

生物大分子标记物检测在环境监测中的应用

周驰^{1,2}, 李纯厚¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要:生物大分子标记物是指生物体内的一些对外界环境变化敏感并能产生一些可检测变化的大分子物质, 这些大分子物质能够反映环境变化对生物体的影响。随着社会对环境保护的日益重视和分子生物学技术的发展, 将生物大分子标记物的检测应用到环境监测中已经成为一种趋势。生物大分子标记物检测由于其测定指标全面、准确、系统且具有特异性等优点, 近十几年来作为污染物暴露和毒性效应的早期预警工具已被广泛应用于环境评价中。本文对一些主要的生物大分子标记物及其检测技术在环境监测中的应用状况及应用前景进行综述, 旨在为生物大分子标记技术在环境检测实际操作中的应用提供参考依据。[中国水产科学, 2007, 14(5): 864–871]

关键词:生物大分子标记物; 标记物检测; 环境监测

中图分类号: X83

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)05–0864–08

生物大分子是近年来生态学研究的主要对象之一。与其他研究手段相比, 生物大分子具有特异性、预警性和广泛实用性等特点, 可以在分子水平阐述分子适应等生态问题的机制, 有助于更好地揭示生物与环境之间的相互作用机制, 为污染环境的生物修复提供理论依据。

生物大分子标记物包括核酸和蛋白质等。任何一种生物大分子标记都是以分子水平上的反应为基础。环境污染物对生物体的作用最早必然是从个体内分子水平上开始的, 然后逐步在细胞、器官、个体、种群、群落、生态系统各个水平上反映出来。因此, 能反映这种早期作用的生物大分子标记物在环境监测中具有很大的应用价值。

外界环境中的许多化学物进入生物体后, 经体内酶系统的活化, 可产生具有强亲电性的中间代谢物, 这些代谢物可与脂类、蛋白质、RNA 或 DNA 发生反应, 形成稳定的或不稳定的加合物, 从而对生物体产生影响^[1]。一般的化学检测方法虽然可以对环境或生物体内污染物含量进行定量描述, 但无法反映这些污染物对生物体的毒害效应^[2]。而实验室毒性活体鉴定也会因实验条件和生物种类的限制而难以体现污染物在实际环境中的生物学效应。另外, 许多污染物在环境中的含量很低, 相互混合, 体

系复杂, 要检测和评估它们对环境质量的影响, 就要研究在污染物作用下生物体内各种指标的变化^[3]。因此, 许多研究者开始采用生化测定和生物标志法等生物化学的方法来探索污染物对生物体的早期影响。生物标志法因为测定指标全面、准确且系统, 因而得到了世人的公认^[4], 而生物大分子标记作为具有特异性、预警性的生物标记则被更广泛地应用。

1 核酸分子标记物检测

1.1 核酸分子损伤检测技术

环境中的许多化学物质能导致核酸分子不同类型的损伤。DNA 与化学物质之间的作用反映了化学物质的毒性, 因此各种类型的 DNA 损伤可以作为化学物质暴露的生物标记物, 用来评价环境化学毒性。

1.1.1 DNA 加合物的检测 DNA 加合物是亲电性化合物及其代谢产物和生物体内的 DNA 形成的共价结合物, 这种加合物一旦逃避了生物细胞的自身修复系统的修复, 就可能成为致突变、致癌的最小因子。DNA 加合物是生物体暴露于致癌物的有效剂量及致癌物在体内产生的有效作用的综合表现, 与致癌物作用直接相关, 定量测定 DNA 加合物即可初步判定样品的遗传毒性^[5], 进而对化学物的潜

收稿日期: 2006–08–14; 修订日期: 2006–11–21.

基金项目: 科技部科研院所社会公益研究专项 (2005DIB3J020).

作者简介: 周驰 (1984–), 女, 硕士研究生, 从事海洋生态环境保护研究. E-mail: zhouchi0703@yahoo.com.cn

通讯作者: 李纯厚. E-mail: scslch@163.com; scslch@126.com

在致癌性进行评价和预测。由于DNA加合物的检测具有材料经济、反应灵敏、与肿瘤和突变的形成有很好的相关性等优点,因而可以作为海洋环境监测的一种良好的标记物。

国外许多对水生生物的DNA加合物的研究结果表明,水生生物尤其是鱼类对致癌物敏感,对水生生物体内DNA加合物的检测可以直接指示水环境中存在的致癌物,因而是进行致癌物检测和筛选的理想模式系统^[6]。已有许多学者对DNA加合物的形成机制及其作为检测海洋环境遗传毒性的生物标记物的应用作了探讨并取得了一定的成果^[7-9]。

