

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第2期

Vol.33 No.2

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

基于人体健康风险的水污染事件污染物安全阈值研究	郑丙辉, 罗锦洪, 付青, 秦延文, 胡林林 (337)
基于人体健康风险的水污染事件遗传性致癌物安全浓度研究	罗锦洪, 郑丙辉, 付青, 黄民生 (342)
湿地水环境健康评价方法及案例分析	李玉凤, 刘红玉, 郝敬峰, 郑因, 曹晓 (346)
北运河下游典型河网区水体中氮磷分布与富营养化评价	单保庆, 菅宇翔, 唐文忠, 张洪 (352)
漳卫南运河流域水质时空变化特征及其污染源识别	徐华山, 徐宗学, 唐芳芳, 于伟东, 程燕平 (359)
黄河三角洲浅层地下水化学特征及形成作用	安乐生, 赵全升, 叶思源, 刘贯群, 丁喜桂 (370)
沉积物扰动持续时间对悬浮物中磷形态数量分布的影响	李大鹏, 黄勇, 李勇, 潘杨 (379)
沉水植物生长期对沉积物和上覆水之间磷迁移的影响	王立志, 王国祥, 俞振飞, 周贝贝, 陈秋敏, 李振国 (385)
长寿湖表层沉积物氮磷和有机质污染特征及评价	卢少勇, 许梦爽, 金相灿, 黄国忠, 胡文 (393)
洪泽湖沉积物中营养盐和重金属的垂向分布特征研究	张文斌, 余辉 (399)
降雨对农家堆肥氮磷流失的影响及其面源污染风险分析	彭莉, 王莉玮, 杨志敏, 陈玉成, 乔俊婧, 赵中金 (407)
浅水湖泊水动力过程对藻型湖区水体生物光学特性的影响	刘笑菡, 冯龙庆, 张运林, 赵林林, 朱梦圆, 时志强, 殷燕, 丁艳青 (412)
基于半分析模型的太湖春季水体漫衰减系数 K_d (490) 估算及其遥感反演	刘忠华, 李云梅, 李瑞云, 吕恒, 檀静, 郭宇龙 (421)
基于 QAA 算法的巢湖悬浮物浓度反演研究	张红, 黄家柱, 李云梅, 徐伟凡, 刘忠华, 徐昕 (429)
好氧/厌氧潜流湿地结构工艺优化	李锋民, 单时, 李媛媛, 李扬, 王震宇 (436)
邻苯二甲酸二丁酯对短裸甲藻活性氧自由基的影响	别聪聪, 李锋民, 李媛媛, 王震宇 (442)
Rac-及 S-异丙甲草胺对 2 种微藻毒性特征影响研究	蔡卫丹, 刘惠君, 方治国 (448)
羟基自由基致死船舶压载水海洋有害生物研究	白敏冬, 张拿慧, 张芝涛, 陈操, 孟祥盈 (454)
天然菱铁矿改性及强化除砷研究	赵凯, 郭华明, 李媛, 任燕 (459)
零价铁降解 4-氯硝基苯动力学研究	廖娣劫, 杨琦, 李俊鎔 (469)
水体中氧氟沙星的光化学降解研究	邵萌, 杨桂朋, 张洪海 (476)
阿替洛尔在硝酸根溶液中的光降解研究	季跃飞, 曾超, 孟翠, 杨曦, 高士祥 (481)
吡啶在紫外光辐射下的生物降解	方苗苗, 阎宁, 张永明 (488)
蜜环菌漆酶对蒽醌类染料的脱色条件优化	朱显峰, 秦仁炳, 余晨晨, 范书军 (495)
ϵ -聚赖氨酸生产废菌体对六价铬吸附影响的研究	曹玉娟, 张杨, 夏军, 徐虹, 冯小海 (499)
丝状菌污泥致密过程的强化条件研究	李志华, 孙玮, 姬晓琴, 王晓昌 (505)
亚硝化颗粒污泥对温度变化的响应特性研究	罗远玲, 杨朝晖, 徐峥勇, 周玲君, 黄兢, 肖勇, 曾光明, 汪理科 (511)
我国典型工程机械燃油消耗量及排放清单研究	李东玲, 吴烨, 周昱, 杜让, 傅立新 (518)
北京市 PM_{10} 自动监测网络优化研究	齐玲, 赵越, 谢绍东 (525)
道路绿化带对街道峡谷内污染物扩散的影响研究	徐伟嘉, 幸鸿, 余志 (532)
Fe^{II} (EDTA) 络合协同 RDB 去除 NO 废气效能及过程分析	陈浚, 杨宣, 於建明, 蒋轶锋, 陈建孟 (539)
UV-B 辐射对亚热带森林凋落叶氮、磷元素释放的影响	宋新章, 张慧玲, 江洪, 余树全 (545)
干热河谷林地燥红土固碳特征及“新固定”碳表观稳定性	唐国勇, 李昆, 孙永玉, 张春华 (551)
九龙江河口表层水体及沉积物中甲烷的分布和环境控制因素研究	郭莹莹, 陈坚, 尹希杰, 孙治雷, 邵长伟 (558)
秋季黄河口滨岸潮滩湿地系统 CH_4 通量特征及影响因素研究	姜欢欢, 孙志高, 王玲玲, 牟晓杰, 孙万龙, 宋红丽, 孙文广 (565)
我国典型非木浆造纸二噁英排放研究	王志芳, 丁琼, 王开祥, 吴昌敏, 曲云欢, 赵晓冬 (574)
典型电器工业区河涌沉积物中的多溴联苯醚空间和垂直分布	邱孟德, 邓代永, 余乐洹, 孙国萍, 麦碧娴, 许玫英 (580)
电子废物拆解区农业土壤中多氯联苯的污染特征	王学彤, 李元成, 张媛, 缪绎, 孙阳昭, 吴明红, 盛国英, 傅家谟 (587)
北京科教园区绿地土壤中多环芳烃的残留特征与潜在风险	彭驰, 王美娥, 欧阳志云, 焦文涛, 陈卫平 (592)
上海城市样带土壤重金属空间变异特征及污染评价	柳云龙, 章立佳, 韩晓非, 庄腾飞, 施振香, 卢小遮 (599)
海河流域北部地区河流沉积物重金属的生态风险评价	尚林源, 孙然好, 王赵明, 汲玉河, 陈利顶 (606)
三峡库区消落带不同水位高程土壤重金属含量及污染评价	王业春, 雷波, 杨三明, 张晟 (612)
超声波促进好氧/缺氧污泥消化过程中细菌群落结构分析	叶运弟, 孙水裕, 郑莉, 刘宝健, 蔡明山, 许燕滨, 占星星 (618)
大庆聚驱后油藏内源微生物群落结构解析与分布特征研究	赵玲侠, 高配科, 曹美娜, 高梦黎, 李国强, 朱旭东, 马挺 (625)
不同碳源刺激对老化污染土壤中 PAHs 降解研究	尹春芹, 蒋新, 王芳, 王聪颖 (633)
应用电致化学发光分子探针技术对微小原甲藻的检测	朱霞, 甄毓, 米铁柱, 于志刚, 池振明, 路兴岚 (640)
软骨藻酸直接竞争 ELISA 方法的建立及优化	王茜, 程金平, 高利利, 董宇, 席磊 (647)
固相萃取-高效液相色谱法同时测定水体中的 10 种磺胺类抗生素	洪蕾洁, 石璐, 张亚雷, 周雪飞, 朱洪光, 林双双 (652)
五氯酚对 HeLa 细胞毒性及 DNA 损伤的研究	金帮明, 王辅明, 熊力, 张晓峰, 刘堰 (658)
建筑陶瓷碳计量与优化模型研究	彭军霞, 赵宇波, 焦丽华, 曾路, 郑为民 (665)
《环境科学》征订启事 (447) 《环境科学》征稿简则 (475) 信息 (524, 586, 605, 624)	

