

【综述】

生物标记物检测在海洋环境污染监测中的应用

刘日先,王新红,洪华生,林建清,王克坚

(厦门大学 海洋环境科学教育部重点实验室,环境科学研究中心,福建 厦门 361005)

摘要:总结了国内外近十几年可应用于海洋环境污染监测常见的生物标记物及其主要的检测方法,对各自的应用特点进行了阐述,并展望了其应用的前景。其中对 DNA 损伤的检测作了较为详细的介绍。

关键词:海洋环境监测;生物标记物;DNA 损伤

中图分类号: X830.2;Q523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2003)03-0068-06

Application of biomarkers in marine environment monitoring

LIU Ri-xian, WANG Xin-hong, HONG Hua-sheng, LIN Jian-qing, WANG Ke-jian

(Key Laboratory for Marine Environmental Science of Ministry of Education, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: This paper sums up the recent - year application of biomarkers in marine environment motoring and the main detection methods of them. The features and the future prospects of these biomarkers are also discussed. The introduction of the DNA damage is the most detailed part in this paper.

Key words: marine enviroment monitoring; biomarker; DNA damage

随着海洋的不断开发与利用,大量污染物进入海洋,因此,监测这些污染物,并对其进行风险评估和管理显得十分重要。而风险评估不能仅仅依靠分析海洋环境中的污染物,更重要的是分析这些污染物对生物体造成的毒性作用。近十几年来,分子和细胞水平上的生物标记物已经在环境评价中作为污染物暴露和毒性效应的早期预警工具被广泛使用。本文将介绍这些生物标记物的基本特征并叙述各自的应用特点。

1 DNA 损伤的检测

海洋环境中的一些化学物经生物体代谢活化后,将会导致 DNA 分子的各种损伤,包

括 DNA 链的断裂、交联(DNA 链内、链间或 DNA 和蛋白质之间发生交联)、DNA 加合物的形成。因此各种类型的 DNA 损伤可以作为暴露的生物标记物。

1.1 DNA 加合物的检测

DNA 加合物,是化学致癌物及其代谢产物与 DNA 分子碱基共价结合所形成的损伤。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 加合物的检测可以作为海洋环境监测的一个良好的标记物。DNA 加合物的检测有如下优点:1)与肿瘤和突变的形成有很好的相关性;2)反应灵敏;3)材料经济。DNA 加合物的测定方法有:³²P-后标记法;特定加合

收稿日期:2002-07-26,修改稿收到日期:2002-09-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(A20077023,C40106012)

作者简介:刘日先(1977-),男,福建厦门人,硕士生,从事海洋环境科学和环境医学的研究。

物的单克隆和多克隆抗体的免疫测定;GC/MS;HPLC/荧光分光光度法等。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^[1~3],最适合于检测大块的和疏水性的加合物,例如多环芳烃或者芳香族杂环所形成的加合物;但测定体积较小的加合物,例如烷化剂产生的加合物,则难以得到满意的效果。

1.2 DNA 链断裂的检测

在细胞里,DNA 链的断裂是一种常见的现象。在正常环境中,由于热能作用 DNA 会发生碱基的缺失,这种缺失能迅速得到修复,但当这些正在修复的 DNA 分子受到环境中基因毒性的化学物质或物理因素的损伤时,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。

1.2.1 碱性解旋法检测 DNA 链断裂

碱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,该方法经过不断改进,已广泛用于分析海星、蝶、蚌以及贻贝、牡蛎等的 DNA 完整性^[4]。此检测方法简单可行,而且能反映多种遗传毒性物质对 DNA 的损伤,对于评价海洋环境质量有较好的应用价值。

1.2.2 单细胞凝胶电泳技术(SCGE 或 SCG)检测 DNA 链断裂

SCG 技术是在碱处理并在碱性条件下电泳,DNA 解螺旋且碱变性为单链,若细胞 DNA 受损有遇碱不定位点和单链断裂则会出现分子量较小的 DNA 片段。在电场中,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,故称 SCG 为彗星实验。

自从 Singh 等^[5]于 1988 对该方法进行了改进后,SCG 就以其简便、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,取得了不同程度的效果^[6~8]。结果显示该方法用于检

测目标物质在海洋环境的排放是很有潜力的。

1.3 微核测定法检测 DNA 损伤

微核是染色体断裂和纺锤体受损伤的产物,出现在细胞核附近的含 DNA 小体。Brunetti 等^[9]在 1988 年首次将该实验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,如 Paola 等^[10]。微核测定法操作简便,所需设备也较为简单。它可以用于指示海洋环境污染的细胞遗传损伤(主要是染色体断裂和纺锤体损伤)。

