

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第8期

Vol.35 No.8

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版



目次

2012年春季京津冀地区一次沙尘暴天气过程中颗粒物的污染特征分析 刘庆阳, 刘艳菊, 赵强, 张婷婷, 张美根, 王存美 (2843)

杭州灰霾天气超细颗粒浓度分布特征 陈秋方, 孙在, 谢小芳 (2851)

气象因素对广州市大气中二噁英污染特征的影响 杜国勇, 苏原, 任明忠, 张素坤, 青宪 (2857)

龙凤山本底站大气 CO₂ 数据筛分及浓度特征研究 栾天, 周凌晔, 方双喜, 姚波, 王红阳, 刘钊 (2864)

区域传输对华东森林及高山背景点位大气污染物浓度的影响 苏彬彬, 许榕洋, 张若宇, 纪贤鑫 (2871)

天津市夏季蜂窝状溶蚀器涂层溶液浓度确定的实验研究 张诗建, 姬亚芹, 张雷波, 赵雪艳, 朱振宇, 杨文 (2878)

铅锌冶炼厂不同工艺铅元素粒径分布特征 梁俊宁, 李文慧, 葛毅, 陈浩, 宋丽娜, 刘杰 (2883)

KI 改性黏土脱除烟气中单质汞的研究 沈伯雄, 陈建宏, 蔡记, 何川, 李卓 (2890)

污泥直接干化产生的恶臭及挥发性有机物特征研究 陈文和, 邓明佳, 罗辉, 张婧赢, 丁文杰, 刘俊新, 李琳 (2897)

基于风险管理的区域(流域)地下水污染预警方法研究 白利平, 王业耀, 郭永丽, 周友亚, 刘俐, 颜增光, 李发生 (2903)

1980~2010年浙江某典型河流硝态氮通量对净人类活动氮输入的动态响应 张柏发, 陈丁江 (2911)

南京仙林新市区土地利用结构与格局对湿地水环境氮、磷影响研究 蔡春晓, 刘红玉, 李玉凤, 王聪, 侯明行 (2920)

三江平原典型沼泽湿地养分累积与沉积特征 李瑞利, 柴民伟, 邱国玉, 石福臣, Sasa Kaichiro (2928)

岩溶地下河流域表层土壤多环芳烃污染特征及来源分析 蓝家程, 孙玉川, 师阳, 徐昕, 袁道先, 胡宁 (2937)

亚热带典型岩溶区地表流水文地球化学昼夜变化及其影响因素研究 张陶, 蒲俊兵, 袁道先, 章程, 何师意, 于爽, 刘文, 莫雪, 周建超, 杨会, 唐伟 (2944)

藏南干旱区湖泊及地热水体氢氧同位素研究 肖可, 沈立成, 王鹏 (2952)

广西五里峡水库夏季溶解无机碳行为的初步研究 刘文, 蒲俊兵, 于爽, 章程, 区绎如, 袁道先, 杨会, 唐伟 (2959)

铜陵相思河流域重金属分布特征研究 陈莉薇, 徐晓春, 王军, 陈芳 (2967)

不同压力作用下太湖蓝藻气囊体积分数及上浮特性研究 王巍, 丛海兵, 徐亚军, 陈雯婧, 徐思涛, 吴军, 蒋新跃 (2974)

酸性条件下Ti(IV)催化 O₃/H₂O₂ 降解邻苯二甲酸二甲酯 高燕, 沈佟栋, 陈尧, 周慧华, 童少平 (2980)

无机离子与胡敏酸对零价铁去除水中Pb(II)、Hg(II)的影响 施秋伶, 周欣, 张进忠, 邱昕凯 (2985)

羟基磷灰石-四氧化三铁-沸石复合材料制备及去除水中刚果红研究 方巧, 林建伟, 詹艳艳, 杨孟娟, 郑雯婧 (2992)

不锈钢 201、304 和 316L 在模拟污水管道反应器中的腐蚀 鲍国栋, 左剑丞, 王雅娇, 于里 (3002)

微滤过程中腐殖酸与膜表面黏附特性的试验研究 王磊, 王磊, 黄丹曦, 王旭东 (3007)

不同类型 LDHs 对垂直流人工湿地无烟煤基质的覆膜改性及其脱氮效果研究 张翔凌, 郭露, 陈俊杰, 刘小婷, 徐璐, 陈巧珍, 王晓晓 (3012)

SPG 膜曝气-基因工程菌生物膜反应器处理阿特拉津废水研究 刘春, 龚鹏飞, 肖太民, 张明, 年永嘉, 杨景亮, 张晶 (3018)

SPG 膜微气泡曝气生物膜反应器运行性能影响因素研究 张磊, 张明, 刘春, 张静, 刘俊良 (3024)

曝气膜生物反应器运行过程中污泥活性特征变化及其对膜污染的影响 陈烜, 汤兵, 张姿, 宾丽英, 黄绍松, 付丰连, 邱兵 (3031)

限量曝气进水时间对硝化颗粒污泥的影响特性研究 刘文如, 阴方芳, 王建芳, 沈耀良 (3038)

UASBB 厌氧氨氧化反应器处理污泥脱水液的影响因素研究 李亚峰, 马晨曦, 张驰 (3044)

开封周边地区地表灰尘中汞背景值及其应用 陈彦芳, 马建华, 董运武, 刘德新, 陈星 (3052)

北京市幼儿园地面尘中有毒金属浓度及其健康风险 段恒轶, 吴亚涛, 王珏, 刘兆荣 (3060)

珠三角电子垃圾和城市地区家庭灰尘中多氯联苯的来源及暴露风险 朱智成, 陈社军, 丁南, 王璟, 罗孝俊, 麦碧娟 (3066)

温带典型草原土壤总有机碳及溶解性有机碳对模拟氮沉降的响应 齐玉春, 彭琴, 董云社, 肖胜生, 孙良杰, 刘欣超, 何亚婷, 贾军强, 曹丛丛 (3073)

不同肥料种类对稻田红壤碳氮淋失的影响 刘希玉, 邹敬东, 徐丽丽, 张心昱, 杨风亭, 戴晓琴, 王忠强, 孙晓敏 (3083)

低分子有机酸对土壤中 Cu 化学形态的影响 黄国勇, 付庆灵, 朱俊, 万田英, 胡红青 (3091)

EDTA 与柠檬酸复配洗修多重金属污染土壤效果研究 尹雪, 陈家军, 蔡文敏 (3096)

不同生态系统土壤生化特征及其与土壤呼吸和 N₂O 排放的关系 陈玲, 范会, 蒋静艳 (3102)

黄河口不同恢复阶段湿地土壤 N₂O 产生的不同过程及贡献 孙文广, 孙志高, 甘卓亭, 孙万龙, 王伟 (3110)

猪粪化肥配施对双季稻田 CH₄ 和 N₂O 排放及其全球增温潜势的影响 王聪, 沈健林, 郑亮, 刘杰云, 秦红灵, 李勇, 吴金水 (3120)

我国北方两地环境臭氧浓度对矮菜豆生长的影响 袁相洋, 张巍巍, 孙敬松, 胡恩柱, 张玉龙, 张红星, 田媛, 冯兆忠 (3128)

丛枝菌根影响纳米 ZnO 对玉米的生物效应 王卫中, 王发园, 李帅, 刘雪琴 (3135)

丛枝菌根对翅荚木生长及吸收累积重金属的影响 李霞, 彭霞薇, 伍松林, 李志茹, 冯红梅, 江泽平 (3142)

含磷物质对水稻吸收土壤砷的影响 雷鸣, 曾敏, 廖柏寒, 胡立琼, 周航, 龙水波 (3149)

重金属铬(VI)的生态毒性及其土壤环境基准 王晓南, 刘征涛, 王婉华, 张聪, 陈丽红 (3155)

维生素 B₁₂ 对脱氮功能蓝藻降解 2,4,4'-三氯联苯的促进作用研究 刘嘉裕, 肖文丰, 鲁莉萍, 张杭君 (3162)

己烯雌酚降解菌株沙雷氏菌的分离鉴定及其降解特性 徐冉芳, 孙敏霞, 刘娟, 汪泓, 李欣, 朱雪竹, 凌婉婷 (3169)

多溴联苯醚在市场鲫鱼体内分布和食鱼暴露量 王俊霞, 王春艳, 刘莉莉, 周啸宇, 刘洋成, 林匡飞 (3175)

稀有鮐鲫 HMGR 基因全长克隆及雌鱼经五氯酚暴露基因表达的分析 邓川, 毛思予, 熊力, 张晓峰, 李伟, 高香, 刘秋萍, 陈韵, 刘堰 (3183)

