

二噁英类生物检测技术

郑明辉 余立凤 丁 琼 田亚静 主编

Biodetection Technologies for Dioxins

中国环境出版社

二噁英类生物检测技术

郑明辉 余立风 丁 琼 田亚静 主编

中国环境出版社·北京

图书在版编目 (C I P) 数据

二噁英类生物检测技术/郑明辉等主编. —北京: 中国环境出版社, 2013. 4
ISBN 978-7-5111-1418-1

I. ①二… II. ①郑… III. ①二噁英—有机污染物—环境监测 IV. ①X5

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第070568号

出版人 王新程
责任编辑 邵 葵
责任校对 扣志红
封面设计 刘丹妮

出版发行 中国环境出版社
(100062 北京市东城区广渠门内大街16号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
联系电话: 010-67112765 (编辑管理部)
010-67112735 (环评与监察图书出版中心)
电子邮箱: bjgl@cesp.com.cn
发行热线: 010-67125803 010-67113405 (传真)

印 刷 北京市联华印刷厂
经 销 各地新华书店
版 次 2013年11月第1版
印 次 2013年11月第1次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 9.25
字 数 150千字
定 价 48.00元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

编 委 (按姓氏笔画排序)

- 王开祥 (环境保护部环境保护对外合作中心)
王 斌 (清华大学)
田 军 (重庆市环境保护局)
刘 芸 (环境保护部华南环境科学研究所)
任明忠 (环境保护部华南环境科学研究所)
阳 剑 (重庆市固体废物管理中心)
陈海君 (环境保护部环境保护对外合作中心)
赵 斌 (中国科学院生态环境研究中心)
黄 俊 (清华大学)
廖世国 (重庆市固体废物管理中心)
蔡洪英 (重庆市固体废物管理中心)

前 言

持久性有机污染物（POPs）是人类根据社会和经济发展的需要而有意识生产合成或伴随人类生活和工业生产而无意识产生的一类化学物质。与常规污染物不同，持久性有机污染物由于其难降解、毒性大、可长距离迁移、能生物蓄积的特点，对人类健康和生态环境已构成严重威胁，成为全球关注的环境污染物。

为逐步消除持久性有机污染物的威胁和危害，国际社会于2001年5月通过《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》。作为一个对民众健康和生态环境高度负责的政府，中国在公约通过后率先签署，承诺与国际社会一道逐步淘汰、削减、控制持久性有机污染物。

随着我国根据履行公约要求编制的《国家实施计划》的完善，以及我国履约行动计划和优先领域的逐步明晰，挪威政府表达了希望支持我国履约的合作意向。中挪双方希望通过借鉴挪威在持久性有机污染物监测方面的优势，开展相关合作示范项目。

在此背景下，2007年8月，中挪合作持久性有机污染物地方履约能力建设项目应运而生。该项目由我国环境保护部、商务部和挪威政府共同发起，并且在挪威水研究所（NIVA）、清华大学和中科院生态环境研究中心的技术支持下，选择重庆市作为示范地区开展具体的持久性有机污染物监测示范工作；同时，该项目的合作领域也符合中国履约工作的优先领域。作为中国首个持久性有机污染物地方履约能力建设示范项目，项目取得的成功经验将为我国其他地区全面启动履约工作提供示范。

经过3年多的实施，在各方的努力下，项目取得了丰硕成果，产生了超出预期的综合效应。项目的实施对今后我国削减和控制持久性有机污染物的相关工作，包括开展二噁英类生物检测、完善技术标准及政策、提高社会公众意识等产生了深远影响，成为中挪环境领域合作的成功典范。

在项目实施过程中，二噁英类生物检测实验室的建立，以及开展污染源和环境介质中的二噁英类快速检测分析是项目的主要亮点之一。与传统的仪器分析方法相比，生物检测方法具有检测时间短、成本低、可以批量检测、便于推广等优势。鉴于国内对二噁英类生物检测方法的研究和实践经验有限，环境保护部对外合作中心联合国内多名专家共同梳理了国际上主要应用的二噁英类生物检测技术，并整理编纂成书，从而让国内同胞更多地了解二噁英类生物检测方法，共同推动建设一个无持久性有机污染物的环境友好世界。