应用电致化学发光分子探针技术对微小原甲藻的检测

朱霞¹, 甄毓^{2*}, 米铁柱², 于志刚³, 池振明¹, 路兴岚²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003; 2. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 海洋环境与生态教育部重点实验室, 青岛 266100; 3. 中国海洋大学化学化工学院, 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 青岛 266100)

摘要:以双特异分子探针技术(NPA-SH)为基础,运用电致化学发光技术(ECL)和磁性微球分选技术对其进行改进,成功建立了用于赤潮藻类定性定量分析的电致化学发光分子探针(ECL-MP)检测新技术.设计微小原甲藻特异性NPA探针并对其进行联吡啶钌和生物素标记,优化磁性微球使用量,在ECL检测装置中启动电化学反应,建立光信号与微小原甲藻细胞数目间的ECL-MP分析曲线并对其进行验证.结果表明,标记后的NPA探针具有一定的特异性和实用性;4 μg是检测20 μL目标藻杂交混合液的最适磁性微球使用量;在最适条件下,微小原甲藻细胞数的线性分析范围 $6.25 \times 10^2 \sim 4 \times 10^4$ 个;比较ECL-MP和显微计数方法的样品检测结果,在95%置信区间内二者无显著差异(*t*-检验).ECL-MP方法为实现微小原甲藻现场样品的快速准确检测提供了一种新方法.

关键词:电致化学发光;双特异分子探针;微小原甲藻;联吡啶钌;三丙胺

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)02-0640-07

Detection of *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller with the Electrochemiluminescence-Molecular Probe

ZHU Xia¹, ZHEN Yu², MI Tie-zhu², YU Zhi-gang³, CHI Zhen-ming¹, LU Xing-lan²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 3. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Abstract: In this study, the electrochemiluminescence-molecular probe (ECL-MP) was established based on the sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay (NPA-SH) improved by electrochemiluminescence (ECL). It can be used for detecting *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller qualitatively and quantitatively. NPA probes of *P. minimum* were designed based on the NPA-SH. After labeled with Ru(bpy)₃²⁺ and biotin, they bounded with streptavidin-coupled magnetic beads and generated electrochemiluminescence in an ECL analyzer. The ECL counts per second (CPS) was drawn against the cell number obtained from microscopy to establish a calibration curve of *P. minimum*. The results showed that the labeled NPA probes had good specificity and practicability, the optimal usage of magnetic beads was 4 μg for detecting 20 μL hybridization mixture, the detection range of *P. minimum* cell numbers was $6.25 \times 10^2 \sim 4 \times 10^4$, and there was no significant difference between the data gained from ECL-MP and microscopy with 95% confidence level (*t*-test) when treated with cultured and mixed samples. ECL-MP was a convenient new tool for rapid assessment of *P. minimum* in marine environment.

Key words: electrochemiluminescence (ECL); sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay (NPA-SH); *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller; Ru(bpy)₃Cl₂·6H₂O; tripropylamine (TPRA)

微小原甲藻[*Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller]是我国常见的赤潮藻种类,在各个海域均有分布^[1].近些年来,由于水体富营养化所引发的微小原甲藻赤潮时有发生^[2,3],微小原甲藻产生的腹泻性贝毒^[4]给鱼虾贝类和人类健康带来巨大威胁.随着人们对赤潮灾害的日益重视,有关赤潮监测和预警的方法也有了长足发展^[5].目前,在生物检测领域,核酸分子探针技术如荧光原位杂交技术^[6]、实时荧光定量PCR技术^[7]和夹心杂交技术^[8]等凭借其快速、准确、专一性强等优点在赤潮生物定

性定量检测中发挥着重要作用^[9,10].

本实验室在对夹心杂交技术进行改良后,克服了其rRNA不稳定、特异性不足的缺点,成功建立了双特异分子探针技术(sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-

收稿日期: 2011-04-26; 修订日期: 2011-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(40706044, 40705047); 国家908项目(908-02-02-02)

作者简介: 朱霞(1985~),女,硕士研究生,主要研究方向为藻类分子生态学,E-mail: myfavorite_1314@163.com

* 通讯联系人,E-mail: zhenyu@ouc.edu.cn

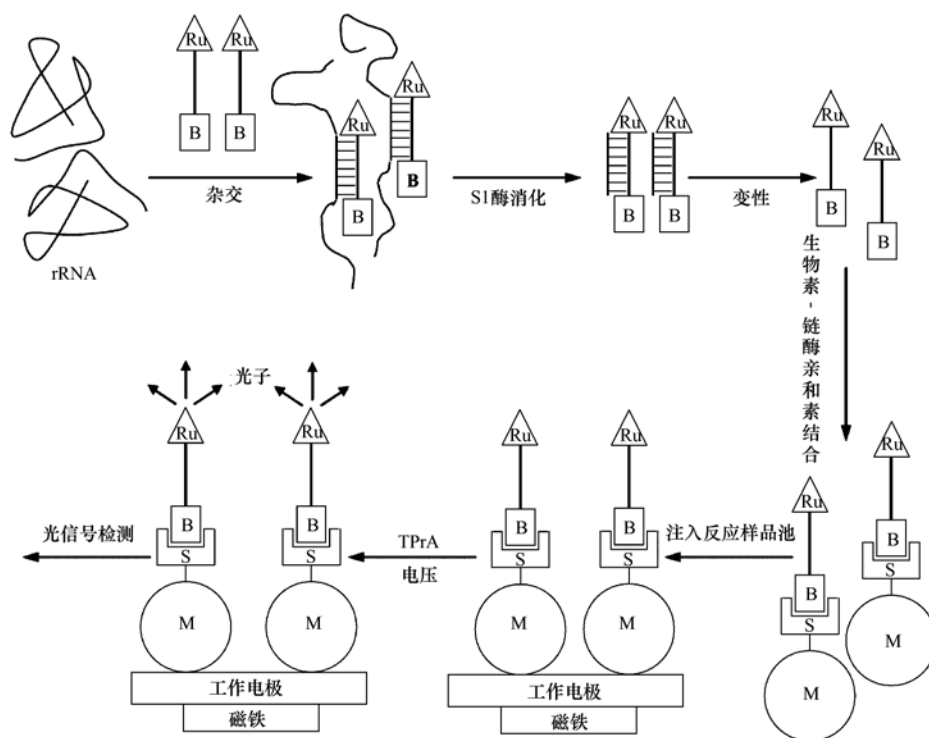
SH)^[11, 12], 从根本上解决了探针种属特异性的难题, 实现了对样品中十余种微藻的定性定量并行分析^[10]. 然而, 该技术也存在一定的缺陷, 比如酶标显色过程时间较长、操作复杂、试剂稳定性较差等. 为此, 本研究尝试用高灵敏度的电致化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 检测来取代其酶标显色过程以克服上述缺点.