藻细胞和高岭土的存在对病毒 MS2 存活的影响 何强, 吴庆庆, 马红芳, 周真明, 苑宝玲 (3192)

多胺功能化介孔炭对 Pb(II) 的吸附动力学与机制 李坤权, 王艳锦, 杨美蓉, 朱志强, 郑正 (3198)

生物活性炭投加量对垃圾渗滤液处理效果的影响 崔延瑞, 郭焱, 吴青, 马罗丹, 孙剑辉, 崔凤灵 (3206)

经济结构调整的污染减排效应: 以 COD 减排为例 李名升, 周磊, 陈远航, 李茜, 张建辉 (3212)

中国铅流改变原因分析 马兰, 毛建素 (3219)

放牧阉牦牛提前出栏甲烷排放强度减排潜力探讨 汪诗平, Andreas Wilkes, 汪亚运, 白玲 (3225)

中国水体硝酸盐氮氧双稳定同位素溯源研究进展 徐志伟, 张心昱, 于贵瑞, 孙晓敏, 温学发 (3230)

《环境科学》征稿简则(2936) 《环境科学》征订启事(3051) 信息(2882,2927,3059,3218)

稀有鮡鲫 HMGR 基因全长克隆及雄鱼经五氯酚暴露基因表达的分析

邓川, 毛思予, 熊力, 张晓峥, 李伟, 高香, 刘秋萍, 陈韵, 刘堰*

(西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 是甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 途径中的第一个关键限速酶。克隆稀有鮡鲫 HMGR 基因全长, 分析该基因在不同组织及雄鱼经不同浓度五氯酚 (pentachlorophenol, PCP) 暴露的表达差异, 探索 PCP 对类固醇激素前体 (胆固醇) 合成水平基因转录调控的内分泌干扰机制。采用同源克隆策略及 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid-amplification of cDNA ends, RACE), 从稀有鮡鲫肝脏中首次克隆得到 3 101 碱基 (bp) 的 HMGR 基因 cDNA 全长, 基因命名为 *GrHMGR* (GenBank accession No: KF885724)。 *GrHMGR* 编码 884 个氨基酸, 系统发育树分析表明, *GrHMGR* 编码的蛋白与其他鱼类来源的 HMGR 氨基酸序列同源性较高。 Real-time PCR 分析表明 *GrHMGR* 的表达有组织特异性, 在大脑, 性腺和肝脏中均有表达, 性腺中表达量最高。稀有鮡鲫雄鱼经不同浓度 PCP 暴露后, *GrHMGR* 在大脑和性腺的表达随 PCP 浓度的增加显著下降, 然而在肝脏组织中表达趋势有所不同。 *HMGR* 的表达下降会减少胆固醇的合成。说明 PCP 暴露会通过干扰稀有鮡鲫的胆固醇合成途径, 进而对内分泌系统产生影响。

关键词: 稀有鮡鲫; 基因克隆; HMGR; 五氯酚; 表达分析

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)08-3183-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.2014.08.049

Cloning of Full-length cDNA of HMGR from *Gobiocypris rarus* and Analysis of Its Expression Profiles in Male Exposed to Pentachlorophenol

DENG Chuan, MAO Si-yu, XIONG Li, ZHANG Xiao-zheng, LI Wei, GAO Xiang, LIU Qiu-ping, CHEN Yun, LIU Yan

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) is the first rate-limiting enzyme in the mevalonate (MVA) pathway. The full-length cDNA of *HMGR* was cloned from *Gobiocypris rarus*, and *HMGR* expression profiles in different tissues and in response to different treatments of pentachlorophenol (PCP) were analyzed by real-time PCR, to investigate the endocrine disruption mechanism of PCP, which altered steroid hormone precursors (cholesterol) levels by modulating gene transcription profiles of *HMGR*. Based on the homologous clone strategy and rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technology, the full-length 3 101-base-pair (bp) cDNA of *HMGR* was isolated from the livers of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) for the first time, and was designated as *GrHMGR* (GenBank accession number KF885724). *GrHMGR* encoded a protein of 884 amino acids and phylogenetic tree analysis indicated that the deduced protein *GrHMGR* had extensive sequence similarities to other fish *HMGR*s. Real-time PCR analyses indicated that *GrHMGR* mRNA expression was tightly controlled in a tissue-specific fashion, with the sites of expression being brain, gonads and liver, and the highest site of expression being gonads. After male rare minnows were exposed to different concentrations of PCP, significant decrease in *GrHMGR* gene expression with increased PCP concentration in the brain and gonads were observed, together with the differential gene expression trend in the liver. Furthermore, it was found that the decrease of *HMGR* could reduce the synthesis of cholesterol. This proved that PCP might disrupt the pathway of cholesterol synthesis and then influenced the endocrine system of rare minnow.

Key words: *Gobiocypris rarus*; gene clone; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR); pentachlorophenol (PCP); expression analysis

3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, HMGR) 是甲羟戊酸 (mevalonic acid, MVA) 途径中的第一个关键限速酶^[1], MVA 是胆固醇 (类固醇激素的前体) 生物合成的关键中间体, 催化体内类固醇激素的合

收稿日期: 2013-12-11; 修订日期: 2014-03-12

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2012CB723205); 重庆市自然科学基金项目 (CSTC. 2011BB0146); 国家自然科学基金项目 (21147002)

作者简介: 邓川 (1990 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: dengchuan7@126.com

* 通讯联系人, E-mail: liuyan@swu.edu.cn

成^[2]. HMGR 在脊椎动物内分泌通路中起重要作用. Skolness 等^[3]发现丙环唑处理后的黑头软口鲮类固醇合成基因 *HMGR* 的表达下降, 导致血浆类固醇激素的浓度下降. Zhang 等^[4]发现雄激素(17 β -trenbolone, TRB)暴露后的日本青鲮 *HMGR* 表达下降, 并且影响到性激素的合成. Zhang 等^[5]发现酮康唑暴露后的日本青鲮 *HMGR* 表达也呈现下降趋势. 不同内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)对鱼类胆固醇合成关键基因 *HMGR* 的表达及其内分泌通路均造成影响. 五氯酚(pentachlorophenol, PCP)属于环境优先检测的 EDCs 之一^[6], 具有强持久性和难降解性的环境污染物^[7,8]. PCP 暴露可能影响脊椎动物的内分泌系统, 造成人类和野生动物的生殖损害^[9]. 由于污染物不同, 研究对象各异, 有关 PCP 的内分泌干扰机制尚不清楚. 脊椎动物体内存在复杂的内分泌系统^[10], 从下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴这一保守的内分泌途径研究 EDCs 对生物内分泌系统的潜在影响成为当今的热点. 本研究选取中国特有鱼种稀有鮡鲫为实验对象, 首次克隆稀有鮡鲫 *HMGR* 全长基因, 并分析鮡鲫经不同浓度 PCP 暴露后 *HMGR* 的表达差异, 揭示 PCP 调控 HPG 轴胆固醇合成关键基因的内分泌干扰机制.

PCP 曾在中国乃至世界范围内被长期使用^[11,12], Montaña 等^[13]发现 PCP 已是人体血液中检测到的最主要的卤代酚类化合物, 环境监测表明 PCP 广泛存在于多种介质中, 如水、土壤、沉积物等^[14], 特别是在水环境^[15,16], Zheng 等^[17]在洞庭湖中检测到 PCP 浓度高达 103.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 由于 PCP 在水环境中的大量残留, 水生脊椎动物, 特别是鱼类, 已经受到了严重威胁. Zha 等^[18]证明 PCP 染毒日本青鲮, 雌性青鲮的产卵能力和平均繁殖力出现显著下降, 造成生殖损害. Yu 等^[19]研究表明环境相关浓度 PCP 会影响成年斑马鱼内分泌通路导致甲状腺激素分泌紊乱, 造成异常的生长发育. 目前, 以 *HMGR* 的表达变化说明 PCP 对稀有鮡鲫 HPG 轴内分泌干扰效应的研究尚未见. 本文首次研究不同浓度 PCP 暴露雄性稀有鮡鲫能否造成 HPG 轴上 *HMGR* 基因的表达变化.