编 者

2013年1月

目 录

第 1 章 二噁英类的危害及检测方法概述.....	1
第一节 二噁英类的来源及危害.....	2
一、人类对二噁英毒性认识的历史简介.....	2
二、二噁英的毒理学机制.....	4
第二节 二噁英检测方法概述.....	6
一、仪器分析法.....	6
二、生物分析法.....	7
三、二噁英生物分析法的历史发展过程.....	8
第三节 二噁英的主要生物检测方法.....	11
一、基于 AhR 信号通路的生物检测方法.....	13
二、基于二噁英抗体的生物检测法.....	16
三、生物检测方法的总结和展望.....	17
第四节 二噁英生物检测技术的应用现状及存在的主要问题.....	19
一、二噁英生物检测技术的应用现状.....	19
二、我国生物检测的主要问题.....	20
参考文献.....	21
第 2 章 二噁英类 ELISA 检测方法与应用.....	25
第一节 ELISA 技术的方法原理.....	26
一、方法原理.....	26
二、方法分类.....	28
三、方法特点.....	29
第二节 ELISA 技术在国外的应用.....	30
一、ELISA 应用于环境样品.....	31
二、ELISA 应用于工业废弃物样品.....	32
三、ELISA 应用于人体生物样品.....	32
四、ELISA 应用于鱼体生物样品.....	33

五、小结	33
第三节 ELISA 技术在国内的应用	34
一、在天津的应用	34
二、在上海的应用	34
三、在重庆的应用	35
第四节 重庆市酶联免疫方法地方标准规范	42
参考文献	43
第 3 章 二噁英类 EROD 检测方法与应用	45
第一节 EROD 检测方法的由来与发展	46
第二节 离体 EROD 生物检测方法原理	49
第三节 EROD 检测方法流程	51
一、样品的采集	51
二、样品的前处理	51
三、体外 H4IIE 细胞培养 EROD 酶活诱导检测	55
第四节 应用实例	61
案例一	61
案例二	63
第五节 EROD 检测方法应用展望	66
参考文献	68
第 4 章 二噁英类 CALUX 检测方法与应用	71
第一节 CALUX 检测方法的原理	72
一、二噁英毒理和健康效应的分子机制	72
二、报告基因简介	74
三、CALUX 方法的基本原理	77
第二节 CALUX 检测方法的发展过程	79
一、二噁英反应元件 (DRE) 的确认	79
二、CALUX 技术的发展	80
第三节 CALUX 方法在国外的实际应用	83
一、CALUX 在科研上的应用	83
二、各国相关管理机构的实际应用	85

第四节 CALUX 检测方法的总结和展望	86
一、CALUX 方法的优缺点	86
二、CALUX 检测方法的未来发展前景和方向	88
三、CALUX 方法在我国的发展和应用前景	89
参考文献	90
第 5 章 二噁英类生物检测方法在国外的实践	101
第一节 美国	102
一、4025 方法	102
二、4425 方法	103
三、4430 方法	104
四、4435 方法	105
五、应用案例：SITE MMT 项目	105
第二节 欧盟	110
一、欧盟二噁英类禁令	110
二、欧盟对二噁英类测定方法的总体要求	111
三、欧盟对基于细胞的生物测试方法的特定要求	112
四、欧盟对基于试剂盒的生物测试方法的特定要求	113
五、应用案例：欧洲的食品二噁英污染事件	113
第三节 日本	114
一、日本的二噁英问题	114
二、日本的二噁英基本法律、环境基准和监测体系	117
三、日本生物检测法相关法律、政策及管理	119
四、日本二噁英生物分析方法的应用经验	122
五、小结	126
参考文献	127
第 6 章 二噁英类生物检测技术在我国应用的展望	129
第一节 我国开展生物检测二噁英类的需求	130
第二节 在我国开展生物检测二噁英类的可能性	132
第三节 二噁英类生物检测应用的优势	133
第四节 在我国开展生物检测二噁英类技术应用的建议	134
参考文献	135

