

基于新型核酸适配体-荧光分子检测探针的石斑鱼虹彩病毒病快速诊断*

Establishment and Characterization of Novel Specific Aptamer-based Fluorescent Molecular Probe for Rapid Diagnosis of Grouper Iridovirus Diseases

李鹏飞^{1**}, 余庆¹, 李菲¹, 覃仙玲¹, 董德信¹, 陈宪云¹, 牙韩争¹, 柯珂¹, 秦启伟²

LI Pengfei¹, YU Qing¹, LI Fei¹, QIN Xianling², DONG Dexin¹, CHEN Xianyun¹, YA Hanzheng¹, KE Ke¹, QIN Qiwei²

(1. 广西科学院广西北部湾海洋研究中心, 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 华南农业大学海洋学院, 广东广州 510642)

(1. Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Beibu Gulf Marine Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China)

摘要:【目的】石斑鱼虹彩病毒(Singapore grouper iridovirus, SGIV)是引起华南沿海地区重要海水养殖鱼类石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)发生病毒性鱼病的主要病毒性病原之一,其引起的鱼病具有发病迅速、死亡率高、流行面广等特点,严重威胁华南地区石斑鱼养殖业的健康可持续发展。着力发展操作便捷、成本低、耗时短、准确度高的 SGIV 快速检测技术,对于及早发现、确定病原,进而有的放矢地制定治疗方案来控制病原扩散、降低损失至关重要。【方法】基于核酸适配体(Q2)就 SGIV 病的快速检测诊断技术进行系统研究,开发出一种新型的核酸适配体-荧光分子检测探针(Aptamer Q2-based fluorescent molecular probe, Q2-AFMP),并对 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的特异性、灵敏性和稳定性进行分析。【结果】Q2-AFMP 可以特异性检测 SGIV 感染,且其灵敏性和稳定性均比较高。【结论】本研究中基于核酸适配体构建的新型高特异性荧光分子探针(Q2-AFMP)有望实现对海水养殖中石斑鱼虹彩病毒病的快速诊断、实时监控和有效预防。

关键词:石斑鱼虹彩病毒 核酸适配体-荧光分子探针 高特异性和灵敏性 快速诊断

中图分类号:S917.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)01-0063-05

Abstract:【Objective】Grouper iridovirus is the major virus pathogen in South China, and causes high mortality to marine cultured grouper, which seriously threatens the healthy and sustainable development for grouper mariculture. Then effective detective techniques for the rapid diagnosis of SGIV infection are urgently needed.

【Methods】Based on the nucleotide aptamer (Q2), the rapid detection and diagnosis technology of SGIV disease was systematically studied and a new Aptamer Q2-based fluorescent molecular probe (Q2-AFMP) was developed. The specificity, sensitivity and stability of Q2-AFMP in detecting SGIV infection were analyzed. 【Results】Aptamer Q2-Based fluorescent molecular

收稿日期:2017-12-06

修回日期:2018-01-08

作者简介:李鹏飞(1988—),男,博士,硕士生导师,主要从事水生经济动物病害防控与生态养殖研究,E-mail:pfli2014@126.com.

* 国家自然科学基金项目(41706145),广西自然科学基金项目(2017GXNSFBA198176)和广西科学院基本科研业务费项目(2017YJJ23002)资助。

** 通信作者。

probe(Q2-AFMP) could detect SGIV infection with high specificity, sensitivity and stability. **【Conclusion】**The novel fluorescent molecular probe(Q2-AFMP) holds great potentials for rapid early diagnosis of pathogen SGIV infection in grouper mariculture in South China.

Key words: Singapore grouper iridovirus, Q2-AFMP, high specificity and sensitivity, rapid early diagnosis