DNA加合物的测定方法主要有:³²P-后标记法;特定加合物的单克隆和多克隆抗体的免疫测定;气相色谱-质谱联用仪(Gas chromatograph-mass spectrometer, GC/MS);高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)/荧光分光光度法(Fluorospectrophotometry)等。其中,³²P-后标记法是海洋环境监测中分析DNA加合物最常用的方法^[10-12],最适合于检测大分子疏水性的加合物(如多环芳烃或者芳香族杂环所形成的加合物),但在用于测定小分子的加合物(如烷化剂产生的加合物)时则难以得到满意的效果。

1.1.2 DNA链断裂的检测 在细胞中,DNA常常会由于热能作用而发生碱基的缺失,这种缺失在正常环境下能迅速得到修复,但当这些正在修复的DNA分子受到环境中污染物的影响而不能正常进行修复时,就会发生DNA链的断裂。因此,DNA链的断裂可以作为生物标记物来监测环境污染。DNA链断裂的检测方法主要有碱性解旋法、单细胞微凝胶电泳技术、微核测定法等。

(1) 碱性解旋法检测DNA链断裂

碱性解旋技术是依据在一定的pH值和温度条件下,DNA双链的解旋发生在DNA分子内单链断裂的部位这一性质而建立的。由于这种检测方法简单可行且能反映多种遗传毒性物质对DNA的损伤,因而可以应用于海洋环境质量的评价。该方法经过不断改进,已被广泛应用于海星、鲷、蛙以及贻贝、牡蛎等的DNA完整性分析中^[13]。

(2) 单细胞微凝胶电泳技术(Single cell gelelectrophoresis assay, SCGE或SCG)检测DNA链断裂

单细胞凝胶电泳实验又称彗星试验,是由Ostling等首次提出的一种在单细胞水平上检测DNA损伤的方法。它的原理是:DNA分子在碱处

理和碱性电泳液作用下会解螺旋且变性为单链,若细胞DNA分子有遇碱不定位点或单链断裂则会出现分子量较小的DNA片段。在电泳时这些带负电荷的小DNA片段会离开核DNA在凝胶分子筛中向阳极移动,形似彗星,故SCG又被称为彗星实验^[14]。细胞DNA受损愈严重,产生的断链和断片就愈多,长度也愈小,在相同的电泳条件下迁移的DNA量就愈多,迁移的距离就愈长。通过测定DNA迁移部分的光密度或迁移长度就可以测定单个细胞DNA损伤程度,从而确立因素的作用剂量与DNA损伤效应的关系^[15]。

自从Singh等^[16]于1988年对该方法进行了改进后,SCG就因其简便、低耗和可对单个细胞进行分析等优点迅速在生物DNA损伤研究领域得到广泛应用。近来已有人将此方法应用于鱼类和无脊椎动物-紫贻贝的DNA损伤研究,取得了不同程度的效果^[17-19]。彗星实验在海洋环境中目标物质排放的检测中也很有潜力,有许多学者已经开始了这方面的研究,如Kira等^[20]利用彗星实验对日本一海湾的贝类及该区域海水的遗传毒性进行了研究,并认为贝类对监测长期受致变物污染的海水的毒性十分有用;Coughlan等^[21]用彗星试验检测了长期生活在受污染的爱尔兰河口底泥中马尼拉蛤所受到的遗传毒害效应;Hamoutene等^[22]也用彗星试验研究了贝类暴露于受石油烃污染的海水后所引起的遗传毒害效应。

(3) 微核测定法检测DNA损伤

微核试验是根据细胞质内产生额外核小体的现象来判断化学物质诱发染色体异常作用的试验方法^[23],常用于淡水环境的遗传毒性检测。所谓微核是指染色体的断片或迟滞的染色体在细胞有丝分裂后期,不能进入子代细胞的细胞核里,而在间期的子代细胞浆内形成的游离团块状物质。当细胞受到化学物质攻击而使染色体发生异常时,细胞质内产生额外的核小体,形成微核,通过观察有微核细胞的千分率可以检测环境中的污染物。微核测定法操作简便,所需设备也较为简单,因而也可以用于指示海洋环境污染造成的细胞遗传损伤(主要是染色体断裂和纺锤体损伤)。

Brunetti等^[24]在1988年首次将微核测定法用于海洋无脊椎动物之后,有大量研究都检测了双壳类细胞内的微核,并且取得了不同程度的成果,如蔡

丽娜等^[25]成功地把海湾扇贝 (*Argopecten irradians* Lamarck) 的微核试验用于南海海水水质的监测。Dolcetti 等^[26]用微核试验检测了地中海海域贻贝不同类型的细胞对遗传毒物的敏感程度。Barsiene 等^[27]利用微核检测方法研究了油类污染物对波罗地海油港区的甲壳类动物的毒害效应。