第 1 章

二噁英类的危害及检测方法概述

第一节 二噁英类的来源及危害

一、人类对二噁英毒性认识的历史简介

随着人类文明的进步,尤其是工业革命以后,伴随着科学技术的发展而带来的工业大发展,人类制造的各种商品除了满足人类自身的发展需求外,也直接或者间接制造出一系列有害物质威胁着人类和其他生物体的健康,例如重金属污染物、持久性有机污染物以及新兴的有潜在危害的纳米材料等。2010年10月,《自然综述——癌症》发表了一篇英国曼彻斯特大学的 A. Rosalie David 与 Michael R. Zimmerman 的文章——《癌症:老病、新病,还是不老不新?》,其通过分析数以百计的木乃伊,以及相关化石和古代医学文献,发现癌症在古时并不普遍^[1]。该研究暗示了癌症——仅次于心血管疾病的人类第二健康杀手与现代工业污染的相关性。该文一发表就受到全世界的瞩目,其结论也有巨大的争议性。但抛开这些争议,我们看到的事实是人类健康受到人类生活环境的影响的确越来越大,环境污染的确在严重威胁人类的健康。

环境污染问题一直伴随着人类社会的发展进程而日益复杂化及多样化,这使得环境污染对人类的健康所带来的负面影响也日益严重。由于经济以及生活的日益全球化,环境与健康问题已经不仅仅是一个区域性的问题,而是成为一个全球性的焦点问题。世界卫生组织(WHO)在其《2004年世界卫生报告》中指出,在全球范围内估计24%的疾病负担(健康寿命年损失)和23%的死亡(早逝)可归因于环境因素,而其中最主要的因素之一就是日益加剧的化学污染物。

在众多的化学污染物中,持久性有机污染物(POPs)因为其自身的物化特性和对人类健康的严重威胁受到全球极大的重视。二噁英类是能持久存在于环境中,并通过生物食物链(网)累积,对人类健康造成有害影响的化学物质。与常规污染物不同,持久性有机污染物对人类健康和自然环境危害更大:在自然环境中极难降解,能在全球范围内长距离迁移;它们被生物体摄入后不易代谢,并沿着食物链逐级浓缩放大,对人体危害巨大;它们不仅具有致癌、致畸、致突变性,而且还对内分泌有干扰作用^[2]。

二噁英类化合物(Dioxins)是典型的持久性有机污染物,也是《斯德哥尔

摩公约》中首批列入受控名单的12种对人类健康和生态环境特别有害的持久性有机污染物中的一类。二噁英的毒性极强,对生物体具有致癌、免疫毒性、肝毒性、皮肤毒性、内分泌干扰、生育障碍等健康威胁^[3-11]。二噁英类化合物是包括多氯二苯并对二噁英(PCDDs)、多氯二苯并呋喃(PCDFs)和共平面多氯联苯(Co-PCBs)等一大类化合物的总称。二噁英类化合物主要是来自废物焚烧、冶金及化工生产。

历史上发生的几起著名的二噁英类化合物危害健康的事件,使得人们更加重视二噁英的威胁。1949年,位于美国西弗吉尼亚州 Nitro 的孟山都化学工厂的一次卤代芳香烃化合物[HAH, 包括2,3,7,8-四氯二苯并二噁英(TCDD)]的意外泄漏导致当地居民患上了氯痤疮、肝脏疾病、血液疾病、肿瘤等疾病,并造成了一些患者的死亡^[12]。1957年, Sandermann 首次合成了 TCDD, 并发现其可导致氯痤疮, 1962—1967年的越南战争期间, 美军为了切断胡志明小道运输线而大量喷洒落叶剂(即橙剂), 橙剂中含有少量的 TCDD, 因此造成越南南方大面积的二噁英污染。虽然战争已经结束了几十年, 但直至今日当地民众和参战双方士兵还在承受着二噁英污染对他们健康的毒害。橙剂中残留的 TCDD 是合成苯氧基-除草剂2,4,5-三氯苯氧基乙酸和氯酚时所产生的副产品^[13]。

1976年位于意大利塞维索的化工厂(Industrie Chimiche Meda Societa Azionaria)发生了一次严重的 TCDD 意外泄漏事故^[14], 粗略估计大概有几千克 TCDD 和二噁英类似物泄漏到空气中并严重危害了当地民众的健康^[15]。当时就有几千只动物因此而死亡, 接下来当地管理部门屠宰了剩下的全部动物以免其进一步污染食物链。Mocaralli 先生收集了当时每个患者的血液样品并保存至今, 所以直到今天有关科学家还可以用这些样品研究二噁英对人类的危害^[14]。人们发现二噁英可能会影响人类的生殖功能, 但是这个结论目前还存在争议^[16, 17]。