稀有鮡鲫是栖息在三峡库区上游水域的一种小型濒危鲤科鱼类. 它具有性成熟快、繁殖力强、产卵频次高、饲养方便等特点^[20]. 同时稀有鮡鲫是我国特有物种, 个体较斑马鱼稍大, 实验操作容易, 且对化学品敏感, 实验重复性更好^[21], 成为我国所特

有的毒理学模式水生生物. 熊力等^[22]以稀有鮡鲫为对象, 通过 PCP 暴露下能显著诱导卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)、VTG 基因的表达, 证明 PCP 具有雌激素效应. 稀有鮡鲫胆固醇合成关键基因 *HMGR* 的全长克隆以及 PCP 暴露前后的表达差异尚未见报道. 本研究克隆了稀有鮡鲫 *HMGR* 基因全长 cDNA 序列, 对该基因进行同源性比较及系统发育树分析, 为稀有鮡鲫在鲤科鱼类的分类及进化地位的研究提供分子水平的科学参考, 同时运用 Real-time PCR 技术对 PCP 诱导下稀有鮡鲫 HPG 轴相关组织(大脑、性腺)及肝脏 *HMGR* 基因表达情况进行分析, 以期阐明 PCP 对脊椎动物通过 HPG 轴行使内分泌干扰作用提供依据.

1 材料与方法

1.1 实验仪器

微量高速冷冻离心机(德国 Hettich ZENTRIFUGEN 公司); NANO DROP 2000 核酸蛋白定量分析仪(美国 Thermo 公司); 核酸电泳系统(美国 BIO-RAD 公司); Tpersonal PCR 仪(德国 Biometra); 玻璃匀浆器.

1.2 实验试剂

PCP(纯度 99%, 购于 Chem. Service); 雌二醇(17 α -Ethinylestradiol, EE2, 纯度 98%, 购于 Sigma); 二甲基亚砜(DMSO)购于 Sanland-Chem; Total RNA 提取试剂(DP419 天根); 反转录试剂盒 Prime ScriptTM RT reagent kit(Takara); SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit(ClonTech); LA Taq DNA 聚合酶(Takara); pMD-19T Vector(Takara); DL 2000 DNA Maker(天根); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司; 其他试剂均为国产分析纯.

1.3 实验动物

稀有鮡鲫种鱼购于中国科学院武汉水生生物研究所, 在本实验室饲养繁殖, 水温控制在 23 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$, 光照周期为白昼/黑夜 = 12 h/12 h, 全部喂养盐水孵化的丰年虫. 实验用鱼为 7 月龄的健康成年鱼(体重 0.53 g \pm 0.15 g, 体长 36.6 mm \pm 3.7 mm). 实验前以连续曝气 24 h 的自来水[pH 7.6 \pm 1.5, DO > 5 mg $\cdot\text{L}^{-1}$, 总硬度为(7.8 \pm 0.7)德国度, 水温(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$]驯化喂养 2 周.

1.4 暴露处理

随机收集 42 条 7 月龄的雄性稀有鮡鲫, 饲养于 10L 玻璃鱼缸内进行实验前驯养. 分别将 42 条稀有鮡鲫暴露在 EE2, PCP 和阴性对照组 DMSO 中 21 d.

采用半静态水体暴露的方法, 每组饲养 7 条雄性稀有鮕鲫(6 条生物学重复, 一条防止稀有鮕鲫突发性死亡), 阳性对照 EE2 组浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, PCP 组浓度分别为 8、16、80、160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, DMSO 组的终浓度为 1:10 000(体积比)。每天喂食刚孵化的丰年虫一次, 观察鱼是否有异常, 并记录。

1.5 稀有鮕鲫 Total RNA 的提取

稀有鮕鲫经低温麻醉后, 迅速取组织, 于液氮中充分研磨, Total RNA 的提取方法参照 Total RNA 提取试剂盒进行, 提取出的 Total RNA 用核酸蛋白仪和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和纯度。最后将 Total RNA 于 -80°C 超低温冰箱保存。

1.6 引物设计与合成

在 NCBI 上查找下列物种的 HMGR 核苷酸序

列信息: 斑马鱼 (*Danio rerio*, BC155135.1)、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*, JN542428.1)、鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*, AY424801.2)、日本青鳉 (*Oryzias latipes*, EU159456.1)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, XM_003974466.1)、细条石颌鲷 (*Lithognathus mormyrus*, DQ849851.1)。利用 Clustal X 软件对上述基因进行比对, 查找 HMGR 的保守区域, 使用 Primer Premier 5.0 软件和 DNASTar 设计稀有鮕鲫 HMGR 基因的简并引物。根据新克隆的 HMGR 基因 cDNA 核心序列中保守片段设计 RACE 引物和实时荧光定量 PCR 的特异性引物, 同时参照 GenBank 中公布的稀有鮕鲫 β -actin 设计内参引物(表 1), 将各引物序列送往上海 Invitrogen 公司合成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers

项目	基因	引物序列
简并引物	HMGR	F: GACYTNGGCACNACNTACT R: TRCANACYTTCTCNAGCT
RACE 引物	HMGR	F1: GTCTCAAACGACGGGAATGGAT F2: CCTTGGGAAGTCATTGTGGCTAC F3: CCAGTTTTGTGTTTCAGCAGCGTTG R1: GTGGGTCTCTAAAACAGCCATTCTCT R2: TTGGAGAGGTCAATCAACAGCAG R3: CCGTGTCTGAACACAAAACACTGGAG
荧光定量 PCR 扩增引物	HMGR	S-TCTGCTGTTGATTGACCTCTCC AS-ATCACCAGGCACTCCACAAG
	β -actin	A-CAGGGCCGTGATGGTGGGGAT AS-GGTTGGCTTTGGGCTTGAG

1.7 HMGR cDNA 全长克隆

cDNA 模板的合成参照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)说明书进行, 合成好的 cDNA 模板于 -20°C 保存。根据由简并引物扩增得到的核心片段, 利用 Primer Premier 5.0 软件对核心序列部分设计特异性引物 (gene-specific primer, GSP), 采用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 进行嵌套式 PCR (nested-PCR) 反应, 3'端程序为 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 3 min, 循环 30 次; 5'端程序为 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 循环 30 次。分别扩增基因的 3' 和 5' 末端序列, 得到 HMGR 序列全长。

1.8 Real-time PCR

在暴露 21 d 后, 取各组稀有鮕鲫雄鱼大脑、性腺、肝脏, 提取总 RNA, 反转录得到 cDNA 第一链作为实时荧光定量 PCR 的模板。为保证实时荧光定

量 PCR 结果的准确性, 每个样品设置 3 个重复, 并进行 6 次重复实验。采用双标准曲线法处理实时荧光定量 PCR 数据, 即对每一对引物分别作标准曲线, 求出标准曲线方程。然后根据检测结果 (CT 值) 和标准曲线方程, 求出各基因的相对表达量。

1.9 统计学分析

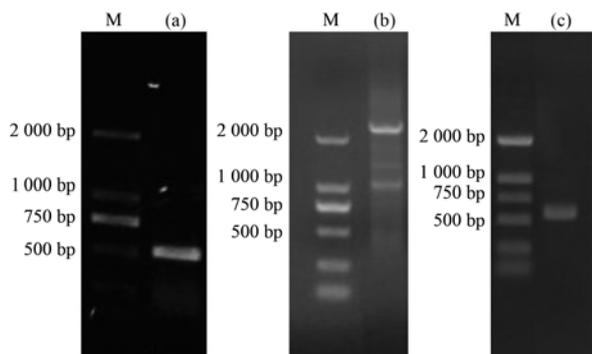
运用 Origin 8.0 软件绘图, 用 SPSS 13.0 软件分析所得数据, 在方差齐性的情况下用 One-way ANOVA 和 Tukey 多重比较来检验相关数据的差异。当 $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。所有数据均以平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 稀有鮕鲫 HMGR 全长的克隆

以 1.5 节提取的 Total RNA 为模板, 用简并引物进行 PCR 扩增, PCR 产物电泳分析结果如图 1 (a)。在 500 bp 上方有 1 条清晰条带, 与预测相符。

按 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (ClonTech) 试剂盒介绍的方法进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增,PCR 产物电泳分析结果如图 1(b) 和图 1(c). 3'-RACE 在 2 000 bp 上方见 1 条清晰条带,经测序获得 2 619 bp 核苷酸序列,5'-RACE 在 500 bp 和 750 bp 间有一条带,经测序得到 526 bp 核苷酸序列. 运用 Vector NTI 11.0 对序列进行拼接得到 1 条 3 101 bp 的全长 cDNA 序列,将该基因命名为 *GrHMGR* (GenBank accession No: KF885724).