1.1.3 DNA 甲基化测定 DNA 甲基化测定法的基本原理是: 甲基化脱氧核糖核苷酸在真核细胞内的含量的比例是一定的^[1], 而有时环境中的化学物可以改变 DNA 所特有的甲基化遗传模式。通过多种酶水解被分离出的 DNA, 可以得到核苷酸混合物, 通过测定其甲基化比例可以判断出 DNA 是否受到影响。

1.2 报告基因标记技术

环境中的一些污染物可以诱导生物体内特定的代谢基因的表达, 这些基因的启动子与报告基因融合后即可对环境中的特定污染物进行检测, 根据这一原理设计生物传感器来对环境中的污染物进行检测的技术就是报告基因标记技术^[5]。报告基因标记技术由于可以实现原位在线检测而倍受重视。目前, 已有许多基因如抗生素抗性基因、重金属抗性基因、半乳糖苷酶基因 (*lac*)、荧光素酶基因 (*lux*) 等被作为报告基因应用于环境监测中^[14]。其中, 绿色荧光蛋白 (GFP) 是 1994 年开始出现的一种较新的标记系统, 由于绿色荧光蛋白基因 (*gfp*) 的表达产物对细胞没有毒害作用, 且由 GFP 产生的荧光标记的检测十分方便简单, 因而被广泛用于科学研究工作中。已有报道利用 *gfp* 基因作为报告基因的生物传感器用于环境中污染物的测控, 如荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) A506 全细胞生物传感器, 这种生物传感器中的广宿主质粒含有 *gfp* 基因和甲苯-苯诱导子 *tbtuT* 及其启动子 *PtbtuA I*, 可以用于监测水体中中苯、甲苯等有毒化合物^[28]。

1.3 DNA 芯片技术

由于环境的变化会引起细胞基因表达谱的变化, 而 DNA 芯片是高效的监测基因表达谱变化的手段, 因此可以利用 DNA 芯片快速检测污染物对人体、动植物的危害。DNA 芯片技术最大的优点体现在规模效应上, 它可以同时分析上万条基因的表达^[14]。另外, 传统的方法只能发现机体经历污染物暴露的结果, 而 DNA 芯片技术可以帮助了解到这些结果发生的过程甚至机理。已经有许多实验室开

始积极探索用 DNA 芯片技术来监测环境污染, 如有报道用鼠的 cDNA 作为微阵列单元的基因芯片可以检验鼠肝脏暴露于肝毒素如醋氨酚或它的相应代谢物、多环芳烃、苯并芘等时的基因响应^[29]。

目前 DNA 芯片技术在环境检测中的应用尚未成熟, 芯片制作过程有待优化, 其检测分析、数据解释的统一标准有待确定, 毒性反应指标与毒性间的关系等问题也还有待解决^[30]。因此不能盲目地将其分析出的数据用于确定污染物危害性大小。

1.4 16S rRNA 的检测技术

在稳定条件下, 某种微生物的 16S rRNA/DNA 比率与其生长率是呈正相关的^[31], 因而 16S rRNA/DNA 的比率是检测复杂的微生物种群特定成员代谢活动的有效参数。通过以专一性和通用型探针分别与直接从微生物样品中分离的总核酸进行杂交的方法可以获得相对于总 DNA 的特定 16S rRNA 数量。在 16S rRNA 检测中常用印迹杂交来定量测定特定微生物种群 16S rRNA 在总 DNA 中的比例^[32]。由于不同种生物细胞内有不同数量的核糖体 (介于 $10^3 \sim 10^5$), 甚至同一种细胞内在不同时期核糖体数目也不同, 所以 16S rRNA 的丰度不能直接用于表示某类微生物细胞数的多少, 但可以代表特定种群的相对生理活性。因而 16S rRNA 检测可用于污染环境微生物种群动态分析的研究中。如 Roane 等^[33]通过 16S rDNA 序列分析, 分别对受 Cd 污染及未受污染的土壤中的微生物进行检测, 结果表明, 污染环境不仅影响微生物数量, 而且也使种群在核酸水平发生了变化。

2 蛋白分子标记物检测

环境中的许多污染物能直接与生物体内的蛋白质发生反应从而对生物体产生影响, 或者诱导 (或抑制) 生物体内一些基因的表达从而影响生物体内一些蛋白质的量。因此, 生物体内的许多种蛋白都可以作为环境中有害物质暴露的生物标记物应用于环境监测中。

2.1 酶分子标记物检测

2.1.1 乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholine esterase, AChE) 的检测 乙酰胆碱酯酶的抑制与有机磷杀虫药和氨基甲酸酯类杀虫药的毒性作用密切相关, 因此 AChE 在血液或组织里的活性可以作为有机磷和氨基甲酸酯类杀虫药暴露和毒性效应的生物标记

