

· 研究报告 ·

环境内分泌干扰物对河川沙塘鳢的雌激素效应检测

吴鹰¹, 孟艳玲¹, 周忠良^{1,2}

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; 2. 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室, 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要: 阐述了从河川沙塘鳢 (*Odonotobutis potamophilus*) 卵巢中提取卵黄磷脂蛋白, 以及制备兔抗卵黄磷脂蛋白抗血清的过程, 介绍了用此血清建立的河川沙塘鳢血清卵黄蛋白原间接竞争 ELISA 检测方法。以卵黄磷脂蛋白为参照, 此法的最低检测质量浓度为 40 μg/L, 最佳工作范围为 160 μg/L ~ 1 280 μg/L。使用此法检测雌二醇 (E₂)、壬基酚 (NP) 对雄性河川沙塘鳢的卵黄蛋白原诱导效果时, 前者的最低有效质量浓度是 0.001 mg/kg (E₂/鱼质量), 后者的最低有效质量浓度是 50 mg/kg (NP/鱼质量)。结果表明, 200 mg/kg (NP/鱼质量) NP 可引起雄性河川沙塘鳢血清卵黄蛋白原显著倍增。在太湖东山水域进行为期 1 年的生态调查时, 发现 3、4 月份期间, 曾有 50% 和 35% 样品呈阳性。

关键词: 环境内分泌干扰物; 河川沙塘鳢; ELISA; 雌二醇; 壬基酚; 太湖

中图分类号: X835 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-2009(2006)06-0013-05

Detecting of the Estrogen Effect in Gobbid Fish (*Odonotobutis potamophilus*) in Response to Endocrine-Disrupting Contaminants

WU Ying¹, MENG Yan-ling¹, ZHOU Zhong-liang^{1,2}

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2. The Fresh Water Fishy Center of Research Institute of Aquatic Product Science of China, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: Lipovitellin extracted from the ovaries of gobbid fish (*Odonotobutis potamophilus*) is used to prepare rabbit antiserum. The method of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established to detect the serum vitellogenin. Lipovitellin was used as a comparative standard. The lowest detectable concentration was 40 μg/L and the optimal determination range is between 160 μg/L ~ 1 280 μg/L. The lowest effectual concentration for E₂ is 0.001 mg/kg (E₂/fish mass) and 50 mg/kg (NP/fish mass) for NP, values obtained through the testing of the induced effect of vitellogenin of E₂ and NP in male gobbid fish. Experimental results show, when fish are exposed to NP contaminants, the concentration of NP in their bodies reaches 200 mg/kg (NP/fish mass) and a sharp vitellogenin increase in serum is detected. During a year long ecological investigation in Dong Shan estuary of Taihu Lake, it was discovered that 50% of the samples collected in March and 35% of the samples collected in April were tested positive for NP contaminants.

Key words: Endocrine-Disrupting Contaminants (EDCs); Gobbid Fish (*Odonotobutis potamophilus*); ELISA; Estradiol; Nonylphenol; Taihu Lake

利用雄鱼、幼鱼血清卵黄蛋白原 (Vitellogenin, Vtg) 水平变化作为水环境类雌激素物质监测的生物标志物, 已经成为一种国际通行的研究方法^[1], 并且已建立了部分实验动物模型^[2-5], 经济合作与发展组织 (OECD) 也将鱼类卵黄蛋白原作为可以选择的内分泌干扰试验终点, 由于卵黄蛋白原有种

属特异性, 故在野外应用时存在本地化过程。

收稿日期: 2006-04-30; 修订日期: 2006-08-20

基金项目: 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室开放基金资助项目

作者简介: 吴鹰 (1981—), 男, 上海人, 硕士研究生, 主要从事水生生态毒理学的研究。

免疫检测方法具有特异性强、抗干扰性好的特点,但是标准蛋白获取和特异性抗体制备往往成为技术瓶颈。虽然雌鱼或被诱导的雄鱼血清中存在一定含量的卵黄蛋白原,但由于血清成分复杂,从中分离纯化标准蛋白的成本相对较高,导致相关免疫检测方法难以推广。鱼类卵黄磷脂蛋白(Lipovitellin, LV)是卵黄蛋白原的修饰产物,可从成熟鱼卵中大量获得,与卵黄蛋白原相比更易于制备,因为两者具同源性,所以可尝试用卵黄磷脂蛋白替代卵黄蛋白原作为标准蛋白制备特异性抗体。