(a) RT-PCR 扩增出 518 bp 的核心片段; (b) 3'-RACE 扩增产物; (c) 5'-RACE 扩增产物 (M: DNA Marker DL2000)

图 1 *GrHMGR* PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of *HMGR* from *Gobiocypris rarus* amplified by PCR

2.2 *GrHMGR* 全长 cDNA 序列分析及对应氨基酸理化性质

稀有鮡鲫 *HMGR* 基因全长 3 101 bp, 经 Vector NTI 11.0 分析得到该序列包含 224 bp 的 5' 非编码区、225 bp 的 3' 非编码区和 2 652 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 共编码 884 个氨基酸残基, 用 ExPASy ProtParam Tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 在线分析预测其编码蛋白属性得到 *GrHMGR* 编码蛋白的分子量和等电点 (pI) 分别为 96.5×10^3 和 6.05, 含量最丰富的氨基酸为亮氨酸 (Leu)、丙氨酸 (Ala)、缬氨酸 (Val)、丝氨酸 (Ser)、谷氨酸 (Glu), 属于不稳定蛋白 (见表 2). 运用 Vector NTI 11.0 推导的稀有鮡鲫 *HMGR* 氨基酸序列如图 2 所示.

2.3 氨基酸序列多重比对

应用 Vector NTI 11.0 将 *GrHMGR* 基因的 ORF 翻译成蛋白质序列, 并用 Clustal X (1.83) 序列对比程序^[23] 将稀有鮡鲫 (*GrHMGR*) 与斑马鱼 (*DrHMGR*)、大菱鲂 (*SmHMGR*)、红鳍东方鲀 (*TfHMGR*)、鲈鱼 (*DIHMGR*) 的蛋白序列进行比对分析, 发现稀有鮡鲫 *HMGR* 与其他鱼类 *HMGR* 同源

表 2 稀有鮡鲫 *HMGR* 基因序列分析及对应氨基酸理化性质

Table 2 Analysis of *HMGR* in *Gobiocypris rarus* and physicochemical properties of the deduced amino acid

指标	稀有鮡鲫
基因全长	3 101 bp
开放阅读框	2 652 bp
起始位点及密码子	225 bp, ATG
终止位点及密码子	2 877 bp, TGA
5'/3'非翻译区长度	224 bp/225 bp
编码氨基酸残基数	884
分子式	C ₄₂₇₅ H ₆₈₇₀ N ₁₁₄₀ O ₁₂₆₀ S ₆₇
相对分子质量	96.5×10^3
理论等电点	6.05
含量最丰富的氨基酸	Leu (10.3%)、Ala (8.1%)、Val (8.4%)、Ser (8.0%)、Glu (6.7%)、Gly (6.4%)、Ile (6.0%)
负电/正电氨基酸比例	88/79
亲水性平均系数	0.148
蛋白质不稳定性指数	53.63, 属于不稳定蛋白

性较高, 经 NCBI 上的 BLASTp 进行在线序列比对发现, 稀有鮡鲫全长序列与斑马鱼、大菱鲂、红鳍东方鲀及鲈鱼的相似度分别为 94%、80%、80%、81%. *GrHMGR* 氨基酸序列相对保守, 但中部序列没有明显的同源性, 这可能是由于几种鱼类在进化程度上的不同且中部序列不包含 *HMGR* 的保守结构域. 在 NCBI 的保守结构域 (CDD) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 及 ExPASy Scanprosite Tool (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>) 进行保守结构域的预测发现, 该序列包括两个保守区, 分别是类固醇敏感多肽区 (Sterol-sensing domain profile) 和 HMG-CoA-reductase 功能域 (见图 3), 位置分别在序列前端 61 ~ 218 和后端 460 ~ 867 氨基酸残基处, 而多重序列对比结果也显示这两个区域相似度较高.