物^[34]。现在确认,20%以上的AChE活性的抑制证明有机磷和氨基甲酸酯类杀虫药暴露作用的存在,50%以上的AChE活性的抑制表明环境中的有机磷和氨基甲酸酯类杀虫药暴露作用已经对生物的生存产生了危害^[5],这对于非急性毒性检测极为有用。有研究表明,红细胞AChE的抑制程度与有机磷农药的中毒症状的严重性以及接触强度和时间有很好的相关性,并且已经有一些研究成功地将乙酰胆碱酯酶活性的抑制作为鱼类有机磷农药中毒的诊断工具^[35-36]。此外,由于被磷酸化的AChE活性能被亲质子剂再次激活,因此,再激活技术的成功使用能够协助区分乙酰胆碱酯酶是自然还是杀虫药介导的改变,从而能使乙酰胆碱酯酶在生物监测中发挥更大的作用。

但是AChE作为生物标记物具有不能反映低剂量接触水平、特异性不够强、会受温度的影响、存在种属和组织差异性等优点。这些缺点都制约了AChE作为生物标记物在环境监测中的应用。

2.1.2 乳酸脱氢酶 (Lactic dehydrogenase, LDH) 的检测 乳酸脱氢酶是一种与耗氧量有关的酶,催化以NADH为辅酶的乳酸与丙酮酸相互转换的反应。在多数高等脊椎动物和水生无脊椎动物中,LDH是通过体内两种多肽链(A和B)的重组构成四聚体,LDH-A4基本上在无氧条件下起作用,而LDH-B4则在有氧组织中表现很高的活性。LDH可作为水中抗氧化指标,评定水体含氧的情况。另外,由于LDH的活力会受到环境中的重金属的影响,因而可以用于环境中存在的重金属的检测。有研究表明,二价镉可以导致喧嘩招潮蟹(*Uca pugnax*)的肝胰腺LDH活力下降和腹部肌肉LDH活力增强^[37]。

2.1.3 细胞色素 P450 系统检测 细胞色素 P450 (CYP450)是微粒体混合功能氧化酶系中最重要的一族氧化酶,是重要的传能物质,参与广泛的内源和外源化合物的合成与代谢,与人类癌症的关系十分密切。大多数化学致癌物(如多环芳烃、黄曲霉素、芳胺、亚硝胺等)均需经其代谢活化才能成为终致癌物发挥致癌作用,且细胞色素 P450 蛋白水平与环境中化学致癌物的水平密切相关。近几年来,细胞色素 P450 系统的检测在许多海洋环境监测项目中已经被广泛地作为暴露标记物^[38-39],发挥着越来越重要的作用。

细胞色素 P450 系统作为生物标记物的优点:
(1)可以得出污染水平的综合效应,包括生物物质与

污染物的相互作用,机体的防御反应等。这对于环境监测具有重要意义。(2)体内 P450 系统增高不仅证明污染的存在,反映出化学物的代谢增加并有可能活化了致癌物质,而且还表明体内解毒机制的破坏,从而可以确切地证明污染物对机体的早期影响的存在。这可以为环境中污染物的早期影响的判断提供重要信息^[5]。

但是由于温度、季节变化和性激素等其他因素也会影响到细胞色素 P450 系统在生物体内的反应^[40],因此很难期望总能得到上述致癌物浓度与CYP450蛋白水平的剂量-反应线性关系,这使得细胞色素 P450 系统作为生物标记物的应用受到了限制。

2.1.4 与组织损伤相关的非特异性酶的检测 在海洋生物中,许多与组织损伤相关的非特异性酶的活性可以作为监测环境污染的标记物。谷丙转氨酶 (Glutamic-pyruvic transaminase, GPT)在生物体蛋白质代谢中起着重要作用,海洋中的Cd、Cu、Pb、Hg等金属浓度增加可引起海洋动物体内GPT的变化,如当水体中的金属浓度增加时可在菲律宾蛤仔腮里检出GPT活性的降低,因此GPT可作为一般的环境压力生物标记物^[41]。值得注意的是,海洋动物的各种组织对上述金属的反应是不一致的,有的GPT会受到抑制,而有的却出现GPT诱导现象^[42],例如对于Cd和Pb,海洋生物的软组织和鳃的GPT都可以作为标记物,但对于Cu,只有鳃可以用作标记物^[43]。腺苷三磷酸酶 (Adenosine triphosphatase, ATPase)是生物体内重要的酶,存在于所有细胞中,它与氧化磷酸化、离子转运、神经冲动传递等生理生化活动密切相关。在研究氯化烃农药的作用机制时,人们发现DDT对 Na^+/K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase有抑制作用,并因此对多种污染物与生物体ATPase的关系作更广泛的研究,已发现多种水生生物(包括鱼、龟以及乌贼)的多种组织(如鳃、肾、脑)的多种ATPase对不同污染物均有反应,且都有一定的剂量/效应关系的存在^[44]。Stagg等的研究结果显示 Na^+/K^+ -ATPase在比目鱼的腮中的活性可以评测污染物对海洋生物的副效应^[45-46]。但是,由于多种类型的污染物都可对ATPase产生显著的影响,这使得ATPase作为生物标记物的应用受到了一定的限制。