2 金属硫因蛋白(MT)的生物标记法

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,它的一个重要特点是可在转录水平上被环境中的金属所诱导,而且这种诱导与环境中的 B 族金属浓度有相关性,如:Ag、Cd、Cu、Hg、Zn,贻贝体内的 MT 已用来监测海洋环境中的金属污染^[11],但使用 MT 来估计环境污染中的 Pb、Zn 的暴露是否可行依然处于探讨中^[12]。

应用特点:用 MT 作为生物标记物可以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 MT 可以视为 Cd 对血液系统效应的早期指标^[13],但目前 MT 的作为生物标记物仍存在一些问题:(1)如何控制个体之间基础 MT 的表达差异。(2)测定 MT 的操作不太简便。(3)重现性不够理想。(4)除了金属,尚有许多内外因子都可以诱导金属硫蛋白,对它的机理尚不清楚。

3 乙酰胆碱酯酶(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,因此它在血液或组织里的活性已经成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。一些研究已经成功地将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^[14,15]。现在确认,20%以上的 AChE 抑制证明暴露作用的存在,50%以上的 AChE

抑制表明对生物的生存有危害,这对于非急性毒性检测极其有用。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。

应用特点:(1)在低剂量接触水平,AChE 没有明显的抑制,因而不能反映低剂量接触水平。(2)除了这些杀虫药,一些其他的污染物包括 Hg 也能引起胆碱酯酶的抑制。(3)由于种属和各组织存在内在的差异,这就更要求在实验室或现场的评估中采样和样品处理需要相同的条件和时间下进行。(4)有实验表明^[16],水温的升高能增加贻贝对杀虫药的敏感性。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胆碱酯酶是自然还是杀虫药介导的改变,从而能使胆碱酯酶在生物监测中发挥更大的作用。

4 细胞色素 P450 系统的检测

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,其中细胞色素 P4501A (CYP1A) 亚基因族的底物以环境致癌物为主,如:多氯联苯和多环芳烃;7-乙氧基异吩唑酮-脱乙基酶 (EROD) 的活性或 CYP1A 蛋白水平与环境中 CYP1A 诱导物如 PAH 或多氯联苯的水平密切相关。在近几年,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^[17~19],发挥着越来越重要的作用。

应用特点:(1)在自然环境中很难期望总能得到上述致癌物浓度与 CYP1A 蛋白水平的剂量-反应线性关系,因为在这些环境中,CYP1A 的诱导物和抑制物是同时存在并同时起作用的^[20]。(2)其他的因素如温度、季节变化和性激素也会影响到 CYP1A 系统在鱼体内的反应^[21]。(3)用细胞色素 P450 系统诱导这种分子水平上的反应可以给出污染水平的综合效应,包括生物的可利用性,生物物质

与污染物的相互作用,毒物之间的相互作用,机体的防御反应等。这对于反映海洋环境质量具有重要意义。(4)与一般参数不同,体内 P450 系统增高不仅证明污染的存在。而且还表明体内解毒机制的破坏,从而确切地指出对机体的早期影响的存在。(5)P450 系统活性偏高还反映出化学物的代谢增加并有可能活化了致癌物质,这些结果将对海洋环境中污染物的早期影响的判断提供重要信息。

5 抗氧化防御系统的生物标记法

抗氧化防御系统是动物体内重要的活性氧质 (ROI) 清除系统,主要包括酶性清除剂抗氧化酶以及小分子抗氧化剂。超氧化物歧化酶 (SOD) 是生物体内唯一一种以自由基为底物的酶,其作用底物为 $O_2^{\cdot -}$,可催化 $O_2^{\cdot -}$ 发生歧化反应生成 H_2O_2 ,是动物体内重要的抗氧化酶。还原型谷胱甘肽 (GSH) 是动物体内重要的水溶性抗氧化剂,它既可作为谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 和谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 的底物,通过这两种酶起解毒作用,又可直接与动物体内的亲电化合物结合起解毒作用,因此,在动物体内的解毒代谢中起着极其重要的作用。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的胁迫而发生改变,因而 SOD 活性和 GSH 含量的变化可间接反映环境中氧化污染的存在,可作为环境污染胁迫的指标。

应用特点:一些毒理实验研究虽然可以得到环境胁迫后抗氧化系统中抗氧化酶的显著改变,但它们的改变却很难得到良好的剂量-反应线性关系^[22]。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,国外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。