国内针对这一生物标志物的研究多数以鲫鱼(*Carassius auratus*)^[6,7]及其他鲤科鱼类^[8]为实验动物。鲫鱼虽为我国常见种,但由于雄性鲫鱼在自然界的性比较低,第二性征不明显,给研究和监测工作增加了取样难度。河川沙塘鳢 *Odontobutis potamophilus* (Günther) 属鲈形目,塘鳢科,俗名塘鳢鱼,为淡水底栖小型野生肉食性鱼类,分布于我国长江水系中下游、钱塘江、闽江等水系。该物种处于水生生态系统食物链的较高层级,对环境中的污染物具有一定的生物富集效应,并且还有环境适应力强、第二性征显著等特点,有一定的野外研究前景。现利用河川沙塘鳢卵黄磷脂蛋白制备抗血清,建立间接竞争酶联免疫吸附检测(ELISA)法,选取雌二醇和壬基酚^[9]进行实验室暴露,并在太湖东山地区开展为期 1 年的监测工作。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

所有化学试剂均为分析纯。羊抗兔 IgG - HRP (Sigma); 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂) (Sigma); 4-壬基酚(4-nonylphenol, 4-NP) (Fluka, 74430, 含 85% 同分异构体)。电泳仪 (Bio-rad); 蛋白纯化仪 AKTA Purifier - 10 (Pharmacia Biotech); Sephacryl S - 300 High Resolution (Pharmacia Biotech); ELx800 酶标仪 (Bio-tek)。

1.2 实验动物

实验用河川沙塘鳢购自苏州东山农贸市场,雌性河川沙塘鳢活体带回实验室后取其卵巢和血清, -70℃ 保存备用。实验用雄性河川沙塘鳢均为性成熟个体,质量 42.68 g \pm 12.48 g (平均值 \pm 标准差),全长 12.89 cm \pm 1.93 cm (平均值 \pm 标准差),雄性个体购回后于实验室内用 20℃ 去氯自来水驯养。实验用雄性新西兰白兔购自中科院上海实验

动物中心。

1.3 兔抗河川沙塘鳢卵黄磷脂蛋白抗血清制备

参考李康^[6]等人制备兔抗鲫鱼卵黄磷脂蛋白抗血清的方法,利用透析和分子筛层析(Sephacryl S - 300 High Resolution, 50 mmol/L Tris - HCl pH 值为 7.5, 0.8 mL/min)从成熟鱼卵匀浆液中提取卵黄磷脂蛋白,采用背部多点注射对雄性新西兰白兔进行初次免疫。在第 28 天、42 天、56 天、70 天、77 天加强免疫,第 84 天采集血清并用双向免疫扩散方法测定效价。抗血清 -70℃ 保存备用。

1.4 电泳及 Western Blotting 印迹检测免疫血清的特异性

随机挑选若干雄性和雌性河川沙塘鳢血清以同样稀释度上样,SDS - PAGE 电泳采用恒压模式(浓缩胶 60 V,分离胶 120 V)。电泳结束后,对照胶用考马斯亮蓝染色,检测胶电并转移至醋酸纤维素膜(0.2 mA, 1 h)。转印完毕后,将醋酸纤维素膜用 10% 脱脂奶粉封阻(2 h),抗 LV 抗血清孵育(1 h),羊抗兔抗血清孵育(IgG - HRP, 1 h),3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。如有条带显示,则说明样品中存在相应抗原,如无条带显示,则说明抗血清与相关样品不发生反应。

1.5 间接竞争 ELISA 方法

1.5.1 抗血清和包被抗原最佳工作浓度筛选

用棋盘滴定法测定,并将 490 nm 波长下的吸光值在 1.0 左右的抗原抗体组合中进一步做标准曲线,以确定抗血清和包被抗原最佳工作浓度。

1.5.2 间接竞争 ELISA 方法及标准曲线制作

用棋盘滴定法确定的抗原包被的质量浓度为 2 mg/L,一抗稀释度为 1:10 000。

(1)包被:用 2 mg/L 的 LV 包被酶标板;