此外,海洋生物的许多非特异性酶的活性会受到季节和自然环境的变化的影响,因此在应用这些

酶时 also 需要注意其季节和自然的变化,以区别于其他污染引起的变化。

2.2 金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 的检测

MT 主要存在于细胞的胞液之中,对二价金属有极高的亲和力,它可以在转录水平上被环境中的 B 族金属 (如: Ag、Cd、Cu、Hg、Zn) 所诱导,且生物体内 MT 的浓度与这些金属在环境中的浓度有相关性,因此 MT 可以作为生物标记物反映上述金属的接触剂量和接触效应,有研究表明,淋巴细胞中 MT 的浓度可以视为 Cd 对血液系统的毒性效应的早期指标^[47]。且已有报导用贻贝体内的 MT 来监测海洋环境中的金属污染^[48]。

但是 MT 的测定方法操作不太简便,重现性不够理想;生物个体之间基础 MT 的表达存在差异;并且除了金属,尚有许多内外因子都可以诱导金属硫蛋白。上述因素使得目前 MT 作为生物标记物在环境检测中的应用在一定程度上受到了限制。

2.3 热休克蛋白 (Heat Shock Protein, HSP) 的检测

HSPs 是一组具有重要生理功能的特殊蛋白质分子,具有分子伴侣 (Molecular chaperone) 作用。多种应激因素可诱导表达 HSPs,因而其又被称为应激蛋白 (Stress proteins, SP)。能诱导 HSPs 产生的不良因素除热刺激之外,还包括紫外线、重金属污染物以及有机污染物暴露等^[49-50]。根据 HSPs 分子量及等电点不同将其分为六个家系,包括小分子 HSPs、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90、HSP110,其中 HSP70 是一族最保守和最重要的热休克蛋白家族^[51]。HSP70 广泛存在于生物界,具有高度的保守性,并且其表达水平与生物体受到环境胁迫时的组织细胞抗损伤及自身保护能力关系密切,呈正相关。因而通过对生物体内 HSP70 的检测可以了解其受到的环境胁迫的状况^[52],但是由于 HSP70 具有交叉耐受机制,即其形成的应激耐力无特异性^[51],这使得 HSP70 在作为环境监测的指标的应用受到了限制。另外,有研究表明 HSP60 也有作为环境监测指标的潜力。以色列科学家曾以绿海葵 (*Anemonia Viridis*) 为代表动物,研究了海洋无脊椎动物对海水温度变化的表型适应能力及其 60 kD HSP (HSP60) 的表达,并且认为 HSP60 的表达可作为检测海洋无脊椎动物遭受环境胁迫的指标^[53]。

2.4 抗氧化剂防御系统的检测

在长期进化过程中,需氧生物形成了一套自我防御的抗氧化损伤系统,如谷胱甘肽 (Glutathione,

GSH)、维生素 C (Ascorbic acid, Vc)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 等^[54]。正常条件下,代谢产生的活性氧可为抗氧化防御系统所控制,但当某些污染物 (如有机物、金属螯合剂等) 在体内进行生物转化时,可产生大量的活性氧和一些自由基代谢物,从而引起机体的氧化应激^[55]。抗氧化防御系统的一个重要特征是其活性或含量可由于污染物的胁迫而发生改变,因而可以间接地反映环境中氧化污染的存在,进而可作为环境污染胁迫的指标^[56]。

目前虽然已经可以在研究中观察到环境胁迫后抗氧化系统中抗氧化酶的显著改变,但是要得到这些改变的良好剂量-反应线性关系仍然十分困难^[57-58]。由于近年来海洋污染日益严重,而且许多污染物具有氧化还原循环活性,关于氧化胁迫下海洋动物抗氧化防御系统的研究正在成为毒理学研究新的热点。