2.4 系统进化树分析

用 ClustalX 和 Mega 5.0 程序^[24] 的比邻法建立系统发生树, 用 1000 组复制子抽样分析, 获得 *HMGR* 氨基酸序列的系统进化树, 结果见图 4. 系统进化树包括稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*, AHI87506.1) 与斑马鱼 (*Danio rerio*, AAI55136.1)、大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*, AEO44579.1)、鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*, AAR02862.2)、日本青鲂 (*Oryzias latipes*, XP_004073005.1)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, XP_003974515.1)、家蝇 (*Monodelphis domestica*, XP_001368743.1)、爪蟾 (*Xenopus laevis*, AAH74197.1)、小鼠 (*Mus musculus*, AAH85083.1)、牛 (*Bos taurus*, AAI53263.1) 和人

```

-224                                     gaccggagtcctgtctcaaacgacggggaatggattaatatcc
-180  tatgtatttatttattccggccactataattatgaaatcaccgctaaaagtaattttgtatcagtggaaatctatagctttgat
-90  ttatttaaatcgcatatgtggaggatttcacagtgatctgctcttggtgtttttatcctaaacctgtaaaagactgtaacacaccttcacat
1   ATGCTACGAGACTTTTCGAATGCACGGCTCTTTGTGCCTCCCATCCTGGGAAGTCATTGTGGCTACTGTGACTCTCACCATCTGC
   M L T R L F R M H G L F V A S H P W E V I V A T V T L T I C
91  ATGATGTCCATGAACATGTTCACTGGAAATGACCAGATTTGTGGGTGGAACCTTGATTGCCCAAAATGGAGGAGCAAACTCTAAGCAGC
   M M S M N M F T G N D Q I C G W N F D C P K L E E Q I L S S
181 GATATCATTATCTGACAATCACAAGATGCATAGCAATCGTCTATATTTTCAATTCAAAATCTTCGACAGTTAGGATCCAAATAT
   D I I I L T I T R C I A I V Y I Y F Q F Q N L R Q L G S K Y
271 ATTTTGGGCATTGCAGGACTTTTACAATATCTCCAGTTTGTGTTGAGCAGGTTGTGATTCACTTCTGGATAAGGAGCTGACAGGC
   I L G I A G L F T I F S S F V F S T V V I H F L D K E L T G
361 CTTAATGAGGCCTTGCATCTTCTGCTGTGATTGACCTTCCAAAGCATGTGCTCGGCAAGTTTGCTTTGAGTTCAAACCTCACAG
   L N E A L P F F L L I D L S K A C A L A K F A L S S N S Q
451 GATGAGGTGAGAGAGAATATTGCCAAAGGAATGGCTGTTTAGGACCCACTTTACTCTTGTAGCCCTGTGGAGTGCCTGGTGTGGT
   D E V R E N I A K G M A V L G P T F T L D A L V E C L V I G
541 GTGGGACAAATGTCAGGTGCGCAGCTTGAGATCATGTGCTGCTTTGGTGTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
   V G T M S G V R Q L E I M C C F G C M S V L A N Y F V F M T
631 TTCTTCCGGCCTGTGCTCTCTGTGTTGGAGTTGTCCAGAGAAAGCAGGAGGGAGCAGCCATCTGGCAGCTGAGTCACTTTCTAGA
   F F P A C V S L V L E L S R E S R E G R P I W Q L S H F S R
721 GTTCTGGAAGAGGAGGACAAAGCCTAACCTGTTACGCAAGAGTCAAAATGATCATGCTCTTGGCCTGGATTCAGTTCAAGT
   V L E E E E D N K P N P V T Q R V K M I M S L G L V M V H A
811 CATAGCCGGTGGATTGCAGATCCCGCTCAAGTAACGGAACTCTGATCTTCCCTCAAGTTGGAGTGAAGTGAATGACAAATGTC
   H S R W I A D P A S S N G T L D L P Q V G V S L N D N V P K
901 AGGATTGAGCCAGCATGCCCTATGGCACTTTACCTGTCAGGATGATCAGCATGGACATTGAGCAGGTGATCAGATGGTGGTGGT
   R I E P D M P L W H F Y L S R M I S M D I E Q V I T L G L A
991 CTGTTCTGGCTGTGAAGTACATTTTCTTGGAGCATGTGGAATGGAATCTACCCTGCTCTGAAAGTCCCCTCCAAGTCCATGCTC
   L F L A V K Y I F F E H V E M E S T L S L K V P T P S S M L
1081 TCTCAGAACCCGTGAGAGGGGTAATGATCCCTGAGAAAATGCTCTCCCAAAATCCAGTGCCTCAGCCCTCCTGCTGCTGCTG
   S Q K R S P D Q C C R K E V A C S S K P E K T P T P L P V V
1171 ACCAAAGAGGAAAGAGATTTAGTGATTCGGCCCTGCCCTTAAAGAGCCTGAGCATAAAAGTAATTTTGTCTGGGAGAGGATGAA
   T K E E R D L V I R P L P A L K E P E H K S N F V L G E D E
1261 ACTCAGAAACCGTGTAGAGGAGGAGTGTGTCGAGCCTGTGATCAATGACCTGCTGAACCTAGATCTGTGGAAGACTGTGCTGCTG
   T Q E N A D V S E P V I N V P A E P R S V E D C L S I L K N
1351 CAAGATATGGGCGCCGTACCTCAGTGTGAGAGGTCATGTTTGGTGAAGTCAAGCAGATCCCATCTTACAACCTGGAGGCGATG
   Q D M G A R Y L S D E E V I V L V N S K H I P S Y K L E A M
1441 ATGGAGACCCGTGAGAGGGGTAATGATCCCTGAGAAAATGCTCTCCCAAAATCCAGTGCCTCAGCCCTCCTGCTGCTGCTG
   M E T P E R G V M I R R K M L S P K F P V P S A L S C L P Y
1531 AAAAATAGCACTACTCTATGGTGTGGAACATGTGCGAGAACGTCATTGGTTACATGCCAGTTCCTGTGGGGTGTGCTGCTCCG
   K N Y D Y S M V M G T C C E N V I G Y M P V P V G V A G P P
1621 TTATTGGATGGAAAGCATTTCAGTCCCATGGCAACAAGTGGGCTGCTAGTTGCCAGCACAAATAGAGGCTGACAGCTATAGCT
   L L D G K H F Q V P M A T T E G C L V A S T N R G C R A I A
1711 TTGGCGGTGTGCGAGTAGCCGTGCTTGCAGATGCAATGACCAGAGGGCGGTGGTGGCTGCTGCTTCTGCTTGTGATCGCGCTGAA
   L A G G A S S R V L A D A M T R G P V V R L P S A C H A A E
1801 GTCACCGCTGGTGGAGAGCACTGAGGCTTCAAGATCATCAAGAGGCTTGCACAGCAGCAGGTTGCGCGCTGACAGGCTT
   V K A W L E S T E G F K I I K E A F D Q T S R F A R L E R L
1891 CTGATTGGCCTGGCAAGTGCACACTGTACATTCGATTCCAGCTTAAACTGGAGATGCAATGGGCATGAACATGATCTCAAAGGCACA
   L I G L A S R N L Y I R F Q S K T G D A M G M N M I S K G T
1981 GAACAGGCTCTCGCAGGCTCAAGGAGAAATTCAGAGCTTCAAGTTTGGCTGTAGTGGAACTACTGTACTGACAAAAACCTGCT
   E Q A L A R L K E E F P E L Q V L A V S G N Y C T D K K P A
2071 GCCATCACTGGATTGAAGGCAGGGCAAGTCAAGTGTGCGGAGACCTCCATCCAGCCAAAGTTGTCAAAGAGATTTTAAAGACGTG
   A I N W I E G R G K S V V C E T S I P A K V V K E I L K T S
2161 ACTGGGCTGTGGTAGATGTAACATAACAAGAATGGTAGGATCTGCCATGGCTGGAAGCATTGAGGTTATAAGGCTGACAGCGCC
   T A A L V D V N I N K N L V G S A M A G S I G G Y N A H A A
2251 AACATTGATAGTGTATTATATGCTGTGGACAGGACCCAGCGCAAACAGTGGGCGAGCTCTAATGTATCACTATAATGGAAGCCTCA
   N I V A A I Y I A C G Q D P A Q T V G S S N C I T I M E A S
2341 GGCACCCAGGGGAGGATCTTATATCAGCTGACTATGCCCTCCATTGAGCTGGGCACTGTGGCGGAGGCGCTAACCTTCTCCACAG
   G T T G E D L Y I S C T M P S I E L G T V G G G A N L P P Q
2431 CAGGCTGTTACAGATGTTAGGTGTTCTGGGTGCCAGTCAGGAGTGTCCCTGGCGAAAATGCCGACAGCTTGTAAAGTGGTGTGTGCA
   Q A C L Q M L G V L G A S Q E C P G E N A R Q L A K V V C A
2521 ACCGTGCTGCAAGGAGCTGCTACTCATGTCTGCACTGTGCTGCGGACACCTGGTAAAAGTCAATGACTCACAACAGATCAAAAGTG
   T V L A G E L S L M S A L A A G H L V K S H M T H N R S K V
2611 AATTTACAAGAAGTTCAGGAACATGTACTAAGCAAGCATCTTGA
   N L Q E V P G T C T K Q A S *
2662  aacgtcacctgttgaagaggcaaggccataagaagaagatttcatttcaaggcacaatgattagtaatttagattttccaa
2752  ggacagcaaaaggaaacagacttacaacttttcattggtttccctgatttgttaaaggaggattgtctttatatcagtttgaaaaatta