0 引言

【研究意义】石斑鱼 (*Epinephelus tauvina*) 肉质细腻, 营养丰富, 作为我国大宗名贵海水养殖鱼类, 在活海鲜市场中的经济价值极高。随着市场需求量的不断增加, 我国石斑鱼养殖业进入快速发展期, 养殖规模不断扩大, 养殖效益持续增加, 目前国内石斑鱼养殖年产量已达 10 万吨以上, 产业直接产值超过百亿元^[1]。但是随着石斑鱼养殖业的迅猛发展, 石斑鱼的养殖密度不断加大, 导致石斑鱼病害大规模暴发, 其中石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 的危害尤为严重, 其致死率可高达 90% 以上, 重创了我国的石斑鱼养殖业^[2-4]。石斑鱼虹彩病毒作为一种高致病性的鱼类传染性病毒, 在极短时间内会导致鱼大量死亡, 因此研发可以快速、便捷检测虹彩病毒感染的诊断技术, 对于控制 SGIV 感染、降低损失至关重要^[5]。**【前人研究进展】**目前针对石斑鱼虹彩病毒发展出的检测方法, 主要包括基于病毒学、组织病理学等传统观察法, 基于分子生物学的 PCR 技术, 以及基于抗体的免疫学检测法等^[6-9]。虽然这些方法灵敏度和精确度比较高, 但是存在操作繁琐、仪器昂贵、检测耗时长, 以及试剂保存条件苛刻等种种不足, 导致仅适用于实验室条件下小规模检测, 无法满足对石斑鱼虹彩病毒病快速、准确检测诊断的要求, 因此应着力发展操作便捷、成本低、耗时短、准确度高、新型的石斑鱼虹彩病毒病快速检测诊断技术^[5]。指数富集配基系统进化 (System evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX) 技术是一种前沿的生物文库筛选技术, 该技术使用容量高达 $10^{14} \sim 10^{15}$ 的随机寡核苷酸文库, 在体外经过多轮筛选最终获得能够特异性识别靶物质的单链寡核苷酸, 即核酸适配体^[10]。核酸适配体具有易筛选获得, 成本低, 易修饰, 稳定性强, 批次间质量相同, 高特异性识别并结合靶物质等诸多优点^[11-15]。**【本研究切入点】**在先前的研究中, 我们基于细胞-指数富集配基系统进化技术 (Cell-SELEX), 以被虹彩病毒感染的石斑鱼脾细胞 (GS) 为靶标进行 Cell-SELEX 筛选, 获得了高特异性的识别 SGIV 感染的核酸适配体^[4]。**【拟解决的关键问题】**本研究基于核酸适配体 (Q2) 就石斑鱼虹彩病毒病的快速检测诊断技术进行系统研究,

开发出一种新型的核酸适配体-荧光分子检测探针 (Aptamer Q2-based fluorescent molecular probe, Q2-AFMP), 并对 Q2-AFMP 检测石斑鱼虹彩病毒感染特异性、灵敏性和稳定性进行分析研究。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验中所使用的石斑鱼虹彩病毒 (SGIV, strain A3/12/98) 来自于患病的石斑鱼 (*Epinephelus tauvina*), 由 Qin 等^[2]于 2003 年首次分离鉴定得到; 细胞培养瓶和 24 孔板、96 孔板购自康宁公司; 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购自 GIBCO 公司; 异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的核酸适配体 Q2 (FITC-Q2) 和 FITC 标记的非特异性单链核酸文库 (FITC-ssDNA Library) 由上海生工合成; 本实验使用的仪器包括多功能酶标仪、无菌操作台、倒置显微镜、尼康荧光显微镜、PCR 仪、生化培养箱、常温低速离心机、低温高速离心机、水浴锅。

1.2 方法

1.2.1 SGIV 感染细胞的准备与处理

在细胞培养瓶中培养石斑鱼脾细胞 (GS) 至基本铺满细胞培养瓶底面, 在实验组细胞中加入 SGIV, 对照组的正常 GS 不作任何处理, 继续培养 48 h, 将实验组和对照组中的细胞用磷酸缓冲盐溶液 PBS (2 mmol/L KH_2PO_4 , 10 mmol/L Na_2HPO_4 , 137 mmol/L NaCl, pH 值为 7.2) 轻轻洗涤 3~5 次后备用。

1.2.2 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的操作流程

Q2-AFMP 的操作方法参考先前的报道^[4], 并进行了优化改进。具体步骤: 将异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的核酸适配体 Q2 (FITC-Q2) 在 92℃ 高温水浴变性 10 min, 然后迅速插入到冰中复性 10 min; 将 FITC-Q2 (200 nmol/L) 与待测细胞在室温结合 30 min, 然后用磷酸缓冲盐溶液 PBS (pH 值为 7.2) 1 000 g 离心清洗 3 次, 移除上清, 将沉淀的样品重悬在 200 μL 磷酸缓冲盐溶液 PBS (pH 值为 7.2) 中, 取 30 μL 重悬的样品滴在预冷的载玻片上并用盖玻片覆盖, 然后在荧光显微镜下观察。将重悬的样品在 92℃ 高温水浴处理 5 min, 5 000 g 离心后取上清,