电致化学发光是指在电极上施加一定的电压, 使电极反应产物之间或电极反应产物与溶液中某组分之间进行化学反应而产生的一种光辐射现象^[13]. 该法不仅具有化学发光分析的灵敏度高、线性范围宽和仪器简单等优点, 还具有电化学分析控制性强、选择性好等优点. 其中, 较为典型的是三丙胺-联吡啶钌 [TPrA-Ru(bpy)₃²⁺] 电致化学发光体系, 它的工作原理是, 在电极上施加一定的电压使 Ru(bpy)₃²⁺ 被氧化成 Ru(bpy)₃³⁺, 成为一种强氧化剂, 同时 TPrA 被氧化成为阳离子自由基 TPrA^{•+}, 并迅速自发脱去一个质子形成自由基 TPrA[•], 成为一种强还原剂; Ru(bpy)₃³⁺ 和 TPrA[•] 发生氧化还原反应, 使 Ru(bpy)₃³⁺ 还原成激发态 Ru(bpy)₃^{2+*}; 接着激发态 Ru(bpy)₃^{2+*} 以荧光机制衰变释放出一个波长为 610 nm 左右的光子后成为基态的 Ru(bpy)₃²⁺, 继续

参与发生在电极表面的电致化学发光反应^[14]. 这一过程在电极表面周而复始地进行, 产生大量光子使测定信号不断放大, 检测灵敏度大大提高. 近些年来, 用发光底物 Ru(bpy)₃²⁺ 标记核酸探针进行检测越来越多地应用于生化、免疫和药物分析等领域^[14~17].

综上所述, 本课题组拟在双特异分子探针技术的基础上, 将具有种特异性的酶保护分析探针 (NPA 探针) 进行联吡啶钌和生物素标记, 并利用磁性微球分选技术^[18, 19] 实现对标记探针的快速分离, 从而建立一种可鉴定到种、分析速度较快的赤潮藻类电致化学发光分子探针检测新技术 (electrochemiluminescence-molecular probe, ECL-MP). 本研究以微小原甲藻为对象介绍 ECL-MP 方法的建立过程.

该技术原理如图 1 所示, 将联吡啶钌和生物素标记的 NPA 探针 (简称为 B-NPA-Ru) 与微小原甲藻的 rRNA 进行杂交; 核酸 S1 酶酶切去除不匹配或游离的 B-NPA-Ru 探针及单链 rRNA; 完全匹配的杂交复合体经变性后释放出单链的 B-NPA-Ru 探针; B-NPA-Ru 探针与链霉亲和素包被的磁性微球结合, 经磁力柱分离后注入反应样品池, 受工作电极



Ru 代表 Ru(bpy)₃²⁺; B 代表生物素; S 代表链霉亲和素; M 代表磁性微球

图 1 电致化学发光分子探针检测技术原理

Fig. 1 Schematic of electrochemiluminescence-molecular probe

下方磁极的作用吸附于电极表面;加入三丙胺溶液,当电极上的电压达到一定值时启动电化学发光反应;通过建立光信号强度与藻细胞数量之间的线性关系实现对目标藻的定性定量检测.

在 S1 酶保护分析阶段,ECL-MP 技术和 NPA-SH 技术基本相同,只是前者用联吡啶钉和生物素对 NPA 探针进行标记,后者使用未标记的 NPA 探针.在对信号的检测方面,NPA-SH 技术利用常规的杂交及酶标显色方法获得信号,而 ECL-MP 则是利用磁珠分选和电致化学发光反应来获取光信号,这样就可以大大简化实验步骤、缩短分析时间.

1 材料与方法

1.1 藻的培养

实验所需藻种培养于 f/2 海水培养液中^[20],置于光照培养箱中,光强为4 000 lx,光照周期为 12 h: 12 h,培养温度为 22℃,每 3 周重新接种一次.

1.2 电致化学发光检测系统

该检测系统由本实验室自行构建而成(另有相关文献报道),其核心部分包括样品反应池和超微光信号采集系统,置于自制暗箱中.样品池是样品发生电致化学反应产生光信号的部位,包括工作电极、对电极和参比电极.工作电极采用圆片状铂电极,对电极采用围绕工作电极的圆环状铂丝电极,Ag/AgCl 参比电极悬置于工作电极上方.工作电极下方放置一磁铁,可以对分选探针的磁性微球进行富集.工作电极与参比电极之间的恒电位由外置的恒电位仪提供(MCP-1,江苏江分电分析仪器有限公司).超

微光信号采集系统由光纤束、光子计数探头(CH151,北京滨松光子技术有限公司,光谱响应范围 300 ~ 650 nm)组成.光子经光纤收集后被光子计数探头捕获并由软件通过 PCI 接口的数据采集卡进行计数,数据最终由计算机处理和显示.该系统经反复验证,灵敏度高,性能稳定,为建立赤潮藻类 ECL-MP 检测方法打下了坚实的基础.

1.3 微小原甲藻特异性探针的制备

微小原甲藻 rRNA 基因序列的获得、特异性 NPA 探针的设计和合成参见文献[21],根据 NPA 探针序列设计相应的捕获探针与信号探针(表 1).