2842  aagactgaaatcaagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图2 稀有鮕鲫 HMGR 序列全长及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Full-length mRNA sequence and deduced amino acid sequence of HMGR in *Gobiocypris rarus*

(*Homo sapiens*, AAH33692.1) 的 HMGR, 结果显示稀有鮕鲫和斑马鱼的 HMGR 聚为一支, 再跟其他鱼类

聚为一支, 鱼类与人, 牛等哺乳动物的 HMGR 有差异。

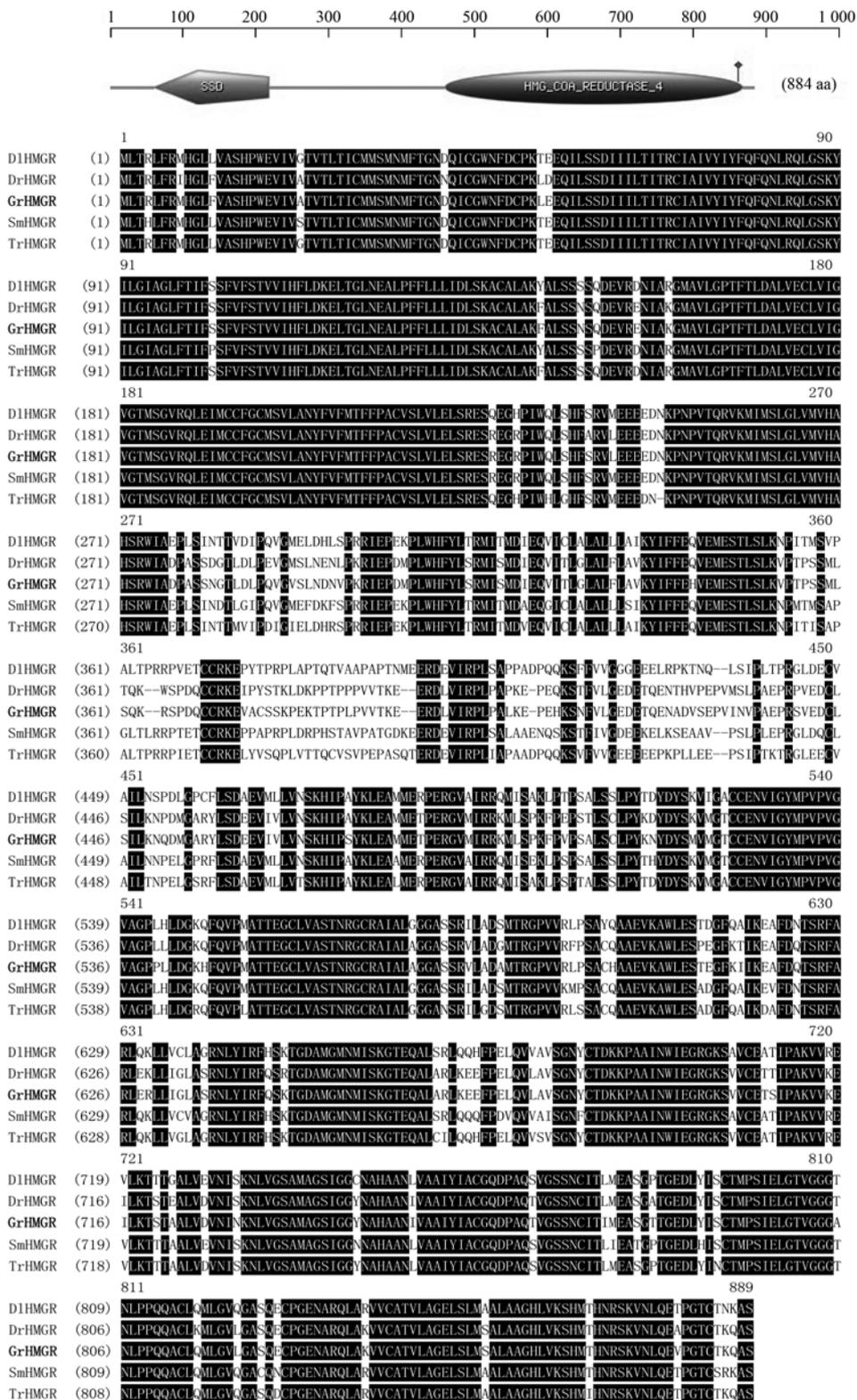


图 3 稀有鮡鲫 HMGR 氨基酸序列多重对比

Fig. 3 Multi-comparison on amino acid sequences of HMGR in *Gobiocypris rarus*

2.5 HMGR 在稀有鮡鲫大脑、肝脏、性腺中的表达
经过 Real-time PCR 检测 HMGR 基因在稀有鮡

鲫 HPG 轴相关组织大脑、性腺及肝脏中的表达情
况(图 5)。检测发现, HMGR 基因在大脑、性腺及肝

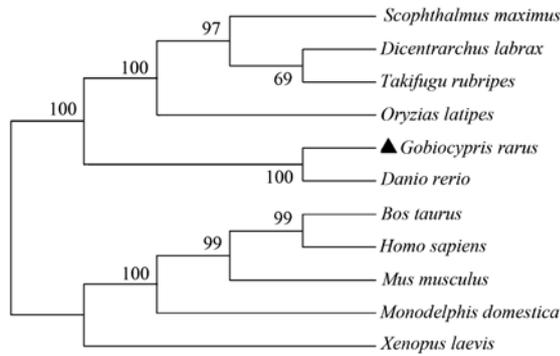
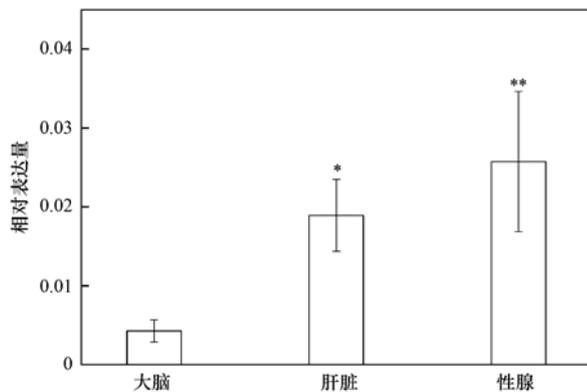


图 4 稀有鮕鲫与其他动物 HMGR 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of the amino acid sequences of HMGR from *Gobiocypris rarus* and other animals



* 表示与空白对照组相比, $P < 0.05$;
** 表示与空白对照组相比, $P < 0.01$, 下同

图 5 稀有鮕鲫 HMGR 的组织相对表达

Fig. 5 Relative expression profiles of HMGR in *Gobiocypris rarus*

脏中均有表达,但是表达量存在差异性, HMGR 基因在性腺中表达量最高,其次是肝脏组织。

2.6 在 EE2 和 PCP 诱导下,成年雄鱼 HMGR 的表达情况

运用 Real-time PCR 技术检测经 PCP 和 EE2 暴露后 HMGR 基因表达量的改变。研究发现对于大脑组织, PCP 抑制 HMGR 基因的表达, 并且随着 PCP 浓度的升高表达量抑制效果越明显, $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP 对 HMGR 基因的抑制效果显著 ($P < 0.05$), $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP 对于 HMGR 基因的抑制效果则与 $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ EE2 相当, 抑制效果极显著 ($P < 0.01$); 对于性腺组织, 高于 $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP 后, 抑制效果显著, 随着 PCP 浓度的逐步增高, 效果更加明显; 对于肝脏组织, 在 8 、 16 、 $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP 暴露 21 d 后, HMGR 基因的表达量分别为: 0.08 、 0.20 、 0.05 , 抑制效果显著, 但值得注意的是 $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PCP 对

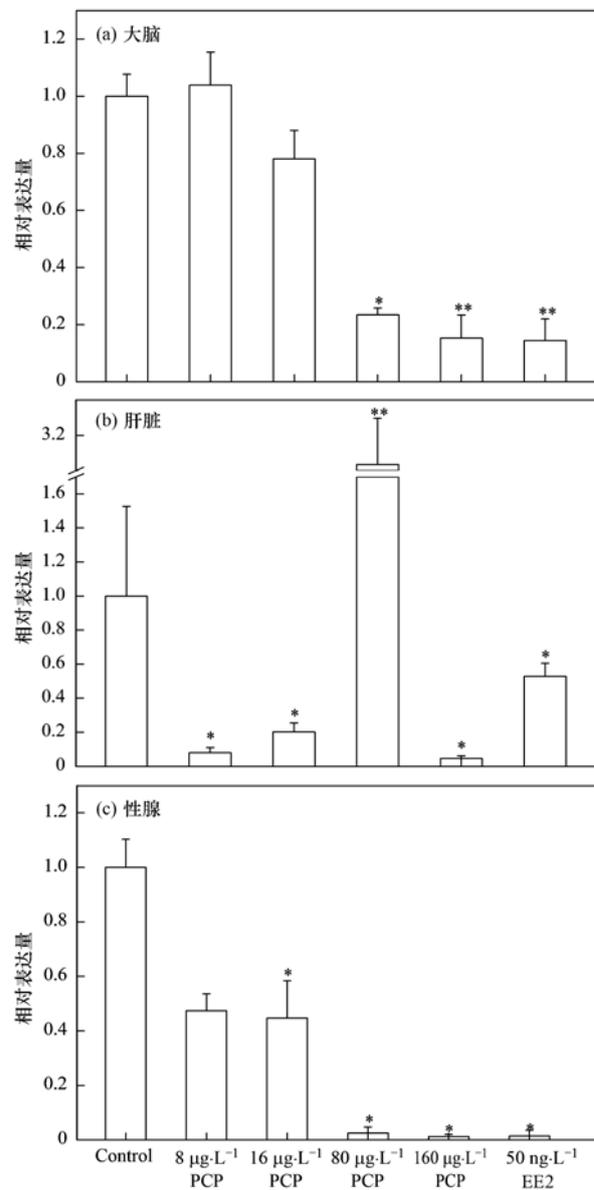


图 6 PCP 暴露下 HMGR 基因在大脑、肝脏、性腺中的表达情况

Fig. 6 Expression of HMGR in brain, liver and gonads of *Gobiocypris rarus* exposed to different concentrations of PCP

HMGR 基因有诱导作用, 但就整体趋势是明显抑制表达的。

3 讨论

3.1 稀有鮕鲫 HMGR 基因的生物信息学分析

HMGR 由于在胆固醇合成过程中起着关键限速酶的作用而备受关注, 其生化性质、结构及功能对胆固醇的代谢调控研究极为重要。本研究利用 RACE 技术克隆出稀有鮕鲫 HMGR 基因全长, 基于 NCBI 数据资源及生物信息学软件相结合的方法对该基因及氨基酸序列进行分析, 并对其蛋白质性质进行预测, 为该基因的研究提供理论参考依据。本研

究结果表明,GrHMGR 与其他物种 HMGR 氨基酸同源性较高,尤其是与斑马鱼,达到 94%,这表明 HMGR 在生物进化中十分保守,可作为胆固醇合成代谢中重要的研究对象。

3.2 在 PCP 及 EE2 诱导下 HMGR 的表达情况分析

HMGR 是内源性胆固醇(类固醇激素的前体)合成中的关键限速酶,维持胆固醇的动态平衡。Liu 等^[25]研究表明在经过磷酸三酯(TDCPP)和磷酸三苯酯(TPP)暴露 21 d 后,斑马鱼 HPG 轴上 HMGR 表达下调,且影响了斑马鱼性激素的平衡;Zhang 等^[4]研究证明在雄激素(TRB)暴露 7 d 后,日本青鳉 HPG 轴上 HMGR 基因表达量下降。本实验结果表明,不同浓度 PCP 对成年雄性稀有鮕鲫暴露 21 d 后,运用 Real-time PCR 技术检测 HMGR 基因在稀有鮕鲫 HPG 轴相关组织大脑、性腺和肝脏中的表达情况,结果显示大脑和性腺中 HMGR 的表达量随着 PCP 浓度的升高呈现明显的下降趋势,且高浓度 PCP 对该基因的诱导效果与 17 α -乙炔基雌二醇(EE2)相当,而 EE2 是典型的类固醇雌激素^[26],可见 PCP 确实通过 HPG 轴影响了 HMGR 的表达,研究证明 PCP 通过调控 HPG 轴上类固醇激素前体(胆固醇)合成水平的关键基因行使内分泌干扰作用。值得注意的是,对于肝脏组织, HMGR 的表达略有不同,在 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP 暴露时, HMGR 基因的表达量出现了明显上升,这一现象有待于进一步的研究。

4 结论

(1)稀有鮕鲫 HMGR 全长 3 101 bp,包含 224 bp 的 5'非编码区、225 bp 的 3'非编码区和 2 652 bp 的开放阅读框(ORF)共编码 884 个氨基酸残基,编码稀有鮕鲫 HMGR 蛋白与其他鱼类 HMGR 蛋白同源性较高,这些结论为稀有鮕鲫 HMGR 遗传学地位奠定了基础。

(2)稀有鮕鲫 HMGR 基因的表达有组织特异性,在脑、性腺、肝脏组织中均有表达,性腺组织中表达量最高,大脑中最少。

(3)内分泌干扰物 PCP 抑制 HMGR 基因在大脑和性腺中的表达,抑制效果与浓度呈正相关,并且在高浓度 PCP 暴露下抑制程度基本与 EE2 相同。说明 PCP 会通过 HPG 轴干扰内分泌系统。

参考文献:

[1] 王晓凤,王爱国,傅金鑫,等.猪 HMGR 基因组织表达特性研究[J].中国畜牧杂志,2010,46(11):16-18.

- [2] Istvan E S, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase [J]. Science, 2001, 292(5519): 1160-1164.
- [3] Skolness S Y, Durhan E J, Reyero N G, et al. Effects of a short-term exposure to the fungicide prochloraz on endocrine function and gene expression in female fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103(3-4): 170-178.
- [4] 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.
- [5] Zhang X W, Hecker M, Jones P D, et al. Responses of the medaka HPG axis PCR array and reproduction to prochloraz and ketoconazole [J]. Environmental Science and Technology, 2008, 42(17): 6762-6769.
- [6] Prevedouros K, Macleod M, Jones K C, et al. Modelling the fate of persistent organic pollutants in Europe: parameterisation of a gridded distribution model [J]. Environmental Pollution, 2004, 128(1-2): 251-261.
- [7] Igbinsola E O, Odjadjare E E, Chigor V N, et al. Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: the public health perspective [J]. The Scientific World Journal, 2013, 2013(1): 1-11.
- [8] Zheng W, Yu H, Wang X, et al. Systematic review of pentachlorophenol occurrence in the environment and in humans in China; not a negligible health risk due to the re-emergence of schistosomiasis [J]. Environment International, 2012, 42(5): 105-116.
- [9] Kloas W, Urbatzka R, Opitz R, et al. Endocrine disruption in aquatic vertebrates [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, 1163(1): 187-200.
- [10] 史熊杰,刘春生,余珂,等.环境内分泌干扰物毒理学研究[J].化学进展,2009,21(3):340-349.
- [11] Zimbron J A, Reardon K F. Continuous combined Fenton's oxidation and biodegradation for the treatment of pentachlorophenol-contaminated water [J]. Water Research, 2011, 45(17): 5705-5714.
- [12] Wang X L, Li Y, Dong D. Sorption of pentachlorophenol on surficial sediments: The roles of metal oxides and organic materials with co-existed copper present [J]. Chemosphere, 2008, 73(1): 1-6.
- [13] Montañó M, Gutleb A C, Murk A T J. Persistent toxic burdens of halogenated phenolic compounds in humans and wildlife [J]. Environmental Science and Technology, 2013, 47(12): 6071-6081.
- [14] Zhou Y, Jiang Q W, Peng Q, et al. Development of a solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of pentachlorophenol in human plasma using experimental design [J]. Chemosphere, 2007, 70(2): 256-262.
- [15] Zheng W W, Wang X, Yu H, et al. Global trends and diversity