6 与组织损伤相关的非特异性酶的检测

在海洋生物中,许多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(GPT)在生物体蛋白质代谢中起着重要作用,当海洋中的Cd、Cu、Pb、Hg等金属浓度增加时,可以引起海洋动物体内GPT的变化,例如在菲律宾蛤仔腮里可检出降低。因此GPT可做为一般的环境压力生物标记物。ATPase是生物体内重要的酶,存在于所有细胞中,广泛分布于细胞膜上。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、乌贼以及鱼的多种组织,如鳃、肾、脑的多种ATPase对不同污染物均有反应,都有一定的剂量/效应关系的存在。Stagg等人实验显示了 Na^+ , K^+ -ATP酶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^[23,24]。

应用特点:(1)对于Cd和Pb,软体组织和腮的GPT可以作为标记物,但对于Cu,只有腮可以用作标记物^[25]。(2)一些研究表明,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^[26,27]。(3)这些酶的应用也需要注意其季节和自然的变化^[28,29],以区别于污染引起的变化。(4)虽然毒物对ATPase作用的研究已进行了三十年,由于多种类型的水污染物对ATPase有显著的影响,因此,从分子生态毒理学的角度来看,ATPase至今仍是一项评价污染压力的参数。

7 溶酶体和过氧化物酶体的检测

当生物体内的污染累积到一定程度,细胞会产生相应的代谢反应和毒性反应,此时细胞内的反应就可以作为环境监测中暴露和效应的生物标记物。溶酶体的变化和过氧化物酶体增生就是此类细胞生物标记物的例子。

溶酶体膜的不稳定可被用作环境胁迫的

标记物,而对溶酶体体积的简单计算却是一般环境胁迫综合作用的一个良好的指标^[30]。当不同的污染因素包括有机的、金属的污染物和一些自然环境的改变(温度、盐度、食物的改变等)出现时,溶酶体就会发生变化。而估计溶酶体的大小可使用自动图象分析系统^[31],它已经成为评价环境污染对水生物影响的一种敏感、精确、快速的技术。在奥斯陆和巴黎共同开发的联合评价监测项目中它也被推荐用作生物效应的评估^[32]指标。此外,过氧化物酶体增生也已作为有机污染物如多环芳烃污染的特殊标记物^[33,30],其主要依靠自动图象分析系统进行分析。

应用特点:(1)在一些研究中,正常溶酶体和过氧化物酶体有明显底季节变化^[34~37]。(2)研究表明溶酶体膜的不稳定性作为生物标记物在指示海洋环境中的化学物污染中具有灵敏度高的特点,但却不具有特异性^[11]。

8 性畸变(Imposex)的检测

所谓的性畸变就是一种性别的生物上出现了另一种性别的特征,是由于环境激素的作用而导致生物的变化。在海洋环境中普遍存在有机锡污染,三丁基锡(TBT)是环境中一种很强的雄性激素性质的组分,在世界范围内,多于128种海洋腹足动物发现了雌性动物出现雄性特征^[38],而这些动物都对TBT污染具有敏感性。在一些严重事件中,性畸变可以导致不孕和/或早熟雌性生物的死亡。在一些研究中,荔枝螺的性畸变就被逐渐发展成为监测TBT的标记物^[39]。另外在雄性鱼中卵黄蛋白原的检测也是一种监测化学物质对内分泌干扰的暴露生物标记物^[40]。

使用性畸变作为生物标记物应注意以下几点:(1)性畸变存在的同时还有可能受到动物内分泌系统的干扰。(2)Evans等人做过实验结果:12%未接触过TBT的雌性荔枝螺会产生性畸变。他们分析这可能暗示着一些自然因素也会诱导性畸变^[39]。(3)要

注意种类的选择,并不是所有种类都适合把性畸变作为生物标记物。Nicholson 等人曾经证明:峨螺的性畸变与有机锡污染不相关,虽然它们的组织里含有高浓度的有机锡,但它们并不发生性畸变^[41]。

在环保观念日益增强的今天,海洋环境的评价始终都将是一个热点问题,而生物标记物研究是它的核心。上述生物标记物检测方法都是监测海洋环境污染较为常用的指标,各有优点和不足,只有对它们作进一步深入的研究,完善优点,弥补缺点,根据各自地区的实际情况和研究实力,把它们联合应用,才能最大限度地发挥每一种方法的作用,为海洋环境评价和污染物的风险评估提供有力的支持,并为海洋环境保护作出贡献,造福人类。

参考文献:

- [1] SHUGART L R. DNA damage as a biomarker of exposure[J]. *Ecotoxicology*, 2000, 9:329-340.
- [2] CANOVA S, DEGAN P, PETERS L D, *et al.* Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A immunopositive proteins in mussels exposed to waterborn benzo(a)pyrene[J]. *Mutat Res*, 1998, 399(1):17-30.
- [3] HARVEY J S, LYONS B P, WALDOCK M, *et al.* The application of the P32-postlabelling assay to aquatic biomonitoring[J]. *Mutat Res*, 1997, 378(1-2):77-88.
- [4] 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 Science and Tech*, 1996, 34(7-8):157-162.
- [5] NARENDRA P S, MICHAEL T M, RAYMORD 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.
- [6] BELPAEME K, DELBEKE K, ZHU L, *et al.* Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta* Farion) [J]. *Mutagenesis*, 1996, 11(5):485-492.
- [7] NACCI D E, CA YULA 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.
- [8] 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: Plecypoda) [J]. *Mutat Res*, 1998, 399:87-95.
- [9] 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.
- [10] VENIER P, MARON S, CANOVA S. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo(a)pyrene[J]. *Mutat Res*, 1997, 390(1-2):33-44.
- [11] 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]. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(12):1373-1378.
- [12] RASPOR B, PAVICIC J. Induction of metallothionein-like proteins in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* after a chronic exposure to the mixture of trace metals[J]. *Chem Spec Bioavail*, 1991, 3:39-46.
- [13] 卢坚. 金属硫蛋白在铜接触评价中的应用[J]. *劳动医学*, 1998, 15(2):113-115.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] ESCARTYN E, PORTE C. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1997, 16:2090-2095.
- [17] 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.
- [18] ESCARTYN E. Utilitzacio de biomarcadors per a la vigilancia dela contaminacio ambiental del Mediterrani Nord - Occiden - tal[D]. Barcelona: University of Barcelona, 1999. 269.
- [19] VIGANO L, ARILO A, FALUGI C, *et al.* Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediment of the Adriatic Sea[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(10):887-894.
- [20] PLUTA H J. Investigations on biotransformation(mixed

- function oxygenase activities) in fish liver[A]. Fish ecotoxicology and ecophysiology [C]. Weinheim: VCH, 1993. 13-33.
- [21] 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.
- [22] 冯涛, 郑微云, 余群, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统影响的初步研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(5): 28-30.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 郑永华, 蒲富永. 汞对鲤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.
- [27] 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.
- [28] BLASCO J , PUPPO J , SARASQUETE M C. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Mar Biol, 1993, 115: 113-118.
- [29] Sole M , Porte C , Albaiges J. Seasonal variation in the mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Environ Toxicol Chem, 1995, 14: 157-164.
- [30] CAJARAVILLE M P , ROBLEDO Y , ETXEBERRIA M , *et al.* Cell biology in environmental toxicology[M]. Bilbo: University of the Basque Country Press Service, 1995. 29-55.
- [31] CAJARAVILLE M P , MARIGOMEZ J A , ANGULO E. Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1991, 21: 395-400.
- [32] STAGG R M. Quality assurance and biological effects measurement[J]. Quasimeme, 1998, 5: 17-18.
- [33] CAJARAVILLE M P , VOLKL A , FAHIMI H D. Peroxisomes in digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. biochemical, ultrastructural and immunocytochemical characterization[J]. Eur J Cell Biol, 1992b, 59: 255-264.
- [34] ETXEBERRIA M , CAJARAVILLE M P , MARIGOMEZ I. Changes in digestive cell lysosomal structure in mussels as biomarkers of environmental stress in the Urdaibai estuary Biscay Coast, Iberian Peninsula[J]. Mar Pollut Bull, 1995, 30: 599-603.
- [35] MARIGOMEZ I , ORBEA A , OLABARRIETA I , *et al.* Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel - watch programmes [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113C: 291-297.
- [36] CAJARAVILLE M P , ORBEA A , MARIGOMEZ I , *et al.* Peroxisome proliferation in the digestive epithelium of mussels exposed to the water accommodated fraction of three oils[J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 117C(3): 233-242.
- [37] CANCIO I , IBABE A , CAJARAVILLE M P. Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content[J]. Comp Biochem Physiol, 1999, 123c: 135-144.
- [38] DE MORA S J. Tributyltin: case study of an environmental contaminant [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.
- [39] EVANS S M , NICHOLSON G J , BROWNING C , *et al.* An assessment of tributyltin contamination in the North Atlantic using imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* as biological indicator of TBT pollution[J]. Invertebrate Reproduction Development, 1998, 34: 277-287.
- [40] NILSEN B M , BERG K , ARUKWE A , *et al.* Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring[J]. Mar Environ Res, 1998, 46: 153-157.
- [41] NICHOLSON G J , EVANS S M , SMITH R. The value of imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* and the common whelk *Buccinum undatum* as indicators of TBT contamination[J]. Invertebrate Reproduction Development, 1998, 34: 289-300.