1.4 钉标记寡核苷酸探针的制备

将 NPA 探针的 5'端和 3'端分别进行生物素和氨基标记,得到 B-NPA-NH₂ 探针,然后利用氨基基团的桥联作用将联吡啶钉与核酸探针连接起来,进而获得 B-NPA-Ru 探针,标记方法如下^[22, 23]:将 B-NPA-NH₂ 探针稀释于 1 × PBS (pH 7.4) 中,浓度为 0.1 μmol·L⁻¹; 将 Origen label ([4-(N-succinimidylloxycarbonylpropyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine] bis (2,2'-bipyridine) ruthenium (II) dihexafluorophosphate) (Sigma 公司)溶于 DMSO (生物工程(上海)有限公司)中,浓度为 5 μmol·L⁻¹; 将上述 2 种溶液按 1:4 比例在室温黑暗处过夜反应;加入 1/10 体积 NaAc 溶液(3 mol·L⁻¹, pH 5.2)和 2 倍体积冰冷无水乙醇,混匀后 -20℃ 静置至少 2 h; 12 000 r·min⁻¹, 4℃ 离心 10 min,弃上清,沉淀用 70% 酒精洗 2 次,室温干燥后即得到 B-NPA-Ru 探针.将其溶解于 25 μL 纯水中, -20℃ 保存备用.

表 1 微小原甲藻 NPA-SH 分析相关探针序列信息

Table 1 Sequences of probes for *P. minimum*

探针	序列(5'-3')	GC/%	T _m /℃	长度/bp
捕获探针	Biotin-tcatggtagctcgtctacgggtga	54.2	65.4	24
NPA 探针	acagtcgcgaatgagttctgccaaggctattcactcacccgtagacgagctaccatga	50.8	82.0	59
信号探针	ggcagaactcatttgcggactgt-Fluorescein	52.2	69.5	23

1.4.1 夹心杂交验证

将裂解液(80% formamide, 400 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA, 1% SDS, pH 6.4) S1 酶缓冲液(25 mmol·L⁻¹ ZnSO₄, 250 mmol·L⁻¹ NaAc, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 4.5)和 S1 酶中止缓冲液(30 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA, 350 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄, 150 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 62.5 mol·L⁻¹ NaCl)按 1:1:5 比例混合制成杂交混合液;将微小原甲藻的 NPA 探针、B-NPA-NH₂ 探针和 B-NPA-Ru 探针用上述混合液各 100 μL 稀释后加入固定有捕

获探针的酶标板(Nunc 公司)中,恒温摇床(50℃, 160 r·min⁻¹)中杂交 30 min,然后用洗涤液 PBST (含有 0.5% Tween-20 的 PBS)洗涤 3 次;每孔注入 100 μL 含有 5 nmol·L⁻¹ 信号探针的杂交缓冲液(4 × SSC, 0.02% SDS, 8% formamide, 50 mmol·L⁻¹ Tris, 5% 山羊血清, pH 7.0),恒温摇床(50℃, 160 r·min⁻¹)中杂交 30 min,然后用 PBST 洗涤 3 次;将辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体按 1:6 000 的比例稀释于生理盐水中(0.9% NaCl, 5% 山羊血清),每孔 100 μL 加入酶标板,恒温摇床(50℃, 160

$\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)中孵育 30 min,然后用 PBST 洗涤 3 次;每孔注入 TMB 显色液 100 μL ,恒温摇床(37°C , 160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)处理 15 min 后,每孔注入 50 μL 硫酸($2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)终止反应,用 450 nm 和 630 nm 双波长测定吸光值。

1.4.2 S1 酶保护分析验证

取微小原甲藻细胞培养液于 2 mL 离心管中,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 裂解液(使用前加入固体酵母 tRNA,使其终浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)稀释藻细胞,然后用 450 W、50% 占空比(超声波细胞破碎仪 JY-92 II,宁波科生仪器厂)周期超声波破碎处理 4 min,真空过滤收集细胞裂解液于另一离心管中;将细胞裂解液二倍逐级稀释后分别与 NPA 探针和 B-NPA-Ru 探针混合(探针终浓度 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),制得杂交混合液 20 μL ,将该混合液 94°C 处理 15 min, 42°C 杂交 2 h;杂交混合液自然冷却后,加入 20 μL S1 酶缓冲液(含 S1 酶 $2\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 42°C 处理 1 h;随后,加入 100 μL S1 酶中止缓冲液, 94°C 处理 15 min,自然冷却后将此 140 μL 反应混合液进行夹心杂交实验。

1.5 磁性微球对 ECL 的影响

分别取 0、2、4、6 和 8 μg 表面标记有链霉亲和素的磁性微球(Promega 公司)用 140 μL 杂交混合液(体积比 1:1:5)稀释,加入定量 B-NPA-Ru 探针,恒温摇床(37°C , 160 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)孵育 30 min,使磁珠与探针充分结合;经磁力柱吸附后,磁珠和溶液分离,用 $1\times\text{PBS}$ (pH 7.4)彻底清洗并稀释磁珠,然后将其与 TPRA($1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Sigma 公司)混合,在外加电压为 1.0 V,电流 1.0 mA(另有相关文献报道)条件下启动 ECL 反应,测定电致化学发光信号值(counts per second, CPS)。

1.6 微小原甲藻 ECL-MP 检测曲线的构建

将微小原甲藻细胞裂解液 2 倍逐级稀释后分别与等量 B-NPA-Ru 探针混合(探针终浓度为 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),制得杂交混合液 20 μL ,进行 S1 酶保护分析实验;经高温变性探针释放后,将 140 μL 反应混合液与 4 μg 包被有链霉亲和素的磁性微球混合,恒温摇床孵育 30 min;磁力柱将磁珠分离后用 $1\times\text{PBS}$ 彻底清洗并稀释磁珠,与 TPRA 混合加入样品池,进行 ECL 光信号检测。以微小原甲藻细胞数为横坐标,光子计数值为纵坐标建立微小原甲藻 ECL-MP 检测曲线。

1.7 微小原甲藻 ECL-MP 检测曲线的验证

根据已建立的微小原甲藻 ECL-MP 线性分析曲

线,分别对纯种目标藻、实验室混合藻及模拟现场样品进行分析,并将检测结果与传统显微计数方法的结果进行比较以验证该方法的准确性和可行性。

1.7.1 纯种目标藻的分析

收集一定浓度的纯种微小原甲藻细胞样品,平均分成 6 份,3 份用 ECL-MP 方法进行定性定量检测,3 份用显微镜观察计数。将 ECL-MP 检测结果与显微镜计数结果进行比较。

1.7.2 实验室混合样品的分析

将数量级相近(10^3)的微小原甲藻、东海原甲藻、中肋骨条藻、裸甲藻、海洋原甲藻、旋链角毛藻这 6 种藻进行混合,制成混合样品。将混合样品平均分成 6 份,3 份用 ECL-MP 方法检测样品中微小原甲藻的数量,3 份用显微镜进行观察计数。计算该方法和显微计数法的平均值、相对标准偏差,比较 2 种方法的百分偏差及结果的差异性,以检验 ECL-MP 方法的可行性。