近期也爆发了几次著名的二噁英污染事件。1998年3月, 德国销售的牛奶中出现高浓度二噁英。1999年2月, 比利时爆发了“二噁英污染鸡事件”, 比利时卫生部和农业部部长相继被迫辞职, 并最终导致内阁的集体辞职。2004年, 发生了乌克兰总统候选人尤先科二噁英中毒事件。2010年年底, 德国发生二噁英饲料事件, 并对该国的猪肉、鸡蛋等食品造成污染。诸如此类的事件说明, 二噁英并没有远去而是随时都可能威胁人们的健康。当然可以想象的是, 因为很多国家和地区二噁英检测手段落后等原因, 所以实际发生的二噁英污染事件肯定比被媒体曝光的多得多。

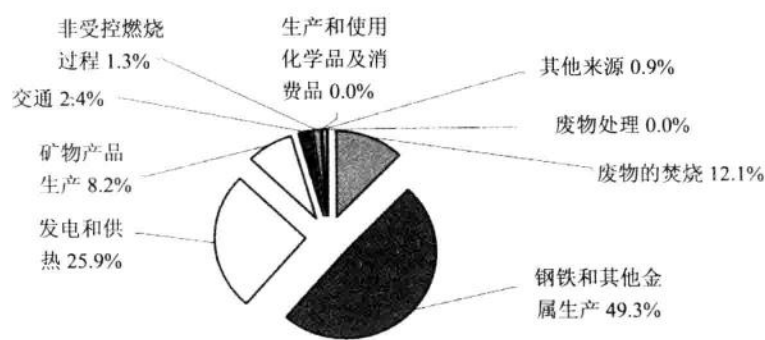
即使是人类认识到二噁英的毒性并对二噁英的生产和排放进行严格监控的今

天,世界各地还在此起彼伏地发生着类似的二噁英污染事件。这就说明,在现代工业时代完全消灭二噁英是不太可能的。在认识到二噁英的毒性后,全世界的有关科学家希望找到有效治疗二噁英中毒的方法。比如说宝洁公司声称如果食用不能消化的 Olestra™油就可以减弱 TCDD 中毒,这是因为其不能被人体所吸收,所以它可以充当 TCDD 的溶剂从而促进了 TCDD 的排泄^[18]。同时人们也发现小球藻^[19]、一些拮抗物质包括黄酮类物质、CH223191^[20]等可能可以减弱 TCDD 的危害。但是要么实际效果并不理想,要么根本还停留在理论阶段。也就是说,目前人类并没有找到一种有效治疗 TCDD 中毒的方法。

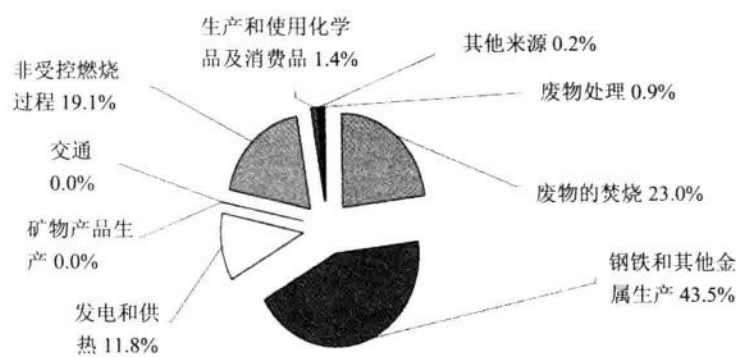
既然目前还没有找到有效治疗二噁英毒害的手段,人们想到的措施是尽量减少二噁英的排放。就目前的二噁英排放源来说,呈现出来源复杂、排放源数量巨大等特点。根据《中华人民共和国履行〈关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约〉国家实施计划》测算,我国存在 10 类 62 个子类二噁英排放源。而我国对二噁英的排放、污染研究的监测数据十分缺乏。依据《二噁英清单估算标准工具包》,并结合已有的监测和研究数据,估算出中国 2004 年各类源产生二噁英排放总量为 10.2 千克毒性当量 (TEQ),其中向空气中排放 5.0 千克 TEQ、水体中排放 0.041 千克 TEQ、产品排放 0.17 千克 TEQ、残留物排放 5.0 千克 TEQ。钢铁和其他金属生产二噁英量的贡献最大,占 45.6%,其次是发电和供热、废物的焚烧,这 3 类污染源排放量合计占到了总排放的 81% (见图 1-1)。