3 结语

目前,中国的环境监测工作还主要是针对环境中化学成分的存在量进行检测。化学监测虽然能清楚地知道环境中各化学成分的具体含量及其变化,但却不能直接反应环境对生物所造成的毒害作用。另外,由于环境中的许多污染物含量很低,相互混合,体系复杂,仅用化学因子监测的手段往往不能够全面的反映环境的污染状况。在环保观念日益增强的今天,社会对环境评价的全面性和准确性的要求也日益增高,这就要求建立一个综合的、多手段的、多参数的环境监测体系以实现快速、高效、准确地对环境状况作出全面的评价。

从上述研究和近几年的发展趋势可以看到,随着生物技术的发展,采用现代分子生物学方法与技术研究污染物的代谢及其对细胞内大分子 (核酸、蛋白质等) 的影响,找出其作用的靶位点或靶分子并揭示其作用机理,从而对个体到群体系统水平上的影响作用进行预测已成为可能。

生物大分子标记物检测方法具有周期短、高效、实用、灵敏度高等特点,因而可用于对环境中的污染物的检测及对其可能造成的环境影响作出更为准确的预测。目前,这些检测手段大多还不够完善且缺乏统一的评价标准,这使得它们在环境监测实际操作中的应用在很大程度上受到了限制。在将来的研究工作中,通过对生物大分子标记物检测方法

进一步的深入研究和完善,建立统一的评价标准;研制出能够快速、高效、准确地对环境状况进行评价的商品化的试剂盒;将传统的污染物的化学测定与生物大分子标记的检测相结合建立一个综合的、多手段的、多参数的环境监测体系,必将为环境评价和污染物的风险评估提供更加有力的支持,对保护环境和生物资源,维护人体健康和促进经济发展起到积极作用。

参考文献:

- [1] 王兰,王茜,杨秀清.生物大分子在水生态毒理学研究中的应用[J].山西大学学报:自然科学版,2004,27(3):316-319.
- [2] Lapez-Barea J, Pueyo C. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by mollusks as biomarkers of marine pollution[J]. Mutation Res, 1998, 399: 3-15.
- [3] Haux C, Forlin L. Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish[J]. AMBIO, 1998, 17: 376-380.
- [4] 谢建春.水体污染与水生动物[J].生物学通报,2001,36(6):10-11.
- [5] 刘日先,王新红,洪华生等.生物标记物检测在海洋环境污染监测中的应用[J].海洋环境科学,2003,22(2):68-73.
- [6] 陆贻通,朱江,余佳丽.环境污染物的分子毒理机制研究进展[J].环境污染与防治,2004,26(3):185-188.
- [7] Peters L D, Telli-Karakoc F, Hewer A, et al. In vitro mechanistic differences in benzo[a] pyrene-DNA adduct formation using fish liver and mussel digestive gland microsomal activating systems[J]. Marine Environ Res, 2002, 54: 499-503.
- [8] Ericson G, Skarphedinsdottir H, Svavarsson J, et al. DNA adducts in mussels, mytilus edulis, from Icelandic and Scandinavian coastal sites[J]. Marine Environ Res, 2002, 54: 529-530.
- [9] Moraga D, Mdelgi-Lasram E, Romdhane M S, et al. Genetic responses to metal contamination in two clams: Ruditapes decussates and Ruditapes philippinarum[J]. Marine Environ Res, 2002, 54: 521-525.
- [10] Elespuru R K A. Future approaches to genetic toxicology risk assessment. Mutation Research[J]. Reviews in Genetic Toxicology, 1996, 365(1-3):191-204.
- [11] Isomaa B A, Lilius H A. The urgent need for in vitro tests in ecotoxicology[J]. Toxicology in Vitro, 1995, 9(6):821-825.
- [12] Guengerich F P. The environmental genome project: functional-analysis of polymorphisms[J]. Environ Health Perspect, 1998, 106: 365-368.
- [13] Everarts J M, Sarkar A. DNA damage as a biomarker of marine pollution: Strand breaks in seastars (*Asterias rubens*) from the North Sea[J]. Water Sci Tech, 1996, 34(7-8):157-162.
- [14] 郭建勇,黄秀清,王金辉等.遗传毒性检测技术在海洋环境监测中的应用[J].海洋环境科学,2004,23(1):77-80.
- [15] Cotellet S, Ferard J F. Comet assay in genetic toxicology[J]. Environ Mol Mutagen, 1999, 34: 246-255.
- [16] Narendra P S, Michael T M, Raymond R T, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988, 175:184-191.
- [17] Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, et al. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta* Fario) [J]. Mutagenesis, 1996, 11(5):485-492.
- [18] Nacci D E, Cayula S, Eugene J. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single gel assay[J]. Aquatic Toxicol, 1996, 35: 197-219.
- [19] Wilson D E, Pascoe P L, Parry J M, et al. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate *Mytilus edulis* L (Mollusca: Pldcy-poda) [J]. Mutat Res, 1998, 399: 87-95.
- [20] Kira S, Hayatsu H, Ogata M. Detection of mutagenicity and their ambient water[J]. Bull Environ Contain Toxic, 1989, 43: 583-589.
- [21] Coughlan B M, Hartl M G J, Oreilly S J, et al. Detecting genotoxicity using the comet assay following chronic exposure of manila clam tapes *semidecussatus* to polluted estuarine sediments[J]. Mar Pollut Bull, 2002, 44: 1359-1365.
- [22] Hamoutene D, Payen J F, Rahimtula A, et al. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons[J]. Mar Environ Res, 2002, 54: 471-474.
- [23] Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations[J]. Mutation Res, 1993, 285: 35-44.
- [24] Brunetti R, Majone F, Gola I, et al. The micronucleus test: example of application to marine ecology[J]. Mar Ecol Ser, 1988, 44: 65-68.
- [25] 蔡亚娜,钱黎明,何海晏.中国南海双壳类微核的再研究[J].海洋环境科学,1993,12(2):1-5.
- [26] Dolcetti L, Venier P. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels[J]. Mar Environ Res, 2002, 54: 487-491.
- [27] Barsiene J. Genotoxic impacts in Klaipeda Marine Port and Butinge oil terminal areas (Baltic Sea) [J]. Mar Environ Res, 2002, 54: 475-479.
- [28] 叶海仁,钟卫鸿,陈建孟.绿色荧光蛋白分子标记在环境微生物研究中的应用[J].环境污染与防治,2003,25(6):353-355.
- [29] Cunningham M J, Zweiger G B, Panzer S R, et al. Toxicity testing using a microarray of nucleic acid toxicological response markers[J]. PCT Int Appl, 2000, 5: 76.
- [30] 曹佳,方福德.毒理基因组学与DNA微阵列技术的应用[J].中国药理学与毒理学杂志,2000,10,14(5):336-340.
- [31] Muttray A F, Mohn W W. Quantitation of the population size and metabolic activity of a resin acid degrading bacterium in activated sludge using slot-blot hybridization to measure the rRNA: rDNA ratio[J]. Microbial Ecol, 1999, 38(4):348-357.