1.7.3 模拟自然海水样品的分析

由于自然海水中有多种微藻、浮游动物还有大量的泥沙碎屑等,这些干扰可能会对新方法的检测产生一定的影响。因此,本实验中选择用石老人海区的自然海水来稀释一定量微小原甲藻细胞,以此来模拟自然环境中的样品。用 ECL-MP 方法对该样品进行检测,通过已建立的分析曲线计算出模拟样品中微小原甲藻的细胞个数,并将结果与显微镜计数结果相比较。

2 结果与分析

2.1 探针特异性验证

用本研究中设计的微小原甲藻特异性探针分别对微小原甲藻及数量级相近(10^5)的其它 11 种常见微藻进行 NPA-SH 分析,以确定该探针在实际检测中具有种特异性。结果表明,探针只有在检测微小原甲藻时,才出现显著不同于检测其它微藻的信号值(图 2),这说明本研究设计的探针具有良好的种特异性,可以用于后续实验。

2.2 钆标记 NPA 探针可行性验证

2.2.1 夹心杂交验证

从图 3 可以看出, B-NPA-Ru 探针可以正常进行夹心杂交实验,随着探针数量的不断增大信号值也逐步升高。这一趋势与未标记的 NPA 探针夹心杂交结果趋势相近,说明用联吡啶衍生物标记核酸探针的方法是可行的,不会影响到酶标板上的夹心杂交反应。

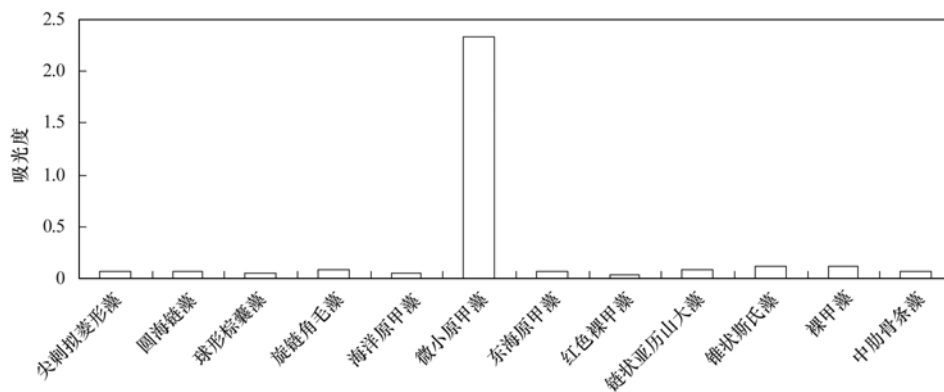


图2 微小原甲藻探针特异性验证

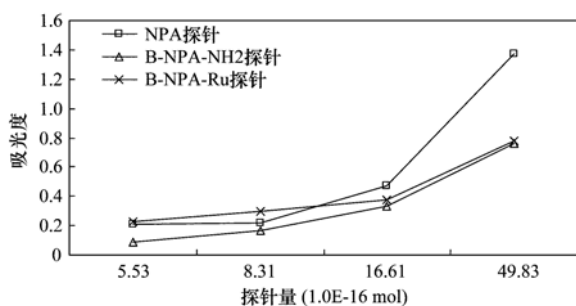
Fig. 2 Specificity of the NPA probe for *P. minimum*

图3 B-NPA-Ru 探针夹心杂交验证

Fig. 3 Tests of the B-NPA-Ru probes with SHA

2.2.2 酶保护分析验证

从图4可以看出,微小原甲藻 B-NPA-Ru 探针针对不同数量的微小原甲藻检测能得到较好的信号值,该结果与未标记的 NPA 探针检测结果相近,变化趋势一致.说明该探针能够正确进行 S1 酶保护分析实验,不会影响后续夹心杂交的信号检测.

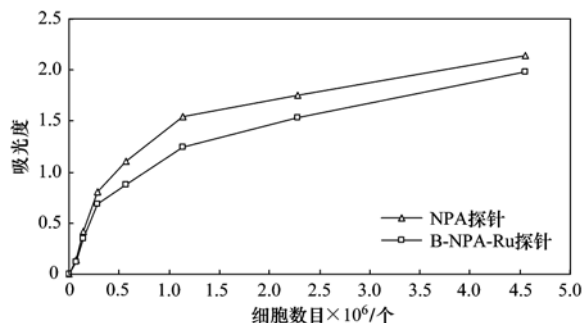


图4 B-NPA-Ru 探针酶保护分析验证

Fig. 4 Tests of the B-NPA-Ru probes with NPA

通过上述实验证明,本研究中对寡核苷酸探针进行联吡啶标记的方法是可行的,联吡啶标记的特异性探针可以正常进行 NPA-SH 分析,这就为

下一步研究奠定了基础.

2.3 磁性微球用量对 ECL 反应的影响

随着磁性微球用量的增加,ECL 检测值先增大后减小,当加入 4 μg 磁性微球时,电化学发光的强度处于最大值(图5).因此,本研究选择 4 μg 作为检测 20 μL 微小原甲藻杂交混合液的最适磁性微球使用量.

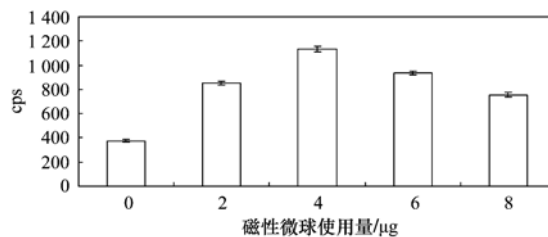


图5 磁性微球用量的优化

Fig. 5 Optimization of magnetic beads

2.4 微小原甲藻 ECL-MP 分析曲线

微小原甲藻 ECL-MP 检测曲线如图6(a)所示,本研究选取 S 形曲线的中间部分即可得到分析曲线[图6(b)].当微小原甲藻细胞数目在 $6.25 \times 10^2 \sim 4 \times 10^4$ 时,ECL 检测值处于线性分析范围内,跨越 3 个数量级;回归方程为 $y = 0.423x + 1.177$, $R^2 = 0.990$,式中, x 代表微小原甲藻细胞数目的对数值, y 代表光子计数值的对数值.