- in pentachlorophenol levels in the environment and in humans: a meta-analysis [J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, **45**(11): 4668-4675.
- [16] Gao J J, Liu L H, Liu X R, *et al.* Levels and spatial distribution of chlorophenols-2, 4-dichlorophenol, 2, 4, 6-trichlorophenol, and pentachlorophenol in surface water of China [J]. *Chemosphere*, 2008, **71**(6): 1181-1187.
- [17] Zheng M H, Zhang B, Bao Z C, *et al.* Analysis of pentachlorophenol from water, sediments, and fish bile of Dongting Lake in China [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, **64**(1): 16-19.
- [18] Zha J M, Wang Z J, Schlenk D. Effects of pentachlorophenol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, **161**(1): 26-36.
- [19] Yu L Q, Zhao G F, Feng M, *et al.* Chronic exposure to pentachlorophenol alters thyroid hormones and thyroid hormone pathway mRNAs in zebrafish [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, **33**(1): 170-176.
- [20] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮕鲫——一种新的鱼类实验动物[J]. *实验动物科学与管理*, 2003, **20**(Z1): 96-99.
- [21] 廖涛, 徐盈, 钟雪萍, 等. EE2 对稀有鮕鲫和斑马鱼幼鱼体内卵黄蛋白原诱导的比较[J]. *水生生物学报*, 2005, **29**(5): 513-517.
- [22] 熊力, 马永鹏, 张晓峥, 等. 五氯酚对稀有鮕鲫卵黄蛋白原及 p53 的诱导效应[J]. *环境科学*, 2012, **33**(6): 1858-1864.
- [23] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876-4882.
- [24] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596-1599.
- [25] Liu X S, Ji K, Jo A, *et al.* Effects of TDCPP or TPP on gene transcriptions and hormones of HPG axis, and their consequences on reproduction in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, **134-135**: 104-111.
- [26] Shao X L, Zhong W Q, Ma X Y, *et al.* Assessing estrogenic activities of selected endocrine disrupting chemicals and their combination effects [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, **765-767**: 2944-2948.

CONTENTS

Chemical Characteristics in Airborne Particulate Matter (PM ₁₀) During a High Pollution Spring Dust Storm Episode in Beijing, Tianjin and Zhangjiakou, China	LIU Qing-yang, LIU Yan-ju, ZHAO Qiang, <i>et al.</i> (2843)
Distribution of Atmospheric Ultrafine Particles During Haze Weather in Hangzhou	CHEN Qiu-fang, SUN Zai, XIE Xiao-fang (2851)
Effect of Meteorological Factors on Characteristics of PCDD/F Pollution in Guangzhou	DU Guo-yong, SU Yuan, REN Ming-zhong, <i>et al.</i> (2857)
Atmospheric CO ₂ Data Filtering Method and Characteristics of the Molar Fractions at the Longfengshan WMO/GAW Regional Station in China	LUAN Tian, ZHOU Ling-xi, FANG Shuang-xi, <i>et al.</i> (2864)
Influence of Atmospheric Transport on Air Pollutant Levels at a Mountain Background Site of East China	SU Bin-bin, XU Ju-yang, ZHANG Ruo-yu, <i>et al.</i> (2871)
Determining the Concentration of Coating Solution Attaching to Honeycomb Denuder in Summer in Tianjin	ZHANG Shi-jian, JI Ya-qin, ZHANG Lei-bo, <i>et al.</i> (2878)
Characterization of Lead Size Distributions with Different Process in Lead-Zinc Smelter	LIANG Jun-ning, LI Wen-hui, GE Yi, <i>et al.</i> (2883)
Effect of KI Modified Clay on Elemental Mercury Removal Efficiency	SHEN Bo-xiong, CHEN Jian-hong, CAI Ji, <i>et al.</i> (2890)
Characteristics of Odors and VOCs from Sludge Direct Drying Process	CHEN Wen-he, DENG Ming-jia, LUO Hui, <i>et al.</i> (2897)
Research of Early-warning Method for Regional Groundwater Pollution Based on Risk Management	BAI Li-ping, WANG Ye-yao, GUO Yong-li, <i>et al.</i> (2903)
Dynamic Response of Riverine Nitrate Flux to Net Anthropogenic Nitrogen Inputs in A Typical River in Zhejiang Province over the 1980-2010 Period	ZHANG Bai-fa, CHEN Ding-jiang (2911)
Research on the Influence of Urban Land Use Structure and Pattern on Nitrogen, Phosphorus of Wetland Water Environment in Xianlin New Town of Nanjing	CAI Chun-xiao, LIU Hong-yu, LI Yu-feng, <i>et al.</i> (2920)
Profile Nutrient Distribution and Sedimentary Characteristics in Typical Marshes of Sanjiang Plain	LI Rui-li, CHAI Min-wei, QIU Guo-yu, <i>et al.</i> (2928)
Source and Contamination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Soil in Karst Underground River Basin	LAN Jia-cheng, SUN Yu-chuan, SHI JIAN, <i>et al.</i> (2937)
Diel Variations of Hydrochemistry and Influencing Factors in a Surface Stream in Subtropical Karst Area, SW China	ZHANG Tao, PU Jun-bing, YUAN Dao-xian, <i>et al.</i> (2944)
Hydrogen and Oxygen Isotopes of Lake Water and Geothermal Spring Water in Arid Area of South Tibet	XIAO Ke, SHEN Li-cheng, WANG Peng (2952)
Preliminary Research on the Feature of Dissolved Inorganic Carbon in Wulixia Reservoir in Summer, Guangxi, China	LIU Wen, PU Jun-bing, YU Shi, <i>et al.</i> (2959)
Distribution of Heavy Metals in Xiangsi River Valley of Tongling, China	CHEN Li-wei, XU Xiao-chun, WANG Jun, <i>et al.</i> (2967)
Volume Fraction of Gas Vesicle and Floating Characteristics of Cyanobacteria in Taihu Lake Under Different Pressures	WANG Wei, CONG Hai-bing, XU Ya-jun, <i>et al.</i> (2974)
Degradation of Dimethyl Phthalate by Ti(IV)-catalyzed O ₃ /H ₂ O ₂ Under Acidic Conditions	GAO Yan, SHEN Tong-dong, CHEN Yao, <i>et al.</i> (2980)
Influence of Inorganic Ions and Humic Acid on the Removal of Pb(II) and Hg(II) in Water by Zero-Valent Iron	SHI Qiu-ling, ZHOU Xin, ZHANG Jin-zhong, <i>et al.</i> (2985)
Synthesis of Hydroxyapatite/Magnetite/Zelite Composite for Congo Red Removal from Aqueous Solution	FANG Qiao, LIN Jian-wei, ZHAN Yan-hui, <i>et al.</i> (2992)
Corrosion of Stainless Steel 201, 304 and 316L in the Simulated Sewage Pipes Reactor	BAO Guo-dong, ZUO Jian-e, WANG Ya-jiao, <i>et al.</i> (3002)