- [32] 张彤, 方汉平. 微生物分子生态技术: 16S rRNA /DNA 方法 [J]. 微生物学通报, 2003, 30 (2): 674-678.
- [33] Roane TM, Pepper I L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium [J]. Microbial Ecol, 1999, 38 (4): 358-364.
- [34] 贾秀英, 董爱华. Cd、Cr(VI) 及其复合污染对鲫鱼脑组织乙酰胆碱酯酶活性的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2003, 22 (3): 337-339.
- [35] Beyers D W, Sikoski P J. Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered Colorado squafish exposed to carbaryl and malathion [J]. Environ Toxicol Chem, 1994, 13: 935-939.
- [36] Galgani F, Bocquene G, Cadiou Y. Evidence of variation in cholinesterase activity in fish along a pollution gradient in the North sea [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1992, 91: 77-82.
- [37] Jmanjula D. Effect of cadmium exposure on lactate dehydrogenase activity in the hepatopancreas and abdominal muscle of the fiddler crab, *Uca pugnator*, comparative biochemistry and physiology [J]. Compar Pharmacol Toxicol, 1993, 106 (3): 739-742.
- [38] Burgeot T, Bocquene G, Porte C, et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1996, 131: 125-141.
- [39] Vigano L, Arillo A, Faugi C, et al. Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediment of the Adriatic sea [J]. Mar Poll Bull, 2001, 42 (10): 887-894.
- [40] Stegeman J J, Hahn M E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species [M]. Boca Raton: Aquatic Publishers, 1994: 87-203.
- [41] 郑永华, 蒲富永. 汞对鲤鲫鱼组织转氨酶活性的影响 [J]. 西南农业大学学报, 1997, 19 (1): 41-45.
- [42] 卢敬让. 镉对中华绒螯蟹肝 R-细胞亚显微结构及血清谷丙转氨酶活力的影响 [J]. 青岛海洋大学学报, 1989, 19 (2): 61-68.
- [43] Blasco J, Puppo J. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) [J]. Comp Biochem Physiol, 1999c, 122: 253-263.
- [44] 方展强, 王春风, 卫焕荣. 汞和硒对剑尾鱼 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12 (2): 220-223.
- [45] Stagg R, Goksoyr A, Rodger G. Changes in branchial Na^+/K^+ -ATPase, metallothionein and P450 1A1 in dab *Limanda* in the German Bight: indicators of sediment contamination [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1992a, 91: 105-115.
- [46] Stagg R M, Rusin J, Brown F. Na^+/K^+ -ATPase activity in the gills of the flounder *Platichthys flesus* in relation to mercury contamination in the Firth of Forth [J]. Mar Environ Res, 1992b, 33: 255-266.
- [47] 卢坚. 金属硫因蛋白在镉接触评价中的应用 [J]. 劳动医学, 1998, 15 (2): 113-115.
- [48] Petrovic S, Ozretic B, Krajnovic M, et al. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study [J]. Mar Pollut Bull, 2001, 42 (12): 1373-1378.
- [49] Todryk SM, Gough MJ, Pockley AG. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential [J]. Immunology, 2003, 110: 1-9.
- [50] Gross C, Hansch D, Gastpar R, et al. Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94 [J]. Biol Chem, 2003, 384: 267-279.
- [51] Shin BK, Wang H, Yim AM, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 7607-7616.
- [52] 沈骅, 王晓蓉, 张景飞. Cu^{2+} 和 Cu-EDTA 对鲫鱼脑组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响 [J]. 环境科学, 2004, 25 (3): 94-97.
- [53] 汪开治. 热休克蛋白的表达是海洋无脊椎动物遭受环境胁迫的指标 [J]. 生物技术通报, 2003, 01: 54.
- [54] 白嵩. 模拟水体镉污染对水稻幼苗某些酶类活性的影响 [J]. 河北农业大学学报, 2006, 29 (2): 1-3.
- [55] 袁敏, 铁柏清, 唐美珍. 重金属单一污染对龙须草叶绿素含量和抗氧化酶系统的影响 [J]. 土壤通报, 2005, 36 (6): 929-932.
- [56] 王虹扬, 黄沈发, 徐镜波, 等. 热污染对金鲫鱼组织内四种酶活性的影响 [J]. 中国环境科学, 2006, 26 (3): 372-375.
- [57] 陈荣, 郑微云, 余群等. 石油污染对僧帽牡蛎 (*Ostrea cucullata*) 抗氧化酶的影响 [J]. 环境科学学报, 2002, 22 (3): 385-388.
- [58] 王重刚, 郑微云, 余群. 苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏抗氧化酶活性的影响 [J]. 环境科学学报, 2002, 22 (4): 529-533.