二、二噁英的毒理学机制

根据多年的研究成果,目前对二噁英的毒理学机制已经相对清晰。人们发现二噁英是通过活化其受体——芳香烃受体 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 发挥其毒理学效应。在没有接受二噁英刺激之前, AhR 存在于细胞质中并与 2 个 HSP90、1 个 XAP2 和 1 个 p23 形成一个复合体,在二噁英通过扩散作用穿过细胞膜进入细胞质后,二噁英与 AhR 结合从而使得 AhR 构象发生变化而暴露了 AhR 的入核序列,并引导该 AhR 复合体入核,入核后, AhR 会从复合体中解离并与细胞核内的 AhR 核转运蛋白 (ARNT) 形成异源二聚体。AhR : ARNT 异源二聚体可以识别一些基因启动子区域的二噁英反应元件 (DRE),并促进了这些基因的转录。除了可以直接调控一些下游基因的转录而影响细胞的功能外,还可以在蛋白水平或转录水平上影响其他转录因子的活性 (如 NFkB、AP-1 等) 从而间接地影响细胞功能。这些 AhR 信号通路直接和间接影响最后导致的结果就是二



中国二噁英大气排放行业分布图



中国二噁英残渣排放行业分布图

图 1-1 中国二噁英的排放分布情况

引自《中华人民共和国履行〈关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约〉国家实施计划》。

噁英的毒理学效应^[21]（详见第 3 章）。

对于上述的信号通路虽然还有一些异议，但是目前人们已经普遍认可 AhR 是二噁英发生生物学效应的最关键分子。但是需要指出的是，目前在二噁英信号通路本身还有大量的未知问题，需要相关研究者进行进一步的探索。而对于二噁英毒理学效应本身还有一些很关键的科学问题没有答案，比如说虽然我们知道了 AhR 信号通路启动了二噁英毒理学效应，但是最后究竟是通过什么分子机制造成最后的毒理学效应等，诸如此类的科学问题，需要有关研究者进一步地深入探索。

第二节 二噁英检测方法概述

目前人类受到二噁英的巨大危害，人们还无法有效避免二噁英的毒害，二噁英排放源多而分散，那么对二噁英的污染及排放进行有效的监控就提到了一个很重要的位置。如何及时、准确、廉价地测量环境或者食品等中的二噁英含量，已经成为二噁英有关研究者和有关管理部门关注的重点之一。经过几十年的发展，已经形成了仪器分析法和生物分析法两大类方法体系^[22]（见表 1-1）。

表 1-1 二噁英的检测方法^[22]

通用方法	例子
化学分析	GC-ECD; GC-MS
化合物免疫学分析	检测 PCBs 或 PCDDs 的酶联免疫反应实验（ELISA）
生物传感器	PCBs 生物传感器
体内暴露生物学标记	体内诱导 CYP1A1 表达
体内生物检测	鱼类早期生活史阶段的生物检测
体外生物检测	
受体结合实验	二噁英受体结合实验
酶活抑制实验	不适用
DNA 结合实验	DRE 结合凝胶阻滞实验
培养细胞本身的反应	培养细胞 CYP1A1 的诱导表达
报告基因实验	DRE- 荧光素酶报告基因质粒在培养细胞内表达

注：GC：气相色谱分析法；ECD：电子俘获检测；MS：质谱分析法；DRE：二噁英反应元件。

一、仪器分析法

20 世纪 90 年代美国环境保护局公布的检测二噁英的标准方法 US EPA Method 1613 和 1618 界定了用高分辨气相色谱 - 高分辨质谱（HRGC-HRMS）联机检测二噁英，该方法也被公认为是鉴定和定量二噁英的“黄金标准”方法。但是需要指出的是，该方法的建立也有一个很漫长的历史过程。在前面提到二噁英其实是一大类具有类似毒理学效应的化合物的总称，在这里面有几百种不同类型的化合物。但是研究者为了研究方便以二噁英的原型物质——TCDD 作为二噁英类化合物的代表，所以可以检测 TCDD 为例来简述仪器分析法的发展历程。