使用多功能酶标仪读取待测样品在 495/535 nm 处的荧光值并记录结果。每个反应均做 3 个重复。

1.2.3 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的特异性分析

将异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的核酸适配体 Q2 (FITC-Q2, 200 nmol/L) 经过 92°C 恒温水浴、冰浴处理; 实验组为 FITC-Q2 (200 nmol/L) 与 SGIV 感染的细胞孵育结合, 对照组设置 4 组: Con1, FITC-Q2 (200 nmol/L) 与正常细胞孵育结合; Con2, FITC-ssDNA Library 与 SGIV 感染的细胞孵育结合; Con3, FITC-Q2 (200 nmol/L) 与中华鳖虹彩病毒 STIV 感染的细胞孵育结合; Con4, 未作其它处理的 SGIV 感染的细胞。孵育结合完成后, 将各组样品用 PBS 离心清洗 3 次, 后续的检测步骤参看 1.2.2 节。每个反应均做 3 个重复。

1.2.4 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染细胞的数量灵敏性分析

将 SGIV 感染的细胞稀释至不同的数量: 1×10^6 个/mL, 1×10^5 个/mL, 1×10^4 个/mL, 5×10^3 个/mL, 1×10^3 个/mL; 然后将 FITC-Q2 与 SGIV 感染的细胞在室温结合 30 min。FITC-ssDNA Library 与相应不同数目的 SGIV 感染细胞的孵育结合作为对照 (Lib)。后续具体的检测操作参看 1.2.2 节。每个反应均做 3 个重复。

1.2.5 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的时间灵敏性分析

将 FITC-Q2 与 SGIV 感染的细胞在室温分别结合 60 min, 40 min, 20 min, 10 min, 5 min 和 1 min。FITC-ssDNA Library 与 SGIV 感染的细胞孵育结合相应时长的实验作为对照 (Lib)。后续具体的检测操作参看 1.2.2 节。每个反应均做 3 个重复。

1.2.6 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的稳定性分析

将 FITC-Q2 与 SGIV 感染的细胞分别在冰上 (Ice)、4°C、28°C、37°C 和 50°C 孵育结合。FITC-ssDNA Library 与 SGIV 感染的细胞在相应温度下的孵育结合作为对照。后续具体的检测操作参看 1.2.2 节。每个反应均做 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 Q2-AFMP 及其检测 SGIV 感染的特异性

在先前研究中, 基于前沿的指数富集配基系统进化技术 (SELEX) 筛选获得特异性识别 SGIV 感染的核酸适配体 aptamer Q2, Q2 的序列如表 1 所示^[4]。如图 1 所示, 与对照组中正常细胞相比, 实验组中细胞接入 SGIV 继续培养 48 h 后, 出现明显的细胞病变 (Cytopathic effects, CPEs)。使用 Q2-AFMP 对实

验组中 SGIV 感染细胞进行检测发现, 与 4 组对照组相比, 酶标仪检测结果显示 Q2-AFMP 能够特异性地检测 SGIV 的感染 (图 2)。由此证明, Q2-AFMP 能够用于海水养殖中石斑鱼虹彩病毒病的特异性检测。

表 1 核酸适配体-荧光分子检测探针 (Q2-AFMP) 中核酸适配体 Q2 的核苷酸序列

Table 1 The aptamer sequences of Q2 used in Q2-AFMP

| 核酸适配体 | 核苷酸序列 |
|---------|--|
| Aptamer | Nucleotide sequences |
| Q2 | GACGCTTACTCAGGTGTGACTCGTATGTC-CATGGCCGCATATTGGGAAGGTTGGTTTG-GACTATGTGGAAGTTCGAAGGACGCAGAT-GAAGTCTC |

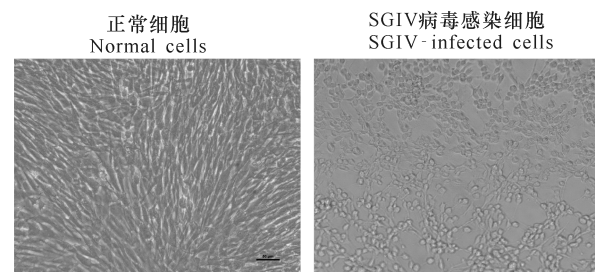
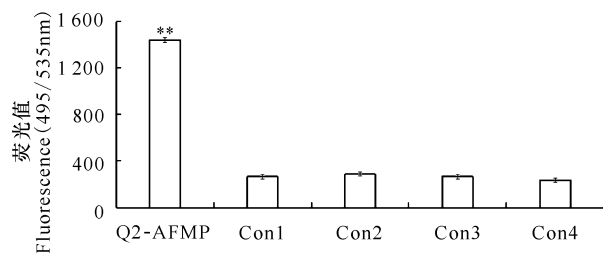