2.5 微小原甲藻 ECL-MP 分析曲线验证

对微小原甲藻细胞通过显微计数和 ECL-MP 方法进行分析,结果如表2所示.在纯种分析中,2 种方法的检测结果在 95% 的置信区间内没有显著性差异(t -检验);虽然混合藻和模拟现场样品的检测结果与显微镜计数的差别较 2 种检测方法对纯种藻检测的差别有所扩大,但在 95% 的置信区间内,二

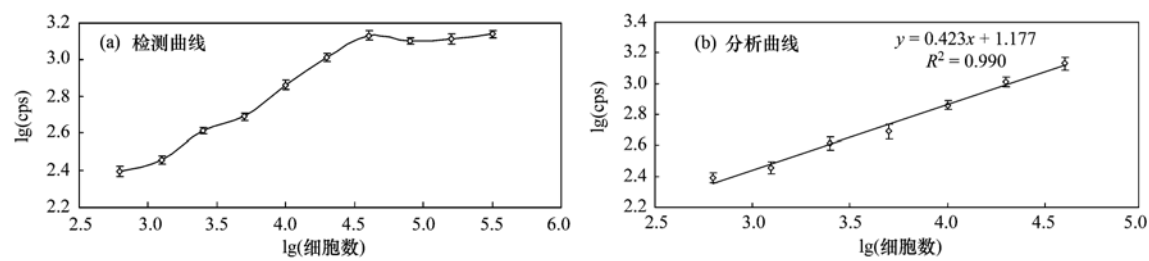


图6 微小原甲藻电致化学发光分子探针检测曲线和分析曲线
Fig. 6 Calibration curves of *P. minimum* with ECL-MP

者还是没有显著性差异(t -检验). 这就表明 ECL-MP 这也为实现微小原甲藻现场样品的快速准确鉴定奠方法在对微小原甲藻检测方面具有良好的特异性, 定了基础.

表2 ECL-MP 和显微镜计数法比较

Table 2 Comparisons of the results between ECL-MP and microscopy

样品	分析方法	平均细胞数/个	相对标准偏差/%	2 种方法的偏差/%
纯种	ECL-MP	1.07×10^4	14.4	2.9
	显微镜计数法	1.04×10^4	4.6	
混合藻	ECL-MP	7.50×10^3	7.2	6.3
	显微镜计数法	8.02×10^3	2.5	
模拟样品	ECL-MP	7.27×10^3	4.9	6.8
	显微镜计数法	7.80×10^3	3.8	

3 讨论

据报道, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的核酸探针具有如下优点^[24]:①在水中溶解度好,稳定性高,在室温下半衰期 $>1\text{ a}$, $2\sim5^\circ\text{C}$ 可保持 1 a 以上,克服了酶标记的不稳定性;②与酶标记物相比, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 的相对分子质量小得多[约 1×10^3 ,而辣根过氧化物酶(HRP)约 4×10^7 ,酸性磷酸酶(AP)约 1×10^8 ,葡萄糖淀粉酶(GAL)约 5×10^5],可在核酸分子上进行多个标记(>20 个)而不影响核酸的杂交性能和特异性;③ $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 在ECL反应中能发生再生循环反应,使得分析灵敏度大幅提高;④可通过改变施加的电位控制来调节化学发光反应的发生和速度. 因此,在本研究中采用 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记NPA探针的方法来改进NPA-SH中酶标显色读取信号过程,以实现简化实验步骤,缩短分析时间,提高检测灵敏度的目的. 其中, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记的NPA探针能否正确进行NPA-SH分析,即标记是否影响杂交、是否影响酶切的精确性等是标记是否成功的关键,研究结果表明 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 标记并未影响NPA探针进行NPA-SH分析,这就为后续实验的顺利开展提供了必要的前提条件.

磁性微球是一种新型的亲和性固相载体,能够方便地将待测组分分离出来. 磁性微球具有非常大

的比表面积,从而使微球功能团及选择性吸附能力增大;具有磁性,可使包被有生物高分子的磁珠在外加磁场的作用下方便地进行分离;此外,它还具有生物相容性及可包被多种功能基团的特性^[25, 26]. 目前,磁性微球广泛应用于核酸探针及其它成分的快速分离和检测^[27, 28]. 本研究通过包被有链酶亲核素的磁性微球与生物素标记的B-NPA-Ru探针结合以完成对目标探针的分选. 在实际操作中,如果磁性微球用量不足,检测探针就不能全部被其捕获,从而使检测灵敏度偏低;相反,如果其用量过多,则过量的磁性微球会吸附于电极表面,阻碍反应的正常进行及光子的检测. 因此,寻找合适的磁性微球用量对提高ECL信号检测的灵敏度和准确性显得十分必要. 经反复测试, $4\text{ }\mu\text{g}$ 是针对 $20\text{ }\mu\text{L}$ 微小原甲藻杂交混合液的最适磁性微球使用量.

本研究在NPA-SH基础上所建立的应用于赤潮藻类定性定量分析的ECL-MP检测方法,经反复验证,操作简洁、灵敏度高、准确性好. 通过对几种不用类型样品的检测,证明了该方法具有很好的特异性、实用性,可以顺利地为目标藻进行定性定量分析. 该方法的整个分析时间大约为 4.5 h ,对比NPA-SH用时 7.5 h ^[10]完成检测来说,检测时间大大缩短;同时,NPA-SH对微小原甲藻的线性分析范围是 $1.1 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^5$ 个细胞^[10],而ECL-MP的线性范围

为 $6.25 \times 10^2 \sim 4 \times 10^4$ 个细胞,因此,从检测限和检测范围来说,ECL-MP 也大大优于 NPA-SH. 赤潮暴发时,每毫升海水中含有的微小原甲藻高达 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞^[21],因此,该方法可以满足微小原甲藻的日常监测、预警预报和发生机制研究等方面的需要。

4 结论

本研究中所设计的微小原甲藻特异性探针(NPA 探针、捕获探针和信号探针)具有良好的种属特异性,且经联吡啶钉和生物素标记后的 NPA 探针也能正常进行 NPA-SH 分析;检测 20 μL 微小原甲藻杂交混合液的最适磁性微球使用量为 4 μg ;当微小原甲藻细胞数目在 $6.25 \times 10^2 \sim 4 \times 10^4$ 时,ECL 检测值处于线性分析范围内,回归方程为 $y = 0.423x + 1.177$ ($R^2 = 0.990$), x 代表微小原甲藻细胞数目的对数值, y 代表光子计数值的对数值;用 ECL-MP 方法对纯种、混合种和模拟自然海水样品进行检测,其结果与显微镜计数结果在 95% 置信区间内无显著差异(t -检验)。

参考文献:

- [1] 郭皓. 中国近海赤潮生物图谱[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.
- [2] 邹景忠, 董丽萍, 秦保平. 渤海湾富营养化和赤潮问题的初步探讨[J]. 海洋环境科学, 1983, 2(2): 41-54.
- [3] 姚伟民, 李超, 郜钧璋. 浙南海域的赤潮生物[J]. 海洋通报, 2006, 25(3): 87-91.
- [4] 林永水, 周近明, 何建宗. 赤潮生物[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] 于志刚, 米铁柱, 姚鹏, 等. 赤潮藻鉴定与定量检测方法进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(5): 1067-1076.
- [6] 陈斌, 梁斌, 郭皓. 应用荧光原位杂交方法检测赤潮异弯藻[J]. 海洋环境科学, 2009, 28(1): 72-75.
- [7] 赵丽媛, 于志刚, 甄毓, 等. 东海原甲藻线粒体细胞色素 b (Cytb) 基因的定量检测[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, 39(3): 448-452.
- [8] Lange M, Medlin L K. Design and testing of ITS probes for distinguishing *Phaeocystis* species[J]. Protist, 2002, 153(3): 275-282.
- [9] 侯建军. 赤潮生物的分子探针检测方法及其应用研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2005.
- [10] 甄毓. 双特异分子探针技术的建立及对十二种常见赤潮藻的检测[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [11] Cai Q S, Li R X, Zhen Y, et al. Detection of two *Prorocentrum* species using sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay[J]. Harmful Algae, 2006, 5(3): 300-309.
- [12] Zhen Y, Yu Z G, Cai Q S, et al. Detection of two diatoms using sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay (NPA-SH)[J]. Hydrobiologia, 2007, 575(1): 1-11.
- [13] Tokel N E, Bard A J. Electrogenerated chemiluminescence. IX. Electrochemistry and emission from systems containing tris(2, 2'-bipyridine) ruthenium (II) dichloride[J]. Journal of the American Chemical Society, 1972, 94(8): 2862-2863.
- [14] Richter M M. Electrochemiluminescence (ECL)[J]. Chemical Reviews, 2004, 104(6): 3003-3036.
- [15] 张成孝, 漆红兰. 电化学发光分析研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 2004, 26(4): 7-13.
- [16] Gorman B A, Francis P S, Barnett N W. Tris (2, 2'-bipyridyl) ruthenium (II) chemiluminescence[J]. Analyst, 2006, 131(5): 616-639.
- [17] Bard A J. Electrogenerated chemiluminescence[M]. New York: Marcel Dekker, 2004.
- [18] Hsueh Y T, Colline S D, Smith R L. DNA quantification with an electrochemiluminescence microcell[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1998, 49(1-2): 1-4.
- [19] Miao W J, Bard A J. Electrogenerated chemiluminescence. 77. DNA hybridization detection at high amplification with [Ru (bpy)₃]²⁺-containing microspheres[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(18): 5379-5386.
- [20] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8(2): 229-239.
- [21] 蔡青松, 李荣秀, 甄毓, 等. 用双特异探针技术定性定量分析微型原甲藻[J]. 海洋学报, 2006, 28(6): 127-133.
- [22] Kenten J H, Casadei J, Link J, et al. Rapid electrochemiluminescence assays of polymerase chain reaction products[J]. Clinical Chemistry, 1991, 37(9): 1626-1632.
- [23] Kenten J H, Gudibande S, Link J, et al. Improved electrochemiluminescent label for DNA probe assays: rapid quantitative assays of HIV-1 polymerase chain reaction products[J]. Clinical Chemistry, 1992, 38(6): 873-879.
- [24] 陈扬, 陆祖宏. 发光标记分析及其在核酸检测中的应用[J]. 化学通报, 2001, 64(9): 537-547.
- [25] 刘尚莲, 崔晗. 生物高分子磁性微球的制备及靶向给药应用[J]. 化工时刊, 2010, 24(7): 34-38.
- [26] 郭英姝. 基于磁性微球的化学发光免疫标记技术的研究及其应用[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2010.
- [27] 丁玮洁, 徐宏, 张吉喜, 等. 磁性微球固相载体化学发光免疫检测方法建立[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(10): 1343-1344.
- [28] 冯国栋, 赵卫星. 磁性微球在生化领域中的应用[J]. 化工时刊, 2010, 24(6): 45-49.