Experimental Study of Adhesion Properties Between Membrane Surface and Humic Acid During Microfiltration	WANG Lei, WANG Lei, HUANG Dan-xi, <i>et al.</i> (3007)
Coating Modification of Anthracite Substrates in Vertical-flow Constructed Wetlands by LDHs Synthesized from Different Metal Compounds and the Nitrogen Removal Efficiencies	ZHANG Xiang-ling, GUO Lu, CHEN Jun-jie, <i>et al.</i> (3012)
Atrazine Wastewater Treatment in a SPG Membrane-Aerated Genetically Engineered Microorganism Biofilm Reactor	LIU Chun, GONG Peng-fei, XIAO Tai-min, <i>et al.</i> (3018)
Influencing Factors for Operational Performance of a Biofilm Reactor with Microbubble Aeration Using SPG Membrane	ZHANG Lei, ZHANG Ming, LIU Chun, <i>et al.</i> (3024)
Variations in the Active Characteristics of Sludge During the Operation of an Aerobic Membrane Bioreactor and Their Effects on Membrane Fouling	CHEN Xuan, TANG Bing, ZHANG Zi, <i>et al.</i> (3031)
Effects of Anaerobic Feeding Period on Nitrifying Granular	LIU Wen-ru, YIN Fang-fang, WANG Jian-fang, <i>et al.</i> (3038)
Influencing Factors of Sludge Liquor Treatment in UASBB	LI Ya-feng, MA Chen-xi, ZHANG Chi (3044)
Background Values of As and Hg in Surface Dusts in the Vicinity of Kaifeng City and Their Application	CHEN Yan-fang, MA Jian-hua, DONG Yun-wu, <i>et al.</i> (3052)
Concentrations and Health Risks of Toxic Metals in Surface Dust in Kindergartens of Beijing	DUAN Heng-yi, WU Ya-tao, WANG Jue, <i>et al.</i> (3060)
Polychlorinated Biphenyls in House Dust at an E-waste Site and Urban Site in the Pearl River Delta, Southern China; Sources and Human Exposure and Health Risks	ZHU Zhi-cheng, CHEN She-jun, DING Nan, <i>et al.</i> (3066)
Responses of Soil Total Organic Carbon and Dissolved Organic Carbon to Simulated Nitrogen Deposition in Temperate Typical Steppe in Inner Mongolia, China	QI Yu-chun, PENG Qin, DONG Yun-she, <i>et al.</i> (3073)
Effects of Different Fertilizer Species on Carbon and Nitrogen Leaching in a Reddish Paddy Soil	LIU Xi-yu, ZOU Jing-dong, XU Li-li, <i>et al.</i> (3083)
Effects of Low Molecular Weight Organic Acids on Speciation of Exogenous Cu in an Acid Soil	HUANG Guo-yong, FU Qing-ling, ZHU Jun, <i>et al.</i> (3091)
Evaluation of Compounding EDTA and Citric Acid on Remediation of Heavy Metals Contaminated Soil	YIN Xue, CHEN Jia-jun, CAI Wen-min (3096)
Soil Biochemical Characteristics in Different Ecological Systems and Their Relationships with Soil Respiration and N ₂ O Emission	CHEN Ling, FAN Hui, JIANG Jing-yan (3102)
Contribution of Different Processes in Wetland Soil N ₂ O Production in Different Restoration Phases of the Yellow River Estuary, China	SUN Wen-guang, SUN Zhi-gao, GAN Zhuo-ting, <i>et al.</i> (3110)
Effects of Combined Applications of Pig Manure and Chemical Fertilizers on CH ₄ and N ₂ O Emissions and Their Global Warming Potentials in Paddy Fields with Double-Rice Cropping	WANG Cong, SHEN Jian-lin, ZHENG Liang, <i>et al.</i> (3120)
Influence of Ozone on Snap Bean Under Ambient Air in Two Sites of Northern China	YUAN Xiang-yang, ZHANG Wei-wei, SUN Jing-song, <i>et al.</i> (3128)
Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis Influences the Biological Effects of Nano-ZnO on Maize	WANG Wei-zhong, WANG Fa-yuan, LI Shuai, <i>et al.</i> (3135)
Effect of Arbuscular Mycorrhizae on Growth, Heavy Metal Uptake and Accumulation of <i>Zenia insignis</i> Chun Seedlings	LI Xia, PENG Xia-wei, WU Song-lin, <i>et al.</i> (3142)
Effects of Phosphorus-containing Substances on Arsenic Uptake by Rice	LEI Ming, ZENG min, LIAO Bo-han, <i>et al.</i> (3149)
Ecotoxicological Effect and Soil Environmental Criteria of the Heavy Metal Chromium(VI)	WANG Xiao-nan, LIU Zheng-tao, WANG Wan-hua, <i>et al.</i> (3155)
Promotion Effects of Vitamin B ₁₂ on the Degradation of 2,4,4'-Trichlorobiphenyl by <i>Nostoc</i> PD-2	LIU Jia-yu, XIAO Wen-feng, LU Li-ping, <i>et al.</i> (3162)
Isolation, Identification and Characterization of a Diethylstilbestrol-degrading Bacterial Strain <i>Serratia</i> sp.	XU Ran-fang, SUN Min-xia, LIU Juan, <i>et al.</i> (3169)
Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers in Wild Crucian Carp and Exposure Estimation of Dietary Intake	WANG Jun-xia, WANG Chun-yan, LIU Li-li, <i>et al.</i> (3175)
Cloning of Full-length cDNA of HMGR from <i>Gobiocypris rarus</i> and Analysis of Its Expression Profiles in Male Exposed to Pentachlorophenol	DENG Chuan, MAO Si-yu, XIONG Li, <i>et al.</i> (3183)
Effects of Algae and Kaolinite Particles on the Survival of Bacteriophage MS2	HE Qiang, WU Qing-qing, MA Hong-fang, <i>et al.</i> (3192)
Adsorption Kinetics and Mechanism of Lead(II) on Polyamine-Functionalized Mesoporous Activated Carbon	LI Kun-quan, WANG Yan-jin, YANG Mei-rong, <i>et al.</i> (3198)
Influence of Biological Activated Carbon Dosage on Landfill Leachate Treatment	CUI Yan-ni, GUO Yan, WU Qing, <i>et al.</i> (3206)
Effect of Economic Structure Adjustment on Pollution Emission: A Case Study of COD	LI Ming-sheng, ZHOU Lei, CHEN Yuan-hang, <i>et al.</i> (3212)
Reasons for the Changes in Anthropogenic Lead Flows of China	MA Lan, MAO Jian-su (3219)
Discussion on Reduction Potential of CH ₄ Emission Intensity for Early Off-take Practice of Grazing Yak	WANG Shi-ping, Andreas Wilkes, WANG Ya-yun, <i>et al.</i> (3225)
Review of Dual Stable Isotope Technique for Nitrate Source Identification in Surface- and Groundwater in China	XU Zhi-wei, ZHANG Xin-yu, YU Gui-rui, <i>et al.</i> (3230)

《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)

2014年8月15日 第35卷 第8期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 8 Aug. 15, 2014

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: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行