Macromolecule biomarker detection used in environmental monitoring

ZHOU Chi^{1,2}, LI Chun-hou¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Macromolecule biomarker is a kind of biological macromolecule which is sensitive to environmental changes. Hence it could reflect the environmental effects on organisms. Nowadays, the significant development of molecular biotechnology has made it possible to apply the macromolecule biomarkers to the environmental monitoring. As people become increasingly concerned about the problem of environmental protection, applying macromolecule biomarker detection methods, which are comprehensive, exact, systematic and specific, in the environmental monitoring have become a trend. During the past two decades, the macromolecule biomarker detection was widely used as early warning tools of toxic pollutant and its toxic effects measurement in environmental monitoring. This paper reviewed the application of some important macromolecule biomarkers and their detection methods in environmental monitoring, in hopes to supply reference to further application of those methods in practice. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (5): 864–871]

Key words: macromolecule biomarker; marker detection; environmental monitoring

Corresponding author: LI Chun-hou. E-mail: scslch@163.com

《遗传学报》和《遗传》杂志

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物研究所主办、科学出版社出版的核心期刊,已被美国化学文摘(CA)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)、俄罗斯文摘杂志(AJ)以及NCBI、CABI等20多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容包括遗传学、发育生物学、基因组学、细胞生物学以及分子进化领域的学术论文。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、研究生、大学生、中学生物学教师等。

2005年,《遗传学报》获得第三届全国期刊奖提名奖,2006–2007年,连续获得中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。自2007年起,《遗传学报》的外文刊名变更为*Journal of Genetics and Genomics*。

《遗传学报》(ISSN 1673–8527, CN11–5450/R)为月刊,全年12期,国内邮发代号2–819,国外发行代号:M63。2008年定价50元,全年600元。期刊中文网址:遗传学报.cn

《遗传》(ISSN 0253–9772, CN11–1913/R)为月刊,全年12期。国内邮发代号2–810,国外发行代号:M62。2008年定价40元,全年480元。期刊中文网址:遗传.cn

欢迎订阅,欢迎网上注册投稿,欢迎发布广告。

联系地址:北京市安定门外大屯路:中国科学院遗传与发育生物研究所编辑室

主 编:薛勇彪 编辑室主任:李绍武

E-mail: ycxh@genetics.ac.cn; ycz@genetics.ac.cn

邮政编码:100101 电话/传真:010–64889354, 64807669

http://www.Chinagene.cn; http://jgenetgenomics.org; 中国遗传网.cn