在分析环境样品中 TCDD 含量之前，人们面临如下几个问题：如何采集样品；如何将 TCDD 从样品中分离并转移到合适的有机溶剂；如何将 TCDD 与其他的

有机物分开；如何将 TCDD 与其他无毒的二噁英类似物分离；最后如何用质谱分析 TCDD。

简单地说，整个二噁英仪器分析甚至说生物分析的发展其实就是围绕这几个问题展开的。目前仪器分析方法的理论基础其实在 20 世纪 70 年代中期就已经确定，1973 年，人们首次用高分辨质谱（HRMS）在几种样品中检测到了 TCDD，其检测灵敏度（Minimal Detection Limit, MDL）达到了 1.0 ppt (10^{-12})。从此以后，仪器分析的方法在此基础上进行了大量的改进，提高了检测灵敏度和准确性。现将仪器分析法过去近 40 年来的发展做一个简单的总结^[23]：

20 世纪 70 年代至 80 年代，在这个阶段人们首要的任务是如何准确地测定 TCDD。在这期间发表的大部分文章是测量二噁英和呋喃（4 氯到 8 氯的）同类物的总浓度，或者是 2,3,7,8-TCDD 的浓度。但并没有建立可靠的标准方法体系，而且全世界也只有少数实验室可以分析。

20 世纪 80 年代至 90 年代，石英毛细管气相质谱（GC）柱被应用到二噁英分析中来；通过同位素稀释法建立了 GC-MS 的质控体系；气相色谱 - 高分辨质谱联用（GC-HRMS）也被认可为检测二噁英的“黄金标准”方法；以 2,3,7,8-TCDD 为标准引入“毒性当量因子”（toxic equivalent factor, TEF）概念，使得人们有了衡量所有的二噁英/呋喃的标准；此时全世界大概有 10~20 个实验室在开展这类工作。

20 世纪 90 年代至今，人们用 ^{13}C 标记了所有的 2,3,7,8-二噁英/呋喃，同时建立了一系列可靠的分析方法；人们可以准确地分析几乎所有样品中的 2,3,7,8-二噁英类的同类物，其检测灵敏度达到了 ppt (10^{-6}) 到 ppq (10^{-15}) 级；大部分管理部门接受并采用了“毒性当量”（Toxic Equivalent Quantity, TEQ）这个概念；共平面多氯联苯开始记入 TEQ 计算中。

目前的仪器分析法已经满足了大部分的检测要求，未来仪器分析法的发展方向还是进一步提供灵敏度以检测极低浓度的二噁英，但是这是极其困难而且极其昂贵的。目前人们正在探索用多维正交、二维气相色谱（GC×GC, LC×GC）和串联质谱（MS/MS）等方法进一步提高仪器分析法的灵敏度。

二、生物分析法

虽然仪器分析法具有灵敏度高、结果准确等优点，但是仪器设备费用、相关分析检测试剂费用及检测费用相当高昂，实验室条件要求非常严格，样品前处理过程复杂，检测周期长，使其在环境、食品和卫生等领域开展的二噁英类化

合物污染状况调查中的应用受到一定限制。近年来,随着生物技术的快速发展,美国、欧盟等国家以现代分子生物学的研究成果为基础,研究开发了生物检测技术(Bioassay)测定二噁英类化合物的总毒性当量,从而满足了大批量的环境、食品和生物样品的检测要求,不仅有效地降低了分析成本,而且还大大缩短了检测周期。

目前人们已经发展了许多种二噁英的生物检测方法,如果从所使用的检测体系来分类,则大致可以分为体内法和体外法。体内法是利用活体动物,比如说小鼠、斑马鱼等,通过检测其生物学标记物表达的变化或其生理指标的变化来检测二噁英类化合物,这种方法虽然费时费力费钱,但是任何化合物毒性的最后确定都需要体内法。体外法简单地讲就是脱离动物活体,以细胞或者抗体等简单的手段检测二噁英的含量,狭义地讲二噁英的生物分析方法就是指的体外法。在体外法中,又可以根据其基本原理分为两大类:一类是基于二噁英毒性信号通路的,包括 EROD、CALUX 等;一类是基于酶联免疫反应的,包括 ELISA、DELFI 等。下面我们将详细介绍这些方法。

三、二噁英生物分析的历史发展过程

二噁英的生物分析方法的发展其实是与人类对二噁英认识的深入以及现代分子生物学的发展同步的,目前已经发展了很多种检测方法。但是如果简单地梳理一下整个二噁英生物检测方法的发展历史,我们就会发现其实二噁英的生物检测方法可以简单地划分为两条发展路线。