(2)样品处理:将抗 LV 抗血清 1:10 000 稀释后,再按 1:1 与样品或标准蛋白(0.20 μ g/L ~ 5.120 μ g/L LV 其间倍比稀释)混合,4℃ 孵育过夜;

(3)封阻:弃去包被液,用吐温 - 磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤 3 次,加入 5% 脱脂奶粉 37℃ 封阻 2 h(每孔 200 μ L);

(4)抗原抗体反应:弃去封阻液,用 PBST 洗涤 3 次。将预混好的抗血清、标准蛋白或样品液的混合物加入板孔(每孔 100 μ L),37℃ 孵育 2 h;

(5)抗原抗体复合物与酶标抗体反应:板用 PBST 洗涤 3 次,加入一定质量浓度的羊抗兔 IgG -

HRP(每孔 100 μL), 37 °C 孵育 1 h;

(6) 显色: PBST洗板 5 次, 在各孔中加入邻苯二胺(OPD)底物显色液(每孔 100 μL), 置于室温显色 30 min;

(7) 终止反应: 每孔加入 2 mol/L 的硫酸终止液 50 μL 终止反应;

(8) 测定: 于 490 nm 波长下测定各孔的吸光值。标准曲线重复测定 5 次, 确定批间差。

1.6 E₂、NP 暴露

将实验所用 E₂ 事先溶于玉米油。第 0 天腹腔注射法暴露, 3 个 E₂ 处理组分别注射 0.001 mg/kg、0.01 mg/kg 和 0.1 mg/kg 的 E₂ (E₂/鱼质量), 阴性对照组只注射玉米油, 每尾 200 μL, 暴露期为 14 d, 其中在第 7 天重复以上注射过程。整个实验在自然光照和人工控温 (20 ± 1) °C 下进行。NP 暴露方法同 E₂, 4 个 NP 处理组分别接受质量浓度为 50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg 和 200 mg/kg (NP/鱼质量) 的 NP, NP 处理组也设阴性对照。

1.7 取样及样品的处理和分析

实验组及对照组都在注射 14 d 后取样, 收集血清后进行 ELISA 法检测, 将测定结果的 O.D 值, 通过标准曲线转换成蛋白浓度值。E₂、NP 暴露组均与该组阴性对照组比较, 如阴性对照组未及检测下限, 则以最低有效浓度暴露组为对照, 求其余浓度组的相对变化率。

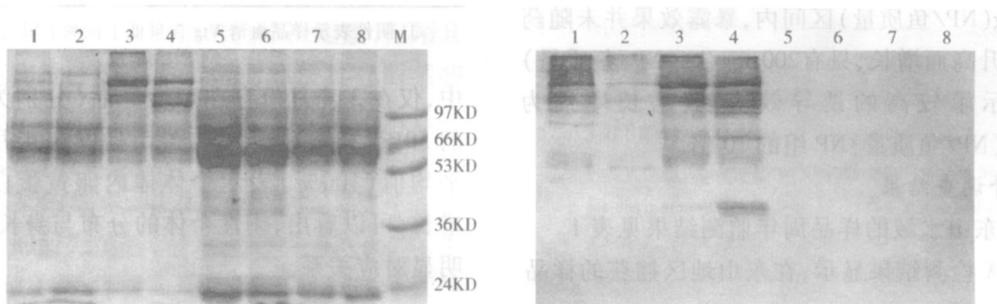
1.8 野外调查

在江苏太湖东山水域 (N31°04'50.3", E120°21'34.0") 设立生态调查点, 委托当地渔民代为捕捞, 于 2005 年 1 月至 12 月, 每月取样 1 次。选雄性样品活体带回实验室后, 取血清进行 ELISA 检测。

2 结果

2.1 抗 LV 抗血清效价及特异性分析

经双向免疫扩散测定抗 LV 抗血清效价为 1:32。河川沙塘鳢成鱼血清的 SDS-PAGE 电泳和用抗 LV 抗血清进行 Western Blotting 印迹的结果见图 1。