图 1 石斑鱼细胞被虹彩病毒 SGIV 感染前后对比

Fig. 1 The comparison of pre-and post-SGIV-infected GS cells



* $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著

A P value < 0.05 was considered statistically significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图 2 Q2-AFMP 特异性检测 SGIV 感染结果

Fig. 2 The results of Q2-AFMP specifically detected SGIV-infected cells

2.2 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染细胞的数量灵敏性

对照组中 FITC-ssDNA Library 与不同数目的 SGIV 感染细胞结合后的荧光值均很低且没有明显差异, 而使用 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染时, SGIV 感染细胞的数量越多, 实验组中待测样品在 495/535 nm 处的荧光值就越高, 即 Q2-AFMP 能够以数量梯度依赖的方式检测 SGIV 的感染。当 SGIV 感染细胞的数目少至 5×10^3 个/mL 时, Q2-AFMP 仍可灵敏地检测到 SGIV 的感染 (图 3)。

2.3 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的时间灵敏性

与对照组中不同孵育结合时间条件下的荧光检测值均较低且没有明显差异的结果相比, 实验组中使

用 Q2-AFMP 检测 SGIV 的感染时, 孵育结合时间越长, 实验组中待测样品在 495/535 nm 处的荧光值就越高, 即 Q2-AFMP 以孵育结合时长依赖的方式检测 SGIV 的感染。当孵育结合时长短至 1 min 时, Q2-AFMP 仍可灵敏地检测到 SGIV 的感染(图 4)。因此, Q2-AFMP 可以用于石斑鱼养殖中 SGIV 感染的快速检测诊断。

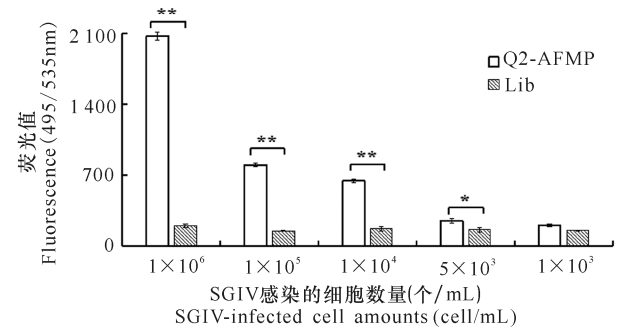


图 3 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染细胞的数量灵敏性
Fig. 3 The sensitivity of Q2-AFMP for SGIV-infected cell amounts

* $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著
A P value < 0.05 was considered statistically significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

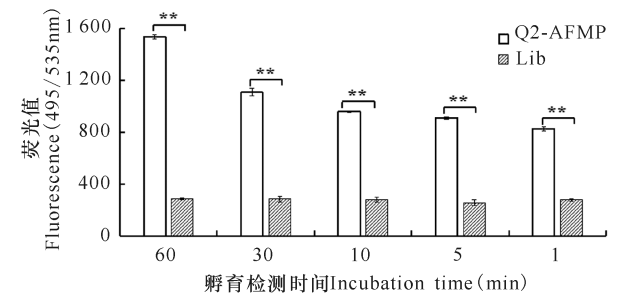


图 4 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染细胞的时间灵敏性
Fig. 4 The time sensitivity of Q2-AFMP for SGIV-infected cells

* $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著
A P value < 0.05 was considered statistically significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.4 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的稳定性

在不同温度的结合条件下, 对照组中不同孵育温度条件下的荧光值均较低且没有明显差异。利用 Q2-AFMP 检测 SGIV 的感染时, 当检测温度为冰上、4℃ 和 28℃ 时, 实验组中待测样品在 495/535 nm 处的荧光值最高, 检测温度升高至 37℃ 时, 酶标仪检测到的荧光值仅有下降。随着温度的升高, 实验组中待测样品的荧光值逐渐降低, 当温度升高至 50℃ 时, Q2-AFMP 仍可准确地检测到 SGIV 的感染, 由此证明新型 Q2-AFMP 具有极高的稳定性(图 5)。