CONTENTS

Safety Value of Contaminant in Water Pollution Accident Based on Human Health Risk	ZHENG Bing-hui, LUO Jin-hong, FU Qing, <i>et al.</i> (337)
Safety Concentration of Genotoxic Carcinogens in Water Pollution Accident Based on Human Health Risk	LUO Jin-hong, ZHENG Bing-hui, FU Qing, <i>et al.</i> (342)
A Quantitative Method and Case Analysis for Assessing Water Health	LI Yu-feng, LIU Hong-yu, HAO Jing-feng, <i>et al.</i> (346)
Temporal and Spatial Variation of Nitrogen and Phosphorus and Eutrophication Assessment in Downstream River Network Areas of North Canal River Watershed ...	SHAN Bao-qing, JIAN Yu-xiang, TANG Wen-zhong, <i>et al.</i> (352)
Spatiotemporal Variation Analysis and Identification of Water Pollution Sources in the Zhangweinan River Basin	XU Hua-shan, XU Zong-xue, TANG Fang-fang, <i>et al.</i> (359)
Hydrochemical Characteristics and Formation Mechanism of Shallow Groundwater in the Yellow River Delta	AN Le-sheng, ZHAO Quan-sheng, YE Si-yuan, <i>et al.</i> (370)
Impacts of Sediment Disturbance Time on the Distribution of Phosphorus Forms in Suspended Solids	LI Da-peng, HUANG Yong, LI Yong, <i>et al.</i> (379)
Influence of Submerged Macrophytes on Phosphorus Transference Between Sediment and Overlying Water in the Growth Period	WANG Li-zhi, WANG Guo-xiang, YU Zhen-fei, <i>et al.</i> (385)
Pollution Characteristics and Evaluation of Nitrogen, Phosphorus and Organic Matter in Surface Sediments of Lake Changshouhu in Chongqing, China	LU Shao-yong, XU Meng-shuang, JIN Xiang-can, <i>et al.</i> (393)
Vertical Distribution Characteristics of Nutrients and Heavy Metals in Sediments of Lake Hongze	ZHANG Wen-bin, YU Hui (399)
Effects of Rainfall on Nitrogen and Phosphorus Loss from Courtyard Compost and Its Risk of Nonpoint Source Pollution	PENG Li, WANG Li-wei, YANG Zhi-min, <i>et al.</i> (407)
Effects of Hydrodynamic Process on Bio-optical Properties in Algal-Dominated Lake Region of Shallow Lake	LIU Xiao-han, FENG Long-qing, ZHANG Yun-lin, <i>et al.</i> (412)
Estimation and Remote Sensing Inversion of Diffuse Attenuation Coefficient $K_d(490)$ in Lake Taihu in Spring Based on Semi-analytical Model	LIU Zhong-hua, LI Yun-mei, LI Rui-yun, <i>et al.</i> (421)
Monitoring the Total Suspended Matter of Lake Chaohu Based on Quasi-Analytical Algorithm	ZHANG Hong, HUANG Jia-zhu, LI Yun-mei, <i>et al.</i> (429)
Optimization of Aerobic/Anaerobic Subsurface Flow Constructed Wetlands	LI Feng-min, SHAN Shi, LI Yuan-yuan, <i>et al.</i> (436)
Effects of Allelochemical Dibutyl Phthalate on <i>Gymnodinium breve</i> Reactive Oxygen Species	BIE Cong-cong, LI Feng-min, LI Yuan-yuan, <i>et al.</i> (442)
Toxicity Effects of <i>Rac</i> - and <i>S</i> -Metolachlor on Two Algae	CAI Wei-dan, LIU Hui-jun, FANG Zhi-guo (448)
Studies for Killing the Oceanic Harmful Organisms in Ship's Ballast Water Using Hydroxyl Radicals	BAI Min-dong, ZHANG Na-hui, ZHANG Zhi-tao, <i>et al.</i> (454)
Modification of Natural Siderite and Enhanced Adsorption of Arsenic	ZHAO Kai, GUO Hua-ming, LI Yuan, <i>et al.</i> (459)
Kinetic Study of 4-Chloronitrobenzene Degradation by Zero-Valent Iron	LIAO Di-jie, YANG Qi, LEE Chun-chi (469)
Photochemical Degradation of Ofloxacin in Aqueous Solution	SHAO Meng, YANG Gui-peng, ZHANG Hong-hai (476)
Photodegradation of Atenolol in Aqueous Nitrate Solution	JI Yue-fei, ZENG Chao, MENG Cui, <i>et al.</i> (481)
Biodegradation of Pyridine Under UV Irradiation	FANG Miao-miao, YAN Ning, ZHANG Yong-ming (488)
Optimization on Decoloration Conditions of Anthraquinone Dyes by Laccase from <i>Amillariella mellea</i>	ZHU Xian-feng, QIN Ren-bing, YU Chen-chen, <i>et al.</i> (495)
Biosorption of Chromium(VI) by Waste Biomass of ϵ -Poly-L-lysine Fermentation	CAO Yu-juan, ZHANG Yang, XIA Jun, <i>et al.</i> (499)
Investigation on Enhanced Conditions for the Densification of Filamentous Sludge	LI Zhi-hua, SUN Wei, JI Xiao-qin, <i>et al.</i> (505)
Effect of Temperature on the Response Characteristics of Shortcut Nitrification Granular Sludge	LUO Yuan-ling, YANG Zhao-hui, XU Zheng-yong, <i>et al.</i> (511)
Fuel Consumption and Emission Inventory of Typical Construction Equipments in China	LI Dong-ling, WU Ye, ZHOU Yu, <i>et al.</i> (518)
Optimization of PM ₁₀ Monitoring Network in Beijing	QI Ling, ZHAO Yue, XIE Shao-dong (525)
Effect of Greenbelt on Pollutant Dispersion in Street Canyon	XU Wei-jia, XING Hong, YU Zhi (532)
Investigation of Effect and Process of Nitric Oxide Removal in Rotating Drum Biofilter Coupled with Absorption by Fe ^{II} (EDTA)	CHEN Jun, YANG Xuan, YU Jian-ming, <i>et al.</i> (539)
Effect of UV-B Radiation on Release of Nitrogen and Phosphorus from Leaf Litter in Subtropical Region in China	SONG Xin-zhang, ZHANG Hui-ling, JIANG Hong, <i>et al.</i> (545)
Characteristics of Carbon Sequestration and Apparent Stability of New Sequestered Carbon in Forested Torrid Red Soil at Dry-Hot Valley	TANG Guo-yong, LI Kun, SUN Yong-yu, <i>et al.</i> (551)
Spatial Distribution of Methane in Surface Water and Sediment of Jiulongjiang Estuary and the Effect Environment factors of It	GUO Ying-ying, CHEN Jian, YIN Xi-jie, <i>et al.</i> (558)
Methane Fluxes and Controlling Factors in the Intertidal Zone of the Yellow River Estuary in Autumn	JIANG Huan-huan, SUN Zhi-gao, WANG Ling-ling, <i>et al.</i> (565)
Study on Dioxin Emission for Typical Non-Wood Pulp Making in China	WANG Zhi-fang, DING Qiong, WANG Kai-xiang, <i>et al.</i> (574)
Horizontal and Vertical Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in River Sediment from a Typical Electrical Equipment Industrial Area	QIU Meng-de, DENG Dai-yong, YU Le-huan, <i>et al.</i> (580)
Characteristics of Polychlorinated Biphenyls in Soils from an Electronic Waste Recycling Area	WANG Xue-tong, LI Yuan-cheng, ZHANG Yuan, <i>et al.</i> (587)
Characterization and Potential Risks of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Green Space Soils of Educational Areas in Beijing	PENG Chi, WANG Mei-e, OUYANG Zhi-yun, <i>et al.</i> (592)
Spatial Variability and Evaluation of Soil Heavy Metal Contamination in the Urban-transect of Shanghai	LIU Yun-long, ZHANG Li-jia, HAN Xiao-fei, <i>et al.</i> (599)
Assessment of Heavy Metal Pollution in Surface Sediments of Rivers in Northern Area of Haihe River Basin, China	SHANG Lin-yuan, SUN Ran-hao, WANG Zhao-ming, <i>et al.</i> (606)
Concentrations and Pollution Assessment of Soil Heavy Metals at Different Water-level Altitudes in the Draw-down Areas of the Three Gorges Reservoir	WANG Ye-chun, LEI Bo, YANG San-ming, <i>et al.</i> (612)
Analysis of Community Structure on Sludge Aerobic/anoxic Digestion After Ultrasonic Pretreatment	YE Yun-di, SUN Shui-yu, ZHENG Li, <i>et al.</i> (618)
Research on Population Structure and Distribution Characteristic of Indigenous Microorganism in Post-polymer-Flooding Oil Reservoir	ZHAO Ling-xia, GAO Pei-ke, CAO Mei-na, <i>et al.</i> (625)
Study on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) with Different Additional Carbon Sources in Aged Contaminated Soil	YIN Chun-qin, JIANG Xin, WANG Fang, <i>et al.</i> (633)
Detection of <i>Prorocentrum minimum</i> (Pavillard) Schiller with the Electrochemiluminescence-Molecular Probe	ZHU Xia, ZHEN Yu, MI Tie-zhu, <i>et al.</i> (640)
Development of Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Domoic Acid	WANG Qian, CHENG Jin-ping, GAO Li-li, <i>et al.</i> (647)
Simultaneous Determination of 10 Sulfonamide Antibiotics in Water by Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography	HONG Lei-jie, SHI Lu, ZHANG Ya-lei, <i>et al.</i> (652)
Effects of Pentachlorophenol on DNA Damage and Cytotoxicity of HeLa Cells	JIN Bang-ming, WANG Fu-ming, XIONG Li, <i>et al.</i> (658)
Modeling of Carbon Dioxide Measurement and Optimization on Building Ceramic Industry	PENG Jun-xia, ZHAO Yu-bo, JIAO Li-hua, <i>et al.</i> (665)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年2月15日 33卷 第2期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 2 Feb. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧 阳 自 远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行人