1, 2, 3, 4——雌鱼血清; 5, 6, 7, 8——雄鱼血清; M——低分子量电泳标准蛋白

图 1 河川沙塘鳢血清 10% SDS-PAGE 电泳及 Western Blotting 印迹结果

由图 1 可见, 抗 LV 抗血清能检测到雌鱼血清中的特异性蛋白, 并与雄鱼血清无交叉反应, 说明用该方法制备的抗 LV 抗血清与血清中 Vtg 的各亚基有较好的特异性结合, 可用于 Vtg 检测。

2.2 间接竞争 ELISA 法标准曲线绘制

间接竞争 ELISA 法标准曲线见图 2。

横坐标为标准蛋白浓度的常用对数值, 纵坐标为吸光值 (O.D)。多次实验显示, 该法的有效测量范围是 40 μg/L ~ 2 560 μg/L, 其中 160 μg/L ~ 1 280 μg/L 区间始终保持 R² > 0.95, 5 次的批间误差为 6.9%。

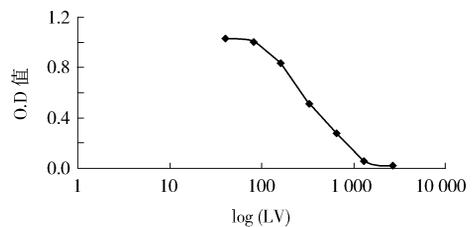


图 2 间接竞争 ELISA 法标准曲线

2.3 NP、E₂ 暴露结果

NP 暴露组与 E₂ 暴露组样品的间接竞争 ELISA 检测结果见图 3。

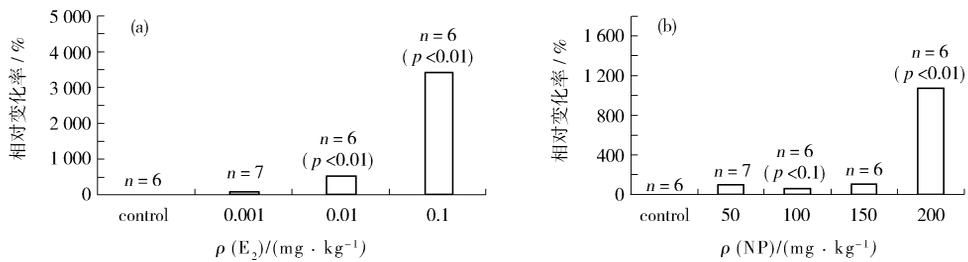


图 3 E₂ 暴露组 (a) 与 NP 暴露组 (b) 样品的间接竞争 ELISA 检测结果

对照组可检测到的血清卵黄蛋白原均未见升高。实验结果显示, 0.001 mg/kg (E₂/鱼质量) E₂、50 mg/kg (NP/鱼质量) NP 均能有效地引起雄性河川沙塘鳢体内卵黄蛋白原的表达, 因为所用方法并非直接测得卵黄蛋白原浓度。因此, 在数据处理时, 可以最低浓度组的平均值为对照, 求出其他浓度组的相对变化率。0.01 mg/kg (E₂/鱼质量) E₂ 组的增长幅度为 0.001 mg/kg (E₂/鱼质量) E₂ 组的 5 倍左右, 0.1 mg/kg (E₂/鱼质量) E₂ 组的增长幅度为 0.001 mg/kg (E₂/鱼质量) E₂ 组的 34 倍左右。各 NP 暴露组均有阳性检测结果, 但在 50 mg/kg ~ 150 mg/kg (NP/鱼质量) 区间内, 暴露效果并未随药品浓度的升高而增长, 只有 200 mg/kg (NP/鱼质量) NP 组显示了较高的诱导效应, 其增长率约为 50 mg/kg (NP/鱼质量) NP 组的 10 倍。