(1) 由毒理学效应及其分子机制发展的路线

虽然早在 20 世纪 20 年代人们就发现了 PCDD,但是直到 1942—1953 年发生在孟山都、巴斯夫等相关化工厂的几起二噁英类似物的公众安全事件,二噁英才开始引起人们的注意。最早的时候,人们主要通过实验动物,如大鼠、鸡等来研究二噁英对实验动物的影响,主要是一些生理指标的检查,而这些指标只适合对二噁英毒性定性的分析而不适合定量。人们在研究二噁英或者其他化合物对各种动物或者人的毒性中,发现二噁英可以影响许多酶的活性,尤其是肝细胞微粒体中的一些 P450 家族的单加氧酶,如芳香烃羟化酶(Aryl Hydrocarbon Hydroxylase, AHH)、乙氧基异吩噻唑酮 O-脱乙基酶(Ethoxy Resorufin O-Deethylase, EROD)和戊氧基异吩噻唑 O-脱乙基酶(Pentoxy Resorufin O-Deethylase, FROD)等^[24, 25]。即使到现在,在试验动物体内检测这些酶的表达水平还是检测二噁英暴露的重要

方法。虽然体内法是所谓的终极解决方法,但是存在试验周期长、代价昂贵等缺陷,于是人们探索是否可以用体外培养的细胞系来代替体内法。1968年,人们首次用体外培养的细胞通过标定 AHH 酶活性而建立了体外检测二噁英类化合物的方法^[26]。再后来人们普遍采用体外的 EROD 方法作为体外检测二噁英的方法,并初步被一些管理部门所使用。

在 EROD 反应普遍被认可用来检测二噁英后,人们就开始探索究竟是什么基因编码了 EROD 反应的酶,这种酶的表达究竟是怎么调控的以及二噁英究竟通过什么机制来调控了这种酶的表达。首先人们通过同位素标记的 TCDD 确定 TCDD 在细胞内的受体为 AhR^[27, 28];然后人们通过分子生物学的手段确定 TCDD 的确可以诱导 P450 1A1 (CYP1A1) 基因 mRNA 的表达^[29],而现在认为主要是由 CYP1A1 所表达的蛋白介导了 EROD 反应,而 CYP1A1 所表达的蛋白就是前面所说的 AHH。1985年,人们通过缺失突变的方法在小鼠 CYP1A1 基因上游找到了所谓的二噁英反应元件(DRE)序列,也就是说,二噁英类化合物活化的 AhR 是通过该序列调控 CYP1A1 表达的^[30]。最后在此基础上,人们构建二噁英的报告基因质粒并构建一系列的细胞株,并最终形成了 CALUX 方法和其他相关的方法^[31-39]。

(2) 基于二噁英抗体检测技术的发展

通过抗体识别检测二噁英并不需要人们对二噁英对生物体本身毒理学效应及其分子机制进行基础研究。理论上来说,只要人们获得了某种化合物的抗体,即使不知道其内在的对生物的影响及其分子机制,一样可以检测到该种化合物,这对于二噁英是一样的。但是在获得抗二噁英的抗体之前有两个问题是必须要解决的。第一,怎么制备抗原;第二,怎么提高特异性。因为二噁英跟很多其他的化合物一样,它是一种半抗原,也就是说它本身并不能激活免疫系统产生抗体,但是如果将它偶联在某种载体蛋白上它就可以形成全抗原,就可以免疫动物并获得抗二噁英的抗体。

因为二噁英本身并不能与载体蛋白形成共价键从而形成全抗原,所以必须对二噁英进行有效的修饰以便其可以共价偶联到载体蛋白上。1977年,人们人工合成了两种带有自由氨基的二噁英衍生物,因为它有一个氨基所以就可以与载体蛋白的自由羧基发生羧合反应从而形成共价键^[40]。1979年,人们利用这种方法获得的抗原免疫兔子并首次获得了兔抗二噁英的多克隆抗体^[41]。

但是多克隆抗体有着特异性差等自身缺陷,为了提高其特异性必须要获得抗二噁英的单克隆抗体。1975年,英国科学家 Milstein 和 Kohler 发明了单克隆抗体