effects in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings [J]. *Veterinary Research Communications*, 2009, 33(7): 771–780.
- [34] LAPOINTE D, PIERRON F, COUTURE P. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 104(1–2): 80–85.
- [35] SAJIKI J, YONEKUBO J. Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species [J]. *Chemosphere*, 2003, 51(1): 55–62.
- [36] 端正花, 朱琳, 冯鸣凤, 等. 斑马鱼基因芯片技术在双酚A毒性机制研究中的应用 [J]. *环境科学*, 2010, 31(3): 808–814.
- [37] ROCCO L, FRENZILLI G, ZITO G. Genotoxic effects in fish induced by pharmacological agents present in the sewage of some Italian water-treatment plants [J]. *Environmental Toxicology*, 2010, online, DOI: 10.1002/tox.20607.
- [38] ZHANG X W, HECKER M, PARK J W, et al. Real-time PCR array to study effects of chemicals on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis of the Japanese medaka [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88(3): 173–182.