2.4 野外调查结果

太湖东山水域的样品周年监测结果见表 1。

ELISA 检测结果显示, 在东山地区捕获的样品

表 1 用 ELISA 法检测样品的周年监测结果

| 采样时间 t/月 | 样品数 条 | 阴性 条 | 阳性 条 |
|----------|-------|------|------|
| 1 | 14 | 14 | — |
| 2 | 12 | 12 | — |
| 3 | 12 | 6 | 6 |
| 4 | 20 | 13 | 7 |
| 5 | 22 | 22 | — |
| 6 | 24 | 24 | — |
| 7 | 15 | 15 | — |
| 8 | 22 | 22 | — |
| 9 | 35 | 35 | — |
| 10 | 9 | 9 | — |
| 11 | 14 | 14 | — |
| 12 | 18 | 18 | — |

阴性表示样品血清 V_{tg} 含量低于检测下限。

中, 仅在 3、4 月份存在阳性样品 (分别为总样品数的 50%、35%)。图 4、图 5 是以 3、4 月份的样品平均值 (100%) 表示个体体内卵黄蛋白原的相对增长, 可以看出, 阳性个体的分布与身长、质量并无明显对应关系。

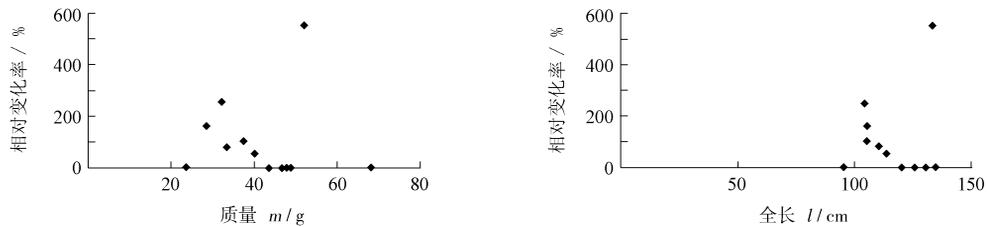


图 4 3 月采样质量 - 血清 V_{tg} 含量、全长 - 血清 V_{tg} 含量关系

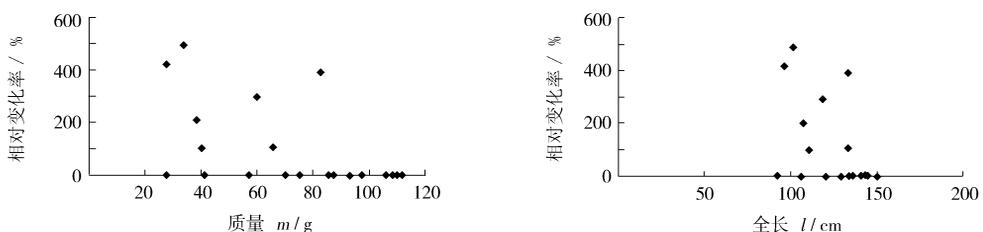


图 5 4 月采样质量 - 血清 V_{tg} 含量、全长 - 血清 V_{tg} 含量关系

3 讨论

实验证明,利用河川沙塘鳢卵黄脂蛋白制备的多克隆抗体与卵黄蛋白原具有较高的特异性亲和力,与雄鱼血清中的杂蛋白成分无明显交叉反应,用此抗血清建立的免疫检测方法可用于检测样品血清中卵黄蛋白原。Henrik Holbech^[4]等人在斑马鱼 (*Danio rerio*) 身上也建立了类似的检测方法,并指出使用卵黄蛋白原或卵黄脂蛋白作为标准蛋白在检测时结果相近。尽管如此,此法所得仍为间接数据。因此,较适合于定性检测和衡量相对效应,如需要样品血清卵黄蛋白原精确质量,则需制备抗卵黄蛋白原抗体。