3 讨论

近年来频繁暴发的石斑鱼虹彩病毒重创了我

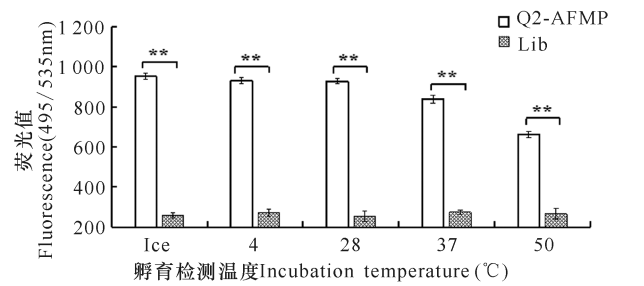


图 5 不同温度下 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染的稳定性分析
Fig. 5 Stability analysis of SGIV infection by Q2-AFMP detection at different temperatures

* $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著
A P value < 0.05 was considered statistically significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

国的石斑鱼养殖业^[5,16]。因此应着力开发海水养殖中针对 SGIV 感染的大批量、快速检测、精确诊断的技术, 以实现在病害感染的早期及时发现病原, 进而采取相应措施来阻止病毒扩散并降低病毒感染鱼体的机率。作为一种新型的分子探针, 核酸适配体具有易筛选获得、易于合成和修饰、高特异性和高亲和性识别并结合靶物质的优良性质^[17-18]。作为传统抗体的替代物, 核酸适配体目前在基础研究、分析检测、临床诊断和新药研发领域等方面均具有广阔的应用前景^[19-20]。

在先前的研究中, 我们以石斑鱼虹彩病毒 SGIV 为研究对象, 以 SGIV 感染的石斑鱼细胞为靶标进行 SELEX 筛选, 获得的核酸适配体不仅可以高特异性的识别虹彩病毒 SGIV 感染的石斑鱼细胞, 还可以识别 SGIV 感染的石斑鱼组织, 这表明筛选得到的核酸适配体具有发展成为高特异性检测分子探针的潜力^[4]。本研究中我们基于核酸适配体(Q2)就石斑鱼虹彩病毒病的快速检测诊断技术进行研究, 开发出一种新型的核酸适配体-荧光分子检测探针(Aptamer Q2-based fluorescent molecular probe, Q2-AFMP), 并对 Q2-AFMP 检测石斑鱼虹彩病毒 SGIV 感染的特异性、灵敏性和稳定性进行了分析。结果发现, Q2-AFMP 用于检测石斑鱼虹彩病毒 SGIV 感染, 不仅特异性很强, 而且灵敏度高, 因此 Q2-AFMP 完全能够满足快速诊断石斑鱼虹彩病毒 SGIV 感染的目的。对 Q2-AFMP 的稳定性进行分析则发现, Q2-AFMP 在冰上、4℃ 和 28℃ 的检测环境中, 其检测效果最好, 当检测环境温度达到 50℃ 时, Q2-AFMP 仍可准确地检测到石斑鱼虹彩病毒 SGIV 的感染, 即新型 Q2-AFMP 用于检测 SGIV 的感染具有极高的稳定性。综上, Q2-AFMP 能够高特异性检测 SGIV 的感染, 并且具有耗时短、灵敏性高、稳定性强等优点, 为丰富和提高各领域的检测技术提供了新方法和新思路, 在石斑鱼虹彩病毒 SGIV 快速检测领域具有极

为广阔的应用前景。

4 结论

本研究基于先前利用 SELEX 技术筛选获得的能够高特异性识别 SGIV 感染的核酸适配体,开发出一种新型的核酸适配体-荧光分子检测探针(Q2-AFMP),并对其特异性、灵敏性和稳定性进行分析。结果显示,Q2-AFMP 能够用于海水养殖中石斑鱼虹彩病毒病的特异性检测,而且 Q2-AFMP 检测 SGIV 感染具有耗时短、灵敏性高、稳定性强等优点。未来研究中,将进一步优化核酸适配体 Q2 的结构以降低 Q2-AFMP 的生产成本,并开发出相应的快速检测试剂盒在海水养殖企业中推广使用,以实现广西海水养殖中石斑鱼虹彩病毒病的快速诊断、实时监控和有效预防。

参考文献:

[1] 刘锡强,马学坤,刘康,等. 华南地区金鲳鱼养殖报告[J]. 当代水产,2014(2):26-29.
LIU X Q, MA X K, LIU K, et al. Reports on the cultured *Trachinotus ovatus* in South China[J]. Current Fisheries, 2014(2):26-29.