该文建立的间接竞争 ELISA 法与在鳊 (*Pleurocetes vetulus*, 10 $\mu\text{g/L}$ ~ 450 $\mu\text{g/L}$)^[10]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, 20 $\mu\text{g/L}$ ~ 320 $\mu\text{g/L}$)^[11]、鳙 (*Salmo trutta*, 25 $\mu\text{g/L}$ ~ 500 $\mu\text{g/L}$)^[2]、太阳鱼 (*Lepomis macrochirus*, 29 $\mu\text{g/L}$ ~ 2 700 $\mu\text{g/L}$)^[5]、鲫鱼 (*Carassius auratus*, 390 $\mu\text{g/L}$ ~ 2 500 $\mu\text{g/L}$)^[6] 等多种鱼类身上的同类方法相比,敏感性一般,可能与卵黄蛋白原在加工成为卵黄脂蛋白的过程中需要被切割及修饰有关,故此卵黄脂蛋白与卵黄蛋白原虽然具有大量相似的抗原决定簇,但用其制备的多克隆抗体缺少卵黄蛋白原所具有的某些特有的抗原决定簇,如果能制备获得抗卵黄蛋白原的多克隆抗体,估计可以进一步提高此方法的敏感性。参考该文的结果,以及 Hashimoto S^[3] 等人对东京湾鲈类的研究结果 (25 $\mu\text{g/L}$ ~ 2 200 $\mu\text{g/L}$, 平均 204 ng/mL), 胡建英^[6] 等人对天津地区野生鲫鱼的结果 (284 mg/L ~ 5 971 mg/L), 该方法的检测下限已经能够满足一般实验室和野外监测要求,故该方法具有一定的实用价值。

E₂ 暴露实验组结果显示,河川沙塘鳢对雌激素有显著的阳性反应,故河川沙塘鳢卵黄蛋白原能作为有效的环境内分泌干扰物检测标志物。NP 暴露实验中出现的非线性结果说明,壬基酚作为一种环境内分泌干扰物,其效应机制与雌激素在生理活动中的作用途径可能存在差异,故在野外监测工作时,还应结合其他环境数据予以考虑,因为可能无法简单对应单一环境内分泌干扰物的有效浓度。

太湖是我国“十五”计划中重点监测“三河三湖”之一,其水质状况直接影响周边居民及下游众多的大、中型城市的用水安全。在我国目前的环境监测标准中环境激素虽未单独立项,但该研究在东

山地区的野外监测中,已经在 3、4 月份检测到阳性样品,虽然不能确定具体的污染类型,这一结果已显示该地区曾经存在环境雌激素的污染。东山区的水产养殖业较为发达,不排除周围部分养殖户曾使用含激素的饲料,这些饲料残渣随水体交换进入自然水体,对误食的鱼类产生了影响。

4 结论

(1) 环境中的雌激素类内分泌干扰物对雄性河川沙塘鳢有明确的效应,其血清卵黄蛋白原含量变化可以作为生物标志物进行野外监测。

(2) 以兔抗卵黄脂蛋白 (LV) 抗血清为抗体建立的间接竞争 ELISA 可用于检测河川沙塘鳢血清卵黄蛋白原 (Vtg) 含量变化。该方法具有较好的特异性,可测的最低质量浓度为 40 $\mu\text{g/L}$,最佳工作范围为 160 $\mu\text{g/L}$ ~ 1 280 $\mu\text{g/L}$ 。

(3) 野外调查显示,太湖东山区部分野生河川沙塘鳢曾受到环境雌激素影响,但这种影响不具普遍性、长期性。

【参考文献】

- [1] HUTCHINSON T H, PICKFORD D B. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment [J]. *Toxicology*, 2002, 181 - 182: 383 - 387.
- [2] SHERRY J, GAMBLE A, FIELDEN M, et al. An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens [J]. *The Science of the Total Environment*, 1999, 225: 13 - 31.
- [3] HASHIMOTO S, BESSHO H, HARA A, et al. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleurocetes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan [J]. *Marine Environmental Research*, 2000, 49: 37 - 53.
- [4] HOLBECH H, ANDERSEN L, PETERSEN G I, et al. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2001, 130(1): 119 - 131.
- [5] CHEEK A O, WILLIAM K V, BURSE J R, et al. Bluegill (*Lepomis macrochirus*) vitellogenin: purification and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of endocrine disruption by papermill effluent [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2004, 137: 249 - 260.
- [6] 李康,周忠良,于静,等. 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 卵黄蛋白原的 ELISA 检测 [J]. *中国环境科学*, 2003, 23(3): 276 - 280.
- [7] 胡建英,安立会,孙晓航,等. 天津野生鲫鱼卵黄蛋白原的研究 [J]. *中国环境科学*, 2003, 23(3): 281 - 284.