[2] QIN Q W, CHANG S F, NGOH G H, et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. Dis Aquat Org, 2003, 53(1):1-9.

[3] LI P F, YAN Y, WEI S N, et al. Isolation and characterization of a new class of DNA aptamers specific binding to Singapore grouper iridovirus (SGIV) with antiviral activities[J]. Virus Research, 2014, 188:146-154.

[4] LI P F, WEI S N, ZHOU L L, et al. Selection and characterization of novel DNA aptamers specifically recognized by Singapore grouper iridovirus-infected fish cells[J]. J Gen Virol, 2015, 96:3348-3359.

[5] LI P F, ZHOU L L, WEI J G, et al. Development and characterization of aptamer-based enzyme-linked aptasorbent assay for the detection of Singapore grouper iridovirus infection[J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(3):634-643.

[6] QIN Q W, GIN K Y H, LEE L Y, et al. Development of a flow cytometry based method for rapid and sensitive detection of a novel marine fish iridovirus in cell culture[J]. J Virol Methods, 2005, 125:49-54.

[7] SHI C J, QIN Q W, GIN K Y H, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to a grouper

iridovirus[J]. J Virol Methods, 2003, 107(2):147-154.

[8] HUANG C H, ZHANG X B, GIN K Y H, et al. In situ hybridization of a marine fish virus, Singapore grouper iridovirus with a nucleic acid probe of major capsid protein[J]. J Virol Methods, 2004, 117:123-128.

[9] MAO X L, ZHOU S, XU D, et al. Rapid and sensitive detection of Singapore grouper iridovirus by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Appl Microbiol, 2008, 105(2):389-397.

[10] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346:818-822.

[11] CHO Y, LEE Y B, LEE J H, et al. Modified AS1411 aptamer suppresses hepatocellular carcinoma by up-regulating galectin-14[J]. PLoS One, 2016, 11(8):E0160822.

[12] KUMAR P K R. Monitoring intact viruses using aptamers[J]. Biosensors (Basel), 2016, 6(3):E40.

[13] ZHOU J H, ROSSI J J. Therapeutic potential of aptamer-siRNA conjugates for treatment of HIV-1[J]. BioDrugs, 2012, 26(6):393-400.

[14] LI P F, WEI S N, ZHOU L L, et al. Selection and characterization of the novel DNA-aptamers specifically recognized Singapore grouper iridovirus (SGIV) infected fish cells[J]. J Gen Virol, 2015, 96(11):3348-3359.

[15] BUNKA D H J, STOCKLEY P G. Aptamers come of age - at last[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(8):588-596.

[16] QIN Q W, LAM T J, SIN Y M, et al. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. J Virol Methods, 2001, 98:17-24.

[17] DUAN N, WU S J, WANG Z P. An aptamer-based fluorescence assay for ochratoxin A[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(3):300-304.

[18] LIANG H R, LIU Q, ZHENG X X, et al. Aptamers targeting rabies virus-infected cells inhibit viral replication both in vitro and in vivo[J]. Virus Research, 2013, 173(2):398-403.

[19] BUMCROT D, MANOHARAN M, KOTELIANSKY V, et al. RNAi therapeutics: A potential new class of pharmaceutical drugs[J]. Nat Chem Bio, 2006, 2(12):711-719.

[20] BUNKA D H J, PLATONOVA O, STOCKLEY P G. Development of aptamer therapeutics[J]. Curr Opin Pharmacol, 2010, 10(5):557-562.

(责任编辑:陆雁)

(上接第 62 页 Continue from page 62)

[23] 田海涛,胡希声,张少峰,等. 茅尾海表层沉积物中重金属污染及潜在生态风险评估[J]. 海洋环境科学, 2014, 33(2):187-191.
TIAN H T, HU X S, ZHANG S F, et al. Distribution and potential ecological risk assessment of heavy metals in surface sediments of Maowei Sea[J]. Marine Environmental Science, 2014, 33(2):187-191.

[24] 吴文成,任露陆,蔡信德,等. 茅尾海沉积物重金属空间分布特征与生态风险[J]. 环境科学研究, 2014, 27(2):147-156.
WU W C, REN L L, CAI X D, et al. Spatial pattern and ecological risk of heavy metals in sediments from Maowei Sea, Southern China[J]. Research of Environmental Sciences, 2014, 27(2):147-156.

(责任编辑:陆雁)