(下转第 40 页)

$$\text{测量下限} = 4.66 \times \frac{\sqrt{40434}}{\sqrt{14400}} = 7.81 \text{ Bq/kg}$$

⁴⁰K 的测量下限 (测量 14 400 s 的空白本底 413 道 ~ 1 020 道的峰面积为 17 921 keV):

$$\text{测量下限} = 4.66 \times \frac{\sqrt{17921}}{\sqrt{14400}} = 5.20 \text{ Bq/kg}$$

²²⁶Ra 的测量下限:

$$\text{测量下限} = 18.09 - 7.81 - 5.20 = 5.08 \text{ Bq/kg}$$

由此产生的内、外照指数的测量下限:

内照射探测下限:

$$I_{Ra} = \frac{C_{Ra}}{200} = \frac{5.08}{200} = 0.025$$

外照射探测下限:

$$I_r = \frac{C_{Ra}}{370} + \frac{C_{Th}}{260} + \frac{C_K}{4200} = \frac{5.08}{370} + \frac{7.81}{260} + \frac{5.20}{4200} =$$

0.045

3 特征峰的漂移

能谱仪对放射性物质的分析基于分析数据库基础之上,以峰址定性、峰面积定量,然后通过一系列计算,得出放射性物质的比活度。但是,能

谱仪经长期使用后,其放射性物质的特征峰峰址会发生漂移,当漂移超出可接受范围时,其测量结果会发生偏离,影响测量结果的可靠性。《规范》与 GB 6566 - 2001《建筑材料放射性核素限量》对放射性物质特征峰漂移的可接受范围没有给出明确的界定。通过对比试验,当 ²³²Th 的特征峰址漂移超过 ±2 道时,其测量结果会超出标准样品的保证值范围。同样,以标准样品对分析数据库重建前后的测量结果进行验证,结果表明,重建库的分析结果更接近真实值。由此得出,以 ²³²Th 的特征峰址为基准,其漂移不超过 ±2 道时,可以保证分析数据可靠性不低于 95% 的置信区间。

[参考文献]

- [1] 蒋云平. 水中放射性核素铯 - 90 测量不确定度的评估 [J]. 环境监测管理与技术, 2004, 16(6): 15 - 18.
- [2] 沙连茂, 卫为强, 宣义仁. 放射性环境监测中探测限附近测量数据的处理 [J]. 环境监测管理与技术, 2006, 18(1): 38 - 43.
- [3] 齐文启, 陈光, 席俊清, 等. 放射性核素污染及监测 [J]. 环境监测管理与技术, 2003, 15(4): 10 - 12.

(上接第 17 页)

- [8] 梁勇, 徐盈, 杨方星, 等. 鲤和团头鲂幼鱼卵黄蛋白原的诱导、纯化及电泳比较 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(4): 317 - 321.
- [9] SCHWABER J, MALLOW U, FERLINGH, et al. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 59: 177 - 189.
- [10] LOMAX D P, ROUBAL W T, MOORE J D, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitello-

- genin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1998, 121B: 425 - 436.
- [11] BON E, BARBEU, RODRIGUEZ J, et al. Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1997, 117B: 75 - 84.

(上接第 29 页)

3 结论

采用 FA - 孔雀绿 - 磷钼杂多酸分光光度法测定水中痕量正磷酸盐,方法快速简便,准确度和精密度均符合要求,适用于地表水、地下水、饮用水等清洁水体中正磷酸盐的测定。

[参考文献]

- [1] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社,

- 2002: 248.
- [2] 方肇伦. 流动注射分析法 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] 齐文启, 孙宗光. 流动注射分析 (FA) 及其在环境监测中的应用 [J]. 现代科学仪器, 1999(1 - 2): 24 - 35.
- [4] BENSON R L, TRUONG Y B, MCKELVIE I D, et al. Monitoring of dissolved reactive phosphorus in wastewaters by flow injection analysis, Part I. Method development and validation [J]. Wat Res, 1996, 30: 1959.
- [5] 王萍, 张新申. 反相流动注射法测定海水中磷酸盐 [J]. 环境监测管理与技术, 2006, 18(2): 26 - 28.

